

T. C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HALOFUGİNONUN HÜCRE PROLİFERASYONU İLE İLGİLİ
SİNYAL YOLAKLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HALİME TOPAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2019

T. C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HALOFUGİNONUN HÜCRE
PROLİFERASYONU İLE İLGİLİ SİNYAL
YOLAKLARINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

HALİME TOPAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE

2019

T. R.

**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF
HALOFUGINONE ON SIGNALING
PATHWAYS RELATED TO CELL
PROLIFERATION**

HALİME TOPAL

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

ASSOC. PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE

2019

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.../06.../2019.. tarih ve 2019.../27..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/ 06/ 2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Halime TOPAL' ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Can Murathan ERİŞTİ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Malignant mezotelyoma (MM) özellikle asbeste uzun süre maruz kalma sonucu gelişen kötü huylu bir kanser türüdür. Sigara içmeye bağlı olarak gelişen akciğer kanseri ise ölüm nedenleri arasında dünya çapında ikinci sırada yer alır. Her iki hastalık da hem kemoterapotik hem de çok yönlü olarak gelişen tedavilere rağmen devam eden ciddi sağlık sorunlarındandır.

Bu tez çalışmasında, geleneksel Çin tıbbında kullanılan ve bitkisel kaynaklı febrifugin analogu olan halofuginon isimli maddenin MM ve akciğer kanserinde tedavi amaçlı kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmada ilk olarak halofuginonun mezotelyoma, MM ve akciğer kanseri hücrelerinde öncelikle hücre morfolojisine olan etkisi araştırılmıştır. Devamında aynı hücrelerin hücre canlılığına etkisi konsantrasyon bağımlı asit fosfataz deneyi ile incelenmiştir. Etkinliği belirlenen konsantrasyonlarla halofuginonun, JAK/ STAT, PI3K/ Akt ve MAPK yollarından klasik MAPK yolu, JNK ve p38 MAPK yollarına etkisi araştırılmıştır.

Halofuginon hücre canlılığı üzerinde konsantrasyon bağımlı olarak etki göstermiştir. Kanser hücrelerinin HF uygulamalarına kontrol hücrelerine göre daha hassas oldukları bulunmuştur. İlaveten HF kanser hücrelerinde JAK/ STAT ve ERK1/2 yollarını baskımlarken, mezotelyal hücrede böyle bir etki gözlenmemiştir. Akt yolağında gözlenen değişim ise kanser hücrelerinde ardışık konsantrasyonlarda artışı yönündedir. Bunlarla birlikte çabuk baskılanması bağlamında akciğer kanseri hücresi, MM hücresinden daha hassas cevap vermektedir. İlaveten Halofuginon, p38 protein fosforilasyonunda artış nedeninin apoptotik indüklenme ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Halofuginonun malignant mezotelyoma ve akciğer kanseri hücrelerine etkisiyle ilgili çalışmalar tarafımızca ilk kez yapılmıştır. Halofuginonun, bu hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere etken madde olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Halofuginon, Malignant Mezotelyoma, Akciğer Kanseri, Hücre Çoğalması, Sinyal Yolları.

SUMMARY

Malignant mesothelioma (MM) is a type of malignant cancer that develops as a result of long-term exposure to asbestos. Lung cancer due to smoking is the second leading cause of death worldwide. Both diseases are still serious health problems despite both chemotherapeutic and multifaceted treatment.

In this thesis, the use of halofuginone, a plant-derived febrifugin analogue used in traditional Chinese medicine, for treatment of MM and lung cancer was investigated. First, we investigated the effect of halofuginone on cell morphology in mesothelioma, MM and lung cancer cells. Subsequently, the effect of the same cells on cell proliferation was investigated by concentration dependent acid phosphatase assay. Halofuginone with effective concentrations of JAK/ STAT, PI3K/ Akt and MAPK pathway in the classical MAPK pathway, JNK and p38 MAPK pathways were investigated.

Halofuginone showed a concentration dependent effect on cell viability. Cancer cells were found to be more sensitive to HF applications than control cell. In addition, HF inhibited JAK/ STAT and ERK1/ 2 pathways in cancer cells, whereas no such effect was observed in mesothelial cells. The change observed in the Akt pathway is the increase in consecutive concentrations in cancer cells. However, in the context of rapid repression, the lung cancer cell is more responsive than in the MM cell. In addition HF is thought to be associated with apoptotic induction due to an increase in p38 protein phosphorylation. Studies on the effect of halofuginone on malignant mesothelioma and lung cancer cells were made by us for the first time. It is thought that halofuginone may be the active ingredient for the treatment of these diseases.

Keywords: Halofuginone, Malignant Mesothelioma, Lung Cancer, Cell Proliferation, Signaling Pathways.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü desteğini gösteren, bu çalışmaları yapabilmem için gerekli olanakları sağlayan danışmanım Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU'na,

Laboratuvar çalışmalarımın başından beri yanımda olan değerli arkadaşım Gülseren TURHAL'a, laboratuvar arkadaşlarım Ronald Regan ODONGO'ya, Araştırma Görevlisi Fadime DONBALOĞLU'na ve tüm KASIAL ekibine,

Tüm samimiyetiyle hemen her konuda yardımcı olan, iyi ki tanıyorum dediğim çok kıymetli Handan EMİŞOĞLU'na,

Ve tabi ki maddi, manevi her konuda her zaman desteklerini sağlayan varlıklarına şükrettiğim canım annem başta olmak üzere, babama, her an gözeten muhabbetli dedeme, merhume babaanneme, abim Uğur TOPAL'a, ablam Zeynep BABAGİL'e, kız kardeşim Hilal TOPAL'a, neşe kaynağı olan sevgili yeğenlerim Mihrimah BABAGİL'e ve Miray BABAGİL'e teşekkürlerimi en derin duygularıyla sunarım.

Bu tez çalışması GTÜ 2017-A-105-43 nolu Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

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 ve Katkısı	1
2. KANSER	2
2. 1. Malignant Mezotelyoma	2
2.2. Akciğer Kanseri	3
3. HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI	5
3.1. JAK/ STAT Sinyal Yolağı	5
3.2. Fosfotidil Inositol Kinaz/ Protein Kinaz B (PI3K/ AKT) Yolağı	6
3. 3. MAPK Yolakları	9
3. 3. 1. Klasik MAPK Yolağı	10
3. 3. 2. Stresle Aktive Olan Protein Kinaz (SAPK/ JNK) Yolağı	12
3. 3. 3. p38 MAPK Yolağı	13
4. HALOFUGİNON	14
5. MATERYAL VE METOT	16
5. 1. Materyal	16
5. 1. 1. Cihazlar	16
5. 1. 2. Kimyasal Maddeler	16
5. 1. 3. Solüsyonlar ve Kullanılan Ajan	17
5. 2. Metot	19
5. 2. 1. Kültür Hücreleri ve Büyütme	19
5. 2. 2. Hücre Ekimi ve Saklama	20

5. 2. 3. Hücre Pasajlama	20
5. 2. 4. HF'nin Hücre Morfolojisine Etkisinin Belirlenmesi	20
5. 2. 5. HF'nin Hücre Canlılığına Etkisinin Değerlendirilmesi	21
5. 2. 6. HF'nin Sinyal Yolaklarına Etkisinin Protein Düzeyinde İncelenmesi	21
5. 2. 6. 1. Hücre Sayısının Belirlenmesi	21
5. 2. 6. 2. HF Uygulamaları	22
5. 2. 6. 3. PI3K İnhibitörünün Kullanımı	22
5. 2. 6. 4. Hücre Lizizi	22
5. 2. 6. 5. Protein Miktarının Belirlenmesi	22
5. 2. 6. 6. SDS- PAGE ve Western Blotlama Yöntemi	23
5. 2. 6. 7. Stripleme	25
6. BULGULAR	26
6. 1. Halofuginonun Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkisi	26
6. 2. Halofuginonun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	28
6. 3. Halofuginonun JAK/ STAT Yolağına Etkisi	29
6. 4. Halofuginonun PI3K/ Akt Yolağına Etkisi	31
6. 5. Halofuginonun MAPK Yolağına Etkisi	34
6. 6. Halofuginonun SAPK/ JNK ve p38 MAPK Yolaklarına Etkisi	36
6. 7. İstatistiksel Analizler	38
7. TARTIŞMA	39
8. SONUÇ	42
 KAYNAKLAR	 43
ÖZGEÇMİŞ	51
EKLER	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
μL	:	Mikrolitre
μM	:	Mikromolar
mL	:	Mililitre
nM	:	Nanomolar
AP-1	:	Aktive edici Protein 1
APS	:	Amonyum Persülfat
CCD	:	Sarmal Bobinli Alan
DBD	:	DNA Bağlama Alanı
ERK	:	Hücre dışı Sinyalle Düzenlenmiş Kinazlar
FBS	:	Fetal Bovin Serum
GAP	:	GTPaz Aktive Edici Protein
GAS	:	Gama Aktive Edilmiş Bölge
GEF	:	Guanin Değişim Faktörleri
GPRC	:	G Proteinle Eşleşen Reseptörler
HF	:	Halofuginon
JAK	:	Janus Kinaz
JNK	:	c- Jun NH ₂ Terminal Kinaz
MAPK	:	Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz
MM	:	Malignant Mezotelyoma
NSCL	:	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
NSCLC	:	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
PDK1	:	Fosfoinositide Bağımlı Kinaz 1
PI3K	:	Fosfotidil Inositol 3 Kinaz
PIP2	:	Fosfotidil Inositol (4, 5) Bisfosfat
PIP3	:	Fosfotidil Inositol (3, 4, 5) Trifosfat
PTEN	:	Fosfataz ve Tensin Homolog
RTK	:	Reseptör Trozin Kinazlar
SAPK	:	Stres Aktivasyonlu Protein Kinaz

SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS- PAGE	:	Sodyum Dodesil Sülfat- Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
STAT	:	Sinyal Transdüserleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri
SV40	:	Simian Virüs 40
TAD	:	Transkripsiyonel Aktivasyon Alanı
Wort	:	Wortmannin

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Sağlıklı hücrenin ve kanser hücresinin çoğalması.	2
3.1: JAK/ STAT yolağı.	6
3.2: PI3K/ Akt yolağı.	7
3.3: Akt ve apoptotik proteinler arasındaki ilişki.	8
3.4: MAPK yolakları.	9
3.5: Ras'ın aktif ve inaktif durumları.	10
3.6: Klasik MAPK yolağı.	11
3.7: SAPK/ JNK yolağı.	12
3.8: p38 MAPK yolağı.	13
4.1: <i>Dichroa febrifuga</i> .	14
4.2: Halofuginonun moleköl yapısı.	14
6.1: HF'nin hücre morfolojisine etkisinin incelenmesi.	27
6.2: HF'nin hücre canlılığına etkisinin ve doz-yanıt ilişkisinin incelenmesi.	29
6.3: HF'nin JAK/ STAT yolağına etkisinin incelenmesi.	31
6.4: HF'nin PI3K/ Akt yolağına etkisinin incelenmesi.	33
6.5: HF'nin wortmannin ile birlikte kullanımının Akt proteini üzerine etkisinin incelenmesi.	34
6.6: HF'nin MAPK yolağına etkisinin incelenmesi.	35
6.7: HF'nin SAPK/ JNK ve p38 MAPK yolaklarına etkisinin incelenmesi.	36
6.7.Devamı: HF'nin SAPK/ JNK ve p38 MAPK yolaklarına etkisinin incelenmesi.	37

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.	23
5.2: ECL hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.	24

1. GİRİŞ

Son yıllarda, kanser tedavisine yönelik olarak, özellikle bitkisel kaynaklı ilaçların üretimine önem verilmektedir. Bunun nedeni, bu moleküllerin doğal olarak anti-kanserojen özellikler göstermesidir. Halofuginon (HF), *Dichroa febrifuga* bitkisinden elde edilen bir maddedir. HF'nin bazı kanser hücrelerinde hücre döngüsünü durdurduğu, proliferasyonu azalttığı ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir. Bilindiği gibi, hücre sinyal ileti sistemlerindeki bozukluklar, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve baskılanmış apoptoza neden olmaktadır. Bu durumlar da hücreleri kanserleşme sürecine yönlendirmektedir. Bu nedenle, kanserli hücrelerdeki sinyallerinin irdelenmesi önemli ve gereklidir. HF'nin kolon kanseri hücrelerinde TGF- β bağımlı Smad yolağını ve AKT/ mTORC1 yolağını blokladığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada HF'nin karaciğer kanseri hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu kapsamda özellikle son yıllarda, Ras/ MAPK ve PI3K/ AKT yolaklarını hedefleyen moleküller ilaç geliştirilmesinde odak noktası olmuştur. Farklı çalışmalar var olsa da HF'nin sinyal yolaklarına ve moleküler mekanizmasına etkisinin malignant mezotelyoma (MM) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerine ilişkin literatürde veriye rastlanılmamıştır. Bu çalışmada bilgilerimiz doğrultusunda HF'nin malignant mezotelyoma ve akciğer kanseri hücre proliferasyonu ve ilgili sinyal yolaklarına etkisi ilk kez bu proje sayesinde incelenmiştir.

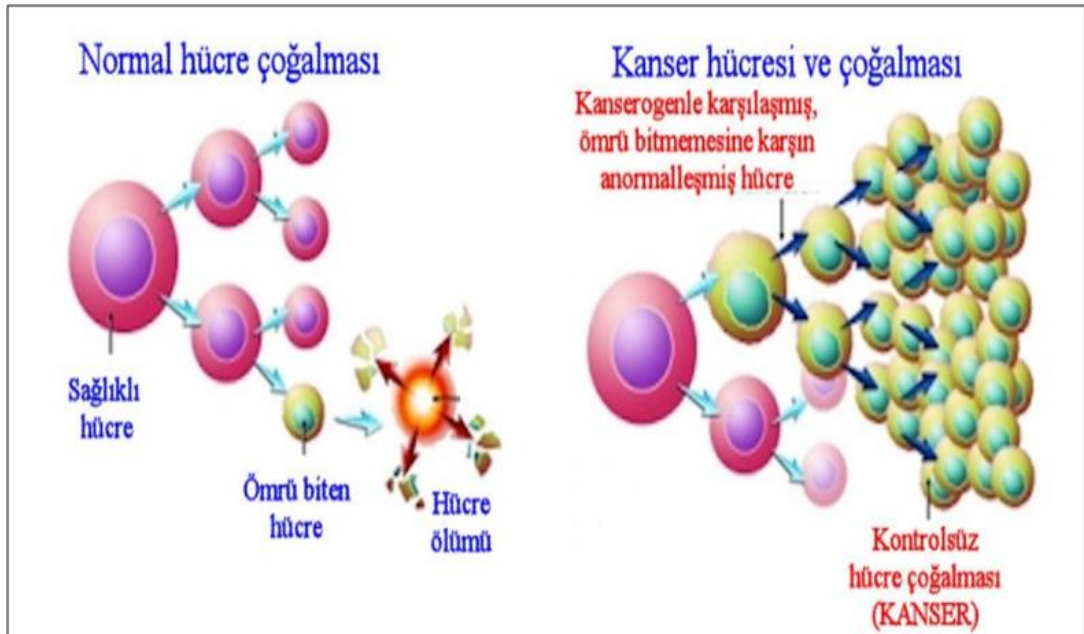
1.1. Tezin Amacı ve Katkısı

Bu tez çalışmasında HF'nin MM (SPC212), mezotelyoma (MeT-5A), NSCLC (A549 ve H1299) canlılığı üzerine etkisi ile hücrelerin çoğalması, sağ kalımı, farklılaşması ve apoptoz gibi pek çok süreçte görev alan sinyal yolaklarına (STAT3, AKT, ERK1/ 2, SAPK/ JNK ve p38 kinaz) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

HF'nin hücre canlılığına etkisi morfolojik, fizyolojik ve protein düzeyinde incelenmiştir. Bu incelemeler yapılırken mikroskopik analiz, sitotoksikite testi ve SDS-PAGE/ Western blot teknikleri kullanılmıştır.

2. KANSER

Önemli bir halk sağlığı sorunu olan kanser, dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada gelmektedir [1]. Doku seviyesinde çeşitli bir hastalık olması teşhisin zorluğunu ve tedavi sürecini de etkilemektedir [2]. Kanserın görülme sıklığı incelendiğinde erkek bireylerde daha çok prostat, akciğer ve bronş, kolon ve rektum, idrar kesesinde görülürken; kadınlarda meme, akciğer ve bronş, kolon ve rektum, tiroid kanserlerine daha yüksek oranda rastlanmaktadır. Çocuklarda ise kan kanseri, beyin ve lenf bezleriyle ilişkili kanerler en çok görülen kanser türleridir [2]. Kanserler, hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol eden düzenleyici sisteme zarar veren somatik mutasyonların sonucu olarak gelişmektedir [3]. Kimyasal bileşikler ve gen mutasyonları kanser hücrelerinin oluşmasında belirgin bir role sahiptir. Kanserojen özelliklere sahip çevresel kimyasal maddeler, hücrelerin sitoplazmasını ve çekirdeğini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek genetik bozukluklara ve mutasyonlara yol açar. Virüsler, bakteriler ve radyasyon ışınları, tüm kanserlerin yaklaşık %7'sini içeren diğer kanserojen faktörlerdir. Şekil 2.1'de belirtildiği gibi kanser, hücrel ilişkileri bozar ve hayati genlerin işlevsizliğine neden olur. Tümör baskılayıcı genlerin kaybı da kanserin nedenleri arasındadır [2].



Şekil 2.1: Sağlıklı hücrenin ve kanser hücresinin çoğalması.

