

T.C.  
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK  
ANABİLİM DALI

DEMİR ŞELATLAYICI SALİSİLİDEN ASİLHİDRAZİD  
GRUBU SENTETİK BİLEŞİKLERİN KANSERLİ  
HÜCRELERİN PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİNİN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE  
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜLEYMAN ARZIMAN

ARALIK 2019

MUĞLA

**T.C.**  
**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK**  
**ANABİLİM DALI**

**DEMİR ŞELATLAYICI SALİSİLİDEN ASİLHİDRAZİD**  
**GRUBU SENTETİK BİLEŞİKLERİN KANSERLİ**  
**HÜCRELERİN PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ**  
**ETKİSİNİN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE**  
**İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SÜLEYMAN ARZIMAN**

**ARALIK 2019**

**MUĞLA**

# MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

## Fen Bilimleri Enstitüsü

### TEZ ONAYI

SÜLEYMAN ARZIMAN tarafından hazırlanan DEMİR ŞELATLAYICI SALİSİLİDEN AZİLHİDRAZİD GRUBU SENTETİK BİLEŞİKLERİN KANSERLİ HÜCRELERİN PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNCELEMESİ başlıklı tezinin, 20/11/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oy birliği ile kabul edilmiştir

#### TEZ SINAV JURİSİ

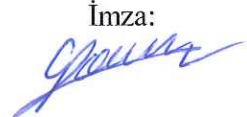
Doç. Dr. Reşat Ünal  
Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:  


Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül YILDIZ  
Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

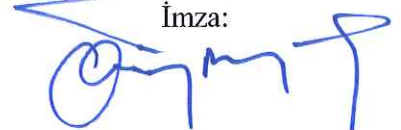
İmza:  


Doç. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,  
Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

İmza:  


#### ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Ömür Baysal  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:  


Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül YILDIZ  
Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

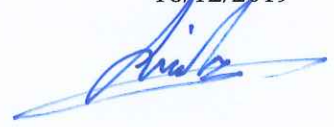
İmza:  


Savunma Tarihi: 18/12/2019

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Süleyman Arzıman

18/12/2019



## ÖZET

### DEMİR ŞELATLAYICI SALİSİLİDEN ASİLHİDRAZİD GRUBU SENTETİK BİLEŞİKLERİN KANSERLİ HÜCRELERİN PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

SÜLEYMAN ARZIMAN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül YILDIZ

Aralık 2019, 51 sayfa

Demir; hücre çoğalması, metabolizması ve büyümesi için gerekli olan temel bir elementtir. Mitokondriyel enzimlerin, katalitik ve katalaz gibi detoksifiye edici yönleri için hayati önem taşır. Aynı zamanda demir, redoks döngüsü ve serbest radikal oluşumunda yer alma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle hücre için demir hem esastır hem de potansiyel olarak toksiktir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda demirin tümör mikro çevresinde ve metastazında da rolü olduğu gösterilmiştir. Demir edinimi, akışı, depolanması ve düzenlenmesi yollarının tümü kanserin oluşumuyla yakından ilişkilidir, bu da demir metabolizmasının yeniden programlanmasının tümör hücresi sağkalımının merkezi bir yönü olduğunu gösterir. Demirin metabolik yollarını hedeflemek, kanser prognozu ve tedavisi için yeni araçlar sağlayabilir. Bu nedenle bu tez çalışmasında demir şelatlayıcı özellikleriyle bilinen salisiliden asilhidrazid sentetik grubundan ME0055 ve ME0192 bileşikleri kullanılarak kanserli SH-SY5Y (nöroblastoma hücre hattı) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Demir şelatlayıcı bileşiklerin genel olarak hücre içinde demiri hedef alarak tümör gelişimi ve metastazda adı sıklıkla geçen ve hücre siklusunu yöneten siklin, CDK gibi moleküller üzerinde, ayrıca PI3K/AKT ve ERK/MAPK gibi sinyal yolları üzerinde etkili oldukları bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada ME0055 ve ME0192 demir şelatlayıcı bileşiklerinin hücrelerin canlılığına ve proliferasyon hızına olan etkisi hem

ERK/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları üzerinden, hem de bu iki sinyal yolunun iletişimde rolü olması kuvvetle muhtemel olan mitotik Speedy/RINGO proteini üzerinden, ayrıca apoptotik bir belirteç olan aktif kaspaz-3 miktarının ölçülmesi ile araştırılmıştır. Bu iki bileşiğin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için  $10 \times 10^5$  hücreye MTT analizi yapılarak yarı-maximal inhibitör konsantrasyon (IC50) için uygun doz  $50 \mu\text{M}$  olacak şekilde belirlenmiştir. Daha sonra hücrelerden total protein izolasyonu sonucunda western blotlama yapılarak kullanılan demir şelatlayıcıların hücrelerin proliferasyon hızına olan etkisi hem ERK/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları üzerinden, hem de bu iki sinyal yolunun iletişimde rolü olması muhtemel mitotik Speedy/RINGO proteini ekspresyonu üzerinden kontrol hücrelerine kıyasla incelenmiştir. Hücre siklus regülatörü olan Speedy/RINGO seviyesinde gözlemlenen düşüşle beraber PI3K/AKT yolağındaki fosforilasyon seviyesinin, dolayısıyla bu yolağın aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Bu durum ME0055 ve ME0192 demir şelatlayıcılarının  $\text{Fe}^{+2}$  ile etkileşime girerek AKT sinyal yolunun inhibitör proteini olan PTEN aktivitesinde artışa sebep olması, ya da PI3K'ın PIP3 ile etkileşime girmesini engellemesinden kaynaklı olabileceği gibi ERK/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları üzerinde regülatör etkisi bulunan Speedy/RINGO ekspresyonunu düşürmesinden kaynaklı olabileceği de akla gelmektedir. ERK/MAPK yolağındaki verilerde ise bileşiklerin etkisinin daha düşük seviyede olduğu gözlemlense de sonuçların istatistiksel olarak anlamlı oluşu göze çarpmaktadır. Son olarak kaspaz-3 aktivitesine bakıldığında ise bileşiklerin (ME0055 ve ME0192) sırasıyla kanserli SH-SY5Y hücrelerinde %90, %175 oranında arttığı saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen çıktılar kanserleşmede önemli rolü olan ERK/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları ve bunların kesişiminde yer alarak kanserleşmeyi tetiklediği düşünülen Speedy/RINGO proteininin regülasyonunda rol oynayan demir metabolizması bozuklukları gibi temel nedenlerin anlaşılmasına ve bu şekilde sentetik olan demir şelatlayıcıların terapötik amaçlı kullanım için geliştirilmesine ışık tutacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Salisiliden Asilhidrazitler, Nöroblastoma Kanseri, ME0055, Speedy/RINGO, ME0192, p-AKT, MAPK, Kaspaz-3

## **ABSTRACT**

### **ANAKYSIS OF THE EFFECT OF IRON CHELATING SALICYLIDENE AZILIDRAZI GROUP SYNTHETIC COMPOUNDS ON PROLIFERATION OF CANCER CELLS IN NEUROBLASTOMA CELLS**

SÜLEYMAN ARZIMAN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ayşegül YILDIZ

December 2019, 51 pages

Iron; It is an essential element necessary for cell proliferation, metabolism and growth. It is vital for detoxifying aspects of mitochondrial enzymes, such as catalytic and catalase. It is also capable of taking part in the redox cycle and free radical formation. Thus, iron is both essential and potentially toxic to the cell. Recent studies have shown that iron has a role in tumor microenvironment and metastasis. All of the ways of iron uptake, flow, storage and regulation are closely related to the occurrence of cancer, indicating that reprogramming iron metabolism is a central aspect of tumor cell survival. Targeting the metabolic pathways of iron may provide new tools for cancer prognosis and treatment. Therefore, in this thesis, the effects of ME0055 and ME0192 from salicylidene acylhydrazide synthetic group known on iron chelating properties on cancer SH-SY5Y (neuroblastoma cell line) were investigated. Iron chelating compounds are generally known to act on molecules in the cell cycle, such as cyclin, CDK, often referred to in tumor growth and metastasis, targeting iron within the cell, as well as signaling pathways such as PI3K / AKT and ERK / MAPK. Therefore, in this study, the effect of ME0055 and ME0192 iron chelating compounds on cell viability and proliferation rate of both the ERK / MAPK and PI3K / AKT signaling pathways, as well as mitotic Speedy / RINGO protein, which are likely to have a role in the communication of these two signaling pathways, are also apoptotic active caspase-3, which is a marker. In order to understand the effect of these two compounds

on cell viability, MTT analysis was performed to  $10 \times 10^5$  cells and the appropriate dose for the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was determined as 50  $\mu$ M. The effect of the iron chelators on the proliferation rate of the cells by Western blotting as a result of total protein isolation from the cells was compared to the control cells by means of both ERK / MAPK and PI3K / AKT signaling pathways and mitotic Speedy / RINGO protein expression, which is likely to have a role in the communication of these two signaling pathways. It was investigated. The decrease in the level of phosphorylation in the PI3K / AKT pathway, and thus the activity of this pathway, was observed with the decrease observed in the cell cycle regulator Speedy / RINGO level. This may be due to the activation of the chelators of ME0055 and ME0192 by Fe<sup>+2</sup>, causing an increase in the inhibitory protein PTEN activity of the AKT signaling pathway, or preventing PI3K from interfering with PIP3, as well as regulating effect on ERK / MAPK and PI3K / AKT signaling pathways. It is also possible that Speedy / RINGO may be caused by lowering expression. The data on the ERK / MAPK pathway showed that the effect of the compounds was lower, but the results were statistically significant. Finally, when the caspase-3 activity was examined, it was found that the compounds (ME0055 and ME0192) increased 90% and 175% in cancerous SH-SY5Y cells, respectively. The results of this study will shed light on the understanding of the underlying causes such as MAPK and Akt signaling pathways, which play an important role in cancer, and the iron metabolism disorders involved in the regulation of the Speedy / RINGO protein, which is thought to trigger cancer, and to develop the synthetic iron chelators for therapeutic use.

**Keywords:** Neuroblastoma Cancer, Salicylidene Acylhydrazide, ME0055, Speedy/RINGO, ME0192, p-AKT, MAPK, Caspase-3





*Sevgili Aileme*

## ÖNSÖZ

Bu çalışma 17/023 numaralı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Ofisi (BAP) Araştırma ARGE projesi tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışma süresince değerli bilgilerini bizlerle paylaşan, saygıdeğer danışman hocam; Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül YILDIZ' a, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Seren Küçükvardar' a ve Yeşim Kaya'ya sonsuz ederim.

İstanbul Teknik Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Arzu Karabay Korkmaz' a ve Gebze Teknik Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Uygur Halis Tazebay'a deneylerimizin devamı için laboratuvarlarının kapılarını açtıkları için teşekkür ederim. Ayrıca Umeå Üniversitesi Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Mikael Elofsson'a ekibinin sentezlemiş olduğu demir şelatlayıcıları (ME0055 ve ME0192) bizimle paylaştığı ve çalışmanın başlatılabilmesini sağladığı için teşekkür etmek isterim.

Çalışmalarında kullandığım SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı için Ege Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Emin İlker Medine'ye ayrıca teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmamın her aşamasında sabırla beni destekleyen aileme minnettar olduğumu belirtmek isterim.

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ix</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Demir Metabolizmasının Kansere İlişkisi .....	1
1.2. Demir Metabolizması .....	1
1.3. Kanser hücrelerinde değişmiş demir metabolizması .....	2
1.3.1. Demir alımı .....	4
1.3.2. Demir akışı .....	4
1.3.3. Demir depolama .....	5
1.4. Demir Şelatörleri .....	5
1.5. Salisiliden asilhidrazid (SA) .....	7
1.6. Demir şelatörleri tarafından hücre sel sinyal yolu modülasyonu .....	7
1.6.1. Hücre döngüsü .....	7
1.6.2. Ribonükleotid redüktaz .....	8
1.6.3. Siklin ve CDK'lar .....	8
1.6.4. p 53.....	9
1.6.5. CDK inhibitörleri .....	9
1.6.6. c-myc.....	10
1.6.7.Speedy/RINGO .....	10
1.6.8. PI3K-PKB/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) sinyal yolağı.....	11
1.6.9. PI3K ve aktivasyon mekanizması .....	13
1.6.10. Ras / Raf / MEK / ERK ilişkisi .....	15
1.7. Çalışmanın amacı .....	17
<b>2. MALZEMELER VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>19</b>
2.1. Malzemeler .....	19
2.1.1. Ekipmanlar .....	19
2.1.2. Kimyasallar ve enzimler .....	20
2.1.3. Ticari kitler.....	21
2.1.4. Tamponlar ve solüsyonlar .....	21

2.1.4.1. <i>IX</i> yükleme boyası (SDS-PAGE için).....	21
2.1.4.2. SDS-PAGE için stacking buffer pH 6.8 0.5 M .....	22
2.1.4.3. SDS-PAGE için separatin buffer pH 8.8 1.5M.....	22
2.1.4.4. SDS running buffer.....	22
2.1.4.5. Tris buffered saline (TBS) .....	22
2.1.4.6. Tris buffered saline-tween20 (TBST) .....	22
2.1.4.7. Towbin buffer .....	22
2.1.4.8. Wesstern Blotlama'da bloklama solüsyonu .....	23
2.1.4.9. Primer ve sekonder antikorların hazırlanması .....	23
2.2. Yöntemler .....	23
2.2.1. Kanserli SH-SY5Y hücre hattının büyütülmesi.....	23
2.2.2. Salisiliden asilhidrazid grubu sentetiklerin hazırlanması .....	24
2.2.3. Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyonun (IC50) belirlenmesi .....	24
2.2.4. Protein izolasyonu.....	24
2.2.5. Protein miktar analizi.....	25
2.3. Western blotlama.....	26
2.3.1. Antikor Uygulaması ve Kemilüminesans Tayini.....	26
2.3.2. Bütünleyici piksel analizi ve istatistiksel analizler .....	27
<b>3. BULGULAR VE İRDELEME .....</b>	<b>28</b>
3.1. Bulgular .....	28
3.1.1. Farklı salisiliden asilhidrazid grubu sentetiklerin kanserli SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri .....	28
3.1.2. ME0055 ve ME0192 bileşikleri ile demirin şelatlanması sonrası PI3K/AKT yolağında Akt (Thr 308) fosforilasyonunun incelenmesi .....	31
3.1.3. ME0055 ve ME0192 bileşikleri ile demirin şelatlanması sonrası PI3K/AKT yolağında Akt (Ser473) fosforilasyonunun incelenmesi .....	32
3.1.4. Demir şelatlanması sonrası MEK1/2 protein ekspresyonunun analizi .....	33
3.2. Speedy / RINGO protein ekspresyon analizi.....	34
3.3. Kaspaz-3 aktivitesi .....	35
3.4. İrdeleme .....	36
<b>4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>40</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>50</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ekipmanlar .....	19
Çizelge 2.2. Kimyasallar ve Enzimler.....	20
Çizelge 2.3. Ticari Kitler.....	21
Çizelge 2.4. Qubit protein miktar tayini .....	25
Çizelge 2.5. Protein konsantrasyonu .....	25
Çizelge 2.6. SDS-PAGE için yüklenecek protein örnekleri .....	26



## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. Hücresel demir metabolizması. Demir atomunun iki atomu dolaşımında bulunan transferrin (Tf) proteinlerine Tf'in demir doymuş formunu (holo-Tf) oluşturur. İki holo-Tf molekülü daha sonra hücre zarında eksprese edilen transferrin reseptörü 1'e (TfR1) bağlanabilir. Tf-TfR1 kompleksi endositoza maruz kalır ve Tf bağlı ferrik demirin salınımını ve prostat 3 altıtransmembran epitel antijeni (STEAP3) ile ferröz forma indirgenmesini indükleyerek endozom içine alınır. Demir daha sonra iki değerli metal taşıyıcı 1 (DMT1) vasıtasıyla sitozol içinde serbest demir havuzuna salınır, burada: (i) ribonükleotit redüktaz gibi aktif protein bölgelerine dahil edilir; (ii) stoplazmik ferritin olarak depolanır; (iii) mitokondri tarafından alınabili; ve (iv) demir akış pompası ferroportin 1 (Fpn1) vasıtasıyla hücreden ihraç edilmiştir. Demir eksikliğinden oluşan Tf (apo-Tf) ve TfR1 molekülleri daha sonra geri dönüştürülür ve hücre yüzeyine geri döndürülür. B. Kanserde tedavisinde kullanılan temel şelatörlerin kimyasal yapısı (Goldie vd., 2015). ..... 3
- Şekil 1.2. Demir şelasyonu, hücre döngüsünün çoklu düzenleyicilerinin modülü (Goldie vd., 2015). ..... 9
- Şekil 1.3. DNA hasar yanıtlarının düzenlenmesinde Spy 1/Ringo'nun rolü (Randy vd., 2007) Ringo'nun DNA hasarına cevap olarak CDK'ları düzenlemedeki ve dolayısıyla hücre döngüsünün ilelemesini, apoptoz veya DNA onarımını kontrol eder ..... 11
- Şekil 1.4. PI3K-Akt yolunun sinyalleşme modeli (Osaki vd., 2004): Büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinazına (RTK) veya G protein-bağlı reseptörlerine (GPCR) bağlanması, p85 VE p110 alt birimlerinden oluşan fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3K) fosforilasyonunu uyarır. PI3K, fosfoinositol-4,5 bisfosfonatı (PI (4,5) P2), PI (3,4,5) P3'e dönüştürken, PTEN (kromozom 10 üzerinden silinen fosforaz ve tensin homoloğu) bu reaksiyonu tersine çevirir. Akt hücre zarına yerleştirir ve PH alanı vasıtasıyla PI (3,4,5) P3 ile etkileşime girer, fosfolinositide bağlı kinaz (PDK1), PDK2 ve integrin-bağlı kinaz (ILK) ile fosforile edilir. .... 12
- Şekil 1.5. AKT proteini izformları (Gizeh vd., 2014) N-terminal ucunda PH domainleri, orta kısımda yarı fosforilasyonun gerçekleştiği threonin rezidülerinin yer aldığı kinase domaini ve C-terminal ucunda ile son fosforilasyonun gerçekleştirdiği serin rezidülerinin yer aldığı hidrofobik motif görülür. † meme kanserinde bildirilen somatik mutasyonları göstermektedir. .... 14

Şekil 1.6. Demir şelasyonu, mitojen aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyalleşmesinin modülü (Rybak, P. 2014).....	16
Şekil 3.1. $10 \times 10^5$ Kanserli SH-SY5Y hücre içeren kontrol grubunun X10 Mikroskop Görüntüsü .....	29
Şekil 3.2. $50 \mu\text{M}$ 'lık ME0055 bileşik dozu uygulanan kanserli SH-SY5Y hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki görüntüsü.....	30
Şekil 3.3. $50 \mu\text{M}$ 'lık ME0192 bileşik dozu uygulanan kanserli SH-SY5Y hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki sitotoksik etkisi .....	30
Şekil 3.4. Akt (Thr308) için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada Akt (Thr308) için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki p-Akt Thr 308 protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil eder. *** $p < 0.001$ . .....	31
Şekil 3.5. p-Akt Ser473 için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada p-Akt Ser473 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki p-Akt Ser473 protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil eder. *** $p < 0.001$ . .....	32
Şekil 3.6 MEK1/2/ için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada MEK1/2 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SHSY5Y nöroblastoma hücrelerindeki MEK1/2 seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil eder. * $p < 0.001$ .....	33
Şekil 3.7. Speedy/RINGO için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada speedy/RINGO için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SHSY5Y nöroblastoma hücrelerindeki speedy/RINGO protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil eder. * $p < 0.001$ .....	34
Şekil 3.8. Kaspaz-3 aktivitesi için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada Kaspaz-3 aktivitesi için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki Kaspaz-3 aktivitesi seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil eder. * $p < 0.001$ .....	35

