

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

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

**BİR SALİSİLİK ASİT ANALOĞU OLAN**  
**ACİBENZOLAR-S-METHYL'İN MİTOJENİK MAPK**  
**SİNYAL YOLU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SH-SY5Y**  
**NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NESLİHAN ÇİTİL**

**ARALIK 2019**  
**MUĞLA**

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

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

**BİR SALİSİLİK ASİT ANALOĞU OLAN**  
**ACİBENZOLAR-S-METHYL'İN MİTOJENİK MAPK**  
**SİNYAL YOLU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SH-SY5Y**  
**NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NESLİHAN ÇİTİL**

**ARALIK 2019**

**MUĞLA**

# MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

## Fen Bilimleri Enstitüsü

### TEZ ONAYI

NESLİHAN ÇİTİL tarafından hazırlanan ACİBENZOLAR-S-METHYL'İN MİTOJENİK MAPK SİNYAL YOLU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA İNCELENMESİ başlıklı tezinin, 18/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

#### TEZ SINAV JÜRİSİ

Doç. Dr. Reşat ÜNAL

Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül YILDIZ

Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Abdullah YALÇIN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,

Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

İmza:

İmza:

İmza:

#### ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof.Dr.Ömür BAYSAL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül YILDIZ

Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

İmza:

Savunma Tarihi: 18/12/2019

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

NESLİHAN ÇİTİL

18/12/19

## ÖZET

# **BİR SALİSİLİK ASİT ANALOĞU OLAN ACİBENZOLAR-S-METHYL'İN MİTOJENİK MAPK SİNYAL YOLU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA İNCELENMESİ**

NESLİHAN ÇİTİL

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül YILDIZ

Aralık, 2019, Sayfa 43

Günümüzde spesifik hücre proliferasyonu inhibitörleri aracılığıyla hedefe yönelik kanser terapileri geliştirebilmek oldukça önemli hale gelmiştir. Son on yılda yapılan çalışmalar, aspirin gibi salisilik asit (SA) içeren steroidal olmayan ilaçların birçok kanserde mortaliteyi azalttığını göstermiştir. Bu açıdan bakıldığında SA'yı, kanserde çoğalmayı önlemek için çok avantajlı olabilecek mitojenik MEK1/2 sinyalleşmesinin potansiyel bir inhibitörü olarak gösteren veriler mevcuttur. Fakat henüz, SA'nın nöroblastoma hücrelerinde MEK1/2 sinyalleşmesi üzerindeki etkisi konusunda herhangi bir çalışma yoktur. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı SA'nın sık görülen ve zayıf prognoza sahip bir pediyatrik kanser olan nöroblastoma kanserinde MEK1/2 sinyalleşmesinde etkili olup olmadığını ortaya çıkarmaktır.

Bu çalışmada, bir SA analogu olan Acibenzolar-S-Methyl'in, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde MEK1/2 sinyal yolu üzerindeki etkisi MTS hücre canlılığı analizi ve MEK1/2 ve aktif kaspaz-3 protein seviyelerinin western blotlama tekniği ile tespiti yapılarak analiz edilmiştir. MTS hücre canlılığı testi, 10 mM Acibenzolar-S-Methyl'in hücre canlılığını %50 azalttığını göstermiştir. 10 mM Acibenzolar-S-Methyl ile muamele edilmiş hücrelerin western blot sonuçları, MEK1/2 sinyalinin önemli ölçüde inhibe edildiğini, bununla uyumlu olarak da SH-SY5Y hücrelerinin apoptotik ölümünün anlamlı şekilde arttığını aktif-kaspaz-3 analizi ile göstermiştir.

Bu çalışma ile SA analogu Acibenzolar-S-Methyl'in SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde MEK1/2 sinyalini olumsuz yönde etkilediği ve onların apoptotik ölümüne neden olduğu ilk kez olarak gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları yalnızca

karsinogenez mekanizmalarını anlamak için değil aynı zamanda etkili tedavi yöntemleri geliştirmek için de fikir verebilecek olması açısından anlamlıdır.

**Anahtar kelimeler:** Salisilik Asit, Acibenzolar-S-Methyl, MEK1/2, SH-SY5Y, Nöroblastoma Kanseri



## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ACIBENZOLAR-S-METHYL ON THE MITOGENIC MAPK SIGNALING PATHWAY AS A SALICYLIC ACID ANALYSIS IN SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELL LINE**

NESLİHAN ÇİTİL

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ayşegül Yıldız

December, 2019, 42 pages

Today, it has become very important to develop targeted cancer therapies through specific cell proliferation inhibitors. Studies over the past decade have shown that non-steroidal drugs containing salicylic acid (SA), such as aspirin, reduce mortality in many cancers. From this point of view, there are data showing SA as a potential inhibitor of mitogenic MEK1 / 2 signalling, which may be very advantageous to prevent proliferation in cancer. However, there is no study on the effect of SA on MEK1 / 2 signalling in neuroblastoma cells. Therefore, the aim of this study was to determine whether SA is effective in MEK1 / 2 signalling in neuroblastoma cancer, a common pediatric cancer with a poor prognosis.

In this study, the effect of Acibenzolar-S-Methyl, a SA analogue, on MEK1 / 2 signalling pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells was analyzed by MTS cell viability analysis and detection of MEK1 / 2 and active caspase-3 protein levels by western blotting technique.

The MTS cell viability test showed that 10 mM Acibenzolar-S-Methyl reduced cell viability by 50%. Western blot results of cells treated with 10 mM Acibenzolar-S-Methyl showed that the MEK1 / 2 signal was significantly inhibited, and correspondingly increased apoptotic deaths of SH-SY5Y cells by active-caspase-3 analysis.

In this study, it was shown for the first time that SA analogue Acibenzolar-S-Methyl negatively affects MEK1 / 2 signalling in SH-SY5Y neuroblastoma cells and causes their apoptotic death. The results of the study are significant not only for

understanding the mechanisms of carcinogenesis but also for the development of effective treatment methods.

**Keywords:** Salicylic Acid, Acibenzolar-s-methyl, MEK1/2, SH-SY5Y, Neuroblastoma Cancer,





*Canlarima...*



## ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sırasında karşılaştığım her zorluğu ustalıklı aşan, değerli deneyimlerini benimle paylaşan, başarılı bir akademisyen olmanın yanında örnek bir anne olan saygıdeğer danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül Yıldız'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmamda kullandığım acibenzolar-s-methly kimyasalı için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ömür Baysal'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın önemli bir kısmında yardımlarını esirgemeyerek laboratuvarlarının kapılarını açan İstanbul Teknik Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Arzu Karabay Korkmaz'a ve Gebze Teknik Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Uygur Halis Tazebay'a teşekkür ederim.

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

Sevgili Yeşim Kaya, Seren Küçükvardar, Süleyman Arzıman ve Doç.Dr. Özgür Tanrıverdi'ye çalışmamın her aşamasında verdikleri emek, destek, gösterdikleri sabır ve ayırdıkları zamanları için çok teşekkür ederim.

Canım eşime, aileme ve ömrümün hediyeleri oğullarıma verdikleri sonsuz destek için teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, BAP 17/023 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                           |             |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>ÖZET .....</b>                                                         | <b>V</b>    |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                      | <b>vii</b>  |
| <b>ÖNSÖZ .....</b>                                                        | <b>X</b>    |
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                                                  | <b>XI</b>   |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>                                             | <b>xiii</b> |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>                                              | <b>xiv</b>  |
| <b>SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>                              | <b>xvi</b>  |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                      | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Kanser .....</b>                                                   | <b>1</b>    |
| <b>1.2. Nöroblastoma Kanseri.....</b>                                     | <b>2</b>    |
| <b>1.3 Hücre İçi Sinyal Yolları .....</b>                                 | <b>3</b>    |
| 1.3.1 Hücre içi sinyal yollarının kanserdeki önemi .....                  | 3           |
| 1.3.2 MAPK (Mitojen aktif protein kinaz) yolu .....                       | 4           |
| 1.3.3 MAPK sinyal yolu bileşenleri.....                                   | 5           |
| <b>1.4 Kanslerle Mücadelede Salisilik Asit ( Aspirin) Kullanımı .....</b> | <b>10</b>   |
| 1.4.1 Aspirin ve etkileri.....                                            | 10          |
| 1.4.2. Nöroblastoma, MAPK sinyal yolu ve salisilik asit ilişkisi .....    | 12          |
| <b>1.5. Çalışmamın amacı.....</b>                                         | <b>13</b>   |
| <b>2.MATERYAL VE METOT .....</b>                                          | <b>15</b>   |
| <b>2.1.Materyaller.....</b>                                               | <b>15</b>   |
| 2.1.1. Ekipmanlar .....                                                   | 15          |
| 2.1.2 Kimyasallar ve enzimler .....                                       | 16          |
| 2.1.3 Ticari Kitler.....                                                  | 18          |
| 2.1.4. Tamponlar ve solüsyonlar.....                                      | 18          |
| 2.1.4.1. SDS-PAGE için IX yükleme boyası .....                            | 18          |
| 2.1.4.2. SDS-PAGE için stacking buffer pH 6.8, 0.5 M .....                | 18          |

|                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.4.3. SDS-PAGE için separating buffer pH 8.8, 1.5 M.....                                                                           | 19        |
| 2.1.4.4. SDS running buffer.....                                                                                                      | 19        |
| 2.1.4.5. Tris buffered saline (TBS) .....                                                                                             | 19        |
| 2.1.4.6. Tris buffered saline – tween20 (TBST).....                                                                                   | 19        |
| 2.1.4.7. Towbin buffer .....                                                                                                          | 19        |
| 2.1.4.8. Western blotlama için bloklama solüsyonu.....                                                                                | 20        |
| 2.1.4.9. Western blotlama için primer ve sekonder antikor hazırlama solüsyonu.....                                                    | 20        |
| 2.1.5. Hücre hattı .....                                                                                                              | 20        |
| <b>2.2.Yöntemler.....</b>                                                                                                             | <b>20</b> |
| 2.2.1. Kanserli SH-SY5Y hücre hattı kültürü .....                                                                                     | 20        |
| 2.2.2. Pasajlama .....                                                                                                                | 21        |
| 2.2.3. Kimyasal dozlarının belirlenmesi (IC50) : MTS Hücre Canlılık Analizi .....                                                     | 23        |
| 2.2.4. Protein izolasyonu .....                                                                                                       | 24        |
| 2.2.5. Protein konsantrasyon tayini .....                                                                                             | 24        |
| 2.2.6. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis).....                                                     | 25        |
| 2.2.7. Western blotlama.....                                                                                                          | 28        |
| 2.2.8. Kemilüminesans tekniği ile western görüntüleme.....                                                                            | 29        |
| <b>2.3. Bütünleştirici Piksel Analizi .....</b>                                                                                       | <b>30</b> |
| <b>2.4. İstatiksel Analizler.....</b>                                                                                                 | <b>30</b> |
| <b>3.BULGULAR.....</b>                                                                                                                | <b>31</b> |
| <b>3.1. Bulgular.....</b>                                                                                                             | <b>31</b> |
| 3.1.1 Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattı canlılığının analizi .....                             | 31        |
| 3.1.2. Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattında MEK1/2 sinyal yolu aktivitesinin incelenmesi ..... | 33        |
| 3.1.3. Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattında kaspaz-3 aktivasyonunun incelenmesi.....           | 34        |
| <b>3.2. İrdeleme.....</b>                                                                                                             | <b>36</b> |
| <b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>                                                                                                  | <b>38</b> |
| <b>KAYNAKÇA .....</b>                                                                                                                 | <b>39</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                                                                  | <b>42</b> |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. Ekipmanlar ve tedarikçi firmalar .....  | 15 |
| Çizelge 2.2. Kimyasallar ve enzimler .....           | 17 |
| Çizelge 3.3. Ticari kitler.....                      | 18 |
| Çizelge 2.4 Qubit assay tüplerin hazırlanması.....   | 25 |
| Çizelge 2.5. SDS-PAGE jellerinin hazırlanması.....   | 27 |
| Çizelge 2.6. Pretein örneklerinin hazırlanması ..... | 28 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Üç MAPK (ERK1/2, JNK1/2/3, p38) yolağı ( Küçükkaya, B., 2012) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 6  |
| Şekil 1.2. ERK MAPK kaskadının onkogen aktivasyonu ( Roberts, P.J.,2007).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 7  |
| Şekil 1.3. Ras/Raf/MAPK yolu (Julian, R., 2006) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 8  |
| Şekil 1.4. MAPK yolundaki ERK1 / 2'nin aşağı yönde ana hedefleri. ( Liu, F., 2017)<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 10 |
| Şekil 1.5.Düşük doz aspirinin antineoplastik etkilerinin altında yatan immünolojik<br>mekanizmaları. (Carlson, L.M., 2013).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 11 |
| Şekil 2.1. Thoma lamı ve sayım prensibi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 22 |
| Şekil 2.2. Kültüre edilmiş kontrol SH-SY5Y hücrelerine MTS uygulaması.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 23 |
| Şekil 3.1.A. Acibenzolar-S-Metil'in 24 saat inkübasyon sonrası nöroblastoma hücre<br>hattı SH-SY5Y büyümesi üzerindeki inhibe edici etkileri. ( 1, 10, 15 ve 20<br>mM'lik nihai konsantrasyonları elde etmek için 96 kuyucuklu bir plakanın<br>her oyuğuna Acibenzolar-S-Metil ilave edildi. Hücre canlılığı, MTS testi<br>ile belirlendi ve absorbans, bir mikropłaka okuyucu kullanılarak 490 nm'de<br>ölçüldü. Grafik, kontrole kıyasla çoğalma yüzdeleri olarak ifade edilen<br>MTS sonuçlarının kantitatif analizini göstermektedir. Çubuk ortalama<br>değerleri $\pm$ SD temsil etmektedir. *** p <0.001 ..... | 32 |
| Şekil 3.2.B. Grafik, Panel A'daki sinyallerin kantitatif analizini göstermektedir.<br>MEK1/2'nin bant yoğunluğu, kalnexin'e göre normalleştirilmiştir. Değerler<br>MEK1/2 ekspresyonunun deneysel / kontrol oranına göre hesaplandı ve<br>sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Çubuk ortalama değerleri $\pm$ SD<br>temsil etmektedir. *** p <0.001 .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 34 |
| Şekil 3.3.A. Kaspaz-3'ün SH-SY5Y hücrelerinde Acibenzolar-S-Methyl muamelesi<br>ile aktivasyonu. Western blot membranı, kaspaz-3 antikoru ve internal<br>kontrol olarak kalnexin antikoru ile işaretlendi. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 35 |
| Şekil 3.4.B. Grafik, Panel A'daki sinyallerin kantitatif analizini göstermektedir.<br>Kaspaz-3'ün bant yoğunluğu, kalnexin'e göre normalleştirilmiştir. Kaspaz-<br>3 ekspresyonunun deneysel / kontrol oranına göre değerler hesaplanmış ve                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |

sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. ubuk ortalama değerleri  $\pm$  SD  
temsil etmektedir. \*\*\* ..... 35



## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                    |                  |
|--------------------|------------------|
| $\alpha$           | Alfa             |
| $\beta$            | Beta             |
| $\gamma$           | Gama             |
| $^{\circ}\text{C}$ | Santigrat derece |
| M                  | Molar            |
| V                  | Volt             |
| A                  | Amper            |
| g                  | Gram             |
| $\mu\text{g}$      | Mikrogram        |
| ng                 | Nanogram         |
| lt                 | Litre            |
| $\mu\text{l}$      | Mikrolitre       |
| mL                 | Mililitre        |
| mM                 | Milimolar        |
| nm                 | Nanometre        |
| cm                 | Santimetre       |
| $\text{cm}^2$      | Santimetrekare   |
| mm                 | Milimetre        |
| $\text{mm}^3$      | Milimetreküp     |
| $\text{O}_2$       | Oksijen          |
| $\text{CO}_2$      | Karbondioksit    |
| HCl                | Hidrojen klorür  |
| NaCl               | Sodyum klorür    |
| $\text{Cl}^-$      | Klorür           |
| dH <sub>2</sub> O  | Distile su       |
| bp                 | Baz çifti        |



|           |                                        |
|-----------|----------------------------------------|
| SD        | Standart sapma                         |
| UV        | Ultraviyole                            |
| pH        | Power of hydrogen                      |
| Ser       | Serin                                  |
| Thr       | Treonin                                |
| DNA       | Deoksiribonükleik asit                 |
| RNA       | Ribonükleik asit                       |
| PI3K      | Phosphatidylinositol 3-kinase          |
| Akt (PKB) | Protein kinase B                       |
| PKC       | Protein kinase C                       |
| PKA       | Protein kinase A                       |
| p-Akt     | Phospho-Akt                            |
| RAS       | G-Proteini türünde proto-onkogen       |
| ERK       | Ekstraselüler sinyalle düzenlenen      |
| RTK       | Receptor tyrosine kinase               |
| RasGEF    | Ras guanine nucleotide exchange factor |
| RasGAP    | Ras GTPase-activating protein          |
| PGH2      | Prostaglandin H2                       |
| PH        | Pleckstrin homology domain             |
| MDM2      | Mouse double minute 2 homolog          |
| mTOR      | Mammalian target of rapamycin          |
| JNK -c    | Jun N-terminal kinase                  |
| Grb2      | Growth factor receptor-bound protein 2 |
| SOS       | Son of sevenless                       |
| GDP       | Guanosine diphosphate                  |
| GTP       | Guanosine triphosphate                 |
| PLD2      | Phospholipase D2                       |
| MKP       | MAP kinase phosphatase                 |
| CDK       | Cyclin-dependent kinase                |

|           |                                                                                           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| CDK2      | Cyclin-dependent kinase 2                                                                 |
| SDS       | Sodium dodecyl sulphate                                                                   |
| SDS-PAGE  | Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis                                |
| DMEM      | Dulbecco's modified eagle medium                                                          |
| FBS       | Fetal bovine serum                                                                        |
| BSA       | Bovine serum albumin                                                                      |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin                                                                   |
| PBS       | Phosphate buffered saline                                                                 |
| DMSO      | Dimethyl sulfoxide                                                                        |
| TEMED     | Tetramethylethylenediamine                                                                |
| APS       | Ammonium persulfate                                                                       |
| GAPDH     | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase                                                  |
| IgG       | Immunoglobulin G                                                                          |
| HRP       | Horse radish peroxydase                                                                   |
| ECL       | Enhanced chemiluminescence                                                                |
| MTS       | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium |
| TBS       | Tris buffered saline                                                                      |
| TBST      | Tris buffered saline tween-20                                                             |
| mRNA      | Messenger RNA                                                                             |
| DTT       | Dithiothreitol                                                                            |
| SPSS      | Statistical package for the social sciences statistical analysis Program                  |
| NB        | Nöroblastoma                                                                              |
| HR-NB     | Yüksek riskli nöroblastom                                                                 |
| SA        | Salisilik asit                                                                            |
| ASA       | Asetil salisilik asit                                                                     |
| AA        | Arakidonik asit                                                                           |
| NSAID     | Steroid olmayan antiinflamatuar ilaç                                                      |

|       |                         |
|-------|-------------------------|
| COX 1 | Siklooksijenaz 1 enzimi |
| COX 2 | Siklooksijenaz 2 enzimi |
| WHO   | Dünya sağlık örgütü     |



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Kanser

Kanser, Dünya Sağlık Örgütü'nce (WHO), anormal hücrelerin normal sınırlarının ötesinde büyümesiyle karakterize edilen ve daha sonra vücudun farklı kısımlarını istila edebilen ve/veya diğer organlara yayılabilen geniş bir hastalık grubu için genel bir terim olarak tanımlanmıştır. Kullanılan diğer yaygın terimler malign tümörler ve neoplazmlardır. Kanser vücudun hemen her bölümünü etkileyebilir ve her biri özel tedavi stratejileri gerektiren birçok anatomik ve moleküler alt tipe sahiptir.

Son otuz yılda araştırmacılar, genler, proteinler ve bunların kanser hücrelerinin gelişimindeki rolleri hakkında önemli miktarda veri elde etmişlerdir. Mutasyona uğramış genlerin kanser hücre gelişimindeki rolü en önemli keşiflerden biridir. Yine son yıllarda kullanılan farklı metotların yardımıyla da yeni kanser biyomarkeri saptanabilmekte ve ayrıca gen ekspresyonu ve kusurlu proteinlerin potansiyeli hakkında bilgi elde edilebilmektedir. Son zamanlarda, genetik mutasyonlarla ilgili çevresel faktörler de tanımlanmıştır. Bu bulgular kanseri tedavi etmek ve kanser komplikasyonlarını azaltmak için yarar sağlamaktadır (Hassanpour, S.H., 2017).

Yakın zamanda yapılan, moleküler genetik çalışmalar ile karsinogenez mekanizmaları tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, genetik bozuklukların kanser oluşumundaki rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlamakla kalmayıp ilaçların kanserli hastalar üzerindeki etki ve yan etkilerinin bazılarının öngörülebilmesi ve hatta yönetilebilir hale gelmesi sağlamıştır (Hassanpour, S.H., 2017).

## 1.2. Nöroblastoma Kanseri

Nöroblastom (NB), bir yaş altı çocuklarda en sık görülen ekstrakranial solid tümör olup, 15 yaşın altındaki hastalarda tüm pediatrik neoplazmların %7' sini ve kanserlerin neden olduğu tüm pediatrik ölümlerin %15' ini oluşturur. Nöral kret hücrelerinden türetilmiş olup adrenal medullada veya paraspinal sempatik ganglionlar boyunca herhangi bir yerde ortaya çıkabilir. Tipik olarak, nöroblastom kemik ağrısı, anemi veya bebeklerde hepatomegali ile ortaya çıkar(Matthay, K.K., 2016)

Nöroblastom, benzersiz özelliklere sahip karmaşık bir tümör tipidir. Bazı hastalarda, nöroblastom tamamen gerileyebilir veya kendiliğinden farklılaşarak herhangi bir tedavi olmadan tam iyileşmeye yol açabilir. Diğer durumlarda, nöroblastomlu çocuklar, çok kötü sonuçları olan yaygın bir metastatik tümör geliştirir (Erin, K., 2018).

Nöroblastom tanısı alan çocukların yaklaşık %40' ı yüksek riskli olarak sınıflandırılır ve bu hastaların sadece %50' si uzun süreli sağkalım elde eder. Düşük ve orta riskli hastalarda hayatta kalma oranı %95' den fazladır(Pinto, N.R., 2015). Bununla birlikte, vakaların yaklaşık %60' ında tespit edilen yüksek riskli nöroblastom(HR-NB) durumunda, tedavinin prognozu olumsuzdur. Agresif multimodal tedaviye rağmen, beş yıllık sağkalım oranı % 50' nin altında kalmaktadır. Standart nöroblastom tedavisi yöntemleri, iç organlara ciddi hasar, anemi, saç dökülmesi ve doğurganlık üzerinde olumsuz etki dahil olmak üzere güçlü yan etkilere sahiptir. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler, hastalık tedavisinin ilerleyen aşamalarında özellikle düşük etkinlik göstermektedir ayrıca sonraki nüksün nedeni olan minimal rezidüel hastalık problemini çözmezler (Erin, K., 2018).

Hücre içi sinyal yollarından biri olan RAS' ta meydana gelen mutasyonlar nöroblastoma kanser etiyolojisinde rol oynarlar. RAS(G-Proteini türünde bir proto-onkogen ve bunu kodlayan gen) proteinleri, hücre içi büyümeyi, farklılaşmayı ve hayatta kalma sinyalini kontrol eder. Bu hayati sinyallerin kontrolünde mitojenle aktive edilen protein (MAP) kinaz sinyal yolu önemli rol almaktadır (Gripp, K.W. 2012).

Nöroblastomun köken aldığı sinir kret hücreleri, çoklu organları geçebilir, bozabilir ve terminal olgunlaşma için RAS sinyallemesini etkileyebilir. Nöral kret hücrelerinin, RAS yolu mutasyonları nedeniyle doğru şekilde gelişmemesi bazı yatkınlık sendromlarında (Costello sendromu, Noonan sendromu ve nörofibromatis tip 1’de dahil olmak üzere) nöroblastom prevalansının açıklanmasına yardımcıdır. RAS-MAPK yolağının nöroblastomdaki öneminin doğrulanması, tekrarlayan, sporadik tümörlerin bu yoldaki yüksek mutasyon sıklığına sahip olması ve bu mutasyonların daha agresif hastalıkların bir göstergesi olduğu gözlemlenmiştir (Lopez-Miranda B.,1997; Cotton J.L., 1995; Romano A.A., 2010).

### **1.3 Hücre İçi Sinyal Yolları**

Sinyal iletimi, hücrede birçok hücresel aktiviteyi ve hücrelerin davranışını düzenleyen karmaşık bir sistemin önemli bir parçasıdır. Dolayısı ile sinyal iletimindeki hatalar kanser, otoimmünite ve diyabet gibi hastalıkların ana nedenidir. Bu nedenle, sinyal iletimi ile ilgili metabolik fonksiyonlar kanser biyolojisinin en önemli konusu haline gelmiştir (Çoban, Z.D., 2013).

#### **1.3.1 Hücre içi sinyal yollarının kanserdeki önemi**

Hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi, embriyogenez, çoğalma (proliferasyon), büyüme, farklanma (diferantiation) gibi biyolojik olaylarını gerçekleştirebilmesi için hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminin devamı önemli ve gereklidir. Bir hücre dışarıdan sinyal almazsa apoptoza gider, ölür. Her hücre kendisine dışarıdan veya diğer hücrelerden gelen sinyalleri algılar. Alınan sinyaller hücre içine iletilerek uygun cevaplar verilir. İşte bu noktada, sinyallerin hücreye geldikten sonra hücre tarafından algılanmasında, hücre içi sinyal iletim mekanizmaları görevlidir. İnsan genomunda görev yapan genlerin yaklaşık beşte birinin bu görevde yer alması bu yolların hücre için ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Alberts, B., 2004).

Karsinogenezisin temelinde, hücrenin biyolojik olaylarını etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır (Doğan, A.L., 2004). Bu nedenle kanserlerde ilk etkilenen mekanizma genellikle hücre içindeki sinyal iletim yollarıdır. Bozulan sinyal iletimi ile ortaya çıkan problemler başta kanser olmak üzere farklı hastalıkları oluşturmaktadır (Blume-Jensen, P., 2001).

Tüm ökaryotik hücrelerde bulunan MAPK enzimleri, farklı reseptörler tarafından alınan mitojenik uyarıcıların kesişme noktaları ve/veya birleşimleridir. Aldığı uyarılara cevap olarak, hücre içi sinyal, küçük onkogenik G-protein Ras'a ve daha sonra MEK1/2 (MAPK/ERK Kinaz veya MAP Kinaz Kinaz) sinyal proteinlerini aktive eden Raf (MEK Kinaz) proteinine aktarılır. Aktive edilmiş MEK1/2, gen ekspresyonu, mitoz, hücre canlılığı, apoptoz, hücre metabolizma, farklılaşma ve hareketlilik gibi temel hücresel olayları düzenleyen ERK1/2'yi fosforilasyonla aktive eder (Dhillon, A.S., 2007). İşlevinden açıkça anlaşıldığı gibi, MEK1/2, MAPK/ERK sinyal zinciri kademesinin ana düzenleyicilerinden biridir.

### **1.3.2 MAPK (Mitojen aktif protein kinaz) yolu**

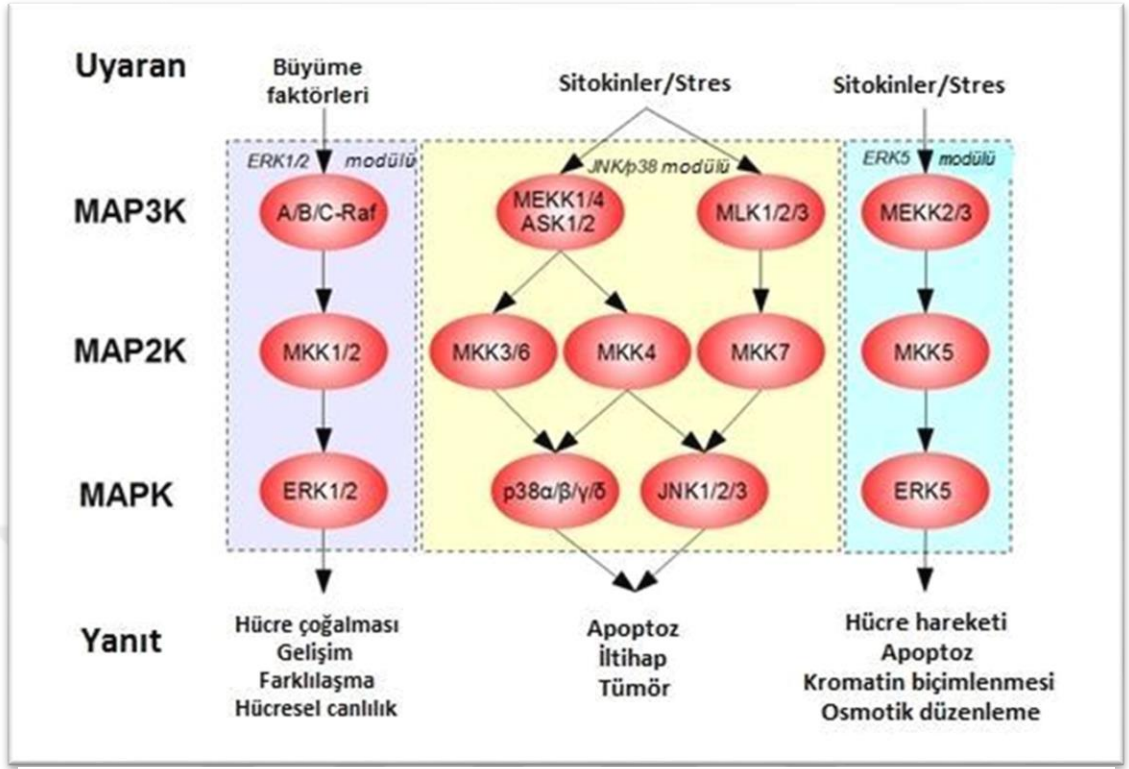
Mitojenlerin aktive ettiği protein kinazlar, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ve sinyalin, reseptörler vasıtasıyla hücre nükleusuna iletiminden sorumlu olan bir dizi protein kinazlardır. MAPK yolağının insan kanserinde en sık mutasyona uğramış sinyal yoludur. Çoğunlukla RAS-RAF-MEK-ERK sinyal kaskadı olarak bilinen mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu, proliferasyon, farklılaşma, hareketlilik, strese cevap, apoptoz ve hayatta kalma gibi çeşitli temel hücresel işlemlerde rol alan yüksek oranda korunmuş bir serin / treonin protein kinaz ailesidir. (Liu, F., 2018).

