



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DNA POLİMERAZ γ PROTEİNİNE BAĞLANAN YENİ
MOLEKÜLLERİN BELİRLENMESİ VE KANSER HÜCRESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İlgü Ece GÜLSER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU

İSTANBUL-2015

Bu çalışma, 212T026 proje numarası ile TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı

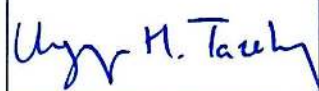
Tez Sahibi : İlgü Ece GÜLSER

Tez Başlığı : DNA Polimeraz γ Proteinine Bağlanan Yeni Moleküllerin Belirlenmesi ve Kanser Hücresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Sınav Yeri : Acıbadem Üniversitesi A Blok 8. Kat

Sınav Tarihi : 27 Ağustos 2015, saat 10.00

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Doç. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU	Acıbadem Üniversitesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof.Dr. Cengiz YAKICIER	Acıbadem Üniversitesi	
Prof.Dr. Uygur Halis TAZEBA Y	Gebze Teknik Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 01.09.2015 tarih ve 16 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mert ÜLGEN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “DNA POLİMERAZ γ PROTEİNİNE BAĞLANAN YENİ MOLEKÜLLERİN BELİRLENMESİ VE KANSER HÜCRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Meltem MÜFTÜOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarih: 27/08/2015

İlgü Ece GÜLSER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, DNA polimeraz γ proteinine bağlanan yeni moleküllerin belirlenmesi ve kanser hücresi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu çalışma, 212T026 proje numarası ile TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir. Katkısından dolayı TÜBİTAK'a,

Bu çalışmanın hayata geçmesini sağlayan, beni yönlendiren ve bana bütün bilgi birikimiyle yardımcı olan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Meltem Müftüoğlu'na,

Bu çalışmanın yapılabilmesi için sağlanan bütün olanaklar adına Acıbadem Üniversitesi'ne,

Bugüne kadar devam ettirdiğim eğitim hayatımda bana destek olan bütün hocalarıma ve geleceği görüp ilim ve bilim ışığında yürümemizi öğütleyen başöğretmen Mustafa Kemal Atatürk'e,

Bu çalışmada bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım ve dostlarım olan Cevriye Pamukçu ve Tuğçe İlhan'a,

Hayatımın her anında yanımda olan, aldığım her karara saygı duyan ve sevgisini hiç eksik etmeyen çok değerli aileme,

Bugüne kadar biriktirdiğim, acısıyla tatlısıyla hem gülüp hem ağladığım ve beni eğitim hayatımda da destekleyerek motive eden değerli arkadaşlarım ve dostlarıma, son olarak uzun bir süredir sevgi ve saygı ile yürüttüğüm ilişkimin zor zamanlarımda en büyük destekçilerinden olması sebebiyle müstakbel eşime en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

İlgü Ece GÜLSER

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR	x
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser ve DNA tamir mekanizmaları.....	5
2.2. Nükleer ve mitokondriyel baz eksizyon tamir yolağı	7
2.3. Yanlış eşleşme tamir (MMR) mekanizması.....	9
2.4. BER ve MMR tamir yollarının sentetik letal inhibisyonu ile kanser hücrelerinin selektif olarak yok edilmesi	9
2.5. DNA Polimeraz γ ve İnhibitörleri.....	10
3.GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Prestwick kimyasal kütüphanesinde® yer alan 1200 küçük molekülün DNA polimeraz γ proteini ile etkileşiminin yüzey plazmon rezonans (SPR) analiz yöntemi	14
3.2. Hücre kültürü ve hücre ekstraktlarının hazırlanması	14
3.2.1. Hücre kültürü	14
3.2.2. Hücre ekstraktlarının hazırlanması	15
3.2.3. Bradford protein tayini.....	15
3.2.4. Western blot analizi	15
3.3. xCELLigence RTCA-DP sistemi kullanılarak hücre büyümesi ve proliferasyonunun gerçek zamanlı (real-time) analizi.....	16

3.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence RTCA-DP) ile hücre sitotoksosite deneyleri.....	17
3.5. HCT116-VA (MLH1 negatif) ve HCT116-V1 (MLH1 pozitif) hücrelerinde Pol γ geninin sessizleştirilmesi	17
3.5.1. Pol γ shRNA ve kontrol shRNA pRS plazmitlerinin çoğaltılması.....	17
3.5.2. Pol γ shRNA pRS plazmitlerinin HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerine retroviral transfeksiyonu ile Pol γ geninin sessizleştirilmesi ve "stable" hücre hattı oluşturulması.....	18
3.5.3. Pol γ shRNA pRS plazmitlerinin HeLa hücrelerine geçici transfeksiyonu ile Pol γ geninin sessizleştirilmesi.....	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. Yüzey plazmon rezonans yöntemi ile DNA polimeraz γ proteinine bağlanan Prestwick kimyasal kütüphanesi® moleküllerinin belirlenmesi.....	19
4.2. HCT116 kolon kanser hücre hatlarının test edilmesi.....	21
4.3. DNA polimeraz γ 'ya bağlanan moleküllerin HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence RTCA-DP) kullanılarak belirlenmesi	23
4.3.1. Sitotoksosite deneyleri için en uygun hücre sayısının ve ilaç uygulama zamanının belirlenmesi.....	23
4.3.2. Sitotoksosite deneyleri	26
4.3.3. Prestw-272 molekülünün Pol γ geni sessizleştirilmiş HCT116 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.....	31
4.3.3.1. HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinde Pol γ geninin shRNA ile sessizleştirilmesi	31
4.3.3.2. Molekül Prestw-272'nin HCT116-VA-Pol γ KD ve HCT116-V1-Pol γ KD hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.....	33
4.4. Prestw-272 molekülünün HeLa hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi.....	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	35
6.KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Mitokondriyel baz eksizyon tamir yolağı.	8
Şekil 2. MLH1 ve Pol γ arasındaki sentetik letal ilişki.....	10
Şekil 3. Pol γ proteinin üç boyutlu yapısı..	11
Şekil 4. Yüzey plazmon rezonans yöntemi ile Prestwick kimyasal kütüphanesinde® bulunan 1200 molekülün Pol γ ile bağlanma analizi.	19
Şekil 5. A) HCT116, HCT116-chr3, HCT116-V1 ve HCT116-VA hücrelerindeki MLH1 (85 kDa) ve β -aktin (42 kDa) protein miktarlarının western blot analizi. B) HCT116, HCT116-VA ve HCT116-chr3 hücrelerinde MLH1 geninin sekans analizi.....	22
Şekil 6. Farklı hücre sayısındaki A) HCT116-VA B) HCT116-V1 C) HeLa hücrelerinin gerçek zamanlı proliferasyon grafiği..	24
Şekil 7. HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücrelerinin bölünme zamanı (iki katına çıkma zamanı; doubling time).	25
Şekil 8. Pol γ 'ya bağlanan Prestwick kimyasal kütüphanesi® moleküllerinin ve Menadione'un 20 μ M konsantrasyonunda HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.....	29
Şekil 9. Prestw-272 molekülünün HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi ve IC50 değeri.	30
Şekil 10. A) Pol γ shRNA A, B, C ve D pRS plazmiti ve kontrol plazmiti, VA ile transfekte edilmiş HCT116-V1 hücrelerinin western blot analizi. B) Pol γ shRNA A, B, C ve D pRS plazmiti ve kontrol plazmiti; ve VA ile transfekte edilmiş HCT116 hücrelerinin western blot analizi.....	31

Şekil 11. A) Pol γ shRNA C pRS plazmiti ile transfekte edilmiş HCT116-VA hücrelerinden seçilen 20 hücre klonunun western blot analizi. B) Pol γ shRNA C pRS plazmiti ile transfekte edilmiş HCT116-V1 hücrelerinden seçilen 20 hücre klonunun western blot analizi.

..... 32

Şekil 12. Molekül Prestw-272'nin HCT116-VA-Pol γ KD ve HCT116-V1-Pol γ KD hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi..... 33

Şekil 13. Molekül Prestw-272'nin HeLa ve HeLa-Pol γ KD hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.. 34



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Klinik denemelerdeki sentetik letalite ilaçları 6

Tablo 2. SPR analizi ile Pol γ 'ya bağlandığı belirlenen 7 Prestwick kimyasal kütüphanesi®
molekülünün kimyasal özellikleri ve SPR sonuçları. 20



KISALTMALAR

8-OH-Gua:	8-hidroksiguanin
α-OGG1:	α -8-hidroksiguanin DNA glikozilaz
AID:	Aksesuar etkileşim belirleyici
AP:	Apirimidinik ya da Apürinik
APE 1:	AP endonükleaz 1
β-OGG1:	β -8-hidroksiguanin DNA glikozilaz
BER:	Baz eksizyon tamiri
BSA:	Sığır serum albümin
DPBS:	Dulbecco'nun Fosfat tamponlu çözeltisi
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS:	Fetal sığır serumu
FEN1:	Flap endonükleaz 1
KD:	Sessizleştirme
LDS:	Lityum dodesil sülfat
LP-BER:	Uzun yama-baz eksizyon tamir yolağı
mtDNA:	Mitokondriyel DNA
MMR:	Yanlış eşleşme tamir mekanizması
Pol γ:	DNA polimeraz gama
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
shRNA:	Kısa saç tokalı RNA
SN-BER:	Kısa yama-baz eksizyon tamir yolağı
TBST:	Tween 20- tris tamponlu tuz çözeltisi

ÖZET

Kanser tedavisinin başarılı olması normal hücrelere zarar vermeden seçici olarak tümör hücresinin öldürülmesine bağlıdır. Bu seçici sitotoksiste, DNA tamirine bağlı sentetik letal etkileşimler üzerinden gerçekleştirilebilir. MLH1 ve DNA polimeraz γ (Pol γ) arasındaki sentetik letal ilişki, *MLH1* mutasyonunun dolayısıyla yanlış eşleşme tamir hasarının neden olduğu polipsiz kolorektal kanser hücrelerinin, normal hücrelere zarar vermeden tedavi edilmesini, Pol γ 'nın inhibisyonu ile mümkün kılar. Bu çalışmada, MLH1 proteini bulunmayan kanser hücrelerine seçici sitotoksiste gösteren küçük molekülleri tespit etmek için, Pol γ proteinine doğrudan bağlandığını belirlediğimiz Prestwick kimyasal kütüphanesi® moleküllerinin MLH1 proteini bulunmayan (HCT116-VA) ve MLH1-proteini bulunan (HCT116-V1) kanser hücreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Kütüphanede bulunan 1200 molekülden 7 molekülün Pol γ 'ya doğrudan bağlandığı yüzey plazmon rezonans analizi ile tespit edilmiştir. Bu moleküllerden Prestw-272'nin MLH1 proteini bulunmayan HCT116 hücresine (IC_{50} : 5,72 μ M) MLH1-proteini bulunan HCT116-V1 (IC_{50} : 36×10^3 μ M) hücresine kıyasla daha letal olduğu gerçek zamanlı hücre analizi ile tespit edilmiştir. Prestw-272 molekülünün Pol γ 'nın sessizleştirildiği HCT116-VA hücresinin canlılığını etkilememesi ama Pol γ 'nın bulunduğu kontrol shRNA-HCT116-VA hücresinin proliferasyonunu etkilemesi, bu inhibitörün etkisinin Pol γ 'nın hücresel fonksiyonu üzerinden olduğunu göstermiştir. Bu veriler, MLH1 mutasyonu nedeniyle oluşan kanserlerin seçici tedavisi için Prestw-272'nin, potansiyel yeni bir molekül olarak geliştirilebileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: DNA polimeraz γ , MLH1, yanlış eşleşme tamiri, baz eksizyon tamiri, sentetik letalite

SUMMARY

Successful cancer therapy depends on selective killing of tumor cells while sparing normal cells. This selectivity can be achieved through DNA repair-based synthetic lethal interactions. The synthetic lethal relationship between MLH1 and DNA polymerase γ (Pol γ) indicating that the inhibition of Pol γ may have a role for the selective treatment of nonpolyposis colorectal cancer arising from mismatch repair deficiency with *MLH1* mutation without impairing normal cells. In this study, to identify the small molecules to which MLH1-deficient cancer cells are selectively cytotoxic, we screened MLH1-deficient (HCT116-VA) and MLH1-proficient (HCT116-V1) cancer cell lines with the Prestwick Chemical Library compounds that interact with Pol γ protein. Of 1200 molecules, seven lead molecules that directly bind to Pol γ were identified by surface plasmon resonance analysis. Among them one molecule, called Prestw-272, was found to be selectively lethal to HCT116 cells (IC_{50} : 5,72 μ M) lacking functional MLH1 compared to MLH1-proficient HCT116-V1 cells (IC_{50} : 36×10^3 μ M) by real time cellular analysis. Pol γ -depleted HCT116-VA grown in the presence of 20 μ M Prestw-272 were resistant to its antiproliferative effects, whereas control shRNA-HCT116-VA cells were highly sensitive to Prestw-272, suggesting that antiproliferative effect of Prestw-272 is Pol γ dependent. These data suggest that Prestw-272 may be used as a new potential molecule for the selective treatment of MLH1-deficient cancers.

Key words: DNA polymerase γ , MLH1, mismatch repair, base excision repair, synthetic lethality

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser tedavisinin başarılı olması ve kemoterapinin yan etkilerinin minimuma indirilmesi sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyen ilaçların belirlenmesi ile mümkün olur. Bu tedaviler yok edilmek istenen kanser hücresinin moleküler ve hücresel özelliklerinden faydalanılarak geliştirilebilir. Birçok kemoterapötik ajan ve radyasyon sitotoksik etkilerini DNA hasarını indükleyerek gösterir. Fakat DNA tamir yolları DNA hasarını tamir ederek bu hasarın öldürücü etkilerinden hücreyi korur ve böylece genomik kararlılığı sağlar. Bu nedenle, kanser hücresindeki DNA tamir yolları kanser tedavisinin önünde çok önemli bir engeldir. Kanser tedavisinin etkinliğinin DNA tamir yolları inhibe edilerek artırılması DNA tamir mekanizmalarını yeni kanser tedavileri için umut vadeden bir hedef haline getirmiştir. Spesifik DNA tamir yollarının inhibitörlerinin DNA'da hasar oluşturan kemoterapötik ilaçlar ile birlikte kanser tedavisinde kullanılması kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırmıştır (1-4). DNA tamir yollarının inhibisyonu kanser tedavisinde umut vadeden bir hedef olmasının diğer bir nedeni de bazı DNA tamir yollarının bazı kanser türlerinde aktif olmamasıdır. Bu özellik, DNA tamir yolları için sentetik letaliteyi (synthetic lethality) mümkün kılarak kanser tedavisinde sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerinin seçici olarak hedeflenmesini sağlar (5-7).

