



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÖZGÜN METİL JASMONAT MİMETİKLERİNİN HÜCRE  
CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİNLİKLERİNİN İNSAN AKCİĞER  
VE YUMURTALIK KANSER HATLARINDA İNCELENMESİ**

BÜŞRA EMİNE YAZICI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç.Dr. ESRA ÇAĞAVİ

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç.Dr. MUSTAFA GÜZEL

İSTANBUL- 2021

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji  
Tez Sahibi : Büşra Emine YAZICI  
Tez Başlığı : Özgün Metil Jasmonat Mimetiklerinin Hücre Canlılığı  
Üzerine Etkinliklerinin İnsan Akciğer ve Yumurtalık Kanseri  
Hatlarında İncelenmesi  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 11.01.2021

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Doç.Dr. Esra ÇAĞAVI	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<b><u>Sınav Jüri Üyeleri</u></b>		
Doç.Dr. Mustafa GÜZEL	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof.Dr. Nuri ÖZTÜRK	Gebze Teknik Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../ ..... tarih ve ...../..... - ..... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.**

## TEŞEKKÜR

Benden hiçbir konuda destek ve yardımlarını esirgemeyip çalışma sürecim boyunca bana destek olarak hayatımın en verimli yıllarını yaşatan danışmanlarım Doç.Dr. Esra ÇAĞAVI'ye, Doç.Dr. Mustafa GÜZEL'e,

Tecrübelerini ve bilgilerini her fırsatta bana aktaran yardımlarıyla çalışmam süresince destek olan Yrd.Doç.Dr. Nihal KARAKAŞ'a,

Bütün ekip arkadaşlarım ve değerli REMER ailesine,

Süreç boyu hep yanımda olarak her aşamamda maddi ve manevi her desteği sağlayan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

BÜŞRA EMİNE YAZICI

# İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAY FORMU</b> .....	<b>i</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>6</b>
4.1. Kanser Hastalığı ve Geleneksel Tedavi Yaklaşımları.....	6
4.2. Kanserde Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımları.....	7
4.3. Hedefe Yönelik Kanser Tedavilerinde Küçük Moleküller.....	8
4.3.1. Oleuropein ve Etki Mekanizması.....	9
4.3.2. Cisplatin ve Etki Mekanizması.....	11
4.3.3. Docetaxel ve Etki Mekanizması.....	12
4.3.4. 5-Florourasil ve Etki Mekanizması.....	12
4.4. Kanser Oluşum Mekanizmaları.....	13
4.5. Kanser Hücre Metabolizması.....	15
4.6. Jasmonat Ailesi ve Metil Jasmonat.....	21
4.7. Jasmonatların Etki Mekanizmaları.....	22

4.7.1. Biyoenerjetik Mekanizma.....	23
4.7.1.1. MeJA'nın Sitotoksik Etkisine PI3K/Akt Yolunun Dahil Olması...24	
4.7.1.2. MeJA'nın Amitokondriyat Bir Parazit Olan T. Vaginalis Üzerindeki Etkisi.....	25
4.7.2. Yeniden Farklılaşma Mekanizması.....	26
4.7.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Aracılı Apoptoz.....	27
4.8. MeJA ve Hücre Ölüm Yolakları.....	28
4.9. MeJA ve Metastaz.....	29
4.10. MeJA Arabidopsis'te Çoğalmayı Baskılar.....	30
4.11. MeJA'nın Diğer Antikanser İlaçlarla Kombinasyonu.....	30
<b>5. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>32</b>
5.1. Hekzokinaz-2 Enzim Aktivite Deneyi.....	33
5.2. Hücre Kültürü.....	34
5.3. Hücre Canlılığı Analizi.....	36
5.4. Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi.....	42
5.4.1. Hücre Lizisi ve Protein İzolasyonu.....	42
5.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)...44	
5.4.2.1. Jel Hazırlama.....	44
5.4.3. İmmün Blotlama.....	46
5.4.3.1. Membrana Transfer İşlemi (Semi-dry Yöntem).....	46
5.4.3.2. Birincil ve İkincil Antikor eklenmesi ve Görüntüleme.....	47
5.4.4. İstatistiksel Yöntemler.....	48

5.5. Antikorlar Yardımı ile Protein Çöktürme (İmmünopresipitasyon).....	48
5.5.1. Mitokondriyal Protein Lizatının Elde Edilmesi.....	48
5.5.2. İmmünopresipitasyon.....	49
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>50</b>
6.1. HK-2 Enzim Aktivite Deney Sonuçları.....	50
6.2. A549 Hücre Hattında Özgün MeJA mimetiklerinin Hücre Canlılık Analizi Sonuçları.....	51
6.3. SKOV-3 Hücre Hattında Özgün MeJA mimetiklerinin Hücre Canlılık Analizi Sonuçları.....	55
6.4. MeJA ve Bileşik 1'in 3T3 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkinliklerinin Değerlendirilmesi.....	57
6.5. OLE, CDDP, 5-FU, DTX Moleküllerinin SKOV-3 ve A549 Hücre Hatlarında Tespit Edilen IC <sub>50</sub> Değerleri.....	59
6.6. OLE, CDDP, 5-FU, DTX Moleküllerinin SKOV-3 ve A549 Hücre Hatlarında Özgün MeJA Mimetği Bileşik 3 ile Kombine Denenmesi.....	61
6.7. HK-2, PARP ve c-PARP Protein Ekspresyon Düzeylerinin İmmün Blotlama Yöntemi Kullanılarak A549 Hücre Hattında Araştırılması.....	63
6.8. A549 Hücrelerinin Bileşik 3 ile Muamelesi Sonrası HK-2 ve VDAC Etkileşiminin İmmünopresipitasyon Yöntemi ile Araştırılması.....	66
<b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>68</b>
<b>8. KAYNAKLAR.....</b>	<b>77</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>90</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 5.3.1.</b> Hücre canlılık deneyinde kullanılan hücreler, maddeler ve konsantrasyonlar.....	39
<b>Tablo 5.3.2.</b> Hücre hatlarında denenmiş özgün moleküller. Reaksiyon verimi dolayısıyla bazı özgün moleküller sadece tek bir hücre hattında denenmiştir.....	39
<b>Tablo 5.3.3.</b> Maddelerin A549 ve SKOV-3 hücre hattındaki IC <sub>50</sub> değerlerinin tespiti için belirlenen konsantrasyonlar.....	40
<b>Tablo 5.3.4.</b> Maddelerin SKOV-3 hücre hattında kombine halde denendiklerinde oluşturacakları düşünülen sinerjik etkiyi görebilmek ve bu durumdaki IC <sub>50</sub> değerini tanımlayabilmek için belirlenen konsantrasyonlar.....	40
<b>Tablo 5.3.5.</b> Maddelerin A549 hücre hattında kombine halde denendiklerinde oluşturacakları düşünülen sinerjik etkiyi görebilmek ve bu durumdaki IC <sub>50</sub> değerini tanımlayabilmek için belirlenen konsantrasyonlar.....	41
<b>Tablo 5.4.2.1.1.</b> Ayrıştırma jeli hazırlama.....	44
<b>Tablo 5.4.2.1.2.</b> Yığılma jeli hazırlama.....	45
<b>Tablo 6.1.1.</b> HK-2 enzim inhibisyonunu ölçmek için kullanılan The Universal Enzyme Assay Kit sonucu alınan dataların yorumlanmasıyla elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri.....	50
<b>Tablo 6.2.1.</b> Özgün MeJA mimetiklerinin A549 hücre hattında denenmesi sonucu elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri.....	54
<b>Tablo 6.3.1.</b> Özgün MeJA mimetiklerinin SKOV-3 hücre hattında denenmesi sonucu elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri.....	56
<b>Tablo 6.5.1.</b> OLE, CDDP, DTX ve 5-FU moleküllerinin SKOV-3 hücre hattında tespit edilen IC <sub>50</sub> değerleri ve literatürde bu moleküllerle yapılan çalışmalarda tespit edilen IC <sub>50</sub> değerlerinin karşılaştırılması.....	59



**Tablo 6.5.2.** OLE, CDDP, DTX ve 5-FU moleküllerinin A549 hücre hattında tespit edilen  $IC_{50}$  değerleri ve literatürde bu moleküllerle yapılan çalışmalarda tespit edilen  $IC_{50}$  değerlerinin karşılaştırılması.....60

**Tablo 6.5.3.** OLE, CDDP, DTX ve 5-FU moleküllerinin A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında tespit edilen  $IC_{50}$  değeri grafikleri.....60

**Tablo 6.6.1.** OLE, CDDP, 5-FU, DTX moleküllerinin SKOV-3 ve A549 hücre hatlarında özgün MeJA mimetiği Bileşik 3 ile kombine denenmesi sonucu tespit edilen  $IC_{50}$  değerleri.....61

**Tablo 6.6.2.** OLE, CDDP, 5-FU, DTX moleküllerinin SKOV-3 ve A549 hücre hatlarında özgün MeJA mimetiği Bileşik 3 ile kombine denenmesi sonucu tespit edilen  $IC_{50}$  değerlerinin grafikleri.....62

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.3.1.1. Oleuropein molekülünün kimyasal yapısı.....	10
Şekil 4.3.1.2. OLE'nin hücrel sinyal molekülü üzerindeki etkileri. OLE Akt'yi inhibe eder, p53 ve Bax ekspresyonunu arttırırken Bcl-2 ve HIF-1a'yı inhibe eder.....	10
Şekil 4.3.2.1. Cisplatin molekülünün kimyasal yapısı.....	11
Şekil 4.3.3.1. Docetaxel molekülünün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 4.3.4.1. 5-Florourasil molekülünün kimyasal yapısı.....	13
Şekil 4.4.1. p53'ün mutasyona uğraması sonucu hücre kaderinin belirlenmesi.....	15
Şekil 4.5.1. Hekzokinaz enzimlerinin hücre içi görevleri ve Hekzokinaz türleri.....	19
Şekil 4.5.2. Apoptozun uyarılmasında intrinsik ve ekstrinsik yollar.....	20
Şekil 4.6.1. Doğada bulunan jasmonatların kimyasal yapıları.....	22
Şekil 5.1. MeJA ve sentezlenen özgün MeJA mimetiklerinin kimyasal yapıları.....	32
Şekil 5.3.1. Thoma lamında bulunan alanlar.....	37
Şekil 5.3.2. Thoma lamı görüntüsü.....	38
Şekil 5.3.3. CellTiter-Glo deney kitinin çalışma prensibi.....	42
Şekil 6.2.1. A549 hücrelerinin MeJA ile 24 saat muamelesi sonucu hücre mikroskop görüntüleri.....	52
Şekil 6.2.2. A549 hücrelerinin Bileşik 3 ile 24 saat muamelesi sonucu hücre mikroskop görüntüleri.....	52
Şekil 6.2.3. A549 hücre hattında A) uygulama yapılmayan hücrelerin, B) %2,5 DMSO ile muamele edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri.....	53
Şekil 6.2.4. MeJA ile karşılaştırmalı olarak Bileşik 1, 3, 9 ve 12'nin A549 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterildiği sütun grafiği.....	53

Şekil 6.2.5. Bileşik 3'ün A549 hücre hattı üzerinde denenmesi ile elde edilen hücre canlılığı sonuçlarının analizi ve IC <sub>50</sub> değerinin tespit edilmesi.....	54
Şekil 6.3.1. MeJA ile karşılaştırmalı olarak Bileşik 1, 3, 9 ve 12'nin SKOV-3 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterildiği sütun grafiği.....	55
Şekil 6.3.2. Bileşik 3'ün SKOV-3 hücre hattı üzerinde denenmesi ile elde edilen hücre canlılığı sonuçlarının analizi ve IC <sub>50</sub> değerinin tespit edilmesi.....	56
Şekil 6.4.1. MeJA ile karşılaştırmalı olarak Bileşik 1'in 3T3 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterildiği sütun grafiği.....	58
Şekil 6.4.2. Bileşik 1'in 3T3 hücre hattı üzerinde denenmesi ile elde edilen hücre canlılığı sonuçlarının analizi ve IC <sub>50</sub> değerinin tespit edilmesi.....	58
Şekil 6.7.1. Bileşik 3 ile muamele edilmiş A549 akciğer kanseri hücre hattının HK-2 protein ekspresyonu seviyeleri.....	64
Şekil 6.7.2. Bileşik 3 ile muamele edilmiş A549 akciğer kanseri hücre hattının PARP kesilme seviyeleri.....	65
Şekil 6.7.3. Bileşik 3 ile muamele edilmiş A549 akciğer kanseri hücre hattının PARP ekspresyon seviyeleri.....	66
Şekil 6.8.1. Bileşik 3 ve DMSO (kontrol) ile muamele edilmiş A549 akciğer kanseri hücre hattının mitokondriyal protein ekstraktlarında HK-2 bağlı VDAC ekspresyonu.....	67

## KISALTMALAR

2-DG	: 2-Deoksi Glikoz
5-FU	: 5-florourasil
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
AIPC	: Androjen Bağımsız Prostat Kanseri
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
ATP	: Adenozin Trifosfat
CDDP	: Cisplatin
CJ	: Cis Jasmon
CML	: Kronik Miyelositik Lösemi
dH <sub>2</sub> O	: Distile Su
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DTX	: Docetaxel
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FDA	: Food and Drug Administration
g	: Gram
GF	: Büyüme Faktörü
GFR	: Büyüme Faktörü Reseptörü
GPCR	: G Protein Kenetli Reseptör
HIF- 1 $\alpha$	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör 1 $\alpha$
HK	: Hekzokinaz
HSP	: Heat Shock Protein
IC <sub>50</sub>	: Yarı Maksimal İnhibisyon Konsantrasyonu

JA	: Jasmonik Asit
kDa	: Kilodalton
MeJA	: Metil Jasmonat
mL	: Mililitre
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
OLE	: Oleuropein
PI3K	: Fosfatidil İnositol 3- Kinaz
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rpm	: Rotations Per Minute
SAR	: Sistemik Edinilmiş Direnç
TCA	: Trikarboksilik Asit
TK	: Tirozin Kinaz
TTP	: Tristetraprolin
VDAC	: Voltaj Bağımlı İyon Kanalları

## 1. ÖZET

### ÖZGÜN METİL JASMONAT MİMETİKLERİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİNLİKLERİNİN İNSAN AKCİĞER VE YUMURTALIK KANSER HATLARINDA İNCELENMESİ

Kanser dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın hastalıkların başında gelmektedir. Warburg hipotezine göre, kanser hücrelerinin enerji tüketimi normal hücrelerden farklıdır. Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak oksijen varlığında dahi glikoliz yolu üzerinden enerji üretmeyi tercih etmektedir. Glikolizdeki ilk adım, glikozun glikoz-6-fosfata fosforilasyonudur. Bu reaksiyon, tümör hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bilinen Hekzokinaz-2 enzimi (HK-2) tarafından katalize edilir. Kanser hücrelerinin beslenmesi, HK-2 enziminin inhibe edilmesiyle engellenebilir. Literatürde, Metil Jasmonat (MeJA), mitokondriyal membran üzerinde VDAC ve HK-2 etkileşimini ortadan kaldırdığı için bir HK-2 inhibitörü olarak bilinir. Bu çalışmada HK-2 enzimi ve özgün MeJA mimetikleri arasındaki etkileşim esas alınarak farklı kanser hücrelerinde hücre canlılığı analizleri yapılmıştır. Araştırılan iki farklı kanser hücresi hattında elde edilen verilere dayanarak, sentezlenen özgün MeJA mimetiklerinin orijinal molekülden daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca özgün MeJA mimetiklerinin kanser tedavilerinde kullanılan Oleuropein, Cisplatin, Docetaxel ve 5-florourasil maddeleriyle kombine uygulandığında bu maddelerin tek başlarına belirlenen IC50 değerlerinin altında etki gösterdiği tespit edilmiştir. HK-2 inhibisyonu üzerinden hücre ölümünün indüklenmesine dair sonuçlar, immün blotlama tekniği ile c-PARP protein miktarının arttığı gösterilerek desteklenmiştir. İmmünopresipitasyon yöntemi ile özgün MeJA mimetiklerinin HK-2 ile VDAC etkileşimini kestiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada uygun modifikasyonlarla sentezlenen özgün MeJA mimetikleri ile kanser hücrelerinde hücre ölüm mekanizmalarını aktifleştirerek kanser tedavisinde enerji metabolizması hedefli yeni bir yola dair veriler ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Hekzokinaz-2, Kanser Tedavisi, Metil Jasmonat, Sinerjik Etki, Warburg Etkisi

Bu Tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK 215S890 adlı proje ile desteklenmektedir.

## **2. ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NOVEL METHYL JASMONATE MIMETICS ON CELL VITALITY IN HUMAN LUNG AND OVARIAN CANCER LINES**

Cancer is one of the most common diseases in our country as well as in the world. According to the Warburg hypothesis, energy consumption of cancer cells is different from normal cells. Unlike normal cells, cancer cells produce energy through glycolysis even in the presence of oxygen. The first step in glycolysis is the phosphorylation of glucose to glucose-6-phosphate. This reaction is catalyzed by the Hexokinase-2 (HK-2) enzyme, which is known to be overexpressed in tumor cells. The nutrition of cancer cells can be inhibited by inhibiting the HK-2 enzyme. In the literature, Methyl Jasmonate (MeJA) is known as an HK-2 inhibitor as it eliminates the interaction of VDAC and HK-2 on the mitochondrial membrane. In this study, cell viability analyzes were performed in different cancer cells based on the interaction between HK-2 enzyme and novel MeJA mimetics. Based on the data obtained from two different cancer cell lines investigated, it has been shown that the novel MeJA mimetics are stronger than MeJA itself. In addition, it has been determined that when novel MeJA mimetics are applied in combination with Oleuropein, Cisplatin, Docetaxel and 5-fluorouracil substances used in cancer treatments, these substances alone show an effect below the IC50 values determined. The results of inducing cell death through HK-2 inhibition were supported by the immunoblotting technique showing that the amount of c-PARP protein increased. By performing the immunoprecipitation method it has been determined that novel MeJA mimetics detach HK-2 from VDAC. In this study, data on a new pathway aimed at energy metabolism in cancer treatment by activating cell death mechanisms in cancer cells with novel MeJA mimetics synthesized with appropriate modifications is obtained.

**Key Words:** Cancer Therapy, Hexokinase-2, Methyl Jasmonate, Synergistic Effect, Warburg Effect

This study was supported by Turkish Scientific and Technical Research Council – TUBITAK, Project number: 215S890.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, organizmada meydana gelen kontrolsüz hücre büyümesi ve metastaz ile karakterize olan kötü huylu tümörlerdir. Kanser hastalığı genetik yatkınlık ile ortaya çıkabileceği gibi, kimyasal ve fiziksel etmenler sebebiyle hücrelerde mutasyonların oluşması sebebiyle de meydana gelebilir (1). Kanser tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en yaygın hastalıklardan biridir. Günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri hala yeterli değildir. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemleri olarak cerrahi müdahale yöntemi ile tümörün uzaklaştırılması, kimyasal ajanlar yardımıyla kanserli hücrelerin çoğalmasının ve beslenmesinin engellenmesi ve radyoterapi yöntemi ile kanserli dokunun radyasyona maruz bırakılması sayılabilir. Kemoterapi ajanlarının ise insan vücuduna verdiği zarar oldukça fazladır. Çünkü bu tür ajanlar kanserli hücrelerde spesifik hedeflere yönelik değil, kanser hücrelerinin artmış metabolik aktivitelerini ve çoğalma yeteneklerinin baskılamaya yöneliktir. Bu durum vücuttaki metabolik olarak aktif ve aktif olarak bölünen diğer hücrelerin de kemoterapiden etkilenmesiyle sonuçlanmaktadır (2). Bu nedenlerle, bilim dünyasında, kanser tedavisi alanında yeni ilaç geliştirme çalışmaları hızla devam etmektedir. Kanser metabolizması ise bilim dünyasında son yıllarda oldukça fazla araştırma konusu olan bir çalışma alanıdır. Özellikle kanser enerji metabolizmasında sağlıklı hücrelere kıyasla meydana gelen değişiklikler ve düzenlenmeler kanser metabolizmasını hedef haline getirmektedir. HK-2, kanser hücrelerinin glikozu enerjiye ve kanser hücresi büyümesini besleyen yapı taşlarına dönüştürmesini sağlayan yoldaki ilk enzimdir ve G protein kenetli reseptör ailesine dahildir. Hekzokinaz enzimi glikozun fosforilasyonu ile glukoz-6-fosfat'ın oluştuğu glikoliz yolağının ilk basamağını katalize eder. Hekzokinazın dört farklı tipi bulunmaktadır. Bunlar HK-1, HK-2, HK-3 ve HK-4'tür (3). HK-2 normalde kalp, iskelet ve yağ hücrelerinde baskın bir izoformdur, ancak birçok tümör türünde ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Ayrıca HK-2 enziminin mitokondri üzerindeki voltaj bağımlı iyon kanallarına (VDAC) bağlanarak hücrelerin içsel yolak ile apoptoza uğramasını engellediği tespit edilmiştir (4).

Jasmonatlar iyi bilenen önemli bitki sinyal molekülleridir. Özellikle yasemin bitkisi tarafından bolca üretilen ve bitkiye stres koşullarında avantaj sağlamaya



yönelik çalışan sekonder metabolitlerdir. Jasmonat ailesi Cis-jasmon (CJ), Jasmonik Asit (JA) ve Metil Jasmonattan (MeJA) meydana gelir. Bunlardan MeJA'nın memeli HK-2 enzimine spesifik olarak bağlandığı ve bu enzimin mitokondri üzerinde bulunan VDAC ile etkileşimini bozarak HK-2 enziminin mitokondriden ayrılmasına ve daha sonrasında sitokrom c salınımına yol açtığı gösterilmiştir (5).

Bu çalışma kapsamında sentezlenen 16 özgün MeJA analogundan büyük bir bölümünün HK-2 enzim aktivite testleri ve hücre canlılığı deneyleri sonucunda sentezlenen bu moleküllerden bazılarının bilinen HK-2 inhibitörlerinden daha aktif moleküller olduğu tespit edilmiştir. HK-2 enziminin çalışma prensibi esas alınarak hazırlanmış olan HK-2 enzim aktivite deneyi sonuçlarına göre sentezlenmiş olan 9 özgün MeJA mimetiğinin HK-2 enziminin inhibisyonunda MeJA'dan daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Hücre canlılık deneyleri ile, sentezlenmiş 16 özgün MeJA mimetiği belirli konsantrasyon aralığında A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında 24 saat boyunca denenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda hücre canlılığı baz alınarak moleküllerin IC<sub>50</sub> dozları belirlenmiştir. A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında yapılan hücre canlılığı deney sonuçlarına göre ise A549 akciğer kanser hücre hattıyla yapılan çalışmalarda MeJA'dan daha aktif 2 adet özgün MeJA mimetiği, SKOV-3 hücre hattında ise MeJA'dan daha aktif 1 adet özgün MeJA mimetiği olduğu tespit edilmiştir.

Sinerjik etki çalışmaları için daha önce A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında hücre canlılık analizleri yapılmış ve IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilmiş MeJA mimetikleri içinden iki hücre hattında da en aktif olan molekül Bileşik 3 ile Oleuropein (OLE), Cisplatin (CDDP), Docetaxel (DTX) ve 5-florourasil (5-FU) maddelerinin, her bir maddenin Bileşik 3 ile kombine etkisinin ayrı ayrı araştırılmak üzere, belirli bir doz aralığında kombine bir şekilde hücrelerle muamele edilmesi sonucu hücrelerde bu moleküller için daha öncesinde tespit edilen IC<sub>50</sub> değerlerinde düşüş görülüp görülmeyeceği araştırılmıştır. Sinerjik etki çalışmalarında A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında en aktif çıkan MeJA mimetiği olan Bileşik 3 ile kombine bir şekilde kullanılan OLE, CDDP, DTX ve 5-FU maddelerinin sinerjik etki gösterdiği ve IC<sub>50</sub> değerlerinde azalma tespit edilmiştir. Bileşik 3 ile kombine olarak hücrelerle 24 saat boyunca muamele edilen moleküllerin, daha öncesinde yine bu hücre hatlarında tespit edilen IC<sub>50</sub> değerlerinin altında etki gösterdiği görülmüştür.

Yapılan Western blot çalışmalarında en aktif MeJA mimetiği olan Bileşik 3'ün IC<sub>50</sub> dozu A549 hücreleri ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir ve bu sürenin sonunda hücrelerden total protein eldesi yapılmıştır. Western blot çalışmaları kapsamında elde edilen proteinlerde kontrol grubu ile IC<sub>50</sub> dozu uygulanan Bileşik 3 grubu HK-2 proteini, PARP ve c-PARP proteinleri anlatımı açısından karşılaştırılmış ve bulunan sonuçlar analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre Bileşik 3 ile muamele edilen hücrelerde HK-2 enziminin anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca Bileşik 3'ün IC<sub>50</sub> dozu ile muamele edilen hücrelerde PARP proteininin miktarının kontrol grubuna kıyasla azaldığı ve bununla uyumlu olarak c-PARP proteinin miktarının ise kontrol grubuna oranla arttığı tespit edilmiştir.

Yapılan immünopresipitasyon çalışmalarında ise özgün MeJA mimetiği olan Bileşik 3'ün IC<sub>50</sub> dozu ile muamele edilen A549 hücrelerinden mitokondriyal protein izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra elde edilen protein özütü içerisindeki HK-2 proteinleri elde edilmiş ve bu proteinler Western blotlama işlemine tabi tutularak VDAC proteini tespiti yapılmıştır. Bulgulara göre Bileşik 3 ile muamele edilen grupta VDAC proteini miktarı kontrol grubuna göre daha az olduğu tespit edilmiştir.

Amacımız, kanser hücreleri üzerinde MeJA'ya göre daha düşük dozlarda etki gösterebilen özgün MeJA mimetiklerinin tespit edilmesi, bu mimetikler içerisinde seçilen en düşük dozda etki gösteren mimetiğin, OLE, CDDP, DTX ve 5-FU maddeleri ile kombine kullanım ile sinerjik etkinin araştırılması ve bu süreçlerde rol alan mekanizmaların tespitidir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Kanser Hastalığı ve Geleneksel Tedavi Yaklaşımları

Organizmada meydana gelen ve hücreleri kontrolsüz büyüyen kötü huylu tümörlere kanser denir. Kanser hastalığına yol açan nedenler olarak genetik yatkınlık, immünite, kimyasal etkenler, fiziksel etkenler (UV radyasyon), biyolojik etkenler (virüs vb.) ve yaşama biçimi sayılabilir. Kanser kendini göstermesi, gelişimi ve sonuçları hastadan hastaya hem makro hem moleküler düzeyde karmaşıklık ve heterojenlik gösterir. Mutasyona uğrayan bir gen; kritik bir proteinin anormal düzeyde üretimine (çok az ya da çok fazla), anormal bir protein üretimine (işlev kazanmış veya kaybetmiş) veya proteinin hiç olmamasına neden olabilir. Kanser hastalığında protoonkogenlerin ve tümör supresör genlerin mutasyona uğraması kanser gelişimi açısından kritiktir. Her kanser türü için farklı bir yol izlenmekle birlikte genel olarak kanser tedavisine yönelik sayılabilecek tedavi yaklaşımları; tümörün cerrahi olarak uzaklaştırılması, radyoterapi ile tümörün bulunduğu bölgenin radyasyona maruz bırakılması ve bölünen hücreleri hedef alarak bölünmeyi durdurup hücrelerin apoptoza gitmesini indükleyen kemoterapi olarak üç ana başlıkta sayılabilir. Bu tedaviler tümör hücrelerine yönelik olmaktan çok tümörü ve bulunduğu ortamı hedef alan ya da aktif olarak bölünen hücrelere (antineoplastik ve/veya antiproliferatif) etki etmeye yöneliktir. Bu şekilde tümöre özgü olmayan tedaviler sonucunda hastalarda oldukça fazla yan etkiler görülmekte ve tedavi sırasındaki yaşam kalitesi oldukça düşmektedir. Kanser hücrelerine özgün olmayan bu tedavilerde sağlıklı hücrelerin ve organların zarar görmesinin yanı sıra bu tedavilerden kaçabilen tümör hücrelerinin hastalığın nüksetmesine neden olması durumu da görülmektedir. Bu sebepler tümör hücrelerine spesifik tedavi yöntemlerine ve kimyasal ajanlara olan ihtiyacın büyüklüğünü, geleneksel tedavi yöntemlerine direnç kazanan kanser türlerinin varlığı da göz önüne alınarak değerlendirildiğinde yeni spesifik stratejilerin ve ajanların geliştirilmesi ve uygulanabilir hale getirilmesine olan ihtiyacın önemini göstermektedir (2,6).

Kanser hücre hatları başarılı ilaç keşif araçları olduklarını kanıtlamışlardır, ancak özellikle kanserin çeşitliliğini tekrarlama konusundaki sınırlı kapasiteleri nedeniyle klinik öngörü gücü konusunda eksik kalmaktadırlar. Kanser hücre hatları, kanser hastalığına dair bilgi edinme, kanser hücre davranışlarını gözlemleme ve kansere karşı tedavi geliştirme çalışmalarında ön data elde etmek için sıklıkla

kullanılmaktadır (7). A549 hücreleri adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücreleridir ve ilk olarak 1972'de D. J. Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki beyaz bir erkeğin eksplante edilen kanserli akciğer tümör dokusunun çıkarılması ve kültürlenmesi yoluyla elde edilmiştir. Bu adenokarsinomik hücre hattı, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (NSCLC) olarak kategorize edilir; bu hat, daha az agresif olma eğilimindedir ve küçük hücreli akciğer karsinomundan (SCLC) daha yavaş yayılır, ancak görülme sıklığı daha fazladır ve tüm akciğer kanseri vakalarının %85-88'ini oluşturur. A549 hücreleri, ilaç gelişimi bağlamında, sırasıyla hücre kültürü ve ksenograftlama yoluyla hem in vitro hem de in vivo olarak Paclitaxel, DTX ve Bevacizumab gibi yeni ilaçlar için test alanı olarak hizmet vermiştir (8).

