

**BAZI BENZOKSAZİN TÜREVLERİNİN ÖKARYOTİK DNA
TOPOİZOMERAZ I ENZİMİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**THE INVESTIGATION OF INHIBITORY EFFECTS OF SOME
BENZOXAZINE DERIVATES ON EUCARYOTIC DNA
TOPOISOMERASE I**

EGEMEN FOTO

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmenliğinin

BİYOLOJİ (MOLEKÜLER BİYOLOJİ) Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2007

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ BÖLÜMÜ (MOLEKÜLER BİYOLOJİ)**
ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....

Prof.Dr. ESİN ŞENER

Üye (Danışman)

.....

Prof.Dr. Nuran DİRİL

Üye

.....

Prof.Dr. Cihan ÖNER

Üye

.....

Prof.Dr. Mübeccel DURUSOY

Üye

.....

Doç.Dr.Hatice MERGEN

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez alışması TBAG – 105 T 081 no ' lu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmektedir.

CANIM BENİM 'e.....

BAZI BENZOKSAZİN TÜREVLERİNİN ÖKARYOTİK DNA TOPOİZOMERAZ I ENZİMİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Egemen Foto

ÖZ

Bu çalışmada, kemoterapötik etkili olabileceği düşünülen yeni sentezlenmiş 18 tane benzoksazin türevi bileşiğin ökaryotik DNA topoizomeraz I enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı.

Test edilen bileşiklerden 14 tanesinin ökaryotik DNA topoizomeraz I enzimi üzerinde katalitik inhibitör etki gösterdiği (S18 (IC₅₀=1,61 µg/µl) > S1 > S16 > S17 > S5 > S14 > S15 > S13 > S2 > S3 > S12 > S9 > S8 > S4 (IC₅₀=24,84 µg/µl)), 1 tanesinin (S10) topoizomeraz zehiri olarak inhibisyon etki gösterdiği, 3 tanesinin ise enzim üzerinde inhibisyon etki göstermediği bulundu.

Denenen bileşikler arasında en güçlü inhibisyon etki gösteren S10 (IC₅₀=0,00017 µg/µl) bileşiğinin klinikte ilaç olarak kullanılan camptothecin (IC₅₀=0,013 µg/µl) daha güçlü inhibisyon etki gösterdiği saptandı.

Anahtar Kelimeler: Benzoksazin, ökaryotik DNA topoizomeraz I (insan), topoizomeraz inhibitörleri, camptothecin.

Danışman: Prof. Dr. Nuran DİRİL, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

THE INVESTIGATION OF INHIBITORY EFFECTS OF SOME BENZOXAZINE DERIVATES ON EUKARYOTIC DNA TOPOISOMERASE I

Egemen Foto

ABSTRACT

In this study, derivatives of newly synthesized 18 benzoxazine compounds, which are thought to have a chemotherapeutically effective, have been investigated about their inhibitory effects on eukaryotic DNA topoisomerase I.

It has been shown that 14 of the tested compounds (S18 (IC₅₀=1,61 µg/µl) > S1 > S16 > S17 > S5 > S14 > S15 > S13 > S2 > S3 > S12 > S9 > S8 > S4 (IC₅₀=24,84 µg/µl)) have inhibitory effect on DNA topoisomerase I enzyme as catalytic inhibitor, 1 of them has poison effect on the enzyme, though and 3 of them don't have any inhibitory effect on the enzyme.

It has been determined that S10 (IC₅₀=0,00017 µg/µl) has the strongest inhibitory effect among tested compounds on topoisomerase I enzyme than camptothecin used as a drug in clinic (IC₅₀=0,013 µg/µl).

Keywords: Benzoxazine, eukaryotic DNA topoisomerase I (human), topoisomerase inhibitors, camptothecin

Advisor: Prof. Dr. Nuran DİRİL, Hacettepe University, Science Faculty, Department of Biology, Division of Molecular Biology

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde her türlü yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Nuran Diril'** e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal bileşiklerin sentezlenmesini ve QSAR analizlerinin yapılmasını sağlayan **Prof. Dr.Esin Şener, Prof. Dr. İsmail Yalçın, Doç. Dr. Özlem Temiz-Arpacı** ve kullanılan bileşiklerle ilgili verdiği teknik bilgilerden ve göstermiş olduğu ilgilerinden dolayı **Dr. Betül Tekiner-Gülbaş'a ve Dr. Sabiha Alper'e;**

Tez deneylerimin DNA bant yoğunluklarının görüntülenmesi aşamasındaki yardımlarından dolayı **Prof. Dr. Cihan Öner** ve çalışma grubundaki **Doç. Dr. Hatice Mergen, Arş. Gör. Ceren Acar ve Arş. Gör. Zekiye Yurtsever'e;**

Tez deneylerimin bütün aşamalarında çok büyük sabır ve özveriyle her zaman yanımda olan ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili meslektaşım **Arş. Gör. Çiğdem Kaplan'a ;**

Tezimin yazılması ve basım aşamalarında çok büyük fedakarlık gösteren ve yardımını esirgemeyen manevi destekçim ve biricik kardeşim **Özgür Foto'ya ;** IC50 değerlerinin hesaplanmasında yardımcı olan **Öner Koçak'a;** tez çalışmam sırasındaki ilgi ve yardımlarından dolayı dostlarım **Nagihan Alkefli ve Seda Sakınç'a;**

Üniversite öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve Ankara'da bana ailemin eksikliğini hissettirmeyen '**Kaya Ailesi' ne (Lütfü-Süheyla-Aslı Kaya);**

Tez döneminde yaşadığım her türlü sıkıntıyı paylaşan ve bana ilgi ve desteğiyle her zaman moral kaynağım olan canım öğretmenim **Berna Duru' ya;**

Hayatım boyunca ilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, mastır tezim boyunca da en zor ve kritik dönemlerimde eksikliklerini hiç hissettirmeyen canım **Annem ve Babam'a (Ayşe – Ahmet Foto)** sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>SAYFA</u>
ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Çalışmada Kullanılan Benzoksazin Türevleri.....	3
2.1.1. Genel Yapıları ve Biyolojik Aktiviteleri.....	3
2.2. DNA Topolojisi.....	7
2.2.1. Süperkıvrımlı DNA	7
2.3. DNA Topoizomerazlar.....	9
2.3.1. DNA Topoizomerazların Yapıları, Fonksiyonları ve Sınıflandırılmaları.....	9
2.3.2. Topoizomerazlarda Ortak Olan Yapılar.....	13
2.3.2.1. 5Y-CAP ve Toprim DNA Kesim Domainleri.....	13
2.3.2.2. Tip IB/Tyr-Rekombinaz DNA Kesim Domainleri.....	14
2.3.2.3. GHKL ATPaz Domainleri.....	14
2.3.3. Ökaryotik DNA Topoizomerazlar.....	16
2.3.3.1. Ökaryotik DNA Topoizomeraz I Enzimi ve Hücrel Rollerini.....	16
2.3.3.1.1. İnsan DNA Topoizomeraz I.....	17

