

T.C
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DEMİR ŞELATLAYICI ME0053 ve ME0055
BİLEŞİKLERİNİN KANSERLİ HÜCRELERİN
PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SH-
SY5Y HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜR TANRIVERDİ

ARALIK 2019
MUĞLA

T.C
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DEMİR ŞELATLAYICI ME0053 ve ME0055
BİLEŞİKLERİNİN KANSERLİ HÜCRELERİN
PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SH-
SY5Y HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜR TANRIVERDİ

ARALIK 2019
MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

ÖZGÜR TANRIVERDİ tarafından hazırlanan “DEMİR ŞELATLAYICI ME0053 ve ME0055 BİLEŞİKLERİNİN KANSERLİ HÜCRELERİN PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ” başlıklı tezin, 18/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oy birliği ile kabul edilmiştir

TEZ SINAV JURİSİ

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

İmza:

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

İmza:

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

İmza:

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

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

İmza:

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

İmza:

Savunma Tarihi: 18/12/2019

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

Özgür TANRIVERDİ

18.12.2019



ÖZET

DEMİR ŞELATLAYICI ME0053 ve ME0055 BİLEŞİKLERİNİN KANSERLİ HÜCRELERİN PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN SH-SY5Y HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

ÖZGÜR TANRIVERDİ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül YILDIZ

Aralık 2019, 67 sayfa

Demir temel bir elementtir ve hücre çoğalması, metabolizması ve büyümesi gibi fonksiyonlarda önemli bir rol oynar. Ayrıca mitokondriyel enzimler için önemli bir katalizördür ve katalaz gibi detoksifikasyon işlemleri için de oldukça önem taşır. Aynı zamanda demir, redoks döngüsü ve serbest radikal oluşumunda da yer alabilir. Bu nedenle hücre için demir hem esastır hem de potansiyel olarak toksiktir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda demirin tümörün mikro-çevresinde ve metastatik sürecinde de yer aldığı gösterilmiştir. Demir edinimi, akışı, depolanması ve düzenlenmesi ile ilgili tüm mekanizmaların karsinogenez ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle demirin metabolik yollarının karsinogenezdeki rolünün belirlenmesi, kanser prognozu ve tedavisi için yeni hedefler sağlayabilir. Bu bilgiler ışığında, SH-SY5Y kanser hücrelerinde demir şelatlayıcı olarak bilinen Salisiliden asilhidrazid sentetik grubundan ME0055 ve ME0053 kimyasallarının etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Bu çalışmada, kimyasalların hücre üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için 10×10^4 hücreye MTT testi yapıldıktan sonra uygun olan doz $50 \mu\text{M}$ olacak şekilde belirlendi. Daha sonra protein izolasyonu sonucunda western blotlama yapılarak Speedy/RINGO, MAPK, p-Akt ve kaspaz-3 aktivitesine bakıldı. Hücre siklus regülatörü olan Speedy/RINGO seviyesinde gözlemlenen düşüşle beraber p-Akt yolağının da fosforilasyon seviyesini düşürdüğü görüldü. Bu durumun sadece Speedy/RINGO seviyesindeki azalma sayesinde değil aynı zamanda demir şelatlayıcı salisiliden asilhidrazidlerin Fe^{+2} ile etkileşime girerek PTEN aktivitesinde

artıřa sebep olmaları yanısıra PI3K'ın PIP3 ile etkileřime girmemesinden kaynaklı olabileceęi dūřunūlebilir. MAPK yolaęına ait verilerimizde, kullanılan bu kimyasalların çok fazla etki etmedięi gözlemlense de yine de anlamlı sonuçlar elde edilmiřtir. Dięer bir sonuç olarak ME0055 ve ME0053 kimyasallarının SH-SY5Y kanserli hūcrelerde sırasıyla kaspaz-3 aktivitesini %59,7 ve %210 oranında artırdıęı saptandı. Bu çalıřmanın sonucunda, karsinogeneizde önemli rolū olan MAPK ve Akt sinyal yolları ve Speedy/RINGO proteininin regūlasyonunda sentetik olan demir řelatlayıcıların tedavi amacı ile kullanımlarının önemli bir etki saęlayacaęı kanısına varıldı. Ancak bu çalıřmanın demir metabolizması ve karsinogeneizden sorumlu molekūler mekanizmalar ile arasındaki iliřkinin dięer kanser hūcre hatlarında ve daha fazla hedef molekūl belirlenerek çalıřılması gerekebileceęi dūřınıldū

Anahtar Kelimeler: Salisiliden Asilhidrazitler, SH-SY5Y Kanser Hūcre Hattı, ME0055, Speedy/RINGO, ME0053, p-AKT, MAPK, Kaspaz-3

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE EFFECT OF IRON CHELATING ME0053 AND ME0055 COMPOUNDS ON PROLIFERATION OF CANCER CELLS IN SH-SY5Y CELLS

ÖZGÜR TANRIVERDİ

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ayşegül YILDIZ

December 2019, 67 pages

Iron is an essential element and plays an important role in functions such as cell proliferation, metabolism and growth. It is also an important catalyst for mitochondrial enzymes and is very important for detoxification processes such as catalase. Iron may also be involved in the redox cycle and free radical formation. Thus, iron is both essential and potentially toxic to the cell. Recent studies have shown that iron is involved in the micro-environment and metastatic process of the tumor. All mechanisms of iron uptake, flow, storage and regulation have been reported to be closely related to carcinogenesis. Therefore, determination of the role of iron metabolic pathways in carcinogenesis may provide new targets for cancer prognosis and treatment. In the light of this information, it was aimed to investigate the effects of ME0055 and ME0053 chemicals from the Salicylidene acylhydrazide synthetic group known as iron chelators in SH-SY5Y cancer cells. In this study, in order to understand the effect of chemicals on the cell, after the MTT test was performed on 10×10^4 cells, the appropriate dose was determined as $50 \mu\text{M}$. After protein isolation, Western blotting was performed to investigate Speedy / RINGO, MAPK, p-Akt and caspase-3 activity. It was observed that the expected decrease in the cyclin A-CDK2 complex together with the observed decrease in the cell cycle regulator Speedy / RINGO level decreased the phosphorylation level of the p-Akt pathway. This may be due to not only the reduction in the level of Speedy / RINGO,

but also the fact that iron chelating salicylidene acylhydrazides interact with Fe^{+2} , leading to an increase in PTEN activity, as well as PI3K not interacting with PIP3. Although it was observed that these chemicals did not affect the MAPK pathway, significant results were obtained. As a result, ME0055 and ME0053 chemicals increased caspase-3 activity by 59.7% and 210% in SH-SY5Y cancer cells, respectively. As a result of this study, it has been concluded that use of synthetic iron chelators on MAPK and Akt signaling pathways, which play an important role in carcinogenesis and Speedy / RINGO, which is a protein in cell-cycle regulation will have a significant effect on cancer treatment. However, it was thought that the relationship between this study and the molecular mechanisms responsible for iron metabolism and carcinogenesis may need to be studied by identifying more target molecules in other cancer cell lines.

Keywords: Salicylidene Acylhydrazide, SH-SY5Y Cancer Cell Line, ME0055, Speedy/RINGO, ME0053, p-AKT, MAPK, Caspase-3

Sevgili Aileme...



ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik alanında Yüksek Lisans eğitimim süresince bilimsel yönden bilgi, tecrübe ve fikirleri ile her türlü desteği esirgemeyen ve insani yönden tanımaktan onur duyduğum saygıdeğer danışman hocam; Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül YILDIZ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden esinlendiğim Doç. Dr. Reşat ÜNAL'a, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ömür BAYSAL ve Anabilim Dalı başkan yardımcısı Dr. Öğretim Üyesi Ergün KAYA ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının değerli öğretim üyelerine ve ayrıca bilimsel ve insani destekleri nedeni ile Araştırma Görevlisi Yeşim KAYA'ya, yüksek lisans öğrencileri Süleyman ARZIMAN ve Neslihan ÇİTİL'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, manevi katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, tüm eğitim hayatım boyunca sabırla beni destekleyen emekli öğretmen Annem Hatice ÖZKAN'a, kardeşim Dt. Deniz AYMAN'a ve hayatımın anlamına sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER ve GRAFİKLER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xivi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Demir Metabolizması	1
1.2. Demir Metabolizmasının Kanserle İlişkisi	2
1.3. Kanser Hücrelerinde Değişmiş Demir Metabolizması	2
1.3.1. Demir alımı	4
1.3.2. Demir akışı	4
1.3.3. Demir depolama	5
1.4. Demir Şelatörleri	5
1.5. Salisiliden Asilhidrazid (SA)	6
1.6. Demir Şelatörleri Tarafından Hücresel Sinyal Yolu Modülasyonu	7
1.6.1. Hücre döngüsü	7
1.6.2. Ribonükleotid redüktaz	7
1.6.3. Siklin ve CDK'lar	8
1.6.4. p 53	9
1.6.5. CDK inhibitörleri	9
1.6.6. c-myc	9
1.6.7. Speedy /RINGO	10
1.6.8. PI3K-PKB / Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) sinyal yolağı	11
1.6.9. PI3K ve aktivasyon mekanizması	12
1.6.10. Ras / Raf / MEK / ERK ilişkisi	15
1.7. Çalışmanın amacı	17
2. MALZEMELER VE YÖNTEMLER.....	19
2.1. Malzemeler	19
2.1.1. Ekipmanlar	19
2.1.2. Kimyasallar ve enzimler	20
2.1.3. Ticari kitler	21
2.1.4. Tamponlar ve solüsyonlar	21

2.1.4.1. <i>IX yükleme Boyası (SDS-PAGE için)</i>	21
2.1.4.2. <i>SDS-PAGE için stacking buffer pH 6.8 0.5 M</i>	21
2.1.4.3. <i>SDS-PAGE için separatin buffer pH 8.8 1.5M</i>	21
2.1.4.4. <i>SDS running buffer</i>	22
2.1.4.5. <i>Tris buffered saline (TBS)</i>	22
2.1.4.6. <i>Tris buffered saline-tween20 (TBST)</i>	22
2.1.4.7. <i>Towbin buffer</i>	22
2.1.4.8. <i>Western Blotlama'da bloklama solüsyonu</i>	22
2.1.4.9. <i>Primer ve sekonder antikorların hazırlanması</i>	22
2.2. Yöntemler	23
2.2.1. <i>Kanserli SH-SY5Y hücre hattının büyütülmesi</i>	23
2.2.2. <i>Salisiliden asilhidrazid grubu sentetiklerin hazırlanması</i>	23
2.2.3. <i>Kimyasal dozlarının belirlenmesi (IC50)</i>	24
2.2.4. <i>Protein izolasyonu</i>	24
2.2.5. <i>Qubit protein miktar analizi</i>	24
2.2.6. <i>Western blotlama</i>	25
2.2.7. <i>Antikor uygulaması ve kemilüminesans tayini</i>	26
2.2.8. <i>İstatiksel ve piksel analizi</i>	27
3. BULGULAR VE İRDELEME	28
3.1. Bulgular	28
3.1.1. <i>Farklı salisiliden asilhidrazid grubu sentetiklerin kanserli SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri</i>	28
3.1.2. <i>ME0055 ve ME0053 kimyasalı ile demirin şelatlanması sonrası p-Akt yolağında Thr 308'in incelenmesi</i>	30
3.1.3. <i>ME0055 ve ME0053 kimyasalı ile demirin şelatlanması sonrası p-Akt yolağında Ser473'ün incelenmesi</i>	31
3.1.4. <i>Demir şelatlanması sonrası MEK1/2 protein ekspresyonunun analizi</i>	32
3.2. <i>Speedy / RINGO Protein Ekspresyon Analizi</i>	33
3.3. <i>Kaspaz-3 aktivitesi</i>	34
3.4. <i>İrdeleme</i>	35
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	48

ÇİZELGELER ve GRAFİKLER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ekipmanlar.....	19
Çizelge 2.2. Kimyasallar ve Enzimler.....	20
Çizelge 2.3. Ticari Kitler.....	21
Çizelge 2.4. Qubit protein miktar tayini	25
Çizelge 2.5. SDS-PAGE için yüklenecek protein örnekleri	26
Grafik 3.1. ME0055 kimyasalının kanserli SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	28
Grafik 3.2. ME0053 kimyasalının kanserli SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. A. Hücresel demir metabolizması. Demir atomunun iki atomu dolaşımda bulunan transferrin (Tf) proteinlerine bağlanır ve Tf'in demir doymuş formunu (holo-Tf) oluşturur. İki holo-Tf molekülü daha sonra hücre zarında eksprese edilen transferrin reseptörü 1'e (TfR1) bağlanır. Tf-TfR1 kompleksi endositoza maruz kalır. Sonra Tf'e bağlı ferrik demirin salınımını ve prostat 3 altıtransmembran epitel antijeni (STEAP3; Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) ile ferröz forma indirgenmesini indükleyerek endozom içine alınır. Demir daha sonra iki değerli metal taşıyıcı 1 (DMT1; Divalent metal transporter 1) aracılığı ile sitozol içinde serbest demir havuzuna salınmış olur. Burada (i) ribonükleotit redüktaz gibi aktif protein bölgelerine dahil edilir; (ii) sitoplazmik ferritin olarak depolanır; (iii) mitokondri tarafından alınır ve (iv) demir akış pompası ferroportin 1 (Fpn1) aracılığı ile hücreden ihraç edilebilir. Demir eksikliği sonucunda oluşan Tf (apo-Tf) ve TfR1 molekülleri daha sonra geri dönüştürülür ve hücre yüzeyine geri döndürülür. B. Kanseri tedavisi için kullanılan temel şelatörlerin kimyasal yapısı (Goldie vd., 2015)..... 3
- Şekil 1.2. Demir şelasyonu, hücre döngüsünün çoklu düzenleyicilerinin modülü (Goldie vd., 2015). 8
- Şekil 1.3. DNA hasar yanıtlarının düzenlenmesinde Spy 1/Ringo'nun rolü (Randy vd., 2007) Spy 1/Ringo, DNA hasarına yanıt olarak CDK'ları düzenler ve dolayısıyla hücre döngüsünün ilerlemesini, apoptoz veya DNA onarımını kontrol eder 10
- Şekil 1.4. PI3K-Akt yolunun sinyalleşme modeli (Osaki vd., 2004): Büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinazına (RTK) veya G protein-bağlı reseptörlerine (GPCR) bağlanması, p85 ve p110 subünitelerinden oluşan fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3K) fosforilasyonunu indükler. PI3K, fosfatidilinositol-4,5 bisfosfonatı (PI (4,5) P2), PI (3,4,5) P3'e dönüştürürken, PTEN (kromozom 10 üzerinden silinen fosforaz ve tensin homoloğu) bu reaksiyonu tersine çevirir. Akt hücre zarına yerleştirir ve PH alanı vasıtasıyla PI (3,4,5) P3 ile etkileşime girer, fosfatidilinositole bağlı kinaz (PDK1), PDK2 ve integrin-bağlı kinaz (ILK) ile fosforile edilir. 12
- Şekil 1.5. AKT proteini izforomları (Gizeh vd., 2014) N-terminal ucunda PH domainleri, orta kısımda yarı fosforilasyonun gerçekleştiği threonin rezidülerinin yer aldığı kinase domaini ve C-terminal ucunda ile son fosforilasyonun gerçekleştirildiği serin rezidülerinin yer aldığı hidrofobik motif görülür. † meme kanserinde bildirilen somatik mutasyonları göstermektedir. 13
- Şekil 1.6. Demir şelasyonu, mitojen aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyalleşmesinin modülü (Rybak, P. 2014)..... 16

- Şekil 3.1. p-Akt Thr308 için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada p-Akt Thr308 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki p-Akt Thr 308 protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$ 30
- Şekil 3.2. p-Akt Ser473 için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada p-Akt Ser473 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki p-Akt Ser473 protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$ 31
- Şekil 3.3 MEK1/2/ için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada MEK1/2 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki MEK1/2 seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$ 32
- Şekil 3.4. Speedy/RINGO için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada speedy/RINGO için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki speedy/RINGO protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$ 33
- Şekil 3.5. Kaspaz-3 aktivitesi için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada Kaspaz-3 aktivitesi için kantitatif sonuçları gösteren grafik. b): ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki Kaspaz-3 aktivitesi seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$ 34

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
M	Molar
V	Volt
A	Amper
g	Gram
μg	Mikrogram
ng	Nanogram
lt	Litre
μl	Mikrolitre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
mm	Milimetre
NO	Nitrit Oksit
O ₂	Oksijen
CO ₂	Karbondioksit
HCl	Hidrojen klorür
NaCl	Sodyum klorür
Cl-	Klorür
dH ₂ O	Distile su

SD	Standart sapma
UV	Ultraviyole
TfR1	Transferrin receptor 1
DFO	Desferrioxamine
Tf	Transferrin
DMT1	Divalent metal transporter 1
Fpn1	Ferroportin 1
STEAP3	Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3
RR	Ribonükleotid redüktaz
IRP	Iron-regulatory proteins
T3SS	Type three secretion system
Ser	Serin
Thr	Treonin
DNA	Deoksiribonükleik asit
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
Akt (PKB)	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PKA	Protein kinase A
p-Akt	Phospho-Akt
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
RTK	Reseptor tirozin kinaz
PH	Plekstrin homoloji domain
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PDK1	Phosphoinositide dependent protein kinase 1
PDK2	Phosphoinositide dependent protein kinase 2
mTOR	Mammalian target of rapamycin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog

ERK	Extracellular signal regulated kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
SOS	Son of sevenless
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
PLD2	Phospholipase D2
MKP	MAP kinase phosphatase
RasGEF	Ras guanine nucleotide exchange factor
RasGAP	Ras GTPase-activating protein
RINGO	Rapid inducer of G2/M progression in oocytes
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2jmm

1. GİRİŞ

1.1. Demir Metabolizması

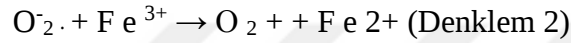
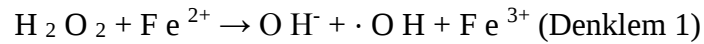
Diyet kaynaklarından elde edilen demir ince bağırsakta emildikten sonra duodenal enterosit aracılığı ile kana geçer, burada transferrin (Tf) isimli demir bağlayıcı proteine bağlanır (Lane vd., 2015). Fizyolojik sıvılarda bulunan Tf molekülü, iki ferrik demir atomunu yüksek bir afinite ile bağlayabilir (Crichton, 2009). Transferrin, eritropoez ve ferritin içinde depolanma gibi kritik fonksiyonlar için demirin bağırsak ve karaciğerden bozulmadan hücrelere taşınmasında önemli bir rol oynar. Transferrin reseptörü 1 (TfR1) proteini, plazma membranında yer alır ve hücrelerin demiri kolay bir şekilde alabilmesi amacıyla iki Tf molekülünü bağlayabilir (Hanover vd., 1995). Sonrasında ferrik demir buradaki asidik ortam nedeniyle Tf'den ayrılır. Bu durum prostat 3 altı transmembran epitel antijeni (STEAP3) ile ferrik demirin ferröz forma indirgenmesini indükler ve Tf-TfR1 kompleksi endozom içine alınır (Şekil 1.1A). Demir, iki değerli metal taşıyıcı 1 (DMT1) vasıtasıyla endosomal membran boyunca sitozol içerisine salınabilir (Fleming vd., 1998).

Hücresel demir, ribonükleotit redüktaz (RR) gibi proteinlerin aktif bölgelerine dahil edilmiş, sitoplazmik ferritinde depolanmış, heme sentezi, demir-sülfür küme üretimi veya mitokondriyal ferritinde depolanmak üzere mitokondriye dağıtılmış veya demir akış pompası ferroportin 1 (Fpn1) şeklinde hücreden atılmak suretiyle vücutta çoklu homeostatik işlemlerde kullanılır (Şekil 1.1A) (Merlot vd., 2013; Richardson vd., 2010).