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
M	Molar
V	Volt
A	Amper
g	Gram
$\mu\text{g}$	Mikrogram
ng	Nanogram
lt	Litre
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
cm	Santimetre
$\text{cm}^2$	Santimetrekare
mm	Milimetre
NO	Nitrit Oksit
O <sub>2</sub>	Oksijen
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
HCl	Hidrojen klorür
NaCl	Sodyum klorür
Cl <sup>-</sup>	Klorür
dH <sub>2</sub> O	Distile su



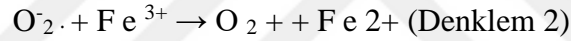
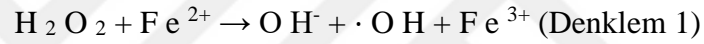
SD	Standart sapma
UV	Ultraviyole
TfR1	Transferrin receptor 1
DFO	Desferrioxamine
EXJADE	Defarasirox
Tf	Transferrin
DMT1	Divalent metal transporter 1
Fpn1	Ferroportin 1
STEAP3	Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3
RR	Ribonucleotide reductase
IRP	Iron-regulatory proteins
MMP1	Matrix metalloproteinase-1
T3SS	Type three secretion system
pH	Power of hydrogen
Rcf (g)	Relative centrifugal force
Ser	Serin
Thr	Treonin
DNA	Deoksiribonükleik asit
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
Akt (PKB)	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PKA	Protein kinase A
p-Akt	Phospho-Akt
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
RTK	Receptor tyrosine kinase
PH	Pleckstrin homology domain
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PDK1	Phosphoinositide dependent protein kinase 1
PDK2	Phosphoinositide dependent protein kinase 2
mTOR	Mammalian target of rapamycin
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 beta
BAD Bcl-2	associated death promoter
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
ERK	Extracellular signal regulated kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
SOS	Son of sevenless
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
PLD2	Phospholipase D2
MKP	MAP kinase phosphatase
RasGEF	Ras guanine nucleotide exchange factor
RasGAP	Ras GTPase-activating protein
RINGO	Rapid inducer of G2/M progression in oocytes
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2jmm

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Demir Metabolizmasının Kansere İlişkisi

Vücuttaki aşırı demir, redoks döngüsüne girme kabiliyeti ve serbest radikal oluşumunu desteklemesi nedeniyle toksiktir (Kalinowski vd., 2005). Fenton reaksiyonu yoluyla demir, hidrojen peroksit üretiminin sonuçlarını şiddetlendirebilir ve biyolojik sistemlerdeki en reaktif kimyasal tür olan hidroksil radikallerinin oluşmasına yol açabilir (Denklem 1) (Barnham vd., 2004; Bergeron vd., 2003). Süperoksit iyonu ayrıca Fenton reaksiyonu için gerekli olan rejenere demir oluşumuna da katılabilir (Denklem 2) (Winterbourn, 1995).



Bu serbest radikaller, DNA oksidasyonuna, mitokondriyal hasara ve membran lipidlerinin peroksidasyonuna yol açan bir dizi kimyasal reaksiyona neden olabilir, böylece DNA hasarını başlatır, hücre döngüsünün ilerlemesini olumsuz yönde etkiler ve hücre apoptosisini teşvik eder (Barnham vd., 2004). Bu nedenle, demir seviyelerinin vücutta özel proteinler ve demirin çözülebilir ve toksik olmayan bir biçimde taşınmasından ve depolanmasından sorumlu prosesler vasıtasıyla sıkı bir şekilde düzenlenmesi çok önemlidir (Richardson vd., 1997). Vücutta demir homeostazını sürdürmemek, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabetes mellitus, enfeksiyonlar ve nöro-dejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalık durumuyla ilişkilidir (Merlot vd., 2013).

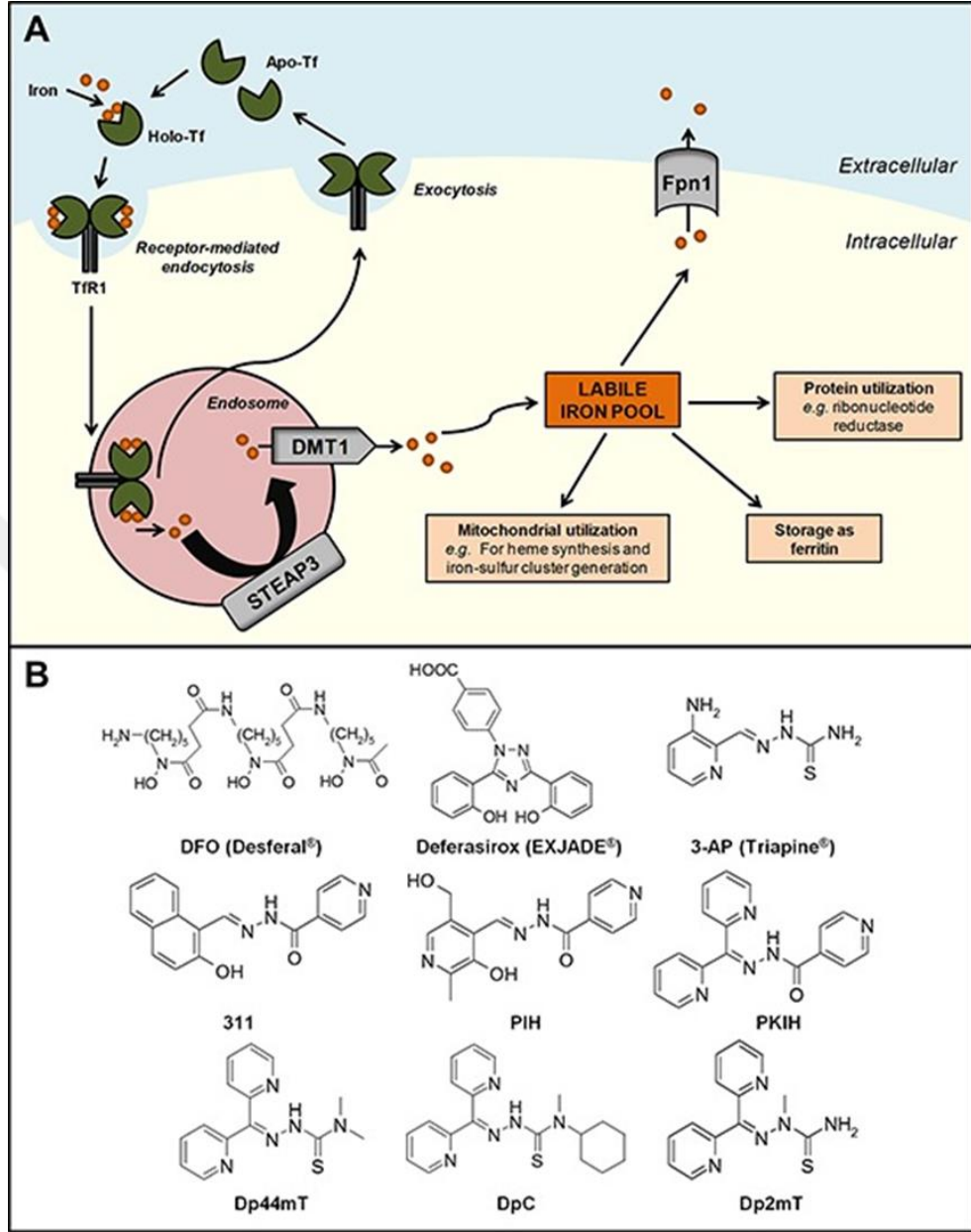
## 1.2. Demir Metabolizması

Diyet kaynaklarından gelen demir ince bağırsakta emilir ve daha sonra duodenal enterositlerden kana aktarılır, burada demir bağlayıcı protein olan transferrine bağlanır (Richardson vd., 1997; Lane vd., 2015). Transferrin, fizyolojik sıvılarda bulunur ve

her transferrin molekülü, iki ferrik demir atomunu yüksek afinite ile bağlayabilir (Morgan, 1981; Crichton, 2009). Transferrin, bağlı demirin emilim bölgelerinden ve hem de bozulmadan (*yani*, bağırsak ve karaciğerden) eritropoez ve ferritin içinde depolanma gibi kritik fonksiyonlar için hücrelere taşınmasında kritik bir rol oynar. Plazma membranında bulunan transferrin reseptörü 1 (TfR1) proteini, hücreler tarafından demir alımını kolaylaştırmak için iki transferrin molekülünü bağlayabilir (Richardson vd., 1997; Morgan, 1981; Hanover vd., 1995). Transferrin-TfR1 kompleksi daha sonra endozom içine alınır, burada ferrik demir, asidik ortam nedeniyle transferinden salınır Tf-TfR1 kompleksi endositoza maruz kalır ve Tf bağlı ferrik demirin salınımını ve prostat 3 altı transmembran epitel antijeni (STEAP3) ile ferröz forma indirgenmesini indükleyerek endozom içine alınır. (Şekil 1.1A). Demir, daha sonra endosomal membran boyunca, iki değerli metal taşıyıcı 1 (DMT1) vasıtasıyla sitozol içerisine salınabilir (Fleming vd., 1998). Hücresel demir, çoklu homeostatik işlemlerde kullanılır. Örneğin, şunlar olabilir: (i) ribonükleotit redüktaz (RR) gibi proteinlerin aktif bölgelerine dahil edilmiş; (ii) sitoplazmik ferritinde depolanır; (iii) heme sentezi, demir-sülfür küme üretimi veya mitokondriyal ferritinde depolanması için mitokondriye dağıtılmış; veya (iv) demir akış pompası ferroportin 1 (Şekil 1.1A) aracılığıyla hücreden ihraç edilir (Merlot vd., 2013; Richardson vd., 2010). Demir homeostazı, en azından kısmen, hücre içi demir konsantrasyonlarına cevap veren ve transkripsiyon sonrası seviyede protein ekspresyonunu kontrol eden ve böylece demirin alımını, kullanımını ve depolanmasını düzenleyen demir düzenleyici proteinler (IRP'ler) ile sağlanır.

### **1.3. Kanser hücrelerinde değişmiş demir metabolizması**

Kanser hücrelerinde demir homeostazının normal hücrelere göre deregülasyonu yaygın olarak bildirilmiştir (Merlot vd., 2013; Eisenstein vd., 1998). Malignitelerdeki bu değişmiş demir halleri, hızlı çoğalmalarına aracılık etmek için kanser hücreleri tarafından artan bir demir edinme fenotipi kazandırabilen demir alımı, akışı ve depolanmasındaki değişikliklerle ortaya çıkabilir (Merlot vd., 2013; Torti vd., 2013)



**Şekil 1.1. Hücresel demir metabolizması.** Demir atomunun iki atomu dolaşımda bulunan transferrin (Tf) proteinlerine Tf'in demir doymuş formunu (holo-Tf) oluşturur. İki holo-Tf molekülü daha sonra hücre zarında eksprese edilen transferrin reseptörü 1'e (TfR1) bağlanabilir. Tf-TfR1 kompleksi endositoza maruz kalır ve Tf bağlı ferrik demirin salınımını ve prostat 3 altıtransmembran epitel antijeni (STEAP3) ile ferröz forma indirgenmesini indükleyerek endozom içine alır. Demir daha sonra iki değerli metal taşıyıcı 1 (DMT1) vasıtasıyla sitozol içinde serbest demir havuzuna salınır, burada: (i) ribonükleotit redüktaz gibi aktif protein bölgelerine dahil edilir; (ii) stoplazmik ferritin olarak depolanır; (iii) mitokondri tarafından alınabilir; ve (iv) demir akış pompası ferroportin 1 (Fpn1) vasıyasıyla hücreden ihraç edilmiştir. Demir eksikliğinden oluşan Tf (apo-Tf) ve TfR1 molekülleri daha sonra geri dönüştürülür ve hücre yüzeyine geri döndürülür. **B. Kanser tedavisinde kullanılan temel şelatörlerin kimyasal yapısı (Goldie vd., 2015).**

### 1.3.1. Demir alımı

Çok sayıda çalışma, kanser hücrelerinin normal hücelere göre daha yüksek TfR1 seviyelerine sahip olduğunu ve daha yüksek TfR1 ekspresyonunun daha gelişmiş kanserler ile korele olduğunu göstermiştir (Merlot vd., 2013; Walker vd., 1986; Soyer vd., 1987). Bu, kanser hücrelerinde görülen transferrinden daha yüksek oranda demir alımını yansıtmaktadır (Richardson vd., 1990). Ayrıca, TfR1'e karşı antikorların tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Taetle vd., 1986). DNA sentezi için gerekli olan hız sınırlayıcı enzim, montajı ve aktivitesi için sürekli bir demir kaynağı gerektirir ve ayrıca kanserde de düzenlenir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde proliferasyon ve DNA sentezi oranları normal hücelere göre artmıştır (Jiang vd., 2010). Demir alımı, eritroid hücrelerinde transferine bağlı endozomal ferrik demiri ferröz formuna indirgeyebilen endozomal metalloredüktaz, STEAP3 ile de kolaylaştırılır (Ohgami vd., 2005). Aslında, STEAP'ın prostat, kolorektal, akciğer ve pankreas kanserlerinde aşırı eksprese edildiği, kanser ile bağlantılı olabilecek değişmiş demir metabolizmasının başka bir yönünün gösterdiği bildirilmiştir (Hubert vd., 1999; Isobe vd., 2011).

### 1.3.2. Demir akışı

Çalışmalar, demir akış pompası Fpn1'in ekspresyonunun meme kanseri, prostat kanseri, hepatoselüler karsinom ve lösemide azaldığını veya bulunmadığını, ancak bu değişikliklerin beyin veya özofagus kanserlerinde görülmediğini bildirmiştir (Jiang vd., 2010; Rhodes vd., 2007). Pinnix ve diğ. (Pinnix vd., 2010), Fpn1 seviyelerindeki azalmanın, internalizasyonu ve bozulmasını teşvik ederek Fpn1 ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen peptid hormonu, hepcidin seviyelerinin artmasıyla birlikte gerçekleştiğini belirtti (Nemeth vd., 2004). Ayrıca, meme kanseri hastalarında azalmış Fpn1 ekspresyonu, diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak zayıf prognoz ve metastaz ile korele idi ve bu hastalık için onkogenik sinyalleşmede Fpn1 hepcidin düzenleyici ekseni için potansiyel olarak önemli rollere işaret eden prognostik bir belirteç olarak önerildi.

Hücrelerdeki demir, sinyal molekülü, nitrik oksit (NO) 'nın etkisiyle de salınabilir (Hibbs vd., 1984; Hibbs vd., 1998). İlginçtir ki, NO demiri doğrudan bağlayabilir ve çeşitli hücre içi proteinleri ve metabolik yolları etkileyebilir (Moncada vd., 1991;

Richardson vd., 1995). Ayrıca, hücre içi olarak (indüklenebilir nitrik oksit sentaz; iNOS) veya hücre dışı üretilen NO'nun hücrelerden demirin serbest salınımına neden olduğu gösterilmiştir (Watts vd., 2001; Lok vd., 2012). Aslında, yukarıda tarif edilen Fpn1'in aracılık ettiği hücrel demir salıverme mekanizmasının aksine, NO-bağımlı demir salıvermenin çok-ilaca dirençli protein 1 (MRP1) aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (Lok vd., 2012; Watts vd., 2006).

### **1.3.3. Demir depolama**

Literatürdeki çalışmalarda demir depolanmasının düzenlenmesinin tümörlerde değiştiğini göstermektedir (Merlot vd., 2013). Ferritin ekspresyon seviyelerinin kanser hücrelerinde ve hasta dokularında değerlendirilmesi, bazılarında ferritinin yukarı regülasyonunu rapor ederken (Milman vd., 2002), bazılarında ise ferritinin aşağı regülasyonu olduğunu gösteren, çelişkili sonuçlara ulaşılmaktadır (Merlot vd., 2013; Pinnix vd., 2010). Primer akciğer kanseri, ileri evre C kolorektal kanseri ve nöroblastoma hastalarında yükselmiş serum ferritin düzeyleri, hepsi kötü sağkalım oranları veya prognozları ile körele olduğu görülmüştür (Hann vd., 1985). İlginç bir şekilde, ferritin ekspresyonunun, insan malignitelerinde sıklıkla ekspresyonu artmış olan c-myc proto-onkogen, DNA sentezi ve hücre büyümesi için serbest demir kullanılabilirliğinin artmasına izin veren c-myc tarafından azaldığı bildirildi. Bu nedenle, ferritin seviyelerindeki sapmalar, tümör ilerlemesini kolaylaştırabilir. Kanserdeki bu demir metabolizması değişiklikleri demir bağlama ligandlarının terapötik manipülasyon potansiyelini göstermektedir. Son on yılda, bu, anti-tümör aktivitesi olan demir şelatörlerinin keşfedilmesine ve gelişmesine yol açmıştır (Merlot vd., 2013).

### **1.4. Demir Şelatörleri**

Desferrioksamın (DFO) veya Desferal®, Streptomyces pilosus bakterisinden izole edilmiş bir heksadentat şelatördür (Aouad vd., 2002) (Şekil 1.1 B). Demir şelatlama terapisi ilk olarak  $\beta$ -talassemia gibi demir yüklenme hastalıklarında toksik demir yüklenmesini engellemek için kullanılmaya başlandı (Ceci vd., 2003). Kanser tedavisinde demir şelatlayıcıların potansiyeli ise ilk defa kültürdeki lösemi hücreleri

ve lösemi hastaları üzerinde Desferrioxamine (DFO) ve diğer demir şelatlayıcılarının etkilerinin denenmesi ile gösterildi (Kontoghiorghes vd., 1986; Estrov vd., 1987). Bu çalışmayı nöroblastoma tümör hücrelerinde yapılan çalışmalar takip etti (Blatt vd., 1987; Blatt vd., 1988). Fakat, DFO'nun rapor edilen anti-tumor aktivitesi bazı çalışmalarda bu etkinin gösterilememesi gibi tutarsızlıklar göstermekteydi (Blatt, 1994; Selig vd., 1998). Bu sonuca sebep olan durum muhtemelen kullanılan demir şelatlayıcıların kısa bir yarı ömüre ve zayıf membran geçirgenliğine sahip olmaları idi (Aouad vd., 2002; Richardson vd., 1994).

Bu sorunu çözmek üzere daha sonra birçok sentetik demir şelatlayıcı dizayn edilerek daha etkili, daha az toksik ve daha az yan etkileri olan bileşikler üretme yoluna gidildi (Kalinowski vd., 2005). Yakın zamanda sentezlenen ve demir yüklenme sorunu olan hastalarda klinik çalışmaları başarıyla gerçekleştirilen demir şelatlayıcı 4-[3, 5-bis-(hydroxyphenyl)-1, 2, 4-triazol-1-yl]-benzoic acid (deferasirox), Novartis tarafından EXJADE® ismiyle  $\beta$ -thalassemia hastalığında DFO'ya alternatif olarak kullanılmak üzere piyasaya sunulmuştur (Cappellini vd., 2009).