SKOV-3, epitel benzeri morfolojiye sahip bir insan yumurtalık kanseri hücre hattıdır. Bu hücre hattı, yumurtalık adenokarsinomu olan 64 yaşındaki kafkas ırkından bir dişinin assitinden 1973 yılında oluşturulmuştur. Bu hücreler, tümör nekroz faktörüne ve difteri toksini, CDDP ve adriamisin dahil çeşitli sitotoksik ilaçlara dirençlidir. Bu hücrelerin bağışıklığı baskılanmış farelere intraperitoneal enjeksiyonu, iki ila üç ay içinde berrak hücre adenokarsinomuna (clear cell adenocarcinoma) benzeyen tümörlerin oluşmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (9).

3T3 hücreleri, 1962'de New York Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Departmanı'nda George Todaro ve Howard Green tarafından elde edilen bir hücre hattından gelmektedir. Todaro ve Green, 3T3 hücrelerini orijinal olarak İsviçre albino fare embriyo dokusundan elde etmiştir. Tadaro, Maryland'deki Ulusal Kanser Enstitüsünde NIH İsviçre fare embriyosundan izolasyon prosedürünü tekrarlamış ve NIH/3T3 hücre hattını oluşturmuştur. Bu hücrelerde kontak inhibisyon görülür. 3T3 hücreleri hipertriploiddir. Modal kromozom sayısı, hücrelerin %30'unda görüldüğü üzere 68'dir (10).

## **4.2. Kanserde Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımları**

Kanserde hedefe yönelik tedavi yaklaşımları genellikle kanser hücrelerinde apoptotik yolları düzenleyen, hücrelerin ekstrinsik ve intrinsik sinyallerle hücre ölümünün herhangi birine yönlendirilmesini engelleyen, tümör hücrelerinin diğer dokulara metastazını ve buldukları dokuya invazyonunu sağlayan mekanizmalarını

ve bu yollarda görev alan spesifik moleküllerin işlevlerini engellemek üzerinedir. Günümüzde lösemi, meme, akciğer, yumurtalık kanseri gibi birçok kanser tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA- Food and Drug Administration) tarafından onaylı hedefe yönelik tedaviler uygulanmakta ve dikkate değer klinik başarı yakalanmaktadır. Hedefe yönelik kanser tedavilerinde hedeflenen moleküller kanser hücrelerinde farklı görevleri yerine getiren gruplardan seçilebilir (11). Bu yolları hedeflemek için kullanılan ajanlar küçük moleküller, monoklonal antikolar, gen terapisi ve immünoterapotik kanser aşuları şeklinde sınıflandırılır (12) (13). Bu yollar hedeflenerek hücre döngüsünü inhibe ederek hücrenin normal çoğalmasını teşvik eden molekülleri inhibe eden, hücre ölümünün uyarılmasını engelleyen ve hücre ölüm sinyallerini bloke eden, kanser hücre çoğalmasını ve büyümesini indükleyen sinyallerin ve buna bağlı moleküllerin işlevleri engellenebilir (13). Bunun dışında hedefe yönelik tedavilerle immün sistem, tümör mikroçevresi içerisindeki belirli moleküllere karşı uyarılarak tümör dokusunu hedef olarak tanıyabilir (14). Bu tedaviler kombine halde kullanılarak da tümör ilerleyişi, metastazı ve dirençli hale gelmiş tümörleri tedaviye cevap vermesi sağlanabilir (15). İlaç kombinasyonu ile tedavide başlıca amaçlar sinerjistik terapötik etki, doz ve toksisiteyi düşürmek ve ilaç direncinin indüksiyonunu en aza indirmek veya geciktirmektir (16). Toksikiteyi azaltma ve direnci en aza indirme yararları sinerjinin en güçlü sonuçları olarak sayılabilir (17).

### **4.3. Hedefe Yönelik Kanser Tedavilerinde Küçük Moleküller**

Küçük molekülü kanser ilaçları, küçük boyutları nedeniyle, hücre dışı, hücre yüzeyi ligand bağlayıcı reseptörlerin yanı sıra hücre büyümesi ve metastaz teşviki için aşağı akış sinyallerinin dönüştürülmesinde anahtar rol oynayan anti-apoptotik proteinler de dahil olmak üzere hücre içi proteinleri hedeflemek için başarıyla kullanılmaktadır. Bu ilaçların çoğu, serin/treonin/tirozin kinazlar, matris metaloproteinazlar (MMP'ler), ısı şoku proteinleri (HSP'ler), proteozom ve sinyal iletim yollarında rol oynayan diğer proteinler gibi kritik kanser hedeflerini inhibe eder.

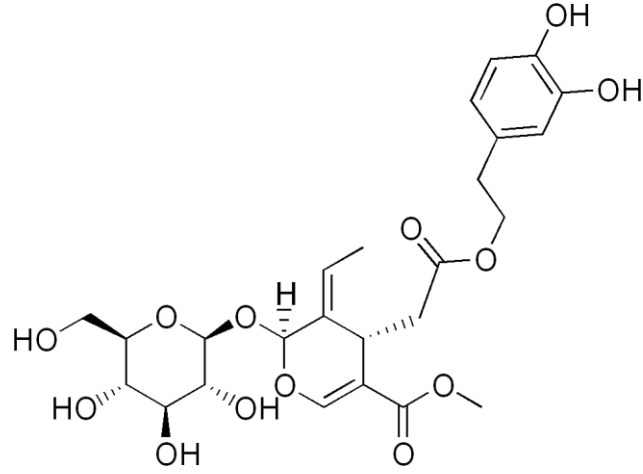
Günümüzde kabul edilen kanser tedavilerinde, hemen hemen tüm küratif kemoterapi rejimlerinde, çok ajanlı ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır (18). Bu, temelde çok ajanlı tedavilerin tek ajan tedavilere kıyasla sahip olduğu avantajlardan

kaynaklanmaktadır. Farklı anti-kanser ilaçlarının birleştirilmesi, konakçı toksisitesini en aza indirirken tümör hücresi toksisitesini en üst düzeye çıkarabilir. Ek olarak, kombine terapi, spesifik bir tedaviye dirençli tümör hücrelerinin üstesinden gelebilir ve ayrıca yeni dirençli tümör hücrelerinin gelişimini önleyebilir veya yavaşlatabilir (19).

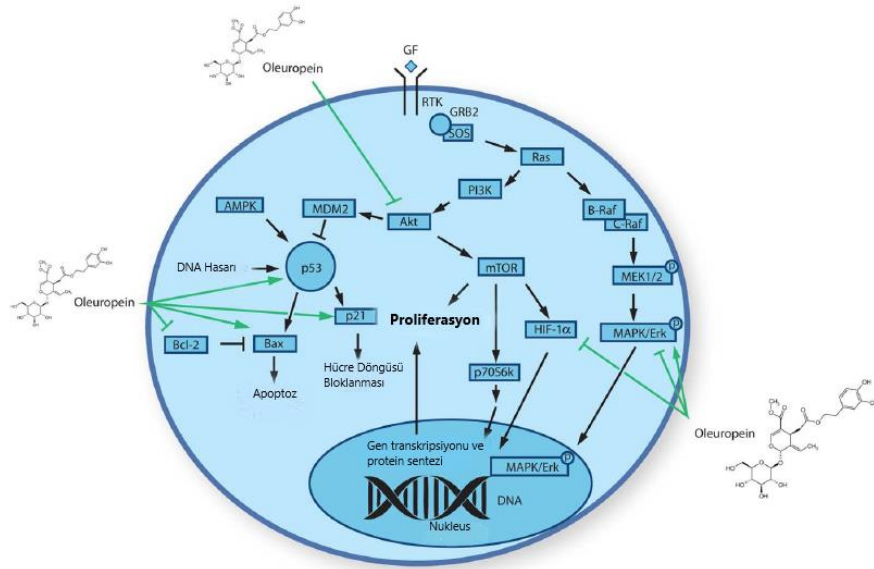
#### **4.3.1. Oleuropein ve Etki Mekanizması**

OLE, yeşil zeytin kabuğunda, etli kısmında ve tohumlarda, yapraklarda ve argan yağında bulunan bir tür fenolik acı bileşik olan glikosile edilmiş sekoiridoiddir (Şekil 4.3.1.1). Oleuropein terimi, zeytin ağacının botanik adı olan *Olea europaea*'dan türetilmiştir. Acı tadı nedeniyle zeytinin yenilebilir olması için OLE tamamen çıkarılmalı veya ayrıştırılmalıdır. Acı ve yenmeyen yeşil zeytinlerin sofralık zeytin olarak tüketilmek üzere işlenmesi sırasında çeşitli yöntemlerle zeytinden OLE uzaklaştırılır. OLE'nin antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir (20).

OLE'nin birincil metaboliti, antikanser etkiler uyguladığı bildirilen bir bileşik olan hidroksitirosooldür (21) ve bu nedenle, OLE'nin antikanser etkilerinin bir kısmının hidroksitirosole bağlı olması mümkündür. HL60 promiyelositik lösemi hücrelerinin (22), PC-3 prostat kanseri hücrelerinin (23), MCF-7 meme kanseri hücrelerinin (24) ve CaCo2 kolon kanseri hücrelerinin (25) hidroksitirosole (10-100  $\mu$ M) maruz kalması, hücre proliferasyonunda önemli bir inhibisyona ve apoptozun indüksiyonuna yol açmıştır. Ek olarak, *in vivo* hayvan çalışmaları, hidroksitirosolün (10 mg / kg vücut ağırlığı) 14 gün boyunca dişi atimik nude farelere uygulanmasının, tümör boyutunda ve tümör anjiyogenezinde önemli (%50) bir azalmaya yol açtığını göstermiştir (26). Genel olarak, bu çalışmalar, hidroksitirosolün antikanser özelliklere sahip olduğuna dair kanıtlar sağlar ve bu nedenle, OLE'nin metabolize edilmesi/hidroksitirosole dönüştürülmesi ve bu da antikanser etkilerini indüklemesi mümkündür.



Şekil 4.3.1.1. Oleuropein molekülünün kimyasal yapısı (27)



Şekil 4.3.1.2. OLEnin hüresel sinyal molekülü üzerindeki etkileri. OLE, Akt'yi inhibe eder, p53 ve Bax ekspresyonunu artırırken Bcl-2 ve HIF-1a'yı inhibe eder (27).

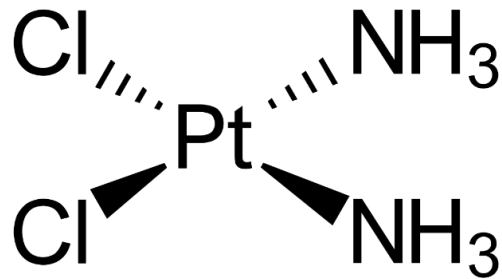
Genel olarak, Şekil 4.3.1.2'de görüldüğü gibi, OLE, kanser hücresi proliferasyonunda ve hayatta kalmasında rol oynayan anahtar sinyal moleküllerini etkiler ve bu nedenle bunları hedeflemek için bir ajan olarak kullanılabilir. Spesifik olarak, Akt inhibisyonu ve p53 indüksiyonu, potansiyel bir kemoterapötik ajana işaret

eder. OLE uygulaması, mevcut geleneksel kemoterapi tedavileri ile sinerjik olarak hareket edebilir ve sıklıkla toksisiteye ve ciddi yan etkilere yol açan dozları azaltabilir.

#### 4.3.2. Cisplatin ve Etki Mekanizması

CDDP, cisplatinum veya cis-diamminedichloroplatinum (II), iyi bilinen bir kemoterapötik ilaçtır (Şekil 4.3.2.1). Mesane, baş ve boyun, akciğer, yumurtalık ve testis kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda insan kanserinin tedavisinde kullanılmıştır. Etki tarzı, DNA üzerindeki pürin bazları ile çapraz bağlanma kabiliyetine bağlanmıştır; DNA onarım mekanizmalarına müdahale etmek, DNA hasarına neden olmak ve ardından kanser hücrelerinde apoptozu indüklemek üzerinden etki gösterir. Ancak ilaç direnci ve şiddetli böbrek sorunları, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyonlara karşı bağışıklığın azalması, gastrointestinal bozukluklar, kanama ve özellikle genç hastalarda işitme kaybı gibi çok sayıda istenmeyen yan etkileri nedeniyle, diğer anti kanser ilaçları ile de kullanılmıştır. CDDP'nin diğer ilaçlarla kombinasyon tedavilerinin ilaca karşı direncin üstesinden geldiği ve toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir (28).

CDDP hücreye girdiğinde aktive olur. Sitoplazmada CDDP üzerindeki klorür atomlarının yerini su molekülleri alır. Bu hidrolize ürün, proteinler üzerindeki sülfhidril grupları ve nükleik asitler üzerindeki nitrojen donör atomları dahil olmak üzere herhangi bir nükleofille reaksiyona girebilen güçlü bir elektrofildir. CDDP, pürin kalıntıları üzerindeki N7 reaktif merkezine bağlanır ve bu nedenle kanser hücrelerinde deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına, hücre bölünmesini bloke ederek ve apoptotik hücre ölümüne neden olabilir.

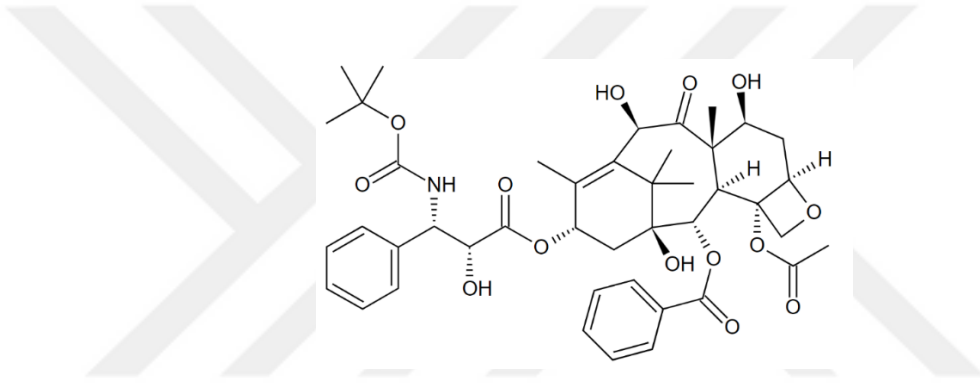


Şekil 4.3.2.1. Cisplatin molekülünün kimyasal yapısı (29)



### 4.3.3. Docetaxel ve Etki Mekanizması

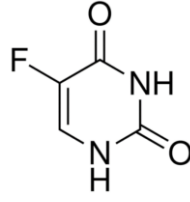
Yarı sentetik bir taksan olan DTX (Şekil 4.3.3.1), prostatik tümörlere karşı önemli tek ajan aktivitesi sergilemektedir. DTX'in iki yönlü bir antineoplastik aktivite mekanizmasına sahip olduğuna inanılmaktadır: (1) mikrotübüler depolimerizasyonunun inhibisyonu ve (2) Bcl-2 ve Bcl-xL gen ekspresyonunun etkilerinin zayıflaması. Taksanla indüklenen mikrotübül stabilizasyonu, hücre döngüsünün G(2)M fazındaki hücreleri tutuklar ve Bcl-2 fosforilasyonunu indükler, böylece nihayetinde apoptotik hücre ölümüne yol açan bir olaylar zincirini destekler (30).



Şekil 4.3.3.1. Docetaxel molekülünün kimyasal yapısı (31)

### 4.3.4. 5-Florourasil ve Etki Mekanizması

5-FU, DNA ve RNA'nın pirimidin moleküllerinin yapısına benzer bir yapıya sahip heterosiklik aromatik bir organik bileşiktir; hidrojen yerine C-5 konumunda bir flor atomuna sahip bir urasil analogudur (Şekil 4.3.4.1). Yapısından dolayı 5-FU, nükleozid metabolizmasına müdahale eder ve RNA ve DNA'ya dahil edilerek sitotoksikite ve hücre ölümüne yol açar (32). 5-FU kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlaç direnci, 5-FU'nun klinik kullanımı için önemli bir sınırlama olmaya devam etmektedir.



Şekil 4.3.4.1. 5-Florourasil molekülünün kimyasal yapısı (33)

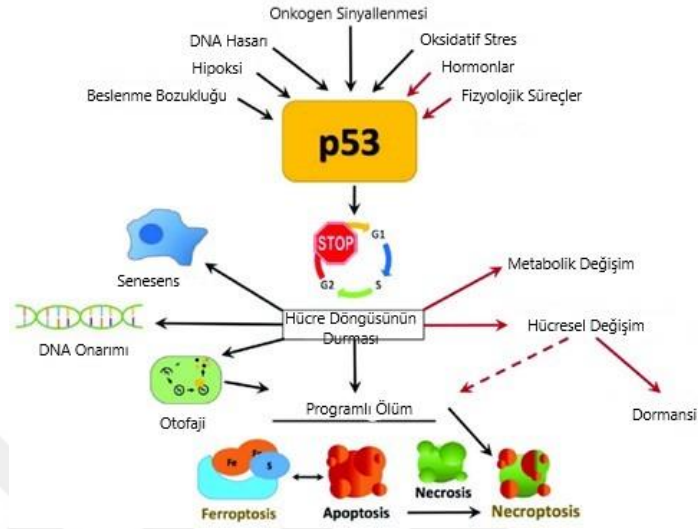
#### 4.4. Kanser Oluşum Mekanizmaları

Kanser hücreleri hakkında hep dile getirilen “kontrolsüz çoğalma” tanımı ile hücrelerin hücre bölünmesi için alması gereken dışsal uyarılara ve içsel engellemelere yanıt vermemesi, yani hücrelerin aslında dışarıdan gelecek bir mitotik uyarıya ihtiyaç duymaksızın çoğalmasını indüklemesi ve hücredeki tümör baskılayıcı genlerin hücrenin çoğalmasını durduramayacak şekilde ya bloklanmış ya da mutasyona uğramış olduğu kastedilmektedir. Bu mekanizmalardan bir veya birkaçı kanserli dokuda görülebilir. Kanser hücrelerinin bu şekildeki kontrolsüz çoğalması ve çoğalmasının baskılanamaması sebebiyle hücreler sürekli bölünme sinyali oluşturmakta ve bu nedenle farklılaşmaya vakit ayırmadan çoğalmaya odaklanmaktadır. Kanser hücreleri de sağlıklı hücrelerin kullandığı metabolik yolları kullanmaktadır. Bu yolları hedefleyen ilaçlar tedavi edici özellik gösteremez. Ancak kanser hücrelerinde bu yollarda bazı enzimlerin farklı izoformlarının yoğun olarak bulunması kanser hücrelerini hedefleyebilmenin bir yolu olarak görülmektedir (34).

Kanser, normal hücrelerin, gelişmiş proliferatif ve azalmış apoptotik yetenekler dahil olmak üzere çeşitli özellikler kazanarak kötü huylu hücrelere dönüştüğü karmaşık, çok faktörlü bir hastalıktır. Sağlıklı bir hücrede, çoğaltma süreci, büyüme faktörlerinin üretimini ve anahtar sinyal moleküllerinin düzenlenmesini kontrol eden ve hücrelerin normal çoğalmasını sağlayan çeşitli kontrol noktaları ile oldukça sıkı düzenlenir. Aksine, kanser hücrelerinde, bu tür düzenleyici sinyaller gen ekspresyonunda değişikliğe yol açan mutasyonların birikmesi nedeniyle, büyüme faktörlerinin (GF) ve hücre yüzeyinde bulunan GF reseptörlerinin (GFR) üretimini ve alt basamaklardaki anahtar sinyalleme kaskadını düzenler (34). Epidermal GFR (EGFR), intrinsik tirozin kinaz (TK) aktivitesine sahip plazma membran proteinleri

gibi GF veya GFR'nin ekspresyonunda artış, bu hücrelerin çoğalmasının artmasına neden olur (35) ve komşu hücreleri etkileyerek kendi hücrelerinin çoğalmasını teşvik eden sinyaller üretir. GF bağlanması, reseptörün tirozin kinaz aktivitesini güçlendirerek tirozin rezidülerinin otofosforilasyonuna yol açar. Reseptörün fosforile tirozin kalıntıları, Src-homoloji 2 (SH2) alanlarını içeren hücre içi proteinler için kenetlenme yerleri olarak hareket ederek, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)- Akt (36), (37) ve Ras-mitojen-aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) (38,39) kaskadları gibi proliferasyonun artması ve apoptozun inhibisyonu ile sonuçlanan hücre içi sinyalleme zincirlerinin aşağı akış aktivasyonuna neden olur. Artmış hücre proliferasyonu, artan bir protein sentezi hızı gerektirir. Rapamisin'in memelilerdeki hedefi (mTOR), çok sayıda çevresel ve beslenme sinyalini algılamaktan ve entegre etmekten sorumlu olan ve aktive edildiğinde protein sentezini, proliferasyonu ve hayatta kalmayı artıran bir serin/treonin kinazdır (40). Normal bir hücrede, DNA'da hasar oluştuğunda, spesifik kontrol noktaları aktive edilir ve replikasyon döngüsünün ilerlemesinde durmaya yol açan hasar tespit edilir (41). Tümör baskılayıcı protein p53, hücre hasarının izlenmesinden sorumludur (42,43). Hücre hasarı tespit edildiğinde p53, DNA hasarı onarılincaya kadar hücrenin replikasyonunu durdurur (Şekil 4.4.1). Bununla birlikte, hücreye verilen hasar hücrenin onarım kapasitesinin dışındaysa, p53 apoptozu (programlanmış hücre ölümü) başlatacaktır (42,43). Ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon, oksidatif stres, DNA'ya kimyasal saldırılar ve düzensiz onkojen ekspresyonu gibi stresler, p53 fosforilasyonuna/aktivasyonuna yol açar (Şekil 4.4.1). Aktive edilmiş p53 DNA'ya bağlanır ve bu da sikline bağlı kinaz inhibitörü (p21) ve Bcl-2 ile ilişkili X'in (Bcl-2 associated X/ Bax) gen transkripsiyonunu aktive eder, bu da hücrenin onarımı ve hayatta kalması veya apoptozu indüklemesi için hücre döngüsü durmasına neden olur (41). DNA hasarını takiben hücre döngüsü durması, olası onarım ve işlevsiz hücre replikasyonunun önlenmesine izin verecektir. Öte yandan, p53 aracılı apoptoz, mitokondriyal membranda Bax/Bak gibi Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerinin dahil olmasına bağlıdır, bu da kaspaz 9'u toplayan ve bir apoptozom oluşturan sitokrom C'nin sitozole salınmasıyla sonuçlanır. Apoptozom kompleksi, her ikisi de apoptozun göstergesi olan pro-kaspaz 9'un kesilmesi ve kaspaz 3'ün aşağı akış aktivasyonuna yol açar. Ayrıca kaspaz 3, poli ADP riboz polimerazı (PARP) da keser

ve böylece aktivitesini inhibe eder. Kesilmiş PARP, apoptozun bilinen başka bir göstergesidir (44).



Şekil 4.4.1. p53'ün mutasyona uğraması sonucu hücre kaderinin belirlenmesi (45)

#### 4.5. Kanser Hücre Metabolizması

Kanser yaygın olarak bilindiği üzere hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ve başka dokulara invaze olması olarak tanımlanmaktadır. Kanserlin ortaya çıkış mekanizmaları ve kanserleşen hücrelerin sağlıklı hücrelere göre metabolizma farklılıkları, kanserli dokulara spesifik metabolizmal veya proteinsel farklılıklar bulmak ve buna yönelik terapötik ajanlar geliştirilmek üzere uzun senelerdir incelenmektedir. En çok irdelenen ve hedeflenen konulardan biri kanser enerji metabolizmasıdır. Bununla bağlantılı olarak Warburg Etkisini ve kanserde enerji metabolizmasını hedef alan terapötik ajanların geliştirilmesi için araştırmalar devam etmektedir.

Tümörlerin metabolizmaları, kökenlendikleri sağlıklı dokularla kıyaslandığında önemli farklılıklar göstermektedir. Kanser hücrelerinin metabolik fenotiplerinde gözlenen farklılıklar, genel olarak kanser hücrelerinin artmış metabolik isteklerini karşılamak üzere değişikliğe uğramasından, normal hücrelere kıyasla bulunduğu doku ile iletişiminin değişmesinden ve çevresel değişimlere uyum

sağlamaya çalışmasından kaynaklanmaktadır. Kansere hücrelerinin metabolizmalarında bu şekilde meydana gelen değişiklikler yeni tedavi yolları için hedef oluşturmaktadır. Bunlara, kanser hücrelerinin biyoenerjik ve anabolik amaçları için glikoz ve glutamin kullanımını artırması ve bu gibi bir düzenlenmeye paralel olarak kanser hücrelerinde bu metabolizmayı destekleyen enzim izoformlarının yoğun bulunması ve kullanılması, düşük oksijen düzeyine uyum sağlamış metabolizma örneği olarak verilebilir (46). Normal hücreler, esas olarak mitokondride pirüvatın oksidasyonu yoluyla enerji üretirken, kanser hücreleri, normoksik veya hipoksik koşullar altında olup olmadıklarına bakmaksızın, ağırlıklı olarak sitozolde glikoliz yoluyla enerji üretirler (47,48).

Tümörlerde genel olarak glikoz kullanımında artış görülür. Tümörlerdeki kontrolsüz çoğalma sebebiyle kanserin bulunduğu dokuda damarlanma uyarılır, buna rağmen dokunun oksijen ihtiyacı tam olarak karşılanamaz ve kanser hücreleri oksijensiz (anaerobik) solunuma yönelir. Kansere hücrelerinde glikoliz yolağının kullanımının artmasının tümör mikroçevresinin asidifikasyonunu artırarak kimyasal ilaçlara direncin ortaya çıkmasına neden olduğuna dair deliller mevcuttur. Normalin üzerinde pirüvat üretilmesi ve bu pirüvatın çoğunun oksijen varlığında dahi Krebs döngüsüne gönderilmek yerine laktik asit üretimine yönlendirilmesi ve bunun sonucu olarak fazla miktarlarda laktat üretilmesi ile bunun hücre dışına verilmesi, tümör mikroçevresinin asidifikasyonunu sebep olmaktadır. Glikolitik ATP üretimi ile tümör malignitesi arasında bir korelasyon olduğu bildirilmektedir (49). Kansere hücrelerinin değiştirilmiş metabolizması, yüksek laktat üretimi ve proton birikimi ile bağlantılıdır, bu da hücre dışı pH'da kansere metastazını teşvik eden bir düşüşe neden olur (50). Glikoz metabolizmasındaki bu değişimin sebebi, oksijen yetersizliğine ya da onkogeneze başlangıcına uyum sağlamak için yapılan bir düzenleme olabilir. Kansere hücreleri aerobik glikoliz yaparak oksijen kullanamadıkları durumlarda dahi büyüme ve çoğalma yeteneklerini kullanabilmekte ve buldukları dokuda yayılabilmekte, ayrıca farklı yollarla anjiyogenezi de uyararak damarlanmayı sağlayıp diğer dokulara da metastazı için uygun ortamı hazırlayabilmektedirler. Bütün bunlar kansere hücrelerine selektif avantaj sağlamaktadır. Glikoliz yolağı kullanımının kansere hücrelerinde artmış olarak kullanılması kansere tedavileri için bir hedef niteliğindedir (51).

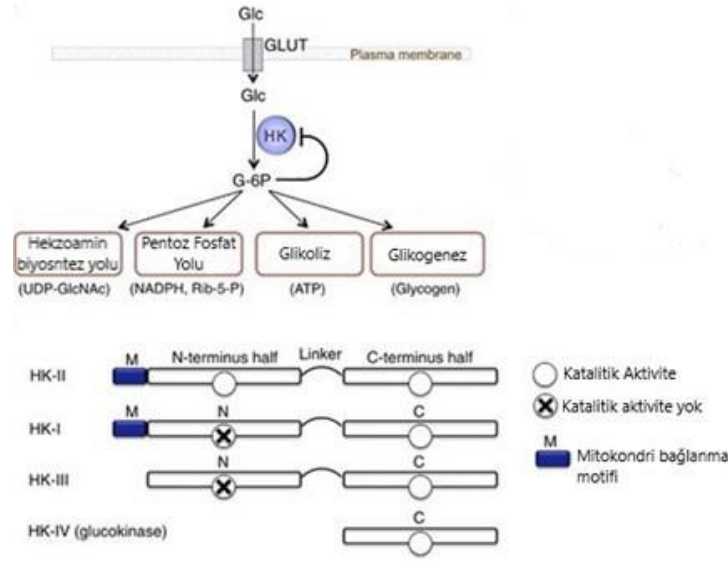
Kanser hücrelerindeki enerji metabolizmasında glikoz pirüvata dönüştükten sonra mitokondride krebs döngüsüne katılmak yerine laktik aside dönüşür ve bu mekanizma ilk olarak Warburg tarafından tanımlanmıştır. 1926 yılında Otto Warburg, kanser hücrelerindeki enerji üretiminin ve kullanımının normal hücrelere göre farklılık gösterdiği ve kanser hücrelerinde glikoz metabolizmasının aerobik glikoliz yoluyla olduğu hipotezini öne sürmüştür (47,48). Bu hipoteze göre, kanser hücreleri yaşamını devam ettirmek ve türemek için kullanacağı enerjiyi normal hücrelerde görülen trikarboksilik asit (TCA) dönüşümü veya diğer adıyla “Kreb Döngüsü (Kreb’s Cycle)” yoluyla değil glikoliz yoluyla devam ettirir ve bu yüzden de glikoz metabolizması esnasında kullanılan enzimlerin ve proteinlerin konsantrasyonlarının kanser hücrelerinde normal hücrelere göre hayli fazla olduğu gözlemlenmiştir (52). Warburg tarafından açıklandığına göre bu yolaktaki proteinler kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre daha fazla eksprese olmaktadır. Bu enzimlerden biri de HK-2 proteindir.

HK-2, G protein kenetli reseptör (GPCR) ailesine dahildir. HK-2 enzimi kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere göre 10 ila 15 kat daha fazla üretilmektedir. Bunun sebebi kanser hücrelerinin enerji metabolizmalarında besin olarak çoğunlukla glikoz kullanıyor olmalarıdır. Bütün bunlar göz önüne alındığında kinazları hedef alan kinaz inhibitörleri kanser tedavisinde umut vadetmektedir.

