



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ONKOPROTEİN C-MYC'İN HÜCRESEL
LOKALİZASYONUNU BELİRLEYEN MOLEKÜLLERİN
GELİŞTİRİLMESİ

Remzi MISIRLILAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Haziran-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Remzi MISIRLILAR tarafından hazırlanan “Onkoprotein C-Myc’in HücreSEL Lokalizasyonunu Belirleyen Moleküllerin Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 30/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur Aslan

.....

Danışman

Doç. Dr. Sündüs Erbaş Çakmak

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aylin Gazdağlı Talay

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Remzi MISIRLILAR
Tarih: 30.05.2025

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ONKOPROTEİN C-MYC'İN HÜCRESEL LOKALİZASYONUNU
BELİRLEYEN MOLEKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Remzi MISIRLILAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. SÜNDÜS ERBAŞ ÇAKMAK

2025, 62 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Sündüs Erbaş Çakmak
Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur Aslan
Dr. Öğr. Üyesi Aylin Gazdağlı Talay

Birçok kanser türünün gelişiminde önemli bir etkisi olan c-MYC onkoproteini transkripsiyon faktörü olarak hücrede birçok genin anlatımının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu genler hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozu, translasyon, transkripsiyon, hücre döngüsü gibi önemli birçok hücresel fonksiyonları yönetir. C-Myc geninin amplifikasyonu, kromozom translokasyonu, retroviral promotör katılması gibi aşırı aktifleşmesine neden olan etkenler hücresel büyüme ve çoğalma kontrolünün kaybolmasına ve dolayısıyla kanser oluşumuna olanak tanımaktadır. C-Myc'in aktive olabilmesi için Max yapısı ile heterodimerizasyon gereklidir. Zayıf prognoz ve düşük sağkalım ile ilişkilendirilen c-MYC mutasyonlarına bağlı kanserleri hedeflemek için literatürde doğrudan veya dolaylı olarak c-MYC yolağını inhibe eden yaklaşımlar çalışılmıştır. MYC seviyesini ve/veya hücresel lokalizasyonunu tespit eden, küçük moleküler problemlerin kullanıldığı yaklaşımlar sınırlıdır ve bu alanda daha fazla araştırılma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Proje kapsamında c-MYC proteinine bağlanan bir modül ile BODIPY floresan probunun birleştirildiği, c-MYC'in hücrede görüntülenmesine imkan veren bir prob üretilmiştir. Proben yüksek kuantum verimine sahip olduğu tespit edilmiş, konfokal mikroskopu ve akış sitometri analizleri ile c-MYC proteininin görüntülenebildiği ispatlanmıştır. C-MYC'i hedefleyen siRNA kullanıldığında floresan sinyalinin üç kattan fazla azaldığı tespit edilmiş olup probun bu proteine spesifik bağlandığı gösterilmiştir. Çekirdek boyası DAPI ile beraber yapılan analizler probun DAPI ile Pearson korelasyon katsayısının 0.989 olduğunu göstermektedir. Bu durum, probun çekirdekte lokalize olan c-MYC proteini görüntülediğine işaret etmektedir. Proben uygulama dozunda insan akciğer hücrelerine toksik etki oluşturduğu görülmüştür. Proben yapısında c-MYC bağlanan modülünün inhibitör özelliğinden yola çıkılarak elde edilen bileşiğin teranostik özellikleri de incelenmiştir. Prob uygulaması sonucu izole edilen RNA, RT-PCR yöntemi ile kantifiye edilmiş ve probun c-MYC altyolağında yer alan siklin D gen anlatımını doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde %50'den fazla azalttığı görülmüştür. Hücre göçünü kontrol grubuna göre 12 kattan fazla azaltılabildiği tespit edilmiştir ve bu bulgular bileşiğin anti-metastatik etki gösterme potansiyelini göstermektedir. Elde edilen veriler kolay elde edilebilir, kuantum verimi yüksek BODIPY temelli probun teranostik etki göstererek hem c-MYC'i görüntülemek için hem de kanser proliferasyonu için önemli siklin D geninin anlatımını baskılamak için kullanılabilir. Bu sonuçlar, c-MYC'in hücre büyümesini ve çoğalmayı kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olarak hücrede birçok genin anlatımının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu genler hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozu, translasyon, transkripsiyon, hücre döngüsü gibi önemli birçok hücresel fonksiyonları yönetir. C-Myc geninin amplifikasyonu, kromozom translokasyonu, retroviral promotör katılması gibi aşırı aktifleşmesine neden olan etkenler hücresel büyüme ve çoğalma kontrolünün kaybolmasına ve dolayısıyla kanser oluşumuna olanak tanımaktadır. C-Myc'in aktive olabilmesi için Max yapısı ile heterodimerizasyon gereklidir. Zayıf prognoz ve düşük sağkalım ile ilişkilendirilen c-MYC mutasyonlarına bağlı kanserleri hedeflemek için literatürde doğrudan veya dolaylı olarak c-MYC yolağını inhibe eden yaklaşımlar çalışılmıştır. MYC seviyesini ve/veya hücresel lokalizasyonunu tespit eden, küçük moleküler problemlerin kullanıldığı yaklaşımlar sınırlıdır ve bu alanda daha fazla araştırılma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: c-MYC, Kanser, Onkoprotein, BODIPY

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

DEVELOPMENT OF MOLECULES THAT IDENTIFY THE CELLULAR LOCALIZATION OF THE ONCOPROTEIN C-MYC

Remzi MISIRLILAR

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

Advisor: Assoc. Prof. Dr. SÜNDÜS ERBAŞ ÇAKMAK

2025, 62 Pages

Jury

Assoc. Prof. Sündüs Erbaş Çakmak

Assist. Prof. Tuğba Nur Aslan

Assist. Prof. Aylin Gazdağlı Talay

The c-MYC oncoprotein, which is critical in the development cancer, plays significant roles in regulating the expression of many genes in the cell as a transcription factor. These genes regulate many important cellular functions such as cell growth, proliferation and apoptosis, translation, transcription, and cell cycle. Factors that cause c-Myc over-activation, such as gene amplification, chromosome translocation, and retroviral promoter insertion, leads to the loss of cellular growth and proliferation control and cause cancer formation. Heterodimerization with the Max is required for c-Myc activation. Approaches that directly or indirectly inhibit the c-MYC pathway have been studied in the literature to target cancers associated with c-MYC mutations and characterized with poor prognosis and low survival. Small probe approaches to detect MYC levels and/or cellular localization are limited and requires more research.

Within the scope of the project, a probe was produced that combines a c-MYC protein binding module and the BODIPY fluorescent probe, allowing the visualization of c-MYC in the cell. It was determined that the probe has a high quantum yield, and the c-MYC protein is shown to be visualized with confocal microscopy and flow cytometry analyses with the use of the probe. When siRNA targeting c-MYC was used, the fluorescence signal decreased more than threefold, which indicates that the probe specifically binds to this target protein. Analyses performed with the nuclear dye DAPI showed that the Pearson correlation coefficient of the probe with DAPI was 0.989. This indicated that the probe visualized the c-MYC protein localized in the nucleus. It was observed that the probe has toxic effect on human lung cells at the applied dose. The theranostic properties of the compound were also examined since the c-MYC binding module is a c-MYC inhibitor. The RNA isolated from the cells after the probe application was quantified by RT-PCR method and it was observed that the probe decreased the cyclin D gene expression located in the downstream of c-MYC pathway by more than 50% in a statistically significant manner, depending on the dose. It was found that cell migration could be reduced by more than 12-fold compared to the control group, and these findings demonstrate the potential of the compound to exhibit anti-metastatic effects. The obtained data indicate that the BODIPY-based probe, which is easily obtainable and has high quantum yield, can be used to both visualize c-MYC protein and suppress cyclin D expression, which is important for cancer proliferation. Hence, the probe can be considered as a theranostic agent.

Keywords: c-MYC, Cancer, Oncoprotein, BODIPY

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinden sonuçlandırılmasına kadar geçen her aşamada desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle çalışmama ışık tutan saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Eleştirel yaklaşımı ve yol göstericiliği, akademik bakış açımı geliştirmemde önemli bir katkı sağlamıştır.

Ayrıca bu süreçte fikirleriyle beni besleyen, zorlukları birlikte göğüslediğimiz değerli laboratuvar arkadaşlarıma; her daim yanımda olan ve desteğini hissettiren aileme gönülden teşekkür ederim. Tez deneylerinde desteğini esirgemeyen Elif Çetli, Emin Şahin, Aliye Beyza Özçelik, Dr. Safaa Altves, Dr. İsmail Selim Yıldırım'a teşekkür ederim.

Bu tezin, çalışma alanıma katkı sağlamasını ve sonraki araştırmalara ilham verecek nitelikte bir kaynak olmasını dilerim.

Remzi MISIRLILAR
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER TABLOSU	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2. 1. MYC Onkoproteini ve Kanserle İlişkisi	2
2.1.1. c-MYC'in Kanser Hücre Metabolizmasına Etkisi.....	4
2.1.2. c-Myc'in Tümör Anjiyogenezini, Metastazı ve Kemorezistansındaki Rolü.....	6
2.2. c-Myc'i Hedefleyen Terapötik Yaklaşımlar	7
2.2.1 c-Myc'i Doğrudan Hedefleme	7
2.2.2 Dolaylı Yoldan Myc'nin Hedeflenmesi	10
2.3. Myc Problemleri.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Prob Tasarımı	17
3.2. Prob Sentezi.....	18
3.2.1. 1 Nolu Bileşiğin Sentezi.....	19
3.1.2. 2 Nolu Bileşiğin Sentezi.....	19
3.1.3. 3 Nolu Bileşiğin Sentezi.....	20
3.1.4. 4 Nolu Bileşiğin Sentezi.....	21
3.1.5. 5 Nolu Bileşiğin Sentezi.....	22
3.1.6. P Kodlu Bileşiğin Sentezi.....	23
3.2. Spektroskopik Analizler	24
3.3. Hücre Sitotoksikite Deneyleri.....	25
3.4. Akış Sitometrisi Deneyi	25
3.5. Konfokal Görüntüleme Analizi	26
3.6. RT-PCR Analizi	27
3.7. Hücre Göçü Analizi.....	27
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	29
4.1. Bileşiklerin Karakterizasyonu	29
4.2. Hücre Sitotoksikite Deneyleri – MTT Testi Sonucu	33
4.3. Spektroskopik Analizler	34

4.4. Akış Sitometrisi Deneyi Sonucu	36
4.5. Konfokal Görüntüleme Deneyi Sonucu	36
4.6. RT- PCR Analizi Sonucu	38
4.7. Hücre Göçü Analizi Sonucu	38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	40
5.1 Sonuçlar.....	40
5.2 Öneriler.....	42
6. KAYNAKLAR.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mL: mililitre

μ L: mikrolitre

nm: nanometre

μ M: Mikromolar

mM: Milimolar

MHz: Mega Hertz

dk: Dakika

s: Saat

Kısaltmalar

A549 : İnsan Akciğer Kanseri

AcOH : Asetik Asit

APL : Akut Promiyelositik Lösemi

BET : Bromodomain ve Eksterminal

BR/HLH/LZ : Temel bölge/Sarmal-Döngü-Sarmal/Lösün Fermuar

CC : Kontrol Hücre

CCND1 : Siklin D1

CCNG2 : Siklin G2

C-MYC: Cellular myelocytomatosis oncogene

CTGF : Bağ Dokusu Büyüme Faktörü

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DKM : Diklorometan

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DMF : Dimetil Formamid

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

E-box : E- Kutusu

FBS : Fetal Sığır Serumu

FITC : Floresan İzotiyosiyanat

GLUT1: Glukoz Transporter 1

HDAC : Histon Deasetilaz

MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür

NFAT : Nükleer Faktör Aktive T Hücreleri

O.S : Oda Sıcaklığında

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

RNA : Ribonükleik Asit

RT-PCR : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

siRNA: Small Interfering RNA

TCA : Trikarboksilik Asit

TFA : Triflorasetik Asit

TLC : İnce Tabaka Kromatografisi

TBST : Tris Tamponlu Salin

Tsp1 : Trombospondin-1

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 2.1. Kanser hücresinin metastaz şeması .	2
Şekil 2.2. Myc hücrede birbirinden farklı fonksiyonları.....	3
Şekil 2.3. Myc, Max ile dimerizasyon sağlayıp, DNA'ya bağlanması	3
Şekil 2.4. Myc'in fazla aktivasyonuna neden olan faktörler.....	4
Şekil 2.5. Arttırılmış c-Myc ifadesi Warburg etkisini ve tümör oluşumunu desteklemektedir.....	5
Şekil 2.6. c-MYC 'in tümör mikro ortamındaki durumu.....	6
Şekil 2.7. Mevcut c-Myc inhibitörleri ve terapotik hedef yolları.....	8
Şekil 2.8. Doğrudan (A) ve dolaylı (B) şekilde c-Myc'in inhibisyonu.....	9
Şekil 2.9. Bromodomain ve ekstra terminal inhibitörlerinin çalışma mekanizması.....	10
Şekil 2.10. c-Myc'nin PP2A tarafından post-translasyonel olarak düzenlenmesi.....	11
Şekil 2.11. c-Myc'in, sinyal mekanizmalarındaki konumu ve görevi.....	12
Şekil 3.1. Hedef prob P'nin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 4.1. 1 nolu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃).....	29
Şekil 4.2. 2 nolu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃).....	29
Şekil 4.3. 4 nolu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃).....	30
Şekil 4.4. 5 nolu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃).....	30
Şekil 4.5. 5 nolu bileşiğin ¹³ C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl ₃).....	31
Şekil 4.6. P kodlu prob bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃).....	31
Şekil 4.7. P kodlu prob bileşiğinin genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃).....	32
Şekil 4.8. P kodlu prob bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl ₃).....	32
Şekil 4.9. P kodlu prob bileşiğinin QTOF-LC/MS kütle spektrumu	33
Şekil 4.10. P molekülünün A549 hücrelerine olan toksisitesi (n = 4).....	33
Şekil 4.11. P molekülünün DMSO çözücüsü içinde UV-Vis absorbans spektrumu.....	34
Şekil 4.12. P probunun DMSO içinde 490 nm'den uyarılarak elde edilen floresans spektrumu.....	34
Şekil 4.13. P probunun DMSO ve su içinde (hacimce 50%), farklı derişimlerde 500 nm'den uyarılarak elde edilen floresans spektrumu.....	35
Şekil 4.14. P probunun DMSO ve su içinde (hacimce 50%), 500 nm'den uyarılarak 2 saat süresince elde edilen floresans spektrumu.....	35
Şekil 4.15. P pronunun akış sitometri yönteminde uygulanması.....	36
Şekil 4.16. Prob P molekülünün konfokal görüntüleme analiz sonucu.....	37
Şekil 4.17. P uygulamasının cMYC alt yolağında yer alan SNAIL, GLUT1, C-MYC ve CCND1 genlerinin anlatımına etkisi.....	38
Şekil 4.18. P (5 µM) uygulamasının A549 hücrelerinde 48 saat boyunca hücre göçüne etkisi.....	39
Şema 3.1. Hedef bileşik P'nin sentez yolu.....	18
Şema 3.2. 1 Nolu bileşiğin sentez şeması.....	19
Şema 3.3. 2 Nolu bileşiğin sentez şeması.....	19
Şema 3.4. 3 Nolu bileşiğin sentez şeması.....	20
Şema 3.5. 4 Nolu bileşiğin sentez şeması.....	21
Şema 3.6. 5 Nolu bileşiğin sentez şeması.....	22
Şema 3.7. P Nolu bileşiğin sentez şeması.....	23
Tablo 3.1 RT-PCR analizinde kullanılan primerler.....	27

1. GİRİŞ

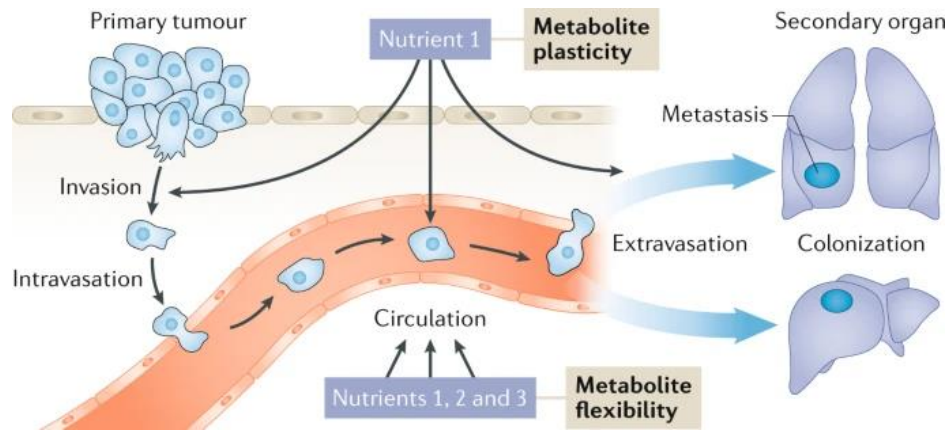
c-MYC onkoproteini birçok kanser türünün gelişiminde önemli bir etkiye sahiptir. Transkripsiyon faktörü olarak hücrede birçok genin anlatımının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu genler hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozu, translasyon, transkripsiyon, hücre döngüsü gibi önemli birçok hücre fonksiyonları yönetir. Zayıf prognoz ve düşük sağkalım ile ilişkilendirilen c-MYC mutasyonlarına bağlı kanserleri hedeflemek için literatürde doğrudan veya dolaylı olarak c-MYC yolağını inhibe eden yaklaşımlar çalışılmıştır. MYC seviyesini ve/veya hücre lokalizasyonunu tespit eden, küçük moleküler problemlerin kullanıldığı yaklaşımlar sınırlıdır ve tez çalışmasının ana motivasyonunu oluşturmaktadır.

Tez projesi kapsamında c-MYC proteinine bağlanan bir modül ile BODIPY floresan probunun birleştirildiği, c-MYC'in hücrede görüntülenmesine imkan veren bir prob üretilmiştir. Proben konfokal mikroskopu ve akış sitometri analizleri ile c-MYC proteininin görüntülenebildiği ispatlanmıştır. C-MYC'i hedefleyen siRNA kullanıldığında floresan sinyalinin üç kattan fazla azaldığı tespit edilmiş olup probun bu proteine spesifik bağlandığı gösterilmiştir. Çekirdek boyası DAPI ile probun Pearson korelasyon katsayısının 0.989 olduğunu göstermektedir. Bu durum, probun çekirdekte lokalize olan c-MYC proteini görüntülediğine işaret etmektedir. Proben uygulama dozunda insan akciğer hücrelerine toksik etki oluşturduğu görülmüştür. Proben yapısında c-MYC bağlanan modülünün inhibitör özelliğinden yola çıkılarak elde edilen bileşiğin teranostik özellikleri de incelenmiştir. Prob uygulaması sonucu izole edilen RNA, RT-PCR yöntemi ile kantifiye edilmiş ve probun c-MYC altyolağında yer alan siklin D gen anlatımını doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde %50'den fazla azalttığı görülmüştür. Elde edilen veriler kolay elde edilebilir, kuantum verimi yüksek BODIPY temelli probun teranostik etki göstererek hem c-MYC'i görüntülemek için hem de kanser proliferasyonu için önemli siklin D geninin anlatımını baskılamak için kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Tez çalışmasında görüntülenmesi hedeflenen ve teranostik bir yaklaşımla inhibe edilmesi sağlanan c-myc onkoproteininin kanser biyolojisindeki önemi, bu proteini hedefleyen farklı terapötik yaklaşımlar ve bu proteini görüntülemek için kullanılan literatürdeki mevcut problemler aşağıda özetlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

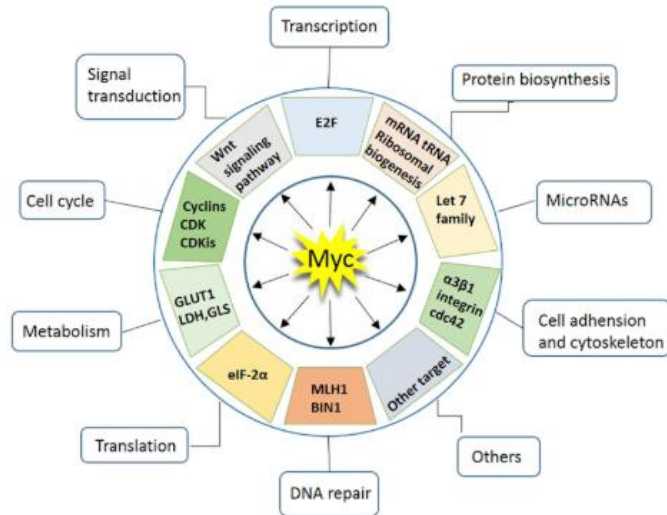
Kanser, organizmada farklı mutasyonlar sonucu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize hastalıklar bütünüdür. Bazı zamanlarda bulunduğu doku veya organı etkilediği gibi, metastas yaparak diğer doku ve organlara da ilerleyip etkisini gösterebilmektedir (Şekil 2.1), (EB Deniz, 2022). Onkolojik hastalıkların 100'den fazla türü görülmektedir ve farklı terapi yöntemleri uygulanabilmektedir. Bu yöntemler kemoterapi, radyoterapi, gen tedavisi, cerrahi müdahale, hormon tedavileri, hedefe yönelik tedaviler ve immüno terapidir (Fitzmaurice ve ark., 2015; Pavlopoulou ve ark., 2015; Tunc vd. 2022).