### 1.3.3 MAPK sinyal yolu bileşenleri

Ras-Raf-MEK-ERK yolu olarak da bilinen MAPK / ERK yolu, hücre yüzeyindeki bir reseptörden hücrenin çekirdeğindeki DNA'ya sinyal ileten hücre içindeki çekirdeğe transloke olan serin ve treonin protein kinazlardan oluşan proteinler zinciridir. ( Küçükkaya, B., 2012).

MAPK yolu, bir "açık" veya "kapalı" anahtar olarak görev yapan komşu bir proteine fosfat grupları eklenerek iletişim kuran mitojenle aktive olan protein kinazlar dahil olmak üzere birçok protein içerir. Memeli hücrelerinde MAPK ailesi; -JNK( Jun Kinaz: JNK1, JNK2 ve JNK3), -p38-MAPK (p38-MAPK $\alpha$ , p38-MAPK $\beta$ , p38-MAPK $\gamma$ , p38-MAPK $\delta$ ) ve -ERK (Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz: ERK1 ve ERK2) olmak üzere 3 gruptan oluşmaktadır (Mascaux, C., 2006).



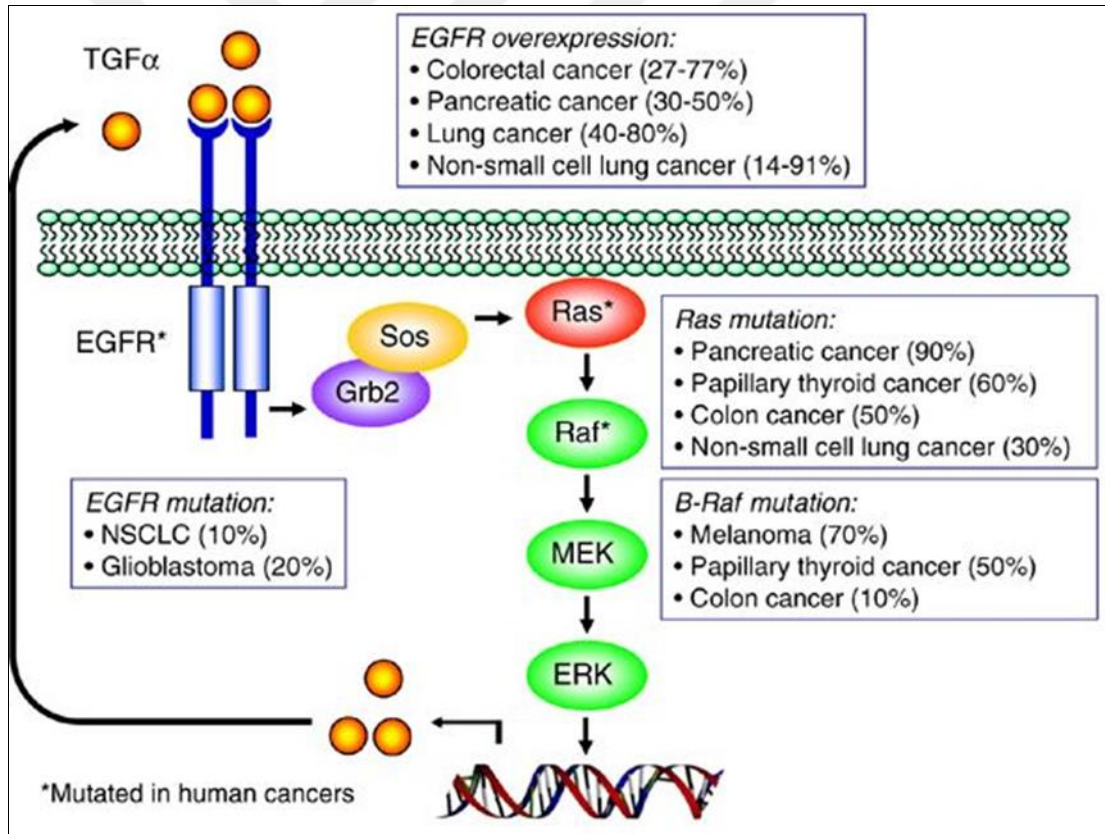


Şekil 1.1. Üç MAPK (ERK1/2, JNK1/2/3, p38) yolağı ( Küçükkaya, B., 2012)

MAP kinazlar protein kinaz basamaklarının içinde bulunur. Her bir MAPK kaskadı, seri olarak aktive edilen üç kinaz ile çalışır. Bunlar: bir MAPK kinaz kinazı (MAPKKK yada MAP3K), bir MAPK kinazı (MAPKK yada MAP2K) ve bir MAP kinazıdır (MAPK). MAPK'lar bir üstteki kinazlar tarafından fosforillenmedikçe etkinleşmezler. MAPK'nın fosforillenmesi yapısal bir değişim ile sonuçlanır. Değişik uyaranlarla MAPK, MAP2K ve MAP3K'da yer alan farklı üyelerin aktifleşmesi sonucunda MAPK kontrolünde çeşitli hücreyel yanıtlar oluşmaktadır(Şekil 1.1). Memeli hücrelerinde en az 14 MAPKKK, 7 MAPKK ve 12 MAPK tanımlanmıştır ( Küçükkaya, B., 2012; Mascaux,C., 2006).

MAPK / ERK sinyalleşme yolunda, tirozin kinaz reseptörlerinin (RTK'ler) uyarılması, çok aşamalı bir işlemde MAPK'lerin aktivasyonunu tetikler. Aktif Ras, RAF kinazın protein kinaz aktivitesini aktive eder. RAF kinaz, MEK' i fosforile eder ve aktive eder (MEK1 ve MEK2). MEK, ERK'yi fosforile eder ve aktive eder. MAPK / ERK yolu, hücre dışı sinyallerin hücreyel tepkilere iletilmesinde kilit bir rol üstlenmiştir.( Dhillon,A.S., 2007)

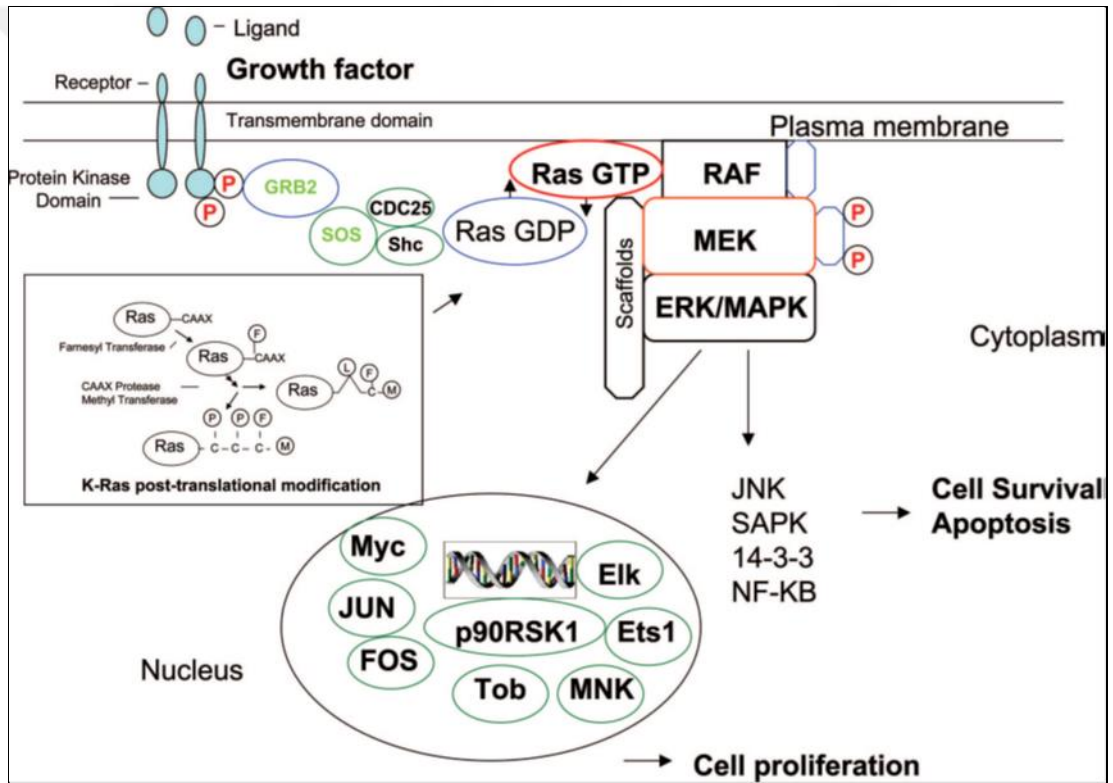
Ras / Raf / MAPK yolu hücre döngüsü düzenlemesinde, yara iyileşmesinde ve doku onarımında, integrin sinyalizasyonunda ve hücre göçünde rol oynar. Dahası, Ras / Raf / MAPK yolağı doğrudan yeni kan damarlarının oluşumunda rol oynayan genlerin ekspresyonunda değişiklikler yoluyla anjiyogenezi teşvik edebilmektedir. Böylece, Ras / Raf / MAPK' den gelen sinyal, tümörijenезi için önemli olan çeşitli hücresel fonksiyonları düzenler. Bu yolun düzensizliği, kanserde sık rastlanan bir olaydır. Çünkü Ras, insan kanserinde en sık mutasyona uğramış bir onkogendir. Yapılan çalışmalar, K-ras mutasyonlarının akciğer kanserlerinin % 15-50' sinde ve pankreas kanserlerinin %72 - 90' ında var olduğunu göstermiştir (Şekil 1.2.) (Mascaux, C., 2006).



Şekil 1.2. ERK /MAPK kaskadının onkogen aktivasyonu ( Roberts, P.J.,2007).

Raf en iyi karakterize edilmiş Ras efektördür ve serin / treonin kinaz ailesinin bir üyesidir. Raf aktivasyonu, ERK1 ve ERK2 gibi aşağı doğru proteinleri art arda fosforile eden ve aktive eden MAPK' nın fosforilasyonu ile bir sinyal kaskadını uyarır (Julian, R., 2006).

Memelilerde MEK olarak da adlandırılan MAPK; JNK, SAPK, 14-3-3 gibi bir dizi aracı vasıtasıyla hücre sağkalımını ve apoptozunu teşvik etmek için büyüme faktörleri ve sitokinler de dahil olmak üzere birçok sinyale yanıt olarak aktive edilen bir serin / treonin kinazdır. ( Şekil 1.3.) MAPK ayrıca, Raf ve ERK'yi düzenleyerek birden fazla sinyal yolu arasında karşılıklı konuşma sağlayabilir (Julian, R., 2006).



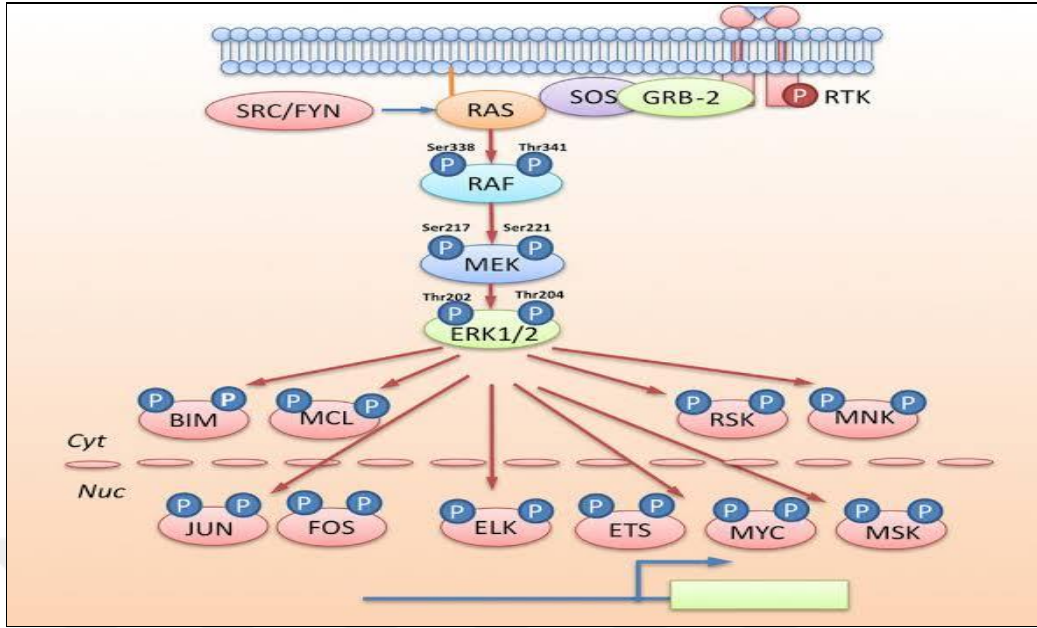
Şekil 1.3. Ras/Raf/MAPK yolu (Julian, R., 2006)

Hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazların (ERK) aktivasyonu, çok sayıda Ras kaynaklı hücrel cevap için kritiktir. ERK1 ve ERK2 çeşitli nükleer transkripsiyon faktörlerini ve kinazlarını fosforile eder ve aktive eder. Bu MAPKK / ERK hedeflerinin birçoğu, Ras kaynaklı hücre dönüşümünde rol oynamaktadır (Liebmann, C., 2001).

Hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar (ERK'ler) olarak da bilinen MAP kinazları, çoklu biyokimyasal sinyaller için bir entegrasyon noktası görevi görür ve çoğalma, farklılaşma, transkripsiyon düzenleme ve geliştirme gibi çok çeşitli hücrel işlemlerde rol oynayan bir protein kinazdır. Çalışmalar da elde edilen kanıtlar, hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz 1/2 (ERK1/2) 'nin, nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli nöronal sistemlerde hücre ölümünü teşvik etmede önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. (Julian, R., 2006)

ERK/MAP kinaz, yukarı akış kinazları tarafından aktive edilir ve bunun nükleer hedefleri fosforile ettiği çekirdeğe taşınmasıyla sonuçlanır. Alternatif olarak, farklı protein izoformlarını kodlayan eklenmiş transkript varyantları tarif edilmiştir. (Kolb, R.H., 2012)

Aynı zamanda mitojenle aktive edilen protein kinaz 1 (MAPK1) olarak da bilinen ERK-2, protein kinaz süper ailesinin ve MAP kinaz alt ailesinin bir üyesidir. MKP-3, substrat tanınması ve fosforilasyon aktivitesi için sadece MAPK1' e özgü çift özgülüklü bir fosfatazdır. MAPK1' in aktivasyonu, yukarı akış kinazları tarafından fosforilasyonunu gerektirir. Aktivasyon üzerine, MAPK1, nükleer hedefleri fosforile ettiği uyarılmış hücrelerin çekirdeğine yer değiştirir. MAPK1, ELK1 gibi bir dizi transkripsiyon faktörünü fosforile ederek farklılaşmış hücrelerde mayoz, mitoz ve postmitotik fonksiyonların başlatılması ve düzenlenmesinde rol oynar. MAPK1, interferon gama kaynaklı genlerin ekspresyonunu baskılayan bir transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yapar. Transkripsiyonel aktivite, kinaz aktivitesinden bağımsızdır. ERK2' nin nükleer sitoplazmik dağılımı, çeşitli uyaranlara ve hücre bağlamındaki değişikliklere cevap olarak düzenlenir. (Houslay, M.D., 2003; Jivan, A., 2010). (Şekil 1.4.)



