

ÖZET

Kanser biyolojisinin moleküler temeli ve gelişim risk faktörlerine yönelik araştırmalar kanserin tanı ve prognozu hakkında genetik, epigenetik ve hücreysel boyutlarda aydınlatıcı ilerlemeler sağlamaktadır. Bu durum geliştirilen terapötik stratejilerin hedefe yönelik odaklanmasına ve kişiye özel alternatif ve etkin ajanların ortaya çıkmasına fırsat tanımaktadır. Diyet kaynaklarından ve bitkilerden elde edilen çeşitli özütler ve küçük sentetik analoglarının DNA onarımı, hücre döngüsü modülasyonu, protein katlanması ve sentezi, apoptoz, anti-inflamatuar aktiviteler gibi önemli hücreysel ve moleküler mekanizmalara dahil oldukları bilinmektedir. Bu araştırmada, epibrassinolidin kanser hücrelerinde interaksiyon partnerlerinin in silico araştırılması ve bu partnerlerle ilişkili hücre ölüm mekanizmalarının in vitro incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ilk olarak, bitki metabolizması ve stres yönetiminin aktif steroid fitohormonu olan 24-Epibrassinolidin (EBR), tümör biyolojisi ile ilişkili seçili otuzbeş fonksiyonel hedef proteinine karşı, *in silico* reseptör-ligand moleküler kenetlenme yaklaşımı ile skorlama fonksiyonları hesaplanmıştır. AutoDock Tools-1.5.7 yazılımı ile yürütülen analizler sonucunda, EBR ligandı için retinoik asit nükleer reseptör RAR γ hedefinin -14.78 kcal/mol bağlanma enerjisi (BE) ile en kararlı interaksiyon partneri olarak belirlenmiştir. Ayrıca, RAR γ ve altı selektif agonisti bileşiklerle ikinci raund simülasyon analizleri en düşük BE skorunu EBR için belirlemiştir. Kompütasyonel verilerin doğrulanması ve EBR'nin hücre içi biyolojik süreçlerdeki moleküler hedeflerinin tanımlanması amacıyla, hücre canlılığı, sitotoksisite, koloni oluşumu ve hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonu ile bağlantılı *in vitro* moleküler analizler tasarlanmıştır. Üç farklı kanser tiplerine ait MDA-MB-231 meme, MIApaca-2 pankreas ve HEP-G2 hepatöselüler karsinoma doğal tip hücre soylarında, doza ve zamana bağlı EBR uygulanma sonrasında nükleer hormon reseptör (NHR) anlatımları, apoptotik, ER stres ve Hippo-YAP/TAZ sinyalizasyonları ile ilişkili etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, EBR uygulamanın doza ve zamana bağlı NHR, ER stres ve hippo aktivatör markerlerin çoğunda anlamlı ifade değişikliğine yol açtığını, özellikle ER stres aracılı esansiyel biyobelirteçlerinin proteomik profil değişimine doğrudan bağlantılı olarak mitokondriyel hücre ölümünü teşvik ettiğini göstermiştir. Özetle, bu araştırmada, 24-epibrassinolidin hormon reseptör duyarlı/duyarsız tümör hücrelerindeki proliferasyon, ER stres yönetimi ve metastaz üzerinde ket vurucu etkileri ile alternatif terapötik stratejilerin geliştirilmesinde umut verici potansiyeli taşıdığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Hücre ölümü, Moleküler modelleme, doğal terapötik, Epibrassinolid

ABSTRACT

Research on the molecular fundamentals and promoting risk factors of cancer biology has provided promising improvements for the diagnosis and prognosis of cancer at the genetic, epigenetic, and cellular levels. This situation leads to the specific target-based therapeutic strategies and the development of the customized optional effective agents. It is well-known that various phytoextracts and micro synthetic analogs occurring from diet sources and herbs are involved in fundamental cellular and molecular mechanisms: DNA repair, cell cycle modulation, and protein folding-synthesis, apoptosis, and inflammatory activities. The objective of this study was to in silico investigate the interacting partners of epibrassinolide in cancer cells and in vitro evaluate the cell death mechanisms associated with these partners. In this manner, 24-Epibrassinolide (EBR) scoring functions, an active steroid phytohormone in the plant metabolism and stress modulation, were initially calculated against the selected 35 functional target proteins to tumor biology using in-silico receptor-ligand molecular docking. Subsequently, the retinoic acid nuclear receptor RAR γ was determined to be the most stable interacting partner with binding energy (BE) value of -14.78 kcal/mole via the performed analyses by AutoDock Tools-1.5.7 software. Furthermore, the secondary simulation analyses obtained the lowest BE score for EBR among RAR γ and six selective agonistic compounds. Following that, in vitro molecular tests, including cell survival, cytotoxicity, colony formation, and activation of cell death signaling pathways, were conducted to test the reliability of the findings derived from computational studies and define the molecular targets of EBR within the intracellular biological pathways. Finally, after dose and time-dependent EBR-intervention for three different cancer cells, including MDA-MB-231 breast, MIApaca-2 pancreas, we evaluated HEP-G2 hepatocellular carcinoma wild types, the expression levels of the proteins linked to nuclear hormone receptor (NHR) expressions, apoptosis, ER stress, and Hipp-YAP/TAZ signaling pathways. According to the findings, we found that the EBR application caused remarkable and significant changes of expression depending on both dose and time, particularly enhanced mitochondrial cell death directly depending on the proteomic profile change of the ER stress-mediated essential biomarkers. In summary, we concluded that 24-epibrassinolide had inhibitory impacts on the proliferation in hormone-receptor sensitive/insensitive tumor cells, ER stress modulation, and metastasis, as well as the promising potential for the development of alternative therapeutic strategies.

Key Words: Cancer, Cell death, Molecular modelling, Natural therapeutic, Epibrassinolide