



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BORTEZOMİB' İN ETOPOSİD VE KAMPTOTESİN İLE
BİRLİKTE ÖKARYOTİK DNA TOPOİZOMERAZ ENZİMLERİ
ÜZERİNE İN VİTRO İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiydem TIRINOĞLU

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

AKSARAY, 2016

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 122307421 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, Çiydem TIRINOĞLU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "BORTEZOMİB'İN ETOPOSİD VE KAMPTOTESİN İLE BİRLİKTE ÖKARYOTİK DNA TOPOİZOMERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE İN VİTRO İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. İlkay YILDIZ

Ankara Üniversitesi

Jüri Üyeleri: Doç. Dr.Kamile ÖZTÜRK

Aksaray Üniversitesi

Teslim Tarihi: 12.05.2016

Savunma Tarihi: 14.04.2016

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, proteozom inhibitörü olup çeşitli kanser tedavilerinde kullanılmakta olan bortezomib bileşiğinin topoizomeraz enzimleri ile biyomoleküler etkileşimleri araştırılmıştır. Bortezomib bileşiği ile topoizomeraz I ve II enzimlerinin etkileşimleri *in vitro* enzim aktivite testleri ile analiz edilmiştir. Aynı zamanda bortezomib bileşiği, topoizomeraz I inhibitörü Kamptotesin ve topoizomeraz II inhibitörü Etoposid ile kombine şekilde uygulandı. Sonuç olarak bu ilaçların tek başına gösterdikleri inhibisyon etkileri ile kombine etkileri karşılaştırıldı.

Deneyisel çalışmalar Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM)- Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

Yüksek lisans öğrencisi Çiydem TIRINOĞLU'nun tezi olan "Bortezomib'in Etoposid ve Kamptotesin İle Birlikte Ökaryotik DNA Topoizomeraz Enzimleri Üzerine İn Vitro İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması " adlı tez Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2013-98 kod nolu "Bortezomib'in ökaryotik DNA topoizomeraz I ve II enzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisinin araştırılması" adlı proje ile desteklenmiştir.

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışmada alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Çiydem TIRINOĞLU

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde her türlü yardımını ve desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLUN'a,

Tez çalışmam boyunca yanımda olan ve çalışmamın deneysel kısmında yardımlarını esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşım Barış KERİMOĞLUN'a, deneysel çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi teknik çalışanlarına,

Hayatım boyunca yanımda olduklarını hep hissettiğim ve hissedeceğim canım aileme;

İçtenlikle teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	i
DOĞRULUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. DNA Topolojisi.....	4
2.2. DNA Topoizomerazlar	5
2.2.1 DNA topoizomerazların yapıları, fonksiyonları ve sınıflandırılmaları.....	5
2.3 Kanser Terapide Topoizomerazların Rolü	18
2.4 Topoizomerazları Hedefleyen Antikanser İlaçların İnhibisyon Mekanizmaları	18
2.5 Topoizomeraz İnhibitörü İlaçlar.....	20
2.5.1 Topoizomeraz I inhibitörü ilaçlar	20
2.5.2 Topoizomeraz II inhibitörü ilaçlar	23
2.6 Proteozom İnhibitörü Bortezomib	25
3. MALZEME VE YÖNTEM	28
3.1 Kullanılan Kimyasallar.....	28
3.2 İnsan Topoizomeraz I ve II Enzim Aktivite Kontrolünün Belirlenmesi.....	28
3.3 İlaçların Topoizomeraz Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Saptanması.....	29
3.3.1 Topoizomeraz I relaxation assay	29
3.3.2 Topoizomeraz II relaxation assay	29
3.4 İlaçların IC ₅₀ İnhibisyon Değerlerinin Hesaplanması	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1 Topoizomeraz I Enziminin Aktivite Sonuçları.....	31
4.2 İlaçların Topoizomeraz I Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkileri	32
4.3 Topoizomeraz II Enziminin Aktivite Sonuçları.....	34
4.4 İlaçların Topoizomeraz II Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkileri	35
4.5 İlaçların Kombine Uygulamaları	37
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	47

ÖZET

BORTEZOMİB'İN ETOPOSİD VE KAMPTOTESİN İLE BİRLİKTE ÖKARYOTİK DNA TOPOİZOMERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE İN VİTRO İNİHİBSİYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DNA topoizomerazlar, DNA yapısındaki konformasyonel değişiklikleri düzenleyerek DNA replikasyonu, transkripsiyon ve rekombinasyon gibi önemli hücresel faaliyetlerin gerçekleşmesini sağlayan spesifik enzimlerdir. Bu nedenle çok sayıda antikanser ilacın hücre içi hedefi olarak karakterize edilmişlerdir. Kamptotesin en iyi bilinen topoizomeraz I inhibitörü antikanser ilaçtır. Etoposid, insan kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan güçlü bir topoizomeraz II inhibitörüdür. Bortezomib (PS-341) ise çeşitli hemotolojik kanserlerin tedavisinde kullanılan güçlü bir proteozom inhibitörüdür. Bununla birlikte, bortezomib'in topoizomeraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi yeterince aydınlatılmamıştır. Bu tez çalışmasında, bortezomib bileşiğinin insan topoizomeraz I ve II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda, proteozom inhibitörü bortezomib ile topoizomeraz I inhibitörü kamptotesin ve topoizomeraz II inhibitörü olan etoposid ilaçları, hem tek başlarına hem de kombine şekilde uygulanmış ve sonuçta gösterdikleri inhibisyon etkileri karşılaştırılmıştır.

Bortezomib ve topoizomeraz inhibitörlerinin insan tip I ve tip II topoizomeraz enzimleri ile etkileşimleri ve kombine çalışmalar hücre dışı sistemlerde relaxation assay kullanılarak araştırılmış ve sonuçlar agaroz jel elektroforezinde analiz edilmiştir. İlaçların topoizomeraz I ve II enzimleri üzerindeki IC₅₀ (% 50 inhibisyon konsantrasyonları) değerleri S probit analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, bortezomib'in insan topoizomeraz I enzimi (IC₅₀= 87.11 mM) üzerinde çok zayıf inhibisyon etkisi gösterdiği, insan topoizomeraz II enzimi (IC₅₀= 1.41 mM) üzerinde ise güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu bulunmuştur. Bizim sonuçlarımız, bortezomib'in sadece proteozom inhibitörü olmayıp aynı zamanda topoizomeraz II inhibitörü olarak da etkili olduğunu göstermiştir. Bortezomib, kamptotesin ve etoposid ile kombine uygulandığında her iki durumda da sinerjik etki gözlenmiş ve bu ilaçların tek başına uygulandıkları zamandan daha düşük dozlarda arttırılmış etki gösterdikleri bulunmuştur. Bu ilaçların kombine uygulamalarına ait elde ettiğimiz bulgular, kanser tedavisi için daha ileride klinikte kullanılacak olan kombine ilaç çalışmalarına ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: DNA Topoizomerazlar, Proteozom İnhibitörü, Bortezomib, Kamptotesin, Etoposid, İlaç Kombinasyonu, Antikanser İlaçlar.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF IN VITRO INHIBITION EFFECTS OF BORTEZOMIB IN COMBINED WITH ETOPOSIDE AND CAMPTOTHECIN ON EUKARYOTIC DNA TOPOISOMERASE ENZYMES

DNA topoisomerases are ubiquitous enzymes that regulate conformational changes in DNA topology during essential cellular processes such as replication, transcription and recombination and for this reason, have been characterized as the cellular targets of a number of anti-cancer drugs. Camptothecin is the best known topoisomerase I inhibitor anticancer drug. Etoposide is a potent topoisomerase II inhibitor that is used to treat a wide spectrum of human cancers. Bortezomib is a powerful proteasome inhibitor which used in the treatment of hematological malignancies. However, the inhibitory effect of bortezomib on topoisomerase enzymes has remained sufficiently undetermined. In this thesis study, we investigated the inhibition effects of bortezomib on human topoisomerase I and II enzymes both alone and in combination modes with topoisomerase I inhibitor camptothecin and topoisomerase II inhibitor etoposide, after all, their inhibition effects were compared.

The interactions of bortezomib and topoisomerase inhibitors with human type I and type II topoisomerase enzymes and combined studies were evaluated by using relaxation assay in cell-free systems, and the results were analyzed on agarose gel electrophoresis. IC_{50} values (50% inhibition concentrations) of the drugs on topoisomerase I and II enzymes were calculated using the S probit analysis program.

In the result, bortezomib showed very weak inhibition effect on human topoisomerase I enzyme (IC_{50} = 87.11 mM). On the other hand, it possesses the strong inhibitory effect on human topoisomerase II enzyme (IC_{50} = 1.41 mM). Our results indicated that bortezomib is effective not only on proteasome but also on topoisomerase II. Bortezomib showed an increased effect at lower doses with synergistic effect when used in combination with camptothecin and etoposide than when used alone. Our findings belongs to combined application of these drugs will shed light to combined drug regimens that are to be used in further clinic for cancer treatment.

Keywords: DNA Topoisomerases, Proteasome Inhibitor, Bortezomib, Camptothecin, Etoposide, Drug Combination, Anticancer Drugs.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Relaks ve süper kıvrımlı plazmid DNA'lar	5
Şekil 2.2: İnsan topoizomerez I yapısında yer alan aktif 5 amino asit ve yerinin gösterilmesi	8
Şekil 2.3: İnsan DNA topoizomerez I'in katalitik döngüsü	11
Şekil 2.4: Topoizomerez I enziminin DNA'ya bağlanması	12
Şekil 2.5: İnsan topoizomerez I enziminin yapısal domainleri	14
Şekil 2.6: İnsan topoizomerez I enziminin moleküler yapısı ve üç boyutlu şekli	15
Şekil 2.7: DNA topoizomerez II enzimlerinin genel fonksiyonları	16
Şekil 2.8: İnsan topoizomerez II enziminin yapısal domainleri	17
Şekil 2.9: Topoizomerez I zehirlerinin etki mekanizması	19
Şekil 2.10: Topoizomerez I inhibitörleri	21
Şekil 2.11: Kamptotesin'in DNA ve topoizomerez I'e bağlanması	21
Şekil 2.12: Kamptotesin etki mekanizması	22
Şekil 2.13: Topoizomerez II inhibitörleri	24
Şekil 2.14: Bortezomib bileşiğinin kimyasal yapısı	26
Şekil 4.1: Topoizomerez I enzim aktivitesinin kontrolü	31
Şekil 4.2: Kamptotesin'in topoizomerez I inhibisyon etkisi	32
Şekil 4.3: Bortezomib'in Topoizomerez I inhibisyon etkisi	33
Şekil 4.4: Topoizomerez II enzim aktivitesinin kontrolü	34
Şekil 4.5: Etoposid'in topoizomerez II inhibisyon etkisi	35
Şekil 4.6: Bortezomib'in Topoizomerez II inhibisyon etkisi	36
Şekil 4.7: Bortezomib + Kamptotesin'in topoizomerez I üzerindeki kombine etkisi	37
Şekil 4.8: Bortezomib + Etoposid'in topoizomerez II üzerindeki kombine etkisi	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Ökaryotik DNA topoizomerazların sınıflandırılması ve fonksiyonları	9
Çizelge 2.2: Ökaryotik topo I'in hücrede etkileşim içinde olduğu proteinler	13



KISALTMALAR DİZİNİ

BRT	Bortezomib
CPT	Kamptotesin
DMSO	Dimetil sülfoksit
ETP	Etoposid
Top I	Topoizomeraz I enzimi
Top II	Topoizomeraz II enzimi



1. GİRİŞ

Kanser; belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucu gen ifadesinin miktarında veya zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan hücresel seviyedeki genetik bir hastalıktır. Kanser sağlıklı hücrelerin anormal bir şekilde büyümesini ve kontrolsüz çoğalmalarını sağlayıp, bulundukları dokuyu işgal etmelerine ve vücutta bulunan dokudan başka dokulara yayılmalarına neden olur. Ölüm oranının yüksek ve sık görülmesi nedeniyle kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Kanser araştırmaları, hem kanser tedavisi hem de önlenmesine dayalı olarak yürütülmektedir.

Dünya üzerinde 2012 yılında 14,1 milyon yeni kanser vakası meydana gelirken, bunların yaklaşık olarak 8,2 milyonu ölümle sonuçlanmıştır. Kanserden dolayı gerçekleşen ölümlerin toplam ölüm vakalarının %14,1'ini oluşturduğu tespit edilmiştir.

Geçtiğimiz 30 yıl içinde kanser vakasının sayısı iki kattan daha fazla artmıştır. 12 milyon yeni kanser vakasının 2008'de teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün olduğu ve kanserli 25 milyon kişinin halen hayatta olduğu düşünülmektedir. 2030' a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş 75 milyon kişiye ulaşılması beklenmektedir (Boyle ve Levin, 2008). Tedavi olanaklarının gelişmesi ve sağlık kuruluşlarından yararlanma olanaklarının artması ile her yıl daha çok kanser vakası teşhis edilmektedir. Aynı zamanda gelişen teknoloji ile çevresel karsinojenlere maruziyetin artışı kanser teşhisi sıklığını arttıran faktörlerdendir. Araştırmalar bir taraftan kanserin moleküler biyolojisi üzerinde çalışılırken, diğer taraftan da cerrahi ve radyoterapi gibi uygulamaların yanı sıra kemoterapotik ilaçlarla yapılan tedavi etkili olmaya ve bu konudaki araştırmalar hızlanmıştır. Kanser tedavisi için gerekli olan ilaç dizaynlarının doğru, sağlıklı bir şekilde yapılması ve etkinliklerinin araştırılması günümüzün en önemli araştırma konularının başında gelmektedir.

Hücre çoğalması için mutlak gerekli olan DNA topoizomeraz enzimleri ise kanser terapinin en etkin hedeflerindendir. Bu nedenle son yıllarda giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörü olan antitümör aktiviteye sahip ilaç tasarımları yapılmakta ve etkinlikleri araştırılıp, klinikte kullanıma sunulmaktadır (Potmesil vd., 1991 ; Ralph vd., 1994).

Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması gibi işlemlerde mutlaka bulunması gereken çok önemli enzimlerdir. Topoizomerazlar hücrelerdeki bu hayati önemlerinin dışında antimikrobiyal ve antikanser ilaçlar için birinci dereceden sitotoksik olmaları bakımından da önem teşkil etmektedir. Daha etkili tümör önleyici ilaçların geliştirilmesi için yeni topo I ve topo II inhibitörleri çeşitli kanser türlerine karşı sitotoksikite yönünden değerlendirilmiştir (Pommier, 2013). Hücre çoğalmasında gerekli olan topoizomeraz enzimlerinin bu ilaçlar tarafından kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurup inhibe edeceği düşünülmektedir (Pindur ve Lemster, 1998).

Giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz I ve II inhibitörleri, antitümör aktiviteye sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak meydana getirmiştir (Potmesil ve Kohn, 1991; Ralph vd., 1994; Osheroff, 2003). Bu yüzden topoizomeraz inhibitörlerinin kanser araştırmaları için önemi giderek artmaktadır ve yeni uygulamalar için kullanılabilirliği kabul görmüş enzimler olarak bilinmektedir (Chen vd., 2013).

Kamptotesin (CPT) kalın bağırsak ve yumurtalık kanseri gibi insan tümörlerinde klinik aktiviteleri gösterilmiş topoizomeraz I hedefli antitümör ilaç sınıfına girmektedir (Christian, 2003). Etoposide (ETP) ise çeşitli tümörlerin tedavisinde (örneğin, küçük hücre akciğer kanseri, meme kanseri, lösemi, lenf kanseri, ve germ-line kanserleri) kullanılan topoizomeraz II inhibitörü bir antikanser ilaçtır (Engel vd., 2004).

Bortezomib (BRT) dipeptid boronik asit analogu olan, antitümör özelliğe sahip bir proteozom inhibitörüdür. Klinikte özellikle, hematolojik kanserlerin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Boccadoro vd., 2005).