Şekil 2.1. Kanser hücresinin metastaz şeması (Bergers ve Fendt, 2021).

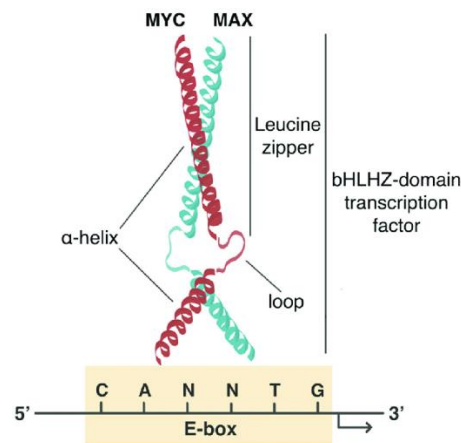
2. 1. MYC Onkoproteini ve Kanserle İlişkisi

c-MYC geni insanda kromozom 8'de yer alır ve protein başta hücre döngüsü olmak üzere proliferasyon ve sağkalım ile ilişkili yollara doğrudan etki eder (Nie ve ark., 2012). Myc, protein ifadesi, hücre döngüsünün ilerlemesi, ribozom biyogenezi, metabolizma, DNA tamiri, bağışıklık ve farklılaşma süreçlerine etki sağlamaktadır (Şekil 2.2), (Dang ve ark., 2006; Meyer ve Penn, 2008). Siklin ve siklin bağımlı kinazlara olan etkisi hücre döngüsüne etki etmesini sağlarken, Glukoz Transporter 1 (GLUT1) gibi genlerin anlatımına olan etkisi doğrudan metabolizmayı etkilemesini sağlar. Yapılan çalışmalarda, transgenik farelerde Myc aktivitesinin geçici bir süreyle azalması durumunda, oluşan tümörün gerilediği görülmüştür. Bu ve benzeri çalışmalar onkojenik Myc'nin düzenlenmesinin terapötik çıktı sağlayabileceğini düşündürmektedir (Shachaf, C. M. ve Felsher, D. W. 2005; Soucek ve ark., 2008; Arvanitis ve Felsher, 2006).



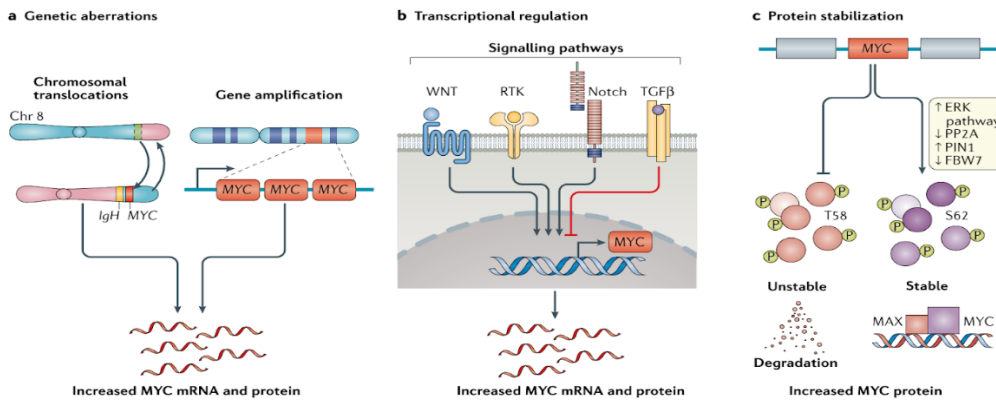
Şekil 2.2. Myc hücrede birbirinden farklı fonksiyonları düzenlemektedir (Chen, Liu, ve Qing, 2018).

C-Myc hedef genlerinin E-kutusu dizilerini tanımakta transkripsiyonel amplifikasyon sağlamaktadır (Lin ve ark., 2012; Xiong ve ark., 2010). Myc protein ailesi, C-terminusunda temel bölge/sarmal-döngü-sarmal/lösün fermuar (BR/HLH/LZ) motifi ve N-terminusunda Myc kutuları 1-3 olarak bilinen yüksek oranda korunmuş üç element içeren yüksek yapısal homoloji sergiler. Myc, DNA-protein etkileşimleri için zorunlu BR/HLH/LZ dizaynını kullanıp Max'e bağlanır. Daha sonra transkripsiyon aktivasyonunun sağlanması için oluşan Myc/Max heterodimeri (Şekil 2.3), kromatin modifiye bileşimini (TRRAP, GCN5, TIP60 ve TIP48) getirerek, hedef genlerin transkripsiyonel düzenleyici alanındaki CACGTG sekansa sahip olan E-kutusu DNA dizisine bağlanır (Adhikary ve Eilers, 2005; Pelengaris, Khan ve Evan, 2002; Meyer ve Penn, 2008).



Şekil 2.3. Myc, Max ile dimerizasyon sağlayıp, DNA'ya bağlanması (Tambay, Raymond, ve Bilodeau, 2021).

Genomun en az % 15'ini kontrol edebilme yeteneğine sahip olan, süper transkripsiyon faktörü olan Myc onkoproteinleri c-Myc, N-Myc ve L-Myc'i kodlayanlar sırasıyla; C-MYC, MYCN ve MYC genleridir (Dang ve ark., 2006; Adhikary ve Eilers, 2005; Pelengaris, Khan ve Evan, 2002; Dang, 2012). Birçok kanser ile ilişkisi olan C-Myc, çokça görülen karaciğer, pankreas, meme kanserleri gelişiminde rol almaktadır (Lin vd., 2010). Kanser hücrelerinin metabolizması, mitokondriyal ve ribozomal biyogenez, diferansiyasyonu, apoptozu ve proliferasyonu ile ilgili anahtar genlerin ifadesi, stabilize C-Myc aracılığıyla tekrar düzenlenebilir (Lin vd., 2010; Dang, 2013; Jain vd., 2015; Parasido vd., 2019). Kanserde Myc ifadesi çoğunlukla düzensizdir. Myc ekspresyonunun yüksek seviyede olması, farklı durumlar ile oluşabilmektedir. Bunlardan bazıları ise, Myc kararlılığını fazlalaştıran yukarı akış sinyal yollarında mutasyon oluşması, kromozomal hatalar, translokasyonu, gen amplifikasyonu, retroviral promotör katılması, Myc'nin sahip olduğu dizilimdeki süper güçlendiricilerin aktive edilmesi ile Myc ifadesi yüksek derecede sağlanabilmektedir (Şekil 2.4), (Meyer ve Penn, 2008). MYC'in temel kanser biyolojisi üzerine etkisi özetlenmiştir.

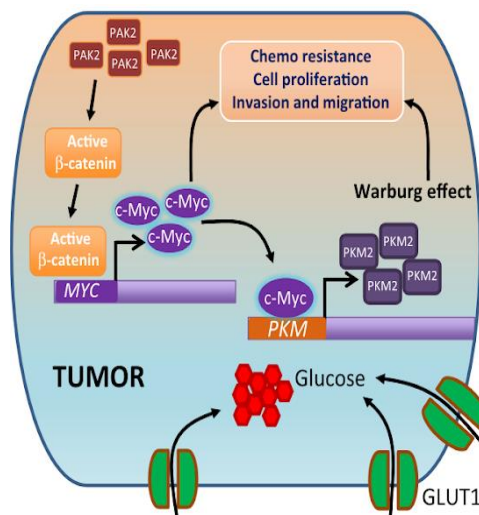


Şekil 2.4. Myc'in fazla aktivasyonuna neden olan faktörler (Dhanasekaran vd. 2022).

2.1.1. c-MYC'in Kanser Hücresi Metabolizmasına Etkisi

Tümör hücrelerinde kullanılan enerjinin düzenini sağlayan temel unsur, C-Myc'dir. Tümörlü hücrelerin büyümeleri için gerekli enerjiyi, mikro alanındaki glikoz kullanımını artırarak sağlayıp aynı zamanda protein, lipid, nükleik asit gibi diğer ihtiyaçlarında üretilmesini temin edilebilmektedir (Miller vd., 2012). C-Myc, aerobik glikoliz ya da diğer adıyla Warburg etkisi ile kanserli hücrenin yeterli oksijen miktarında dahi enerji metabolizmasının temel kaynağı olan Krebs döngüsünü atlatıp, hücrelerin

glikoz alımı yapmasını ve laktoz üretiminin kolaylaşmasını sağlamaktadır. Anabolik süreçler içerisinde gereken laktozu kanser hücrelerine sağlayabilmek için glikoliz sistemi kullanılmaktadır (Warburg, Wind ve Neglers, 1930; Yan vd., 2019). Glikolizi, kanser hücrelerinin invazyonunu, kemorezistansını ve proliferasyonunu artıran c-Myc'in, enerji mekanizmasını düzenlemek için piruvat kinaz izoenzim tip M2'nin ekspresyonunu artırdığı belirtilmiştir (Şekil 2.5), (Yan vd., 2019; Luan vd., 2015; Gupta vd., 2018).

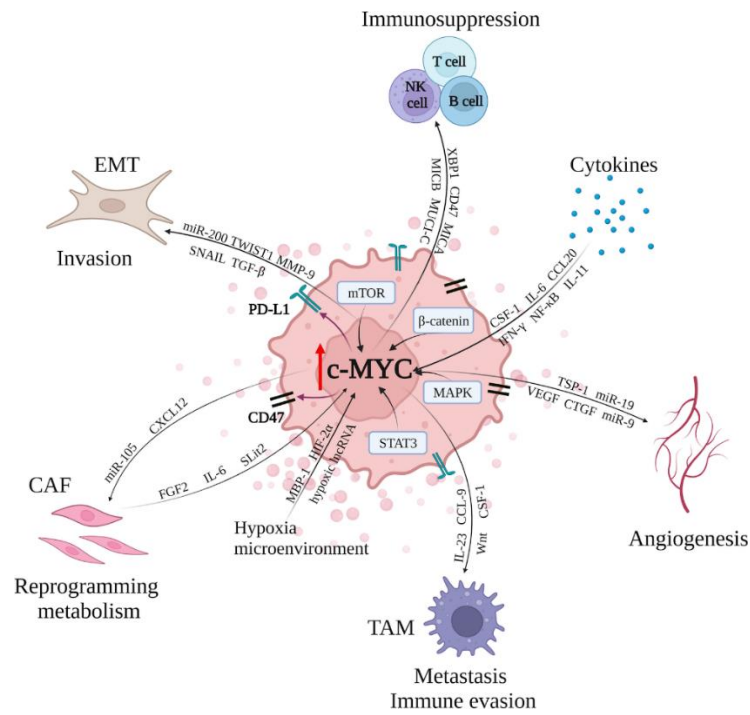


Şekil 2.5. Arttırılmış c-Myc ifadesi Warburg etkisini ve tümör oluşumunu desteklemektedir (Gupta vd. 2018).

Kan şeker oranının yükselmesinin farelerdeki pankreas kanser hücrelerinin daha çok büyümesine sebep olduğu açıklanmıştır (Sato vd., 2020). Glutamini glutamata çevirip daha sonrada trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ile ATP oluşumu için kullanılan enzim olan mitokondriyal glutaminazın, ekspresyonunun artışı için c-Myc'nin miR-23a ve miR-23b'yi baskıladığı anlaşılmıştır. c-Myc'nin bu işlevinin kanserli hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu sonucuna varılmıştır (Gao vd., 2009). Kanser hücreleri hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek için glutamine gereksinim duymaktadırlar. Aynı zamanda glutaminin diğer bir önemi, mTOR'un çalışmayı sürdürebilmesi ve esansiyel amino asitlerin hücreye girişinin sağlanmasıdır (Wise ve Thompson, 2010). Kanser hücrelerinin çevresinde, yeterli glikoz varlığında, glutamat ve amonyaktan yeni glutamin oluşumunun artmasını sağlayan etken yapı glutamin sentetazdır. Kanserli hücrelerin glutamin eksiklik durumunun azaltılması, canlılığının sağlanması, amino asit taşınımını geliştirici bir etki göstermesi, glutamin sentetazın yüksek ekspresyonu ile gerçekleşir. c-Myc'in demetilasyon yolu ile bu enziminin ekspresyon artışına neden olduğu keşfedilmiştir (Bott vd., 2015).

2.1.2. c-Myc'in Tümör Anjiyogenezini, Metastazı ve Kemorezistansındaki Rolü

Kanser hücreleri büyüebilmeleri ve metastaz yapabilmeleri için yeni kan damarı oluşumuna (anjiyogenez) ihtiyaç duymaktadırlar. Hızlı besin, oksijen gibi etmenlere ulaşabilmek için anjiyogenez hızlandırmak adına kanser hücreleri, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyojenik faktörlerin üretimini artırmaktadır. Anjiyogenez aynı zamanda kanser hücrelerine, oluşturulan kan damarları ile vücutta hareket etme, başka dokulara metastaz olanağı sağlamaktadır (Folkman, 2002). C-Myc'in anjiyogenezde önemli bir yeri bulunmakta olup anjiyogenez arttırdığı belirtilmiştir (Şekil 2.6). Yapılan deneylerde c-Myc'in susturulması, tümör içindeki vaskülarizasyon azalması ile korelasyon göstermiştir. Pozitif olarak düzenlediği faktörlerden VEGF ve anjiyogenezde yolağında etkinlik gösteren diğer proteinlerin ifadesini olumlu yönde düzenleyebilmektedir (Huang vd., 2019; Baudino vd., 2002; Smits vd., 2012). Fakat anjiyogenez üzerine yapılan çalışmalarda Dews ve arkadaşları, anjiyogenez üzerindeki etkisi olan c-Myc'nin VEGF'e bağlı olmadığını ileri sürmüşlerdir. Bunun üzerine c-Myc'in, anti-anjiyojenik faktörlerin ifadesini azalttığı, trombospondin-1 (Tsp1) ve bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) gibi anti-anjiyojenik faktörlerinde ifadelerini düşürdüğü belirtilmiştir.



Şekil 2.6. c-MYC 'in tümör mikro ortamındaki durumu (Gao vd., 2023)

C-Myc, miR-17-92 ekspresyonunu artırarak trombospondin-1 (Tsp1) ve bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ekspresyonunu engellediği açıklanmıştır (Dews vd., 2006). Diğer bir araştırmada ise, Chen ve arkadaşları HIF-1 α etkinliğini post-transkripsiyonel olarak c-Myc ile artırılabilirliğini, HIF-1 α /VEGF yolu aracılığıyla yeni kan damarları oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Hücreler düşük oksijen seviyelerine maruz kaldığında, HIF-1 α VEGF üretimini tetikler ve bu da anjiyogenez sürecini hızlandırabileceği anlatılmaktadır (Chen vd., 2013; Arany vd., 2008). Anjiyogenezin pozitif düzenleyicisi olarak c-Myc'i hedeflemek, tümör hücrelerinin metabolizmasını bozabilir ve metastatik potansiyellerini azaltabilir. Bu nedenle, c-Myc'in inhibisyonu, kanser tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilebilir. Bu tezin amacı, kanser gelişimini önlemek ve azaltmak için C-Myc sistemini kullanmaktır. Bu bağlamda çalışma, C-Myc'in hücre içi sinyal yollarındaki etkilerini keşfetmeyi ve kanser hücrelerinin çoğalmasını ve metastatik potansiyelini azaltmak için yeni terapötik stratejiler geliştirmeyi amaçlamaktadır. Bu tezde, C-Myc'nin biyolojik işlevlerini ve rolünü derinlemesine analiz ederek, kanser tedavisinde yeni ve etkili yaklaşımların önünü ve C-Myc lokasyonunun kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştırarak yenilikçi ve etkili kanser tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmayı amaçlamaktadır.

2.2. c-Myc'i Hedefleyen Terapötik Yaklaşımlar

Bununla birlikte, ilaç geliştirme çalışmalarında direkt Myc'yi hedefleyen ilaçların geliştirilmesi oldukça zordur. Kinaz veya benzeri enzimlerde olduğu gibi kolay hedeflenir protein aktif bölgesinin olmayışı, çekirdekte bulunması sebebiyle monoklonal antikörlerin kullanımındaki güçlükler bu zorluğun ana nedenleridir. Belirtilen güçlüklerin üstesinden gelebilmek için kansere gelişiminde etkin rol oynayan Myc'nin, dolaylı veya doğrudan inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar sürdürülmektedir ve aşağıda bu yaklaşımlar özetlenmiştir (Chen, Liu ve Qing, 2018).

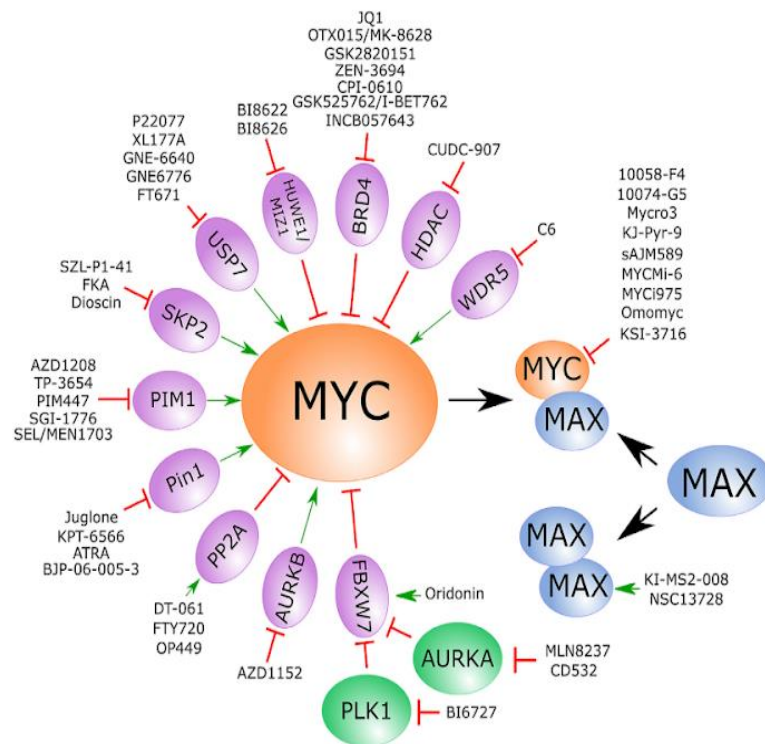
2.2.1 c-Myc'i Doğrudan Hedefleme

Literatürde farklı mekanizmalarla c-Myc hedefleyen inhibitörler mevcuttur (Şekil 2.7). Han vd., treonin-58'de fosforilasyonunu uyararak c-Myc ubiquitinasyonunu ve parçalanmasını uyararak MYCⁱ³⁶¹ ve MYCⁱ⁹⁷⁵ küçük molekül c-Myc inhibitörleri

geliştirmişlerdir. Bu sistem c-Myc'i doğrudan hedef alabilmektedir (Han vd., 2019). C-Myc çalışabilmesi için MAX ile heterodimer yapı oluşturmak zorundadır. Bu sayede DNA'ya bağlanabilmektedir (Blackwood ve Eisenman, 1991). Heterodimer yapının bir elemanının parçalanması altyolağı etkilemektedir. MYCi361'in tümör büyümesini baskıladığı ve kanser hücresinde PD-L1 anlatımını artırarak immünoterapötik yanıtın artmasını sağladığı anlaşılmıştır (Şekil 2.7).

KSI-3716 antikanser etkileri araştırılan bir diğer c-Myc inhibitörüdür. Bu inhibitörün amacı c-Myc/MAX heterodimerinin hedef genin promotör bölgesine bağlanmasını engelleyerek, transkripsiyonun başlayamamasını sağlamaktadır. Bu durum siklin D2, CDK4 gibi farklı genlerin c-Myc aracılı fazla ifadesini güçlü bir şekilde inhibe edebilmektedir. Ayrıca KSI-1449 ve KSI-2302, c-Myc/Max/DNA kompleksinin oluşumunu önleyerek c-Myc üzerinde benzer bir etkiye sahiptir (Jeong vd., 2014; Jeong vd., 2010). KSI-3716'nin farelerdeki mesane kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Jeong vd. 2014).

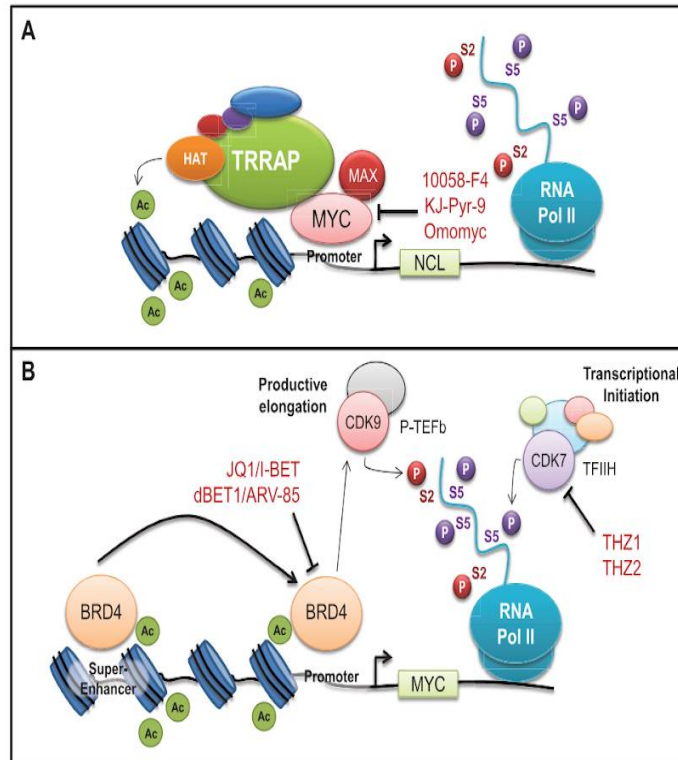
Bir başka inhibitör olan sAJM589, c-Myc/MAX heterodimer yapısını doza bağlı olarak engelleyebilmiştir. sAJM589 inhibitörünün, c-Myc'in hedef aldığı genlerin ifadesini etkili bir şekilde azaltabileceği açıklanmıştır (Choi vd., 2017).