Demir düzenleyici proteinler (IRP; iron regulated proteins), hücre içi demir yoğunluğuna yanıt veren ve transkripsiyon sonrasında protein ekspresyonunu kontrol eden, demirin alımını, kullanımını ve depolanmasını kısmen de olsa düzenleyen demir homeostazı proteinleridir.

1.2. Demir Metabolizmasının Kansere İlişkisi

Redoks döngüsüne girebilmesi ve serbest radikal oluşumunu desteklemesi nedeniyle vücuttaki aşırı demirin toksik olduğu bilinir (Kalinowski vd., 2005). Demir, Fenton reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksit üretiminin olumsuz sonuçlarını artırabilir ve biyolojik sistemler için en reaktif kimyasal olarak kabul edilen hidroksil radikallerinin oluşmasında rol oynayabilir (Denklem 1) (Barnham vd., 2004). Süperoksit iyonunun Fenton reaksiyonu için gerekli olan rejenere demir oluşumuna da katılabileceği bildirilmiştir (Denklem 2) (Winterbourn, 1995).



Serbest radikaller bir dizi kimyasal reaksiyona neden olabilir ve sonuçta DNA oksidasyonu, mitokondriyal hasar ve membran lipidlerinin peroksidasyonu sonrasında DNA hasarı başlar, hücre döngüsünün ilerlemesi engellenir ve hücrenin apoptoza gidişi teşvik edilir (Barnham vd., 2004). Bu nedenle, demir seviyelerinin sıkı bir şekilde düzenlenmesi oldukça önemlidir. Bu düzenlemeyi özel proteinler ve demirin çözülebilir ve toksik olmayan bir biçimde taşınmasından ve depolanmasından sorumlu olan süreçler sağlar (Richardson vd., 1997). Vücut demir homeostazını koruyamaz ise; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabetes mellitus, enfeksiyonlar ve nöro-dejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalık durumu ortaya çıkar (Merlot vd., 2013).

1.3. Kanser hücrelerinde değişmiş demir metabolizması

Demir homeostazının regülasyonu, normal hücreler ile karşılaştırıldığında kanser hücrelerinde bozulmuştur (Merlot vd., 2013; Eisenstein vd., 1998). Kanserdeki bu bozulmuş demir homeostazı, kanser hücrelerinin hızlı çoğalmalarına aracılık etmek için artan demir ihtiyacını karşılayabilecek fenotipi kazandırabilen demir alımı, akışı ve depolanmasındaki değişikliklerle ortaya çıkabilir (Merlot vd., 2013; Torti vd., 2013)

1.3.1. Demir alımı

Kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla yüksek TfR1 seviyelerine sahip oldukları ve agresif kanserlerin daha yüksek oranda TfR1 eksprese ettikleri gösterilmiştir (Merlot vd., 2013; Soyer vd., 1987). Bu nedenle, kanser hücrelerinin varolan Tf'den daha yüksek oranda demir alımına sahip oldukları bildirilmiştir (Richardson vd., 1990).

DNA sentezinde görev alan hız sınırlayıcı enzimin aktive olabilmesi için kanser hücrelerinin de sürekli bir demir kaynağına ihtiyaç duyduğu ve bu nedenle de kanser hücre proliferasyonunun ve DNA sentezi oranlarının normal hücrelere göre artmış olduğu saptanmıştır (Jiang vd., 2010). Endozomal metalloreduktaz, Tf'ne bağlı endozomal ferrik demiri ferröz formuna indirgeyebilen bir enzimdir ve STEAP3 ile birlikte eritroid seri hücrelerinin demir alımını kolaylaştırır (Ohgami vd., 2005). Nitekim prostat, kolorektal, akciğer ve pankreas kanserlerinde aşırı eksprese edildiği bildirilen STEAP3'ün, kanser hücresindeki değişmiş demir metabolizmasını gösterebileceği belirtilmiştir (Hubert vd., 1999; Isobe vd., 2011).

1.3.2. Demir akışı

Meme kanseri, prostat kanseri, hepatoselüler karsinom ve lösemide Fpn1 ekspresyonunun azaldığını veya bulunmadığı, buna karşın ekspresyondaki bu değişikliklerin beyin veya özofagus kanserlerinde görülmediğini bildirmiştir (Jiang vd., 2010; Rhodes vd., 2007). Hepsidin, bir peptid hormonudur ve hepsidin düzeylerindeki artışın Fpn1'in ekspresyonunu negatif yönde düzenlediği saptanmıştır (Nemeth vd., 2004; Pinnix vd., 2010). Azalmış Fpn1 ekspresyonunun diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak meme kanserli hastalarda kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Nemeth vd., 2004; Pinnix vd., 2010).

Hücrelerdeki demirin, hücre içi indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olarak veya hücre dışı üretilen ve bir sinyal molekülü olan nitrik oksit (NO)'in etkisiyle de serbest bir şekilde salınabileceği saptanmıştır (Hibbs vd., 1998; Lok vd., 2012; Watts vd., 2001). Ayrıca NO'nin demiri doğrudan bağlayarak çeşitli hücre içi proteinleri ve metabolik yolları etkileyebileceği gösterilmiştir (Moncada vd., 1991; Richardson vd., 1995). Bu çalışmalar göstermiştir ki; NO-bağımlı demir salıvermenin, Fpn1'in

aracılık ettiği hücrese demir salıverme mekanizmasının aksine çok-ilaca dirençli protein 1 (MRP1) aracılığıyla gerçekteşmektedir (Lok vd., 2012; Watts vd., 2006).

1.3.3. Demir depolama

Tümör hücrelerinde demir depolanması ile ilgili regülasyonun da değişiklik gösterdiği saptanmıştır (Merlot vd., 2013). Kanser hücrelerindeki ve kanserli dokudaki ferritin ekspresyon seviyeleri ile ilgili veriler çelişkilidir; bazı çalışmalarda ferritin ekspresyonun yukarı regülasyonu (up-regulation) saptanmışken, bazılarında ise ferritin ekspresyonun aşağı regülasyon (down-regulation) gösterdiği bildirilmiştir (Merlot vd., 2013; Pinnix vd., 2010). Artmış serum ferritin düzeyinin primer akciğer kanseri, ileri evre kolorektal kanser ve nöroblastom tanılı hastalarda kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hann vd., 1985).

İnsan kanserlerinde c-myc protoonkogen ekspresyonundaki artışın, hücrese proliferasyon ihtiyacını karşılamak üzere demirin DNA sentezi ve hücre büyümesi için kullanılmasına neden olmasıyla ferritin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Ferritin seviyelerindeki bu değişikliklerin tümör ilerlemesi üzerine etkisinin olabileceği varsayılmış ve demir bağlama ligandlarının manüplasyonu ile kanser tedavisi için kullanılabileceği düşünölmüştür. Bu düşünce ile anti-tümör aktivitesi olan demir şelatörlerinin keşfedilmesi ve geliştirilmesi üzerinde durulmuştur (Merlot vd., 2013).

1.4. Demir Şelatörleri

Desferrioksamin (DFO), *Streptomyces pilosus* bakterisinden izole edilmiş bir hekzadentat yapıda şelatördür (Aouad vd., 2002) (Şekil 1.1 B). Demir şelatörleri tedavi edici olarak ilk defa β -thalassemia hastalığında toksik demir yüklenmesini engellemek için kullanılmıştır (Ceci vd., 2003). Demir şelatlayıcıların kanser tedavisindeki potansiyel etkileri ise ilk defa hücre kültür çalışmalarında DFO ve diğer demir şelatlayıcılarının lösemi hücreleri üzerine olan etkilerinin denenmesi ile gösterildi (Kontoghiorghes vd., 1986). Ardından nöroblastom tümör hücrelerinde yapılan çalışmalar bunu takip etti (Blatt vd., 1988). Buna karşın bazı çalışmalarda, DFO'nun anti-tumor aktivitesi üzerine etkisinin olmadığına dair olumsuz sonuçlar

bildirilmiştir (Blatt, 1994; Selig vd., 1998). Bu durumun muhtemel nedeni olarak, kullanılan demir şelatlayıcıların yarı ömürlerinin kısa ve membran geçirgenliklerinin zayıf olması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Aouad vd., 2002; Richardson vd., 1994). Bu sorunu çözmek üzere daha etkili ve daha az yan etkileri olan sentetik bileşikler üretmek için çalışmalar yapılmıştır (Kalinowski vd., 2005). Bunlardan birisi 4-[3, 5-bis-(hydroxyphenyl)-1, 2, 4-triazol-1-yl]-benzoic acid (deferasirox) isimli moleküldür ve β -thalassemia hastalığında DFO'ya alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (Cappellini vd., 2009).

Deferasirox gibi demir şelatlayıcıların anti-tumor etkilerinin olup olmadığını araştıran çalışmaların sonucunda, deferasiroxun hepatom, miyeloid lösemi, mantle hücre lenfoması, DMS-53 akciğer kanseri ve OE33, OE19, ve OE21 isimli özofageal kanser hücre serilerinde büyümeyi inhibe edici etkisinin olduğu bildirilmiştir (Chantrel-Groussard vd., 2006; Ford vd., 2013; Lui vd., 2013; Ohyashiki vd., 2009). Ayrıca kemoterapiye direnç gösteren bir akut monositik lösemi hastasına deferasirox uygulaması yapıldığında, kuvvetli bir anti- lösemik etki ile hastalığın tamamen iyileştiği gösterilmiştir (Fukushima vd., 2011). Bu çalışmaların sonucunda, demir şelatlayıcıların kemoterapi için kuvvetli bir alternatif olabileceği fakat daha ileri seviyede çalışmalar ile bu etkinin net olarak ortaya konulması gerektiği kanısına varılmıştır.

1.5. Salisiliden asilhidrazid (SA)

Salisiliden asilhidrazidler, gram negatif bakterilerdeki efektör proteinlerin konak hücre içerisine geçmesini engelleyen flagella çıkıntısı şeklindeki (enjektöre benzer) yapı olan Tip 3 salgı sistemini (T3SS; Type three secretion system) inhibe etmek amacıyla üretilmiş sentetik bir moleküldür. Bu sentetiklerin gen düzeyinde regülasyona da sahip oldukları bildirilmiştir. Bir çalışmada, *C. trachomatis* ile enfekte olan HeLa hücrelerine demir tuzları eklenmesinin SA bileşiğinin etkisini tersine çevirdiği ve asilhidrazon parçasının Fe^{2+} iyonlarına seçici bir afinitesinin olduğu gösterilmiştir (Fukushima vd., 2011). Buna karşın demir tuzlarının eklenmesinin, SA bileşiğinin etkisini sadece kısmen tersine çevirdiği veya hiç etkisinin olmadığını da bildiren çalışmalar mevcuttur (Fukushima vd., 2011; Tree vd., 2009). Sonuç olarak, SA bileşiklerinin hücre içi demir şelatlama özelliğine ve

demir regülasyonunda görevli genler üzerinde etkiye sahip oldukları düşünülmektedir.

1.6. Demir şelatörleri tarafından hücresel sinyal yolu modülasyonu

1.6.1. Hücre döngüsü

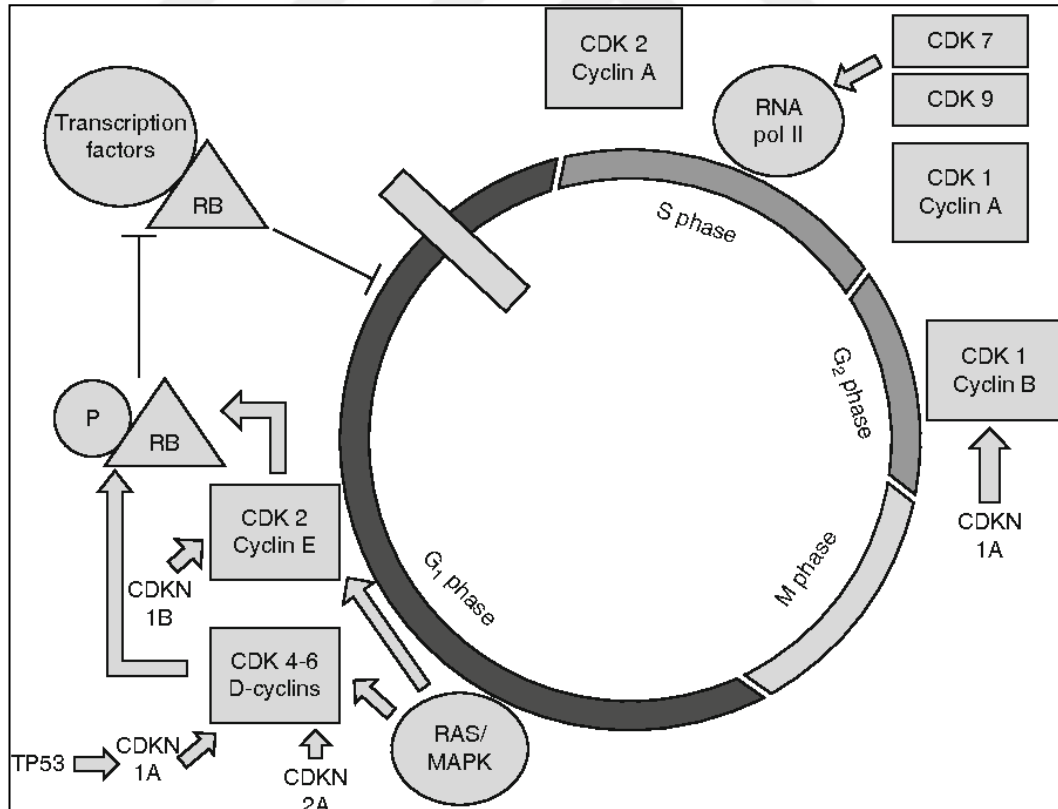
Şelatörler sadece demiri bağlama yetenekleri ile değil, aynı zamanda çoklu hücre içi hedefler üzerindeki karmaşık etkileri nedeni ile de anti-proliferatif etkiye sahiptirler. Demir şelatörlerinin, ribonükleotid redüktaz (RR), siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK; Cycline-dependent kinases), retinoblastom proteini (Rb), p53, p21 WAF1 / CIP1, p27 KIP1, N-myc akış aşağı yönünde düzenlen gen 1 (NDRG1) ve apoptotik proteinler dahil hücre döngüsünün ilerlemesini düzenlemede kritik olan çoklu molekülleri hedef aldığı bildirilmiştir (Gao vd., 2001; Yu vd., 2007).

1.6.2. Ribonükleotid redüktaz

Ribonükleotid redüktaz, DNA replikasyonu için gerekli deoksiribonükleotitlerin sentezini, DNA sentezinin hız sınırlayıcı aşamasını, hücre döngüsünün ilerlemesini ve hücre onarımı katalize eden bir enzimdir (Thelander vd., 1979). İnsan RR'si allosterik modülatörler için aktif bölgeyi ve bağlama bölgesini içeren R1 ve enzimatik aktivite için hayati önem taşıyan monomer başına bir di-nükleer demir merkezi ve stabil tirozil radikalini içeren R2 olmak üzere iki homodimerden oluşur (Jordan vd., 1998). Hücre döngüsünün S / G2 fazı sırasında normal DNA sentezi için gerekli olan R2 alt biriminin haricinde p53-bağımlı bir şekilde DNA hasarını takiben G0 / G1 faz hücrelerinde DNA onarımı için dNTP'leri sağlayan ve p53R2 olarak isimlendirilen bir varyantı da mevcuttur (Jordan vd., 1998; Tanaka vd., 2000). Enzimatik fonksiyonları için önemli olan bir demir bağlama bölgesine sahip olan R2 ve p53R2 alt birimleri demir şelasyonu ile aktivitelerini kaybedebilirler (Nyholm vd., 1993). Malign transformasyon ve kanser hücresi büyümesi için RR aktivitesinde bir artış olduğu bilindiğinden (Tsimberidou vd., 2002), demir şelatörlerinin RR aktivitesini inhibe edebilme yetenekleri nedeni ile kanser hücre proliferasyonunu engelleyebileceği düşünülebilir (Şekil 1.2).

1.6.3. Siklin ve siklin bağımlı kinazlar

Demirin şelatörler aracılığı ile elimine edilmesi ile bir dizi siklin ve CDK'nın ekspresyonunun etkilendiği gösterilmiştir (Gao vd., 2001). SK-N-MC nöroepitelyalom hücrelerinde demir şelasyonu ile siklin D1, D2, D3 ve daha az oranda siklin A, siklin B ekspresyonunun, prostat ve pankreas kanseri hücrelerinde DFO ve DpT şelatçıları ile ve ayrıca DMS-53 akciğer karsinomu ve mantle hücreli lenfoma hücrelerinde deferasirox ile siklin D1 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Gao vd., 2001; Vazana-Barad vd., 2013). Ayrıca, DMS-53 akciğer karsinomu ve mantle hücreli lenfoma hücrelerinde deferasirox ile ortaya çıkan fosforile Rb'nin aşağı regülasyonu sonucunda E2F/Rb kompleksi ve G1/S faz hücre miktarının arttığı saptanmıştır (Vazana-Barad vd., 2013). Sonuçları hücre tipine ve farklı deney koşullarına bağlı olarak değişiklik gösteriyor olsa bile demir şelatörlerinin CDK2 veya CDK4'ün ekspresyonunu azaltabildiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Chaston vd., 2003; Gao vd., 2001; Kulp vd., 1996) (Şekil 1.2).



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

1.6.4. p 53

Bir çalışmada, DFO ile yapılan demir şelasyonunun, G 1 / S kontrol noktasında kritik bir role sahip tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün ekspresyonunu transkripsiyon sonrası seviyede düzenlediği bildirilmiştir (Fukuchi vd., 1995). Bu gen hücre stresi veya DNA hasarı koşullarında aktive olur ve hasar onarımı yapılamıyorsa onarım mekanizmalarını başlatır veya apoptozu indükler (Kastan vd., 1995). Hücrelerin DFO ve 311 gibi şelatörler ile muamele edilmesi sonucunda, nükleer p53 proteinini düzeyinde ve p53 DNA-bağlama aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.2) (Shen vd., 2014).

1.6.5. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, p21 WAF1 / CIP1, G1 / S fazı CDK-siklin komplekslerine bağlanarak hücre döngüsünü negatif olarak düzenleyen ve bunları inaktif hale getiren moleküllerdir (Alberts vd., 2008). Bu durum, Rb'nin E2F1'i bağlamasına izin verir, böylece G1 / S faz geçişini önler ve sonuç olarak hücre döngüsünün durmasına neden olur. Bir çalışmada, MCF-7 meme adenokarsinom hücrelerinde DFO ve 311 kullanılarak yapılan demir şelasyonu ile p21 WAF1 / CIP1 proteininin ekspresyonunun azaldığı, p21 mRNA'yı yukarı düzenlediği gösterilmiştir (Fu vd., 2007).