Topoizomerazların metabolizmanın sürekliliğini sağlamadaki görevleri anlaşıldıkça sağlık alanındaki kullanılabilirliklerinin önem ve farkına varılmıştır. Kansere hücrelerinin gelişiminde topoizomeraz enzimlerinin hücre içindeki ifadelerinin arttığı göz önüne alındığında, hücrelerin bölünmesinin durdurulması için topoizomerazlar ilaç hedefi olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle topoizomeraz enzimlerinin çalışmasını engelleyecek potansiyel kimyasalların araştırılması ve üretilmesi, hem yeni antibiyotiklerin üretimi için hem de kanser tedavisinde alternatif olarak kullanımları için kritik bir konu haline gelmiştir (Lyu vd., 2007; Rogojina ve Nitiss, 2008; Capranico vd., 2012).

Yapılan bu tez çalışmasında; kanser terapide başarı ile kullanılan ilaçlar olan bortezomib, etoposid ve kamptotesin'in ökaryotik topoizomeraz I ve II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda, proteozom inhibitörü bortezomib ile topoizomeraz I inhibitörü kamptotesin ve topoizomeraz II inhibitörü olan etoposid ilaçları hem tek başlarına hem de kombine şekilde uygulanmış ve sonuçta gösterdikleri inhibisyon etkileri karşılaştırılmıştır.

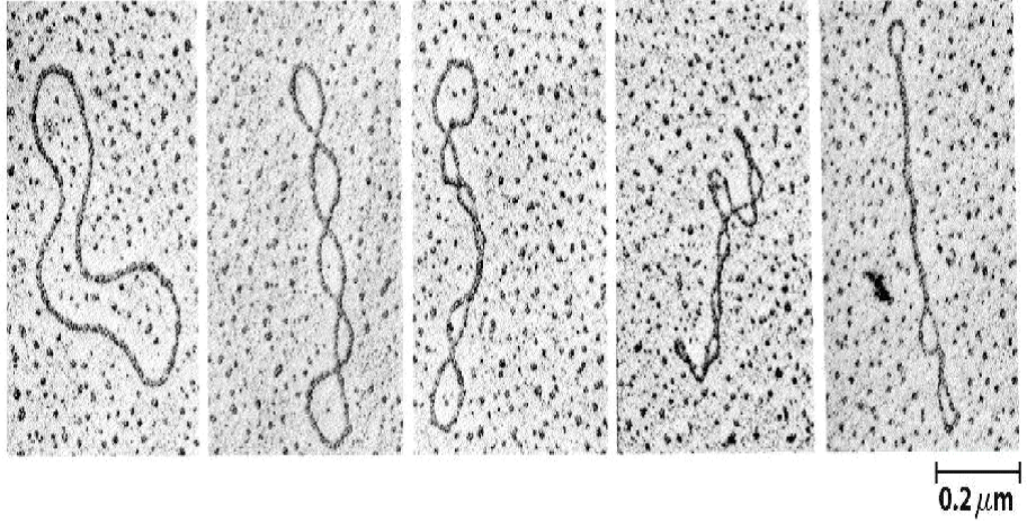
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. DNA Topolojisi

Yetişkin bir insan vücudu 10^{14} hücreden oluşur ve her hücrede yaklaşık 2 metre uzunluğunda DNA olduğu düşünüldüğünde toplam DNA uzunluğu 2×10^{11} km olarak hesaplanabilir.

Prokaryotik genomlar ökaryotik genomlara göre daha az bilgi taşıdıkları ve kompakt -intron/ekzon farklılaşması bulunmaz bir yapıda oldukları için daha kısa olsalar da, tüm prokaryotik ve ökaryotik genomların hücre içinde daha az yer kaplamaları için paketlenmeleri gerekmektedir. Örneğin insan genomu diploit yapıda yaklaşık 6.10^9 baza sahiptir. Diğer taraftan *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisi farklı suşlarında ortalama $4.6.10^6$ baza sahiptir ve genomu açık halde 1,5 mm uzunluğa sahiptir. Bu genomlar bu kadar büyük olmalarına rağmen birkaç μm genişliğe sığabilmektedirler. Bu uzunlukta bir molekülün bu kadar dar bir alana sığabilmesi için DNA'nın düzenli bir şekilde kendi etrafında katlanarak bir yapı oluşturması gerekir. DNA'nın oluşturduğu bu yapıya DNA süpersarmal yapısı denir (Bates ve Maxwell, 2005; Pommier vd., 2010).

DNA süpersarmal yapılarının histon proteinleri üzerinde düzenli olarak sarılması ile nükleozom yapıları ve bunların da mitoz sırasında kısalıp kalınlaşması ile kromozom yapıları oluşur (Bates ve Maxwell, 2005). Sıkı şekilde paketlenmiş hücresel DNA'da molekülün kendi üzerine sarılması ve süper kıvrımlı hale gelmesi mantıklı görünmektedir. Bunun kanıtı hücrelerden, proteinler ve diğer hücresel bileşenlerden arındırılarak, izole edilen çoğu halkasal DNA molekülün yüksek oranda süper kıvrımlı olmasıdır. Bu durum bütün hücresel DNA'larda oluşur ve her hücrede yüksek oranda düzenlenmektedir. Watson-Crick yapısındaki DNA'da gerilim stresi yoktur. Bu DNA relaks DNA olarak isimlendirilir. Canlı sistemlerde DNA %6 oranında süpersarmal halindedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Relaks ve süper kıvrımlı plazmid DNA'lar. Elektron mikrografda en soldaki molekül relakstır; soldan sağa doğru süper kıvrılma artmaktadır (Nelson ve Cox, 2004'ten değiştirilerek alınmıştır).

2.2. DNA Topoizomerazlar

2.2.1. DNA topoizomerazların yapıları, fonksiyonları ve sınıflandırılmaları

DNA molekülünün bir topolojik formdan diğer topolojik forma dönüşümü biyolojik olarak bir enzim ailesi tarafından olur. Bu enzim ailesi, DNA'yı bir ya da iki zincirinden kesebilen ve uçları tekrar birleştirmeden önce DNA'nın sarmal yapısını açabilen ya da yeniden sarmal yapı oluşturabilen ve işlevlerine uygun olarak adlandırılan topoizomerazlardır. Topoizomerazlar, hücre içerisinde DNA'nın topolojik özelliklerinden sorumlu enzimlerdir.

Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hemde ökaryotlarda DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması gibi işlemlerde gerekli ve önemli enzimlerdir (Baranello vd., 2013).

Topoizomerazlar IUPAC adlandırma sisteminde tip I: EC5.99.1.2 (ω -protein, topoizomeraz I) ve tip II: EC5.99.1.3 (topoizomeraz II, giraz) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Topoizomeraz enzimleri DNA'yı, tek iplikten (tip I) veya iki ipliğini de kırarak (tip II) etki ederler. Tip I DNA topoizomerazlar tek iplik kırıkları oluştururken ATP enerjisine ihtiyaç duymadan reaksiyonlarını sağlayabilirler. Tip II DNA topoizomerazlar ise ATP ihtiyacı duyan enzimlerdir ve çift iplik kırıkları oluşturarak işlev görürler.

DNA topoizomerazlar aktif bölgelerinde bulunan tirozin aminoasidi ile DNA uçlarından birine transesterifikasyon reaksiyonu ile kovalent bağ yaparak fosfat bağını koparıp etki ederler. Böylece orijinal fosfodiester bağının enerjisi korunur ve bu enerji zincirin tekrar birleştirilmesi için kullanıldığından ATP harcanmamış olur. İkinci bir DNA esterifikasyonu serbest hidroksil (OH) ucuna sahip DNA ile meydana gelir ve kovalent değildir. Fosfotirozin bağı DNA'daki kırığı onarır. Genellikle bu ikinci reaksiyon orijinal fosfodiester bağını onarmaktadır fakat bazı koşullarda DNA topoizomerazlar DNA'nın bir ucunu başka bir DNA ucuna transfer etmek için uyarılabilirler (Pommier vd., 2010).

Topoizomeraz enzimlerinin çoğunluğunun reaksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için divalent katyonlara ihtiyaç duyarlar. Magnezyum, enzimlerin en çok kullandığı metal iyon kofaktörüdür. Magnezyum (Mg^{+2}), fosfat içeren enzimlerde kararlı kompleksler oluşturur ve ATP metal iyonuyla fizyolojik koşullarda etkileşir. Topoizomeraz enzimleri Tip I DNA Topoizomeraz ve Tip II DNA Topoizomeraz olarak ikiye ayrılır:

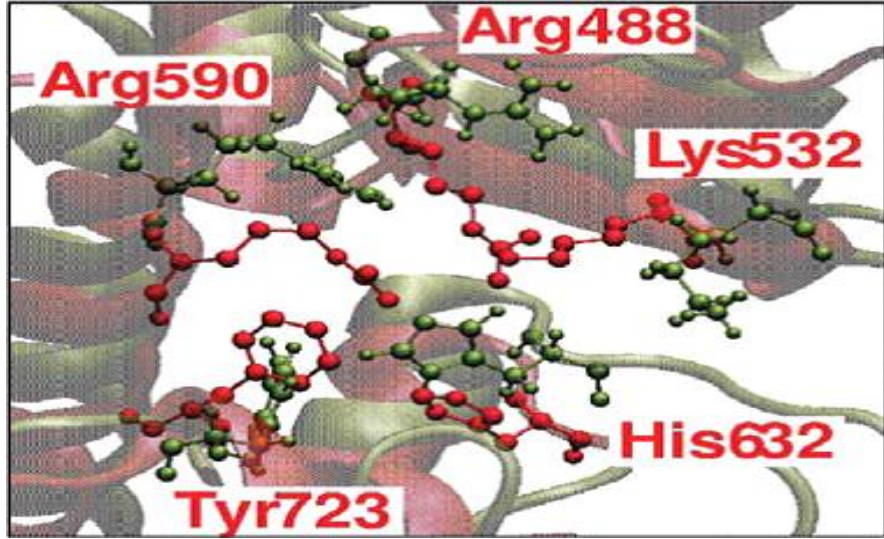
Tip I DNA Topoizomeraz; tip IA, IB ve IC olmak üzere üç sınıfa ayrılmıştır. Sınıflar kendi içerisinde dizi, yapı ve atomik mekanizma açısından benzerlikler gösterirler. Ancak farklı sınıflar arasında herhangi bir dizi veya yapı benzerliği yoktur. Farklı ailelerin kesme ve tekrar bağlama atomik mekanizmaları ise yalnızca yüzeysel benzerlikler gösterir. Tip I DNA topoizomerazlar; DNA'nın tek zincirinde geçici olarak bir kırık oluşturup daha sonra, uçlardan birini kırılmayan zincir etrafında döndürürler ve kırılan uçları tekrar ligaz aktivitesi ile birleştirerek süper kıvrımlı DNA'yı relaks hale çevirirler. Bu işlem için herhangi bir enerjiye (ATP) ihtiyaç duymazlar. DNA'daki süper kıvrımların kaldırılması enerji açısından uygun bir tepkimedir. Enzim DNA'ya bağlanır ve bir zinciri keser. Kesilen DNA zincirine 3' veya 5' uçtan geçici bir kovalent fosfotirozin bağı ile bağlanır (Baker vd., 2009). Burada meydana gelen reaksiyonun asit-baz tipi olduğu gösterilmiştir (Wang, 1996). Kesilmemiş zincirin kesilmiş olanın içinden geçirilmesinden sonra kırık tekrar bağlanır. Bu işlem sonunda (-) süper kıvrım sayısında bir tane eksilme olur. Bu işlemde sorumlu enzim ailesi tip I DNA topoizomerazlar olarak adlandırılır. *E. coli* topoizomeraz I enzimi, (-) süper kıvrımlı DNA'yı relaks haldeki DNA'ya dönüştürürken, ökaryotik topoizomeraz I enzimleri hem (-) hem de (+) süperkıvrımlı DNA'yı relaks forma dönüştürebilirler (Pindur ve Lemster, 1998).

Bakterilerde bulunan tip IA enzimlerinin 5' kovalent ara ürünlerini oluşturarak DNA'yı enzim köprüsü yolu ile relaks hale getirdiği, ökaryotlar ve virüslerde bulunan tip IB ve IC'nin ise 3' kovalent ara ürünleri meydana getirerek DNA'nın kendi etrafında dönmesi (kontrollü rotasyonla) ile relaksasyonun (Şekil 2.3) gerçekleştiği rapor edilmiştir (Baker vd., 2009).

Tip IB topoizomerazlar, ökaryotlar, bakteri, poxvirus de tanımlanmışken, arkeada yoktur. Ökaryotik tip IB molekülleri tek bir polipeptitten (monomer) meydana gelen büyük, genel olarak 90 kDa'un üzerindeki bir proteinken, virüs ve bakterilerde tip IB molekülleri yaklaşık olarak küçük ve 36 kDa moleküler ağırlıktadır. Boyutlarındaki farklılığa rağmen tüm tip IB molekülleri genel katalitik mekanizmaları ve aktif bölgelerinin etrafında benzer katlanmaları ile benzerlik taşırlar. Bu benzerliklerin tirozin rekombinaz ailesinde de olması, rekombinaz ve tip IB topoizomerazlar ile tek bir ortak atadan geldiğini ispatlamıştır.

Tip IB enzimleri DNA'nın kırık ucunda geçici bir 3'-fosfotirozil kovalent bağlanması gerçekleştirirler. Hem negatif hem de pozitif süper kıvrımlı DNA'yı herhangi bir iki değerlikli katyon veya ATP gibi enerji kofaktörü gerekmeksizin relaks hale çevirirler (Pindur ve Lemster, 1998; Baker vd., 2009).

Bütün tip IB topoizomerazların yapısal ve fonksiyonel özellikleri ortaktır. Hepsi yüksek oranda korunmuş olan şekil 2.2'de de gösterilen 5 rezidulu bir aktif bölgeden (Tyr, Arg, Arg, Lys ve His/Asn) oluşurlar.



Şekil 2.2: İnsan topoizomerez I yapısında yer alan aktif 5 amino asit ve yerinin gösterilmesi. Tyr723: tirozin, Lys 532 Lys 587: lizin, Arg 488, Arg490:arjinin, His632: histidin (Chillemi vd., 2007).

Tip IC'nin hem yapısal hem de fonksiyonel olarak diğer tip I enzimlerinden tamamen farklı olması ve sadece arkealarda bulunması bu enzimin yeni bir sınıf olarak kabul edilmesine sebep olmuştur (Taneja vd., 2006).

Tip II DNA Topoizomerezlar; Prokaryotlarda tip IIA ve IIB, ökaryotlarda ise tip II α ve tip II β olmak üzere 2'ye ayrılır. DNA'nın her iki zincirini birden kesip yeniden birleştirerek DNA'nın topolojisini değiştirirler. Bu işlem için ATP 'ye ihtiyaç duyarlar. Tip IIA grubu topoizomerezlar, ilk olarak Gellert ve ark. (1976) tarafından izole edilmiştir. Tip IIA grubu enzimler, ikili DNA sarmalının her iki zincirini geçici olarak kırdıktan sonra ATP harcayarak başka bir ikili heliksi bu aralıktan geçirirler.

Tip IIB grubu topoizomerezlar ise Bergerat ve ark. (1994) tarafından tanımlanmıştır. Tip IIA grubu enzimlerinden yapısal olarak farklıdır. Tip IIB topoizomerezlar tüm prokaryotik tip II ler gibi heterotetramer olup, prototipi arkeal DNA topoizomerez VI'dır. ATP kullanarak negatif ve pozitif süper sarmalları gevşetirler, süper sarmal oluşturmazlar ve kuvvetli dekatensasyon aktivitesine sahiptirler (Bergerat vd., 1997).

Tip II topoizomerezlar içinde ilk olarak izole edilmiş olan *E.coli* DNA topoizomerez II ya da Giraz olarak da adlandırılan enzimdir. Bu enzim, pozitif süper kıvrımlı DNA'yı önce relaks haldeki DNA'ya, sonra da ATP hidrolizi ile tekrar negatif süper kıvrımlı DNA'ya dönüşümünü sağlamaktadır (Gellert vd., 1976; Pindur ve Lemster, 1998).

