

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNDOLİN-2-ON TÜREVLERİNİN KANSER HÜCRE
PROLİFERASYONUNA ETKİSİ

BÜŞRA DEMİRKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNDOLİN-2-ON TÜREVLERİNİN KANSER
HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİ

BÜŞRA DEMİRKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE
2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

THE EFFECT OF INDOLIN-2-ONE DERIVATIVES
ON CANCER CELL PROLIFERATION

BÜŞRA DEMİRKAN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE
2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/02/2023 tarih ve 2023/11 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 17/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Büşra DEMİRKAN' ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Can Murathan ERİŞTİ

ÜYE

: Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Malign mezotelyoma (MM), vücudun plevral, peritoneal ve perikardiyal seröz boşluklarını kaplayan ince bir doku tabakasından kaynaklanan bir malignitedir. MM tedavisinde mevcut antikanser ilaçların seçiciliğinin düşük olması ya da hücrelerin zamanla direnç göstermesi gibi durumlar etkin ve güvenli tedavi için yeni ilaç adaylarının tasarımı ve sentezine ihtiyacın önemini ortaya koymaktadır. Kanser hücrelerini küçük molekülü inhibitörlerle hedeflemek, potansiyel bir terapötik strateji olarak doğrulanmıştır. Bu kapsamda indolin-2-on potansiyel antikanser ajanları geliştirmek için kullanılan çok yönlü bir yapı iskelesidir. Bu çalışmada orijinal olarak tasarlanan ve sentezlenen indolin-2-on türevi dört bileşiğin anti-proliferatif aktivitesi değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin potansiyeli ilk olarak MTT analizi ile mezotelyum (MeT-5A) ve Malign Mezotelyoma (SPC111, SPC212) hücre hatlarında incelenmiştir. Bileşikler, her iki MM hücre hatlarında büyümeyi konsantrasyona bağlı inhibe ederek antikanser aktivite sergilemiştir. İlâveten bileşikler kanser hücrelerine kanser olmayan mezotel hücrelerine göre daha toksik etki göstermişlerdir. Türevlerin konsantrasyona bağlı olarak hücre göçü ve koloni oluşum yeteneklerini de baskıladığı sonucuna varılmıştır. Ek olarak, hücre proliferasyon mekanizmasında etkin sinyal yollarında rol alan anahtar proteinlerin aktivasyon ve ekspresyon seviyeleri incelendiğinde; türevlerin konsantrasyon bağımlı olarak ERK1/2, AKT, STAT3 ve ERK5 protein fosforilasyonunu baskıladığını fakat total ifadelerinde değişime neden olmadığını göstermiştir. İlâveten genel olarak hücre ölümü ile ilişkilendirilen stresle aktive olan MAPK ailesinin diğer alt üyeleri olan JNK/SAPK ve p38 sinyal yollarının konsantrasyon bağımlı olarak indolin-2-on türevlerince aktive edildiği bulgusuna da ulaşılmıştır. Tüm bu sonuçlar indolin-2-on türevi bileşiklerin MM hücreleri için anti-kanser potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Malignant Mezotelyoma, İndolin-2-on, Anti-proliferatif, Hücre Göçü.

SUMMARY

Malignant mesothelioma (MM) is a malignancy arising from a thin layer of tissue lining the pleural, peritoneal and pericardial serous spaces of the body. The low selectivity of existing anticancer drugs in the treatment of MM or the resistance of cells over time reveals the importance of the need for the design and synthesis of new drug candidates for effective and safe treatment. Targeting cancer cells with small molecule inhibitors has been validated as a potential therapeutic strategy. In this context, indolin-2-one is a versatile scaffold used to develop potential anticancer agents. In this study, the anti-proliferative activity of four indolin-2-one derivative compounds that were originally designed and synthesized were evaluated. The potential of the synthesized compounds was first investigated by MTT analysis in mesothelium (MeT-5A) and malignant mesothelioma (SPC111, SPC212) cell lines. The compounds exhibited anticancer activity by concentration-dependent inhibition of growth in both MM cell lines. In addition, the compounds were more toxic to cancer cells than to non-cancer mesothelial cells. It was concluded that the derivatives also suppressed cell migration and colony formation abilities depending on the concentration. In addition, examining the activation and expression levels of key proteins involved in active signaling pathways in cell proliferation mechanism showed that the derivatives suppressed ERK1/2, AKT, STAT3 and ERK5 protein phosphorylation in a concentration-dependent manner but did not cause a change in their total expression. Moreover, JNK/SAPK and p38 signaling pathways which is generally associated with cell death, were concentration-dependently activated by indolin-2-one derivatives. All these results show that indolin-2-one derivative compounds have anti-cancer potential for MM cells.

Key Words: Malignant Mesothelioma, Indolin-2-one, Anti-proliferative, Cell Migration.

TEŞEKKÜR

Akademik gelişimim için danışmanlığımı yapan, yüksek lisans eğitimim boyunca tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum sayın danışman hocam Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU'na,

KASIAL ekibine dahil olduğum ilk günden son güne kadar yanımda olan tüm bilgi ve birikimini eksiksiz aktaran, bu süreçteki en büyük gücüm olduğuna inandığım, onunla çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum, haricinde olan tüm dostluğu ve arkadaşlığı için Gülseren TURHAL' a, tüm güzel enerjisi ve desteğini benden esirgemeyen birlikte vakit geçirmekten keyif aldığım Nimet Şule YÜNCÜ' ye, yüksek lisans eğitimine birlikte başladığım yol arkadaşım İzel Nermin BAŞLILAR' a, lisans ve yüksek lisans döneminde aynı sıraları paylaştığım Dayk MURATOĞLU' na,

Varlıklarına şükrettiğim, olmasalardı olmazdım dediğim, beni ben yapan değerlerime: “Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, canım annem ve babama, mutluluğumuzu ve sevgimizi paylaştıkça çoğalttığımız canım kardeşlerime, hayatıma dahil oldukları ilk günden beri iyi kötü her anımda yanımda olan manevi kardeşlerim Şeyma AKPINAR ve Merve YILDIZ' a, gün içindeki koşturmadan sonra eve vardığımda tüm yorgunluğumu alan neşe kaynaklarım canım papağanım Paşa' ya ve minik kedim Topak'a”

Yüksek lisans eğitimim boyunca sağladıkları maddi desteklerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)-Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na

Sonsuz saygı ve sevgi ile teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Mezotelyal Yapıların Gelişimsel Kökeni	3
2.2. Malignant Mezotelyoma	3
2.3. Sinyal Yolakları	4
2.3.1. MAP Kinaz Ailesi	4
2.3.1.1. MEK1/2-ERK1/2 Yolağı	5
2.3.1.2. MEK5/ERK5 Yolağı	6
2.3.1.3. SAPK/JNK Yolağı	7
2.3.1.4. p38MAPK Yolağı	8
2.3.2. PI3K/AKT Yolağı	9
2.3.3. STAT Yolağı	10
2.4. İndol Yapısı ve Sentezlenen Türevler	12
3. MATERYAL ve METOD	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Kimyasallar	15
3.1.2. Cihazlar	16
3.1.3. Hücre Kültürü Sıvı Besi Ortamları	16
3.1.4. Tampon ve Solüsyonlar	17
3.1.5. Antikorlar	18
3.2. Metod	18

3.2.1. Hücre Hatları ve Kültürü	18
3.2.2. Hücre Ekimi ve Besiyeri Değişimi	18
3.2.3. Hücre Pasajlama (Altkültür) ve Saklama	19
3.2.4. Maddelerin Hazırlanması	19
3.2.5. Hücre Canlılığı Analizi	20
3.2.6. Yara İyileşmesi Deneyleri	20
3.2.7. Koloni Oluşum Deneyleri	21
3.2.8. Protein Analizleri	21
3.2.8.1. Protein izolasyonu	21
3.2.8.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	22
3.2.8.3. SDS-PAGE ve Western Blot	22
3.2.9. İstatistiksel Analizler	24
4. BULGULAR	25
4.1. İndolin-2-on Türevleri MM Hücre Canlılığını Azaltıcı Etki Göstermiştir	25
4.2. Türevler in vitro Hücre Göçünü İnhibe Etmiştir	27
4.3. İndolin-2-on Türevleri MM Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yeteneğini Azaltmıştır	30
4.4. Türevler Hücre Proliferasyonunda Etkin Proteinlerin Fosforilasyonunu Baskılamıştır	32
5. TARTIŞMA	34
 KAYNAKLAR	 37
ÖZGEÇMİŞ	43
EKLER	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
--	--------------------

g	: Gram
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
M	: Molar
AKT	: Protein Kinaz B
APS	: Amonyum Persülfat
BCA	: Bikinkoninik Asit
BSA	: Sığır Serum Albümini
Cis	: Cisplatin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ECL	: Geliştirilmiş Kemilüminesans
ERK	: Hücre Dışı Sinyal ile Düzenlenen Kinaz
FBS	: Fetal Sığır Serum
GTP	: Guanozin-5'-trifosfat
JAK	: Janus Kinaz
JNK	: C-Jun N-Terminal Kinaz
MAPK	: Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
MM	: Malignant Mezotelyoma
MMP	: Matris Metalloproteinaz
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin

Pen/Strep	: Penisilin/Streptomisin
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PVDF	: Poliviniliden Diflorür
RAS	: Sıçan Sarkomu
SAPK	: Stresle Aktive Olan Protein Kinaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
STAT	: Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü
SV40	: Simian Virus 40
TAD	: Transkripsiyonel Aktivasyon Alanı
TBS	: Tris Tamponlu Salin
TBS-T	: Tris Tamponlu Salin ile Tween 20
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil Etilendiamin
TGF- β	: Dönüşen büyüme faktörü β
Thr	: Treonin
TRIS-HCl	: Tris(hidroksimetil)aminometan Hidroklorür
Tyr	: Tirozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: MAPK kaskadının şematik gösterimi.	5
2.2: MEK/ERK1/2 kaskadının şematik gösterimi.	6
2.3: JNK yolağının yukarı akış aktivatörleri ve aşağı akış hedefleri.	7
2.4: p38MAPK yolağı, yukarı akış ve aşağı akış aktivasyonu.	9
2.5: PI3K/AKT sinyal iletimi.	10
2.6: JAK-STAT sinyal yolağı mekanizması.	12
2.7: İndol'ün moleküler yapısı.	13
2.8: Yeni sentezlenen indolin-2-on türevi maddelerin moleküler yapısı.	14
4.1: MTT analizine dayalı hücre canlılığının türev bileşiklerin konsantrasyona bağlı inhibisyonu ve doz-yanıt eğrisi.	26
4.2: Türev bileşiklerin SPC111 hücre hattında konsantrasyona ve zamana bağlı hücre göçü üzerindeki etkisi.	28
4.3: Türev bileşiklerin SPC212 hücre hattında konsantrasyona ve zamana bağlı hücre göçü üzerindeki etkisi.	29
4.4: İndolin-2-on türevlerinin SPC111 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğine etkisi.	31
4.5: İndolin-2-on türevlerinin SPC212 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğine etkisi.	32
4.6: Türev bileşiklerin proliferasyonda etkili proteinlerin ekspresyon ve fosforilasyon seviyelerine etkisi.	33

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Cihaz listesi.	16
3.2: Tamponlar ve solüsyonlar listesi.	17
3.3: %10 SDS-PAGE’de kullanılan solüsyonlar ve hacimleri.	23
4.1: Türev bileşiklerin uygulanmasından sonra normal (MeT-5A), kanserli hücre hatları (SPC111, SPC212) için inhibisyon konsantrasyonları (IC ₅₀) ve seçicilik indeksleri (SI).	27

1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Malignant Mezotelyoma (MM), perikard, periton ve plevranın iç boşluklarını kaplayan mezotelyumdan kaynaklanan hücrelerin anormal hale gelmesi ve kontrolsüz bölünmesi sonucu oluşan bir kanserdir [Tosun et al., 2015]. MM anatomik konumu, radyolojik tanı araçlarının yetersizliği, özgün serum biyobelirteçlerinin olmaması nedeniyle erken evrede teşhis edilmesi oldukça güç olan bir malignitedir [Sekido., 2013], [Toyokuni., 2019]. Günümüzde mezotelyoma tedavisi için tanınan veya standartlaştırılmış bir ilaç bulunmamaktadır [Grégoire., 2010]. Bu kapsamda tedavi ve sağ kalımı iyileştirmek için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser patogenezinin daha iyi anlaşılması üzerine kanser tedavi stratejileri spesifik olmayan sitotoksik ajanlardan, seçici mekanizmaya dayalı ve moleküler yolları engellemeyi amaçlayan hedefe yönelik ajanlara yönelmiştir. Amaçlanan, normal dokulara zarar vermeden, spesifik olarak tümördeki hücre sinyallerine seçici olarak müdahale edebilen yeni anti-kanser ajanların üretilmesidir.

Sinyal yolları, çoğalma, farklılaşma, metabolizma, apoptoz veya hayatta kalma gibi birçok hücrel fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Normal hücrelerde bu sinyaller sıkı bir şekilde düzenlenirken, kanserli hücrelerde kontrol kaybolmaktadır. Kontrolün kaybolması, proliferasyonu destekleyen yolları stimüle ederken, apoptoz gibi hücrel ölüm yollarını inhibe ederek kanserli hücrenin hayatta kalmasını ve büyümesini desteklemektedir.

Son yıllarda kanser tedavisi için kullanılan ilaçların yaklaşık %60'ı heterosiklik bileşiklerdir [Sachdeva et al., 2020]. İndolin-2-on, aromatik heterosiklik bir organik bileşik olarak tedavide kullanılan ilaçların yapısında sıklıkla bulunmaktadır. Hatta Sunitinib, FDA tarafından gastrointestinal ve renal kanser için onaylanmış indolin-2-on yapısı taşıyan çok hedefli reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörüdür. Yeni ajanlar keşfetme sürecinde çok sayıda moleküler hedefe yönelik bileşikler sentezlemek için bu yapı üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmada, endüstriyel ve ekonomik yararları nedeniyle geçen yüzyılda tüm dünyada kullanılan doğal bir lifli silikat minerali olan asbeste çevresel veya mesleki maruz kalma ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiş ve coğrafi konumu nedeniyle ülkemiz içinde önemli bir kanser türü olan Malignant Mezotelyomaya ile çalıştık.

Bu kapsamda, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya bölümünde özel olarak sentezlenmiş olan indolin-2-on yapısında dört maddenin (GY342, GY339, GY306, GY333) anti-kanser etkileri mezotelyoma ve mezotelyum hücrelerinde değerlendirilmiştir. Sırasıyla maddelerin hücre canlılığı, hücre proliferasyonunda etkin sinyal yollarına etkisi, hücre göçüne ve hücrelerin koloni oluşturmalarına etkileri MTT, western blot, yara iyileşmesi ve koloni oluşma deneyleri ile incelenmiştir. Türevlerin yapı ve aktiviteleri ilişkilendirilmesi, indolin-2-on yapısına bağlı radikal grupların seçici olarak hangi yolları hedef aldığının belirlenmesi ve hücre göçü ile koloni oluşum etkilerinin belirlenmesi türevlerin anti-karsinogen potansiyeli hakkında bilgi verecektir. Böylece yüksek potansiyel ve etkinliğe sahip yeni türevlerin tasarım ve sentezi için ön veriler sağlanmış olacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mezotelyal Yapıların Gelişimsel Kökeni

Mezotelyal ("mezotelyum" olarak da adlandırılır) hücreler, döllenmeden ~3 hafta sonra oluşturulan yüzey hücreleri olarak ortaya çıkan mezodermal orjinlidir. Mezoderm, erken embriyonik gelişim sırasında oluşan üç germ tabakasından biridir. Mezoderm, diğer iki germ tabakası, ektoderm ve endoderm arasındaki boşlukta gastrulasyon adı verilen bir süreçte gelişmektedir. Embriyo gelişmeye devam ettikçe, sölomik boşluklar ortaya çıkar ve bu boşluklar aşağı yukarı üç ayrı parça olarak tanımlanabilir. Perikardiyal boşluk gelişmekte olan kalbi barındırır, periton (karın) boşluğu sindirim sisteminin gelişen iç organlarını içerir ve iki taraflı plevral (göğüs) boşluklarda akciğerler ortaya çıkar [Hiriart et al., 2019], [Toyokuni 2019]. Mezotelyal hücreler plevral, perikardiyal, peritoneal boşluklar dahil somatik boşlukları kaplar, hyaluronik asit salgılar ve her organı veya organ loblarını sınırlar [Toyokuni 2019].