Kanser hücrelerinde sıklıkla gözlemlenen aerobik glikoliz (Warburg etkisi), glikoz metabolizmasında rol oynayan bazı enzimlerin protein düzeyinde artış göstermesi ile tespit edilmiştir. Kanser hücrelerinin enerji eldesi için glikolitik yolu kullanarak glikoz harcanmasını arttırmaları kanser fenotiplerinde sık görülen hızlı kanser büyümesi durumu için hücrelerin ihtiyaç duydukları metabolik araçların ortaya çıkmasını sağlar. Bu araçlardan biri olan glikoz-6-fosfat, pentoz fosfat yoluyla nükleik asit sentezinde kullanılarak tümör hücrelerinin hızlı bir şekilde DNA’yı replike edebilmelerini sağlar. Glikolitik yol ile bol miktarda üretilen pirüvat, hücre bölünmesi için gerekli membran lipitlerinin sentezlenmesini teşvik eder. Ayrıca tümör hücreleri tarafından hücre dışına da verilen laktat ile tümör mikroçevresinin asidifikasyonu sağlanmış olur ki bu mikroçevre hem tümör gelişimini desteklemekte hem de antikanser ilaçların faaliyetlerini engelleyebilmektedir (53).

Glikolizin ilk basamağında glikoz, glikoz-6-fosfata dönüşür. Bu aşamada görev alan enzim ise HK-2 enzimidir. HK-2, glikolitik yolun, ATP'nin eşzamanlı fosforilasyonu ile glikoz-6-fosfata fosforile edildiği bu ilk kararlı aşamayı katalize eder (Şekil 4.5.1). Memeli hücrelerinin dört ana HK izoformu vardır: HK-1, HK-2, HK-3 ve HK-4 (54). HK-1 en yüksek oranda eksprese edilen heksokinaz izoformudur ve insan kanserinde belgelenmiş bir işlevi bulunmamaktadır, HK-2 ise kanser ilerlemesinde rol oynar (55). HK-2'nin upregülasyonu çoklu insan kanserlerinde görülür (56) ve HK-2, Warburg etkisinde doğrudan bir fonksiyona sahip olan en önemli Heksokinaz enzimidir. HK-2 ayrıca kanser büyümesi, hayatta kalması ve metastazı için de gereklidir. Bu enzim, HIF ve MYC proteinleri tarafından ekspresyonu arttırılan birçok proteinden biridir. HIF ve MYC proteinleri birçok tümör tipinde yüksek miktarda eksprese edilen proteinlerdendir (57).

HK-2 ekspresyonunun epigenetik, transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyelerde düzenlendiği bildirilmektedir. Transkripsiyonel seviyede, HK-2 ekspresyonu, kanser hücrelerinde hipoksi ile indüklenen faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ile upregüle edilir. Hipoksi ile indüklenen faktör 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), oksijen homeostazıyla, dolayısı ile hipoksiye uyum ile ilgili çok kritik rolü olan bir pleiotropik (birden fazla genin transkripsiyonunda etkili olan) transkripsiyon faktörüdür. Bu faktör, hipoksi durumunda metabolizmadaki değişimin sağlanması ve duruma ayak uydurulması için işlev görecektir genlerin anlatımının düzenlenmesini sağlar. Bunun yanı sıra anjiyogenezde ve tümör pH'sının ayarlanmasında görevlidir. Hipoksik solid tümörlerde karakteristik olarak görülen yüksek glikoz kullanımı, HIF-1 $\alpha$ 'nın transkripsiyonel düzeyde hedeflerinden biri olan HK-2 enziminin ekspresyonunu arttırır. HK-2 promotörü, HIF-1 $\alpha$  (58,59) için bir konsensus motifine sahiptir ve hipoksi durumunda ekspresyonu uyarılır (58–61). Dolayısıyla, HK-2'nin bir HIF-1 $\alpha$  hedef geni olduğu düşünülmektedir (62). Ek olarak, c-Myc'nin, fibroblast büyüme faktörü ile uyarılan endotelial hücrelerde HK-2'nin upregülasyonunda rol oynadığı bildirilmektedir (63).



Şekil 4.5.1. Hekzokinaz enzimlerinin hücre içi görevleri ve Hekzokinaz türleri (64)

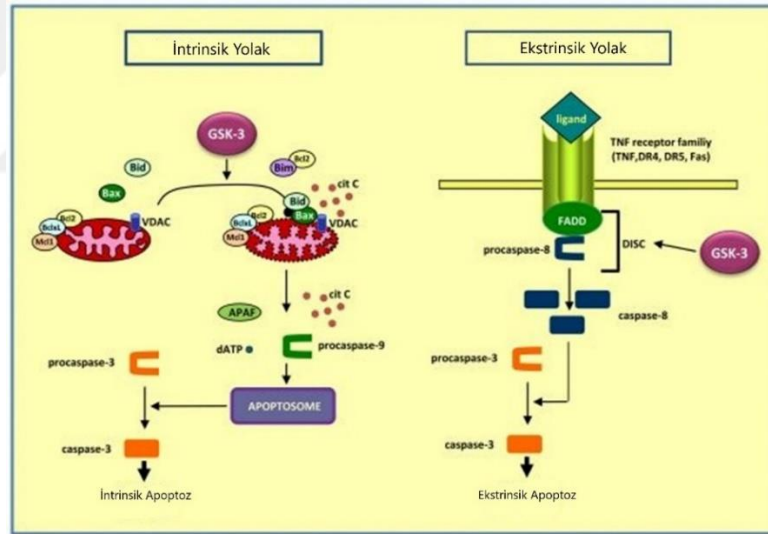
HK-2 enzimi, hücre solunumunda glikozun içeri alındıktan sonra ATP kullanılarak glikoz-6-fosfata dönüşmesini katalizlemektedir. Memelilerde bilinen dört izoformu bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla Hekzokinaz 1, 2, 3 ve 4'tür (Şekil 4.5.1). Literatürde HK-4'ün diğer adı Glikokinaz olarak da geçmektedir. Glikokinazın karaciğer ve pankreasta oldukça fazla miktarlarda bulunduğu bilinmektedir. HK-1 ise beyinde ve kas dokularında oldukça fazla görülür. Bunun yanında HK-2 normal hücrelerde bulunmakla beraber kanserli hücrelerde normal hücrelere göre 10-15 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir (65).

HK-2 enzimi kanser hücrelerinde, aerobik glikolize yönelmiş olmalarının etkisiyle, normal hücrelere göre çok daha fazla sentezlenmektedir. Bu proteinin artmış ekspresyonunun kanser hücrelerinde apoptoza dirençte ve metastazda önemli rol oynadığı bilinmektedir (66) (4). HK-2 enziminin VDAC ile ilişkide olduğu gösterilmiştir (67). VDAC proteini 30 kDa'luk bir proteindir ve mitokondri dış membranında bulunup iyon geçişini düzenlemektedir.

Apoptoz yolağı içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) olarak temelde ikiye ayrılarak incelenebilir (Şekil 4.5.2). Ekstrinsik yolakta sitotoksik T hücrelerinden gelen sinyallerle ve ölüm reseptörlerine ligandların bağlanmasıyla apoptoz yolağı başlamış olur. İntrinsik yolakta ise DNA hasarı ve benzeri durumlar oluştuğunda Bax



ve Bak proteinleri aracılığı ile VDAC üzerinden mitokondriden sitokrom-c salınımı gerçekleştirilir ve böylece pro-kaspazların kesim kaskadı başlatılır. Kaspazlar apoptoz yolağının başrol enzimleridir. Bu enzimlerin aktifleşmeye başlamasıyla kaspaz kaskadı başlar ve prokaspaz-3'ün kesilmesi ve kaspaz-3 aktif formuna dönüşmesiyle apoptoz geri döndürülemez bir noktaya ilerlemiş olur. Bu sebeple apoptoz yolağı birçok enzim ve faktör tarafından birçok aşamada sıkıca kontrol edilmektedir. İnterinsik apoptoz yolağında mitokondriden sitokrom-c ve SMAC/DIABLO gibi apoptojenik faktörlerin salınımının uyarılmasında Bcl-2 protein ailesine ait proteinler görevlidir. Bu süreçte Bax ve Bak proteinleri sitokrom-c salınımı için zorunludur. Bu proteinlerin mitokondri ile etkileşimlerine dair farklı birkaç model ortaya atılmıştır. Bu modellerden biri, Bax proteininin VDAC ile etkileşimi başlatarak sitokrom-c'nin hücre sitoplazmasına salınması için kanal oluşumunu tetikleme şeklidir (68).



Şekil 4.5.2. Apoptozun uyarılmasında intrinsik ve ekstrinsik yollar (69)

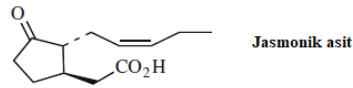
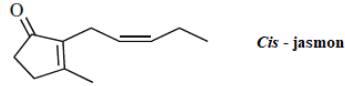
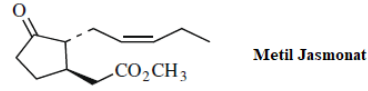
VDAC ile etkileşime girdiğine dair bulgular olan HK-2 enzimi, Bax/Bak gibi mitokondri membranında bulunan VDAC üzerinden apoptozu indüklediği düşünülen proapoptotik proteinlerin VDAC ile etkileşime girmesini engellemek suretiyle apoptozun başlamasına müdahale etme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple, hipoksik tümörlerde HK-2 ekspresyonunun artması ile hipoksiye uyum

sağlanırken apoptoz direnci de gelişebilmektedir. GSK3 $\beta$  aktivasyonu ile VDAC fosforlanması ve bu nedenle HK-2 enziminin VDAC ile etkileşiminin bozulması durumu gösterilmiş ve buna bağlı olarak kemoterapi-indüklü sitotoksitenin arttığı tespit edilmiştir. Bunun dışında VDAC ile direkt etkileşime girdiği gösterilen MeJA'nın, HK-2 enziminin VDAC ile etkileşimini keserek yalnızca kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği görülmüştür. HK-2 VDAC etkileşiminin kesilmesi ile kombine bir şekilde uygulanan CDDP tedavisinin ise etkinliğinin arttığı bildirilmiştir (70). Bütün bunlar göz önüne alındığında kanser hücrelerinin hipoksiye yanıt oluştururken aynı zamanda da apoptozda da direnç geliştirdiğini de göstermektedir.

HK-2 enzimini inhibe ettiği bilinen iki inhibitör Ionidamine ve 2-deoksiglikoz (2-DG) halihazırda bazı solid tümör tedavilerinde antikanser ajanlarla kombine olarak denlenmektedirler (57,71).

#### **4.6. Jasmonat Ailesi ve Metil Jasmonat**

Jasmonatlar, özellikle yasemin bitkisi tarafından bolca üretilen, bitkiye kuraklık vb. stres koşullarında avantaj sağlayan sekonder metabolitlerdir. İlk önce yasemin bitkisinden izole edilmişler ve salisilatlarla benzer bir bitki stres hormonu sınıfındırlar. Jasmonatlar, bitkiler UV radyasyonu, ozmotik şok ve ısı gibi çevresel streslere maruz kaldıklarında sinyal iletim ara maddeleri olarak işlev görürler (72). Cis-jasmon, Jasmonik asit ve Metil Jasmonattan (73) oluşan jasmonat ailesi, bitkiler aleminde her yerde bulunan yağ asidi kaynaklı siklo pentanonlardır (Şekil 4.5.3). Jasmonatların, bitki aleminin farklı türlerinde savunma ile ilgili genlerin düzenlenmesi için en güçlü ve önemli sinyaller arasında olduğu kabul edilmektedir. Jasmonik Asit'in rolü, yaralanmaya karşı hücre içi sinyal verme tepkisidir; MeJA ise, yaralanmaya veya patojenik saldırılara yanıt olarak biriken proteinaz inhibitörünün indüksiyonuna neden olur (74). Jasmonatların memeli apoptozuna benzeyen bir mekanizmada bitki programlı hücre ölümüne rol aldığı bildirilmiştir (72). Bitkilerdeki rollerine ek olarak, jasmonatların kültüre edilmiş hayvan hücreleri üzerinde de etkileri olduğu bulunmuştur. Bu etkiler hem in vitro hem de in vivo sergilenen anti-kanser aktiviteleridir (75).



Şekil 4.6.1. Doğada bulunan jasmonatların kimyasal yapıları (76)

Jasmonatların ve bazı sentetik türevlerinin, meme, prostat, melanom, lenfoblastik lösemi ve lenfoma hücreleri (77) dahil olmak üzere çeşitli insan ve fare kanser hücre hatlarında çoğalmayı inhibe ettiği ve hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir ve Kronik Lenfositik Lösemi (CLL) hastalarının kanından alınan karma bir lösemik ve normal hücre popülasyonu ile muamele edildiklerinde bile kanser hücrelerine karşı seçici sitotoksikite gösterdiği görülmüştür. Ayrıca jasmonatların T hücreli lenfoma taşıyan farelerin yaşam süresini uzattığını göstermiştir (77).

Geçtiğimiz birkaç yıl içinde birkaç grup, jasmonatların in vitro ve in vivo anti-kanser aktivitesi sergilediğini, transforme hücreler için seçici olduğu ve transkripsiyon, translasyon ve p53 ekspresyonundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (78). Jasmonatların etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır ve farklı kanser hücrelerinde farklı hücre ölümü sinyal yollarını indüklediğine dair yorumlamalar yapılmıştır (79–82).

#### 4.7. Jasmonatların Etki Mekanizmaları

Kanser hücrelerine karşı jasmonat sitotoksitesinin mekanizması halen araştırılmaktadır. Bununla ilgili üç mekanizma önerilmiştir. Birincisi yeniden

farklılaşma (redifferentiation) mekanizmasıdır. Jasmonatlar, mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) yoluyla insan miyeloid lösemi hücrelerinde yeniden farklılaşmayı indükler. İkincisi reaktif oksijen türleri (ROS) aracılı mekanizmalardır. Jasmonatların, hidrojen peroksidaz ve Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik proteinleri aracılığıyla akciğer karsinoma hücrelerinde apoptozu indüklediği görülmüştür. Ve üçüncü olarak biyoenerjetik mekanizmadır. Jasmonatlar, mitokondriyal pertürbasyon (mitokondrinin işlevinin değiştirme ve düzenleme) yoluyla kanser hücrelerinde ciddi oranlarda ATP tükenmesine/azalmasına neden olur ve bu yolak üzerinden apoptozu indükler (78,83).

#### **4.7.1. Biyoenerjetik Mekanizma**

Mitokondrinin hücrelerde yaşam ve ölüm kararları açısından çok önemli bir role sahip olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Aslında hem apoptotik hem de nekrotik ölüm, mitokondriyal pertürbasyondan kaynaklanabilir.

MeJA'nın kanser hücrelerinden izole edilen mitokondri üzerindeki sitotoksik etkisini ve MeJA'nın sağlıklı normal ve kanser hücreleri üzerindeki anti-mitokondriyal etkileri üzerine araştırmalar yapılmıştır. MeJA'nın anti-mitokondriyal etkileri, mitokondriyal membran depolarizasyonu, şişme ve sitokrom c salınımını içerir. Jasmonatların, sağlam CLL lösemik hücrelerde ve bu hücrelerden izole edilen mitokondride mitokondriyal pertürbasyona neden olduğunu gösterilmiştir. Bununla birlikte MeJA, kanser hücresi mitokondrileri üzerinde seçici olarak hareket etmiş ve mitojenik olarak uyarılan normal insan lenfositlerini etkilememiştir (79). Kanser mitokondrileri çeşitli açılardan normal mitokondrilerden farklıdır. Bu, kanser hücrelerinde daha yüksek mitokondriyal membran potansiyeli, adenin nükleotid translokatorü, siklofilin D ve VDAC içeren geçirgenlik transisyon por kompleksi (permeability transition pore complex- PTPC) bileşenlerinin ekspresyonunun olası modülasyonunu ve kanser hücrelerinde rastlanılan oksidatif fosforilasyon yerine glikoliz yoluyla (Warburg etkisi) artan ATP üretim oranlarını içerir (1,52,84–86). Yukarıdakilerin ışığında, kanser hücresi mitokondrilerinin bozulmuş ATP üretme yeteneğinin, onları MeJA'nın neden olduğu hızlı ATP tükenmesine karşı daha duyarlı hale getireceğini varsayılmıştır. Daha öncesinde yapılan çalışmalarda bunu destekler şekilde, MeJA'nın çeşitli kanser hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etki belirtisi

gözlenmeden çok önce ATP hücresele seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (83). Mitokondrinin MeJA'nın hedef organelleri olmasına göre, ATP düzeylerindeki bu düşüşlerin, oksidatif fosforilasyonun substratı ve inhibitörü olan piruvat ve oligomisinden bağımsız olduğu bulunmuştur (87). Öte yandan glikoz, hücreleri MeJA kaynaklı azalmış ATP seviyelerine karşı koruyucu etki göstermiş ve glikoliz inhibitörü 2DG ve MeJA kombinasyonu sinerjik etkiler göstermiştir (83,87). MeJA'nın antikanser potansiyelini keşfettikten sonra amaç, kanser hücresi mitokondrilerindeki MeJA hedef molekülünü bulmak olmuştur. Bunun daha sonra HK-2 enzimi olduğu keşfedilmiştir.

MeJA'nın hedef molekülü olan HK-2, glikolitik yoldaki ilk enzimdir. İzozimleri, HK-1 ve HK-2, bir hidrofobik etkileşim yoluyla mitokondriyal VDAC'a bağlanabilir (88). Kanser hücrelerinde, mitokondriye bağlı heksokinaz ve VDAC aşırı ekspresyon edilir (89), bu aşırı ekspresyonun glikoz fosforilasyon aktivitesi ile birlikte, kanser hücresi büyüme hızı ve hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir (90,91).

MeJA'nın memeli HK-2 enzime spesifik olarak bağlandığını ve bunun VDAC ile etkileşimini bozarak HK-2'nin mitokondriden ayrılmasına ve ardından sitokrom c salımına yol açtığı gösterilmiştir (5). Mitokondriye bağlı HK-2'nin MeJA kaynaklı ayrılması, mitokondriyal geçirgenliği ve genel hücresele biyoenerjiyi bozar.

#### **4.7.1.1. MeJA'nın Sitotoksik Etkisine PI3K/Akt Yolunun Dahil Olması**

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) / Akt yolu temel hücresele fonksiyonları düzenler ve genellikle çok çeşitli tümör tiplerinde aşırı aktive edilir (37,92,93). Bu yol, tümör hücrelerinin geleneksel anti-kanser tedavilerine karşı direncinde önemli bir rol oynar. Çeşitli araştırmalara göre, yüksek Akt aktivitesi, kanser hücre dizilerinin Vincristine, Staurosporine ve TRAIL gibi farklı kemoterapötik ajanlara karşı duyarlılığını azaltır (94–96) ve fosfo-Akt (pAkt) ekspresyon düzeyinin, meme karsinomu (97), mide karsinomu (98) ve yumuşak doku sarkomları (soft-tissue sarcoma- STS) (99) gibi farklı kanser türlerine sahip hastalarda önemli bir prognostik faktör olduğu bulunmuştur. Ayrıca, sıçan fibroblastları üzerine yapılan bir çalışmaya göre, hücre ölümünün düzenlenmesinde Akt sinyali ile mitokondriyal

heksokinaz arasında bir bağlantı vardır. Akt, HK-2'nin mitokondriye bağlanmasını teşvik eder; bu, kısmen Akt'nin bazı antiapoptotik özelliklerini açıklayabilir (100). Bunların tümü göz önüne alındığında, PI3K / Akt yolunun bloke edilmesi, tümör hücrelerinin büyüme inhibisyonu ile sonuçlandığı ve bunları farklı sitotoksik ajanlara karşı duyarlı hale getirdiği için antikanser terapisinde iyi bir hedef olabilir.

Yakın zamanda hücrelerin MeJA'ya duyarlılığı ile sarkom hücre dizilerindeki bazal pAkt seviyeleri arasında güçlü bir korelasyon belirlenmiştir (101). MeJA ile tedavinin, iki sarkom hücre hattında (sıçangil ve insan) pAkt seviyelerinde bir artışa neden olduğunu bulunmuştur ve PI3K / Akt yolağı inhibitörlerinin MeJA ile kombinasyonunun, Akt'nin MeJA ile indüklenen aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir. Bu tıkanma, hücrenin MeJA'nın sitotoksik etkisine duyarlı hale gelmesine ve sinerjik bir sitotoksik etkiye yol açmasına neden olmuştur (101).

Akt'nin hayatta kalmayı teşvik etme ve hücre ölümünü önleme yeteneği glikoz mevcudiyetine bağlıdır (102). MeJA kaynaklı sitotoksitede Akt'nin rolü göz önüne alındığında, bu süreçte glikoz metabolizmasının rolünü incelenmiş ve elde edilen sonuçlar, glikolitik yolun değiştirilmesinin ve Akt yolunun değiştirilmesinin benzer etkilere yol açtığını göstermiştir.

MeJA'nın 2-DG ile kombinasyonu sinerjistik bir sitotoksik etki ortaya çıkarmıştır; glikozsuz ortamda büyütülen hücrelerin MeJA'nın sitotoksik etkisine daha duyarlı olduğu görülmüştür. 2-DG, pAkt seviyelerinde MeJA ile indüklenen yükselmeyi ortadan kaldırmış ve Akt'in anti-apoptotik etkilerini inhibe etmek için yeterli gelmiştir, böylece hücreleri MeJA'nın sitotoksik etkilerine daha duyarlı hale gelmiştir (101). Bu sonuçlar, MeJA ve Akt inhibitörü / 2-DG kombinasyonlarının sarkomlar için yeni çok bileşenli bir antikanser terapötik yöntemi olarak kullanılmasının avantajlarına işaret etmektedir.

#### **4.7.1.2. MeJA'nın Amitokondriyat Bir Parazit Olan T. Vaginalis Üzerindeki Etkisi**

T. vaginalis, trichomoniasis adı verilen cinsel yolla bulaşan bir hastalığa neden olan insan ürogenital sistem parazitidir. T. vaginalis, mitokondriye sahip olmamasıyla karakterizedir ve bu nedenle bu parazit üzerinde yapılan deneyler, hücrelerin MeJA'nın

sitotoksik etkisine duyarlı olması için mitokondrinin gerekli olup olmadığı konusunda bir cevap verebilmektedir.

Çeşitli memeli kanser hücre tipleri hakkındaki bulgulara göre, belirli bir hücre tipinin MeJA'nın sitotoksik etkisine duyarlılığı ile bu hücrede indüklenen ATP tükenmesinin derecesi arasında pozitif bir korelasyon vardır (5). Bununla birlikte, MeJA'nın kanser hücreleri üzerindeki etkisine ters olarak (83,87), *T. vaginalis* parazitik hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin öncesinde hücre ATP düzeylerinde bir düşüş olmadığı ortaya konulmuştur ki bu da kanser hücrelerini etkileyen mekanizmadan farklı bir sitotoksik mekanizmanın işlediğini gösteren bir durumdur (103). Dahası, MeJA'nın hücre döngüsünün G2/M fazında durmasını ve apoptoza özgü ayırt edici özellikleri ortaya çıkarmadan, yani kaspaz-3 aktivitesi, DNA parçalanması (laddering) ve sub-G1 piki olmadan (103), apoptotik olmayan hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir.

Mitokondrinin MeJA'nın hedef organeli olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen (103), MeJA'nın mitokondri içermeyen hücrelere, yani mitokondri eksikliği olan *T. vaginalis* parazitlerine zarar verebildiğini yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (104).

#### **4.7.2. Yeniden Farklılaşma Mekanizması**

Yeniden farklılaşma, kanser hücreleri genetik ve fenotipik olarak bir genetik programa göre değiştirildiğinde meydana gelir. Bu değiştirilmiş durumda hücreler, daha yavaş bir hızda çoğalır ve daha önceki neoplastik özelliklerini kaybeder. Retinoidler, bu mekanizma üzerinden hareket ettiği düşünülen doğal ve sentetik bir nükleer reseptör ligandları ailesidir (105). Tamamı-trans retinoik asit (All-trans retinoic acid- ATRA), akut promiyelositik lösemi hücrelerinin (APL) yeniden farklılaşmasını indüklemektedir (106), ancak diğer hematopoietik malignitelerin tedavisinde tek bir ajan olarak sınırlı bir başarıya sahiptir (107). Ayrıca bitki hormonlarından Sitokinin ailesinin lösemik hücrelerde yeniden farklılaşmayı indüklediği bulunmuştur. Tsumura ve arkadaşlarının yaptığı özgün bir çalışmada Sitokinin, İzopenteniladenin (IPA) ve MeJA'nın insan miyeloid lösemi (HL-60) hücrelerinde birkaç farklılaşma belirtecini indüklediğini gösterilmiştir (108).

### 4.7.3. Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species- ROS) Aracılı Apoptoz

MeJA için önerilen üçüncü antikanser mekanizması, ROS'un MeJA ile indüklenen apoptozdaki rolüdür. Oh ve ark. (2005) tarafından MeJA'nın C6 glioma hücrelerinde ısı şoku faktörü I yoluyla ısı şoku proteini 72'yi (heat shock protein 72-HSP72) indüklediği gösterilmiştir (82). MeJA ile indüklenen bu ekspresyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin spesifik inhibisyonu ile önlenmiştir (82). Dahası, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (the human non-small cell lung cancer- NSCLC) hücrelerinde (A549), MeJA'nın hidrojen peroksit oluşumunu içeren bir kaskad yoluyla apoptozu indüklediği ve pro-apoptotik proteinler Bax ve Bcl-XS'de bir artış gösterdiği gösterilmiştir (82). MeJA'nın A549 hücreleri üzerindeki etkisinin daha fazla araştırılması, daha fazla pro-apoptotik proteinin rol oynadığını ortaya çıkarmıştır.

Yeruva ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada iki NSCLC hücresi, A549 ve H520 üzerinde, MeJA hayatta kalma deneylerinde gösterildiği gibi uzun vadeli proliferasyonu inhibe ettiği ve her iki hücre hattında da G2/M kontrol noktasının bloklanması indüklediği görülmüştür (80). MeJA ile muamele, toplam apoptotik hücre miktarını arttırmış ve H520 hücrelerinde hem pro-apoptotik protein Bax hem de anti-apoptotik protein Bcl-2'yi arttırmıştır (80). Daha önceki çalışmalar, Yeruva ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyumlu olarak MeJA'nın A549 ve lösemi hücrelerinde mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK) fosforilasyonuna neden olduğunu bildirmiştir (81,82). İki NSCLC hücre hattı, A549 ve H520, p53 ekspresyonlarında farklılık gösterir (sırasıyla fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan). p53, bir tümör baskılayıcı genidir ve p21 ve pro-apoptotik Bax için doğrudan transkripsiyonel bir aktivatördür. Bu nedenle, wt-p53 (wild type- fonksiyonel) geninden yoksun hücrelerin apoptotik indükleyicilere karşı daha dirençli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu çalışma, mutant-p53 eksprese eden hücrelerin, yani H520'nin MeJA'ya wt-p53 eksprese eden hücrelerden, yani A549'dan daha duyarlı olduğu bulunduğu sanılanın tersini destekleyen sonuçlar ortaya konmuştur (80). Elde ettikleri sonuçlar ayrıca H520 hücrelerindeki Bcl2 seviyesinin A549 hücrelerindekiinden daha yüksek olduğunu göstermiştir, bu nedenle bu durum önceki deneyde kullanılan hücrelerin jasmonatlara daha yüksek duyarlılığının Bcl2 seviyesine bağlı olmadığını



düşündürmüştür. Ayrıca, p53'ü fosforile etme ve aktivitesini artırma kabiliyetine sahip bir MAPK olan p38'in H520 hücrelerinde fosforilasyonu, MeJA'ya maruz kaldıktan 2 saat sonra artarken A549 hücrelerinde fosforilasyonu, maruziyetten en az 8 saat sonra azalmıştır. Sonuç olarak, MeJA'nın NSCLC hücrelerine yönelik sitotoksik etkileri p53 ekspresyonundan ve p38 fosforilasyonundan bağımsızdır, ancak seviyelerine bakılmaksızın Bcl2 proteinlerinin varlığına bağlıdır.

#### 4.8. MeJA ve Hücre Ölüm Yolakları

MeJA, aktivitesi kanıtlanmış bir HK-2 inhibitörüdür. Kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere göre spesifik olarak fazla eksprese olan proteinlerden biri olan HK-2 enziminin inhibe edilmesi sonucu kanser hücrelerinin glikoz alımı sekteye uğramakta ve bu yolla hücrenin glikoz üzerinden beslenmesi engellenmektedir. Hücrelerin beslenmelerinin engellenmesi/yavaşlatılması ise kanserin yayılımını durdurmak üzere düşünülen yollardan biridir.

Cohen ve arkadaşları tarafından, jasmonatların çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılayabildiği ve bu hücreleri ölüme götürebileceği bildirilmiştir. Jasmonatlar, kanser hücrelerine karşı oldukça seçici olması, normal hücrelere karşı etkisiz olması ve tedaviye direnç gösteren hücrelere karşı etki etme kabiliyetine sahip olması ile kanser tedavi ve önlemeye yönelik ilaçlarda en çok arzu edilen özelliklere sahip olmaları ile oldukça dikkate değer bileşiklerdir. Lösemik hücre hattı (MOLT-4)'nda, MeJA'nın bu habis hücre hattına karşı normal lenfositlerden çok daha fazla sitotoksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (87). Bir diğer özellik ise, p53 ekspresyonlarında farklılık gösteren (mutant p53 genine sahip ve mutasyona uğramamış (wild) tip p53 genine sahip) aynı soydan bir çift B-lenfoma klonu kullanılarak gösterilmiştir. Bu klonlar, sitotoksik bir ilaç olan Bleomycin ve radyomimetik neokarzinostatin (NCS)'e verdikleri hücresel yanıtlar açısından büyük ölçüde farklılık göstermektedir. Tespit edilene göre mutant p53 eksprese eden klon, bu maddelere çok daha az duyarlıdır (75,77). Aksine, jasmonatların her iki klona karşı da eşit derecede aktif olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yabani tip hücrelerde MeJA çoğunlukla apoptotik ölüme neden olurken, mutant hücrelerde nekrotik ölüme neden olmuştur (77,104). Bu bulgu, jasmonatların apoptotik olmayan bir hücre ölümü modunu indükleyerek, mutant p53 eksprese eden hücrelerin kemoterapiye karşı

direncini aşabildiğini göstermektedir (77). Bunun yanı sıra jasmonatlar, p53 mutasyonu veya P-glikoprotein (P-gp) aşırı ekspresyonunun sebep olduğu ilaç direncine rağmen hücre ölümünü indüklemeye kabiliyetine sahiptir.