Şekil 2.7. Mevcut c-Myc inhibitörleri ve terapötik hedef yolları (Lombart and Mansour, 2022).

Daha öncede belirtildiği üzere, c-Myc'in hedef genlerin E-kutusunda bağlanması için c-Myc/MAX heterodimer yapısının oluşabilmesi gerekmektedir. Bu kompleks yapı oluşmadığında c-Myc işlevsiz kalmaktadır. Bu c-Myc/MAX dimerini inhibe eden bir başka yapı ise Mycro3'dür. Mycro3, c-Myc/MAX dimerizasyon inhibitörü olarak pankreas kanserinde, önemli ölçüde apoptoz düzeyini arttırabildiği rapor edilmiştir (Choi vd., 2017).

c-Myc/MAX dimerizasyonun engelleyen diğer bir molekül ise 10058-F4'dür. Rodaninin konsanzasyonu ile elde edilen bu inhibitör tez projesinde de MYC bağlanan modülü olarak kullanılmıştır. Bu inhibitör, pre-B hücre hattında apoptozu arttırabilirken, kanser tedavileri sırasında uygulanan deksametazon ve vinkristin gibi diğer ilaçlara karşı kanserli hücrelerin hassasiyetinin artmasını sağlayabilmektedir. Aynı zamanda bu yapı, akut promiyelositik lösemi (APL)'de arsenik trioksit hassasiyetini arttırabilmektedir. Pankreas tümör hücrelerinin apoptozunu hızlandıran 10058-F4 ile yapılan tedavi, glikolizde kısmen baskılama ve pankreatik tümör hücre döngüsünün G1/S evresinde durmasını sağlamaktadır (Sheikh-Zeineddini vd., 2019; Lv vd., 2018; Sayyadi vd., 2020; Zhang vd., 2015).

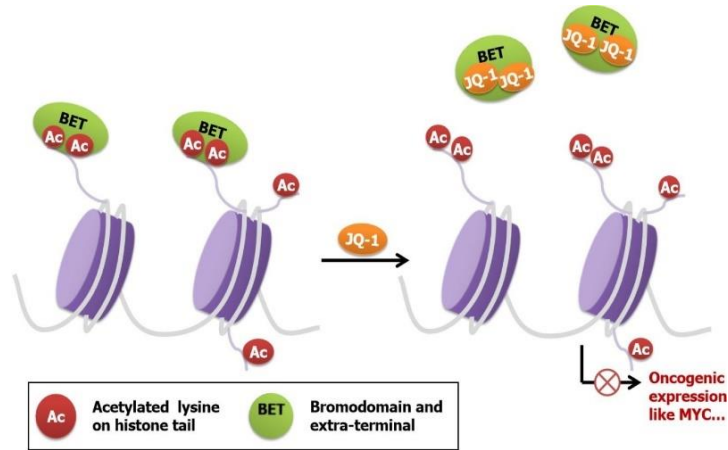


Şekil 2.8. Doğrudan (A) ve dolaylı (B) şekilde c-Myc'in inhibisyonu (Posternak ve Cole 2016). Çalışmada da c-MYC bağlanma modülü olarak kullanılan 10058-F4'nin kimyasal yapısı sağda verilmiştir.

2.2.2 Dolaylı Yoldan Myc'nin Hedeflenmesi

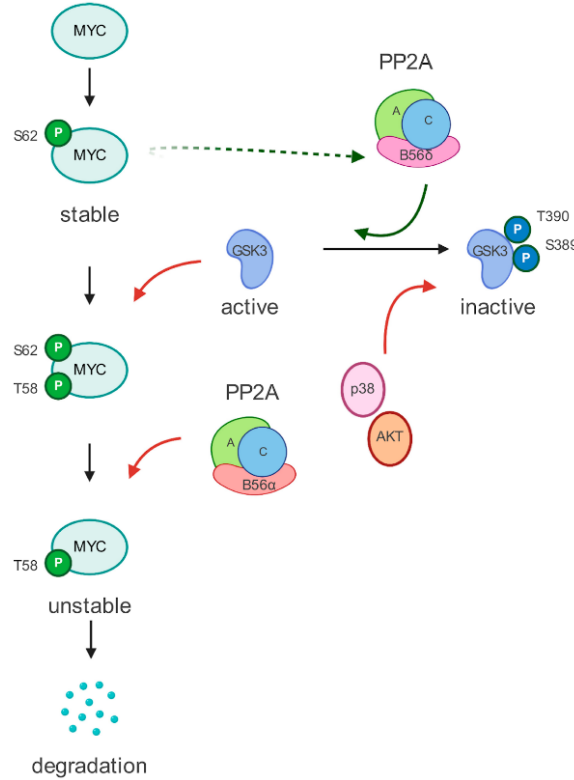
Myc kaynaklı kanserleri tedavi etmek için yeni yaklaşımlarda, Myc'yi doğrudan hedef alan stratejilerin yetersizliğinde, dolaylı hedefleyen yeni yöntemlerden yararlanılmıştır (Chen vd., 2018). Karmaşık yapısı, ilaç etkileşimi için enzim aktif bölgesi gibi belirgin bir bölgesinin olmaması ve aynı zamanda çoğunlukla hücrelerin çekirdeğinde yer alması sebebiyle, güçlü bir şekilde c-Myc'i hedef alacak inhibitör geliştirmenin güçlük oluşturduğu belirtilmektedir (Wang vd., 2021; Wang vd., 2021). c-Myc proteininin hücre içinde etkileşime geçtiği birçok farklı protein ve RNA vardır. Bu yapılardan bazıları; transkripsiyonel ve translasyonel kompleksler, kodlamayan RNA'lar, hücre içi sinyal yollarının farklı bileşenleridir. Post-transkripsiyonel ve translasyonel değişiklikler, c-Myc geninin epigenetik susturulması transkripsiyonel farklılıklar ile c-Myc'in ifadesi sırasında dolaylı inhibisyonun gerçekleşebileceği belirtilmiştir. Dolaylı yoldan c-Myc'nin inhibisyonu ve hedeflediği genlere olan etkisini azaltmak ya da durdurmak için farklı mekanizmalar sunulmaktadır (Ala, 2022).

Protein-protein etkileşimini düzenleyen ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde yer alan BRD2, BRD3 ve BRD4 gibi BET çekirdek proteinleri, ana transkripsiyonel faktörler ve histonlar üzerindeki asetillenmiş lizinlere bağlanarak epigenetik etkiler gerçekleştirilebilmektedir. BRD2 ve BRD3 gibi BET proteinleri, c-Myc ifadesini yukarı regüle ederken, JQ1 ve OTX015 gibi BET inhibitörleri, c-Myc ifadesini aşağı regüle ederek azaltmaktadırlar (Şekil 2.9). C-Myc ile etkileşim halinde olan kanser hücreleri için yeni terapötik tedavi olarak düşünülen BET inhibitörleri tedavi için yeni bir yol oluşturmaktadır (Morgado-Pascual vd., 2019; Coudé vd., 2015; Delmore vd., 2011; Mertz vd., 2011).



Şekil 2.9. Bromodomain ve ekstra terminal inhibitörlerinin çalışma mekanizması (Sun vd. 2022).

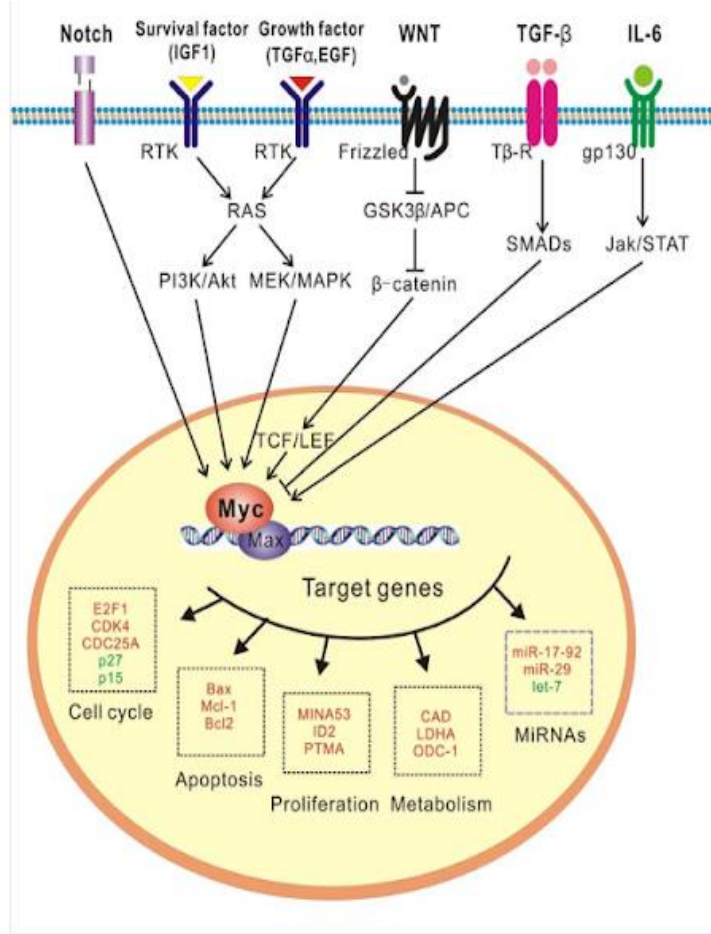
PP2A, defosforilasyon sağlayabilen tümör baskılayıcı bir enzimdir. Serin/treonin fosfatazi olup c-Myc'i defosforile edebilmektedir (Şekil 2.10). B56 α , düzenleyici alt ünite olup PP2A'yı tamamlamaktadır. PP2A, c-Myc'in post-translasyonel değişimini sağladıktan sonra ubiquitinasyon ve ardından bozulmasını sağlaması açısından önemli bir yere sahiptir. Bu süreç çerçevesi ile B56 α 'nın degrede olması ile birlikte, c-Myc'in ifadesinin çok fazla artması, durumlar arasındaki bağlantıyı göstermektedir (Arnold ve Sears, 2006; Liu ve Eisenman, 2012; Farrell vd.,2014). Farrington ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmada, kullanılan PP2A'nın küçük molekül aktivatörlerinin (SMAPs) uygulanımının, c-Myc etkisinde düşüş ve kanser hücrelerinin artmasında azalış görülmektedir. Bu azalışın Burkitt lenfoma, KRAS odaklı küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve üçlü negatif meme kanseri ve diğer çeşitli kanserlerde de görüldüğü belirtilmektedir (Farrington vd., 2020).



Şekil 2.10. c-Myc'nin PP2A tarafından post-translasyonel olarak düzenlenmesi (Pippa ve Odero 2020).

MAPK, WNT, Notch yolları gibi birden fazla ana proliferatif yolak altında yer alan c-Myc'in aktivitesi, belirtilen bu yollarından birinin engellenmesi durumunda kısmen azalabilmektedir (Şekil 2.11). Bu duruma örnek olarak, akciğer kanser hücrelerine ERK2 inhibisyonu ile G1-S ilerlemesine katılan proteinlerin ifadelerinde düşüş ve hücre döngüsünün G1 fazında durmasına yol açtığı açıklanmıştır (Young Lim

vd., 2016). PI3K/AKT/mTOR yolunu hedef almanın esasen daha etkili olduğu belirtilmektedir. Hücre içerisindeki c-Myc mRNA'sının ribozomal ifadesinin başlatılıp, uzaması için önemli bir yere sahip olan 4EBP1 ve S6 gibi farklı bileşenleri kontrol edebilen mTOR, aynı zamanda birçok farklı proteinin translasyonunu düzenlemektedir. PI3K, AKT, mTOR ve birbirleriyle etkileşim halinde olan PI3K/mTOR inhibitörleri geliştirilmiş ve klinik deneme çalışmalarının yapıldıkları belirtilmektedir (Fonseca vd., 2014; Alzahrani, 2019).



Şekil 2.11. c-Myc'in, sinyal mekanizmalarındaki konumu ve görevi (Huang vd. 2014).

Histon Deasetilaz Enzimleri (HDAC) birçok proto-onkogen ve kanser baskılayıcı genin ifadesini tekrar programlayabilmektedirler. Bunu kromatinde histon proteinlerinin deasetilasyonu ile gerçekleştirebilirler (Li ve Seto, 2016). Kanser hücrelerinin gelişme ve büyümesinde baskılayıcı etki sağlayan HDAC inhibitörleri, kanser baskılayıcı genlerin aktifleşmesini uyararak, c-Myc ile uyarılan kanser hücresi oluşum mekanizması üstünde etkili inhibisyon oluşturduğu açıklanmaktadır (Liu vd., 2007; San José-Enériz vd. 2019). HDAC ve c-Myc proteinleri, transkripsiyonun ve hücre çoğalmasının düzenli olmasında

görev üstlenmektedirler. Ek olarak, pankreas kanserinde görülen c-Myc'in, HDAC2 ifadesini artırıp, kanserli hücrelerin büyümesini engelleyen siklin G2 (CCNG2) ifadesini baskıladığı açıklanmıştır (Marshall vd.,2010). Diğer bir şekilde, c-Myc düşürülmesini sağlayan, HDAC6 inhibisyonu pankreas kanser hücrelerinin artmasını engellediği anlatılmaktadır (X-h F vd., 2019). Ek olarak lenfoma görünümünde ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda, HDAC inhibisyonu sonrasında c-Myc ifadesinin düştüğü saptanmıştır (Kretzner vd.,2011; Seo vd., 2011).

C-Myc transkripsiyonunu uyarıp, tümör hücrelerinin çoğalmasını destekleyen NFAT'lar, kalsinörin duyarlı transkripsiyon faktörlerinden oluşmuş bir gruptur. Pankreas kanser hücrelerinde NFAT1c'nin ifadesinin yüksek seviyelerde olduğu rapor edilmiştir. Pankreas kanseri hücrelerin çoğalmayı ve büyümeyi durdurması için, kalsinörin bloke edilmesi ya da NFAT1c seviyelerinin azaltılması gerekmektedir. Bu yol ile hücre döngüsünde G1 duraklamasına sebep olunup, kanser hücrelerinin gelişmesine güçlü bir şekilde engel olduğu söylenmektedir (Buchholz vd., 2006; Köenig vd., 2010).

c-Myc-MAX heterodimerizasyonunun, belirli genlerin promotöründeki E-kutusuna bağlandığını aynı zamanda c-Myc-MAX kombinasyonun engellenmesi sonucunda c-Myc'in onkogenik tesirinin baskılanacağı belirtilmişti. Bu bağlamda, Struntz ve arkadaşları KI-MS2-008 inhibitörü kullanarak, MAX'in homodimerini stabilize edip, c-Myc ile olan heterodimerizasyonunu engelleyebilmektedir. KI-MS2-008 asimetrik bir polisiklik laktam olup c-Myc-MAX oluşumunu önleyebilmektedir. Bu sistem ile, c-Myc tarafından kontrol edilen transkripsiyonu etkili şekilde azaltıp, yapılan fare denemelerinde, hepatoselüler karsinomu veya T hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi'ye sahip farelerin, kanser hücre boyutlarında azalmaların sağlanabileceği saptanmıştır (Struntz vd., 2019).

Literatürdeki çalışmalarda MYC'deki anormal etkinliği engellemek amacıyla çalışılan, MYC'deki post-translasyonel düzenleyicileri kontrol etme, epigenetik baskılama, MAX-MAX dimerizasyonunda MAX'i sekteye uğratma, dolaylı ve direkt yollardan düzenlemeye yönelik yaklaşımlar araştırılmıştır (Allen-Petersen & Sears, 2019; Janghorban vd., 2014; Struntz vd., 2019). MYC'e hedeflenen ilaç geliştirme ve klinik stratejiler için MYC'in floresan olarak takip edilmesi ve/veya teranostik yöntemler

ile görüntülemenin yanında terapötik etki sunulması önemlidir ve tez projesinin ana konusunu oluşturmaktadır.

2.3. Myc Problemleri

Küçük moleküller kullanılarak MAX-MAX dimerlerinin oluşumunu etkileyerek MAX'ı etkisiz hale getirme, MYC'in post-translasyonel organizatörlerini yönetme, MYC'deki karışıklıkları epigenetik susturma gibi yöntemlerle biçimlendirmeye özgü stratejiler araştırılmıştır (Allen-Petersen & Sears, 2019; Janghorban vd., 2014; Struntz vd., 2019). Bulunan stratejilerin bir çoğu MYC'e yönelik olmadığı, aynı zamanda hedeften ayrı teşkil oluşturma ve kapasitans yolları düzenlemektedir (Allen-Petersen & Sears, 2019). MYC inhibasyonu için çalışılan yöntemler, MYC ve MAX ikilisinde protein-protein etkileşimini (PPI) direkt şekilde bozmayı ya da DNA bağlanmasını engileyip gen transkripsiyonunu önlemeyi sağlamak üzerinedir (Allen-Petersen & Sears, 2019). İnhibitör geliştirmede yaşanan sınırlamalar myc probu geliştirme söz konusu olduğunda da geçerlidir.

Benzer şekilde iki esas güçlük bulunmaktadır:

1. Küçük moleküller ile MYC'i hedeflemek, belirli bir hedeflenebilir domaini olmaması sebebiyle güçlük arz etmektedir (Jin vd., 2013; Michel & Cuchillo, 2012; Yu vd., 2016).
2. Protein-Protein etkileşim yüzey alanlarının molekül ağırlığı az olan yapılarla hedeflenmesi zordur (Mabonga & Kappo, 2019).

Buna rağmen bu stratejilerin uygulanabilirliğini gösteren MYC-MAX dimerini baskılayabilen inhibitörler geliştirilebilmiştir ve benzer yaklaşımların / benzer modüllerin prob geliştirmede de kullanılabileceği düşünülebilir (Hart vd., 2014; Stellas vd., 2014; Choi vd., 2017; Castell vd., 2018; Han vd., 2019; Wang vd., 2007; Yin vd., 2003; Berg vd., 2002; Kiessling vd., 2006; Shi vd., 2009; Chauhan vd., 2014; Kiessling vd., 2007). Tarama yöntemlerinden, florasan polarizasyonu, Förster rezonans enerji transferi, bimoleküler floresan/lüsiferaz tamamlayıcılığı, elektroforetik mobilite değişimi ve elektroforetik mobilite değişimi MYC inhibitörlerini araştırmak için yararlanılmıştır (Berg vd., 2002; Choi vd., 2017; Hart vd., 2014; Kiessling vd., 2006; Wang vd., 2007; Shirey vd., 2021).

Shirley ve arkadaşları MYC görüntülemesini sağlayabilmek için yapısında MYC baskılayıcı KJ-Pyr-9 taşıyab bir floresan bir prob üretmişlerdir (Shirey vd., 2021). Florofor iskeleti olarak 7-dietilamino-4-metilkumarin kullanılmış ve emisyonun myc ile arttığı tespit edilmiştir. Yarışçı inhibitör, izotop değişim deneyleri gibi çeşitli farklı yöntemlerle bağlanma teyit edilmiştir. İnhibitör tarama çalışmalarında prob değişim analizlerinin kullanılabilirdiği gösterilmiştir ve bu sonuç myc gibi hedeflenmesi zor proteinlere karşı ilaç geliştirmede problemlerin önemini ortaya koymaktadır. Tez projesi kapsamında Shirley ve arkadaşlarının yaklaşımına benzer bir yöntem uygulanmak istenmiş, cMYC bağlanan inhibitör birim ile BODIPY floroforu birleştirilmiştir.

c-MYC proteinin yanı sıra çeşitli farklı amaçlarla c-MYC genini hedefleyen prob da çalışılmıştır. Bu proteini kodlayan genin G-dörtlüsü oluşturan yapısını (5-TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA-3 dizisine sahip) tanıyan floresan bir prob bu yapının oluşumu ve ilişkili transkripsiyonel yollar hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. c-MYC'in tümörlerde aşırı ekspresyon olduğu görülmüştür (Baudino vd., 2002; He vd., 1998). G-dörtlü yapıları oluşturan, DNA'da promotör alandaki guanin-zengini G-dörtlülerinin ipliğin transkripsiyonunu organize ettiği düşünülmektedir. Sentezlenen ligand veya problemler için muhtemel kenetlenme bölgeleri belirtilmiştir (Dai vd., 2011). Bu çalışmada kenetlenme bölgeleri için c-MYC Pu22 G-dörtlü yapısına yönelik problemler tespit edilmiş ve ticari anlamda bulunan floresan bulunan sentezler, içerdikleri ligand tutunma alanlarına konumlandırılarak uygunlukları incelenmiş ve A549 hücreleri ile *in vitro* floresan analizinde floresan cevaplar analiz edilmiştir. Sentezlenen yapının, c-MYC Pu22 G-kuadrupleksi ayırt ettiği konfokal lazer taramalı mikroskobu ile teyit edilmiştir (Zhai vd., 2019). Bu çalışma, G-dörtlüsü yapılarının genomda çok sayıda olması ve bu yöntemin cMYC protein seviyesi hakkında bilgi vermiyor olması nedeniyle tez projesindeki yaklaşımdan ayrılmaktadır.