Özetle tip II topoizomeraz (Topo II), transkripsiyon, replikasyon, kromozom segregasyonu işlemlerde esas ve ATP-bağımlı bir enzimdir, kanser terapisi için önemli bir hedeftir (Daumar vd., 2014).

Ökaryotik DNA Topoizomerazlar; Bugüne kadar ökaryotlarda bulunan 5 çeşit topoizomeraz enzimi rapor edilmiştir (Çizelge 2.1). Bunlar sırasıyla, topo I, topo III α , topo III β , bu gruptakiler tip I topoizomerazlardır ve diğer grup olan topo II α ve topo II β enzimleri de tip II topoizomeraz ailesindendir (Nitiss vd ., 1998).

Çizelge 2.1: Ökaryotik DNA topoizomerazların sınıflandırılması ve fonksiyonları (Cortes vd., 2003).

Topoizomeraz Enzimleri	Tipi	Yapısı	Mol. Ağ. (kDa)	DNA kesimi	Gen Lokasyonu (insan kromozomu)	Fonksiyonu
I	1B	monomer	100	tek zincir	20	Replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon
III α	1A	2 izoform	110	tek zincir	17	Rekombinasyon, rDNA metabolizması
III β	1A	3 izoform	96	tek zincir	22	Rekombinasyon
II α	2	homodimer	170	çift zincir	17	Kromozom yoğunlaşması ve ayrışması, replikasyon
II β	2	homodimer	180	çift zincir	3	Tam olarak tanımlanmamış iş

Ökaryotik DNA Topoizomeraz I ; Ökaryotik topoizomeraz I enzimi nükleer bir protein olup, yaklaşık %95' lik kısmı çekirdekçik içerisinde bulunur. (Muller vd., 1985). Topoizomeraz I enzimleri DNA replikasyonu, transkripsiyon ve homolog rekombinasyonda görev alır. Enzim, RNA transkripsiyonunun aktif olduğu bölgelerde yaygın olarak bulunur.

Memeli DNA topoizomeraz I enzimi ilk kez rat karaciğerinden, hem pozitif hem de negatif süper kıvrımlı DNA'nın relaks forma dönüşümünü sağlayan 67 kDa ağırlığında monomerik bir protein olarak bilinmektedir (Chen ve Liu, 1994). Miller ve arkadaşları tarafından da, HeLa hücrelerinden aynı aktiviteye sahip olan 100 kDa'luk bir monomerik protein bulunmuştur. İnsan DNA topoizomeraz I enzimi tip IB enzimidir ve 100 kDa ağırlığında, monomer olarak katalitik aktivite gösteren bir yapıdadır. ATP'den bağımsız bir şekilde DNA'yı tek zincirinden kırar ve kırılmış DNA zincirinin 3' ucuna kovalent olarak bağlanarak DNA-topoizomeraz I kesim kompleksini sağlar. Topoizomeraz I' in katalitik döngüsü; DNA'ya bağlanma, kesim, religasyon ve salınım basamaklarından meydana gelir (Şekil 2.3).

A

B Noncovalent complex

C Covalent Intermediate

D

E Covalent Intermediate

F Noncovalent complex

G

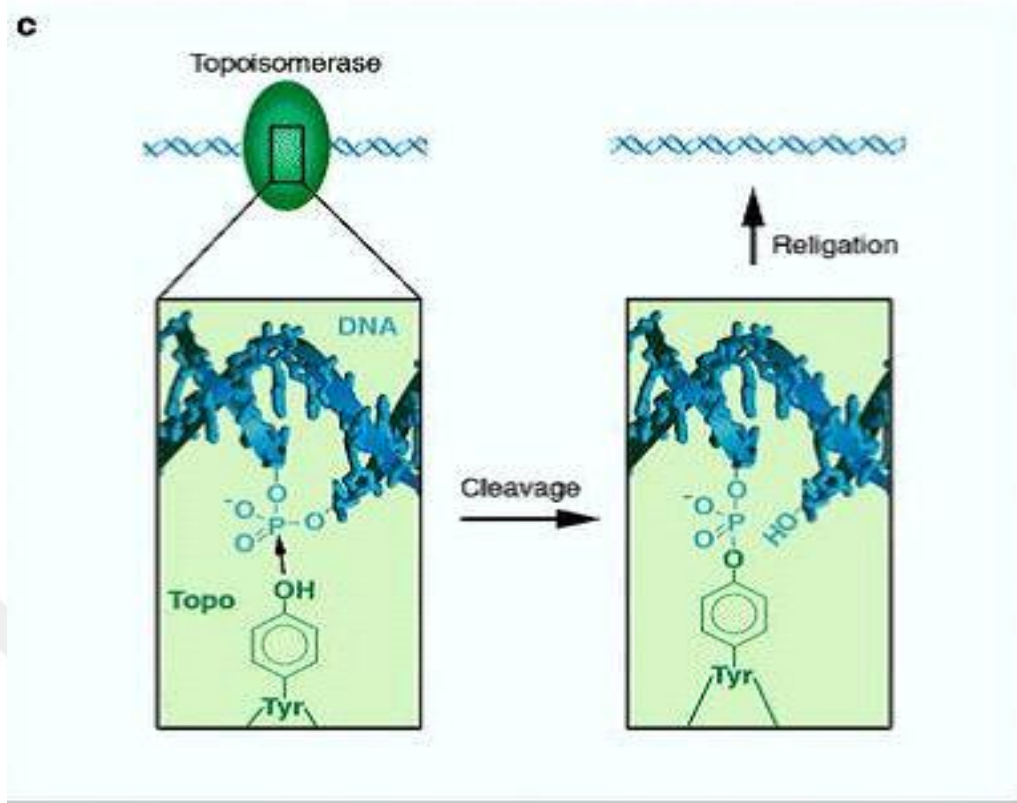
BAĞLANMA

SALINIM

KESİM

RELİGASYON

KONTROLLÜ ROTASYON MEKANİZMASI



Şekil 2.4: Topoizomeraz I enziminin DNA'ya bağlanması (Leppard ve Champoux, 2005).

Bağlayıcı ve N-terminal domainin bazı kısımları da rotasyonu etkiler. Bu kısımlar DNA ile etkileşime girdiği ve hatta enzimin aktif bölgesine uygulanan kısılcının açık / kapalı halleriyle iletişim kurabilen bir sensör olarak rol oynadığı için topoizomeraz I tarafından meydana getirilen “kontrollü rotasyon mekanizması” ile oluşmaktadır (Şekil 2.4) (Stewart vd., 1998).

Topoizomeraz I'in hücrede birçok proteinle direkt etkileşim halinde olduğu bulunmuştur (Çizelge 2.2) (Gilmour vd., 1986; Gilmour ve Elgin, 1987).

Çizelge 2.2: Ökaryotik topoizomeraz I' in hücrede etkileşim içinde olduğu proteinler (Leppard ve Champoux, 2005).

ETKİLEŞEN PROTEİN	FONKSİYONU	ETKİLEŞİMDEKİ POTANSİYEL ÖNEMİ
WRN	Helikaz	Replikasyon, onarım ve transkripsiyon
PARP-1	Tümör supresör	Topoizomeraz I kesim kompleksinin onarımı
p53	Tümör supresör	DNA onarımı, transkripsiyon ve apoptozis sırasında DNA fragmentasyonu
p14ARF	Tümör supresör	Çekirdekçikte Topoizomeraz I in aktivasyonunun stabilizasyonu
Nükleolin	DNA bağlama	rDNA intergenik spacer bölgesine toplanma; nükleolar bozulmadan sonra DNA sentezinin inhibisyonu
TATA bağlanma protein (TBP)	transkripsiyon faktörü	Transkripsiyon
UBC9	SUMO E2	Sumolizasyon, lokalizasyon, onarım
Topors	E3 ligaz	Topoizomeraz I ubigutinasyonu ve degradasyon
SF2/ASF	RNA-splicing faktör	RNA splicing

Araştırmacılar, insan DNA topoizomeraz I cDNA'nın dizisini çıkartmışlar ve *top1* geni olarak adlandırılan bu genin 20. kromozomun q kolunda (20q12) olduğunu bulmuşlardır. İnsan DNA topoizomeraz I cDNA'sı, 765 aminoasitlik bir polipeptiti kodlamaktadır (Engel vd., 2004).

Ökaryotik topoizomeraz I enzimlerinin çoğu benzer diziler içermekte ve dört ana domainden oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla; N-terminal domaini, çekirdek (core) domaini, bağlayıcı (linker) domain ve C-terminal domainidir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: İnsan topoizomeraz I enziminin yapısal domainleri (Champoux, 2001).

N-terminal domaini (1-212 amino asit arası); zayıf olarak korunmuş, yüksek oranda yüklüdür. Çok düşük oranda hidrofobik amino asit içerir ve büyük oranda düzensizdir. Bu bölge dört nükleer lokalizasyon dizisi ve hedefleyici sinyaller bulundurulur.

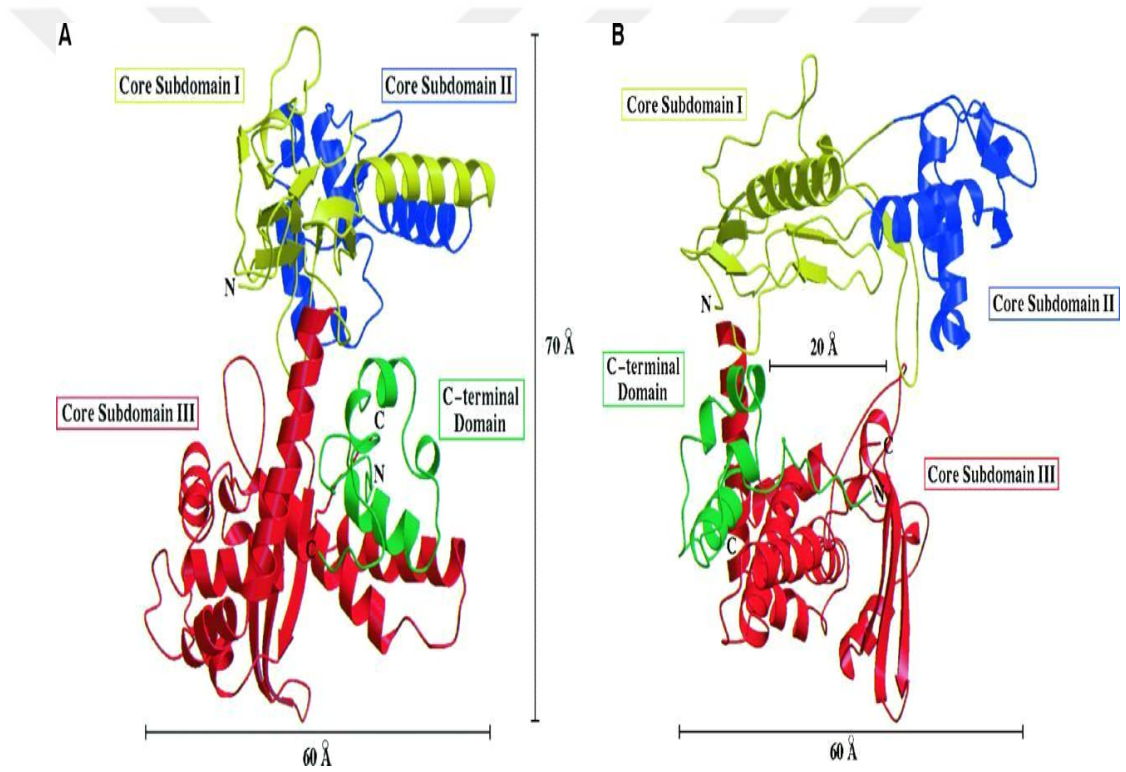
Çekirdek domaini (213-635 amino asit arası); yüksek oranda korunmuş ve DNA'ya bağlanması için gereklidir. Birçok katalitik dizi içerir.

Bağlayıcı (linker) domain (636-712 amino asit arası); düşük oranda korunmuştur ve enzimin katalitik aktivitesi için zorunlu değildir.

C-terminal domain (713-765 amino asit arası); yüksek oranda korunmuştur ve DNA'nın relaks forma dönüşmesi için mutlak gerekli olan aktif 723. amino asit tirozin (try723) rezidüsünü içerir. Bu tirozin amino asidi, DNA'nın 3' ucu ile enzim arasında kovalent bir bağ kurar.

Bu da zincir geçişine izin veren tek zincirli DNA kırıklarının (nick) oluşumuna neden olur (Larsen ve Gobert, 1999; Champoux, 2001).

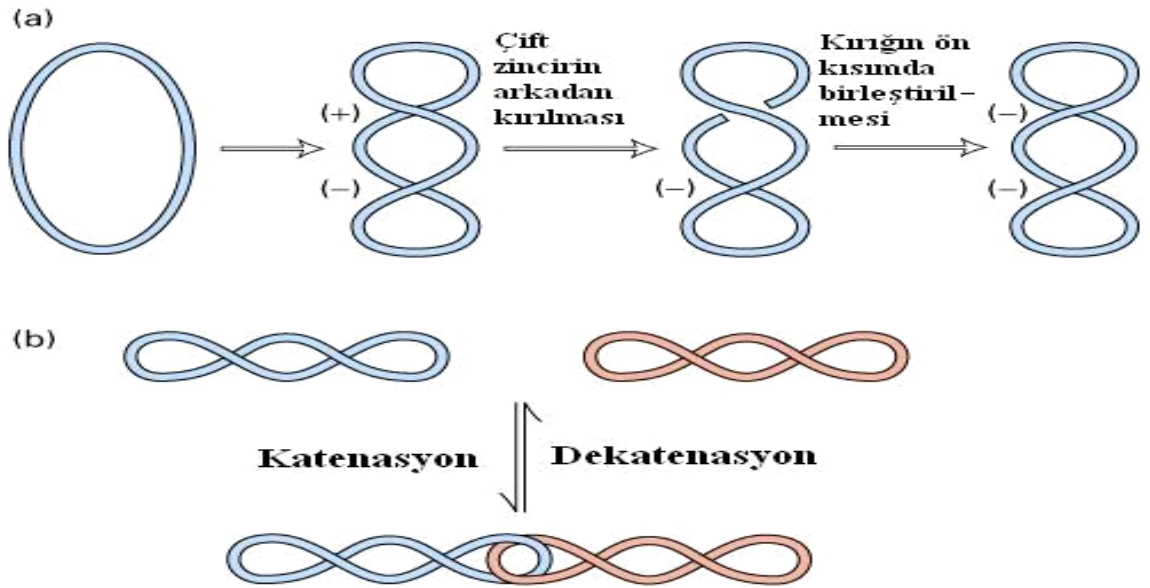
Bu domainlerden ikisinin birbirlerine bağlanması enzimatik aktiviteyi düzenlerken kor ve C-terminal domainler in vitroda DNA replikasyonu için gerekli minimal gereksinimi göstermektedir (Şekil 2.6). Bu iki domain; ökaryotik Tip I B grubu enzimleri arasında iyi korunmuş beş aktif bölge amino asit rezidüsünü içerir (Stewart vd., 1997; Redinbo vd., 1998). Hem kovalent hem de non kovalent bir şekilde DNA'ya bağlanan kısım topoizomeraz I' in 201-765 aminoasitlik bölgesidir (Stewart vd., 1998).



Şekil 2.6: İnsan topoizomeraz I enziminin moleküler yapısı ve üç boyutlu şekli.