2.3.3.1.1.1. İnsan DNA Topoizomeraz I Enziminin Yapısı.....	18
2.3.3.1.1.2. İnsan DNA Topoizomeraz I Enziminin Tepkime Mekanizması.....	21
2.4. Ökaryotik DNA Topoizomerazların Kromozom Ayrılması ve Mitozdaki Rollerini.....	23
2.5. Topoizomeraz Enzimlerinin İnhibisyon Mekanizmaları.....	24
2.6. Topoizomeraz I Hedefli Kemoterapi.....	26
2.6.1. Topoizomeraz I Hedefli İlaçlar ve Bu İlaçlara Dirençlilik.....	26
2.6.1.1. Camptothecin (CPT)	26
2.6.1.2. Topotecan ve Irinetocan.....	28
2.7. Apoptosis ve Topo I-Hedefli İlaç Hasarının Onarımı.....	29
3. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLER	31
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Test Edilen Kimyasal Bileşikler.....	31
3.3. Benzoksazin Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri.....	33
3.3.1. S1, S2, S3, S4, S5 ve S7 Bileşiklerinin Genel Sentez Yöntemi.....	33
3.3.2. S6 Bileşiğinin Genel Sentez Yöntemi.....	34
3.3.3. S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16 ve S17 Bileşiklerinin Genel Sentez Yöntemi.....	34
3.3.4. BS18 Bileşiğinin Genel Sentez Yöntemi.....	35
3.4. Benzoksazinlerin İnsan DNA Topoizomeraz (I) Enzimi Üzerine Etkileri.....	36
3.4.1. İnsan DNA Topoizomeraz I Enzim Aktivitesinin Kontrolü.....	36

4. SONUÇLAR	38
4.1. Ökaryotik DNA Topoizomeraz I Enzimin Aktivite Sonuçları.....	38
4.2. Benzoksazin Türevlerinin Topoizomeraz I İnhibisyon Etkilerinin Sonuçları.....	39
4.3. Benzoksazin Türevlerinin Topoizomeraz I Enzimi Üzerindeki %50 İnhibisyon (IC50) Değerleri.....	60
5. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>SAYFA</u>
Şekil 2.1. Ofloksazin bileşiğinin yapısı.....	6
Şekil 2.2. DNA'nın relaks ve süperkırımlı yapısı.....	8
Şekil 2.3. Kapalı çembersel DNA moleküllerinde bağlantı sayısının (Lk) değişimi ve DNA'nın negatif ve pozitif süperkırımlı yapısı.....	9
Şekil 2.4. İnsan topoizomeraz I enziminin yapısal domainleri.....	18
Şekil 2.5. İnsan DNA topoizomeraz enziminin moleküler yapısı ve domain organizasyonu.....	20
Şekil 2.6. İnsan DNA topoizomeraz I' in kontrollü rotasyon mekanizması ...	21
Şekil 2.7. Topoizomeraz I enziminin DNA' ya bağlanması	22
Şekil 2.8. Topoizomeraz I zehirlerinin etki mekanizması.....	25
Şekil 2.9. CPT ve türevlerinin moleküler yapıları.....	26
Şekil 3.1. S1 – S17 bileşiklerin ortak halka yapıları	32
Şekil 3.2. S18 bileşiğinin halka yapısı.....	32
Şekil 4.1. Topoizomeraz I enzim aktivitesinin kontrolü.....	38
Şekil 4.2. S1'in topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	39
Şekil 4.3. S2'nin topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	40
Şekil 4.4. S3'ün topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi.....	41
Şekil 4.5. S4'ün topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi.....	42
Şekil 4.6. S5'in topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi.....	43
Şekil 4.7. S6'nın topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi.....	44
Şekil 4.8. S6'in artan konsantrasyonlarının topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	45
Şekil 4.9. S7'nin topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	46

Şekil 4.10. S8'in topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	47
Şekil .4.11. S9'un topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	48
Şekil 4.12. S10'un topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	49
Şekil 4.13. S11'in topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	50
Şekil 4.14. S12'nin topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	51
Şekil 4.15. S13'ün topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	52
Şekil 4.16. S13'ün artan konsantrasyonlarının topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	53
Şekil 4.17. S14'ün topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	54
Şekil 4.18. S14'ün artan konsantrasyonlarının topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi.....	55
Şekil 4.19. S15'in topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	56
Şekil 4.20. S16'nın topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	57
Şekil 4.21. S17'nin topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	58
Şekil 4.22. S18'in topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Test edilen kimyasal bileşiklerin kod numaraları ve moleküler yapıları.....	3
Çizelge 2.2. Topoizomerazların sınıflandırılması.....	11
Çizelge 2.3. Ökaryotik DNA topoizomerazların sınıflandırılması ve fonksiyonlar	15
Çizelge 2.4. Ökaryotik topo I' in hücrede etkileşim içinde olduğu proteinler.....	17
Çizelge 3.1. Test edilen kimyasal bileşikler.....	32
Çizelge 4.1. Topoizomeraz I enzimi için bileşiklerin test edilen konsantrasyon aralığında verdikleri IC50 değerleri.....	60

1. GİRİŞ

Ölümcül hastalıklar içinde kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada gelen ve son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan hastalıklardan biri olan kanser; belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucu gen ifadesinin miktarında veya zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Kanserli hücreler, kontrolsüz bir şekilde bölünerek oluştukları bölgelerden başka bir bölgeye göç ederek bu bölgelerde ikincil tümörleri oluştururlar.

Çalışmalar bir taraftan kanserin moleküler biyolojisi üzerinde yoğunlaşırken, diğer taraftan da cerrahi ve radyoterapi gibi uygulamaların yanı sıra kemoterapötik ilaçlarla yapılan tedavi etkili olmaya ve gün geçtikçe bu konudaki araştırmalar hız kazanmaya başlamıştır. Kanser oluşum mekanizmaları moleküler düzeyde aydınlatılmaya çalışılarak, hücre döngüsünün farklı evrelerinde müdahale şansları denenmektedir.

Bu ilaçların en önemli etki şekillerinden biri de kanser hücrelerinde nükleik asit sentezinin inhibe edilmesidir. Bu nedenle pek çok kemoterapötik ilaç, DNA-ilaç kompleksleri meydana getirerek DNA'ya bağımlı RNA polimerazı inhibe ederler (Meyers et al., 1976). Tümör hücrelerinde DNA metabolizmasında yer alan enzimlerin sentez hızının yüksek olması nedeniyle antitümör ilaç tasarımında DNA metabolizması ile ilgili enzimler hedef moleküller olarak seçilmektedir.

Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması gibi işlemlerde mutlak gerekli olan enzimlerdir. Topoizomerazlar hücrelerdeki bu hayati önemlerinin dışında antimikrobiyal ve antikanser ilaçlar için primer sitotoksik olmaları bakımından da çok önemlidir. Son yıllardaki farmakolojik çalışmalar, genellikle DNA küçük oluğundaki özgül dizilere bağlanarak antitümör aktivite gösteren ilaçların, DNA topoizomeraz enzimlerini inhibe ederek de etkili olduğunu göstermiştir. Hücre çoğalmasında gerekli olan topoizomeraz enzimlerinin bu ilaçlar tarafından inhibisyonu, kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabileceği düşünülmektedir (Pindur and Lemster, 1998). Giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörleri, antitümör aktiviteye sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak oluşturmuştur (Potmesil and Kohn, 1991; Ralph et al., 1994; Osheroff, 2003).

Günümüzde tedavi amacıyla sıklıkla kullanılan kemoterapötik etkili bu tip ilaçlara (Örn; daunomycin, bleomycin vb.) karşı direnç kazanılması veya istenmeyen yan etkilerinin bulunması bu ilaçların kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Bu durum, araştırmacıları daha etkili ve geniş spektruma sahip, yan etkileri daha az olan kemoterapötik etkili yeni ilaçların aranması çalışmalarına yönlendirmektedir.

Cappamensin A (2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, 6-methoxy-2-methyl-4-carbaldehyde), Capparis sikkimensis subsp. izole edilmiş ve in vitro çalışmalarla tümör hücre replikasyonunun inhibitörü olduğu saptanmış yeni bir benzoksazin türevidir. Ayrıca bu ilacın yumurtalık (1A9), akciğer (A549), ileoceal (HCT-8), göğüs (MCF-7), nasofarjial (KB) ve vincristine dirençli (KB-VIN) insan tümör hücre hatlarına karşı in vitro'da önemli antikanser aktivite gösterdiği saptanmıştır (Wu et al., 2003). Cappamensin A'dan elde edilen bu sonuçlar, diğer benzoksazin türevlerinin potansiyel antitümör ajanları olabileceğini göstermektedir.

Bu amaçla; Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda, antimikrobiyal ve antitümöral aktiviteye sahip olabileceği düşünülen benzoksazin türevi yeni heterosiklik bileşikler sentezlenmiştir (Çizelge 2.1). Bu bileşiklerin antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri incelenmiş ve bunların oldukça geniş bir antimikrobiyal etki spektrumu gösterdikleri gözlenmiştir (Alper-Hayta et al., 2006).

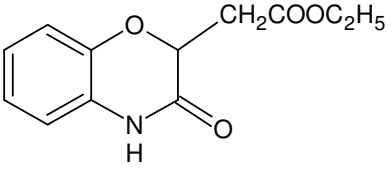
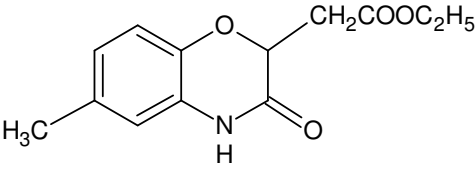
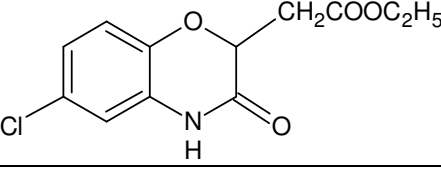
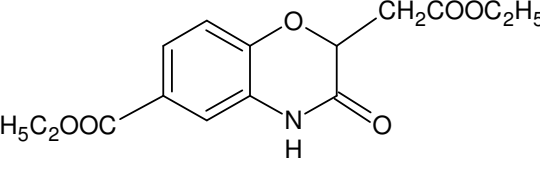
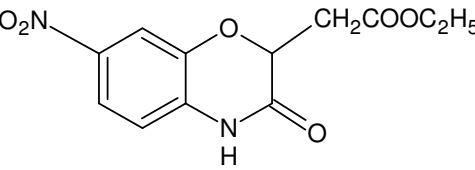
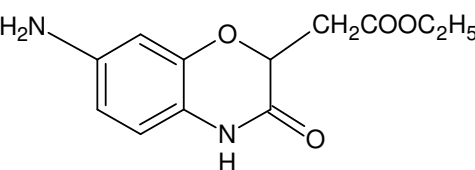
Bu çalışmanın amacı, ön ilaç (prodrug) olarak düşünülebilen benzoksazin halka sisteminin ökaryotik DNA topoizomera I enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin olup olmadığının araştırılmasıdır. Çalışmanın sonucunda proje kapsamında yapılan bütün çalışmalara ait tüm veriler topluca değerlendirilip bileşiklerin yapı-etki ilişkisi analizleri gerçekleştirilecektir. Bu sonuçlar, kemoterapötik etkili ilaç-etken madde tasarımında kılavuz olabilecek daha etkili yeni bileşiklerin oluşturulmasına ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Çalışmada Kullanılan Benzoksazin Türevleri

2.1.1. Genel Yapıları ve Biyolojik Aktiviteleri

Çizelge 2.1. Test edilen kimyasal bileşiklerin kod numaraları ve moleküler yapıları

KOD	MOLEKÜL FORMÜLÜ	MOLEKÜL ADI	MOLEKÜL AĞIRLIĞI (Da)
S1		Etil (3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il) asetat	235
S2		Etil (6-metil-3- okso -3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)asetat	249
S3		Etil (6-kloro-3- okso -3,4-dihidro -2H-1,4-benzoksazin -2-il) asetat	269
S4		Etil 2-(2-etoksi-2-oksoetil)-3- okso -3,4-dihidro -2H-1,4-benzoksazin -6-karboksilat	307
S5		Etil (7-nitro-3-okso-3,4-dihidro -2H-1,4-benzoksazin -2-il) asetat	280
S6		Etil (7-amino-3-okso-3,4-dihidro -2H-1,4-benzoksazin -2-il) asetat	250

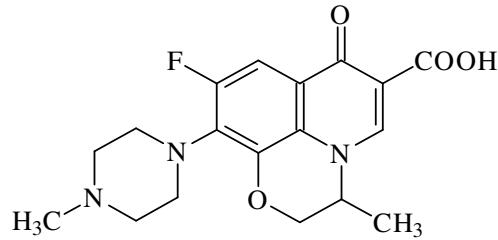
S7		Etil (6-kloro-7-nitro-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	314
S8		Etil (4-metil-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	249
S9		Etil (4,6-dimetil-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	263
S10		Etil (6-kloro-4-metil-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	283
S11		Etil 2-(2-etoksi-2-oksoetil)-4-metil-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -6- karboksilat	321
S12		Etil (4-metil-7-nitro-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	294

S13		Etil (6-kloro-4-metil-7-nitro-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	328
S14		Etil (4-etil-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	263
S15		Etil (6-kloro-4-etil-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	297
S16		Etil (4-etil-7-nitro-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	308
S17		Etil (6-kloro-4-etil-7-nitro-3-okso-3,4- dihidro -2H-1,4- benzoksazin -2-il) asetat	342
BS18		2-Hidroksi-2H-1,4- benzoksazin -3(4H)-on	165

Virtanen ve Hietala tarafından (1960) çavdar bitkisinden izole edilen glikozitin enzimatik parçalanması sonucunda 1,4-benzoksazin-3-on halkası taşıyan DIBOA (2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on) bileşiği elde edilmiştir. Daha sonra Gramineae familyasında yer alan buğday ve mısır bitkilerinde de aynı bisiklik halka sistemini içeren bileşiklere rastlanılmıştır. 1,4-benzoksazin-3-on yapısı taşıyan bu türevlerin buğday bitkisinde DIMBOA (2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on) ve mısır bitkisinde DIM2BOA (2,4-dihidroksi-7,8-dimetoksi-1,4-benzoksazin-3-on) oldukları belirlenmiştir (Niemeyer, 1988; Otsuka et al., 1988).