Şekil 1.4. MAPK yolundaki ERK1 / 2'nin aşağı yönde ana hedefleri. ( Liu, F., 2017)

## 1.4 Kanserle Mücadelede Salisilik Asit ( Aspirin) Kullanımı

### 1.4.1 Aspirin ve etkileri

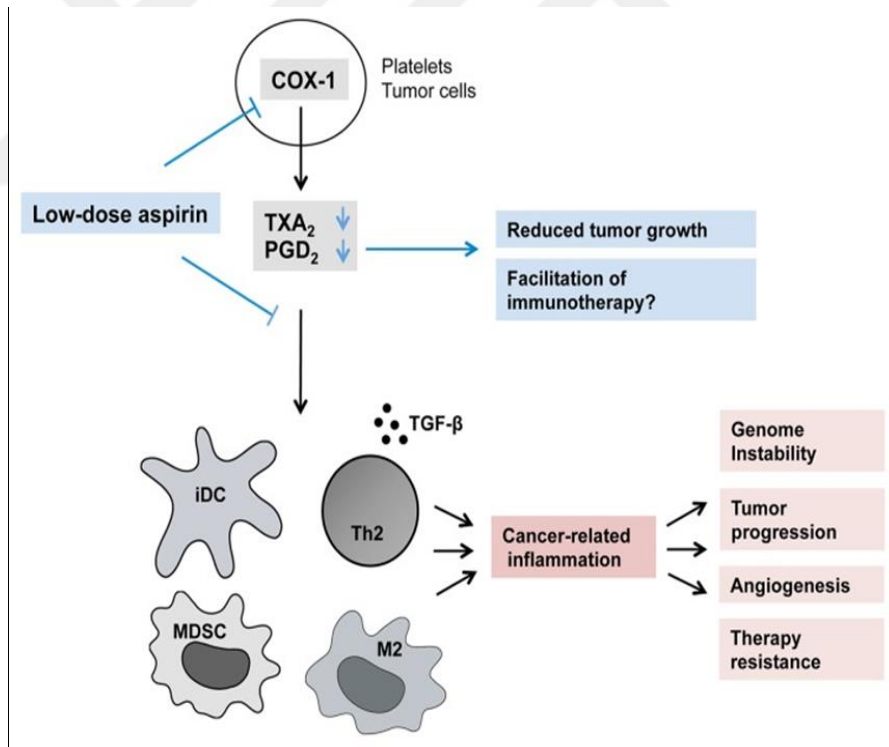
Almanya'daki Bayer firmasında çalışan Felix Hoffman, 1897'de asetillenmiş salisilik asit formunu yaptı. Bu ilaca "Aspirin" adı verildi ve tüm zamanların en çok kullanılan ilacı oldu. 1971'de Vane, aspirinin antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkilerini uyguladığı mekanizmayı keşfetti.( Kanat, J.R., 2003)

Yaygın olarak kullanılan aspirinin primer metaboliti salisilik asittir. Aspirin (Asetilsalisilik asit: ASA) bir asırdan fazla bir süredir kullanılmakta olup temel etki mekanizması ve yan etkileri en iyi bilinen ilaçlardandır.( Harris, R.E., 2005)

Aspirin eşsizdir, çünkü anti-enflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkilerini ortaya çıkaran COX enzimlerinin her iki izoformunu (COX-1 ve COX-2) geri dönüşümsüz olarak etkisizleştiren tek steroid olmayan antienflamatuvar ilaçtır (NSAID). COX enzimleri, arakidonik asitten (AA) siklik endoperoksitlerin sentezinde rol oynar ve çok çeşitli etkileri olan prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar içerir. Siklooksijenaz enzimleri (COX-1 ve 2) arakidonik asitten prostaglandin H2 (PGH2)

üretiminde hız sınırlandırıcı basamağı oluşturur. PGH2'den prostaglandin sentaz enzimleriyle inflamasyondan sorumlu olan prostoglandin çeşitleri veya TX(Tromboksan) A2 üretilir. İnflamasyon bölgesinde üretilen prostaglandinler, doku hasarı ve hipoksisi, apoptozis inhibisyonu, hücre büyümesi, artmış hücre migrasyonu, immun cevabın baskılanması ve anjiyogenezin uyarılmasında rol alırlar. COX-1 birçok dokuda eksprese olurken; COX-2 inflamasyon veya malinite durumlarında sitokinler, büyüme hormonları, onkogenler tarafından uyarılabilen proanjiyogenik ve hücre koruyucu bir enzimdir (Kilciler, M., 2010).

Sonuçta, bu tür immünomodülatör etkiler, tümör büyümesini sınırlandırır, bu da düşük doz aspirinin immünoterapinin terapatik etkinliğini arttırmak için başarıyla kullanılabileceğini gösterir(Şekil1.5.)( Carlson, L.M., 2013).



**Şekil 1.5. Düşük doz aspirinin antineoplastik etkilerinin altında yatan immünolojik mekanizmaları. (Carlson, L.M., 2013)**

Son yıllarda, aspirin, epidemiyolojik verilerden elde edilen güçlü kanıtlarla desteklenen potansiyel bir kemopreventif ajan olarak önemli ilgi görmektedir. Çok



sayıda klinik gözlem ve laboratuvar çalışması, düzenli olarak aspirin kullanımının kolorektal, özofageal, meme, akciğer, prostat, karaciğer ve cilt kanserleri için azaltılmış bir risk ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Harris, R.E.,2005). Kolon kanseri hücreleri ve tümör modellerini kullanan birkaç çalışma, aspirinin kanser hücresi büyümesini önleyebildiğini ve apoptozu indükleyebildiğini göstermiştir. Bu etkilere katkıda bulunan çeşitli mekanizmalar ve hücrel yolaklar tespit edilmiştir (Thun, M.J., 2012; Dovizio, M., 2013).

#### **1.4.2. Nöroblastoma, MAPK sinyal yolu ve salisilik asit ilişkisi**

Sempatik sinir sisteminin habis bir embriyonik tümörü olan nöroblastoma geniş bir klinik davranış yelpazesi sergileyebilen bebekler arasında en yaygın görülen tümördür. Bilim insanlarıncı yapılan pek çok çalışma umut verici sonuçlar elde etse de nöroblastomdan etkilenen hastaların iyileştirilmesindeki sorunlar halen devam etmektedir. Tümör mikro ortamının, çeşitli belirgin kanserlerin immünoterapisine verilen klinik yanıtı önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir. Özellikle kansere bağlı inflamasyonun immünoterapinin klinik etkinliğini engellemesi beklenmektedir. Lena maria Carlton, 2013'te yayınladığı tümör micro ortamıyla ilgili bilinen ilk çalışma ile yüksek riskli nöroblastomdan etkilenen bireylerde düşük doz aspirin kullanma olasılığının yanı sıra kansere bağlı inflamasyonun pediatrik kanser hastaları için uygun bir terapötik hedefi temsil edeceği hipotezi üzerinde ileri çalışmalar rapor edilmiştir.

Bu noktada “ Kanserde salisilatın apoptotik etkisinin mekanizması ne olabilir? ” sorusu ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda, salisilat tarafından modüle edilen çok sayıda protein kinaz, salisilatın kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi için güçlü bir açıklama sağlayabilir. Bu açıdan bakıldığında, kayda değer miktarda veri SA'nın hücrenin en hayati sinyal yollarından biri olan mitojenik MAPK/ERK (Mitojenle aktive olan protein kinaz / hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar) sinyal yolu üzerinde bir etkisi olabileceğini göstermektedir (Pan, M.R., 2008; Haydn, J.M., 2014).

Bu bakımdan, hedef inhibitörler yoluyla hücre çoğalmasını veya hücre büyümesini bastırmak amacıyla mitojenik ve/veya hayatta kalma sinyallerini hedeflemek üzerine yapılan çalışmalar daha fazla dikkat çekmektedir. Hedeflenen inhibitörler sayesinde, tümör büyümesi sırasında hücre çoğalmasını veya hücre büyümesini baskılayarak başarılı sonuçlar elde etme potansiyeli yüksektir. Bu amaçla, birçok önemli çalışma yapılmış ve sonuçlar, salisilik asit (SA) içeren düşük doz aspirinin kolorektal, meme, mide, akciğer veya diğer kanserlerin insidansını ve mortalitesini azalttığını göstermiştir (Brasky, T.M., 2010; Rothwell, P.M., 2012; Elwood, P.C., 2016; Klessing, D.F., 2016; Giampieri, R., 2016).

Ayrıca, SA'nın bir hepatoma hücre hattı üzerindeki etkisini inceleyen araştırmacılar, SA'nın süre ve doza bağlı şekilde proliferasyonu inhibe edebileceğini ve hepatoma hücre hattında apoptozu uyurabildiğini göstermiştir (Liu, Y., 2017). Ek olarak, insan kolorektal tümör hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada, bir aspirin metabolite olan salisilatın bu hücre hatları üzerindeki etkisi belirlenmiş ve salisilat, tüm hücre hatlarında doza bağımlı inhibitör etkiler göstermiştir (Elder, D.J., 1996). Bütün bu çalışmalar SA'nın kansere karşı koruyucu ve önleyici olabileceğini göstermektedir.

### **1.5. Çalışmanın amacı**

Bu tez konusunun amacı, salisilikasit(SA) ile MAPK sinyal yolu arasındaki moleküler mekanizmanın SH-SY5Y nöroblastoma kanser hücrelerinde ortaya çıkarılmasıdır. Bu sayede başta nöroblastoma kanseri olmak üzere birçok kanser türünde başlatıcı etkisi bilinen, yanı sıra zayıf prognoz ve tedaviye dirençle de ilişkilendirilen MAPK sinyal yolundaki anormal davranışların altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılması ve tanı ve tedavide doğru hedeflerin seçilmesi mümkün olabilecektir. Böylece ileride salisilik asit temelli preparatların tedaviye destek amaçlı kullanımından daha geniş çapta ve daha bilinçli olarak faydalanılabilecektir.



Bu hedef doğrultusunda, nöroblastoma kanseri hücrelerinde salisilik asitin MAPK sinyal yolu üzerinde bir etkisi olup olmadığı, var ise nasıl bir etkisi olduğu ilk kez olarak ortaya çıkarılmış olacaktır.

Bunun sonucunda ise başta nöroblastoma kanseri olmak üzere birçok kanserin hem tanı hem de tedavisi için hücresel mekanizmaların, hücre içi proteinler arasındaki ilişkilerin doğru şekilde anlaşılabilmesi ve bu sayede doğru moleküler hedeflerin seçilebilmesi mümkün olacak ve böylece belirlenen doğru hedefler üzerinden hastalığın tanı ya da tedavisinde kullanılabilecek ticari kitler geliştirilmesi mümkün olabilecektir.



## 2.MATERYAL VE METOT

### 2.1.Materyaller

#### 2.1.1. Ekipmanlar

Tez çalışmasında kullandığım ekipmanlar Çizelge 2.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Ekipmanlar ve tedarikçi firmalar

| Ekipman                            | Tedarikçi Firma                 |
|------------------------------------|---------------------------------|
| +4 Soğutucu                        | Arçelik                         |
| -20 Soğutucu                       | Arçelik                         |
| Vorteks                            | BioCote                         |
| Falcon tüp (15 mL)                 | Biologix                        |
| Hücre kazıyıcı                     | Biologix                        |
| Buz makinesi                       | Brema/GB903A-Q                  |
| Trans-blot turbo transfer pack     | BIO-RAD                         |
| Elektroforez jel sistemi(SDS-PAGE) | BIO-RAD MiniProtean             |
| Western blotlama cihazı            | BIO-RAD Trans-blot Turbo        |
| Western görüntüleme sistemi        | BIO-RAD ChemiDoc XRS+           |
| Hücre kültür flaskları             | Corning                         |
| Hassas terazi                      | Denver Instrument               |
| Isıticılı magnetik karıştırıcı     | Denver Instrument               |
| pH metre                           | Hanna Instrument (HI241 Ph/ORP) |
| Pasteur pipet                      | ISOLAB                          |

**Çizelge 2.1. (devam)**

| <b>Ekipmanlar</b>         | <b>Tadarikçi Firma</b>           |
|---------------------------|----------------------------------|
| Hemositometre             | ISOLAB                           |
| Otoklav                   | Nüve OT40L                       |
| Distile su cihazı         | Nüve ND8                         |
| Santrifüj                 | Nüve NF400                       |
| Soğutmalı santrifüj       | Nüve NF800R                      |
| Nitroselüloz membran      | Santa Cruz                       |
| 6 well plate              | SPL Life Sciences                |
| Güç kaynağı               | Thermo Fisher                    |
| 96 well plate             | Thermo Fisher                    |
| Mikro pipet               | Thermo Fisher                    |
| Serolojik pipet           | Thermo Fisher                    |
| Otomatik pipetör          | Thermo Fisher                    |
| CO2 inkübatör             | Thermo scientific                |
| Biyogüvenlik kabini       | Thermo scientific                |
| Su banyosu                | Wisd Laboratory instruments      |
| Çalkalayıcı               | Wisd Laboratory instruments      |
| Inverted mikroskop        | Leica DM13000 B                  |
| Mikroplate okuyucu sistem | Molecular devices, spectraMax i3 |
| -80 Soğutucu              | New Brunswick Scientific         |
| Qubit 3.0 fluorometer     | Invitrogen                       |

### **2.1.2 Kimyasallar ve enzimler**

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve enzimler çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Kimyasallar ve enzimler

| Kimyasal / Enzim                                                  | Tedarikçi Firma |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Blotting grade blocker                                            | BIO-RAD         |
| Akrilamid/bisakrilamid, %30                                       | Santa Cruz      |
| TEMED                                                             | Santa Cruz      |
| APS                                                               | Santa Cruz      |
| SDS                                                               | Santa Cruz      |
| Tris base                                                         | Santa Cruz      |
| Glisin                                                            | Santa Cruz      |
| Gliserol                                                          | Santa Cruz      |
| DMEM, high glucose                                                | Sigma-Aldrich   |
| FBS                                                               | Sigma-Aldrich   |
| Pen/strep                                                         | Sigma-Aldrich   |
| L-glutamine                                                       | Sigma-Aldrich   |
| PBS                                                               | Sigma-Aldrich   |
| Trypsin,%2,5                                                      | Sigma-Aldrich   |
| DMSO                                                              | Sigma-Aldrich   |
| Tween-20                                                          | Sigma-Aldrich   |
| □-merkaptotanol                                                   | Sigma-Aldrich   |
| Trypan blue                                                       | Sigma-Aldrich   |
| n-bütanol                                                         | MERCK           |
| HCl                                                               | MERCK           |
| Metanol                                                           | Sigma-Aldrich   |
| Absolute ethanol                                                  | Sigma-Aldrich   |
| Anti-kaspaz-3 mouse monoklonal antikor (sc-271759)                | Santa Cruz      |
| m-IgG <sub>K</sub> BP-HRP anti-mouse sekonder antikor (sc-516102) | Santa Cruz      |
| Anti-MEK 1 / 2 mouse monoklonal antikor (sc-81504)                | Santa Cruz      |
| Anti-Calnexin Mouse monoklonal antikor (sc-80645)                 | Santa Cruz      |

### 2.1.3 Ticari Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan ticari kitler Çizelge 2.3.'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Ticari kitler

| KİT                               | TEDARİKÇİ FİRMA |
|-----------------------------------|-----------------|
| Whole Cell Protein Extraction Kit | Millipore       |
| Qubit Protein Assay Kit           | Invitrogen      |
| Clarity Western ECL Substrate Kit | BIO-RAD         |
| MTS Cell Proliferation Assay Kit  | Abcam           |

### 2.1.4. Tamponlar ve solüsyonlar

#### 2.1.4.1. SDS-PAGE için 1X yükleme boyası

Protein örneklerini SDS poliakrilamid jeline yüklemeden önce denatüre etmek için 1X örnek yükleme boyası kullanıldı. 1X yükleme boyası; 340 µl dH<sub>2</sub>O, 400 µl %10 SDS, 120 µl %100 gliserol, 100 µl 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) ve 40 µl %0.5 bromofenol blue karışımı olarak hazırlandı. Kullanmadan önce 54 µl β-merkaptoetanol eklendi.