Tek başına hücre ölümüne neden olmayan mutant bir tümör baskılayıcı DNA tamir geni diğer mutant bir DNA tamir geni ile birlikte hücre ölümüne neden oluyorsa bu iki gen arasında sentetik letal ilişki vardır (5-7). Son yıllarda yapılan çalışmalar, mitokondriyel baz eksizyon tamir (BER) yolağında görev alan DNA polimeraz γ (Pol γ) ile yanlış eşleşme tamirinde (MMR) görev alan MLH1 proteini arasındaki sentetik letal bir ilişki olduğunu göstermiştir (8). Sentetik letal ilişki nedeniyle, MLH1 genindeki mutasyonun neden olduğu polipsiz kolorektal kanser hücrelerinde kemoterapötik ajanların neden olduğu DNA hasarı mitokondriyel BER yolağı ile tamir edilerek tümör hücresinin canlılığı sağlanmaktadır. DNA tamir mekanizmaları, DNA hasarına özgü olmakla birlikte bazı DNA tamir mekanizmaları aynı DNA hasarının tamir edilmesinde de rol oynar. Örneğin, MMR proteinleri replikasyon hasarlarının yanı sıra oksidatif DNA hasarlarının ve tek zincir

kırıklarının tamirinde de rol oynar. Oksidatif baz hasarını tamir eden temel mekanizma BER yolağıdır. Polipsiz kolon kanser hücresinde *MLH1* geni tümör baskılayıcı gen özelliğine sahiptir ki bu durumda tümör hücrelerinde MLH1 fonksiyonu kaybolurken normal hücrelerde *MLH1* geninin en az bir fonksiyonel alleli kalır. Bu hücrelerde, Pol γ dolayısıyla mitokondriyel BER yolağı inhibisyonu hücre ölümüne neden olurken sağlıklı hücrelerde hücre ölümüne neden olmamaktadır (8). Bu çalışmanın amacı, Pol γ ile MLH1 arasındaki sentetik letal ilişkiden yola çıkarak, spesifik olarak Pol γ proteinine bağlanan küçük molekülleri tespit etmek; bu moleküllerden MLH1 genindeki mutasyon sonucunda gelişen polipsiz kalıtsal kolon kanser hücresine (HCT116) seçici olarak daha fazla sitotoksosite gösteren molekülü belirlemektir. Böylece, kanser tedavisinde ilaç gelişimine ve yeni ilaç hedeflerinin bulunmasına katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve DNA tamir mekanizmaları

Kanser hücrelerinin proliferasyonu sağlıklı (normal) hücrelere göre çok daha hızlıdır. Hücre proliferasyonu hücre siklusu tarafından düzenlenir ve bu nedenle, kanser ilaçları ile hücre siklusu hedeflenerek hücrenin çoğalması engellenir. Bu ilaçlar, genellikle DNA hasarı oluşturarak hücre siklusu üzerine etkilerini gösterirler. DNA hasarı ya doğrudan ya da hücre siklusunun S-fazında meydana gelen DNA replikasyonundan sonra siklusun durmasına ve hücre ölümüne neden olur. Hücrenin S-fazında hasarlı DNA'yı replike etmeye çalışması hücre ölümünün artmasına neden olur. Bu nedenle, DNA da hasar oluşturarak kanser tedavisini sağlayan ilaçlar çoğalma özelliğine sahip hücrelerde daha toksik bir etki yaratır. Fakat kanser hücrelerinin sitotoksik DNA hasarını etkin bir şekilde tanıma ve toksik etki oluşturmadan tamir etme özellikleri bu hücrelerin terapötik direncinde anahtar rol oynar. Bu nedenle, kanser tedavisinin etkinliğinin DNA tamir yolları inhibe edilerek artırılması DNA tamir mekanizmalarını yeni kanser tedavileri için umut vadeden bir hedef haline getirmiştir. Spesifik DNA tamir yollarının inhibitörlerinin DNA'da hasar oluşturan kemoterapötik ilaçlar ile birlikte kanser tedavisinde kullanılması kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırmaktadır (1-4).

DNA tamir yolları arasındaki sentetik letal ilişki (synthetic lethality) sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerinin seçici olarak hedeflenmesini sağlar. Tek başına hücre ölümüne neden olmayan mutant bir gen diğer mutant bir gen ile birlikte hücre ölümüne neden oluyorsa bu iki gen arasında sentetik letal ilişki vardır (5-7). Örneğin, baz eksizyon tamir (BER) mekanizmasında görev alan PARP1 proteininin inhibisyonu ile mutasyonu meme kanserine neden olan ve homolog rekombinasyon tamir yolağında görev alan BRCA1 veya BRCA2 genleri arasında sentetik letal bir ilişki vardır. Bu nedenle, PARP1 inhibitörleri BRCA1/BRCA2 mutant meme kanseri tedavisinde monoterapi (KU-0059436/AZD2281) olarak kullanılmaktadır (8-11). Ayrıca, PARP1 için bulunan diğer bir inhibitör ilaç (INO-1001) ise melanoma ve glioblastoma'nın tedavisinde temozolomid ile birlikte uygulanmaktadır (7). Tablo

1'de DNA tamir proteinleri arasındaki sentetik letal ilişki sonucunda klinikte denemede olan bazı kanser ilaçları özetlenmiştir (11).

Tablo 1. Klinik denemelerdeki sentetik letalite ilaçları (11).

İlaç	Sınıf	Faz
Iniparib (BSI-201)	PARP inh.	Faz 2-3
Veliparib (ABT-888)	PARP inh.	Faz 1-2
Olaparib (AZD2281)	PARP inh.	Faz 1-2
CEP-8933	PARP inh.	Faz 1
INO-1001	PARP inh.	Faz 1
AG014699	PARP inh.	Faz 1
GPI 21 016	PARP inh.	Faz 1
MK4827	PARP inh.	Faz 1
O ⁶ -benzylguanine	MGMT inh.	Faz 2
Lomeguatrib	MGMT inh.	Faz 2
KU55933	ATM inh.	Klinik öncesi
CP466722	ATM inh.	Klinik öncesi
KU7441	DNA-PKc inh.	Klinik öncesi
TRC102	APE inh.	Faz 1
MP470	Rad51 inh.	Klinik öncesi

DNA tamir yolları genomun bütünlüğünün korunması için çok önemlidir. Çekirdekte baz eksizyon, nükleotid eksizyon, yanlış eşleşme ve rekombinasyon tamir yolları bulunur. Mitokondride ise BER ve yanlış eşleşme tamir (MMR) yolları mitokondriyel genomu DNA hasarından korur. Yapılan çalışmalar, rekombinasyon tamirinde görev alan proteinlerin mitokondride bulunduğunu göstermiş ancak moleküler mekanizması henüz detaylı olarak aydınlatılamamıştır (12-15). BER yolağı normal hücre metabolizması (mitokondriyel solunum) sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve ekzojen kaynaklı DNA'ya hasar veren faktörlerin, örneğin, kanser tedavisinde sık kullanılan iyonize edici radyasyon ve alkilleyici ajanların, DNA bazlarında oluşturduğu oksidatif veya anormal hasarı ve tek zincir

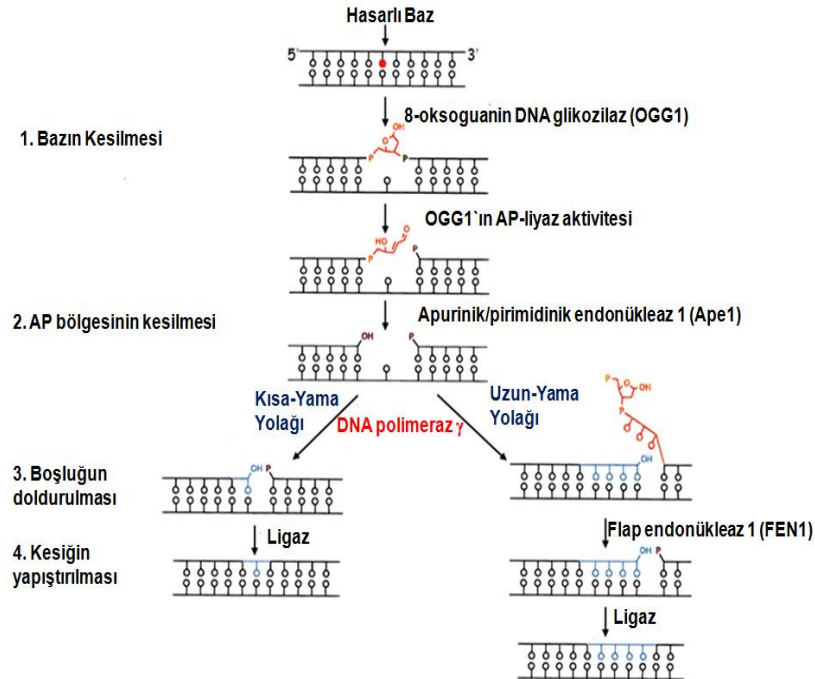
kırıklarını tamir eden temel mekanizmadır (15). Bu DNA hasarlarının genellikle mutajenik olması ve sporadik kanserler ile etiyolojik bağlantısının olması nedeniyle BER yolağı hem kanser patogeneğinde hem de tedavisinde çok önemlidir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan faktörler farklı DNA tamir yolları ile tamir edilen çeşitli DNA hasarlarına neden olur. İyonize edici radyasyon ve bleomisin gibi radyoterapi ve radyomimetikler, DNA'da tek ve çift zincir kırıkları ve baz hasarına neden olurken, temozolomid, nitosoure bileşikler ve alkilsulfonatlar gibi monofonksiyonel alkilleyici ajanlar baz hasarı, replikasyon lezyonları ve büyük adüktlere neden olur. 5-florourasil, tiyopurinler ve folat analogları gibi antimetabolitler ise baz hasarı ve replikasyon lezyonlarına neden olarak tümör hücrelerini öldürür. Baz hasarları ve tek zincir kırıkları BER yolağı, çift zincir kırıkları rekombinasyon tamir yolağı (homolog rekombinasyon ve nonhomolog uç birleştirme (NHEJ)), büyük adüktler nükleotid eksizyon DNA tamir yolağı ve replikasyon sırasında yanlış eşleşen bazlar ise MMR tamir yolağı ile tamir edilir. DNA tamir mekanizmaları, DNA hasarına özgü olmakla birlikte bazı DNA tamir mekanizmaları aynı DNA hasarının tamir edilmesinde de rol oynar. Örneğin, MMR proteinleri replikasyon hasarlarının yanı sıra oksidatif ajanların neden olduğu oksidatif DNA hasarlarının tamirinde de rol oynar. Oksidatif baz hasarını tamir eden temel mekanizma BER yolağıdır (1;16).

2.2. Nükleer ve mitokondriyel baz eksizyon tamir yolağı

BER yolağı hem çekirdekte hem de mitokondride bulunur. Çekirdek ve mitokondrideki BER yolağının mekanizması benzerdir (Şekil 1), fakat bu mekanizmanın bazı basamaklarında farklı proteinler rol oynar. BER yolağının ilk basamağında DNA hasarına özgü DNA glikozilaz enzimleri görev alır. DNA glikozilazlar modifiye olmuş veya uygun olmayan DNA bazlarını tanır ve baz ile şeker arasındaki N-glikozidik bağı keserek DNA zincirinde abazik bölge oluşturur. Örneğin, 8-oksoguanin (8-OH-Gua) baz hasarının tamiri için gerekli primer enzim, 8-oksoguanin DNA glikozilaz enzimi (OGG1)'dir. OGG1 geninin farklı bölgelerinin transkripsiyonu ve alternatif uçbirleştirme (splicing) ile OGG1 proteininin çekirdekteki formu (α -OGG1) ve mitokondriyel formu (β -OGG1) meydana gelir. α -OGG1 hem nükleer hem de mitokondriyel BER yolağında görev alırken β -OGG1

sadece mitokondriyel BER yolağında görev alır. OGG1'in her iki izomeri de çift fonksiyonludur; hem glikozilaz hem de AP-liyaz aktivitesine sahiptir. İnsanda farklı oksidatif DNA hasarını substrat olarak kullanan DNA glikozilaz enzimleri bulunur: OGG1, NEIL1 DNA glikozilaz, NEIL2 DNA glikozilaz ve Nth1 DNA glikozilaz gibi. DNA glikozilazlar farklı substratlara spesifik olmalarıyla birlikte aynı DNA hasarı için de aktivite gösterirler. Böylece, hücrede birbirleri için “back up” görevi yaparlar (15;17).

Çift fonksiyonlu DNA glikozilazlar ile modifiye baz ve apurinik/apirimidinik (AP) bölgesinin 3'-ucu kesildikten sonra AP endonükleaz 1 (Ape1) hasara yakın bölgedeki DNA omurgasından keser ve tek zincir kırığı oluşturur. Mitokondriyel Ape1, çekirdekte bulunan Ape1 proteininin N-terminalinden çekirdeğe lokalizasyon sinyali de içeren 33 amino asit rezidusunun proteolitik olarak kesilmiş şeklidir. Abazik bölgenin Ape1 ile kesilmesiyle oluşan tek nükleotidlik boşluk çekirdek DNA'sında DNA polimeraz β ile mitokondri DNA (mtDNA)'sında ise Pol γ ile doldurulur. DNA polimerazlar ile sentez yapıldıktan sonra DNA ligaz enzimi ile DNA zinciri birleştirilerek BER yolağı tamamlanır (15;17).



Şekil 1. Mitokondriyel baz eksizyon tamir yolağı.

DNA glikozilazlar ile hasarlı baz kesildikten sonra BER yolağı ya tek nükleotid sentezi (kısa-yama BER; Short Patch-BER; SP-BER) ya da oligodeoksinükleotid zincirinin yerinden kaydırılmasına neden olan birkaç nükleotid sentezi (uzun-yama BER; Long Patch-BER; LP-BER) yapar. SP-BER yolağının sentez basamağında çekirdekte polimeraz β , mitokondride ise Pol γ görev alır. LP-BER yolağında ise çekirdekte polimeraz β ile birlikte PCNA-bağı polimerazlar (polimeraz δ ve polimeraz ϵ) görev alır. LP-BER yolağında DNA zincirinin kaydırılmasından sonra flap endonukleaz 1 (Fen1) proteini kaydırılmış zinciri keser ve polimeraz ve ligazlarla sentez tamamlanır. Son yıllarda yapılan araştırmalar mitokondride SP-BER yolağı yanı sıra LP-BER yolağının da bulunduğunu göstermiştir. Her iki yolda da polimeraz aktivitesi gösteren enzim Pol γ 'dır. Hücrelerin hangi koşullarda LP-BER'a yöneldiği henüz tam olarak açıklanamamıştır (13;15;17).

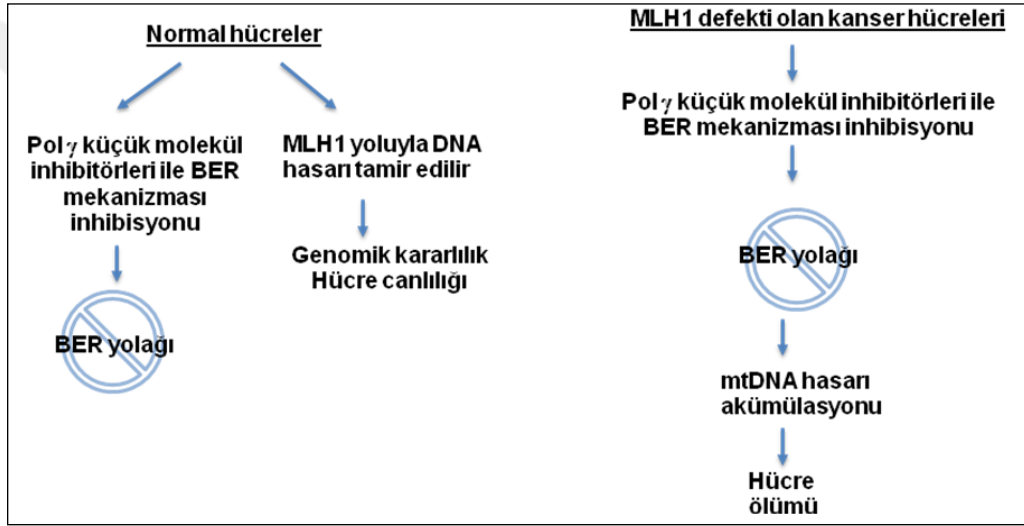
2.3. Yanlış eşleşme tamir (MMR) mekanizması

MMR mekanizması DNA replikasyonu ve rekombinasyon sırasında meydana gelen yanlış eşleşmiş bazları tamir eder. MMR mekanizmasındaki hasar mutasyon hızının artmasına ve dolayısıyla farklı kanser türlerinin gelişimine neden olur. MLH1 genindeki mutasyondan dolayı kalıtsal MMR hasarı polipsiz kalıtsal kolon kanserine (Lynch syndrome) ve ayrıca MMR genlerinin somatik genetik ve epigenetik inaktivasyonu çeşitli spontan tümörlerini gelişimine neden olur. Ökaryotlarda MMR mekanizmasının ilk basamağında, MSH2-MSH6 veya MSH2-MSH3 protein kompleksleri yanlış eşleşmiş bazları tanır. Yanlış eşleşme tanıma faktörleri yanlış eşleşmiş bazlara bağlandıktan sonra endonükleaz aktivitesine sahip MLH1-PMS1 (MLH1-MLH3) kompleksi bağlanarak "daughter" DNA zincirinin tamirini başlatır (18).