Bu bileşikler üzerinde yapılan biyolojik etki çalışmaları sonucunda ise DIBOA ve DIMBOA bileşiklerinin insektisit gibi etki gösterdikleri belirtilmiştir (Virtanen, 1961; Barria et al., 1992). Ayrıca bu bileşiklerin tahıllara karşı yumuşak çürütücü olarak etki gösteren bazı mikroorganizma türlerine karşı antibakteriyel ve/veya antifungal etki gösterdikleri de belirlenmiştir (Corcuera et al., 1978).

Daha sonraki yıllarda, yapısında 1,4-benzoksazin halka sistemi içeren ve antibakteriyel etkili bir ilaç olan ofloksazinin ortaya çıkışı ile araştırmacıların benzoksazin türevlerine olan ilgisi artmıştır (Şekil 2.1) (Hayakawa et al., 1986).



Şekil 2.1. Ofloksazin bileşiğinin yapısı (Osada et al., 1987)

İlerleyen zamanlarda doğada pek çok 1,4-benzoksazin analogu bulunmasına karşın 1,4-benzoksazin halka sistemi taşıyan çok az sayıda bileşiğin kemoterapötik aktivitesi çalışılmıştır. 1,4-benzoksazin halka sistemine sahip ofloksazin molekülü yapısında ilginç bir gözlem ile bu heterosiklik çekirdeğin klinik olarak kullanılan diğer antimikrobiyal ilaçlardan daha avantajlı bir yapı sunduğu saptanmış ve bu bileşiğin DNA giraz inhibitörü olduğu belirlenmiştir (Osada et al., 1987; Willmott and Maxwell, 1993).

Sekiz benzoksazin-4-türevi, iki farklı hücre sisteminde sitotoksosite açısından test edilmiştir. Bunlardan iki tanesinin P388 hücrelerinde yüksek sitotoksik etki gösterdiği, Nitrobenzoksazin-4-türevi P388 hücrelerinde hücre döngüsünde değişmelere neden olduğu ve porsin pankreatik elastaz enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Hadfield et al., 1994).

Ayrıca yapılan başka bir çalışmada; Young ve ark. (1994), 2,4-benzoksazin-3-on yapısındaki bir bileşiğin HIV enfeksiyonlarında rol oynayan dirençli varyetelerin içerdiği HIV reverse transkriptaz enziminini inhibe ettiğini ve AIDS tedavisinde yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

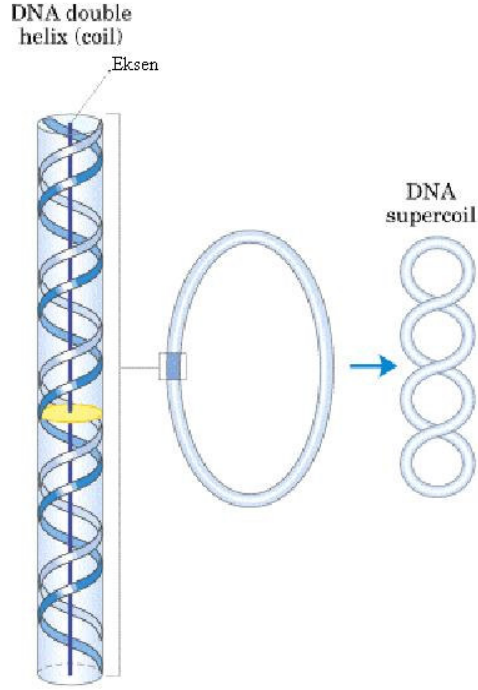
Buğday, mısır ve çavdar gibi tahıllardan izole edilen 1,4-benzoksazin-3-ones (Hx)'den siklik hidroksamik asitler türetilmiştir. Bu moleküllerin bitkilerin insektisitlere, bakterilere ve funguslara karşı korunmalarında önemli bir rol oynadığı ileri sürülmekte ve bu yönde bir çok çalışma sürdürülmektedir (Ozden et al., 2000; Lu and McKnight , 1999; Macchiarulo, et al., 2002). Hx türevlerinin bilinen aktiviteleri gün geçtikçe artmakta ve allelopatik, anti-inflamatuar, antimikrobia, antialgal ve antikanser özellikleri bilinmektedir (Bravo, 2000). Ayrıca benzoksazin türevi bileşiklerin oksidatif stresle ortaya çıkan nörodejenerasyonları inhibe ettiği ve bunların standart R-tocopherol ile benzer aktiviteye sahip olan potansiyel nöroprotektif ajanlar olduğu gösterilmiştir (Blattes, et al., 2005).

2.2. DNA Topolojisi

2.2.1. Süperkıvrımlı DNA

Elektron mikroskobu ile virüs ve bakteri DNA'larının halkasal olduğu gösterilmiş, bazılarının tipik dönüşler yaptığı gözlenmiştir. Bu yapıya "süper sarmal yapı" ya da DNA'nın *tersiyer yapısı* denmektedir. Doğadaki DNA moleküllerinin çoğu halkasaldır, yani serbest 5' ve 3' uçları yoktur. Bazı viral ve ökaryotik kromozomlar ise doğrusal moleküllerdir. Doğrusal kromozomlar da hücre içi yerleşimlerinde luplar yaparak halkasal yapılara benzerlik gösterirler (Zubay, 1993; Voet D. and Voet J., 1995).

Birçok hücrel DNA süperkırımlıdır. Süperkırımla relaks veya B formundaki DNA'da olması gereken toplam heliksin dönüş sayısının azalması sonucunda DNA'nın kendi eksenini etrafında dönüş yaparak süperkırımlı şekle dönüşmesidir (Şekil 2.2). Süperkırımlı DNA yapısının sürdürülebilmesi için DNA'nın ya kapalı çembersel yapıda ya da proteinlerle sarılmış olması gerekmektedir.