2.2. Malignant Mezotelyoma

Malignant Mezotelyoma (MM), plevra (%85) ve peritonu (%15) kaplayan mezotelyal hücrelerin malign transformasyonu nedeniyle oluşan bir tümördür. MM, çok nadiren perikard ve tunika vajinalisi kaplayan mezotelyal hücrelerden gelişir. Vücut boşluklarını çevreleyen serozal astardaki hücrelerden kaynaklanan MM, histolojik olarak 3 ana alt sınıfta toplanırlar: Epitelyal tip (%50), iğsi hücre morfolojisine sahip Sarkomatoid tip (%15-20) ve diğeri ise iki morfolojinin bir karışımına sahip Bifazik (%30) tiptir [Blum et al., 2015], [Hung and Chirieac., 2020].

Plevral MM gelişimi, başta asbest olmak (vakaların %80'i) üzere kanserojen mineral liflere maruz kalma ile bağlantılıdır. Asbest benzeri lifli bir silikat olan erionitinde yüksek oranda kanserojen olduğu ve Türkiye'de vakaların çoğunun erionite maruz kalma nedeniyle görüldüğü bildirilmiştir [Metintaş et al., 2017]. Türkiye'de Kapodokya çevresinde üç köyde MM tanımlanmıştır. Bu köylerde mezotelyoma bulgusunun, evleri inşa etmek için kullanılan taşlarda ve kullanılan çakıllarda bu liflerin varlığından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır [Carbone et al., 2011], [Metintaş et al., 2017]. MM oluşumuna yol açan kanserojen liflere maruz kalmanın yanı sıra, genetik yatkınlık ve nadiren iyonlaştırıcı radyasyon gibi diğer etiyolojiler

MM ile ilişkili bulunmuştur. Ek olarak, asbest lifleri ile SV40 onkoproteinlerinin birlikte kanserojen olduğu gösterilmiştir. Maruz kalma ve hastalığın gelişimi arasındaki uzun süreç nedeniyle, MM genellikle ileri aşamalarda teşhis edilmektedir. Bu nedenle mevcut tedavilerin hayatta kalma süreleri üzerine etkileri sınırlıdır ve çeşitli araştırmalar, MM teşhisinin konan bir hastanın ortalama sağkalımının 6 ile 18 ay arasında olduğunu bildirmektedir [Blum et al., 2015].

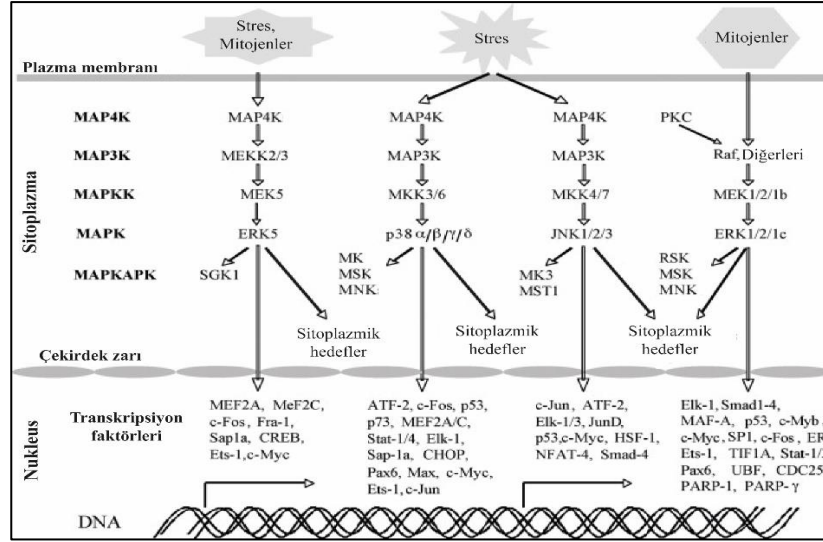
MM için henüz etkili bir tedavi bulunmamaktadır. Mevcut klinik yaklaşımlar kombine tedavilerden oluşmaktadır. Gelişmiş MM'nin sistemik tedavisi için mevcut standart, sisplatin ve pemetreksed kombinasyonudur [Martinotti et al., 2011].

2.3. Sinyal Yolakları

2.3.1. MAP Kinaz Ailesi

Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) evrimsel olarak korunmuş, büyüme, çoğalma, farklılaşma, migrasyon ve apoptoz gibi çok sayıda temel hücresel süreci kontrol eden hücre içi sinyal iletim yolaklarıdır [Plotnikov et al., 2011], [Asl et al., 2021]. Bu yolağın aktivasyonunda, ligandın bir transmembran protein olan bir reseptör tirozin kinaza bağlanmasıyla sinyallerin bir dizi protein kinazın ardışık aktivasyonu yoluyla iletilmesi gerçekleşir [Safa et al., 2020].

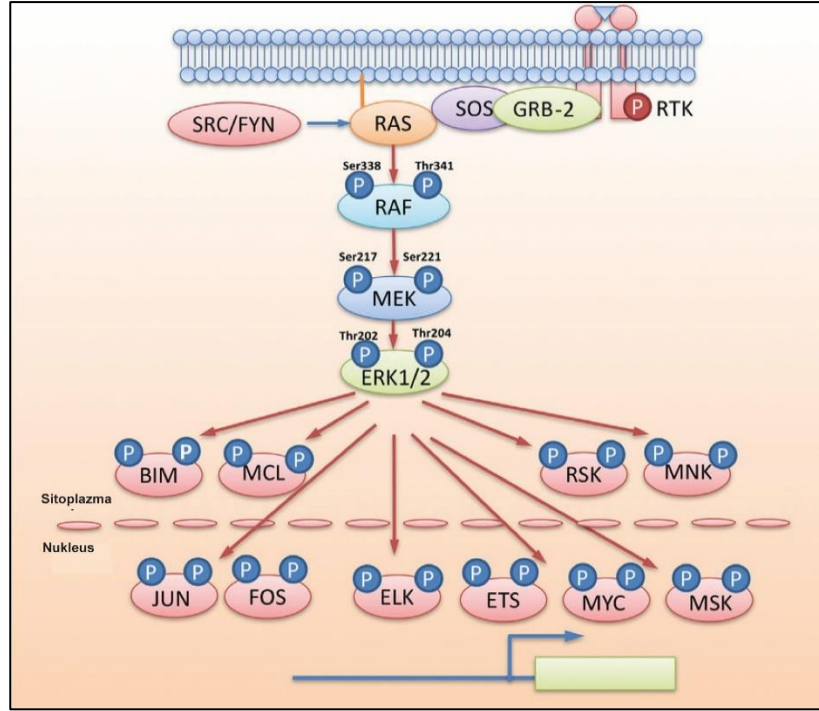
MAPK kaskadı temelde üç kinaz modülünden oluşmaktadır: (i) MAP kinaz kinaz (MAPKKK veya MEKK), (ii) MAP kinaz kinaz (MAPKK veya MEK) ve (iii) MAP kinaz (MAPK). MAPKK kinazlar (en yukarı akış katmanı) aşağı akış MAPKK'yi kinaz bölgesinde serin (Ser) fosforilasyonunu düzenleyerek aktive eder. Aktive olan MAPKK, katalitik alan içindeki Thr ve Tyr residuelerinin fosforilasyonunu katalize ederek MAPK'yi aktive eder. Basamakların her biri içinde, sinyal sıralı fosforilasyon ve sıralı kinazların aktivasyonlarıyla yayılır ve sonunda hedef düzenleyici proteinlerin fosforilasyonuna yol açar [Katz et al., 2007], [Plotnikov et al., 2011], [Liu et al., 2018]. Memeli hücrelerinde dört farklı, klasik MAPK kaskadı mevcuttur (Şekil 2.1): Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK) $\frac{1}{2}$, c-Jun NH2-terminal kinazlar (JNK) $\frac{1}{2}/3$, p38 MAPK $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ve ERK5 [Nithianandarajah-Jones et al., 2012].



Şekil 2. 1: MAPK kaskadının şematik gösterimi.

3.2.1.1. MEK1/2-ERK1/2 Yolağı

Raf-MEK1/2-ERK1/2 yolu, en iyi karakterize edilmiş MAPK sinyal yoludur. Bu çok aşamalı sürecin aktivasyonu, büyüme ve farklılaşma faktörleri, sitokinler, hormonlar gibi uyarılar tarafından tetiklenir [Zhang and Liu 2002], [Kidger et. al., 2018]. Yolu aktivasyon sinyali üzerine, Son-of-Sevenless (SOS) gibi guanin nükleotid değişim faktörleri GDP'nin sıçan sarkomu (RAS) proteinlerinden ayrılmasını teşvik eder ve RAS'ı aktif konformasyonuna geçiren GTP ile değiştirilmesini sağlar. RAS-GTP daha sonra plazma zarında aktif homo veya heterodimerler oluşturan hızlı hızlandırılmış fibrosarkom (RAF) proto-onkogen serin/treonin-protein kinaza bağlanır, bu daha sonra MEK1/2'yi fosforile eder [Montagut and Settleman., 2009], [Kidger et al., 2018]. Çoğu protein kinaz gibi, ERK1/2 hücrelerde inaktif zimojenler olarak sentezlenir. Aktivasyon, kinaz aktivasyon döngüsünde bulunan Thr-X-Tyr motifindeki kritik treonin ve tirozin kalıntılarının fosforilasyonunu gerektirir [Kidger et al. 2018]. Aktif MEK1/2, Tyr204/187 ve Thr202/185'te ERK1/2'nin (p44/p42) fosforilasyonunu katalize eder [Zou et al., 2019]. Daha sonra aktive ERK'ler çekirdeğe yer değiştirir ve burada Elk1, c-Myc, c-Jun, c-Fos dahil olmak üzere transkripsiyon faktörlerini kodlayan substrat genlerinin yukarı akış düzenleyicisi olarak işlev görür (Şekil 2.2). Transkripsiyon faktörlerini transaktif ederek büyümeyi, farklılaşmayı veya mitozu teşvik etmek için gen ekspresyonunu değiştirir [Zhang and Liu., 2002], [Zou et al., 2019].



Şekil 2. 2: MEK/ERK1/2 kaskadının şematik gösterimi.

2.3.1.2. MEK5/ERK5 Yolağı

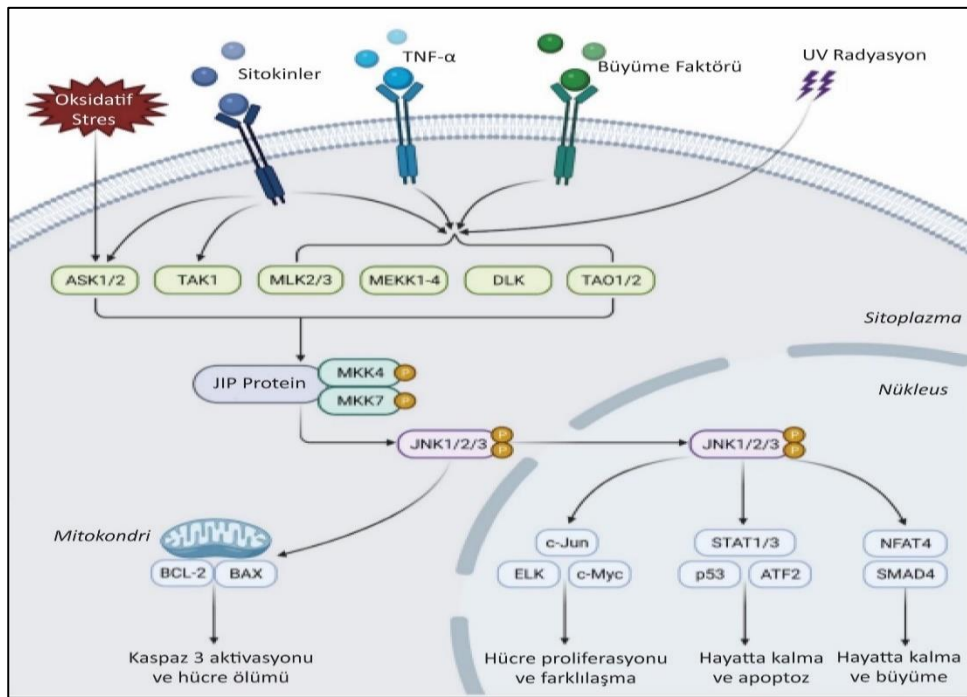
ERK5, moleküler ağırlığı ~110 kDa olan, klasik MAPK'lerin iki katı büyüklüğünde bir 816 amino asitli (a.a.) proteinden oluşur. Geniş ve benzersiz C-terminali nedeniyle büyük MAP kinaz 1 (BMK1) olarak da adlandırılır [Paudel et al., 2021]. Protein kinaz aktivitesinden sorumlu olan ERK1/2'ye %50 sekans özdeşliğine sahip katalitik bir N-terminal bölgesi ve bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), bir transkripsiyonel aktivasyon alanı (TAD) içeren büyük, alışılmadık derecede uzun bir C-terminal iki farklı fonksiyonel alandan oluşmaktadır [Cook et al., 2020], [Pereira and Rodrigues., 2020]. Mitojenler, toll benzeri reseptör ligandları veya hücrel stresler tarafından hücrel uyarım üzerine aktive edilmiş MEK5, ERK5 aktivasyon döngüsündeki TEY motifini fosforile ederek, MEK1/2 tarafından ERK1/2 aktivasyona çok benzer şekilde kinaz alanının aktivasyonuna yol açar [Cook et al., 2020]. ERK5'in N ve C terminal yarımlarının sitozolde birbirine bağlandığı ve MEK5 tarafından fosforile edildikten sonra bu bağlanmanın bozulduğu varsayılmaktadır [Drew., 2012]. Dolayısıyla, MEK5 ile aktivasyon, ERK5'in açık konformasyonunun, NLS'nin açığa çıkmasını indükler. ERK5 daha sonra, ERK5'in sitozolden çekirdeğe translokasyonunu destekleyen C-terminalini oto-fosforile eder ve çekirdeğe translokasyonu indükler. ERK5 için bilinen substratlar, c-FOS, c-MYC, Sap-1a ve

MEF2A, MEF2C, MEF2D, RSK ve serum/glukokortikoidle düzenlenen kinaz (SGK) gibi diğer kinazlar dahil olmak üzere transkripsiyon faktörleridir [Drew., 2012], [Stecca and Rovida., 2019].

2.3.1.3. SAPK/JNK Yolağı

Stresle aktive olan protein kinaz (SAPK) olarak da bilinen c-Jun amino-terminal kinaz (JNK), öncelikle UV ışınlanması, DNA hasarı, ısı şoku ve oksidanlar gibi çok sayıda stres koşuluyla uyarılır [Katz et al., 2007]. JNK proteinleri üç gen tarafından kodlanır: MAPK8 (JNK1'i kodlar), MAPK9 (JNK2'yi kodlar) ve MAPK10 (JNK3'ü kodlar). JNK1 ve JNK2 hemen hemen her hücrede ifade edilirken, JNK3 esas olarak beyinde bulunmaktadır [Wagner and Nebreda., 2009].

JNK proteinini, JNK'nin yukarı akışında yer alan MKK4 ve MKK7 iki MAPKK tarafından aktive edilir. Hem MKK4 hem de MKK7, JNK'yi Thr183 ve Tyr185 bölgelerinde eşzamanlı olarak fosforile edilir, ancak, MKK4'ün tirozini fosforile etmeyi tercih ederken, MKK7'nin treonini fosforile etmeyi tercih eder. MKK4 ve MKK7, uyarı aktivasyonu üzerine sırayla TNF- α ve FFA dahil olmak üzere birçok farklı yukarı akış faktörü tarafından düzenlenen bir dizi yukarı akış MAP3K tarafından etkinleştirilir [Feng et al., 2020].



Şekil 2. 3: JNK yolağının yukarı akış aktivatörleri ve aşağı akış hedefleri.