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

0.5 M stacking buffer, 100 mL dH<sub>2</sub>O içerisinde 7.88 g Tris-Cl'nin çözündürülmesi ile hazırlandı. pH 6.8'e ayarlandı.

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

1.5 M separating buffer, 100 mL dH<sub>2</sub>O içerisinde 23.64 g Tris-Cl'nin çözündürülmesi ile hazırlandı. pH 8.8'e ayarlandı.

#### *2.1.4.4. SDS running buffer*

SDS running buffer; 30 g tris, 144 g glisin ve 10 g SDS'nin 1 lt dH<sub>2</sub>O içerisinde çözündürülmesi ile 10X stok solüsyon halinde hazırlanıp, pH 8.3'e ayarlandı. 1X çalışma solüsyonu, 10X SDS running bufferın 10 kez seyreltilmesiyle hazırlandı.

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

Tris buffered saline, 24.23 g tris ve 87.66 g NaCl'nin 1 lt dH<sub>2</sub>O içerisinde çözündürülmesi ile 10X stok solüsyon halinde hazırlanıp, pH 7.6'ya ayarlandı. 1X çalışma solüsyonu, 10X TBS'nin 10 kez seyreltilmesiyle hazırlandı.

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

Tris buffered saline – tween20, bu çalışmadaki tüm western blotlamalarda kullanılan yıkama tamponudur. TBST, 100 mL 10X TBS ve 1 mL tween-20'nin 1 lt dH<sub>2</sub>O içerisinde çözündürülmesi ile 1X çalışma solüsyonu halinde hazırlandı.

#### *2.1.4.7. Towbin buffer*

Towbin buffer, bu çalışmadaki tüm western blotlamalarda kullanılan transfer tamponudur. Towbin buffer, 30.25 g tris ve 144 g glisinin 1 lt dH<sub>2</sub>O içerisinde çözündürülmesi ile 10 X stok solüsyon halinde hazırlanıp, pH 8.3'e ayarlandı. 1X

Çalışma solüsyonu; 100 mL 10X towbin buffer, 200 mL methanol ve 700 mL dH2O'nun karışımı olarak hazırlandı.

#### *2.1.4.8. Western blotlama için bloklama solüsyonu*

100 mL western bloklama solüsyonu hazırlamak için 5 g (%5) blocker, 1X TBS içerisinde çözdürüldü.

#### *2.1.4.9. Western blotlama için primer ve sekonder antikor hazırlama solüsyonu*

1:1000 konsantrasyonda 5 mL primer/sekonder antikor solüsyonu, 5 µl antikor ve 4995 µl bloklama solüsyonu karışımı olarak hazırlandı.

### **2.1.5. Hücre hattı**

Çalışma kapsamında, Acıbenzolar-S-Metil'in nöroblastoma hücrelerinde MAPK sinyal yolakları üzerindeki etkisinin anlaşılması için, Ege Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Emin İlker Medine tarafından sağlanmış olan SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanıldı.

## **2.2.Yöntemler**

### **2.2.1. Kanserli SH-SY5Y hücre hattı kültürü**

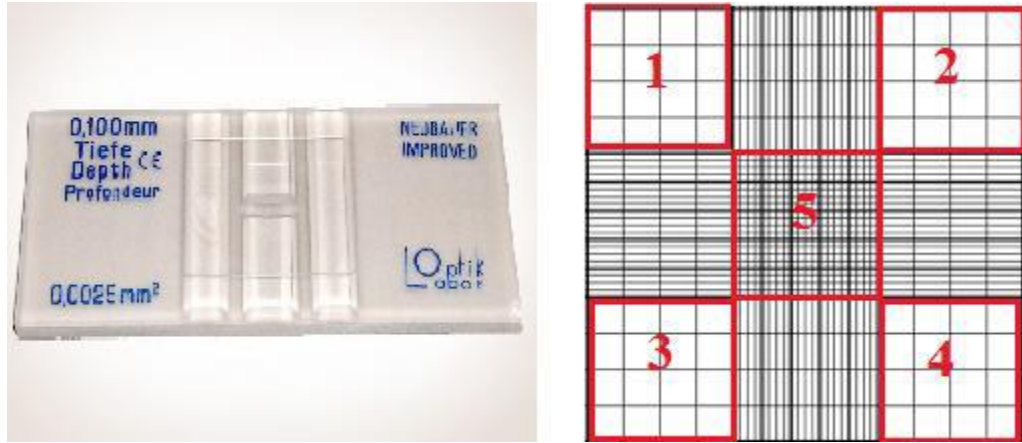
Hücre kültürü, hücrelerin canlı dokulardan izole edildikten sonra kontrollü şartlar altında, genellikle doğal ortamlarının dışında büyütölmesidir. Planlanan alışma için SH-SY5Y Nöroblastoma hücreleri, % 10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-Glutamin ve %1 pen/strep içeren yüksek glukozlu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri ortamında 1 atmosfer basıncında % 5 CO2 ile 37 ° C'de kültüre edildi. Hücreler yeterli yoğunluğā ulaştığında, steril Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) ile yıkandı. Daha sonra hücreler,% 2.5'lik steril Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA) 1X stok çözeltisi ile kültür kabından kaldırılarak toplandı.

### 2.2.2. Pasajlama

Kültüre edilen nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri, istenen yoğunluğa ulaştığında hem besiy ortamı hücreler için yetersiz hale gelir hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalması durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanması gerekir. Pasajlama işleminde ilk olarak istenen yoğunluğa (confluence) ulaşan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinin mediumu flasktan çekildi. Ardından hücreler PBS ile bir kere yıkandı. Daha sonra flaskın yüzeyini kaplayacak kadar %2.5 tripsin (1-2 mL) kondu. Tripsinin fonksiyonunu göstermesi için flasklar 37°C'ye konup 2-3 dakika beklendi. Daha sonra inverted mikroskopta hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkıp kalkmadıklarına bakıldı. Hemen ardından tripsin inhibe edildi. Tripsini inhibe etmek için 1:1 oranında medium eklendi. Yüzeyden kalkan hücreler toplanarak 15 mL'lik falcon tüplere alındı. Daha sonra 200 g (rcf)'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant atıldı ve pellete 5 mL taze kültür mediumu eklendi. Hücre sayımı için homojenite sağlayabilmek amacıyla birkaç defa pipetleme yapıldı. Daha sonra hemositometre ile sayım için 18 µl hücre bir endorfa alındı.

Hemositometre (Thoma lamı), bir süspansiyonun birim hacmi başına düşen hücre sayısını belirlemek için kullanılan özel bir lamdır. Genel prensibi,  $0.1 \text{ mm}^3$  (1 mm boy x 1 mm en x 0.1 mm derinlik =  $0.1 \text{ mm}^3$  hacim) hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamında 9 temel kare vardır. Bu karelerin her birinde 16 büyük kare ve her büyük karede 25 küçük kare bulunmaktadır. Sayım bu karelerde yapılmaktadır. Genellikle 1, 2, 3 ve 4 numaralı karelerdeki hücreler sayılıp ortalaması alınır ya da sadece 5 numaralı karedeki hücreler sayılır (Şekil 2.1.). Sayılan hücre sayısı kullanılarak, mL'deki toplam hücre sayısı 2.1'de verilen formül ile hesaplanır. Formüldeki dilüsyon faktörü, toplam/stok oranından bulunur.  $10^4$  ise  $0.1 \text{ mm}^3$ 'teki hücre sayısını 1 mL'ye çevirmek içindir.





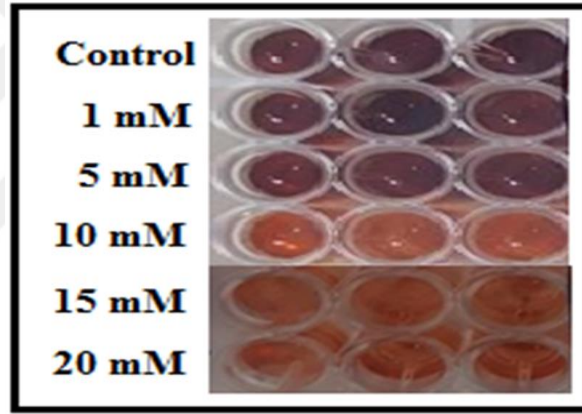
**Şekil 2.1. Thoma lamı ve sayım prensibi**

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \text{Hücre sayısı (A)} \times \text{Dilüsyon faktörü (DF)} \times 10^4 \quad (2.1)$$

Sayım yapılırken, hesaplamalarda yanlışlıklara ve sapmalara sebebiyet vermemek için canlı ve ölü hücreler birlikte sayılmaz. Bazı boyalar kullanılarak canlı ve ölü hücreler birbirinden ayrılabilir. Bu boyalardan en sık kullanılanı trypan blue boyasıdır. Trypan blue boyası, ölü hücrelerin zarlarından geçerek ölü hücreleri maviye boyar. Böylece mikroskop altında ölü hücreler mavi renkte gözükürken canlı hücreler şeffaf renkte gözükerek ayırt edilirler. Hemositometre ile sayım için ependorfa alınan 18 µl hücrenin üzerine 18 µl trypan blue boyası eklendi ve pipetleme yapıp karışımından 12 µl alınarak hemositometredeki her iki kuyuya sayım için yükleme yapıldı. Hemositometre inverted mikroskop altına kondu ve 10X büyütmede, her iki kuyudaki 5 numaralı karelerdeki hücreler sayılarak ortalamaları alındı. 2.1’de verilen formüle göre hücre sayısı hesaplandıktan sonra hücreler 25 cm<sup>2</sup>’lik iki ayrı flaska bölüştürüldü. Ardından, 37°C %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde büyümeye bırakıldı.

### 2.2.3. Kimyasal dozlarının belirlenmesi (IC50) : MTS Hücre Canlılık Analizi

SH-SY5Y hücrelerinde Acibenzolar-S-methyl için IC50 değerini araştırmak üzere üreticinin talimatlarına uygun şekilde MTS Hücre Canlılığı Testi (ab197010, Abcam) kullanıldı. Kısaca, kültüre edilmiş kontrol SH-SY5Y hücrelerine ve farklı konsantrasyonlarda (1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM) Acibenzolar-S-methyl ile muamele edilmiş ( Şekil 2.2.) ve 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiş SH-SY5Y hücrelerine 20 µl MTS çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra hücreler 3,5 saat 37 ° C'de % 5 CO<sub>2</sub> ile inkübe edildi. Bundan sonra, spektrofotometrik analiz, SpectraMax® i3 Platformu (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, ABD) kullanılarak absorbans ölçümü için 490 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Hücre canlılığı verileri, üç bağımsız deneyden elde edildi ve her deney üç tekrar olacak şekilde yapıldı.



Şekil 2.2. Kültüre edilmiş kontrol SH-SY5Y hücrelerine MTS uygulaması

Şekil 2.2.'de görüldüğü üzere control gruplarında gözle görülebilir bir renk değişimi olmadığı acibenzolar-s-methyl uygulandığı kuyucuklarda da renk açılması olduğu görülmektedir. Bu durum bu kuyucuklarda canlılık aktivitesinin azaldığını göstermektedir. MTS sonucunda %50 canlılık yakalanması amaçlanan kuyucuk 10mM kimyasal uygulanan kuyucukların olduğu saptanmıştır.

#### **2.2.4. Protein izolasyonu**

Protein izolasyonu; genellikle hücrelerden, dokulardan veya bütün organizmalardan oluşan kompleks bir karışımdan proteinleri ayırmaya yönelik bir işlemdir. Proteinin büyüklüğü, yükü, şekli ve işlevi gibi birçok özelliğini belirlemek için gereklidir. Protein izolasyonunda ilk dikkat edilmesi gereken, proteininin hücre içinde mi yoksa hücre dışında mı olduğudur. Protein hücre içinde ise, protein yapısını en az etkileyecek yöntem kullanılarak hücre çeperi parçalanmalıdır. Proteinleri, bu esnada açığa çıkacak olan proteazların etkisinden korumak için tampona proteaz inhibitörleri eklenmelidir.

Çalışmada, Kontrol ve Acibenzolar-S-metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinden toplam protein, Total Hücre Protein Ekstraksiyon Kiti (2910, Millipore) kullanılarak saflaştırıldı. İlk olarak Kontrol ve Acibenzolar-S-methyl ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücreleri toplandı. Pelletler 2 kez 2 mL soğuk PBS ile yıkanıp 200 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Buz üzerinde, her pellete 100 µl 1X whole cell extraction buffer + protease inhibitör karışımı eklenip yavaşça süspanse edildi. Ardından ince uçlu sonikatör kullanılarak 25 saniye aralıklarla 3 kez 5'er saniye sonikasyon yapıldı. Daha sonra 15 dakika buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 8000 g'de 20 dakika +4°C'de santrifüj yapıp süpernatantlar (proteinler) toplandı. Böylece proteinler izole edilmiş oldu. İzole edilen proteinler aliquotlanarak -80°C'de saklandı.