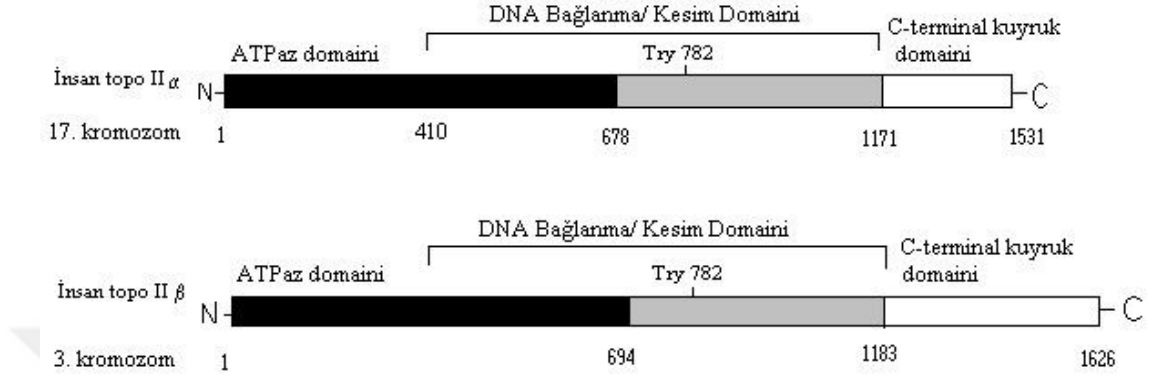
Ökaryotik DNA Topoizomeraz II; Memeli hücrelerinde, topoizomeraz II'nin iki izoformu vardır. Bunlar, topoizomeraz II α (180 kDa) ve topoizomeraz II β (170 kDa)'dır (Engel vd., 2004).

Topoizomeraz II enzimleri DNA replikasyonu, transkripsiyon ve homolog rekombinasyon gibi kendine özgü eşsiz görevlerinin yanı sıra DNA replikasyonundan sonraki kardeş kromotitlerin ayrılması, kromozom yoğunlaşması ve mitoz esnasında anafazdan sonraki kromozom ayrılmasında da görev almaktadır (Hatsui vd., 1998). Topoizomeraz II'ler homodimerler oluşturur. ATP'yi kullanarak DNA'da çift zincir kırıkları meydana getirdikten sonra bu kırıklarını DNA zincirlerinin 5' fosforil ucuna bağlayarak faaliyet gösterirler. Memeli DNA topoizomeraz II enzimi, ATP-bağımlı gevşeme (relaxation), düğümlenme-çözülme (knotting-unknotting) ve bağlanma-kopma (catenation-decatenation) reaksiyonlarını katalizlemektedir. Şekil 2.7'de DNA topoizomeraz II enzimlerinin genel fonksiyonları gösterilmektedir.



Şekil 2.7: DNA topoizomeraz II enzimlerinin genel fonksiyonları

Ökaryotik topoizomeraz II enzimleri üç yapısal domainden oluşmaktadır. Bunlar: ATPaz domaini, DNA bağlanma/ kesim domaini ve C-terminal kuyruk domainleridir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: İnsan topoizomeraz II enziminin yapısal domainleri (Champoux, 2001).

ATPase domaini (topo II α için 1-678, topo II β için 1-694 amino asit arası) ; topoizomeraz II enziminin katalitik aktivitesi için ATP mutlaka gereklidir. Bu bölgenin ilk 400 amino asitlik kısmında ATP bağlanma bölgesi vardır. Diğer kısmında da DNA bağlanma / kesim domaini bulunur.

DNA bağlanma/kesim domaini (topo II α için 410-1171, topo II β için 410-1183 amino asit arası) ; DNA'ya bağlanma ve kesim için gerekli olan yüksek oranda korunmuş dizileri içerir. Bu bölge, enzimin katalitik aktivitesini gerçekleştirebilmesi için gerekli olan 782. aminoasit tirozin (try782) rezidüsünü içerir. Tirozin aminoasidi, DNA'nın 5' fosfat ucuna bağlanarak DNA ile enzim arasında kovalent bir bağ oluşturur. Bu da zincir geçişine izin veren DNA çift zincir kırıklarının oluşmasına izin verir (Champoux, 2001).

C-terminal kuyruk domaini (topo II α için 1172-1531 , topo II β için 1184- 1626 amino asit arası) ; Diğer proteinlerle etkileşim ve nükleer hedefleme açısından önemlidir.

2.3. Kanser Terapide Topoizomerazların Rolü

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 2020 yılına kadar her yıl 20 milyon yeni kanser hastası olacağı tahmin edilmektedir. Dünya genelinde kanser, kalp damar hastalıklarından sonra ölüm oranı en yüksek hastalıktır. Kanser oldukça kompleks bir hastalıktır, birbirinden farklı 200'den fazla çeşidi vardır. Akciğer, kolon, prostat, meme en yaygın olanlarıdır ve bütün yeni vakaların yarısından fazlasını oluştururlar (Meyers, 2004).

DNA topoizomerazların evrimsel olarak korunması onların hayatsal olarak önemli bir fonksiyona sahip olduklarını belirtir. DNA'nın hücre içerisindeki yapısının korunması bu enzimlerin aktivitesine bağlıdır ve bu enzimler olmadan DNA replikasyonu ve hücre bölünmesinin olması mümkün değildir. Birçok çalışma transforme ve hızla çoğalan hücrelerin yüksek seviyede topoizomeraz enzimlerini içerdiğini göstermiştir. Bu nedenle topoizomerazlar, çeşitli antitümör ve antimikrobiyal ilaçların ana hedefleri haline gelmiştir (Kellner vd., 2000 ; Engel vd., 2004 ; Rogojina ve Nitiss, 2008; March ve Pommier, 2012).

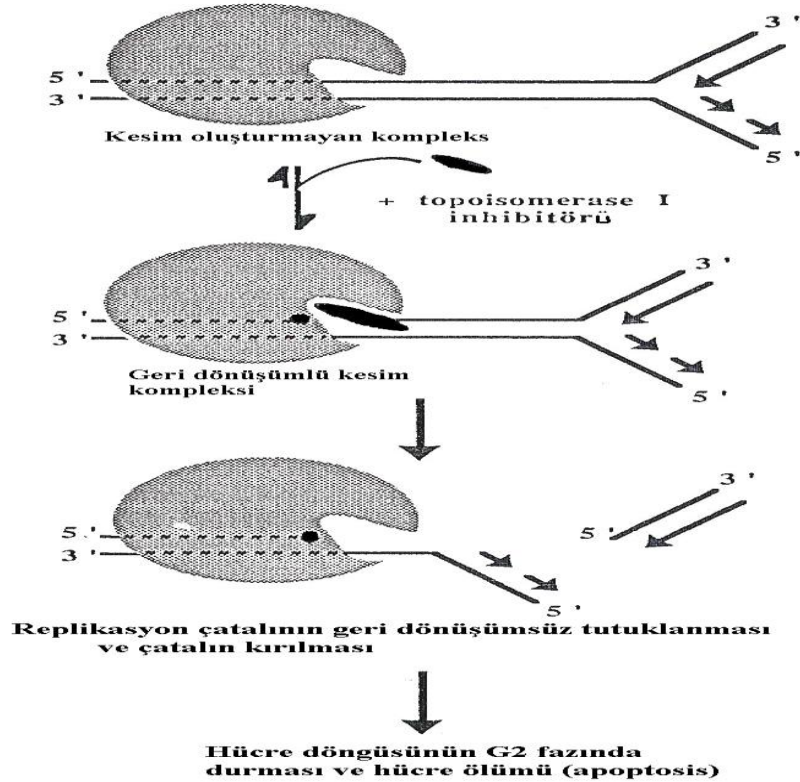
Giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörleri, antitümör aktiviteye sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak oluşturmuştur (Potmesil vd., 1991 ; Ralph vd., 1994; Osheroff, 2003). Son yıllarda yapılan çalışmalar aynı zamanda topoizomerazların; antifungal, antiviral ve antiparazit ilaçlar için de terapötik hedefler olabileceğini ortaya çıkarmışlardır.

Topoizomeraz I hücre döngüsü sırasında miktar ve kararlılıkta herhangi bir farklılık göstermez iken, topoizomeraz II hücre döngüsünün protein seviyesine, çoğalma basamağına bağlı olarak S fazında artış gösterir. Topoizomeraz II'nin bu özelliği çeşitli antineoplastik ilaçlar için bu enzimi öncelikli hücresel hedef haline getirmiştir ve bu antineoplastik ilaçlar, yüksek DNA replikasyon oranına ve ayrıca yüksek topoizomeraz II seviyesine sahip hücrelere karşı daha fazla öldürücü etki yaparlar.

2.4. Topoizomerazları Hedefleyen Antikanser İlaçların İnhibisyon Mekanizmaları

Topoizomeraz aktivitesinin inhibisyonu ile ilgili çok farklı mekanizmalar vardır ve genel olarak topoizomeraz inhibitörleri iki sınıfa ayrılır: (Sınıf 1) topoizomeraz zehirleri, (Sınıf 2) katalitik inhibitörler.

Topoizomeraz Zehirleri (Sınıf 1); Topoizomeraz zehirleri olarak anılmalarının sebebi DNA kırıkları oluşturarak hücrede zehir etkisi yaratmalarıdır. DNA-topoizomeraz kovalent kompleksini (cleavage complex) kararlı hale getiren ve DNA’da meydana getirilen geçici kırığın tekrar birleştirilmesine engel olur. Normalde, topoizomeraz-DNA cleavage komplekslerinin ömürleri kısadır ve kolayca geri dönüşebilirler. Fakat ortamda bir topoizomeraz zehiri olduğunda topoizomeraz-DNA kovalent komplekslerinin fizyolojik konsantrasyonu önemli derece artar ve delesyonlar, translokasyonlar ve kromozomal insersiyonlar gibi mutajenik olaylar oluşmasına neden olur (Şekil 2.9). Hücrelerde hasarlı DNA’nın (tek ya da çift zincir kırıklı DNA parçalarının) birikimine bağlı olarak da programlı hücre ölümü (apoptosis) dediğimiz olay meydana gelir (Baguley ve Ferguson, 1998; Osheroff, 2003).



Şekil 2.9: Topoizomeraz I zehirlerinin etki mekanizması (Chen ve Liu, 1994).

Topoizomeraz zehirleri olan bileşikler akridinler (acrydines), antrasiklinler (anthracyclines), aktinomisinler (actinomycins), eliptisinler (ellipticines), alkaloidler (kamptotesin), epipodofilotoksinler (epipodophyllotoxins), izoflavodinler (isoflavodins), kinolonları içerirler. Bu ilaçlar enzim-DNA kovalent komplekslerini stabilize ederler.

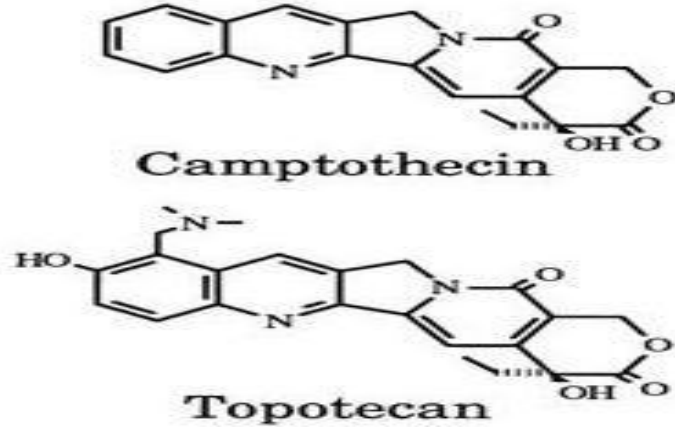
Katalitik İnhibitörler (Sınıf 2); DNA'ya bağlanarak ya da topoizomerazlara bağlanarak DNA'nın enzime bağlanmasını bloke edebildikleri gibi topoizomeraz katalitik döngüsündeki basamakların herhangi birini durdurarak DNA'da meydana gelen süper kıvrılmaların, düğümlerin ya da karışıkların çözülmesini önleyerek mitotik ve mayotik başarısızlıklara neden olurlar. Ayrıca, topoizomeraz II'nin katalitik döngüsü sırasında ATP'nin bağlanması veya serbest bırakılmasını engelleyen maddeler de katalitik inhibitörler arasına girmektedir (Fortune ve Osheroff, 1998 ; Syrovest vd., 2000; Larsen vd., 2003; Kaina, 2003).

2.5. Topoizomeraz İnhibitörü İlaçlar

2.5.1. Topoizomeraz I inhibitörü ilaçlar

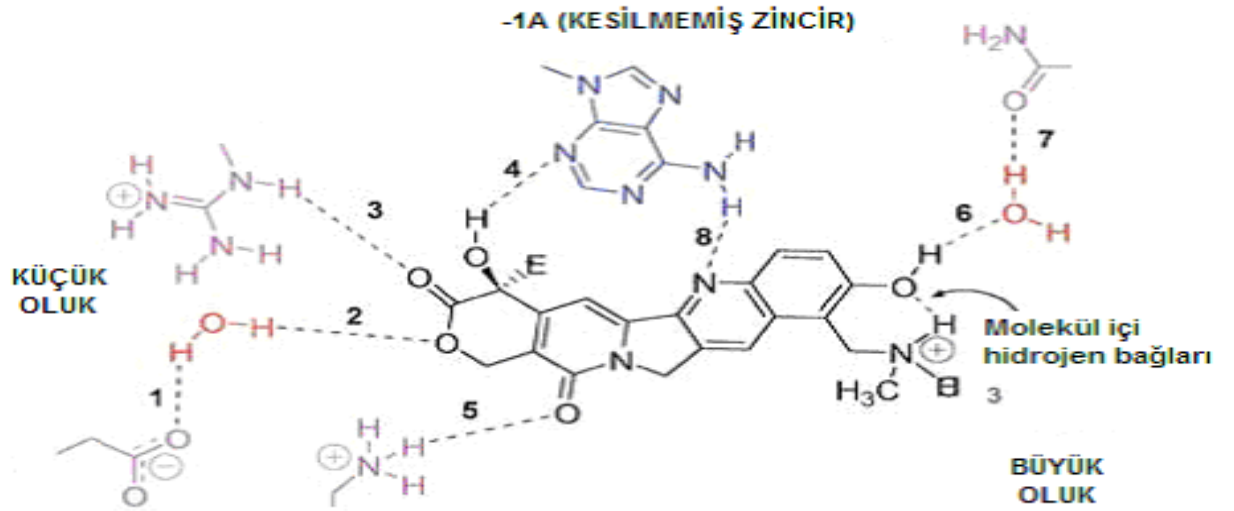
TipI hedefli topoizomeraz zehiri olan ilaçlardan en yaygın kullanılanı *Camptotheca accumita*'dan izole edilmiş sitotoksik bir alkaloid olan kamptotesindir (Zhang vd., 2013). 1970'ten beri ökaryotik topo I inhibitörü olarak kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır.

Kamptotesin, kalın bağırsak ve yumurtalık kanseri gibi insan tümörlerinde klinik aktiviteleri gösterilmiş topoizomeraz I hedefli antitümör ilaç sınıfına aittir. Kamptotesin türevleri, kanser tedavisinde kullanılan seçici inhibitör olarak bilinir (Coletta vd; 2013). Örneğin topotekan ve irinotekan gibi kanser tedavisi için uygulanan topoizomeraz I (top1) inhibitörleri, doğal alkaloid kamptotesin (CPT) türevleridir. Günümüzde, irinotekan (CTP-11) ve topotekan klinik uygulamaları ve aktiviteleri giderek daha iyi karakterize edilen ve en yaygın olarak kullanılan kamptotesin analoglarıdır (Şekil 2.10). Diğer klinikte kullanılan kamptotesin türevleri ise 9- amino kamptotesin, 9-nitro kamptotesin, GI147211 ve DX-8951f'dir. Kamptotesin türevlerinin çoğu güçlü topoizomeraz I inhibitörleridir (Takimoto vd., 1998 ; Christian, 2003).



Şekil 2.10: Topoizomerez I inhibitörleri.