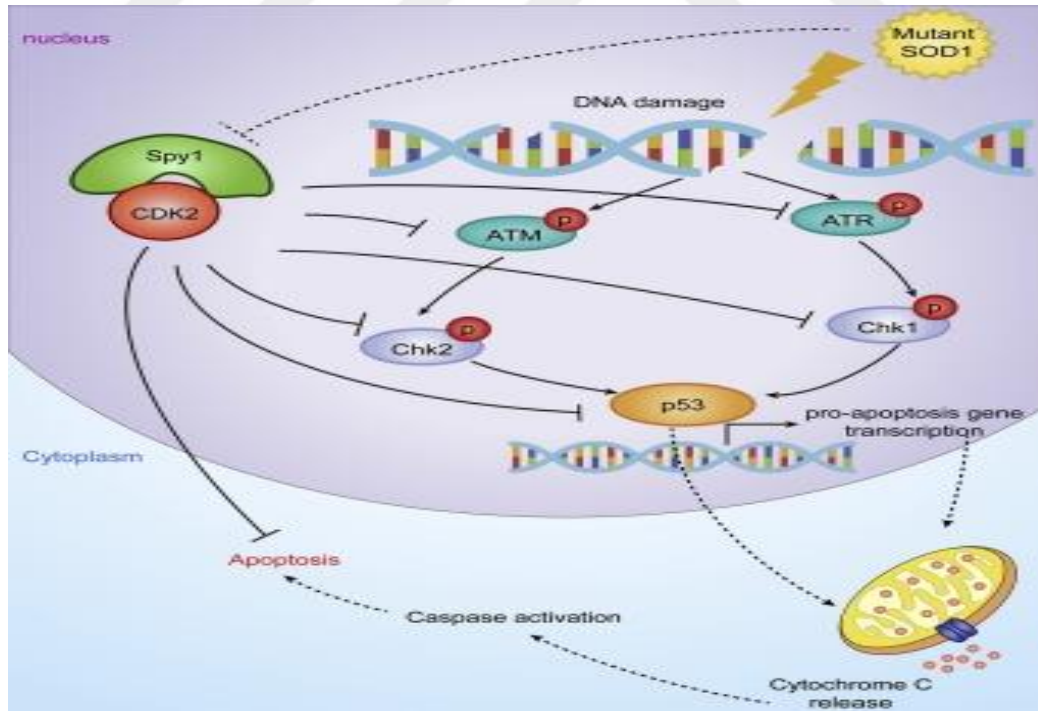
1.6.6. c-myc

Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK; Mitogen-activated protein kinase), büyüme faktörü- β (TGF- β), Wnt ve sinyal transdüseri ve transkripsiyon (STAT) yollarının aktivatörü dahil olmak üzere çoklu sinyal iletim yollarının "kavşağında" bulunan Myc proteinleri, her ne kadar hücre döngüsünün klasik düzenleyicileri olmasa da, hücrelerin hücre döngüsüne girmesini sağlarlar ve hücre döngüsünün ilerlemesini hızlandırırlar (Dang, 2012; Kiuchi vd., 1999; Tansey, 2014). Mitojenik sinyallere güçlü bir hücre döngüsü yanıtı için c-myc proto-onkojen ekspresyonunun indüksiyonu gereklidir (de Alboran vd., 2001). Bu durum, siklin D / CDK4- 6 aktivitesini pozitif yönde düzenleme ve p21 WAF1 / CIP1'in transkripsiyonunu baskılama özelliği sayesinde ortaya çıkar (Gartel vd., 2001; Mateyak vd., 1999). Bir çalışmada, DFO ile yapılan demir şelasyonunun lösemik kan hücrelerinde c-myc

ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Kyriakou vd., 1998). Ayrıca, DFO, Dp44mT ve DpC gibi şelatörlerin, pankreas ve prostat kanseri hücrelerinde c-myc seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (Şekil 1.2) (Lui vd., 2015). Bu ajanların etki mekanizmasının, STAT3 yolunun inhibe edilmesi sonrasında siklin D1, c-myc ve Bcl-2 dahil olmak üzere bir çok hedefin aşağı yöndeki regülasyonu olduğu belirtilmiştir (Lui vd., 2015).

1.6.7. Speedy /RINGO

İlk kez *Xenopus* oositlerinde varlığı gösterilen Speedy/RINGO, bir başka hücre siklus proteinidir ve hücre döngüsü regülatörlerinden oldukça farklıdır. Hücre siklusunun ilerleyişinde CDK2 aktivitesini ve G1-S fazı geçişini kontrol eder (Nebrada, 2006). Bu fonksiyonunu, klasik siklinlerden farklı olarak CDK2' nin fosforlanmasına gerek duymadan yapar ve p27Kip1 gibi inhibitör regülatörler tarafından fosforilasyon aracılığı ile olan inhibisyona karşı da fazla duyarlı değildir (Cheng vd., 2005; Dinarina vd., 2005; McAndrew vd., 2007; Porter vd., 2003).



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

Çalışmalarda, Speedy/RINGO ile CDK2 etkileşiminden oluşan kompleksin, p27Kip1 inhibitörünün CDK2 ile etkileşmesini engellemek suretiyle CDK2 aktivasyonuna ve buna bağlı olarak da p27Kip1 inhibitörünün fosforlanarak degradasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Porter vd., 2002; Porter vd., 2003) (Şekil 1.3). Speedy/RINGO hücre siklusundaki DNA hasar kontrol noktaları dahil olmak üzere birçok kontrol noktasını aşan bir moleküldür ve bu özelliğiyle kanser hücrelerinde aşırı miktarda eksprese olarak onları apoptozdan kaçırıp hücre bölünmesini devam ettirir, yani onkogenik fonksiyonu mevcuttur (Gastwirt vd., 2006; McAndrew vd., 2009).

Bu molekülün ayrıca MAPK ve AKT sinyal yollarının arasında var olan iletişim ve etkileşimleri üzerinde de etkisi olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Matsuo vd., 2001; Molenaar vd., 2009). Bu nedenle anti-kanser tedaviler için oldukça uygun bir moleküler hedef olarak görülen Speedy/RINGO'nun ekspresyonu üzerinde demir homeostazının ve demir şelatlayıcılarının etkisinin incelenmesi önem arz edebilir.

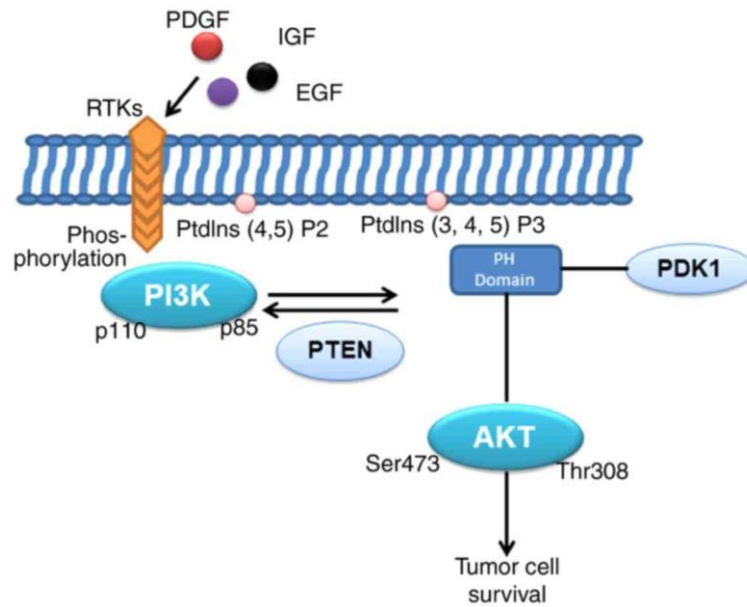
1.6.8. PI3K-PKB / Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) sinyal yolağı

İnsülin reseptör sinyalini karakterize etmek için 1980'lerin başında yapılan çalışmalar sonrasında, fosfoinositol-3-kinaz- protein kinaz B / Akt (PI3K-PKB / Akt) yolunun ve aktive edici reseptör tirozin kinazlarının (RTK) varlığı tespit edilmiştir (Alessi, 2001). Bu çalışmaların sonucunda, insülin reseptör substratı (IRS) proteinleri yoluyla PI3K'ya sinyal ileten bileşenler ve insülin reseptör mekanizması tanımlanmış ve 3-fosfoinositol bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) tarafından PKB / Akt aracılı aktivasyonun varlığı saptanmıştır. Sonraki çalışmalar ile PI3K ve PKB / Akt aktivasyonunun tümör gelişmesi ve ilerlemesindeki önemli etkisinin, PH-domaini lösin-zengin-tekrar-içeren protein fosfatazların (PHLPP1 / 2) ilişkisinin ve ayrıca negatif düzenleyicilerin, protein fosfataz 2'nin (PP2A) ve tensin homologunun (PTEN) keşfedilmesine yol açmıştır. Ek olarak, PKB / Akt'ta C- terminal domainin de hidrofobik motif içerdiğinin bulunması sonrasında, rapamisinin memeli hedefi (mTOR; Mammalian target of rapamycin) kompleksi 2 (mTORC2) ve DNA'ya bağlı protein kinaz (DNA-PK) ile ilişkisi olduğu ve Ras'ın PI3K-PKB / Akt yolunu PI3K üzerinden etki gösterebildiği tespit edilmiş; böylece mevcut PI3K-PKB / Akt sinyal yolağında etkisi olan proteinler tanımlanabilmiştir (Şekil 1.4) (Aksamitiene vd., 2012; Luo vd., 2003).

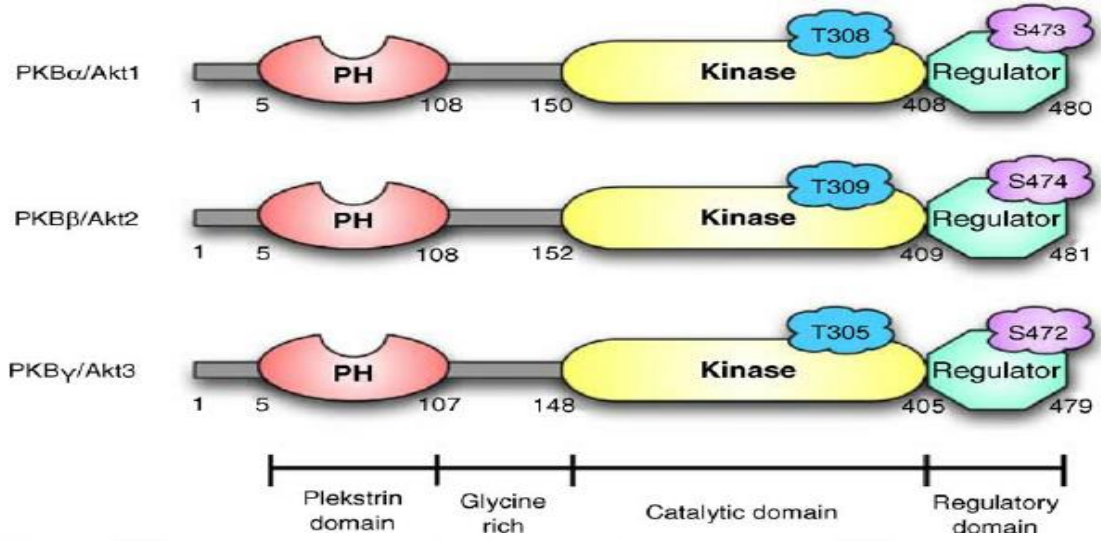
Transkripsiyon, translasyon, büyüme, hayatta kalma ve proliferasyon gibi önemli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan bir protein olan PI3K -Akt sinyal yolu birçok hücresel uyarın tarafından veya toksik insülin tarafından aktive edilir (Aksamitiene vd., 2012; Luo vd., 2003). Bu yolak kontrolsüz şekilde aktive olur ise, kanser, diyabet ve otoimmünite gibi hastalıklar gelişir. Nitekim PI3KAkt sinyalleşmesinin kontrolsüz şekilde bozulması, insanlarda kanser gelişimi ve ilerlemesi, hücre çoğalması ve hayatta kalma (apoptozdan kaçış) arasındaki dengeyi bozan ve oldukça sık görülen bir durumdur.

1.6.8. PI3K ve aktivasyon mekanizması

İlgili sinyaller ile PI3K fosforilasyonu uyarıldığında, plazma membran lipidlerinden olan fosfatidilinositol-4,5 bisfosfonat (PI (4, 5) P2)'nin inositol halkasının 3' pozisyonu fosforile olur ve hayatta kalma sinyali için gereken güçlü bir ikinci haberci olan PI (3, 4, 5) P3'e saniyeler içinde dönüşür. Fosfatidilinositol 3 kinazlar, katalitik bir alt birim (P110) ile protein tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler (Gn reseptör Tirozin Kinaz, RTK) ve G- couple protein reseptörü (GPCR) tarafından aktive edilen bir adaptör / düzenleyici alt birimden (P85) oluşan heterodimerlerdir.



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



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

Plekstrin homoloji (PH) ve FYVE (Fenilalanin-Tirozin-Valin-Glutamik asit) alanlarından oluşan PI (3,4,5) P3 domainleri etkileşince, PI3K aktif hale gelerek hücre membranına bağlanır. Birçok proteinde bulunan PH alanları, yaklaşık 100 amino asitten oluşan bir globüler protein alanlarıdır. Nitekim PH alanlarını içeren proteinler, PI3K kaynaklı sinyal için kritik mediatörler olarak kabul edilir. Ayrıca Akt'deki PH alanının serin / treonin kinaz 3-fosfoinositol bağımlı kinaz 1 (PDK1) ile etkileşimi sonrasında Thr308'i fosforilize olur ve Akt yarı aktif hale gelir. Sonrasında yarı aktif hale gelen Akt'nin C-terminal domaininde bulunan ser473 bölgesi, PDK2 ile fosforlanındığında Akt proteini tam anlamıyla aktif hale gelmiş olur. Aktif hale gelmiş olan Akt proteini hücre proliferasyonu ve hücrenin hayatsal faaliyetlerinde görev alan diğer hücre içi kaskat sistemlerinin aktifleşmesi için önemli bir proteindir ve sadece hücrel homeostazı sağlamakla kalmaz aynı zamanda apoptozu baskılayan sinyallerin oluşumuna da neden olabilir (Aksamitiene vd., 2012; Luo vd., 2003).

Farelerdeki bir lösemide ilk defa v-Akt ismi ile tanımlanan bir viral onkoproteininin hücrel homoloğu olması nedeni ile c- Akt olarak da isimlendirilen Akt proteini 57 Kd'dur. Ayrıca v-Akt ve c-Akt'ın protein kinaz C'ye (PKC) ve protein kinaz A (PKA)'ya benzer bir protein kodladığı saptandığı için PKB (Protein kinaz B) ya da RAC (protein kinaz A veya C ile ilişkili) olarak da adlandırılır. cAMP'ye bağımlı,

cGMP'ye bağımlı ve protein kinaz C familyası (AGC) üyesi olan serin / treonin protein kinaz yapısındaki bir sitoplazmik protein kinaz kabul edilen AKT kinazın domaininin kristal yapısı ilk defa 2002 yılında tanımlanmıştır. Memelilerde cDNA keşfi ile sonuçlanan genom çalışmaları esnasında, Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β), Akt3 (PKB γ) izoformlarını kodyalan 3 genin varlığının saptanması ile Akt/PKB de keşfedilmiştir. Akt2'nin Akt1 ile %82 ve Akt3'ün Akt1 ile %83 yüksek sekans homolojisine sahip olduğu ve aynı zamanda, bir N-terminali plekstrin homoloji (PH) domaini, merkezi bir kinaz domaini içeren benzer alan yapısı gösterdikleri ve bir C-terminal düzenleyici hidrofobik motiflerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.5). Tanımlanan bu üç insan AKT izoformu, sırasıyla 14q32 (AKT1), 19q13 (AKT2) ve 1q44'te (AKT3) bulunan ayrı genlerle kodlanır (Luo vd., 2003).

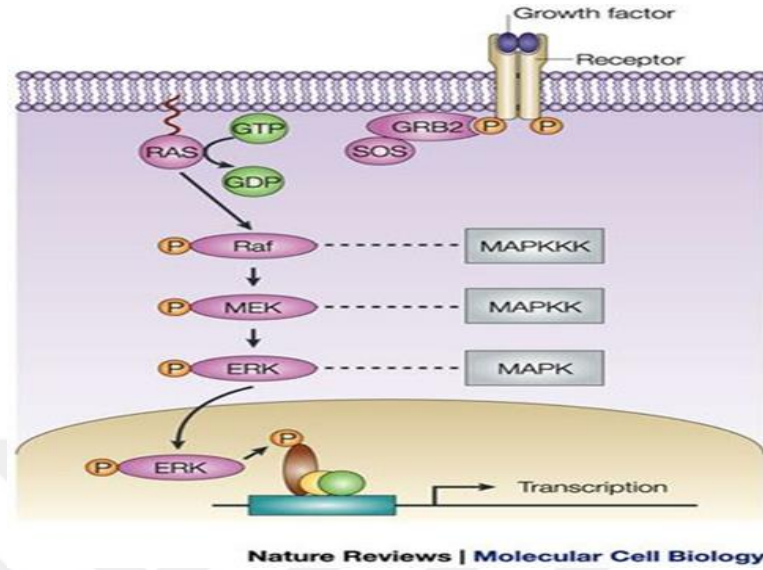
Bir çalışmada, demir şelatörlerinin prostat kanserinde PI3K / AKT / PTEN yolunu hedefleyerek anti-tümör aktivitesi gösterdikleri bildirilmiştir (Dixon vd., 2013). Bu çalışmada, prostat epitel hücrelerinin ve DU145 prostat kanseri hücre hattının DFO veya Dp44mT ile inkübe edilmesi aonrasında, tümör baskılayıcı gen olan PTEN ve anti-metastatik bir gen olan NDRG1 ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Buna ek olarak NDRG1'in aşırı ekspresyonu sonucunda onkojenik olan p-AKT aktivitesinin azaldığı ve PTEN düzeylerinin ise anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca NDRG1 aracılı p-AKT inhibisyonunun PC3 hücrelerinde PTEN inhibisyonu ile birlikte gösterilmiş olması, NDRG1 aracılı etkinin PTEN'den bağımsız olduğunu düşündürülebilir (Dixon vd., 2013; Liu vd., 2012). MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışma göstermiştir ki; NDRG1 aşırı ekspresyonunun bir sonucu olarak PTEN düzeyleri artabilirken, p-AKT ve p-mTOR seviyeleri düşebilir (Kovacevic vd., 2013). Ayrıca, NDRG1 aşırı ekspresyonu ile PI3K p110 α / β katalitik alt ünitesinin birleşmesini önleyen fosfo-p85a ve fosfo-p55 γ gibi PI3K düzenleyici alt birimlerin ifadesinin önemli ölçüde azaldığı da bildirilmiştir. Şelatörlerden Dp44mT ve DpC gibi NDRG1'i belirgin bir şekilde düzenleyen tiyosemikarbazonlar, MIAPaCa-2 ve diğer pankreas kanseri hücre hatlarında bu kritik moleküllerin modülasyonu yoluyla anti-tümör aktivitesi göstermişlerdir (Kovacevic vd., 2013).

1.6.9. Ras / Raf / MEK / ERK İlişkisi

Memeli hücrelerinde dört ana MAPK protein kinaz kaskadı tanımlanmıştır: i. Ras / Raf / MEK / ERK yolu (tipik olarak büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından aktive edilir), ii. c-Jun N -terminal kinaz (JNK) (çevresel stres ile aktive edilir), iii. p38 yolu, iv. ERK5 yolu (Roberts vd., 2007). Bu yollardan Ras / Raf / MEK / ERK kaskadının hücrelerin çoğalması, hayatta kalması, farklılaşması, göç edebilmesi ve anjiyogenezi başlatıp sürdürebilmesi gibi bir dizi önemli hücresel işlemi düzenlediği bilinmektedir (Chang vd., 2003). Keşfedilen ilk RTK olan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR; ErbB1 veya HER1 olarak da bilinir) gibi RTK'lara ilgili ligandların bağlanması sonrası hücre yüzeyinde reseptör-ligand etkileşimi aktifleşir (Gschwind vd.,2004). Bu reseptör ailesinin ErbB2 / HER2, ErbB3 / HER3 ve ErbB4 / HER4 olmak üzere diğer üç üyesi daha sonra tanımlanmıştır. Bir büyüme faktörünün reseptörüne bağlanması sonrasında, reseptörün iki monomerinin dimerizasyonunu kolaylaştıran hücre dışı bir konformasyonel değişiklik ortaya çıkar (Schlessinger vd., 2002). Bu değişiklik, büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2'nin (GRB2) Src homolojisi 2 (SH2) alanı için yüksek afinite gösteren bir sitoplazmik tirozin kinaz rezidüe bölgesinin çapraz fosforilasyonu ile sonuçlanır. Daha sonra, GRB2'nin iki Src homolojisi 3 (SH3) alanı SOS (son of sevenless) ile etkileşime girer ve bu etkileşim GDP'nin GTP ile değişimi sonrasında hücre içi transdüser görevi olan Ras'ın aktivasyonunu kolaylaştırır (Şekil 1.6).