#### **2.2.5. Protein konsantrasyon tayini**

Bir proteinin miktarının belirlenmesi, protein veriminin ve saflığının kontrolünde oldukça önemlidir. Ayrıca, çalışmanın devamında uygulanacak olan SDS-PAGE ve western blotlama tekniklerinde doğru analiz yapabilmek amacıyla her kuyuya eşit konsantrasyonda protein yükleme bakımından da gereklidir. Çalışma da, Protein konsantrasyonu, Qubit <sup>TM</sup> Protein Test Kiti (Thermo Fisher Scientific) ve Qubit <sup>TM</sup> 3.0 Florometre kullanılarak ölçüldü. Kit; ölçüm reaktifi, seyreltme tamponu ve önceden seyreltilmiş BSA standartları içermektedir. Kitte bulunan ölçüm reaktifi, ilgilenilen hedefe özgü floresan boyaları içerir ve bu boyalar, düşük

konsantrasyonlarda bile yalnızca hedef moleküllere bağlandığında ortaya çıkarlar. Bu bağlanma sonucu, ışığın doğal emilimini proteinler için 280 nm’de ölçmek amacıyla Qubit fluorometer kullanılır. Örnekteki protein miktarı ne kadar fazla ise, bu dalga boyunda o kadar fazla ışık emilir. Emilim miktarı, kit içindeki konsantrasyonları bilinen BSA standartları ile karşılaştırılarak proteinin konsantrasyonu hesaplanır. Çalışmada, bir önceki aşamada izole edilen proteinlerin Qubit protein assay kit kullanılarak konsantrasyonları belirlendi. Bu yöntem için ilk olarak kit içerisinde bulunan Qubit reaktifi ve Qubit seyreltme tamponu kullanılarak 1:200 oranında 1000 µl çalışma solüsyonu hazırlandı. Qubit assay tüpler kullanılarak Çizelge 2.4.’te gösterildiği gibi standartlar ve örnekler hazırlandı. Her tüp 2-3 saniye vortekslendi. Ardından tüpler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler Qubit 3.0 Fluorometer cihazında okutuldu.

**Çizelge 2.4 Qubit assay tüplerin hazırlanması**

|                               | <b>Standart/örnek</b> | <b>Çalışma solüsyonu</b> |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| <b>Standart 1 (0 ng/µl)</b>   | 10 µl                 | 190 µl                   |
| <b>Standart 2 (200 ng/µl)</b> | 10 µl                 | 190 µl                   |
| <b>Standart 3 (400 ng/µl)</b> | 10 µl                 | 190 µl                   |
| <b>Kontrol SH-SY5Y</b>        | 10 µl                 | 190 µl                   |
| <b>ASM SH-SY5Y</b>            | 10 µl                 | 190 µl                   |

#### **2.2.6. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)**

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis), moleküler biyoloji de dahil olmak üzere birçok alanda proteinleri, elektriksel bir alanda moleküler ağırlıklarına göre ayırmak ve tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte destek matriksi, akrilamid monomerlerinin kovalent bağ yaparak çapraz bağlayıcı moleküller ile bağlanması sonucu oluşturdukları bir polimer olan poliakrilamittir. Jelin içeriğinde APS, TEMED ve SDS bulunmaktadır. APS ve TEMED, jeli polimerleştirmede sırasıyla başlatıcı ve

katalizör olarak kullanılmaktadır. SDS ise, hidrofobik bölgelere bağlanarak tüm kovalent olmayan bağları parçalayarak proteinleri denatüre eden ve proteinlerin negatif yükle yüklenmesini sağlayan bir deterjandır. SDS ile birlikte, disülfid bağlarını parçalayarak bazı üçüncül protein katlanmalarını ortadan kaldıracak  $\beta$ -merkaptoetanol ya da DTT gibi indirgeyici maddeler de kullanılır. Proteindeki her iki aminoasit kalıntısına bir molekül SDS bağlanır. Böylece SDS moleküllerinin sayısı protein büyüklüğü ile orantılı olmuş olur ve elektriksel alanda negatif yüklü proteinler katottan (-) anoda (+) doğru hareket ederek sadece moleküler ağırlıklarına göre ayrılır. Küçük polipeptidler büyük polipeptidlere göre daha hızlı hareket ederler. SDS-PAGE yönteminde toplayıcı (stacking) ve ayırıştırıcı (separating) olmak üzere 2 çeşit jel vardır. Toplayıcı jel; üst kısımda yer alan, içerik olarak az miktarda akrilamid-bisakrilamid karışımı içeren ve bu nedenle por genişliği daha büyük olan jeldir. Tampon olarak Tris-HCl pH 6.8 kullanılır. Bu tamponda bulunan glisin aminoasidi pH 6.8 değerinde nötral yapıda olduğundan proteinlerden daha yavaş hareket eder. Tampondaki  $\text{Cl}^-$  iyonları ise proteinlerden daha hızlı hareket eder. Böylece proteinler glisin/ $\text{Cl}^-$  sandviç sistemi arasında kalır ve proteinlerin aynı hizaya gelmesi sağlanır. Por genişliği de büyük olduğundan hem büyük hem de küçük proteinler porlardan kolaylıkla geçebilir. Ayırıştırıcı jel ise; alt kısımda yer alan, içerik olarak daha fazla miktarda akrilamid-bisakrilamid karışımı içeren ve bu nedenle por genişliği daha küçük olan jeldir. Tampon olarak Tris-HCl pH 8.8 kullanılır. Bu tamponda bulunan glisin aminoasidi pH 8.8 değerinde negatif yüklü olduğundan proteinlerden daha hızlı hareket eder. Tampondaki  $\text{Cl}^-$  iyonları da yine aynı şekilde proteinlerden daha hızlı hareket eder. Glisin ve  $\text{Cl}^-$  iyonları, proteinlerin önüne geçerek proteinlerin ilerlemesi sağlanır. Por genişliği de küçük olduğundan proteinin büyüklüğü, hızı belirler. Böylece protein ne kadar küçükse jelin bitimine o kadar hızlı ulaşır.

Çalışmada önceki aşamalarda ASM (Acibenzolar-S-Metil) uygulanan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerden izole edilen proteinlerin konsantrasyonları belirlendikten sonra, sonraki aşamada yapılacak olan western blotlama yöntemi için ön koşul olduğundan proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması amacıyla SDS-PAGE yapıldı.

Çizelge 2.5. SDS-PAGE jellerinin hazırlanması

|                        | Separating jel (%12)    | Stacking jel (%4)       |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Tris-CI tamponu</b> | 1250 µl (1.5 M, pH 8.8) | 1250 µl (1.5 M, pH 8.8) |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b> | 1675 µl                 | 3009 µl                 |
| <b>%30 akrilamid</b>   | 2000 µl                 | 666 µl                  |
| <b>%25 SDS</b>         | 20 µl                   | 20 µl                   |
| <b>%10 APS</b>         | 50 µl                   | 50 µl                   |
| <b>TEMED</b>           | 5 µl                    | 5 µl                    |

SDS-PAGE yöntemi için ilk olarak Çizelge 2.5.'te verilen içeriklere göre %12'lik 5 mL separating jel hazırlandı. Jel sisteminde dikey olarak bulunan cam plakalar arasına, üstten 2 cm boşluk kalacak şekilde mikropipet yardımı ile yüklendi. Hemen ardından n-bütanol ile muamele edilerek polimerize olması beklandı. Polimerizasyonun ardından n-bütanol yıkanarak uzaklaştırıldı. Hemen sonra yine Çizelge 2.5.'te verilen içeriklere göre %4'lük 5 mL stacking jel hazırlandı. Cam plakalar arasına, separating jel yüklenirken bırakılan 2 cm'lik üst kısma mikropipet yardımı ile yüklendi. Stacking jele tarak yerleştirilerek polimerize olması beklandı. Ardından jel tankına 1X 750 mL SDS running buffer döküldü ve polimerize olan jel, tanka yerleştirilip stacking jeldeki tarak çıkarıldı. Daha sonra, jeldeki kuyulara eşit konsantrasyonda (100 µg/kuyu) yüklemek üzere Çizelge 2.6.'da verildiği gibi protein örnekleri hazırlandı. Hazırlanan örnekler 100°C'de 10 dakika kaynatılıp, kuyulara yüklendi. En baştaki kuyuya ise 15 µl protein markerı yüklendi. Ardından proteinler stacking jelden çıkana kadar 100 V akımda, çıktıktan sonra 130 V akımda olmak üzere yaklaşık 1.5-2 saat yürütüldü. Elektroforez bittikten sonra jel, cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkarılıp stacking jel kısmı kesildi. Ardından bir sonraki aşama olan western blotlama kısmında jel membrana transfer edileceğinden, soğuk 1X towbin buffer içerisine kondu.

**Çizelge 2.6. Protein örneklerinin hazırlanması**

| <b>Örnekler</b>        | <b>Protein miktarı</b> | <b>1X yükleme boyası</b> |
|------------------------|------------------------|--------------------------|
| <b>Kontrol SH-SY5Y</b> | 7 µl                   | 14 µl                    |
| <b>ASM SH-SY5Y</b>     | 9 µl                   | 18 µl                    |

### **2.2.7. Western blotlama**

Western blotlamada, SDSPAGE tekniği ön koşuldur. Bu yöntemin prensibinde ilk olarak proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre SDS-PAGE yöntemi ile ayrılması vardır. Ardından proteinlerin, nitroselüloz ya da PVDF bir membran üzerine elektroforetik transferini içerir. Daha sonra ise membranın sırasıyla; istenmeyen membran-protein etkileşimini önlemek için bloklanmasını, hedef proteine özgü primer antikor solüsyonu ile muamele edilmesini, primer antikora bağlanan işaretli bir sekonder antikor solüsyonu ile muamelesini ve son olarak çeşitli yöntemlerle analizini kapsar. Analiz sonrası oluşan bandın kalınlığı, mevcut proteinin ekspresyon miktarına karşılık gelir. Bu ekspresyon miktarının, jel yükleme veya protein transfer hataları yerine yalnızca değiştirilmiş protein ekspresyon seviyelerinden kaynaklandığından emin olmak amacıyla housekeeping genler denilen kontrol genleri kullanılır. Housekeeping genler, temel hücresel fonksiyonların sürdürülebilmesi için gerekli olan ve normal ve patofizyolojik koşullar altında bir organizmanın tüm hücrelerinde sabit oranlarda eksprese edilen yapısal genlerdir. Genel olarak değerlendirildiğinde bu teknik sayesinde bir proteinin varlığı, büyüklüğü, ekspresyonu, ekspresyon değişimleri ve farklı gruplar arasındaki ekspresyonlarının karşılaştırılması gibi analizler yapılabilir.

Western blotlama tekniğinin uygulanması için ilk olarak, bir önceki aşamada ASM uygulanan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerden izole edilen proteinlerden alınan eşit miktarda numune (100 µg protein / kuyucuk) SDS-PAGE (proteinlerin molekül ağırlığına göre % 12.5 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid elektroforezi) ile ayrıldı ve nitroselüloz membrana (sc-3724, Santa Cruz Biotechnology) Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (BioRad) kullanılarak transfer edildi. Membranlar, % 5 BSA/Tris

Tamponlu Salin-Tween'de (TBS-T) 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloke edildi, 4 ° C'de gece boyunca primer antikörlerle ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca sekonder antikörlerle boyandı. Aşağıdaki birincil antikörler 1:1000 seyreltmede kullanıldı; mouse monoklonal anti-MEK1/2 (sc-81504, Santa Cruz Biyoteknoloji), mouse monoklonal anti-kalnexin (sc-80645, Santa Cruz Biyoteknoloji) ve mouse monoklonal anti-kaspaz-3 (sc-271759, Santa Cruz Biyoteknoloji) ise % 5 BSA/TBS-T içinde 1:500 seyreltmede kullanıldı. Birincil antikör inkübasyonundan sonra, membranlar 6 kez her biri 5 dakika olacak şekilde oda sıcaklığında 1XTBS-T tamponu ile yıkandı ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca 1: 1000 seyreltilmiş seconder antikör anti-mouse IgGκ light chain binding protein (m-IgGκ BP) conjugated to HRP (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology) ile inkübe edildi. 1 saat sonunda membranların her biri 1X TBS ile 1'er kez 6 dakika, oda sıcaklığında yıkandı. Sonraki aşamalarda membranların görüntülenmesi ve analizi yapıldı.

#### **2.2.8. Kemilüminesans tekniği ile western görüntüleme**

Kemilüminesans western görüntülemesi, yüksek duyarlılığı nedeni ile western blotlama için geniş bir protein konsantrasyonu aralığında analiz yapmaya izin veren bir protein tespit yöntemidir. Kemilüminesans, ışık üreten kimyasal bir reaksiyondur. Bu teknikte sekonder antikörler, haberci enzim olan HRP (horse radish peroxydase) ile etiketlidir. Sekonder reaktif membrandaki hedef proteine bağlandıktan sonra membran, kemilüminesans substratı içeren bir çözelti ile inkübe edilir. Peroksit varlığında HRP enzimleri, luminol oksidasyonunu katalize eder ve bu da daha sonra ışık üretir. Yayılan ışığın ömrünü ve yoğunluğunu arttırmak için substrat çözeltisine bir arttırıcı dahil edilmiştir. Substrat ve arttırıcı, ışık üreten reaksiyonun yarı ömrünü birkaç dakika ile 1 saat arasında değiştirebilir. Bu reaksiyondan kaynaklanan ışık, CCD kamera ya da X-ışını filmi kullanılarak tespit edilebilir. Çalışmada, hedef proteinlere özgü antikörler ile boyanan membranların görüntülenmesi için blotlarda Clarity Western ECL Substrate Kit (170-5061, BioRad) kullanıldı. Her membran için 1:1 seyreltmede 500 µl peroksidaz reaktifi ile 500 µl luminol/arttırıcı reaktifi karıştırılıp membran üzerine damlatılarak 5 dakika inkübe edildi. Ardından membranlar bir peçeteye süzdürülerek, ChemiDoc cihazına yerleştirilip



membranlardaki bantlar Image Lab 4.0 yazılımı ile görselleştirildi. Blotlar Clarity Western ECL Substrat Kiti (170-5061, BioRad) kullanılarak görüntülendi. Blotlar daha sonra tarandı ve spesifik bantların yoğunlukları, ChemiDoc <sup>TM</sup> Görüntüleme Sistemleri (BioRad) ve Lab 4.0 Yazılımı kullanılarak internal yükleme kontrolü olan calnexine kıyasla ölçüldü ve normalleştirildi.

### **2.3. Bütünleştirici Piksel Analizi**

Western blot görüntüleri için, protein bantlarının nispi yoğunluğunu analiz etmek için Photoshop CS6 Yazılımı kullanılmıştır. Bağıl ekspresyon değeri, analiz edilen her protein için işlenmemiş kontrol hücrelerinde "1" e normalize edildi ve daha sonra deney gruplarının nispi protein ekspresyon kat değişiklikleri hesaplandı.