2. 1. Malignant Mezotelyoma

Malignant mezotelyoma (MM), uzun süreli olarak asbeste maruz kalmış bireylerde görülen, plevra ve peritonu çevreleyen hücrelerden kaynaklanan kötü huylu bir kanser türüdür [4], [5]. Kadınlara oranla erkeklerde daha yaygın olan MM ilerleyen yaşlarda daha çok görülmektedir. Nefes darlığı (%90), yorgunluk (%36), kabızlık, terleme ve öksürük (%22) [6], bunların yanında kilo kaybı ateş, ses kısıklığı ve omuz ağrısı en yaygın görülen belirtilerindendir. MM, %80 oranında asbestos fiberlerinden kaynaklanmakla birlikte, simian virus 40 (SV40), radyasyon ve erionit minerali de neden olmaktadır [7], [8]. Yapılan moleküler çalışmalarda insanların ve hayvanların asbest kaynaklı tümör oluşumuna karşı genetik yatkınlığının olduğu bilinmektedir [9]. Ayrıca asbestin yoğun olduğu iş ortamlarında asbeste yönelik alınan önlemlerin artmasıyla mezotelyoma oranı düşerken, önlem alınmayan ortamlarda mezotelyoma ile karşılaşma durumunun aynı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte mezotelyoma riskini taşıyanlar sadece çalışanların değil aile bireylerinin de bu risk altında olduğu belirtilmiştir [4]. Bu çalışma ortamlarına tekstil, tersane, izolasyon maddeleri, çatı kaplama maddeleri, yanmaz maddeler ve gaz maskesi imalatı gibi alanlar örnek verilebilmektedir. Asbest mineral lifleri ve tozlarının solunumuna bağlı akciğer hastalıkları, Türkiye’de önemli bir sağlık sorunudur. Hastalıkların yoğun olduğu bölgeler arasında Trakya’nın birkaç köyü, Kütahya, Afyon, Eskişehir, Konya, Çankırı, Yozgat, Sivas ve Diyarbakır bulunmaktadır. Yapılan tıbbi araştırmalarda asbest liflerinin iç ve dış ortam yoluyla solunması sonucu akciğer zarında kireçlenme ve kalınlaşma, su toplanması, MM’nin yanı sıra karın zarı kanserine neden olduğu da ortaya konmuştur [10]. Kapadokya köylerinde ise erionit ile ilgili hastalıklar daha çok görülmektedir [11]. Erionit lifleri fibröz bir yapı özelliğine sahip olup asbest liflerine göre çok daha güçlü karsinojendir. Türkiye ve Oregon'dan alınan erionit örnekleri ile yapılan çalışmada, örnekler farelere soluma yoluyla verilmiş, bunun sonucunda farelerde yüksek oranda MM oluşumu gözlenmiştir [12].

2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer almaktadır. Akciğer kanserinin küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve

küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) olmak üzere iki çeşidi vardır. Bununla birlikte %85 ini NSCLC oluşturmaktadır [13]. Periferik veya dış alanlarda gelişim gösteren adenokarsinomlar, akciğerin merkezinde oluşan skuamöz hücreli karsinomlar ve akciğer dokusunun herhangi bir yerinde bulunabilen büyük hücreli karsinomlar olmak üzere 3 türü bulunmaktadır. Bunlar daha çok sigara içmeye bağlı olarak gelişmektedir. SCLC, NSCLC'den farklı olarak bronşlarda, göğsün ortasındaki hava yollarında başlar ve sigara içmeyen kişilerde nadiren görülmektedir. Yine SCLC, NSCLC'den daha hızlı bir şekilde diğer organlara yayılmaktadır. Belirtileri arasında MM'ye benzer olarak nefes darlığı, öksürük, göğüs ağrısı, kilo kaybı, yüz ve boyunda şişme sayılabilmektedir. Araştırmalar, kanser vakalarının sigara içmeye bağlı olarak erkeklerde %90'dan fazla iken kadınlar arasında % 80'in üzerinde olduğunu göstermiştir [14]. Kanser hücrelerini öldürmek için hastalığın evresine bağlı olarak hastalara kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır. Cerrahi tedavi ve çok yönlü tedavisindeki ilerlemelere rağmen, akciğer kanseri halen dünya çapında kötü huylu hastalıklardan önde gelen ölüm nedenidir [15].

3. HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI

3.1. JAK/ STAT Sinyal Yolağı

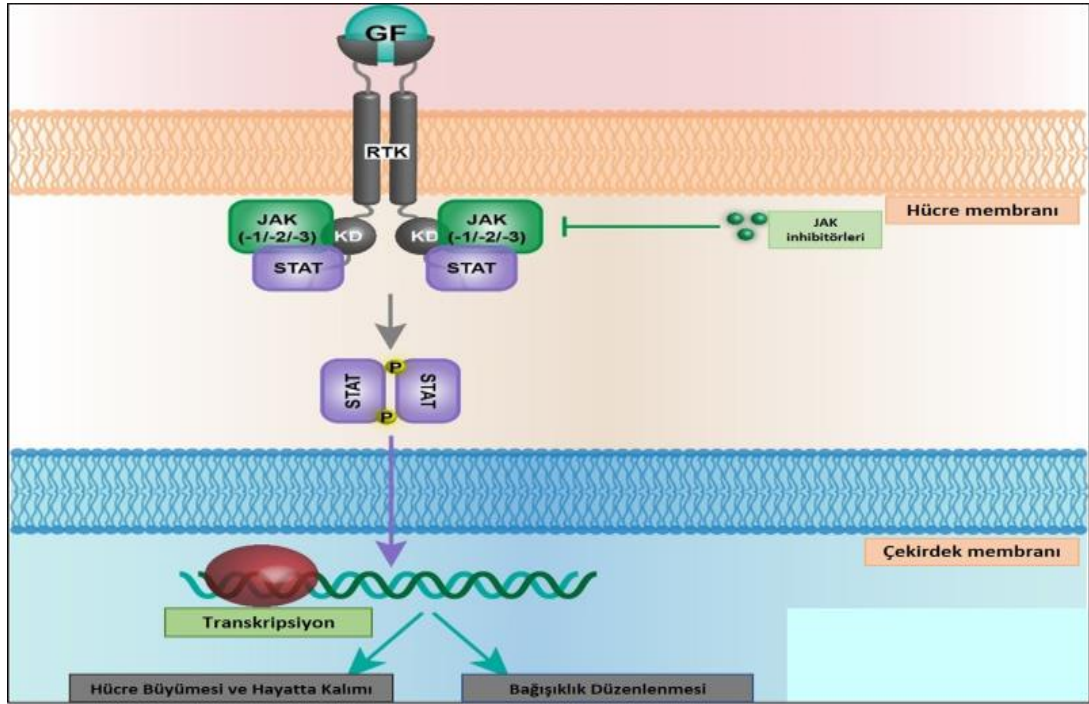
Janus Kinaz/ Sinyal Transdüserleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri (JAK/ STAT) yolağının aktivasyonu, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, hücre migrasyonunu ve apoptozu düzenlemede görevlidir [16], [17], [18], [19].

JAK ailesi memelilerde JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 olmak üzere 4 üyeden oluşur [20]. Bunlardan üçü (JAK1, JAK2, TYK2) her yerde bulunurken, JAK3 çoğunlukla hematopoietik hücrelerde bulunur [20]. STAT ailesi ise STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 olmak üzere 7 üyeye sahiptir. STAT' lar, N- terminal alanında sarmal bobinli alan (CCD), DNA bağlama alanı (DBD), bağlayıcı bölge ve SH2/ tirozin aktivasyon alanı dahil olmak üzere yüksek ölçüde korunmuş bölgeleri olan ortak bir yapısal organizasyona sahiptir. N terminalin aksine karboksi- terminal transkripsiyonel aktivasyon alanı (TAD) oldukça farklıdır. N-terminal alanı, tandem gama-aktive edilmiş bölge (GAS) elemanları, STAT'ların reseptör alanları ile etkileşimi ve nükleer translokasyon ile ilişkilidir. CCD, diğer sarmal proteinlerle spesifik etkileşimlere girer buna ek olarak, tirozin fosforilasyonu ve nükleer ihracat ile ilişkilidir [20].

Bir peptit ligandının (örneğin sitokin) ilgili homodimerik veya heterodimerik reseptörlere bağlanmasıyla JAK/ STAT sinyalleri başlar. JAK'lar, tirozin kinaz aktivitesine sahip olduğu için bu aktiviteye sahip olmayan ve yüzeyde bulunan reseptörlerin ihtiyaç duyduğu proteinlerdir. Şekil 3.1'de de gösterildiği üzere sinyal molekülü reseptöre bağlanır ve oluşan dimer sitoplazmik kısımda bulunan JAK proteinine bağlanmış olur.

Diğer bir deyişle reseptör oligomerizasyonu ve konformasyonel değişiklik sonucu yakın konuma gelen JAK'lar birbirlerini fosforilleyerek aktif hale gelirler. Aktive edilmiş JAK'lar daha sonra, sitokin reseptörlerinin fosforilasyonuna yol açarak STAT moleküllerinin o bölgelere bağlanması için çekim alanı oluşturur. STAT'lar bu bölgelere gelirler. STAT'ların Src homolog 2 (SH2) uçlarının bir başka STAT'ın fosfotirozin rezidüsüne bağlanabilme yeteneği vardır. Böylece iki STAT proteini fosfotirozin etkileşimleri yoluyla dimerleşirler ve reseptörden ayrılarak aktif hale

gelirler. Aktif hale gelen STAT'lar, hücre çekirdeğine geçer ve hedef genleri aktifleştirerek transkripsiyonu başlatır [19].



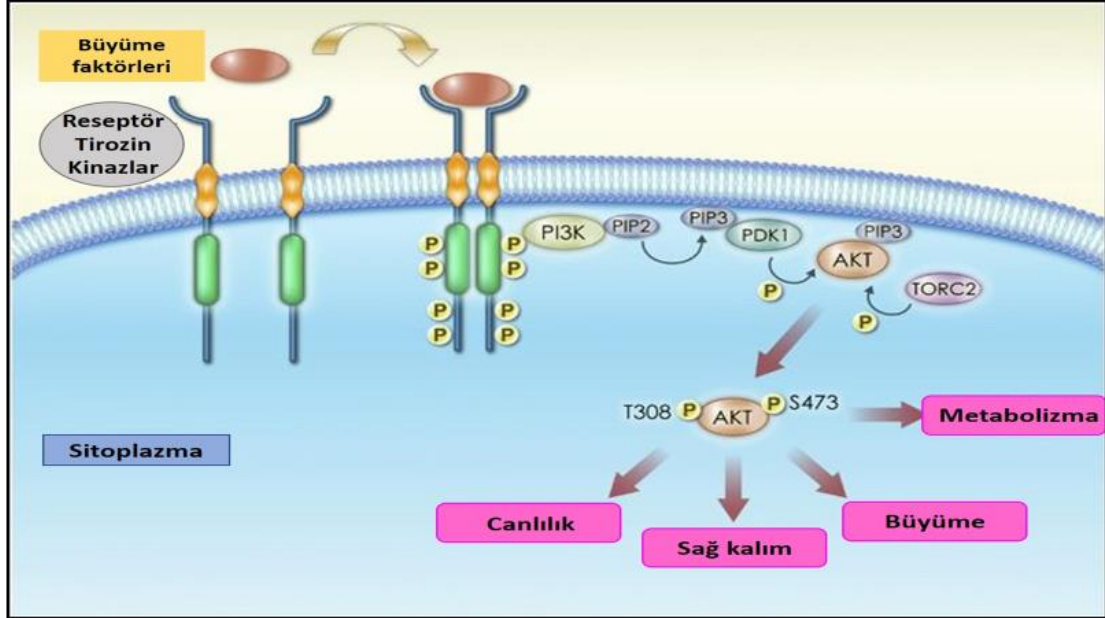
Şekil 3.1: JAK/ STAT yolağı.

JAK/ STAT sinyal yolağında meydana gelen problemler kanser başta olmak üzere hematolojik hastalıklar, immün yetmezlik gibi durumlara neden olmaktadır. JAK/ STAT yolağı üyeleri olan STAT3 ve STAT5 birçok kanser hücresinde önemli derecede aktive olur [21], [22]. Kanser gelişimi ve ilerlemesine sebep olmakla birlikte hayatta kalmasına da neden olmaktadır. Bunlarla birlikte kanser hücrelerinde bu yolağın baskılanması, kanserin büyümesinin durmasını sağlayacağından dolayı bu yolağa hedefli olarak çalışılmaktadır [23], [24]. Bununla birlikte antikanserojen olarak önerilen Kukurbitakin B isimli maddenin prostat kanseri ile yapılan araştırmada ilgili maddenin JAK/ STAT yolağını baskıladığı, apoptozu uyardığı bildirilmiştir [25].

3.2. Fosfotidil Inositol Kinaz/ Protein Kinaz B (PI3K/ AKT) Yolağı

Hücresinin çoğalması, hayatta kalması, hareketi ve invazyonu gibi süreçlerde rol oynayan önemli bir sinyal iletimi sistemi fosfotidilinositol 3 kinaz/ protein kinaz B

(PI3K/ AKT) yolağıdır [26]. PI3K enzimleri lipid kinazlar olarak fonksiyon gösterirler [27]. Bu enzimler hem reseptör tirozin kinazlar (RTK) hem de G- proteinle eşleşen reseptörler (GPCR) ile aktifleşebilirler.



Şekil 3.2: PI3K/ Akt yolağı.

PI3 kinaz, PIK3CA geninin kodladığı katalitik aktiviteye sahip olan p110 ve PIK3R1 geni tarafından kodlanan düzenleyici rol oynayan p85 proteinlerinden oluşan bir heterodimer yapı gösterir. GTP-Ras, doğrudan p110'a bağlanarak bu heterodimeri etkin hale getirir. Aktifleşen PI3K, hücre membranında inositol fosfolipitlerin fosforilasyonunu katalizler. Yani PI3K aktifleştğinde fosfotidil inositol (4, 5) bisfosfat (PIP2)'yi inositol halkasının üçüncü pozisyonundan fosforile ederek fosfotidil inositol (3, 4, 5) trifosfat (PIP3)'a dönüştürür. Zarda oluşan PIP3, serin treonin kinaz olan AKT ve fosfoinositide bağımlı kinaz-1 (PDK1) için bir bağlanma hedefi haline gelir ve bunların aktivasyonundan sorumludur. AKT ve PDK1, yapılarındaki plektrin homoloji domaini aracılığı ile PIP3'e bağlanır. İki proteinin PIP3 aracılığı ile zara bağlanmasıyla PDK1 proteini, AKT'yi fosforilasyonla aktifleştirir (Şekil 3.2) [28], [29], [30]. Sonrasında ise AKT, hücre içinde hedefi olan çeşitli proteinlerin fosforilasyon ile aktifleşmesini sağlar [28]. Bunlardan biri kinaz aktivitesine sahip olan mTOR (mammalian target of rapamycin) proteinidir [31].

Çok hücreli organizmaların embriyonik gelişimi, hücre yaşlanması gibi hayati süreçlerde rol oynayan ve programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz [32], [33],

mitokondriyel yolak da denilen içsel ve dışsal olmak üzere iki ayrı sistem üzerinden devam eder. Mitokondriyel yolakta Bcl-2 ailesi görev almaktadır. Bu ise Akt'nin doğrudan etkin rol aldığı hücresel mekanizmalardan biridir. Hücrelerin sağ kalımında görevli olan bu yolak proteini, apoptozda işlev gören proteinlerle de bağlantı halindedir [34]. Akt, Bad, Bax ve Bim dahil olmak üzere proapoptotik Bcl-2 aile üyelerini fosforile eder ve inhibe eder [34] (Şekil 3.3).

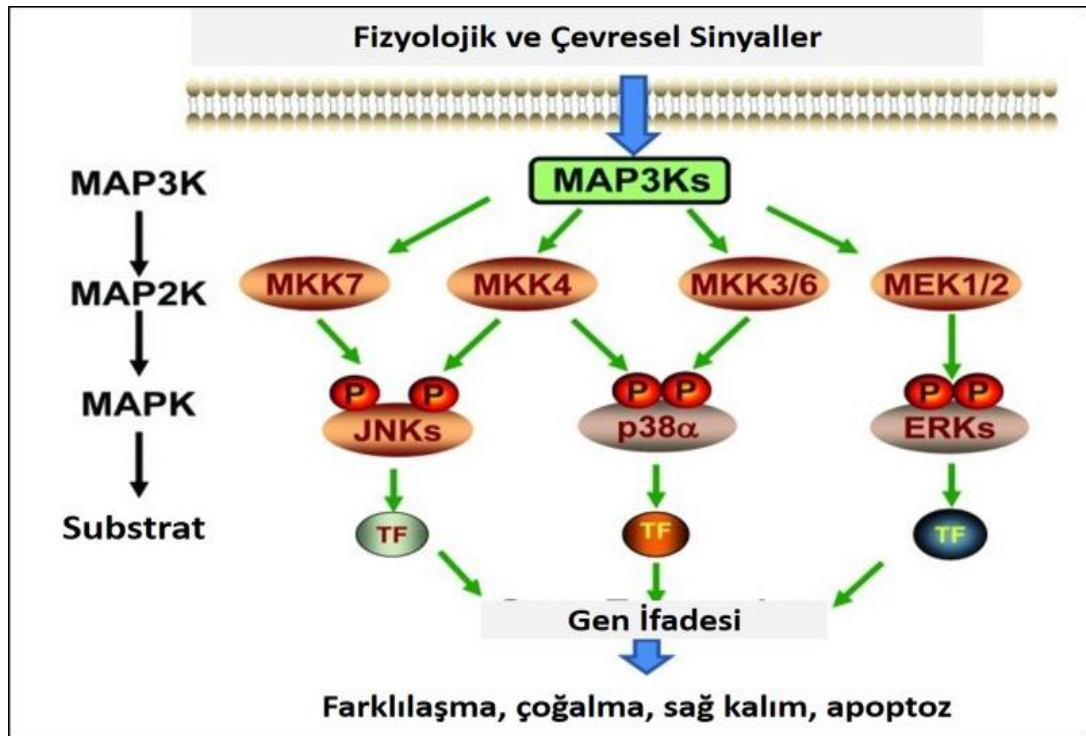
Şekil 3.3: Akt ve apoptotik proteinler arasındaki ilişki.

Bu sinyal iletiminin negatif düzenleyicisi olan fosfataz ve tensin homologu (PTEN) molekülünün işlevsiz hale gelmesi, PI3K sinyal iletim sistemini hücrede sürekli aktif hale getirir [35]. PI3K/ AKT yolunun bloke edilmesi, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini inhibe ederek onları programlanmış hücre ölümüne duyarlı hale getirebilmektedir [28]. EGF ve PDGF gibi bazı büyüme faktörlerinin PI3K yolunu uymalarında Ras, en az düzeyde etki gösterir. PI3K yolunun güçlü bir aktivatörü olan onkogenik Ras, bu yolu aktive ederek apoptozu baskılar. Ras ile birlikte PI3K/ AKT yolağı ile bağımlı tümörlerin oluşmaya başlamasında ve devamında; AKT'nin

aşırı aktivasyonu, p110'u kodlayan PIK3CA genindeki mutasyonlar, tümör baskılayıcı gen olan PTEN'in kaybı veya mutasyona uğraması neden olmaktadır [28].