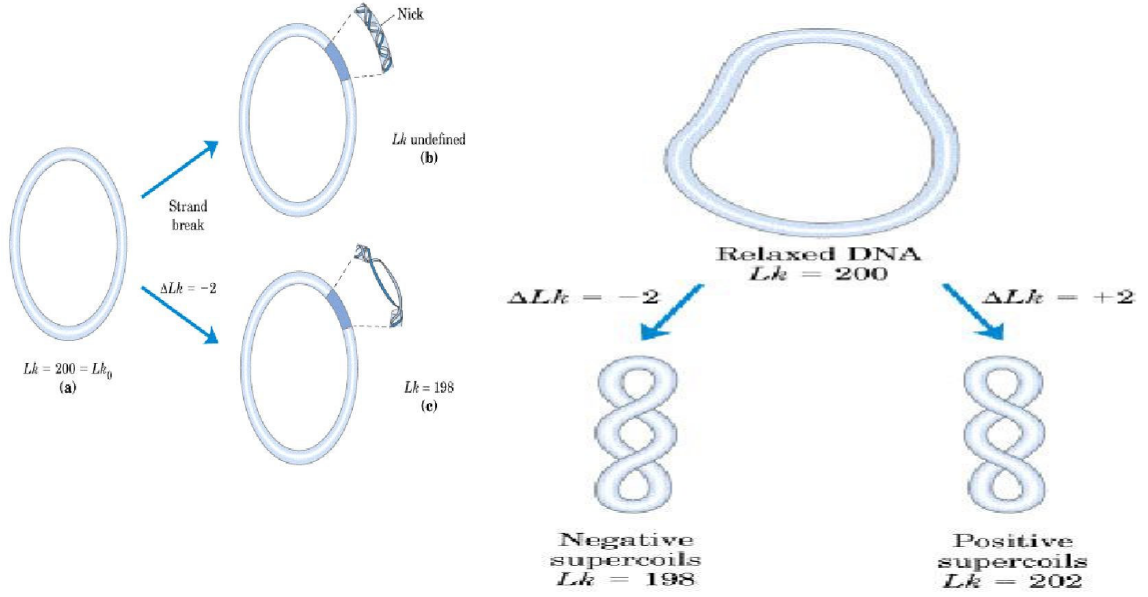
Şekil 2.2. DNA'nın relaks ve süperkırımlı yapısı (Nelson and Cox, 2000)

Relaks haldeki kapalı çembersel DNA'daki dönüş sayısı referans olarak kabul edilir ve (Lk_0) olarak isimlendirilir. Lk_0 DNA'da yer alan baz sayısının 10.5'e bölünmesiyle elde edilir. Başka bir terim olan σ ise özgül süpersarmal yoğunluğu olarak tanımlanır ve $\sigma = \frac{(Lk - Lk_0)}{Lk_0}$ formülünden hesaplanır.

$$Lk_0$$

Hücrel DNA'lar için bu değer yaklaşık $\sigma = -0,05$ ile $-0,07$ arasındadır bu değer DNA'daki heliks dönüş sayısının % 5-7 oranında ortadan kaldırıldığını ifade eder.

Lk değeri Lk_0 değerinden küçükse σ değeri negatiftir ve (-) süperkırımlı DNA oluşur, Lk değeri Lk_0 değerinden büyükse σ değeri pozitiftir ve (+) süperkırımlı DNA oluşur.



Şekil 2.3. Kapalı çembersel DNA moleküllerinde bağlantı sayısının (Lk) değişimi ve DNA'nın negatif ve pozitif süperkırımlı yapısı (Nelson and Cox, 2000)

Şekil 2.3'de verilen örnekte görüldüğü gibi 2100 baz çiftlik kapalı dairesel DNA'nın Lk_0 değeri 200'dür ($2100/10.5 = 200$). Eğer bu DNA'nın herhangi bir iplikçisinde bir kırık oluşursa Lk değeri tanımlanamaz. Aynı DNA segmentinde dönüşlerden 2 tanesi kaldırılırsa Lk değeri 198 olur. Değişiklik aşağıdaki eşitlik ile gösterilebilir;

$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 198 - 200 = -2$. Böylece (-) negatif süperkırımlı DNA oluşur. Aynı DNA segmentine iki dönüş eklenirse $\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 202 - 200 = +2$ 'dir. Bu durumda oluşan DNA (+) pozitif süperkırımlı DNA'dır.

2.3. DNA Topoizomerazlar

2.3.1. DNA Topoizomerazların Yapıları, Fonksiyonları ve Sınıflandırılmaları

Sadece bağlantı sayıları (Lk) farklı olan 2 özdeş DNA molekülü birbirinin topoizomeridir. Prokaryotlarda görülen halkasal DNA molekülünün serbest ucu yoktur. Serbest ucu olmayan bir molekülün bir topolojik formdan diğer topolojik forma dönüşümü biyolojik olarak bir enzim ailesi tarafından düzenlenir. 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.

Süperkırımlı DNA'lar ve topoizomerazlar ökaryotlarda da bulunur. Ökaryotlarda ise, kromozomlar genellikle halkasal yapıda olmamalarına karşın histonlar ve diğer proteinlerle ilişkisi süperkırımları meydana getirir ve bunların topoizomerazlar tarafından relaks hale getirilmesi gerekmektedir. Bütün hücrelerde tam olarak replike edilmiş kromozomların, hücre bölünmesinden önce DNA topoizomerazlar tarafından çözülmüş olması zorunludur (Champoux, 2001).

1971 yılında, ilk kez Wang tarafından *E.coli* DNA topoizomeraz I enzimi keşfedildi. Bu enzim, DNA'nın tek iplikçiğinde DNAaz aktivitesi ile kırık oluşturarak herhangi bir enerji gerektirmeden negatif süperkırımlı DNA'nın relaks (gevşemiş) forma dönüşümünü katalizler. *E.coli* DNA topoizomeraz I aynı zamanda yine herhangi bir enerjiye gereksinim duymadan DNA ligaz aktivitesi ile geçici olarak kırılmış fosfodiester bağları arasında yüksek enerjili kovalent bağ oluşturur (Chen and Liu, 1994).

Liu ve ark. (1979) tarafından *E.coli* 'yi enfekte eden T4 bakteriyofajından, T4 DNA topoizomeraz enzimi izole edildi. T4 DNA topoizomeraz, ATP hidrolizini gerektiren bir reaksiyonla hem pozitif hem de negatif süperkırımlı DNA'nın relaks forma dönüşümünü katalizler. T4 DNA topoizomeraz, ökaryotik DNA topoizomeraz II ile aynı enzimatik aktiviteye sahiptir (Miller et al., 1981). T4 DNA topoizomerazın kataliz mekanizması üzerindeki çalışmalar, topoizomerazların iki şekilde sınıflandırılmasına yol açmıştır. I. Tip DNA topoizomerazlar (*E.coli* DNA topoizomeraz I ve ökaryotik topoizomeraz I), geçici olarak tek zincirde DNA kırığı oluşturarak DNA'nın relaks hale dönüşümünü katalizler. II. Tip DNA topoizomerazlar (*E.coli* DNA giraz ve ökaryotik DNA topoizomeraz II) ise geçici bir çift zincirli DNA kırığı oluşturarak DNA'da oluşan topolojik stresin azalmasını katalizler (Gellert, 1981; Chen and Liu, 1994). Bu iki temel grubunda fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre A ve B olarak adlandırılan alt grupları bulunmaktadır (Çizelge 2.2) (Mathews and Van Holde., 1996; Bjornsti et al., 1989; Corbett and Berger, 2004).