### **2.4. İstatiksel Analizler**

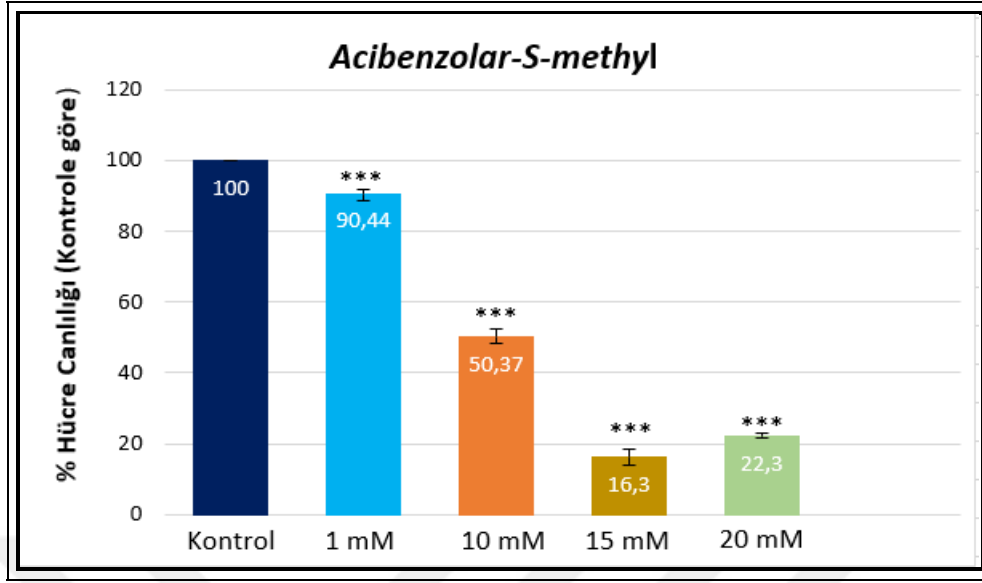
Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi (SPSS) İstatistiksel Analiz Programı kullanılmıştır ve sonuçlar “eşleştirilmiş-2 kuyruklu student t-testi” ne göre istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Tüm istatistiksel analizler için 0,05'in altındaki p değeri anlamlı, 0,001'in altındaki p değeri çok anlamlı kabul edildi. MTS hücre canlılığı ve western blot analizi için hazırlanan grafiklerdeki hata çubukları  $\pm$  s.d kullanılarak üretildi.

## 3.BULGULAR

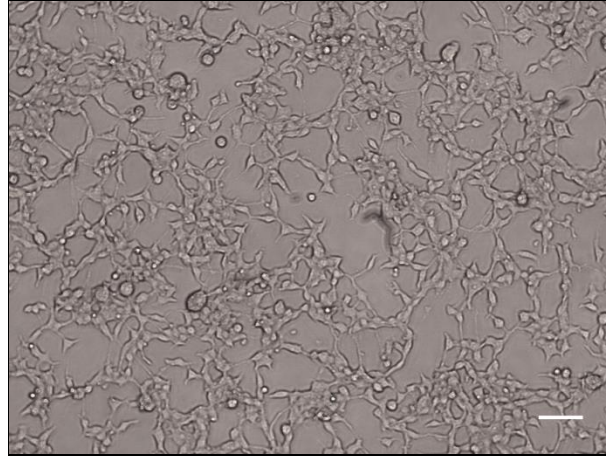
### 3.1. Bulgular

#### 3.1.1 Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattı canlılığının analizi

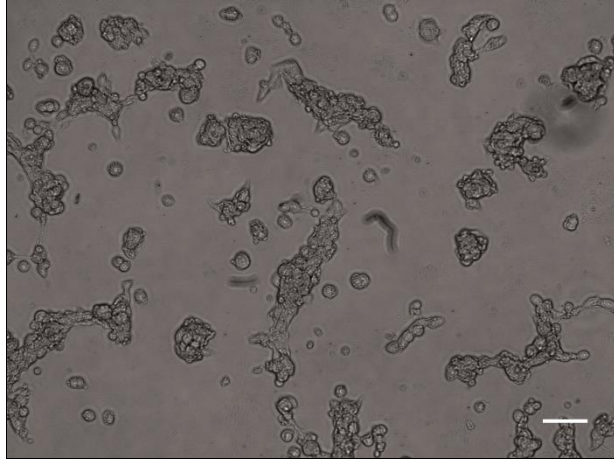
MTS testi, SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinin proliferasyonunun, Acibenzolar-S-Metil işlemiyle süre ve doza bağlı bir şekilde inhibe edildiğini gösterdi (Şekil 1A-C / Ters mikroskopi görüntüleri, Leica DMi1 Inverted Microscope for Cell Culture ile alındı, Leica, Wetzlar, Germany). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, düşük konsantrasyonlarda (1 mM) Acibenzolar-S-Metil, hücre canlılığı üzerinde çok az inhibisyon etkisi gösterirken, 10, 15 ve 20 mM konsantrasyonlarda canlılık seviyeleri 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinin her ikisinde de açıkça azaldı. Canlılıktaki düşüş miktarı hem 24 saat hem de 48 saat inkübasyon ile IC50 değerine ulaşmak için birbirine oldukça yakın ve yeterli olduğundan, 72 saatlik inkübasyon denemesi yapılmamıştır. SH-SY5Y hücreleri için, 10 mM konsantrasyondaki Acibenzolar-S-Metil, 24 saatte IC50 değerine ulaşmayı sağlamıştır (Şekil 3.1.A. \*\*\* p <0.001). Bu nedenle, diğer bütün deneylerde bu konsantrasyon ve bu zaman noktası kullanılmıştır.



Şekil 3.1. A. Acibenzolar-S-Metil'in 24 saat inkübasyon sonrası nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y büyümesi üzerindeki inhibe edici etkileri. ( 1, 10, 15 ve 20 mM'lik nihai konsantrasyonları elde etmek için 96 kuyucuklu bir plakanın her oyuğuna Acibenzolar-S-Metil ilave edildi. Hücre canlılığı, MTS testi ile belirlendi ve absorbans, bir mikrolaka okuyucu kullanılarak 490 nm'de ölçüldü. Grafik, kontrole kıyasla çoğalma yüzdeleri olarak ifade edilen MTS sonuçlarının kantitatif analizini göstermektedir. Çubuk ortalama değerleri  $\pm$  SD temsil etmektedir. \*\*\*  $p < 0.001$



Şekil 3.1. B. Kontrol SH-SY5Y hücrelerinin ters mikroskopi görüntüsü (Büyütme: 10X). Ölçek çubuğu 50 $\mu$ m'dir.



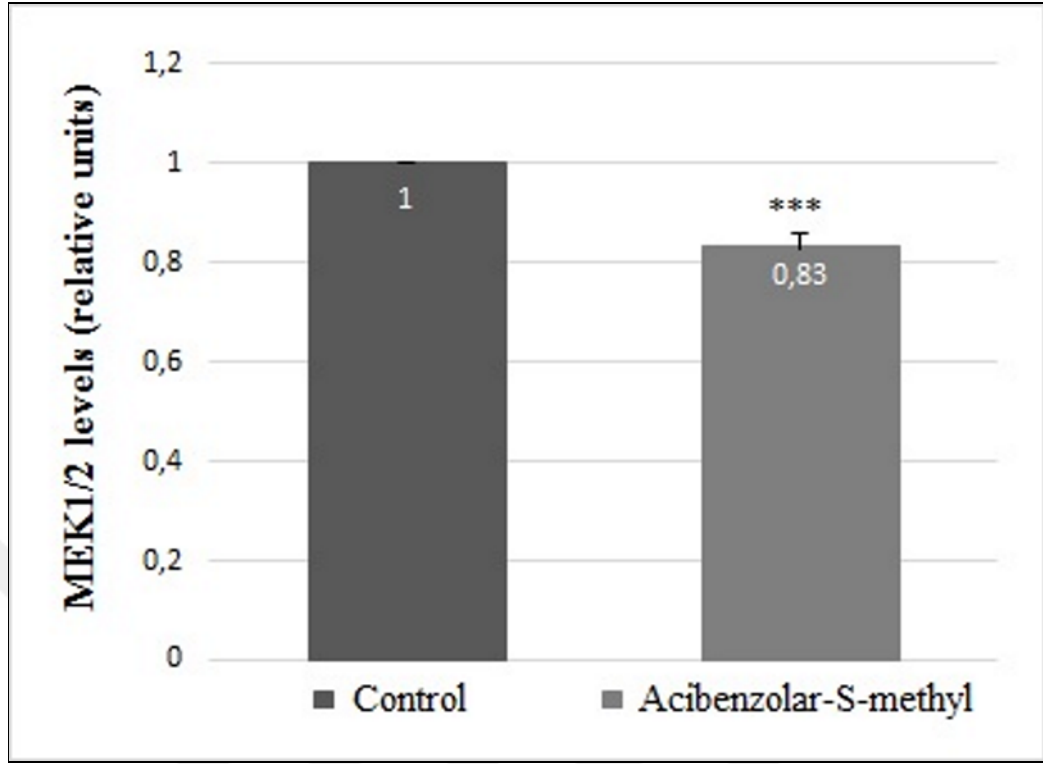
**Şekil 3.1. C. 10 mM-Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin ters mikroskopi görüntüsü (Büyütme: 10X). Ölçek çubuğu 50μm'dir.**

### **3.1.2. Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattında MEK1/2 sinyal yolu aktivitesinin incelenmesi**

Acibenzolar-S-Metil' in MEK1/2 sinyal yolu üzerindeki etkisini araştırmak için fare monoklonal anti-MEK1/2 (sc-81504, Santa Cruz Biotechnology) kullanılarak 10 mM Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücreleri ile Western blot işlemi gerçekleştirildi ve internal kontrol olarak fare monoklonal anti-calnexin (sc-80645, Santa Cruz Biotechnology) kullanıldı. Blotlama sonuçları, MEK1/2 sinyalinin Acibenzolar-S-Metil uygulamasıyla önemli ölçüde inhibe olduğunu gösterdi (Şekil 3.2.A ve 3.2.B, \*\*\* p <0.001).



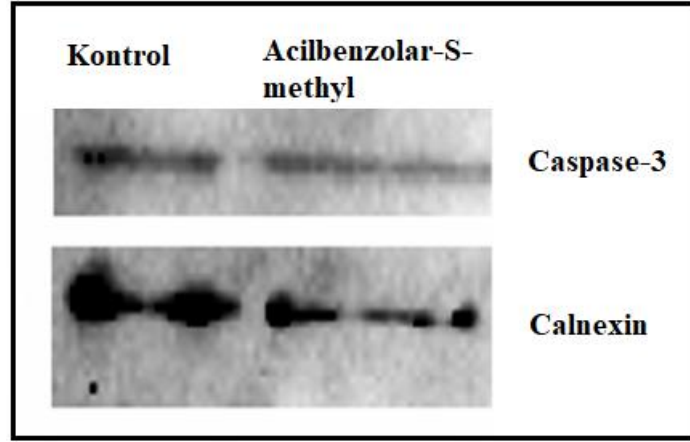
**Şekil 3.2. A. Acibenzolar-S-Methyl'in SH-SY5Y hücrelerinde MEK1/2 sinyal yolu üzerindeki inhibisyon etkisi. Western blot membranı, MEK1/2 antikor ve internal kontrol olarak calnexin antikor ile işaretlendi.**



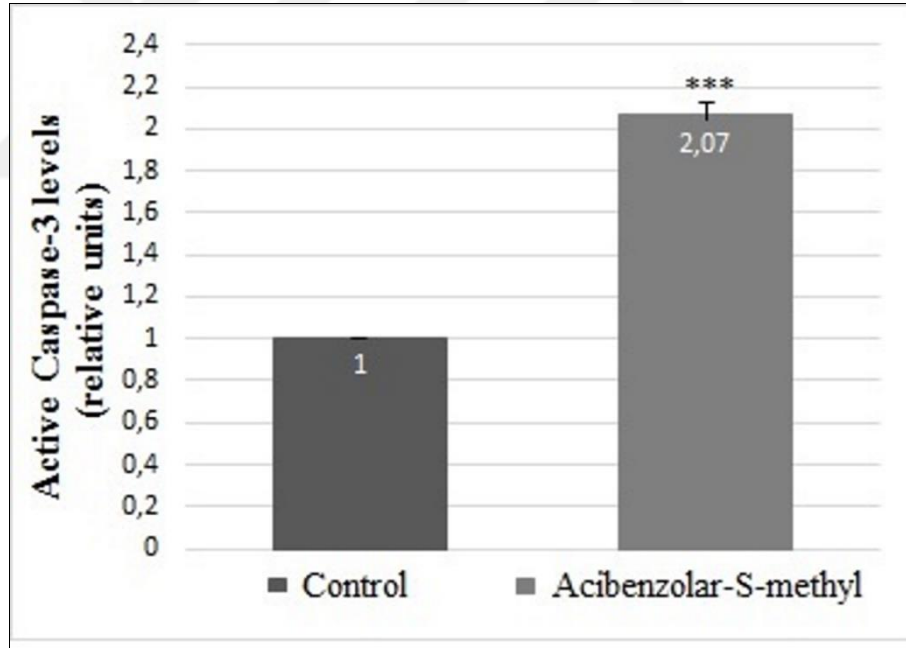
Şekil 3.2. B. Grafik, Panel A'daki sinyallerin kantitatif analizini göstermektedir. MEK1/2'nin bant yoğunluğu, calnexin'e göre normalize edilmiştir. Değerler MEK1/2 ekspresyonunun deneysel / kontrol oranına göre hesaplandı ve sonuçlar kat değişimi olarak gösterildi. Çubuk ortalama değerleri  $\pm$  SD temsil etmektedir. \*\*\*  $p < 0.001$

### 3.1.3. Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmiş SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattında kaspaz-3 aktivasyonunun incelenmesi

MTS analizi, SH-SY5Y hücrelerinin canlılığının, MEK1/2 sinyalindeki düşüşle tutarlı olarak Acibenzolar-S-Methyl işleminden sonra önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Hücre canlılığındaki azalmanın, majör apoptotik bir protein olan kaspaz-3'ün aktivasyonu ile ilişkili olup olmadığını ortaya çıkarmak için, aktif kaspaz-3 ekspresyonu, fare monoklonal anti-kaspaz-3 (sc-271759, Santa Cruz Biyoteknoloji) kullanılarak western blotlama ile analiz edildi ve fare monoklonal anti-calnexin (sc-80645, Santa Cruz Biyoteknoloji) internal kontrol olarak kullanıldı. Western blot sonuçları, aktif kaspaz-3 seviyelerinin Acibenzolar-S-Methyl uygulaması ile önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Şekil 3.3.A ve 3.3.B, \*\*\*  $p < 0.001$ )



Şekil 3.3. A Kaspaz-3'ün SH-SY5Y hücrelerinde Acibenzolar-S-Methyl muamelesi ile aktivasyonu. Western blot membranı, kaspaz-3 antikorü ve internal kontrol olarak kalnexin antikorü ile işaretlendi.