3.3. MAPK Yolakları

MAP kinazlar büyüme faktörleri ve mitojenler tarafından aktive edilen serin ve treonin kinazlardır. Ökaryotik hücrelerde bulunan bu proteinlerin görevi hücre membranından çekirdeğe bilgi taşımaktır. Bu sayede transkripsiyon faktörlerini aktif veya inaktif duruma gelmesiyle transkripsiyon tetiklenmiş olur. Hücre çoğalması, büyümesi, hayatta kalması ve apoptoz gibi süreçlerde görevli olan MAPK ailesi temel olarak ERK (Hücre dışı Sinyalle Düzenlenmiş Kinaz Ailesi), genetik veya çevresel stres durumlarında aktive edilen p38 MAP kinaz ailesi ve SAPK/ JNK (Stresle Aktive Protein Kinazlar/ c-Jun NH₂ Terminal Kinaz) olmak üzere 3 alt grupta kategorize edilir [36]. Bu gruplardan p38 ve JNK daha çok hücre invazyonu, hayatta kalması ve ölümü ile ilgili durumlarda aktive edilirken, ERK yolu ise büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi süreçlerde aktif rol oynamaktadır [37] (Şekil 3.4).

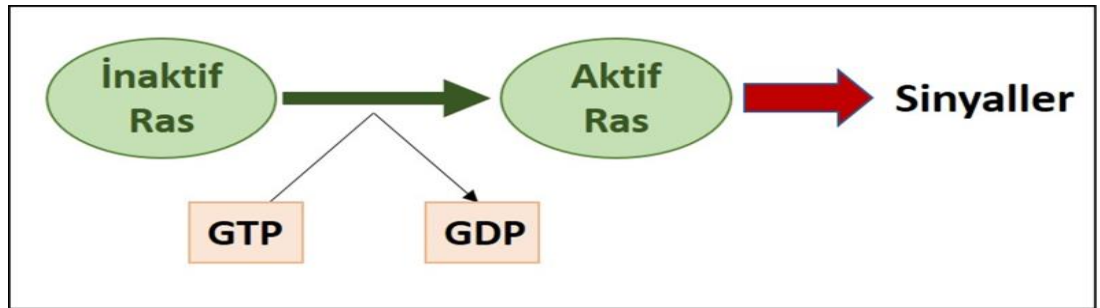


Şekil 3.4: MAPK yolakları.

3. 3. 1. Klasik MAPK Yolağı

Klasik MAPK yolağı, hücrenin büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve apoptoz, gibi temel hücresel programları aktive eden bir sinyal sistemidir. Tüm ökaryotik hücrelerde ifade edilen MAPK'lar; MAPK kinaz kinaz (MKKK/ MAP3K), MAPK kinaz (MKK/ MAP2K) ve MAPK olmak üzere üç ana bileşen içermektedir [38], [39], [40].

MAPK yolaklarının en çok çalışılmış olan proteini olan ERK [41] yolağı genellikle Ras'ın aktivasyonu ile başlar. Hücre membranının iç yüzeyine yerleşen Ras proteinleri; protein taşınmasını, gen ifadesini, hücre iskeletinin düzenlenmesini ve büyüme faktörlerinin sinyal iletimini düzenlerler. H-ras, N-ras ve K-ras olmak üzere de 3 alt türe sahiptir [3], [28], [42]. GTPaz aktivitesine sahip olan Ras proteini 21 kDa ağırlığına sahip monomerik bir G proteinidir. Ras'ın aktivasyonu ile birlikte, Ras efektörü olarak tanımlanmış ilk protein olan Raf, sinyalleri başlatır. ERK aktivasyonu, Raf ve MEK (MAP Kinaz veya ERK Kinaz) olmak üzere iki protein kinaz tarafından sağlanır. Böylece hücre içerisindeki pek çok proteini etkileyerek onların şekillerinin değişmesine ve fosforlanmasına yol açarak sinyal iletimini tetikler [31].

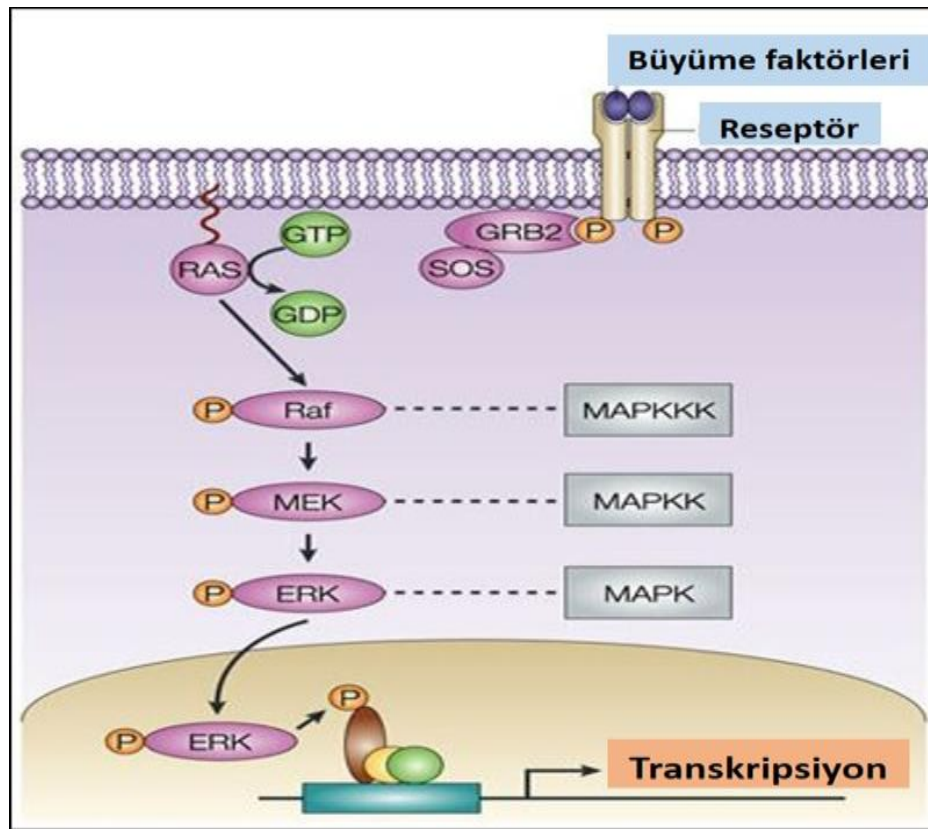


Şekil 3.5: Ras'ın aktif ve inaktif durumları.

Şekil 3.5'de ifade edildiği üzere Ras'ın GTP (Ras-GTP) bağlı formundan GTP hidrolizinin tetiklenmesiyle gama fosfat uzaklaştırılır ve GTP, GDP'ye dönüştürölmüş olur. Bu durumda GTP bağı G proteini etkisini kaybeder, sinyal iletimi kapalı konuma getirilir. Kapalı konuma getirilmesi ise GAP (GTPaz aktive edici protein)'lar ile gerçekleştirilir [3]. GEF (Guanin değişim faktörleri) proteinleri ise kapalı konumda olan Ras-GDP formu ile etkileşir ve GDP'nin uzaklaşarak yerine GTP bağlanması sağlamış olur. Aktif haldeki GTP-Ras, bir serin/ treonin kinaz olan Raf proteinini

fosforilleyerek aktive eder. Bu sayede sistem yeniden açık hale gelerek etkin konuma getirilmiş olur [43].

Şekil 3.6’da gösterildiği gibi Ras, alt akıştaki moleküllerden Raf (MAP3K)’ı, MAP3K da MAP2K’yı fosforilasyonla aktive eder ve o da, serin ve treonin kalıntılarından fosforillemek üzere ERK (MAPK)’i aktive eder [44]. Aktif olan MAPK, uygun biyolojik yanıtı yürüten protein fonksiyonunda ve gen ekspresyonunda değişiklikler meydana getirmek için sitozoldeki ve çekirdekteki transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlar [45].



Şekil 3.6: Klasik MAPK yolağı.

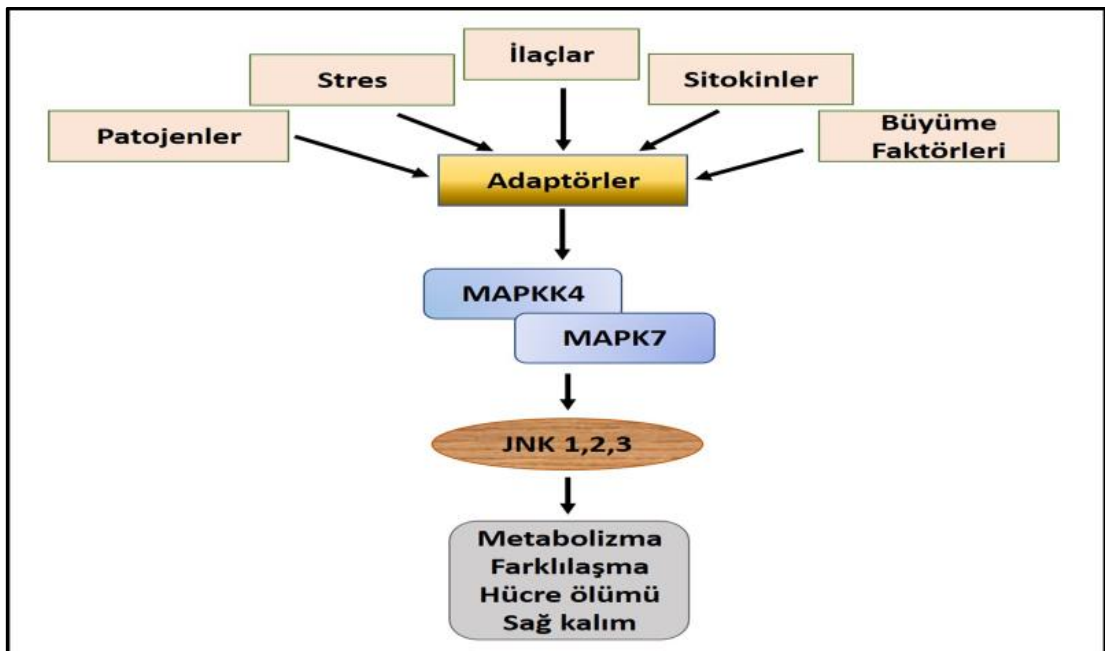
Ayrıca aktif hale gelen Raf-Ras-MEK-ERK sinyal iletimi, memeli hücre hatlarının onkogenik transformasyonu için yeterli olmakla birlikte benzer herhangi bir bozulması insanda kanserleşmeye yol açmaktadır [46]. Kanserın çeşitli aşamalarında önemli rol alan Raf-Ras-MEK-ERK iletimi hücrenin sağkalımını da sağlamaktadır. İnsan kanserlerinin yaklaşık %30’unun Ras proteinleri ile ilgili olduğu gösterilmiştir [47]. Yani Ras genleri kanserde en sık mutasyona uğrayan onkogenleri içerir [48].

3. 3. 2. Stresle Aktive Olan Protein Kinaz (SAPK/ JNK) Yolağı

MAPK yolak ailesinin diğ er bir dalı, genotoksik, hipoksik, ozmotik veya oksidatif h ucresel stres uyaranları [36] karşısında aktive olan c-jun terminal kinaz (JNK) proteinlerini içerir [42], [49] (şekil 3.7). Morfogenez, h uce çoğalması, farklılaşma, hayatta kalma ve ölüm dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci düzenleyen ana protein kinazlar [49] olan JNK'ların apoptozu arttırdığı da bilinmektedir [50]. JNK proteinlerini, JNK1, JNK2 ve JNK3 olmak üzere 3 gen kodlar. JNK1 ve 2 tüm hücrelerde ifade edilirken JNK3 ifadesi beyin, kalp ve testiste ifade edilir [42], [51].

JNK için önemli bir substrat, serin 63 ve 73'ten fosforile edildiğinde, AP- 1 transkripsiyonel aktivitesinin artırılmasına yol açan transkripsiyon faktörü c-Jun'dur. JNK'lar ayrıca ATF- 2, NFAT1, HSF- 1 ve STAT3 de dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerini de aktive edebilir.

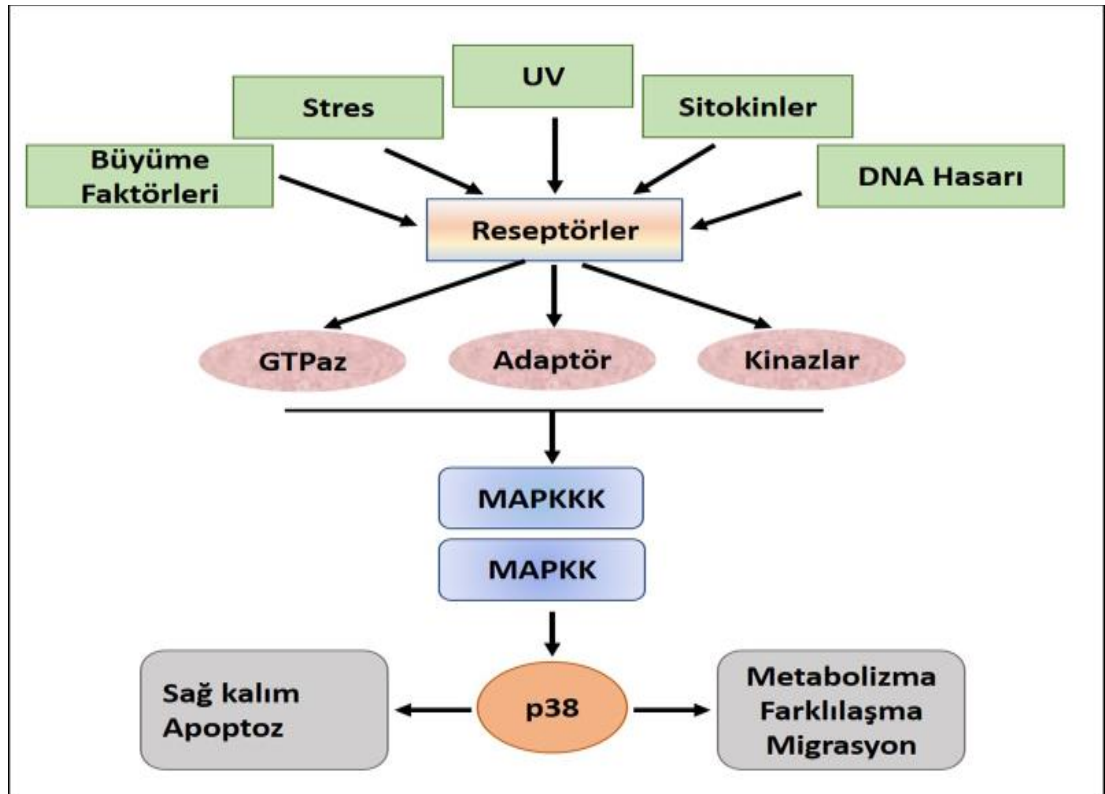
JNK'ların aktivasyonu ile kanserin gelişimi arasında ilişki olduğu araştırmalarda giderek daha da anlaşılmaktadır [49]. JNK'ların normal olmayan ifade düzeyleri birçok kanser hücresi hattında [51], diyabet hastalarında ve nörodejeneratif hastalıklarda karşılaşılmaktadır. Ras, c-fos, Met ve Bcr-Abl gibi çeşitli onkogenler JNK sinyaline bağlı olarak kanserin gelişimine neden olmaktadır [52].



şekil 3.7: SAPK/ JNK yolağı.

3. 3. 3. p38 MAPK Yolağı

Stres karşısında aktive edilen diğer modüler MAPK sistemi p38'dir. p38 MAPK, apoptoz, farklılaşma, hayatta kalma, çoğalma, gelişme, inflamasyon gibi stres yanıtlarında önemli bir rol oynamaktadır [42], [53] (Şekil 3.8). p38'in MKK3 ve 6 tarafından fosforile edilen α , β , γ , δ olmak üzere 4 izoformu bilinmektedir. p38 α , siklinlerin aşağı regülasyonu ve CDK inhibitörlerinin yukarı regülasyonunu içeren, G1/ S ve G2/ M geçişlerinde hücre döngüsünün negatif düzenleyicisi olarak görev alır [54]. p38-MAPK α ve p38-MAPK β sırayla ifade edilirken, p38-MAPK γ ve p38-MAPK δ doku tipine bağlı olarak farklı şekillerde ifade edilirler.



Şekil 3.8: p38 MAPK yolağı.

p38 MAPK hücre ölümünün düzenleyicisi olarak görev alarak hem uyarıcı tipine hem de hücre tipine bağlı olarak hücre sağ kalımı veya ölümüne yönlendirilmesinde rol alır. p38'in meme, mesane, akciğer ve karaciğer kanserlerinde önemli görevi olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir.

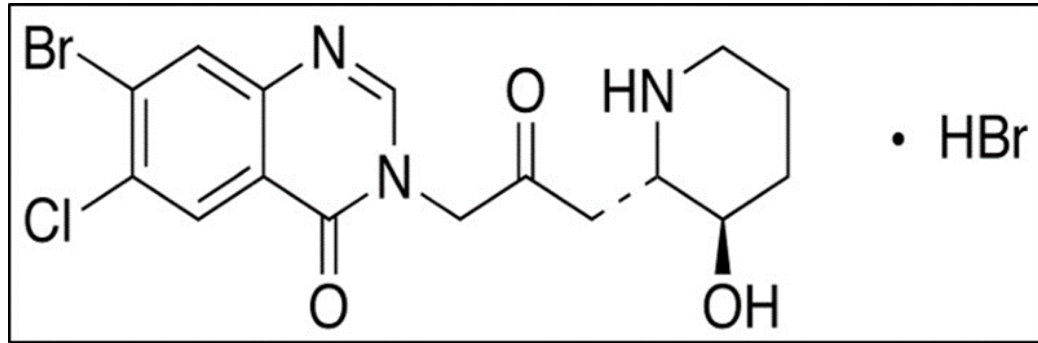
4. HALOFUGİNÖN

Dichroa febrifuga (Şekil 4.1), ılıman bölgelerde yetişebilen ve 1 ile 3 metre boyutlarında olabilen tropik bir bitkidir. Bitkinin yaprak ve köklerinden izole edilen febrifugin ve isofebrifugin analogları çeşitli tedavilerde kullanılmaktadır [55].