Saç tokası bileşimindeki DNA sekanslarının otonom birleşim göstererek uzun DNA polimerleri inşa ettiği HCR (Hybridization Chain Reaction), enzimsiz bir arttırma yöntemidir (Gu vd., 2019). Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, DNAzyme ve cHCR (clamped HCR) ile Myc-Max proteinine duyarlı saptama mekanizması tasarlanmıştır. DNAzyme'ı etkinleştiren Myc-Max proteindir ve etkin DNAzyme, floresan yayıcı işaretli substratı kesmesi ile başlayan süreç nihayetinde floresan yayıcı birimden yoğun bir FRET sinyali ortaya çıkarmaktadır. Böylelikle, az yoğunluktaki

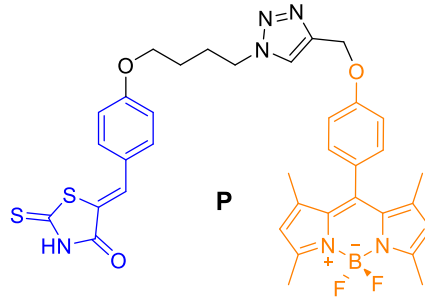
Myc-Max saptanması imakanlı olabilmektedir (Li vd., 2023). Başka bir çalışmada, c-MYC non-invaziv görüntülemesini sağlamak maksadıyla Fan Minogue ve arkadaşları Lsiferaz sistemi aracılığıyla fosforilasyona bağlı glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) ve c-MYC etkileşimini görüntülemeyi başarmışlardır (Fan Minogue v.d. 2010).

Bu tezde, teranostik bir yaklaşım ile, c-Myc'nin görüntülenmesi ve hedeflenmesinin kanser hücrelerinin çoğalması, büyümesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olacağı öngörülmüştür. c-Myc'nin inhibe edilmesi, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini durdurabilir ve tümör gelişimini önleyebilir. Sonuç olarak, c-Myc'nin hedeflenmesinde, lokasyonun belirlenmesi ve belirli genlerin ifaderlerindeki yukarı veya aşağı akış, mevcut tedavi yöntemlerine veya ilaç keşiflerinde daha odaklı ve etkili bir yaklaşımı temsil etmekte ve böylece kanser tedavisinde önemli bir strateji haline gelmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Prob Tasarımı

Tez kapsamında c-MYC onkoproteini görüntülemek ve lokasyonunu belirlemek amacıyla sentezlenecek olan hedef bileşik **P**'nin kimyasal yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir. Molekülün yapısında yer alan mavi renkte gösterilen birim c-myc'e bağlanan 10058-F4 türevi bir inhibitör yapısıdır ((Sheikh-Zeineddini vd., 2019; Lv vd., 2018; Sayyadi vd., 2020; Zhang vd., 2015) ve turuncu BODIPY yapısı floresan bilgi vererek c-myc lokasyonunun tespitine imkan verecektir (Loudet v.d. 2007). BODIPY bileşikleri yüksek kuantum verimleri, fotokararlılıkları ve biyolojik uygulamalara uygun özellikleri nedeniyle biyogörüntülemeye kullanılmaktadırlar. Bu bileşiklerin kolay türevlendirilebilir olması kullanımı kolaylaştırmaktadır. Proje kapsamında kullanılan türevi proparjil yapıda üretilmiş ve kolayca myc bağlanan birimin bir parçası ile birleştirilmiştir. Diğer taraftan prob yapısında yer alan mavi inhibitör birimi son aşamada rodaninden yola çıkarak üretilmiştir.



Şekil 3.1. Hedef prob **P**'nin kimyasal yapısı. Turuncu olarak gösterilen BODIPY biriminin ise floresan özelliği ile proteinin yeri hakkında bilgi vermesi beklenmektedir. Mavi olarak gösterilen birim c-MYC proteinine bağlanmaktadır.

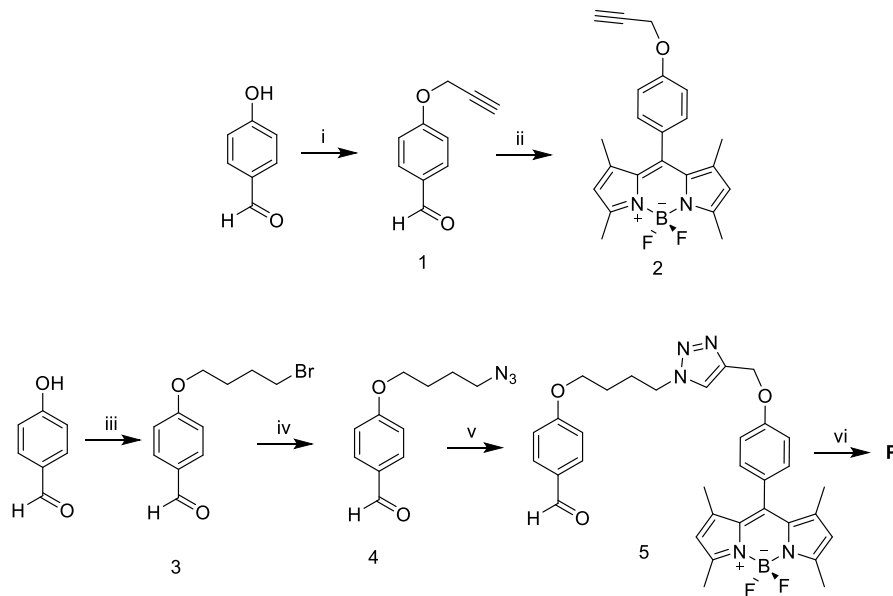
Prob yapısındaki inhibitörün seçilme amacı c-MYC proteinini tanıma olsa da, inhibisyon özelliğinden de faydalanılarak teranostik bir etki de gözlenmek istenmiştir. Teranostik yaklaşım görüntülemeyi tedavi ile birleştiren bir yaklaşımdır ve terapötik süreçlerin, hücre ve dokulardaki birikme, ilaç etkinliğinin eş zamanlı görüntülenmesine imkan vermektedir. Pankreas tümör hücrelerinin apoptozunu hızlandıran 10058-F4 ile yapılan tedavi, glikolizde kısmen baskılama ve pankreatik tümör hücre döngüsünün G1/S evresinde durmasını sağlamaktadır (Sheikh-Zeineddini vd., 2019; Lv vd., 2018; Sayyadi

vd., 2020; Zhang vd., 2015). Diğer bir deyişle, prob yapısındaki bu inhibitörün cMYC yolağını da düzenlemesi beklenmektedir.

Proje deney planı probun sentezi ve karakterizasyonu ile başlamakta olup A549 insan akciğer kanser hücrelerinde toksisite analizi yapılmış, cMYC floresan analizi akış sitometri ve konfokal mikroskobu ile gerçekleştirilmiş ve son olarak probun teranostik etki gösterme potansiyeli araştırılmıştır.

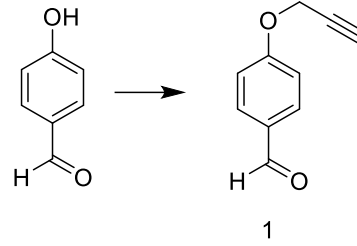
3.2. Prob Sentezi

P'nin sentez yolu Şema 1'de verilmiştir. Bileşiğin 6 basamakta sentezlenmesi planlanmıştır. Prob birimi geleneksel BODIPY sentez yöntemi kullanılarak üretilmiş olup bakır katalize klik tepkimesi ile **5** nolu bileşik elde edildikten sonra kondanzasyon yolu ile **P** ürünü elde edilmiştir. Bileşikler Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrumları ve/veya yüksek çözünürlüklü kütle analizi yapılarak (QTOF-LC/MS) karakterize edilmiştir. Karakterizasyon için Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki (BİTAM) Bruker Avance Neo 400 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) cihazı kullanılmıştır. Yüksek Çözünürlüklü Kütle (QTOF-LC/MS) analizleri Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nden (UNAM) temin edilmiştir.



Şema 3.1. Hedef bileşik **P**'nin sentez yolu. Proje kapsamında geliştirilen c-MYC proteinine bağlanarak protein lokalizasyonunu belirleyen ve ayrıca teranostik etki göstererek cMYC altyolağını etkileyen probun yapısı. Tepkime koşulları: i) propargil bromür, K_2CO_3 , DMF; ii) a. 2,4-dimetilpirol, TFA, DKM; a. p-kloranil; c. Et_3N , $BF_3 \cdot OEt_2$; iii) 1,4-dibromobütan, K_2CO_3 , DMF; iv) NaN_3 , DMSO; v) 2, $CuMCN_4PF_6$, DKM; vi) rodanin, AcOH, EtOH.

3.2.1. 1 Nolu Bileşğin Sentezi

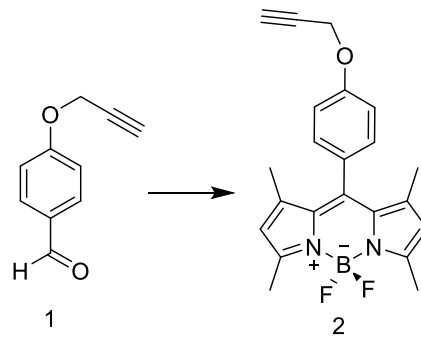


Şema 3.2. 1 Nolu bileşğin sentez şeması. Tepkime koşulları: DMF, K₂CO₃, Proparjil bromür, 16s, O.S.

1 nolu bileşik olan 4-(prop-2-yn-1-yloksi)benzaldehit literatürde var olan prosedürden faydalanılarak sentezlenmiştir (Erbas v.d. 2009). 4-Hidroksibenzaldehit (2.45 gr, 20 mmol) 15 mL dimetilformamid (DMF) içinde çözüldü. K₂CO₃ (5.5 gr, 40 mmol) reaksiyon karışımına eklendi. Proparjil bromür (1.5 mL (2,36 gr), 19,83 mmol) çözeltiye eklendi. Tepkime oda sıcaklığında 16 saat karıştırıldı. Daha sonra tepkimenin çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı. 4M HCl çözeltisi ile pH 4'e ayarlanan, 200 mL su ve 200 mL DKM ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra süzülüp, çözücü evaporatör altında uzaklaştırıldı. Sentezlenen maddeye hekzan ile yıkama işlemi yapıldı. DKM mobil fazı ile silika kolon kromatografisi yapılarak, saflaştırma gerçekleştirildi. Ürün toplanıp çözücüsü evaporatörde uçuruldu. Ürün miktarı, 1.784 gr olarak tartıldı. ¹H NMR ölçümü yapıldı ve maddenin %56 verimle saf olduğu belirlendi. ¹H NMR verisi literatür ile uyumluydu.

¹H NMR (400 MHz, Kloroform-*d*) δ 9.91 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.79 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H).

3.1.2. 2 Nolu Bileşğin Sentezi

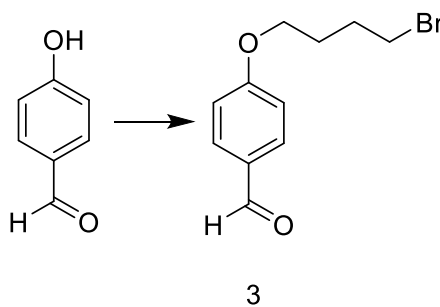


Şema 3.3. 2 Nolu Bileşik Sentezi. Tepkime koşulları: DKM, 2,4-dimetil pirol, TFA, p-kloranil, BF₃.OEt₂, Et₃N, O.S, 16s.

2 nolu bileşik literatürden faydalınarak sentezlenmiştir (Erbaş v.d. 2007). 500 mL'lik balon içerisine 300 mL DKM eklenip 40 dk DKM içerisine azot gazı verildi. Daha sonra balonun içinde azot gazı verilmeye devam edilirken, balona aldehit (**1** numaralı bileşik) (784 mg, 4.9 mmol) eklenip, çözdürüldü. Daha sonra balon içine 2,4-dimetil pirol (1.3 mL, 1.2 gr, 12,61 mmol) eklendi. Hemen ardından 8-10 damla Triflorasetik asit (TFA) eklendi. Balonun içine hava girişi olmaması için kapak ile kapatıldı. 1 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. 1 gün sonra aldehite göre eşit mol sayıda p-kloranil (1.40 gr, 5.70 mmol) eklendi ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Sonra 5 mL boron trifluorid-dietil eter kompleks ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) ve ardından 5 mL trietilamin (Et_3N) eklendi ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre dolduktan sonra 200 mL saf su, 100 mL DKM ile ekstraksiyon yapıldı. DKM fazına susuz sodyum sülfat eklendi ve süzüldü. Solvent vakum evaporatörde uçuruldu. Sentezlenen madde için 3:1 hekzan, etil asetat sistemli silika kolon kromatografisi kurulup, karışım sisteme katı ekim yöntemi ile eklendi. İstenilen ürün kolon sisteminde saf toplanıp, çözücü evaporatörde uçuruldu. Elde edilen madde miktarının 694.1 mg olduğu belirlendi. Madde saflığını teyit etmek için ^1H NMR spektrumu alındı ve maddenin % 37 verimle saf olarak elde edildi. ^1H NMR verisi literatür ile uyumluydu.

^1H NMR (400 MHz, Kloroform-*d*) δ 7.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.76 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.55 (m, 6H+1H), 1.42 (s, 6H).

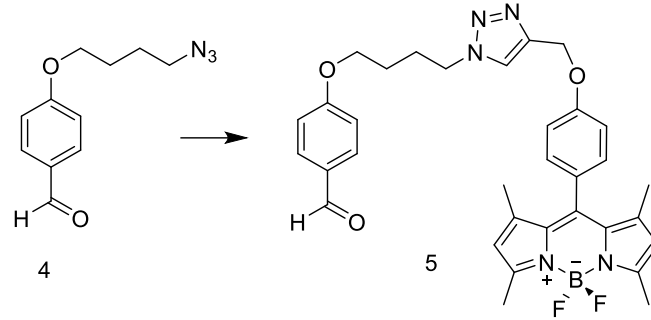
3.1.3. 3 Nolu Bileşiğin Sentezi



Şema 3.4. 3 Nolu Bileşiğin Sentezi. Tepkime koşulları: DMF, K_2CO_3 , 1,4-dibromobütan, 18s, O.S.

4-Hidroksibenzaldehit (2.44 gr, 20 mmol) 20 mililitre (mL) dimetil formamid (DMF) içinde çözüldü. K_2CO_3 (5.5 gr, 39,79 mmol) eklendi. 2 mol eşdeğer 1,4-dibromobütan (4.8 mL, 40 mmol) eklenerek 18 saat (s) boyunca oda sıcaklığında (O.S)

3.1.5. 5 Nolu Bileşiğin Sentezi



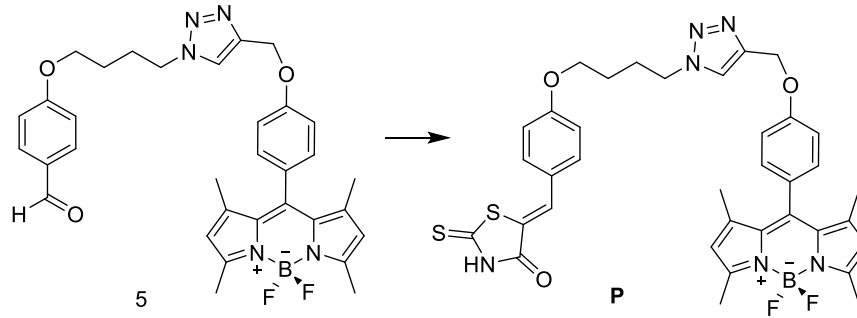
Şema 3.6. 5 Nolu bileşiğin sentezi. Tepkime koşulları: DKM, O.S, CuMeCN₄PF₆

129 mg 0.59 mmol **4** nolu bileşik ve 75 mg 0.19 mmol **2** nolu bileşik (BODIPY), 10 mL DKM içinde çözdürülüp 80 mg Tetrakis(asetonitril)bakır(I) heksaflorofosfat (CuMeCN₄PF₆) eklendi. Oda sıcaklığında gece boyu karıştırıldı ve TLC ile ürün oluşumu takip edildi. Ekstraksiyon hunisine DKM ve EDTA (1 g) içeren saf su eklenip, ekstraksiyon yapıldı. DKM kısmı ayrılıp sodyum sülfat ile kurutulup, süzdürüldü ve çözücü vakum evaporatörde uçuruldu. Methanol : Etilasetat (hacimce 5:95) mobil fazı ile silika kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak mobil karışım saflaştırıldı. Hedeflenen madde 32 mg toplandı ve saflığını teyit etmek için ¹H NMR spektrumu alındı. Madde % 25 verimle elde edildi. Bileşiğin DKM içinde ve asidik ortamda bozunabileceği tespit edildi.

¹H NMR (400 MHz, Kloroform-*d*) δ 9.89 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.96 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.27 – 2.06 (m, 2H), 1.91 – 1.80 (m, 2H), 1.42 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 190.75, 163.66, 158.80, 155.38, 143.85, 143.05, 141.52, 132.04, 130.14, 129.35, 127.76, 122.68, 118.92, 115.39, 114.68, 67.23, 62.10, 51.11, 50.05, 27.14, 26.07, 14.56.

3.1.6. P Kodlu Bileşğin Sentezi



Şema 3.7. P kodlu bileşğin sentezi. Tepkime koşulları: Etanol, AcOH, NaOAc, 1s, 80°C.

2-Tiyoakzotiazolidin (Rodanin) (80 mg, 6 mmol) tartılıp balona alındı. 5 nolu bileşik (32 mg, 0.05 mmol) balona eklendi. 4 mL etanol, 1 mL asetik asit (AcOH) ve 200 mg sodyum asetat eklendi. 60°C'de 30 dk karıştırıldı ve TLC bakıldı. **5** nolu bileşik bitene kadar karıştırma işlemine devam edildi. Daha sonra DKM ile ekstraksiyon yapıldı ve DKM ayrılıp sodyum sülfat ile kurutulup, süzdürüldü. Çözücü vakum evaporatörde uçuruldu. %5 Methanol – DKM ile TLC bakıldı. Başlangıç fazla olduğu için madde 25 mL'lik balona alındı. 50 mg daha Rodanin, 2 mL asetik asit, 5 mL Etanol, 200 mg sodyum asetat eklenerek, 70°C'de 1 gece karıştırıldı. 1 gün sonra TLC bakıldı ve tam oluşmadığı tespit edildi. Tekrar 1 mL asetik asit, 200 mL sodyum asetat, 1 saat 80°C'de, soğutucu balon üzerine takılarak karıştırıldı. 1 saat sonra tekrar TLC bakıldı ve madde oluşumu görüldü. Saf elde edebilmek için %5 Methanol – DKM sistemi ile preparatif TLC yöntemi ile saflaştırma yapıldı. %20 Verimle elde edilen madde için NMR, ¹³C NMR, kütle analizi yapıldı. Maddenin saf olarak elde edildiği tespit edildi.

¹H NMR (400 MHz, Kloroform-d) δ 7.69 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.96 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.25 – 2.12 (m, 2H), 1.91 – 1.80 (m, 2H), 1.41 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 192.92, 168.33, 160.99, 158.81, 155.40, 143.87, 143.06, 141.51, 133.38, 132.81, 131.79, 129.36, 127.78, 125.89, 122.68, 122.15, 121.17, 115.40, 67.21, 62.11, 51.22, 50.06, 33.23, 31.94, 30.95, 29.71, 28.56, 27.14, 26.19, 26.08, 24.23, 22.70, 14.57, 14.13, 0.00.

QTOF-LC/MS: Teorik [M+H]⁺ 711.22004, deneysel, 711.22536, Δ = 7.48 ppm

3.2. Spektroskopik Analizler

P probunun fotofiziksel karakterizasyonu 3 mL'lik kuartz küvetler kullanılarak Ultraviyole, Görünür ve Yakın Kızılötesi Spektrometresi (Shimadzu UV-3600 Plus) ve Floresans Spektrometresi (Agilent Cary Eclipse) cihazlarında dimetilsülfoksit (DMSO) çözücüsü içinde temin edildi. Analizler 3 mL hacim içinde alındı. Floresans spektrumu 490 nm'den uyarılarak elde edildi. Ekstinksiyon katsayısı Formül 1'de verilen Beer-Lambert kuralı uygulanarak hesaplandı.

$$A = \epsilon Cl \quad \text{Formül 1}$$

Formülde A çözeltinin pik dalgaboyunda UV-Vis absorbands değeri, ϵ ekstinksiyon katsayısı ve l ise ışık yolu uzaklığıdır. Bileşiğin DMSO içinde kuvantum verimi 488 nm'den uyarılarak ve spektral veriler referans bileşik Rodamin 6G ile kıyaslanarak aşağıda verilen Formül 2 kullanılarak belirlendi. Bu referans bileşiğin etanol içindeki floresan kuvantum verimi (ϕ_F) 0.95'dir (Magde v.d. 2002). Hesaplama dimetilsülfoksit ve etanol çözücülerinin refraktif indisleri (n) sırasıyla 1.4793 ve 1.361 olarak alınmıştır.

$$\phi_F = [\phi_F(\text{ref}) * A(\text{ref}) * I(P) * n^2(P)] / [A(P) * I(\text{ref}) * n^2(\text{ref})] \quad \text{Formül 2}$$

Verilen formülde A değeri uyarma dalgaboyu olan 488 nm'deki absorbands, I değeri ise 488 nm ile 800 nm'deki emisyon spektrumunun alanıdır. Alan Origin yazılımı kullanılarak alınmıştır.