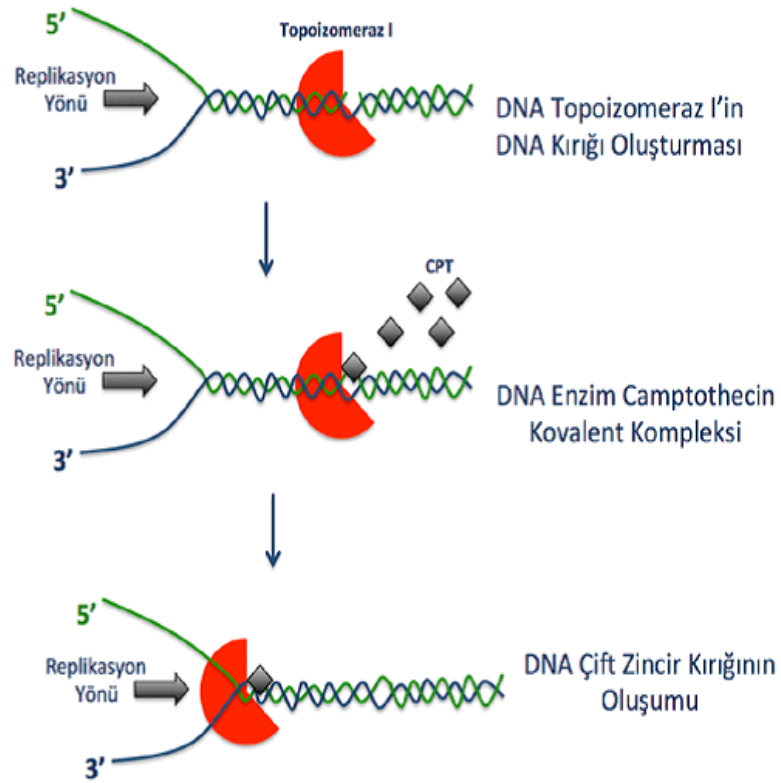
Kamptotesin, DNA'daki topoizomerez I kesim bölgesinin -1 ve +1 baz çiftleri arasına bağlanabilir. Enzim tek zincirde kesim yaptıktan sonra kesilmemiş zincirdeki bağlanma bölgesindeki +1 ve -1 nükleotidler arasındaki fosfodiester bağı dönerek kamptotesin'in bağlanabileceği bir yapı oluşturur. Bu nedenle kamptotesin yalnızca DNA- enzim kompleksine bağlanabilir (Şekil 2.11) (Rashed ve Rubin, 2003).



Şekil 2.11: Kamptotesin'in DNA ve topoizomerez I'e bağlanması.

Kamptotesin ve türevleri DNA’da tek zincir kırıkları ve çapraz bağlanmalara neden olurlar. Bu ajanlar DNA- topo I enzim komplekslerine bağlanırlar ve enzimin yeniden bağlama aktivitesini inhibe ederek komplekslerin kararlılığını artırır.

Bu nedenle DNA’da tek zincir kırıkları oluşturmaları yanında replikasyon ve transkripsiyon komplekslerinin bu yapılarla karşılaşması bu kırıkların çift zincir kırığına dönüşmesini sağlamaktadır (Şekil 2.12) (Pommier vd., 1998; Stewart ve Champoux, 2001; Rashed ve Rubin, 2003).



Şekil 2.12: Kamptotesin etki mekanizması. Replikasyon sırasında Kamptotesin bileşiği DNA-enzim kovalent kompleks oluşumuna neden olur. Replikasyon devamında oluşan DNA çift iplik kırıkları oluşur. Topcu, (2001)’den değiştirilerek alınmıştır.

2.5.2. Topoizomeraz II inhibitörü ilaçlar

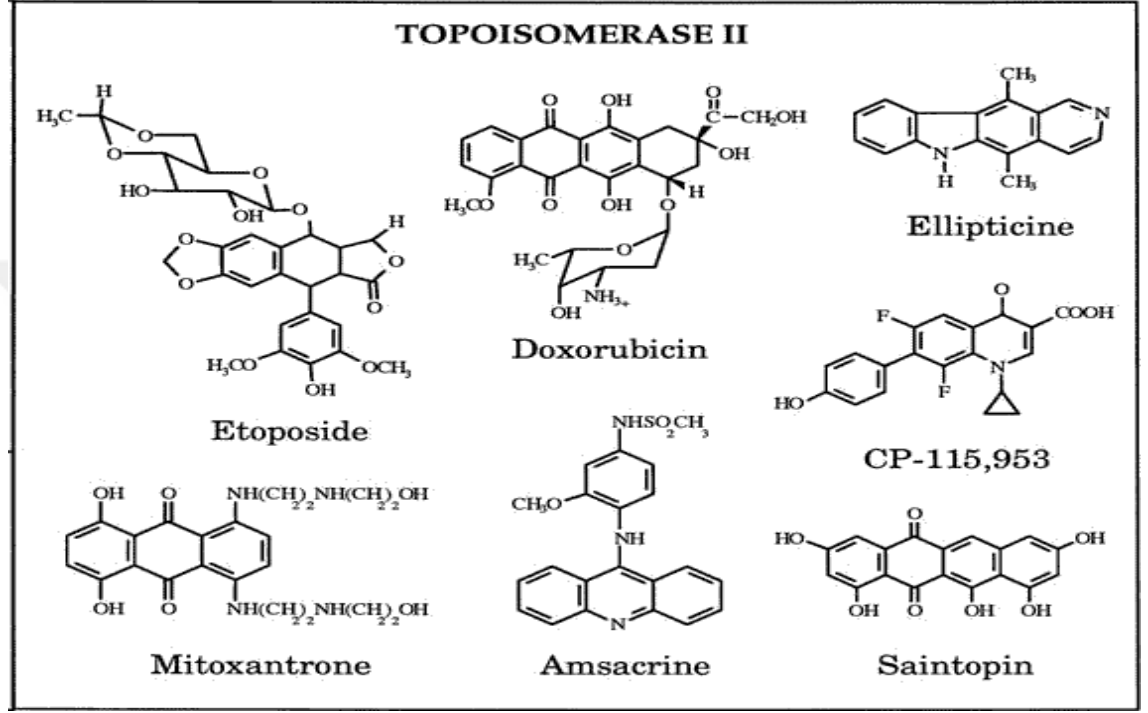
Tip II topoizomerazları hedefleyen bileşikler, onkolojide ve hematolojide kullanılan en eski antikanser ajanlarıdır. Topoizomeraz II hedefleyen ilaçlar, klinik kullanımda çok etkili olup antikanser tedavisinde, hastalığın stabilitesi ve ilerlemesinin durdurulmasında kullanılmaktadır (March ve Pommier, 2012).

Topoizomeraz zehirleri ve bunlarla ilgili bileşikler, kanser terapide en çok kullanılan ilaçlar arasındadır. Bu bileşiklerden podofilotoksinlerin (etoposid) kanser tedavisinde uygulanması ile ilgili ilk kayıtlar 8. yüzyıla dayanır.

Topoizomeraz II hedefleyen interkalatif ilaçlar arasından akridin türevleri lösemnin farklı formlarını tedavi etmek için kullanılmıştır. Bileşiklerden podofilotoksinlerin (etoposide, teniposide), anthracyclines (doksorubisin, daunorubicin, mitoxantrone) ve aminoacridine (amsakrin) bazılarıdır (Şekil 2.13). Antrasiklin bir antibiyotik olan amsakrin, sadece kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Doksorubisin bileşiği bir hidroksil grubu ile doğal bir ürün olan dounorubisinden ayrılır. Klinik araştırmalarda kullanılmakta olup akut myeloid lösemiye karşı aktiftir fakat toksiktir (Nitiss, 2009). Antrasiklinler ve epidofil toksinler 1960'dan beri medikal onkolojinin başlıca dayanağı olmuş ve sonunda bu ilaçların hedefi olarak DNA topoizomeraz II gösterilmiştir. 1950'ler de kimyasal modifikasyonla doğal kimyasalların etkisinin artırılması yönünde yapılan çalışmalar, (epi-)podofilotoksinlerin 2 tane yarı sentetik türevinin geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır. Bunlar etoposide ve teniposide'dir. Bu iki türev, podofilotoksinlerden farklı olarak mikrotübül topluluklarını inhibe etmez fakat topoizomeraz II'yi inhibe eder. 1971 'de etoposide ve teniposide'in klinik denemeleri başlamış ve akut myeloid lösemi (AML) , hodgkins hastalığı, non-hodgkins lenfoma, akciğer, mide, meme ve yumurtalık kanserlerinde aktiviteleri gösterilmiştir. Günümüzde, etoposide küçük-hücre akciğer kanseri ve testis kanserleri gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde çok yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Etoposid, topoizomeraz II'ye bağlanarak DNA'nın yeniden birleşmesini engeller ve çift zincir DNA kırıkları oluşturarak hücre döngüsünü durdurur (Doğan İ., 2013). Antrasiklinler geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bunlardan doxorubicin, lenfoma, akciğer kanseri, sarkoma, Kaposi's sarkoma ve lösemi tedavisinde kullanılmaktadır.

Doxorubicinden daha az kardiyotoksik olan epirubicin en son Avrupa’da akciğer kanserinin tedavisi için kullanılmış ve Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç (FDA) örgütü tarafından akciğer kanserinin terapisi için onaylanmıştır.

Bu ilaçlar, topoizomeraz II’ nin, geçici çift zincir DNA kırıklarının yeniden birleştirmesi aktivitesini inhibe ederek DNA replikasyonunun devam etmesini geri dönüşümsüz olarak önlemektedirler.



Şekil 2.13: Topoizomeraz II inhibitörleri.

Birçok çalışmada apoptotik hücre ölümünde topoizomeraz II hedefleyen ilaçların ilişkisi bildirilmiştir. Genel olarak çoğalan kanser hücrelerinde topoizomeraz II reaksiyonları ile etkileşerek etki eden ilaçlar S fazında hücre döngüsünü ya da mitozda kromozom ayrılmasını engellerler (Topcu, 2001).

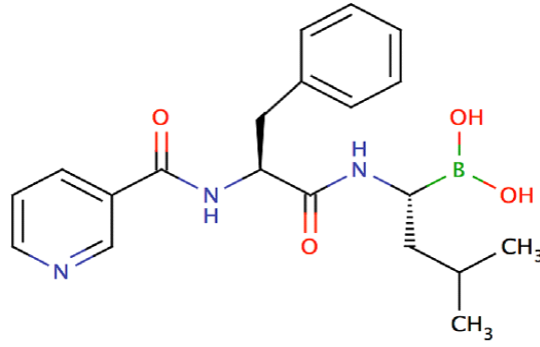
Tip II topoizomerazlar ayrıca katalitik inhibitörler tarafından da hedeflenir. Bu kategorideki ilaçlar kovalent enzim-DNA kompleksini stabilize etmeden, kesilebilir kompleksi baskılayarak enzimin katalitik fonksiyonu ile etkileşirler. Buna temel örnekler kumarinler (coumarins), fostriesin (fostriecin) analogları, merbaron, suramin ve topostin’i içermektedir.

Tip II topoizomerazların katalitik inhibitörlerinin etkileri çeşitli faktörlere bağlıdır. Tip I enziminden farklı olarak topoizomeraz II hücre döngüsü bağımlıdır. Bu sebeple artan topoizomeraz II aktiviteleri ile çoğalan hücreler ilaçlara, diğer durağan haldeki hücrelerden daha hassastır (Topcu, 2001; Rogojina ve Nitiss, 2008).

2.6. Proteozom İnhibitörü Bortezomib

Sentetik bir bileşik olan bortezomib, pirazonik asit, fenilalanin, lösin ve boronik asitten oluşmaktadır ve moleküler ağırlığı 384,24g'dır (Şekil 2.14). Dipeptid boronik asit analogu olan bortezomib, antitümör özelliğe sahip bir proteozom inhibitörüdür. Daha önce PS-341 olarak adlandırılan bortezomib, 2003'te bir proteozom inhibitörü olarak Velcade ismiyle FDA (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) ilk kez Multiple Myeloma tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Hayashi vd., 2003 ; Paramore ve Frantz, 2003 ; Adams ve Kauffman, 2004). 2009 yılında ise lenfoma hastalarında tedaviye yanıt verdiği rapor edilmiştir.

Proteozom; hücre döngüsü, transkripsiyon, spermatogenez, anjiyogenez, protein sentezi ve apoptozis gibi birçok çeşitli hücresel olayda görevli olan proteinleri yıkımını ya da işlenmesini sağlayarak bu hücresel mekanizmalara doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunmaktadır. Bundan dolayı kanser terapisi için önemlidir. Bortezomibin proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durmasına yol açan, apoptoza neden olan ve anjiyogenezi inhibe eden çeşitli hücre sinyal iletim yollarını bozar. Yapılan çalışmalar, bortezomibin transkripsiyonel faktör NF-kB'nin aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu etkiyi, NF-kB'nin hücre içi inhibitörü I-kB'nin proteozomal yıkımını engelleyerek gerçekleştirir. Bortezomib'in apoptozu indüklemesi ve proliferasyonu baskılaması hücrelerin kemoterapiye karşı duyarlılıklarının artmasına neden olur (Blade vd., 2005; Boccadoro vd ., 2005). Proteozom inhibitörü olan bortezomibin klinikte özellikle hematolojik kanserlerin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılması, sonrasında diğer solid tümörlerin tedavisinde de kullanılabileceğini gösteren in vitro çalışmaların yapılmasına yol açmıştır.



Şekil 2.14: Bortezomib bileşiğinin kimyasal yapısı. Bileşik dipeptid yapıda olup N’ ucunda pirazonik aside bağlı sırasıyla fenilalanin ve lösin bulunur. Ayrıca lösin C’ ucuna bağlı boronik asit bulunur.

Proteozom inhibitörleri ile apoptoz uyarımı normalde ubikütin/proteozom yolağı ile yıkılması gereken düzenleyici proteinlerin hücrede birikimi ile oluşmaktadır. Ubikütin/proteozom yolağı substratları; siklinler, myc onkogen proteini, p53 gibi düzenleyici moleküller olup bu moleküllerin yıkımı, hücre proliferasyonunun ve hücre döngüsünün kontrolü ile ilişkilendirilmiştir.

Apoptoz düzenleyicilerinden biri olan p53, proteozom tarafından ubikütinize edilir ve yıkılır. Birçok hücre tipinde p53 ekspresyonunun artışı da apoptoz uyarıcı bir etkidir (Lopes vd., 1997; Zhang vd., 2007). Son yıllarda p53’ü ve NF-κB yolağını aktifleyen kemoterapötik ajanlar hakkında yapılan çok sayıda araştırmaya göre birbirlerinin fonksiyonlarını apoptoza yol açarak veya NF-κB’yi uyararak etkileyebilecekleri gözlenmiştir. Bazı kemoterapötik ajanlar, p53’ü aktive ederken aynı zamanda NF-κB’yi baskılamaktadır.

Proteozom inhibitörlerinin NF-κB inhibitörü olan I-κB proteininin degradasyonunu engelleyerek NF-κB aktivasyonunu engellediği yönünde çalışmalar yapılmış olup hücre döngüsünde regülatör mekanizmalarla etkileşerek birçok siklinin ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin degradasyonunu engellediği öne sürülmüştür (Wagenknecht vd., 1999; Von Metzler vd., 2009).

Bortezomib anti-tümör özelliğe sahip bir proteozom inhibitörüdür. Bortezomib’in apoptozu indüklemesi ve proliferasyonu baskılaması hücrelerin kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapiye karşı duyarlılıklarının artmasına da sebep olmaktadır.

Bortezomib sadece multiple myelomanın tedavisinde değil diğer solid ve hematolojik malignitelerin tedavilerinde ya tek başına ya da kombine terapinin bir parçası olarak çalışılabilmektedir. Fakat bortezomib tedavisi ile ilgili bazı toksik etkileride gözlenmiştir. Buna ek olarak, bortezomib'in solid ve hematolojik tümörlerin tedavisinde en az etki gösterdiği bu yüzden kombine tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar:

Deneylerde, ökaryotik enzim kaynağı olarak insan (human) topoizomeraz I ve II enzimi (Inspiralis UK.), substrat olarak %90 süper kıvrımlı formda olan pBR322 plazmid DNA'sı (Inspiralis UK.), ilaç olarak Kamptotesin (Sigma), Etoposid (Sigma) ve Bortezomib (Velcade) kullanılmıştır.