Şekil 4.1: *Dichroa febrifuga*.

Halofuginon (Şekil 4.2) {7- bromo- 6- chloro- 3- [3- (3- hydroxy- 2- piperidiny)- 2- oxopropyl]- 4 (3H)- quinazolinone}, *Dichroa febrifuga* bitkisinden elde edilen febrifugin alkaloidinin analogudur [56], [57].



Şekil 4. 2: Halofuginonun molekül yapısı.

Geleneksel Çin tıbbında kullanılan [55] HF anti- malarya tedavisinde de kullanılmaktadır. Anti- malaryal aksiyonunun kanda prolyl- tRNA synthase (ProS) aktivitesini inhibe ederek bu sayede yüksüz tRNA toplanmasına ve prolin seviyesinin düşmesine yol açtığı belirlenmiştir [58]. HF'nin seçici olarak T hepler-17 (Th17)

farklılaşmasını ve Th17 ile ilişkilendirilen otoimmün ensefalomyelitisin oluşumunu engellediği belirtilmiştir [59]. HF'nin diğer önemli bir özelliği ise antifibrotik bir ajan olmasıdır [60], [61]. Bunlardan hareketle antifibrotik ve antienflamatuvar özelliklere sahip olan HF'nin sıçanlarda bulunan kostik yaralanmayı iyileştirdiği yapılan çalışmada gösterilmiştir [62]. İnsan endotel hücrelerini H₂O₂ kaynaklı yaralanmaya karşı koruduğu da araştırmalarda bildirilmiştir [63]. Yara iyileştirme çalışmalarına ek olarak, kollajenlerle ilgili yapılan çalışmada HF'nin MAPK/ ERK yolağı üzerinden etkisi incelenmiş ve ERK1/ 2'nin uyarıldığı görülmüştür, böylece yara iyileştirme özelliği olduğu vurgulanmıştır [64].

HF'nin TGF- β bağımlı SMAD3 fosforilasyonunu inhibe ederek, SMAD7 ifadesini de yükselttiği farklı hücrelerde gösterilmiştir [65], [66], [67], [68]. HF'nin *in vivo* çalışmalarda tümörlere hiçbir tepki göstermeyen farede [69], idrar kesesi [60], wilms tumor [70], melanoma [71], pankreas [67] ve prostat [72] kanserlerinde canlılığı baskıladığı bildirilmiştir. HF'nin tek bir hücre [73] hariç tüm test edilen hücrelerde apoptoza neden olduğu belirlenmiştir [74], [75], [76], [77], [78]. Yine HF'nin, meme kanseri, kolorektal kanser ve melanoma gibi tümörlerin hücre çoğalmasını, metastazını ve invazyonunu [79], [80], ve HepG2 hücrelerinin [81] çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir.

HF'nin meme ve prostat kanserindeki kemik metastazını inhibe ettiği; TGF β ve BMP sinyallerinin baskıladığı yakın zamanda yapılan çalışmada gösterilmiştir. Buna bağlı olarak HF'nin, antikanserojen ilaç olarak kullanılan zelodronik asit (ZA) ile birlikte kullanımı tümör metastazını azalttığı belirtilmiştir [82]. HF'nin yapılan çeşitli çalışmalarda hücre canlılığını baskıladığı; mezenjiyal hücrelerinde [83], kronik eklem iltihabı olarak bilinen romatoid artrit hücrelerinde [84], akut lösemide [85] ve meme kanseri [86] hücrelerinde gösterilmiştir. Ayrıca HF'nin canlılığı baskılayarak, miyofibroblastların apoptozunu uyardığı da belirtilmiştir [87]. Multipl miyelom hücreleri ile yapılan çalışmada HF'nin JNK ve p38 aktivasyonunun artışı sağlayarak apoptozu uyardığı gösterilmiştir [88]. Bunun yanında karaciğer yıldızsı hücrelerinde de HF'nin hücre canlılığını baskımlarken p38 aktivasyonunu artırdığı belirtilmiştir [89].

5. MATERİYAL VE METOT

5. 1. Materyal

5. 1. 1. Cihazlar

CO₂ inkübatörü (Thermo Forma Hepa Filter), laminar akımlı kabin (Heraeus), su banyosu, ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ti), santrifüj (Beckman coulter allegra X-22, Eppendorf centrifuge 5810R), soğutmalı santrifüj (VWR Micro Star 17R), sıcaklık inkübatörlü çalkalayıcı (Biosan ES-20), plate reader (Varioskan flash), dikey elektroforez ve transfer sistemi (BioRad Mini Protean), hassas terazi (Precisa XB320M), vorteks (Dathan Scientific VM-10), manyetik karıştırıcı (Heidolph), rotater (BioCote), jel görüntüleme sistemi (BioRad, ChemiDoc XRS+), -80 °C dondurucu (Thermo Forma), sıvı azot tankı (Arpege 140), pH metre (Jenco), otoklav (Hirayama, 110), pipet tabancası (CappAid)), mikro pipetörler (Gilson, Eppendorf).

5. 1. 2. Kimyasal Maddeler

Halofuginone (Sigma Aldrich 64924-67-0), RPMI 1640 (Sigma Aldrich R6504; Lonza 15-7020; HyClone SH3001103), Medium 199 (Sigma Aldrich M5017), Fetal Bovine Serum (Gibco 10270), Penicillin- Streptomycin (Thermo, 15140122), Sodyum Bikarbonat (Sigma Aldrich S8875), İnsülin (Sigma, I6634), Hidrokortizon (Sigma-Aldrich H0888), EGF (Sigma-Aldrich E9644), L-Glutamin (Sigma-Aldrich G7513), Sodyum Pirüvat (Sigma-Aldrich P5280-100G), HEPES (Sigma-Aldrich H0891), D-Glukoz (Sigma-Aldrich 16301), Wortmannin (Calbiochem, 681675), DMSO (Merck, 1167431.1000), 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate tablets (Sigma-Aldrich N2765), PBS, Trypsin (Gibco 25200-056), Page Ruler Prestained (Thermo Scientific 26616), Acrlyamid/ bisacrlyamid (MP BIAC3752, %40; Applichem UN3426 ,%40), SDS (Merck, 817034), Trizma (Sigma, T1503), BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227), Yağsız süt tozu (Applichem non fat derived milk powder A0830), p- Coumaric Acid (Sigma-Aldrich, C9008), Luminol (Sigma-Aldrich, A8511), H₂O₂ (Riedel, 1831212V).

5. 1. 3. Solüsyonlar ve Kullanılan Ajan

- Halofuginon (HF):

Serum fizyolojik su içerisinde çözülerek 5 µM konsantrasyonlarda hazırlanarak kullanılmıştır. Ana stok ve diğer stokları -20 °C’de saklanmıştır.

- RPMI 1640:

SPC212 hücresi için RPMI 1640 ile hazırlanan besi yeri final konsantrasyonu 0,024 M olacak şekilde sodyum bikarbonat ekleyip 100 mL otoklavlanmış su ile çözülmüştür. %10 FBS ve %1 penisilin/ streptomisin içerecek şekilde son hacim su ile 500 mL’e tamamlanmıştır. A549 ve H1299 hücrelerinin besi yeri için ise final konsantrasyonları; 0,018M sodyum bikarbonat, 0,001M sodyum piruvat, 0,01M D-Glukoz, 0, 1 M HEPES eklenerek 100mL otoklavlanmış su ile çözülmüştür. %10 FBS ve %1 penisilin/ streptomisin de ekledikten sonra hacim 500 mL’e tamamlanmıştır.

- M199:

MeT-5A hücresinde kullanmak üzere hazırlanan besi yeri için kullanılan M199’a ilaveten final konsantrasyonları 1,25 g/L Sodyum bikarbonat, 0,75mM L-glutamin, 3,3nM EGF, 870nM insülin, 400nM hidrokortizon, 20mM HEPES eklenerek 100 mL otoklavlanmış su ile çözülmüştür. %10 FBS ve %1 penisilin/ streptomisin ekleyip son hacim 500 mL’e tamamlanarak hazırlanmıştır.

- Hücre Dondurma Besiyeri:

Hücreleri sıvı azot tankında veya -80 °C’de saklayabilmek için, FBS içine %5 DMSO eklenerek hazırlanmıştır.

- Liziz Tamponu:

Final konsantrasyonları 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, %10 gliserol, 20mM Tris, %1 Triton X-100 olmak üzere su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 5X SDS Yürütme Tamponu:

Final konsantrasyonları 25mM tris base, 0,19M glisin, %0,1 (w/v) SDS, içerecek halde su ile istenen hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır.

- 1X SDS Yürütme Tamponu:

%20 oranında 5X SDS yürütme tamponundan içerecek şekilde dH₂O ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 10X Transfer Tamponu:

Final konsantrasyonları 250mM tris base, 0,19M glisin olacak şekilde tartılıp su ile tamamlanmıştır.

- 1X Transfer Tamponu:

%10 10X transfer tamponu ve %20 metanol olacak şekilde dH₂O eklenerek hazırlanmıştır.

- 10X TBS:

Final konsantrasyonları 200 mM tris HCl, 1,5 M NaCl içerecek şekilde su ile hazırlanmıştır.

- 1X TBS-T:

10X TBS ve dH₂O 1: 10 oranında 1X TBS hazırladıktan sonra %0,1 olacak şekilde Tween 20 eklenerek 1X TBS- T hazırlanmıştır.

- Stripleme Tamponu:

Final konsantrasyonları %2 SDS, 100mM Beta-merkapto- etanol, 62,5mM Tris-HCl (pH=6,7) olacak şekilde dH₂O ile hazırlanmıştır.

- 4X Yükleme Boyası:

Final konsantrasyonları için 0,2M Tris-HCl (pH=6,8), %8 SDS, %0,4 bromofenol mavisi, %40 gliserol ve %20 Beta- merkapto- etanol ile hazırlanıp kullanılmıştır.

- Membran Bloklama Solüsyonu:

1XTBS- T içine %5 oranında yağsız süt tozu ekleyip çözündürülerek hazırlanmıştır.

- Tris HCl Çözeltileri:

1,5 M (pH=8,8) ve 0,5 M (pH=6,8) olmak üzere iki ayrı çözelti SDS- PAGE jeli için kullanılmak üzere tartılan Tris belirtilen konsantrasyonlar için dH₂O ile çözülerek hazırlanmıştır.

- %10 SDS:

dH₂O içine %10 olacak şekilde toz SDS tartılarak hazırlanmıştır.

- APS:

%10 oranında amonyum persülfat, dH₂O içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

- Wortmannin (Wort):

Stok konsantrasyonları 100µM olmak üzere DMSO içinde hazırlanmıştır. Ara konsantrasyonları kullanılacak hücreye uygun serumsuz besiyeri ile birlikte hazırlanarak -20 °C’de saklanmıştır.

5. 2. Metot

5. 2. 1. Kültür Hücreleri ve Büyütme

Bu çalışmada *in vitro* model olarak MeT-5A (ATCC®CRL-9444), SPC212 (Histoloji ve Genel Embriyoloji Enstitüsü, Fribourg Üniversitesi, İsviçre), A549 (ATCC®CCL-185) ve H1299 (ATCC®CRL-5803) hücreleri kullanılmıştır.

MeT-5A, kanser olmayan bireylerden alınan plevral sıvıdan elde edilmiştir. pRSV- T plasmidi transfekte edilen ve klonlanan bu hücrelerin morfolojileri epitel olarak tanımlanmış olan mezotelyal hücre hattıdır. M199, %10 FBS, %0, 6 penicillin-streptomycin, sodyum bikarbonat, L-Glutamin, hidrokortizon, HEPES, EGF, insülin içeren besi yerinde büyütülmüştür. SPC212, asbeste maruz kaldığı bilinen 47 yaşındaki malignant mezotelyoma hastası bir erkek bireyin göğüs boşluğundan alınan çift fazlı bir tümör hücresidir. RPMI 1640, %10 FBS, %1 penicillin-streptomycin, sodyum bikarbonat içeren besiyerinde büyütülmüştür. A549 hattı ise 1972 yılında DJ Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki Kafkas bir erkekten alınarak kültürlenmiştir. Epitelyal hücre tipine sahip akciğer kanseri hücresidir. RPMI 1640,

%10 FBS, %1 penicillin-streptomycin, sodyum bikarbonat, sodium pirüvat, D-Glukoz, HEPES ile hazırlanan besiyerinde büyütülmüştür. H1299 hücre hattı, önceden radyasyon tedavisi alan 43 yaşındaki yetişkin bir erkek hastadan, akciğerin lenf nodu metastazı ile oluşturulmuştur. Hücreler, p53 proteininin ekspresyonuna sahip değildir. Epitelyal hücre tipine sahip akciğer kanseri hücresidir. A549 hücre hattı için kullanılan besiyeri içeriğine sahip besiyeri hazırlanarak kullanılmıştır.

5. 2. 2. Hücre Ekimi ve Saklama

-80 °C’de veya sıvı azotta bulunan soğutucu tüpteki hücreler deneylerde kullanılmak üzere içinde taze besiyeri ile çözündürülerek oda sıcaklığında 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısım uzaklaştırılmıştır. Hücre çökeltisi yeni serumlu besiyeri ile çözündürüldükten sonra 37 °C %5 CO₂ ortamına sahip inkübatöre kaldırılmıştır.

%85- 90 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlama işlemindeki gibi toplanmıştır. Santrifüjden sonra üst kısım atılmıştır. Hücre çökeltisi 1, 5 mL dondurma stok besiyeri ile çözündürülüp ve soğutucu tüpe alınmış ve -80 °C’ye kaldırılmıştır.

5. 2. 3. Hücre Pasajlama

Belirlenen sayılarda ekilen hücreler petride büyütülerek %85- 90 yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlama işlemi uygulanmıştır. Petrideki besiyeri vakum ile çekilerek uzaklaştırıldıktan sonra 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Sonrasında hücrelerin üzerine tripsin eklenmiştir, 1- 3 dakika inkübe edilen hücreler besiyeri bulunan tüplere toplanmıştır. Oda sıcaklığında 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra eski besiyeri uzaklaştırılarak yeni besiyeri eklenmiştir.

5. 2. 4. HF’nin Hücre Morfolojisine Etkisinin Belirlenmesi

Hücrelerdeki morfolojik değişimleri belirlemek için hücreler, 96 kuyucuklu plakaya serumlu besiyeri ile birlikte hücre sayısı 1×10^4 olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra yine serumlu besiyeri ile 0, 25, 50, 250, 500 nM konsantrasyonlarında HF uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücre

değişimleri ışık mikroskopunda 20X büyütmede çekilmiştir. Hücre sayımları yapıldıktan sonra GraphPad'de grafiksel olarak analiz edilmiştir.

5. 2. 5. HF'nin Hücre Canlılığına Etkisinin Değerlendirilmesi

HF'nin mezotelyoma, malignant mezotelyoma ve akciğer kanseri hücrelerinde canlılık üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla asit fosfataz yöntemi uygulanmıştır [90]. MeT-5A için 1×10^4 ; SPC212, A549 ve H1299 hücreleri için 5×10^3 olarak belirlenen sayılarda 96 kuyucuklu plakaya ekim yapılmıştır. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyerlerini çekip, belirlenen konsantrasyonlarda halofuginon, yeni besiyeri ile birlikte uygulanmıştır. 72 saat sonunda besiyerleri atılıp kuyular 1X PBS ile yıkanmıştır. Her kuyuya 0,1M NaAC ve %0,1 TritonX-100 ile hazırlanan tamponda (pH=5) çözölen tablet karışımından 100 µL eklenmiştir. İnkübatörde 90 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyuya 10 µL 1M NaOH eklenmiştir ve 405 nm dalga boyunda VarioScan cihazında ölçüm alınmıştır. Analiz için tekrarlı kurulan konsantrasyonların ortalamaları alındıktan sonra GraphPad programında p değerleri hesaplanıp grafikleri çizilmiştir.

5. 2. 6. HF'nin Sinyal Yolaklarına Etkisinin Protein Düzeyinde İncelenmesi

Canlılık analizleri sonucunda etkin dozları belirlenen hücrelerde de hedef protein analizleri yapılmıştır. Çalışmalara MeT-5A kontrol hücresi, SPC212 MM hücresi ve etki göstermesi baz alınarak A549 hücreleriyle devam edilmiştir.

5. 2. 6. 1. Hücre Sayısının Belirlenmesi

HF'nin hücreler üzerindeki etkisini protein seviyesinde de gözlemlemek için western blotlama tekniği uygulanmıştır. Her bir deneyde %85-90 yoğunluk oranına ulaşmış hücreler kullanılmıştır. Tüplere toplanan hücreler iyice karıştırıldıktan sonra sayım yapmak için test tüplerine 50 µL alınmıştır. Hücrelerin boyanması amacıyla trypan blue isimli boyadan da 50 µL ekleyip ve thoma lamında sayım yapılarak ekilecek hücre sayısı belirlenmiştir.

5. 2. 6. 2. HF Uygulamaları

6 kuyulu petrilere hücre sayıları SPC212, A549 için $2,5 \times 10^5$; MeT-5A için ise 5×10^5 olacak şekilde serumlu besiyeri ile birlikte ekilmiştir. 37 °C %5 CO₂ koşullarındaki inkübatöre kaldırılan hücrelerin besiyerleri 24 saat sonunda çekilmiştir. Serumlu besiyeri kalıntısını uzaklaştırmak için de 1X PBS ile yıkama yaptıktan sonra, hücrelerin senkronizasyonu için serumsuz besiyeri eklenip, inkübatöre kaldırılmıştır. 2 saat sonunda serumsuz besiyerleri uzaklaştırılarak yıkama yapılmıştır. Serumlu besiyeri ile birlikte 0, 25, 50, 100, 250nM konsantrasyonlarında HF uygulanarak 24 saat sonunda hücre lizizleri gerçekleştirilmiştir.