Neoplastik dönüşümde rol oynayan ilk tanımlanmış onkogen olan Ras, büyüme faktörü sinyallerini, hücre içindeki çok önemli faktörlerle birleştirip, nükleusa iletilmesini sağlayarak hücre büyümesini düzenlemede anahtar bir oyuncu olarak kabul edilir (Avruch vd., 2007; Harada vd., 2004). Aktif RAS (RAS-GTP) daha sonra Raf fosforilasyonu aracılığı ile ana efektörlerinden biri olan mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz kinazını (MAPKKK veya MEKK) aktive eder ki bu durum daha sonra mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK'ler) fosforilasyonuna neden olur. Aktive edilmiş MAPK'lar, hücre büyümesine ve çoğalmasına yol açan c-myc, Elk1, ve CREB gibi birçok transkripsiyon faktörünün fosforilasyon ile aktif hale geçmesini sağlamak ve düzenlemek üzere çekirdeğe girebilir. Ayrıca Ras / Raf / MEK / ERK yolunun pro-apoptotik Bim ve BAD'yi fosforilasyonla etkisiz hale getirerek apoptozu inhibe edebildiği, böylece Bcl-2 ve Bcl-xL'nin anti-apoptotik rollerini teşvik ettiği bildirilmiştir (Ley vd., 2003; Zha vd., 1996). Bunların yanı sıra,

ERK, matriks metalloproteinaz 2/9 ve miyosin hafif zincir kinazın aktivitesini artırmak suretiyle hücre hareketliliğinin ve metastazın indüklenmesinde önemli rol oynar.



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

Karsinomların %50' sinden fazlasında EGFR'nin aşırı eksprese edildiği, özellikle meme kanserli hastaların %30' unda ErbB2 aşırı ekspresyonunun olduğu bildirilmiştir (Downward, 2003). Pankreas kanserlerinin %90'ından fazlasında Ras'ta mutasyon saptanırken, kolorektal kanser, akciğer kanserleri, karaciğer kanseri, melanomlar ve tiroid malignitelerinde de daha düşük oranlarda da olsa Ras mutasyonu ovarlığı gösterilmiştir (Dhillon vd., 2007). Bu onkogenlerin tanımlanması, EGFR-Ras-MAPK yolunda yer alan bu kritik moleküllere yönelik geliştirilen hedefleyici ajanların klinik uygulamalara yansımaları sağlamıştır (Roberts vd., 2007). Hedefe yönelik tedavilerin klinik başarısının en fazla gözlemlendiği kanserlerin, öncelikle EGFR, ErbB2, BCR-ABL ve KIT gibi yollara dahil olan tirozin kinazların kullanıldığı kanserler olduğu söylenebilir (Hudis, 2007; Izar vd., 2013).

Bir çalışmada, DFO ve Dp44Mt gibi demir şelaötrlerinin, PC-3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde ERK1 / 2 fosforilasyonunu azaltarak Ras / Raf / MEK / ERK kademesini düzenleyebildiğini gösterilmiştir (Dixon vd., 2013). Bu nedenle, bir dizi mitojenik uyarıcı tarafından aktive edilen ERK'nın, çoklu mitojenik sinyal yolları

için kritik bir rolünün olduğu göz önüne alındığında, demir şelatörlerinin ERK yolağının aktivasyonunu inhibe ederek anti-kanser etki gösterebileceği düşünülebilir.

1.7. Çalışmanın amacı

Bu tez konusunun amacı, bakterilerde demirin şelatlanması sonrasında replikasyonu durdurma özelliklerine dayanarak farklı salisiliden asilhidrazid bileşiklerinin (ME0055 ve ME0053), kanserli SH-SY5Y hücre hattında proliferasyon üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde incelenmesidir.

Bu amaçla yapılacak deneyde başlangıç olarak kültür ortamında her uygulama ve kontrol grubu için 10×10^4 kanserli SH-SY5Y hücreleri üretildikten sonra belli dozlarda sitotoksikite dozunun belirlenmesi için dilue edilen ME0055 ve ME0053 ile 24 saat inkübasyona bırakılan bu hücrelere MTT testi uygulanarak uygun doz belirlenecektir. Bir sonraki aşamada, hücre siklus düzenleyicisi olan Speedy/RINGO seviyesine bakılarak elde edilen sonuca göre çalışmanın akışı iki yönlü olarak değerlendirilecektir: i. Eğer Speedy/RINGO seviyesinde beklenen düşüş saptanırsa, bu duruma bağlı olarak siklin A-CDK2 kompleksinde ortaya çıkacak bir düşüşün p-Akt yolağını etkileyeceği bilgisi ile fosforlanma miktarındaki değişim incelenecektir. ii. Eğer Speedy/RINGO seviyesinde beklenen düşüş gözlenmez ise, bu durumda Akt sinyal yolağında demir şelatörlerin PI3K üzerinden de inhibisyona neden olabileceği bilgisi göz önüne alınarak inceleme yapılacaktır.

Diğer bir aşamada ise, kanserleşmede ve metaztazda önemli bir rolü olan MAPK yolağının demir şelatörleriyle olan etkileşimi incelenecektir ve hücrelerdeki kaspaz-3 aktivitesine bakılarak apoptozun gerçekleşip gerçekleşmediği gözlemlenecektir.

Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar ile bakterilerde virulanslığı kontrol etmek için kullanıldığı bilinen ancak ilk kez SH-SY5Y hücre hattı üzerinde uygulanacak olan ME0055 ve ME0053 kimyasallarının Speedy/RINGO, Akt ve MAPK sinyal yolları üzerindeki etkileri belirlenmiş olacaktır.

Bu çalışma, karsinogenezi başlatan ve aynı zamanda kötü prognozu ve tedaviye direnci gösterdiği kabul edilen MAPK ve AKT sinyal yolundaki anormal davranışların demir metabolizması ile olan ilişkisinin belirlenmesini sağlayabileceği

gibi kanser tedavisinde demir şelatlayıcı salisiliden asilhidrazid temelli ilaçların etkinliği ile ilgili ileriki çalışmalara da bir kaynak olabilecektir.



2. MALZEMELER VE YÖNTEMLER

2.1. Malzemeler

2.1.1. Ekipmanlar

Bu çalışma için kullanılan tüm ekipmanların listesi Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ekipmanlar

Ekipman	Tedarikçi Firma
Biyogüvenlik kabini	Thermo Scientific
Buz makinesi	Brema/GB903A-Q
CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific
Çalkalayıcı	Wisd Laboratory Instruments
Distile su cihazı	Nüve ND8
Elektroforez jel sistemi (SDS-PAGE)	BIO-RAD Mini Ptotean
Falcon tüp (15mL, 50mL)	Biologix
Güç Kaynağı	Thermo Fisher
Hassas Terazi	Denver Instrument
Hemositometre	ISOLAB
Hücre kazıyıcı	Biologix
Hücre kültür flaskları	Corning
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Denver Instrument
Inverted mikroskop	Leica DMI3000 B
Mikropipet	Thermo Fisher
Mikroplate okuyucu sistem	Molecular Devices, SpectraMax i3
Nitroselüloz membran	Santra Cruz
Otoklav	Nüve OT40L
Otomatik pipetör	Thermo Fisher
Pasteur pipet	ISOLAB
pH metre	Hanna Instruments (HI241 pH/ORP)
Santrifüj	Nüve NF400
Serolojik pipet	Thermo Fisher
Soğutmalı santrifüj	Nüve NF800R
Su banyosu	Wisd Laboratory Instruments
Trans-blot turbo transfer pack	BIO-RAD
Western Blotlama Cihazı	BIO-RAD Trans-blot Turbo
Western görüntüleme sistemi	BIO-RAD ChemiDoc XRS+
Vorteks	BioCote

Çizelge 2.1. (devamı)

Ekipman	Tedarikçi Firma
Qubit 3.0 fluorometer	Invitrogen
+4 soğutucu	Arçelik
-20 soğutucu	Arçelik
-80 soğutucu	New Brunswick Scientific
96 well plate	Thermo Fisher

Kimyasallar ve enzimler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve enzimlerin tamamı Çizelgesi 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kimyasallar ve Enzimler

Kimyasal/Enzim	Tedarikçi Firma
Absolute ethanol	Sigma- Aldrich
Akrilamid/bisakrilamid, %30	Santa Cruz
Anti-Caspase-3 antibody (E87)	Santa Cruz
APS	Santa Cruz
B-merkaptoetanol	Sigma- Aldrich
Bromofenol blue	Novex
Calnexin mouse monoklonal antikor (TO-5)	Santa Cruz
DMEM, high glucose	Sigma- Aldrich
DMSO	Sigma- Aldrich
FBS	Sigma- Aldrich
GapDH mouse monoklonal antikor (0411)	Santa Cruz
Gliserol	Santa Cruz
Glisin	Santa Cruz
HCl	MERCK
L-glutamine	Sigma- Aldrich
m-IgG _K BP-HRP anti-mouse sekonder antikor	Santa Cruz
ME0055	
ME0053	
MEK1/2 mouse monoklonal antikor (9G3)	Santa Cruz
Methanol	Sigma- Aldrich
Mouse anti-rabbit IgG/HRP sekonder antikor	Bioss Antibodies
n-bütanol	MERCK
NaCl	EMSURE
p-Akt1/2/3 mouse monoklonal antikor (C-11)	Santa Cruz
p-Akt1/2/3 mouse monoklonal antikor (B-5)	Santa Cruz
PBS	Sigma- Aldrich
Pen/Strep	Sigma- Aldrich
SDS	Santa Cruz
SeeBlue Plus2 Pre-stained protein standart	Invitrogen

Çizelge 2.2. (devamı)

Kimyasal/Enzim	Tedarikçi Firma
SPDYA poliklonal antikor	Thermo Fisher
TEMED	Santa Cruz
Trypsin, %2,5	Sigma- Aldrich
Tris base	Santa Cruz
Trypan blue	Sigma- Aldrich
Tween-20	Sigma- Aldrich

2.1.2. Ticari kitler

Bu çalışmada kullanılan ticari kitler Çizelge 2.3'te listelenmiştir.

Çizelge 2.3. Ticari Kitler

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

2.1.3. Tamponlar ve solüsyonlar

2.1.3.1. 1X yükleme Boyası (SDS-PAGE için)

1X yükleme boyasının kullanılmasının amacı; SDS-PAGE uygulamasından önce izolasyonu yapılan protein örneklerinin denatürasyonu içindir. 1X yükleme boyası; 340 µL dH₂O, 400 µL %10 SDS, 120 µL %100 gliserol, 100 µL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) ve 40 µL %0,5 bromofenol blue karışımından oluşmakta idi. Son olarak örnekler SDS-PAGE'e yüklenmeden önce 54 µL β-merkaptoetanol bu solüsyona eklendi.

2.1.3.2. SDS-PAGE için stacking buffer pH 6,8 0,5 M

SDS-PAGE için stacking buffer pH 6,8 0,5 solüsyonu; 100 mL dH₂O içerisinde 7,88 g Tris-Cl çözdürüldükten sonra son pH'ı 6,8 olacak şekilde hazırlanan 0,5 M stacking buffer şeklinde hazırlandı.

2.1.3.3. *SDS-PAGE için separatin buffer pH 8,8 1,5M*

1,5 M separating buffer solüsyonu 100 mL dH₂O içerisinde 23.64 g Tris-Cl'ün çözülmesiyle ve son pH'ı 8,8 olacak şekilde hazırlandı.

2.1.3.4. *SDS running buffer*

Çalışmada, 1L dH₂O içerisinde 30 g tris ve 144 g glisin'in çözündürülmesiyle pH'ı 8,3 olacak şekilde 10X stok solüsyonu halinde hazırlandı. 10X SDS running buffer 10 kez seyreltilmek suretiyle 1X çalışma solüsyonu oluşturuldu.

2.1.3.5. *Tris buffered saline (TBS)*

Çalışmada, 1 L dH₂O içerisinde 23,23 g tris ve 87,66g NaCl'ü çözündürülmesiyle pH'ı 7,6 olacak şekilde 10X stok solüsyonu halinde hazırlandı. 10X SDS running buffer 10 kez seyreltilmek suretiyle 1X çalışma solüsyonu oluşturuldu.

2.1.3.6. *Tris buffered saline-tween20 (TBST)*

Tüm western blotlama aşamasında yıkama tamponu olarak kullanılan Tris buffered saline-tween20 solüsyonu 1 L dH₂O içerisinde 100 mL 10X TBS ve 1 mL tween-20'nin eklenerek oluşturuldu.

2.1.3.7. *Towbin buffer*

Western blotlama aşamasında transfer tamponu olarak kullanılan Towbin buffer içeriği; 1 L dH₂O içerisinde 30,25g tris ve 144 g glisin'in çözündürülmesi ile pH'ı 8,3 olacak şekilde 10X stok solüsyonu şeklinde idi. 10X towbin bufferı 200 mL metanol ve 700 mL dH₂O ile karıştırılarak 1X çalışma solüsyonu elde edilmiş oldu.

2.1.3.8. *Western Blotlama'da bloklama solüsyonu*

Western blotlamada kullanılan 100 mL bloklama solüsyonu 5 g (%5) blocker, total hacmi 100 mL olacak şekilde 1X TBS içerisinde çözündürülerek elde edildi.

2.1.3.9. *Primer ve sekonder antikorların hazırlanması*

Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar 1:1000 konsantrasyonda 5 mL primer/sekonder antikor solüsyonu, 5 µL antikor ve 4995 µL bloklama solüsyonu içerecek şekilde hazırlandı.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Kanserli SH-SY5Y hücre hattının büyütülmesi

Kanserli SH-SY5Y hücre hattı %20 FBS, %1 Pen/strep ve 2 Mm 1 cc L-Glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içinde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler her 48 saatte bir inverted mikroskopta incelendi, kültür mediumları değiştirildi ve belirli bir konfluent yapıya ulaşıldığında hücrelerin logaritmik fazda kalmaları açısından hücre pasajlama işlemine geçildi, büyüme hızları kontrollü bir şekilde takip edildi. Pasajlama işleminde flask içerisindeki kültür mediumları çekildi, ardından 3 ml PBS ile yıkama yapıldı, daha sonra flaskta hücrelerin bulunduğu yüzeyi kaplayacak miktarda %2,5 yani 2 ml tripsin konularak hücrelerin yüzeyden ayrılması için 2-3 dakika inkübatörde bekletildi. Süreç sonunda flask yüzeyinden kalkan hücreleri alabilmek ve tripsini inhibe edebilmek için 3ml taze medium konuldu. Flaskta bulunan medium içeriği 15 ml'lik falcon tüplere alındı ve 200g (rcf)'te 10 dakika sanrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatant kısmı döküldü, pellet kısmı 5ml taze DMEM içerisinde çözdürüldü. Flasklara eşit hücre dağıtılabilmesi amacıyla Thoma lamı kullanılarak hücre sayıları belirlendi ve flasklara hücrelerin ekimi gerçekleştirildi.

Kontrol, ME0055 ve ME0053 grupları için 25 ml'lik 3 ayrı flask içerisinde her birinde %98'i canlı olmak üzere en az 10×10^5 hücre olacak şekilde deneylere başlandı.

2.2.2. Salisiliden asilhidrazid grubu sentetiklerin hazırlanması

Deneyin bu aşaması için ME0055 ve ME0053 kimyasalları temin edildi (Jai J Tree, UNSW Sdney). ME0055 (Ma=301,07 g/mol) 16,9 mg kimyasalı 5 ml içinde, ME0053 (Ma=379,09 g/mol) 16,1 mg kimyasalı ise 4 ml Dimetil Sülfoksit (DMSO)

içerisinde çözülerek 10 mM stok ME0055 ve ME0053 oluşturuldu. ME0055 ve ME0053 kimyasallarına ait uygulama dozlarının belirlenmesi amacı ile 10 mM stoklardan DMEM ile seyreltme işlemi yapıldı ve kimyasalların son konsantrasyonları 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM olacak şekilde hazırlığı tamamlandı.

2.2.3. Kimyasal dozlarının belirlenmesi (IC50)

Hücre proliferasyon testi olarak sitotoksik etkilerin belirlenmesinde kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntem olan MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide] kullanıldı. Bu yöntem, mitokondriyel aktiviteye sahip olan hücrelerin belirlenmesinde kullanılan NADH'a bağımlı oksiredüktaz enziminin formazan tuzlarıyla etkileşime girmesiyle renk değişimini içeren bir yöntemdir. Bu araştırmada 96 kuyucuklu plat'lere 10×10^3 kanserli SH-SY5Y hücre hattı ekimi yapıldı. Önceden ME0055 ve ME00192 için belirlenen kimyasal konsantrasyonları olarak 50µM, 100µM, 150µM ve 200µM uygulandı ve uygulama yapılmayan hücreler kontrol grubunu oluşturdu. Sonraki aşamada tüm hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. Ardından 20 µl MTS reaktifi [MTS Cell Proliferation Assay Kit (Abcam)] eklendi ve 3,5 saat süre ile, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde tutulduktan sonra bir BioTec plaka okuyucuda 490 nm'lik uyarma ve emisyon dalga boyu kullanılarak ölçümler yapıldı.

2.2.4. Protein izolasyonu

Kontrol grupları ve kimyasal uygulama yapılan kanserli SH-SY5Y hücreler toplanıp, iki kez 2 ml PBS ile yıkandı. Bunu takiben 10 dakika 4° C'de 200xg'de santrifüj edildi ve pellet 2 kez 2 ml buz gibi 1X PBS ile durulandı. Pellet nazikçe 1x Whole Cell Extraction Kiti (Millipore) (yaklaşık 100 ul) ile homojenize edildikten sonra 25 saniye aralıklar ile 3 kez 5'er saniye sonikasyon uygulandı. Sonikasyonu yapılmış ependoftaki örnekler 15 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldıktan sonra 20 dakika 4° C'de 8000xg'de santrifüj işlemi yapıldı ve santrifüj sonrası supernatant kısım alınarak total protein izolasyonu elde edildi. Deneyin sonraki aşaması için elde edilen protein örnekleri eşit hacimde alıquotlandı ve -80 °Cye kaldırılarak stoklandı.

2.2.5. Qubit protein miktar analizi

Her deneysel durum için elde edilen total proteinlerin miktar tayininde Invitrogen Qubit Protein Test Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Toplam hacmi 200 µl olan üç farklı konsantrasyondaki BSA içeren Qubit ajanı 1:200 Qubit buffer (Qubit ajanını 200 kez seyreltilmiş) olacak şekilde dilue edildi. Çizelge 2.4.'de de gösterildiği gibi 10 ul örneklerden alınan ve 190 ul Working Solution ile muamele edilen tüpler 2-3 saniye vortekslendi. Ardından karanlık ortamda, oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildikten sonra Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogend™) cihazı kullanılarak tüpler okutuldu ve örneklerdeki protein miktarı tayin edildi. Her numune üç kopya halinde ölçüldü.

Çizelge 2.4. Qubit protein miktar tayini

	Standart/Örnek	Çalışma Solüsyonu
Standart 1 (0 ng/µl)	10µl	190 µl
Standart 2 (200 ng/µl)	10µl	190 µl
Standart 3 (400 ng/µl)	10 µl	190 µl
Kontrol SH-SY5Y	10 µl	190 µl
ME0055 ile muamele edilen SH-SY5Y	10 µl	190 µl
ME0053 ile muamele edilen SH-SY5Y	10 µl	190 µl

2.2.6. Western blotlama

Çizelge 2.5'de belirtilen miktarda protein içeren ependorflara NEBx3 redükleyici mavi yükleme tamponu eklenildikten sonra 95° C'de 5 dakika kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlandı ve jeldeki kuyulara eşit konsantrasyonda (100 µg/kuyu) protein örnekleri yüklenmesi için hazır duruma getirildi.