Son yıllarda deferasirox gibi demir şelatlayıcıların potansiyel bir anti-tumor ajan olarak kullanımına ilgi oldukça artmış bulunmaktadır (Cappellini vd., 2009). Deferasirox' un hepatoma, miyeloid lösemi ve mantolu hücre lenfoması gibi kanserlerde büyümeyi inhibe edici etkisi rapor edilmiştir (Ohyashiki vd., 2009; Chantrel-Groussard vd., 2006). Ayrıca son olarak deferasirox'un DMS-53 akciğer kanseri ve OE33, OE19, ve OE21 isimli özofageal kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu da gösterilmiştir (Lui vd., 2013; Ford vd., 2013). İlginç olan bir çalışmada ise kemoterapiye direnç gösteren bir akut monositik lösemi hastasına deferasirox uygulaması yapıldığında bunun kuvvetli bir anti- lösemik etki yarattığı ve sonuçta hastalığın tamamen iyileştiği gösterilmiştir (Fukushima vd., 2011). Sonuç olarak bu çalışmalar demir şelatlayıcıların kemoterapi için kuvvetli bir alternatif olabileceğini fakat daha ileri seviyede çalışmalarla bu etkinin onaylanması gerektiğini göstermektedir.



## 1.5. Salisiliden asilhidrazid (SA)

Salisiliden asilhidrazidler Tip 3 salgı sistemini (T3SS) bloklamak üzere üretilmiş sentetik bir moleküldür. Bu moleküller Gram negatif bakterilerdeki efektör proteinlerin konak hücre içerisine geçmesini engellemek amacıyla flagella çıkıntısı şeklindeki (enjektöre benzer) yapının oluşmasını engellemek amacıyla üretilmiştir. Slopenkin ve ark. tarafından SA bileşiklerinin gen düzeyinde regülasyona sahip olması üzerindeki önerileriyle başlayan araştırmalar sonucunda SA bileşiklerinin hücrel demir depolarını bozabildiğini gösteren sonuçlara ulaşılmıştır. Çalışma, *C. trachomatis* ile enfekte olan HeLa hücrelerine demir tuzları eklenmesi SA bileşiğinin etkisini tersine çevirdiğini göstermiştir ve asilhidrazon parçasının  $Fe^{+2}$  iyonları ile seçici bir afinitesi olduğuna işaret etti. Layton ve ark. Demir tuzlarının eklenmesinin, SA bileşiğinin etkisini sadece kısmen tersine çevirdiğini göstermiştir. Bu yargıya transkriptomik analiz sonucunda demir düzenlemede yer alan genlerin yukarı doğru düzenlendiğini ortaya çıkardı; Bununla birlikte, bu çalışmada hücre kültürüne eklenen demir ilavesi SA bileşiklerinin engelleyici etkisini tam olarak tersine çevirmedi. SA bileşikleri ve ilave demir tuzları ile muamele edilmiş EHEC üzerinde yapılan başka bir transkriptomik analiz, T3SS ile ilgili genlerin önemli bir aşağı regülasyonunu göstermiştir; bu nedenle, demirin SA bileşiğinin aktivitesini tersine çevirmediğini öne sürdü. (Tree vd., 2009) Kısacası SA birleşiklerinin hücre içi demir şelatlama özelliği ve demir regülasyonundaki genler üzerindeki etkisi olduğu düşünülmektedir.

## 1.6. Demir şelatörleri tarafından hücrel sinyal yolu modülasyonu

### 1.6.1. Hücre döngüsü

Şelatörlerin anti-proliferatif etkilerinin, sadece demiri bağlama yeteneklerinden değil, aynı zamanda çoklu hücre içi hedefler üzerindeki karmaşık etkilerinden kaynaklandığı açıktır. Demir şelatörlerinin, RR, siklinler, sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler), retinoblastoma proteini (Rb), p53, p21 WAF1 / CIP1, p27 KIP1, N-myc akış aşağı yönünde düzenlenen gen 1 (NDRG1) ve apoptotik proteinler dahil hücre döngüsünün ilerlemesini düzenlemede kritik olan çoklu molekülleri hedef aldığı bilinmektedir. (Gao vd., 2001; Yu vd., 2007).

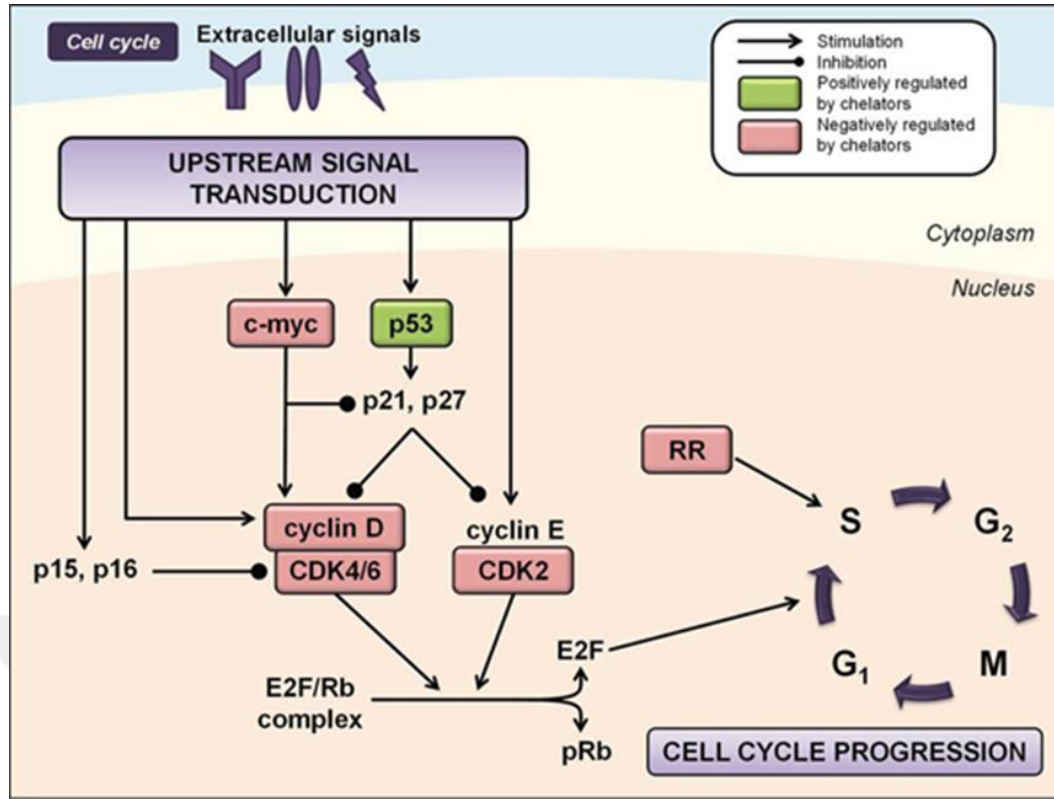
### 1.6.2. Ribonükleotid redüktaz

RR, DNA replikasyonu için gerekli deoksiribonükleotitlerin sentezini, DNA sentezinin hız sınırlayıcı aşamasını, hücre döngüsünün ilerlemesini ve hücre sel onarımı katalize etmekten sorumlu bir enzimdir (Thelander vd., 1979). İnsan RR'si iki homodimerden, (yani allosterik modülatörler için aktif bölgeyi ve bağlama bölgesini içeren) R1'i ve enzimatik aktivite için hayati önem taşıyan monomer başına bir dinükleer demir merkezi ve stabil tirosil radikalini içeren R2'yi içerir (Jordan vd., 1998). Ayrıca, R2 alt birimi, hücre döngüsünün S / G2 fazı sırasında normal DNA sentezi için gerekli iken, R2 alt ünitesinin bir varyantı, p53R2 alt ünitesinin, p53-bağımlı bir şekilde DNA hasarını takiben DNA onarımı için dNTP'leri sağladığı bilinmektedir.

G0 / G1 faz hücrelerinde (Tanaka vd., 2000). Hem R2 hem de p53R2 alt birimleri, enzimatik fonksiyonları için kritik olan bir demir bağlama bölgesine sahiptir ve demir şelasyonunun, RR'nin aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (Nyholm vd., 1993). Artan RR aktivitesinin malign transformasyon ve kanser hücresi büyümesi ile ilişkili olduğu göz önüne alındığında (Tsimberidou vd., 2002), demir şelatörlerinin aktivitesini inhibe edebilme yeteneğinin kanser karşıtı etkileri için önemli olması muhtemeldir (Şekil 1.2).

### 1.6.3. Siklin ve CDK'lar

Şelatörler tarafından yapılan demir tükenmesinin bir dizi siklin ve CDK'nın ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir (Gao vd., 2001). SK-N-MC nöroepitelyalom hücrelerinde demir şelasyonu, siklin D1, D2 ve D3 ekspresyonunu ve daha az oranda siklin A ve B'yi azalttığı gözlemlenmiştir (Gao vd., 2001). Siklin D1 ekspresyonunun DFO ve DpT şelatçıları tarafından inhibisyonu, prostat ve pankreas kanseri hücrelerinde, DMS-53 akciğer karsinomu hücrelerinde ve manto hücreli lenfoma hücrelerinde deferasiroksla gösterilmiştir (Vazana-Barad vd., 2013). Bu son çalışmada deferasiroksun aracılık ettiği fosforile Rb'nin aşağı regülasyonunun olduğunu bundan kaynaklı olarakta E2F/Rb kompleksinin ve G1/S faz hücre miktarının arttığını bulunmuştur. Çalışmalar ayrıca demir şelatörlerinin CDK2 veya CDK4'ün ekspresyonunu azaltabildiğini göstermiştir, ancak bu hücre tipine bağlı bir şekilde ortaya çıkmaktadır ve farklı deney koşulları altında değişmektedir (Chaston vd., 2003; Gao vd., 2001; Kulp vd., 1996) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Demir şelasyonu, hücre döngüsünün çoklu düzenleyicilerinin modülü (Goldie vd., 2015).

#### 1.6.4. p 53

DFO kullanılarak yapılan demir şelasyonunun transkripsiyon sonrası seviyedeki tümör baskılayıcı p53'ün ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Fukuchi vd., 1995). Önemli olarak, p53, G 1 / S kontrol noktasında kritik bir role sahiptir ve hasar onarımı yapılamıyorsa onarım mekanizmalarını başlatmak veya apoptozu indüklemek için hücre stresi veya DNA hasarı koşullarında aktive edilir (Kastan vd., 1995). Hücrelerin şelatörler, DFO ve 311 ile muamele edilmesi sonucunda nükleer p53 proteini ve p53 DNA-bağlama aktivitesinin arttırdığı görülmüştür (Şekil 1.2) (Shen vd., 2014).

#### 1.6.5. CDK inhibitörleri

CDK inhibitörü, p21 WAF1 / CIP1, G1 / S fazı CDK-siklin komplekslerine bağlanarak hücre döngüsünü negatif olarak düzenler ve bunları inaktif hale getirir (Alberts vd., 2008). Bu, Rb'nin E2F1'i bağlamasına izin verir, böylece G 1 / S faz geçişini önler ve hücre döngüsü durmasına neden olur. MCF-7 göğüs adenokarsinom hücrelerinde DFO ve 311 kullanılarak yapılan demir şelasyonunun, p21 WAF1 / CIP1 proteininin

ekspresyonunu azaltırken, p21 mRNA'yı yukarı düzenlediği göstermiştir (Fu vd., 2007).

### **1.6.6. c-myc**

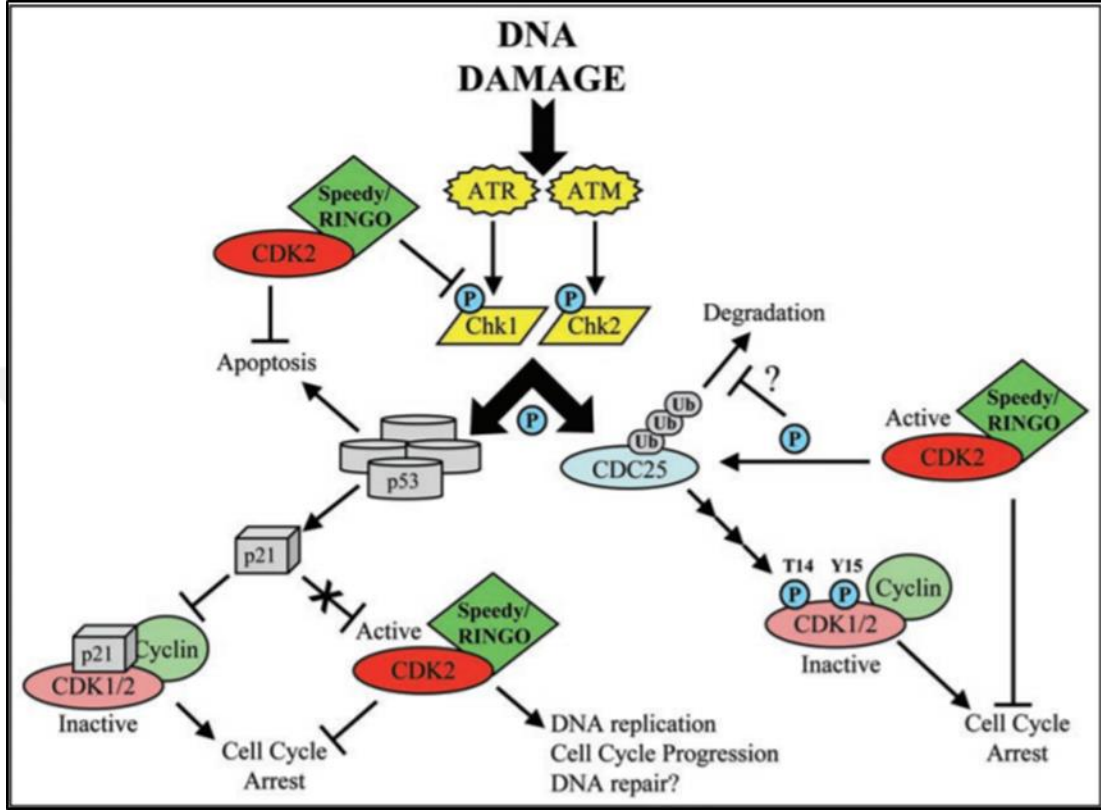
Her ne kadar hücre döngüsünün klasik düzenleyicileri olmasa da, Myc proteinleri, hücrelerin hücre döngüsüne girmesini sağlama ve hücre döngüsü ilerlemesini hızlandırma üzerinde derin etkilere sahiptir (Tansey, 2014). Myc, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Wnt ve sinyal transdüseri ve transkripsiyon (STAT) yolaklarının aktivatörü dahil olmak üzere çoklu sinyal iletim yollarının "kavşağında" bulunur (Kiuchi vd., 1999; Dang, 2012). Aslında, c-myc proto-onkojen ekspresyonunun indüksiyonu, mitojenik sinyallere güçlü bir hücre döngüsü yanıtı için gereklidir (de Alboran vd., 2001). Bu olasılık, siklin D / CDK4- 6 aktivitesini pozitif olarak düzenleme ve p21 WAF1/CIP1'in transkripsiyonunu baskılama kabiliyeti sayesinde ortaya çıkar (Mateyak vd., 1999; Gartel vd., 2001). DFO kullanılarak yapılan demir şelasyonunun lösemik kan hücrelerinde c-myc ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Kyriakou vd., 1998). Ayrıca, şelatörlerin, DFO, Dp44mT ve DpC'nin yakın zamanda pankreas ve prostat kanseri hücrelerinde c-myc seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (Şekil 1.2) (Lui vd., 2015). Bu ajanların aracılık ettiği mekanizma, STAT3 yolunun inhibe edilmesini ve daha sonra, siklin D1, c-myc ve Bcl-2 dahil olmak üzere aşağı yöndeki hedeflerinin regüle edilebildiği görülmüştür.

### **1.6.7. Speedy/RINGO**

Siklus regülatörlerinden oldukça farklı bir başka hücre siklus proteini olan ise ilk kez *Xenopus* oositlerinde varlığı gösterilen Speedy/RINGO olup, hücre siklusunun ilerleyişinde CDK2 aktivitesini ve G1-S fazı geçişini kontrol etmektedir. Bu fonksiyonunu yerine getirirken klasik siklinler gibi CDK2' nin fosforlanmasına ihtiyaç duymadığı gibi, p21Cip1 and p27Kip1 gibi inhibitör regülatörler tarafından fosforilasyonla inhibisyona karşı da fazla duyarlı değildir (Porter vd., 2003). Speedy/RINGO-CDK2 kompleksinin p27Kip1 inhibitörünün CDK2 ile etkileşmesini engelleyerek CDK2 aktivasyonuna ve buna bağlı olarak p27Kip1 inhibitörünün fosforlanarak degradasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Porter vd., 2003) (Şekil 1.3). Bu sayede de Speedy/RINGO hücre siklusundaki DNA hasar kontrol noktaları dahil

birçok kontrol noktasını aşarak, bu özelliğiyle kanser hücrelerinde aşırı miktarda eksprese olarak onları apoptozdan kaçırıp hücre bölünmesini devam ettirici, yani onkogenik fonksiyonu ile bilinmektedir (Gastwirt vd., 2006).

Bu hücre siklus regülatörünün ayrıca MAPK ve AKT sinyal yollarının arasında var



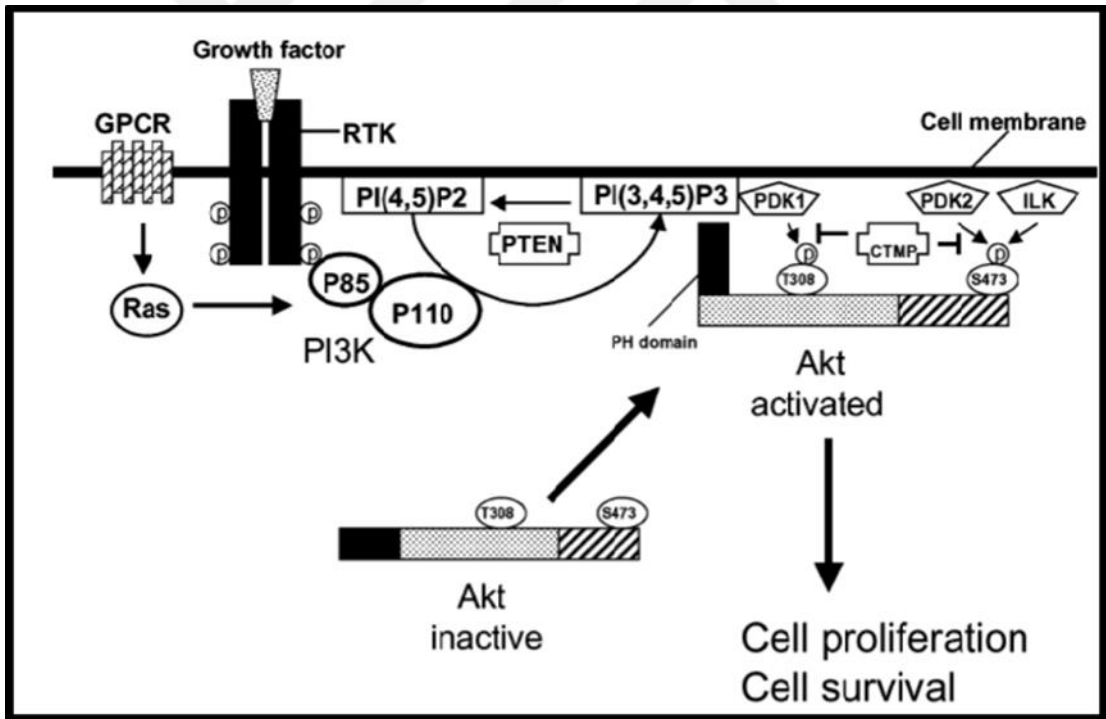
Şekil 1.3. DNA hasar yanıtlarının düzenlenmesinde Spy 1/Ringo'nun rolü (Randy vd., 2007) Ringo'nun DNA hasarına cevap olarak CDK'ları düzenlemedeki ve dolayısıyla hücre döngüsünün ilemesini, apoptoz veya DNA onarımını kontrol eder

olan ve kanserleşmede oldukça önemli rolü olan iletişim ve etkileşimleri üzerinde de etkisi olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle anti-kanser terapiler için oldukça yüksek potansiyelli ve uygun bir moleküler hedef olarak görülen Speedy/RINGO' nun ekspresyonu üzerinde demir homeostazının ve demir şelatlayıcılarının etkisinin incelenmesi önem arz etmektedir.