5. 2. 6. 3. PI3K İnhibitörünün Kullanımı

SPC212 hücresi model alınarak hücrelerin artan Akt aktivasyonunu inhibitör varlığında ne gibi değişimler olabileceğini araştırmak için Wortmannin kullanılmıştır. Hücreler ekildikten 22 saat sonra taze besiyeri ile birlikte 100nM final konsantrasyonu olacak şekilde inhibitör uygulandıktan 2 saat sonra da 250nM HF uygulanmıştır.

5. 2. 6. 4. Hücre Lizizi

Laboratuvar ortamına getirilen petrillerdeki besiyerleri tüplere toplanmıştır. Hücrelere 1mL soğuk 1X PBS ekleyip kazıyıcı ile hücrelerin fiziksel olarak kaldırılması sağlanmıştır. İyice kazıdıktan sonra tüpteki besiyeri ile hücreler toplanmıştır. Oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Liziz yapabilmek için 100: 1 oranında liziz tamponu: proteaz- fosfataz inhibitör karışımı taze olarak eklenmiştir. Santrifüj sonrası üst kısımlar atılarak hücreler üzerine 120 µL liziz karışımı eklenmiş insülin enjektörü ile hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. 14g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj sonrası üst kısımlar, yeni test tüplerine alınarak - 20 °C'ye kaldırılmıştır.

5. 2. 6. 5. Protein Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen proteinlerin miktarını belirlemek amacıyla BCA yapılır. Önce BSA

standartlarının hazırlanması için stok BSA solüsyonu, 2 mg/ mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu stok solüsyonundan dilüsyonlar (2 mg/ mL- 0,12 mg/mL) hazırladıktan sonra test tüplerine konulmuştur. 96 kuyucuklu plakaya her bir örnekten iki tekrarlı olacak şekilde 10 µL eklenip, ayrıca daha önce blank olarak kullanmak için ayrılan liziz karışımından da eklenmiştir. Örneklerin üzerine Thermo BCA Protein Assay kitindeki A ve B solüsyonlarından 50:1 oranında hazırlanan karışımdan her bir kuyucuğa 200 µL eklendikten sonra plaka, karanlık ortam oluşturmak adına alüminyum folyo ile sarılmıştır ve 37 °C’de 30 dakika bekletilmiştir. 5 dakika da oda sıcaklığında beklendikten sonra Varioscan cihazında 562 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Alınan BSA değerleri ile Excelde grafik çizilmiştir, R² değerine göre denklem belirlenmiştir ve protein konsantrasyonları da bu denklem üzerinden µg/ mL cinsinden hesaplanmıştır.

5. 2. 6. 6. SDS- PAGE ve Western Blotlama Yöntemi

Protein seviyesindeki etkiyi belirlemek adına yapılan western blotlama tekniğinde ilk olarak SDS-PAGE dediğimiz farklı ağırlıklara sahip proteinlerin ayrılmasını sağlayan aşama gerçekleştirilmiştir. Bunun için Tablo 5.1’de gösterilen miktarlarda, alt ve üst olmak üzere iki kısımdan oluşan %10-12 yoğunluğuna sahip olan SDS jeli hazırlanmıştır.

Tablo 5.1: SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.

	ALT JEL	ÜST JEL
ddH ₂ O	3,625 mL	1,865 mL
1.5M pH: 8,8 Tris HCl	1,875 mL	-
0,5M pH: 6,8 Tris HCl	-	750 µL
%10 SDS	75 µL	30 µL
TEMED	5,5 µL	3 µL
APS	75 µL	30 µL
%40 Akrilamid/ Bisakrilamid	1,875 mL	337,5 µL

40 µg hücre lizati, 4X örnek yükleme tamponu ile 3: 1 oranında karıştırılarak 95 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edilmiştir. İçerisinde 1X yürütme tamponu bulunan tanka yerleştirilen SDS- PAGE jeline denatüre edilen örnekler 80 V'da 20 dakika; 120 V'da 90 dakika olarak yürütülmüştür. Jelde ayrılan proteinlerin membrana transferi için kullanılan PVDF membran; 30 saniye metanolde, 2,5 dakika suda ve 3 dakika da transfer tamponunda bekletildikten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir. 1X transfer tamponu içinde 110 V'da 90 dakika boyunca proteinlerin membrana transferi sağlanmıştır. Bu süre sonunda membran bloklama işlemi için %5 olarak hazırlanan yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T içerisinde 100 rpm'de oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalanmıştır. Bloklama sonrası membran, 1X TBS- T ile 5- 10- 5 dakika olmak üzere 3 kez 120 rpm'de çalkalama ile yıkanmıştır. %5 yağsız süt tozu ile 1X TBS- T karışımına verilen oranlarda seyreltilerek eklenen birincil antikor ile 4 °C'de gece boyunca (yaklaşık 16 saat) çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonunda membran 1X TBS- T ile 3 kez 5- 10- 5 dakika şeklinde yıkanmıştır. Membran, %5 yağsız süt tozu ile 1X TBS- T karışımına verilen oranlarda seyreltilerek eklenen HRP- konjuge ikincil antikor ile 4 °C'de 2 saat boyunca çalkalanmıştır. Bu süre sonunda yine 3 kez 1X TBS- T ile yıkamalar yapılmıştır. Membran, ev yapımı olarak A ve B şeklinde iki solüsyon halinde (Tablo 5.2) hazırlanan ECL (enhanced chemiluminescence)'den 1: 1 oranında alınarak oluşturulan karışım ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ve karanlık ortam oluşturmak için membranın üzeri kapatılmıştır.

Tablo 5.2: ECL hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.

	A	B
100mM Tris (pH=8,6)	10 mL	10 mL
90mM p-Coumaric Acid	44 µL	-
250mM Luminol	200 µL	-
%30 H ₂ O ₂	-	12,08 µL

Uygulama süresi bitince, ChemiDoc XRS+ (BioRad) cihazında görüntüleme yapılmıştır. Görüntüde elde edilen bantların yoğunlukları BioRad ImageLab 6.0 programı ile protein seviyelerindeki değişimler karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Protein tespiti için p- STAT3 (Tyr 705, CST 9131), t- STAT3 (CST 9132), p- AKT (Ser 473 CST 4060), t- AKT (CST 4891), p- ERK1/ 2 (Thr 202/ Tyr 204 CST 9101), t- ERK1/ 2 (CST 9102), p- JNK (SC 4668), t- JNK (SC 7345), p- p38 (CST 4511), t- p38 (CST 9212), antikorları; yükleme kontrolü olarak Cyclophilin B (PA1- 027A) antikoru kullanılmıştır. İlgili tüm antikorlar için ikincil olarak da anti- rabbit (CST 7075) antikoru kullanılmıştır.

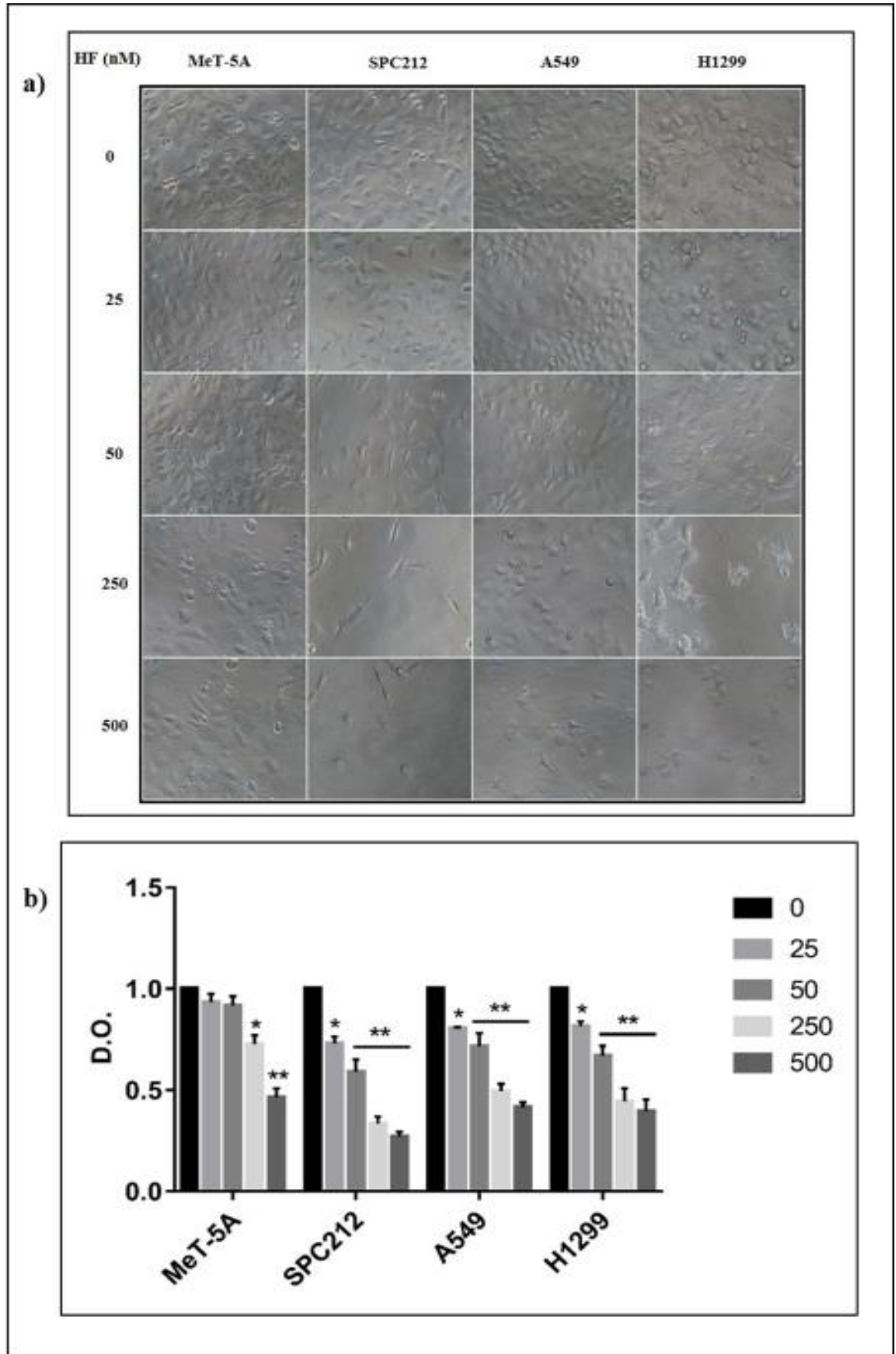
5. 2. 6. 7. Stripleme

Birbirine yakın ağırlıktaki proteinleri ve bir proteinin hem aktivasyonuna hem de ifade edilmesine etkisini görüntülemek için daha önce bağlanan antikoru uzaklaştırmak adına stripleme işlemi yapılır. Stripleme tamponu ile 42 °C’de 30 dakika 120 rpm’de çalkalandıktan sonra 5- 10- 5 dakika 1X TBS- T ile yıkama yapılmıştır. Transferden sonra yapıldığı gibi %5 lik yağsız süt tozu içeren 1X TBS- T karışımı içinde 100 rpm’de 1 saat boyunca çalkalanarak bloklama yapılmıştır. 5- 10- 5 dakika 1X TBS- T ile yıkama sonrasında birincil antikor uygulaması ile işlemlere devam edilmiştir.

6. BULGULAR

6. 1. Halofuginonun Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkisi

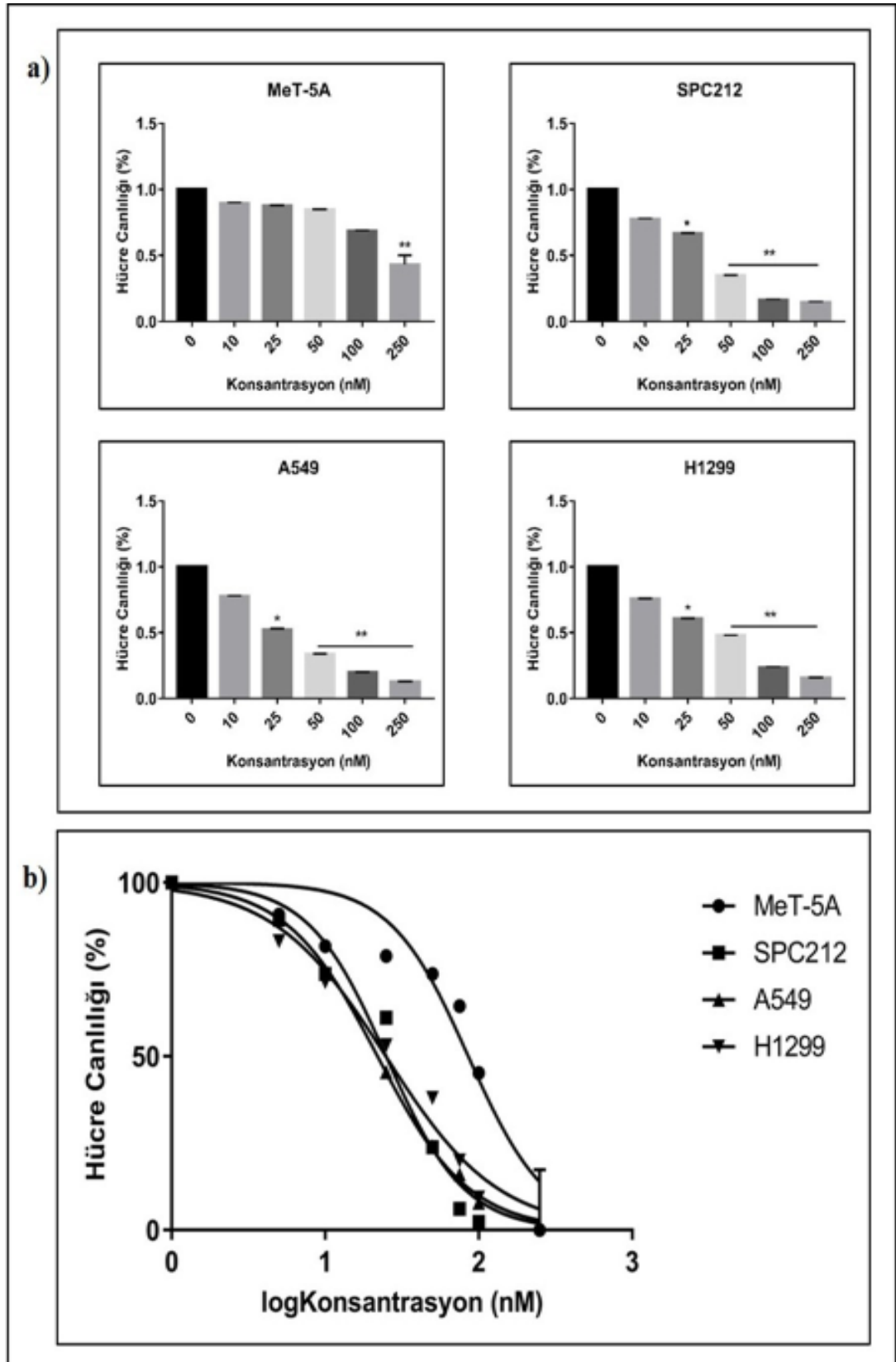
Bahsi geçen tüm hücreler (MeT-5A, SPC212, A549, H1299) 96 kuyucuklu plakalara 1×10^4 mL/ hücre gelecek şekilde ekim yapılarak 24 saat büyütülmüşlerdir. Besiyerleri tazelenerek HF'nin 0, 25, 50 250 ve 500 nM konsantrasyonları uygulanarak ve 24 saat sonunda hücre morfolojisinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Şekil 6.1.a'da gözlendiği gibi normal mezotelyal hücrelerde (MeT-5A) 50nM'a kadar hücre sayısında belirgin azalma gözlenmezken; 250nM ($p < 0,05$) ve 500nM ($p < 0,01$) uygulanan hücrelerin sayısında önemli derecede azalma belirlenmiştir. Karşılaştırıldığında aynı miktarlarda HF uygulanan malignant mezotelyoma (SPC212) hücrelerinin Şekil 6.1.b'de görüldüğü gibi 25nM'da ($p < 0,05$) MeT-5A hücrelerinden daha hassas olduğu morfolojik incelemelerde belirlenmiştir. Bununla birlikte 50nM'nin üzerindeki konsantrasyonlarda etkinin istatistiksel olarak hatırı sayılır olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). MM hücrelerine ilaveten iki akciğer kanseri hücresine de (A549, H1299) eş konsantrasyonlarda HF eklenerek eş zamanlı incelenmiştir. HF'nin her iki akciğer hücre morfolojisine etkisi MM hücrelerine benzer bir profil sergilemiştir. Morfoloji analizleri takibinde HF'nin hücre canlılığına etkisi 4 hücrede asit fosfataz deneyi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 6. 1: HF'nin hücre morfolojisine etkisinin incelenmesi. 0, 25, 50, 250 ve 500nM HF uygulayarak 24 saat sonunda analiz edilmiştir. Morfolojik görüntüler (a) ve istatistiksel analizler (b) gösterilmektedir. Analizlerde Image J ve GraphPad programları kullanılmıştır (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