2.4. BER ve MMR tamir yollarının sentetik letal inhibisyonu ile kanser hücrelerinin selektif olarak yok edilmesi

MMR mekanizmasında görev alan MLH1 genindeki mutasyonların neden olduğu polipsiz kalıtsal kolon kanseri tüm kolorektal kanserler arasında görülme sıklığı %5'dir. MLH1 promoter bölgesinin metilasyonu da sporadik kolorektal kanserlere neden olmaktadır. Bu kanserlerde MLH1 geni tümör baskılayıcı gen

özelliğine sahiptir ki bu durumda tümör hücrelerinde MLH1 fonksiyonu kaybolurken normal hücrelerde MLH1 geninin en az bir fonksiyonel alleli kalır. Şekil 2’de Pol γ ile MLH1 arasındaki sentetik letal ilişki nedeniyle kanser hücresinin seçici olarak hedeflenme prensibi gösterilmektedir (8). MLH1 gen hasarının neden olduğu kolorektal kanser hücrelerinde kemoterapötik faktörlerin verdiği DNA hasarı mitokondriyel BER yolağı ile tamir edilerek hücre canlılığı sağlanmaktadır. Bu hücrelerde Pol γ dolayısıyla mitokondriyel BER yolağı inhibe edildiğinde ise hücre ölümü gerçekleşmektedir (8).

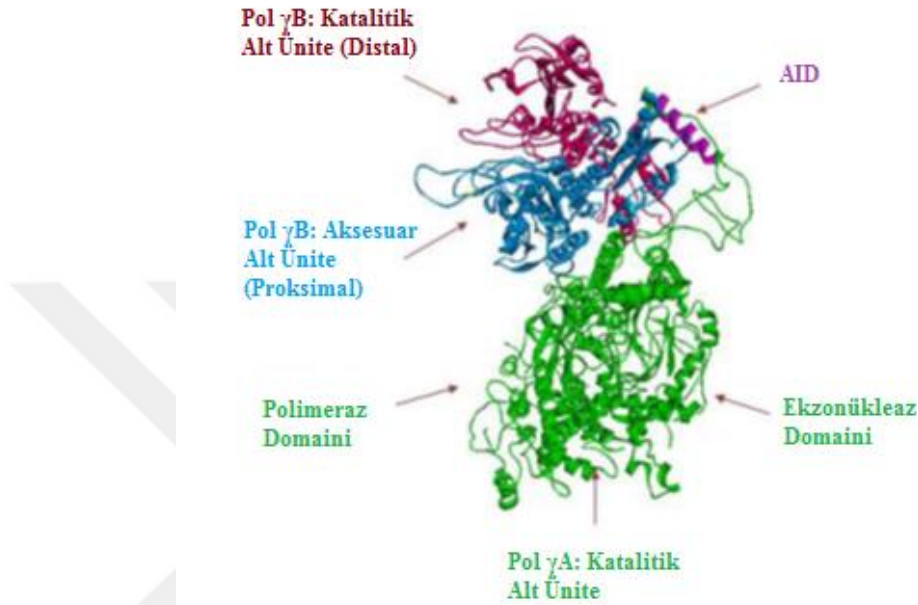


Şekil 2. MLH1 ve Pol γ arasındaki sentetik letal ilişki. Mitokondriyel BER ve MMR tamir yollarının inhibisyonu ile kanser hücrelerinin selektif olarak yok edilmesi.

2.5. DNA Polimeraz γ ve İnhibitörleri

Pol γ mitokondriyel BER mekanizması ve mtDNA replikasyonda görev alan tek polimerazdır (19,20). Pol γ heterotrimerik bir proteindir. Bir katalitik altbirim, Pol γ A (140 kDa), ve iki aksesuar altbirim Pol γ B (53 kDa) den meydana gelir. Pol γ A polimeraz ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir (19). Pol γ B ise, Pol γ A'nın aktivitesini artırır (21). Bağlayıcı bölgenin aksesuar etkileşim belirleyici alt bölgesi (AID) polimeraz alt bölgesinden yaklaşık olarak 50 Å uzak olup, DNA

bağlanmasının arttırılmasını sağlar (Şekil 3). Bu alt bölge proksimal aksesuar alt ünite ile katalitik alt birimin L-heliksi arasında hidrofobik etkileşimler oluşturur (21).



Şekil 3. Pol γ proteinin üç boyutlu yapısı. Pol γ 'nın yapısı “Discovery Studio” ile görüntülenmiştir (PDB code: 3IKM).

Literatürde antikanser etkisi belirlenmiş Pol γ inhibitörleri ile ilgili çok sınırlı düzeyde çalışma bulunmaktadır (22-24). Seçici olarak sadece Pol γ 'nın inhibisyonunu hedefleyen bir inhibitör henüz tanımlanmamıştır. Bugüne kadar belirlenen Pol γ inhibitörleri (örneğin, vitamin K3 ve HIV'e karşı kullanılan nükleozid analogu ters transkriptaz inhibitörleri) Pol γ 'nın aktivitesini inhibe etmenin yanı sıra hücrede farklı mekanizmalar üzerinde de etkilerini göstermiştir (22-24). Vitamin K3 (menadion; 2-metil-1,4-naftakinon) vitamin K'nın sentetik formudur ve vücutta vitamin K bileşiklerinin prekürsörü olarak görev yapar. Kanser hücrelerinde vitamin K3'ün Pol γ 'nın mtDNA replikasyon aktivitesini inhibe ederek mitokondriyel sitotoksositeye neden olduğu gösterilmiştir (22). Sasaki ve arkadaşları, vitamin K3'ün Pol γ 'nın sentez aktivitesi üzerine etkisini ölçmek için HCT116 kolon

kanser hücre hattından mitokondriyel ekstrakt hazırlamış ve primer/template oligodeoksinükleotid substratı (poli(dA)/oligo(dT)12-18) kullanarak Pol γ 'nın sentez aktivitesini ölçmüş ve vitamin K3'ün mitokondriyel replikasyon ve mtDNA tamirini inhibe ettiğini öne sürmüştür (22). Ancak, primer/template substratları DNA polimerazların DNA replikasyonundaki sentez aktivitesini ölçmek için kullanılır. Primer/template substratı Pol γ 'nın BER yolağındaki sentez aktivitesinin biyolojik substratı değildir. Mitokondriyel BER yolağındaki Pol γ 'nın sentez aktivitesini ölçmek için tek nükleotidlik boşluk içeren oligodeoksinükleotid substratı (gap substrate) kullanılır ve bu substrat kısa yol BER yolağında boşluk doldurma basamağında Pol γ 'nın kullandığı biyolojik substrattır. Bu nedenle, Sasaki ve arkadaşlarının yaptığı araştırma vitamin K3'ün Pol γ 'nın sadece mtDNA replikasyonundaki aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir. Vitamin K3'ün Pol γ 'nın mitokondriyel BER aktivitesini inhibe ettiğini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Vitamin K3'ün antikanser etkisi çeşitli kanser tiplerinde, örneğin, hepatik, oral kavite, meme, mesane, pankreas ve kan kanseri gibi in vitro olarak gösterilmiştir (25). Bu kanser türlerinde vitamin K3'ün sitotoksik etki mekanizmasını aydınlatmak için yapılan çalışmalar, bu vitaminin hücre içi tiyol (GSH) düzeyini düşürdüğünü, oksidatif stresi artırdığını dolayısıyla superoksit radikali ve hidrojen peroksit düzeylerini artırdığını, hücre içi kalsiyum homeostazını bozduğunu, DNA kırıklarına, DNA'da oksidatif hasara ve hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir (22,25). Son yıllarda yapılan bir başka çalışma ise vitamin K3'ün tubulin'in kolkilin bağlanma bölgesine de bağlandığını ve mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (25). Pankreas kanserinde vitamin K3'ün moleküler etki mekanizmasını aydınlatmak için yapılan çalışmada vitamin K3'ün ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz (ERK)'ın fosforilasyonunu artırarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (26). Tüm bu araştırmalar vitamin K3'ün sitotoksik etkisini sadece Pol γ 'nın aktivitesini inhibe ederek değil farklı molekülleri ya da yolları etkileyerek de gösterdiğini belirtmektedir. Birçok hücresel veya mitokondriyel fonksiyonlar kanser hücrelerinin yanı sıra normal hücrenin canlılığı için de gerekli olduğundan selektif olarak hedeflenmeyen inhibitörlerin kullanılması sağlıklı hücrelerin ölümüne de yol açacaktır. Bu nedenle, vitamin K3'ün kanser tedavisinde

terapötik seçici bir ilaç olarak kullanılması efektif bir sonuç vermemiştir. Örneğin, vitamin K3 ilerlemiş malignansisi bulunan hastalarda klinik denemelerde kullanılmış ve ilerlemiş farklı tip kanser vakalarında denendiğinde tam bir yanıt alınamamıştır. İlerlemiş karaciğer kanseri olan hastalara günlük dozlar halinde uygulandığında %17.4 hastanın yaşam süresini uzatmış ancak hastaların genel yaşam süreleri üzerine bir etki görülmemiştir (25).

Pol γ 'nın aktivitesini inhibe ederek mitokondriyel fonksiyonel bozukluğuna ve sitotoksositeye neden olan diğer inhibitör grubu ise nükleozid analogu ters (reverse) transkriptaz inhibitörleridir, örneğin timidin analogları stavudin (d4T) ve fialuridin (23,24). Nükleozid analogu ters transkriptaz inhibitörleri antiretroviral ilaçlardır ve HIV-enfeksiyonuna karşı kullanılmaktadırlar. Ancak bu ilaçların AIDS tedavisinde uzun süreli kullanılması (6 aydan fazla) ciddi yan etkilere neden olmuştur, örneğin, laktik asidosis sendromu, hepatik steatosis, hepatit ve diğer kronik karaciğer hastalıkları. İnhibitörlerin yan etkilerinin mtDNA replikasyonunu inhibe etmelerinden dolayı olduğu gösterilmiştir (23). Nükleozid analogu ters transkriptaz inhibitörleri mtDNA replikasyonu sırasında ya yeni sentezlenmiş olan mtDNA zincirine Pol γ ile eklenerek mtDNA replikasyonunu inhibe ederler örn, stavudin (d4T) ya da mtDNA replikasyonunda Pol γ ile DNA'ya eklenerek mtDNA replikasyonunu inhibe ederler, örneğin fialuridin (replikasyon sırasında timidin trifosfatın alternatifi olarak kullanılarak mtDNA'nın yapısına katılırlar). Stavudin (d4T) HIV1'in replikasyonunu ve Pol γ 'nın replikasyonunu aynı güçte inhibe eder. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, bu inhibitörlerden stavudin (d4T)'ün mtDNA'nın yapısına inkorpore olarak Pol γ 'nın replikasyon aktivitesini inhibe ettiği ve aynı zamanda hepatik HuH-7 hücrelerinde Pol γ aktivitesini inhibe ederek mitokondriyel BER aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (23). Sonuç olarak nükleozid analogu ters transkriptaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar bu inhibitörlerin mitokondriyel BER yolağının inhibisyonuna özgü olmadıklarını göstermektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Prestwick kimyasal kütüphanesinde® yer alan 1200 küçük molekülün DNA polimeraz γ proteini ile etkileşiminin yüzey plazmon rezonans (SPR) analiz yöntemi

SPR yöntemi kullanılarak Prestwick kimyasal kütüphanesinde® bulunan 1200 küçük molekülün Pol γ proteinine bağlanma analizi yapılmıştır. SPR yönteminde Pol γ proteini ve negatif kontrol proteini olarak kullanılan RNA helikaz A “Biacore T100 sensor chip” leri üzerine immobilize edildikten sonra Prestwick kütüphanesinde® bulunan 1200 küçük molekül 50 μ M konsantrasyonunda uygulanmıştır. Prestwick kütüphanesindeki® 1200 küçük molekül 96-kuyulu tabaka içerisindedir. Her 96-kuyulu tabaka 80 molekül içerir (15 tane 96 kuyulu tabaka x 80 molekül= 1200 molekül). 96-kuyulu tabakada bulunan moleküller %0.05 Tween-20 ve %5 DMSO 1XPBS ile 50 μ M konsantrasyonunda dilue edilerek 384-kuyulu tabakalara aktarılmış ve Biacore 4000 kullanılarak SPR analizi yapılmıştır. Her örnek 60 sn, 30 μ L/dak akış hızında enjekte edilmiş ve 34 saat 19 dakika sürecince takip edilmiştir. Elde edilen veriler “Biacore4000 Evaluation software (v. 1.0)” ile analiz edilmiştir (27).

3.2. Hücre kültürü ve hücre ekstraktlarının hazırlanması

3.2.1. Hücre kültürü

Kolon adenokarsinoma hücre hatları, HCT116 ve HCT116-chr3 hücreleri "National Institutes of Health, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)" den Dr.Thomas Kunkel'den; HCT116-VA ve HCT116-V1 hücreleri ise Brown Üniversitesi'nden Dr. Anatoly Zhitkovich' ten temin edilmiştir. HCT116 hücreleri için kültür medyumı Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Life Tech, USA), %10 Fetal Sığır Serumı (FBS) (Life Tech, USA) ve %1 penisilin/streptomisin (Life Tech, , USA) dir. HCT116-chr3, HCT116-VA ve HCT116-V1 hücreleri için aynı kültür ortamına 400 μ g/ml Genetisin (Life Tech, USA) eklendi. HeLa hücresi DMEM, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren kültür ortamında büyütüldü. Tüm hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde (Thermo Scietific, USA) büyütüldü.

3.2.2. Hücre ekstraktlarının hazırlanması

Hücre kültürü ortamında büyütülen hücreler 2 kez 1XPBS ile yıkandıktan sonra 500xg'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı. Elde edilen hücre peletine uygun hacimde RIPA tamponu (50 mM Tris-HCl (Bio-Rad, USA), 150 mM NaCl (Sigma Aldrich, USA), 1 mM EDTA (Life Tech, USA), 1 mM NaF (VWR, USA), 1 mM sodyum ortovanadat (VWR, USA), %0,5 NP-40 (Thermo Scientific, USA), %0,5 Triton X-100 (Thermo Scientific, USA), 0,5 mM PMSF (Roche, İsviçre), 1 mM DTT (Life Tech, USA) ve 1xproteaz inhibitör tableti (Roche, İsviçre) eklenerek 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Hücre lizati 5 pulse da 6 kez 1 saniye sonike (Omni Ruptor 4000, USA) edildikten sonra 14,000xg'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant toplanarak protein analizinde kullanıldı. Hücre lizati -80 °C'de saklandı.

3.2.3. Bradford protein tayini

Bradford solüsyonu (BioRad, USA), üreticinin protokolü takip edilerek total hücre ekstraktlarında protein miktarlarının tespiti için kullanıldı. Sığır serum albumini (BSA) protein standardı (Bio-Rad, USA) olarak kullanıldı. Spektrofotometrede (PowerWave HT, BioTek, USA) 595 nanometre dalga boyunda absorbansı ölçüldü.