P bileşiğinin biyolojik ortamdaki gibi sulu ortamdaki çözünürlüğünü test etmek için 50% su içeren DMSO çözeltisi içinde 5 μM **P** çözeltisi hazırlandı. Floresan spektrumu 1 mL'lik kuartz küvet içinde 500 nm'den uyarılarak temin edildi. Sonrasında kademeli olarak 1 mL'lik küvetten 250 μL çözelti alınıp madde içermeyen DMSO su karışımı ile seyreltildi. Elde edilen grafiklerde 511 nm'deki emisyon şiddetinin derişime göre grafiği çizdirilerek oluşan grafiğin lineeritesi, dolayısıyla uygulama dozundaki sulu ortamda çözünürlük tespit edildi.

3.3. Hücre Sitotoksosite Deneyleri

Hücre kültürü çalışmaları insan akciğer kanseri (A549) hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücrelere %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve % 0.1 gentamisin (Sartorius) içeren HG-DMEM (pirüvatlı) (Sigma) besiyerinde 37°C, %5 CO₂ inkübatörde (Nüve EC 160) inkübe edildi. Hücre sayısı Thoma Lamı kullanılarak Formül 3'e göre belirlendi.

Hücre sayısı = Ortalama hücre sayısı x Sulandırma Faktörü x 10⁴ hücre/mL
(Formül 3)

Son hücre yoğunluğu 5x10³ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakaya 4 replika ekim yapıldı, hücreler 1 gün boyunca yukarıda belirtilen koşullarda inkübe edildi, plaka yüzeyine tutunması beklendi. İnkübasyon sonrasında besiyerler kuyudan çekildi ve farklı dozlarda hazırlanan **P** bileşiği besiyer ortamında uygun dozlara seyreltilerek kuyulara eklendi. **P** stok çözeltisi DMSO içinde hazırlandı ve DMSO oranının kültürde 1%'nin altında olmasına özen gösterildi. Hücreler 37°C inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Besiyerler boşaltıldı ve son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazolyum Bromür (MTT) taze besiyerinde hazırlanıp karanlıkta eklendi. 4 saat inkübe edildi. Besiyerler boşaltılıp 100 µL DMSO eklendi, oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı ve 10 dk inkübe edildi. Örneğin 570 nm'deki absorbansları mikropilaka okuyucu ile ölçüldü. Elde edilen veriler uygulama yapılmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslanarak verildi.

3.4. Akış Sitometrisi Deneyi

Her kuyuda 350.000 hücre olacak şekilde 6-kuyulu plaklara A549 hücresinin ekimi yapıldı. Kuyuların bir grubuna 5 µM olacak şekilde **P** ajanı içeren taze besiyer eklendi. 2 saat inkübasyona bırakıldı. Kuyulardan besiyeri çekilip, hücreler toplandı. Bu aşamada 750 µL Fosfat Tamponlu Salin (PBS) eklenerek kuyular yıkandı. PBS çekildi ve 750 µL Tripsin eklendi. Sonra 5 dakika inkübasyon edildi. Üzerine 1.5 mL besiyer eklendi. Falconlar etiketlenir ve kuyulardaki hücreler falkonlara alındı. 5 dakika 1000 rpmde santrifüj edildi. Besiyeri ve tripsin uzaklaştırıldı. Üzerine 500 µL %100 ethanol vorteks üzerinde damla damla eklendi. +4 de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Etanol boşaltılıp ve 500 µL PBS eklenildi. 1000 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı. PBS boşaltıldı ve üzerine 500 µL Tween 20 eklendi (PBS içerisinde %0.5'lik). Oda sıcaklığında 20 dakika

inkübe edildi. Tween 20 boşaltıldı. İki sefer PBS ile yıkandı (5dk 1000 rpm santrifüj). PBS boşaltılıp, üzerine 500 µL Propidium Iodide (PI) eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra 5 dk 1000 rpm’de santrifüj edildi. PI boşaltılıp, PBS ile 2 sefer yıkama yapıldı. Daha sonra 2 numaralı kuyuya 500 µL bloklama çözeltisi (%15 FBS içeren PBS içinde) eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta karıştırıcıda çalkalandı. 500 µL PBS eklenerek +4’e kaldırıldı. Bloklama aşamasından sonra 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra bloklama solüsyonu döküldü ve c-myc antikoru eklenecek gruba 1:500 oranında hazırlanan myc primer antikordan 500 µL eklendi ve 1 saat karıştırıcıda karıştırıldı. Sonrasında primer antikolar boşaltılıp ve Tween 20 içeren Tris Tamponlu Salin (TBST) ile 2 yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında Floresan İzotiyosiyanat (FITC) sekonder antikor (İnvitrogen) eklenip, 1 saat inkübe edilmiştir. Akış sitometri analizleri BİTAM bünyesinde yer alan Beckman Coulter- Cytoflex B4R0V0 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5. Konfokal Görüntüleme Analizi

Konfokal hücre görüntüleme analizi için, her kuyuda 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. siRNA uygulanacak grubun işlemleri kitte belirtilen prosedür takip edilerek yapılmıştır (sc-29226). Kontrol grubuna siRNA hariç aynı işlemler uygulanmıştır. Daha sonra kuyulara (kontrol grubu ve siRNA uygulanmış grup) son derişim 5 µM olacak şekilde P molekülü eklendi ve 2 saat inkübe edilmiş ve sonrasında fiksasyon aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada kuyular %70 etanol ile fikse edilmiştir. Bunun için kuyulara 300 µL %70’lik etanol eklenip, 30 dk, +4°C’de beklenilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyular PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra DAPI boyama işlemine geçildi. DAPI boyasından (1 µg/mL) her bir kuyuya 300 µL eklenmiştir. Kuyuların üzeri folyo ile sarılıp karanlık ortamda, oda sıcaklığında 10-15 dk bekletilmiştir. Süre sonunda kuyular 3 kez PBS ile yıkandı ve son yıkamadan sonra PBS eklenip konfokal mikroskobu (Zeiss) ile görüntüleme gerçekleştirildi. Elde edilen görüntüler ImageJ ile kantifiye edildi ve gruplar arasındaki istatistiki analiz GraphPad yazılımı kullanılarak öğrenci t testi ile analiz edildi. P değeri 0.05’den küçük veya eşit olan karşılaştırmalar istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. Diğer taraftan çekirdek boyası DAPI ile kolokalizasyon analizi ImageJ JACoP plugin yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6. RT-PCR Analizi

RT-PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi, myc altyolaklarında yer alan genlerin RNA düzeylerini karşılaştırmak için yapılmıştır. Tezde hedeflenen β -ACTİN, SNAIL, GLUT1, C-MYC, CCND1 gen bölgesine özgü primerler kullanılarak DNA örnekleri analiz edilmiştir. Kullanılan primerlerin sekansları Tablo 1’de verilmiştir. β -Aktin referans gen olarak kullanılmıştır. 24 Saat boyunca P ile inkübe edilen veya herhangi bir uygulama yapılmayan hücrelerden RNA izole edilmiş, izole edilen RNA’lar NanoDrop cihazında ölçülüp konsantrasyonu ve saflığı kontrol edildikten sonra cDNA sentezlenmiştir. PCR reaksiyonu NucleoGene Qpcr sybr Green Master Mix (2x) protokolüne göre hazırlanıp, toplamda 10 μ L hacminde hazırlanmış ve şu bileşenler içermektedir; Syber green 5 μ L, 2,5 μ L dH₂O, olarak Master Mix hazırlanmış ve son olarak 2 μ L cDNA kuyucuklar eklenmiştir. Cihaz olarak Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR cihazı kullanılmıştır. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hesaplanarak analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiki analiz GraphPad yazılımı kullanılarak öğrenci t testi ile analiz edildi. P değeri 0.05’den küçük veya eşit olan karşılaştırmalar istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 3.1 RT-PCR analizinde kullanılan primerler

Gen	Primer 1	Primer 2
c-MYC	CCT GGT GCT CCA TGA GGA GAC	CAG ACT CTG ACC TTT TGC CAG G
CCND1 (siklin D1)	TCTACACCGACAACCTCCATCCG	TCTGGCATTGTTGGAGAGGAAGTG
GLUT1	GCTACAACACTGGAGTCATCAA	ACTGAGAGGGACCAGAGC
SNAIL	TGCCCTCAAGATGCACATCCGA	GGGACAGGAGAAGGGCTTCTC
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC
ACTB	CAC CAT TGG CAA TGA GCG GTTC	AGG TCT TTG CGG ATG TCC ACG T

3.7. Hücre Göçü Analizi

Hücre göçü deneyi, P bileşiğinin anti-metastatik etkisini anlamak amacıyla insan akciğer adenokarsinom kökenli A549 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler, %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %0.1 gentamisin (Sartorius) içeren, pirüvat ilaveli HG-DMEM (Sigma) besiyerinde kültüre edilmiştir. Hücreler, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Nüve EC 160) uygun koşullarda inkübe edilmiştir.

Hücre sayımı, Thoma lamı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve her bir kuyuda 10×10^4 hücre olacak şekilde 24'lü well plate'lere ekim yapılmıştır. Hücreler, 24 saat boyunca inkübasyonda bırakılarak konfluensin sağlanması beklenmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyuda steril 200 μ L pipet ucu kullanılarak yukarıdan aşağıya doğru çizik oluşturulmuş ve böylece yapay bir yara alanı meydana getirilmiştir. Ardından, mevcut besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) ile iki kez yıkanarak artık hücreler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Kontrol grubuna herhangi uygulama yapılmazken bir grup hücreye 5 μ M dozda taze besiyer ile uygulama yapılmıştır. Çizik oluşturulduğu anda mikroskop altında ilk görüntüler alınmış ve bu zaman noktası t_0 olarak kabul edilmiştir. Aynı kuyular, 24. ve 48. saatlerde tekrar mikroskop altında görüntülenmiş ve hücre göçü süreci takip edilmiştir.

Görüntüler, ImageJ yazılımı ile analiz edilmiş; her zaman noktasında dört farklı alandan elde edilen yara alanı ölçümleri kullanılarak ortalama yara alanları ve standart sapmalar hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ile P probunun hücrelerinin göç kapasitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Yara alanındaki değişim ilk yara alanına normalize edilerek, Formül 4 kullanılarak her grup için ayrıca hesaplanmıştır:

$$\text{Yara Alanı} = (\text{Belirli Zamandaki Yara Alanı}) / (\text{Başlangıç Yara Alanı}) * 100$$

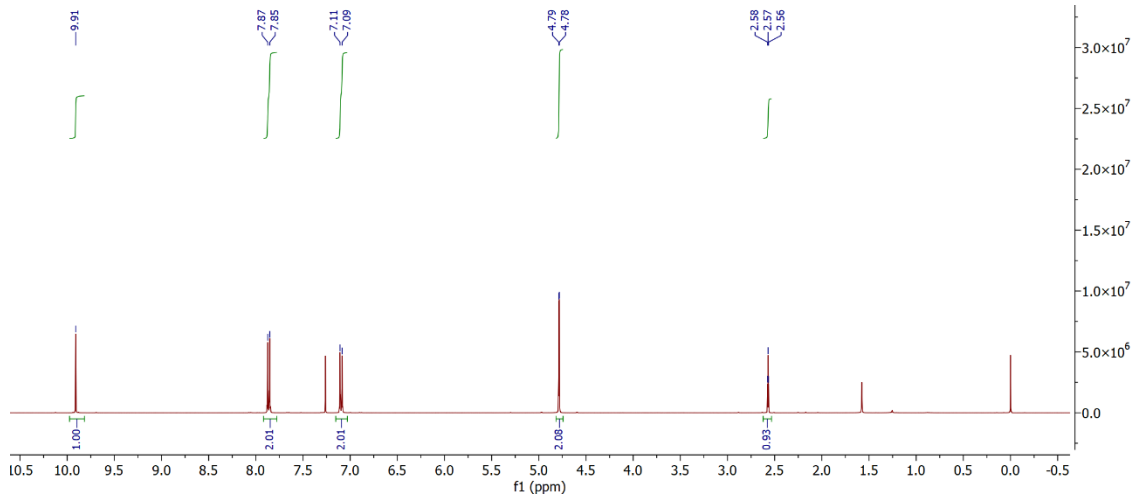
Formül 4

Hesaplanan alanların istatistiksel analizi GrapPad öğrenci unpaired t testi kullanılarak analiz edilmiş, p değeri 0.05'in üzerinde olan karşılaştırmalar anlamlı kabul edilmiştir.

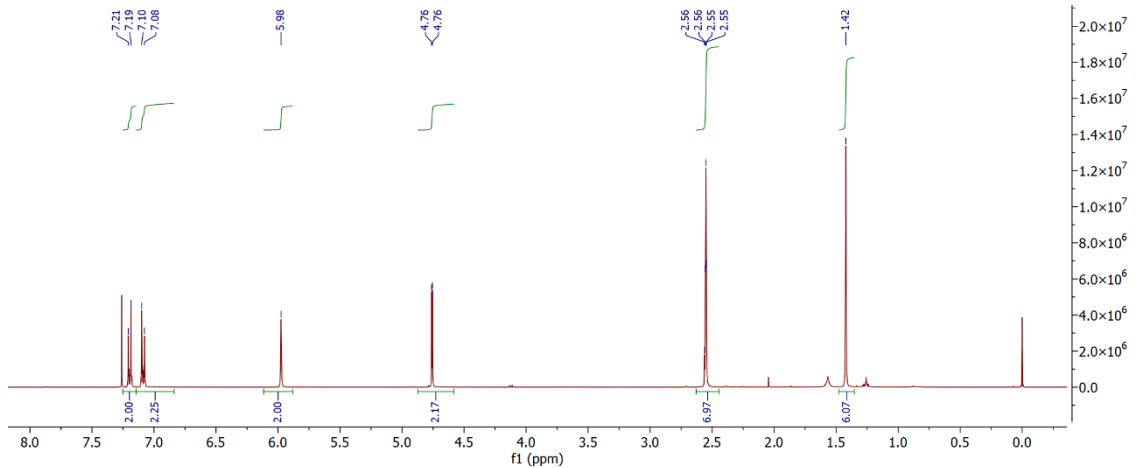
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Bileşiklerin Karakterizasyonu

Altı basamaklı sentez sonrası elde edilen bileşikler NMR yöntemi ile karakterize edilmiştir. 1 nolu bileşik literatüre uygun şekilde üretilmiştir (Erbaş v.d. 2007). Saflaştırma işlemi sonrası elde edilen spektrum Şekil 4.1’de verilmiştir. 4-hidroksibenzaldehide proparjil biriminin bağlanabildiği oluşan yeni maddedeki 4.79 ve 2.57 ppm’de gelen proparjil pikleri ile teyit edilmiştir. Benzer şekilde BODIPY bileşiğinin başarıyla elde edildiği 9.91 ppm’deki aldehit pikinin yok olmasından, 5.98, 2.56 ve 1.42’deki yeni pirolük piklerin de spektrumda bulunmasından anlaşılmaktadır (Şekil 4.2).

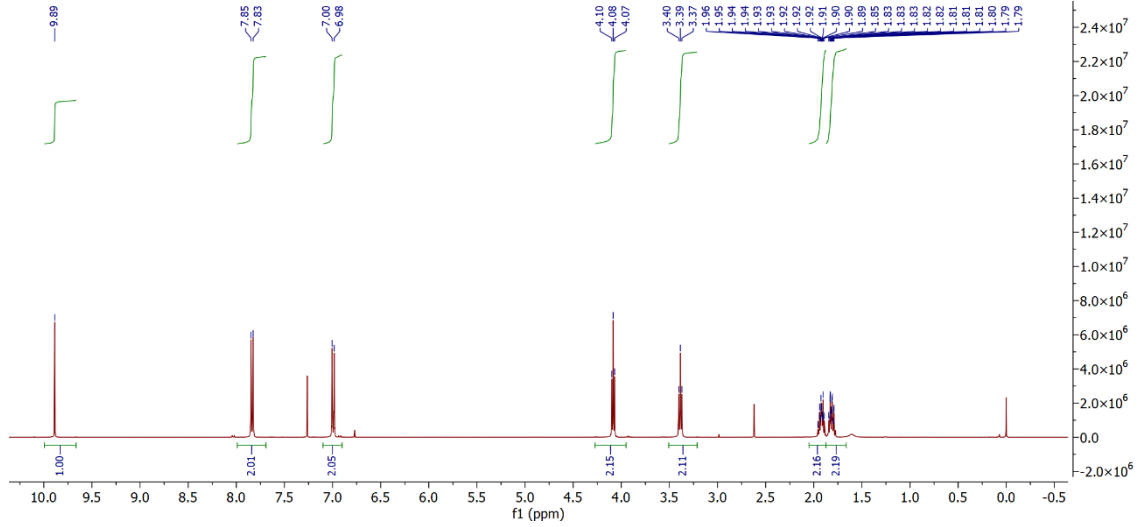


Şekil 4.1. 1 nolu bileşiğin ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3)

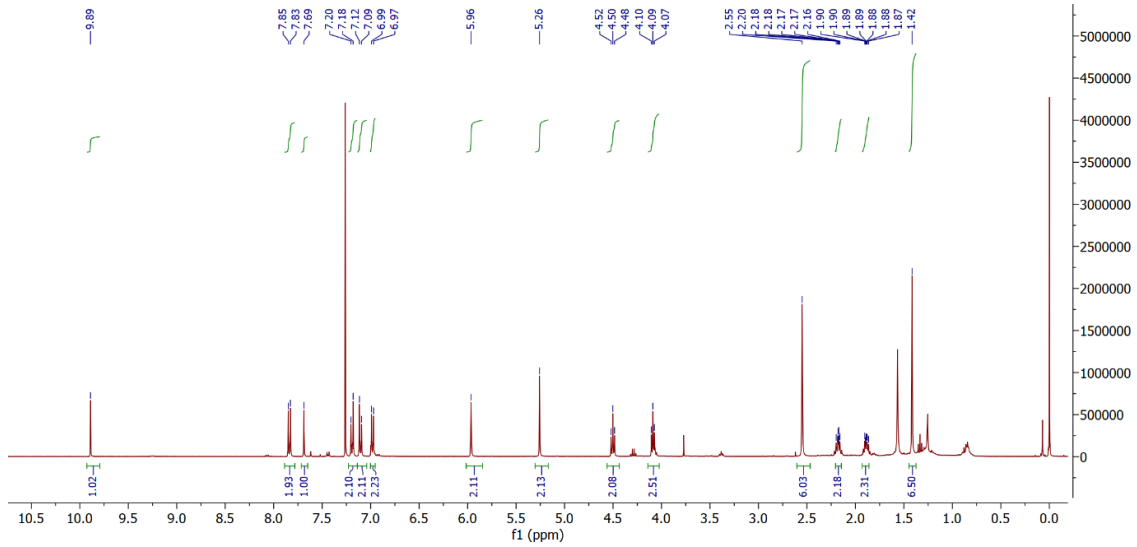


Şekil 4.2. 2 nolu bileşiğin ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3)

3 nolu bileşik bileşik literatüre göre sentezlenmiş ve sonrasında **4** nolu bileşiğin sentezine geçilmiştir. Sentez yüksek verimle gerçekleşmiş olup yapıya azid biriminin katıldığı 3.39 ppm'deki sinyal ile teyit edilmiştir. **4** nolu bileşiğin ^1H NMR spektrumu Şekil 4.3'de verilmiştir.