6. 2. Halofuginonun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

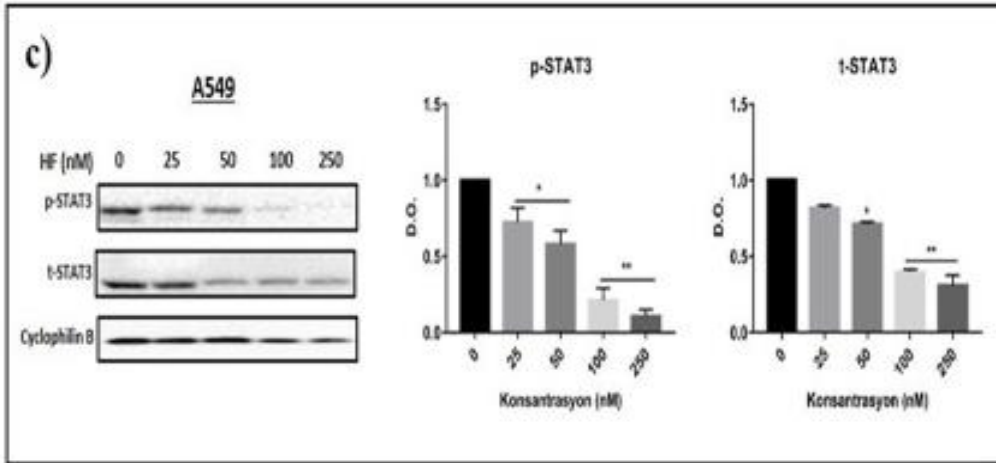
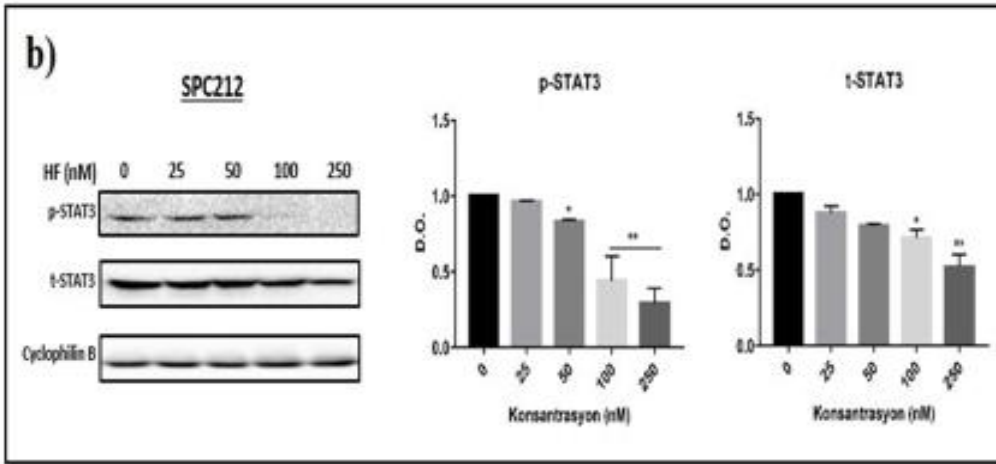
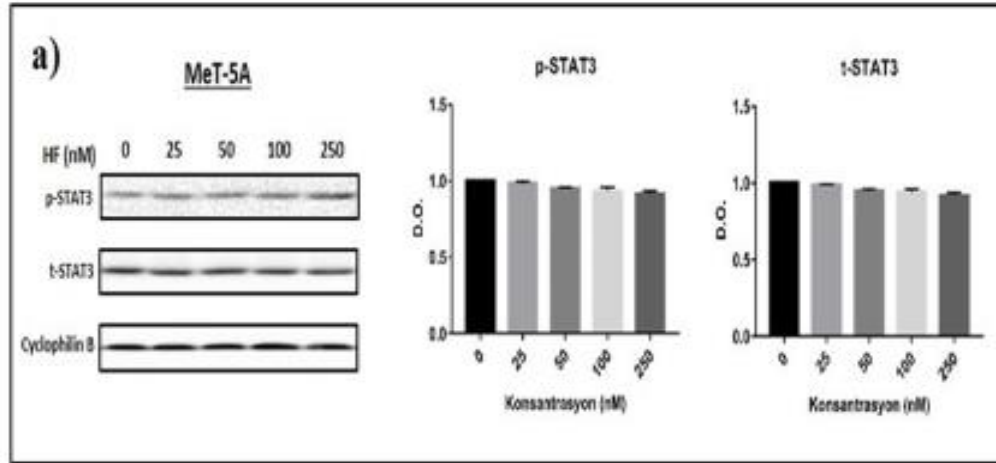
MeT-5A için 1×10^4 ; SPC212, A549 ve H1299 hücreleri için ise 5×10^3 sayıda 96 kuyulu plakalara 4 tekrarlı ekilen hücrelere 0, 10, 25, 50, 100 ve 250nM konsantrasyonlarında HF uygulanarak hücre canlılığı 72 saatlik süre için değerlendirilerek hesaplanmıştır. Ölçüm değerlerine göre GraphPad programında grafiklendirilmiş ve hücreleri %50 inhibe eden konsantrasyon (IC_{50}) değerleri belirlenmiştir. Şekil 6.2.a.'da gözlenildiği gibi HF uygulanan kanser olmayan mezotelyal hücrelerde (MeT-5A), hücre sayısında belirgin şekilde azalış ($p < 0,01$) 250nM konsantrasyonundan itibaren gerçekleşmiştir. Diğer taraftan SPC212, A549 ve H1299 hücrelerine HF uygulamasının sonunda hücre canlılığı 25nM ($p < 0,05$) ile 50nM'nin üstündeki konsantrasyonlarda ($p < 0,01$) önemli derecede azalmaktadır. Yapılan canlılık analizleri doğrultusunda HF'nin, hücre canlılığını %50 oranında inhibe ettiği konsantrasyon (IC_{50}) değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler sırasıyla MeT-5A, SPC212, A549, H1299 için 85,6nM, 24,97nM, 21,95nM ve 24,86nM olarak belirlenmiştir (Şekil 6.2.b). IC_{50} değerleri esas alınarak bundan sonraki analizlerde kontrol hücresi ve iki kanser hücresi ile devam edilmiştir.



Şekil 6. 2: HF'nin hücre canlılığına etkisinin ve doz-yanıt ilişkisinin incelenmesi. 0-250nM HF uygulandıktan sonra canlılık değerleri analiz edilmiştir. Canlılık değişimi (a) ve hesaplanan doz-yanıt ilişkisi (b) gösterilmiştir. Analizler için MS Excel ve GraphPad programları kullanılmıştır (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

6. 3. Halofuginonun JAK/ STAT Yolağına Etkisi

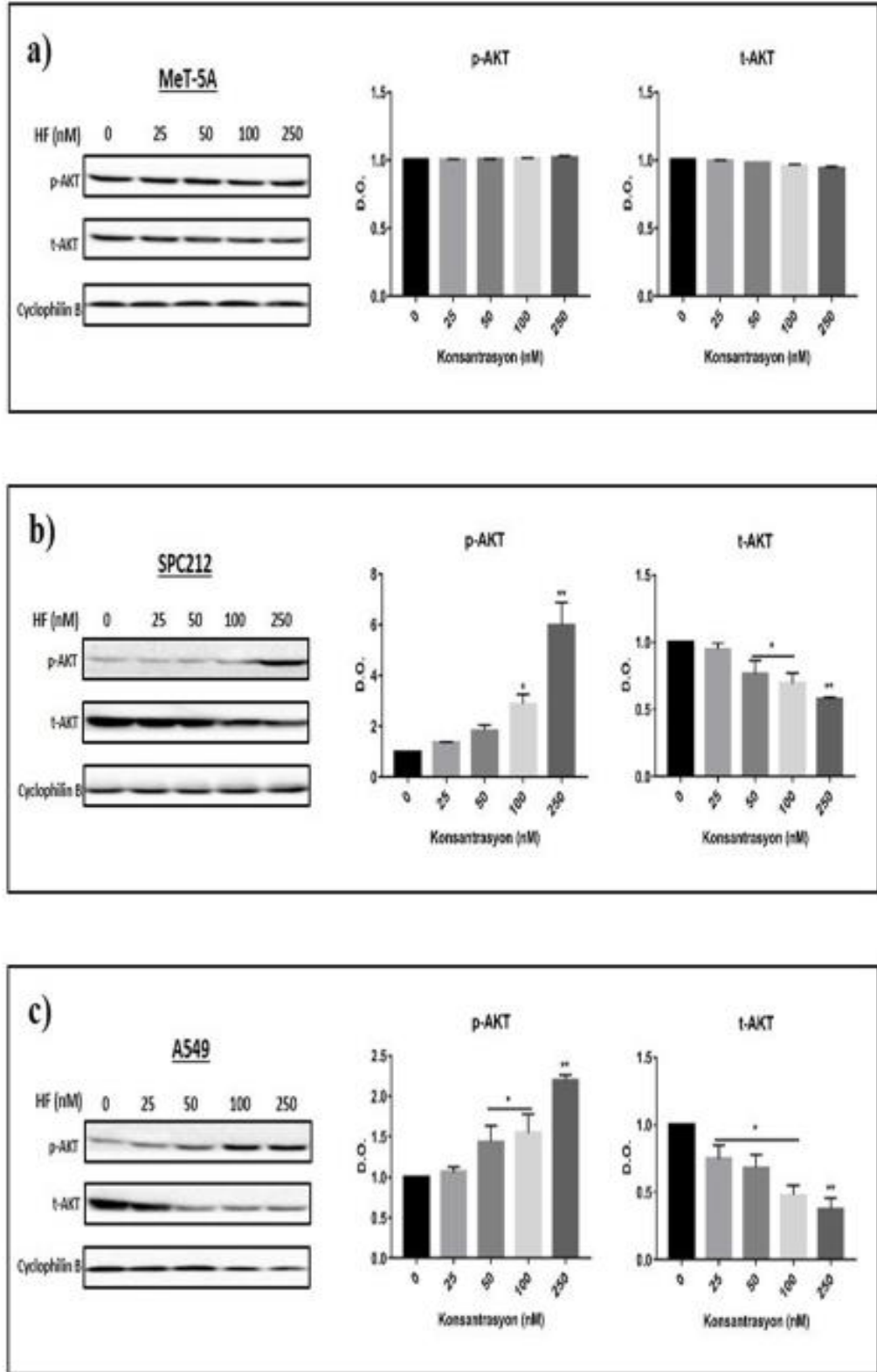
HF'nin JAK/ STAT yolağı üzerine etkisi Met-5A, SPC212, A549 hücrelerinde incelenmiştir. $2,5 \times 10^6$ A549 ile SPC212 ve 5×10^5 sayıda MeT-5A hücresi 6 kuyulu plakaya ekilerek 0-250nM konsantrasyonlarda HF uygulanarak 24 saat sonunda hücreler liziz edilmiştir. Örnekteki toplam protein miktarları BCA ile belirlendikten sonra SDS/ PAGE ve Western blot yardımıyla proteinlerin aktivasyonu ve ifadesindeki değişimler araştırılmıştır. Şekil 6.3.a'da görüldüğü üzere HF'nin MeT-5A kontrol hücrelerinde uygulanan konsantrasyonlar için STAT3 proteinlerinin aktivasyonunda ya da ifadesinde, önemli bir değişim belirlenmemiştir. Aynı konsantrasyonda HF uygulanan SPC212 (Şekil 6.3.b) ve A549 (Şekil 6.3.c) hücrelerinde de STAT3 fosforilasyonu 50nM ($p < 0,05$) ve üstündeki konsantrasyonlarda ($p < 0,01$) önemli derecede baskılanmaktadır. SPC212 ve A549 hücrelerinde 50nM ($p < 0,01$) ve 25nM ($p < 0,05$) konsantrasyonlarda fosforilasyonda baskılanma görülmüştür. HF'nin STAT3 ifadesine etkisi her iki hücrede 100nM üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte istatistiksel olarak değerlendirildiğinde HF'nin STAT3 yolağına etkisi A549 hücrelerinde SPC212'ye kıyasla daha düşük dozlarda başlamaktadır.



Şekil 6. 3: HF'nin JAK/ STAT yolağına etkisinin incelenmesi. IC₅₀ değerleri belirlendikten sonra 0-250nM HF uygulayarak STAT3 aktivasyonu ve ifadesindeki etki (a) MeT-5A, (b) SPC212 ve (c) A549 hücrelerinde gösterilmektedir (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

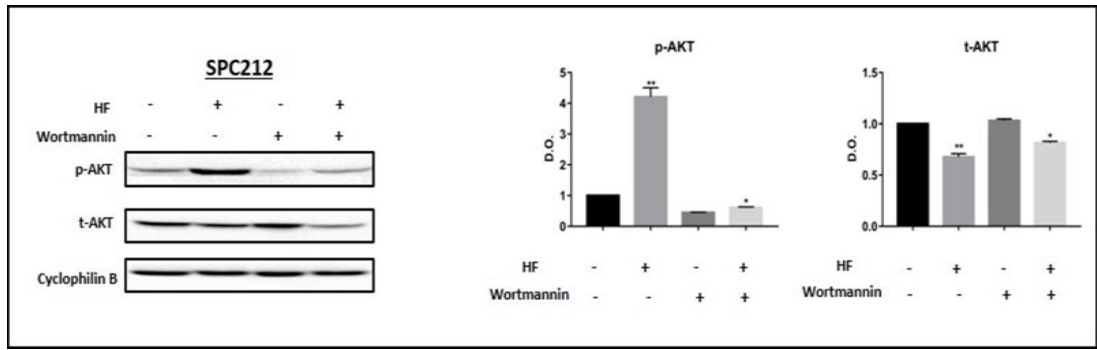
6. 4. Halofuginonun PI3K/ Akt Yolağına Etkisi

JAK/ STAT yolağına ilaveten HF'nin hücre çoğalması, hayatta kalması ve karsinogenezde önemli olan PI3K/ Akt yolağına etkisi de konsantrasyon bağımlı araştırılmıştır. HF uygulamasının takibinde mezotelyoma hücrelerinde Akt proteininin aktivasyonunda ve ifade edilmesinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 6.4.a). Buna karşın SPC212 ve A549 hücrelerinde sırasıyla Akt fosforilasyonunda 100nM ve 50nM konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir. Buna karşın Akt proteininin ifadesinde SPC212 hücrelerinde 100nM ve A549 hücrelerinde 50nM üzerinde aşağı düzenlemeler belirlenmiştir (Şekil 6.4.b ve c).



Şekil 6. 4: HF'nin PI3K/ Akt yolağına etkisinin incelenmesi. 0- 250nM konsantrasyonlarda uygulanan HF'nin MeT-5A (a), SPC212 (b) ve A549 (c) hücrelerinde Akt proteinin değişimi gösterilmektedir (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

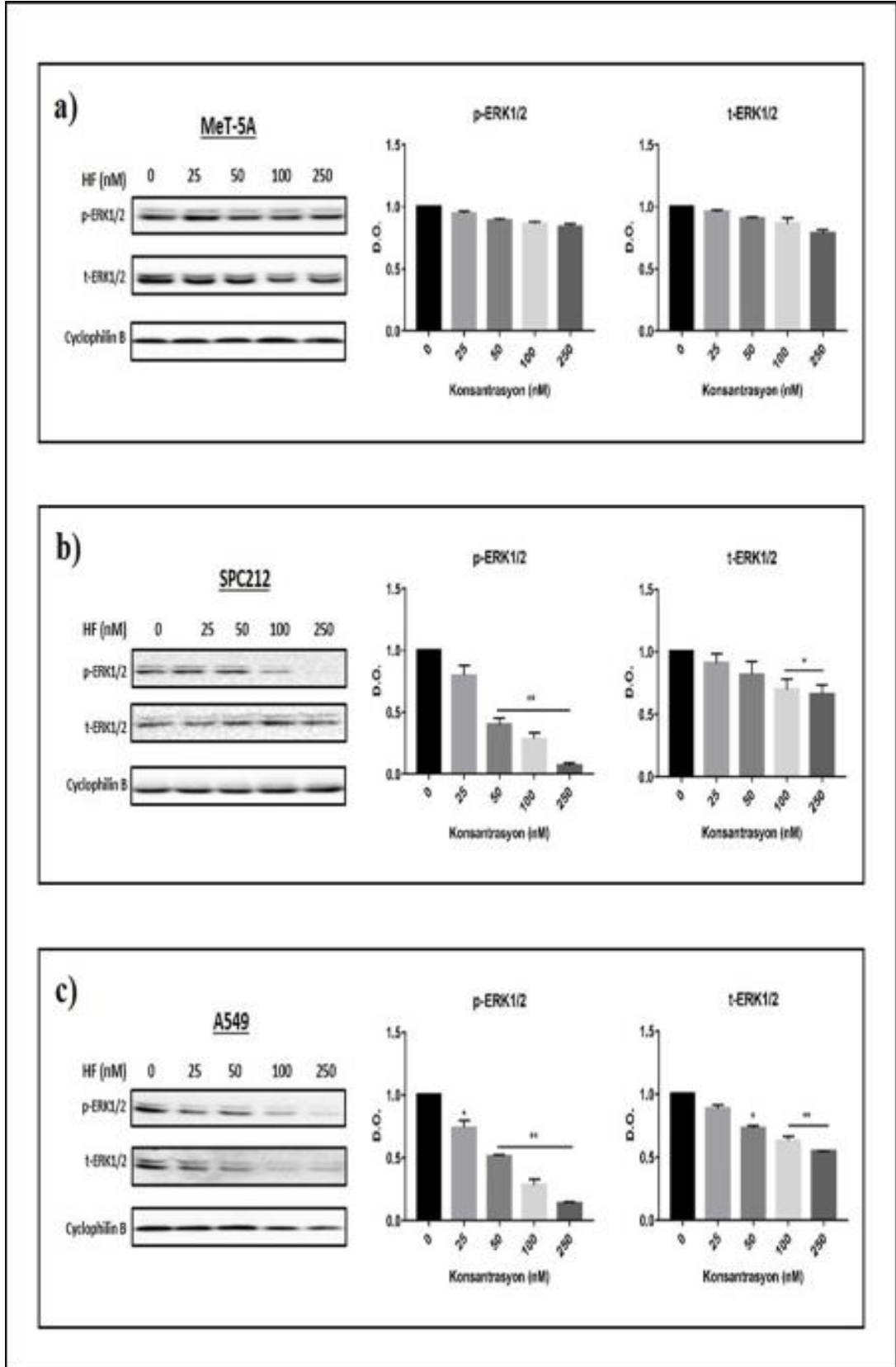
Bilindiği gibi Wortmannin (Wort) PI3K inhibitörüdür. HF'nin Akt fosforilasyonunu artırması sonucuyla birlikte her iki molekülün birlikte uygulanmasının hücrelerde nasıl bir değişime yol açacağını belirlemek amacıyla 250nM HF ve 100nM Wort, SPC212 hücrelerine uygulanmıştır. Uygulanan konsantrasyonlarda Wort, Akt fosforilasyonunu düşürürken ifade seviyesine etki göstermemiştir. HF ise ifade seviyesini düşürmektedir. Kombine uygulama sonucu hem aktivasyon hem de ifade seviyesi aşağı çekilmiştir (Şekil 6.5). Bu sonuçlar bu iki molekülün kombine uygulamasının bir alternatif oluşturabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 6. 5: HF'nin wortmannin ile birlikte kullanımının Akt proteini üzerine etkisinin incelenmesi. HF (250nM), Wort (100nM), HF ve Wort kullanımının SPC212 hücrelerindeki etkisi gösterilmektedir (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