Ticari olarak elde edilen pBR 322 plazmid DNA'sı 4361 baz çifti uzunluğunda, %90'dan daha fazla oranda süper kıvrımlı formda ve saflığı $A_{260}/A_{280} = 1.8$ (DNA saflık aralığı, 1.8 -2.0' dir) olarak belirtilmiştir.

3.2. İnsan Topoizomeraz I ve II Enzim Aktivite Kontrolünün Belirlenmesi:

Çalışmada öncelikle, pBR322 plazmid DNA' sının insan topoizomeraz I ve II enzimleri aracılığıyla relaks forma dönüştürülmesi test edilerek enzimlerin hangi konsantrasyonlarda daha iyi sonuç verdiği aktivite kontrolleri yapıldı.

İnsan topoizomeraz I ve II enzim aktivitelerinin kontrolü için ;

- enzim miktarı,
- substrat konsantrasyonu,
- enzim inkübasyon süresi,
- jel konsantrasyonu,
- kullanılacak tampon,
- uygulanan voltaj
- elektroforez süresi

gibi parametreler bakımından deney koşulları standart hale getirildi. Çok sayıdaki denemeler sonunda en iyi sonuç veren parametreler elde edildi ve bütün deneylerde standardize edilmiş bu parametreler kullanıldı.

3.3. İlaçların Topoizomeraz Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Saptanması:

Farklı konsantrasyonlardaki ilaçlar ile pBR322 plazmid DNA' sı, topoizomeraz I ve II enzimleri inkübe edilip, bileşiklerin topoizomeraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri agaroz jel elektroforezinde analiz edildi.

3.3.1. Topoizomeraz I relaxation assay;

10x assay tamponunun [20 mM Tris.HCl pH:7.5 , 200 mM NaCl, 0.25 mM EDTA, % 5 glycerol] 1 µl'si;

0.3µg pBR322 plazmid DNA, 3 ünit topoizomeraz I enzimi ve farklı konsantrasyonlardaki ilaçlar ile toplam hacim 10 µl' ye tamamlandı.

3.3.2 Topoizomeraz II relaxation assay;

10x assay tamponunun [50 mM Tris.HCl pH:7.5, 125 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 µg/ml albumin, 1 mM ATP]1 µl'si;

0.3µg pBR322 plazmid DNA, 3 ünit topoizomeraz II enzimi ve farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri ile toplam hacim 10 µl'ye tamamlandı.

Substrat konsantrasyonu olarak 0.5 µg ve 0.3 µg DNA, enzim miktarı olarak da 1, 2, 3 ve 4 ünit enzim (topoizomeraz I ve II için) konsantrasyonları denendi. Substrat konsantrasyonu olarak 0.3 µg DNA, her iki enzim için de 3 ünit enzim miktarının yeterli olduğu belirlendi ve bütün deneylerde bu miktarlar kullanıldı.

Substrat ve enzim konsantrasyonları belirlendikten sonra yukarıda belirtilen aynı deney ortamına test edilecek ilaçların farklı konsantrasyonu ilave edilerek bu moleküllerin topoizomeraz I ve II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi.

Çalışmamızda, etkisi araştırılacak ilaçlardan biri olan proteozom inhibitörü bortezomib, yukarıda belirtilen topoizomeraz I ve II reaksiyon ortamlarına 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarda ilave edildi ve IC₅₀ inhibisyon değerleri belirlendi.

Topoizomeraz I inhibitörü olarak kamptotesin kullanıldı. Topoizomeraz I reaksiyon ortamına 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ve 1 mM konsantrasyonlarda kamptotesin ilave edilerek etkili olan IC₅₀ inhibisyon konsantrasyonu belirlendi.

Topoizomeraz II inhibitörü olarak da etoposid kullanıldı. Belirtilen topoizomeraz II reaksiyon ortamına 0.75, 1.5, 3 ve 6 mM konsantrasyonlarda etoposid ilave edilerek etkili olan IC₅₀ inhibisyon konsantrasyonu belirlendi. Test edilen ilaçların hepsi %50'lik DMSO'da (dimetil sülfoksit) çözüldü.

Reaksiyon tüpleri, hem topoizomeraz I hem de topoizomeraz II için 37°C sıcaklıktaki su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Enzim aktivasyonları tamamlandıktan sonra her bir tüpe 2µl yükleme boyası+durdurma solüsyonu eklendi ve örnekler (aşağıda belirtilen en iyi sonuçların elde edildiği parametreler kullanılarak) ;

-1xTAE (Tris-Asetat- EDTA) tamponu içersinde,

- 45 voltta,

-3 saat süresince,

-%1' lik agaroz (Sigma) jelde yürütüldü.

Elektroforezler tamamlandıktan sonra, jeller ethidyum bromür (1µg/ml) ile boyandı ve UV lambası altında DNA bantları gözlenerek jellerin fotoğrafı çekildi.

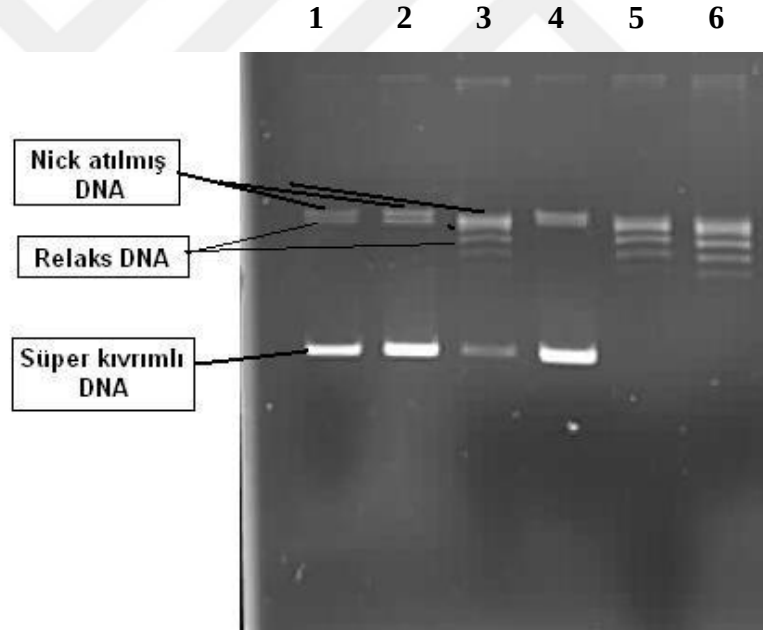
3.4. İlaçların IC₅₀ İnhibisyon Değerlerinin Hesaplanması:

Elektroforezlerden sonra jel analyzer system ile DNA bant yoğunlukları ölçüldü ve her bir ilaç için %50 inhibisyon değeri = ilaç ile muamele edilen DNA' nın yoğunluğu / kontrol DNA' nın yoğunluğu x100 formülü ile hesaplandı. Bileşiklerin topoizomeraz I ve II üzerinde %50 inhibisyon etkisi (IC₅₀) gösterdikleri konsantrasyonlar, probit programı kullanılarak her ilaç için elde edilen grafiğin eğiminden mM cinsinden hesaplandı. Ayrıca bu ilaçlar; yukarıda belirtilen aynı reaksiyon ortam ve parametreleri kullanılarak Bortezomib+ Kamptotesin ve Bortezomib+Etoposid olarak kombine şekilde uygulandı. Sonuç olarak bu ilaçların tek başına gösterdikleri inhibisyon etkileri ile kombine etkileri karşılaştırıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Topoizomeraz I Enziminin Aktivite Sonuçları:

Topoizomeraz I enziminin aktivitesi, farklı miktarlarda enzim (1, 2 ve 3 ünit) ve değişik konsantrasyonlarda substrat (0.2 ve 0.3 µg plazmid DNA) kullanılarak standart hale getirildi. Şekil 4.1'de 5. ve 6. Kuyucuklardaki jel görüntüsüne göre, (2 ve 3 ünit) enzimin 0.3 µg DNA'yı tam olarak relaks forma dönüştürebildiği belirlendi. Bu sonuçlara göre, bütün deneylerde enzim miktarı olarak 3 ünite enzim ve substrat konsantrasyonu olarak da 0.3 µg DNA kullanıldı.

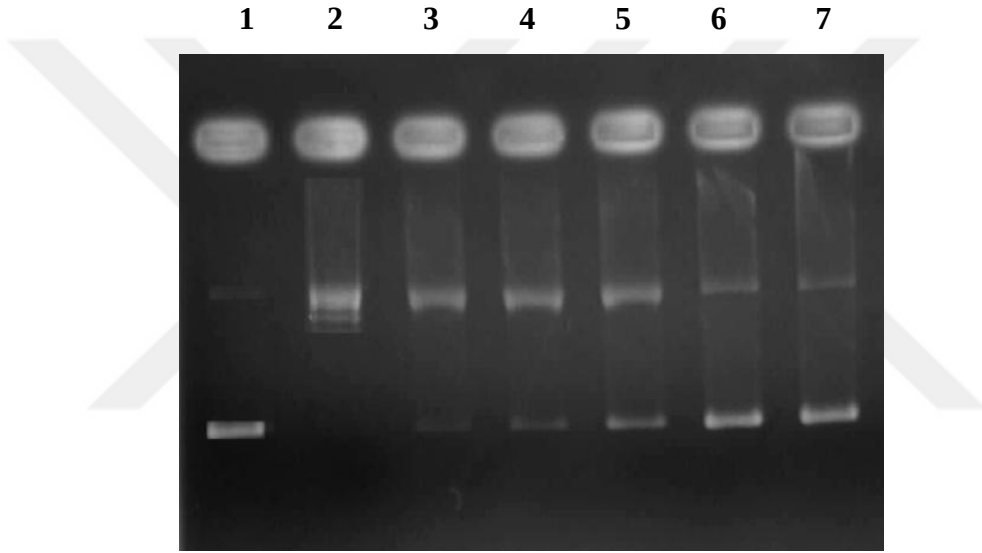


Şekil 4.1: Topoizomeraz I enzim aktivitesinin kontrolü.

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 2 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,3 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
5. Kuyucuk : 0,3 µg DNA + 2 ünite Topo I
6. Kuyucuk : 0,3 µg DNA + 3 ünite Topo I

4.2. İlaçların Topoizomeraz I Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkileri

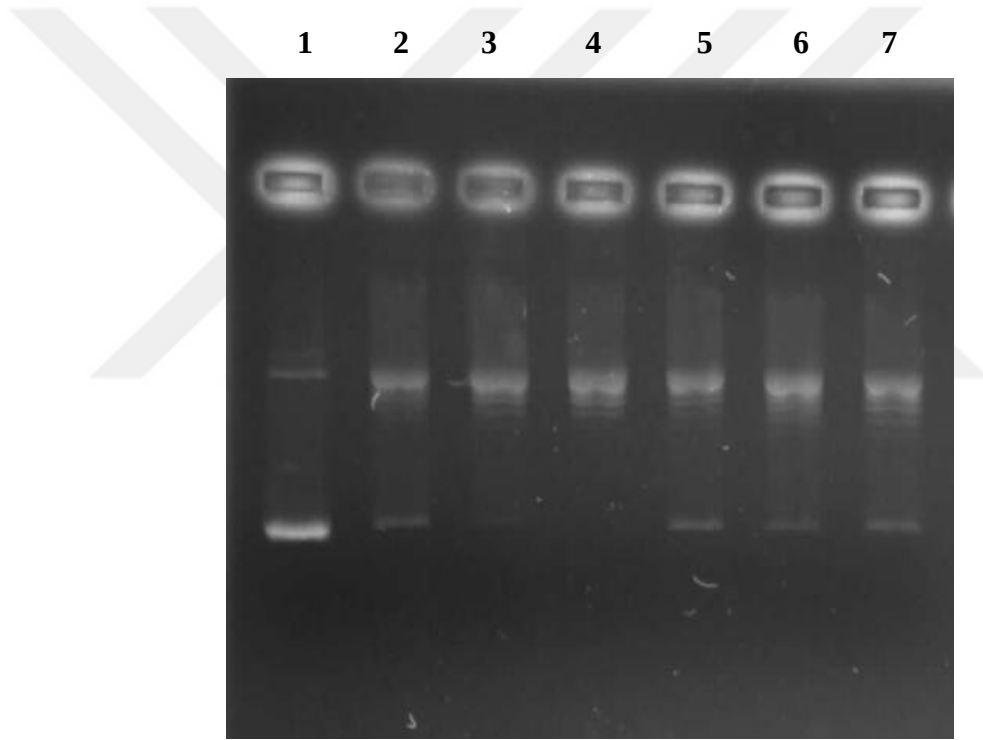
2. kuyucukta, 3 ünit topoizomeraz I enzimi 0.3 µg süper kıvrımlı formdaki DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5. , 6. ve 7. kuyucuklarda, ortama artan (0.25, 0.5 ve 1 mM) konsantrasyonlarda kamptotesin ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süper kıvrımlı formda kalmaktadır. Şekil 4.2'de; Kamptotesin'in güçlü bir topoizomeraz I inhibitörü olduğu görülmektedir. Kamptotesin'in topoizomeraz I enzimi üzerindeki IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri 0.29 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2: Kamptotesin'in topoizomeraz I inhibisyon etkisi.

- 1.kuyucuk; 0.3 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
- 2.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I
- 3.kuyucuk; 0.3 µg DNA+ 3 ünit topo I + 0.05 mM kamptotesin
- 4.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I + 0.1 mM kamptotesin
- 5.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I + 0.25 mM kamptotesin
- 6.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I + 0.5 mM kamptotesin
- 7.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I + 1 mM kamptotesin

Bortezomib'in topoizomerez I enzimi üzerinde çok zayıf bir inhibisyon etkisi gösterdiği gözlenmektedir. 2. ve 3. kuyucukta, 3 ünit topoizomerez I enzimi 0.3 µg süper kıvrımlı formdaki DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5. , 6. ve 7. kuyucuklarda, ortama artan (0.5, 1 ve 2 mM) konsantrasyonlarda bortezomib ilave edildiği zaman enzimin aktivitesindeki inhibisyonun çok zayıf olduğu Şekil 4.3'de gözlenmektedir. Çünkü enzim DNA'nın büyük bir kısmını relaks hale dönüştürebilmiş, çok az bir kısmı süper kıvrımlı formda kalmıştır. Bortezomib'in topoizomerez I enzimi üzerindeki IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri 87.11 mM olarak bulunmuştur.



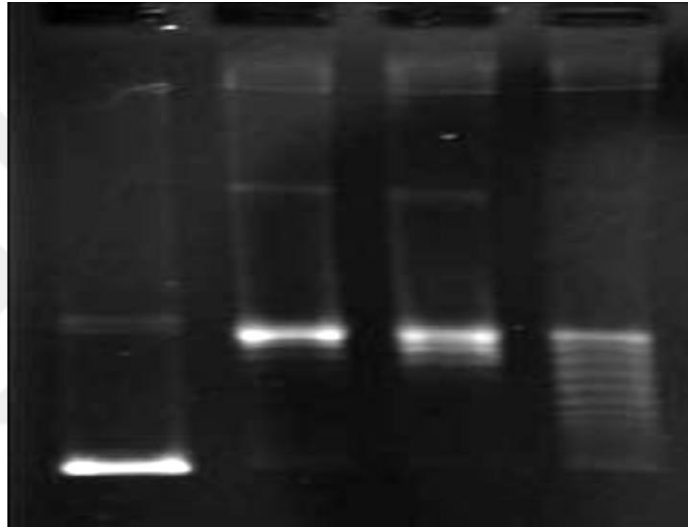
Şekil 4.3: Bortezomib'in Topoizomerez I inhibisyon etkisi

- 1.kuyucuk; 0.3 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
- 2.kuyucuk; 0.3 µg DNA +3 ünit topo I
- 3.kuyucuk; 0.3 µg DNA +3 ünit topo I
- 4.kuyucuk; 0.3 µg DNA+ 3 ünit topo I + 0.25 mM bortezomib
- 5.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I + 0.5 mM bortezomib
- 6.kuyucuk; 0.3 µg DNA +3 ünit topo I + 1 mM bortezomib
- 7.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I + 2 mM bortezomib

4.3. Topoizomeraz II Enziminin Aktivite Sonuçları:

Topoizomeraz II enziminin aktivitesi, farklı miktarlarda enzim (1, 2 ve 3 ünit) ve 0.3 µg plazmid DNA kullanılarak standart hale getirildi. Şekil 4.4' deki jel görüntüsüne göre, (1, 2 ve 3 ünit)enzimin 0.3 µg DNA'yı tam olarak relaks forma dönüştürebildiği belirlendi. Bu sonuçlara göre bütün deneylerde enzim miktarı olarak 3 ünite enzim ve substrat konsantrasyonu olarak da 0.3 µg DNA kullanıldı.