3.2.4. Western blot analizi

Eşit protein miktarları içeren hücre ekstratları yükleme tamponu (Bolt® lithium dodecyl sulfate (LDS) Sample Buffer, Novex, USA) ve 10X örnek indirgeyici faktör (Bolt® Sample Reducing Agent, Novex, USA) ile karıştırılarak 95 °C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra 4-12% gradiyent SDS-PAGE jelde (Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gel, 10 Well, Novex, USA) yürütüldü. Örnekler Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad) kullanılarak PVDF membrana (Trans-Blot Turbo Midi PVDF Transfer Packs, Bio-Rad, USA) transfer edildikten sonra %5'lik süt tozu (dry milk) (Bio-Rad, USA) ve 5 M NaCl, 1M Tris pH 7.4 ve % 0.1'lik Tween 20 (Bio-Rad, USA) içeren çözelti (TBST) içinde çalkalamaya bırakıldı. Bu süre sonunda membran tercih edilen birincil antikor ile 4 °C'de bir gece çalkalamaya bırakıldı. Araştırmada kullanılan birincil antikorlar ve miktarları: Beta-Actin (8H10D10) Mouse mAb

(1:1000, Cell Signalling, USA), DNA Polymerase gama (D1Y6R) Rabbit mAb (1:1000, Cell Signalling, USA), MLH1 (4C9C7) Mouse mAb (1:1000, Cell Signalling, USA). Ertesi gün, membran 3 kez 5 er dakika TBST çözeltisi ile yıkandıktan sonra birincil antikora uygun HRP-konjuge ikincil antikor ile 1 saat çalkalamaya bırakıldı. Araştırmada kullanılan ikincil antikorlar 1:2500 oranında kullanıldı: Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signalling, USA) ve Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signalling, USA). Membran 3 kez 15'er dakika TBST çözeltisinde yıkandıktan sonra ECL (SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo, USA) ile görüntüledi. Membranlar "Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer" (Bio-Rad) içinde 30 °C' de 1,5 saat inkübe edilerek "strip" yapılarak farklı birincil antikorlar için kullanıldı.

3.3. xCELLigence RTCA-DP sistemi kullanılarak hücre büyümesi ve proliferasyonunun gerçek zamanlı (real-time) analizi

Hücre proliferasyonunun empedansa-dayalı gerçek zamanlı analizi xCELLigence DP sisteminin kullanım klavuzuna göre yapıldı (Roche, İsviçre). xCELLigence DP sistemine özgü 16 kuyulu tabakaların (E-plate16) her bir kuyusuna 100 µl hücre kültür medyumunu eklendi; 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra cihazda arka plan (backgorund) okuması yapıldı. Exponensiyal (exponential) büyüme fazında (Log fazı) bulunan hücreler tripsinize edilerek sayıldı. HCT116-VA ve HCT116-V1 hücreleri bir kuyuda hücre sayısı 20000, 40000 veya 60000; HeLa hücresi ise bir kuyuda hücre sayısı 625, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 ve 40000 olacak şekilde 100 µl içinde E-plate16'ya eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 37 °C %5'lik CO2 hücre kültür inkübatöründe bulunan xCELLigence DP cihazına yerleştirildi. Hücre büyümesi ve proliferasyonu 30 dakikada bir ölçüm alınarak 50 saat takip edildi. E-plate'lerde her kuyunun zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçülür. Hücre ve elektrot arasındaki fiziksel teması modüle eden hücrelerin fizyolojik özelliklerindeki herhangi bir değişiklik örneğin, hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi elektriksel empedans ölçümünde değişikliklere neden olur. Empedans değişikliği de sistemde hücre indeks değeri (cell index; CI) olarak ifade edilir. Dolayısıyla, hücre

proliferasyonu xCELLigence sisteminde hücre indeks değeri olarak ifade edilmektedir.

3.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence RTCA-DP) ile hücre sitotoksisite deneyleri

SPR analizi ile Pol γ proteinine bağlandığı belirlenen Prestwick kütüphanesi® moleküllerinin HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi her bir hücre hattı için optimum hücre sayısı yöntem 3.3'te belirtildiği gibi belirlendikten sonra hücreler 200 μ l içinde E-plate16 kuyularına ekildi. Hücreler log fazına geldiğinde (S-fazında) hücrelere farklı konsantrasyonlarda Pol γ 'ya bağlanan Prestwick kütüphanesi® molekülleri eklendi. Bu moleküllerin hücre proliferasyonu üzerine etkileri 30 dakika aralıkla 72 saat boyunca izlendi. EC₅₀/IC₅₀ değerleri xCELLigence ölçümleri ile elde edilen doz-yanıt eğrileri ile RTCA yazılımı ile analiz edilerek belirlendi.

3.5. HCT116-VA (MLH1 negatif) ve HCT116-V1 (MLH1 pozitif) hücrelerinde Pol γ geninin sessizleştirilmesi

3.5.1. Pol γ shRNA ve kontrol shRNA pRS plazmitlerinin çoğaltılması

Pol γ geninin katalitik alt-parçasına karşı shRNA ifade eden plazmitler Origene şirketinden satın alındı (katalog no: TR310307A, TR310307B, TR310307C, TR310307D ve kontrol plazmit katalog no: TR30012). Şirketten gelen plazmit DNA'ların miktarını çoğaltıp hücre kültüründe kullanılabilir hale getirmek için, DNA'lar E.coli DH5a kimyasal kompetent hücrelerine aktarıldı. Bakterinin 200 μ l'si 100 pg plazmit DNA ile karıştırıldı ve buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Bakteri plazmit karışımı 42 °C'de 90 saniye inkübe edildikten sonra tekrar buz üzerine alınarak 60 saniye kadar soğumalarına izin verildi. Daha sonra üzerlerine 800 μ l antibiyotiksiz LB eklenerek 37 °C'de 45 dakika büyümeleri sağlandı. Bu sürenin sonunda bakteriler cam boncuklar kullanılarak antibiyotik (100 μ g/ml ampisilin) içeren agar tabaklarına yayıldı ve 37 °C'de bir gece boyunca büyümeye bırakıldı. Ertesi gün, tabakta büyümüş bakteri kolonilerinden bir tanesi seçilerek 100 ml antibiyotikli (100 μ g/ml ampisilin) LB kültürüne aktarıldı ve bir gece boyunca 37 °C'de 250 rpm hızla sallanarak büyütüldü. Takip eden günde, bu bakteri kültürü

kullanılarak midiprep DNA'sı hazırlandı. Bunun için üreticinin protokolü takip edildi (Invitrogene katalog no: K210005). Hazırlanan shRNA plazmitleri HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücrelerinde Pol γ geninin sessizleştirilmesinde kullanıldı.

3.5.2. Pol γ shRNA pRS plazmitlerinin HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerine retroviral transfeksiyonu ile Pol γ geninin sessizleştirilmesi ve "stable" hücre hattı oluşturulması

Fare katyonik amino asit taşıyıcısını (mCAT) kodlayan cDNA (Addgene plazmid 10687) ile HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinin geçici transfeksiyonu yapılarak bu hücreler retroviral enfeksiyona duyarlı hale getirildi. Pol γ cDNA'sı içeren pRS vektör (Origene HuSH-29 shRNA vector TR310307) omurgası ile ekotropik retrovirüs zar proteinlerini kodlayan plazmitin (pCL-Eco; Addgene plazmid 12371) HEK293T-Phoenix-Eco retroviral paket hücre hattına transfeksiyonu ile retrovirüsler üretildi. Viral süpernatantlar polybrene (hexadimethrine bromide; 8 μ g/ml) ile karıştırıldıktan sonra hedef hücreler (HCT116-VA ve HCT116-V1) ile 37 °C de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler, Pol γ cDNA'sı taşıyan pRS-plazmitinin seçici antibiyotiği puromisin (1 μ g/ml) (Sigma Aldrich, USA) içeren ortamda 2 hafta büyütüldü. Hücre kültür ortamına 0,5 mM Sodyumpiruvat (Life Tech, USA) ve 0,2 mM üridin (Sigma Alrich, USA) eklendi. shRNA plazmiti ile transfekte olmayan hücreler puromisin antibiyotiğinin seleksiyon ortamında öldü. Her iki hücre tipinden hücre kolonileri belirlendi ve Pol γ protein miktarları Western blot yöntemi ile analiz edildi.

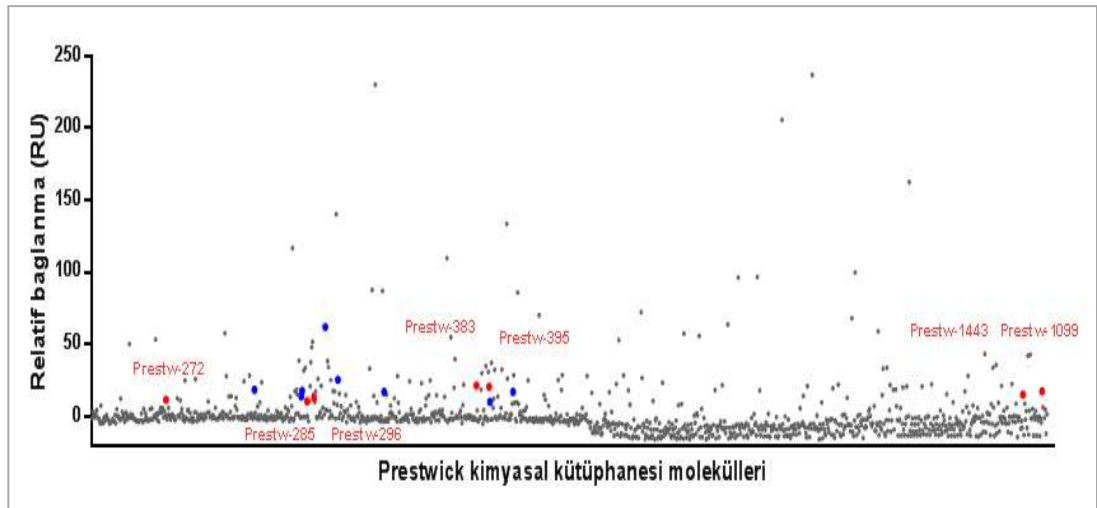
3.5.3. Pol γ shRNA pRS plazmitlerinin HeLa hücresine geçici transfeksiyonu ile Pol γ geninin sessizleştirilmesi

Pol γ geninin katalitik alt-parçasına karşı shRNA ifade eden TR310307C (Origene) ve kontrol plazmit (katalog no: TR30012) FuGENE® 6 Transfeksiyon reaktifi (Promega, USA) kullanılarak kullanılarak HeLa hücresine transfekte edildi. FuGENE® 6 Transfeksiyon reaktifinin kullanım klavuzu takip edildi (Promega, USA). Plazmid DNA 3:1 oranında kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Yüzey plazmon rezonans yöntemi ile DNA polimeraz γ proteinine bağlanan Prestwick kimyasal kütüphanesi® moleküllerinin belirlenmesi

Prestwick kimyasal kütüphanesinde® Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration; FDA), Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı (the European Medicines Agency; EMA) ve diğer sağlık merkezleri tarafından %100 onaylanan ve ilaç olma olasılığı (drug-likeness) yüksek 1200 küçük molekül bulunmaktadır. Yüksek kimyasal ve farmakolojik çeşitliliğinin yanı sıra insanlarda bilinen biyoyararlılığı ve güvenilirliği açısından aktif bileşikler içerdiği için bu kütüphane, bu araştırma için özel olarak seçilmiştir. Prestwick kimyasal kütüphanesinde® bulunan 1200 küçük molekül SPR analizi ile taranmış ve Pol γ proteinine spesifik olarak doğrudan bağlanan 15 molekül tespit edilmiştir (Şekil 4; mavi ve kırmızı noktalar). SPR verileri "Biacore 4000 software" (v.1.0) kullanılarak analiz edilmiştir. SPR analizinde ilk taramada Pol γ proteinine bağlanan 135 molekül belirlenmiş ancak bu moleküllerden RNA helikaz A'ya (negatif kontrol proteini) bağlanan moleküller nonspesifik olarak kabul edilmiştir. Sonuç olarak, Prestwick kimyasal

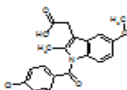
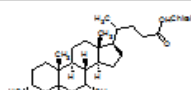
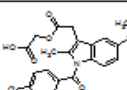
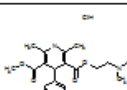
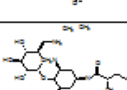
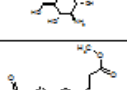
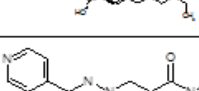


Şekil 4. Yüzey plazmon rezonans yöntemi ile Prestwick kimyasal kütüphanesinde® bulunan 1200 molekülün Pol γ ile bağlanma analizi. Gri noktalar Pol γ proteinine spesifik olarak bağlanmayan molekülleri, kırmızı ve mavi noktalar proteine spesifik

kütüphanesinde® bulunan 1200 molekülden Pol γ 'ya bağlanıp RNA helikaz A proteinine bağlanmayan 15 molekül gerçek bağlanma olarak kabul edilmiştir (Şekil 4). Dolayısıyla, SPR analizinde her yüksek bağlanma gösteren (yüksek RU değeri) molekül Pol γ 'ya spesifik olarak bağlanan molekül olarak kabul edilmemiştir.

Bu çalışmada, SPR analizi ile Pol γ 'ya bağlandığı belirlenen 15 molekül arasından 7 molekül fonksiyonel deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 4'de kırmızı renkli noktalar). Fonksiyonel analiz için seçilen 7 molekülün kimyasal yapısı, molekül ağırlığı ve SPR bağlanma analiz sonuçları: relatif bağlanma (RU) ve yüzde Rmaksimum (Rmax%) değerleri Tablo 1'de sunulmuştur. Proteine bağlanan ilacın, beklenen maksimum bağlanma sinyalinin yüzde kaç kadar bağlandığı, Rmax% ile ifade edilmektedir.

Tablo 2. SPR analizi ile Pol γ 'ya bağlandığı belirlenen 7 Prestwick kimyasal kütüphanesi® molekülünün kimyasal özellikleri ve SPR sonuçları.

Prestwick kimyasal kütüphanesi molekül sıra no/plate no	Molekül Ağırlığı (Da)	Molekülün Yapısı	Relatif Bağlanma (RU)	Rmax%
Prestw-272 (04D03)	357.80		11.68359	89
Prestw-285 (04E06)	392.58		10.52051	71
Prestw-296 (04F07)	415.83		13.0127	85
Prestw-383 (05G04)	516.00		21.57227	113
Prestw-395 (05H06)	621.64		20.72363	91
Prestw-1443 (14F04)	382.55		15.13281	107
Prestw-1099 (14F10)	298.35		17.48828	159

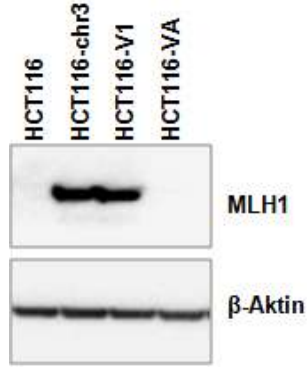
4.2. HCT116 kolon kanser hücre hatlarının test edilmesi

HCT116 ve HCT116-VA (boş vektör transfekte edilmiş HCT116 hücresi) hücreleri MLH1 geninde homozigot anlamsız (nonsense) mutasyon (c.755C>A) taşır. Bu mutasyonun amino asite yansıması, S252, dur (stop) kodonu meydana getirdiği için HCT116 ve HCT116-VA hücrelerinde MLH1 proteini üretilmez. Bu nedenle, HCT116 ve HCT116-VA hücrelerinde MLH1 proteininin görev aldığı yanlış eşleşme DNA tamir mekanizması hasarlıdır. MLH1 geni üçüncü kromozomda bulunur. HCT116-chr3 hücresi üçüncü kromozom; HCT116-V1 hücresi ise vektör içerisinde MLH1 geni transfekte edilerek normal MLH1 geni eklenmiş hücrelerdir. Bu nedenle, HCT116-chr3 ve HCT116-V1 hücrelerinde yanlış eşleşme DNA tamir mekanizması normal fonksiyon gösterir. Bu çalışmada, bu hücreler kontrol hücresi olarak kullanılmıştır.