6. 5. Halofuginonun MAPK Yolağına Etkisi

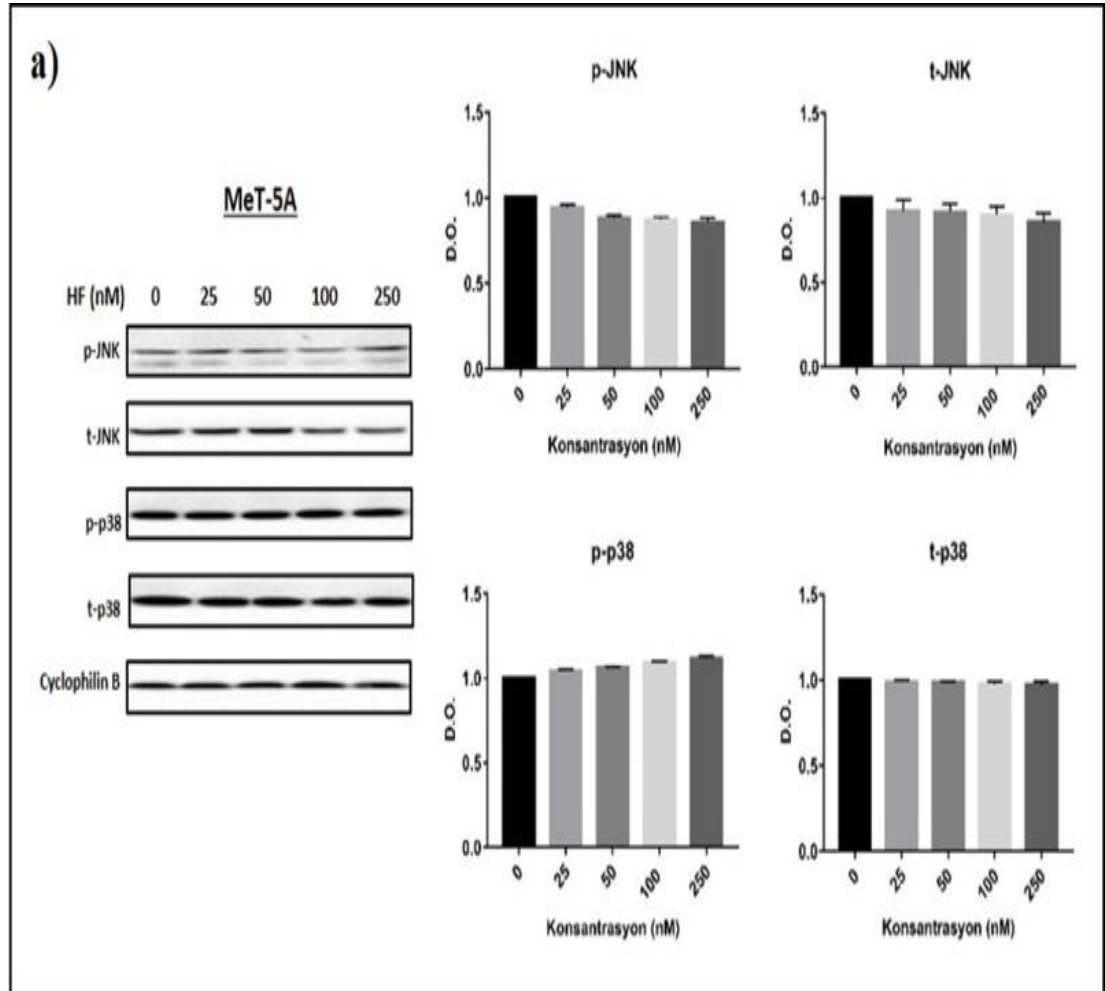
Halofuginonun hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi hücrenin temel işlevlerinde görevli olan MAPK sinyal yolağına olan etkisi normal ve kanserli hücrelerde araştırılmıştır. Yukarıda bahsedildiği şekilde ekilen hücreler HF uygulamasından 24 saat sonra liziz edilerek incelenmiştir. Şekil 6.6.a'da görüldüğü gibi MeT-5A hücrelerinde HF'nin ERK1/2 proteininin hem aktivasyon hem de ifade edilmesi seviyesine etkisi gözlemlenmemiştir. Buna karşın SPC212 hücrelerinde (Şekil 6.6.b) 50nM ve üzeri, A549 hücresinde ise (Şekil 6.6.c) HF 25nM ve üzeri konsantrasyonlarda ERK fosforilasyonunu baskımlarken, protein ifade seviyeleri SPC212 ve A549'da sırasıyla 100nM ve 50nM üzerinde baskılanmaktadır.



Şekil 6. 6: HF'nin MAPK yolagına etkisinin incelenmesi. ERK1/2 aktivasyonu ve ifadesindeki değişimler MeT-5A (a), SPC212 (b) ve A549 (c) hücrelerindeki değişim gösterilmektedir (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

6. 6. Halofuginonun SAPK/ JNK ve p38 MAPK Yolaklarına Etkisi

MAPK sisteminin üyesi olan ve stres karşısında aktifleşen JNK ve p38 yolakları hücrelerde hayatta kalma ve apoptozu tetikleme durumlarında görevlidir. HF'nin JNK ve p38 proteinlerinin aktivasyon ve ifade edilme seviyelerine olan etkileri eş hücrede konsantrasyona bağlı olarak incelenmiştir. Sonuçlar HF'nin hiçbir hücrede SAPK/ JNK protein fosforilasyonu ve ifade seviyelerine etkisi olmadığını göstermiştir (Şekil 6.7). Buna karşın iki kanser hücresinde de 100nM üzerindeki konsantrasyonlarda p38 fosforilasyonunda artış belirlenmiştir ($p<0,01$) (Şekil.6.7.b. ve c.). HF uygulamasının takibinde ise total protein ifadesinde değişim belirlenmemiştir.



Şekil 6. 7: HF'nin SAPK/ JNK ve p38 MAPK yolaklarına etkisinin incelenmesi. HF'nin JNK ve p38 proteinlerindeki etkisi MeT-5A (a) hücrelerinde gösterilmektedir (n=3, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

6. 7. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada morfolojik analizlerde Image J, canlılık analizlerinde VarioScan cihazı ile birlikte MS Excel, western blot analizlerinde Image Lab programları kullanılmıştır. En az 3 bağımsız tekrarlı ve 3 replikalı yapılan deneylerde istatistiksel analizler için GraphPad programları kapsamında one-way ve two-way Anova programları kullanılarak p değerleri hesaplanmıştır. *=p<0,05, **=p<0,01 anlamlılık değerlerini ifade etmektedir.

7. TARTIŞMA

Malignant mezotelyoma ve akciğer kanserine yakalanan kişilerin sayısı kullanılan sigara miktarı ve maruz kalınan asbeste bağlı olarak gün geçtikçe artmaktadır. Bununla birlikte kemoterapotik ve diğer uygulamalar yönünden tedaviler yapılmaya çalışılmış ve çalışmaya devam edilmektedir. Kanser tedavilerinde hali hazırda kullanılan ilaçların önemli bir kısmını doğal kaynaklı aktif bileşenler oluşturur. Bitkisel kökenli bileşik olan HF'nin prostat kanseri [72], pankreas kanseri [67] ve meme kanseri [82] hücrelerinde antikarsinojen etkisine dair çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmada literatürden farklı olarak HF'nin etkisi ilk kez MeT-5A, SPC212, A549 ve H1299 hücrelerinde incelenmiştir. Bahsi geçen hücrelerle yapılan canlılık analizleri literatürdeki verileri destekleyen sonuçlar vermiştir. HF uygulaması, kanser hücrelerinde konsantrasyona bağlı hücre sayısında azalmaya neden olurken, kanser olmayan hücrelerdeki hücre sayısını yüksek konsantrasyonlarda azalttığı belirlenmiştir. Bu da HF'nin kanser hücrelerine daha seçici özellik gösterdiğine işaret etmektedir.

Bilindiği üzere hücrelerin büyümesi, çoğalması, hayatta kalması, farklılaşması ve apoptoza yönelmesi gibi hayati önem taşıyan süreçler hücre sinyal yollarıyla düzenlenmektedir. Kanser oluşumuna ve ilerlemesine de bu yollardaki bozukluklar yol açmaktadır [41]. Bu nedenle kanser tedavilerinde sinyal yollarında rol alan moleküllere hedef terapiler uygulanmaktadır [49]. Bu çalışmada biz ilk olarak birçok kanser hücresinde kontrolsüz şekilde aktive olan [21] JAK/ STAT yolağına HF'nin etkisini inceledik. Konsantrasyon bağımlı deneyler sonucunda HF, SPC212 ve A549 kanser hücrelerinin fosforilasyon ve ifadesi üzerine etki gösterirken; MeT-5A hücrelerinde etkilemediğini belirledik. HF'nin STAT3 fosforilasyonu ve ifadesine etkisi kanser hücreleri arasında karşılaştırma yapıldığında A549 hücrelerinde SPC212 hücrelerine göre daha düşük konsantrasyondan itibaren başlamaktadır. Bu da STAT3 yolağının baskılanması hususunda A549 hücresinin SPC212'ye göre daha hassas olduğunu işaret edebilir.

Kanserde regülasyonu bozulan diğer yollardan birisi de PI3K/ Akt yolağıdır. HF'nin Akt yolağı üzerine etkisiyle ilgili çalışmalara rastlanmaktadır. Örneğin, kolorektal kanseri hücresinde Akt aktivasyonunun HF tarafından baskılandığı bildirilmiştir [80]. Buna karşın HF'nin myotube hücrelerinde Akt ve p38 fosforilasyonunu artırdığı ve Smad3 aktivasyonunu indirdiği bildirilmiştir [66], yine

bu yolak üzerinden otofajiyi düzenlediği [91] gösterilmiştir. HF uygulaması MeT-5A hücrelerinde Akt'nin ne fosforilasyonuna ne de ifadesinde bir değişime neden olmamıştır. HF uygulamasının ardından her iki kanser hücresinde ise Akt fosforilasyonunun arttığı belirlenmiştir. Buna karşın her iki hücrede de Akt ifadesi konsantrasyon bağımlı olarak aşağı düzenlenmiştir. Literatürde de sıklıkla rastlanıldığı üzere aynı madde farklı hücrelerde tam tersi etki gösterebilmektedir. Örneğin, gallik asitin malignant mezotelyoma hücrelerinde Akt aktivasyonunu baskımlarken [92], melanoma hücrelerinde aktivasyonunu artırdığı gözlenmiştir [93]. Kanser hücrelerinde Akt fosforilasyonundaki artış A549 hücrelerinde SPC212'ye göre daha düşük konsantrasyonda olmuştur. İlâveten ifade seviyelerinde de düşürölmesi A549 hücrelerine göre daha yüksek konsantrasyonda gerçekleşmektedir. Bu sonuç A549 hücrelerinin Akt üzerinden HF baskılanmasına SPC212'den daha duyarlı olduğu sonucunu desteklemektedir. Prostat ve meme kanserinde HF'nin etkisinin incelenmesiyle ve bu incelemelerde ilaç olarak zelodronik asit ile birlikte kullanımının ZA'dan daha etkin olduğu gösterilmiştir [82]. Yukarıda belirtildiği gibi HF uygulamaları, kanser hücrelerinde Akt fosforilasyonunu arttırmıştır. Bu iki durumdan yola çıkararak bu çalışmada PI3K inhibitörü (wortmannin) ve HF'nin birlikte kullanımının etkisi araştırılmıştır. Sonuçlarımız doğrultusunda HF ve wortmannin kombinasyonunun SPC212 hücreleri üzerinde tek uygulamadan daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Bunu izleyen deneylerde, HF'nin hücre büyümesi ve bölünmesini tetikleyen yollardan bir diğeri olan MAPK/ ERK1/2 üzerine etkisi incelenmiştir. Önceki bir çalışmada HF'nin ERK1/ 2'yi uyararak yara iyileştirme özelliği vurgulanmıştır [64]. HF uygulamaları MeT-5A hücreleri üzerinde etki göstermezken; SPC212 ve A549 hücrelerinde fosforilasyon ve protein ifadesi seviyelerinde konsantrasyona bağlı olarak düşüşe neden olmuştur. HF, STAT3'deki etkisine benzer şekilde, A549 hücrelerinde ERK1/ 2 fosforilasyonu ve ifadesini SPC212 hücrelerinden daha düşük konsantrasyonlarda gerçekleştirmiştir. Diğeri bir deyişle A549 hücreleri HF'ye yolak baskılama kapsamında daha fazla duyarlılık göstermektedir.

İlâveten MAPK yollarının diğeri modülleri olan stres karşısında aktive olan JNK/ SAPK ve p38/ MAPK aktivitesine etkileri de incelenmiştir. JNK fosforilasyonu ve ifadesi hiçbir hücrede değişim göstermezken; her iki kanser hücresinde 100nM üzerinde p38 fosforilasyonunun indüklendiği belirlenirken ifadeleri değişmemiştir. p38 ve JNK yolağı hücrelerde genelde apoptotik aktivasyonla ilişkilendirilen yollar

olarak düşünöldüğünde [94] HF'nin bu hücrelerde bu yolaklar üzerinden apoptoza götürebileceğı fikrinin düşöndürmektedir.

8. SONUÇ

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere son yıllarda, sağlıklı hücrelerden ziyade kanser hücrelerinde seçici karakter gösteren ajanlar tercih edilmektedir. Bu kapsamda tez çalışmasında kullandığımız HF kanser hücreleri üzerinde daha seçici aktivite göstermesi önemlidir. HF, hem MM hem de NSCLC hücrelerinin hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak önemli düzeyde baskılamaktadır. İlaveten HF hücre sinyal yollarından JAK/ STAT (STAT3), klasik MAPK (ERK1/ 2) proteinlerinin aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu bulgu HF'nin bu hücrelerde proliferasyonu baskılarken STAT ve ERK yollarını kullandığını göstermektedir. Akt yolağında artış gözlenirse de konsantrasyona bağlı olarak ifadesi hücrelerde aşağı çekilmektedir. HF uygulaması, JNK yolağını aktive etmezken p38 yolağının aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu yolağın aktivasyonu apoptozla ilişkilendirilse de bu ileriki deneylerle araştırılacaktır. Özetle bu çalışma literatür bilgilerimiz doğrultusunda ilk kez tarafımızdan HF'nin MM ve akciğer kanseri hücre yollarına etkisinin belirlenmesini sağlayarak yeni çalışmalara da ışık tutmaktadır. Daha sonraki yapılacak yoğun araştırmalarla HF'nin belki de MM ve NSCLC tedavisinde alternatif ajan olma ihtimali artacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A., (2017), "Cancer Statistics, 2017", *Cancer Journal for Clinicians*, 67 (1), 7-30.
- [2] Hassanpour S. H., Dehghani M., (2017), "Review of cancer from perspective of molecular", *Journal of Cancer Research and Practise*, 4 (4), 127-9.
- [3] Clark D. P., Pazdernik N. J., (2016), "Cancer", *Biotechnology*, 593-626.
- [4] Mott F. E., (2012), "Mesothelioma: a review", *The Ochsner Journal*, 12 (1), 70-9.
- [5] Bononi A., Napolitano A., Pass H. I., Yang H., Carbone M., (2015), "Latest developments in our understanding of the pathogenesis of mesothelioma and the design of targeted therapies", *Expert Review of Respiratory Medicine*, 9 (5), 633-54.
- [6] Porpodis K., Zaroguolidis P., Boutsikou E., Papaioannou A., Machairiotis N., Tsakiridis K., Katsikogiannis N., Zaric B., Branislav P., Huang H., Kuogioumtzi I., Spyrtos D., Zarogoulidis K., (2013), "Malignant pleural mesothelioma: Current and future perspectives", *Journal of Thoracic Disease*, 5 (4), 397-406.
- [7] Zucali P. A., Ceresoli G. L., De Vincenzo F., Simonelli M., Lorenzi E., Gianoncelli L., Santoro A., (2011), "Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma", *Cancer Treatment Reviews*, 37 (7), 543-58.
- [8] Carbone M., Pass H. I., Miele L., Bocchetta M., (2003), "New developments about the association of SV40 with human mesothelioma" *Oncogene*, 22 (33), 5173-80.
- [9] Dobra K., Hjerpe A., (2012), "Malignant Mesothelioma", *Serous Effusions*, 225-40.
- [10] Atabey E., (2009), "Madencilikte maruz kalinan asbest, eriyonit ve diğer mineral tozlari ve etkileri (mezotelyoma-pnömokonyozlar): tıbbi jeolojik değerlendirme", 1-20.
- [11] Jasani B., Gibbs A., (2012), "Mesothelioma Not Associated With Asbestos Exposure", *Archievs of Pathology and Laboratory Medicine*, 136 (3), 262-7.
- [12] Wagner J. C., Skidmore J. W., Hill R. J., Griffiths D. M., (1985), "Erionite exposure and mesotheliomas in rats", *British Journal of Cancer*, 51 (5), 727-30.
- [13] Ling C., Wang X., Zhu J., Tang H., Du W., Zeng Y., Sun L., Huang H. A., Liu Z., (2019), "MicroRNA-4286 promotes cell proliferation, migration, and invasion via PTEN regulation of the PI3K/Akt pathway in non-small cell lung cancer", *Cancer Medicine*, 1-12.