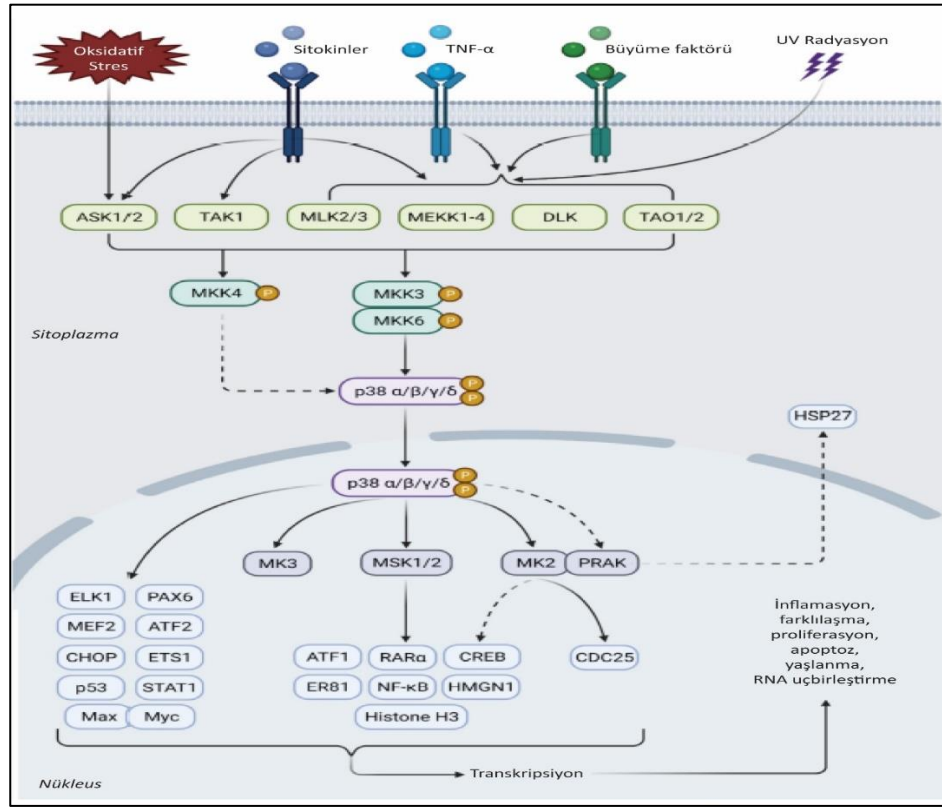
Aktive edilmiş JNK'ler daha sonra Jun proteinlerini fosforile eder (JunB, JunD, and c-Jun) ve bu da bunun Fos proteinleri (c-Fos, FosB, Fra-1/2) ile dimerizasyonuna yol açarak transkripsiyon faktörü aktivatör protein-1'i (AP-1) oluşturur ve ardından hedef genlerin transkripsiyonel programını aktive eder. Aktive JNK'ler c-Myc, p53, ETS Like-1 proteini (ELK1), aktive edici transkripsiyon faktörü 2 (ATF2), aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1/3'ün (STAT1/3), BCL2 ailesi proteinleri (örn., BCL2, BCL-xL, BAD, BIM ve BAX) transkripsiyonunu da düzenler (Şekil 2.3). Bu sinyaller sonunda hücre proliferasyonu ve apoptoz, immünolojik etkiler, insülin sinyali ve nöronal aktivite dahil olmak üzere çoklu hücresel süreçlerin düzenlenmesine yol açar [Pua et al., 2022].

2.3.1.4. p38MAPK Yolağı

p38MAPK'ler, ozmotik, oksidatif, UV ışığı ve ısı şoku stresi nedeniyle ortaya çıkabilecek sitokinler ve hücresel stres tarafından güçlü bir şekilde aktive edilir. Mayadan memelilere kadar korunmuş dört aile üyesi mevcuttur: p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 δ (MAPK13) ve p38 γ (MAPK12) [Brennan., 2021]. p38'in farklı izoformları, farklı dokularda farklı şekilde eksprese edilir. Örneğin, p38 α ve p38 β çoğu dokuda her yerde ve özellikle kalp ve beyinde yüksek oranda eksprese edilir; p38 γ öncelikle iskelet kasında eksprese edilirken, p38 δ ekspresyonu esas olarak akciğerlerde, pankreasta, ince bağırsakta, böbreklerde ve testistedir [Pua et al., 2022].

p38 yolağı MEKK3/4, TGF β ile aktive olan kinaz 1 (TAK1) ve apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1) gibi karakteristik MAPKKK'ler tarafından aktive edilir. Birkaç MAP3K, p38 sinyalini düzenler ve bazıları belirli streslere yanıt verir. Örneğin, ASK1, oksidatif strese yanıt olarak p38'i aktive eder [Brennan., 2021], [García-Hernández et al., 2021]. Üç MAP2K (MKK3, MKK4 ve MKK6) p38 aktivitesini düzenler. MKK4, spesifik olarak p38 α ve p38 β 'yi düzenler; MKK6, p38 γ ve p38 δ için spesifiktir ve MKK3, p38 α , p38 β ve p38 δ 'yi fosforile eder [Brennan., 2021]. JNK aktivasyonunda olduğu gibi, p38 MAPK aktivasyonu, Thr-Gly-Tyr (TGY) motifinde MAP3K'ler tarafından ikili fosforilasyon gerektirir [Pua et al., 2022]. Sitozolden çekirdeğe yer değiştiren aktif p38 PAX6, ETS1, PRAK, MK3, RAR, AP-1, ATF1 ve CHOP gibi akış aşağı transkripsiyonel hedefleri aktive ederek hücresel fonksiyonları düzenlerler [Pua et al., 2022]. p38'in indüksiyonunun, apoptozu indüklediği, hücre

yüzeyinden mitojenik reseptörleri uzaklaştırdığı ve böylece hücrenin hayatta kalmasını engellediği bildirilmiştir [Katz et al., 2007].

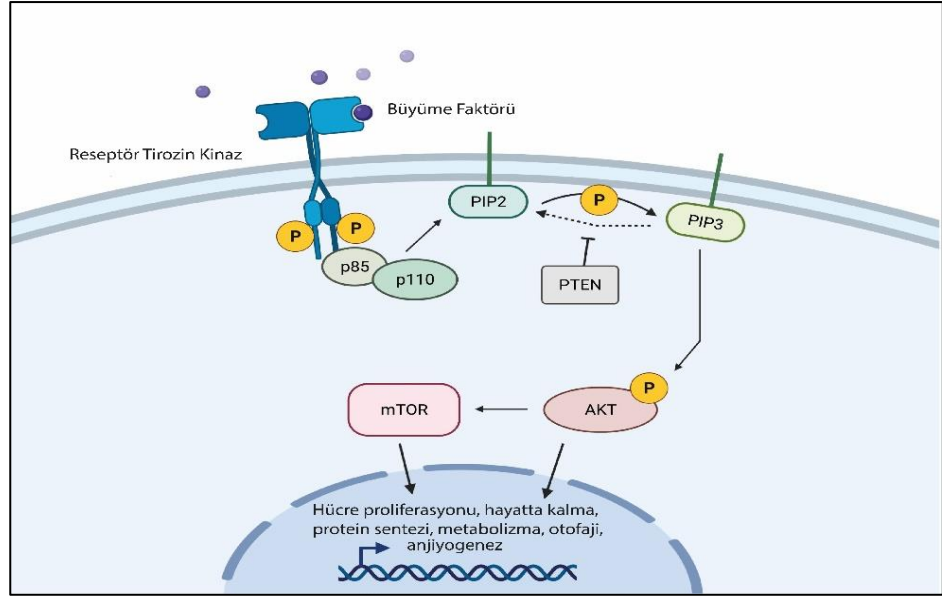


Şekil 2. 4: p38MAPK yolağı, yukarı akış ve aşağı akış aktivasyonu.

2.3.2. PI3K/AKT Yolağı

Fosfatidilinositol 3-kinaz/Protein Kinaz B (PI3K/AKT) sinyal yolağı, çoğalma, farklılaşma, metabolizma, apoptoz ve otofajiyi içeren birçok fizyolojik hücre sürecinin anahtar düzenleyicisidir [Yang et al., 2019].

Memeli hücrelerindeki PI3K, yapı, dağılım ve aktivasyon mekanizmasına göre üç sınıfa ayrılabilen bir aile oluşturur. Sınıf I PI3K'ler, farklı ilişkili adaptörlere dayalı olarak sınıf IA ve sınıf IB'ye ayrılır. Sınıf IA PI3K'ler, reseptör tirozin kinazlar tarafından aktive edilirken, sınıf IB PI3K'ler, G-protein-bağlı reseptörler tarafından aktive edilir. Bu PI3K'ler, p85 gibi düzenleyici bir alt birimden ve p110 gibi bir katalitik alt birimden oluşan heterodimerlerdir [Matsuda et al., 2013]. AKT, PI3K'lerin aşağı yönlü ana hedefidir. İnsan AKT'sinin üç izoformu vardır: AKT1, AKT2 ve AKT3. Bir amino terminali (N-terminali), bir merkezi ve bir karboksil terminali parçası (C-terminali) olmak üzere üç alan içerir [Nitulescu et al., 2018].



Şekil 2. 5: PI3K/AKT sinyal iletimi.

Hücre dışı uyanlar tarafından yolun aktivasyonu üzerine, p85 ve p110 heterodimerinde p85'in düzenleyici etkisi giderildikten sonra, aktive sınıf 1A PI3 kinaz plazma zarına bağlanır [Van Huizen and McInerney., 2020]. Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfatın (PIP2) fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfata (PIP3) dönüştürülmesinde katalitik bir rol oynar [Sanaei et al., 2022]. PI3K'nın bir ürünü olan PIP3, AKT'ye bağlanır ve AKT'nin membran alımına yol açar (Şekil 2.5). Pleckstrin homoloji (PH) alanları aracılığıyla fosfoinositide bağımlı kinaza 1'e (PDK1) bağlanır, ardından PDK1, kinazda AKT'yi fosforile eder (AKT1'de Thr 308). AKT'nin tam aktivasyonu için, AKT'nin karboksil terminali düzenleyici alanı (AKT1'de Ser 473) içinde PDK2 tarafından fosforilasyonu gereklidir. Aktive edildikten sonra, AKT aşağı akış substratları dizisini fosforile eder veya çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlemek için birçok aşağı akış hedefi inhibe eder [Hoxhaj and Manning.,2020], [Matsuda et al., 2013].

2.3.3. STAT Yolağı

JAK/STAT sinyal yolu, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve immün/inflamatuar yanıtın modülasyonu dahil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonlarda önemli roller oynamaktadır [Hin et al., 2020].

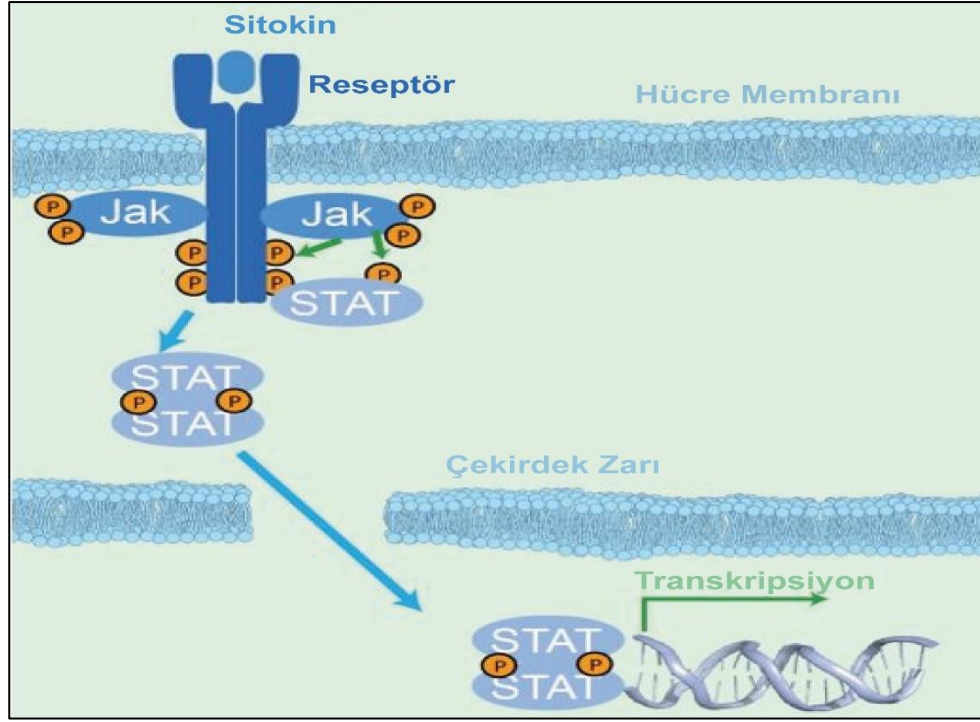
JAK ailesi, her biri yedi korunmuş JAK homoloji alanı (yani, JH1–7) içeren dört üyeden (yani, JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2) oluşur. JAK proteinlerinin boyutları 120

ila 140 kDa arasında değişir [Pencik et al., 2016]. JAK'ların N-terminali (JH5-7), JAK'lar ve sitokin reseptörleri ile diğer kinazlar arasındaki ilişkide işlev gören bir "4.1 protein, ezrin, radixin, moesin" (FERM) alanını içerir. Src-homology-2 (SH2) alanları ile yapısal benzerliklere sahip olan JH3 ve JH4 alanları, C-terminali ve N-terminali alanlarını birbirine bağlar ve aynı zamanda aynı kökenli sitokin reseptörlerinin bağlanması yardımcı olur. JAK'ların C-terminali, bir JH1 kinaz alanı ve bir JH2 psödo-kinaz alanı içerir. JH1 alanı, JAK'ların kinaz aktivitesi için esastır ve JAK'ların aktivasyonu için gerekli korunmuş tirozin kalıntılarını içerir [Pencik et al., 2016], [Luo et al., 2019].

STAT protein ailesi yedi üyeden oluşur: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6. Bu proteinler, reseptörler üzerindeki fosforile edilmiş tirozin kalıntılarını ve aktive STAT proteinlerini tanıyan SH2 alanı ve aktiveştirilmiş STAT' lerin dimerizasyonunun yanı sıra diğer proteinlerle etkileşimi sağlayan bir sarmal-sarmal alanı da dahil olmak üzere biręok fonksiyonel alanı paylaşır. DNA bağlama alanı, DNA'ya bağlanmaya ek olarak, STAT dimerlerinin nükleer translokasyonunda da rol oynar. STAT'ler ayrıca, transkripsiyonun aktivasyonu için gerekli olan bir C-terminal transaktivasyon alanı içerir [Hin Tang et al., 2020].

JAK/STAT yolu, ilgili transmembran reseptörlerine bağlanan interlökinler, interferonlar ve EGF ailesi üyeleri gibi çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilir [Hin Tang et al., 2020]. Ligandın bağlanması, reseptör kompleksinde JAK'ların nispi pozisyonunu değiştiren, fosforilasyona ve tirozin kinaz aktivitelerinin aktivasyonuna yol açan konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Aktive edilmiş JAK'lar, reseptörlerin sitoplazmik kuyruklarındaki tirozin kalıntılarını fosforile eder (şekil 2.6) [Thomas et al., 2015].

Sitoplazmik STAT'lar, fosforile edilmiş reseptörlere bağlanarak JAK'lar için substratlar haline gelir. Fosforillenmiş STAT'ler, dimerler oluşturur ve çekirdekte birikir ve spesifik genlerin transkripsiyonunu aktive eder [Thomas et al., 2015]. STAT-3'ün akış aşağısında Mcl-1, siklin D1, MYC proto-onkogen bHLH transkripsiyon faktörü (c-Myc) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü dahil olmak üzere ęok sayıda gen tanımlanmıştır [Gu et al., 2020].

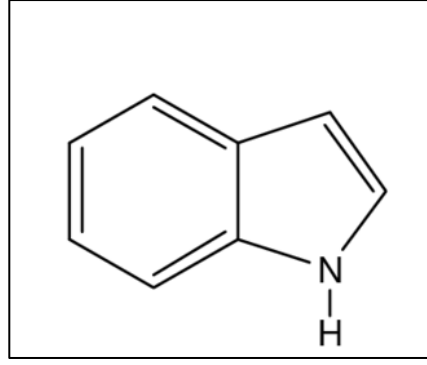


Şekil 2. 6: JAK-STAT sinyal yolağı mekanizması.

JAK yolu sinyali, aktivatörler ve inhibitörler arasındaki hassas bir denge ile normal hücrelerde sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu dengenin bozulması ve JAK yolunun anormal aktivasyonu, kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalması gibi kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinin birçoğunu teşvik ederek çok sayıda kanser türünün gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunur.