İlk kuyucuğa 15 ul protein markerı yüklendikten sonra sırasıyla kontrol SH-SY5Y, ME0055 ve ME0053 kimyasalları ile muamele edilmiş olan protein örnekleri kuyucuklara yüklendi. Stacking bölgesinden ayrılınca kadar jel 100V akımda Separating bölgesinde ise 130V akımda 1,5 saat yürütülerek proteinlerin ayrımı sağlandı. Jel nitrocelulaz membrana aktarıldıktan sonra soğuk 1X towbin bufferin içerisine konuldu.

Jeldeki proteinler Bio-Rad protein blotting guide bulletin 2895 (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak sandwich haline getirildi. Sonrasında jel 25V, 2,5A'de 15dk'lık tranfer süreci sonunda proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı sağlandı.

Çizelge 2.5. SDS-PAGE için yüklenecek protein örnekleri

	Protein Miktarı	1x NEBX3
Kontrol SH-SY5Y	6 µl	19µl
ME0055 ile muamele idelen SH-SY5Y	9µl	14µl
ME0053 ile muamele idelen SH-SY5Y	10µl	15µl

Transfer edildikten sonra zarlar, oda sıcaklığında 1 saat süreyle %5 yağsız süt tozunun PBS solüsyonunda blokladı.

2.2.7. Antikor Uygulaması ve Kemilüminesans Tayini

Gece boyunca 4° C'de hafifçe çalkalanan membranlar primer antikorları içinde inkübe edilmiş oldu. Her biri için ayrı uygulama yapılacak olan 5 membran House-keeping gen ürünü primer antikor olarak kullanıldı. Calnexin grubu için Calnexin (TO-5): sc-80645 fare monoklonal Ab (Santa Cruz) (1:1000 seyreltme) primer antikoru ve GapDH için ise GAPDH (0411): sc-47724 fare monoklonal Ab (Santa Cruz) (1:500 seyreltme) primer antikoru içeren bir karışım içerisinde inkübasyon gerçekleştirildi.

Speedy/RINGO için spdy A tavşan poliklonal Ab (Invitrogen PA1-16959) (1:500 seyreltme) uygulaması yapılırken, p-ERK için MEK-1/2 Antibody 9G3 fare monoklonal Ab (Santa Cruz sc-81504) (1:1000 seyreltme) kullanıldı. Aktif kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi için Anti-Caspase-3 antibody [E87]: ab32351 (1:500 seyreltme) uygulandı. p-AKT'nin ekspresyon düzeyinin tayini için ise ser473 ve thr308'e bakıldı. Ser473 için kullanılır primer antikor p-Akt1/2/3 Antibody (C-11): sc-514032 fare monoklonal Ab (Santa Cruz) (1:1000 seyreltme) iken, thr308 için p-Akt1/2/3 (B-5): sc-271966 fare monoklonal Ab (Santa Cruz) (1:1000 seyreltme) uygulamaları yapılarak inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında bu membranlar beş kez 5 dakika süreyle %3 BSA içeren TBST (TBST;500Mm NaCl, 20Mm Tris-Cl, pH 7,5, %0,05 (w/v) Tween 20) ile yıkandı. Sekonder antikor uygulaması için

hazır olan membranlar; primer antikorlarına göre Mouse Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), HRP Conjugated: bs-0295M-HRP (Bioss) ve m-IgGκ BP-HRP: sc-516102 (Santa Cruz) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat süre ile inkübe edildi. Ardından oda sıcaklığında bulunan TBST içinde 3-5 kez 5 dakikalık yıkama sonrasında görüntü elde etmek için 5 dakika boyunca Clarity Western ECL substract kemilüminesan algılama reaktifinde (Bio-Rac) inkübe edildi ve sonra Chemichazda mebranlardaki bantların görüntüsü elde edildi.

2.2.8. İstatiksel ve Piksel Analizi

İstatistiksel analiz için Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi (SPSS)- İstatistiksel Analiz Programı kullanılmıştır. Bütün sonuçlar en az üç ayrı deneyi temsil edecek şekilde elde edilmiştir ve verilerin ortalaması $SD \pm$ olarak ifade edilmiştir. Analizde t-test'i kullanılarak istatistiksel anlamlılık aranmıştır. Western sonuçlarından elde edilen görüntülerle Piksel Analizine gidilmiştir. Piksel analizinde, İmage lab soft-ware kullanılarak bantlar ve bunların yoğunlukları tespit edilmiştir. Ek olarak Photoshop CS6 programı kullanılarak histograma bağlı olarak oluşturulan kontrast değerleriyle göreceli yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Kontrole bağlı normalleştirme yapılırken kontrol grupları 1'e normalleştirilmiştir ve daha sonra deney gruplarının nispi protein ekspresyonu değişiklikleri hesaplanmıştır.

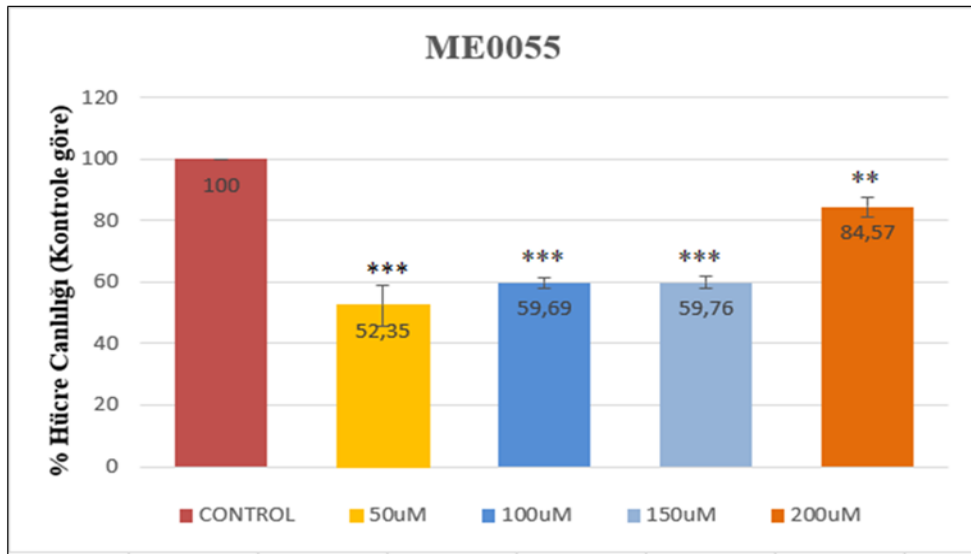
3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. Bulgular

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

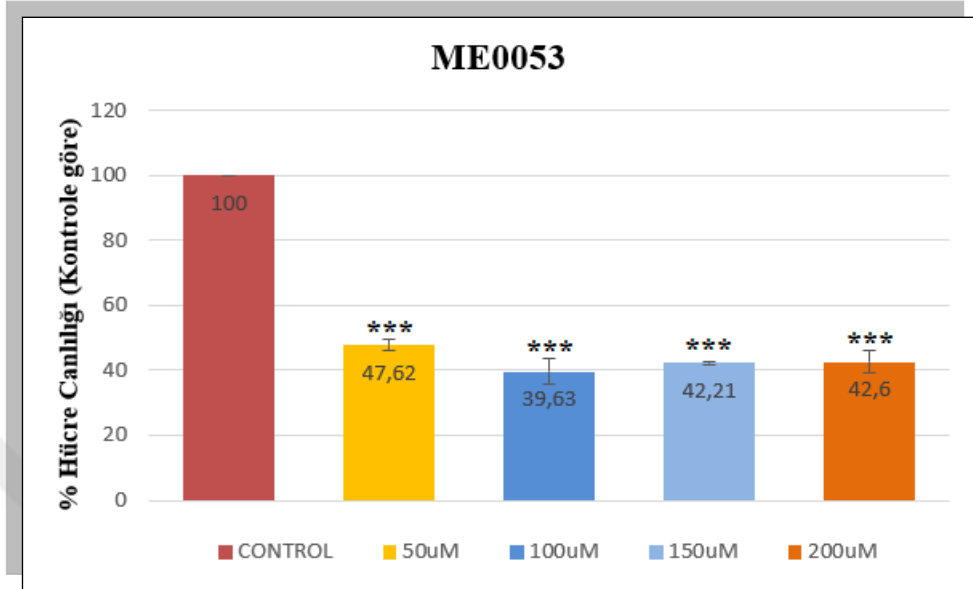
Salisiliden asilhidrazid grubu kimyasallarından olan ME0055 ve ME0053'nin 50µM, 100µM, 150µM, 200µM dozları SH-SY5Y hücre hatlarına uygulanmış ve 24 saat inkübasyon sonrasında yapılan MTT analizi ile bu kimyasalların hücre proliferasyonunu ne kadar baskıladığı hesaplanmıştır. Grafik 1 ve 2'de kimyasalların MTT analiz değerleri sonucunda elde edilen canlılık oranları yüzde (%) olarak verilmiştir. Bu iki kimyasalın sitotoksik etkileri incelendiğinde, ME0055 kimyasalının 50 µM'lık dozda yapılan uygulamada %52,35'lik canlılık oranı elde edilmişken ($P=0,0002$), bu oran 100 µM ve 150 µM'lık dozlarda $SD\pm =1,8$ $p=0,0003$ olmasına rağmen sırasıyla %59,69 ve %59,76 olarak saptanmıştır. Ayrıca 200 µM'de ise canlılık oranı %84,57 olduğu için en uygun doz olarak %50 canlılığa en yakın değeri sağlamış olan 50 µM dozu kabul edildi (Grafik 3.1).

Aynı değerlendirme ME0053 kimyasalının kanserli SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki etkisi için yapıldığında ise; uygulama yapılan tüm dozlarda canlılık oranının %50'nin altında olduğu saptanmıştır. Elde edilen $SD\pm 0,6$ ($p<0,001$) sonucuna göre tüm dozlar için bu durumun yüksek derecede anlamlı olduğu görüldü. Çalışmanın devamı için



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

uygun dozajın belirlenmesinde asıl hedef %50 (IC₅₀) canlılık olduğundan ME0053 kimyasalı içinde en uygun dozaj %47,62'lik canlılığa sahip olan 50µM'lık konsantrasyon idi (Grafik 3.2).

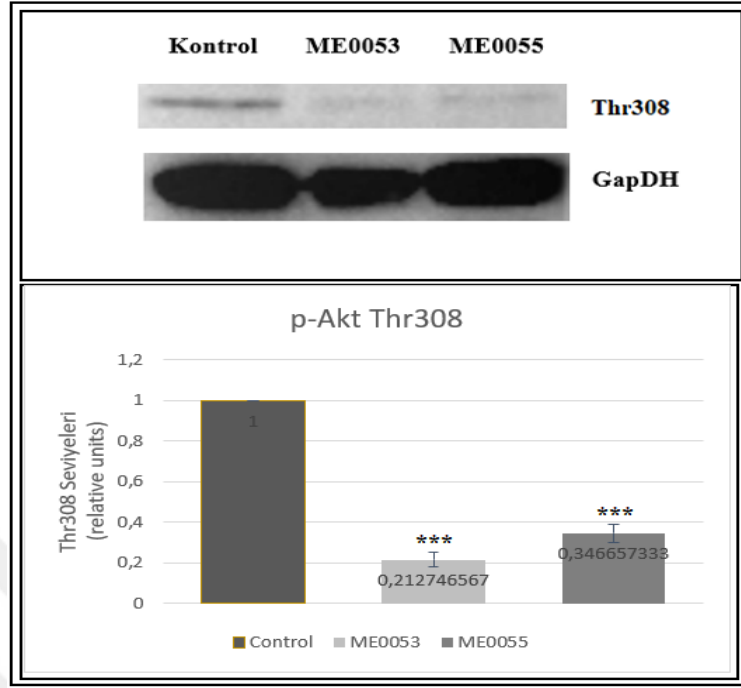


Grafik 3.2. ME0053 kimyasalının kanserli SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

3.1.2. ME0055 ve ME0053 kimyasalı ile demirin şelatlanması sonrası p-Akt yolağında Thr 308'in incelenmesi

Bu çalışmada, ME055 ve ME0053 kimyasalları ile yapılan demir şelatlanmasına bağlı olarak Speedy/RINGO (Cylin A ve CDK2) seviyesindeki düşüşün Akt yolağı üzerine olan etkisinin gösterilebilmesi amacıyla p-Akt yolağında ilk fosforilasyonun gerçekleştiği (yarı aktif p-Akt forma ulaşması) Thr 308'in fosforilasyon seviyesine bakıldı.

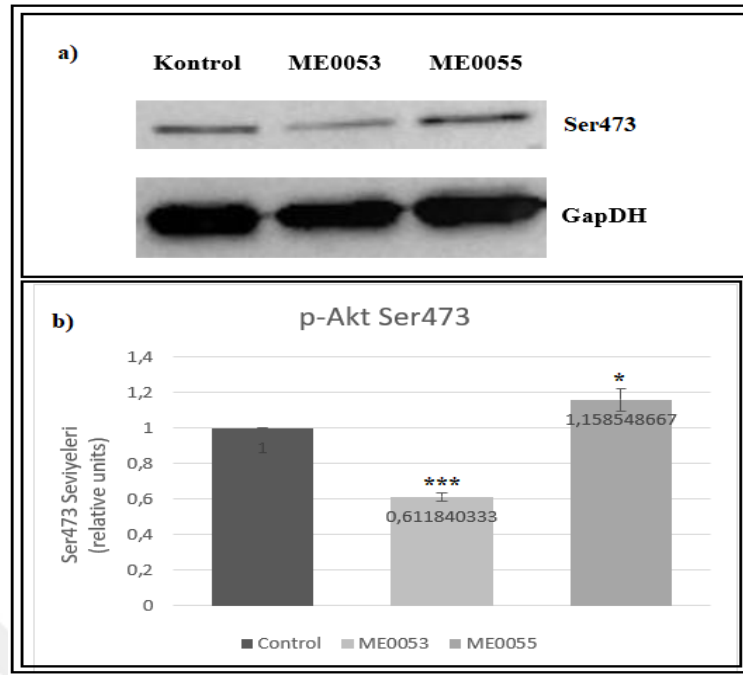
Şekil 3.1.'de görüldüğü üzere Thr308 üzerinden fosforilasyon seviyesinin incelenmesinde uyguladığımız her iki kimyasalın da kontrol grubuna göre anlamlı derecede fosforilasyonu azalttığını saptadık. Fosforilasyonda ME0055 kimyasalı ile %75'lik bir azalma saptanmışken, ME0053'nin %99 oranında düşüş sağladığı görülmüştür ($p<0,001$).



Şekil 3.1. p-Akt Thr308 için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada p-Akt Thr308 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. **b):** ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki p-Akt Thr 308 protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$.

3.1.3. ME0055 ve ME0053 kimyasalı ile demirin şelatlanması sonrası p-Akt yolağında Ser473'ün incelenmesi

Şekil 3.2.'de görüldüğü üzere pAkt (Ser4) miktarı incelendiğinde, şelatör ile uygulama yapılan SH-SY5Y hücrelerinde fosforilasyon miktarında kontrol grubuna göre farklılıklar olduğu saptandı. ME0055 kimyasalı uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre %16'lık bir artış olduğu ($p < 0,05$) saptanmışken, ME0053 kimyasalı ile şelate edilen hücrelerde ise %39'luk bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Uygulaması yapılan salisiliden asilidrazidlerin pAkt(ser473)'ün fosforilasyon miktarı üzerine farklı şekilde etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

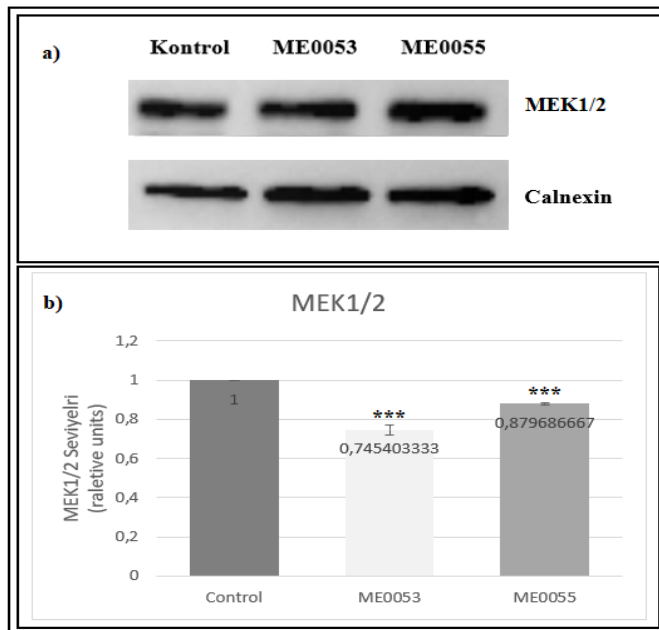


Şekil 3.2. p-Akt Ser473 için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada p-Akt Ser473 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. **b):** ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki p-Akt Ser473 protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$.

3.1.4. Demir şelatlanması sonrası MEK1/2 protein ekspresyonunun analizi

Bu çalışmada, demir şelasyonu uygulanan hücrelerdeki MEK1/2'nin nasıl etkilendiği anlaşılmaya da çalışılmıştır. Şekil 3.3'te görüldüğü üzere ME055 kimyasalı MEK1/2 seviyesini %22 oranında azaltmışken, ME0053 ile %36'lık bir

düşüşe neden olduğu saptanmıştır.

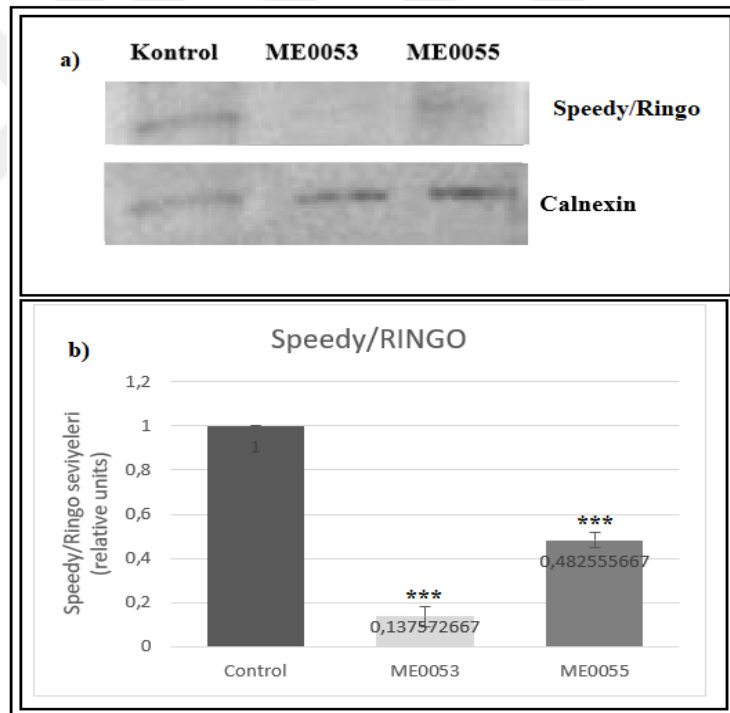


Şekil 3.3 MEK1/2 için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada MEK1/2 için kantitatif sonuçları gösteren grafik. **b):** ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki MEK1/2 seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. * $p < 0.001$

3.2. Speedy / RINGO protein ekspresyon analizi

Demir şelasyonu yapıldığında, hücre döngüsünde kontrol noktası olarak rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarında önemli oranda düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Bu düşüşün siklin D1 ve CDK2'nin ekspresyon seviyelerinde önemli derecede olduğu buna karşın siklin A ve B üzerinde diğerleri kadar olmasa da bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Speedy/RINGO, siklin A-CDK2 kompleksi üzerinde etkisi olduğu bilinen bir moleküldür ve bu araştırmada demir şelasyonunun bu proteinin ekspresyon seviyesine olan etkisine de bakıldı.