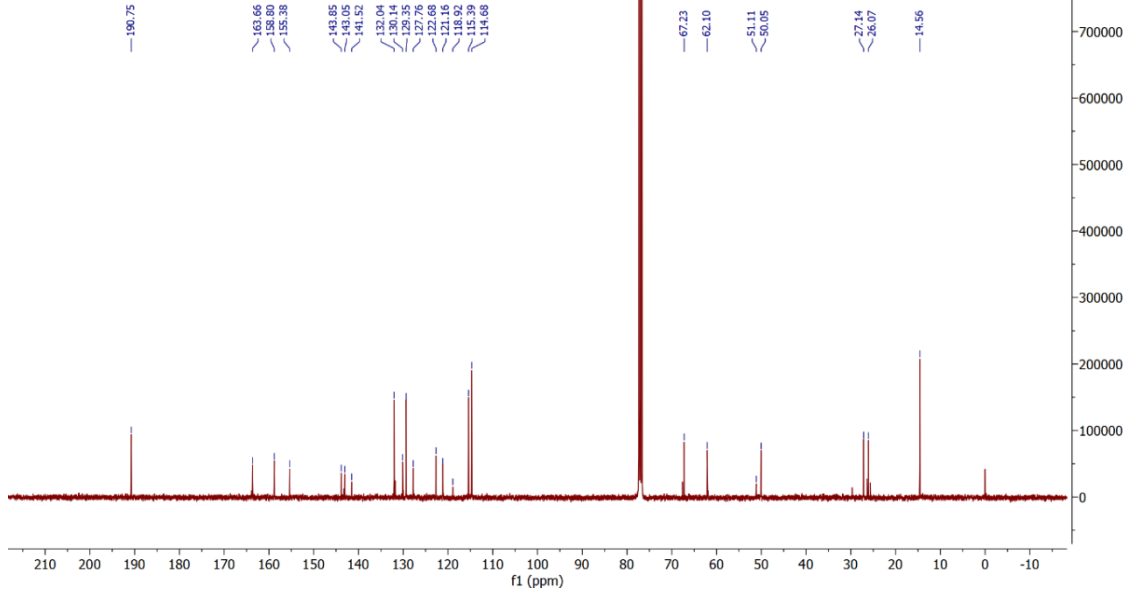


Şekil 4.3. **4** nolu bileşiğin ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3)



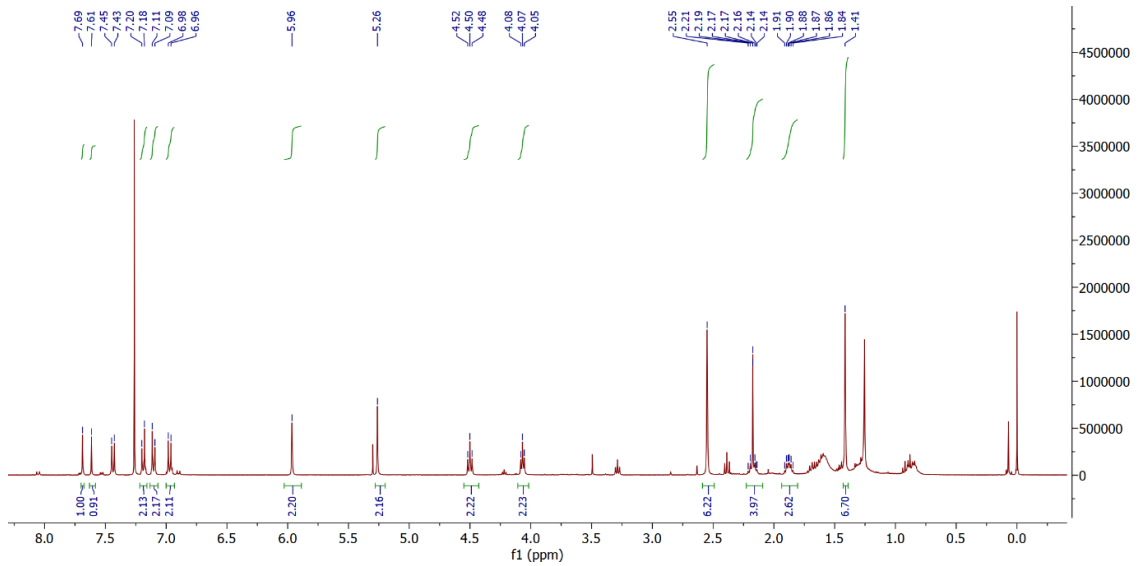
Şekil 4.4. **5** nolu bileşiğin ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3)

5 nolu bileşik bileşik **2** ile **4** nolu bileşiklerin bakır katalizörlüğünde siklokatalım yöntemi ile elde edilmiştir. Oluşan üründe triazol protonu singlet olarak 7.69 ppm'de gelmektedir ve bu ürünün olduğunun göstergesi kabul edilmiştir. ^1H NMR spektrumu Şekil 4.4'de verilmiş olup ^{13}C NMR spektrumu Şekil 4.5'de verilmiştir.

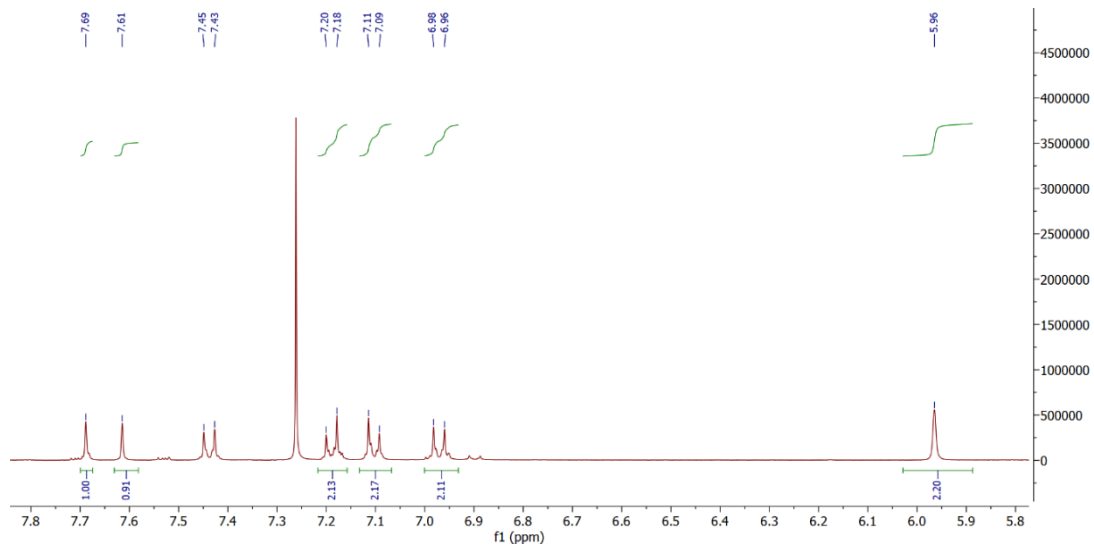


Şekil 4.5. 5 nolu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3)

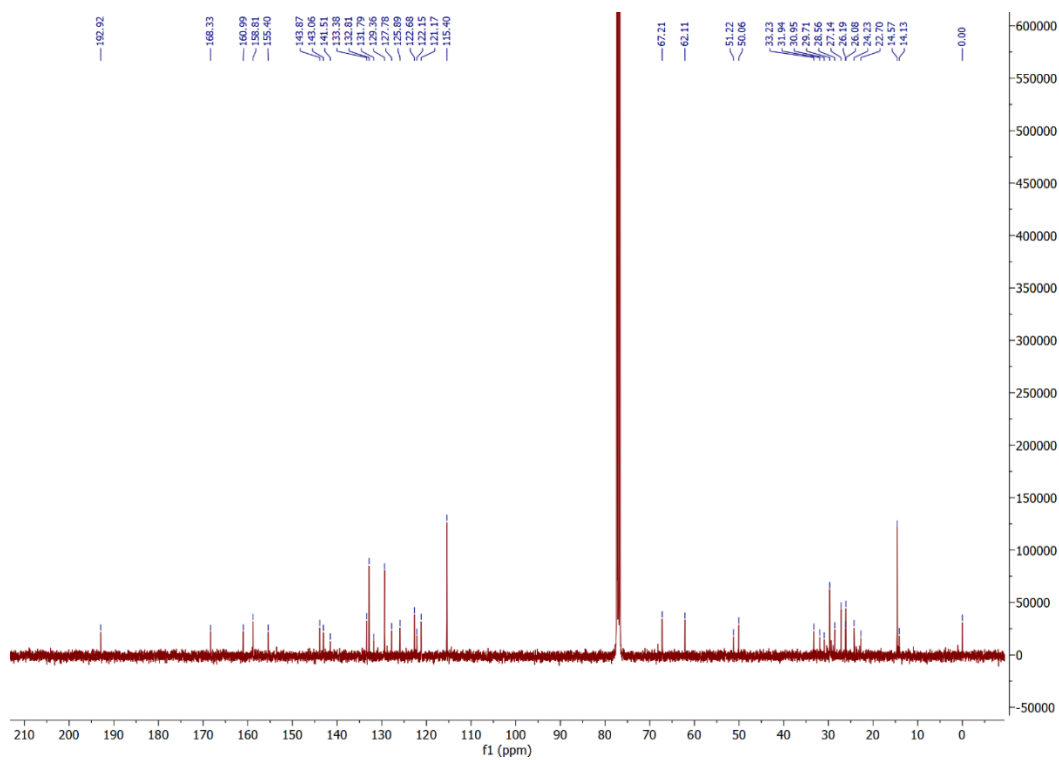
P kodlu prob ise rodanin ile **5** nolu bileşiğin kondanzasyonundan elde edilmiştir. Oluşan üründe stiril bağı protonu singlet olarak 7.61 ppm'de gelmektedir ve bu ürünün olduğunun göstergesi kabul edilmiştir. ^1H NMR spektrumu Şekil 4.6 ve 4.7'de verilmiş olup ^{13}C NMR spektrumu Şekil 4.8'de verilmiştir. Bileşik ayrıca yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi ile (QTOF-LC/MS) karakterize edilmiştir, 7.48 ppm tutarlılıkla kütle teyit edilmiş ve sonuç Şekil 4.9'da verilmiştir.



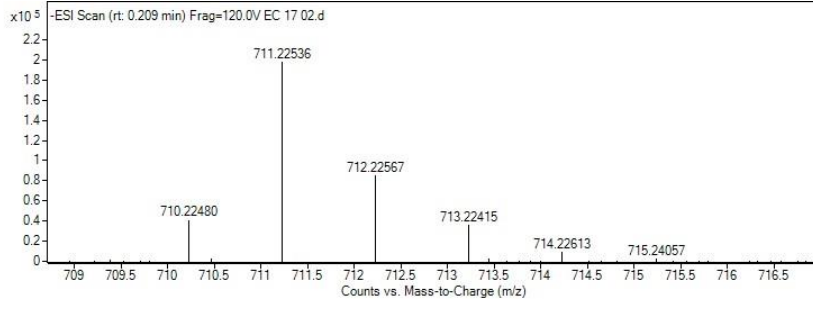
Şekil 4.6. **P** kodlu prob bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3)



Şekil 4.7. P kodlu prob bileşiğinin genişletilmiş ^1H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3)

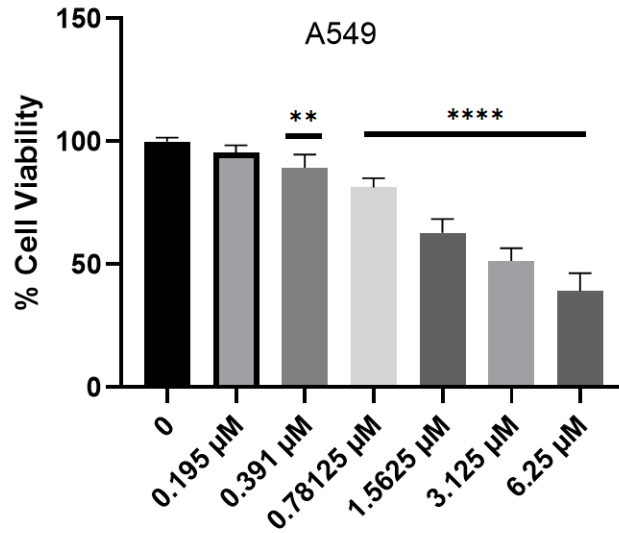


Şekil 4.8. P kodlu prob bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (101 MHz, CDCl_3)



Şekil 4.9. P kodlu prob bileşiğinin QTOF-LC/MS kütle spektrumu

4.2. Hücre Sitotoksosite Deneyleri – MTT Testi Sonucu

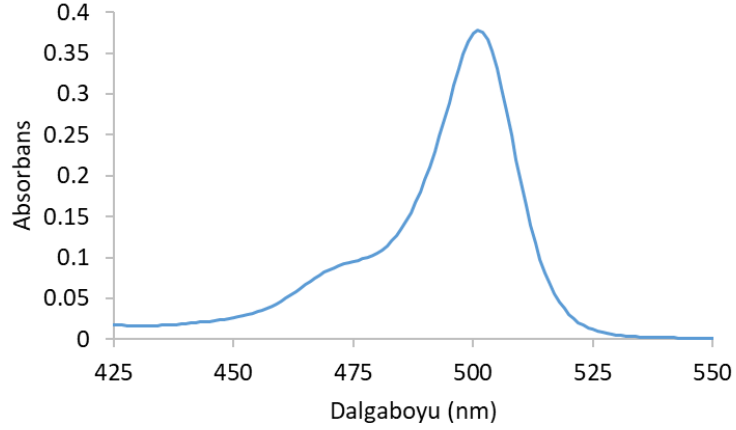


Şekil 4.10. P molekülünün A549 hücrelerine olan toksisitesi (n = 4)

Sentezlenen **P** prob molekülünün in vitro sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı kullanılarak MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) hücre canlılık testi uygulanmıştır. Hücrelere 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0-6.25 µM arası) bileşik uygulanmıştır. Uygulanan tüm konsantrasyon aralığında, hücre canlılık oranlarında 0.391 µM'dan başlayarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

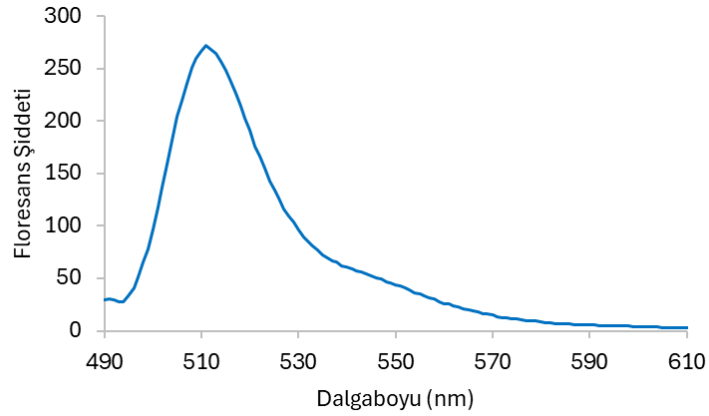
Sonuçlar, maddeye ait IC₅₀ değerinin 4 µM olduğunu göstermektedir.

4.3. Spektroskopik Analizler



Şekil 4.11. P molekülünün DMSO çözücüsü içinde UV-Vis absorbans spektrumu. Pik absorbans değerinin 501 nm’de olduğu değerlendirilmektedir.

Spektroskopik analizleri gerçekleştirilen **P** bileşiğinin UV-Vis spektrumunda, sentezlenen prob molekülün dimetilsülfoksit çözücüsü içinde pik absorbans değerinin 501 nm dalga boyunda olduğu ve bu bölgedeki absorbans şiddeti değerlendirilerek Beer Lambert kuralı ile hesap yapıldığında ekstinksiyon katsayısının (ϵ) $78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olduğu bulunmuştur.

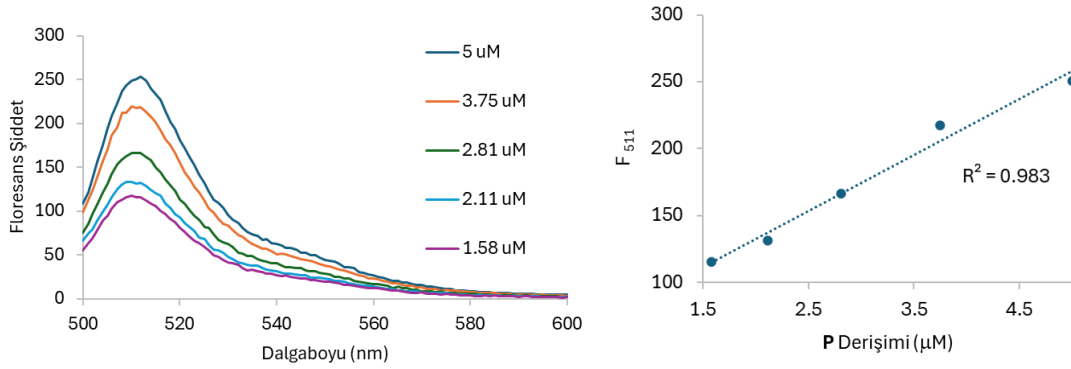


Şekil 4.12. P probunun DMSO içinde 490 nm’den uyarılarak elde edilen floresans spektrumu. Spektrumun 511 nm’de pik değere sahip olduğu görülmektedir.

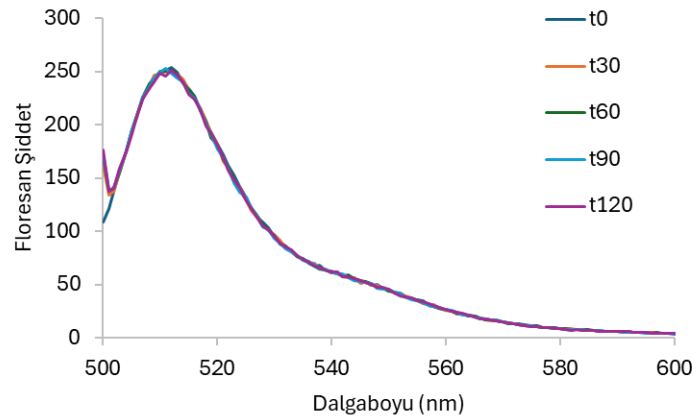
Prob **P**’nin 490 nm’de uyarılarak DMSO çözücüsü içinde elde edilen spektrumu Şekil 4.12’de verilmiştir. Emisyon piki 511 nm olarak bulunmuş olup Stokes kayması 10 nm’dir ve görece küçük bir kaymadır. Bu emisyon dalgaboyu ve kayma değeri BODIPY bileşiklerinde çoğunlukla gözlemlenen seviyededir. Bileşiğin Rodamin 6G referans

bileşiği ile karşılaştırılarak hesaplanan floresan kuantum verimi DMSO içinde 0.42 olarak belirlenmiştir.

Probun sulu ortamda çözünürlüğünü test etmek için $5 \mu\text{M}$ **P** çözeltisi DMSO ve su karışımında çözüldü (hacimce eşit). Çözelti derişiminde kısmi azaltma yapılarak alınan spektrumların 511 nm 'deki floresan değişimi derişime göre çizdirildiğinde lineer bir korelasyon olduğu ($R^2 = 0.983$) ve uygulama dozu olan $5 \mu\text{M}$ 'da bileşiğin yeterince çözüldüğü tespit edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. **P** probunun DMSO ve su içinde (hacimce 50%), farklı derişimlerde 500 nm 'den uyarılarak elde edilen floresans spektrumu. F_{511} değeri bileşiğin 511 nm 'deki floresan şiddetini ifade etmektedir.

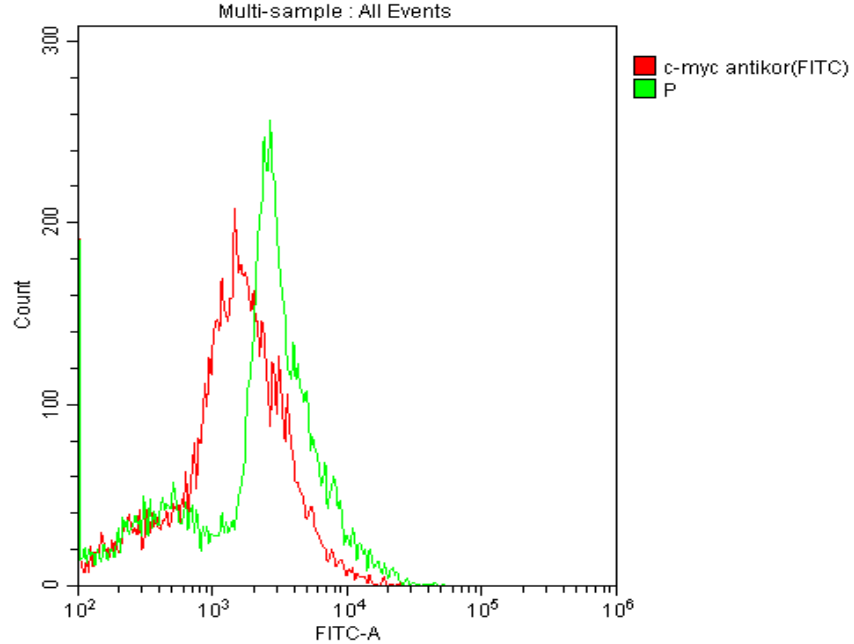


Şekil 4.14. **P** probunun DMSO ve su içinde (hacimce 50%), 500 nm 'den uyarılarak 2 saat süresince elde edilen floresans spektrumu.

Probun uygulama süresi olan iki saat boyunca sulu çözeltilerde kararlı olup olmadığını test etmek amacıyla bu süre boyunca emisyon spektrumundaki değişim takip edilmiştir. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi pik emisyon şiddetinde herhangi bir değişim olmamıştır. Bu

sonuç bileşiğın ölçüm süresince bozunmadan kaynaklı herhangi bir yanlış bilgi üretmeyeceğini göstermektedir.