2.4. İndol Yapısı ve Sentezlenen Türevler

İndol, bir boya olan indigo'nun incelenmesiyle ortaya çıkan temel bir heterosiklik yapı iskelesidir. Bu yapı iskelesi, benzen ve pirol halkalarından oluşur (Şekil 2.7). Birçok doğal kaynakta bulunan, triptofan esansiyel amino asitin ve sinir uyarılarının iletimi ile ilişkili önemli bir nörotransmitter olan serotoninin yapısında bulunur [Dhuguru and Skouta., 2020]. Ayrıca doğal sekonder metabolit (alkaloitler), bitkiler (vinkristin), deniz canlıları (manzaminler), böcekler, mantar metabolitleri (sitokalsinler), memelilerin yanı sıra insan dokuları ve vücut sıvıları dahil olmak üzere indol çekirdeğini içerir [Negi et al., 2014].



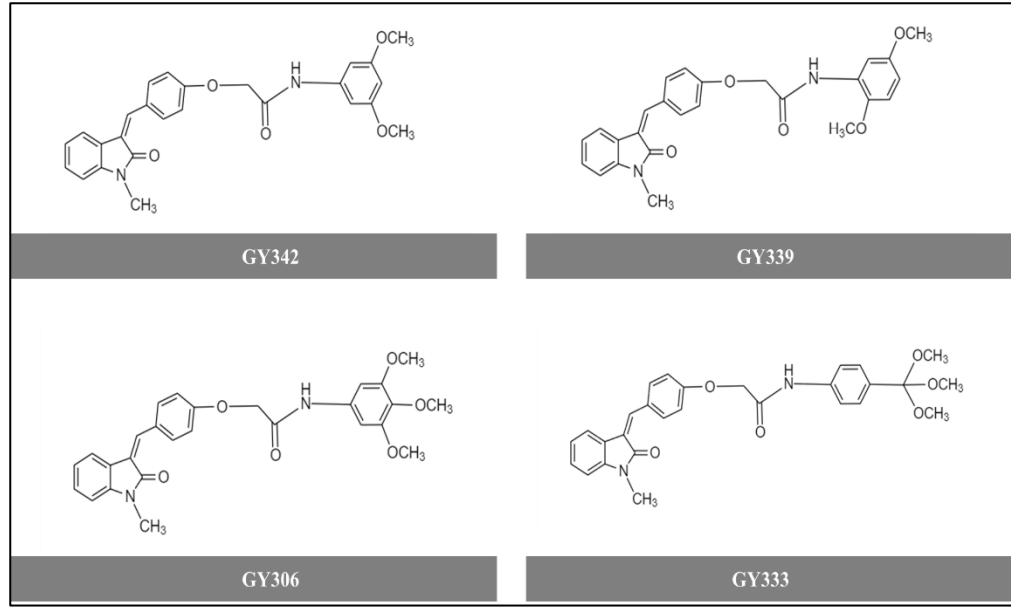
Şekil 2. 7: İndol'ün moleküler yapısı.

İndol ve türevleri anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-malaryal, anti-viral ve anti-kanser aktiviteleri dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahip bileşiklerdir [Sachdeva et al., 2020]. Kanser hücrelerinde çeşitli hedefler üzerinde hareket etme ve ilaca dirençli kanserlere karşı ümit verici aktivite sergileme potansiyeline sahiptir. Ayrıca, Semaxanib, Sunitinib, Vinorelbine ve Vinblastine gibi bazı indol içeren bileşikler, ilaca dirençli kanser tedavisi dahil çeşitli kanser türleri için klinikte uygulanmaktadır [Jia et al., 2020].

Süstitüe edilmiş indolin-2-on'lar, çeşitli süstitüentleri değiştirerek farklı reseptör tirozin kinazlara karşı seçicilik sergileyen protein kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi için çok yönlü bir yapı iskelesi olarak tanımlanmıştır. Pirol-indolin-2-on'lar, kinaz inhibitörleri olarak tanımlanan ilk yapılar arasındadır ve VEGFR, c-Kit, FLT3, PDGFR-R / ve CSF1R'nin inhibisyonu ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Kliniğe ulaşan indolin-2-on tipi çok hedefli kinaz inhibitörü Sunitinib'dir [R Prakash and Raja., 2012]. Sunitinib' in papiller tiroid kanseri hücrelerinde G0 / G1 fazında hücre döngüsü durdurduğu ve ERK 1/2 ve JNK fosforilasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir [Fenton et al., 2010]. 3-süstitüe-5- (fenilamino) indolon türevlerinin A549 hücre hattında ERK ve AKT'nin fosforilasyon seviyelerini güçlü bir şekilde bloke ettiği gösterilmiştir [Yu et al., 2019]. Pirol süstitüe indolinon türevi maddenin çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği ve G2/M fazında hücre döngüsü tutuklamasını indüklediği, hem CDK1 (Cdc2) hem de siklin B1 protein seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [Xiong et al., 2010]. İndol bazlı imidazo[2,1- b][1,3,4]tiadiazol türevlerinin pankreas kanseri hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği ve yara iyileştirme deneyinde göç hızını önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir [Cascioferro et al., 2020]. İndolilakrilamid türevi maddelerin hepatoselüler karsinomada fosforile

ERK1/2 ve c-Jun protein seviyelerinin önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [Hawash et al., 2021].

Literatürdeki bu bulgular doğrultusunda ERK yolağında etkin olacağı öngörülen orijinal olarak sentezlenen, “İndolin-2-on” yapısı taşıyan dört maddenin kantitatif ve kalitatif analizleri yapılarak anti-kanser etkileri incelenmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8: Yeni sentezlenen indolin-2-on türevi maddelerin moleküler yapısı. R=3,5-dimetoksifenil (GY342); R=2,5-dimetoksifenil (GY339); R=3,4,5-trimetoksifenil (GY306); R=ter-butil (GY333).

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada aşağıda belirtilen kimyasallar kullanılmıştır.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) :F12 (Sigma-Aldrich D8900), Medium199 (Sigma M5017), Fetal sığır serumu (Gibco Invitrogen 10270106), Penisilin/Streptomisin (Gibco Invitrogen 11548876), Tripsin (Thermo Fisher 25200056), Sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich S8875), L-Glutamin (Sigma-Aldrich G7513), HEPES (Sigma-Aldrich H0891), EGF (Sigma-Aldrich E9644), İnsülin (Sigma-Aldrich I0516), Dimetil sülfoksit (Merck 116743.1000), Amonyum persülfat (Applichem A2941), Sodyum dodesilsülfat (MP Biomedicals 194831), Trizma base (Sigma-Aldrich T1503), Glisin (MP Biomedicals 808822), Hidrojen klorür (Sigma-Aldrich 07102), Sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich 06203), Gliserol (Applichem A3092), β -Merkaptoetanol (AppliChem A1108), Metanol (Sigma-Aldrich 32213), Triton X-100 (Sigma-Aldrich T8787), Sodyum klorür (Sigma-Aldrich S3014), Potasyum klorür (Sigma-Aldrich P5405), Sodyum fosfat dibazik (Sigma-Aldrich S3264), Potasyum fosfat monobazik (Sigma-Aldrich P9791), Tween 20 (Applichem A4974), Bromofenol Mavisi (Sigma-Aldrich B0126), Magnezyum klorür (Sigma-Aldrich M4880), TEMED (Sigma-Aldrich T7024), Proteaz-Fosfataz inhibitör (Thermo Scientific 1862495) Akrilamid/Bisakrilamid (Fisher BioReagents BP1410-1), ECL (Advansta K-12045-D20), Yağsız süt tozu (Applichem A0830), Protein marker (Thermo Scientific 26616), MTT tozu (Sigma-Aldrich M2128), Sisplatin (Thermo Scientific Acros Organics 193760010).

3.1.2. Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlar Tablo 3.1.' de belirtilmektedir.

Tablo 3.1: Cihaz listesi.

Ekipman Adı	Marka, Model
Su banyosu	Memmert, VWR VWB2
CO ₂ İnkübatör	Nüve EC160
Santrifüj	Beckman Coulter allegra X-22, Eppendorf centrifuge 5810R, VWR Micro Star 17R
Laminer Akım Kabini	HERAsafe
Vorteks	VWR, DaiHan Scientific VM-10
Isı Bloğu	VWR
Plaka Okuyucu	Thermo Scientific Varioskan Flash
Rotater	BioCote
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
pH metre	Jenco 6173
Orbital Shaker	Biosan ES-20
Dikey Elektroforez ve Transfer Sistemi	BioRad Mini Protean
Ters Mikroskop	Leica DMi1, Leica DM IL LED
Hassas Terazî	Precisa XB320M

3.1.3. Hücre Kültürü Sıvı Besi Ortamları

MeT-5A hücre hattı için kullanılan M199 (9,5 g/L) besiyeri, son konsantrasyonu 400 nM hidrokortizon, 20 mM HEPES, 3,3 nM EGF, 870 nM insülin, 1,24 g/L yoğunlukta sodyum bikarbonat ve %4 L-Glutamin içeren 500 mL otoklavlanmış dH₂O ile çözülmüştür. %10 FBS ve %1 Pen/Strep eklenerek son hacim 1 L olacak şekilde dH₂O ile tamamlanmıştır. Hazırlanan tüm besiyerleri 0.22-µm gözenek boyutlu bir filtreden geçirilip sterilize edilmiş ve +4°C' de saklanmıştır.

SPC111 ve SPC212 hücre hattı için kullanılan DMEM: F12 (15,6 g/L) besiyeri, 1,2 g/L sodyum bikarbonat içeren 500 mL otoklavlanmış dH₂O' da çözülmüştür. %15 FBS ve %1 Pen/Strep eklenerek son hacim 1L olacak şekilde dH₂O ile tamamlanmıştır.

3.1.4. Tampon ve Solüsyonlar

Deneylerde kullanılan tampon ve solüsyonların, içerik ve konsantrasyonları Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Tamponlar ve solüsyonlar listesi.

Tampon ve Solüsyonlar		İçerik ve Final Konsantrasyonları
Elektroforez Tamponu	5X	Final konsantrasyonları 125 mM Tris Base, 0,95 M Glisin %0,1 SDS olacak şekilde istenilen hacime uygun tartım yapıp dH ₂ O ile çözülmüştür.
Transfer Tamponu	10X	Final konsantrasyonları 250 mM Tris, 1,9 M Glisin olacak şekilde istenilen hacime uygun tartım yapıp dH ₂ O ile çözülmüştür.
10X Tris Tamponlu Tuzlu Su (TBS)		Final konsantrasyonu 200 mM Tris-HCl (pH: 7,4), 1,5 M NaCl olacak şekilde istenilen hacime uygun tartım yapıp üzeri dH ₂ O ile tamamlanmıştır.
Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS)	10X	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4g KH ₂ PO ₄ tartılıp 100 mL steril suda çözülmüş 0,22-µm filtreden geçirilmiştir. Sonrasında otoklavlanmış steril su ile 1L’ye tamamlanmıştır.
4X Protein Yükleme Boyası		Final konsantrasyonu 0,2 M Tris-HCl (pH: 6,8), %8 SDS, %0,4 Bromofenol Mavisi, %40 Gliserol, %20 β-Merkaptoetanol olacak şekilde istenilen hacime uygun solüsyonlardan alınıp üzeri dH ₂ O ile tamamlanmıştır.
Lizis Tamponu		Final konsantrasyonu 1M NaCl, 1M MgCl ₂ , %10 Gliserol, 1M Tris-HCl (pH:7,5-8), %1 Triton X-100 olacak şekilde istenilen hacime uygun solüsyonlardan alınıp üzeri dH ₂ O ile tamamlanmıştır.
Stripleme Tamponu		Final konsantrasyonu 62,5 mM Tris-HCl (pH: 6,7), %2 SDS, 100mM β-Mercaptoetanol olacak şekilde istenilen hacime uygun solüsyonlardan alınıp üzeri dH ₂ O ile tamamlanmıştır.
%5’lik Bloklama Solüsyonu		Yoğunluğu %5 olacak şekilde istenilen hacim için yağsız süt tozu tartılıp 1X TBS-T ile çözülmüştür.
TRİS-HCl Solüsyonu		Konsantrasyonu 0,5 ve 1,5M olacak şekilde TRİS tartılıp, hazırlanması istenilen hacmi geçmeyecek şekilde belirli miktar dH ₂ O’da çözülmüştür. HCl solüsyonu ile pH (6,8 ve 8,8) ayarlanıp istenilen hacim dH ₂ O ile tamamlanmıştır.
%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)		Yoğunluğu %10 olacak şekilde istenilen hacim için SDS tartılıp dH ₂ O ile çözülmüştür.
%10 Amonyum Persülfat (APS)		Yoğunluğu %10 olacak şekilde istenilen hacim için APS tartılıp dH ₂ O ile çözülmüştür.

3.1.5. Antikorlar

Protein fosforilasyon ve ekspresyon düzeylerinin analizinde kullanılan tüm antikorlar, ürünlerin veri sayfasında belirtilen dilüsyonlarda %5'lik bloklama solüsyonunda hazırlanmıştır. Primer antikor olarak, t-ERK1/2 (CST 9102), p-ERK1/2 (Thr 202/ Tyr 204 CST 9101), t-ERK5 (CST3372), p-ERK5 (Thr218/Tyr220 CST3371), t-JNK (SC 7345), p-JNK (SC 4668), t-p38 (CST 9212), p-p38 (CST 4511), t-Akt (CST 4891), p-Akt (Ser 473 CST 4060), t-STAT3 (CST 9132), p-STAT3 (Tyr 705, CST 9131) yükleme kontrolü olarak Cyclophilin B (PA1- 027A) kullanılmıştır. Tüm primer antikorlara uygun Anti-Rabbit (CST 7075) sekonder antikoru uygulanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Hücre Hatları ve Kültürü

MeT-5A hücre hattı, kanserli olmayan bireylerin plevral sıvılarından izole edilmiştir. Hücreler, pRSV-T plazmidi ile transfekte edilmiş ve klonlanmıştır. SV40 ile ölümsüzleştirilmiş, epitel morfolojiye sahip bir insan mezotel hücre dizisidir. SPC212 hücre hattı, tedavi öncesinde asbeste maruz kalma öyküsü mevcut 47 yaşındaki bir kadın hastanın plevral boşluğunun bifazik tümöründen elde edilmiştir. SPC111 hücre hattı, asbeste maruz kalma öyküsü bilinen 55 yaşındaki bir erkek hastanın tedaviden önce akciğerler ve göğüs duvarı arasındaki boşlukta biriken ekstra sıvısından (plevral efüzyon) elde edilmiştir. Tüm hücreler 3.1.3' de belirtilen besiyerlerinde 37 °C'de %5'lik CO₂'den oluşan nemli bir atmosferde büyütülmüştür.

Mezotelyoma hücre hattı ATCC'den (MeT-5A, CRL-9444), MM hücre hatları ECACC' den (SPC111, 11120716; SPC212, 11120717) ticari olarak satın alınmıştır.

3.2.2. Hücre Ekimi ve Besiyeri Değişimi

Sıvı nitrojenden alınan hücreler kullanılmak üzere taze besiyeri ile çözdürülmüştür. Çözdürülen hücre çözeltisi 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp pellet formundaki hücreler serum içeren taze besiyerinde çözdürülmüştür. Süspansiyon haldeki hücreler, yine taze besiyeri içeren

petrilere aktarılmış ve 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Her 2-3 günde bir besiyeri yenilenmiştir.

3.2.3. Hücre Pasajlama (Altkültür) ve Saklama

Petride %90-95 yoğunluğa ulaşan tek tabaka halindeki hücrelere altkültürleme yapılmıştır. Mevcut bulunan eski besiyeri uzaklaştırılıp petri yüzeyi nazikçe 1X PBS ile yıkanmıştır. Hücreleri ayrıştırmak için hücrelerin yüzeyini örtecek kadar 1X tripsin eklenerek 2-3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, tripsinin aktivitesini inhibe etmek için serum içeren besiyeri ile hücreler falkona toplanmıştır. Hücre çözeltisi 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp pellet taze besiyerinde çözülmüş ve hücreler belli oranlarda dilüe edilerek ekim işlemi yapılmıştır.

Pasajlama işlemindeki gibi toplanan hücre çözeltisi 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp hücreler dondurma solüsyonu (%5 oranda DMSO içeren besiyeri) ile süspanse edilmiştir. Süspansiyon halindeki hücreler hızla kriyojenik tüplere aktarılıp buz üzerinde -80°C'ye kaldırılmıştır. 24 saat sonra -196°C'ye (sıvı nitrojene) aktarılıp saklanmıştır.