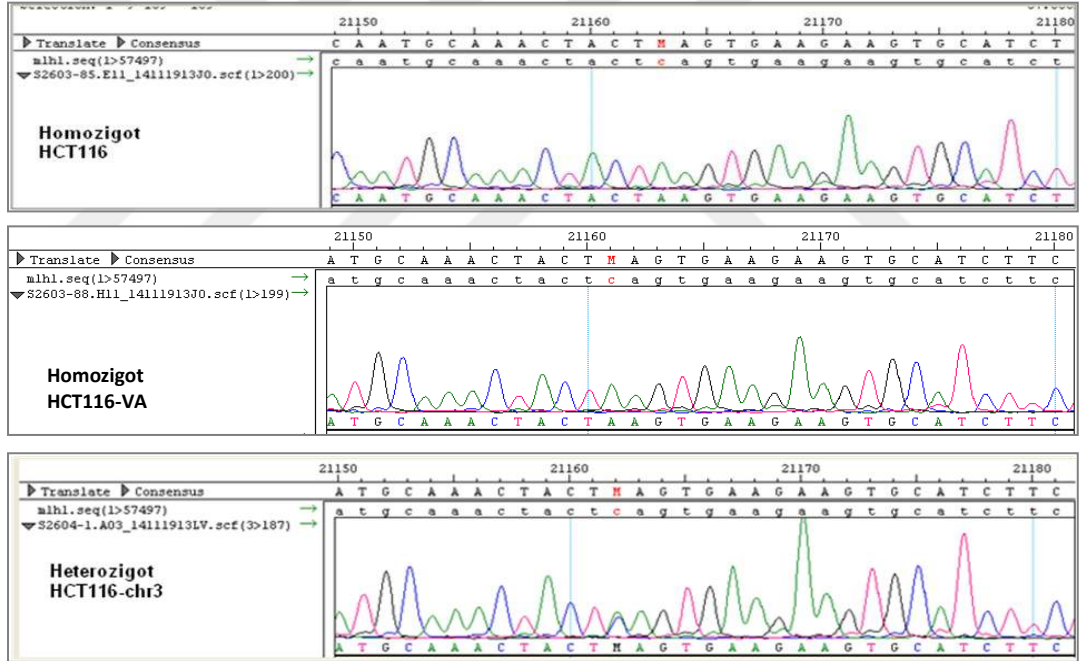
Bu çalışmada kullanılacak hücre hatları ile araştırmaya başlamadan önce farklı özellikteki HCT116 hücrelerinin MLH1 geni ve proteini içerip içermediği western blot ve sekans analizleri ile test edilmiştir (Şekil 5A ve B). HCT116 hücrelerinin western blot analizi için total hücre ekstraktı hazırlanarak total protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Eşit miktarda total protein yüklenerek gerçekleştirilen western blot analizi sonucunda, HCT116 ve HCT116-VA hücrelerinde MLH1 proteini bulunmadığı HCT116-chr3 ve HCT116-V1 hücrelerinde ise MLH1 proteini bulunduğu görülmüştür (Şekil 5A). β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

MLH1 geninin sanger yöntemi ile sekans analizi Acıbadem Genetik Tanı Merkezinde (LabGen) yapılmıştır. HCT116, HCT116-VA ve HCT116-chr3 hücrelerinde MLH1 geninin sekans analizi HCT116 ve HCT116-VA hücrelerinin homozigot c.755C>A mutasyonunu taşıdığını, HCT116-chr3 hücresinin ise heterozigot olduğunu göstermiştir (Şekil 5B). Çapraz hücre kontaminasyonu olmadığı ve doğru MLH1 geni mutasyonu ve proteini taşıdığı tespit edilen bu hücrelerden HCT116-VA ve HCT116-V1 hücreleri, bu çalışmada hem Pol γ geninin sessizleştirilmesi hem de sitotoksite deneylerinde kullanılmıştır.

A)



B)



Şekil 5. A) HCT116, HCT116-chr3, HCT116-V1 ve HCT116-VA hücrelerindeki MLH1 (85 kDa) ve β -aktin (42 kDa) protein miktarlarının western blot analizi. B) HCT116, HCT116-VA ve HCT116-chr3 hücrelerinde MLH1 geninin sekans analizi. MLH1 geninde homozigot anlamsız (nonsense) mutasyon (c.755C>A).

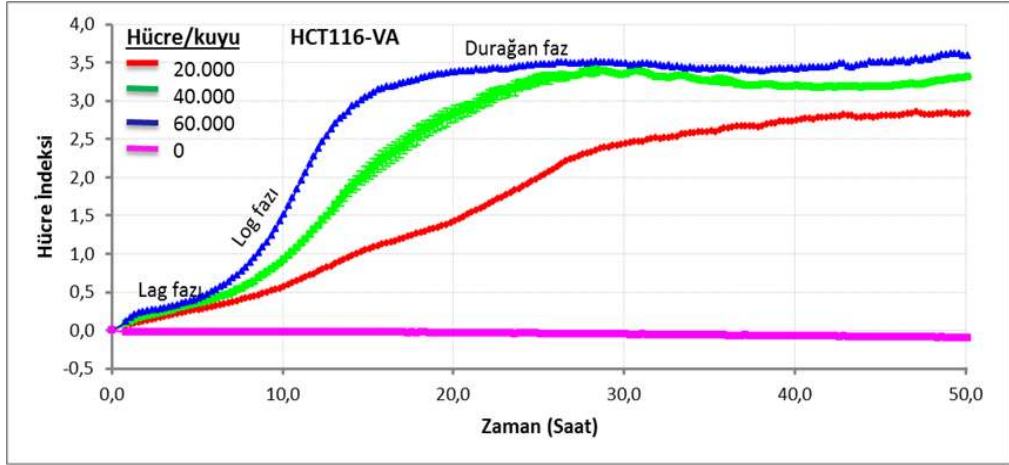
4.3. DNA polimeraz γ 'ya bağlanan moleküllerin HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence RTCA-DP) kullanılarak belirlenmesi

4.3.1. Sitotoksikite deneyleri için en uygun hücre sayısının ve ilaç uygulama zamanının belirlenmesi

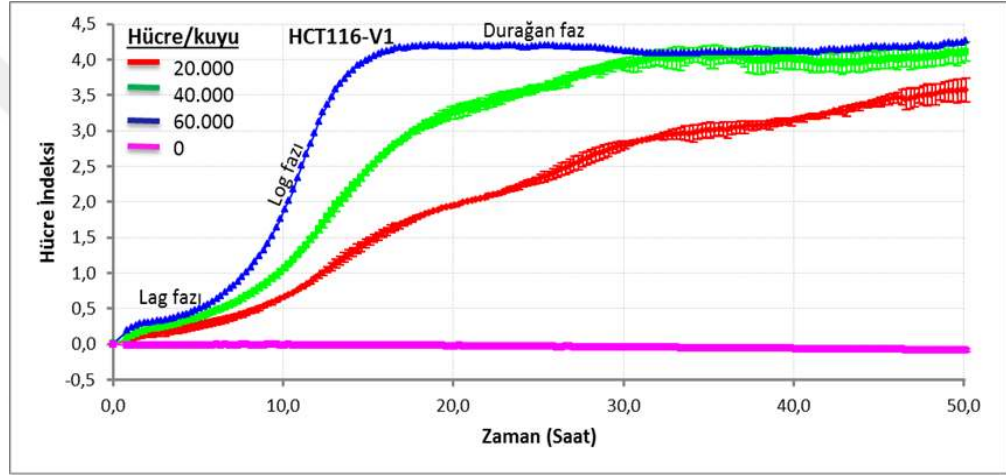
Hücre sitotoksikite ve/veya proliferasyon deneylerinde hatalı pozitif ya da hatalı negatif sonuçlardan kaçınmak için her hücre çeşidi için en uygun (optimum) hücre dansitesini ve logaritmik büyüme zamanını belirlemek ve seçmek çok önemlidir. HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücrelerinin proliferasyon profilini belirlemek amacıyla farklı sayıda hücreler xCELLigence sistemine özgü 16 kuyulu hücre kültürü tabakalarına (E-plate) ekildi. HCT116 hücrelerinin büyümesi 50 saat, HeLa hücrelerinin büyümesi ise 100 saat boyunca, 30 dakikalık aralıklarla ölçüm alınarak takip edildi (Şekil 6). Şekil 6'da sunulduğu gibi HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücreleri hücre sayısına, büyüme hızına, hücre morfolojisine ve E-plate'nin zeminine bağlanma derecesine bağlı olarak farklı proliferasyon profili göstermiştir. xCELLigence sisteminde, hücre proliferasyonundaki bu değişiklik hücre indeks değerindeki değişiklik (Şekil 6, y-ekseni) olarak ifade edilir. Örneğin, HCT116-VA hücresi 60000 hücre sayısında maksimum hücre indeks (CI_{max}) değeri 3.38'e, 20 saatte ulaşırken 20000 hücre sayısında 40 saatte maksimum hücre indeks değerine (CI_{max} : 2.73) ulaşmıştır (Şekil 6). Sadece hücre kültür medyumunu eklenen negatif kontrol kuyularında hücre indeks değerinin sıfır olması bu kuyularda proliferasyon olmadığını, dolayısıyla hücre kültür medyumunun hücre ile kontamine olmadığını göstermiştir (Şekil 6A ve B, pembe düz çizgi; Şekil 6C, yeşil düz çizgi).

Hücrelerin proliferasyon grafiği; HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinin 40000 ve 60000 hücre/kuyu hücre dansitesinde, HeLa hücrelerinin 20000 ve 40000 hücre/kuyu hücre dansitesinde proliferasyon fazının (log fazı) kısa olduğunu ve hücrelerin hızlı bir şekilde durağan faza ulaştığını yani hücre indeksinin sabit kalıp bir süre sonra düşmeye başladığını göstermiştir (Şekil 6). Örneğin, 60000 hücre/kuyu dansitesinde HCT116-VA ve HCT116-V1 hücre proliferasyonları yaklaşık 15. saatte yavaşlayarak durağan faza girmiştir. Bu dansitede hücreler yaklaşık 10 saat büyüme fazında (log fazı) kaldıkları için hücre sitotoksikite deneylerinde ilacın uzun süreli

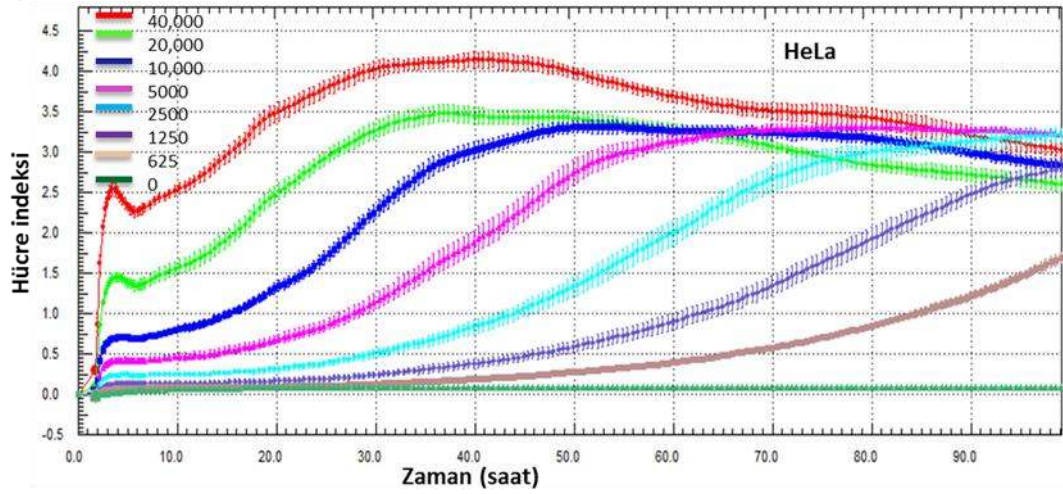
A)



B)

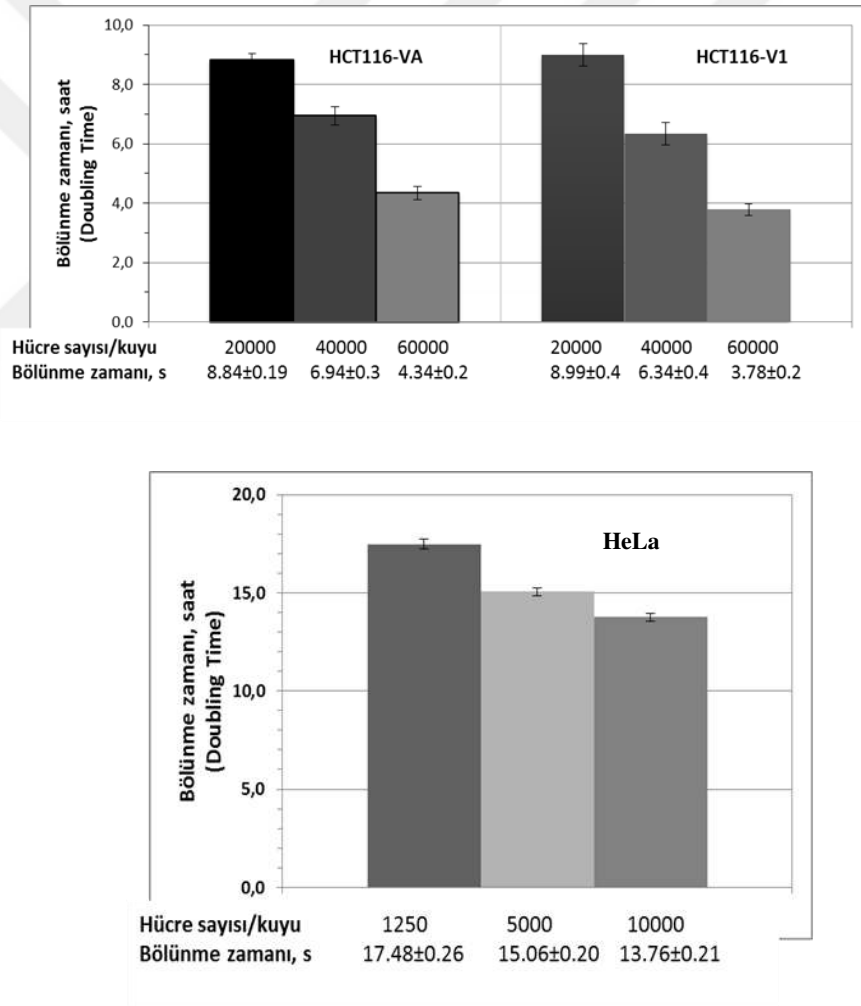


C)



Şekil 6. Farklı hücre sayısındaki A) HCT116-VA B) HCT116-V1 C) HeLa hücrelerinin gerçek zamanlı proliferasyon grafiği. Her bir data 3'lü çalışıldı.