4.4. Akış Sitometrisi Deneyi Sonucu



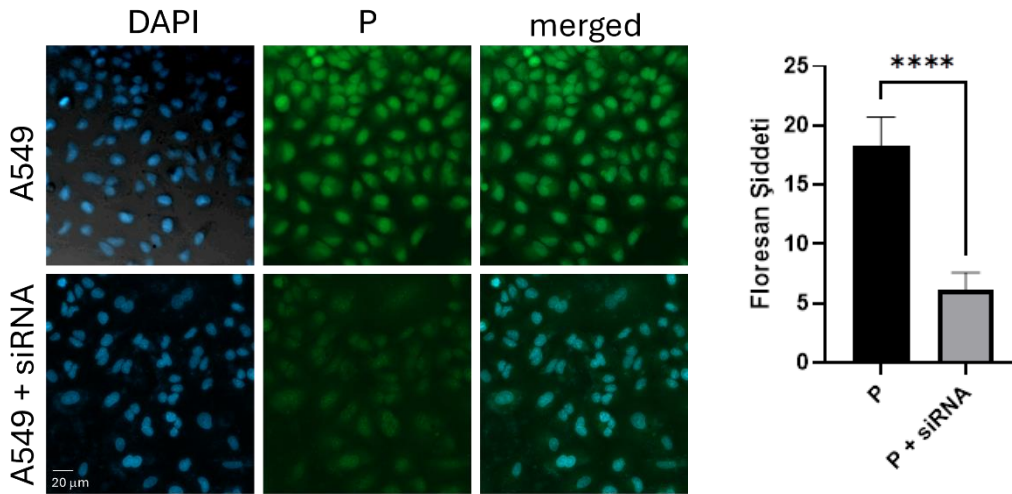
Şekil 4.15. P pronunun akış sitometri yönteminde uygulanması. Kontrol örneklerine c-MYC antikoruna ve akabinde FITC etiketli sekonder antikor uygulanmıştır (kırmızı). P probunun uygulandığı örneklerde FITC sinyali güçlü şekilde alınmıştır. P probu da FITC ile aynı yerde emisyonuna sahiptir.

Tez çalışmasında, P propu ile klasik c-myc antikoruna karşılaştırılarak, hedef proteine bağlanma etkinliği akış sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla c-MYC antikoruna uygulamasından sonra FITC etiketli sekonder antikor kullanılmıştır (Şekil 4.15, kırmızı kontrol grubu). Sonuçlar, P'nin c-myc antikoruna kıyasla daha fazla FITC sinyali üretebildiğini ortaya koymuştur. Daha ucuz küçük molekül kullanımı ile, ikincil antikor gerektirmeden tek hamlede ölçüm yapılabilmektedir.

4.5. Konfokal Görüntüleme Deneyi Sonucu

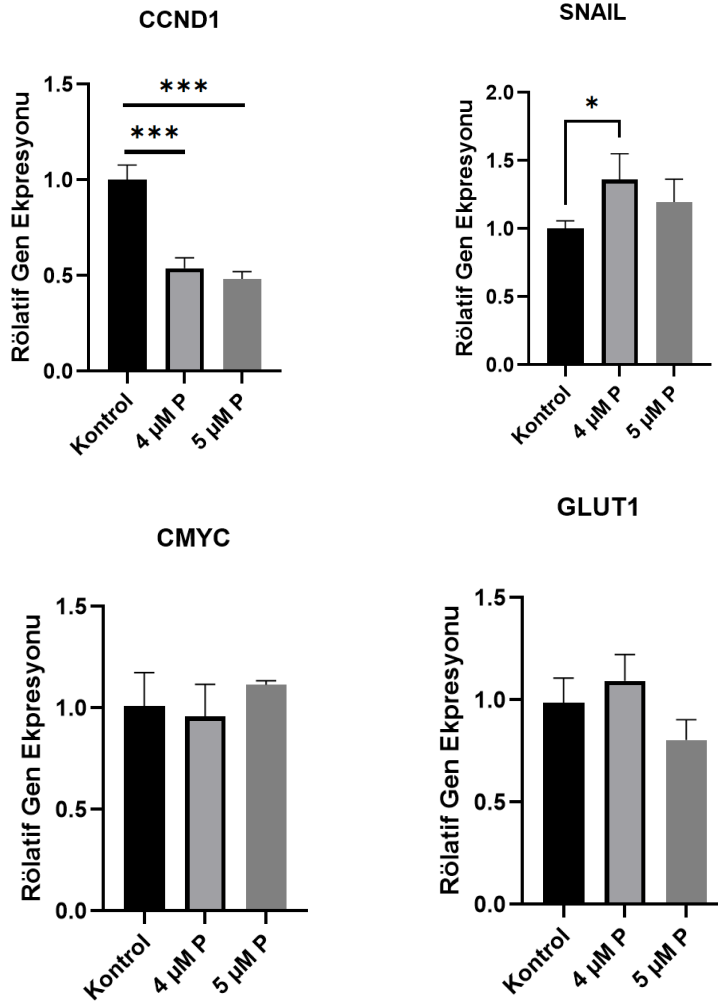
Bu çalışmada, A549 akciğer kanser hücrelerinde c-Myc protein ekspresyonu ve lokalizasyonu konfokal mikroskopi kullanılarak değerlendirildi. Hücre çekirdekleri DAPI boyasından gelen mavi floresan sinyali aracılığıyla net bir şekilde görselleştirildi. c-Myc proteininin lokalizasyonunu belirlemek amacıyla özel olarak geliştirilen ve P

olarak adlandırılan prob 5 μ M derişimde hücreye uygulandı ve emisyon FITC kanalında görüntülendi. Bir grup hücre c-myc'e özgü siRNA ile susturuldu ve probun bu koşullardaki floresan tepkisi bu hücre grubunda test edildi. Şekil 4.16'da gösterilen sonuçlara göre siRNA ile susturulmamış grupta floresan şiddetin anlamlı şekilde yaklaşık üç kat baskılandığı görüldü. Bu durum, c-Myc protein seviyesi baskılanmadığında probun hedef proteine bağlanarak etkili bir sinyal oluşturduğunu göstermektedir. Buna karşılık, siRNA ile c-Myc susturulmuş grupta floresan sinyali anlamlı şekilde azalmış, sinyal yoğunluğu düşmüştür ve bu durum floresan sinyalinin cMYC ekspresyon seviyesi ile korele olduğuna işaret etmektedir. Transkripsiyon faktörü olan cMYC'in çekirdekte lokalize olamsı beklenir. DAPI çekirdek boyası ile yapılan çift boyama sonucu elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri ImageJ JACoP plugin yazılımı ile analiz edildiğinde Pearson katsayısı 0.989 olarak bulunmuştur. Bu sonuç cMYC'in çekirdek lokalizasyonuna işaret etmektedir ve elde edilen probun cMYC proteininin hücresel lokasyonunu belirlemek için etkili bir şekilde kullanılabileceğinin göstergesidir.



Şekil 4.16. Prob **P** molekölünün konfokal görüntüleme analiz sonucu. Görüntüler 5 μ M **P** kullanılarak A549 hücrelerinde alınmıştır.

4.6. RT- PCR Analizi Sonucu

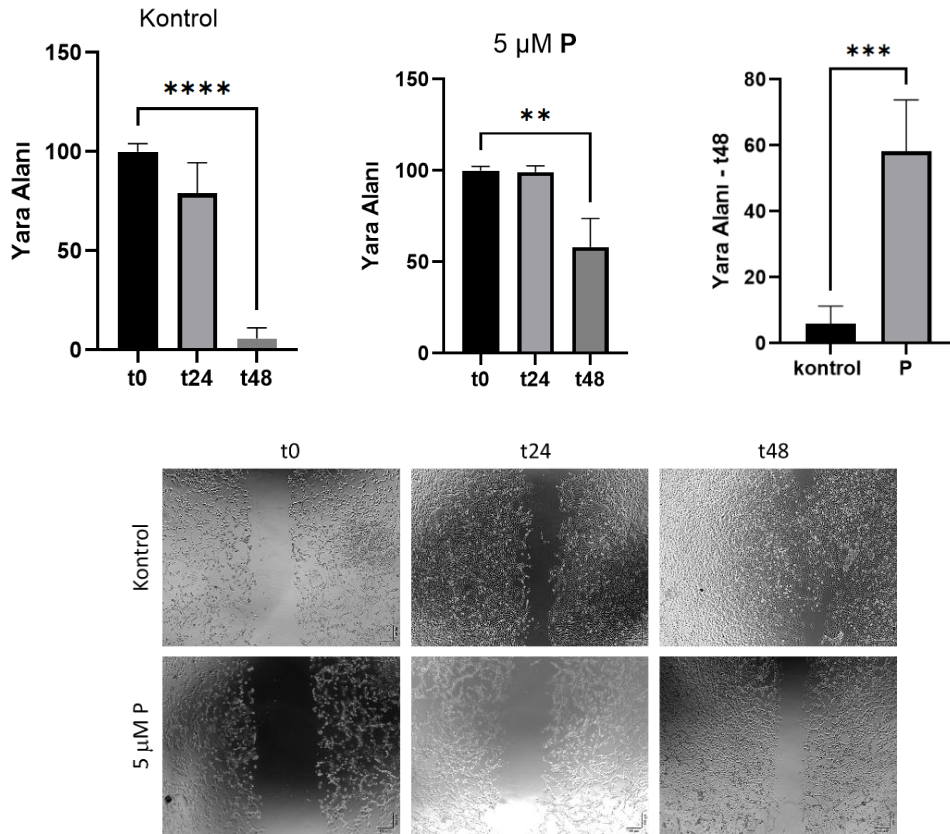


Şekil 4.17. P uygulamasının cMYC alt yolağında yer alan SNAIL, GLUT1, C-MYC ve CCND1 genlerinin anlatımına etkisi. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. (n \geq 3)

P uygulanmış A549 hücrelerinden elde edilen RNA kullanılarak yapılan RT-PCR analizinde 4 μ M ve 5 μ M konsantrasyonlarında uygulama sonrası özellikle siklin D1 (CCND1) geninde yarı oranda bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.17). GLUT1'de 5 μ M P uygulamasında kısmi bir azalış olsa da bu sonuç istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. SNAIL'de 4 μ M'da kısmi bir artış tespit edilmiştir. cMYC'in doğrudan kontrolünde olan ve hücre döngüsü için kaçınılmaz olarak gerekli olan siklin D1 seviyesindeki azalma prob P'nin terapötik etkisine işaret etmektedir.

4.7. Hücre Göçü Analizi Sonucu

A549 hücre hattında, sentezlenen P probunun hücre göçü üzerindeki etkisi, çizik testi (scratch assay) yöntemi ile değerlendirilmiştir. A549 hücreleri steril pipet ucu kullanılarak çizik oluşturulmuş ve hücreler mikroskop altında görüntülenmiştir. Her bir görüntü için yara alanı ölçülerek ortalamalar alınmış ve standart sapmalar hesaplanmıştır. Bu ölçümler doğrultusunda, her grup kendi başlangıç yara alanına normalize edilerek hücre göç kapasitesi değerlendirilmiştir.



Şekil 4.18. P (5 µM) uygulamasının A549 hücrelerinde 48 saat boyunca hücre göçüne etkisi.

Kontrol grubunda, herhangi bir madde uygulanmaksızın yapılan ölçümlerde yara alanının neredeyse tamamını kapandığı göstermektedir (Şekil 4.18). 5 µM doz uygulamasında ise hücreler 48 saat sonunda bile yara alanının yarısından fazlasını kapatamamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yara kapanmasının baskılanmasının 12 kattan fazla olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, P probunun A549 hücrelerinin göç potansiyeli üzerindeki etkisinin olduğu belirgin şekilde gözlemlenmiştir.

Bu veriler, P probunun 5 μ M konsantrasyonlarda hücre göçünü baskılayan anti-metastatik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

c-Myc, hücre sel proliferasyon, metabolizma, büyüme, apoptozis ve farklılaşma gibi çok sayıda temel biyolojik sürecin merkezinde yer alan oldukça güçlü bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsünü hızlandırıcı etkisi ve anabolik metabolizmayı destekleyici rolü nedeniyle fizyolojik koşullarda sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekirken, patolojik koşullarda bu kontrol mekanizmalarının bozulması c-Myc'nin tümörigenik potansiyelini ortaya çıkarır. Özellikle genetik amplifikasyon, kromozomal translokasyon ve epigenetik düzenleyiciler aracılığıyla MYC ekspresyonunun artması, pek çok solid tümör ve hematolojik malignitede agresif tümör davranışları ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle MYC, hem kanserin moleküler biyolojisinin anlaşılmasında hem de hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik bir oyuncudur. Ancak MYC'nin ilaçla hedeflenebilirliğinin düşük olması, doğrudan inhibitör geliştirme sürecini zorlaştırmıştır. Son yıllarda geliştirilen epigenetik inhibitörler (örneğin BET inhibitörleri), translasyonel baskılayıcılar, MYC-Max etkileşimini engelleyen moleküller ve PROTAC teknolojileri, MYC'nin dolaylı yollarla hedeflenmesine olanak tanımış ve prelinik çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

c-Myc problemleri, MYC geninin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesini sağlayarak MYC hedeflenmesine yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir başlangıç noktası oluşturur. c-Myc problemleri, c-Myc anlatımını ölçmek üzere spesifik olarak tanımak üzere geliştirilirler fakat literatürde örneği azdır. c-Myc ekspresyonunun artışı birçok kanser türüyle ilişkili olduğundan, bu problemler sayesinde c-Myc düzeylerindeki değişimler hassas şekilde ölçülebilir. Yüksek özgüllüğe sahip problemler, özellikle kanserli ve normal dokular arasındaki farkların ortaya konulmasında büyük önem taşır. Klinik tanı, prognostik değerlendirme ve hedefe yönelik tedavi araştırmalarında c-Myc problemleri önemli bir araç olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışma kanser tedavisindeki potansiyel hedeflerden biri olan c-Myc proteininin hücrel lokalizasyonunu belirlenmesi ve yapısında cMYC tanıyan birim sayesinde MYC altyolağında yer alan genlerin ifadesinin değişikliğinin, teranostik etkisinin, tespiti amacıyla yürütülmüştür.

Çalışmada sentezlenen **P** molekülünün 501 nm'de absorbanansa sahip olduğu ve 511 nm'de emisyon piki verdiği tespit edilmiştir. Bileşiğin floresan kuantum verimi 0.42 olarak belirlenmiştir. Sulu çözeltilerde bileşiğin uygulama dozunda çözünür olduğu gösterilmiştir. Hücre uygulamalarında gerekli olan iki saatlik süre boyunca bileşiğin spektrumunda herhangi bir değişiklik olmadığı kanıtlanmış, bileşiğin sulu çözeltilerde ölçüm süresince kararlı olduğu anlaşılmıştır. Bileşiğin ilk olarak sitotoksik analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla A549 hücre hattına farklı dozlarda **P** probu uygulanmış ve bu hücre hattı üzerinde 24 saat içinde toksik etki oluşturduğu, 0.39 μ M ve üzeri derişimde hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkilediği gösterilmiştir.

Çalışmada, tasarlanan MYC probu ile klasik FITC etiketli c-Myc antikoruna karşılaştırılmış, akış sitometrisi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen FITC sinyalleri kıyaslandığında, **P** probunun, c-Myc antikoruna kıyasla hedef proteini çok daha yüksek bir etkinlikle tanıdığını ve bağlandığını gösterilmiştir. Ayrıca, cMYC hedefleyen siRNA uygulamasıyla birlikte **P** bileşiğine ait sinyalde anlamlı bir azalma gözlenmiş; bu da probun etkisinin spesifik olarak bu protein üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, A549 akciğer kanser hücrelerinde c-Myc protein ekspresyon düzeyleri ve hücre içi lokalizasyonu, konfokal mikroskopisi kullanılarak detaylı biçimde analiz edilmiştir. Hücre çekirdekleri, DAPI ile boyanarak mavi floresan sinyali aracılığıyla net şekilde görselleştirilmiştir. Deneysel tasarım kapsamında, A549 hücreleri iki gruba ayrılmıştır: birinci grup yalnızca **P** probu ile muamele edilirken, ikinci grupta c-Myc'e özgü siRNA ile gen susturulması gerçekleştirilmiş ve ardından **P** uygulanmıştır. Her iki grupta da DAPI ve FITC floresan sinyalleri konfokal mikroskopisi ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Probun ışınması FITC bölgesinde olduğu için bu takip gerçekleştirilmiştir. siRNA uygulanmayan kontrol grubunda prob kaynaklı floresan sinyali daha yoğun ve parlak olup, c-Myc proteininin hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edildiğini ve **P** probunun hedefe başarıyla bağlandığını göstermektedir. Buna karşın, siRNA ile c-Myc ekspresyonu baskılanmış grupta floresan sinyali belirgin şekilde

azalmıştır. Bu bulgular, hem siRNA'nın c-Myc ifadesini etkin biçimde bastırdığını hem de P probunun cMYC seçici bağlanma kapasitesine sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Ayrıca DAPI çekirdek boyası ile yapılan kolokalizasyon analizleri probun ışımının çekirdekte olduğunu teyit etmiş ve cMYC transkripsiyon faktörünün hücrel loaksiyonunun tespitinin prob ile sağlanabileceğini göstermiştir. Prob FITC etiketli antikor temelli görüntüleme ile, akış sitometri yöntemi kullanılarak kıyaslanmış ve floresan sinyalin prob ile daha iyi elde edilebildiği gösterilmiştir.

Probu teranostik etkisini araştırmak maksadıyla prob uygulanmış A549 akciğer hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmış ve RT-PCR yöntemi ile kantifiye edilmiştir. Analizler, özellikle cMYC tarafınan kontrol edilen siklinD1 geninin yarı oranında baskılandığını göstermektedir. Hücre döngüsünün önemli bir elemanı olan bu genin baskılanması probun teranostik potansiyeline işaret etmektedir. Diğer taraftan probun kontrol grubuna kıyasla 48 saat içinde hücre göçünü 12 kattan fazla baskıladığı gösterilmiş ve anti-metastatik potansiyelinin olduğu değerlendirilmiştir.

5.2 Öneriler

c-Myc ekspresyonunun, tümör mikroçevresi, bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmaları ve metabolik yeniden programlama üzerindeki etkilerinin daha derinlemesine anlaşılması, mevcut tedavilere entegre edilebilecek yeni stratejilerin geliştirilmesine zemin hazırlayabilir. Özellikle c-Myc ile ilişkili tümörlerde, bağışıklık yanıtının baskılanmasına neden olan moleküler yolların aydınlatılması, mevcut immünoterapötik yaklaşımların etkinliğini artırmak açısından büyük önem taşımaktadır.

c-Myc, günümüzde hem tanı hem prognoz hem de tedavi hedefi açısından öne çıkan önemli bir biyobelirteç konumundadır. Önümüzdeki dönemde, c-Myc odaklı çalışmaların artarak sürmesi; bu proteinin düzenleyici rolünü daha ayrıntılı şekilde ortaya koyarak, kişiselleştirilmiş onkolojik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sunacaktır. Böylece, c-Myc hedefli tedavi stratejileri, kanser tedavisinde dönüştürücü nitelikte yeni kapılar aralayabilir.