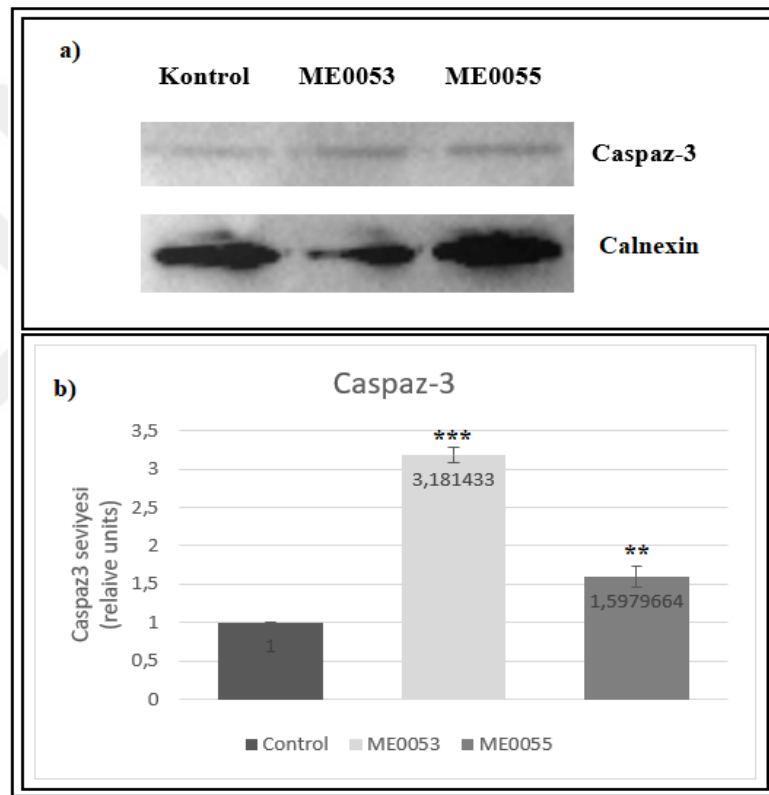
Şekil 3.4 de görüldüğü üzere, ME0055 kimyasalı ile yapılan şelasyonun Speedy/RINGO seviyesini %52 oranında azalttığı ($p=0,001$), buna karşın ME0053 ile şelasyonun %92'lik bir oranda düşüşe neden olduğu ($p=0,000003$) saptandı.



Şekil 3.4. Speedy/RINGO için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada speedy/RINGO için kantitatif sonuçları gösteren **grafik. b):** ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki speedy/RINGO protein seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. * $p<0.001$

3.3. Kaspaz-3 aktivitesi

Bu araştırmada, kanserli SH-SY5Y hücrelerinin ME055 ve ME0053 kimyasalları ile muamele edilmesi sonrasında, bu hücrelerdeki son durumun ve yaşamsal aktivitenin ne şekilde devam ettiğinin anlaşılması için kaspaz-3 aktivitesine de bakılmıştır. Bu uygulama sonucunda ME0055 kimyasalı uygulanan hücrelerde kaspaz-3 aktivitesinde %59,7'lik düzeyde anlamlı bir artış gözlenmişken, ME0053 uygulanan hücrelerde ise %210'luk bir aktivite artışı olduğu ve hücrelerin apoptoza uğradıkları saptanmıştır ($p<0,001$) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kaspaz-3 aktivitesi için western blotlama sonucu. a): Western blotlamada Kaspaz-3 aktivitesi için kantitatif sonuçları gösteren grafik. **b):** ME0055 ve ME0053 ile demir şelatlaması yapılan SH-SY5Y hücrelerindeki Kaspaz-3 aktivitesi seviyesi. Sonuçlar kat değişimi olarak gösterilmiştir. Hata çubukları, ortalama değer $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. * $p<0.001$

3.4. İrdeleme

Bu araştırma sonucunda, Speedy/RINGO protein seviyesinin SH-SY5Y kanser hücreleri ME055 ve ME0053 kimyasallarına maruz kaldıklarında anlamlı bir oranda azaldığı (ME055'te %52 ve ME0053'de %92'lik) saptanmıştır. Bu sonuç, demir şelatörlerinin Speedy/RINGO proteininin ekspresyon seviyesi ve aktivasyonu üzerinde etkin bir inhibitör olduğunu göstermiştir.

Speedy/RINGO protein seviyesindeki azalmanın bir sonucu olarak hücre döngüsünde etkili olan siklin A-CDK2 kompleksinde de bir azalmanın olduğu ve neticede Akt yolağının fosforilasyonu üzerine etki gösterebileceği düşünülmektedir. Bu varsayıma karşın Akt yolağının sadece bu kompleks tarafından kontrol edilmediği gerçeği de vardır. Akt yolağının Thr308 ve Ser473 üzerinden fosforilasyon ile aktif hale geldiği bilinmektedir. Bu iki bölgeden ilk önce Thr 308'ün PIP3-PDK1 ile fosforlanarak yarı aktif forma geldiği, daha sonra PDK2 ile Ser473'ün fosforilasyonu sonucunda p-Akt'nin oluştuğu bildirilmiştir.

Demir şelatörlerinin PIP3'ün oluşmasında görev alan PI3K seviyesini azalttığı ve bu yolaktaki negatif geri beslemeyi yani PIP3'ün PIP2'ye dönüşmesini kolaylaştırarak Akt yolağının fosforlanmasını inhibe eden PTEN seviyesinde artışa neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada kullanılan ME055 kimyasalının SH-SY5Y hücrelerinde Thr308 üzerinde % 75'lik bir azalmaya neden olduğu, Ser473'te ise %16'lık bir artış sağladığı saptanmıştır. Her ne kadar ME055 kimyasalı ile yapılan şelasyon Ser473 üzerinde bir artışa neden olsa bile, Akt yolağının ilk basamağı gerçekleşmeden Ser473 fosforilasyonu gerçekleşmeyeceği için demir şelasyonunun Akt yolağı üzerine inhibitör etki gösterdiği söylenebilir.

Çalışmamızda, ME0053 kimyasalı ile yapılan şelasyon sonrasında SH-SY5Y kanser hücrelerinde Thr308 üzerinde %99 luk bir azalma gözlenmişken, Ser473 'de ise %39'luk bir düşüş söz konusudur.

Bu çalışmada uygulanan kimyasalların Akt yolağı üzerine olan etkilerinin moleküler düzeyde net olarak açıklanabilmesi için öncelikli olarak PI3K, PTEN, Speedy/RINGO ekspresyon seviyelerinin ve siklin A, CDK2 ve CDK inhibitörlerinin de değerlendirilmesi önem taşıyabilir. Ancak tüm bu moleküllerin değerlendirilmesi,

sinyal yolları arasındaki bağlantının akış yönünün belirlenmesindeki zorluklar nedeni ile kolay olmayabilir.

Preklinik birçok çalışmada, bir demir şelatörü olan DFO'un hücre sinyali yollarında birçok noktada etkili olduğu ve bu sonuçlarla kanser tedavisi için önemli bir araştırma alanı haline geldiği bildirilmiştir. Bu kimyasalın PTEN seviyesini artırırken, CDK D1, siklin A-B ve CDK 2 seviyelerini azalttığı ve aynı zamanda CDK inhibitörlerinin aktif hale gelmesini sağladığı bildirilmiştir. Sonuç olarak DFO ile şelasyonun p21WAF/CIP1 gibi komplekslere bağlanarak hücre döngüsünü negatif olarak düzenlediği ve hücrelerin G1/S fazına geçişinin önlenebileceği ya da p53 gibi hücrede en önemli kontrol mekanizmaları üzerinde artışa neden olarak apoptozu indükleyebileceği belirtilmiştir. Sonuç olarak, çalışmamızın sınırlayıcı yönlerinden biri kullandığımız kimyasalların hedefleyebileceği daha bir çok molekülün bakılmamış olmasıdır. Ancak literatür bilgilerine bakıldığında bu kimyasalların kullanıldığı ilk çalışma olduğu da göz önüne alınırsa elde etmiş olduğumuz verilerin ileri çalışmalara ışık tutabileceği düşünülebilir.

Önemli bir hücre içi sinyalizasyon yolu olan MAPK kinaz yolağında ise günümüzde kullanılan demir şelatlayıcıları ile ERK1/2 yolunda fosforilasyonun azaldığı bildirilmiştir. Çalışmamızda ME055 kimyasalı ile MEK1/2 protein ekspresyonunda %22'lik bir azalma elde edilmişken, ME0053 ile bu oranın %36 olduğu saptanmıştır.

Aşırı NO ya da ROS oluşumu ile kaynaklanan hücre içi stres koşullarında ve p53 aktivitesindeki artış sonucunda kaspaz-3 aktif hale gelir ve hücrelerdeki apoptotik proteinleri uyararak hücrenin kontrollü bir şekilde yaşamsal faaliyetlerini sona erdirmesine neden olur. Çalışmamızda kullandığımız demir şelatörlerinin, hücrenin sinyal yolları üzerinde yapmış oldukları bu değişikliklerin SH-SY5Y kanser hücrelerinin yaşamsal aktivitelerini ne şekilde etkilediğini de belirlemeye çalıştık. Sonuç olarak ME055 ve ME0053 kimyasalına maruz kalan SH-SY5Y kanser hücrelerinde sırasıyla %59,7'lik ve %210'luk bir kaspaz3 aktivite artışını gözlemledik. Bu sonuçlar ME055 ve ME0053 şelatörleri ile muamele edilmiş SH-SY5Y kanser hücrelerinin apoptoza uğradığı kanısına varmış olduk.

Anti-kanser tedavide, kanser hücresinin proliferasyon hızının kontrol altına alınması ve metastaz gelişmesinin engellenmesi amaçlandığı için ME055 ve ME0053

kimyasalları ile hücre içi sinyal yollarına ait değişiklikler ve hücrelerin kontrollü bir şekilde apoptoza uğradıklarına dair elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak demir şelatörlerinin kanser tedavisi için iyi bir hedef olabileceği düşünülebilir.

Bu çalışma ile kanser tedavisinde tek başına veya kemoterapi ile kombine bir şekilde ME055 ve ME0053 gibi demir şelatörlerinin tedavide kullanılması için ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varıldı. Önceki çalışmalarda kemoterapiye destek amacıyla kullanılan demir şelatörleri ile benzer etkilerin ME055 ve ME0053 kimyasalları ile de elde edilebilmiş olması bu konudaki çalışmaları teşvik edebilir. Nitekim bu araştırma, ME055 ve ME0053 kimyasallarının kanser hücrelerinin proliferasyonunu MAPK, AKT sinyal yolları ve Speedy/RINGO proteini ekspresyonu üzerinden durdurabileceğini gösteren literatürdeki ilk çalışmadır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile demir şelatörü olan ME0055 VE ME0053 kimyasallarına maruz kalan SH-SY5Y kanser hücrelerinin proliferasyonlarında inhibisyon ve apoptoza gidişlerinde artış olduğu ile ilgili güçlü ve özgün sonuçlara ulaştık.

ME0055 ve ME0053 kimyasalları kullanarak SH-SY5Y kanser hücreleri üzerine yapmış olduğumuz bu çalışma, ileride başka kanserli hücre hatlarında anti-kanser tedavi için yeni ve doğru hedeflerin keşfedilmesi, ilaçlara dirençli kanserlerde yeni yolların hedeflenmesi yönünde literatüre önemli bir katkı sağlayacak olarak düşünülebilir. Sonraki süreçte yapılacak çalışmaların sonucunda, bu kimyasalların farklı kanser hücre hatlarında hangi hedef moleküller ile etkileşim gösterdiği ve ayrıca normal hücreler üzerine olabilecek zararlı etkilerinin belirlenebileceği kanınsa varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts., K., Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell, New York: Garland Science.*
- Aouad, F., Florence, A., Zhang, Y., Collins, F., Henry, C., Ward, R.J., Crichton, R.R. (2002) Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorg Chim Acta*, 339:470–480.
- Avruch, J. (2007) MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta*, 1773:1150–1160.
- Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush, A.I. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 205–214.
- Bazley, L.A., Gullick, W.J. (2005) The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer*, 12: S17–S27.
- Blatt, J. (1994) Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. *Anticancer Res*, 14: 2109–2112.
- Blatt, J., Taylor, S.R., Stitely, S. (1988) Mechanism of antineuroblastoma activity of deferoxamine *in vitro*. *J Lab Clin Med*, 112:433–436.
- Cappellini, M.D., Taher, A. (2009) Deferasirox (Exjade) for the treatment of iron overload. *Acta Haematol*, 122:165–173.
- Ceci, A., Felisi, M., De Sanctis, V., De Mattia, D. (2003) Pharmacotherapy of iron overload in thalassaemic patients. *Expert Opin Pharmacother*, 4: 1763–1774.
- Chang, F., Steelman, L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A., McCubrey, J.A. (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, 17: 1263–1293.
- Chantrel-Groussard, K., Gaboriau, F., Padeloup, N., Havouis, R., Nick, H., Pierre, J.L., Brissot, P., Lescoat, G. (2006) The new orally active iron chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox. *Eur J Pharmacol*, 541: 129–137.
- Chaston, T.B., Lovejoy, D.B., Watts, R.N., Richardson, D.R. (2003) Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of Triapine compared with desferrioxamine and

- the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin Cancer Res*, 9:402–414.
- Crichton, R.R., Boelaert, J.R. (2001) Inorganic biochemistry of iron metabolism: From molecular mechanisms to clinical consequences. (New York: John Wiley and Sons).
- Dang, C.V. (2012) MYC on the path to cancer. *Cell*, 149: 22–35.
- De Alboran, I.M., O'Hagan, R.C., Gartner F., Malynn, B., Davidson, L., Ricker, R., Rajewski, K., DePinho, R.A., Alt, F.W. (2001) Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*, 14: 45–55.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26: 3279–3290.
- Downward, J. (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3: 11–22.
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., Andrews, NC. (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 1148–1153.
- Ford, S.J., Obeidy, P., Lovejoy, D.B., Bedford, M., Nichols, L., Chadwick, C., Tucker, O., Lui, G.Y., Kalinowski, D.S., Jansson, P.J., Iqbal, T.H., Alderson, D., Richardson, D.R., Tselepis, C. (2013) Deferasirox (ICL670A) effectively inhibits oesophageal cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol*, 168:1316–1328.
- Fu, D., Richardson, D.R. (2007) Iron chelation and regulation of the cell cycle: 2 mechanisms of posttranscriptional regulation of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21(CIP1/WAF1) by iron depletion. *Blood*, 110:752–761.
- Fukuchi, K., Tomoyasu, S., Watanabe, H., Kaetsu, S., Tsuruoka, N., Gomi, K. (1995) Iron deprivation results in an increase in p53 expression. *Bio Chem Hoppe Seyler*, 376:627–630.
- Fukushima, T., Kawabata, H., Nakamura, T., Iwao, H., Nakajima, A., Miki, M., Sakai, T., Sawaki, T., Fujita, Y., Tanaka, M., Masaki, Y., Hirose, Y., Umehara, H. (2011) Iron chelation therapy with deferasirox induced complete remission in

- a patient with chemotherapy-resistant acute monocytic leukemia. *Anticancer Res*, 31: 1741–1744.
- Gao, J., Richardson, D.R. (2001) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: the mechanisms involved in inhibiting cell-cycle progression. *Blood*, 98: 842–850.
- Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., Tyner, A.L. (2001) Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4510–4515.
- Gizeh, P. T, Karlsson, E., Stal, O (2014) Clinical value of isoform-specific detection and targeting of AKT1, AKT2 and AKT3 in breast cancer, *Breast Cancer Manag*, 3(5): 409-421
- Hann, H.W., Evans, A.E., Siegel, S.E., Wong, K.Y., Sather, H., Dalton, A., Hammond, D., Seeger, R.C. (1985) Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res*, 45: 2843–2848.
- Hanover, J.A., Dickson, R.B. (1985). Transferrin: Receptor-Mediated Endocytosis and Iron Delivery. In: Pastan I, Willingham M, eds. *Endocytosis*, (New York: Springer US), pp. 131–161.
- Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, 157: 87–94.
- Hubert, R.S., Vivanco, I., Chen, E., Rastegar, S., Leong, K., Mitchell, S.C., Madraswala, R., Zhou, Y., Kuo, J., Raitano, A.B., Jakobovits, A., Saffran, D.C., Afar, D.E. (1999) STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 14523–14528.
- Hudis, CA. (2007) Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*, 357: 39–51.
- Isobe, T., Baba, E., Arita, S., Komoda, M., Tamura, S., Shirakawa, T., Ariyama, H., Takaishi, S., Kusaba, H., Ueki, T., Akashi, K. (2011) Human STEAP3

- maintains tumor growth under hypoferric condition. *Exp Cell Res*, 317:2582–2591.
- Izar, B., Rotow, J., Gainor, J., Clark, J., Chabner, B. (2013) Pharmacokinetics, clinical indications, and resistance mechanisms in molecular targeted therapies in cancer. *Pharmacol Rev*, 65: 1351–1395.
- Jiang, X.P., Elliott, R.L., Head, J.F. (2010) Manipulation of iron transporter genes results in the suppression of human and mouse mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res*, 30: 759–765.
- Jordan, A., Reichard, P. (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*, 67: 71–98.
- Kalinowski, D.S., Richardson, D.R. (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 57: 547–583.
- Kastan, M.B., Canman, C.E., Leonard, C.J. (1995) p53, cell-cycle control and apoptosis - implications for cancer. *Cancer Metast Rev*, 14: 3–15.
- Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., Hirano, T. (1999) STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med*, 189: 63–73.
- Kontoghiorghe, G.J., Piga, A., Hoffbrand, A.V. (1986) Cytotoxic and DNA-inhibitory effects of iron chelators on human leukaemic cell lines. *Hematol Oncol*, 4: 195–204.
- Kulp, K.S., Green, S.L., Vulliet, P.R. (1996) Iron deprivation inhibits cyclin-dependent kinase activity and decreases cyclin D CDK4 protein levels in asynchronous MDA-MB-453 human breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 229: 60–68.
- Kyriakou, D., Eliopoulos, A.G., Papadakis, A., Alexandrakis, M., Eliopoulos, G.D. (1998) Decreased expression of c-myc oncoprotein by peripheral blood mononuclear cells in thalassaemia patients receiving desferrioxamine. *Eur J Haematol*, 60: 21–27.
- Lane, D.J., Bae, D.H., Merlot, A.M., Sahni, S., Richardson, D.R. (2015) Duodenal Cytochrome b (DCYTB) in Iron Metabolism: An Update on Function and Regulation. *Nutrients*, 7: 2274–2296.

- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., Cook, S.J. (2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, *Bim*. *J Biol Chem*, 278: 18811–18816.
- Liang, S.X., Richardson, D.R. (2003) The effect of potent iron chelators on the regulation of p53: examination of the expression, localization and DNA-binding activity of p53 and the transactivation of WAF1. *Carcinogenesis*, 24: 1601–1614.
- Lok, H.C., Suryo, Rahmanto, Y., Hawkins, C.L., Kalinowski, D.S., Morrow, C.S., Townsend, A.J., Ponka, P., Richardson, D.R. (2012) Nitric oxide storage and transport in cells are mediated by glutathione S-transferase P1-1 and multidrug resistance protein 1 via dinitrosyl iron complexes. *J Biol Chem*, 287: 607–618.
- Lui, G.Y.L., Kovacevic, Z., V Menezes S., Kalinowski, D.S., Merlot, A.M., Sahni, S., Richardson, D.R. (2015) Novel thiosemicarbazones regulate the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway: inhibition of constitutive and interleukin 6-induced activation by iron depletion. *Mol Pharmacol*, 87: 543–560.
- Lui, G.Y.L., Obeidy, P., Ford, S.J., Tselepis, C., Sharp, D.M., Jansson, P.J., Kalinowski, D.S., Kovacevic, Z., Lovejoy, D.B., Richardson, D.R. (2013) The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. *Mol Pharmacol*, 83: 179–190.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3: 459–465.
- Mateyak, M.K., Obaya, A.J., Sedivy, J.M. (1999) c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Mol Cell Biol*, 19: 4672–4683.
- Merlot, A.M., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R. (2013) Novel chelators for cancer treatment: where are we now? *Antioxid Redox Signal*, 18: 973–1006.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109–142.

- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., Kaplan, J. (2004) Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306: 2090–2093.
- Nyholm, S., Mann, G.J., Johansson, A.G., Bergeron, R.J., Graslund, A., Thelander, L. (1993) Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. *J Biol Chem*, 268: 26200–26205.
- Ohgami, R.S., Campagna, D.R., Greer, E.L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J.J., Fujiwara, Y., Barker, J.E., Fleming, M.D. (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*, 37: 1264–1269.
- Ohyashiki, J.H., Kobayashi, C., Hamamura, R., Okabe, S., Tauchi, T., Ohyashiki, K. (2009) The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci*, 100: 970–977.
- Osaki, M., Oshimura, M., Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9(6): 667-676.
- Randy, F., Gastwirt, Christopher, W., McAndrew, Daniel, J. (2007) Donoghue Speedy/RINGO Regulation of CDKs in Cell Cycle, Checkpoint Activation and Apoptosis, *Cell Cycle*, 6: 10, 1188-1193, DOI: 10.4161/cc.6.10.4252
- Rhodes, D.R., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Varambally, R., Yu, J., Briggs, B.B., Barrette, T.R., Anstet, M.J., Kincaid-Beal, C., Kulkarni, P., Varambally, S., Ghosh, D., Chinnaiyan, A.M. (2007) Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18, 000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*, 9: 166–180.
- Richardson, D., Ponka, P., Baker, E. (1994) The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res*, 54: 685–689.
- Richardson, D.R., Baker, E. (1990) The uptake of iron and transferrin by the human malignant melanoma cell. *Biochim Biophys Acta*, 1053: 1–12.
- Richardson, D.R., Lane, D.J., Becker, E.M., Huang, M.L., Whitnall, M., Suryo, Rahmanto, Y., Sheftel, A.D., Ponka, P. (2010) Mitochondrial iron trafficking

- and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 10775–10782.
- Richardson, D.R., Neumannova, V., Ponka P. (1995) Nitrogen monoxide decreases iron uptake from transferrin but does not mobilise iron from prelabelled neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1266: 250–260.
- Roberts, P.J., Der, C.J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26: 3291–3310.
- Rybak, A., Bristow, R., Kapoor, A. (2014) Prostate cancer stem cells: Deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*, 6(4): DOI: 10.18632/oncotarget.2953
- Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 110: 669–672.
- Selig, R.A., White, L., Gramacho, C., Sterling-Levis, K., Fraser, I.W., Naidoo, D. (1998) Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res*, 58: 473–478.
- Soyer, H.P., Smolle, J., Torne, R., Kerl, H. (1987) Transferrin receptor expression in normal skin and in various cutaneous tumors. *J Cutan Path*, 14: 1–5.
- Taetle, R., Castagnola, J., Mendelsohn, J. (1986) Mechanisms of growth inhibition by anti-transferrin receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 46: 1759–1763.
- Takeda, E., Weber, G. (1981) Role of ribonucleotide reductase in expression in the neoplastic program. *Life Sci*, 28: 1007–1014.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., Nakamura, Y. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*. 2000; 404: 42–49.
- Tansey, W.P. (2014) Mammalian MYC Proteins and Cancer. *New J Sci*, Volume 2014, Article ID 757534, 27 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/757534>.
- Thelander L, Reichard P. Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem*, 1979; 48: 133–158.

- Torti, S.V., Torti, F.M. (2013) Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer*, 13: 342–355.
- Torti, S.V., Torti, F.M. (2011) Ironing out cancer. *Cancer Res*, 71: 1511–1514.
- Tree, J. J., Wang, D., McNally, C., Mahajan, A., Layton, A., Houghton, I., Elofsson, M., Stevens, M. P., Gally, D. L., and Roe, A. J. (2009) Characterization of the effects of salicylidene acylhydrazide compounds on type III secretion in *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun*, 77: 4209–4220.
- Tsimberidou, A-M., Alvarado, Y., Giles, F.J. (2002) Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2: 437–448.
- Vaughn, C.B., Weinstein, R., Bond, B., Rice, R., Vaughn, R.W., McKendrick, A., Ayad, G., Rockwell, M.A., Rocchio, R. (1987) Ferritin content in human cancerous and noncancerous colonic tissue. *Cancer Invest*, 5: 7–10.
- Vazana-Barad, L., Granot, G., Mor-Tzuntz, R., Levi, I., Dreyling, M., Nathan, I., Shpilberg, O. (2013) Mechanism of the antitumoral activity of deferasirox, an iron chelation agent, on mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 54: 851–859.
- Watts, R.N., Hawkins, C., Ponka, P., Richardson, D.R. (2006) Nitrogen monoxide (NO)-mediated iron release from cells is linked to NO-induced glutathione efflux via multidrug resistance-associated protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 7670–7675.
- Watts, R.N., Richardson, D.R. (2001) Nitrogen monoxide (NO) and glucose: unexpected links between energy metabolism and NO-mediated iron mobilization from cells. *J Biol Chem*, 276: 4724–4732.
- Welch, D.R., Sakamaki, T., Pioquinto, R., Leonard, T.O., Goldberg, S.F., Hon, Q., Erikson, R.L., Rieber, M., Rieber, M.S., Hicks, D.J., Bonventre, J.V., Alessandrini A. (2000) Transfection of constitutively active mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase confers tumorigenic and metastatic potentials to NIH3T3 cells. *Cancer Res*, 60: 1552–1556.
- Yu, Y., Kovacevic, Z., Richardson, D.R. (2007) Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell Cycle*, 6: 1982–1994.

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



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad	Özgür TANRIVERDİ
Doğum Tarihi	19.03.1974
Doğum Yeri	Tarsus
Medeni Durumu	Bekar
Askerlik Durumu	Muaf

İletişim Bilgileri

Adres	Akyaka Mahallesi Dr. Coşkun Çıldır Sk. Yeşil Vadi
Sitesi B1 Blok N0: 5 Ula- Muğla	
Telefon	0532 391 79 28
E-mail	dr.ozgur.tanriverdi@gmail.com

Eğitim Bilgileri

1988-1991 (Lise)	Bakırköy Yahya Kemal Beyalı Lisesi
1991-1997 (Lisans)	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (Tıp)
1998-2003 (Tıpta Uzm.)	İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi (İç Hastalıkları)
2008-2011 (Tıpta Yan Dal)	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi (Tıbbi Onkoloji)
2017- (Yüksek Lisans)	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik

Yayın Bilgileri

Uluslararası indeksler tarafından taranan Özgün Makale, Olgu Sunumu, Derleme, Editör Mektup, Short Communication niteliğindeki bilimsel yayınları

1. Kalemci S, Tanrıverdi O, Şimşek A, Aksun S, Celik OI, Barutca S, Zeybek A, Demirci B. Evaluation of oxaliplatin-induced pulmonary toxicity in rats. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2019;23(3):151-156. doi: 10.5114/wo.2019.89242.
2. Alkan A, Tanrıverdi Ö. Olanzapine: Sancho Panza for clinicians who care for patients with advanced cancer. *Support Care Cancer*. 2019 Oct 24. doi: 10.1007/s00520-019-05105-4. [Epub ahead of print] No abstract available.
3. Yildiz A, Kaya Y, Tanrıverdi O. Effect of the Interaction Between Selenium and Zinc on DNA Repair in Association With Cancer Prevention. *J Cancer Prev*. 2019 Sep;24(3):146-154. doi: 10.15430/JCP.2019.24.3.146. Epub 2019 Sep 30. Review.
4. Alkan A, Türkkan G, Tanrıverdi Ö. Vitamin D deficiency in oncology practice-more roads to cross. *Support Care Cancer*. 2019 Dec;27(12):4385. doi: 10.1007/s00520-019-05024-4. Epub 2019 Aug 3.
5. Alkan A, Türkkan G, Tanrıverdi Ö. Folic Acid: A New Weapon for Mucositis? *Clin Genitourin Cancer*. 2019 Oct;17(5):e885. doi: 10.1016/j.clgc.2019.06.014. Epub 2019 Jun 26.
6. Murat Sedef A, Taner Sumbul FKA, Ayberk Besen A, Hacıoglu B, Gunaldi M, Nayir E, Tanrıverdi O, Arpacı E, Abalı H, Ozyılkan O. Addition of taxanes to combination chemotherapy in distal intestinal gastric cancer is more beneficial than proximal ones: A multicenter retrospective study of Turkish Oncology Group. *J BUON*. 2019 Mar-Apr;24(2):650-655.
7. Irmak Z, Tanrıverdi Ö, Ödemiş H, Uysal DD. Use of complementary and alternative medicine and quality of life of cancer patients who received chemotherapy in Turkey. *Complement Ther Med*. 2019 Jun;44:143-150. doi: 10.1016/j.ctim.2019.04.008. Epub 2019 Apr 16.

8. Degirmencioglu S, Tanriverdi O, Demiray AG, Senol H, Dogu GG, Yaren A.
J Int Med Res. 2019 Jun;47(6):2507-2515. doi: 10.1177/0300060519848258.
Epub 2019 May 17.
9. Degirmencioglu S, Tanriverdi O, Menekse S, Dogan M, Hacıoglu B, Oktay E, Erdem D, Arpacı E, Uluc BO, Turhal S, Yılmaz M, Pilancı KN, Sakin A, Araz M, Cokmert S, Ozdemir O, Sen E, Nayir E. A retrospective analysis on first-line bevacizumab, cetuximab, and panitimumab-containing regimens in patients with RAS-wild metastatic colorectal cancer: A Collaborative Study by Turkish Oncology Group (TOG). J BUON. 2019 Jan-Feb;24(1):136-142.
10. Demir Kureci H, Tanriverdi O, Ozcan M. Attitudes towards and experiences of ethical dilemmas in treatment decision-making process among medical oncologists. J Eval Clin Pract. 2019 Mar 25. doi: 10.1111/jep.13127. [Epub ahead of print]
11. Alkan A, Cenikli U, Uylaş S, Yılmaz M, Çakır T, Çetinkaya H, Kıran A, Tanriverdi Ö. Treatment-refractory paraneoplastic opsoclonus-myoclonus syndrome in a patient with small-cell carcinoma of the lung. J Oncol Pharm Pract. 2020 Jan;26(1):209-211. doi: 10.1177/1078155219831366. Epub 2019 Feb 22. Erratum in: J Oncol Pharm Pract. 2019 Jun;25(4):NP4
12. Kalemci S, Akpınar O, Dere Y, Sarihan A, Zeybek A, Tanriverdi Ö. Efficacy of clarithromycin as a protective agent in the methotrexate-induced pulmonary fibrosis model. Kardiochir Torakochirurgia Pol. 2018 Dec;15(4):209-212. doi: 10.5114/kitp.2018.80915. Epub 2018 Dec 31.
13. Oktay E, Oflazoglu U, Varol Y, Tanriverdi O, Mermur N, Arda HU, Demir L, Keskin O, Ahmadli T, Somali I, Oztop I, Meydan N. The prognostic role of thyroid transcription factor-1 in lung adenocarcinoma. J Cancer Res Ther. 2018 Dec;14(Supplement):S1201-S1208. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_1404_16.
14. Oktay E, Levent M, Gelincik H, Aktaş G, Yumuk F, Koral L, Arpacı E, Keser M, Alkan A, Karci E, Karadurmuş N, Degirmencioglu S, Turan M, Uyeturk U, Cabuk D, Avcı N, Toprak O, Ergen A, Urvay S, Bayman E, Petekkaya E, Nayir

- E, Paydaş S, Yavuzsen T, Senler FC, Yaren A, Barutca S, Şahinler İ, Ozyilkan O, Tanriverdi O. Perspective of Turkish Medicine Students on Cancer, Cancer Treatments, Palliative Care, and Oncologists (ARES Study): a Study of the Palliative Care Working Committee of the Turkish Oncology Group (TOG). *J Cancer Educ.* 2018 Nov 16. doi: 10.1007/s13187-018-1441-6. [Epub ahead of print]
15. Ercelep O, Ozdemir N, Turan N, Topcu TO, Uysal M, Tanriverdi O, Demirci U, Taskoylu BY, Urakcı Z, Duran AO, Aksoy A, Menekse S, Ozcelik M, Gumus M. Retrospective evaluation of patients diagnosed solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas. *Curr Probl Cancer.* 2019 Feb;43(1):27-32. doi: 10.1016/j.crrproblcancer.2018.06.014. Epub 2018 Jul 19.
16. Inal A, Kodaz H, Odabas H, Duran AO, Seker MM, İnanc M, Elkıran ET, Gunaydın Y, Menekse S, Topcu TO, Urakcı Z, Tastekin D, Bilici M, Cihan S, Geredeli C, Sezer E, Uncu D, Arpacı E, Ozturk B, Bal O, Uysal M, Tanriverdi O, Gumus M, Oven Ustaalioglu BB, Suner A, Cokmert S, Hacıbekiroğlu İ, Aydın K, Isıkdoğan A. Prognostic factors of patients who received chemotherapy after cranial irradiation for non-small cell lung cancer with brain metastases: A retrospective analysis of multicenter study (Anatolian Society of Medical Oncology). *J Cancer Res Ther.* 2018 Apr-Jun;14(3):578-582. doi: 10.4103/0973-1482.176417.
17. Tanriverdi O, Barista I, Paydas S, Nayir E, Karakas Y. Oncologists' Perspectives on Consolidation Radiation Treatment after Chemotherapy for Lymphomas: A Survey Study by the Lymphoma Working Committee of the Turkish Oncology Group (TOG). *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Nov 26;18(11):3149-3155.
18. Çetin D, Tanriverdi Ö, Solak Özşeker H, Özşeker B. A rare association of celiac disease and rectal neuroendocrine tumor. *Clin J Gastroenterol.* 2017 Oct;10(5):474-477. doi: 10.1007/s12328-017-0766-8. Epub 2017 Jul 28.
19. Yıldız I, Bilici A, Karadurmuş N, Ozer L, Tural D, Kaplan MA, Akman T, Bayoglu IV, Uysal M, Yıldız Y, Tanriverdi Ö, Yazıcı O, Sürmeli Z, Serdar Turhal N, Bavbek S, Selçukbiricik F, Koca D, Basaran M. Prognostic factors for

survival in metastatic renal cell carcinoma patients with brain metastases receiving targeted therapy. *Tumori*. 2018 Dec;104(6):444-450. doi: 10.5301/tj.5000635. Epub 2018 May 9.

20. Nayir E, Bakir Koyuncu M, Esin E, Turker I, Tanriverdi O, Uysal M, Er O, Demir A, Tuzel Akman T, Nur Pilanci K, Paydas S, Kocar M, Saip P, Kilickap S, Turhal S, Kacan T. Attitudes of cancer patients after diagnosis: How cancer affects social life? A Turkish Oncology Group study. *J BUON*. 2017 Jan-Feb;22(1):208-213.
21. Cetin AO, Omar M, Calp S, Tunca H, Yimaz N, Ozseker B, Tanriverdi O. Hyperuricemia at The Time Of Diagnosis is a Factor for Poor Prognosis in Patients With Stage II and III Colorectal Cancer (Uric Acid and Colorectal Cancer). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Feb 1;18(2):485-490.
22. Bilir C, Yıldız İ, Bilici A, Ucar M, Berk V, Yıldız Y, Yazıcı O, İmamoğlu Gİ, Karadurmuş N, Pilancı KN, Arpacı E, Tanriverdi Ö, Karcı E, Temiz S, Nayır E, Oktay E, Dal P, Petekkaya İ, Varım C, Cinemre H. Is Change in Hemoglobin Level a Predictive Biomarker of Tyrosine Kinase Efficacy in Metastatic Renal Cell Carcinoma? A Turkish Oncology Group Study. *Cancer Invest*. 2017 Apr 21;35(4):248-255. doi: 10.1080/07357907.2017.1292518. Epub 2017 Mar 23.
23. Cokmert S, Tanriverdi O, Karapolat I, Demir L, Bayoglu V, Can A, Akyol M, Yilmaz Y, Oktay Tarhan M. The maximum standardized uptake value of metastatic site in 18 F-FDG PET/CT predicts molecular subtypes and survival in metastatic breast cancer: An Izmir Oncology Group study. *J BUON*. 2016 Nov-Dec;21(6):1410-1418.
24. Omar M, Tanriverdi O, Cokmert S, Oktay E, Yersal O, Pilancı KN, Menekse S, Kocar M, Sen CA, Ordu C, Goksel G, Meydan N, Barutca S; Turkish Descriptive Oncological Researches Group. Role of increased mean platelet volume (MPV) and decreased MPV/platelet count ratio as poor prognostic factors in lung cancer. *Clin Respir J*. 2018 Mar;12(3):922-929. doi: 10.1111/crj.12605. Epub 2017 Jan 6.

25. Kumbasar A, Navdar M, Ataoglu E, Uzunhasan I, Ergen K, Poturoglu S, Basinoglu F, Yilmaz F, Yenigun M, Sar F, Tanriverdi O. N-Terminal pro-B-Type Natriuretic Peptide Levels are Linked with Modified Child-Pugh Classification in Patients with Nonalcoholic Cirrhosis [NT-ProBNP and Liver Cirrhosis]. *Cell Biochem Biophys*. 2017 Mar;75(1):111-117. doi: 10.1007/s12013-016-0773-2. Epub 2016 Dec 2.
26. Özaslan E, Karaca H, Koca S, Sevinç A, Hacıoğlu B, Özkan M, Özçelik M, Duran AO, Hacibekiroğlu İ, Yıldız Y, Tanriverdi Ö, Menekşe S, Aksoy A, Bozkurt O, Urvay S, Uysal M, Demir H, Çıltas A, Dane F. Comparison of survival with somatostatin analog and chemotherapy and prognostic factors for treatment in 165 advanced neuroendocrine tumor patients with Ki-67 20% or less. *Anticancer Drugs*. 2017 Feb;28(2):222-229. doi: 10.1097/CAD.0000000000000445.
27. Cicin İ, Özatlı T, Türkmen E, Öztürk T, Özçelik M, Çabuk D, Gökduzalı A, Balvan Ö, Yıldız Y, Şeker M, Özdemir N, Yapar B, Tanriverdi Ö, Günaydin Y, Menekşe S, Öksüzöğlu B, Aksoy A, Erdogan B, Bekir Hacıoğlu M, Arpacı E, Sevinç A. Predictive and Prognostic Factors in Ovarian and Uterine Carcinosarcomas. *Balkan Med J*. 2016 Sep;33(5):517-524. Epub 2016 Sep 1.
28. Tanriverdi O, Menekşe S, Teker F, Oktay E, Nur Pilanc K, Gunaldi M, Kocar M, Kacan T, Bahceci A, Avcı N, Akman T, Cokmert S, Yesil-Cinkir H, Teoman Yanmaz M. The mean platelet volume may predict the development of isolated bone metastases in patients with breast cancer: a retrospective study of the Young Researchers Committee of the Turkish Oncology Group (TOG). *J BUON*. 2016 Jul-Aug;21(4):840-850
29. Aydın D, Sendur MA, Kefeli U, Unal OU, Tastekin D, Akyol M, Tanrikulu E, Ciltas A, Ustaalioglu BB, Uysal M, Esbag O, Yazilias D, Tanriverdi O, Bilici A, Arpacı E, Berk V, Yetisyigit T, Ozdemir NY, Oztop I, Alacacioglu A, Aydın O, Ozcelik M, Yildirim E, Dinc N, Gumus M. Evaluation of Prognostic Factors and Adjuvant Chemotherapy in Patients With Small Bowel Adenocarcinoma Who Underwent Curative Resection. *Clin Colorectal Cancer*. 2017

Sep;16(3):220-227. doi: 10.1016/j.clcc.2016.08.002. Epub 2016 Aug 30.