3.2.4. Maddelerin Hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan özel olarak sentezlenmiş olan indolin-2-on yapısında dört madde Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya bölümünden temin edilmiştir. Türev maddeler stok konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde Dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülmüş ve nihai çözücü konsantrasyonu maksimum %0,2 olacak şekilde besiyeri ile dilüe edilerek hücrelere uygulanmıştır. Maddeler kullanılmadan önce her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.

Kontrol grubundaki hücrelere herhangi bir madde uygulaması yapılmazken, tedavi gruplarına farklı konsantrasyonlarda tekrarlı olacak şekilde madde uygulaması yapılmıştır.

3.2.5. Hücre Canlılığı Analizi

Tetrazolyum boyasının, esas olarak mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi temeline dayanan MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile hücre canlılığı değerlendirilmiştir [Patravale et al., 2012]. SPC111, SPC212 hücreleri 5×10^4 hücre/mL ve MeT-5A hücreleri 1×10^5 hücre/mL yoğunlukta 96 kuyulu plakalara ekilip 37°C ' de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, 0-100 μM konsantrasyonlar arasında maddeler eklenmiş ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. MTT tozu 5 mg/mL yoğunlukta olacak şekilde 1X PBS içinde çözündürülüp ana stok elde edilmiştir. Ana stok solüsyonu taze besiyeri ile 5 kat dilüe edilerek final solüsyonu hazırlanmıştır. İnkübasyon sonunda ortam uzaklaştırılmış ve final solüsyondan 100 μL eklenip 2 saat 37°C ' de inkübe edilmiştir. Formazan ürünü, oda sıcaklığında karanlıkta 10 dakika 100 μL DMSO içinde çözündükten sonra Thermo, Varioskan Flash mikrotitre plaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alınmıştır. Seçicilik indeksi normal hücre hattındaki IC_{50} değerleri kanserli hücre hattındaki IC_{50} değerlerine oranlanarak hesaplanmıştır. ~ 3 'e yakın değerler o bileşiğin kanser hücrelerine olan seçiciliği olarak kabul edilmiştir [Weerapreeyakul et al., 2012].

3.2.6. Yara İyileşmesi Deneyleri

SPC111, SPC212 hücreleri $2,5-3 \times 10^6$ hücre/mL yoğunlukta 96 kuyulu plakalara ekilip 37°C ' de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Yaklaşık %80-90 yoğunluğa ulaşmış hücre katmanı 10 μL pipet ucu kullanılarak kazınmıştır. Ayrılmış hücreleri çıkarmak için hücre katmanı 1X PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Hücreler madde varlığında veya yokluğunda %1 FBS içeren kültür ortamı ile muamele edilmiştir. Sisplatin (10 μM) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Madde uygulamasından sonra yara alanı 5x büyütmede 0, 48. saatlerde inverted (ters) mikroskop (Leica DM IL LED) ile görüntülenmiş ve görüntüler LAS V4.6 programı ile yakalanmıştır. Her numune için elde edilen görüntüler, İmageJ yazılımı tarafından "MRI_Wound_Healing_Tool.ijm" eklentisi ile nicel olarak analiz edilmiş ve yakalanan görüntülerdeki hücresiz alan hesaplanmıştır. Migrasyon oranı veya kapanma yüzdesi Formül 3.1' deki gibi hesaplanmıştır:

$$\text{Yara İyileşmesi \%} : \left[\frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \right] \times 100\% \quad (3.1)$$

$A_{t=0h}$ kazımadan hemen sonra ölçülen yara alanı ($t=0h$).

$A_{t=\Delta h}$ kazıma yapıldıktan h saat sonra ölçülen yaranın alanı.

3.2.7. Koloni Oluşum Deneyleri

SPC111 ve SPC212 hücreleri, $0,5-1 \times 10^3$ hücre/mL yoğunlukta olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilip 37°C ' de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında, hücreler belirli konsantrasyonlarda ($5,10 \mu\text{M}$) türevleri içeren besiyeri ile 24 saat muamele edilip inkübasyon sonunda besiyeri ilaçsız besiyeri ile değiştirilmiştir. Yaklaşık 3 günde bir besiyeri değiştirilerek kolonilerin oluşumuna izin verilmiştir ve koloni oluşumu mikroskop altında günlük olarak takip edilmiştir. Minimum 50 veya daha fazla hücre popülasyonu 1 koloni olarak kabul edilmiştir. Koloniler yeri kadar büyüklüğe ulaşınca kuyulardaki eski besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler %4'lük formaldehit (1X PBS içinde) fiksatif ile 20 dakika inkübe edilerek sabitlenmiştir. Daha sonra hücreler %0,1'lik kristal viyole (1X PBS içinde) ile 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyular dH_2O ile yaklaşık 70 rpm' de çalkalanarak yıkanmış boya kalıntıları uzaklaştırılmış ve oluşan koloniler kamera ile fotoğraflanmıştır. Son olarak, plate yüzeyine sabitlenmiş koloniler sayılmış ve Formül 3.2 ile kaplama verimliliği hesaplanmıştır:

$$\text{Kaplama verimliliği: } \frac{\text{Koloni Sayısı}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.8. Protein Analizleri

3.2.8.1. Protein izolasyonu

SPC111 ve SPC212 hücreleri, 1×10^6 yoğunlukta olacak şekilde 6 cm'lik petrilere ekilip 37°C ' de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra ortam uzaklaştırılmış, hücreler madde içermeyen ve belirli konsantrasyonlarda ($5, 10, 20 \mu\text{M}$) dört maddeyi içeren besiyeri ile 24 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler inkübatörden çıkarılıp laboratuvar ortamına getirilmiştir. Petrilerde mevcut

bulunan besiyeri 15 mL'lik falkonlara toplanmıştır. Petri yüzeyindeki hücreler soğuk 1X PBS içinde plastik hücre kazıyıcısı yardımıyla kazınmıştır. Kazınan hücreler falkonlardaki besiyeri yardımıyla toplanıp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet, lizis buffer:proteaz-fosfataz inhibitörü'den (100:1) oluşan lizis mix yardımıyla fazla köpürtülmeden alınıp ependorf setlerine aktarılmıştır. Aktarılan karışım 1000 µL pipet yardımıyla köpürtülerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Sonrasında örnekler 14000 g/ref'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant da kalan protein lizatları, detaylı etiketlenmiş ependorf setlerine aktararak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.8.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein lizatlarında bulunan total protein miktarını tayin etmek amacıyla Bikinkoninik asit analizi (BCA) yapılmıştır. -20°C'de muhafaza edilen protein numuneleri buz üzerinde laboratuvar ortamına çıkarılmıştır. Her numunenin total protein tüpünden ve blank olarak kullanılmak üzere lizis tampondan 10 µL alınıp tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu plakalara aktarılmıştır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda, örnek sayısına göre A ve B solüsyonları 50:1 oranda karıştırılıp çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonundan örnek başına 200 µL olacak şekilde kuyulara eklenmiştir. Daha sonra 96 kuyulu plaka folyo ile sarılıp 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Mikroplaka okuyucu kullanılarak 562 nm'de absorbans ölçümü alınmıştır. Bilinmeyen numunelerdeki protein konsantrasyonlarını belirlemek için BSA dilüsyonu yapılarak (2 mg/mL-0,12 mg/mL) standart bir eğri oluşturulmuş ve R² değerleri belirlenmiştir. Absorbans ölçümü alınan numunelerden blank değeri çıkarıldıktan sonra elde edilen değerler, BSA standardından elde edilen denklemde yerine yazılarak protein konsantrasyonları µg/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.8.3. SDS-PAGE ve Western Blot

Protein numunelerinin ekspresyon seviyelerini kıyaslamak için, proteinlerin önce yığılma, sonra moleküler ağırlıklarına göre ayrılma prensibine göre çalıştığı ikili jel sistemi SDS-PAGE ve Western Blot tekniği kullanılmıştır. SDS jel Tablo 3.3.' de belirtilen hacimler kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.3: %10 SDS-PAGE’de kullanılan solüsyonlar ve hacimleri.

%10 SDS Jel	Yığılma Jeli	Ayrılma Jeli
dH ₂ O	1,865 mL	3,625 mL
1,5M Tris-HCl pH:8,8	-	1,875 mL
0,5M Tris-HCl pH:6,8	750 µL	-
%10 SDS	30 µL	75 µL
TEMED	3 µL	5,5 µL
%10 APS	30 µL	75 µL
Akrilamid/Bisakrilamid	337,5 µL	1,875 mL

40-50 µg protein lizatu ve 4X yükleme boyası (3:1 oranda) karıştırılarak örnekler yüklenmek üzere hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler, ısı bloğunda 95°C’ de 5 dakika kaynatılarak denatüre edilmiştir. Daha sonra kuyulara yüklenip 1X elektroforez tamponu içerisinde 75V’ta 20-25 dakika, devamında 120V’ta 90 dakika yürütülmüştür. SDS-PAGE ile ayrılan proteinlerin, ıslak transfer yöntemiyle 1X transfer tamponu içerisinde 110V’da 90 dakikada, aktive edilen PVDF membrana transferi sağlanmıştır. Membranlar %5’lik bloklama solüsyonu (Tablo 3.2) içerisinde 1 saat oda sıcaklığında 100-120 rpm’de çalkalanmıştır. Sonrasında 5-10-5 dakika olmak üzere 3 kez 1X TBS-T ile çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkaması tamamlanan membranlar, uygun dilüsyonlarda ilgilenilen proteine ait primer antikoru bulunduran %5’lik bloklama solüsyonunun içerisinde 1 gece boyunca +4°C’ de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda membranlar 3 kez 1X TBS-T ile 5-10-5 dakika olmak üzere 120 rpm’de çalkalanarak yıkandıktan sonra uygun dilüsyonlarda HRP-konjuge sekonder antikoru bulunduran %5’lik bloklama solüsyonu ile 1,5-2 saat +4°C’de inkübe edilmiştir. Daha önceki yıkamalarda belirtildiği gibi membranlara son bir yıkama işlemi yapılmıştır. Antikor uygulamasından sonra, üreticinin önerdiği şekilde 1:1 oranda ECL (Enhanced Chemiluminescence) ajanları karıştırılıp membran üzerine bırakılmış ve karanlıkta 5-6 dakika inkübe edildikten sonra ChemiDoc XRS+ (BioRad) ile görüntülenmiştir. Her bandın yoğunluğu ve normalizasyon işlemleri BioRad Image Lab programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bantların yoğunluğu, yükleme kontrolüne göre normalize edilmiştir.

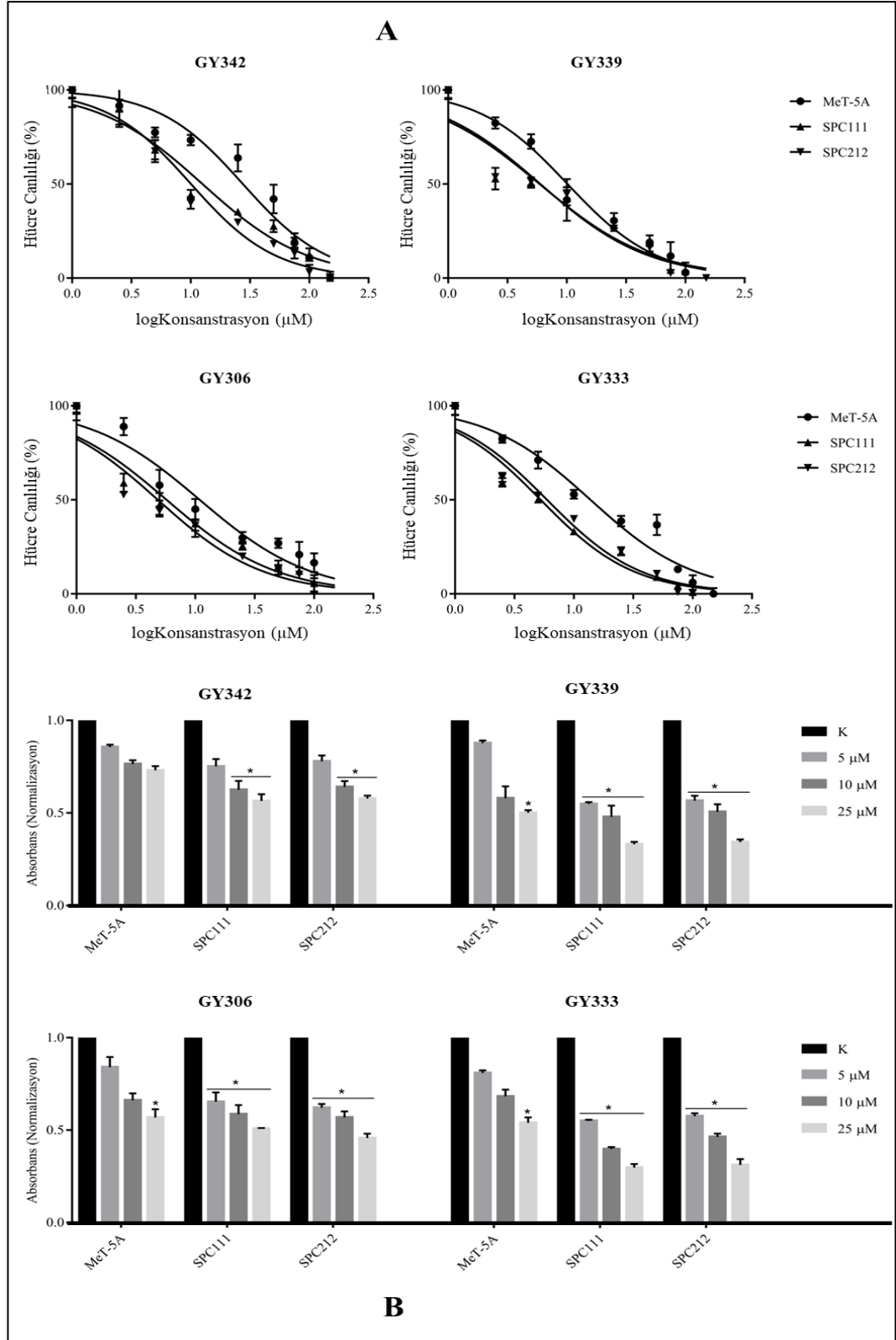
3.2.9. İstatistiksel Analizler

Deneyisel verilerin istatistiksel analizi, varyans analizi Two-way ANOVA ile GraphPad Prism 7 kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneyler, çoklu tekrarlarla en az üç kez tekrarlanmıştır. $p < 0,01=*$ istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1. İndolin-2-on Türevleri MM Hücre Canlılığını Azaltıcı Etki Göstermiştir

İndolin-2-on türevi maddelerin Malignant Mezotelyoma (SPC111 ve SPC212) ve mezotelyal (MeT-5A) hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi için MTT analizleri yapılmıştır. SPC111, SPC212 hücreleri 5×10^4 hücre/mL ve MeT-5A hücreleri 1×10^5 hücre/mL yoğunlukta olacak şekilde 96 kuyulu plakalara tekrarlı olarak ekildikten sonra tüm hücre hatları 72 saat boyunca, 0-100 μ M konsantrasyon aralıklarında maddelere maruz bırakılmış ve hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız indolin-2-on çekirdeğine bağlı yapının fenil halkası üzerindeki metoksi gruplarının farklı pozisyonlarda (GY342 ve GY339), sayıda (GY306) ve tersiyer (GY333) bağlanmasına göre sitotoksik etkinin değiştiğini göstermektedir. 3 ve 5C pozisyonunda metoksi grubu bağlı olan GY342 kodlu bileşik her iki hücrede de yaklaşık 10 μ M konsantrasyonda; 2 ve 5C pozisyonunda metoksi grubu bağlı olan GY339, 4C pozisyonunda bir metoksi grubu daha bağlı olan GY306 ve fenil halkasına ter-bütil bağlı türev GY333 5 μ M konsantrasyonda hücre büyümesini yarıya indirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bilindiği gibi seçicilik indeksi kanser olmayan hücrelerin IC_{50} değerlerinin, kanser hücrelerinin IC_{50} değerlerine oranı ile hesaplanmaktadır. IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında SPC111 ve SPC212 hücre hatları, MeT-5A hücre hattına kıyasla türevlere daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. SI değerinin de 2' nin üstünde olması türevlerin kanserli hücre hatlarına, kanser olmayan hücre hattına kıyasla daha seçici olduğunu düşündürmektedir. Tablo 4.1, bu çalışmada kullanılan hücre hatlarında değerlendirilen bileşikler için elde edilen IC_{50} değerlerini özetlemektedir. Çalışmamızdaki ileri analizler için kullanılan konsantrasyonlar, bu değerler baz alınarak gerçekleştirilmiştir.