Çizelge 2.2. Topoizomerazların Sınıflandırılması

(Bjornsti and Osheroff, 1999; Corbett and Berger,2004)

GRUPLAR	I. TİP		II. TİP	
	IA	IB	IIA	IIB
KATALİTİK BÖLGELER				
DNA Kesimi	toprim/CAP*	IB/Int*	toprim/CAP*	toprim/CAP*
ATP Hidrolizi	—	—	GHKL*	GHKL*
KATALİTİK ÖZELLİKLER				
Metal Gereksinimi	Var	Yok	Var	Var
ATP Gereksinimi	Yok	Yok	Var	Var
DNA Kesimi	Tek zincir	Tek zincir	Çift zincir	Çift zincir
Kesim Polaritesi	5'	3'	5'	5'
ΔLk	+1	+/- n	+/- 2	+/- 2
ÖRNEKLER	<i>Bakteriyel</i> topo I <i>Bakteriyel</i> topo III Ökaryotik topo III Ters giraz	Ökaryotik topo I Mitekondriyal topo I İnsan topo I, Vaccinia topo I, topo V	Bakteriyel topo II (Giraz) Bakteriyel topo IV T4 topoizomeraz Ökaryotik topo II	Arkeobakter topo VI

*toprim/CAP,IB/int ve GHKL topoizomerazlarda gözlenen ortak yapılarıdır.

I. Tip topoizomerazlar ; DNA'nın tek zincirinde geçici olarak bir kırık oluşturup daha sonra uçlardan birini kırılmayan zincir etrafında çevirirler ve kırılan uçları tekrar ligaz aktivitesi ile birleştirerek süperkırımlı DNA'yı relaks hale getirirler. Bu işlem için herhangi bir enerjiye gereksinim yoktur. DNA'daki süperkırımların kaldırılması enerji açısından uygun bir tepkimedir. Enzim DNA'ya bağlanır ve bir zinciri keser. Kesilmiş DNA zinciri, kesilmemiş DNA zincirinin alt kısmından geçer ve kırılmış olan iplik tekrar kapatılır. Bu işlem sonunda (-) süperkırım sayısında bir tane eksilme olur. Bu işlemde sorumlu enzim ailesi I. Tip topoizomerazlar olarak adlandırılır. E. coli topoizomeraz I enzimi, (-) süperkırımlı DNA'yı relaks haldeki DNA'ya dönüştürürken, ökaryotik topoizomeraz I enzimleri hem (-) hem de (+) süperkırımlı DNA'yı relaks forma dönüştürebilirler (Pindur and Lemster, 1998). I. Tip topoizomerazlar kendi içlerinde tip IA ve tip IB olmak üzere 2 alt gruba daha ayrılır;

Tip IA grubu topoizomerazlar ilk olarak Wang tarafından (1971) tanımlanmıştır. Tip IA enzimler monomerik olup, tek zincirli DNA'ya bağlanmayı tercih eder, tek zinciri belirli

bir bölgeden kopararak negatif süpersarmalları kısmen gevşetirler. Katalizleri sırasında DNA parçalarının 5'ucu ile kovalent fosfotirozin bağı yaparlar. ATP kullanmadan ilgili DNA segmentinden gelen serbest enerji ile reaksiyon ilerlemektedir (Wang, 1971; Champoux and Dulbecco, 1972; Kirkegaard et al., 1984; Bjornsti et al., 1989).

Tip IB grubu enzimler ilk olarak Champoux ve Dulbecco tarafından (1972) tanımlanmıştır. Tip IB enzimler de monomerik olup çift zincirli DNA'ya bağlanmayı tercih eder, tek diziyi kopararak negatif ve pozitif süper sarmalları ATP kullanmadan tamamen gevşetirler. Bu enzimler katalizleri sırasında DNA parçasının 3' ucu ile bağlantı kurar ve kopan dizinin sağlam fosfodiester bağlar etrafında bir veya birden fazla dönüşüne izin verir (Corbett and Berger, 2004). Tip I DNA topoizomerazlar, süpersarmallaşmayı değiştirmekten başka çentikli dsDNA veya ssDNA halkalarının düğümlerini de çözebilmektedirler (Tse-Dinh, 1998).

II. Tip topoizomerazlar, DNA'nın her iki zincirini birden kesip yeniden birleştirerek DNA'nın topolojisini değiştirirler. Bu işlem için ATP hidrolizi gereklidir.

Tip IIA grubu topoizomerazlar, 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. Bu sırada kullanılan sarmalların her ikisi de aynı DNA parçasına ait ise ΔL 'yi +/-2 olarak değiştirir. Tip II grubu enzimler DNA süper sarmal sayısını değiştirebildikleri gibi, çift sarmal DNA'nın halkalarını açabilir veya iç içe sokabilirler (Levine et al., 1998; Bjornsti and Osheroff, 1999; Corbett and Berger, 2004).

Bu enzimler birden fazla alt birimli proteinler olup, katalitik aktiviteleri için ATP gereklidir. Bu grupta yer alan Tip IIA topoizomerazlardan bakteriyel olanlar heterotetramer, ökaryotik olanlar ise homodimerdirler. E. coli DNA giraz ise 400 kDa ağırlığında olup A₂B₂ heterotetramer yapıdadır. Saccharomyces cerevisiae (maya) enzimi 320 kDa olup (BA)₂ homodimer yapıdadır. Ökaryotik enzimler B-A alt birimlerinin füzyonu olan proteinin homodimeridirler. Girazın B ve A (GyrB ve Gyr A) alt birimleri mayanın sırası ile N- ve C- terminal yarılıarı ile homologtur (Lynn et al., 1986). B alt biriminin N terminal ucu ATP bağlama ve hidroliz aktivitesi gösterir. A alt ünitesi ise DNA'yı kıran aktif bölge tirozini ve oligomerleşmeyi sağlayan dimer ara

yüzünü içerir. C terminali ve GyrA birbirinden bağımsızdır, bu bölgenin fosforilasyonu proteinin katalitik aktivitesini düzenler (Ullsperger and Cozzarelli, 1996; Levine et al., 1998).

Tip IIB grubu topoizomerazlar ise Bergerat ve ark. (1994) tarafından tanımlanmıştır. Tip IIA grubu enzimlerden yapısal olarak farklılık göstermektedirler. Tip IIB topoizomerazlar tüm prokaryotik tip II ler gibi heterotetramer (A₂B₂) olup, prototipi arkeal DNA topoizomeraz VI'dır. ATP'ye bağımlı olarak negatif ve pozitif süper sarmalları gevşetirler, süper sarmal oluşturmazlar ve kuvvetli dekatensasyon aktivitesine sahiptirler (Bergerat et al., 1997; Corbett and Berger, 2003).