#### 1.6.8. PI3K-PKB/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) sinyal yolağı

Fosfoinositol-3-kinaz- protein kinaz B / Akt (PI3K-PKB/Akt) yolunun ve aktive edici reseptör tirozin kinazlarının (RTK'ların) belirlenmesi, 1980'lerin başında; insülin reseptör sinyalini karakterize etmek için yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Bu

çalışmalar, insülin reseptör substratı (IRS) proteinleri yoluyla, PI3K'ya sinyal veren bileşenlerin ve insülin reseptör mekanizmasının tanımlanmasına ve bunun sonucunda 3-fosfoinositol bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) tarafından PKB / Akt aracılı aktivasyonuna yol açtı. PI3K ve PKB/Akt aktivasyonunun tümörigeneze olan güçlü katkısının keşfedilmesiyle, bu yolun düzenlenmesi üzerine yapılan yoğun araştırmalar, negatif düzenleyicilerin, protein fosfataz 2'nin (PP2A) ve tensin homologunun (PTEN) keşfedilmesine yol açmıştır. Ayrıca PH-domeni lösin-zengin-tekrar-içeren protein fosfatazların (PHLPP1/2) ilişkisinin açığa kavuşmasını sağlamıştır. Daha sonraki zamanlarda, PKB/Akt'ta C- terminal domainin de hidrofobik motif içerdiğinin bulunması, mTOR kompleksi 2 (mTORC2) ve DNA'ya bağlı protein kinaz (DNA-PK) ile ilişkilendirilmesi, rapamisinin memeli hedefi (mTOR), Ras'ın PI3K-PKB/Akt yolunu PI3K üzerinden etkileme kabiliyeti olduğu gösterilmiş ve böylece mevcut PI3K-PKB/Akt sinyal yolağında etkisi olan proteinlerin, ilişki ağı oluşturulmuştur (Şekil 1.4).



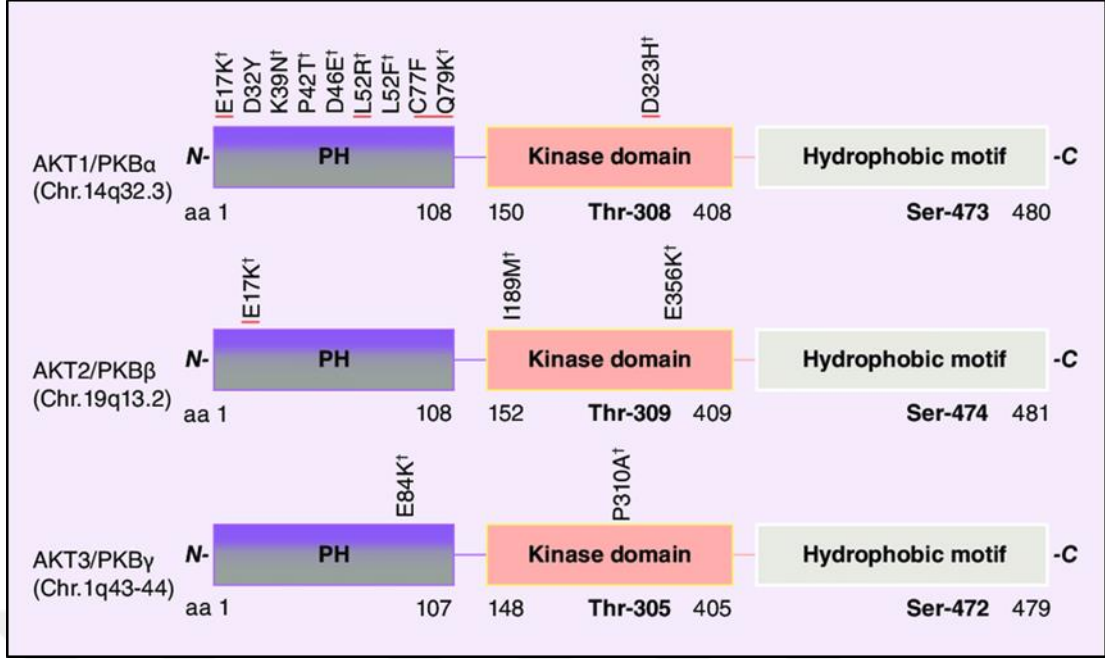
**Şekil 1.4. PI3K-Akt yolunun sinyalleşme modeli (Osaki vd., 2004):** Büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinazına (RTK) veya G protein-bağlı reseptörlerine (GPCR) bağlanması, p85 VE p110 alt birimlerinden oluşan fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3K) fosforilasyonunu uyarır. PI3K, fosfoinositol-4,5 bisfosfonatı (PI (4,5) P2), PI (3,4,5) P3'e dönüştürken, PTEN (kromozom 10 üzerinden silinen fosforaz ve tensin homologu) bu reaksiyonu tersine çevirir. Akt hücre zarına yerleştirir ve PH alanı vasıtasıyla PI (3,4,5) P3 ile etkileşime girer, fosfolinositide bağlı kinaz (PDK1), PDK2 ve integrin-bağlı kinaz (ILK) ile fosforile edilir.

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) -Akt sinyal yolu; transkripsiyon, translasyon, büyüme, hayatta kalma ve proliferasyonda yer alıp hücre fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan elzem bir proteindir ve bu protein birçok hücre uyararı tarafından veya toksik insülin tarafından aktive edilir.

PI3K-Akt yolunun rahatsız edici bir aktivasyonu, kanser, diabet ve otoimmünite gibi hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle, PI3KAkt sinyallemesinin insan kanserlerinde sıklıkla bozulduğu gösterilmiştir. Kanser gelişimi ve ilerlemesi, hücre çoğalması ve hayatta kalma (apoptozdan kaçış) arasındaki dengede bir rahatsızlığın sonucudur. Aslında, PI3K-Akt sinyali bu olayların her ikisiyle de ilişkilidir ve sadece tümör büyümesinde değil aynı zamanda bir tümörün kanser tedavisine potansiyel tepkisinde de büyük rol oynar.

#### **1.6.9. PI3K ve aktivasyon mekanizması**

PI3K, PI (4, 5) P2 inositol halkasının 3' pozisyonunun fosforilasyonundan, hayatta kalma sinyali için gereken güçlü bir ikinci haberci ve insülin hareketi için PI (3, 4, 5) P3'ün üretilmesinden sorumludur. Şekil 1'de gösterildiği gibi, PI3K'lar, katalitik bir alt birimden (P110) ve protein tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler (Gn reseptör Tirozin Kinaz, RTK) ve G- couple protein reseptörü (GPCR) tarafından aktive edilen bir adaptör / düzenleyici alt birimden (P85) oluşan heterodimerlerdir. Aktive edilmiş PI3K, plazma membran lipid PI (4,5) P2'yi PI (3,4,5) P3'e saniyeler içinde dönüştürür. PI (3,4,5) P3 domainlerinin, yani FYVE (Fenilalanin-Tirozin-Valin-Glutamik asit) ve pleksstrin homoloji (PH) alanlarının etkileşmesi sonucunda PI3K aktif hale gelerek membrana bağlanır. Bu alanı içeren proteinler, PI3K kaynaklı sinyal için kritik mediatörleri temsil eder. PH alanları, birçok proteinde bulunan yaklaşık 100 amino asidin globüler protein alanlarıdır. Akt'deki PH alanının Serin / treonin kinaz 3-fosfoinositol bağımlı kinaz 1 (PDK1) ile etkileşime girerek Thr308'i fosforlanması sağlayarak ve Akt'nin yarı aktif forma ulaştırır. Yarı aktif hale gelen Akt'nin C-terminal domaininde yer alan ser473 bölgesinin ise PDK2 ile fosforlanmasıyla Akt proteini tam anlamıyla aktivasyonu sağlanır. Aktif formuna ulaşan Akt proteini hücre proliferasyonunu ve hücrenin hayatsal faaliyetlerinde görev alan diğer hücre içi kaskatın aktifleşmesini sağlayarak hücre homeostezisinin sağlanmasının yanında apoptozun baskılanmasını sağlayan sinyallerinde oluşumunda yer alabilir (Luo vd., 2003).



**Şekil 1.5. AKT proteini izoformları (Gizeh vd., 2014)** N-terminal ucunda PH domainleri, orta kısımda yarı fosforilasyonun gerçekleştiği threonin rezidülerinin yer aldığı kinase domaini ve C-terminal ucunda ile son fosforilasyonun gerçekleştirdiği serin rezidülerinin yer aldığı hidrofobik motif görülür. † meme kanserinde bildirilen somatik mutasyonları göstermektedir.

AKT, cAMP'ye bağımlı, cGMP'ye bağımlı ve protein kinaz C familyası (AGC) serin / treonin protein kinaz ailesine aittir ve AKT kinaz domeninin ilk kristal yapısı 2002 yılında rapor edilmiştir. Akt proteini 57 kD olup ilk olarak farelerde bir lösemiden sorumlu olduğu bilinen viral onkoprotein v-Akt'ın hücrel homologudur bu yüzden c-Akt veya Akt olarak adlandırılır. Ayrıca PKB (Protein kinaz B) ya da RAC (protein kinaz A veya C ile ilişkili) olarak da adlandırılır, çünkü birkaç çalışma v-Akt ve c-Akt'ın protein kinaz C'ye (PKC) ve protein kinaz A (PKA)'ya benzer bir protein kodladığını gösterdi. Akt/PKB'nin keşfi memelilerde yapılan cDNA keşfine dayanmaktadır. Genom çalışmaları sırasında Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ), Akt3 (PKB $\gamma$ ) izoformlarının kodyalan 3 genin varlığının ortaya çıkarılmasına dayanır. Akt2 ve Akt3, sırasıyla Akt1 ile sırasıyla %82 ve %83 yüksek sekans homolojisine sahiptir ve bir N-terminali pleckstrin homoloji (PH) domeni, merkezi bir kinaz domeni içeren benzer bir alan yapısına sahiptirler ve bir C-terminal düzenleyici hidrofobik motifleri bulunur (Şekil 1.5). Üç insan AKT izoformu, sırasıyla 14q32 (AKT1), 19q13 (AKT2) ve 1q44'te (AKT3) bulunan ayrı genlerle kodlanır (Luo vd., 2003). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, demir şelatörlerinin, anti-tümör aktivitelerinin bir parçası olarak prostat kanserinde PI3K/AKT/PTEN yolunu nasıl hedeflediğini açıklamıştır (Dixon vd., 2013). Prostat epitel hücrelerinin ve DU145 prostat kanseri hücre hattının DFO



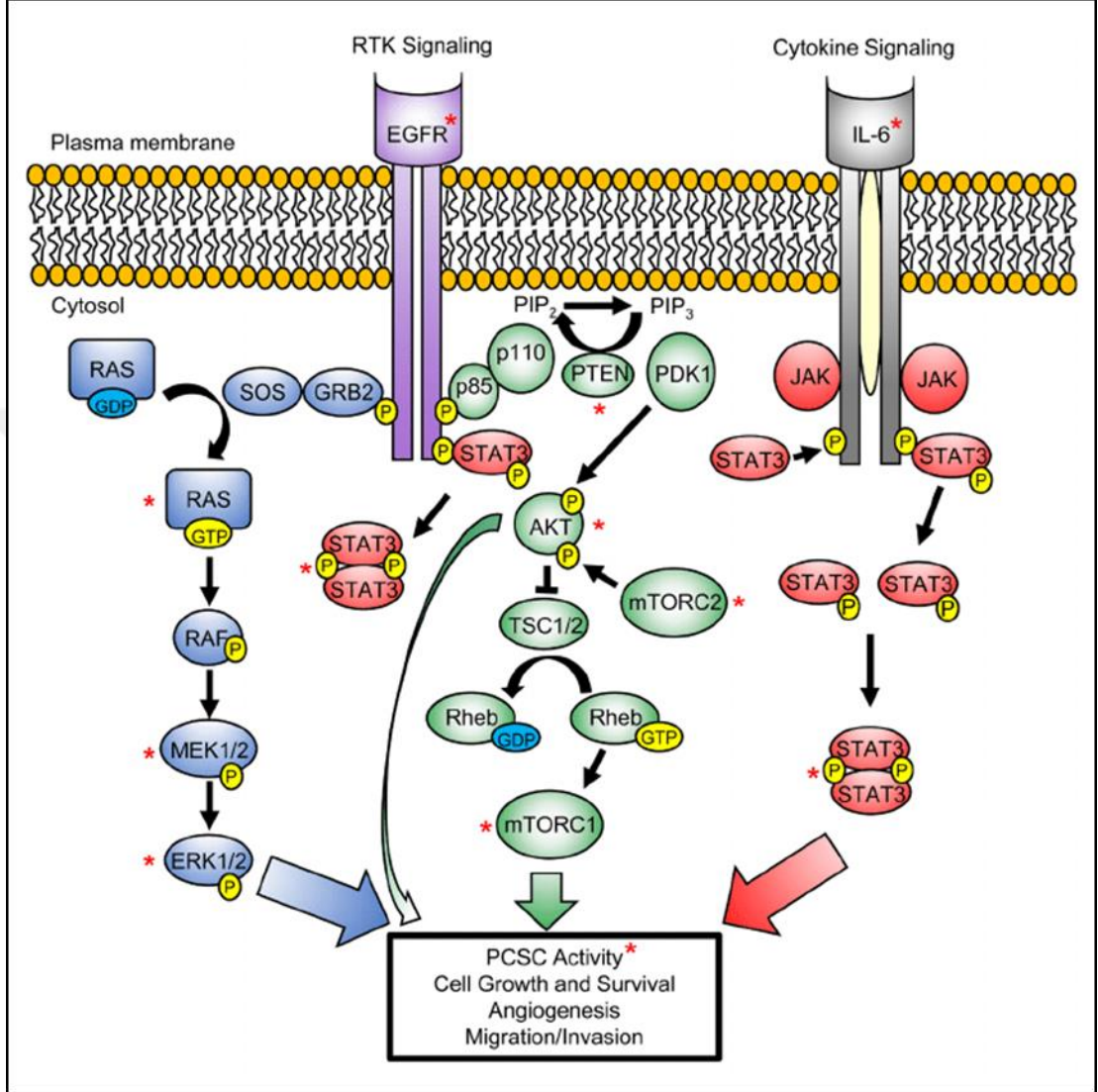
veya Dp44mT ile inkübasyonu, tümör baskılayıcı PTEN ve anti-metastatik NDRG1 ekspresyonunu arttırmıştır. Dahası, NDRG1 aşırı ekspresyonu onkojenik p-AKT aktivitesini hafifletmiş ve PTEN düzeylerini anlamlı şekilde arttırdığı göstermiştir. NDRG1 aracılı p-AKT inhibisyonu, inhibe edilmiş PTEN PC3 hücrelerinde de gözlenmiş bu etkinin PTEN'den bağımsız olarak oluştuğunu düşündüren sonuçlara ulaşılmıştır (Liu vd., 2012).

MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde, NDRG1 aşırı ekspresyonu ayrıca PTEN düzeylerini arttırmış ve p-AKT ve p-mTOR seviyelerini düşürmüştür (Kovacevic vd., 2013). Ayrıca, PI3K düzenleyici alt birimlerin ifadesi, fosfo-p85a ve fosfo-p55γ, NDRG1 aşırı ekspresyonu ile önemli ölçüde azaldı; bu, PI3K p110α / β katalitik alt ünitesinin kompleks oluşumunu önler. MIAPaCa-2 ve diğer pankreas kanseri hücre hatlarında NDRG1'i belirgin bir şekilde düzenleyen tiyosemikarbazonlar, Dp44mT ve DpC'nin (Liu vd., 2012), bu NDRG1'in, bu kritik moleküllerin modülasyonu yoluyla pankreas kanserinde gösterdiği anti-tümör aktivitesine aracılık edebileceğini göstermektedir.

#### **1.6.10. Ras / Raf / MEK / ERK İlişkisi**

Memeli hücreleri dört ana MAPK protein kinaz kaskadına sahiptir. Bunlar, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından tipik olarak aktive edilen Ras/Raf/MEK/ERK yolunu ve çevresel stres ile aktive edilebilen c-Jun N -terminal kinaz (JNK), p38 ve ERK5 yollarını içerir (Roberts vd., 2007). Ras/Raf/MEK/ERK kaskadı, çoğalma, hayatta kalma, farklılaşma, göç ve anjiyogenez dahil olmak üzere bir dizi önemli hücre işlemleri düzenler (Chang vd., 2003). Ligandları, keşfedilen ilk RTK olan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR; ErbB1 veya HER1 olarak da bilinir) gibi RTK'lara bağlanması üzerine hücre yüzeyinde aktive edilir (Gschwind vd.,2004). ErbB2/ HER2, ErbB3/HER3 ve ErbB4/HER4 adında üç aile üyesi daha sonra tanımlandı. Bir büyüme faktörünün reseptörüne bağlanması (örneğin, EGFR'ye bağlanan epidermal büyüme faktörü (EGF)), iki reseptör monomerinin dimerizasyonunu kolaylaştıran hücre dışı bir konformasyonel değişikliğe neden olur (Schlessinger vd., 2002). Bu, büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2'nin (GRB2) Src homolojisi 2 (SH2) alanı için yüksek afiniteli bir sitoplazmik tirozin kinaz rezidülerin yer aldığı bölgelerin çapraz fosforilasyonunu sağlar. Daha sonra, GRB2'nin

İki Src homolojisi 3 (SH3)alanı, GDP'nin GTP ile değişimi yoluyla hücre içi enerji transferinde yer alan Ras'ın aktivasyonunu kolaylaştıran, SOS (son of sevenless) ile etkileşime girer (Şekil1.7).



Şekil 1.6. Demir şelasyonu, mitojen aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyalleşmesinin modülü (Rybak, P. 2014)

Ras, neoplastik dönüşümde rol oynayan ilk tanımlanmış onkogendir ve büyüme faktörü sinyallerini, bu sinyalleri çekirdeğe ileten çok önemli faktörlerle birleştiren, hücre büyümesini düzenlemede anahtar bir oyuncu olarak kabul edilir (Avruch vd., 2007; Harada vd., 2004). Aktif RAS (RAS-GTP) daha sonra ana efektörlerinden birini, mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz kinazını (MAPKKK veya MEKK), Raf aktive eder.

Raf fosforilasyonları mitojenle aktive olan protein kinaz kinazı (MAPKK veya MEK), ki bu daha sonra mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK'ler) fosforile eder.

Aktive edilmiş MAPK'lar, hücre büyümesini ve çoğalmasını teşvik etmek için, c-myc, Elk1, transkripsiyon faktörlerini ve CREB dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörünün aktivitesini fosforile etmek ve düzenlemek için çekirdeğe girebilir. Ras / Raf / MEK / ERK yolu ayrıca pro-apoptotik Bim ve BAD'yi fosforilasyonla etkisiz hale getirerek apoptozu inhibe edebilir, böylece Bcl-2 ve Bcl-xL'nin anti-apoptotik rollerini teşvik eder (Zha vd., 1996; Ley vd., 2003). Dahası, ERK, matris metaloproteinazlarının 2/9 (MMP-2/9) ve miyosin hafif zincir kinazın (MLCK) aktivitelerini artırma kabiliyeti sayesinde hücre hareketliliğinin ve metastazın indüklenmesinde rol oynar.