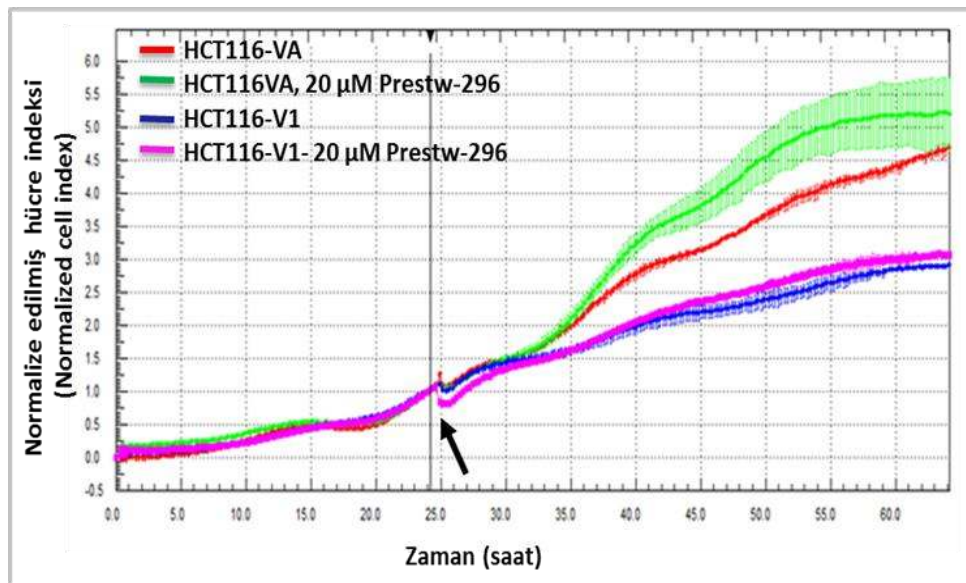
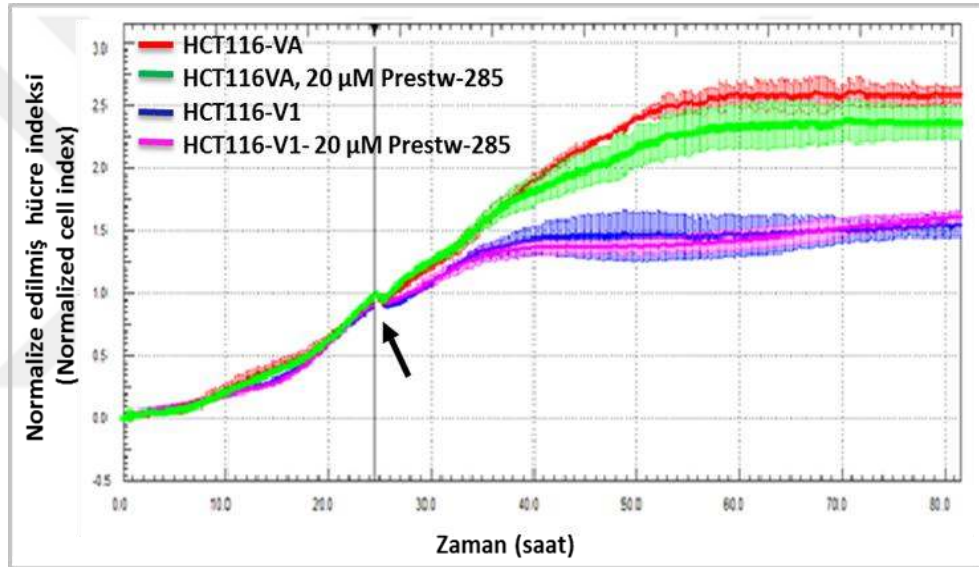
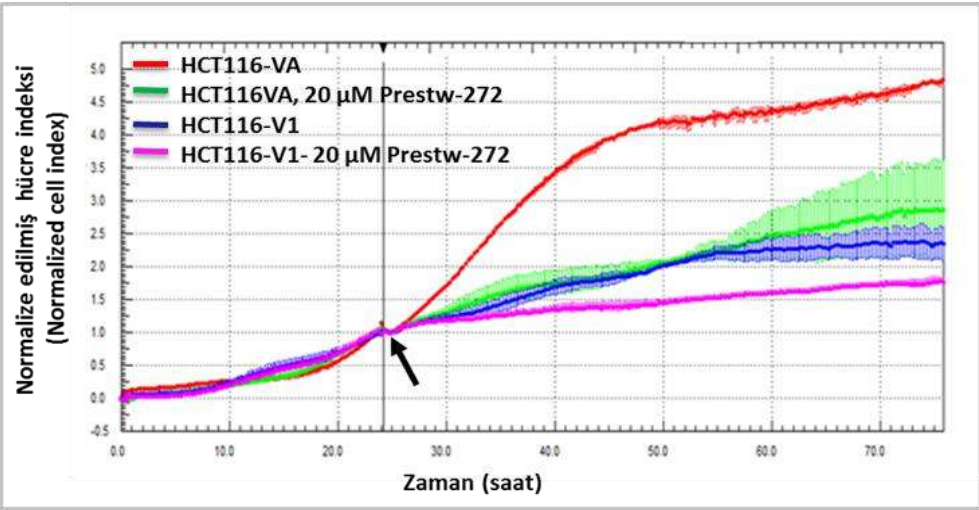
takibi için uygun bulunmamıştır. HCT116-VA ve HCT116-V1 hücreleri 20000 hücre/kuyu dansitesinde; HeLa hücresi ise 10000 hücre/kuyu hücre dansitesinde yaklaşık 6 saat lag fazında ve yaklaşık 40 saat büyüme fazında (log fazı) kaldığı için sitotoksosite deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 6). HeLa hücresi 2500 hücre/kuyu ve daha düşük hücre dansitesinde çok uzun süre, yaklaşık 25 saat, lag fazında kaldığı için bu hücre dansiteleri sitotoksosite deneyleri için uygun değildir. HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücrelerinin proliferasyon profili (Şekil 7) kullanılarak hücrelerin bölünme zamanı (doubling time) belirlenmiştir. Hücrelerin bölünme zamanı xCELLigence sisteminin yazılım programı kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 7).

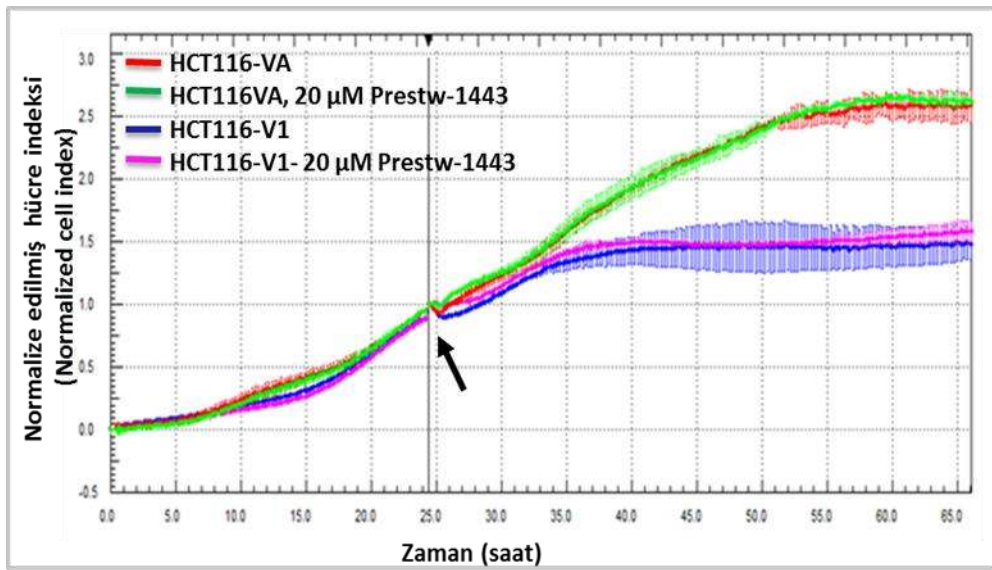
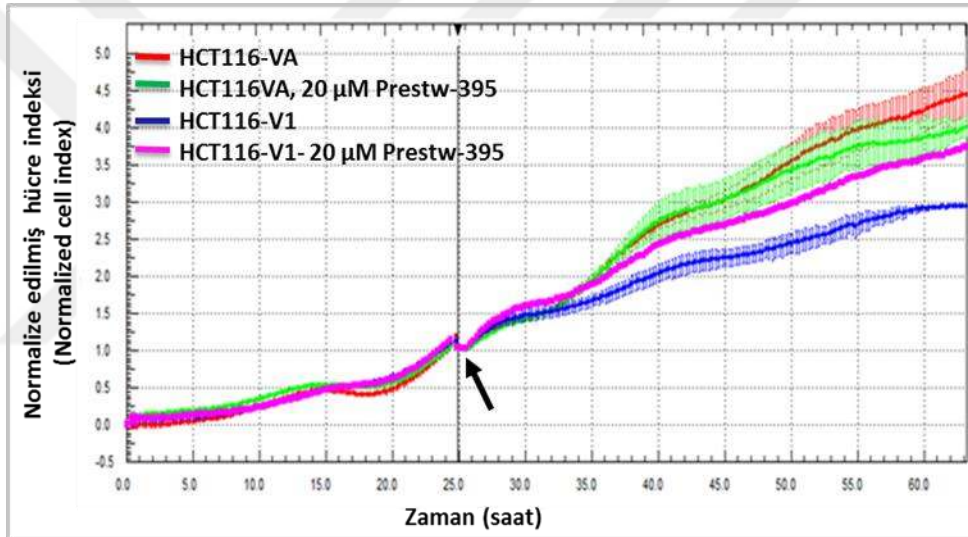
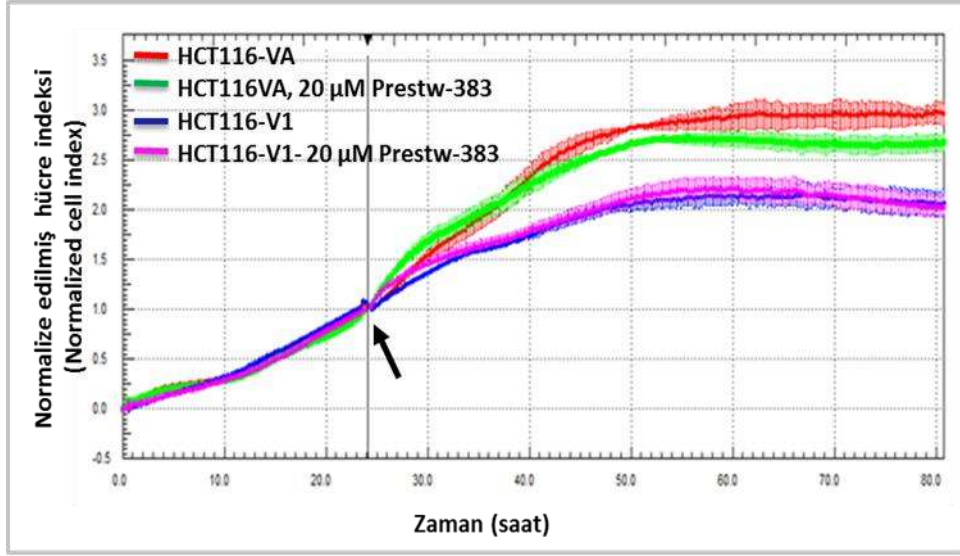


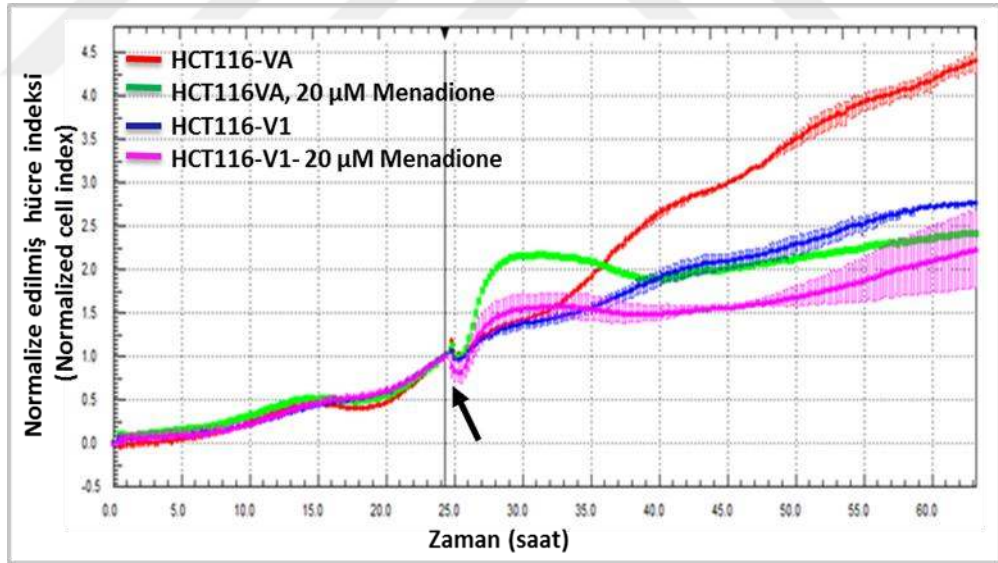
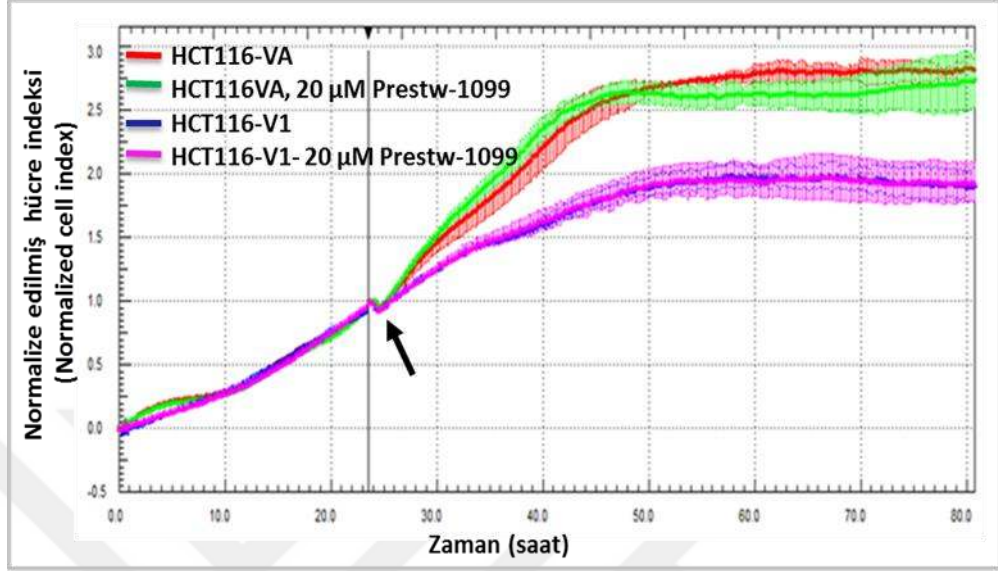
Şekil 7. HCT116-VA, HCT116-V1 ve HeLa hücrelerinin bölünme zamanı (iki katına çıkma zamanı; doubling time).

4.3.2. Sitotoksisite deneyleri

Hücre sitotoksisite deneylerindeki amaç SPR analizi ile Pol γ 'ya bağlandığı belirlenen moleküllerden, MLH1 genindeki mutasyonun neden olduğu polipsiz kolon kanseri hücresi, HCT116-VA'yı (yanlış eşleşme tamir mekanizması hasarlı) seçici olarak öldüren ancak MLH1 proteini bulunan HCT116-V1 (yanlış eşleşme tamir mekanizması fonksiyonel) hücresinde ise daha az sitotoksisite gösteren bir molekül tespit etmektir. Bu amaçla, ilk etapta Pol γ 'ya bağlanan 7 molekülün 20 μ M'lık tek bir konsantrasyonunun HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi değerlendirildi (Şekil 8). Hücrede farklı mekanizmaları etkilemesinin yanı sıra Pol γ inhibitörü olarak da kullanılan menadione ise pozitif kontrol olarak bu sitotoksisite deneylerinde kullanıldı (Şekil 8). Seçilen 20 μ M molekül konsantrasyonunda Prestw-272'nin HCT116-VA hücrelerine HCT116-V1 hücrelerinden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği (Şekil 8); molekül Prestw-285, -296, -383, -395, -1443 ve -1099'un ise her iki hücreye sitotoksik etkisinin benzer olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8). Pozitif kontrol inhibitörü olarak kullanılan menadione'un HCT116-VA hücrelerine sitotoksik etkisi HCT116-V1 hücrelerinden daha fazladır (Şekil 8).