1 2 3 4

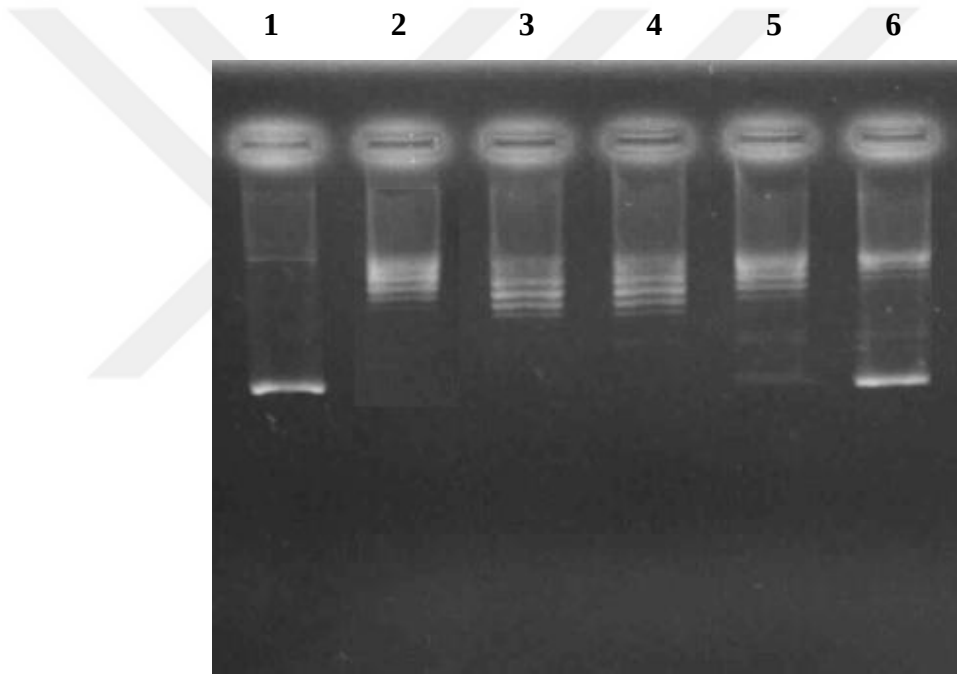


Şekil 4.4: Topoizomeraz II enzim aktivitesinin kontrolü

1. Kuyucuk : 0,3 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,3 µg DNA + 1 ünite Topo II
3. Kuyucuk : 0,3 µg DNA + 2 ünite Topo II
4. Kuyucuk : 0,3 µg DNA +3 ünite Topo II

4.4. İlaçların Topoizomeraz II Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkileri:

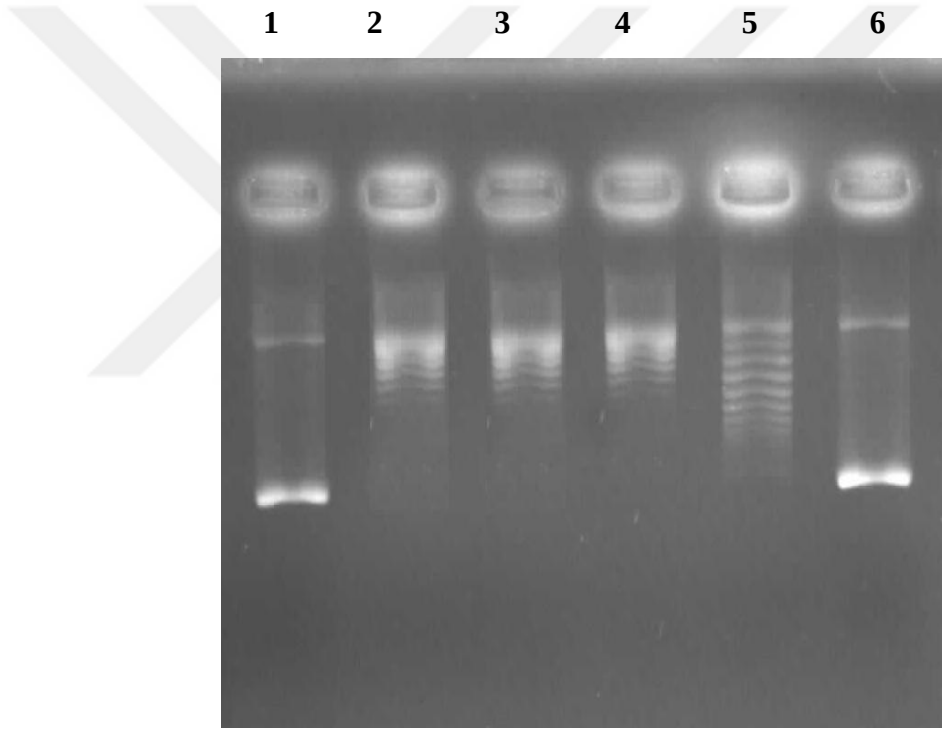
Etoposid'in güçlü bir topoizomeraz II inhibitörü olduğu görülmektedir. Şekil 4.5.'de 2.kuyucukta, 3 ünit topoizomeraz II enzimi 0.3 µg süperkırımlı formdaki DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, diğer kuyucuklarda ortama artan (0.75 – 6 mM) konsantrasyonlarda etoposid ilave edilmiş ve 6. kuyucukta görüldüğü gibi 6 mM etoposid konsantrasyonunda enzimin katalitik aktivitesi tamamen inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süper kıvrımlı formda kalmaktadır. Etoposid'in topoizomeraz II enzimi üzerindeki IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri 3.77 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5: Etoposid'in topoizomeraz II inhibisyon etkisi.

- 1.kuyucuk; 0.3 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
- 2.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II
- 3.kuyucuk; 0.3 µg DNA+ 3 ünit topo II + 0.75 mM etoposid
- 4.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 1.5 mM etoposid
- 5.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 3 mM etoposid
- 6.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 6 mM etoposid

Bortezomib'in topoizomeraz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği gözlenmektedir. Şekil 4.6.'da 2. kuyucukta, 3 ünit topoizomeraz II enzimi 0.3 µg süper kıvrımlı formdaki DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, diğer kuyucuklarda ortama artan (0.25-2 mM) konsantrasyonlarda bortezomib ilave edilmiş ve 6. kuyucukta görüldüğü gibi 2 mM bortezomib konsantrasyonunda enzimin aktivitesi tamamen inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süper kıvrımlı formda kalmaktadır. Bortezomib'in topoizomeraz II enzimi üzerindeki IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri 1.41 mM olarak bulunmuştur.

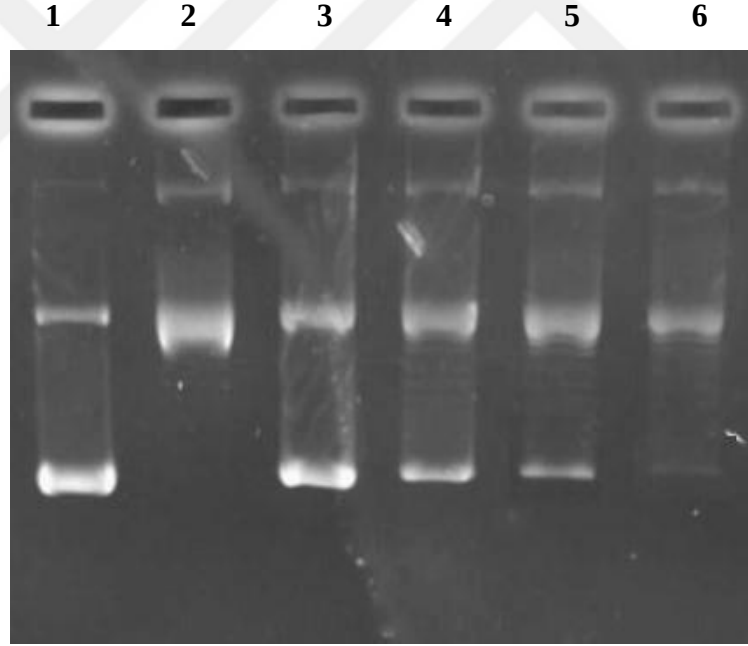


Şekil 4.6: Bortezomib'in Topoizomeraz II inhibisyon etkisi.

- 1.kuyucuk; 0.3 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
- 2.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II
- 3.kuyucuk; 0.3 µg DNA+ 3 ünit topo II + 0.25 mM bortezomib
- 4.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 0.5 mM bortezomib
- 5.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 1 mM bortezomib
- 6.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 2 mM bortezomib

4.5. İlaçların Kombine Uygulamaları:

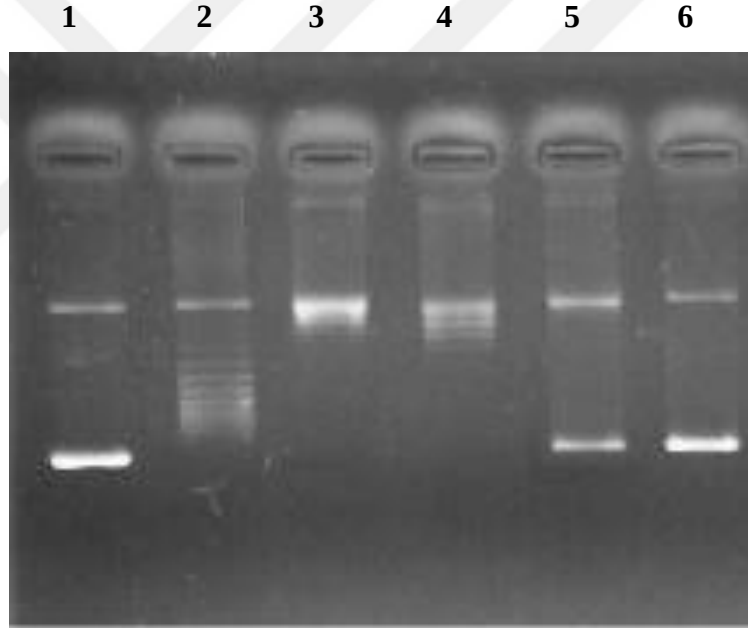
Bortezomib + Kamptotesin birlikte uygulandıklarında tek başlarına uygulandıkları zamana göre inhibisyon etkilerinin daha fazla arttığı gözlenmektedir. Şekil 4.7’de 2. kuyucukta, 3 ünit topoizomerez I enzimi 0.3 µg süper kıvrımlı formdaki DNA’yı tamamen relaks hale getirmekte, diğer kuyucuklarda, ortama bortezomib ve kamptotesin birlikte ilave edildiği zaman enzimin aktivitesinin daha güçlü şekilde inhibe olduğu gözlenmektedir. Daha önce, 0.5 mM bortezomib ve 0.1 mM kamptotesin tek başlarına uygulandıkları zaman bu bileşiklerin topoizomerez I enzimi üzerinde çok zayıf inhibisyon etkisi gösterdikleri belirtilmiş idi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.2’de görüldüğü gibi). Fakat, 5. kuyucukta görüldüğü gibi 0.5 mM bort. + 0.1 mM kamptotesin birlikte kullanıldıkları zaman topoizomerez I enzimi üzerinde daha güçlü inhibisyon etkisi gösterdikleri gözlenmektedir.



Şekil 4.7: Bortezomib + Kamptotesin’in topoizomerez I üzerindeki kombine etkisi.

- 1.kuyucuk; 0.3 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
- 2.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I
- 3.kuyucuk; 0.3 µg DNA+ 3 ünit topo I + 2 mM bort. + 1 mM Kamptotesin
- 4.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I + 1 mM bort. + 0.5 mM Kamptotesin
- 5.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo I + 0.5 mM bort. + 0.1 mM Kamptotesin
- 6.kuyucuk; 0.3µg DNA +3 ünit topo I +0.25 mM bort.+ 0.05 mM Kamptotesin

Bortezomib + Etoposid birlikte uygulandıklarında tek başlarına uygulandıkları zamana göre inhibisyon etkilerinin daha fazla arttığı gözlenmektedir. Şekil 4.8’ de 2. kuyucukta, 3 ünit topoizomeraz II enzimi 0.3 µg süper kıvrımlı formdaki DNA’yı tamamen relaks hale getirmekte, diğer kuyucuklarda, ortama bortezomib ve etoposid birlikte ilave edildiği zaman enzimin aktivitesinin daha güçlü şekilde inhibe olduğu gözlenmektedir. Daha önce, 1 mM bortezomib ve 3 mM etoposid tek başlarına uygulandıkları zaman bu bileşiklerin topoizomeraz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermedikleri belirtilmiş idi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.5’de görüldüğü gibi). Fakat, 5. kuyucukta görüldüğü gibi 1 mM bort. + 3 mM etoposid birlikte kullanıldıkları zaman topoizomeraz II enzimi üzerinde güçlü inhibisyon etkisi gösterdikleri gözlenmektedir.



Şekil 4.8: Bortezomib + Etoposid’in topoizomeraz II üzerindeki kombine etkisi.

- 1.kuyucuk; 0.3 µg pBR322 plazmid DNA kontrol (enzimsiz)
- 2.kuyucuk; 0.3 µg DNA +3 ünit topo II
- 3.kuyucuk; 0.3 µg DNA+ 3 ünit topo II + 0.25 mM bort.+ 0.75 mM etoposid
- 4.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 0.5 mM bort. + 1.5 mM etoposid
- 5.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 1 mM bort. + 3 mM etoposid
- 6.kuyucuk; 0.3 µg DNA + 3 ünit topo II + 2 mM bort. + 6 mM etoposid

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser, günümüzde en önemli sağlık problemlerinden biri olup halen dünyadaki ölümcül hastalıkların başında gelmektedir. Kanser hastalığının ortaya çıkışından bu yana çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Bunların bir kısmının yan etkilerinin çok fazla oluşu, bazılarının ise ilaca karşı direnç oluşturmaları nedeniyle kullanılamamakta; bunların yerine daha etkili, yan etkisi daha az yeni ilaçlar geliştirilmeye çalışılmakta ve kombine ilaç uygulamaları denenmektedir (Da Yong L., 2015., Chou TC., 2010).

Hücre çoğalması için mutlak gerekli olan DNA topoizomeraz enzimleri kanser terapinin en etkin hedeflerindendir. Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve rekombinasyon işlemlerinde olması gereken enzimlerdir. Hücre çoğalmasında gerekli olan topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonu, kontrolsüz ve hızlı olarak bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabilecektir bu nedenle topoizomeraz enzimlerinin farmakolojik olarak inhibisyonu özel bir ilgi kazanmıştır (Pindur ve Lemster, 1998 ; Kellner vd., 2000 ; Syrovets vd., 2000 ; Engel vd., 2004). Bu nedenle son yıllarda giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörü olan antitümör aktiviteye sahip ilaç tasarımları yapılmakta ve etkinlikleri araştırılmaktadır (Potmesil vd.,1991 ; Ralph vd., 1994). Topoizomeraz hedefli ilaçlar topoizomerazların daha yüksek seviyede bulunduğu kanser hücrelerinde daha öldürücü hale gelirler. Hızlı büyüyen hücrelerde topoizomerazlar, genellikle, daha yüksek seviyede bulunur. Bu nedenle kanser hücrelerinde, ilaç muamelesi daha fazla DNA kırığı ortaya çıkarır ve daha yüksek toksisiteye neden olur. Günümüzde, topoizomeraz I ve II inhibitörleri klinikte kullanılan en önemli kemoterapötik ilaçların başında gelmektedir.