MeJA, serviks kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemesine rağmen, hücre ölümünün çoğu apoptotik olmayan/nekrotik bir süreçten kaynaklandığı görülmektedir. Annexin V bağlanması (PI+ artı PI<sub>-</sub>) ile tanımlanan, MeJA ile muameleden 24 ve 48 saat sonra tespit edilen apoptotik hücre yüzdeleri, düşük DNA içeriği (sub G1) ile karakterize edilenlerden daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Ek olarak, Annexin V/PI<sub>-</sub> (erken apoptotik) oranı, Annexin V/PI+ (geç apoptotik/nekrotik) hücrelere kıyasla daha düşük oranda saptanmıştır. En olası açıklama, MeJA muamelesinden sonra gözlenen hücre ölümünün sadece kısmen apoptozdan kaynaklandığıdır. ATP seviyesinin 0,5 saatten sonra net bir şekilde gözlenebilen ATP seviyesindeki hızlı düşüş, nekrotik hücre ölümüne işaret etmektedir, çünkü ATP kaybı nekroz için karakteristiktir (109). Bu, daha önce lösemi hücrelerinde (79) gösterildiği gibi MeJA'nın mitokondri üzerindeki doğrudan etkisinden veya ATP'nin tükenmesiyle ilişkili bir nekrotik hücre ölüm programının aktivasyonundan kaynaklanıyor olabilir (83,109). Apoptotik olmayan bir hücre ölümünün, yüksek dirençli mutant p53-eksprese eden B-lenfoma hücrelerinde MeJA tarafından mitokondriyal ATP'nin tükenmesi yoluyla indüklendiği gösterilmiştir (87).

#### **4.9. MeJA ve Metastaz**

Jasmonatların meme ve prostat kanseri, melanom, lenfoblastik lösemi vb. kanser türleri dahil olmak üzere çeşitli murin ve insan tümörleri üzerindeki kanser önleyici etkisine tanık olunduktan sonra, jasmonatların metastatik süreci inhibe etme kabiliyetine sahip olup olmadıkları üzerine daha fazla araştırma yapılmaya başlanmıştır (110). İnvazyon ve metastaz geleneksel anti-kanser tedavilerinin iki temel problemi. Metastatik hastalık aşamasında, kanser hücreleri dokular içinde kendileri hareket ederler ve uzaktaki organları istila edip lokalize olabilirler. Metastatik bir hastalık olduğunda, lokal terapi artık tek başına hastaları iyileştiremez ve böyle bir durumda kanser hücrelerinin göçünü kontrol etmek için alternatif bir tedaviye ihtiyaç duyulur. Bu nedenle, jasmonatların potansiyel anti-metastatik aktivitelerini metastatik melanom modelinde değerlendirilmiş ve bunun üzerine araştırmalar yapılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu elde edilen in vitro sonuçlara göre, MeJA'nın hücre

sayısını azaltmayan veya hücre ATP depolarını etkilemeyen konsantrasyonlarda hücre hareketliliğine müdahale edebildiğini ortaya konmuştur. In vivo çalışmalar ise, MeJA'nın murin akciğerlerinde melanom büyümesinin gelişimini önemli ölçüde baskıladığını göstermiştir (104). Bu bulgular, kanser hücrelerinde proliferasyon ve ölümün baskılanmasının yanı sıra (110), MeJA'nın metastatik süreç için gerekli olan motilite gibi çeşitli hücre fonksiyonları bastırma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

#### **4.10. MeJA, Arabidopsis'te Çoğalmayı Baskılar**

Memeli kanser hücrelerinde apoptoz ve hücre döngüsünün bloklanması indüklemekteki rollerinin yanı sıra, jasmonatların bitkilerde mitoz ve büyümeyi inhibe etmekten sorumlu olduğu da bulunmuştur. Zhang ve Turner'ın (2008) bir çalışması, tekrarlanan yaralanmanın, sonunda organ boyutunda bir azalmaya neden olan bir büyüme inhibitörü olan jasmonat sentezini aktive ettiğini göstermiştir (111).

#### **4.11. MeJA'nın Diğer Antikanser İlaçlarla Kombinasyonu**

Cohen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MeJA ve diğer çeşitli anti-kanser ajanlarının ve 2-deoksi-D-glukozun (2DG) kombine etkileri değerlendirilmiştir. 2DG, MeJA ile kombine olarak kullanıldığında vahşi tip (wt) veya mutant p53 eksprese eden B lenfoma hücrelerinde ATP tükenmesi üzerinde ilave bir etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuş bir glikoliz inhibitörüdür (87). Bu ilave etkinin temeli muhtemelen jasmonatların ve 2DG'nin ATP üretiminin yapıldığı oksidatif fosforilasyon ve glikoliz hücre fonksiyonları üzerindeki inhibe edici etkilerinden kaynaklanmaktadır. Yapılan bu çalışmada ise MeJA'nın diğer kanser önleyici ilaçlarla kombinasyonları sinerjik veya aditif etkiler sergilediği gösterilmiştir. MeJA'nın glikoliz inhibitörü 2-deoksi-D-glukoz (2DG) ve dört geleneksel kemoterapötik ilaç ile kombinasyonu, çeşitli kanser hücre türleri üzerinde sitotoksik etkilere yol açtığı görülmüştür. Rutin klinik kullanımdaki dört farklı kemoterapötik ilaç, MeJA'dan farklı olan etki mekanizmaları baz alınarak seçilmiştir. BCNU (Carmustine) ve CDDP ilaçları, biyolojik olarak önemli moleküllerde amino, karboksil, sülfhidril ve fosfat grupları ile kovalent bağlar oluşturarak hücre fonksiyonlarını bozan alkilleyici ajanlar ailesine aittir. Taksol, porsuk bitkilerinin iğnelerinden çıkarılan öncülerin yarı sentetik türevleri olan Taksan ailesine aittir. Taksenler, mikrotübüler birleşmeyi ve stabilizeyi

teşvik eder, bu nedenle mitozda hücre döngüsünü bloke eder (19). Daha öncesinde yapılan çalışmalarda mitokondrinin MeJA'nın doğrudan hedef organeli olduğunu gösterilmiştir. BCNU'nun mitokondriyal DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (112). Taksol, mitokondriyal membran depolarizasyonunu indükleyerek apoptozu indükleyen faktörün (AIF) mitokondriden sitozole translokasyonuna neden olur (113). CDDP, mitokondriyal membran depolarizasyonunu ve sitokrom c salınımını indükler (114). Yapılan bu çalışma ile MeJA'nın, istenmeyen yan etkileri azaltma potansiyeline işaret ederek, bu kemoterapötik ilaçların IC<sub>50</sub> değerlerini önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir. MeJA ve 2DG kombinasyonu, muhtemelen her iki ATP biyosentez yolunun inhibisyonu arasındaki iş birliği nedeniyle, karsinom hücreleri üzerinde süper etkili sitotoksik bir etkiye sahiptir.

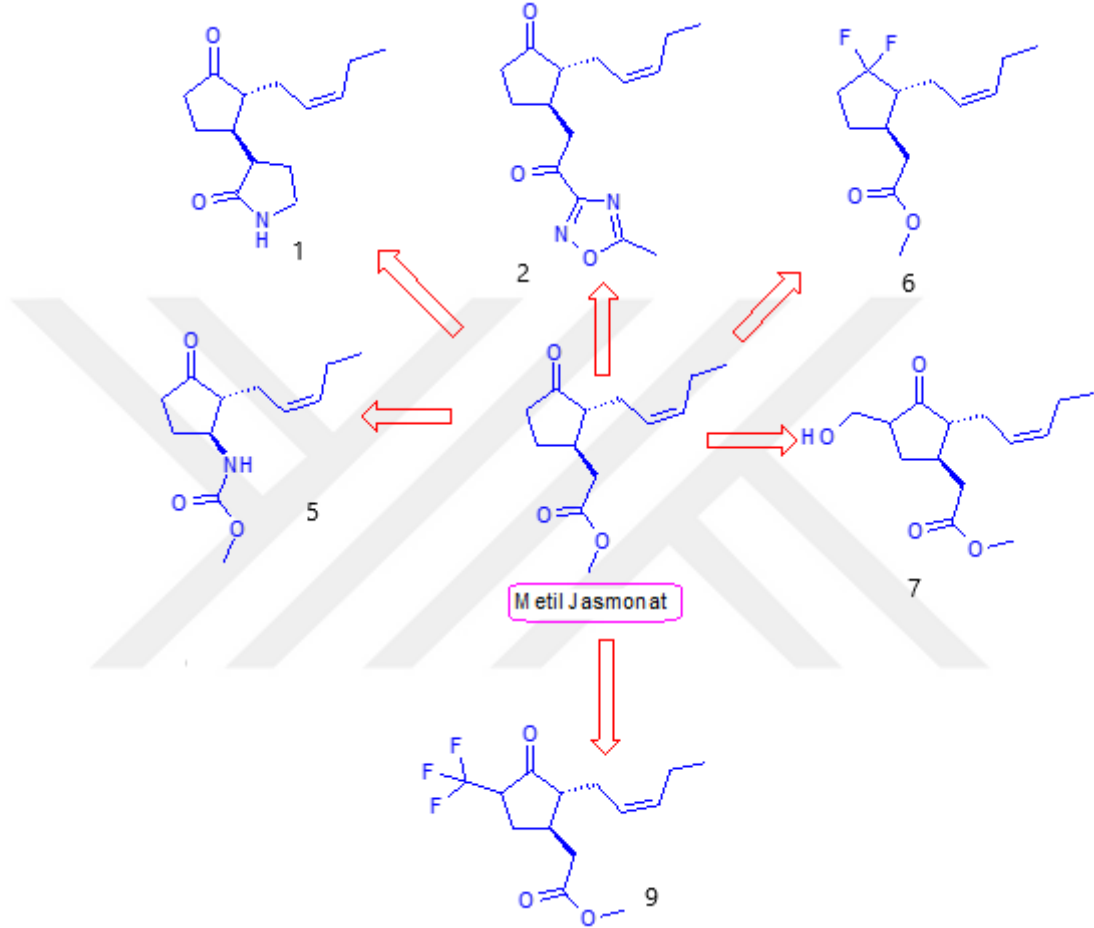
MeJA'nın serviks kanseri hücrelerine karşı CDDP'den daha seçici olduğu ortaya konmuştur (115).

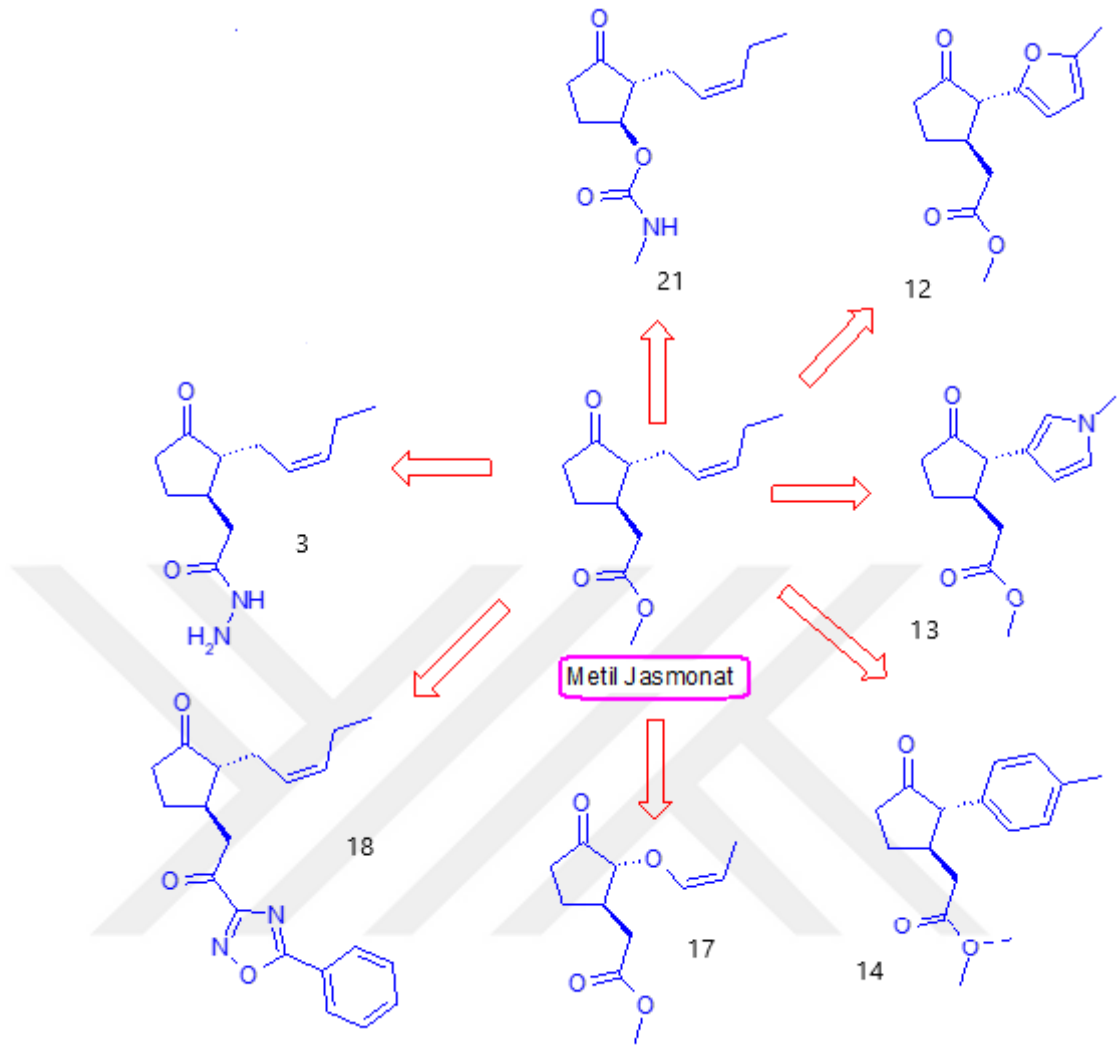
Özet olarak, jasmonatlar, kanser hücrelerine karşı seçici sitotoksikite sergileyen ve böylece kanser terapötiklerinin gelişimi için umut sunan antikanser ajanlarıdır (104). Jasmonatlar hem anti tümör aktiviteler sergileyen stres hormonlarıdır (77) hem de sistemik edinilmiş direncin (SAR) yerleşik indükleyicileridir. Yıllar içinde MeJA'nın hem in vitro hem de in vivo olarak çeşitli tümörlere karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Transforme hücrelere karşı sitotoksikitesi oldukça seçicidir, bu nedenle genellikle mevcut sitotoksik ilaçlarda karşılaştırıldığında düşük yan etkileri dikkat çekmektedir.

Ek olarak, MeJA'nın hem in vitro hem de in vivo olarak murin metastatik melanom hücreleri üzerinde anti-metastatik etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır. MeJA'nın memeli hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisinin yanı sıra, MeJA'nın amitokondriyal parazit *T. vaginalis*'e karşı sitotoksik olduğu ve *Arabidopsis* bitkisinde büyümeyi engellediği bulunmuştur.

## 5. MATERYAL VE METOD

Deneylerde kullanılan özgün MeJA mimetikleri İstanbul Medipol Üniversitesi İlaç Keşif ve Geliştirme Laboratuvarında Doç.Dr. Mustafa Güzel ve ekibi tarafından sentezlenmiştir (Şekil 5.1) (116).





Şekil 5.1. MeJA ve sentezlenen özgün MeJA mimetiklerinin kimyasal yapıları.

### 5.1. Hekzokinaz-2 Enzim Aktivite Deneyi

Özgün MeJA mimetiklerinin HK-2 enzim inhibisyonunu belirlemek için The Universal Enzyme Assay Kit (R & D, EA004) kullanıldı. Bu kit, içinde bulunan Coupling fosfataz yardımıyla ADP'yi AMP'ye dönüştürdüğü için inorganik fosfatı kantitatif olarak ayırır. Serbest kalan inorganik fosfat, malakit yeşili fosfat tespit reaktifleri ile kompleksleşir. Elde edilen kompleks oran, fosfataz tarafından ADP'den AMP oluşumu ile orantılıdır. Bu nedenle inorganik fosfat üretim hızı, kinaz reaksiyonunun kinetiğini yansıtır. Enzim aktivitesi deneyi, üreticinin talimatlarına göre uygulandı. Kısaca, 0.5 mM ATP ve 25 mM glikoz kullanılarak bir substrat

karişımı hazırlandı. İnsan Hekzokinaz-2 Enzimi (rhHK2) 7.5 ng / µL olacak şekilde ve Coupling fosfataz 4 enzimi 10 µg / mL olacak şekilde hazırlandı. Sırasıyla, 20 µL tampon, 20 µL rhHK2, 2 µL örnek (MeJA mimetikleri) ve 10 µL Coupling fosfataz 4, kuyuya eklendi ve 10 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra 30 µL malakit yeşili reaktif A, 100 µL ultra saf su, 30 µL malakit yeşili reaktif B eklendi ve 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, absorbans 620 nm'de okundu ve sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı. Pozitif kontrol olarak ATP yerine ADP konuldu. Negatif kontrol olarak kinaz yerine tampon konuldu.

$$\text{Spesifik Aktivite (pmol/dk/}\mu\text{g)} = \frac{\text{Oranlanmış fosfat salınımı}^* \text{ (nmol)} \times (1000 \text{ pmol/nmol})}{\text{İnkübasyon süresi (dk)} \times \text{enzim miktarı} (\mu\text{g}) \times \text{coupling oranı}^{**}}$$

\* Fosfat standardının doğrusal eğrisinden elde edilir ve kontrole göre ayarlanır.

\*\* Belirtilen koşullarda coupling oranı 0,475'tir.

## 5.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan İnsan Akciğer Karsinoma Hücre hattı A549 (ATCC # CCL-185), İnsan Yumurtalık Kanseri Hücre Hattı SKOV-3 (ATCC # HTB-77) ve Fare Fibroblast Hücre Hattı 3T3 (ATCC # CRL-1658) sırasıyla A549 hücre hattı için RPMI (Gibco) ve SKOV-3 ve 3T3 hücre hatları için yüksek glukoz içeren (high glucose) DMEM (Gibco) besiyerleri kullanılarak kültüre edildi. Her iki hücre hattı için de %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (hacim/hacim) (Gibco) ve %1 Penisilin/streptomisin (h/h) (Gibco) kullanılarak uygun besiyeri hazırlandı. Hücreler, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'lik ortam sağlayan inkübatörde çoğaltıldı. Stok kültürler 25 cm<sup>2</sup> steril filtreli kapaklı flasklarda (Corning) ve deney kültürleri ise 100 mm x 15 mm hücre kültürü uyumlu, kapaklı, steril petri kaplarında (Corning) çoğaltıldı. Hücreler stok kültürlerden açıldığı zaman sırasıyla şu adımlar izlendi:

- Hücreleri içeren tüp (Cryovial) -80°C ortam sağlayan soğutucudan çıkarılır çıkarılmaz 37°C ortam sağlayan su banyosunda yaklaşık 15 saniye tutuldu.
- Hücreleri içeren tüp steril hale getirilerek hücre kültüre edilme işleminin gerçekleştirileceği ve daha önceden steril hale getirilmiş Sınıf II biyogüvenlik kabinin içine alındı.
- 15 ml hacimli tüp (Falcon) içinde önceden ısıtılmış, taze ve serum içermeyen 10 ml hücre besiyerine, hücreleri içeren bu tüpün içeriği tamamıyla aktarıldı ve 1 ml kapasiteli pipet yardımıyla birkaç kez pipetaj yapıldı.
- Hücreler süspanse edildikten sonra hücrelerin bulunduğu tüp (Falcon) 5 dakika 1000 rpm (revolutions per minute/dakikadaki dönüş sayısı)'de santrifüj edildi.
- Üst sıvı (süpernatant) uzaklaştırıldı ve tüpün dibine çökmüş olan hücreler üzerlerine 2 ml tam besiyeri (%10 FBS %1 Penisilin/Streptomisin içeren) eklenerek 1 ml hacimli pipet ile pipetaj yapıldı. Böylece hücreler yeni besiyerinde süspanse hale getirilmiş oldu.
- Hücrelerin üzerine gerekli kadar besiyeri eklenerek 10 ml hacimli serolojik pipet yardımıyla tekrar süspanse edildi ve 25 cm<sup>2</sup> steril filtreli kapaklı flaska aktarıldı.
- Hücreler, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'lik ortam sağlayan inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.

Hücre pasajı (alt kültürü) hücreler ~%70 yoğunluğa ulaştınca aşağıdaki adımlar izlenerek yapıldı:

- Hücrelerin üzerindeki tüm besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler nazikçe 5 ml 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) (Gibco) ile yıkandıktan sonra 2 ml %0,25 Trypsin/EDTA (Gibco) hücrelerin üzerine eklendi ve hücreler yaklaşık olarak 3 dakika 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'lik ortamda Trypsin/EDTA ile muamele edildi.
- Hücrelerin bulunduğu kültür kabına FBS içeren 10 ml yeni besiyeri eklendi ve bu şekilde tripsin enziminin aktivitesi durduruldu.
- Eklenen 10 ml besiyeri serolojik pipet yardımıyla alınıp verilerek hücrelerin tamamen hücre kültür kabı yüzeyinden kaldırılması sağlandı.



- Bütün sıvı çekilerek uygun hacimdeki bir tüpe alındı ve 5 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- Üst sıvı atılarak hücreler yeni besiyeri ile süspanse edildi.
- Deney yapılmayacağı zaman pasajlama için hücreler 1/5 oranında yeni besiyeri ile seyreltilerek petrilere ekildi.
- Hücre pasajlama işlemi her 3 günde bir hücre yoğunluğu dikkate alınarak periyodik olarak yapıldı.

Hücrelerin saklanmak üzere dondurulması işleminde aşağıdaki adımlar sırasıyla izlendi:

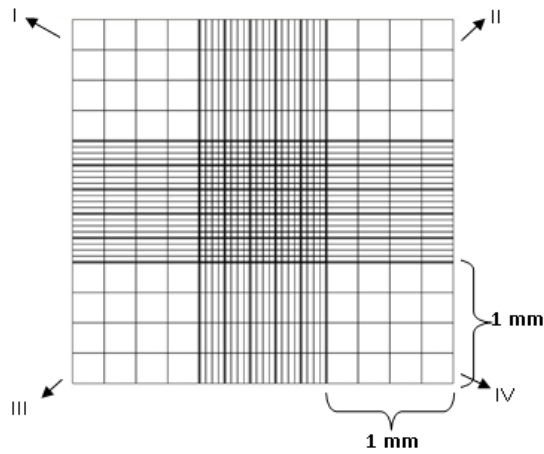
- Hücrelerin sağlıklı olduklarından ve kontaminasyon bulunmadığından emin olundu. Hücrelerin pasaj yoğunluğuna gelmesi ile hücreler dondurulmak üzere steril hale getirilmiş hücre kültürü kabinine alındı.
- Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile yıkandı.
- Tripsin enzimi yardımıyla hücrelerin buldukları yüzeye bağları koparıldı.
- %10 FBS içeren tam besiyeri ile tripsin inhibe edildi ve hücreler 15 ml hacimli tüpe toplandı.
- 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj gerçekleştirildi ve hücrelerin pellet şeklinde dibe çöktüğü görüldükten sonra steril kabin içerisinde üst sıvı uzaklaştırıldı.
- Eğer kültür devam ettirilecek ise hücreler taze tam besiyerinde süspanse edilerek uygun miktarda hücrenin alt kültürü yapıldı ve kalan hücreler ile santrifüj işlemi tekrarlanarak üst sıvı uzaklaştırıldı.
- %10 DMSO (dimetilsülfoksit) içeren FBS ile hücreler süspanse edildikten sonra hücreleri içeren bu solüsyondan 1,5 ml hacimli tüplerin (cryovial) her birine 1 ml olacak şekilde alındı.
- Kapaklar sıkıca kapatıldıktan sonra hızlı bir şekilde hücreler -80°C'ye alındı.

### 5.3. Hücre Canlılığı Analizi

A549, SKOV-3 ve 3T3 hücreleri hücre kültüründe 100 mm x 15 mm steril petrilere, 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de logaritmik faza ulaşana kadar inkübe edildi. Hücreler, steril petrilere ~%70 doluluğa ulaşınca aşağıda detaylı bir şekilde açıklandığı üzere hücre sayımı yapıldı ve her bir hücre hattı için ayrı olacak şekilde, siyah 96 kuyucuklu plakaların (Corning 96 well plate black- clear bottom) her bir kuyucuğunda 1x10<sup>4</sup>

hücre ihtiva edecek şekilde kuyucuklara hücre ekimi gerçekleştirildi. Daha sonrasında hücreler 24 saat boyunca özgün moleküllerle ve MeJA (kontrol) ile altı ayı konsantrasyonda (0,1- 10 mM) inkübe edildi. Birbirinden bağımsız üç deney gerçekleştirildi.

Hücre canlılık deneyi için hücrelerin her kuyucuğa uygun sayıda ekiminin yapılması için öncelikle hücreler hemasitometrede (Thoma lamı) sayıldı (Şekil 5.3.2). Thoma lamının üzerine lamel yerleştirildikten sonra hücre içeren medium 1/10 oranında tripan mavisi ile karıştırıldıktan sonra 10 µl hücre-boya karışımı, lam ile lamelin altında dikkatlice pipetlendi ve ters mikroskopta (inverted mikroskop) 10x büyütmede hücreler sayıldı. Toplam 4 büyük kare (Şekil 5.3.1'deki I, II, III ve IV no'lu kareler) sayıldı ve ortalamaları alındı. Her bir büyük kare 16 birbirine eş küçük kareden oluşmaktadır. Daha sonra 4 büyük karede bulunan canlı hücrelerin sayılması ve bu sayının ortalamasının alınması ile elde edilen sayı  $10^4$  ile çarpılarak ml'deki hücre sayısı bulundu. Hücreleri sayma işleminden önce kaç mililitrede süspanse ettiyse bu da çarpıma ekleyerek elimizdeki toplam hücre sayısını buluruz. Bir büyük karenin her kenarının uzunluğu 1 mm ve derinliği 0.1 mm olduğu için hacmi  $0.1 \text{ mm}^3$ 'e eşittir (yani  $0.1 \text{ µl}$ ). Bu nedenle dört karede bulunan canlı hücrelerin sayılmasıyla elde edilen ortalama sayı, ml'deki canlı hücre sayısını bulmak için 10.000 ile çarpılmaktadır.



Şekil 5.3.1. Thoma lamında bulunan alanlar



Şekil 5.3.2. Thoma lamı görüntüsü

I, II, III ve IV no'lu karelerde bulunan hücreler sayıldı ve yukarıda anlatıldığı şekilde mililitredeki hücre sayısı bulundu.

Hücreler sayılıp 1 mililitredeki toplam hücre sayısı tespit edildikten sonra, sayım öncesi tripsin ile kaldırmış hücreler kaç mililitre besiyerinde süspansedildiyse mililitredeki hücre sayısı ile çarpılarak toplam hücre sayısı bulunabilir. Buna göre deney için gerekli hücre sayısına sahip olduğundan da emin olunmuş olur. Bu deneyde her bir özgün molekül için, siyah 96 kuyucuklu plakada konsantrasyon başına 3 tekrar olacak şekilde, 5 konsantrasyon hazırlandı. Bu konsantrasyonlar hücreler özgün maddeler ile muamele aşamasına geldiğinde hazırlanarak hücrelere taze hazırlanmış şekilde verildi. Buradaki amaç özgün maddelerin saklanma esnasında istenmeyen durumların oluşabilme ihtimalini sıfıra yaklaştırmaktır.

Hesaplamalar yapıldıktan sonra hücreler gerekli miktarda besiyerinde süspansedildi ve rezervuar içine alındı. 8 uçlu otomatik pipet yardımıyla hücreler siyah 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve 37°C %5 CO<sub>2</sub>'lik ortam sağlayan inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda hücreler kontrol edildi ve madde ekimi için standart durumda oldukları gözlemlendikten sonra taze hazırlanan maddeler hücrelerin bulunduğu ortama ekildi. Bunun için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri 8 uçlu otomatik pipet kullanılarak uzaklaştırıldı. Daha sonra maddelerin çeşitli konsantrasyonlarını içeren besiyeri, her kuyucukta 100 µL ihtiva edecek şekilde, hücrelere verildi (Tablo 5.3.1).

**Tablo 5.3.1.** Hücre canlılık deneyinde kullanılan hücreler, maddeler ve konsantrasyonlar.

Denenen Moleküller	MeJA, OLE, 5-FU, DTX, CDDP, Özgün MeJA mimetikleri (10 madde), %2,5 DMSO (negatif kontrol)
Kullanılan Hücre Hatları	A549, SKOV-3, 3T3
MeJA Mimetikleri için Denenen Konsantrasyonlar	0,1 mM- 0,5 mM- 1 mM- 2 mM- 5 mM- 10 mM
Kombine Uygulamada Denenen Maddeler	CDDP + En aktif MeJA mimetigi OLE + En aktif MeJA mimetigi 5-FU + En aktif MeJA mimetigi DTX + En aktif MeJA mimetigi

**Tablo 5.3.2.** Hücre hatlarında denenen özgün moleküller. Reaksiyon verimi dolayısıyla bazı özgün moleküller sadece tek bir hücre hattında denenmiştir.