Şekil 3.4. B Grafik, Panel A'daki sinyallerin kantitatif analizini göstermektedir. Kaspaz-3'ün bant yoğunluğu, kalnexin'e göre normalize edilmiştir. Kaspaz-3 ekspresyonunun deneysel / kontrol oranına göre değerler hesaplanmış ve sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Çubuk ortalama değerleri  $\pm$  SD temsil etmektedir. \*\*\*

### 3.2. İrdeleme

Kanser, otoimmünite ve diyabet gibi hastalıklarda altta yatan temel hastalık mekanizmalarından biri, hücrede gerekli aktiviteleri düzenleyerek hücrel davranışı kontrol eden hücre içi sinyal kaskadlarının bozulmasıdır. Bu nedenle, sinyal iletimi eksikliğinin moleküler mekanizmasını ve bunun kanser gelişimi ile ilişkisini daha iyi anlamak, kanser biyolojisinin en önemli hedefi haline gelmiştir (Çoban, Z.D., 2013). Bu konuda, çok sayıda çalışma düşük doz aspirin içeren SA'nın kolorektal, meme, mide, akciğer kanserleri gibi birçok kansere karşı koruyucu olduğunu göstermiştir ((Brasky, T.M., 2010; Rothwell, P.M., 2012; Elwood, P.C., 2016; Klessing, D.F., 2016; Giampieri, R., 2016). Artan sayıda kanıtlar, SA'nın kanserde apoptotik bir etkiye sahip olduğunu ve bu eylemin mitojenik MEK1/2 sinyal kaskadı üzerindeki düzenleyici etkisinden kaynaklanıyor olabileceğini göstermektedir (Pan, M.R., 2008). Birçok kanserde MEK1/2 sinyalini inhibe etmek apoptotik ölüme neden olurken, melanom gibi bazı kanser türlerinde MEK1/2 sinyalini inhibe etmek aksine apoptoza dirençle sonuçlanmaktadır (Haydn, J.M., 2014). Bununla birlikte, sınırlı sayıdaki çalışma, bu sinyal yolunun nöroblastoma kanserinde etkisi üzerine odaklanmıştır. Ayrıca, SA'nın MEK1/2 sinyal yolu üzerindeki etkisi hakkında bir çalışma henüz yoktur.

Bu çalışmada SA analogu Acibenzolar-S-Metil'in MEK1/2 sinyal yolu üzerinde ve bununla ilişkili olarak nöroblastoma hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırdık ve Acibenzolar-S-Metil'in MEK1/2 sinyalini inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinin ölümüne neden olma potansiyeli olduğunu ilk kez olarak gösterdik.

Sonuçlarımız, SH-SY5Y hücrelerinin, 10 mM Acibenzolar-S-Metil ile muamele edilmesinin, A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde SA ile yapılan başka bir çalışmanın sonuçlarıyla tutarlı bir şekilde (Pan, M.R., 2008), MEK1/2 sinyalini (Şekil 3.2.A ve 3.2.B) düşürdüğünü göstermiştir.

Ayrıca bu çalışmada, MEK1/2 sinyal inhibisyonunun apoptotik etkisi ve SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde Acibenzolar-S-Metil'in hücre canlılığını azaltan etkisi hakkında bir ön yorum yapabilmeyi amaçladık. Bu sebeple, çok güçlü bir apoptoz

göstergesi olan aktif kaspaz-3 protein seviyesini Western blotlama ile analiz ettik ve aktif kaspaz-3 seviyelerinde Acibenzolar-S-Methyl ile işlem görmüş nöroblastoma hücrelerinde MEK1/2 seviyesindeki azalmayla tutarlı şekilde anlamlı iki kat artış olduğunu gösterdik (Şekil 3.3.A ve 3.3.B). Bu sonuç, SA'nın doza ve zamana bağlı apoptotik etkisini gösteren insan kolorektal tümör hücre hatları ve hepatoma hücre hattı ile yapılan çalışmaların sonuçlarıyla (LiuY., 2017; Elder, D.J., 1996) ve ayrıca A549 insan akciğeriyle yapılan ve SA'nın MAPK sinyalleme üzerindeki baskılayıcı ve apoptotik etkisini gösteren çalışmanın sonuçlarıyla korelasyon göstermektedir (Pan, M.R., 2008). Diğer yandan, çalışmamızın sonuçları, MEK1/2 sinyalini inhibe etmenin, melanom hücrelerinde apoptoza direnç göstermesine katkıda bulunduğunu gösteren çalışmanın sonuçlarıyla tutarsızdır (Haydn, J.M., 2014). Bu çelişki, kanserin moleküler temelini oldukça heterojen olabileceği ve dolayısıyla her kanser türünün kendisine özgü olabileceği anlamına gelir. Bu nedenle, tüm bu sonuçlar, uygun tedavi yöntemleri için doğru hedefleri düzenlemenin etkili bir yolunu bulmak amacıyla her kanser türüne özgü moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır. Bu nedenle, aktif kaspaz-3 analizimiz, SA'nın bazı kanserlere karşı apoptotik olabileceğine işaret etse de, SH-SY5Y hücrelerinde Acibenzolar-S-Metil tedavisi ile apoptoz arasında nedensel bir ilişki kurmak için daha fazla apoptoz çalışmaları yapılması gerekmektedir.

SA'nın veya analoglarının nöroblastomada kanser önleyici ajanlar olarak kullanımını daha ileri seviyede araştırmak için, kanserli olmayan sağlıklı hücre hatları, SA'nın hem kanserli hem de kanserli olmayan hücrelerde etkilerini ve yan etkilerini açık bir şekilde analiz etmek ve karşılaştırmak için kullanılabilir. Ayrıca, nöroblastoma hasta örnekleriyle in vitro çalışmalar yapılmalı, canlı organizmalarda tam etkinliğini analiz etmek için hastalık modelleriyle de in vivo çalışmalar yapılmalıdır.



#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, **ilk kez** SA analogu Acibenzolar-S-Methyl'in MEK1/2 sinyalini olumsuz yönde etkilediğini ve SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinin canlılığını azalttığını gösterdik. Melanom gibi bazı kanserlerde SA'nın kanseri teşvik eden anti-apoptotik özelliklerini gösteren çalışmalar olduğundan, ön apoptotik veri elde etmek için aktif kaspaz-3 analizi yaptık ve Acibenzolar-S-Methyl'in SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri için pro-apoptotik olabileceğini gösterdik.

Bu bağlamda, her bir kanser tipinin heterojen ve kendine özgü doğası dikkate alındığında, bu çalışma, özellikle nöroblastoma kanseri olmak üzere birçok kanser için uygun terapötik hedeflerin seçilmesini ve etkili teşhis ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlama potansiyeline sahiptir.

## KAYNAKÇA

- Blume-Jensen, P. ve Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411: 355-65.
- Brasky, T.M., Bonner, M.R., Moysich, K.B., Ambrosone, C.B., Nie, J. Ve Tao, M.H., (2010) Non steroidal anti-inflammatory drug use (NSAID) and breast cancer risk in the western New York Exposures and Breast cancer(WEB) study, *Cancer Causes Control*, 9: 1503-1512.
- Cotton, J.L. ve Williams, R.G. (1995) Noonan syndrome and neuroblastoma. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med*, 149:1280– 1281.
- Çoban, Z.D., Güran Ş. (2013) The role of signal transducing mechanisms in cancer diagnosis and treatment, *Cumhuriyet Medical Journal*, 35: 302-310.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O. Ve Kolch W. (2007) Map kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*,26(22):3279-90.
- Doğan A.L., Güç, D. (2004) Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35: 34-42.
- Dovizio, M., Bruno, A., Tacconelli, S., Patrignani, P. (2013) Mode of action of aspirin as a chemopreventive agent. *Recent Results Cancer Res*, 191:39-65.
- Elder, D.J., Hague, A., Hicks, D.J. ve Paraskeva C. (1996) Differential Growth Inhibition by the Aspirin Metabolite Salicylate in Human Colorectal Tumor Cell Lines: Enhanced Apoptosis in Carcinoma and in Vitro-transformed Adenoma Relative to Adenoma Cell Lines. *Cancer Research*, 56: 2273-2276.
- Elwood, P.C., Morgan, G., Pickering, J.E., Galante, J., Weightman, A.L., Morris, D., Kelson, M. ve Dolwani, S. (2016) Aspirin in the treatment of cancer: reductions in metastatic spread and in mortality: a systematic review and meta-analyses of published studies. *PLoS One*, 11(4): e0152402.
- Giampieri, R., Restivo, A., Pusceddu, V., Del Prete, M., Maccaroni, E., Bittoni, A., Faloppi, L., Andrikou, K., Bianconi, M., Cabras, F., Berardi, R., Zorcolo, L., Scintu, F., Cascinu, S. ve Scartozzi, M. (2016) The role of aspirin as antitumoral agent for heavily pretreated patients with metastatic colorectal cancer receiving capecitabine monotherapy. *Clin Colorectal Cancer*, 16(1):38-43.
- Gripp, K.W. ve Lin, A.E. (2012) Costello syndrome: A Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. *Genet. Med*, 14: 285–292.
- Harris, R.E., Beebe-Donk , J., Doss, H., Burr Doss, D. (2005) Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a

- critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep*, 13(4):559-83.
- Hassanpour, S.H., Dehghani, M. (2017) Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4 :127-129.
- Haydn, JM, Hufnagel A, Grimm, J., Maurus, K., Scharlt, M. ve Meierjohann S. (2014) The MAPK pathway as an apoptosis enhancer in melanoma. *Oncotarget*, 5(13): 5040-5053.
- Houslay, M.D., (2003) The role of ERK2 insertion and phosphorylation of the PDE4 cAMP phosphodiesterase isoform in mediating the conversation between the cAMP and ERK signaling pathways. *Biochem Soc Trans*, 31 (Pt 6): 1186-90 .
- Jivan, A., (2010) Restructuring of Nuclear Transport of MAP Kinase ERK2. *Methods Mol Biol*, 661: 273-85.
- Julian, R., Molina, M.D., (2006) The Ras/Raf/MAPK Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*, Volume 1, Issue 1, Pages 7–9.
- Kanat, J.R., Bot, R.M., ( 2003) The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*. 110 (5-6): 255-8.
- Kilciler, M., Zorba, O.U.(2010) Toremifene and NSAID In Prevention of Prostate Cancer. *Turk Urol Sem*,1: 168-76.
- Klessig, D.F., (2016) Newly identified targets of aspirin and its primary metabolite, salicylic acid. *DNA Cell Biol*, 35(4):163–6.
- Kolb, R.H., Greer, P.M., Cao, P.T., Cowan, K.H., Yan, Y. (2012) ERK1/2 Signaling Plays an Important Role in Topoisomerase II Poison-Induced G2/M Checkpoint Activation. *Tan Med. PLoS ONE*, 7(11):e50281.
- Küçükkaya, B. ve Afrasyap, L. (2012) Mitojenle etkinleşen protein kinazların heterotrimerik G proteinleri ile düzenlenmesi. *Turk J. Biochem*, 37(2):218–228.
- Liebmman, C. (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell. Signal*, 13: 777–7.
- Liu, F., Yang, X., Meiyu Geng, M., ve Huang, M. (2018)Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, Jul; 8(4): 552–562.
- Liu, Y., Wang, Y., Li, L., Hu, Y., Ge, S., Li, K. ve Wang S. (2017) The apoptotic inducible effects of salicylic acid on hepatoma cell line: relationship with nitric oxide signaling. *J. Cell Commun Signal*, 11: 245-253.
- Lopez-Miranda, B., Westra, S.J., Boechat, M.I. ve Yazdani, S. (1997) Noonan syndrome associated with neuroblastoma: A case report. *Pediatr. Radiol*, 27: 324– 326.
- Lubanska, D., Market, B., De Calvalho, A., Mikkelsen, T., Fidalgo da Silva, E. Ve Porter LA. (2014) The atypical cell cycle regulator Spy1 suppresses

- differentiation of the neuroblastoma stem cell population. *Oncoscience*, 25: 64-7.
- Maris, J.M. (2010) Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J. Med*, 62(23):2002.
- Mascaux, C., Iannino, N., Martin, B., Paesmans, M., Berghmans, T., Dusart, M., Haller, A., Lothaire, A.P., Meert, A.P., Noel, S. ve Lafitte, JJJP. (2006) The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br. J. Cancer*, 92: 131–139.
- Matthay, K.K., Maris, J.M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C.L., Diller, L., Weiss, W.A. (2016) Neuroblastoma. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2:16078. 17. Erin, K. B. ve Mark, A. (2018) Nöroblastoma ve Genetik Yatkınlık. *Applebaum Çocuklar (Basel)*, 5 (9): 119.
- Mattingly, R.R., Milstein, M.L ve Mirkin, B.L. (2001) Down-regulation of growth factor-stimulated MAP kinase signaling in cytotoxic drug-resistant human neuroblastoma cells. *Cell Signal*, 13(7):499-505.
- P.J. Roberts and C.J. Der. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26, 3291–3310.
- Pan, M.R., Chang, H.C.ve Hung, W.C. (2008) Non-steroidal anti-inflammatory drugs suppress the ERK signaling pathway via block of Ras/c-Raf interaction and activation of MAP kinase phosphatases. *Cell Signal*, 20(6):1134-41.
- Pinto, N.R., Applebaum, M.A., Volchenboum, S.L., Matthay, K.K., London, W.B., Ambros, P.F., Nakagawara, A., Berthold, F., Schleiermacher, G., Park, J.R., et al. (2015) Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *J. Clin. Oncol*, 33: 3008–3017.
- Romano, A.A., Allanson, J.E., Dahlgren, J., Gelb, B.D., Hall, B., Pierpont, M.E., Roberts, A.E., Robinson, W., Takemoto, C.M., Noonan, J.A. (2010) Noonan syndrome: Clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics*, 126:746–759.
- Rothwell, P.M., Wilson, M., Price, J.F., Belch, J.F., Meade, T.W. ve Mehta, Z. (2012) Effect of Daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials, *Lancet*, 379:1591-601.
- Thun, M.J. (2012) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and amyotrophic lateral sclerosis: results from five prospective cohort studies. *Amyotroph Lateral Scler*, 13(6):573-9.
- Tougeron, D., Sha, D., Manthravadi, S., ve Frank, A. (2014) Aspirin and Colorectal Cancer: Back to the Future. *Clinical Cancer Research*, 10:1158/1078

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Neslihan ÇİTİL  
Uyruk : T.C.  
Doğum Yeri ve Tarihi: Anlara, 13/08/1981  
Medeni Hali : Evli  
Telefon : 0 505 231 87 01  
E-posta : neslihancitil@gmail.com

### Eğitim

| Alınan Derece | Aldığı Kurum/Üniversite         | Mezuniyet Yılı |
|---------------|---------------------------------|----------------|
| Lise          | Yenimahalle Halide Edip Lisesi  | 1998           |
| Lisans        | Ankara Üniversitesi             | 2003           |
| Yüksek Lisans | Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi | 2019           |

### İş Tecrübesi

| Yıl       | Yer      | Pozisyon/ Görev               |
|-----------|----------|-------------------------------|
| 2003-2005 | Ankara   | Yönetici asistanı - Kontrolör |
| 2005-2006 | Ankara   | Embriyolog- Biyolog           |
| 2008-2009 | Adıyaman | Yönetici                      |

### Yabancı Dil

| Dil ( İngilizce) | Başlangıç | Orta | İleri |
|------------------|-----------|------|-------|
| Yazma            |           | X    |       |

|         |   |   |  |
|---------|---|---|--|
| Konuşma | X |   |  |
| Anlama  | X |   |  |
| Okuma   |   | X |  |

### **Bilimsel Faaliyetler**

1. IX. Fen Bilimleri Araştırma Sempozyumu, Muğla, Atatürk Kùltür Merkezi Fuaye Alanı, 16 Mayıs 2019, Poster Sunumu
2. Semen ve testis doku kriyoprezervasyonu, Ankara Üniversitesini Tıp Fakùltesi, Histoloji ve embriyoloji Anabilim Dalı, Mayıs 2005, Seminer Sunumu

### **Hobiler**

Araba kullanmak, seyahat etmek, spor yapmak, müzik dinlemek...