EGFR'nin aşırı ekspresyonu, karsinomların%50' sinden fazlasında gözlenir ve ErbB2 aşırı ekspresyonu, meme kanserlerinin%30' unda görülür (Downward, 2003). Ras'ta mutasyonlar pankreas kanserlerinin%90'ından fazlasında meydana gelir ve akciğer kanserleri, karaciğer kanserleri, melanomlar ve tiroid malignitelerinde bulunur (Dhillon vd., 2007). Bu onkogenlerin tanımlanması, EGFR-Ras-MAPK yolunda yer alan kritik moleküllere yönelik hedefli terapötiklerin geliştirilmesine yol açmıştır (Roberts vd., 2007). Gerçektende, klinikte en başarılı hedefe yönelik tedaviler öncelikle EGFR, ErbB2, BCR-ABL ve KIT gibi bu yola dahil olan tirozin kinazlara yöneliktir (Hudis, 2007; Izar vd., 2013).

Son zamanlarda, DFO ve Dp44mT'nin PC-3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde ERK1 / 2 fosforilasyonunu azaltarak Ras / Raf / MEK / ERK kademesini düzenleyebildiğini göstermiştir (Dixon vd., 2013). ERK'nın bir dizi mitojenik uyarıcı tarafından aktive edildiği ve çoklu mitojenik sinyal yolları için kritik bir yakınsama noktasını temsil ettiği göz önüne alındığında, demir şelatörlerinin ERK yolağının aktivasyonunu hafifletme kabiliyeti, kanseri önlemede önemli bir mekanizma olabilir.

## **1.7. Çalışmanın amacı**

Bu tez konusunun amacı, farklı salisiliden asilhidrazid bileşiklerinin (ME0055 ve ME0192) bakterilerde gözlenen demir şelatlama ve bu sayede replikasyonu durdurma özelliğini göz önünde bulundurarak bu bileşiklerin kanserli SH-SY5Y hücre hattının çoğalması üzerindeki etkilerinin ERK/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları ve bu iki sinyal yolu arasındaki iletişimi sağlayan odaklardan biri olması muhtemel olan mitotik

regülatör Speedy/RINGO üzerinden moleküler düzeyde incelenmesidir. Bu sayede birçok kanser türünde başlatıcı etkisi bilinen, yanı sıra zayıf prognoz ve tedaviye dirençle de ilişkilendirilen ERK/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yollarındaki anormal davranışların altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılmasına ve tanı ve tedavide doğru hedeflerin seçilmesine olanak sağlayacak, ayrıca ileride demir şelatlayıcı salisiliden asilhidrazid temelli preparatların tedaviye destek amaçlı kullanımından daha geniş çapta ve daha bilinçli olarak faydalanılabilmemesinin önünü açacak bir çalışma gerçekleştirilmiş olacaktır.

Bu doğrultuda, başlanan deneyde kültür ortamında her uygulama ve kontrol grubu için  $10 \times 10^4$  kanserli SH-SY5Y hücreleri üretildi ve sitotoksite dozunun (IC50) belirlenmesi için (belli dozlarda dilue edilen ME0055 ve ME0192) 24 saat inkübasyona bırakılıp MTT testi uygulanıp uygun doz belirlenmesi sağlandı. Daha sonraki aşamada ise hücre siklus regülatörü olan Speedy/RINGO seviyesine bakılıp beklenen düşüşe bağlı olarak ERK/MAPK ve PI3K/AKT yollarının bundan etkilenip etkilenmedikleri araştırıldı. Ayrıca bu iki sinyal yolu hücrenin hayatta kalımı ve proliferasyonunu kontrol ettiği için demir şelatörleriyle olan etkileşimleri sonucu hücrelerde apoptotik bir belirteç olan kaspaz-3 aktivitesine bakılarak hücrelerin apoptotik yola girip girmediklerinin gözlemlenmesi amaçlandı. Bakterilerde virulanslığı kontrol etmek için kullanılan ve ilk kez nöroblastoma hücre hattında uygulaması yapılan ME0055 ve ME0192 bileşikleri sayesinde Speedy/RINGO, Akt ve MAPK sinyal yolları üzerindeki etkilerini gösteren bilgiler sunması amaçlandı. Günümüzde kanser tedavisine destek amacıyla kullanılan demir şelatörlerinin yanında salisiliden asilhidrazidlerinde demir şelatlama özelliğinin açıklanarak hedefe yönelik tedavilere ışık tutacağı düşünülmektedir

## 2. MALZEMELER VE YÖNTEMLER

### 2.1. Malzemeler

#### 2.1.1. Ekipmanlar

Bu çalışmada kullanılan tüm ekipmanlar Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ekipmanlar

Ekipman	Tedarikçi Firma
Mikropipet	Thermo Fisher
Otomatik pipetör	Thermo Fisher
Serolojik pipet	Thermo Fisher
96 well plate	Thermo Fisher
Hücre kültür flaskları	Corning
Pasteur pipet	ISOLAB
Hemositometre	ISOLAB
Hücre kazıyıcı	Biologix
Falcon tüp (15mL, 50mL)	Biologix
Santrifüj	Nüve NF400
Soğutmalı santrifüj	Nüve NF800R
Otoklav	Nüve OT40L
Distile su cihazı	Nüve ND8
Qubit 3.0 fluorometer	Invitrogen
Nitroselüloz membran	Santra Cruz
Güç Kaynağı	Thermo Fisher
Elektroforez jel sistemi (SDS-PAGE)	BIO-RAD Mini Ptotean
Trans-blot turbo transfer pack	BIO-RAD
Western Blotlama Cihazı	BIO-RAD Trans-blot Turbo
Western görüntüleme sistemi	BIO-RAD ChemiDoc XRS+
Qubit 3.0 fluorometer	Invitrogen
Mikroplate okuyucu sistem	Molecular Devices, SpectraMax i3
Inverted mikroskop	Leica DMI3000 B
CO <sub>2</sub> inkübatörü	Thermo Scientific
Biyogüvenlik kabini	Thermo Scientific
Su banyosu	Wisd Laboratory Instruments
Çalkalayıcı	Wisd Laboratory Instruments
Vorteks	BioCote
Hassas Terazi	Denver Instrument

Çizelge 2.1. (devamı)

<b>Ekipman</b>	<b>Tedarikçi Firma</b>
Isıtıcıly manyetik karıştırıcı	Denver Instrument
+4 soğutucu	Arçelik
-20 soğutucu	Arçelik
-80 soğutucu	New Brunswick Scientific
Buz makinesi	Brema/GB903A-Q
pH metre	Hanna Instruments (HI241 pH/ORP)

### 2.1.2. Kimyasallar ve enzimler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve enzimler Çizelgesi 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kimyasallar ve Enzimler

<b>Kimyasal/Enzim</b>	<b>Tedarikçi Firma</b>
ME0055	Umeå Üniversitesi’nden Prof. Dr. Mikael Elofsson
ME0192	Prof. Dr. Mikael Elofsson
DMEM, high glucose	Sigma- Aldrich
FBS	Sigma- Aldrich
Pen/Strep	Sigma- Aldrich
L-glutamine	Sigma- Aldrich
PBS	Sigma- Aldrich
Tripsin, %2,5	Sigma- Aldrich
DMSO	Sigma- Aldrich
Tween-20	Sigma- Aldrich
B-merkaptotanol	Sigma- Aldrich
Trypan blue	Sigma- Aldrich
Methanol	Sigma- Aldrich
Absolute ethanol	Sigma- Aldrich
SDS	Santa Cruz
Gliserol	Santa Cruz
APS	Santa Cruz
TEMED	Santa Cruz
Tris base	Santa Cruz
Glisin	Santa Cruz
Akrilamid/bisakrilamid, %30	Santa Cruz
p-Akt1/2/3 mouse monoklonal antikor (C-11)	Santa Cruz
p-Akt1/2/3 mouse monoklonal antikor (B-5)	Santa Cruz
MEK1/2 mouse monoklonal antikor (9G3)	Santa Cruz
Calnexin mouse monoklonal antikor (TO-5)	Santa Cruz
GapDH mouse monoklonal antikor (0411)	Santa Cruz

Çizelge 2.2. (devamı)

Kimyasal/Enzim	Tedarikçi Firma
Anti-Caspase-3 antibody (E87)	Santa Cruz
SPDYA poliklonal antikor	Thermo Fisher
m-IgG <sub>K</sub> BP-HRP anti-mouse sekonder antikor	Santa Cruz
Mouse anti-rabbit IgG/HRP sekonder antikor	Bioss Antibodies
Bromofenol blue	Novex
n-bütanol	MERCK
HCl	MERCK
SeeBlue Plus2 Pre-stained protein standart	Invitrogen
NaCl	EMSURE

### 2.1.3. Ticari kitler

Bu çalışmada kullanılan ticari kitler Çizelge 2.3 'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Ticari Kitler

Kit	Tedarikçi Firma
Whole Cell Protein Extraction Kit	Millipore
Qubit Protein Assay Kit	Invitrogen
Clarity Western ECL Substrate Kit	BIO-RAD
MTS Cell Proliferation Assay Kit	Abcam

### 2.1.4. Tamponlar ve solüsyonlar

#### 2.1.4.1. 1X yükleme Boyası (SDS-PAGE için)

İzolasyonu yapılan protein örneklerinin SDS-PAGE uygulama öncesi denatüre edilmesi amacıyla 1X yükleme boyası kullanıldı. 1X yükleme boyası; 340 µL dH<sub>2</sub>O, 400 µL %10 SDS, 120 µL %100 gliserol, 100 µL 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) ve 40 µL %0.5 bromofenol blue karışımından oluşturuldu. Örnekler SDS-PAGE'e yüklenmeden önce 54 µL β-merkaptoetanol eklendi.

#### 2.1.4.2. *SDS-PAGE için stacking buffer pH 6.8 0.5 M*

0.5 M stacking buffer; 100mL dH<sub>2</sub>O içerisinde 7.88g Tris-Cl'ün çözülmesiyle ve son pH'ı 6.8 olacak şekilde hazırlandı.

#### 2.1.4.3. *SDS-PAGE için separatin buffer pH 8.8 1.5M*

1.5 M separating buffer; 100mL dH<sub>2</sub>O içerisinde 23.64g Tris-Cl'ün çözülmesiyle ve son pH'ı 8.8 olacak şekilde hazırlandı.

#### 2.1.4.4. *SDS running buffer*

SDS running buffer; 1L dH<sub>2</sub>O içerisinde 30g tris ve 144g glsinin çözündürülmesiyle pH'ı 8,3 olacak şekilde 10X stok solüsyonu hazırlandı. 10X SDS running bufferı 10 kez seyreltmesi yapılarak 1X çalışma solüsyonu oluşturuldu.

#### 2.1.4.5. *Tris buffered saline (TBS)*

Tris buffered saline; 1L dH<sub>2</sub>O içerisinde 23.23g tris ve 87.66g NaCl'ü çözündürülmesiyle pH'ı 7.6 olacak şekilde 10X stok solüsyonu hazırlandı. 10X SDS running bufferı 10 kez seyreltmesi yapılarak 1X çalışma solüsyonu oluşturuldu.

#### 2.1.4.6. *Tris buffered saline-tween20 (TBST)*

Tris buffered saline-tween20; 1L dH<sub>2</sub>O içerisinde 100mL 10X TBS ve 1mL tween-20'nin eklenerek 1X çalışma solüsyonu oluşturuldu. Bu solüsyon tüm western blotlama aşamasında yıkama tamponu olarak kullanılmıştır.

#### 2.1.4.7. *Towbin buffer*

Towbin buffer; western blotlama aşamasında kullanılan transfer tamponudur. Towbin buffer içeriği; 1L dH<sub>2</sub>O içerisinde 30.25g tris ve 144g glsinin çözürülmesiyle pH'ı 8,3 olacak şekilde 10X stok solüsyonu hazırlandı. 10X towbin bufferı 200 mL metanol ve 700 mL dH<sub>2</sub>O ile karıştırılarak 1X çalışma solüsyonu oluşturuldu.



#### 2.1.4.8. *Wesstern Blotlama 'da bloklama solüsyonu*

5g (%5) blocker, total hacmi 100 mL olacak şekilde 1X TBS içinde çözdürülerek 100 mL bloklama solüsyonu hazırlandı.

#### 2.1.4.9. *Primer ve sekonder antikorların hazırlanması*

1:1000 konsantrasyonda 5 mL primer/sekonder antikor solüsyonu, 5 µL antikor ve 4995 µL bloklama solüsyonu olacak şekilde hazırlandı.

## 2.2. **Yöntemler**

### 2.2.1. **Kanserli SH-SY5Y hücre hattının büyütülmesi**

Kanserli SH-SY5Y hücre hattı %20 FBS, %1 Pen/strep ve 2Mm 1cc L-Glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içinde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler her 48 saatte bir inverted mikroskopta incelenerek kültür mediumları değiştirildi ve belirli bir konfluent yapıya ulaştığında hücrelerin logaritmik fazda kalmaları açısından hücreler pasajlanarak büyüme hızları kontrollü bir şekilde takip edildi. Pasajlama işleminde flask içerisindeki kültür mediumları çekildikten sonra 3ml PBS ile yıkandı. Daha sonra flaskta hücrelerin bulunduğu yüzeyi kaplayacak kadar %2.5 tripsin (yani 2ml) konarak hücrelerin yüzeyden ayrılması için 2-3 dakika inkübatörde bekletildi. Süreç sonunda flask yüzeyinden kalkan hücreleri almak ve tripsinin inhibe edilmesi için 3ml taze medium konuldu. Flaskta bulunan medium içeriği 15ml'lik falcon tüplere alınarak 200g (rcf)'te 10 dakika sanrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatant kısmı dökülerek pellet kısmı 5ml taze DMEM içerisinde çözdürüldü. Flasklara eşit hücre dağıtılması için hücre sayıları ise Thoma lamı ile sayılarak belirlendi ve flasklara hücrelerin ekimi gerçekleştirildi.

Kontrol, ME0055 ve ME0192 grupları için 25ml'lik 3 flask içerisinde her birinde %98'i canlı en az 10x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde deneylere başlandı.

### 2.2.2. Salisiliden asilhidrazid grubu sentetiklerin hazırlanması

ME0055 ve ME0192 bileşikleri temin edildi (Umeå Üniversitesi'nden Prof. Dr. Mikael Elofsson tarafından). ME0055 ( $M_a=301,07\text{g/mol}$ ) 16,9mg bileşiği 5ml içinde, ME0192 ( $M_a=379,09\text{g/mol}$ ) 16.1mg bileşiği ise 4ml Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 10mM stok ME0055 ve ME0192 oluşturuldu. ME0055 ve ME0192 bileşiklerinin uygulama dozajının belirlenmesi için 10mM stoklardan DMEM ile seyreltme işlemine gidilerek son konsantrasyonları 50 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ , 150 $\mu\text{M}$  ve 200 $\mu\text{M}$  olacak şekilde kimyasallar hazırlandı.

### 2.2.3. Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyonun (IC50) belirlenmesi

Mitokondriyel aktiviteye sahip olan, yani canlı hücrelerin belirlenmesinde kullanılan; NADH' a bağımlı oksiredüktaz enziminin formazan tuzlarıyla etkileşime girmesiyle renk değişimini içeren ve sitotoksik etkilerin belirlenmesinde kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntem olan MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide] hücre proliferasyon testi kullanıldı. Bu araştırmada 96 kuyucuklu plat'lere  $10 \times 10^3$  kanserli SH-SY5Y hücre hattı ekimi yapılmıştır. ME0055 ve ME00192'nin 50 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ , 150 $\mu\text{M}$  ve 200 $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarındaki dozajlarının uygulaması yapıldı, uygulama yapılmayan hücreler ise kontrol grubunu oluşturdu ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24h inkübe edilmiştir. Ardından 20 $\mu\text{l}$  MTS reaktifi [MTS Cell Proliferation Assay Kit (Abcam)] eklenerek 3.5 saat, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra bir BioTec plaka okuyucuda 490 nm'lik uyarma ve emisyon dalga boyu kullanılarak ölçülmüştür.

### 2.2.4. Protein izolasyonu

Kontrol grupları ve kimyasal uygulaması yapılan kanserli SH-SY5Y hücreler toplanarak iki kez 2ml PBS ile yıkandıktan sonra buna takiben 10 dakika 4° C'de 200xg de santrifüj edildi, pellet 2 kez 2ml soğuk 1X PBS ile durulandı. Pellet nazikçe 1x Whole Cell Extraction Kiti (Millipore) (yaklaşık 100 $\mu\text{l}$ ) ile homojenize edildi ve 25 saniye aralıklarla 3 kez 5'er saniye sonikasyon yapıldı. Sonikasyonu yapılmış ependoftaki örnekler 15 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 20 dakika 4° C'de 8000xg'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası supernatant kısım alınarak total protein izolasyonu yapılmıştır. Deneyin sonraki

aşaması için protein örnekleri eşit hacimde alıquotlanarak -80 °Cye kaldırılarak üzere stoklandı.

### 2.2.5. Protein miktar analizi

Invitrogen Qubit Protein Test Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak her deneysel durum için elde edilen total proteinlerin miktar tayini yapıldı. Üç farklı konsantrasyondaki BSA içeren Qubit ajanı ve Qubit seyreltme tamponu kullanılarak e 1:200 oranında 1200µl olacak şekilde Working Solution hazırlandı. Çizelge 2.4.'de de görüldüğü gibi 10ul örneklerden alınarak 190ul Working Solution ile muamele edilen tüpler 2-3 saniye vortekslendi. Ardından karanlık ortamda, oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Qubit™ 4 Fluorometer (İnvitrogen™) cihazında tüpler okutularak örneklerdeki protein miktarı tayin edildi (Çizelge 2.5.). Her numune üç kopya halinde ölçülmüştür.

Çizelge 2.4. Qubit protein miktar tayini

	Standart / Örnek	Working Solution
Standart 1 (0 ng/µl)	10µl	190 µl
Standart 2 (200 ng/µl)	10µl	190 µl
Standart 3 (400 ng/µl)	10 µl	190 µl
Kontrol SH-SY5Y	10 µl	190 µl
ME0055 ile muamele edilen SH-SY5Y	10 µl	190 µl
ME0192 ile muamele edilen SH-SY5Y	10 µl	190 µl

Çizelge 2.5. Protein konsantrasyonu

	Protein konsantrasyonu
SH-SY5Y Kontrol	17,680 µg/ml
ME0055 ile muamele edilen SH-SY5Y	12,400 µg/ml
ME0192 ile muamele edilen SH-SY5Y	10,480 µg/ml

### 2.3. Western blotlama

Çizelge 2.5.2’de verilen verilerdeki belirtildiği miktarda protein içeren ependorflara NEBx3 redükleyici mavi yükleme tamponu eklenildi ve 95° C’de 5 dakika kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlandı. Daha sonra, jeldeki kuyulara eşit konsantrasyonda (100 µg/kuyu) protein örnekleri yüklenmesi için hazır duruma geldi.

İlk kuyucuğa 15 µl protein markerı yüklendi. Ardından sırasıyla Kontrol SH-SY5Y, ME055 ve ME0192 ile muamele edilmiş olan protein örnekleri kuyucuklara yüklendi. Stacking bölgesinden ayrılıncaya kadar jel 100V akımda Separating bölgesinde ise 130V akımda 1.5 saat yürütülerek proteinlerin ayrımı sağlandı. Jel daha sonra nitroselulaz membrana aktarıldığından, soğuk 1X towbin bufferin içerisine kondu

Çizelge 2.6. SDS-PAGE için yüklenecek protein örnekleri

	Protein Miktarı	1x NEBX3
<b>Kontrol SH-SY5Y</b>	6µl	19µl
<b>ME0055 ile muamele idelen SH-SY5Y</b>	9µl	16µl
<b>ME0192 ile muamele idelen SH-SY5Y</b>	10µl	15µl

Jeldeki proteinler Bio-Rad protein blotting guide bulletin 2895 (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak sandwich haline getirilen jel 25V, 2.5A’de 15dk’lık tranfer süreci sonunda proteinler nitroselüloz membrana aktarımı gerçekleştirildi. Transferin ardından membranlar, oda sıcaklığında 1saat süreyle %5 yağsız süt tozunun PBS solüsyonunda oda sıcaklığında, bloklama solüsyonu içerisinde 1 saat bloklandı.