Tez projesi kapsamında elde edilen prob pahalı antikor temelli yöntemlere bir alternatif sunabilir. Ayrıca, ileri çalışmalarla cMYC yolağında teranostik etkisinin detaylı olarak incelenmesi probun terapötik potansiyeline daha fazla ışık tutacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Adhikary, S., & Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 635-645.
- Ala, M. (2022). Target c-Myc to treat pancreatic cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 23(1), 34-50. <https://doi.org/10.1080/15384047.2021.2017223>
- Allen-Petersen BL, Sears RC. Mission Possible: Advances in MYC Therapeutic Targeting in Cancer. *BioDrugs*. 2019;33:539–553. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00370-5>.
- Alzahrani, A. S. (2019). PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside. In *Seminars in Cancer Biology* (pp. 125-132). Elsevier.
- Annibaldi, D., Whitfield, J. R., Favuzzi, E., Jauset, T., Serrano, E., Cuartas, I., Redondo-Campos, S., Folch, G., González-Juncà, A., Sodrì, N. M., et al. (2014). Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nature Communications*, 5, 4632.
- Arany, Z., Foo, S.-Y., Ma, Y., Ruas, J. L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S. M., et al. (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature*, 451(7181), 1008-1012. <https://doi.org/10.1038/nature06613>
- Arvanitis, C., & Felsher, D. W. (2006). Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 16(4), 313-317.
- Baudino, T. A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J. A., Maclean, K. H., White, E. L., Davis, A. C., Ihle, J. N., & Cleveland, J. L. (2002). c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes & Development*, 16(19), 2530-2543. <https://doi.org/10.1101/gad.1024602>
- Baser, A.S., Basar, B., Dogan, H. B., Sener, G., Ozsamur, N. G., Celik F.S., Altves, S., Erbas-Cakmak, S. (2023). Reprograming Cancer Cells by a BODIPY G-Quadruplex Stabiliser”, *Chem. Commun.*, 59, 12447. <https://doi.org/10.1039/D3CC03453D>
- Beaulieu, M-E., Jauset, T., Massó-Vallés, D., Martínez-Martín, S., Rahl, P., Maltais, L., Zacarias-Fluck, M. F., Casacuberta-Serra, S., Serrano Del Pozo, E., Fiore, C., et al. (2019). Intrinsic cell-penetrating activity propels Omomyc from proof of concept to viable anti-MYC therapy. *Science Translational Medicine*, 11(483), eaar5012.
- Berg T, Cohen SB, Desharnais J, et al. Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:3830–3835. <https://doi.org/10.1073/pnas.062036999>.
- Bergers, G., & Fendt, S. M. (2021). The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 21(3), 162–180. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00320-2>

- Blackwood, E. M., & Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*, 251(4998), 1211-1217. <https://doi.org/10.1126/science.2006410>
- Bott, A. J., Peng, I.-C., Fan, Y., Faubert, B., Zhao, L., Li, J., Neidler, S., Sun, Y., Jaber, N., Krokowski, D., et al. (2015). Oncogenic Myc induces expression of glutamine synthetase through promoter demethylation. *Cell Metabolism*, 22(6), 1068-1077. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.025>
- Castell A, Yan Q, Fawkner K, et al. Selective high affinity MYC-binding compound inhibits MYC-MAX interaction and MYC-dependent tumor cell growth. *Sci Rep*. 2018; 8:10064. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-3952>.
- Chauhan J, Wang H, Yap JL, et al. Discovery of methyl 4'-methyl-5-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylate, an improved small-molecule inhibitor of c-Myc-max dimerization. *ChemMedChem*. 2014;9:2274–2285. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402189>.
- Chen, C., Cai, S., Wang, G., Cao, X., Yang, X., Luo, X., Feng, Y., & Hu, J. (2013). c-Myc enhances colon cancer cell-mediated angiogenesis through the regulation of HIF-1 α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(2), 505-511. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.006>
- Chen, H., Liu, H., & Qing, G. (2018). Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3, 5. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0008-7>
- Choi, S. H., Mahankali, M., Lee, S. J., Hull, M., Petrassi, H. M., Chatterjee, A. K., Schultz, P. G., Jones, K. A., & Shen, W. (2017). Targeted disruption of Myc–Max oncoprotein complex by a small molecule. *ACS Chemical Biology*, 12(11), 2715-2719. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00799>
- Coudé, M.-M., Braun, T., Berrou, J., Dupont, M., Bertrand, S., Masse, A., Raffoux, E., Itzykson, R., Delord, M., & Riveiro, M. E., et al. (2015). BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. *Oncotarget*, 6(19), 17698. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4131>
- Dai, J., Carver, M., Hurley, L. H., and Yang, D. (2011) Solution structure of a 2:1 quindoline-c-MYC G-quadruplex: insights into G-quadruplex-interactive small molecule drug design. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17673–17680.
- Dhanasekaran, R., Deutzmann, A., Mahauad-Fernandez, W. D., et al. (2022). The MYC oncogene — the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19, 23–36. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00549-2>
- Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*, 149(1), 22-35.
- Dang, C. V. (2013). MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(8), a014217. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014217>

- Dang, C. V., et al. (2006). The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology*, 16(4), 253-264.
- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R., & Qi, J., et al. (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*, 146(6), 904-917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>
- Demma, M. J., Mapelli, C., Sun, A., Bodea, S., Ruprecht, B., Javaid, S., Wiswell, D., Muise, E., Chen, S., Zelina, J., et al. (2019). Omomyc reveals new mechanisms to inhibit the MYC oncogene. *Molecular Cell Biology*, 39(16), e00248–19.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Sevignani, C., Wentzel, E., Furth, E. E., Lee, W. M., Enders, G. H., Mendell, J. T., et al. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nature Genetics*, 38(9), 1060-1065. <https://doi.org/10.1038/ng1855>
- Erbas, S., Görgülü, A., Kocakuşakoğulları, M., Akkaya, E. U. (2007). Non-covalent Functionalized SWNTs as Delivery Agents for Novel Bodipy-based Potential PDT Sensitizers, *Chem. Commun.*, 4956. <https://doi.org/10.1039/B908485A>
- Fan-Minogue, H., Cao, Z., Paulmurugan, R., Chan, C. T., Massoud, T. F., Felsher, D. W., & Gambhir, S. S. (2010). Noninvasive molecular imaging of c-Myc activation in living mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(36), 15892–15897. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007443107>
- Farrington, C. C., Yuan, E., Mazhar, S., Izadmehr, S., Hurst, L., Allen-Petersen, B. L., Janghorban, M., Chung, E., Wolczanski, G., Galsky, M., et al. (2020). Protein phosphatase 2A activation as a therapeutic strategy for managing MYC-driven cancers. *Journal of Biological Chemistry*, 295(3), 757-770. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)49933-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49933-9)
- Farrell, A. S., Allen-Petersen, B., Daniel, C. J., Wang, X., Wang, Z., Rodriguez, S., Impey, S., Oddo, J., Vitek, M. P., Lopez, C., et al. (2014). Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Molecular Cancer Research*, 12(6), 924-939. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0542>
- Fiorentino, F. P., Tokgün, E., Solé-Sánchez, S., Giampaolo, S., Tokgün, O., Jauset, T., Kohno, T., Perucho, M., Soucek, L., & Yokota, J. (2016). Growth suppression by MYC inhibition in small cell lung cancer cells with TP53 and RB1 inactivation. *Oncotarget*, 7(24), 31014–31028.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., Allen, C., et al. (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncology*, 1(4), 505-527.
- Fonseca, B. D., Smith, E. M., Yelle, N., Alain, T., Bushell, M., & Pause, A. (2014). The ever-evolving role of mTOR in translation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, 102-112. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.014>

- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6 Suppl 16), 15-18. <https://doi.org/10.1053/sonc.2002.37263>
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T., et al. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239), 762-765. <https://doi.org/10.1038/nature07823>
- Gao, F., Li, X., Xu, K., & et al. (2023). c-MYC mediates the crosstalk between breast cancer cells and tumor microenvironment. *Cell Communication and Signaling*, 21(28). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01043-1>
- Gupta, A., Ajith, A., Singh, S., Panday, R. K., Samaiya, A., & Shukla, S. (2018). PAK2–c-Myc–PKM2 axis plays an essential role in head and neck oncogenesis via regulating Warburg effect. *Cell Death & Disease*, 9(8), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0887-0>
- Gu, C., Kong, X., Liu, X., Gai, P., & Li, F. (2019). Enzymatic biofuel-cell-based self-powered biosensor integrated with DNA amplification strategy for ultrasensitive detection of single-nucleotide polymorphism. *Analytical Chemistry*, 91(14), 8697–8704. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01434>
- Han, H., Jain, A. D., Truica, M. I., Izquierdo-Ferrer, J., Anker, J. F., Lysy, B., Sagar, V., Luan, Y., Chalmers, Z. R., Unno, K., et al. (2019). Small-molecule MYC inhibitors suppress tumor growth and enhance immunotherapy. *Cancer Cell*, 36(5), 483-497.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.10.001>
- Hart JR, Garner AL, Yu J, et al. Inhibitor of MYC identified in a Krohnke pyridine library. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:12556–12561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319488111>.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281, 1509–1512.
- Huang, X., Sun, J., Chen, G., Niu, C., Wang, Y., Zhao, C., Sun, J., Huang, H., Huang, S., Liang, Y., et al. (2019). Resveratrol promotes diabetic wound healing via SIRT1-FOXO1-c-Myc signaling pathway-mediated angiogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 421. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00421>
- Huang, H., Weng, H., Zhou, H., & Qu, L. (2014). Attacking c-Myc: Targeted and combined therapies for cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 20(42), 6543-6554. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140826153203>
- Jain, S., Wang, X., Chang, C.-C., Ibarra-Drendall, C., Wang, H., Zhang, Q., Brady, S. W., Li, P., Zhao, H., Dobbs, J., et al. (2015). Src inhibition blocks c-Myc translation and glucose metabolism to prevent the development of breast cancer. *Cancer Research*, 75(22), 4863-4875. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2345>

- Janghorban M, Farrell AS, Allen-Petersen BL, et al. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111:9157–9162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317630111>.
- Jeong, K.-C., Ahn, K.-O., & Yang, C.-H. (2010). Small-molecule inhibitors of c-Myc transcriptional factor suppress proliferation and induce apoptosis of promyelocytic leukemia cell via cell cycle arrest. *Molecular BioSystems*, 6(8), 1503–1509. <https://doi.org/10.1039/c002534h>
- Jeong, K.-C., Kim, K.-T., Seo, H.-H., Shin, S.-P., Ahn, K.-O., Ji, M.-J., Park, W. S., Kim, I.-H., Lee, S.-J., & Seo, H. K., et al. (2014). Intravesical instillation of c-MYC inhibitor KSI-3716 suppresses orthotopic bladder tumor growth. *Journal of Urology*, 191(2), 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.07.019>
- Jin F, Yu C, Lai L, Liu Z. Ligand Clouds around Protein Clouds: A Scenario of Ligand Binding with Intrinsically Disordered Proteins. *PLOS Comput Biol.* 2013;9, e1003249. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003249>.
- Kretzner, L., Scuto, A., Dino, P. M., Kowolik, C. M., Wu, J., Ventura, P., Jove, R., Forman, S. J., Yen, Y., & Kirschbaum, M. H., et al. (2011). Combining histone deacetylase inhibitor vorinostat with Aurora kinase inhibitors enhances lymphoma cell killing with repression of c-Myc, hTERT, and microRNA levels. *Cancer Research*, 71(11), 3912–3920. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2259>
- Kiessling A, Sperl B, Hollis A, Eick D, Berg T. Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization and DNA binding by small molecules. *Chem Biol.* 2006;13:745–751. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.05.011>.
- Kiessling A, Wiesinger R, Sperl B, Berg T. Selective Inhibition of c-Myc/Max Dimerization by a Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine. *ChemMedChem.* 2007;2:627–630. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600294>.
- Li, Y., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), a026831. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>
- Li, D., Li, Y., Yuan, R., & Xiang, Y. (2023). Target-responsive DNA translator for amplified and sensitive sensing of Myc-Max transcription factor dimer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 390, 133949. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133949>
- Lin, C. Y., et al. (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*, 151(1), 56–67.
- Lin, C.-P., Liu, C.-R., Lee, C.-N., Chan, T.-S., & Liu, H. E. (2010). Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.4254/wjh.v2.i1.16>
- Liu, L., & Eisenman, R. N. (2012). Regulation of c-Myc protein abundance by a protein phosphatase 2A–glycogen synthase kinase 3 β –negative feedback pathway. *Genes & Cancer*, 3(1), 23–36. <https://doi.org/10.1177/1947601912448067>

- Liu, T., Tee, A. E., Porro, A., Smith, S. A., Dwarte, T., Liu, P. Y., Iraci, N., Sekyere, E., Haber, M., & Norris, M. D., et al. (2007). Activation of tissue transglutaminase transcription by histone deacetylase inhibition as a therapeutic approach for Myc oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18682-18687. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705524104>
- Llombart, V., & Mansour, M. R. (2022). Therapeutic targeting of "undruggable" MYC. *eBioMedicine*, 75, 103756. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103756>
- Loudet A., & Burgess K. (2007). BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chemical Reviews*, 107 (11), 4891-4932.
- Luan, W., Wang, Y., Chen, X., Shi, Y., Wang, J., Zhang, J., Qian, J., Li, R., Tao, T., Wei, W., et al. (2015). PKM2 promotes glucose metabolism and cell growth in gliomas through a mechanism involving a let-7a/c-Myc/hnRNPA1 feedback loop. *Oncotarget*, 6(15), 13006. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3514>
- Mabonga L, Kappo AP. Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. *Biophys Rev*. 2019;11:559–581. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00570-x>.
- Magde, D, Wong, R, Seybold P. G. (2002), Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields, *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 75(4): 327–334. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750327FQYATR2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750327FQYATR2.0.CO2)
- Marshall, G. M., Gherardi, S., Xu, N., Neiron, Z., Trahair, T., Scarlett, C., Chang, D. K., Liu, P. Y., Jankowski, K., & Iraci, N., et al. (2010). Transcriptional upregulation of histone deacetylase 2 promotes Myc-induced oncogenic effects. *Oncogene*, 29(44), 5957-5968. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.332>
- Mertz, J. A., Conery, A. R., Bryant, B. M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D. A., Bergeron, L., & Sims, R. J. (2011). Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), 16669-16674. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108190108>
- Meyer, N., & Penn, L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer*, 8, 976-990.
- Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clinical Cancer Research*, 18(20), 5546-5553. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>
- Michel J, Cuchillo R. The Impact of Small Molecule Binding on the Energy Landscape of the Intrinsically Disordered Protein C-Myc. *PLoS ONE*. 2012;7, e41070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041070>.

- Morgado-Pascual, J. L., Rayego-Mateos, S., Tejedor, L., Suarez-Alvarez, B., & Ruiz-Ortega, M. (2019). Bromodomain and extraterminal proteins as novel epigenetic targets for renal diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1315. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01315>
- Nie, Z., et al. (2012). c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*, 151(1), 68-79.
- Parasido, E., Avetian, G. S., Naeem, A., Graham, G., Pishvaian, M., Glasgow, E., Mudambi, S., Lee, Y., Ihemelandu, C., Choudhry, M., et al. (2019). The sustained induction of c-MYC drives nab-paclitaxel resistance in primary pancreatic ductal carcinoma cells. *Molecular Cancer Research*, 17(9), 1815-1827. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0191>
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A., & Michalopoulos, I. (2015). Human cancer databases (review). *Oncology Reports*, 33(1), 3-18.
- Pelengaris, S., Khan, M., & Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer*, 2, 764-776.
- Pippa, R., & Odero, M. D. (2020). The role of MYC and PP2A in the initiation and progression of myeloid leukemias. *Cells*, 9(3), 544. <https://doi.org/10.3390/cells9030544>
- Posternak, V., & Cole, M. D. (2016). Strategically targeting MYC in cancer [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, 5(F1000 Faculty Rev), 408. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7879.1>
- San José-Enériz, E., Gimenez-Camino, N., Agirre, X., & Prosper, F. (2019). HDAC inhibitors in acute myeloid leukemia. *Cancers*, 11(11), 1794. <https://doi.org/10.3390/cancers11111794>
- Sayyadi, M., Safaroghli-Azar, A., Pourbagheri-Sigaroodi, A., Abolghasemi, H., Anoushirvani, A. A., & Bashash, D. (2020). c-Myc inhibition using 10058-F4 increased the sensitivity of acute promyelocytic leukemia cells to arsenic trioxide via blunting PI3K/NF-κB axis. *Archives of Medical Research*, 51(7), 636-644. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.06.002>
- Sato, K., Hikita, H., Myojin, Y., Fukumoto, K., Murai, K., Sakane, S., Tamura, T., Yamai, T., Nozaki, Y., Yoshioka, T., et al. (2020). Hyperglycemia enhances pancreatic cancer progression accompanied by elevations in phosphorylated STAT3 and Myc levels. *PLOS One*, 15(7), e0235573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235573>
- Savino, M., Annibali, D., Carucci, N., Favuzzi, E., Cole, M. D., Evan, G. I., Soucek, L., & Nasi, S. (2011). The action mechanism of the Myc inhibitor termed Omomyc may give clues on how to target Myc for cancer therapy. *PloS One*, 6(6), e22284.
- Seo, S.-K., Jin, H.-O., Woo, S.-H., Kim, Y.-S., An, S., Lee, J.-H., Hong, S.-I., Lee, K.-H., Choe, T.-B., & Park, I.-C., et al. (2011). Histone deacetylase inhibitors sensitize human non-small cell lung cancer cells to ionizing radiation through acetyl p53-mediated c-Myc down-regulation. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(8), 1313-1319. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318220caff>

- Shachaf, C. M., & Felsher, D. W. (2005). Tumor dormancy and MYC inactivation: pushing cancer to the brink of normalcy. *Cancer Research*, 65(11), 4471-4474.
- Sheikh-Zeineddini, N., Bashash, D., Safaroghli-Azar, A., Riyahi, N., Shabestari, R. M., Janzamin, E., & Safa, M. (2019). Suppression of c-Myc using 10058-F4 exerts caspase-3-dependent apoptosis and intensifies the antileukemic effect of vincristine in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8), 14004-14016. <https://doi.org/10.1002/jcb.28675>
- Shi J, Stover JS, Whitby LR, Vogt PK, Boger DL. Small molecule inhibitors of Myc/ Max dimerization and Myc-induced cell transformation. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2009;19:6038–6041. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.044>.
- Shirey, R. J., Hart, J. R., Sridharan, B., Novick, S. J., Turner, L. D., Zhou, B., Nielsen, A. L., Eubanks, L. M., Ueno, L., Hixon, M. S., Lairson, L. L., Spicer, T. P., Scampavia, L. D., Griffin, P. R., Vogt, P. K., & Janda, K. D. (2021). Synthetic fluorescent MYC probe: Inhibitor binding site elucidation and development of a high-throughput screening assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 42, 116246. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116246>
- Smits, M., Wurdinger, T., van Het Hof, B., Drexhage, J. A., Geerts, D., Wesseling, P., Noske, D. P., Vandertop, W. P., Vries, H. E., Reijerkerk, A., et al. (2012). Myc-associated zinc finger protein (MAZ) is regulated by miR-125b and mediates VEGF-induced angiogenesis in glioblastoma. *FASEB Journal*, 26(6), 2639-2647. <https://doi.org/10.1096/fj.11-202820>
- Sodir, N. M., Swigart, L. B., Karnezis, A. N., Hanahan, D., Evan, G. I., & Soucek, L. (2011). Endogenous Myc maintains the tumor microenvironment. *Genes & Development*, 25(10), 907–916.
- Soucek, L., Helmer-Citterich, M., Sacco, A., Jucker, R., Cesareni, G., & Nasi, S. (1998). Design and properties of a Myc derivative that efficiently homodimerizes. *Oncogene*, 17, 2463-2472.
- Soucek, L., Nasi, S., & Evan, G. I. (2004). Omomyc expression in skin prevents Myc-induced papillomatosis. *Cell Death & Differentiation*, 11(9), 1038-1045.
- Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C. P., Finch, A. J., Murphy, D. J., Sodir, N. M., Karnezis, A. N., Swigart, L. B., Nasi, S., & Evan, G. I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature*, 455(7213), 679-683.
- Soucek, L., Whitfield, J. R., Sodir, N. M., Massó-Vallés, D., Serrano, E., Karnezis, A. N., Swigart, L. B., & Evan, G. I. (2013). Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. *Genes & Development*, 27(5), 504–513.
- Struntz, N. B., Chen, A., Deutzmann, A., Wilson, R. M., Stefan, E., Evans, H. L., Ramirez, M. A., Liang, T., Caballero, F., & Wildschut, M. H. E., et al. (2019). Stabilization of the Max homodimer with a small molecule attenuates Myc-driven transcription. *Cell Chemical Biology*, 26(5), 711-723.e14. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.02.009>

- Struntz NB, Chen A, Deutzmann A, et al. Stabilization of the Max Homodimer with a Small Molecule Attenuates Myc-Driven Transcription. *Cell Chem Biol*. 2019;26: 711–723.e14. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.02.009>.
- Stellas D, Szabolcs M, Koul S, et al. Therapeutic effects of an anti-Myc drug on mouse pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106:dju320. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju320>.
- Sun, H. Y., Du, S. T., Li, Y. Y., Deng, G. T., & Zeng, F. R. (2022). Bromodomain and extra-terminal inhibitors emerge as potential therapeutic avenues for gastrointestinal cancers. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 14(1), 75-89. <https://dx.doi.org/10.4251/wjgo.v14.i1.75>
- Tambay, V., Raymond, V. A., & Bilodeau, M. (2021). MYC rules: Leading glutamine metabolism toward a distinct cancer cell phenotype. *Cancers*, 13(17), 4484. <https://doi.org/10.3390/cancers13174484>
- Tune, B. X. J., Sim, M. S., Poh, C. L., Guad, R. M., Woon, C. K., Hazarika, I., Das, A., Gopinath, S. C. B., Rajan, M., Sekar, M., Subramaniyan, V., Fuloria, N. K., Fuloria, S., Batumalaie, K., & Wu, Y. S. (2022). Matrix metalloproteinases in chemoresistance: Regulatory roles, molecular interactions, and potential inhibitors. *Journal of Oncology*, 2022, 3249766. <https://doi.org/10.1155/2022/3249766>
- Yan, L., Raj, P., Yao, W., & Ying, H. (2019). Glucose metabolism in pancreatic cancer. *Cancers*, 11(10), 1460. <https://doi.org/10.3390/cancers11101460>
- Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function. *Oncogene*. 2003;22:6151–6159. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206641>.
- Yu C, Niu X, Jin F, Liu Z, Jin C, Lai L. Structure-based Inhibitor Design for the Intrinsically Disordered Protein c-Myc. *Sci Rep*. 2016;6:22298. <https://doi.org/10.1038/srep22298>.
- Zhai, Q., Gao, C., Ding, J., Zhang, Y., Islam, B., Lan, W., Hou, H., Deng, H., Li, J., Hu, Z., Mohamed, H. I., Xu, S., Cao, C., Haider, S. M., & Wei, D. (2019). Selective recognition of c-MYC Pu22 G-quadruplex by a fluorescent probe. *Nucleic acids research*, 47(5), 2190–2204. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz059>
- Wang H, Hammoudeh DI, Follis AV, et al. Improved low molecular weight Myc-Max inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:2399–2408. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0005>.
- Warburg, O., Wind, F., & Neglers, E. (1930). *The metabolism of tumors*. London: Constable & Co. Ltd.
- Wise, D. R., & Thompson, C. B. (2010). Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(8), 427-433. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003>