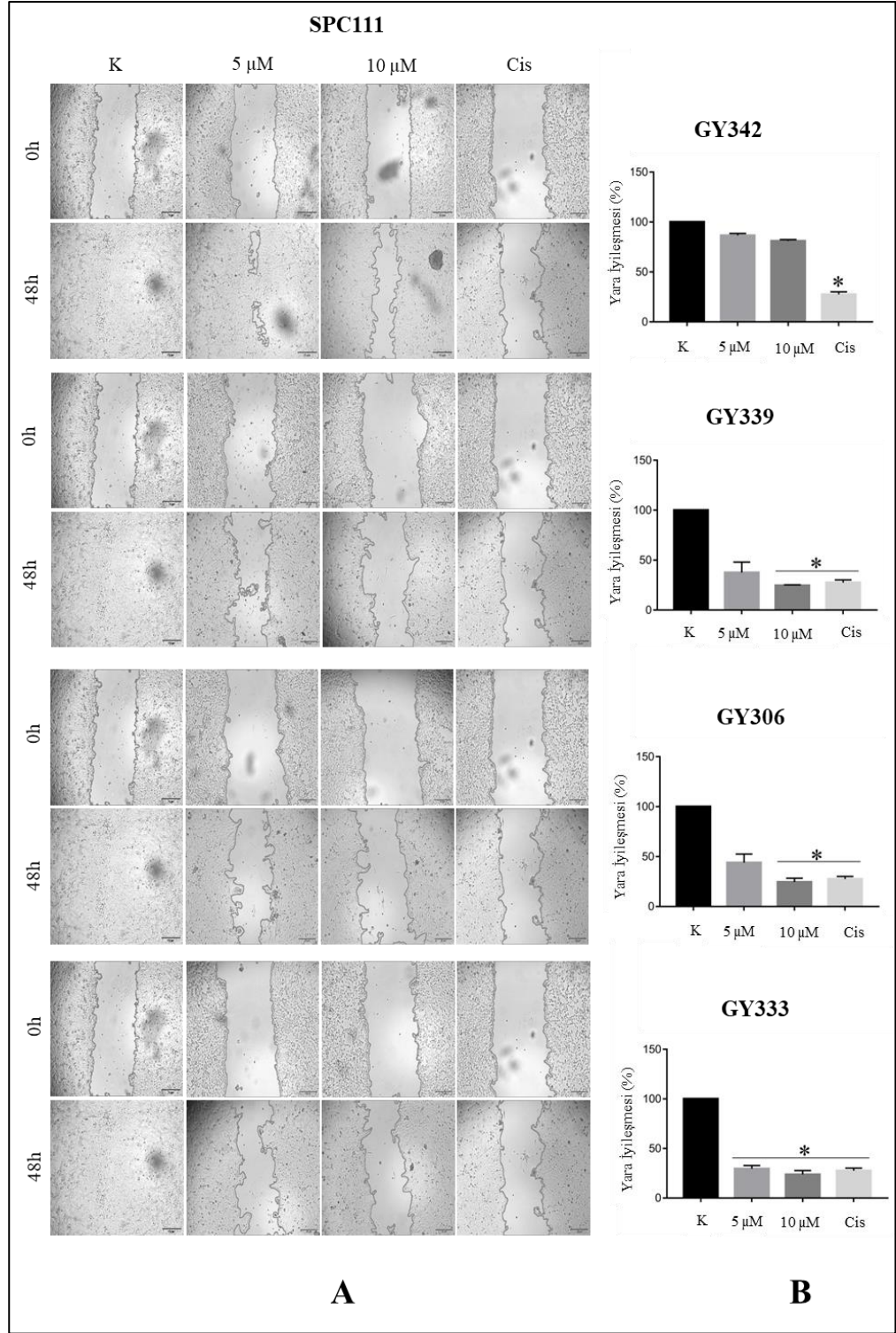
Şekil 4.1: MTT analizine dayalı hücre canlılığının türev bileşiklerin konsantrasyona bağlı inhibisyonu ve doz-yanıt eğrisi. A) Doz yanıt eğrileri ve karşılık gelen IC_{50} değerleri. B) Ortalama canlı hücre sayısının absorbansının normalizasyonunu ifade eder. Veriler üçlü bağımsız deneylerden elde edilmiştir. Anlamlı değerler * $p < 0.01$ olarak seçilmiştir.

Tablo 4.1: Türev bileşiklerin uygulanmasından sonra normal (MeT-5A), kanserli hücre hatları (SPC111, SPC212) için inhibisyon konsantrasyonları (IC₅₀) ve seçicilik indeksleri (SI). Her bileşik için SI değerleri normal hücre hattındaki IC₅₀ değerleri/kanserli hücre hattındaki IC₅₀ değerlerine oranlanarak hesaplanmıştır.

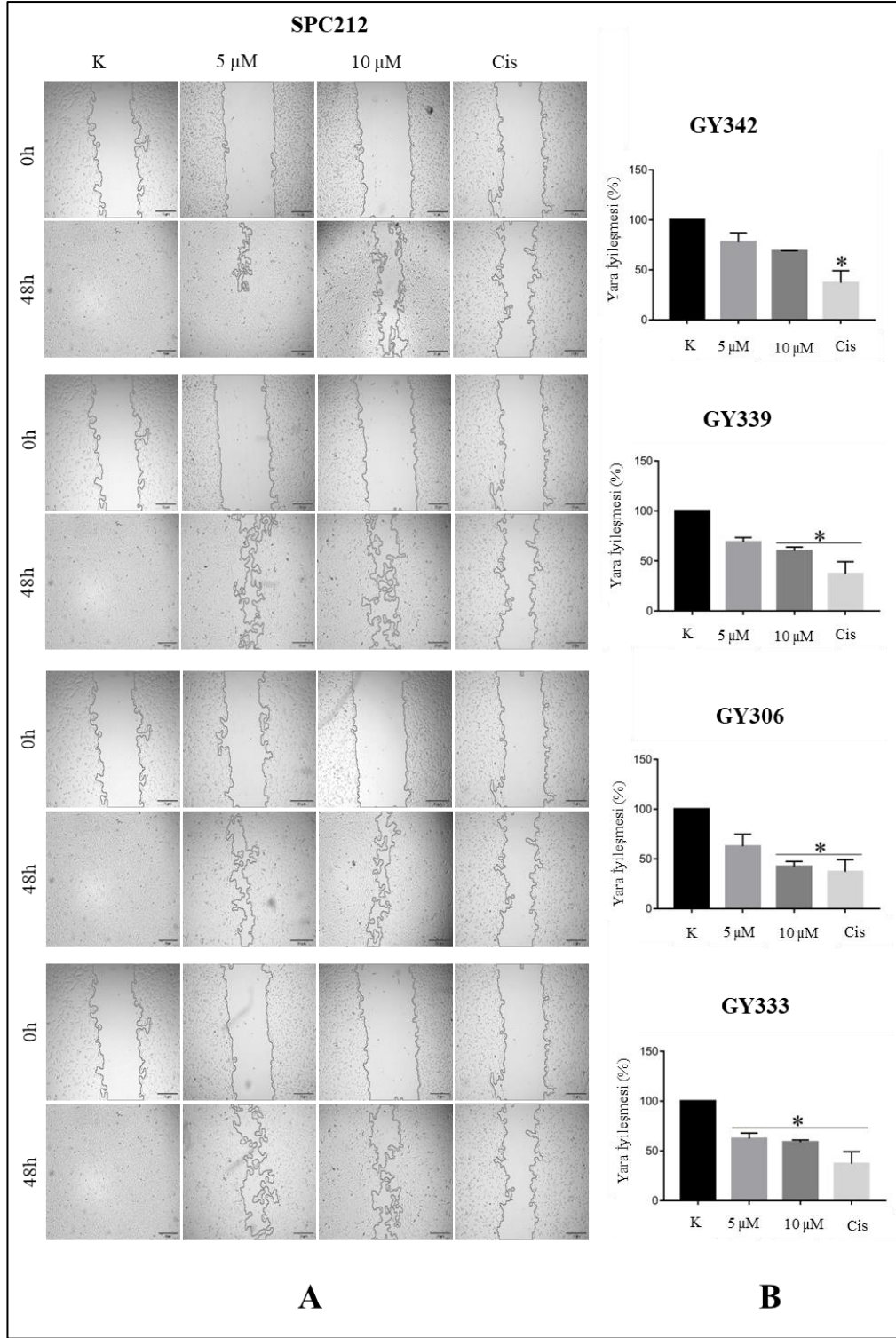
	GY342		GY339		GY306		GY333	
	IC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (μM)	SI
MeT-5A	23.3 ± 1.2		12.57 ± 1.35		10.91 ± 1.4		13.82 ± 1.5	
SPC111	11.02 ± 0.85	2.11	6.02 ± 1.1	2.08	5.38 ± 0.95	2.02	5.26 ± 0.86	2.62
SPC212	10.08 ± 0.7	2.31	5.98 ± 0.96	2.10	4.20 ± 1.05	2.59	5.90 ± 0.82	2.34

4.2. Türevler *in vitro* Hücre Göçünü İnhibe Etmiştir

Türev uygulamalarının hücrelerin hareketliliğini ve göçü üzerine etkileri araştırmak için deneyler her iki MM hücresinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2-4.3’ de gösterildiği gibi 48 saat sonra her iki hücre hattının yara alanlarında yüksek iyileşme kontrol gruplarında görülürken, uygulama yapılmış hücreler, bu kontrol grupları ile karşılaştırıldığında GY342 kodlu bileşiğin hücrelerin hareketliliğini uygulanan konsantrasyonlarda anlamlı derecede etkilemediği gözlemlenmiştir. Türevlerin hücre göçünü inhibe edici etkisi, GY339 ve GY306 için 10 μM konsantrasyonda gerçekleşirken; GY333 için 5 μM konsantrasyonda anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar, türevlerin kanser hücrelerinin göçünü zaman ve konsantrasyon bağımlı engelleyerek, türevlerin hücre hareketliliği ve göçü üzerinde etkin olabileceğini düşündürmektedir.



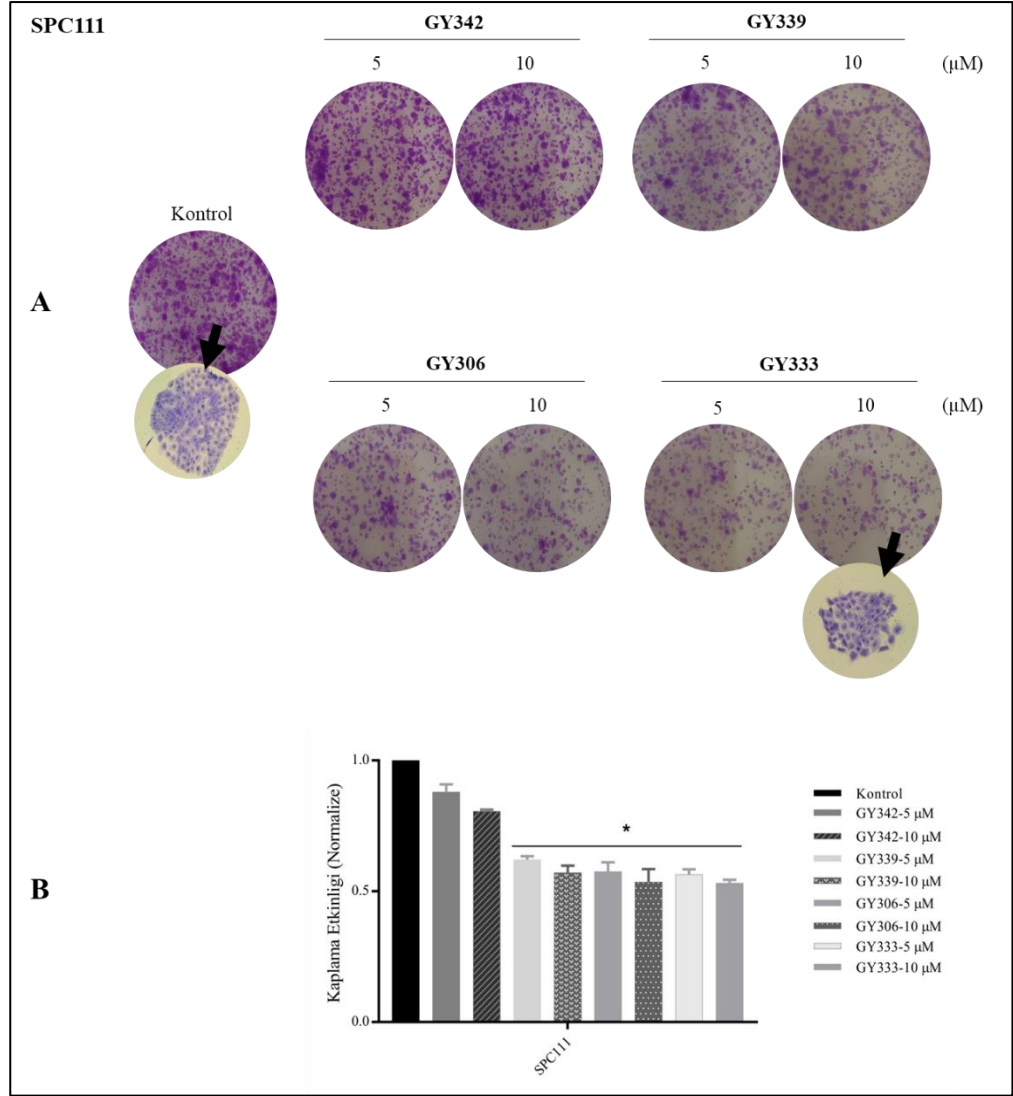
Şekil 4.2: Türev bileşiklerin SPC111 hücre hattında konsantrasyona ve zamana bağlı hücre göçü üzerindeki etkisi. Hücreler, 10 μ L'lik bir pipet ucu ile kazınmış ve 5, 10 μ M konsantrasyonlarda türev bileşiklerle işlenmiştir. Pozitif kontrol olarak Cisplatin (Cis:10 μ M) kullanılmıştır. A) Örneklerin 0 ve 48 saatlerde ters mikroskopla (5x objektif) görüntüsü B) Yara alanları, Image J yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Anlamlı değerler *p<0.01 olarak belirlenmiştir.



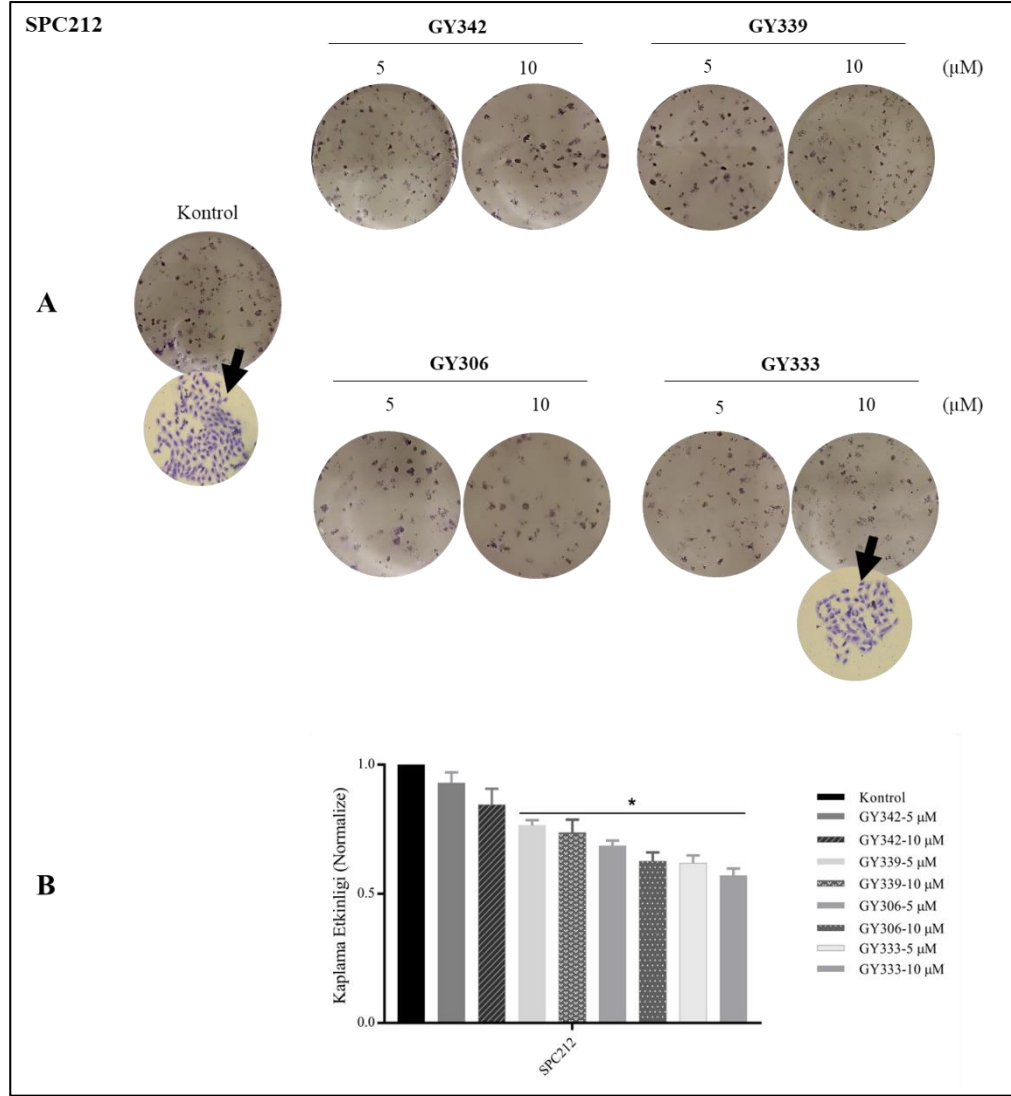
Şekil 4.3: Türev bileşiklerin SPC212 hücre hattında konsantrasyona ve zamana bağlı hücre göçü üzerindeki etkisi. Hücreler, 10 μ L'lik bir pipet ucu ile kazınmış ve 5, 10 μ M konsantrasyonlarda türev bileşiklerle işlenmiştir. Pozitif kontrol olarak Cisplatin (Cis: 10 μ M) kullanılmıştır. A) Örneklerin 0 ve 48 saatlerde ters mikroskopa (5x objektif) görüntüsü B) Yara alanları, Image J yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Anlamlı değerler * $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir.