A549	SKOV-3
Bileşik 1	Bileşik 1
X	Bileşik 2
Bileşik 3	Bileşik 3
Bileşik 5	Bileşik 5
X	Bileşik 6
Bileşik 9	Bileşik 9
Bileşik 12	Bileşik 12
Bileşik 13	Bileşik 13
Bileşik 14	Bileşik 14

Bileşik 17	Bileşik 17
Bileşik 18	X
Bileşik 21	Bileşik 21
MeJA	MeJA

**Tablo 5.3.3.** Maddelerin A549 ve SKOV-3 hücre hattındaki IC<sub>50</sub> değerlerinin tespiti için belirlenen konsantrasyonlar

<b>Maddeler</b>	<b>IC<sub>50</sub> Değeri Belirlenmesi için Denenen Konsantrasyonlar (μM)</b>
DTX	50- 100- 200- 500- 1000
OLE	5- 20- 60- 200- 500
CDDP	10- 50- 100- 200- 500
5-FU	10- 100- 200- 500- 1000

**Tablo 5.3.4.** Maddelerin SKOV-3 hücre hattında kombine halde denendiklerinde oluşturacakları düşünülen sinerjik etkiyi görebilmek ve bu durumdaki IC<sub>50</sub> değerini tanımlayabilmek için belirlenen konsantrasyonlar

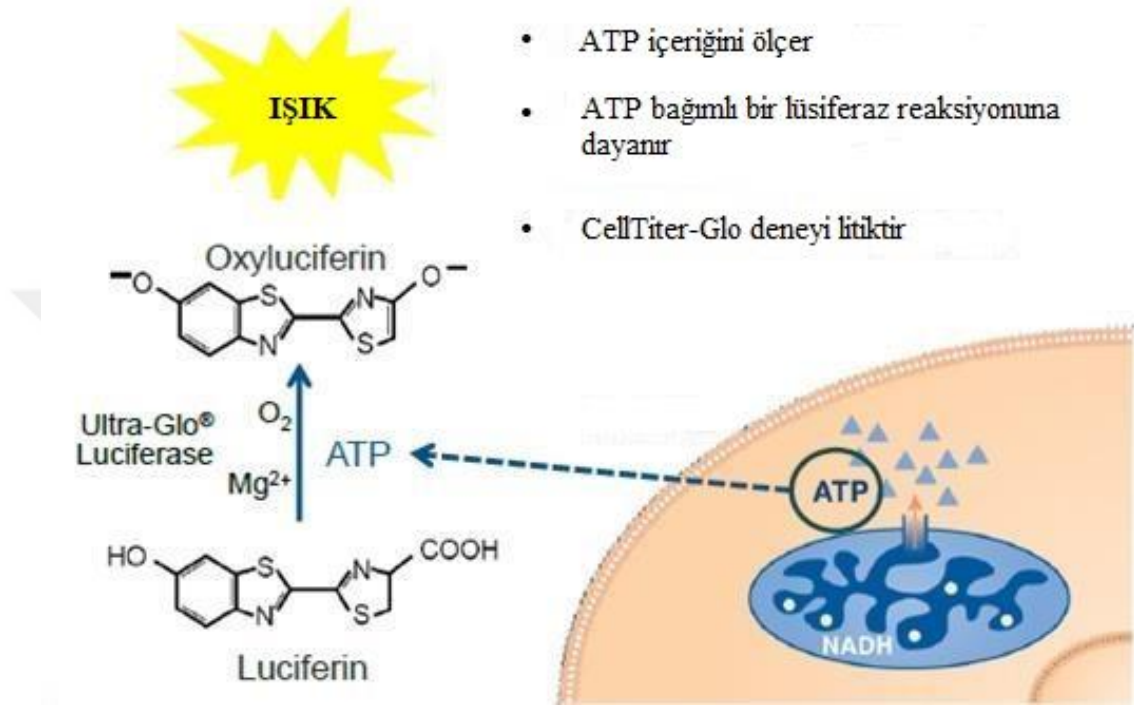
<b>Maddeler</b>	<b>Kombine Olarak Denenen Maddeler için Belirlenen Konsantrasyonlar</b>
DTX	10- 50- 250- 500- 1000 (μM)
OLE	2- 10- 50- 100- 200 (μM)
CDDP	2- 10- 50- 100- 200 (μM)
5-FU	5- 25- 133- 225- 450 (μM)
Bileşik 3	0,002- 0,1- 0,5- 1- 2 (mM)

**Tablo 5.3.5.** Maddelerin A549 hücre hattında kombine halde denendiklerinde oluşturacakları düşünülen sinerjik etkiyi görebilmek ve bu durumdaki IC<sub>50</sub> değerini tanımlayabilmek için belirlenen konsantrasyonlar

<b>Maddeler</b>	<b>Kombine Olarak Denenen Maddeler için Belirlenen Konsantrasyonlar</b>
DTX	10- 50- 250- 500- 1000 (µM)
OLE	1- 5- 25- 50- 100 (µM)
CDDP	1,2- 6- 30- 60- 120 (µM)
5-FU	2,5- 12,5- 62,5- 125- 250 (µM)
Bileşik 3	0,07- 0,35- 1,75- 2,5- 5 (mM)

Özgün maddeler DMSO içerisinde çözdürülmüş ve deneye başlamadan önce içerisinde tortu kalmadığından emin olunmuştur. Maddelerde çözücü olarak DMSO kullanılmasından dolayı kontrol gruplarında %2,5 DMSO içeren besiyeri kullanıldı. Bunun yanı sıra sadece besiyeri içeren kontrol grupları da her bir plakada yer almaktadır. 3T3 hücre hattında yalnızca Bileşik 1 için analiz yapıldı. Maddelerin A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında IC<sub>50</sub> değerleri tespit edildikten sonra, bu değerler esas alınarak belirlenen aralıkta kombine madde uygulamasında, özgün bir madde ve kanser tedavilerinde üzerinde çalışılan bir madde sinerjik etki tespiti amacıyla hücrelere birlikte uygulandı (Tablo 5.3.4 ve Tablo 5.3.5). Burada etkinliği kanıtlanmış özgün olmayan maddeler; OLE, CDDP, DTX ve 5-FU'dur. Bu maddelerin IC<sub>50</sub> değerlerini belirlemek ve literatürde yer alan verilerle eşleşme durumunu kontrol edebilmek için bu maddeler A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında canlılık deneylerine tabi tutuldu (Tablo 5.3.3). Kombine madde uygulanan gruplarda ise iki madde aynı besiyeri içinde hazırlandı ve bu şekilde hücrelere aynı anda verilmiş oldu. Konsantrasyonlar eklendikten sonra hücreler 24 saat boyunca 37°C %5 CO<sub>2</sub>'lik ortam sağlayan inkübatörde maddelerle muameleye bırakıldı. 24 saatin sonunda hücre metabolizması üzerinden hücre canlılığını ölçme temeline dayanan (Şekil 5.3.3) Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI, ABD) reaktifi her bir plakaya besiyeri aspire edilmeden 5 µL uygulandı ve plakalar alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde sarıldıktan sonra 5 dakika boyunca horizontal hareketlerle hafifçe karıştırıldı. Plakaların spektrofotometrede (SpectraMax i3x Multi-Mode Detection Platform

(Molecular Devices, USA)) lüminesans ışık ölçümü yapılarak canlı hücrelerin yüzdesi belirlendi. Elde edilen veriler GraphPad Prism 7 programında analiz edilerek IC<sub>50</sub> değerleri belirlendi.



Şekil 5.3.3. CellTiter-Glo deney kitinin çalışma prensibi (117)

#### 5.4. Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi

Apoptotik yolağın son basamağında kesilime uğrayan PARP (cleaved-Poly (ADP-ribose) Polymerase) ve glikoz alım aşamasında aktif rol oynayan HK-2 proteinlerinin deneysel uygulamalardan sonra translasyonel düzeydeki değişiminin tespit edilmesi amacıyla immün blotlama tekniği kullanıldı. Housekeeping genlerden biri olan Aktinin protein düzeyindeki anlatımı kontrol olarak kullanıldı. Western blot için Bio-Rad firmasının protokolü takip edildi.

##### 5.4.1. Hücre Lizisi ve Protein İzolasyonu

A549 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve ertesi gün her madde için ayrı iki kuyucuk olacak şekilde maddeler hücrelere verildi ve hücreler 24 saat boyunca

Bileşik 3'ün IC<sub>50</sub> konsantrasyonu ile muamele edildi. Kontrol grubu olarak hücreler %1 DMSO içeren besiyeri ile muamele edildiler.

Hücreler, maddeler ile 24 saatlik muamele sürelerini tamamlamadan önce lizis tamponu hazırlandı. Lizis tamponu içerisinde %1 100X proteaz/phosphatase inhibitörü (Cell Signaling / 5872), %10 NaF (Sodyum Florür), %0,5 200 mM'lık PMSF bulunur. PMSF'in yarılanma ömrü 30 dakika olduğu için en son konur. Hazırlanan lizis tamponu buzda bekletildi.

24 saatin sonunda hücreler inkübatörden çıkarıldı. Hücre kültürü kabini içerisinde hücrelerin üzerinde besiyeri çekildi ve hücreler sanki yıkama yapar gibi, kendi besiyeri ile yıkandı. Daha sonra çekilen bu besiyeri 50 ml steril, kapaklı tüpe toplandı. Daha sonra besiyeri çekilmiş bu hücreler 3 ml FBS içermeyen besiyeri ile yıkandı. Toplanan besiyeri 50 ml steril tüpe alındı. Hücreler 3 dakika boyunca inkübatörde tripsin ile muamele edildi. Daha sonrasında farklı gruplar, besiyerlerinin de toplanmış olduğu farklı tüplere alındı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar atıldı ve hücreler soğuk PBS (+4°C) ile süspansiyon edildi ve 2 ml hacimli tüplere alındı (Eppendorf) ve hücreler buzda tutuldu. Hücrelerin bulunduğu tüpler 5 dakika 1200 rpm'de +4°C'de santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Pellet, lizis tampon ile süspansiyon edildi ve ultrasonikatör ile 5 saniye süresince 3 döngü ve %50 güçte ses dalgalarına maruz bırakılmak yoluyla homojenize edildi. Bu aşamadan sonra lizis edilen bu hücreler 13.300 rpm'de 20 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvı yeni tüplere alındı ve örnekler, SDS muamelesi yapılana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Örneklerden (süpernatant) 1 µl alındı ve 29 µl dH<sub>2</sub>O eklendi. 1:30 oranında seyreltilen bu örnekler protein konsantrasyonunu ölçmek için kullanıldı. Konsantrasyon ölçmek için Implen Spektrofotometrik Nanodrop cihazı kullanıldı.

Bu aşamadan sonra tüm protein örnekleri aynı konsantrasyona eşitlenecek şekilde hesaplama yapıldı. Yapılan hesaplamalara göre protein örnekleri Laemmli buffer ve β-merkaptoetanol ile karıştırıldı. 5 dk boyunca 100°C'de tutuldu ve proteinlerin denatüre olması sağlandı.

- Biorad protokolüne göre 2X %5'lik Laemmli Buffer hazırlamak için;



100 µl için; 95 µl 2X Laemmli Buffer + 5 µl β-merkaptoetanol ile karıştırılır.

Daha sonra bu hazırlanan bufferdaki laemmli miktarı 1X'e inecek şekilde protein ile karıştırılır.

- 2X için; 30ul protein + 30ul Laemmli Buffer + β-merkaptoetanol ile karıştırılır. Total hacim yükleme yapılacak kuyu sayısına bağlı olarak ayarlanır.

Bu aşamadan sonra örnekler kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### 5.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

##### 5.4.2.1. Jel Hazırlama

Hücrelerden elde edilen proteinlerin ayrılması için, %5 konsantre edici faz ve %10 ayırma fazı içeren poliakrilamid jeller hazırlandı. Bunun için önce jelin döküleceği camlar, kullanılmadan önce, distile su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Jelin iki kısmı bulunur; ayrıştırma (resolving) jeli ve yığma (stacking) jeli. Bunlardan ayrıştırma jeli, önce hazırlandı ve döküldü (Tablo 5.4.2.1.1). Ayrıştırma jeli polimerleştikten sonra yığma jeli döküldü ve taraklar yerleştirilerek polimerleşmeye bırakıldı.

**Tablo 5.4.2.1.1.** Ayrıştırma jeli hazırlama.

%10'luk Ayrıştırma Jeli (6 ml)	
Akrilamid-Bisakrilamid (%40'luk)	1,5 ml
Ayrıştırma Tamponu (4X)	1,5 ml
dH <sub>2</sub> O	296 µl
APS (%10'luk)	30 µl
Temet	5 µl

Jeli döktükten ve jelin düz olduğundan ve kabarcık kalmadığından emin olduktan hemen sonra jelin yüzeyine izopropanol eklendi. Daha sonra jel bu şekilde

polimerleşmeye bırakıldı. Yaklaşık yarım saat sonra jelin sabitlendiği aparat sağa-sola eğilerek izopropanol ve jel arasındaki çizginin oynayıp oynamadığı kontrol edilerek jelin polimerleştiğinden emin olundu. Daha sonra aparat eğilerek izopropanol döküldü. Daha sonra yığıma jeli döküldü (Tablo 5.4.2.1.2), tarak yerleştirildi ve jel polimerleşmeye bırakıldı.

**Tablo 5.4.2.1.2. Yığıma jeli hazırlama**

<b>%5'lik Yığıma Jeli (2 ml)</b>	
<b>Akrilamid-Bisakrilamid (%40'lık)</b>	250 µl
<b>Yığıma Tamponu (4X)</b>	500 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1236 µl
<b>APS (%10'luk)</b>	10 µl
<b>Temet</b>	4 µl

Ayrıştırma Tamponu (4X) hazırlamak için; 181,5 g Tris base, 850 ml H<sub>2</sub>O içinde homojen hale getirilir. pH, HCl (6M) kullanılarak 8.8'e ayarlanır. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra pH tekrar kontrol edilir ve ayarlanır (pH: 8.8). Daha sonra 1000 ml'e tamamlanır ve +4 C'de saklanır.

Yığıma Tamponu (4X) hazırlamak için; 60,5 g Tris base, 850 ml H<sub>2</sub>O içinde homojen hale getirilir. pH, HCl (6M) kullanılarak 6.8'e ayarlanır. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra pH tekrar kontrol edilir ve ayarlanır (pH: 6.8). Daha sonra 1000 ml'e tamamlanır.

%40 Akrilamid-Bisakrilamid hazırlamak için; 19.48 g akrilamid, 0.52 g bisakrilamid, 50 ml dH<sub>2</sub>O'da (son hacimde) çözülür.

%10 Amonyum Persülfat hazırlamak için; 0.1 g amonyum persülfat 1 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülür. Elektroforez yapılacağı gün (taze olarak) hazırlanır.

Jeller, kasetlere takıldı ve yürütme tankına alındı. Tank, 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. Jellerden taraklar çıkarıldı.

Kuyucuklar yıkandıktan sonra her bir kuyuya 15 µl örnek yüklendi ve bir kuyuya 5 µl protein belirteci (marker) yüklendi. Her bir kuyuya totalde 60 µg protein yüklendi. Madde uygulaması yapılmayan gruplar hariçtir, bu gruplar için kuyuya 30 µg protein yüklenmiştir. Numuneler jele yüklendikten sonra 150V'da akıtıldı ve bromophenol blue jelden çıkar-çıkamaz güç kaynağı durduruldu. Jel çıkarıldıktan sonra kurumaması için transfer solüsyonuna konuldu.

2X Elektroforez Tampon Solüsyonu (Running Solution/ Yürütme Tamponu) hazırlamak için; 12 g Tris Base, 57,6 g Glisin ve 4 g SDS tartılır, dH<sub>2</sub>O ile 2 L'ye tamamlanır. Elektroforez yapılacağı zaman 1:1 dH<sub>2</sub>O ile seyreltilerek kullanılır.

### **5.4.3. İmmün Blotlama**

#### **5.4.3.1. Membrana Transfer İşlemi (Semi-dry Yöntem)**

Jelde yürütme tamamlandıktan sonra jel tanktan çıkarıldı ve sırasıyla kasetten ve camlardan ayrıldı.

8 x 9 cm ebatlarında kesilen poliviniliden diflorür (PVDF) membran kullanılmadan önce metanol ile aktiveştirildi. Bunun için PVDF membran metanolde 30 saniye kadar tutuldu ve hafifçe çalkalandı. Daha sonra membran transfer tamponu içine alındı.

Semi-dry transfer için cihaza (Trans-Blot TurboTransfer System, Biorad) önce transfer tamponu ile ıslatılmış 11 cm x 9 cm ebatlarında kesilmiş filtre kağıtları (2 adet) kondu. Daha sonra membran yerleştirildi. Hava kabarcığı kalmaması için her aşamada yığının üzerinden transfer tamponu ile ıslatılmış rulo ile geçildi. Membran üzerine jel kondu ve arada hava boşluğu kalmadığına emin olundu. Filtre kağıtları arasında kalan hava boşlukları elektrik akımını engellediği için transferin gerçekleşmesini engelleyebilir. Jel üstüne tekrar iki adet temiz filtre kâğıdı kondu ve rulo ile üzerinden geçildi. Sonuç olarak PVDF membran, iki sünger ve ikişer filtre kâğıdı arasında jelin üzerine kapatılmış oldu. Daha sonra bu yığının üstüne bir miktar transfer tamponu eklendi. Biorad Semidry sistemine ait düzeneğin kapağı sıkıca

kapatıldı ve transfer yapılacak program ayarlandı. 1.5 Amper, 25 Volt, 10 dakika protokolü uygulanarak proteinlerin membrana transferi gerçekleştirildi.

Transfer Tamponu hazırlamak için 28,826 g Glisin, 6,057 g Tris-Base, 1,4 g SDS ve 140 ml Metanol kullanılır. dH<sub>2</sub>O ile son hacim 2 L'ye tamamlanır.

#### **5.4.3.2. Birincil ve İkincil Antikor Eklenmesi ve Görüntüleme**

Proteinler membrana transfer edildikten sonra %5'lik bloklama solüsyonu ile 1,5 saat kadar çalkalayıcı üstünde oda sıcaklığında muamele edildi.

Bloklama solüsyonu hazırlamak için, 100 ml için 5 g süt tozu tartılır ve 1X TBS-T içinde çözündürülür.

1X TBS-T hazırlamak için, 137 mM NaCl, 20 mM Tris ile 0.1% Tween-20 karıştırılır.

Bloklama işleminden sonra 3 defa (1. yıkama 15 dk., 2. yıkama 5 dk. ve 3. yıkama 5 dk. olacak şekilde) 1X TBS-T ile yıkama yapıldı. Daha sonra membran, +4°C'de çalkalayıcı üstünde birincil antikor ile tüm gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Birincil antikor HK-2 (monoclonal rabbit Hexokinase-2 antibody (12885S, cell signaling)) 1:750 oranında seyreltildi (15 ml hazırlandı; 20 µl antikor, 15 ml TBS-T solüsyonuna konuldu). Yükleme kontrolü anti β-aktin (monoclonal mouse β-actin antibody (CST #3700s; Cell Signaling)) 1:1000 oranında seyreltildi. Anti-PARP (anti-poly-ADP-ribose polymerase (PARP) (CST #9542)) ise 1:1000 oranında seyreltildi. Birincil antikor sonrasında 3 kere 5'er dakika 1X TBS-T ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında membran tavşan veya fare HRP-bağlı ikincil antikorlar ile muamele edildi.

İkincil antikor (anti-mouse CST#7076S; anti-rabbit CST#7074S) anti-tavşan (rabbit) 1:2500, anti-fare (mouse) 1:2500 oranında seyreltildi: 3 µl antikor, 15 ml 1X TBS-T solüsyonunda hazırlandı, karanlık ortamda (membranın bulunduğu kap alüminyum folyoya sarılarak karanlık ortam elde edilerek) oda sıcaklığında ve 20 rpm'de çalkalayıcı üstünde 1,5 saat boyunca membran ile inkübe edildi. İkincil antikordan sonra 3 kere 5'er dakika 1X TBS-T ile yıkama yapıldı. İkincil antikor ile muamele ve sonrasındaki yıkamalardan sonra görüntüleme yapıldı. Bunun için öncelikle membranlar fazla TBS-T'den arındırılmak üzere forceps ile tutularak dik bir

şekilde filtre kağıdına dokunduruldu. Daha sonra şeffaf plastik kâğıdın üstüne kondu. Satın alınan markanın talimatlarına göre (Reaktif I ve Reaktif II'den eşit hacimlerde karıştırılarak) (Thermo Fisher Scientific) hazırlanan ECL HRP substratı membran üzerine damlatıldı ve membranın her yerine substrat ulaştığına emin olundu. Daha sonrasında 5 dk boyunca membran ECL HRP substratı ile karanlıkta muamele edildi. Daha sonrasında fazla ECL HRP substratı membran üzerinden uzaklaştırıldı ve membranın üstü kapatıldı. Membran, Western görüntüleme cihazına (ChemiDoc, MP System, Biorad) yerleştirildi. Öncelikle jelin pozisyonu ayarlandı ve daha sonrasında marker görüntüsü alındı. Bunun ardından membrandaki proteinlerin tespiti için görüntüleme yapıldı. Protein seviyeleri ImageJ programı kullanılarak analiz edildi ve bant yoğunlukları  $\beta$ -aktin bantlarına göre normalize edildi.

#### **5.4.4. İstatistiksel Yöntemler**

Veriler, iki grup karşılaştırılırken SPSS 19.0 ile ANOVA Tukey testi ile analiz edildi. Veriler çiftlerin ortalaması ile ifade edildi ve farklılıklar  $p \# < 0.01$ ;  $p * < 0,005$ ;  $p ** < 0.0005$  ve  $p *** < 0.0001$  şeklinde ifade edildi.

### **5.5. Antikorlar Yardımı ile Protein Çöktürme (İmmünopresipitasyon)**

#### **5.5.1. Mitokondriyal Protein Lizatının Elde Edilmesi**

Hücreler (A549 akciğer kanseri hücre hattı) 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Hücre yoğunluğu %80-90 civarına ulaşınca hücrelere madde ekimi yapıldı. 6 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler (her doz için iki kuyucuk olacak şekilde) 24 saat boyunca maddelerin (Bileşik 3)  $IC_{50}$  dozları (A549 hücre hattında elde edilen değerler) ile muamele edildi. 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve santrifüj edildi. Daha sonra hücreler 1 ml  $+4^{\circ}C$  PBS ile yıkandı ve PBS iyice uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonra RIPA buffer (Thermo Fischer, Cat. No 89900) + PIC (Roche, cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Cat. No 04693159001) (her kuyucuğa 50  $\mu$ L) konuldu ve scrapper (hücre kazıyıcısı) yardımıyla hücreler toplandı. Toplanan hücreler ve santrifüj ile elde edilen aynı gruptaki hücreler aynı tüpe alındı ve  $+4^{\circ}C$ 'de 20-25 dk çalkalayıcı üzerinde 25 rpm'de inkübe edildi. Daha sonra hücreler 12.000 x g'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Bu aşamadan sonra lizat, 12.000 x g'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant alındı ve süpernatant 13.000 rpm'de 30dk boyunca tekrar santrifüj edildi.

Santrifüjden sonra elde edilen süpernatant atıldı. Elde edilen pellet ise 55 µL RIPA buffer ile çözdürüldü. Konsantrasyonlar ölçüldü. Ve IP yapılmak üzere -20 C'ye kaldırıldı. Konsantrasyon ölçüm aşaması hücreden protein eldesi başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Bu şekilde mitokondriyal proteinler izole edilmiş oldu.

RIPA Lizis Buffer hazırlamak için, 1485 µl RIPA ile 15 µl proteaz inhibitör kokteyli karıştırılır.

### 5.5.2. İmmünopresipitasyon

Konsantrasyonları hesaplanmış olan protein örneklerinden 500 µg elde edilecek şekilde her grup için ayrı 1,5 µl hacimli tüplere alındı. Bunların üzerine 30 ila 50 µL sefaroze bead (%4 agaroz, GE Healthcare Protein G Sepharose 4 Fast Flow, 17-0618-01, Lot no: 10253638) eklendi. 500 µL soğuk (+4°C) PBS eklendi. Ve beadler ile proteinlerin interaksiyona girebilmesi ve yıkama yapabilmek için çalkalayıcı üzerinde +4°C'de 1 saat tutuldu. Daha sonra eppendorflar 3000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant alındı. Süpernatantı alırken dibe çökmüş olan beadlerin oynatılmamasına veya alınmamasına dikkat edildi. Alınan bu süpernatantın üstüne 1 µg Hexokinase-2 antikoru (Cell Signaling, Hexokinase II (C64G5) Rabbit mAb #2867) eklendi. Örnekler, çalkalayıcı üstünde +4°C'de yaklaşık 1 saat tutuldu. 1 saatin sonunda her örneğe 75 µL bead eklendi ve çalkalayıcı üstünde +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün örnekler 3000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pelletlere %10 β-merkaptolanol içeren Laemmli tampon eklendi ve örnekler 100°C'de 5-10 dakika inkübe edildi. Daha sonra western aşamaları gerçekleştirildi ve VDAC antikoru (Anti VDAC Antibody Millipore AB10527 Rabbit Lot: 2272158) kullanılarak VDAC proteini tespit edildi.

PBS (phosphate buffered saline) hazırlamak için; 4 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,72 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>, dH<sub>2</sub>O'da tamamen çözdürüldükten sonra pH 7.4'e ayarlanır. Son hacim 500 ml'ye tamamlanır.

## 6. BULGULAR

### 6.1. HK-2 Enzim Aktivite Deney Sonuçları

Özgün MeJA mimetiklerinin HK-2 enzimi üzerindeki direkt inhibisyon etkisinin araştırılması için inorganik fosfat salımının ölçülmesi tekniğine dayanan The Universal Enzyme Assay Kit kullanıldı. MeJA referans standardı olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak reaksiyon karışımına ATP yerine ADP konuldu. Negatif kontrol olarak reaksiyon karışımına rekombinant insan HK-2 enzimi yerine deney tamponu kullanıldı. Elde edilen HK-2 enzim inhibisyonunun IC<sub>50</sub> değerlerine dayanarak, 1 µM'den daha düşük IC<sub>50</sub> dozunda aktivite gösteren bileşikler 3> 2> 1> 7> 6 olarak listelendi (Tablo 6.1.1). İnorganik fosfat salımı dikkate alınarak inhibe edici aktivite sırası oluşturuldu.

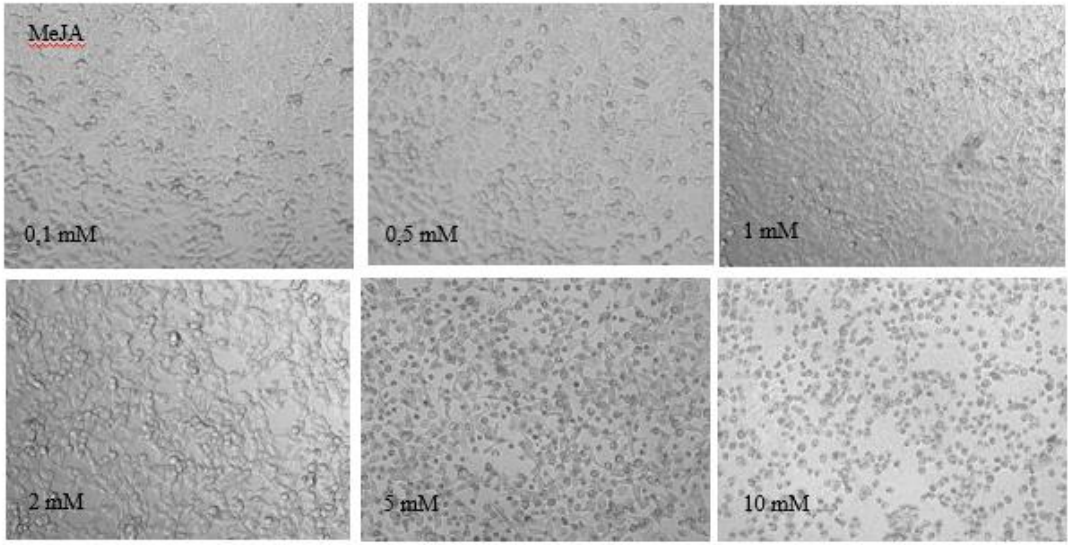
**Tablo 6.1.1.** HK-2 enzim inhibisyonunu ölçmek için kullanılan The Universal Enzyme Assay Kit sonucu alınan dataların yorumlanmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri.

Bileşikler	IC <sub>50</sub> Değerleri (µM)
MeJA	7,47
Bileşik 1	0,40
Bileşik 2	0.29
Bileşik 3	0.27
Bileşik 5	1.86
Bileşik 6	1.01
Bileşik 7	0.99
Bileşik 9	2.15
Bileşik 12	2.53
Bileşik 13	5.70
Bileşik 14	16.8
Bileşik 17	38.1
Bileşik 18	14.0
Bileşik 21	27.1

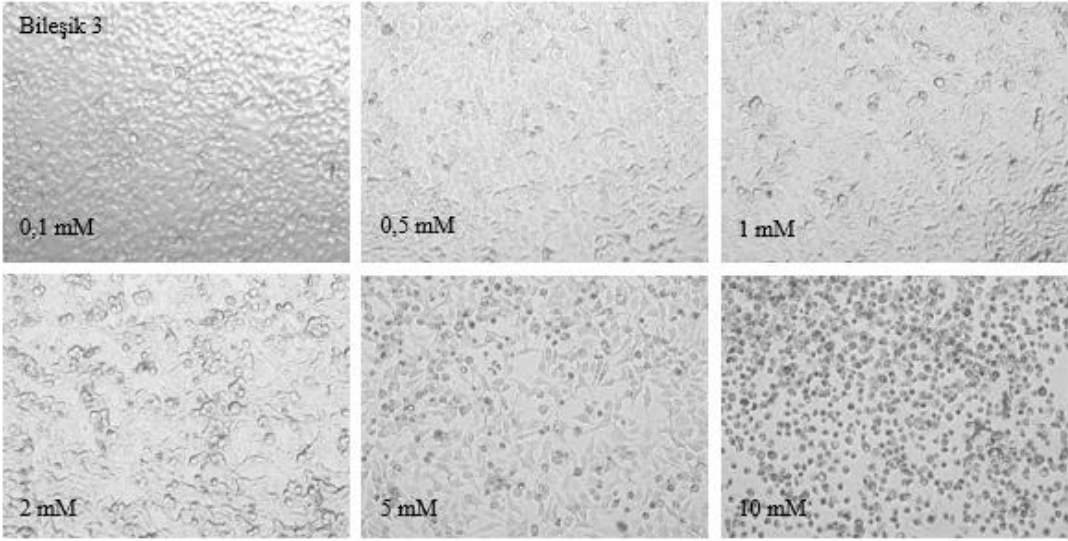
## 6.2. A549 Hücre Hattında Özgün MeJA Mimetikleri Hücre Canlılık Analizi Sonuçları

A549 akciğer kanseri hücre hattında özgün MeJA mimetiklerinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmak üzere hücreler Tablo 5.3.2’de belirtilen moleküller 0,1-10 mM doz aralığında hücrelere uygulandı ve ortamdaki ATP miktarının tespitine dayalı bir kit olan CellTiter Glo deney kiti kullanılarak hücre canlılık ölçümü yapıldı. Test edilen tüm moleküller arasında, HK-2 inhibitörü kontrolü olan MeJA ile karşılaştırıldığında Bileşik 1 ve 3’ün daha düşük IC<sub>50</sub> değerinde etkinlik gösterdiği bulundu. (Şekil 6.2.4, p <0.0001). Ek olarak, Bileşik 3, hücre canlılığında %0,36’ya (IC<sub>50</sub> değerleri: 4.250 mM) kadar inen önemli bir azalma ile A549 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki gösterdi (Şekil 6.2.5). A549 hücre hattında, hücrelerin Bileşik 3 ve MeJA ile 24 saat boyunca muamele edilmesi sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 6.2.1 ve Şekil 6.2.2’de sunuldu. Herhangi bir madde uygulamasının yapılmadığı kontrol hücrelerinin ve %2,5 DMSO uygulaması yapılan kontrol hücrelerinin mikroskop görüntüleri Şekil 6.2.3’te sunuldu. Sonuçlar, üç bağımsız deney esas alınarak ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi (Tablo 6.2.1) (p \*\*\* <0.0001). Buradaki datalar esas alınarak immün blotlama deneylerinde vahşi tip p53’e sahip olduğu bilinen A549 hücre hattı üzerinde özgün MeJA mimetiği olan Bileşik 3 molekülünün denemesi ve apoptoz yolağı üzerindeki etkilerinin araştırılması uygun görüldü.