II. tip topoizomerazlar içinde ilk önce izole edilmiş olan enzim E.coli DNA topoizomeraz II ya da Giraz olarak isimlendirilmiştir. Bu enzim, pozitif süperkıvrımlı DNA'yı önce relaks haldeki DNA'ya, sonra da ATP hidrolizi ile tekrar negatif süperkıvrımlı DNA'ya dönüşümünü katalizlemektedir (Gellert et al., 1976; Pindur and Lemster, 1998). Ökaryotik DNA topoizomeraz II enzimi ise, ATP hidrolizini gerektiren bir reaksiyonla hem pozitif hem de negatif süperkıvrımlı DNA'nın relaks forma dönüşümünü katalizlemektedir. Ökaryotlarda histonların bağlanması, süperkıvrılma potansiyelini arttırabileceği için ökaryotik topoizomeraz II'nin DNA'yı tekrar süperkıvrımlı forma döndürme aktivitesi yoktur. Ökaryotik hücrelerdeki II. tip enzimler hem (+) hem de (-) süpersarmal yapıyı relaks hale getirebilirler. II. tip topoizomerazlar her iki DNA zincirini de kesebildikleri için, bu işlem sonunda (-) süperkıvrım sayısında iki tane eksilme olur.

2.3.2. Topoizomerazlarda Ortak Olan Yapılar

2.3.2.1. 5Y-CAP ve Toprim DNA Kesim Domainleri

Tip IA, IIA ve IIB topoizomerazlarda DNA'ya bağlanma ve kesim için gerekli olan iki bölge ortaktır (Aravind et al., 1998). Bu yapılardan birincisi; E.coli katabolit aktivatör proteininde (CAP) olduğu gibi, DNA'ya bağlanan birçok proteinde bulunan 5Y-CAP bölgesidir. Kanatlı sarmal katlanımı gösteren bu bölgeye 5Y-CAP adı verilmesinin nedeni fosfodiester bağının nükleofilik atakla kırılmasından sonra, DNA'nın 5 'ucuna kovalent olarak bağlanan katalitik tirozin kalıntısını taşımasıdır. Katalitik tirozine yakın

lokalizasyonda bulunan arjinin, pentavalent transisyon durumunun stabilize edilmesine yardımcı olmaktadır (Berger et al., 1998; Corbett and Berger, 2004).

Kesim tepkimesi için gerekli olan ikinci bölge “toprim”, hem tüm topoizomerazlarda hem de bakteriyal primazlarda ve belirli nükleazlarda bulunması nedeni ile bu adı almıştır (toprim : **topoisomerase/primase**). Toprim bölgesinde paralel dört veya beş iplikli β -tabaka yapısı α -helikslerle çevrelenmiştir. Üç veya dört iyi korunan asidik kalıntı kümesi, bölgenin ikincil yapısal elementlerle ilişki kuran halkalarının bulunduğu bölgede yer alır. Bu asidik kümenin; tam katalitik fonksiyon için gerekli kofaktör olan Mg^{+2} iyonlarının bağlanma bölgesi olduğu düşünülmektedir (Aravind et al., 1998).

2.3.2.2. Tip IB / Tyr-Rekombinaz DNA Kesim Domainleri

Tip IB topoizomerazlar diğer topoizomerazlarla ortak yapılar içermezler. Buna karşın Haemophilus influenza faj integrası (HP1), λ integrazlar, integraz rekombinaz protein (XerC/D), siklizasyon rekombinaz protein (Cre) ve flippaz rekombinaz protein (Flp) gibi tirozin rekombinazlarla ortak katalitik bölgeler bulundurlar (Cheng et al., 1998; Stewart et al., 1998; Subramaniam et al., 2003). Bu IB/Int (Tip **IB** / **Integr**az) bölgesi 8 ile 10 α -heliks, küçük bir antiparalel β -tabakaya sahiptir ve DNA zincirinin kırılmasından sonra 3' ucuna kovalent bağlanma için gerekli yapıları bulundurmaktadır (Redinbo et al., 1998; Chen and Rice, 2003).

IB/Int olarak adlandırılan katalitik çekirdek bölgesi, çiçek virüsü ve insan topo I' in her ikisinde de bulunmaktadır. Önemli aktif bölge elemanları ise, katalitik tirozin, transisyon durumunu stabilize eden histidin-lizin çifti ve aktif bölge tirozini ile proton naklini sağlayarak 5' hidroksili serbestleştiren arginin-lizin çiftleridir. 5Y-CAP / Toprim topoizomerazların aksine tip IB grubu enzimler DNA'nın 3' ucuna kovalent bağla tutunurlar ve Mg^{+2} gibi divalent metal iyonlarına gereksinim duymazlar (Kirkegaard and Wang, 1985; Cheng et al., 1998; Stewart et al., 1998; Chen and Rice, 2003).

2.3.2.3. GHKL ATPaz Domainleri

Tüm tip II topoizomerazlar, DNA ikili sarmalını diğerinin içinden geçirebilmek için ATP bağlama ve hidrolize gereksinim duyarlar. ATPaz bölgesi tip IIA ve tip IIB'lerde farklılık gösteren iki ayrı bölge ile bu fonksiyonu gerçekleştirir (Berger et al., 1997;

Corbett and Berger, 2003). Bu bölgeye GHKL adı verilmesinin nedeni birçok ATPazda ortak olmasından dolayıdır. Bunlar tip II topoizomerazlar (E.coli DNA Giraz), ısı şoku proteini 90 (Heat shock protein 90, Hsp90), bakteriyel kemotaksis protein (CheA)-ailesi histidin Kinazlar ve DNA yanlış eşleşmiş baz onarım proteinini (MutL) içermektedir (Dutta and Inouye, 2000; Meyer et al., 2003).

Tip II topoizomerazlarda ATP bağlanması, GHKL bölgesinin dimerleşmesini sağlayarak, DNA ikili sarmalının içinden geçeceği kapıyı oluşturan protein-konformasyon değişimlerinin temelini oluşturur (Roca et al., 1996; Williams et al., 2001). GHKL proteinlerinin ATP bağlayıcı bölgeleri, β -tabakadan bir zemin ve α -helikslerden duvarlar ile oluşmuştur. GHKL bölgesi, ATP kapağı denilen, glisince zengin P-lup motifi içermektedir. GHKL ATPazların; DNA metabolizması, protein katlanması ve sinyal iletiminde çok önemli rolleri vardır (Hu et al., 2003).