Birçok çalışmada proteozom inhibitörü olan bortezomib bileşiğinin antikanser etkisi gösterilmiş olup apoptotik yollar üzerindeki etki mekanizmaları çeşitli kanser türlerinde araştırılmıştır (Wagenknecht vd. 1999; Von Metzler vd., 2009). Fakat proteozom inhibitörü bortezomib'in topoizomeraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri yeterince çalışılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, proteozom inhibitörü olarak çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan bortezomib bileşiğinin topoizomeraaz enzimleri ile biyomoleküler etkileşimleri araştırılmıştır. Bortezomib bileşiği ile topoizomeraaz I ve II enzimlerinin etkileşimleri *in vitro* enzim aktivite testleri ile analiz edilmiştir. Aynı zamanda bortezomib bileşiği, topoizomeraaz I inhibitörü kamptotesin ve topoizomeraaz II inhibitörü etoposid ile kombine şekilde uygulanmış ve sonuç olarak bu ilaçların tek başına gösterdikleri inhibisyon etkileri ile kombine etkileri karşılaştırılmıştır.

Topoizomeraaz enzimlerinin aktivitesi üzerinde %50 inhibisyon (IC_{50}) etkisi gösterebilen bileşikler topoizomeraaz inhibitörleri olarak kabul edilmektedir. Bir bileşiğin %50 inhibisyon gösterdiği konsantrasyon değeri ne kadar düşüğe bu bileşik o kadar güçlü topoizomeraaz inhibitörüdür. Çok düşük dozlarda bile topoizomeraaz inhibisyon aktivitesi gösterebilen bileşikler, kanser kemoterapisi için daha etkili ilaçlar olarak kullanılabilirler. Çünkü, kemoterapatik ilaçlar ancak organizmanın tolere edebileceği belli dozlarda uygulanabilmektedir (Larsen vd., 2003).

Çalışmamızda, bortezomib'in topoizomeraaz I enzimi üzerinde çok zayıf bir inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır. Bortezomib'in topoizomeraaz I enzimi üzerindeki IC_{50} (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri ise 87.11 mM gibi çok yüksek bir değer bulunmuştur. Kanser terapi için ilaçların bu kadar yüksek dozda kullanılabilirliği mümkün değildir. Bortezomib'in topoizomeraaz II enzimi üzerinde ise güçlü inhibitör etkisi gösterdiği bulunmuştur. Bortezomib'in topoizomeraaz II enzimi için IC_{50} (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri de 1.41 mM olarak hesaplanmıştır. Bu bulgulara göre bir proteozom inhibitörü olan bortezomib'in aynı zamanda topoizomeraaz II inhibitörü olarak da etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bortezomib ve kamptotesin'in topoizomeraaz I üzerindeki kombine etkisine baktığımızda, 0.5 mM bortezomib ve 0.1 mM kamptotesin tek başlarına uygulandıkları zaman bu bileşiklerin topoizomeraaz I enzimi üzerinde çok zayıf inhibisyon etkisi gösterdiklerini bulduk.

Fakat, 0.5 mM bortezomib + 0.1 mM kamptotesin birlikte kullanıldıkları zaman topoizomeraaz I enzimi üzerinde daha güçlü inhibisyon etkisi gösterdiklerini saptadık. Bortezomib ile kamptotesin'in kombine kullanıldıklarında sinerjik etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Aynı şekilde, bortezomib ve etoposid'in topoizomeraz II üzerindeki kombine etkisine baktığımızda, 1 mM bortezomib ve 3 mM etoposid tek başlarına uygulandıkları zaman bu bileşiklerin topoizomeraz II enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermediklerini gözlemledik. Fakat 1 mM bortezomib+ 3 mM etoposid birlikte kullanıldıkları zaman topoizomeraz II enzimi üzerinde güçlü inhibisyon etkisi gösterdiklerini saptadık. Burada bortezomib ile etoposid'in topoizomeraz II inhibisyonu üzerinde sinerjik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasıyla bortezomib'in sadece proteozom inhibitörü olmayıp aynı zamanda topoizomeraz II inhibitörü olduğu bulunmuştur. Bunun yanında; bortezomib, kamptotesin ve etoposid'in kombine uygulamalarının tek başına kullanıldıkları zamana göre daha etkili oldukları saptanmıştır. Bu bulgular, antikanser ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarına yardımcı olacaktır. Bu ilaçların kombine uygulamalarına ait elde ettiğimiz bulgular, daha ileride kanser terapi için klinikte kullanılacak olan kombine ilaç denemelerine ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, J. ve Kauffman M., 2004. Development of the proteasome inhibitor Velcade, (Bortezomib), *Cancer Investigation*, 22, 2, 304-311.
- Baguley, B.C. ve Ferguson, L.R., 1998. Mutagenic properties of topoisomerase targeted drugs, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 213-222.
- Baker, N.M., Rajan, R., ve Mondragon, A., 2009. Structural studies of type topoisomerases, *Nucleic Acids Research*, 37, 3, 693-701.
- Baranello, L., Kouzine, F., ve Levens, D., 2013. DNA topoisomerases: beyond the Stevard role Transcription, 232–237.
- Bates, A. D. ve Maxwell, A., 2005. DNA topology, Oxford University Press, Oxford, 198.
- Bates, A. D. ve Maxwell A., 2007. Energy coupling in type II topoisomerases: why do they hydrolyze ATP, *Biochemistry*, 46, 27, 7929-7941.
- Bergerat, A., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A. ve Forterre, P., 1997. An atypical topoisomerase II from archea with implications for meiotic recombination, *Nature*, 386, 414-417.
- Blade, J., Teresa-Ciberia, M. ve Rosinol, L., 2005. Bortezomib A valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma. *Acta Oncologica*, 44, 440- 448.
- Boccadora M, Morgan G. ve Cavenagh J., 2005. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor in cancer therapy *Cancer Cell Int.*, 5, 18, 1-9.
- Boyle, P. ve Levin, B., 2008. Dünya Kanser Raporu, Dünya Sağlık Örgütü, Lyon Cedex, Fransa.
- Burden, D.A. ve Osherooff, N., 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II ve drug targeted to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1400, 139-154.
- Capranico, G., Baranello, L., Bertozi, D., ve Marinello, J., 2012. Transcriptional stress by camptothecin: mechanisms and implications for the drug antitumor activity, DNA topoisomerases and cancer, Pommier, Y., Springer, New York, 309-324.
- Champoux, J. J., 2001. DNA topoisomerases: structure, function ve mechanism, *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 369–413.

- Chen, A.Y. ve Liu, L.F., 1994. DNA Topoisomerases: Essential Enzymes ve Lethal Targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34, 191-218.
- Chen, T.C., Yu, D.S., Huang, K.F., Fu, Y.C., Lee, C.C., Chen, C.L., Huang, F.C., Hsieh, H.H. ve JLin, H.S., 2013. Huang Structure-based design, synthesis and biological evaluation of novel anthra[1,2-*d*]imidazole-6,11-dione homologues as potential antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 69, 78–293.
- Chillermi, G., Bruselles, A., Fiorani, P., Bueno, S. ve Desideri, A., 2007. The open state of human topoisomerase I as probed by molecular Dynamic simulation, *Nuc. Ac. Res.* 35, 9 , 3032-38.
- Chou, TC., 2010. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the 26 Chou-Talalay Method. *Cancer Res* 70, 440-446.
- Christian, B., 2003. Homo camptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promoting anticancer drugs, *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 45, 91-108
- Coletta, A. ve Desideri, A., 2013. Role of the protein in the DNA sequence specificity of the cleavage site stabilized by the camptothecin topoisomerase IB inhibitor a metadynamics study *Nucleic Acids Res.*, 41 , 9977–9986.
- Cortes, F., Pastor, N., Mateos, S., ve Dominguez, I., 2003. Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis, *Mut. Res.*, 543, 59–66.
- Daumar, P., Zeglis, B.M., Ramos, N., Divilov, V., Sevak, K.K., Pillarsetty, N., ve Lewis, J.S., 2014. Synthesis ve evaluation of 18F-labeled ATP competitive inhibitors of topoisomerase II as probes for imaging topoisomerase II expression *Eur. J. Med. Chem.*, 86, 769–781.
- Da Yong L., 2015. Drug combinations. *Personalized Cancer Chemotherapy. An Effective 4 Way of Enhancing Outcomes in Clinics*, 37–41
- Doğan, İ., 2013. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]* 38, 2; 229–237.
- Engel, R., Valkov, N.I., Gump, J.L., Hazlehurs, L., Dalton, W.S. ve Sullivan, D.M., 2004. The cytoplasmic trafficking of DNA topoisomerase II correlates with etoposide resistance in human myeloma cells, *Experimental Cell Research*, 295, 421-431.
- Fortune, J.M., ve Osheroff, N., 1998. Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II by blocking DNA cleavage, *J. Biol. Chem.*, 273, 17643 -17650.

- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H. ve Nash, H.A., 1976. An enzyme that introduces superhelical turns into DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7024-7027.
- Gilmour, D.S., Pflugfelder, G., Wang, J.C. ve Lis, J.T., 1986. Topoisomerase I interacts with transcribed regions in *Drosophila* cells, *Cell*, 44, 401.
- Hatsuiker, E., Bahler, J. ve Kohli, J., 1998. The role of topoisomerase II in meiotic chromosome condensation and segregation in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol. Biol. Cell*, 9, 2739-2750.
- Hayashi, T., Hideshima, T. ve Anderson, K. C., 2003. Novel therapies for multiple myeloma. *Br J Haematol*, 10-17.
- Kaina, B., 2003. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling, *Biochemical Pharmacology*, 66, 1547- 1554.
- Kellner, U., Sehested, M., Jensen, P.B., Gieseler, F. ve Rudolph, P., 2000. Culprit and victim- DNA topoisomerase II, *Lancet Oncol.*, 3, 235-43.
- Larsen, A.K., Escargueil, A.E., ve Skladanowski, A., 2003. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy, *Pharmacology and Therapeutics*, 99, 167-181.
- Larsen, A.K. ve Gobert, C., 1999. DNA Topoisomerase I in Oncology Dr Jekyll or Mr Hyde *Pathology Oncology Research*, 5, 171-178.
- Leppard, J.B ve Champoux, J.J., 2005. Human DNA topoisomerase I relaxation, roles, and damage control, *Chromosoma*, 114, 2, 75-85.
- Lopes, U. G., Erhardt, P., Yao, R. ve Cooper, G. M., 1997. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20, 12893- 12896.
- Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C. P., Azarova, A. M., Tsai Y. C., Ban, Y. ve Liu, L. F., 2007. Topoisomerase II beta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane, *Cancer Research*, 67, 18, 8839-8846.
- March, C. ve Pommier, Y., 2012. Topoisomerases inhibitors: a paradigm for interfacial inhibition, *DNA topoisomerases and cancer*, Pommier, Y., Springer, New York, 175- 184.
- Meyers, R.A., 2004. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology ve Molecular Medicine*, 2nd Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, ISBN:3- 527- 30543-2, Edited by Robert A. Meyers, Theoretical foundations of Cancer Chemotherapy, 174.

- Muller, M.T., Pfund, W.P., Mehta, V.B. ve Trask, D.K., 1985. Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA, *EMBO J*, 4, 1237–1243.
- Nelson, D. L. ve Cox, M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Third Edition, New York, 907.
- Nitiss, J.L., 1998. Investigating of biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1400, 63-81.
- Nitiss, J. L., 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nature Reviews Cancer*, 9, 5, 338-350.
- Osheroff, N., 2003. *DNA Topology, Topoisomerases and Chemotherapy*, IGP, Autumn.
- Paramore, A. ve Frantz, S., 2003. Bortezomib, *Nat Rev Drug Discov*, 2, 8, 611-612.
- Pindur, U. ve Lemster, T., 1998. Antitumor drug design: DNA-binding ligands, which inhibit the topoisomerase I, *Pharmazie*, 53, 2, 79-86.
- Pommier, Y., Pourquier P., Yi F. ve Dirk S, 1998. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1400, 83-106.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. ve March, C., 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs, *Chemistry & Biology*, 17, 5, 421-433.
- Pommier, Y., 2013. Drugging topoisomerases: lessons ve challenges *ACS Chem. Biol.*, 8, 82–95
- Potmesil, M. ve Kohn, K.W., 1991. *DNA topoisomerase in cancer*, Oxford University Press, New York.
- Ralph R.K., Judd, W., Pommier, Y., Kohn, K.W., Neidle, S. ve Waring, M.J. (eds), 1994. *DNA topoisomerases in molecular aspects and anticancer drug-DNA interaction*, 2, 1. Macmillan, London.
- Rashed, Z., A. ve Rubin, E. H., 2003. Mechanisms of resistance to topoisomerase II targeting drugs, *Oncogene*, 22, 7296–7304.
- Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J. ve Hol, W.G., 1998. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA, *Science*, 279, 1504-1513.
- Rogojina, A. T. ve Nitiss, J. L., 2008. Isolation and characterization of mamsa-hypersensitive mutants: cytotoxicity of top2 covalent complexes containing DNA single strand breaks, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 43, 29239-29250.

- Stewart, L., Ireton, G.C. ve Champoux, J.J., 1997. Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation, *J. Mol. Biol.*, 269: 355– 372.
- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G.J. ve Champoux, J.J., 1998. A model for the mechanism of human topoisomerase I., *Science*, 279, 1534-1541.
- Syrovets, T., Büchele, B., Gedig, E., Slupsky, J.R. ve Simmet, T., 2000. Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerase I and II α , *Molecular pharmacology*, 58, 71-81.
- Taneja, B., Patel A, Slesarev A, ve Mondragon A., 2006. Structure of the N-terminal fragment of topoisomerase V reveals a new family of topoisomerases., *EMBOJ.*, 25, 2, 398 408.
- Takimoto, C.H., Wright, J. ve Arbuck, S.G., 1998. Clinical applications of the camptothecins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 107-109.
- Topcu, Z., 2001. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 26, 6, 405-416.
- Von Metzler, I., Heider, U., Mieth, M., Lamottke, B., Kaiser, M., Jakob, C. ve Sezer, O., 2009. Synergistic interaction of proteasome and topoisomerase II inhibition in multiple myeloma, *Experimental Cell Research*, 315, 14, 2471-2478.
- Wagenknecht, B., Hermisson, M., Eitel, K. ve Weller, M., 1999. Proteasome inhibitors induce p53/p21-independent apoptosis in human glioma cells, *Cell Physiol Biochem*, 9, 3, 117-125.
- Wang, J.C., 1996. DNA Topoisomerases, *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 635-692.
- Zhang, L., Ma, D., Zhang, Y., He, W., Yang, J. ve Li, C., 2013. Characterization of DNA Topoisomerase-1 in *Spodoptera exigua* for Toxicity Evaluation of Camptothecin and Hydroxy-Camptothecin 17, 5, 421-433.
- Zhang, F., Paterson, A. J., Huang, P., Wang, K. ve Kudlow, J. E., 2007. Metabolic control of proteasome function, *Physiology*, 22, 6, 373-379.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Çiydem TIRINOĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri : 27.03.1987 – ANKARA
E-posta adresi : cigdem_tirinoglu@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans :Aksaray Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans :Aksaray Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Oksuzoğlu E., **Tırinoğlu Ç.**, Kerimoğlu B. (2016). The combined effects of proteasome inhibitor bortezomib with topoisomerase I and II inhibitors on topoisomerase enzymes, Turkish Journal of Medical Science (Accepted Papers).

Oksuzoğlu E, **Tırinoğlu Ç**, Kerimoğlu B, Ozturk K. The Investigation of Inhibition Effect of Bortezomib on Human DNA Topoisomerase I and II Enzymes. 1st International NanoBio Technology Symposium, 27-29 August 2014, Köyceğiz, Muğla, Turkey.

Bortezomib'in Ökaryotik DNA Topoizomeraz I ve II Enzimi Üzerindeki in vitro İnhibisyon Etkisinin Araştırılması, Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: 2013-98.