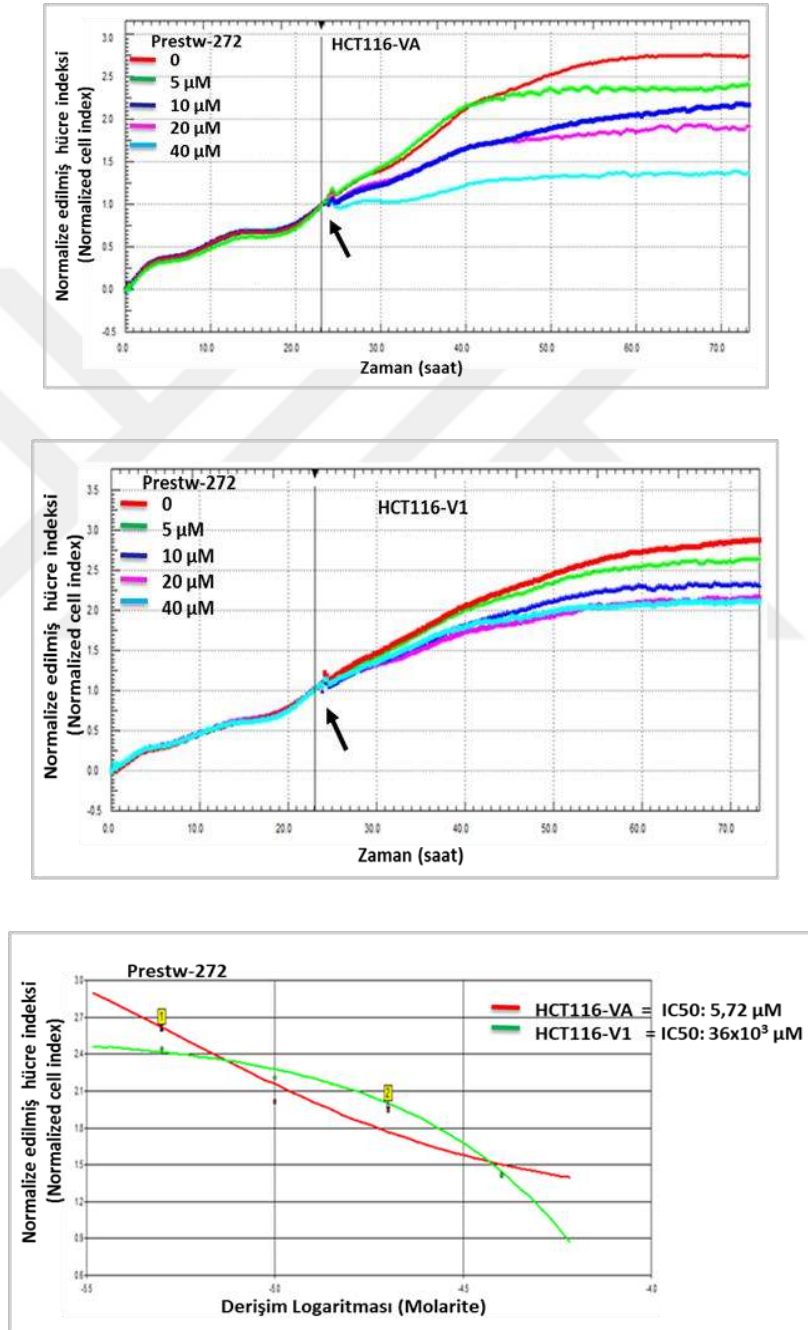






Şekil 8. *Pol γ*'ya bağlanan Prestwick kimyasal kütüphanesi® moleküllerinin ve Menadione'un 20 µM konsantrasyonunda HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi. Siyah ok: molekül ekleme zamanını gösterir.

Şekil 8'de ilk grafikte sunulduğu gibi HCT116-VA hücrelerine HCT116-V1 hücrelerinden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği tespit edilen molekül Prestw-272'nin bu hücrelerin proliferasyonuna etkisi molekülün farklı konsantrasyonları kullanılarak izlendi ve doza bağlı IC₅₀ değerleri belirlendi (Şekil 9). IC₅₀ değeri xCELLigence cihazının yazılımı kullanılarak hesaplandı.

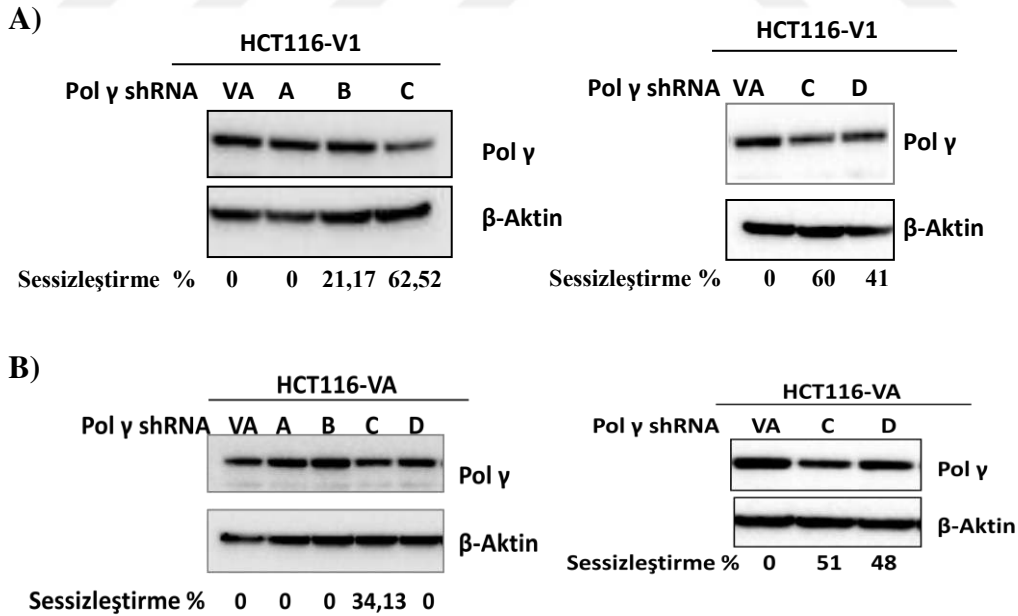


Şekil 9. Prestw-272 molekülünün HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi ve IC₅₀ değeri. Siyah ok: Hücreye molekül ekleme zamanı.

4.3.3. Prestw-272 molekülünün Pol γ geni sessizleştirilmiş HCT116 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi

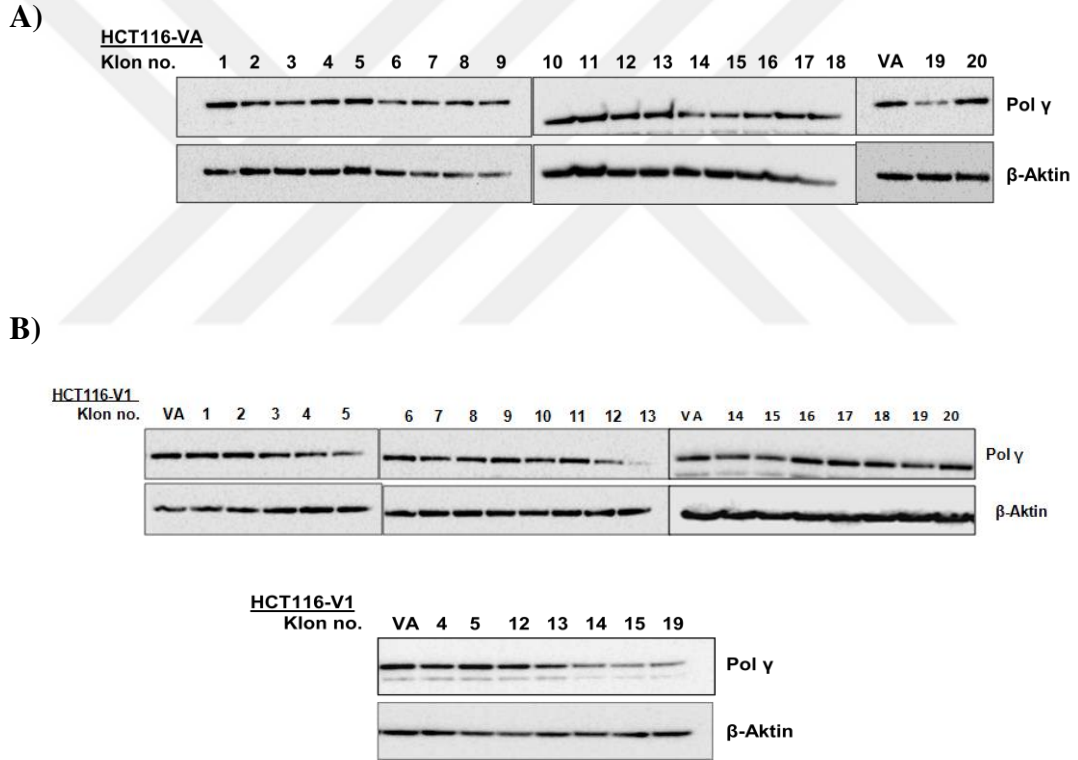
4.3.3.1. HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinde Pol γ geninin shRNA ile sessizleştirilmesi

Yöntem 3.4 bölümünde açıklandığı üzere Pol γ shRNA pRS plazmiti ve kontrol pRS plazmiti origene'den temin edildi. Pol γ için 4 farklı shRNA (A, B, C, D) pRS plazmiti ve bir kontrol pRS plazmiti (sadece pRS vektörü, VA) HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerine retrovirüs ile transfekte edildi. Seçici puromisin antibiyotiği içinde büyütülen hücrelerden hücre ekstraktı hazırlanarak Pol γ proteininin miktarları western blot ile analiz edildi. β -aktin proteini yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Pol γ genini sessizleştirmek için kullanılan shRNA A, B, C ve D lerden shRNA C'nin hem HCT116-V1 hücrelerinde (Şekil 10A) hem de HCT116-VA hücrelerinde (Şekil 10B) Pol γ geninin baskılanmasında daha etkin olduğu belirlendi. HCT116-V1 hücresinde shRNA C'nin polimeraz geninin ekspresyonunu % 60-62,5 baskıladığı, HCT116-VA hücrelerinde ise %51 baskıladığı tespit edildi (Şekil 10A ve B).



Şekil 10. A) Pol γ shRNA A, B, C ve D pRS plazmiti ve kontrol plazmiti, VA ile transfekte edilmiş HCT116-V1 hücresinin western blot analizi. B) Pol γ shRNA A, B, C ve D pRS plazmiti ve kontrol plazmiti; ve VA ile transfekte edilmiş HCT116 hücresinin western blot analizi.

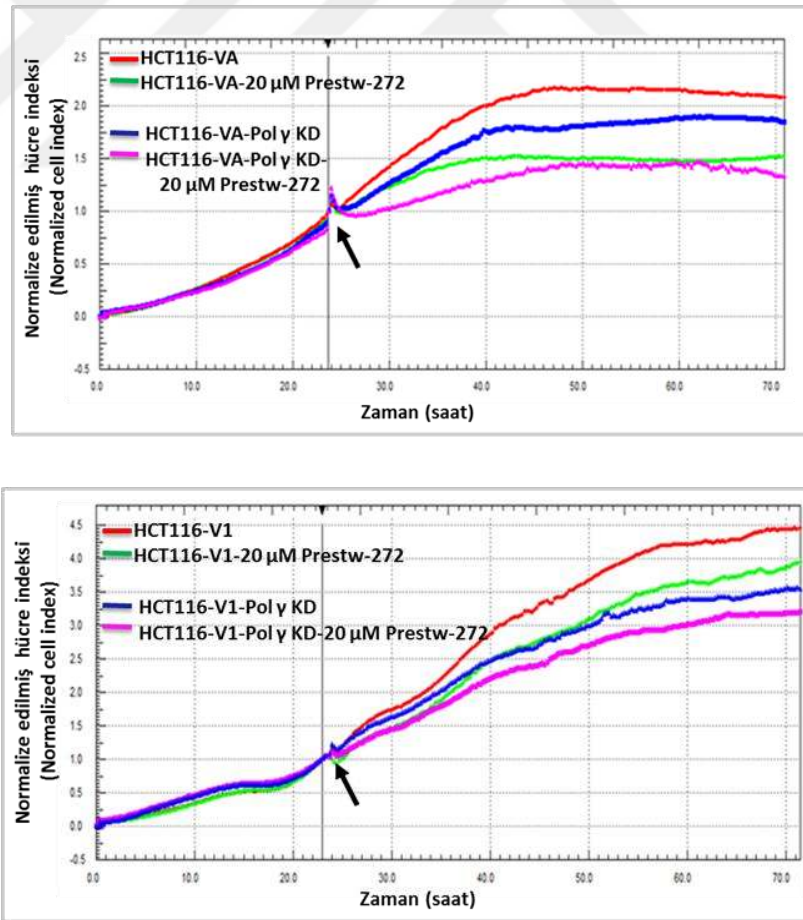
Pol γ 'yı en fazla baskılayan shRNA C (Şekil 10) pRS plazmidi kullanılarak transfekte edilen HCT116-V1 ve HCT116-VA hücrelerinden klonal seleksiyon yapıldı. Böylece Pol γ geninin en iyi baskılandığı tek bir hücre klonu belirlendi. Klonal seleksiyon için her bir hücre tipinden 20 hücre klonu seçildi, büyütüldü, ve hücre ekstraktı hazırlanarak western blot analizi ile Pol γ protein miktarları tespit edildi (Şekil 11A ve B). Hem HCT116-VA (Şekil 11A) hem de HCT116-V1 (Şekil 11B) hücrelerinde hücre klon no 19 ile Pol γ proteininin baskılanması yaklaşık %90 (Şekil 11A ve B) olduğu için hücresel deneylerde klon 19 ile transfekte edilen hücreler kullanıldı.



Şekil 11. A) *Pol γ* shRNA C pRS plazmiti ile transfekte edilmiş HCT116-VA hücrelerinden seçilen 20 hücre klonunun western blot analizi. B) *Pol γ* shRNA C pRS plazmiti ile transfekte edilmiş HCT116-V1 hücrelerinden seçilen 20 hücre klonunun western blot analizi.

4.3.3.2. Molekül Prestw-272'nin HCT116-VA-Pol γ KD ve HCT116-V1-Pol γ KD hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi

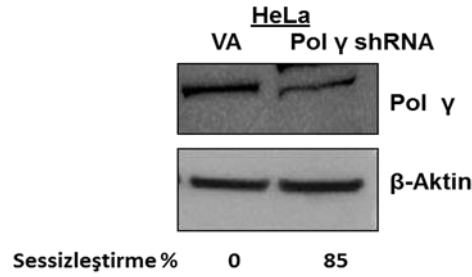
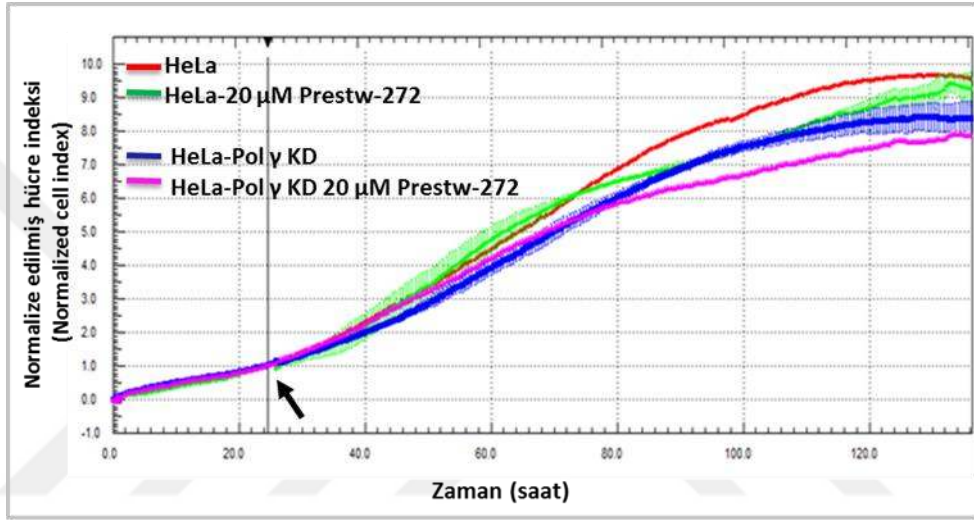
MLH1 geninde mutasyon nedeniyle MMR mekanizması hasarlı olan HCT116-VA hücresinde Pol γ geni sessizleştirilerek mitokondriyel BER mekanizması da hasarlı hale getirildi. HCT116-V1 hücresinde ise MMR mekanizması fonksiyon gösterirken Pol γ geninin sessizleştirilmesi ile mitokondriyel BER mekanizması hasarlı hale getirildi. HCT116-VA hücresinde daha fazla sitotoksik etki gösteren Prestw-272 molekülünün 20 μ M konsantrasyonunda HCT116-VA, HCT116-VA- Pol γ KD, HCT116-V1 ve HCT116-V1- Pol γ KD hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırıldı (Şekil 12). Prestw-272 molekülü Pol γ 'nın sessizleştirildiği HCT116-VA Pol γ KD ve HCT116-V1 Pol γ KD hücrelerinin hücre canlılığını çok az etkilemiş ama Pol γ 'nın bulunduğu HCT116-VA ve HCT116-V1 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Molekül Prestw-272'nin HCT116-VA-Pol γ KD ve HCT116-V1-Pol γ KD hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi. Siyah ok: Molekülün hücrelere uygulama zamanı.