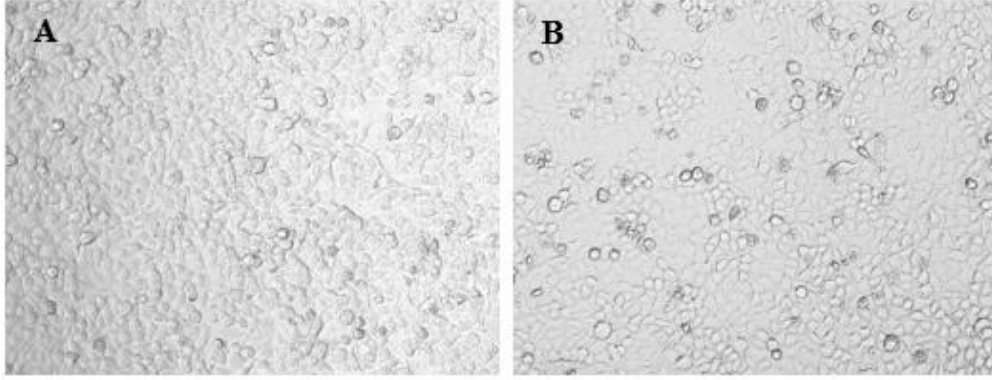




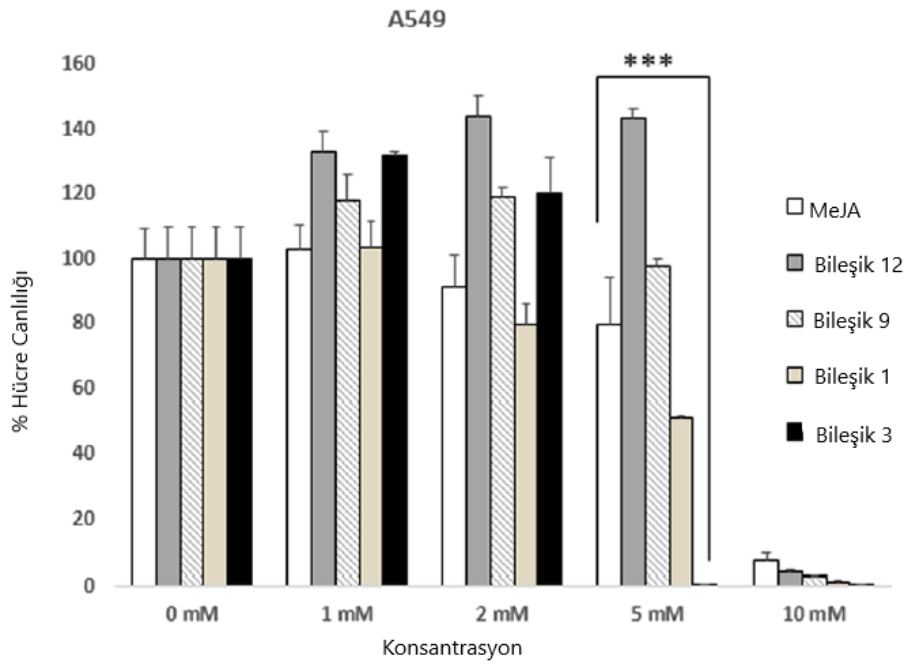
Şekil 6.2.1. A549 hücrelerinin MeJA ile 24 saat muamelesi sonucu hücre mikroskop görüntüleri.



Şekil 6.2.2. A549 hücrelerinin Bileşik 3 ile 24 saat muamelesi sonucu hücre mikroskop görüntüleri.

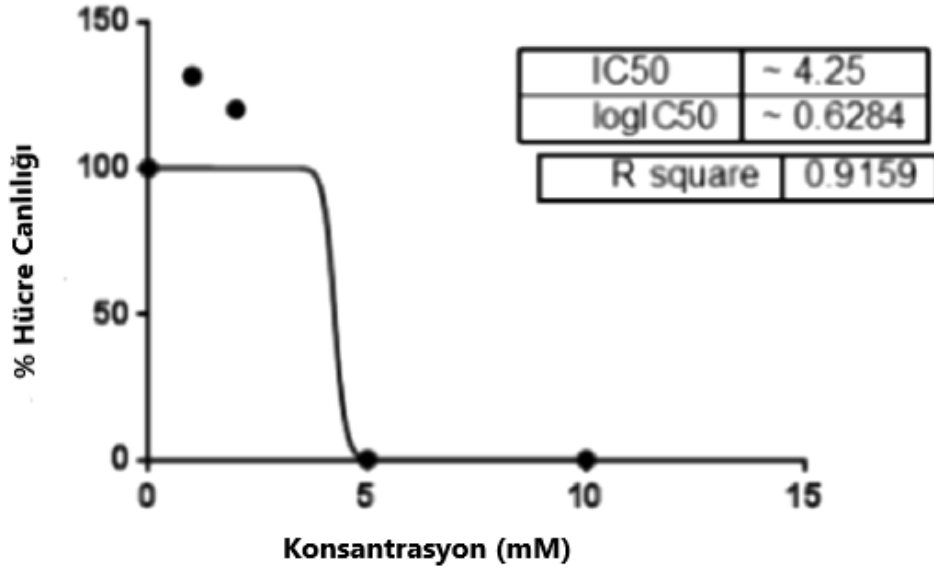


Şekil 6.2.3. A549 hücre hattında A) uygulama yapılmayan hücrelerin, B) %2,5 DMSO ile muamele edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri.



Şekil 6.2.4. MeJA ile karşılaştırmalı olarak Bileşik 1, 3, 9 ve 12'nin A549 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterildiği sütun grafiği.

### Bileşik 3 (A549 Hücre Hattı)



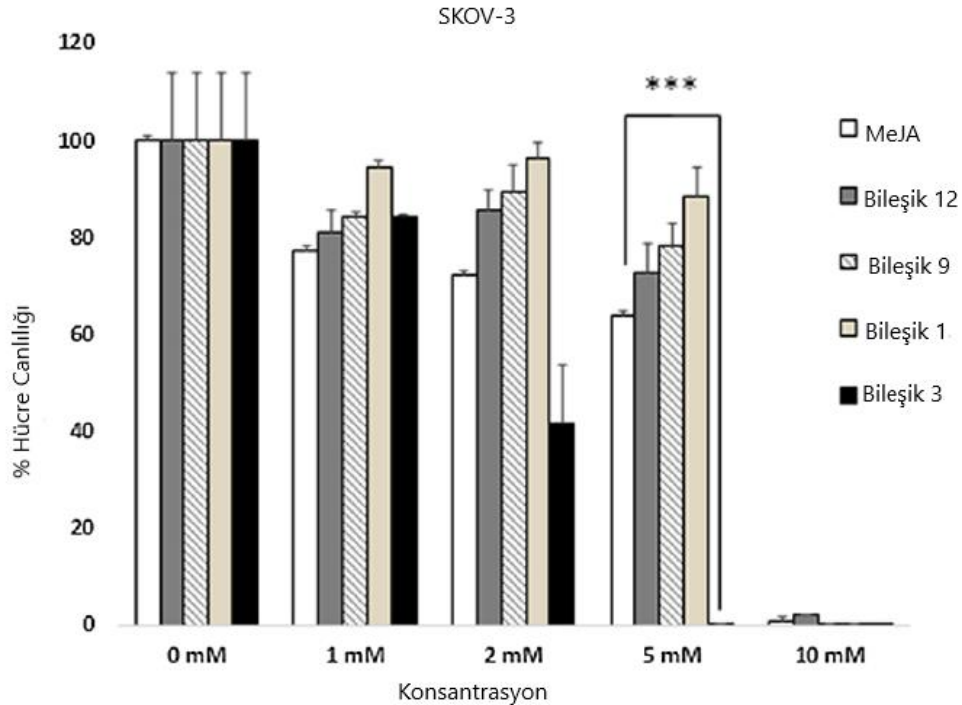
Şekil 6.2.5. Bileşik 3'ün A549 hücre hattı üzerinde denemesi ile elde edilen hücre canlılığı sonuçlarının analizi ve IC<sub>50</sub> değerinin tespit edilmesi.

**Tablo 6.2.1.** Özgün MeJA mimetiklerinin A549 hücre hattında denemesi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri.

Denenen Bileşik	IC <sub>50</sub> Değeri (mM)
MeJA	6,383
Bileşik 1	4,564
<b>Bileşik 3</b>	<b>4,25</b>
Bileşik 5	9,778
Bileşik 9	7,115
Bileşik 12	9,011
Bileşik 13	10,88
Bileşik 14	9,878
Bileşik 17	Tespit Edilemedi

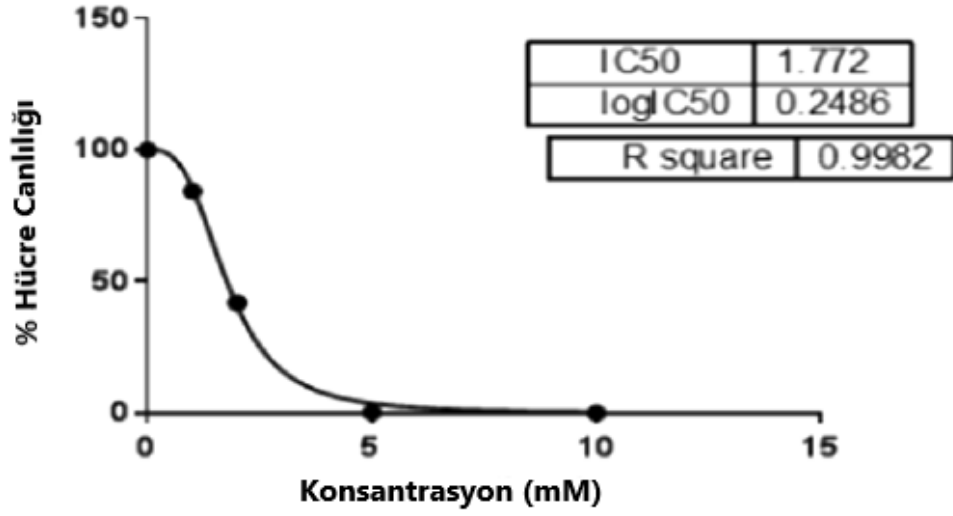
### 6.3. SKOV-3 Hücre Hattında Özgün MeJA Mimetikleri Hücre Canlılık Analizi Sonuçları

SKOV-3 hücreleri, özgün HK-2 inhibitörlerinin artan dozları (0,1-10 mM) ve referans standardı olarak MeJA ile muamele edilerek hücre canlılığı üzerindeki etkinlikleri araştırıldı. Kontrol hücreleri eşit konsantrasyonlarda DMSO çözücüsü (%2,5 h/h) ile işleme tabi tutuldu. 24 saatlik muameleden sonra hücreler, canlı hücrelerdeki ATP miktarının ölçümüne dayanan CellTiter Glo deney kiti kullanılarak canlılık analizine tabi tutuldu. Ölçümlere göre hücre canlılığının, 5 mM dozunda uygulanan Bileşik 3 ile muamele edilmiş hücrelerde %0,28'e (IC<sub>50</sub> değeri: 1,772 mM) düştüğü görüldü (Şekil 6.3.1). SKOV-3 hücre hattında denenen bütün özgün MeJA mimetiklerinin hücre canlılık deneyleri sonrasında elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 6.3.1'de gösterilmiştir. Şekil 6.3.2, SKOV-3 hücre hattında denenen Bileşik 3'ün IC<sub>50</sub> değerini göstermektedir. Sonuçlar, üç bağımsız deney esas alınarak ortalama ± SD olarak ifade edildi (p \*\*\* <0.0001).



Şekil 6.3.1. MeJA ile karşılaştırmalı olarak Bileşik 1, 3, 9 ve 12'nin SKOV-3 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterildiği sütun grafiği.

### Bileşik 3 (SKOV-3 Hücre Hattı)



Şekil 6.3.2. Bileşik 3'ün SKOV-3 hücre hattı üzerinde denenmesi ile elde edilen hücre canlılığı sonuçlarının analizi ve IC<sub>50</sub> değerinin tespit edilmesi.

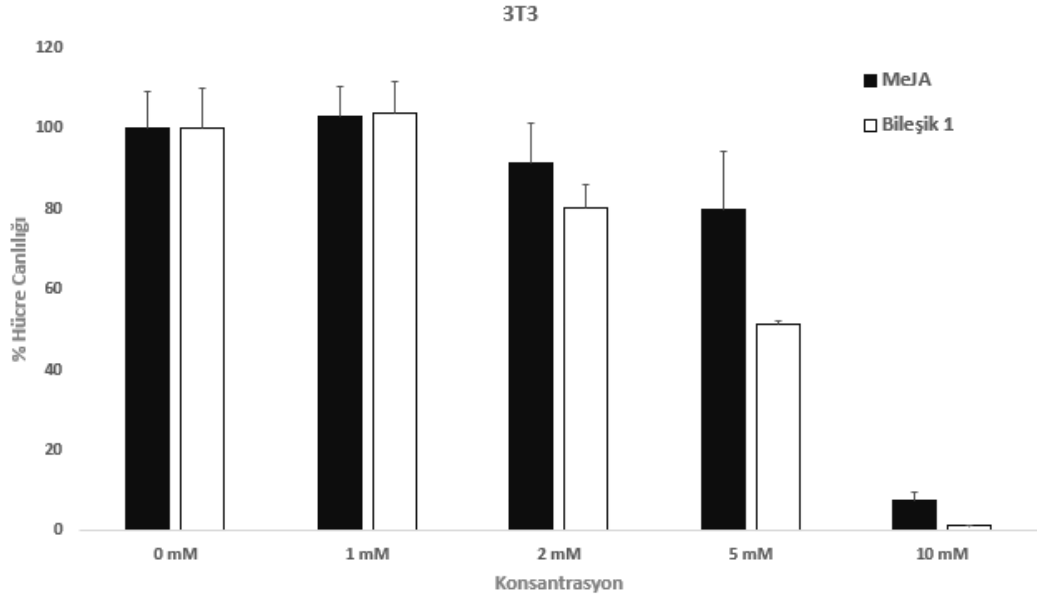
**Tablo 6.3.1.** Özgün MeJA mimetiklerinin SKOV-3 hücre hattında denenmesi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri.

Denenen Bileşik	IC <sub>50</sub> Değeri (mM)
MeJA	4,17
Bileşik 1	6,077
Bileşik 2	Tespit Edilemedi
<b>Bileşik 3</b>	<b>1,772</b>
Bileşik 5	Tespit Edilemedi
Bileşik 6	Tespit Edilemedi
Bileşik 9	5,758
Bileşik 12	5,82
Bileşik 13	Tespit Edilemedi
Bileşik 14	7,68
Bileşik 17	Tespit Edilemedi

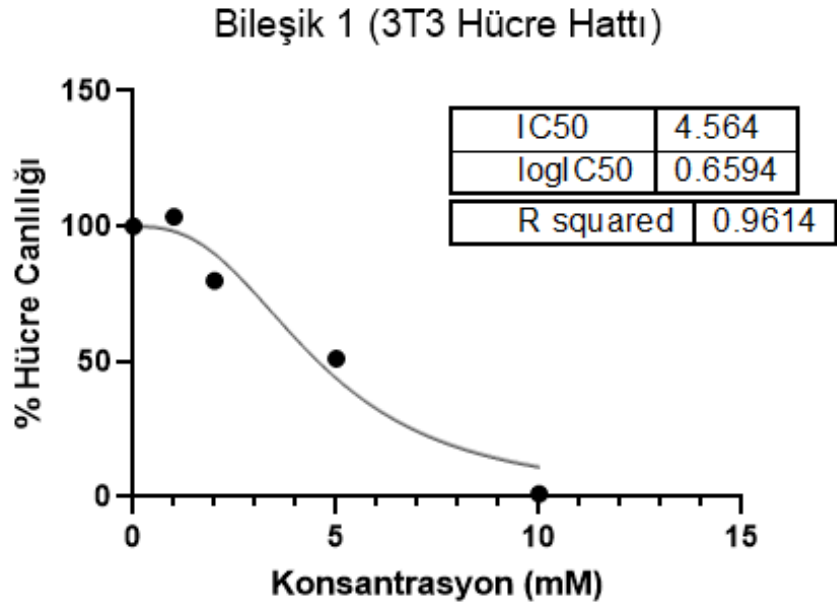
Tablo 6.3.1’de görüldüğü üzere özgün MeJA mimetiklerinin hücre hatlarında denenmesi sırasında bazı bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri, maddelerin DMSO çözücüsünde çözdürüldükten sonra hücre besiyerine eklenmesi sonrası çökmesi nedeniyle elde edilememiştir. Bunun yanı sıra MeJA mimetiklerinin sentezi sırasında meydana gelen reaksiyon veriminin düşük olması sebebiyle bazı bileşikler sadece tek bir hücre hattında denenebilmiştir (Tablo 5.3.2.).

#### **6.4. MeJA ve Bileşik 1’in 3T3 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkinliklerinin Değerlendirilmesi**

3T3 hücreleri, özgün HK-2 inhibitörlerinden Bileşik 1’in artan dozları (0,1-10 mM) ve referans standardı olarak MeJA ile muamele edilerek hücre canlılığı üzerindeki etkinlikleri araştırıldı. Kontrol hücreleri eşit konsantrasyonlarda DMSO çözücüsü (%2,5 h/h) ile işleme tabi tutuldu. 24 saatlik muameleden sonra hücreler, canlı hücrelerdeki ATP miktarının ölçümüne dayanan CellTiter Glo deney kiti kullanılarak canlılık analizine tabi tutuldu. Ölçümlere göre hücre canlılığının, 5 mM dozunda uygulanan Bileşik 1 ile muamele edilmiş hücrelerde %51,21’e (IC<sub>50</sub> değeri: 4,564 mM) ve 10 mM dozunda ise %1,29’a düştüğü görüldü (Şekil 6.4.1). Şekil 6.4.2, 3T3 hücre hattında denenilen Bileşik 1’in IC<sub>50</sub> değerini göstermektedir. Yapılan hücre canlılığı analizleri sonucu MeJA’nın 3T3 hücre hattındaki IC<sub>50</sub> değeri 6,383 mM olarak tespit edildi. Ayrıca MeJA ile 5mM dozunda muamele edilen hücrelerde hücre canlılığının %79,76’ya düştüğü tespit edildi (Şekil 6.4.1).



Şekil 6.4.1. MeJA ile karşılaştırmalı olarak Bileşik 1'in 3T3 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterildiği sütun grafiği.



Şekil 6.4.2. Bileşik 1'in 3T3 hücre hattı üzerinde denenmesi ile elde edilen hücre canlılığı sonuçlarının analizi ve IC<sub>50</sub> değerinin tespit edilmesi.

### 6.5. OLE, CDDP, 5-FU, DTX Moleküllerinin SKOV-3 ve A549 Hücre Hatlarında Tespit Edilen IC<sub>50</sub> Değerleri

OLE, CDDP, DTX ve 5-FU moleküllerinin SKOV-3 ve A549 hücre hatları ile 24 saat muamele edilmesi ile hücre canlılığı üzerindeki etkinlikleri araştırıldı. Bunun için literatürde bu moleküllerin SKOV-3 ve A549 hücre hatlarında belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri araştırıldı. Buna göre OLE molekülünün 24 saatlik muamele ile SKOV-3 hücre hattında tespit edilen IC<sub>50</sub> değerine literatürde rastlanmadı. Literatürde OLE molekülünün 24 saatlik muamele ile A549 hücre hattındaki IC<sub>50</sub> değeri 60 µM (118) olarak bulundu. 5-FU molekülünün SKOV-3 hücreleriyle 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değeri literatürde 169 µM (119) olarak bulundu. Bu değer A549 hücre hattında ise 1,49 µM (120) olarak bulundu. SKOV-3 hücre hattı 5-FU molekülüne dirençli bir hücre hattıdır. DTX molekülü için literatürde 24 saatlik muamele sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değeri SKOV-3 hücre hattı için 372 µM (121) olarak bulundu, A549 hücre hattı içinse veri bulunamadı. Literatürde CDDP molekülü için 24 saatlik muamele sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değeri SKOV-3 hücre hattı için 22 µM (122), A549 hücre hattı için ise 33 µM (123) olarak bulundu. Tablo 6.5.1’de OLE, 5-FU, DTX ve CDDP moleküllerinin SKOV-3 hücre hattı üzerinde denenmesi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, literatür değerleriyle birlikte sunuldu. Tablo 6.5.2’de ise bu moleküllerin A549 hücre hattı üzerinde denenmesi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, literatür değerleriyle birlikte sunuldu. Tablo 6.5.3’te moleküllerin A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında tespit edilen IC<sub>50</sub> değerleri bireysel olarak grafik halinde sunuldu.

**Tablo 6.5.1.** OLE, CDDP, DTX ve 5-FU moleküllerinin SKOV-3 hücre hattında tespit edilen IC<sub>50</sub> değerleri ve literatürde bu moleküllerle yapılan çalışmalarda tespit edilen IC<sub>50</sub> değerlerinin karşılaştırılması.

Maddeler	Literatür (µM)	Bulunan Sonuç – SKOV-3 (µM)
5-FU	169	434
OLE	Yok	182
DTX	372	1028

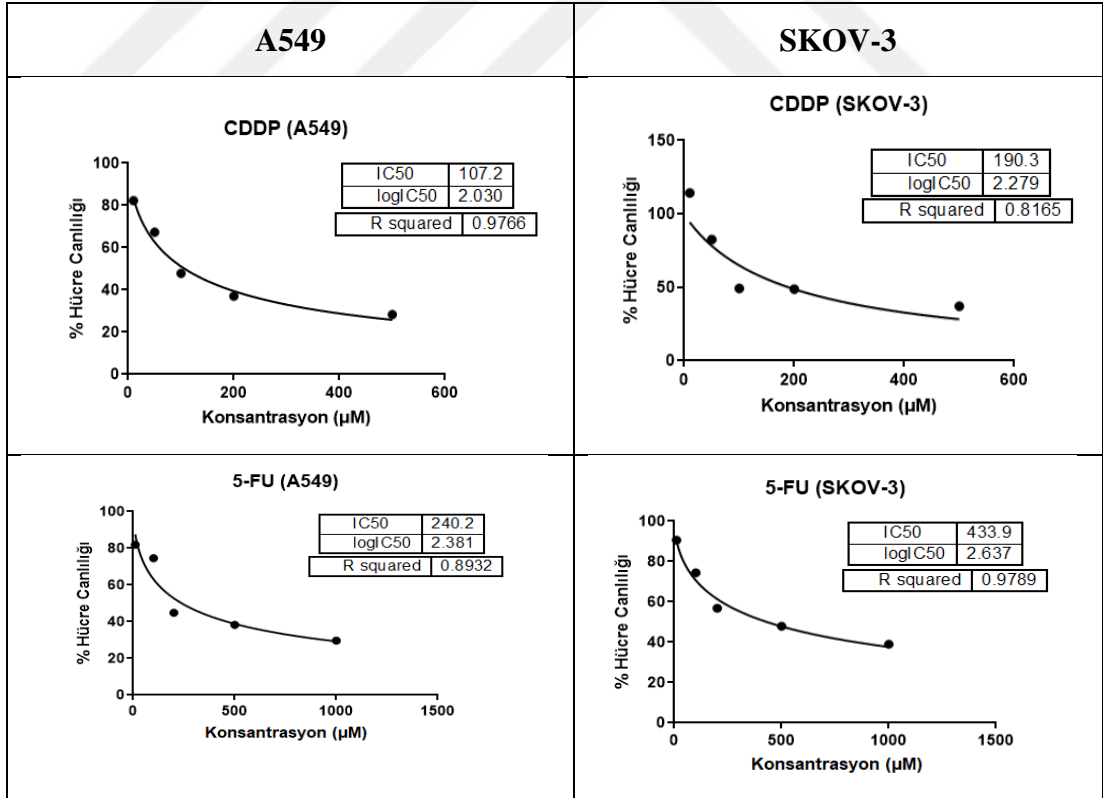


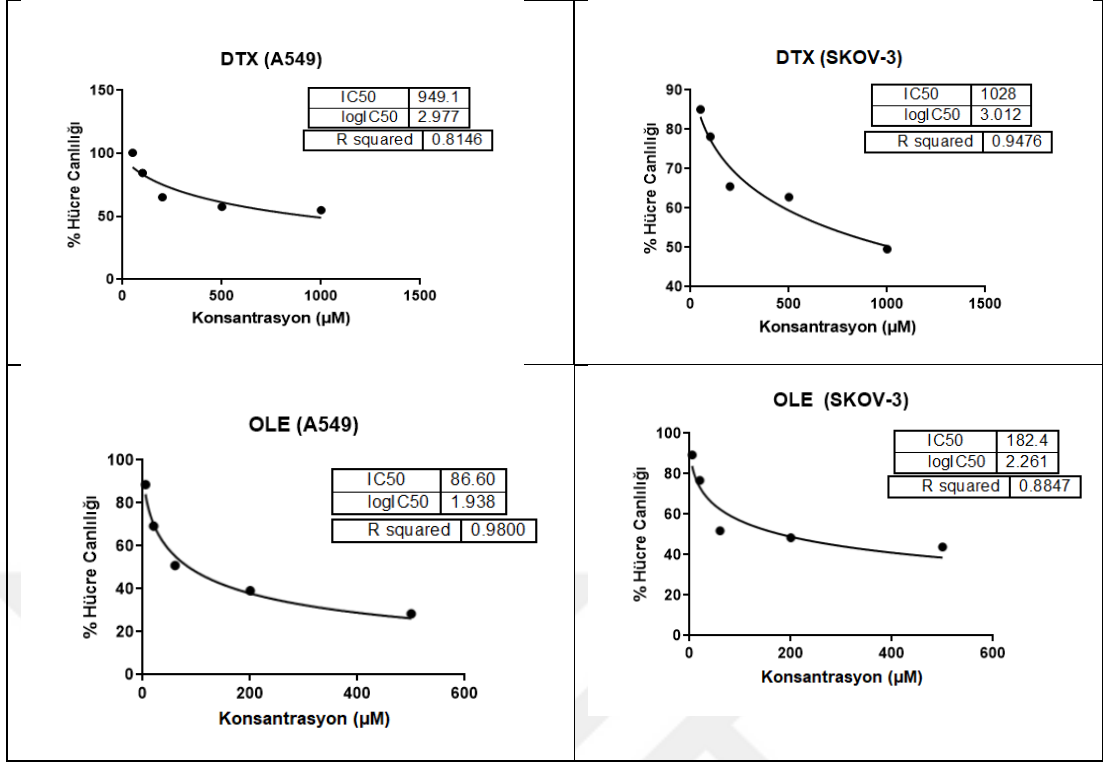
CDDP	22	190
------	----	-----

**Tablo 6.5.2.** OLE, CDDP, DTX ve 5-FU moleküllerinin A549 hücre hattında tespit edilen IC<sub>50</sub> değerleri ve literatürde bu moleküllerle yapılan çalışmalarda tespit edilen IC<sub>50</sub> değerlerinin karşılaştırılması.