#### 2.3.1. Antikor Uygulaması ve Kemilüminesans Tayini

Membranlar, gece boyunca 4° C’de hafifçe çalkalanarak primer antikorları içinde inkübe edilmiştir. Membranlar House-keeping gen ürünü olarak kullanılan Calnexin proteinine özel primer antibody olarak Calnexin (TO-5): sc-80645 fare monoklonal Ab (Santa Cruz) (1:1000 seyreltme), GAPDH için ise GAPDH (0411): sc-47724 fare monoklonal Ab (Santa Cruz) (1:500 seyreltme) içeren bir karışım içerisinde inkübe edildi. Speedy/RINGO için Spdy A tavşan poliklonal Ab (İnvintrogen PA1-16959)

(1:500 seyreltme) uygulaması yapılırken MAPK sinyal yolu aktivitesi için MEK-1/2 Antibody 9G3 fare monoklonal Ab (Santa Cruz sc-81504) (1:1000 seyreltme) yapıldı. Aktif kaspaz-3 aktivitesi için tavşan Anti-Caspase-3 antibody [E87]: ab32351 (1:500 seyreltme) uygulandı. p-AKT'ın ifade edilme düzeyi için ise ser473 ve thr308'e bakıldı. Ser473 için kullanılır primer antikor p-Akt1/2/3 Antibody (C-11): sc-514032 fare monoklonal Ab (Santa Cruz) (1:1000 seyreltme) kullanılırken, thr308 için p-Akt1/2/3 (B-5): sc-271966 fare monoklonal Ab (Santa Cruz) (1:1000 seyreltme) uygulamaları yapılarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bu membranlar beş kez 5 dakika süreyle %3 BSA içeren TBST (TBST;500Mm NaCl, 20Mm Tris-Cl, pH 7,5, %0,05 (w/v) Tween 20) ile yıkandı. Sekonder antibody uygulaması için hazır olan membranlar; primary antibodylerine göre Mouse Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), HRP Conjugated: bs-0295M-HRP (Bioss) ve m-IgGκ BP-HRP: sc-516102 (Santa Cruz) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından oda sıcaklığında bulunan TBST içinde 3-5 kez 5 dakikalık yıkama sonrasında görüntü elde etmek için 5 dakika boyunca Clarity Western ECL substract kemilüminesan algılama reaktifinde (Bio-Rac) inkübe edildikten sonra ChemiDoc cihazında mebranlardaki bantların görüntüsü elde edildi.

### **2.3.2. Bütünleyici piksel analizi ve istatistiksel analizler**

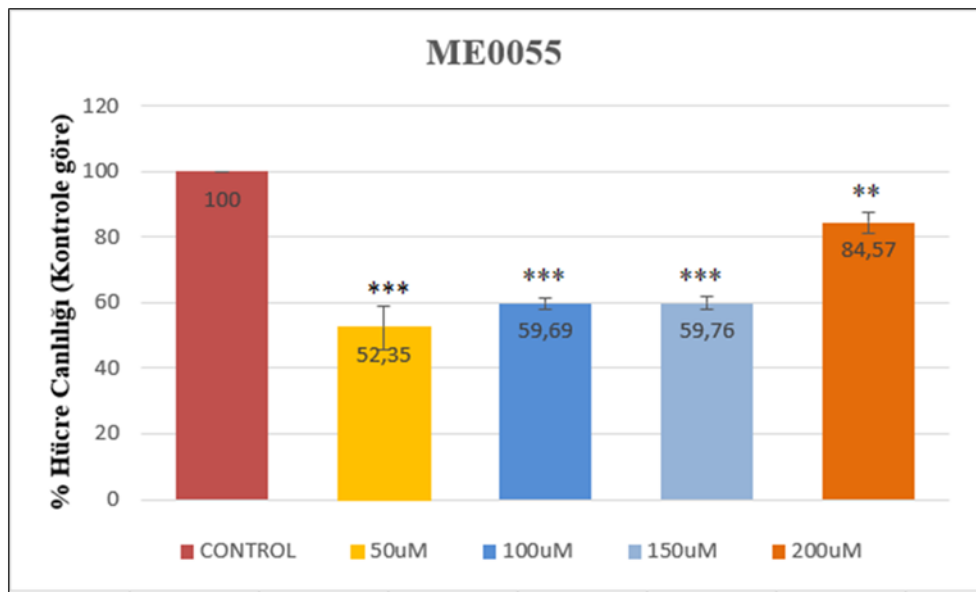
Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi (SPSS) İstatistiksel Analiz Programı kullanılmış ve sonuçlar t-test'i kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Verilerin ortalaması  $SD \pm$  olarak ifade edilmiş ve bütün sonuçlar en az üç ayrı deneyi temsil etmektedir. Western sonuçlarından elde edilen görüntülerle Piksel Analizine gidilmiştir. Piksel analizi için; İmage lab software kullanılarak bantlar ve yoğunlukları tespit edilmiş ayrıca Photoshop CS6 programı kullanılarak histograma bağlı olarak oluşturulan kontrast değerleriyle göreceli yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Kontrole bağlı normalleştirme yapılırken kontrol grupları 1'e normalleştirildi ve daha sonra deney gruplarının nispi protein ekspresyonu değişiklikleri hesaplandı.

### 3. BULGULAR VE İRDELEME

#### 3.1. Bulgular

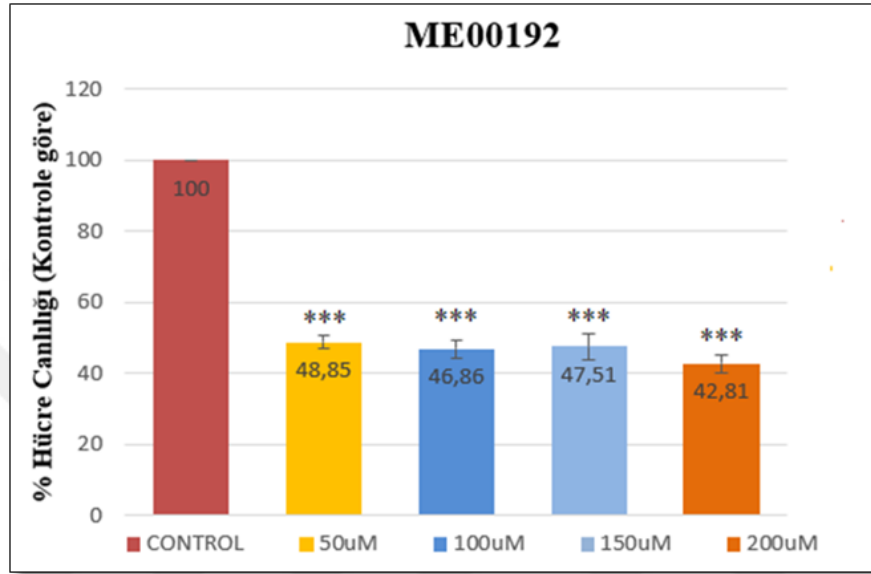
##### 3.1.1. Farklı salisiliden asilhidrazid grubu sentetiklerin kanserli SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

Salisiliden asilhidrazid grubu kimyasallarından olan ME0055 ve ME0192'nin 50µM, 100µM, 150µM, 200µM dozları SH-SY5Y hücre hatlarına uygulanmış ve 24 saat inkübasyon sonrasında MTT analizi verilerine göre bu kimyasalların hücre proliferasyonunu ne kadar baskıladığı hesaplanmıştır. Grafik 1 ve 2'de bileşiklerin MTT analiz değerleri sonucunda elde edilen canlılık oranları yüzdesi (%) verilmiştir. Bileşiklerin sitotoksik etkileri incelendiğinde ME0055 bileşiği Grafik 1'deki değerlere bakıldığında 50µM'lık dozda %52,35'lik canlılık oranı elde edilmiştir (P=0,0002 \*\*\*p<0,001). 100µM ve 150µM'lık dozajlarda da SD± =1,8 p=0,0003 \*\*\*p<0,001 olmasına rağmen canlılığın %59 olduğu görülmektedir. 200µM'de ise %84 oranında canlılık olduğu gözlemlendiğinden en uygun dozun %50 canlılığa en yakın değer olan 50µM dozajı kabul edilmiştir.



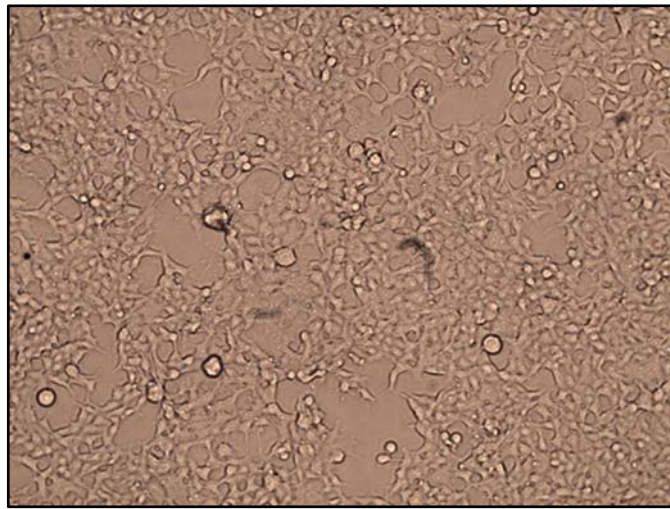
Grafik 3.1. ME0055 bileşiğinin kanserli SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

ME0192 bileşigi kanserli SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki etkisi ise uygulama yapılan tüm konsantrasyonlarda %50 canlılığın altında olduğu hesaplanmıştır.  $SD \pm 0,6$  \*\*\* $p < 0,001$  verisine göre tüm konsantrasyonlar yüksek derecede anlamlı olduğu görülmektedir. Çalışmanın devamı için uygun dozajın belirlenmesi %50 (IC50) canlılığa bağlı olduğundan ME0192 bileşigi içinde en uygun dozajın %48,85'lik canlılığa sahip olan 50 $\mu$ M'lık konsantrasyon olduğu saptanmıştır.



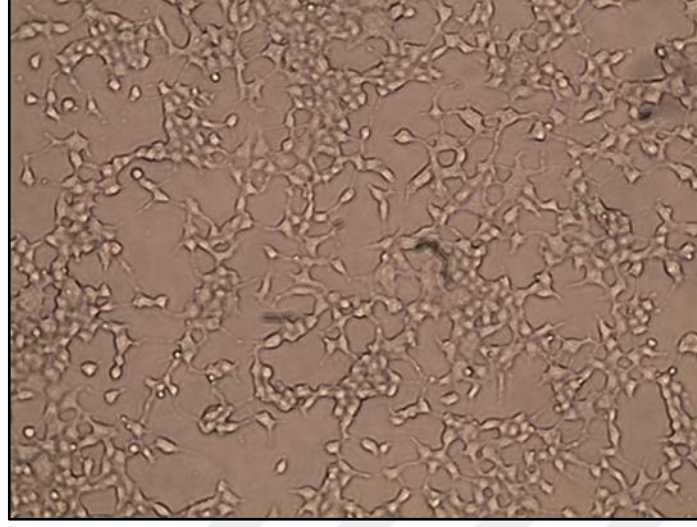
Grafik 3.2. ME0192 bileşiginin kanserli SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

Şekil 3.1.'de  $10 \times 10^5$  kanserli SH-SY5Y hücre hattı içeren kontrol grubunun 24 saatlik süre sonunda konfluent bir yapı oluşturduğu görülmektedir.



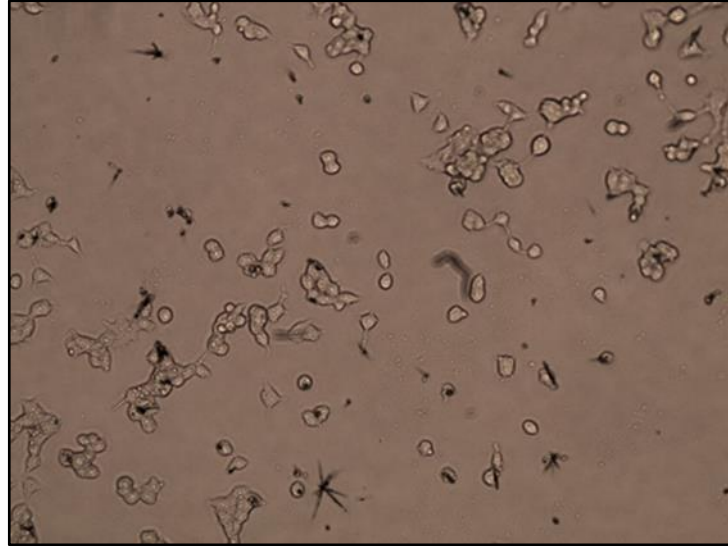
Şekil 3.1.  $10 \times 10^5$  Kanserli SH-SY5Y hücre içeren kontrol grubunun X10 Mikroskop Görüntüsü

Şekil 3.2. 'de ise  $10 \times 10^5$  kanserli SH-SY5Y hücrelerine 50uM ME0055 bileşiği uygulamasından, 24 saat sonundaki görüntüsü görülmektedir.



**Şekil 3.2. 50µM'lık ME0055 bileşik dozu uygulanan kanserli SH-SY5Y hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki görüntüsü**

Şekil 3.3.'te ise  $10 \times 10^5$  kanserli SH-SY5Y hücre ekimi yapıldıktan sonra 50µM ME0192 bileşiği uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonucunda kontrol grubuna göre büyük miktarda hücrelerin degrede olduğu görülmektedir. Bu durumda ME0192 bileşiğinin ME0055 bileşiğine göre aynı dozajda dahil hücreleri daha fazla ölüme götürdüğü bulgusuna ulaşılmıştır

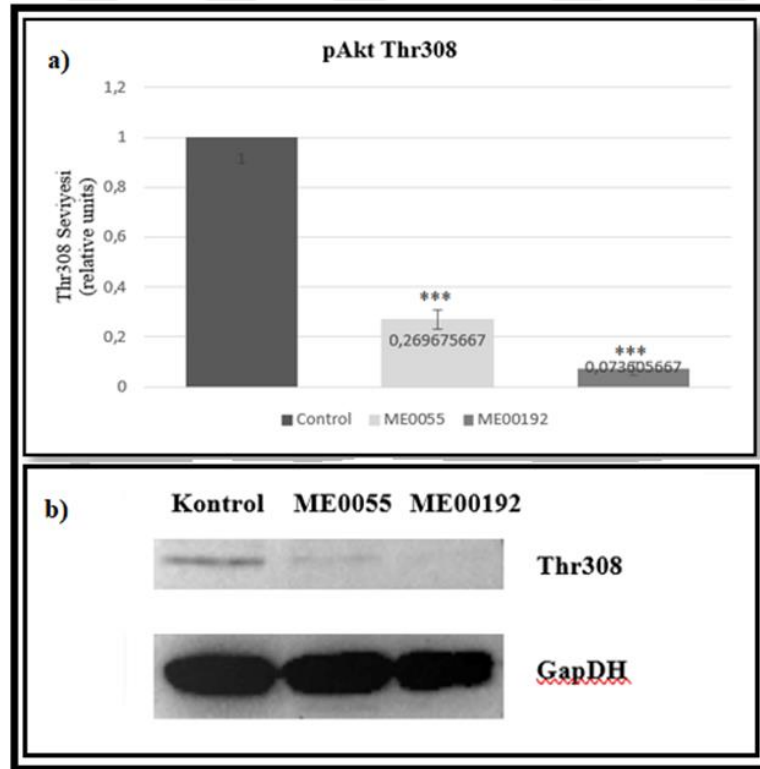


**Şekil 3.3. 50µM'lık ME0192 bileşik dozu uygulanan kanserli SH-SY5Y hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki sitotoksik etkisi**



### 3.1.2. ME0055 ve ME0192 bileşikleri ile demirin şelatlanması sonrası PI3K/AKT yolağında Akt (Thr 308) fosforilasyonunun incelenmesi

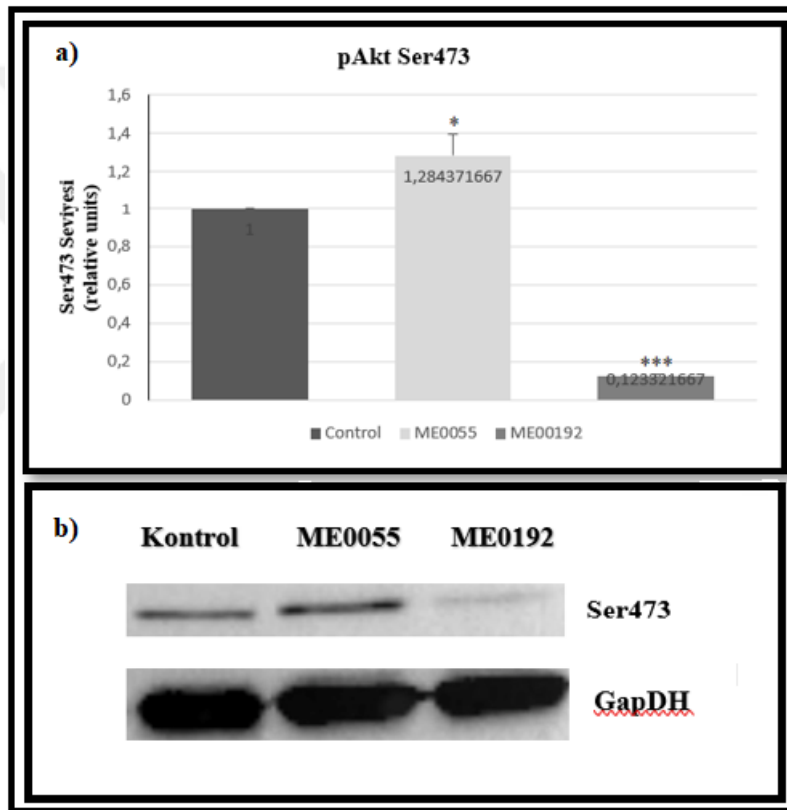
Litaratürdeki demir şelatlamasının kanser hücrelerindeki etkisi incelendiğinde PI3K'ın şelatlanmaya bağlı olarak düştüğü ve PTEN seviyesindeki artış bilinmektedir. Bu sonuçlar ise PI3K/AKT yolağında fosforilasyon seviyesinde düşüşe neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada ise demir şelatlanmasına bağlı olarak MAPK dan başlayan ve Speedy/RINGO (Cyclin A ve CDK2) seviyesindeki düşüşün son aşamaları olarak da PI3K/AKT yolağı arasındaki bağlantıda etkili olup olmadığının gözlemlenmesi amacıyla başlanan deneyde ME055 ve ME0192 bileşikleri kullanılarak gerçekleştirilen şelatlama sonucunda PI3K/AKT yolağında ilk fosforilasyonun gerçekleştiği (yarı aktif p-Akt forma ulaşması) Thr 308'in fosforilasyon seviyesine bakılmıştır. Şekil 3.4.'de p-Akt yolağını incelediğimiz Thr308 bulguları görülmektedir. Thr308 üzerinden fosforilasyon seviyesinin incelenmesinde uyguladığımız her iki bileşimde kontrol grubuna göre anlamlı derecede fosforilasyonu azalttığı görülmektedir. ME0055 bileşiği %74'lik bir azalma sağlarken ME0192'de ise %93'lük azaltma sağladığı görülmüştür ( $p < 0,001$ ).