- [14] Lortet-Tieulent J., Soerjomataram I., Ferlay J., Rutherford M., Weiderpass E., Bray F., (2014), "International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women", *Lung Cancer*, 84 (1), 13-22.
- [15] Yasufuku K., Chiyo M., Koh E., Moriya Y., Iyoda A., Sekine Y., Shibuya K., Iizasa T., Fujisawa T., (2005), "Endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for staging of lung cancer", *Lung Cancer*, 50 (3), 347-54.
- [16] Rawlings J. S., Rosler K. M., Harrison D. A., (2004), "The JAK/STAT signaling pathway", *Journal of Cell Science*, 117 (8), 1281-3.
- [17] Igaz P., Tóth S., Falus A., (2001), "Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice", *Inflamm Research*, 50 (9), 1-7.
- [18] Oshea J. J., Gadina M., Schreiber R. D., (2002), "Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway", *Cell*, 109 (2), 121-31.
- [19] Harrison D. A., (2012), "The JAK/ STAT Pathway", *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 4 (3), 2-5.
- [20] Cai B., Cai J. P., Luo Y. L., Chen C., Zhang S., (2015), "The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis", *Inflammation*, 38 (4), 1599-608.
- [21] Lavecchia A., Giovanni C. D., Novellino E., (2011), "STAT-3 Inhibitors: State of the Art and New Horizons for Cancer Treatment", *Current Medicinal Chemistry*, 18 (16), 2359-75.
- [22] Yu H., Jove R., (2004), "The stats of cancer - New molecular targets come of age", *Nature Reviews Cancer*, 4 (2), 97-105.
- [23] Vogelstein B., Kinzler K. W., (2004), "Cancer genes and the pathways they control" *Nature Medicine*, 10 (8), 789-99.
- [24] Ferbeyre G., Moriggl R., (2011), "The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes", *Biochimia et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1815 (1), 104-14.
- [25] Thoennissen N. H., Iwanski G. B., Doan N. B., Okamoto R., Lin P., Abbassi S., Song J. H., Yin D., Toh M., Xie W. D., Said J. W., Koeffler H. P., (2009), "Cucurbitacin B Induces Apoptosis by Inhibition of the JAK/STAT Pathway and Potentiates Antiproliferative Effects of Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cells", *Cancer Research*, 69 (14), 5876-84.
- [26] Chen Y. L., Law P. Y., Loh H. H., (2005), "Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy", *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5 (6), 575-89.
- [27] West K.,Castillo S., Dennis P., (2002), "Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance", *Drug Resistant Updates*, 5 (6), 234-48.

- [28] Garcia-Echeverria C., Sellers W. R., (2008), "Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer", *Oncogene*, 27 (41), 5511-26.
- [29] Osaki M., Oshimura M., Ito H., (2004), "PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer", *Apoptosis*, 9 (6), 667-76.
- [30] Fresno Vara J. Á., Casado E., Castro J., Cejas P., Belda-Iniesta C., González-Barón M., (2004), "P13K/Akt signalling pathway and cancer", *Cancer Treatment Reviews*, 30 (2), 193-204.
- [31] Telkoparan P., Tazebay U. H., (2011), "Ras Family of Proteins : Cellular Function , Molecular Control , and its Role in Oncogenesis", 36 (4), 367-73.
- [32] Elmore S., (2007), "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death", *Toxicologic Pathology*, 35 (4), 495-516.
- [33] Su Z., Yang Z., Xu Y., Chen Y., Yu Q., (2015), "Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis", *Molecular Cancer*, 14 (48), 1-14.
- [34] Hein A. L., Ouellette M. M., Yan Y., (2014), "Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival", *International Journal Oncology*, 45 (5), 1813-9.
- [35] Parsons R., (2004), "Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway", *Seminar in Cell-Developmental Biology*, 15 (2), 171-6.
- [36] Sümer-Turanlıgil N. C., Uyanıkgil Y., (2010), "Hücre İçi Sinyal Yolakları ve Klinik Yansımaları", *Arşiv*, 19 (3), 180-91.
- [37] Kyriakis J. M., Avruch J., (2001), "Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation", *Physiological Reviews*, 81 (2), 807-69.
- [38] Widmann C., Gibson S., Jarpe M. B., Johnson G. L., (1999), "Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human", *Physiological Reviews*, 79 (1), 143-80.
- [39] Pierce K. L., Luttrell L. M., Lefkowitz R. J., (2001), "New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades", *Oncogene*, 20 (13), 1532-9.
- [40] Wang J., Xia Y., (2012), "Assessing developmental roles of MKK4 and MKK7 in vitro", *Communicative-Integrative Biology*, 5 (4), 319-24.
- [41] Dhillon A. S., Hagan S., Rath O., Kolch W., (2007), "MAP kinase signalling pathways in cancer", *Oncogene*, 26 (22), 3279-90.
- [42] Zhang W., Liu H. T., (2002), "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells", *Cell Research*, 12 (1), 9-18.

- [43] Hennig A., Markwart R., Esparza-Franco M. A., Ladds G., Rubio I., (2015), "Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems", *Biological Chemistry*, 396 (8), 831-48.
- [44] Seger R., (2004), "MAP Kinase Signaling Protocols", *Methods in Molecular Biology*.
- [45] Cuevas B. D., Abell A. N., Johnson G. L., (2007), "Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration", *Oncogene*, 26 (22), 3159-71.
- [46] Rajagopalan H., Bardelli A., Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B., Velculescu V. E., (2002), "RAF/ RAS oncogenes and mismatch-repair status", *Nature*, 418, 934.
- [47] Asati V., Mahapatra D. K., Bharti S. K., (2016), "PI3K/ Akt/ mTOR and Ras/ Raf/ MEK/ ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 109, 314-41.
- [48] Ryan M. B., Der C. J., Wang-Gillam A., Cox A. D., (2015), "Targeting RAS - mutant Cancers: Is ERK the Key?", *Trends in Cancer*, 1 (3), 183-98.
- [49] Bubici C., Papa S., (2014), "JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets", *British Journal of Pharmacology*, 171 (1), 24-37.
- [50] Dhanasekaran D. N., Reddy E. P., (2008), "JNK signaling in apoptosis", *Oncogene*, 27 (48), 6245-51.
- [51] Wagner E. F., Nebreda A. R., (2009), "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development", *Nature Reviews Cancer*, 9 (8), 537-49.
- [52] Manning A. M., Davis R. J., (2003), "Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold?", *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (7), 554-65.
- [53] Tuncay S., Banerjee S., (2011), "MAPK3 (mitogen-activated protein kinase 3)", *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 1 (11), 1011-5.
- [54] Cargnello M., Roux P. P., (2011), "Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75 (1), 50-83.
- [55] Smullen S., McLaughlin N. P., Evans P., (2018), "Chemical synthesis of febrifugine and analogues", *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 26 (9), 2199-220.
- [56] Taras D., Blanc J. F., Rullier A., Dugot-Senant N., Laurendeau I., Bieche I., Pines M., Rosenbaum J., (2006), "Halofuginone suppresses the lung metastasis of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats through MMP inhibition", *Neoplasia*, 8 (4), 312-8.

- [57] Sheffer Y., Leon O., Pinthus J. H., Nagler A., Mor Y., Iluz M., Kawada N., Yoshizato K., Pines M., (2007), "Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect", *Molecular Cancer Therapeutics*, 6 (2), 570-7.
- [58] Zhou H., Sun L., Yang X. L., Schimmel P., (2013), "ATP-directed capture of bioactive herbal-based medicine on human tRNA synthetase", *Nature*, 494 (7435), 121-4.
- [59] Sundrud M. S., Koralov S. B., Feurer M., Calado D. P., Kozhaya A. E., Rhule-Smith A., Lefebvre R. E., Unutmaz D., Mazitschek R., Waldner H., Whitman M., Keller T., Rao A., (2009), "Halofuginone inhibits th17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response", *Science*, 324 (5932), 1334-8.
- [60] Elkin M., Ariel I., Miao H. Q., Nagler A., Pines M., De Groot N., Hochberg A., Vlodavsky I., (1999), "Inhibition of bladder carcinoma angiogenesis, stromal support, and tumor growth by halofuginone", *Cancer Research*, 59 (16), 4111-8.
- [61] Pines M., Spector I., (2015), "Halofuginone - The multifaceted molecule", *Molecules*, 20 (1), 573-94.
- [62] Cerit K. K., Karakoyun B., Bahadır E., Yüksel M., Bülbül N., Ercan F., Dağlı E. T., Yeğen B. Ç., (2018), "Halofuginone improves caustic-induced oxidative injury of esophagus in rats", *Esophagus*, 15 (2), 59-68.
- [63] He B., Fu G., Du X., Chu H., (2019), "Halofuginone protects HUVECs from H₂O₂ -induced injury by modulating VEGF / JNK signaling pathway", *Journal of Chinese Medical Association*, 82 (2), 92-8.
- [64] Tacheau C., Michel L., Farge D., Mauviel A., Verrecchia F., (2007), "Involvement of ERK signaling in halofuginone-driven inhibition of fibroblast ability to contract collagen lattices", *European Journal Pharmacology*, 573 (1), 65-9.
- [65] Gnainsky Y., Kushnirsky Z., Bilu G., Hagai Y., Genina O., Volpin H., Bruck R., Spira G., Nagler A., Kawada N., Yoshizato K., Reinhardt D. P., Libermann T. A., Pines M., (2007), "Gene expression during chemically induced liver fibrosis: Effect of halofuginone on TGF- β signaling", *Cell and Tissue Research*, 328 (1), 153-66.
- [66] Roffe S., Hagai Y., Pines M., Halevy O., (2010), "Halofuginone inhibits Smad3 phosphorylation via the PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways in muscle cells: Effect on myotube fusion", *Experimental Cell Research*, 316 (6), 1061-9.
- [67] Spector I., Zilberstein Y., Lavy A., Nagler A., Genin O., Pines M., (2012), "Involvement of host stroma cells and tissue fibrosis in pancreatic tumor development in transgenic mice", *PLoS One*, 7 (7), 19-21.
- [68] Zeplin P. H., (2014), "Halofuginone down-regulates Smad3 expression and inhibits the TGF β -induced expression of fibrotic markers in human corneal fibroblasts", *Annals of Plastic Surgery*, 72 (4), 489.

- [69] Abramovitch R., Dafni H., Neeman M., Nagler A., Pines M., (1999), "Inhibition of Neovascularization and Tumor Growth, Facilitation of Wound Repair, by Halofuginone, an Inhibitor of Collagen Type I Synthesis", *Neoplasia*, 1 (4), 321-9.
- [70] Pinthus J. H., Sheffer Y., Nagler A., Fridman E., Mor Y., Genina O., Pines M., (2005), "Inhibition of Wilms tumor xenograft progression by halofuginone is accompanied by activation of WT-1 gene expression", *Journal of Urology*, 174 (4), 1527-31.
- [71] Van Kempen L. C., Rijntjes J., Mamor-Cornelissen I., Vincent-Naulleau S., Gerritsen M. J., Ruiter D. J., Van Dijk M. C., Geffrotin C., Van Muijen G. N., (2008), "Type I collagen expression contributes to angiogenesis and the development of deeply invasive cutaneous melanoma", *International Journal of Cancer*, 122 (5), 1019-29.
- [72] Gavish Z., Pinthus J. H., Barak V., Ramon J., Nagler A., Eshhar Z., Pines M., (2002), "Growth inhibition of prostate cancer xenografts by halofuginone", *Prostate*, 51 (2), 73-83.
- [73] Bodanovsky A., Guttman N., Barzilai-Tutsch H., Genin O., Levy O., Pines M., Halevy O., (2014), "Halofuginone improves muscle-cell survival in muscular dystrophies", *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1843 (7), 1339-47.
- [74] Grudzien M. M., Low P. S., Manning P. C., Arredondo M., Belton R. J., Nowak R. A., (2010), "The antifibrotic drug halofuginone inhibits proliferation and collagen production by human leiomyoma and myometrial smooth muscle cells", *Fertility and Sterility*, 93 (4), 1290-8.
- [75] Figueiredo-Pontes L. L., Assis P., Santana-Lemos B., Jacomo R., Lima A. S., Garcia A., Thome R., Araujo A., Panepucci R., Zago M., Nagler A., Falcao R., Rego E. M., (2011), "Halofuginone has anti-proliferative effects in acute promyelocytic leukemia by modulating the transforming growth factor beta signaling pathway", *PLoS One*, 6 (10), 1-11.
- [76] Leiba M., Jakubikova J., Klippel S., Mitsiades C. S., Hideshima T., Tai Y. T., Leiba A., Pines M., Richardson P. G., Nagler A., Anderson K. C., (2012), "Halofuginone inhibits multiple myeloma growth in vitro and in vivo and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents", *British Journal Haematology*, 157 (6), 718-31.
- [77] Chu T. L. H., Guan Q., Nguan C. Y. C., Du C., (2013), "Halofuginone suppresses T cell proliferation by blocking proline uptake and inducing cell apoptosis", *International Immunopharmacology*, 16 (4), 414-23.
- [78] Jin M. L., Park S. Y., Kim Y., Park G., Lee S. J., (2014), "Halofuginone induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits migration via downregulation of matrix metalloproteinase-9", *Int. J. Oncol.*, 44 (1), 309-18.

- [79] Zhan W., Kang Y., Chen N., Mao C., Shang J., (2017), “Halofuginone ameliorates inflammation in severe acute hepatitis B virus (HBV)-infected SD rats through AMPK activation”, *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 2947-55.
- [80] Chen G. Q., Tang C. F., Shi X. K., Lin C. Y., Fatima S., Pan X. H., Yang D. J., Zhang G., Lu A. P., Lin S. H., Bian Z. X., (2015), “Halofuginone inhibits colorectal cancer growth through suppression of Akt/mTORC1 signaling and glucose metabolism”, *Oncotarget*, 6 (27), 24148-62.
- [81] Huo S., Yu H., Li C., Zhang J., Liu T., (2015), “Effect of halofuginone on the inhibition of proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cell line”, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8 (12), 15863-70.
- [82] Juárez P., Fournier P., Mohammed K. S., Kenna R., Davis H. W., Peng X. H., Niewolna M., Mauviel A., Chirgwin J. M., Guise T. A., (2017), “Halofuginone inhibits TGF-B/BMP signaling and in combination with zoledronic acid enhances inhibition of breast cancer bone metastasis”, *Oncotarget*, 8 (49), 86447-62.
- [83] Nagler A., Katz A., Aingorn H., Miao H. Q., Condiotti R., Genina O., Pines M., Vlodavsky I., (1997), “Inhibition of glomerular mesangial cell proliferation and extracellular matrix deposition by halofuginone”, *Kidney International*, 52 (6), 1561-9.
- [84] Zeng S., Wang K., Huang M., Quio Q., Xiao Y., Shi M., Zou Y., Xu H., Liang L., (2017), “Halofuginone inhibits TNF- α -induced the migration and proliferation of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients”, *International Immunopharmacology*, 43, 187-94.
- [85] Figueiredo-Pontes L. L., Assis P., Santana-Lemos B., Jacomo R., Lima A. S., Garcia A., Thome R., Araujo A., Panepucci R., Zago M., Nagler A., Falcao R., Rego E. M., (2011), “Halofuginone Has Anti-Proliferative Effects in Acute Promyelocytic Leukemia by Modulating the Transforming Growth Factor Beta Signaling Pathway,” *PLoS One*, 6 (10), 1-11.
- [86] Xia X., Wang W., Zhang S., Zheng Y., Wang L., Xu Y., Hang B., Sun Y., Lei L., Bai Y., Hu J., (2019), “miR-31 shuttled by halofuginone-induced exosomes suppresses MFC-7 cell proliferation by modulating the HDAC2/cell cycle signaling axis”, *Journal of Cellular Physiology*, 1-15.
- [87] Barzilai-Tutsch H., Bodanovsky A., Maimon H., Pines M., Halevy O., (2016), “Halofuginone promotes satellite cell activation and survival in muscular dystrophies”, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1862 (1), 1-11.

- [88] Leiba M., Jakubikova J., Klippel S., Mitsiades C. S., Hideshima T., Tai Y. T., Leiba A., Pines M., Richardson P. G., Nagler A., Anderson K. C., (2012), "Halofuginone inhibits multiple myeloma growth in vitro and in vivo and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents", *British Journal Haematology*, 157 (6), 718-31.
- [89] Popov Y., Patsenker E., Bauer M., Niedobitek E., Schulze-Krebs A., Schuppan D., (2006), "Halofuginone Induces Matrix Metalloproteinases in Rat Hepatic Stellate Cells via Activation of p38 and NF κ B", *Journal Biology Chemistry*, 281 (22), 15090-8.
- [90] Lugini L., Sciamanna I., Federici C., Iessi E., Spugnini E. P., Fais S., (2017), "Antitumor effect of combination of the inhibitors of two new oncotargets: proton pumps and reverse transcriptase", *Oncotarget*, 8 (3), 4147-55.
- [91] Chen G. Q., Gong R. H., Yang D. J., Zhang G., Lu A. P., Yan S. C., Lin S. H., Bian Z. X., (2017), "Halofuginone dually regulates autophagic flux through nutrient-sensing pathways in colorectal cancer", *Cell Death and Disease*, 8 (5), e2789.
- [92] Demiroglu-Zergeroglu A., Candemir G., Turhanlar E., Sagir F., Ayvali N., (2016), "EGFR-dependent signalling reduced and p38 dependent apoptosis required by Gallic acid in Malignant Mesothelioma cells", *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 2000-7.
- [93] Su T. R., Lin J. J., Tsai C. C., Huang T. K., Yang Z. Y., Wu M. O., Zheng Y. Q., Su C. C., Wu Y. J., (2013), "Inhibition of Melanogenesis by Gallic Acid: Possible Involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathways in B16F10 Cells", *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10), 20443-58.
- [94] Sui X., Kong N., Ye L., Zhou J., Zhang Q., He C., Pan H., (2014), "p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents", *Cancer Letters*, 344 (2), 174-9.

ÖZGEÇMİŞ

Halime TOPAL 1994 yılında Erzurum’da doğdu. 2012 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden 2016 yılında mezun oldu. Aynı yıl başladığı Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Anabilim Dalı Yüksek Lisans programını 2019 yılında tamamladı.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Poster Sunumları

Ceylan H., Topal H., Turhal G., Demiroğlu-Zergeroğlu A., (2017), “Inhibition of Cellular Proliferation and Induction of Apoptosis by Halofuginone in Human Mesothelioma Cell Lines”, 3 rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, Erzurum/ Türkiye, 5-7 Ekim.

Topal H., Turhal G., Demiroğlu-Zergeroğlu A., (2019), “Alteration of MAPK Signaling by Halofuginone Treatment”, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu ve Tanıtım Günleri, Kocaeli/ Türkiye, 17-18 Haziran.