4.3. İndolin-2-on Türevleri MM Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yeteneğini Azaltmıştır

Türevlerin, kanserli hücrelerin çoğalması ve karsinogenezi ile ilgili olan koloni oluşturma yeteneğine etkisi her iki MM hücresinde incelenmiştir. Hücreler ekilip türevleri içeren besiyeri ile 24 saat inkübe edildikten sonra bileşikleri içermeyen taze besiyeri ile muamele edilmiştir. Sonraki her üç günde bir besiyeri değiştirilip koloni oluşumu mikroskop altında takip edilmiştir. Tek bir hücrenin koloni oluşturma yeteneği kaplama etkinliği ile değerlendirilmiştir. İki hücre hattında da kontrol grubundaki koloni sayısının en fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). GY342 uygulanan hücrelerde koloni sayısı 10 μM ' da azalmış fakat bu azalma miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte diğer üç bileşiğin 5 μM konsantrasyondan itibaren koloni oluşturma yeteneğini inhibe ettiği belirlenmiştir. İlaveten türevlerin, kontrol grubu kolonileri ile karşılaştırıldıklarında, etkin oldukları konsantrasyonlarda oluşan koloni boyutlarının küçülmesine sebep olduğu bulgusu da dikkat çekmektedir.



Şekil 4.4: İndolin-2-on türevlerinin SPC111 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğine etkisi. Hücreler uygulamadan sonra koloni oluşumu deney protokolüne tabi tutulmuştur. A) Oluşan kolonilerin görüntüleri B) Oluşan kolonilerden elde edilen kaplama etkinliği değerleri (Bölüm 3.2.7' deki formül yardımıyla hesaplanmıştır). Elde edilen veriler, en az üç bağımsız deneyin ortalamasının normalize halini sunmaktadır. Anlamlı değerler * $p < 0.01$ olarak seçilmiştir.

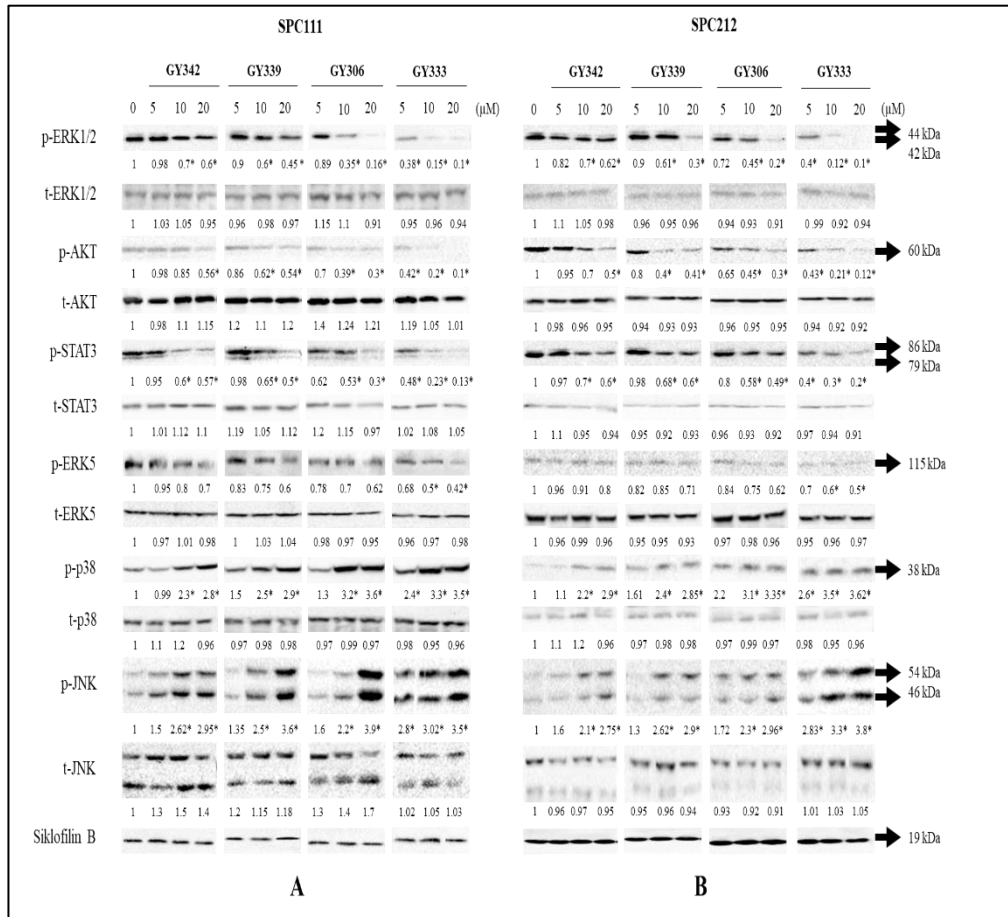


Şekil 4.5: İndolin-2-on türevlerinin SPC212 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğine etkisi. Hücreler uygulamadan sonra koloni oluşumu deney protokolüne tabi tutulmuştur. A) Oluşan kolonilerin görüntüleri B) Oluşan kolonilerden elde edilen kaplama etkinliği değerleri (Bölüm 3.2.7’ deki formül yardımıyla hesaplanmıştır). Elde edilen veriler, en az üç bağımsız deneyin ortalamasının normalize halini sunmaktadır. Anlamlı değerler * $p < 0.01$ olarak seçilmiştir.

4.4. Türevler Hücre Proliferasyonunda Etkin Proteinlerin Fosforilasyonunu Baskılamıştır

SPC111 ve SPC212 hücreleri 0, 5, 10 ve 20 µM konsantrasyonlarda türevlerle 24 saat inkübe edildikten sonra protein seviyeleri incelenmiştir (Şekil 4.6). Belirtilen konsantrasyonlarda GY342, GY339 ve GY306 uygulaması SPC111, SPC212 hücre hatlarının ERK1/2 fosforilasyonu anlamlı olarak 10 µM’ dan ve GY333 uygulaması 5 µM konsantrasyondan başlayarak baskılamıştır. PI3K yolağının alt akış proteini olan

AKT' nin fosforilasyonu incelendiğinde GY342' de 20 μ M, GY339 ve GY306' da 10 μ M, GY333' de 5 μ M konsantrasyonlardan itibaren her iki hücre hattında da anlamlı bir azalma göstermiştir. Türevler, STAT3 fosforilasyonunu GY342, GY339, GY306 için 10 μ M konsantrasyondan itibaren baskımlarken GY333 5 μ M konsantrasyondan itibaren anlamlı bir şekilde etkilemiştir. Türevler arasında sadece GY333 ERK5 fosforilasyonu üzerinde 10 μ M konsantrasyonla birlikte inhibisyona yol açmaktadır. Türevlerin hücresel stres durumunda aktive olan, apoptoz gibi hücresel süreçlerde rol oynayan proteinlere etkisi incelendiğinde ise; her iki hücre hattında da GY342, GY339, GY306 uygulamasının 10 μ M konsantrasyondan itibaren p38 ve JNK fosforilasyonunun artışı sağlarken, GY333 uygulaması bu artışı 5 μ M' dan itibaren sağlamıştır. Ayrıca her iki hücre hattının tüm total proteinlerin seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.6: Türev bileşiklerin proliferasyonda etkili proteinlerin ekspresyon ve fosforilasyon seviyelerine etkisi. A) SPC111 B) SPC212 hücre hatlarına türevlerin 5, 10, 20 μ M konsantrasyonlarda uygulanmasının protein seviyesindeki değişimlerini göstermektedir. Elde edilen veriler, en az üç bağımsız deneyin ortalamasının normalize halini sunmaktadır. Anlamlı değerler * $p < 0,01$ olarak seçilmiştir.

5. TARTIŞMA

Sanayileşmeden bu yana dünya çapında birçok faaliyet için temel bir mineral olarak kullanılan asbeste maruziyet, çoğunlukla plevrayı etkileyen MM' nin en yaygın nedenidir. Şu anda, MM için uygulanan mevcut tedaviler sınırlı etkinlik göstermektedir. Hedefe yönelik tedaviler, günümüzde kanser araştırmalarının ana odak noktalarından biridir. Indolin-2-on, antikanser aktivitesi ile biyolojik etkilere sahip heterosiklik bir yapı iskelesidir. SU4984, SU6668 ve BIBF1120 bu gruptan ortaya çıkan ve hedefe yönelik antikanser tedavileri için klinik kullanımda olan ilaçlardır [Meti et al., 2016].

Bu kapsamda, yaptığımız çalışmada ERK yolağında etkin olacağı öngörülerek tasarlanan ve sentezlenen GY342, GY339, GY306 ve GY333 kodlu dört indolin-2-on türevlerinin SPC111, SPC212 ve MeT-5A hücrelerinde anti-kanser etkinliği değerlendirilmiştir. Hücre canlılık deneyleri, türevlerin anti-kanser veya sitotoksik etkisinin yapısal modifikasyonla değiştiğini göstermektedir. Dört türev bileşik MM hücrelerinin canlılığını konsantrasyona bağlı bir şekilde azaltmıştır. Bu etki mezotelyum kontrol hücresinde MM hücrelerine uygulanan konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda gözlemlenmiştir. Uygulanan bileşiklerin kanser hücrelerine seçiciliği SI hesaplamasıyla doğrulanmıştır.

Yara iyileşmesi deneyinden elde edilen sonuçlar SPC111 ve SPC212 hücrelerinde, türevlerin hücre hareketliliğini ve göçünü kısıtladığını göstermektedir. Önceki araştırmalar, ERK1/2, JNK ve p38 dahil olmak üzere MAPK'lerin, hücre göçü ve proliferasyonunun düzenlenmesinde yer aldığını ve ERK1/2/MAPK yolunun aşağı regülasyonunun, hücre göçünün ve çoğalmasının azalmasına yol açtığını göstermiştir [Wu et al. 2008]. Protein seviyesindeki analizlerimiz, ERK1/2/MAPK yolunun aşağı regülasyonu yoluyla yara iyileşmesi sonuçlarımızı destekler niteliktedir. İndolin-2-on yapısı taşıyan bileşiklerin HeLa [Song et al., 2021] ve HepG2 [Wang et al., 2015] hücrelerinin göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir. Prostat PC-3 kanser hücrelerinin indolin-2-on yapısı taşıyan bileşiğe maruz kalması, F-aktin yapılarının düzensizliği ve bozulması yoluyla *in vitro* hücre göçünün kayda değer bir şekilde engellenmesiyle sonuçlanmıştır [Senwar et al., 2016]. Sharma ve ark. yaptıkları bir çalışmada MDA-MB-231 kanser hücrelerinin bileşiğe maruz bırakılması, F-aktin iskeletinin bozulması yoluyla *in vitro* hücre göçü inhibe ettiğini göstermiştir [Sharma et al., 2016]. Çalışmamız, türevlerin hücre göçünün inhibisyonu üzerinde etkili olduğunu

göstermektedir. Ancak türevlerin hücre dışı matriksin (ECM) farklı bileşenlerini bozan önemli derecede hücre göçüyle ilgili olan MMP gibi regülatörlere etkisi gen veya protein seviyesinde daha fazla moleküler düzeyde çalışma gerektirmektedir.

Koloni oluşum deneyleri, tümör oluşumu için *in vitro* bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Literatüre bakıldığında indolin-2-on yapısı taşıyan bir dizi bileşik A2780 insan yumurtalık kanseri [Karthikeyan et al., 2019], HT-29 insan kolorektal adenokarsinom ve A375 insan malign melanom [Tumosienė et al., 2021], HepG2 insan karaciğer kanseri [Zhang et al., 2019] hücrelerinin klonojenik hayatta kalmasını önemli ölçüde inhibe edici etki göstermiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, uygulanan indolin-2-on türevi bileşiklerin MM hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini anlamlı şekilde azalttığını göstermektedir.

Bilindiği üzere kanser hücrelerinde bozulmuş proliferasyon sinyallerin ve proteinlerin hedeflenmesi güncel bir tedavi stratejisidir. İndolin-2-on türevlerinin çeşitli hücre yolaklarını etkilediğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin HepG2, MCF7 ve A549 kanser hücre hatlarında EGFR yolunun akış aşağı molekülleri olan AKT ve STAT3' ün ekspresyon ve fosforilasyonun indolin-2-on yapısı bulunduran bileşik ile tedavisini takiben aktivitesinde azalma olduğunu göstermiştir [Liu et al., 2015]. Başka bir çalışmada MCF-7 ve HeLa kanser hücre hatlarında türevler apoptotik hücre ölümü sırasında kaspazdan bağımsız bir yolda pro-apoptotik proteinler Bak ve Mcl-1' lerin aktivasyonunu indüklemiştir. Bahsi geçen çalışmada, bileşiğin neden olduğu apoptoz mekanizmasında MAP kinaz yolağının önemi belirtilmiştir. MAPK aşağı akış hedefi olarak, p53 proteini aktive edilmiştir. p53 proteini JNK, p38 ve ERK dahil olmak üzere farklı MAPK modülleriyle etkileşime girmiştir. Sonuçlar, p38, ERK1/2 ve JNK MAPK' nın spesifik inhibitörlerinin eklenmesiyle, MAPK kaskadlarının p38 ve ERK' in, HeLa ve MCF7 hücre hatlarında bileşik ile indüklenen apoptotik aktivite için vazgeçilmez olduğunu göstermiştir [Sreenivasulu et al., 2019]. Argyros ve ark. tümör dokusu ekstraktlarında birkaç kinazın fosforilasyon durumunu analiz etmiştir. İndolin-2-on yapısı taşıyan kimyasalla tedavi edilen farelerde p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) ve p-AKT (Ser473) belirgin bir azalma ortaya çıkarmıştır. Düşük p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) seviyeleri sonraki immünohistokimya deneyleriyle doğrulanmıştır [Argyros et al., 2017]. Diğer bir çalışmada Sunitinib mimikleri sentezlemiş MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde apoptozun indüksiyonuna, esas olarak p53 artışı ve STAT3 aktivatörünün aşağı regülasyonunun aracılık ettiğini göstermiştir [Shah et al., 2016].