30. Kara A, Belli AA, Alatas ET, Tanriverdi O, Dere Y. Widespread cutaneous metastasis from ovarian serous adenocarcinoma. *Dermatol Online J*. 2016 Jul 15;22(7). pii: 13030/qt9mx8r32z.
31. Nayir E, Tanriverdi O, Karakas Y, Kilickap S, Serdar Turhal N, Avci N, Okutur K, Koca D, Erdem D, Abali H, Yamac D, Bilir C, Kacan T. Tendency of cancer patients and their relatives to use internet for health-related searches: Turkish Oncology Group (TOG) Study. *J BUON*. 2016 May-Jun;21(3):714-9.
32. Erdogan B, Kodaz H, Karabulut S, Cinkaya A, Tozgir H, Tanriverdi O, Cabuk D, Hacıoglu MB, Turkmen E, Hacıbekiroglu I, Uzunoglu S, Cicin I. Impact of active smoking on survival of patients with metastatic lung adenocarcinoma harboring an epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation. *Bosn J Basic Med Sci*. 2016 Nov 10;16(4):280-285. doi: 10.17305/bjbms.2016.1380
33. Alkan A, Guc ZG, Senler FC, Yavuzsen T, Onur H, Dogan M, Karci E, Yasar A, Koksoy EB, Tanriverdi O, Turhal S, Urun Y, Ozkan A, Mizrak D, Akbulut H. Breast cancer survivors suffer from persistent postmastectomy pain syndrome and posttraumatic stress disorder (ORTHUS study): a study of the palliative care working committee of the Turkish Oncology Group (TOG). *Support Care Cancer*. 2016 Sep;24(9):3747-55. doi: 10.1007/s00520-016-3202-6. Epub 2016 Apr 2.
34. Sahin C, Omar M, Tunca H, Kalemci S, Ozseker B, Akbaba G, Tanriverdi O. Weight loss at the time of diagnosis is not associated with prognosis in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J BUON*. 2015 Nov-Dec;20(6):1576-84.
35. Tonyali O, Coskun U, Yuksel S, Inanc M, Bal O, Akman T, Yazilitas D, Ulas A, Kucukoner M, Aksoy A, Demirci U, Uysal M, Tanriverdi O, Gunaydin Y, Sumbul AT, Yildiz R, Karaca H, Oksuzoglu B, Ciltas A, Buyukberber S, Benekli M; Anatolian Society of Medical Oncology (ASMO). Risk factors for brain metastasis as a first site of disease recurrence in patients with HER2

positive early stage breast cancer treated with adjuvant trastuzumab. *Breast*. 2016 Feb;25:22-6. doi: 10.1016/j.breast.2015.11.006. Epub 2015 Dec 20.

36. Tanriverdi O, Avci A, Yugunt I, Polat M. A case report of breast and liver metastases of thyroid follicular carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2015 Jul-Sep;11(3):652. doi: 10.4103/0973-1482.138003.
37. Avci N, Deligonul A, Tolunay S, Cubukcu E, Fatih Olmez O, Altmisdortoglu O, Tanriverdi O, Aksoy A, Kurt E, Evrensel T. Prognostic impact of tumor lymphocytic infiltrates in patients with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *J BUON*. 2015 Jul-Aug;20(4):994-1000.
38. Yıldırım B, Basaran O, Alatas OD, Yeniceri EN, Alatas OD, Yeniceri EN, Altun I, Tanriverdi O, Dogan V, Acar E, Biteker M. Chest tube insertion techniques on YouTube: is social media a reliable source of learning medical skills? *Am J Emerg Med*. 2015 Nov;33(11):1709-10. doi: 10.1016/j.ajem.2015.08.040. Epub 2015 Aug 28.
39. Avci N, Hayar M, Altmisdortoglu O, Tanriverdi O, Deligonul A, Ordu C, Evrensel T Smoking.habits are an independent prognostic factor in patients with lung cancer. *Clin Respir J*. 2017 Sep;11(5):579-584. doi: 10.1111/crj.12386. Epub 2015 Oct 7.
40. Tanriverdi O, Avci N, Oktay E, Kalemci S, Pilanci KN, Cokmert S, Menekse S, Kocar M, Sen CA, Akman T, Ordu C, Goksel G, Meydan N, Barutca S. Pretreatment Serum Albumin Level is an Independent Prognostic Factor in Patients with Stage IIIB Non-Small Cell Lung Cancer: A Study of the Turkish Descriptive Oncological Researches Group. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(14):5971-6.
41. Yıldırım B, Yeniceri EN, Tanriverdi O, Ünalı M, Başaran Ö, Alataş ÖD, Acar E. What else could be done for management of cancer patients in ED? Challenges and suggestions (cancer patients and emergency service). *Am J Emerg Med*. 2015 Oct;33(10):1518-9. doi: 10.1016/j.ajem.2015.07.046. Epub 2015 Jul 29.

42. Erdogan B, Turkmen E, Yalta TD, Usta U, Kodaz H, Hacibekiroglu İ, Tanriverdi O, Uzunoglu S, Cicin I. Importance of Ki-67 in human epidermal growth factor receptor 2 positive breast cancer. *J BUON*. 2015 May-Jun;20(3):730-6.
43. Yildirim B, Karagoz U, Acar E, Beydilli H, Nese Yeniceri E, Tanriverdi O, Alatas OD, Kasap Ş. A Case Report of Prilocaine-Induced Methemoglobinemia after Liposuction Procedure. *Case Rep Emerg Med*. 2015;2015:282347. doi: 10.1155/2015/282347. Epub 2015 Jun 23.
44. Kara A, Alatas E, Dogan G, Celik SY, Tanriverdi O. A first case report of diffuse acneiform eruption caused by capecitabine in a patient with small-cell neuroendocrine lung carcinoma. *J Oncol Pharm Pract*. 2016 Oct;22(5):717-9. doi: 10.1177/1078155215587542. Epub 2015 May 20.
45. Saydam O, Karapinar K, Gokce M, Kilic L, Metin M, Oz II, Tanriverdi O. The palliative treatment with intrapleural streptokinase in patients with multiloculated malignant pleural effusion: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Med Oncol*. 2015 Jun;32(6):612. doi: 10.1007/s12032-015-0612-0. Epub 2015 May 10.
46. Tanriverdi O, Ersen A, Cokmert S, Koca E, Bulut N, Gul S, Yilmaz N. The Case of an Elderly Male Patient with Unknown Primary Mucinous Adenocarcinoma within Presacral Teratoma (Teratoma with Malignant Transformation). *Case Rep Oncol Med*. 2015;2015:170479. doi: 10.1155/2015/170479. Epub 2015 Mar 22.
47. Tanriverdi O, Cay-Senler F, Yavuzsen T, Turhal S, Akman T, Komurcu S, Cehreli R, Ozyilkan O. Perspectives and practical applications of medical oncologists on defensive medicine (SYSIPHUS study): a study of the Palliative Care Working Committee of the Turkish Oncology Group (TOG). *Med Oncol*. 2015 Apr;32(4):106. doi: 10.1007/s12032-015-0555-5. Epub 2015 Mar 7.
48. Tanriverdi O, Yeniceri N. Importance of meta-analysis and practical obstacles in oncological and epidemiological studies: statistics very close but also far! *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(3):1303-6.
49. Tanriverdi O, Yavuzsen T, Akman T, Senler FC, Taskoylu BY, Turhal S,

- Komurcu S, Cehreli R, Yaren A, Ozyilkan O. The Perspective of Non-oncologist Physicians on Patients with Metastatic Cancer and Palliative Care (ALONE Study): A Study of the Palliative Care Working Committee of the Turkish Oncology Group (TOG). *J Cancer Educ.* 2015 Jun;30(2):253-9. doi: 10.1007/s13187-015-0794-3.
50. Tanriverdi O, Ogunc H. A case report of three patients with metastatic gastric cancer on hemodialysis who were treated with cisplatin-fluorouracil regimen. *J Oncol Pharm Pract.* 2016 Apr;22(2):345-9. doi: 10.1177/1078155214567160. Epub 2015 Jan 7.
 51. Duran AO, Karaca H, Besiroglu M, Bayoglu IV, Menekse S, Yapici HS, Yazilitas D, Bahceci A, Uysal M, Sevinc A, Hacibekiroglu I, Aksoy A, Tanriverdi O, Arpaci E, Inanc M, Dane F, Ozkan M. XELOX plus bevacizumab vs. FOLFIRI plus bevacizumab treatment for first-line chemotherapy in metastatic colon cancer: a retrospective study of the Anatolian Society of Medical Oncology. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(23):10375-9.
 52. Tanriverdi O. Is there a predictive significance of ABO blood group on chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with stage III colon cancer? *Med Oncol.* 2015 Jan;32(1):384. doi: 10.1007/s12032-014-0384-y. Epub 2014 Nov 27.
 53. Tanriverdi O. A discussion of serum albumin level in advanced-stage hepatocellular carcinoma: a medical oncologist's perspective. *Med Oncol.* 2014 Nov;31(11):282. doi: 10.1007/s12032-014-0282-3. Epub 2014 Oct 15. Review.
 54. Tanriverdi O, Cokmert S, Oktay E, Pilanci KN, Menekse S, Kocar M, Sen CA, Avci N, Akman T, Ordu C, Goksel G, Meydan N. Prognostic significance of the baseline serum uric acid level in non-small cell lung cancer patients treated with first-line chemotherapy: a study of the Turkish Descriptive Oncological Researches Group. *Med Oncol.* 2014 Oct;31(10):217. doi: 10.1007/s12032-014-0217-z. Epub 2014 Sep 13.
 55. Tanriverdi O, Yildirim B, Gul S, Cevik E, Akman T, Cokmert S, Pilanci KN,

- Avci N, Ordu C, Barutca S. Is there any effect of lower extremity deep vein thrombosis which proven by Doppler ultrasonography on cancer recurrence in patients with stage III colon cancer? A study of the Turkish Descriptive Oncological Researches Group. *Med Oncol*. 2014 Oct;31(10):215. doi: 10.1007/s12032-014-0215-1. Epub 2014 Sep 11.
56. Tanriverdi O, Kaytan-Saglam E, Ulger S, Bayoglu IV, Turker I, Ozturk-Topcu T, Cokmert S, Turhal S, Oktay E, Karabulut B, Kilic D, Kucukzeybek Y, Oksuzoglu B, Meydan N, Kaya V, Akman T, Ibis K, Saynak M, Sen CA, Uysal-Sonmez O, Pilancı KN, Demir G, Saglam S, Kocar M, Menekse S, Goksel G, Yapar-Taskoylu B, Yaren A, Uyeturk U, Avci N, Denizli B, Ilis-Temiz E. The clinical and pathological features of 133 colorectal cancer patients with brain metastasis: a multicenter retrospective analysis of the Gastrointestinal Tumors Working Committee of the Turkish Oncology Group (TOG). *Med Oncol*. 2014 Sep;31(9):152. doi: 10.1007/s12032-014-0152-z. Epub 2014 Aug 10.
57. Tanriverdi O. Acute Effect on QT Dispersion and Cardiac Function of Trastuzumab: A Controversial Situation. *Angiology*. 2016 May;67(5):499. doi: 10.1177/0003319714535972. Epub 2014 May 15. No abstract available.
58. Tanriverdi O. Is there any effect of bolus and/or infusion 5-fluorouracil treatment on microalbuminuria in immediate or long term? *Med Hypotheses*. 2014 Jul;83(1):116-8. doi: 10.1016/j.mehy.2014.03.030. Epub 2014 Apr 5.
59. Uysal-Sonmez O, Tanriverdi O, Uyeturk U, Budakoglu II, Kazancioglu R, Turker I, Budakoglu B, Yalcintas-Arslan U, Oksuzoglu B. Awareness of cancer screening during treatment of patients with renal failure: a physician survey in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(5):2165-8.
60. Tanriverdi O, Meydan N, Barutca S. Reconsideration of clinical and histopathological prognostic factors in breast cancer patients: a single center experience. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(2):807-12.
61. Tanriverdi O, Beydilli H, Yildirim B, Karagoz U. Single center experience on causes of cancer patients visiting the emergency department in southwest

- Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(2):687-90.
62. Tanriverdi O. Is a new perspective for definition and diagnostic criteria of fibromyalgia in early stage cancer patients necessary? *Med Hypotheses*. 2014 Apr;82(4):433-6. doi: 10.1016/j.mehy.2014.01.018. Epub 2014 Jan 27.
63. Yildirim B, Tanriverdi O. Evaluation of cancer patients admitted to the emergency department within one month before death in Turkey: what are the problems needing attention? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(1):349-53.
64. Tanriverdi O, Aydemir NF. Perspectives of medical oncologists regarding music therapy for patients with cancer in Turkey - can musicology be integrated into psycho-oncology? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014 Jan;14(11):6537-40.
65. Erdogan B, Turkmen E, Uzunoglu S, Tanriverdi O, Cicin I. Performance status is an important prognostic factor in second line treatment of pancreaticobiliary adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2013 Sep;60(126):1479-83.
66. Sen CA, Kargi A, Kaya V, Tanriverdi O. Isolated and solitary splenic metastasis detected by positron emission tomography in a patient with malignant melanoma: case report and review of the literature. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2013;17(2):214-7. doi: 10.5114/wo.2013.34627. Epub 2013 Apr 29.
67. Tanriverdi O. Review on targeted treatment of patients with advanced-stage renal cell carcinoma: a medical oncologist's perspective. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):609-17. Review.
68. Tanriverdi O, Kaskari D. Fibromyalgia and breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2014 Feb;19(1):204-5. doi: 10.1007/s10147-013-0545-6. Epub 2013 Mar 30.
69. Uysal-Sonmez O, Tanriverdi O, Esbah O, Uyeturk U, Helvaci K, Bal O, Yalcintas-Arslan U, Budakoglu B, Oksuzoglu B. Multicenter evaluation of patients with cutaneous malignant melanoma in Turkey: MELAS study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(1):533-7.
70. Tanriverdi O. Predictive value of baseline plasma D-dimers for chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with stage III colon cancer: a pilot study.

Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(1):293-7.

71. Tanriverdi O. Association of Helicobacter pylori infection with chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with stage III colon cancer: a pilot study. Platelets. 2014;25(2):118-24. doi: 10.3109/09537104.2013.778397. Epub 2013 Mar 15.
72. Tanriverdi O. A medical oncologist's perspective on communication skills and burnout syndrome with psycho-oncological approach (to die with each patient one more time: the fate of the oncologists). Med Oncol. 2013 Jun;30(2):530. doi: 10.1007/s12032-013-0530-y. Epub 2013 Mar 15. Review.
73. Tanriverdi O, Meydan N, Barutca S, Ozsan N, Gurel D, Veral A. Anti-Yo antibody-mediated paraneoplastic cerebellar degeneration in a female patient with pleural malignant mesothelioma. Jpn J Clin Oncol. 2013 May;43(5):563-8. doi: 10.1093/jjco/hyt031. Epub 2013 Mar 8.
74. Tanriverdi O, Meydan N, Barutca S, Kadikoylu G, Sargin G, Tataroglu C, Culhaci N. Cutaneous metastasis of gallbladder adenocarcinoma in a patient with chronic lymphocytic leukemia: a case report and review of the literature. Ann Dermatol. 2013 Feb;25(1):99-103. doi: 10.5021/ad.2013.25.1.99. Epub 2013 Feb 14.
75. Tanriverdi O, Meydan N, Barutca S. Long-term effect of trastuzumab on QT dispersion in adjuvant treatment for patients with Her2 receptor positive breast cancer: a pilot study. Med Oncol. 2012 Dec;29(5):3265-71. doi: 10.1007/s12032-012-0291-z. Epub 2012 Jun 30.
76. Coşkun ST, Tanriverdi O, Kumbasar A, Ergen A. Comparison of blood lipid levels of people of Armenian and non-Armenian origin living in Istanbul, Turkey. Anadolu Kardiyol Derg. 2012 Jun;12(4):370. doi: 10.5152/akd.2012.110. Epub 2012 Apr 13.
77. Tanriverdi O. Association of Helicobacter pylori infection with microalbuminuria in type 2 diabetic patients. Turk J Gastroenterol. 2011 Dec;22(6):569-74.

78. Tanriverdi O, Barutca S, Meydan N. Relapse with isolated peritoneal metastasis in lung adenocarcinoma: case report and review of the literature. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2012;16(6):586-9. doi: 10.5114/wo.2012.32495. Epub 2013 Jan 4.
79. Tanriverdi O, Unubol M, Taskin F, Meydan N, Sargin G, Guney E, Barutca S. Imatinib-associated bilateral gynecomastia and unilateral testicular hydrocele in male patient with metastatic gastrointestinal stromal tumor: a literature review. *J Oncol Pharm Pract*. 2012 Jun;18(2):303-10. doi: 10.1177/1078155211424629. Epub 2011 Oct 18. Review.
80. Kilicgun A, Tanriverdi O, Turna A, Metin M, Sayar A, Solak O, Urer N, Gurses A. Prognostic stratification of patients with T3N1M0 non-small cell lung cancer: which phase should it be? *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):607-13. doi: 10.1007/s12032-011-9907-y. Epub 2011 Mar 24
81. Saydam O, Gokce M, Kilicgun A, Tanriverdi O. Accuracy of positron emission tomography in mediastinal node assessment in coal workers with lung cancer. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):589-94. doi: 10.1007/s12032-011-9879-y. Epub 2011 Mar 6.
82. Uzunoglu S, Karagol H, Ozpuyan F, Cosar R, Cicin I, Yurutcaloglu V, Denizli B, Tanriverdi Ö, Sut N, Kocak Z. Protective effect of L-carnitine versus amifostine against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Med Oncol*. 2011 Dec;28 Suppl 1:S690-6. doi: 10.1007/s12032-010-9746-2. Epub 2010 Dec 8.
83. Tanriverdi O. [Ventricular septal rupture and cardiogenic shock in the myocardial infarction case presenting with fever and leukocytosis]. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2007 Dec;7(4):453. Turkish.

(Not: Ulusal dergilerde özgün araştırma, derleme, olgu sunumu, editöre mektup; ulusal ve uluslar arası kongrelerde poster ve sözlü bildiri, davetli konuşmacı, uluslararası kitap bölümü yazarlığı (2019; 2), ulusal kitap bölüm yazarlığı, kitap bölüm çevirileri, ulusal ve uluslar arası hakemlikler)

Bilimsel Faaliyetler

2017 (MORE 2017) Muğla Multidisipliner Onkolojik Araştırmalar Sempozyumu, Sempozyum Başkanı, Ekim, Bodrum

2018 (MORE 2018) 2. Muğla Multidisipliner Onkolojik Araştırmalar Sempozyumu, Sempozyum Başkanı, Ekim, Bodrum

2019 (AMORE 2019) 3. Muğla Multidisipliner Onkolojik Araştırmalar Kongresi & Kansere Genç Yaklaşım Sempozyumu (A Young Look at Cancer Science and Art: MedArt 2019); Kongre Başkanı , Ekim, Bodrum

Yabancı Dil

İngilizce

Yazma : İyi, Konuşma: orta

Yetkinlikler

Bilgisayar

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

PHP, Java