Maddeler	Literatür	Bulunan Sonuç – A549 (µM)
5-FU	1,49 µM	240
OLE	60 µM	87
DTX	Yok	950
CDDP	33 µM	107

**Tablo 6.5.3.** OLE, CDDP, DTX ve 5-FU moleküllerinin A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında tespit edilen IC<sub>50</sub> değeri grafikleri





### 6.6. OLE, CDDP, 5-FU, DTX Moleküllerinin SKOV-3 ve A549 Hücre Hatlarında Özgün MeJA Mimetliği Bileşik 3 ile Kombine Denenmesi

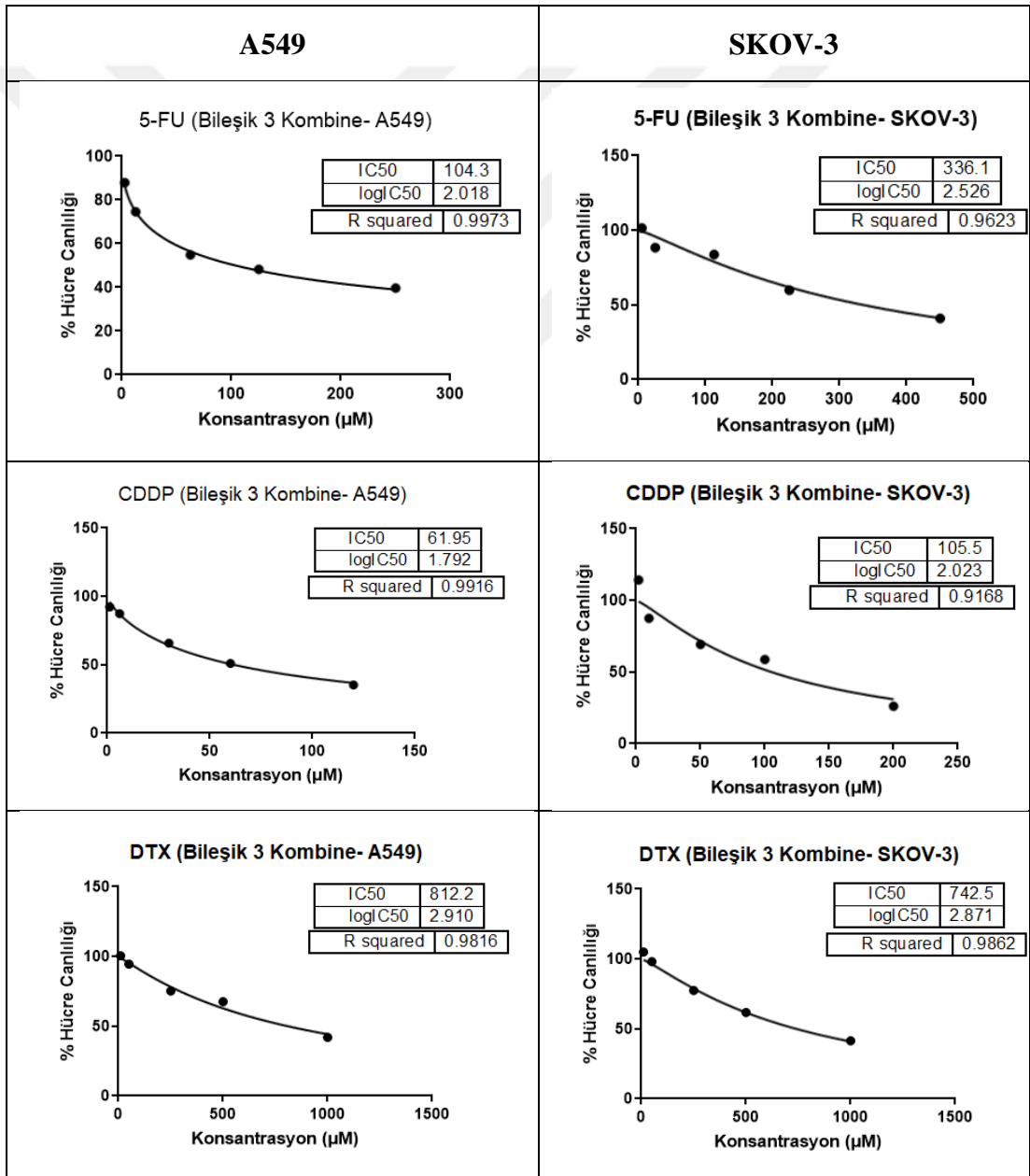
A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında özgün MeJA mimetiklerinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin denenmesi sonucu en düşük IC<sub>50</sub> değerinde etki gösterdiği belirlenen Bileşik 3 ile OLE, CDDP, 5-FU, DTX molekülleri ayrı ayrı Tablo 5.3.5'te belirtilen dozlarda kombine bir şekilde denenmiştir. Deney sonucunda Bileşik 3 ile kombine olarak uygulanan OLE, CDDP, 5-FU, DTX moleküllerinin daha düşük IC<sub>50</sub> değerlerinde etki gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 6.6.1). Belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 6.6.2.'de grafik halinde ifade edildi.

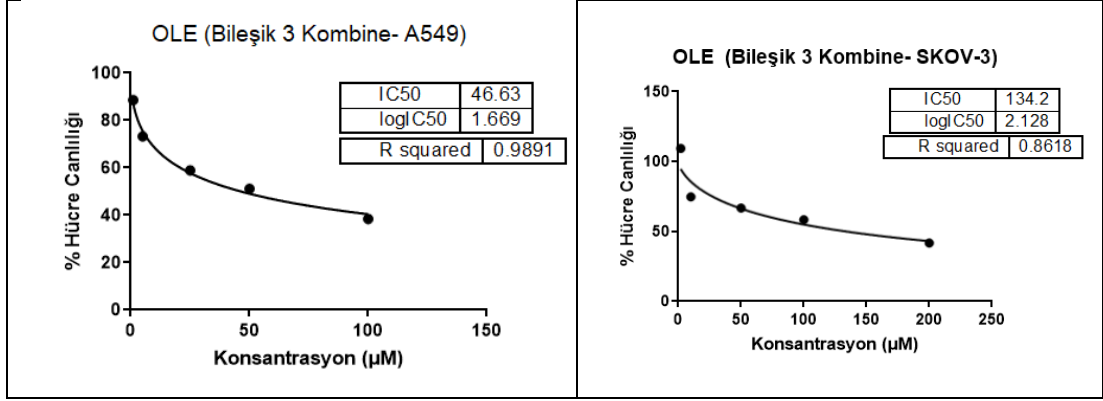
**Tablo 6.6.1.** OLE, CDDP, 5-FU, DTX moleküllerinin SKOV-3 ve A549 hücre hatlarında özgün MeJA mimetliği Bileşik 3 ile kombine denenmesi sonucu tespit edilen IC<sub>50</sub> değerleri

	SKOV-3 IC <sub>50</sub> Değerleri (µM)	A549 IC <sub>50</sub> Değerleri (µM)
5-FU+ Bileşik 3	336	104

OLE+ Bileşik 3	134	46
CDDP+ Bileşik 3	105	61
DTX+ Bileşik 3	742	812

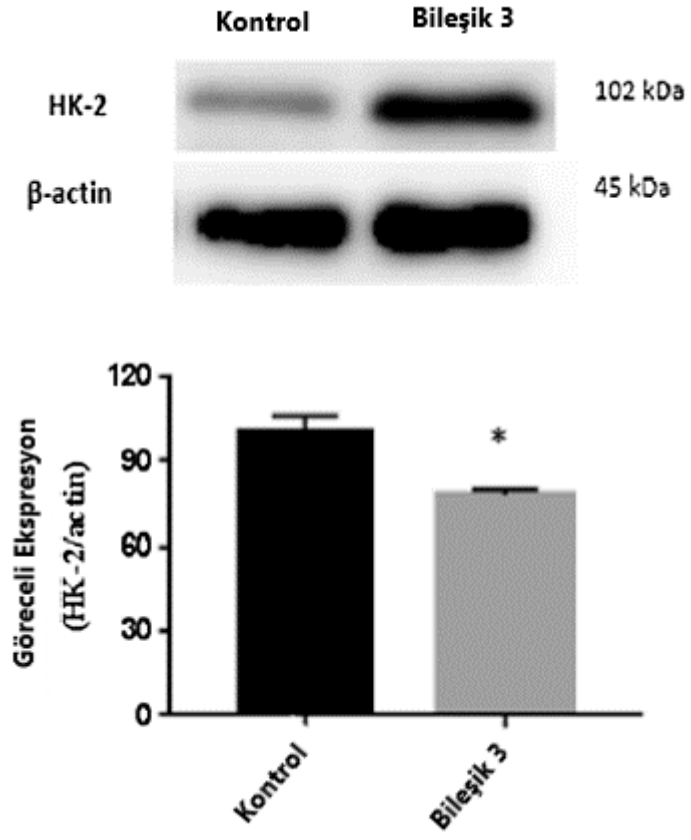
**Tablo 6.6.2.** OLE, CDDP, 5-FU, DTX moleküllerinin SKOV-3 ve A549 hücre hatlarında özgün MeJA mimetiği Bileşik 3 ile kombine denemesi sonucu tespit edilen IC<sub>50</sub> değerlerinin grafikleri.



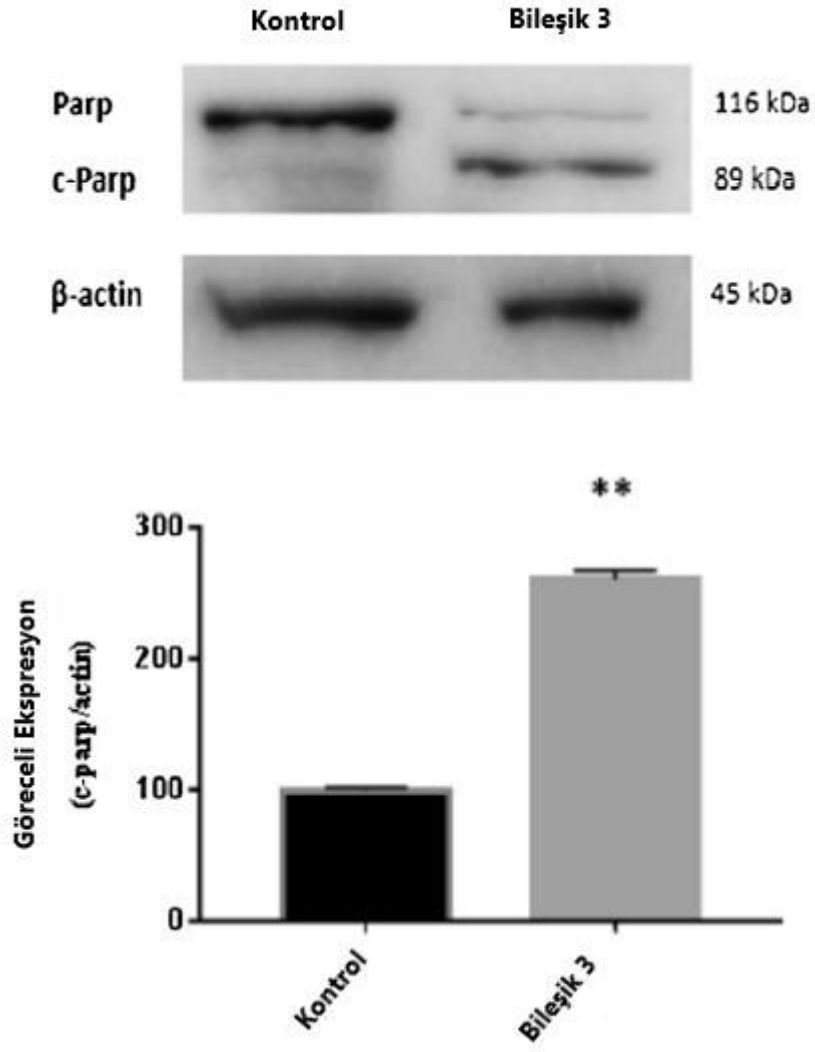


### 6.7. HK-2, PARP ve c-PARP Protein Ekspresyon Düzeylerinin İmmün Blotlama Yöntemi Kullanılarak A549 Hücre Hattında Araştırılması

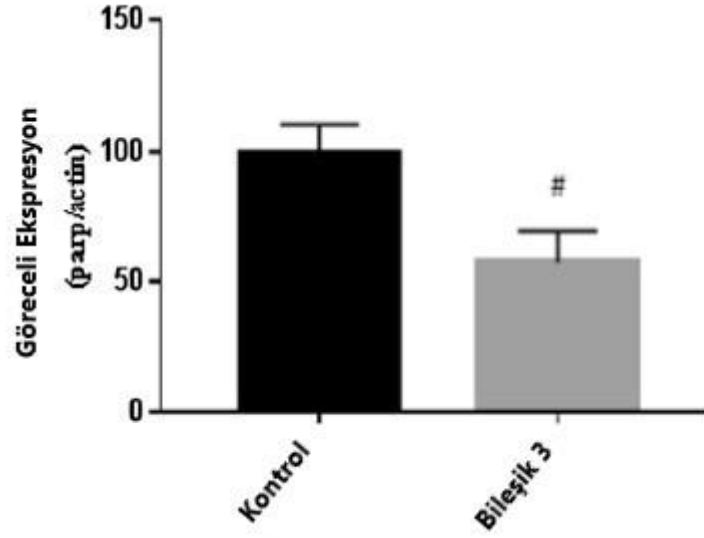
HK-2 inhibisyonunun HK-2 protein ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri ve hücre ölümünün biyokimyasal doğrulaması western blot analizi ile incelendi. Hücreler, HK-2 ve hücre ölüm yolağı proteinlerinin ekspresyonunu saptamak için 24 saat boyunca Bileşik 3 ( $IC_{50} = 4.25$  mM) ve kontrol solventi (DMSO çözücü kontrolü) ile muamele edildi. Protein ekspresyon seviyeleri ImageJ ile belirlendi ve  $\beta$ -aktin seviyelerine normalize edildi. A549 hücre hattının özgün MeJA mimesi Bileşik 3 ile muamelesi, kontrol solventi ile muamelesine kıyasla artmış HK-2 ekspresyonları ile sonuçlandı (Şekil 6.7.1). Bileşik 3'ün A549 hücrelerinde hücre ölümünü protein seviyesinde tetiklemesi üzerine inceleme yapıldı ve kesilmiş PARP'ın (c-PARP) varlığının yanı sıra bunun öncüsünün (PARP) azalmış seviyeleri gösterildi. Bunun yanı sıra, beklendiği gibi kontrol DMSO konsantrasyonları (%1 DMSO) ile muamele edilen kontrol hücrelerinde kesilmiş PARP tespit edilmedi (Şekil 6.7.2 ve Şekil 6.7.3). Bulgular, Bileşik 3'ün A549 hücreleriyle tek sefer muamele edilmesi ile elde edilen proteinlerin 3 ayrı sefer immün blotlama yöntemi ile denenmesi sonucu elde edildi ve bu şekilde standart sapma değeri hesaplandı. Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi ( $p \# < 0.01$ ;  $p * < 0.005$ ; ve  $p ** < 0.0005$ ).



Şekil 6.7.1. Bileşik 3 ile muamele edilmiş A549 akciğer kanseri hücre hattının HK-2 protein ekspresyonu seviyeleri.



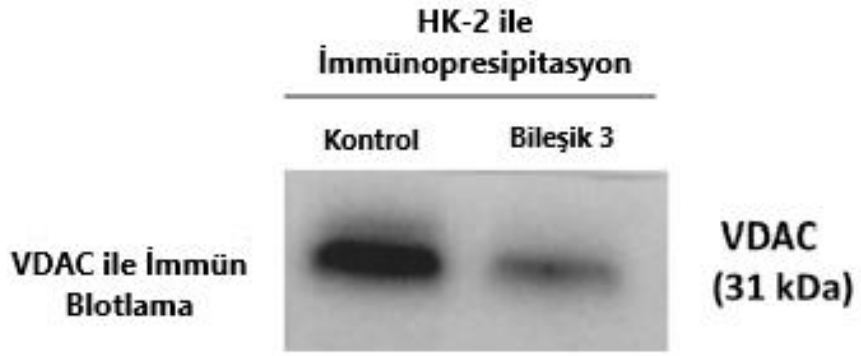
Şekil 6.7.2. Bileşik 3 ile muamele edilmiş A549 akciğer kanseri hücre hattının PARP kesilme seviyeleri.



Şekil 6.7.3. Bileşik 3 ile muamele edilmiş A549 akciğer kanseri hücre hattının PARP ekspresyon seviyeleri.

#### **6.8. A549 Hücrelerinin Bileşik 3 ile Muamelesi Sonrası HK-2 ve VDAC Etkileşiminin İmmünopresipitasyon Yöntemi ile Araştırılması**

Bileşik 3'ün, HK-2 proteininin VDAC ile bağlanması üzerindeki etkinliğini saptamak için, HK-2 immünopresipitasyon yöntemi ile çöktürüldü ve HK-2 bağlı VDAC ekspresyonları immünoblotlama ile saptandı. Bunun için A549 hücreleri, 24 saat boyunca Bileşik 3 ( $IC_{50} = 4.25$  mM) ve kontrol ortamı (%1 DMSO kontrolü) ile muamele edildi ve mitokondriyal proteinler elde edildi. Bir MeJA mimetiği olan Bileşik 3 ile muamele edilen A549 hücrelerinde HK-2 bağlı VDAC protein miktarının azaldığı görüldü (Şekil 6.8.1). Bileşik 3, A549 hücreleri ile bir kez muamele edildi ve bunun sonucunda elde edilen proteinlerle immünopresipitasyon deneyi gerçekleştirildi.



Şekil 6.8.1. Bileşik 3 ve DMSO (kontrol) ile muamele edilmiş A549 akciğer kanseri hücre hattının mitokondriyal protein ekstraktlarında HK-2 bağlı VDAC ekspresyonu.



## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser hastalığı, dünyada en fazla ölüme neden olan hastalıklardan birisidir. Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelerin bölünmek için ihtiyaç duyduğu hücre dışı sinyallere gerek duymadan ve sağlıklı hücrelerde düzgün bir şekilde işlev gören hücre bölünmesinin içsel kontrol mekanizmaları tarafından engellenmeden kontrolsüz bir şekilde çoğalarak buldukları dokuda yayılmakta, hatta diğer dokulara metastaz yapabilmektedir. Bu “kontrolsüz çoğalma” tanımı ile hücrelerin hücre bölünmesi için alması gereken dışsal uyarılara ve içsel engellemelere yanıt vermemesi, yani hücrelerin aslında dışarıdan gelecek bir mitotik uyarıya ihtiyaç duymaksızın çoğalmasını indüklemesi ve hücredeki tümör baskılayıcı genlerin hücrenin çoğalmasını durduramayacak şekilde ya bloklanmış ya da mutasyona uğramış olduğu kastedilmektedir. Bu bahsedilen mekanizmalardan bir veya birkaçı kanserli dokularda tespit edilebilir. Kanser hücrelerinin çoğalma ve metastaz odaklı izledikleri yol, onlara hücre farklılaşması için yeterli zamanı vermemektedir. Bu sebeple kanser hücrelerine özgü moleküllerin ve proteinlerin tespiti oldukça zordur. Mutant protein sentezi yapan kanser hücrelerinin immün sistem tarafından tespit edilip, ortadan kaldırılması kaçınılmazdır. Ancak immün sistem tarafından tespit edilebilen mutant protein sentezi yapmayan kanser hücreleri kaçabilmektedirler. Kanser hücrelerine özgü protein bulmaktaki zorluk, bu hücrelerin tedavi amacıyla hedeflenmesinde de zorluklar doğurmaktadır. Bu hastalığı tamamen ortadan kaldıran, gelişimini durduran veya yavaşlatan güçlü bir ilaç maalesef henüz bulunmamaktadır. Bu bağlamda bakıldığında kanseri hedefleyen çoğu moleküler tedavinin kanserin hızlanmış metabolizmasını, sürekli bölünme yeteneğini hedeflediği görülebilir. Bu tedaviler sonucunda vücuttaki sağlıklı hücreleri de etkileyen durumlar ortaya çıkmaktadır (34).

Kanserin oluşumu ve ilerleyişi ile ilgili birden fazla karakteristik nitelik belirlenmiştir. Bunlardan yakın zamanda belirlenenlerden biri kanser metabolizmasıdır. Kanser hücrelerinin beslenmek ve enerji ile yapıtaşı üretmek için kullandığı moleküller ve yolaklar incelenmektedir. 1926 yılında Warburg'un da belirttiği gibi kanserli hücreler normal hücrelere göre enerji elde etmede farklılıklar gösterirler ve belirli enzimleri daha fazla eksprese ederler. Kanser hücreleri aerobik

glikoliz yaparak enerji elde ederler ki bu da oksijen varlığında dahi glikoliz yolu ile enerji elde ettikleri anlamına gelmektedir. Bu kapsamda kanser hücrelerinin normal hücrelerle kıyaslandığında farklılık gösteren enerji metabolizmasına yoğunlaşmış ve HK-2 enziminin sağlıklı hücelere kıyasla kanser hücrelerinde anlatımının daha fazla yapıldığı tespit edilmiştir. HK-2 enziminin inhibe edilmesi hem kanser glikoz metabolize etmek için kullanılan yolağın ilk basamağını durdurur, hem de VDAC enzimi ile ilişkisinin kesilmesine neden olur ki bu da mitokondriden sitokrom c salınımını sağlayarak kanser hücresinin apoptoza uğramasına neden olur. HK-2 hedefine özgü inhibitörlerin geliştirilmesi ve kanser tedavisinde kullanılması toksisite ve verimlilik açısından ele alındığında önemli bir hedef haline gelmektedir. Bu fikri temel alarak, MeJA, 2-Deoksiglikoz, 2-Bromopiruvat, Lonidamine gibi moleküller, HK-2 inhibitörü olarak geliştirilmeye çalışıldıysa da klinik çalışmalarda etkinlikleri tartışılır durumdadır. Bu sebeple daha etkili ve özgün HK-2 inhibitörlerinin geliştirilmesi ve bunları çeşitli in vitro kanser modellerinde deneyerek etkinliklerinin gösterilmesi bu çalışmada hedeflenmiştir. Dolayısıyla bu hipotezi desteklemek için yeni ve daha etkili HK-2 inhibitörlerinin keşfedilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu amaca dayanarak antikanser özelliği bilinen ve değişik kanser türleri üzerinde in vivo ve in vitro deneylere tabi tutularak etkinliği ispatlanmış bir bitki stres hormonu olan MeJA molekülünün modifiye edilerek daha etkili hale getirilmeye çalışılmak üzere yeni tasarlanmış özgün moleküller sentezlenmiş ve bu çalışma kapsamında aktivitelerinin tespiti gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu özgün HK-2 inhibitörleri (özgün MeJA mimetikleri), kanser hücrelerinin glikozu almasını durdurarak Warburg etkisinin kullandığı yolağı engelleme fırsatı sağlayabilir ve bu da kanser için yeni tedavilere olanak sağlayacak kapılar açabilir.

Literatürde HK-2'nin aktivitesini iki şekilde gösterdiği görülmüştür: glikolizde glikozdan glukoz-6-fosfat oluşumunun reaksiyonunu katalize ederek veya mitokondriye VDAC'ı bağlayarak (5,124,125). Her iki etkinin engellenmesi hücre ölümüne neden olur. 2-DG gibi HK-2 inhibitörleri, enzimin katalitik aktivitesini engellemek yoluyla etki ederken, bitki stres hormonlarından olan jasmonat ailesinin bir üyesi olan MeJA ise HK-2'nin mitokondriyal etkileşiminin kesintiye uğraması yoluyla etki eder (126). Bu nedenle, HK-2 inhibitörleri olarak sentezlenen MeJA mimetiklerinin, MeJA ile aynı etki mekanizmasını gösterdiği tahmin edilmektedir.

MeJA iyi bilinen bir HK-2 inhibitörüdür ve aktivitesini mitokondri membranı üzerinde bulunan VDAC ile etkileşimde olan HK-2'nin bulunduğu bu yerden ayrılmasına neden olarak gösterir. MeJA'nın HK-2'nin katalitik aktivitesi üzerinde bir intihibör etkisi olup olmadığına dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda HK-2 enziminin inhibisyonunu ölçmek için inorganik fosfat salınımının ölçümüne dayalı gerçekleştirilen deneyde MeJA'nın gösterdiği inhibisyonun IC<sub>50</sub> değerine dayanarak daha düşük dozlarda aktivite gösteren özgün MeJA mimetiklerinin olduğu tespit edilmiştir. 1 µM'den daha düşük IC<sub>50</sub> dozunda aktivite gösteren bileşikler 3> 2> 1> 7> 6 olarak listelenmiştir. Ön enzim inhibisyon çalışmaları, MeJA'nın kendisinden çok daha güçlü bir grup yeni MeJA mimetiği tanımlandığını ortaya koymaktadır. HK-2 katalitik aktivitesinin inhibisyonu üzerindeki etki mekanizmasını tam olarak anlamak ve açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırma yapılması gerekir.

Hücre canlılığı deneylerinde A549 akciğer kanseri hücre hattı ve SKOV-3 yumurtalık kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Özgün mimetiklerin A549 hücre hattının canlılığı üzerindeki etkinliklerinin tespit edilmesi ve değerlendirilmesi için hücreler farklı özgün moleküllerle, MeJA'nın literatürde tespit edilen etkinlik dozu dikkate alınarak belirlenmiş doz aralıklarında 24 saat boyunca muamele edilmiştir. HK-2 inhibitörü kontrolü olarak kullanılan MeJA'nın A549 hücre hattında gösterdiği etkinlik dikkate alınarak özgün MeJA mimetiği olarak sentezlenmiş Bileşik 1 ve 3'ün son derece aktif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.2.1). Ek olarak Bileşik 3'ün hücre canlılığında %0.36'ya (IC<sub>50</sub> değeri: 4.250 mM) kadar inen önemli bir azalma ile sitotoksik etkiler gösterdiği görülmüştür (Şekil 6.2.2). Burada bazı moleküllerin güçlü hidrofobik yapıları nedeniyle hücre besiyerine konulduklarında çökme meydana gelmiştir. Bu sebeple bazı moleküllerin IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilememiştir. Yeruva ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir çalışmada A549 hücre hattında MeJA'nın hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücreleri apoptoza götürdüğü tespit edilmiştir (80). Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada MeJA'nın A549 hücrelerinde hidrojen peroksit oluşumunu içeren bir kaskad yoluyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir (82). Bu literatürü göz önünde bulundurarak bu tez kapsamında yapılan deneyler ile MeJA'nın A549 hücre hattı üzerindeki etkilerine

paralel sonuçlar elde edildiği ve MeJA'dan daha aktif moleküllerin tespit edildiği söylenebilir.

Hücre canlılık deneyleri kapsamında özgün MeJA mimetiklerinin SKOV-3 yumurtalık kanseri hücre hattında denenmesi gerçekleştirilmiştir. A549 hücre hattında izlenen metodla paralel olarak özgün mimetiklerin SKOV-3 hücre hattının canlılığı üzerindeki etkinliklerinin tespit edilmesi ve değerlendirilmesi için hücreler farklı özgün moleküllerle, MeJA'nın literatürde tespit edilen etkinlik dozu dikkate alınarak belirlenmiş doz aralıklarında 24 saat boyunca muamele edilmiştir. HK-2 inhibitörü kontrolü olarak kullanılan MeJA'nın SKOV-3 hücre hattında gösterdiği etkinlik dikkate alınarak özgün MeJA mimetiği olarak sentezlenmiş Bileşik 3'ün hücre canlılığında %0.28'e (IC<sub>50</sub> değeri: 1,772 mM) kadar inen önemli bir azalma ile sitotoksik etkiler gösterdiği görülmüştür (Şekil 6.3.2). Burada, A549 hücre hattında yaşandığı gibi, bazı moleküllerin güçlü hidrofobik yapıları nedeniyle hücre besiyerine konulduklarında çökme meydana gelmiştir. Bu sebeple bazı moleküllerin IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilememiştir (Tablo 6.3.1). Liechti ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre (2002) mutant p53'e sahip hücre hatlarında MeJA p53-bağımsız apoptoza veya nekroza neden olmaktadır (127). Yeruva ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (2010) MeJA'nın hücreleri CDDP'ye hassaslaştırması üzerine deneyler yapılmış ve bu deneylerde kullanılan SKOV-3 hücrelerinin MeJA uygulamasından sonra proliferasyonunun inhibisyona uğradığı ve sitotoksik etkilerin ortaya çıktığı bildirilmiştir (128). Mutant p53'e sahip SKOV-3 hücrelerinde yaptığımız deney sonucu görülen hücre ölümü bu datalarla desteklenmektedir.

Bütün bunlar göz önüne alındığında literatürde kanser hücrelerine özgü sitotoksik etki gösterdiğine dair bulgular olan (129) ve hücre döngüsünü durdurma, antimetastatik etki gösterme gibi özelliklere sahip bir sekonder metabolit olan MeJA'nın (77) A549 ve SKOV-3 hücre hatlarındaki IC<sub>50</sub> değerinden daha düşük dozlarda etki eden mimetiklerinin tespit edilmesi kanser tedavisi için önem arz etmektedir.

3T3 hücre hattı embriyonik fare fibroblast hücrelerinden kökenlenmektedir. Çalışmamızda bu hücre hattını kullanarak özgün MeJA mimetiklerinin sağlıklı hücreler üzerindeki seçici sitotoksik etkisini test etmeyi amaçladık. Bu doğrultuda

A549 hücre hattında en yüksek aktiviteyi gösteren ikinci molekül olan Bileşik 1 tercih edilmiştir. Bunun sebebi bu molekülün sentezinin diğer moleküllerden erken yapılmış olması ve bazı moleküller için başlangıç maddesi olarak kullanılmış olmasıdır. Maddelerin IC<sub>50</sub> değerlerinin mM düzeyinde olmasından kaynaklı olarak sentez aşamasında kullanılan başlangıç madde miktarları da fazladır. Bundan kaynaklı olarak 3T3 hücre hattında denemek ve sağlıklı hücredeki sitotoksik etkiyi ölçmek üzere yalnızca 1 adet molekül seçilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılmasına ağırlık verilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında özgün MeJA mimetiklerinden Bileşik 1'in 3T3 fare fibroblast hücrelerinde denemesi sonucu Bileşik 1'in IC<sub>50</sub> değeri 4, mM olarak tespit edilmiştir. Yine bu tez çalışması kapsamında Bileşik 1'in A549 hücre hattındaki IC<sub>50</sub> değeri 4,564 mM ve MeJA'ya kıyasla daha düşük IC<sub>50</sub> değerinde etkinlik gösterdiği tespit edilmiş iken SKOV-3 hücre hattındaki IC<sub>50</sub> değeri 6,077 mM olarak tespit edilmiştir ve MeJA'nın bu hücre hattında gösterdiği etkinliğe kıyasla MeJA'dan daha yüksek bir IC<sub>50</sub> değerinde etkinlik gösterdiği bulunmuştur. 3T3 hücre hattında hücre canlılığının MeJA uygulamasının 5mM dozunda %79,76'ya düştüğü tespit edilmiştir. Aynı dozda Bileşik 1 uygulandığında ise hücre canlılığının %51,21'e düştüğü görülmüştür. Bu verilere bakarak Bileşik 1'in 3T3 fare fibroblast hücrelerine karşı MeJA'ya göre daha sitotoksik etki gösterdiği söylenebilir. Rotem ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 0,5-3 mM aralığında 3T3 hücreleriyle muamele edilen MeJA'nın 3T3 hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir (79).