Özetle, çalışmamızda ERK yolağında etkin olacağı öngörülerek tasarlanan türevlerin *in vitro* sistemde anti-kanser potansiyelleri incelenmiştir. Tasarlanan türevlerin bulgularımız doğrultusunda öngörülen etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. İndolin-2-on yapısına dahil olan fenil halkasına bağlı metoksi radikal grupları farklı pozisyonlarda (GY342 ve GY339), sayıda (GY306) ve tersiyer (GY333) bağlanarak türev aktivitesini değiştirmiştir. Hücre canlılık analizleri GY342 kodlu bileşik haricinde GY339, GY306, GY333 kodlu bileşiklerin MM hücrelerinin canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonun ~5 µM olduğunu göstermiştir. GY342 için ise bu etki ~10 µM konsantrasyonda görülmüştür. Mevcut sonuçlarımız türev aktivitesindeki belirgin farkı protein analizleri ile ortaya koymuştur. GY333 kodlu bileşik MM hücrelerinde ERK1/2, AKT, STAT3 fosforilasyonunu 5 µM konsantrasyondan başlayarak baskılamak, GY342, GY339, GY306 10 µM konsantrasyonda baskılamıştır. Yalnızca GY342 kodlu bileşik AKT fosforilasyonu 20 µM konsantrasyondan itibaren anlamlı bir şekilde azaltmıştır. p38 ve JNK fosforilasyonunu her iki hücre hattında da GY333 kodlu bileşik 5 µM konsantrasyonda anlamlı bir şekilde artırırken, GY342, GY339, GY306 10 µM konsantrasyonda artırmıştır. JNK ve p38 MAPK yollarının, Bax fosforilasyonunu ve mitokondriyal translokasyonu indükleyerek yalnızca pro-apoptotik süreçleri teşvik etmekle kalmayıp ayrıca Bcl-2 ailesi üyelerinin fonksiyonlarını inhibe ederek anti-apoptotik fonksiyonları baskılayan mekanizmalarda yer aldığı bilinmektedir. Mevcut veriler, sitotoksik etkinin p38 ve JNK fosforilasyonundaki artışın programlı hücre ölümü olan apoptoz ilişkisini düşündürmektedir. Sonuçlarımız GY333 kodlu türevi bir adım öne çıkarmaktadır. Benzer şekilde bu bileşik hücrelerin göçünde ve koloni oluşturma potansiyelinde de biraz daha etkin gözükmektedir. Ancak diğer türev bileşiklerin hücreler üzerindeki etkinliği de açıktır. Tüm sonuçlarımız indolin-2-on türevlerinin kanser terapötikleri olarak gelecek vaat eden kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi için önemli bir potansiyele sahip olabileceğini işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

Argyros O., Karampelas T., Varela A., Asvos X., Papakyriakou A., Agalou A., Tamvakopoulos, C., (2017), "Targeting of the breast cancer microenvironment with a potent and linkable oxindole based antiangiogenic small molecule" *Oncotarget*, 8(23), 37250.

Asl E. R., Amini M., Najafi S., Mansoori B., Mokhtarzadeh A., Mohammadi A., Baradaran B., (2021), "Interplay between MAPK/ERK signaling pathway and MicroRNAs: a crucial mechanism regulating cancer cell metabolism and tumor progression", *Life Sciences*, 278, 119499.

Blum, W., Pecze, L., Felley-Bosco, E., Worthmüller-Rodriguez, J., Wu, L., Vrugt, B., Schwaller B., (2015), "Establishment of immortalized murine mesothelial cells and a novel mesothelioma cell line", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 51(7), 714-721.

Brennan C. M., Emerson Jr. C. P., Owens J., Christoforou N., (2021), "p38 MAPKs—roles in skeletal muscle physiology, disease mechanisms, and as potential therapeutic targets", *JCI insight*, 6(12).

Carbone M., Baris Y. I., Bertino P., Brass B., Comertpay S., Dogan A. U., Miller A., (2011), "Erionite exposure in North Dakota and Turkish villages with mesothelioma", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13618-13623.

Cascioferro S., Li Petri G., Parrino B., El Hassouni B., Carbone D., Arizza V., Diana P., (2020), "3-(6-phenylimidazo [2, 1-b][1, 3, 4] thiadiazol-2-yl)-1H-indole derivatives as new anticancer agents in the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma", *Molecules*, 25(2), 329.

Cook S. J., Tucker J. A., Lochhead P. A., (2020), "Small molecule ERK5 kinase inhibitors paradoxically activate ERK5 signalling: be careful what you wish for", *Biochemical Society Transactions*, 48(5), 1859-1875.

Dhuguru J., Skouta R., (2020), "Role of indole scaffolds as pharmacophores in the development of anti-lung cancer agents", *Molecules*, 25(7), 1615.

Drew B. A., Burow M. E., Beckman B. S., (2012), "MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1825(1), 37-48.

Feng J., Lu S., Ou B., Liu Q., Dai J., Ji C., Ma Y., (2020), "The Role of JNK Signaling Pathway in Obesity-Driven Insulin Resistance", *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 13, 1399.

Fenton M. S., Marion K. M., Salem A. K., Hogen R., Naeim F., Hershman J. M., (2010), "Sunitinib inhibits MEK/ERK and SAPK/JNK pathways and increases

sodium/iodide symporter expression in papillary thyroid cancer”, *Thyroid*, 20(9), 965-974.

García-Hernández L., García-Ortega M. B., Ruiz-Alcalá G., Carrillo E., Marchal J. A., García M. Á., (2021), “The p38 MAPK Components and Modulators as Biomarkers and Molecular Targets in Cancer”, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 370.

Grégoire M., (2010), “What's the place of immunotherapy in malignant mesothelioma treatments?”, *Cell adhesion & migration*, 4(1), 153-161.

Gu Y., Mohammad I. S., Liu Z., (2020), “Overview of the STAT-3 signaling pathway in cancer and the development of specific inhibitors”, *Oncology Letters*, 19(4), 2585-2594.

Hawash M., Kahraman D. C., Cetin-Atalay R., Baytas S. N., (2021), “Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by novel indolylacrylamide derivatives: synthesis and biological evaluation”, *Chemistry & Biodiversity*, 18(5), e2001037.

Hin Tang J. J., Hao Thng D. K., Lim J. J., Toh T. B., (2020), “JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma”, *Hepatic oncology*, 7(1), HEP18.

Hiriart E., Deepe R., Wessels A., (2019), “Mesothelium and malignant mesothelioma”, *Journal of developmental biology*, 7(2), 7.

Hoxhaj G., Manning B. D., (2020), “The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism”, *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 74-88.

Hung Yin P., Chirieac Lucian R., (2020), “Pathology of Malignant Pleural Mesothelioma”, *Thoracic Surgery Clinics*, 30(4), 367–382.

Jia Y., Wen X., Gong Y., Wang X., (2020), “Current scenario of indole derivatives with potential anti-drug-resistant cancer activity”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112359.

Karthikeyan C., Amawi H., Ashby C. R., Khare V. M., Jones V., Moorthy N. H. N., Tiwari A. K. (2019), “Novel 3-((2-chloroquinolin-3-yl) methylene) indolin-2-one derivatives produce anticancer efficacy in ovarian cancer in vitro”, *Heliyon*, 5(5).

Katz M., Amit I., Yarden Y., (2007), “Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1161-1176.

Kidger A. M., Sipthorp J., Cook S. J., (2018), “ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway”, *Pharmacology & therapeutics*, 187, 45-60.

Liu F., Yang X., Geng M., Huang M., (2018), “Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy”, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(4), 552-562.

Liu Y. H., Wei X. L., Hu G. Q., Wang T. X. (2015), "Quinolone-indolone conjugate induces apoptosis by inhibiting the EGFR-STAT3-HK2 pathway in human cancer cells" *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 2749-2756.

Luo N., Balko J. M., (2019), "Role of JAK-STAT pathway in cancer signaling", *Predictive biomarkers in oncology*, 311-319.

Martinotti S., Ranzato E., Burlando B., (2011), "In vitro screening of synergistic ascorbate–drug combinations for the treatment of malignant mesothelioma", *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1568-1574.

Matsuda S., Kobayashi M., Kitagishi Y., (2013), "Roles for PI3K/AKT/PTEN pathway in cell signaling of nonalcoholic fatty liver disease", *International Scholarly Research Notices*, 2013.

Meti, G. Y., Kamble, R. R., Kamble, A. A., Kumbar, M. N., Joshi, S. D., Dixit, S. R. (2016), "Synthesis and Anti-Proliferative Activity of Biphenyl Derived 5-Substituted-Indolin-2-Ones", *Arch. Chem. Res*, 1(1).

Metintaş S., Batırel H. F., Bayram H., Yılmaz Ü., Karadağ M., Ak G., Metintaş M., (2017), "Turkey national mesothelioma surveillance and environmental asbestos exposure control program", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(11), 1293.

Montagut C., Settleman J., (2009), "Targeting the RAF–MEK–ERK pathway in cancer therapy", *Cancer letters*, 283(2), 125-134.

Negi A., Singla R., Singh V., (2014), "Indole based alkaloid in cancer: an overview", *PharmaTutor*, 2(1), 76-82.

Nithianandarajah-Jones G. N., Wilm B., Goldring C. E. P., Müller J., Cross M. J., (2012), "ERK5: Structure, regulation and function", *Cellular Signalling*, 24(11), 2187–2196.

Nitulescu G. M., Van De Venter M., Nitulescu G., Ungurianu A., Juzenas P., Peng Q., Margina D., (2018), "The Akt pathway in oncology therapy and beyond", *International Journal of Oncology*, 53(6), 2319-2331.

Patravale V., Dandekar P., Jain R., (2012), "Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles", *Nanoparticulate Drug Delivery*, 4, 123-155.

Paudel R., Fusi L., Schmidt M., (2021), "The MEK5/ERK5 pathway in health and disease", *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7594.

Pencik J., Pham H. T. T., Schmoellerl J., Javaheri T., Schleederer M., Culig Z., Kenner L., (2016), "JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome", *Cytokine*, 87, 26-36.

Pereira D. M., Rodrigues C. M., (2020), "Targeted Avenues for Cancer Treatment: The MEK5–ERK5 Signaling Pathway", *Trends in Molecular Medicine*, 26(4), 394-407.

Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R., (2011), "The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619-1633.

Pua L. J. W., Mai C. W., Chung F. F. L., Khoo A. S. B., Leong C. O., Lim W. M., Hii L. W., (2022), "Functional Roles of JNK and p38 MAPK Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma", *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1108.

R Prakash C., Raja S., (2012), "Indolinones as promising scaffold as kinase inhibitors: a review", *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(2), 98-119.

Sachdeva H., Mathur J., Guleria A., (2020), "Indole derivatives as potential anticancer agents: A review", *Journal of the Chilean Chemical Society*, 65(3), 4900-4907.

Safa A., Abak A., Shoorei H., Taheri M., Ghafouri-Fard S., (2020), "MicroRNAs as regulators of ERK/MAPK pathway: a comprehensive review", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 110853.

Sanaei M. J., Razi S., Pourbagheri-Sigaroodi A., Bashash D., (2022), "The PI3K/Akt/mTOR pathway in lung cancer; oncogenic alterations, therapeutic opportunities, challenges, and a glance at the application of nanoparticles", *Translational Oncology*, 18, 101364.

Sekido Y., (2013), "Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma", *Carcinogenesis*, 34(7), 1413-1419.

Senwar K. R., Reddy T. S., Thummuri D., Sharma P., Naidu V. G. M., Srinivasulu G., Shankaraiah, N. (2016) "Design, synthesis and apoptosis inducing effect of novel (Z)-3-(3'-methoxy-4'-(2-amino-2-oxoethoxy)-benzylidene) indolin-2-ones as potential antitumour agents", *European journal of medicinal chemistry*, 118, 34-46.

Shah S., Lee C., Choi H., Gautam, J., Jang H., Kim G. J., Jeong B. S. (2016), "5-Hydroxy-7-azaindolin-2-one, a novel hybrid of pyridinol and sunitinib: design, synthesis and cytotoxicity against cancer cells", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(21), 4829-4841.

Sharma, P., Thummuri, D., Reddy, T. S., Senwar, K. R., Naidu, V. G. M., Srinivasulu, G., Shankaraiah, N. (2016), "New (E)-1-alkyl-1H-benzo [d] imidazol-2-yl) methylene) indolin-2-ones: Synthesis, in vitro cytotoxicity evaluation and apoptosis inducing studies", *European journal of medicinal chemistry*, 122, 584-600.

Song, R., Yang, Y., Huang, J., Qiao, W., Luo, B., Ju, Y., ... & Luo, Y. (2021), "Discovery of novel indolin-2-one compounds as potent inhibitors of HsClpP for cancer treatment", *Bioorganic Chemistry*, 110, 104820.

Sreenivasulu R., Reddy K. T., Sujitha P., Kumar C. G., Raju R. R. (2019), "Synthesis, antiproliferative and apoptosis induction potential activities of novel bis (indolyl) hydrazide-hydrazone derivatives" *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(6), 1043-1055.

Stecca B., Rovida E., (2019), "Impact of ERK5 on the Hallmarks of Cancer" *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1426.

Thomas S. J., Snowden J. A., Zeidler M. P., Danson S. J., (2015), "The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours" *British journal of cancer*, 113(3), 365-371.

Tosun A. B., Yergiyev O., Kolouri S., Silverman J. F., Rohde G. K., (2015), "Detection of malignant mesothelioma using nuclear structure of mesothelial cells in effusion cytology specimens", *Cytometry Part A*, 87(4), 326-333.

Toyokuni S., (2019), "Iron addiction with ferroptosis-resistance in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis: toward the era of mesothelioma prevention", *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 206-215.

Tumosienė I., Jonuškienė I., Kantminienė K., Mickevičius V., Petrikaitė V., (2021) "Novel N-substituted amino acid hydrazone-isatin derivatives: Synthesis, antioxidant activity, and anticancer activity in 2D and 3D models in vitro" *International journal of molecular sciences*, 22(15), 7799.

Van Huizen E., McInerney G. M., (2020), "Activation of the PI3K-AKT pathway by old world alphaviruses" *Cells*, 9(4), 970.

Wagner E. F., Nebreda Á. R., (2009), "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development", *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537-549.

Wang, L. J., Wang, S. Y., Jiang, B., Wu, N., Li, X. Q., Wang, B. C., Shi, D. Y. (2015), "Design, synthesis and biological evaluation of novel bromophenol derivatives incorporating indolin-2-one moiety as potential anticancer agents", *Marine Drugs*, 13(2), 806-823.

Weerapreeyakul N., Nonpunya A., Barusrux S., Thitimetharoch T., Sripanidkulchai, B. (2012), "Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line" *Chinese medicine*, 7(1), 1-7.

Wu, WS., Wu, JR., Hu, CT. (2008), "Signal cross talks for sustained MAPK activation and cell migration: the potential role of reactive oxygen species", *Cancer Metastasis Rev* 27, 303–314 (2008).

Xiong X., Zhang Y., Gao X., Dong Z., Li L., Ji C., Mei C., (2010), "B5, a novel pyrrole-substituted indolinone, exerts potent antitumor efficacy through G2/M cell cycle arrest", *Investigational new drugs*, 28(1), 26-34.

Yang, Q., Jiang, W., Hou, P. (2019), "Emerging role of PI3K/AKT in tumor-related epigenetic regulation", In *Seminars in Cancer biology* (Vol. 59, pp. 112-124). Academic Press.

Yu Z., Chen Z., Su Q., Ye S., Yuan H., Kuai M., Li Q., (2019), "Dual inhibitors of RAF-MEK-ERK and PI3K-PDK1-AKT pathways: design, synthesis and preliminary anticancer activity studies of 3-substituted-5-(phenylamino) indolone derivatives", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(6), 944-954.

Zhang Q., Fu Y., Zhao Y., Cui S., Wang J., Liu F., Teng Y. (2019), "5-Acetamido-1-(methoxybenzyl) isatin inhibits tumor cell proliferation, migration, and angiogenesis" *RSC advances*, 9(63), 36690-36698.

Zhang W., Liu H. T., (2002), "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells", *Cell research*, 12(1), 9-18.

Zou J., Lei T., Guo P., Yu J., Xu Q., Luo Y., Huang D., (2019), "Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence", *Molecular Medicine Reports*, 19(2), 759-770.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra DEMİRKAN, Üsküdar Üniversitesi'nde başladığı Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü lisans eğitimini 2019 yılında onur öğrencisi olarak tamamlamıştır. Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU danışmanlığında başladığı yüksek lisans eğitimini 2023 yılında başarıyla tamamlamıştır.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Busra Demirkan, Noor-ul-Huda Butt, Gulseren Turhal, Sultan Nacak Baytas, Asuman Demiroglu-Zergeroglu. “The Anti-proliferative Effects of Indolin-2-on Derivatives in In Vitro”, The Sixth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Gaziantep-Turkey, May 26-28 2022.