4.4. Prestw-272 molekülünün HeLa hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi

Prestw-272 molekülünün 20 μ M konsantrasyonunda HeLa hücresinin proliferasyonu üzerine etkisi gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile 130 saat takip edildi (Şekil 13, yeşil çizgi). Molekül eklenmemiş HeLa hücresi (Şekil 13, kırmızı çizgi) ile karşılaştırıldığında bu molekülün bu konsantrasyonda sitotoksik etkisinin az olduğu görüldü. 20 μ M Prestw-272 molekülünün *Pol γ* geni sessizleştirilmiş HeLa hücresinin proliferasyonuna ise etki etmediği gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 13. Molekül Prestw-272'nin HeLa ve HeLa-*Pol γ* KD hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi. Siyah ok: Molekülün hücrelere uygulama zamanı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde kanser önemli sağlık sorunlarından biridir. Dünya sağlık örgütünün 2012 yılı verilerine göre kanser 8.2 milyon insanın ölümüne neden olmuştur (28). Kanser tedavisinde genellikle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri kullanılır. Son yıllarda bu tedavilere ek olarak hormon ve biyolojik tedavi yöntemleri gibi yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde kullanılan bu tedavi yöntemlerinin dezavantajı ise sağlıklı hücrelere de zarar verebilmesidir (29). Bu nedenle, kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyen ilaçların araştırılması kanser hastalığının tedavisinde önem kazanmıştır. Sağlıklı hücreye zarar vermeden kanser hücresinin seçici olarak hedefleyen moleküllerin belirlenmesi için bu çalışmada, mitokondriyel BER yolağında görev alan Pol γ ile MMR mekanizmasında görev alan MLH1 arasındaki sentetik letal ilişki kullanılmıştır.

Bu çalışmada, insanlarda biyogüvenirliliği ve biyoyararlılığı bilinen, ilaç olma-olasılığı yüksek 1200 molekül içeren Prestwick kimyasal kütüphanesi® molekülleri SPR analizi ile taranmış ve Pol γ proteinine doğrudan bağlanan 15 yeni molekül tespit edilmiştir. Prestwick kimyasal kütüphanesi® molekülleri ilk kez bu çalışma ile Pol γ proteinine doğrudan bağlanma özelliği için taranmıştır. Pol γ proteinine doğrudan bağlandığı tespit edilen 15 yeni molekül arasından seçilen 7 molekül sitotoksikite deneylerinde kullanılmıştır (Tablo 2). Literatürde antikanser etkisi belirlenmiş Pol γ inhibitörleri ile ilgili çok sınırlı düzeyde çalışma bulunmaktadır (22-24). Seçici olarak sadece Pol γ 'nın inhibisyonunu hedefleyen bir molekül henüz tanımlanmamıştır. Bugüne kadar belirlenen Pol γ inhibitörleri (örneğin, vitamin K3 ve HIV'e karşı kullanılan nükleozid analogu ters transkriptaz inhibitörleri) Pol γ 'nın aktivitesini inhibe etmenin yanı sıra hücrede birçok farklı mekanizmalar üzerinde de etkilerini göstermiştir. Dolayısıyla, bu moleküllerin kanser tedavisinde terapötik seçici bir ilaç olarak kullanılması efektif bir sonuç vermemiştir. Hücresel veya mitokondriyel fonksiyonlar kanser hücresinin yanı sıra normal hücrenin canlılığı için de gerekli olduğundan selektif olarak hedeflenmeyen protein inhibitörlerinin kullanılması sağlıklı hücrelerin ölümüne de yol açmıştır (22-25). Daha önce belirlenmiş Pol γ inhibitörleri için sentetik letal yaklaşım ile seçici olarak kanser hücresini öldürmek mümkün değildir.

Pol γ proteinine bağlandığı belirlenen moleküllerin (Şekil 4), Pol γ proteininin sentez, dRP liyaz, zinciri kaydırma (strand displacement) ve mitokondriyel BER aktivitesi üzerine etkisi araştırılmaktadır. Bu çalışmada, bu moleküllerin, *MLH1* genindeki mutasyon sonucu oluşan polipsiz kalıtsal kolon kanser hücreleri (HCT116) ile MLH1 proteinine sahip benzer hücreler (HCT116-V1) üzerindeki sitotoksik etkisi karşılaştırılmıştır. Burada amaç, MLH1 proteini bulunmayan HCT116 kolon kanser hücrelerini hedeflemektir. Dolayısıyla, HCT116 hücrelerine, MLH1 proteini bulunan eşdeğer hücreye (HCT116-V1) kıyasla, çok daha fazla sitotoksosite gösteren molekülü tespit etmektir.

İlaçların hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkilerini tespit etmek için çeşitli sitotoksosite yöntemleri mevcuttur. Tetrazolyum tuzlarına dayalı kolorimetrik yöntemler (MTT) gibi genelde yaygın olarak kullanılan uç-nokta (end-point) yöntemlerinin çeşitli dezavantajları vardır. Örneğin, hücrenin düşük glukoz konsantrasyonu, indirgenmiş piridin nükleotidleri, asidik pH'sı, ve artan süperoksit oluşumu gibi çeşitli şartlara bağlı olarak hatalı pozitif ya da hatalı negatif sonuç ortaya çıkar. Bu nedenle bu çalışmada, moleküllerin hücre üzerine sitotoksik etkisi gerçek-zamanlı olarak analiz edilmiş, ve her hücre çeşidi için en uygun hücre dansitesi, logaritmik büyüme zamanı ve ilaç (molekül) uygulama zamanı belirlenmiştir. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile HCT116 ve HeLa hücrelerinin proliferasyon kinetiğindeki fark tespit edilmiştir. HCT116-VA ve HCT116-V1 hücreleri 20 000 hücre/kuyu, HeLa hücresi ise 10 000 hücre/kuyu dansitesinde sitotoksosite deneyleri için uygun bulunmuştur.

Sitotoksosite taramasında, Pol γ 'ya doğrudan bağlanan 7 molekül (20 μ M konsantrasyonda) arasından Prestw-272 molekülünün HCT116-VA hücrelerine HCT116-V1 hücrelerine kıyasla daha fazla sitotoksosite gösterdiği tespit edildi. Diğer 6 molekülün ise her iki hücre proliferasyonuna benzer etki gösterdiği tespit edildi. Prestw-272 molekülü uygulandıktan sonraki 48.saatteki HCT116-VA hücresi için IC_{50} değeri 5,72 μ M, HCT116-V1 hücresi için IC_{50} değeri 36×10^3 μ M olarak hesaplandı. Sonuç olarak, Prestw-272 molekülü *MLH1*-genindeki mutasyonun neden olduğu kolon kanser hücresi HCT116-VA'ya MLH1 proteininin aktif olduğu HCT116-V1 hücresinden yaklaşık 1000-kat daha az bir dozda toksik etkisini

göstermiştir. Prestw-272 molekülünün farklı bir hücre hattı, HeLa hücresine sitotoksik etkisi HCT116-V1 hücresine gösterdiği sitotoksikite profiline bezerdir. Dolayısıyla, Prestw-272 molekülünün MLH1 proteini bulunan hücrelerin proliferasyonuna etkisinin çok az olduğu gözlenmiştir.

Prestw-272 molekülünün HCT116-VA hücresindeki sitotoksik etkisinin Pol γ üzerinden olup olmadığını anlamak amacıyla *MLH1* geninde mutasyon nedeniyle MMR mekanizması hasarlı olan HCT116-VA hücresinde *Pol* γ geni sessizleştirilerek mitokondriyel BER mekanizması da hasarlı hale getirildi. HCT116-V1 hücresinde ise MMR mekanizması fonksiyon gösterirken *Pol* γ geninin sessizleştirilmesi ile mitokondriyel BER mekanizması hasarlı hale getirildi. Prestw-272 molekülü Pol γ 'nın sessizleştirildiği HCT116-VA Pol γ KD hücresinde hücre canlılığını etkilemediği ama Pol γ 'nın bulunduğu HCT116-VA hücresinde hücre proliferasyonunu etkilemesi, bu inhibitörün etkisinin Pol γ 'nın hücre fonksiyonu üzerinden olduğunu göstermiştir. Molekülün bu etkisi *Pol* γ geni sessizleştirilen HeLa ve HCT116-V1 hücrelerinde görülmüştür.

Bu sonuçlar, Prestw-272 molekülünün sadece Pol γ 'ya bağlanarak düşük dozlarda MLH1 proteini ile Pol γ geni arasındaki sentetik letal ilişki nedeniyle HCT116-VA kolon kanseri hücresi üzerinde daha fazla sitotoksik etkisi olduğu göstermektedir. Bu çalışmanın gelecekte sağlıklı hücrelere zarar vermeden uygulanabilecek yeni kanser tedavileri açısından ilaç geliştirme çalışmalarına ışık tutabileceği düşünülmektedir.

6.KAYNAKLAR

1. Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R. A. 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8:193-204.
2. Sharma, R. A. and Dianov, G. L. 2007. Targeting base excision repair to improve cancer therapies. *Mol. Aspects Med.* 28:345-374.
3. Ding, J., Miao, Z. H., Meng, L. H., and Geng, M. Y. 2006. Emerging cancer therapeutic opportunities target DNA-repair systems. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:338-344.
4. Zhu, Y., Hu, J., Hu, Y., and Liu, W. 2009. Targeting DNA repair pathways: a novel approach to reduce cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat. Rev.* 35:590-596.
5. Guo, G. S., Zhang, F. M., Gao, R. J., Delsite, R., Feng, Z. H., and Powell, S. N. 2011. DNA repair and synthetic lethality. *Int. J. Oral Sci.* 3:176-179.
6. Madhusudan, S. and Hickson, I. D. 2005. DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *Trends Mol. Med.* 11:503-511.
7. Martin, S. A., Lord, C. J., and Ashworth, A. 2008. DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18:80-86.
8. Martin, S. A., McCabe, N., Mullarkey, M., Cummins, R., Burgess, D. J., Nakabeppu, Y., Oka, S., Kay, E., Lord, C. J., and Ashworth, A. 2010. DNA polymerases as potential therapeutic targets for cancers deficient in the DNA mismatch repair proteins MSH2 or MLH1. *Cancer Cell* 17:235-248
9. Kuiken, H. J., Beijersbergen, R. L. 2010 Exploration of synthetic lethal interactions as cancer drug targets. *Future Oncol.* 6(11):1789-1802.
10. Fong, P. C., Boss, D. S., Yap, T. A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., Mortimer, P., Swaisland, H., Lau, A., O'Connor, M. J., Ashworth, A., Carmichael, J., Kaye, S. B., Schellens, J. H., and de Bono, J. S. 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* 361:123-134.

11. Shaheen, M., Allen, C., Nickoloff, J. A., Hromas R. 2011. Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood* 117(23):6074-6082.
12. Weidle, U. H., Maisel, D., Eick, D. 2011. Synthetic lethality-based targets for discovery of new cancer therapeutics. *Cancer Genomics Proteomics*. 8(4):159-171.
13. Liu, P. and Dimple, B. 2010. DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? *Environ. Mol. Mutagen*. 51:417-426.
14. de Souza-Pinto, N. C., Mason, P. A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevnsner, T. V., Rasmussen, L. J., and Bohr, V. A. 2009. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair (Amst)* 8:704-719.
15. de Souza-Pinto, N. C., Wilson, D. M., III, Stevnsner, T. V., and Bohr, V. A. 2008. Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration. *DNA Repair (Amst)* 7:1098-1109.
16. Conklin, K. A. 2004. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr. Cancer Ther*. 3:294-300.
17. Hegde, M. L., Hazra, T. K., and Mitra, S. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*. 18:27-47.
18. Li, G. M. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 18(1):85-98.
19. Yakubovskaya, E., et al., Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *J Biol Chem*, 2006. 281(1): p. 374-82
20. Lee, Y.S., W.D. Kennedy, and Y.W. Yin, Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations. *Cell*, 2009. 139(2): p. 312-24

21. Bailey, C.M. and K.S. Anderson, A mechanistic view of human mitochondrial DNA polymerase gamma: providing insight into drug toxicity and mitochondrial disease. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1804(5): p. 1213-22.
22. Sasaki R, Suzuki Y, Yonezawa Y, Ota Y, Okamoto Y, Demizu Y, Huang P, Yoshida H, Sugimura K, Mizushima Y. 2008. DNA polymerase gamma inhibition by vitamin K3 induces mitochondria-mediated cytotoxicity in human cancer cells. *Cancer Sci.* 99(5):1040-1048.
23. Wu Y, Li N, Zhang T, Wu H, Huang C, Chen D. 2009. Mitochondrial DNA base excision repair and mitochondrial DNA mutation in human hepatic HuH-7 cells exposed to stavudine. *Mutat Res.*, 664(1-2):28-38.
24. Lewis W, Levine ES, Griniuvienė B, Tankersley KO, Colacino JM, Sommadossi JP, Watanabe KA, Perrino FW. 1996. Fialuridine and its metabolites inhibit DNA polymerase gamma at sites of multiple adjacent analog incorporation, decrease mtDNA abundance, and cause mitochondrial structural defects in cultured hepatoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(8):3592-7.
25. Chen G, Wang F, Trachootham D, Huang P. 2010. Preferential killing of cancer cells with mitochondrial dysfunction by natural compounds. *Mitochondrion*, 10(6):614-25.
26. Osada S, Tomita H, Tanaka Y, Tokuyama Y, Tanaka H, Sakashita F, Takahashi T. The utility of vitamin K3 (menadione) against pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2008, 28(1A):45-50.
27. Uren A, Tcherkasskaya O, Toretsky JA. Recombinant EWS-FLI1 oncoprotein activates transcription. *Biochemistry.* 2004;43:13579–13589
28. World Cancer Report. Geneva: World Health Organization, 2014.
29. Farrell A. A close look at cancer . *Nat Med.* 2011, 17(3):262-265.
30. Ataergin, S., Özet, A., Arpacı, F. Kanser Tedavisinde Anjiyogenez İnhibitörlerinin Yeri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1999, 19(2):100-105

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İlgü Ece	Soyadı	Gülser
Doğum Yeri	Fatih/İSTANBUL	Doğum Tarihi	10.08.1991
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	35527868734
E-mail	gulserece@gmail.com	Tel	05366574654

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Acıbadem Üniversitesi	2015
Lisans	Balıkesir Üniversitesi	2013
Lise	Bahçeşehir Atatürk Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Biyoteknoloji Grubu	Turgut İlaç	2015-...
2.		-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	58,03945	57,91231	57,85353
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Windows XP/7/8	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer: Cevriye Pamukcu, Nazlı Keskin, Derya Aydın, Ilgu Ece Gulser, Batu Erman, Burak Erman, Aykut Uren, Cengiz Yakicier, Meltem Muftuoglu. Identification and characterization of small molecule inhibitors targeting DNA polymerase gamma for the treatment of cancers deficient in mismatch repair. 40th FEBS congress, 2015, Berlin, Germany.

İLGÜ ECE GÜLSER

**ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS

İSTANBUL-2015