Şekil 3.4. Akt (Thr308) için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada Akt (Thr308) için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki p-Akt Thr 308 protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer  $\pm$  SD'yi temsil eder. \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.1.3. ME0055 ve ME0192 bileşikleri ile demirin şelatlanması sonrası PI3K/AKT yolağında Akt (Ser473) fosforilasyonunun incelenmesi

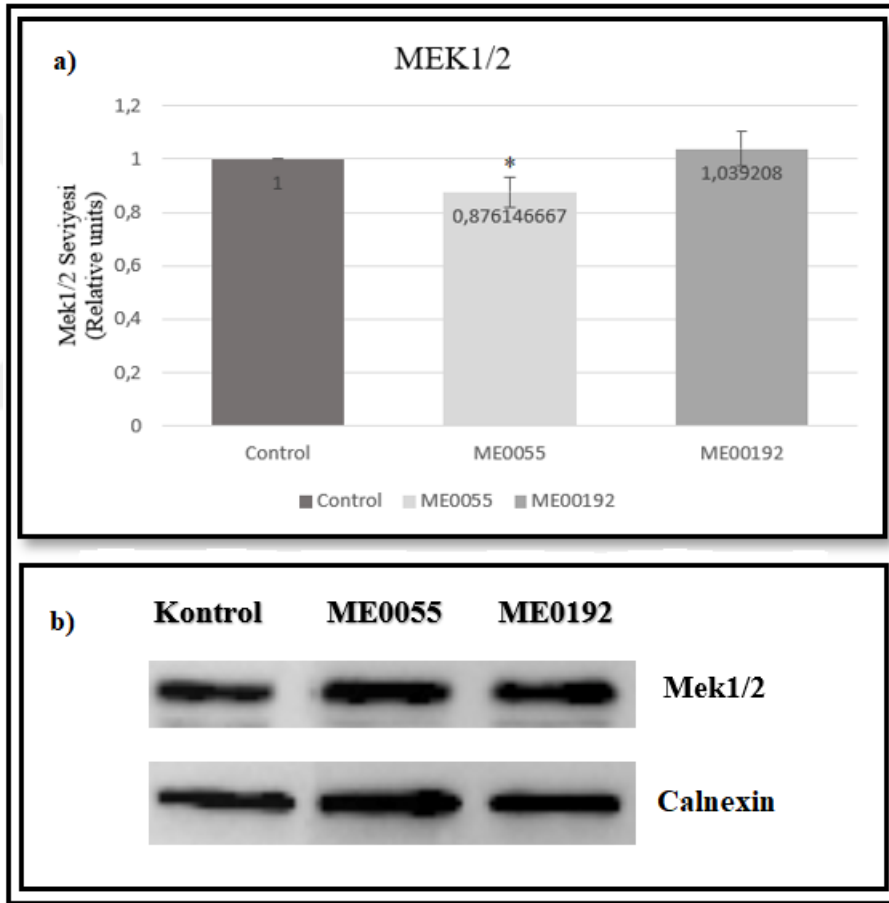
Şekil 3.5.' de p-Akt (Ser473) miktarı incelendiğinde Kontrol grubuna göre uygulama yapılan SH-SY5Y hücrelerinde fosforilasyon miktarında farklılıklar gözlemlenmiştir. ME0055 bileşiğinde kontrol grubuna göre %20'lik bir artış gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). ME0192 bileşiğinde ise %90 lık bir azalış gözlemlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Uygulaması yapılan salisiliden asilidrazidler arasında pAkt(ser473) üzerinde birisinde fosfarilasyon miktarında artış gözlemlenirken diğer kimyasalda fosforilasyonu azalttığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 3.5. p-Akt Ser473 için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada p-Akt Ser473 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki p-Akt Ser473 protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer  $\pm$  SD'yi temsil eder. \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.1.4. Demir şelatlanması sonrası MEK1/2 protein ekspresyonunun analizi

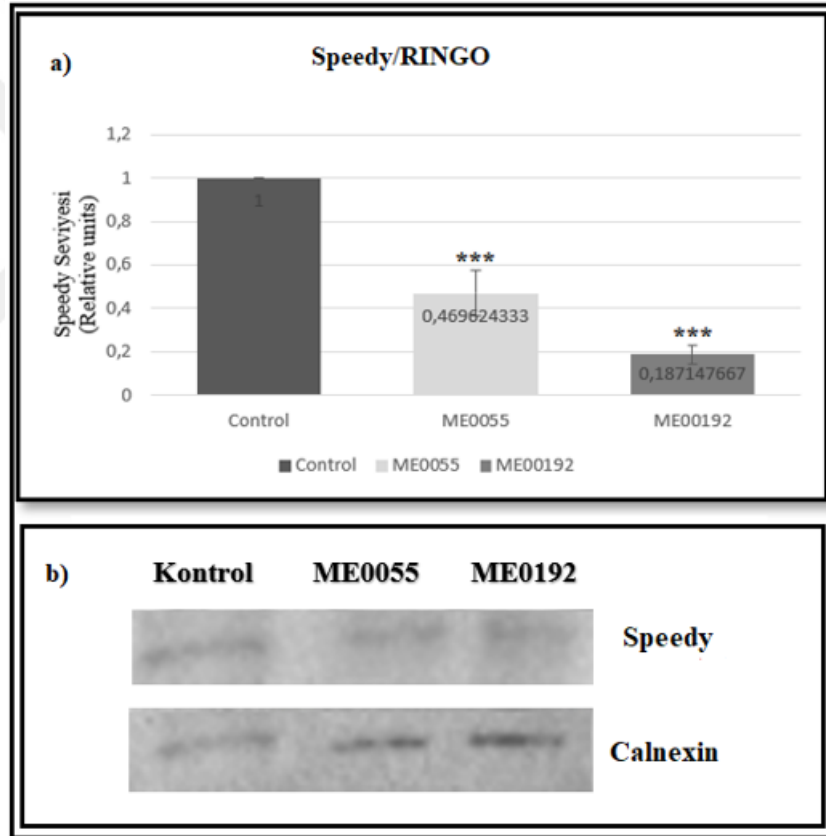
MAPK sinyal yolağı birçok hücre içi kaskatta yer alan ve kanser dokusunda hücre hareketliliği ve metaztazından sorumludur ve bunları c-myc fosfore ederek ekspresyon seviyesini arttırmasıyla, ayrıca pro-apoptotik Bim ve BAD'yi fosforilasyonla etkisiz hale getirerek apoptozu inhibe edebilir. Bu yüzden demir şelatasyonu sonucunda hücrelerde MEK1/2 'yi nasıl etkilediğinin anlaşılması için yapılan bu uygulamada ME0055 ve ME0192 demir şelatörleriyle yapılan deneyde elde edilen veriler Şekil 3.6. görüldüğü üzere ME055 bileşiği MEK1/2 seviyesini 0,2 kat azaltırken ME0192'de ise 0,3 katlık bir artışa sebep olduğu saptanmıştır.



**Şekil 3.6 MEK1/2/ için western blotlama sonucu. a):** Western blotlamada MEK1/2 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. **b):** ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SHSY5Y nöroblastoma hücrelerindeki MEK1/2 seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer  $\pm$  SD'yi temsil eder. \*  $p < 0.001$

### 3.2. Speedy / RINGO protein ekspresyon analizi

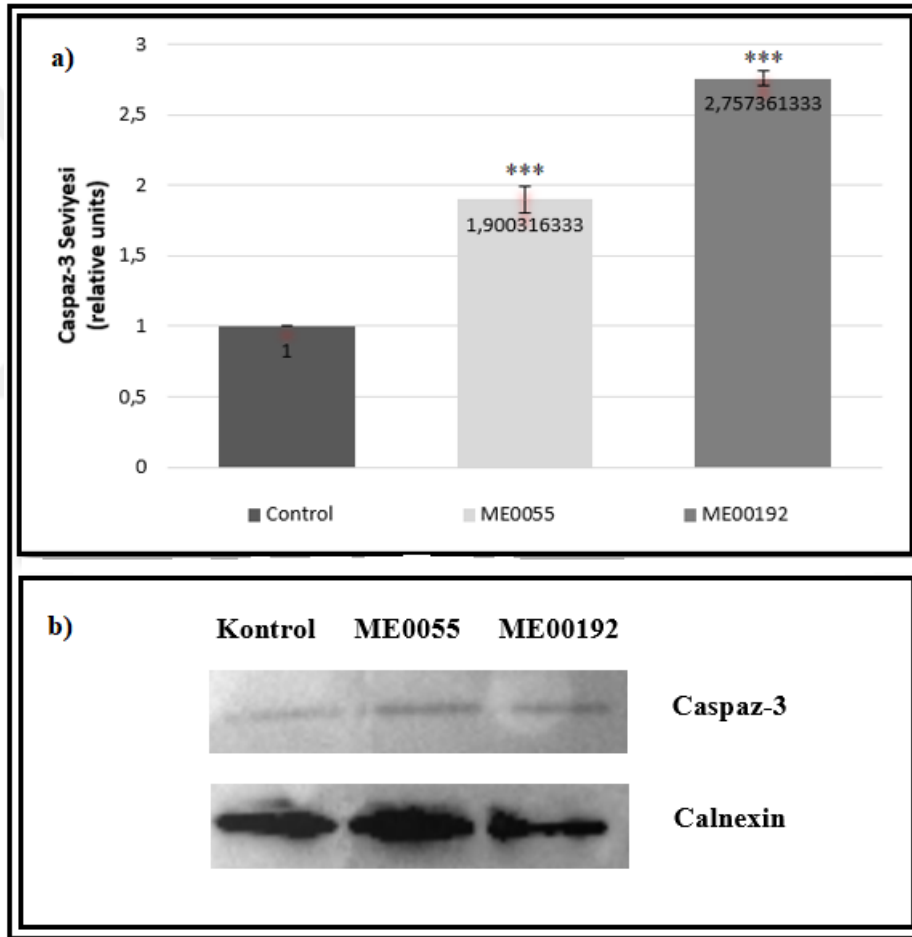
Hücre döngüsünü kontrol ettiği bilinen proteinlerin, demir şelasyonu sonucunda ekspresyon seviyelerinin önemli derecede azaldığı bilinmektedir. Bir hücre döngüsü kontrol proteini olan Speedy/RINGO'nun da aynı şekilde etkilenme potansiyeli göz önüne alınarak, ayrıca bu proteinin ERK/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları üzerindeki etkisi de düşünülerek, bu çalışmada ilk kez uygulanan demir şelatörlerin bu proteinin ekspresyon seviyesine etkisi incelenmiştir. Yapılan western blot çalışmasında Şekil 3.7.'de gösterilen bulgulara ulaşılmıştır. ME0055 bileşiği Speedy/RINGO seviyesini %54 azaltırken ( $p=0,001$ ), ME0192 ise 1'den 0,18'e (%82'lik) çok yüksek düzeyde anlamlı ( $p=0,000004$ ) bir düşüşe sebep olmuştur.



**Şekil 3.7. Speedy/RINGO için western blotlama sonucu. a):** Western blotlamada speedy/RINGO için kantitatif sonuçları gösteren **grafik. b):** ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SHSY5Y nöroblastoma hücrelerindeki speedy/RINGO protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer  $\pm$  SD'yi temsil eder. \*  $p<0,001$

### 3.3. Kaspaz-3 aktivitesi

Bu deneyde kanserli SH-SY5Y hücrelerinin ME0055 ve ME0192 kimyasalları ile muamele edilmesi sonucunda sinyal yolları üzerindeki ve hücre siklus proteinlerinde elde edilen veriler göz önüne alındığında hücrelerdeki son durumun ve yaşamsal aktivitenin ne şekilde devam ettiğinin anlaşılması için kaspaz-3 aktivitesine bakılmıştır. Bu uygulama sonucunda kaspaz-3 ME0055 bileşiği uygulanan hücrelerde %90'lık çok yüksek düzeyde anlamlı bir artış gösterirken, ME0192 hücrelerinde ise %175'lik bir aktivite artışı olduğunu ve hücrelerin apoptoza uğramış olabileceğine işaret etmektedir. ( $p < 0,001$ ).



**Şekil 3.8. Kaspaz-3 aktivitesi için western blotlama sonucu. a):** Western blotlamada Kaspaz-3 aktivitesi için kantitatif sonuçları gösteren grafik. **b):** ME0055 ve ME0192 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerindeki Kaspaz-3 aktivitesi seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Hata çubukları, ortalama değer  $\pm$  SD'yi temsil eder. \*  $p < 0,001$

### 3.4. İrdeme

Speedy/RINGO'nun ME0055 ve ME0192 bileşiklerine mağruz kalan nöroblastoma hücrelerinde çok yüksek düzeyde anlamlı olacak bir düşüş (ME0055 için %54, ME0192'de %84'lük) göstermesi demir şelatlanmasının Speedy/RINGO proteininin ekspresyon seviyesini ve aktivasyonu üzerinde etkili bir inhibisyona sebep olduğunu **ilk defa** olarak göstermiştir. Speedy/RINGO'nun PI3K/AKT ve ERK/MAPK sinyal yolları üzerindeki kontrol etkisi düşünüldüğünde ise, Speedy/RINGO miktarındaki bu düşüşün hücre döngüsünde etkili olan PI3K/AKT sinyal yolağının aktivitesi üzerinde de etkili olabileceği düşünülmüştür. PI3K/AKT sinyal yolunun aktifleşmesi için Akt proteininin Thr308 ve Ser473 olmak üzere iki farklı bölgesi üzerinden fosforlanması gerektiği bilinmektedir. Bu iki bölgeden öncelikle Thr 308'ün PIP3-PDK1 ile fosforlanması ile Akt proteini yarı aktif forma girer, daha sonra ise PDK2 ile Ser473 üzerinden fosforlanarak tam aktif p-Akt oluşur. Demir şelatörlerinin ise bu mekanizmadaki PIP3'ün oluşmasında görev alan PI3K seviyesini azaltarak bu yolaktaki negatif geri besleme yani PIP3'ün PIP2 ye dönüşmesi sağlayarak Akt yolağının fosforlanmasını inhibe eden PTEN seviyesinde artışı sağladığı bilinmektedir. Bu çalışmada kullanılan ME0055 bileşiği Thr308 fosforilasyonu üzerinde % 74'lük azalma sağlarken Ser473 fosforilasyonu üzerinde ise %20'lik bir artışa sebep olmaktadır. Her ne kadar Ser473 üzerinde bir artışa sebep olsa da PI3K/AKT yolağının Thr308 üzerinden ilk fosforlanma basamağı gerçekleşmeden Ser473 fosforlanması anlam kazanmamakta ve Akt proteini aktivite kazanmamaktadır. Bu durumda her iki şelatörün de PI3K/AKT yolağında etkili bir inhibisyon sağladığı söylenebilir. ME0192 bileşiği ise Thr308 fosforilasyonu üzerinde %93 lük bir azalma sağlayıp Ser473 fosforilasyonu üzerinde ise %88 'lik bir azalma sağlayarak her iki fosforlanma bölgesinde de inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu bileşiklerin PI3K/AKT yolağındaki etkilerinin hangi moleküllerle etkileşime girmeleri sonucu ortaya çıktığının anlaşılması için öncelikli olarak PI3K, PTEN ve Speedy/RINGO gibi bu sinyal yolu üzerinde etkili olan proteinlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi gerekmektedir. Bunun için PTEN'den kaynaklı olma ihtimalini değerlendirmek üzere PTEN siRNA tekniği ile susturularak PI3K/AKT yolağındaki fosforlanma seviyesindeki değişikliklere bakılabileceği gibi PTEN ve PI3K'nın inhibe edildiği hücrelere bileşiklerimizi uygulayarak Speedy/RINGO'nun ekspresyon seviyesine bağlı olarak PI3K/AKT yolağının fosforilasyon seviyesi

incelenebilir. Bu uygulama ile Speedy/RINGO ile PI3K/AKT sinyal yolağı arasında daha direkt bir bağlantının varlığı grleebileceği gibi akışın hangi yönde olduğu da görülebilir. Fakat günümüzde kanser tedavisinde kullanılmakta olan DFO gibi demir şelatlayıcılar hücre sinyal yolaklarında birçok noktada etkili olduğu için demir şelatlayıcıların etkisini mevcut tekniklerle net olarak ortaya koyabilmek oldukça zordur. Bu yüzden kullanılan bileşiklerin hücre içinde neleri hedef aldığının bilinmesi için yapılması gereken daha birçok çalışma vardır. Bu tez çalışmasının ise iki bileşiğin nöroblastoma kanser hücrelerinde kullanıldığı ilk çalışma olduğu göz önüne alındığında bileşiklerin iki mitojenik sinyal yolu üzerinde, ayrıca bu sinyal yolları üzerinde etkili olan mitotik regülatör protein Speedy/RINGO zerindeki etkisi hakkında değerli ipuçlarına ulaşıldığı görülmektedir.

ERK/MAPK yolağında ise günümüzde kullanılan demir şelatlayıcıları ile yapılan çalışmalarda bu sinyal yolunun kilit elemanlarından biri olan ERK1/2 fosforilasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan ME0055 bileşiği ile ise, yine bu sinyal yolunun önemli yelerinden MEK1/2 ekspresyonunun anlamlı derecede 0,2 kat (%2) ( $P < 0,05$ ) azaldığı görülürken ME0192 bileşiği uygulandığında ise 0,3 kat (%3) bir artış görüldü. Demir şelatlayıcı bileşiklerin hücre içindeki çoklu etkileşimleri ve çoklu etkileri bilindiğinden, ve çalışmada kullanılan bileşikler daha önce yalnızca bakteri hücrelerinde denenmiş fakat ökaryotik hücrelerde çalışılmamış olduğundan henüz ökaryotik hücrelerdeki, dahası anormal hücresel davranış gösteren kanserli hücrelerdeki etki mekanizmaları bilinmemektedir. Ayrıca hücrelerin stres ortamında farkı davranışlar gösterebildikleri ve literatür bilgilerine bakıldığında da kullanılan demir şelatlayıcıların farklı kanser dokularında ya da stres koşulları altında beklenenin aksine sonuçlar verebildiği göz önüne alındığında çalışmada MEK1/2 ile ilgili elde edilen bu sonuç çok şaşırtıcı değerildir. Fakat ME0192 bileşiği ERK/MAPK sinyal yolu üzerinde aktivasyon etkisi göstermiş olsa bile mitotik tetikleyiciler olan Speedy/RINGO proteini ve PI3K/AKT sinyal yolu üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi ile yine de hücrelerin canlılığını azaltmış ve apoptotik bir belirteç olan kaspaz-3 aktivitesinde artışa neden olabilmemiştir. Bu da hücrenin büyüme ve bölünmesi ile ilişkili proteinlerin ve ilişkili sinyal yollarının birbirleriyle etkileşimlerinin, özellikle de kanser hücrelerindeki çok yönlülüğünün derecesini gözler önüne sermektedir.

Hücre içi stres koşullarında (ROS ya da Aşırı NO oluşumundan kaynaklanan) ve p53 aktivite artışı sonucunda kaspaz-3 aktifleşerek hücrelerin apoptotik proteinleri uyararak hücre kontrollü şekilde yaşamsal faaliyetlerini sona erdirir. Son olarak demir şelatlayıcıların hücrenin sinyal yolları üzerinde yapmış olduğu bu değişimler onların proliferasyonunu ve yaşamsal aktivitelerini ne şekilde yönlendirdiğini incelediğimiz kaspaz-3 aktivitesine bakılmıştır. ME0055 ve ME0192 bileşikleri sırasıyla %90 ve %175'lik bir kaspaz-3 aktivitesi göstermiştir ki bu durum hücrelerin apoptoza uğradığına işaret eden güçlü bir bulgudur (Şekil3.2.- Şekil3.3.).