Günümüzde kabul edilen kanser tedavilerinde çok ajanlı ilaç kombinasyonları hemen hemen tüm küratif kemoterapi rejimlerinde kullanılmaktadır (18). Bunun temelinde çok ajanlı tedavilerin tek ajan tedavilere kıyasla sahip olduğu avantajlar yatmaktadır. Farklı anti-kanser ilaçlarının kombine olarak kullanılması, konakçı toksisitesini en aza indirirken tümör hücresi toksisitesini en üst düzeye çıkarabilir. Ek olarak, kombine terapi, spesifik bir tedaviye dirençli tümör hücrelerinin tedavisinde kullanılabilir ve ayrıca yeni dirençli tümör hücrelerinin gelişimini önleyebilir veya yavaşlatabilir (19). OLE molekülü yeşil zeytinin birçok bölümünde bulunan fenolik bir bileşiktir. OLE'nin antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir (20). OLE, HL60 promiyelositik lösemi hücrelerinde (22), PC-3 prostat kanseri hücrelerinde (23), MCF-

7 meme kanseri hücrelerinde (24) ve CaCo2 kolon kanseri hücrelerinde (25) denenmiş ve antiproliferatif ve apoptozu indüklemek yoluyla antikanser etki gösterdiği görülmüştür. OLE'nin etki mekanizması Akt inhibisyonu ve p53 aktivasyonu üzerindedir. Sinerjik etki çalışmalarında kullanılan bir diğer molekül olan CDDP iyi bilinen bir kemoterapötik ilaçtır. Çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmış ve etkinliği gösterilmiştir. Etki mekanizması DNA onarım mekanizmalarına müdahale etmek, DNA'da hasar oluşturmak ve apoptozu indüklemek şeklindedir. Çok sayıda yan etkisi sebebiyle diğer ilaçlarla kombine şekilde kullanılmaya başlanmış ve CDDP'nin bu şekildeki kombinasyon tedavilerinin toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir (28). Bir diğer molekül olan yarı sentetik bir taksan olan DTX, mikrotübül depolimerizasyonun inhibisyonu ve Bcl-2 gen ekspresyonunun azalması ile antikanser etki göstermektedir (30). Son olarak heterosiklik aromatik bir bileşik olan 5-FU, 5'inci karbonunda hidrojen atomu yerine flor atomuna sahip bir urasil analogudur. Yapısı dolayısıyla RNA ve DNA'ya dahil edilerek sitotoksositeye ve hücre ölümüne yol açar (32). Ancak ilaç direnci 5-FU'nun klinik kullanımı için önemli bir sınırlama oluşturmaktadır. Bahsedilen bu moleküllerin her biri için klinik kısıtlamalar ve ilaç direncinden söz edilebilir. Böyle bir durumda hem ilaç direncinden kurtulmak hem de sistemik toksisiteyi azaltmak için farklı yollara etki eden veya aynı yolak üzerinden etki eden moleküllerle kombine tedavilere yönelmek doğru bir taktik olarak görülmektedir.

Bu tez kapsamında yapılan sinerjik etki çalışmalarında A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında gerçekleştirilen hücre canlılık deneyi sonucunda elde edilen verilere bakılarak en aktif çıktığı tespit edilen MeJA mimetiği olan Bileşik 3 ile OLE, CDDP, 5-FU ve DTX molekülleri ayrı ayrı kombine olarak A549 ve SKOV-3 hücre hatlarında denenmiştir. Yukarıda belirtildiği üzere bu moleküllerin her biri farklı bir yolak üzerinden antikanser etki göstermektedir. Yapılan deneyle sonucunda en aktif olduğu önceki deneylerle tespit edilmiş özgün MeJA mimetiği Bileşik 3 ile kombine denen bu moleküllerin IC<sub>50</sub> değerlerinin tek başlarına gösterdikleri IC<sub>50</sub> değerlerinden daha düşük olduğu ve buna göre bu moleküllerin daha düşük dozlarda sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada A549 hücre hattında SKVO-3 hücre hattına göre daha anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeninin SKOV-3 hücre hattının birçok antikanser ajanına direnç gösteren bir hat olması olduğu

düşünülmektedir. Yaptığımız bu kombine deneme çalışmasıyla antikanser etkileri olduğu bilinen maddelerin en aktif bulunan özgün MeJA mimetiğiyle kombine olarak kullanılıp daha düşük dozlarda etki gösterip göstermediğini tespit etmek amaçlanmıştır. Literatürde, yukarıda bahsedilen moleküllerden OLE ve DTX moleküllerinin MeJA ile sinerjik etkisinin tespitine dair yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra Heyfets ve Flescher (2007) tarafından CT26, DA-3, GTRAMP C1, MCF7, MIA PaCa-2, D122, ve BCL1 hücre hatlarında yapılan bir çalışmada MeJA ve CDDP molekülleri ile yapılan sinerjik etki çalışmalarında güçlü kooperatif etkiye rastlandığı belirtilmiştir (70). Avila-Roman ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada HT-39 hücrelerinde MeJA ve 5-FU moleküller kombine olarak denenmiş ve 5-FU molekülünün  $IC_{50}$  değerinin 5 mM'dan 2,5 mM'a düştüğü tespit edilmiştir (130). Literatürdeki bu çalışmalar dikkate alındığında bu tez kapsamında elde edilen sonuçların literatür datalarıyla örtüştüğü görülmektedir.

Yapılan sinerjik etki deneylerinde görüldüğü üzere özgün MeJA mimetiklerinin OLE, CDDP, 5-FU ve DTX gibi kanser tedavilerinde kullanılan veya kanser tedavisinde potansiyel teşkil ettiği düşünülen maddeler ile kombine kullanılması durumunda belirtilen bu maddelerin bu çalışmada kullanılan kanser hücre hatlarındaki (A549 ve SKOV-3) yarı maksimal inhibisyon konsantrasyon ( $IC_{50}$ ) değerini düşürmüştür.

Poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) kesilmesi, hücre ölümünün en iyi biyokimyasal belirteçlerinden biridir ve PARP, apoptotik kaskadın en aşağı akışında kesilir, böylece DNA hasarının meydana geldiği hücre ölümünün son aşamalarını gösterir (131,132). Bu çalışmada, apoptotik yolağın son basamağında kesilime uğrayan PARP (cleaved-Poly (ADP-ribose) Polymerase) ve glikoz alım aşamasında aktif rol oynayan HK-2 proteinlerinin özgün MeJA mimetiği olan Bileşik 3'ün  $IC_{50}$  dozu ile muamele edilmesinden sonra translasyonel düzeydeki değişiminin tespit edilmesi amacıyla immün blotlama tekniği kullanılmıştır. Housekeeping genlerden biri olan Aktin'in protein düzeyindeki anlatımı kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar bize Bileşik 3 ile muamele edilen A549 hücrelerinde HK-2 protein miktarının kontrol grubuna göre arttığını göstermektedir (Şekil 6.7.1). Bu, büyük olasılıkla, protein ekspresyon seviyelerini artırarak HK-2 aktivitesini karşılayan bir hücresel

savunmadan kaynaklanmaktadır. Ekspresyon seviyesi HK-2 inhibitörlerinin inhibitör etkisine bağlı olmadığından, hücreler inhibe edici sinyalleri aldıktan sonra hücre ölümü kaçınılmazdır. Bunun yanı sıra, Bileşik 3 ile muamele edilen hücrelerde c-PARP miktarının kontrol hücrelerine göre arttığı tespit edilmiştir (Şekil 6.7.2). Liechti ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan bir çalışmada MeJA'nın fonksiyonel p53 genine sahip kanser hücreleri üzerinden p53 aracılı apoptozu indüklediği gösterilmiştir (127). Bu bilgiyle kıyaslandığında fonksiyonel p53 geni içeren A549 hücrelerinin özgün MeJA mimetiği olan Bileşik 3 ile muamele edilmesi sonucu apoptoza gitmesi ve immün blotlama sonucunda apoptozun en net göstergelerinden biri olan c-PARP proteininin yaptığımız deney sonucunda kontrol grubuna kıyasla spesifik olarak yüksek çıkması durumu (Şekil 6.7.2) literatür bilgisiyle uyumaktadır.

Goldin ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada HK-2'nin over ekspresyonunun MeJA'nın sitotoksitesini azalttığı bulunmuştur. Bu deneyi gerçekleştirmek için hücreler HK-2 geni içeren plazmitlerle transforme edilmiştir. Bunun sonucunda HK-2 enziminin normalden fazla ekspresyonunun MeJA'nın sitotoksik etkisini azalttığı görülmüştür (5). Bu veriler, yaptığımız immün blotlama deneyi sonucunda özgün MeJA mimetiği olan Bileşik 3'ün IC<sub>50</sub> dozunun uygulandığı A549 hücre grubundan elde edilen HK-2 protein miktarının kontrol grubu hücrelerinden elde edilen HK-2 proteine oranla artmış olması durumunu desteklemektedir (Şekil 6.7.1). Burada hücrelerin kendilerini MeJA sitotoksitesinden korumak üzere HK-2 ekspresyonunu arttırmış olabileceği düşünülebilir.

Bileşik 3'ün IC<sub>50</sub> dozu ile muamele edilen A549 hücrelerinden elde edilen mitokondriyal proteinler öncelikle HK-2 antikor yardımıyla çöktürülmüş ve HK-2 proteini ve buna bağlı proteinler elde edilmiştir. Elde edilen proteinlerde immün blotlama yöntemi kullanılarak VDAC proteini miktarı ölçülmüştür. Buna göre madde uygulaması yapılan grupta VDAC miktarı kontrol grubuna oranla azalmıştır (Şekil 6.8.1). Literatürde MeJA'nın HK-2'nin VDAC ile olan etkileşimini ortadan kaldırarak etki gösterdiğine dair bulgular mevcuttur (76,80). Buna dayanarak Bileşik 3 ile muamele edilen hücrelerde HK-2'nin VDAC ile etkileşiminin kesildiği yorumu yapılabilir.



HK-2 inhibitörleri olarak sentezlenen MeJA mimetiklerinin, MeJA ile aynı etki mekanizmasını gösterdiği tahmin edilmektedir. Bu amaçla, Bileşik 3'ün HK-2'nin immünopresipitasyonu ve ardından VDAC'nin western blotlama yoluyla HK-2 ve VDAC etkileşimi üzerindeki inhibitör etkisi bu çalışmada araştırıldı. Sonuçlara dayanarak, MeJA'nin kendisinden daha güçlü HK-2 inhibitörü (ör: Bileşik 3) olma potansiyeline sahip özgün moleküller belirlendi. Ayrıca, en güçlü MeJA mimetiği olarak tespit edilen Bileşik 3'ün, mitokondriyal membran üzerinde VDAC ve HK-2 etkileşimini bozarak etki ettiğini belirlendi; bu nedenle hücre ölümüne neden olduğu tespit edildi. Bu çalışmada yapılan enzim inhibisyon deneyi özgün MeJA analoglarının HK-2 inhibisyonu için potansiyel adaylar olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonucunda biyolojik sistemlerde aktif özgün potansiyel HK-2 inhibitörü olabilecek bir ilaç adayının ilerde daha sonra hayvan deneylerinin de yapılmasıyla geliştirilebileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra özgün MeJA mimetiklerinin hücrelerdeki etki mekanizmasının daha detaylı araştırılması yapılabilir. Ayrıca bu mimetiklerin tamamının, sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri ve güvenilirlikleri daha detaylı olarak araştırılabilir. Mimetiklerin mutant p53 genine sahip hücre hatlarında denenmesi yapıp, indükledikleri hücre ölüm mekanizmaları yapılacak çalışmalar ile aydınlatılabilir.

## 8. KAYNAKLAR

1. Debatin KM, Poncet D, Kroemer G. Chemotherapy: Targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*. 2002;
2. De Berardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016;2(5).
3. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: Identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem*. 2001;
4. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*. 2002;
5. Goldin N, Arzoine L, Heyfets A, Israelson A, Zaslavsky Z, Bravman T, et al. Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene*. 2008;
6. Ferreira LMR. Cancer metabolism: The Warburg effect today. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2010;89(3):372–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.08.006>
7. Cassidy JW, Bruna A. Tumor heterogeneity. In: *Patient Derived Tumor Xenograft Models: Promise, Potential and Practice*. 2017.
8. In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973;
9. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977.
10. TODARO GJ, GREEN H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*. 1963;
11. Saijo N. Progress in cancer chemotherapy with special stress on molecular-

- targeted therapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;
12. National Cancer Institute. Metastatic Cancer - National Cancer Institute. Nci. 2017.
  13. Padma R, Paulraj S, Sundaresan S. Squamous cell carcinoma of buccal mucosa: Prevalence of clinicopathological pattern and its implications for treatment. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015;
  14. Amer MH. Genetic factors and breast cancer laterality. *Cancer Manag Res.* 2014;
  15. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer Epigenetics: Tumor Heterogeneity, Plasticity of Stem-like States, and Drug Resistance. *Molecular Cell.* 2014.
  16. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews.* 2006.
  17. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research.* 2010.
  18. Hait WN, Eder JP. Principles of Dose, Schedule, and Combination Therapy. In: *Holland-Frei Cancer Medicine.* 2019.
  19. CH T, E C. In *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach.* In: *Principles of oncologic pharmacotherapy.* 2008.
  20. Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica.* 2010.
  21. Sirianni R, Chimento A, de Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res.* 2010;
  22. Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev.* 2002;

23. Luo C, Li Y, Wang H, Cui Y, Feng Z, Li H, et al. Hydroxytyrosol Promotes Superoxide Production and Defects in Autophagy Leading to Anti-proliferation and Apoptosis on Human Prostate Cancer Cells. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013;
24. Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, et al. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 2009;
25. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessià MA, Spencer JPE. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol Nutr Food Res*. 2009;
26. Terzuoli E, Donnini S, Giachetti A, Iñiguez MA, Fresno M, Melillo G, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2010;
27. Shamshoum H, Vlavcheski F, Tsiani E. Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors*. 2017;43(4):517–28.
28. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014.
29. Cisplatin. *Am Soc Heal Pharm*. 2016;
30. Pienta KJ. Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer. *Semin Oncol*. 2001;28(4 SUPPL. 15):3–7.
31. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000.
32. Thomas DM, Zalberg JR. 5-Fluorouracil: A pharmacological paradigm in the use of cytotoxics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*.

- 1998.
33. Fluorouracil. Am Soc Heal Pharm. 2016;
  34. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. 2011.
  35. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. FEBS Journal. 2010.
  36. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. Annual Review of Biochemistry. 1998.
  37. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in humancancer. Nat Rev Cancer. 2002;
  38. Bos JL. Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. Cancer Res. 1989;
  39. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. Nature Reviews Cancer. 2004.
  40. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. Nature. 2006.
  41. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature. 2004.
  42. Oren M. Decision making by p53: Life, death and cancer. Cell Death and Differentiation. 2003.
  43. Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: One protein, many possibilities. Cell Death and Differentiation. 2006.
  44. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell. 1997;
  45. Moulder DE, Hatoum D, Tay E, Lin Y, McGowan EM. The roles of p53 in mitochondrial dynamics and cancer metabolism: The pendulum between survival and death in breast cancer? Cancers. 2018.

46. Galluzzi L, Kepp O, Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013.
47. Warburg O. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science* (80- ). 1956;
48. Koppenol WH, Bounds PL, Dang C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011.
49. Gaudin M, Simonnet X, Debrunner N, Ryser A. Breeding for a *Hypericum perforatum* L. variety both productive and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) tolerant. In: *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 2002.
50. Bellone M, Calcinotto A. Ways to enhance lymphocyte trafficking into tumors and fitness of tumor infiltrating lymphocytes. *Frontiers in Oncology*. 2013.
51. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011.
52. Dang C V., Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*. 1999.
53. Zhong YY, MacGregor-Das A, Saunders T, Whittle MCM, Makohon-Moore AA, Kohutek ZA, et al. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Res*. 2016;
54. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*. 2003.
55. Peschiaroli A, Giacobbe A, Formosa A, Markert EK, Bongiorno-Borbone L, Levine AJ, et al. MiR-143 regulates hexokinase 2 expression in cancer cells. *Oncogene*. 2013;
56. Fang R, Xiao T, Fang Z, Sun Y, Li F, Gao Y, et al. MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *J Biol Chem*. 2012;

57. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011.
58. Riddle SR, Ahmad A, Ahmad S, Deeb SS, Malkki M, Schneider BK, et al. Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2000;
59. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*. 2006;25(34):4777–86.
60. Gwak GY, Yoon JH, Kim KM, Lee HS, Chung JW, Gores GJ. Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *J Hepatol*. 2005;
61. Kim J, Gao P, Liu Y-C, Semenza GL, Dang C V. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively Induce Vascular Endothelial Growth Factor and Metabolic Switches Hexokinase 2 and Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1. *Mol Cell Biol*. 2007;
62. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003.
63. Yu P, Wilhelm K, Dubrac A, Tung JK, Alves TC, Fang JS, et al. FGF-dependent metabolic control of vascular development. *Nature*. 2017;
64. Roberts DJ, Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akt acting on mitochondria and TORC1 to autophagy. *Cell Death and Differentiation*. 2015.
65. Fan Y, Zong WX. Hacking hexokinase halts tumor growth. *Cancer Biology and Therapy*. 2008.
66. Coller HA. Is cancer a metabolic disease? 9582978472. *American Journal of Pathology*. 2014.
67. Patra KC, Hay N. Hexokinase 2 as oncotarget. *Oncotarget*. 2013.

68. Krasnov GS, Dmitriev AA, Snezhkina A V., Kudryavtseva A V. Deregulation of glycolysis in cancer: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013.
69. Apoptosis Pathway [Internet]. Available from: medbooksvn.org%0A
70. Heyfets A, Flescher E. Cooperative cytotoxicity of methyl jasmonate with anti-cancer drugs and 2-deoxy-d-glucose. *Cancer Lett*. 2007;
71. Zhang Q, Zhang Y, Zhang P, Chao Z, Xia F, Jiang C, et al. Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells. *Genes and Cancer*. 2014;5(3–4):100–12.
72. Wang, Y., Zhou, X., Moore, D., Gao, D., Weistein, E., Chaudhari, P., Lebwohi, M., Wei H. Effects of jasmonic acid and its methyl jasmonates (MJ) on UVB induced skin carcinogenesis. 2007;
73. Sembdner G, Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1993;
74. Farmer EE, Ryan CA. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;
75. Flescher E. Jasmonates in cancer therapy. *Cancer Letters*. 2007.
76. Cohen S, Flescher E. Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry* [Internet]. 2009;70(13–14):1600–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.007>
77. Fingrut O, Flescher E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. *Leukemia*. 2002.
78. Flescher E. Jasmonates - A new family of anti-cancer agents. *Anti-Cancer Drugs*. 2005.
79. Rotem R, Heyfets A, Fingrut O, Blickstein D, Shaklai M, Flescher E.



- Jasmonates: Novel anticancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria. *Cancer Res.* 2005;
80. Yeruva L, Pierre KJ, Carper SW, Elegbede JA, Toy BJ, Wang RC. Jasmonates induce apoptosis and cell cycle arrest in non-small cell lung cancer lines. *Exp Lung Res.* 2006;
  81. Rotem R, Fingrut O, Moskovitz J, Flescher E. The anticancer plant stress-protein methyl jasmonate induces activation of stress-regulated c-Jun N-terminal kinase and p38 protein kinase in human lymphoid cells [1]. *Leukemia.* 2003.
  82. Kim JH, Lee SY, Oh SY, Han SI, Park HG, Yoo MA, et al. Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-X and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncol Rep.* 2004;
  83. Goldin N, Heyfets A, Reischer D, Flescher E. Mitochondria-mediated ATP depletion by anti-cancer agents of the jasmonate family. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2007.
  84. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 2003.
  85. Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annual Review of Cell Biology.* 1988.
  86. The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem. *JAMA J Am Med Assoc.* 1931;
  87. Fingrut O, Reischer D, Rotem R, Goldin N, Altboum I, Zan-Bar I, et al. Jasmonates induce nonapoptotic death in high-resistance mutant p53-expressing B-lymphoma cells. *Br J Pharmacol.* 2005;
  88. Nakashima RA, Pedersen PL, Mangan PS, Colombini M. Hexokinase Receptor Complex in Hepatoma Mitochondria: Evidence from N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-Labeling Studies for the Involvement of the Pore-Forming Protein VDAC. *Biochemistry.* 1986;

89. Pedersen PL. The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: An overview. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2007.
90. Bustamante E, Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;
91. Hammerman PS, Fox CJ, Thompson CB. Beginnings of a signal-transduction pathway for bioenergetic control of cell survival. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004.
92. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004;
93. Sroka IC, Nagle RB, Bowden GT. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase is regulated by Sp1 through the differential activation of AKT, JNK, and ERK pathways in human prostate tumor cells. *Neoplasia*. 2007;
94. Mookherjee P, Quintanilla R, Roh MS, Zmijewska AA, Jope RS, Johnson GVW. Mitochondrial-targeted active Akt protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from staurosporine-induced apoptotic cell death. *J Cell Biochem*. 2007;
95. Nesterov A, Lu X, Johnson M, Miller GJ, Ivashchenko Y, Kraft AS. Elevated Akt Activity Protects the Prostate Cancer Cell Line LNCaP from TRAIL-induced Apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;
96. VanderWeele DJ, Zhou R, Rudin CM. Akt up-regulation increases resistance to microtubule-directed chemotherapeutic agents through mammalian target of rapamycin. *Mol Cancer Ther*. 2004;
97. Pérez-Tenorio G, Stål O, Arnesson LG, Malmström A, Nordenskjöld B, Nordenskjöld K, et al. Activation of Akt/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer*. 2002;
98. Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, Saito H, Katano K, Tatebe S, et al. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy. *Gastric Cancer*. 2007;

99. Tomita Y, Morooka T, Hoshida Y, Zhang B, Qiu Y, Nakamichi I, et al. Prognostic significance of activated AKT expression in soft-tissue sarcoma. *Clin Cancer Res.* 2006;
100. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* 2001;
101. Elia U, Flescher E. PI3K/Akt pathway activation attenuates the cytotoxic effect of methyl jasmonate toward sarcoma cells. *Neoplasia.* 2008;
102. Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB. Akt-Directed Glucose Metabolism Can Prevent Bax Conformation Change and Promote Growth Factor-Independent Survival. *Mol Cell Biol.* 2003;
103. Ofer K, Gold D, Flescher E. Methyl jasmonate induces cell cycle block and cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol.* 2008;
104. Cohen S, Flescher E. Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry.* 2009.
105. Brtko J, Thalhamer J. Renaissance of the Biologically Active Vitamin A Derivatives: Established and Novel Directed Therapies for Cancer and Chemoprevention. *Curr Pharm Des.* 2005;
106. Zhang JW, Gu J, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Journal of Biosciences.* 2000.
107. Ohno R, Naoe T, Hirano M, Kobayashi M, Hirai H, Tubaki K, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with all-trans retinoic acid. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare. *Blood.* 1993;
108. Tsumura H, Akimoto M, Kiyota H, Ishii Y, Ishikura H, Honma Y. Gene expression profiles in differentiating leukemia cells induced by methyl jasmonate are similar to those of cytokinins and methyl jasmonate analogs

- induce the differentiation of human leukemia cells in primary culture. *Leukemia*. 2009;
109. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007.
  110. Reischer D, Heyfets A, Shimony S, Nordenberg J, Kashman Y, Flescher E. Effects of natural and novel synthetic jasmonates in experimental metastatic melanoma. *Br J Pharmacol*. 2007;
  111. Zhang Y, Turner JG. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS One*. 2008;
  112. Cai S, Xu Y, Cooper RJ, Ferkowicz MJ, Hartwell JR, Pollok KE, et al. Mitochondrial targeting of human O6-methylguanine DNA methyltransferase protects against cell killing by chemotherapeutic alkylating agents. *Cancer Res*. 2005;
  113. Ahn HJ, Kim YS, Kim JU, Han SM, Shin JW, Yang HO. Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells. *J Cell Biochem*. 2004;
  114. Wang P, Song JH, Song DK, Zhang J, Hao C. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal*. 2006;
  115. Kniazhanski T, Jackman A, Heyfets A, Gonen P, Flescher E, Sherman L. Methyl jasmonate induces cell death with mixed characteristics of apoptosis and necrosis in cervical cancer cells. *Cancer Lett*. 2008;
  116. Guzel M., Sucu B.O., Savlug O. OS. Methyl jasmonate derivatives as possible drug candidates for use in treatment of cancer. *PCT/TR2018/050522*, 2018.
  117. CellTiter Glo Viability Assay [Internet]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/cell-viability/>
  118. Mao W, Shi H, Chen X, Yin Y, Yang T, Ge M, et al. Anti-proliferation and

- migration effects of oleuropein on human A549 lung carcinoma cells. *Lat Am J Pharm.* 2012;
119. Ser Z, Gao X, Johnson C, Mehrmohamadi M, Liu X, Li S, et al. Targeting One Carbon Metabolism with an Antimetabolite Disrupts Pyrimidine Homeostasis and Induces Nucleotide Overflow. *Cell Rep.* 2016;
  120. Nmr H. Novel 5-Fluorouracil Derivatives : Synthesis and Cytotoxic Activity of. 2013;34(5):1–6.
  121. De Souza R, Zahedi P, Moriyama EH, Allen CJ, Wilson BC, Piquette-Miller M. Continuous docetaxel chemotherapy improves therapeutic efficacy in murine models of ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(6):1820–30.
  122. Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol.* 2005;98(1):141–5.
  123. Kaplan A, Akalin Ciftci G, Kutlu HM. The apoptotic and genomic studies on A549 cell line induced by silver nitrate. *Tumor Biol.* 2017;39(4).
  124. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene.* 2006.
  125. Galluzzi L, Kepp O, Tajeddine N, Kroemer G. Disruption of the hexokinase-VDAC complex for tumor therapy. *Oncogene.* 2008.
  126. Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Letters.* 2014.
  127. Liechti R, Farmer EE. The Jasmonate pathway. *Science.* 2002.
  128. Yeruva L, Hall C, Elegbede JA, Carper SW. Perillyl alcohol and methyl jasmonate sensitize cancer cells to cisplatin. *Anticancer Drugs.* 2010;21(1):1–9.

129. Wang Y, Xiang W, Wang M, Huang T, Xiao X, Wang L, et al. Methyl jasmonate sensitizes human bladder cancer cells to gambogic acid-induced apoptosis through down-regulation of EZH2 expression by miR-101. *Br J Pharmacol.* 2014;
130. Avila-Roman J, Talero E. Methyl jasmonate is a promising tool against colon cancer. *Proc 6th Eur Congr Pharmacol.* 2012;
131. Kitazumi I, Tsukahara M. Regulation of DNA fragmentation: The role of caspases and phosphorylation. *FEBS Journal.* 2011.
132. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/PPP32 $\beta$ , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995;

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Büşra Emine	<b>Soyadı</b>	YAZICI
<b>Doğum Yeri</b>	İSTANBUL	<b>Doğum Tarihi</b>	04.10.1994
<b>Uyruğu</b>	TÜRK	<b>T.C. Kimlik No</b>	

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi / Fen Fakültesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik	2016
<b>Lise</b>	Ergün Öner Mehmet Öner Anadolu Lisesi	2012

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl/Yıl)</b>

### Yabancı Diller

<b>Dil</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Japonca	Orta	Orta	Orta

## Sınav Puanları

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2016)	79,586	80,384	72,211
	<b>İngilizce</b>		
YDS Puanı (2018)	76,25		
	<b>KPSS1</b>	<b>KPSS2</b>	<b>KPSS3</b>
KPSS Puanı (2018)	81,562	77,913	74,210

## Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım Becerisi
MS Office	Çok iyi
GraphPad Prism	Çok iyi
Image J	Çok iyi
ZEN Image Processing	İyi
Adobe Illustrator	Çok iyi
Adobe Photoshop	Çok iyi
Adobe Xd	Çok iyi
Adobe InDesign	Çok iyi
Python	Orta
Camtasia	Çok iyi
OpenCart	İyi



## Sertifikalar

Eğitim	Sertifika No
Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	İMÜDHK X 2017 / 96C
İSMEK Adobe Illustrator Eğitimi	R6SQ9QMirn 22/08/20
İSMEK Adobe XD ile Mobil Uygulama Tasarımı	xx1FiaFfFe 22/08/20
İSMEK Blog Web Sitesi Tasarımı ve Bloggerlık Eğitimi	36yEEM1hgg 30/06/20
İSMEK Camtasia 2019 Eğitimi	EKGZvnneCN 17/08/20
İSMEK MS Powerpoint 2019 Eğitimi	JQ0UO7Tydu 27/08/20
İSMEK MS Word 2019 Eğitimi	p6lLdoPYH 22/08/20
İSMEK OpenCart ile E-Ticaret Sitesi Yapımı Eğitimi	7Vemnp5cEd 19/08/20
İSMEK Python Programlamaya Giriş Eğitimi	epZEY9xzfD 20/08/20
İSMEK Adobe InDesign Eğitimi	nNhYFPZZGO 23/08/20
İSMEK Adobe Photoshop Eğitimi	scfEFNm5ss 22/06/20
İSMEK MS Word ile Akademik Doküman (Tez) Hazırlama Eğitimi	izR1a5iV7L 22/08/20
İSMEK Japonca Eğitimi A1	16045220170049295364
İSMEK Japonca Eğitimi A2	16045220170050858088
İSMEK Japonca Eğitimi B1	2460218
Council of Europe American Cultural School Certificate - C1	223740

## Makaleler

“Synthesis of Novel Methyl Jasmonate Derivatives and Evaluation of Their Biological Activity in Various Cancer Cell Lines”	Bioorganic chemistry 91 (2019): 103146.
--	---

## Posterler

Büşra Emine Yazıcı, Bilgesu Onur Sucu, Özgecan Şavluğ, Şükran Özdatlı, Damla Uludağ, Nihal Karakaş, Mustafa Güzel (2018). “**Targeting different types of cancers by Novel Methyl Jasmonate Derivatives**”, 3rd Annual Meeting MuTaLig COST Action Malta/Italy

Damla Uludağ, Bilgesu Sucu, Özgecan Savluğ, Büşra Emine Yazıcı, Mustafa Güzel, Nihal Karakaş (2018). ‘**Therapeutic effects of novel methyl jasmonate derivatives on brain cancer cell lines**’ 3rd Annual meeting | MuTaLig Cost Action, Malta/Italy

## Laboratuvar Yeterlilikleri

DNA ve RNA izolasyonu
Plazmit İzolasyonu
Spinning Disc Mikroskop
cDNA Sentezi
Western Blot (Wet Blot - Semi-dry Blot)
Agaroz ve SDS-PAGE Jel Elektroforezi
Protein izolasyonu (Dokudan ve hücreden)
Reverse Transcriptase-PCR
Hücre Transfeksiyonu
İmmünohistokimya
İmmünopresipitasyon
Primer ve Sekonder Hücre Kültürü
Genel Laboratuvar Pratikleri
Bitki Doku Kültürü
Flow Cytometry Cell Sorting
Fare Diseksiyonu