Kanser tedavilerinde amaç kontrollü bir şekilde hücrelerin proliferasyon hızını kontrol altına almak ve metastazını önlemek olduğundan, ME0055 ve ME0192 demir şelatlayıcılarının nöroblastoma kanser hücrelerinin proliferasyonu ve hücrelerin yaşamsal aktiviteleri üzerindeki etkisinin, proliferasyon ilişkili sinyal yolları ve yine proliferasyon ilişkili Speedy/RINGO proteini üzerinden incelenmesi önem arz etmektedir.

Bu çalışma ile kanser tedavisinde kemoterapiye destek amacıyla kullanılan demir şelatörleri ile benzer şekilde ME0055 ve ME0192 bileşiklerinin de aynı anti-proliferatif etkiyi sağlayabildikleri, bu iki bileşiğin ERK/MAPK, PI3K/AKT sinyal yolları ve Speedy/RINGO ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi sonucu literatüre **ilk kez** sunulmuştur. Bu çalışma demir metabolizmasındaki değişikliklerin kritik bir mitotik regülatör olan ve kanserleşmede adı sıkça geçen Speedy/RINGO protein ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu **ilk kez** olarak göstermesi bakımından da önemlidir.



#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında nöroblastoma kanserli hücrelerinde kullandığımız ME0055 ve ME0192 bileşiklerinin bu hücrelerin proliferasyon hızına olan azaltıcı etkisi gösterilmiş olup ni, bu etkinin mekanizmasını anlamak üzere ise bu bileşiklerin MAPK sinyal yolu üyelerinden MEK1/2 ekspresyonuna, PI3K/Akt sinyal yolağı üyelerinden AKT proteininin fosforilasyonuna ve hem bir hücre siklus regülatörü olan hem de bu iki sinyal yolunun iletişimde rolü olması muhtemel Speedy/RINGO ekspresyonuna olan etkileri incelenmiş, ayrıca hücrelerin apoptotik durumlarını anlayabilmek için de aktif kaspaz-3 analizi yapılmıştır. Sonuç olarak bu iki bileşiğın ERK/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolları üzerinde farklı düzeylerde inhibe edici etkileri olduğuna, Speedy/RINGO proteinin ekspresyonu üzerinde ise belirgin olarak inhibe edici etkisi olduğuna, ayrıca kaspaz-3 aktivitesini artırarak hücreleri apoptoza yönlendirme özelliğinde olduğuna dair önemli ipuçları ilk kez olarak literatüre sunulmuştur.

ME0055 ve ME0192 bileşikleri ile nöroblastoma hücrelerinde yapılmış olan bu çalışma farklı kanser türlerinde kanserleşmenin ortaya çıkışı ve tedaviye direnç gelişmesinin altında yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesine ve böylece tanı ve tedavide doğru hedeflerin seçilmesine olanak sağlayacak çalışmalara ışık tutacaktır. Bu tür çalışmaların ilerletilmesi ve çok yönlü in vitro ve in vivo analizlerin yapılması durumunda ileride demir şelatlayıcı salisiliden asilhidrazid temelli preparatların tedaviye destek amaçlı kullanımından daha geniş çapta ve daha bilinçli olarak faydalanılabilmemesinin önü açılacak ve literatüre büyük katkı sağlanacaktır.

## KAYNAKLAR

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts., K., Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell, New York: Garland Science.*
- Alessi, D., R., Andjelkovic, M., Caudwel, B. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15: 6541–6551.
- Aouad, F., Florence, A., Zhang Y., Collins, F., Henry, C., Ward, R.J., Crichton, RR. (2002) Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorganica Chimica Acta.*; 339:470–480.
- Avruch, J. (2007) MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta*, 1773:1150–1160.
- Barnham, KJ., Masters, CL., Bush, AI. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 3:205–214.
- Bergeron, R.J., Wiegand, J., McManis, J.S., Bussenius, J., Smith, RE., Weimar, WR. (2003) Methoxylation of desazadesferrithiocin analogues: enhanced iron clearing efficiency. *J Med Chem*, 46:1470–1477.
- Blatt, J. (1994) Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. *Anticancer Res*, 14:2109–2112.
- Blatt, J., Stitely, S. (1987) Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines. *Cancer Res*, 47:1749–1750.
- Blatt, J., Taylor, SR., Stitely, S. (1988) Mechanism of antineuroblastoma activity of deferoxamine *in vitro*. *J Lab Clin Med*, 112:433–436.
- Cappellini, MD., Taher, A. (2009) Deferasirox (Exjade) for the treatment of iron overload. *Acta Haematol*, 122:165–173.
- Ceci, A., Felisi, M., De Sanctis, V., De Mattia, D. (2003) Pharmacotherapy of iron overload in thalassaemic patients. *Expert Opin Pharmacother*, 4:1763–1774.

- Chang, F., Steelman, LS., Lee, JT., Shelton, JG., Navolanic, PM., Blalock, WL., Franklin, RA., McCubrey, JA. (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, 17:1263–1293.
- Chantrel-Groussard, K., Gaboriau, F., Padeloup, N., Havouis, R., Nick, H., Pierre, JL., Brissot, P., Lescoat, G. (2006) The new orally active iron chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox. *Eur J Pharmacol*, 541:129–137.
- Chaston, TB., Lovejoy, DB., Watts, RN., Richardson, DR. (2003) Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of Triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin Cancer Res*, 9:402–414.
- Crichton, RR., Boelaert, JR. (2001) Inorganic biochemistry of iron metabolism: From molecular mechanisms to clinical consequences. (New York: John Wiley and Sons).
- Dang, CV. (2012) MYC on the path to cancer. *Cell*, 149:22–35.
- De Alboran, IM., O'Hagan, RC., Gartner F., Malynn, B., Davidson, L., Ricker, R., Rajewsk, K., DePinho, RA., Alt, FW. (2001) Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*, 14:45–55.
- Dhillon, AS., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26:3279–3290.
- Downward, J. (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3:11–22.
- Estrov, Z., Tawa, A., Wang, XH., Dube, ID., Sulh, H., Cohen, A., Gelfand, EW., Freedman, MH. (1987) In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia. *Blood*, 69:757–761.
- Fleming, MD., Romano, MA., Su, MA., Garrick, LM., Garrick, MD., Andrews, NC. (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:1148–1153.
- Ford, SJ., Obeidy, P., Lovejoy, DB., Bedford, M., Nichols, L., Chadwick, C., Tucker, O., Lui, GY., Kalinowski, DS., Jansson, PJ., Iqbal, TH., Alderson, D.,

- Richardson, DR., Tselepis, C. (2013) Deferasirox (ICL670A) effectively inhibits oesophageal cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol*, 168:1316–1328.
- Fu, D., Richardson, DR. (2007) Iron chelation and regulation of the cell cycle: 2 mechanisms of posttranscriptional regulation of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21(CIP1/WAF1) by iron depletion. *Blood*, 110:752–761.
- Fukuchi, K., Tomoyasu, S., Watanabe, H., Kaetsu, S., Tsuruoka, N., Gomi, K. (1995) Iron deprivation results in an increase in p53 expression. *Bio Chem Hoppe Seyler*, 376:627–630.
- Fukushima, T., Kawabata, H., Nakamura, T., Iwao, H., Nakajima, A., Miki, M., Sakai, T., Sawaki, T., Fujita, Y., Tanaka, M., Masaki, Y., Hirose, Y., Umehara, H. (2011) Iron chelation therapy with deferasirox induced complete remission in a patient with chemotherapy-resistant acute monocytic leukemia. *Anticancer Res*, 31:1741–1744.
- Gao, J., Richardson, DR. (2001) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: the mechanisms involved in inhibiting cell-cycle progression. *Blood*, 98:842–850.
- Gizeh, P. T, Karlsson, E., Stal, O (2014) Clinical value of isoform-specific detection and targeting of AKT1, AKT2 and AKT3 in breast cancer, *Breast Cancer Manag*, 3(5), 409-421
- Goldie, Y. L., Kovacevic, Z, Vera, R., Angelica, M. (2015) Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signalig pathways. *Oncatarget*. 6: 22.
- Gschwind, A., Fischer, OM., Ullrich, A. (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 4:361–370
- Hann, HW., Evans, AE., Siegel, SE., Wong, KY., Sather, H., Dalton, A., Hammond, D., Seeger, RC. (1985) Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res*, 45:2843–2848.
- Hanover, JA., Dickson, RB. (1985). Transferrin: Receptor-Mediated Endocytosis and Iron Delivery. In: Pastan I, Willingham M, eds. *Endocytosis*, (New York: Springer US), pp. 131–161.

- Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., Korsmeyer, SJ. (2004) Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:15313–15317
- Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, EM. (1998) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 157:87–94
- Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z. (1984) Iron depletion: possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 123:716–723.
- Hibbs, JB., Jr., Taintor, RR., Vavrin, Z., Rachlin, EM. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, 157:87–94.
- Hubert, RS., Vivanco, I., Chen, E., Rastegar, S., Leong, K., Mitchell, SC., Madraswala, R., Zhou, Y., Kuo, J., Raitano, AB., Jakobovits, A., Saffran, DC., Afar, DE. (1999) STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:14523–14528.
- Hudis, CA. (2007) Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*, 357:39–51.
- Isobe, T., Baba, E., Arita, S., Komoda, M., Tamura, S., Shirakawa, T., Ariyama, H., Takaishi, S., Kusaba, H., Ueki, T., Akashi, K. (2011) Human STEAP3 maintains tumor growth under hypoferric condition. *Exp Cell Res*, 317:2582–2591.
- Izar, B., Rotow, J., Gainor, J., Clark, J., Chabner, B. (2013) Pharmacokinetics, clinical indications, and resistance mechanisms in molecular targeted therapies in cancer. *Pharmacol Rev*, 65:1351–1395.
- Jiang, XP., Elliott, RL., Head, JF. (2010) Manipulation of iron transporter genes results in the suppression of human and mouse mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res*, 30:759–765.
- Jordan, A., Reichard, P. (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*, 67:71–98.

- Kalinowski, DS., Richardson, DR. (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 57:547–583.
- Kandel, ES., Hay, N. (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253: 210–229.
- Kastan, MB., Canman, CE., Leonard, CJ. (1995) p53, cell-cycle control and apoptosis - implications for cancer. *Cancer Metast Rev*, 14:3–15.
- Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., Hirano, T. (1999) STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med*, 189:63–73.
- Kontoghiorghes, GJ., Piga, A., Hoffbrand, AV. (1986) Cytotoxic and DNA-inhibitory effects of iron chelators on human leukaemic cell lines. *Hematol Oncol*, 4:195–204.
- Kovacevic, Z., Chikhani, S., Lui, GY., Sivagurunathan, S., Richardson, DR. (2013) The iron-regulated metastasis suppressor NDRG1 targets NEDD4L, PTEN, and SMAD4 and inhibits the PI3K and Ras signaling pathways. *Antioxid Redox Signal*. 18:874–887.
- Kulp, KS., Green, SL., Vulliet, PR. (1996) Iron deprivation inhibits cyclin-dependent kinase activity and decreases cyclin D CDK4 protein levels in asynchronous MDA-MB-453 human breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 229:60–68.
- Kyriakou, D., Eliopoulos, AG., Papadakis, A., Alexandrakis, M., Eliopoulos, GD. (1998) Decreased expression of c-myc oncoprotein by peripheral blood mononuclear cells in thalassaemia patients receiving desferrioxamine. *Eur J Haematol*, 60:21–27.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., Cook, SJ. (2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, *Bim*. *J Biol Chem*, 278:18811–18816.
- Liu, W., Zhou, Y., Reske, SN., Shen, C. (2008). PTEN mutation: Many birds with one stone in tumorigenesis. *Anticancer Res* 28: 3613–3619.

- Lui, GYL., Kovacevic, Z., S VM, Kalinowski. DS, Merlot, AM., Sahni, S., Richardson, DR. (2015) Novel thiosemicarbazones regulate the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway: inhibition of constitutive and interleukin 6-induced activation by iron depletion. *Mol Pharmacol*, 87:543–560.
- Lui, GYL., Obeidy, P., Ford, SJ., Tselepis, C., Sharp, DM., Jansson, PJ., Kalinowski, DS., Kovacevic, Z., Lovejoy, DB., Richardson, DR. (2013) The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. *Mol Pharmacol*, 83:179–190.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O’Meally, R., Cole, RN., Pandey, A., Semenza, GL. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 145: 732–744.
- Mateyak, MK., Obaya, AJ., Sedivy, JM. (1999) c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Mol Cell Biol*, 19:4672–4683.
- Merlot, AM., Kalinowski, DS., Richardson, DR. (2013) Novel chelators for cancer treatment: where are we now? *Antioxid Redox Signal*, 18:973–1006.
- Milman, N., Pedersen, L.M. (2002) The serum ferritin concentration is a significant prognostic indicator of survival in primary lung cancer. *Oncol Rep*. 9:193–198
- Moncada, S., Palmer, RM., Higgs, EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43:109–142.
- Morgan, EH. (1981) Transferrin, biochemistry, physiology and clinical significance. *Mol Aspects Med*, 4:1–123.
- Nemeth, E., Tuttle, MS., Powelson, J., Vaughn, MB., Donovan, A., Ward, DM., Ganz, T., Kaplan, J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306:2090–2093.
- Ohgami, RS., Campagna, DR., Greer, EL., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, JJ., Fujiwara, Y., Barker, JE., Fleming, MD. (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*, 37:1264–1269.

- Ohyashiki, JH., Kobayashi, C., Hamamura, R., Okabe, S., Tauchi, T., Ohyashiki, K. (2009) The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci*, 100:970–977.
- Osaki, M., Oshimura, M., Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. *Apoptosis*, 9(6): 667-676.
- Pinnix, Z.K., Miller, L.D., Wang, W., D’Agostino, R., Jr., Kute, T., Willingham, MC., Hatcher, H., Tesfay, L., Sui, G., Di, X., Torti, SV. Torti, F.M. (2010) Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Sci Transl Med*. 2: 43ra56
- Potter, CJ., Pedraza, LG., Xu, T. (2002) Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 4: 658–665.
- Randy, F., Gastwirt, Christopher, W., McAndrew & Daniel, J. (2007) Donoghue Speedy/RINGO Regulation of CDKs in Cell Cycle, Checkpoint Activation and Apoptosis, *Cell Cycle*, 6:10, 1188-1193, DOI: 10.4161/cc.6.10.4252
- Rhodes, DR., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Varambally, R., Yu, J., Briggs, BB., Barrette, TR., Anstet, MJ., Kincaid-Beal, C., Kulkarni, P., Varambally, S., Ghosh, D., Chinnaiyan, AM. (2007) Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18, 000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*, 9:166–180.
- Richardson, D., Ponka, P., Baker, E. (1994) The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res*, 54:685–689.
- Richardson, DR., Baker, E. (1990) The uptake of iron and transferrin by the human malignant melanoma cell. *Biochim Biophys Acta*, 1053:1–12.
- Richardson, DR., Neumannova, V., Ponka P. (1995) Nitrogen monoxide decreases iron uptake from transferrin but does not mobilise iron from prelabelled neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1266:250–260.



- Richardson, DR., Ponka, P. (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1331:1–40.
- Richardson, DR., Lane, DJ., Becker, EM., Huang, ML., Whitnall, M., Suryo, Rahmanto, Y., Sheftel, AD., Ponka, P. (2010) Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:10775–10782.
- Roberts, PJ., Der, CJ. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26:3291–3310.
- Rybak, A., Bristow, R., Kapoor, A. (2014) Prostate cancer stem cells: Deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*, 6(4) DOI: 10.18632/oncotarget.2953
- Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 110:669–672.
- Selig, RA., White, L., Gramacho, C., Sterling-Levis, K., Fraser, IW., Naidoo, D. (1998) Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res*, 58:473–478.
- Shen, HM., Tergaonkar, V. (2009). NFκB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis* 14: 348–363.
- Shen, J., Sheng, X., Chang, Z., Wu, Q., Wang, S., Xuan, Z., Li, D., Wu, Y., Shang, Y., Kong, X., Yu, L., Li, L., Ruan, K., Hu, H., Huang, Y., Hui, L. (2014) Iron metabolism regulates p53 signaling through direct heme-p53 interaction and modulation of p53 localization, stability, and function. *Cell Rep*. 7:180–193.
- Soyer, HP., Smolle, J., Torne, R., Kerl, H. (1987) Transferrin receptor expression in normal skin and in various cutaneous tumors. *J Cutan Path*, 14:1–5.
- Taetle, R., Castagnola, J., Mendelsohn, J. (1986) Mechanisms of growth inhibition by anti-transferrin receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 46:1759–1763.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., Nakamura, Y. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a

p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*. 2000; 404:42–49.

Tansey, WP. (2014) Mammalian MYC Proteins and Cancer. *New J Sci*, 757534.

Thelander L, Reichard P. Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem*, 1979; 48:133–158.

Torti, SV., Torti, FM. (2011) Ironing out cancer. *Cancer Res*, 71:1511–1514.

Torti, SV., Torti, FM. (2013) Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer*, 13:342–355.

Tree, J. J., Wang, D., McInally, C., Mahajan, A., Layton, A., Houghton, I., Eloffsson, M., Stevens, M. P., Gally, D. L., and Roe, A. J. (2009) Characterization of the effects of salicylidene acylhydrazide compounds on type III secretion in *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun*, 77, 4209–4220.

Tsimberidou, A-M., Alvarado, Y., Giles, FJ. (2002) Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2:437–448.

Vazana-Barad, L., Granot, G., Mor-Tzuntz, R., Levi, I., Dreyling, M., Nathan, I., Shpilberg, O. (2013) Mechanism of the antitumoral activity of deferasirox, an iron chelation agent, on mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 54:851–859.

Walker, RA., Day, SJ. (1986) Transferrin receptor expression in non-malignant and malignant human breast tissue. *J Pathol*, 148:217–224.

Winterbourn, C., C. (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*. 82–83:969–974.

Yu, Y., Kovacevic, Z., Richardson., DR. (2007) Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell Cycle*, 6:1982–1994.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, SJ. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87:619–628.

Zhou, BP., Hu, MC., Miller, SA. (2000) HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 8027–7031.



# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

---

Ad Soyad	Süleyman ARZIMAN
Doğum Tarihi	01.08.1995
Doğum Yeri	Konak/İZMİR
Medeni Durumu	Bekar
Askerlik Durumu	Tecilli

## İletişim Bilgileri

---

Adres	14 Mayıs Mah. 4049 Sok. NO:3 Kat:2 Selçuk/İZMİR
Telefon	0544 748 46 15
E-mail	suleymanarziman@gmail.com

## Eğitim Bilgileri

---

2009-2013	Tire Kutsan Anadolu Lisesi
2013-2017 (Lisans)	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
2017- (Yüksek lisans)	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik

## Yayın Bilgileri

---

**Uluslararası kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve tam metin olarak yayımlanan bildiri**

1-) Arzıman Süleyman, Zengin Talip, Baysal Ömür, Baştaş Kubilay Kurtuluş, 2017. In-silico analysis on gene sequence encoding type III effector proteins reflect similar host- speciation for bacterial pathogens infecting tomato. 4th ICSAE

## Bilimsel Faaliyetler

---

1) Muğla Multidisipliner Onkolojik Araştırmalar Sempozyumu, Muğla, Bodrum, 5-7 Ekim 2018, Katılımcı

2) IX. Fen Bilimleri Araştırma Sempozyumu, Muğla, Atatürk Kültür Merkezi Fuaye Alanı, 15 Mayıs 2019, Poster Sunumu

## Yabancı Dil

---

İngilizce

Yazma : orta, Konuşma: orta

## Yetkinlikler

---

Bilgisayar

Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint), SPS,  
PHP, Java