Çizelge 2.3. Ökaryotik DNA topoizomerazların sınıflandırılması ve fonksiyonlar

(Cortes et al., 2003)

Topoizomeraz Enzimleri	Tipi	Yapısı	Mol. Ağ. (kDa)	DNA kesimi	Gen Lokalizasyonu (İnsan 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

2.3.3. Ökaryotik DNA Topoizomerazlar

DNA topoizomerazlar, evrimsel olarak korunmuş çekirdek enzimleri olup, geçici DNA kesimi, zincir geçişi ve yeniden birleşme olaylarını katalizleyerek DNA'nın değişik topolojik izoformları arasında meydana gelen çeşitli dönüşümleri sağlar. Bu güne kadar ökaryotlarda bulunan 5 farklı topoizomeraz enzimi rapor edilmiştir. Bunlar sırasıyla; topo I, topo III α , topo III β (I. Tip topoizomerazlar), topo II α ve topo II β enzimleridir (II. Tip topoizomerazlar) (Nitiss,1998 ; Cortes et al., 2003). Bu enzimlerin tipleri, molekül ağırlıkları, fonksiyonları gibi özellikleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir;

2.3.3.1. Ökaryotik DNA Topoizomeraz I Enzimi ve Hücresel Roller

Topoizomeraz grubu enzimler, çoğunlukla mayalar, Drosophila ve memeli hücreleri üzerinde çalışılmıştır. Ökaryotik DNA topoizomeraz I, bakteriyel topoizomeraz I' in aksine DNA 'da kesik kısmın 3' ucuna bağlandıkları için tip 1B sınıfında yer almakta ve hücre döngüsü boyunca konstitütif olarak ifade edilmektedir.

Ökaryotik topo I'in E.coli topo I'i ile homolojisi birbirinden farklı olduğu gibi topoizomerizasyon reaksiyonları da farklıdır. Bakteriyel enzimin aksine enzim indüklü tek zincir kırıklarını köprülemediği gibi DNA eksenine etrafında dönerek kırıkları ya tamamen ya da kısmen serbest bırakabilir. Bu çalışma mekanizması ile bir fırdöndüye benzetilmektedir. Tek zincirli DNA'dan çok, çift zincirli DNA'ya bağlanmayı tercih eder. Bu biyokimyasal özelliği; topo I in neden hem negatif hem de pozitif süper kıvrımları açabildiğini açıklar niteliktedir (Kirkegaard et al., 1984; Pommier et al., 1998).

Ökaryotik topo I enzimi nükleer bir protein olup, yaklaşık %95' lik kısmı çekirdekçik içerisinde yoğunlaşmıştır (Muller et al., 1985; Zhang et al., 1988; Christensen et al., 2004). Enzim, RNA transkripsiyonunun aktif olduğu bölgelerde yaygın olarak bulunur, mRNA sentezi sırasında süper kıvrımları açmak suretiyle oluşan süper helikal stresi azaltmak için transkripsiyonda görev alan moleküllerin ilerisinde yer alır ve Çizelge 2.4'de görülen bir çok proteinle de direkt etkileşim halinde olduğu saptanmıştır (Gilmour et al., 1986; Gilmour and Elgin, 1987).

Çizelge 2.4. Ökaryotik topo I in hücrede etkileşim içinde olduğu proteinler
(Leppard and Champoux, 2005)

ETKİLEŞEN PROTEİN	FONKSİYONU	ETKİLEŞİMDEKİ POTANSİYEL ÖNEMİ	REFERANS
WRN	Helikaz	Replikasyon, onarım ve transkripsiyon	Laine et al., 2003
PARP-1	Poly (ADP-riboz) polimeraz	Topoizomeraz I kesim kompleksinin onarımı	Bauer et al., 2000
p53	Tümör supresör	DNA onarımı, transkripsiyon ve apoptozis sırasında DNA fragmentasyonu	Gobert et al., 1996
p14ARF	Tümör supresör	Çekirdekçikte Topoizomeraz I ' in aktivasyonunun stabilizasyonu	Karayan et al., 2001
Nükleolin	DNA bağlama	rDNA intergenik spacer bölgesine toplanma; nükleolar bozulmadan sonra DNA sentezinin inhibisyonu	Bharti et al., 1996
TATA bağlanma protein (TBP)	Transkripsiyon faktörü	Transkripsiyon	Merino et al., 1993
UBC9	SUMO E2	Sumoylasyon, lokalizasyon, onarım	Mao et al., 2000
Topors	E3 ligaz	Topoizomeraz I ubigutinasyonu ve degradasyon	Haluska et al., 1999
SF2/ASF	RNA-splicing faktör	RNA splicing	Rossi et al., 1996
PSF	RNA-splicing faktör	RNA splicing	Straub et al., 1998

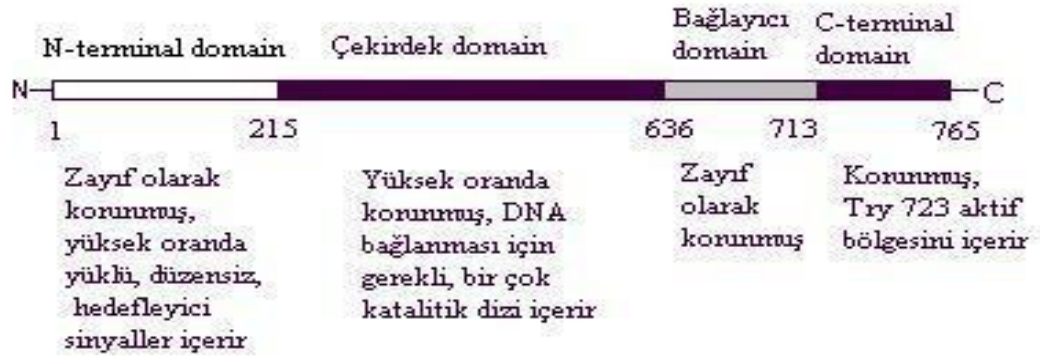
2.3.3.1.1. İnsan DNA Topoizomeraz I

Üzerinde en çok araştırma yapılan insan topoizomeraz enzimlerinden biri DNA topoizomeraz I' dir. İnsan DNA topoizomeraz I; DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve kromozom yoğunlaşmasında oluşabilecek pozitif ve negatif süper kıvrımları relaks hale getirerek gerginliklerin azaltılmasında görev alan, ökaryotik topoizomerazların tip 1B grubundaki temel bir enzimdir. Monomer olarak katalitik aktivite gösteren enzim, ATP'den bağımsız bir şekilde DNA'yı tek zincirinden kırar ve kırılmış DNA zincirinin 3' ucuna kovalent olarak bağlanarak DNA-topoizomeraz I kesim kompleksini oluşturur. 100 kDa büyüklüğünde, 765 amino asit içeren monomerik enzimin ifade edilebilmesinden sorumlu, 21 ekzon içeren ve 85 Kb büyüklüğündeki Top1geni; insan DNA'sında 20. kromozomda (20q12) lokalize olmuştur. Ayrıca biri 1. diğeri 22.

kromozomda bulunan iki ayrı topoizomeraz I pseudogeni tanımlanmıştır (Yang et al., 1990; Kunze et al., 1991; Juan et al., 1998; Engel et al., 2004).

2.3.3.1.1.1. İnsan DNA Topoizomeraz I Enziminin Yapısı

Ökaryotik topoizomeraz I enzimlerinin çoğu benzer diziler içermekte ve dört ana domainden oluşmaktadır. İnsan DNA topoizomeraz I enziminde bu yapılar sırasıyla; N-terminal domaini, çekirdek (kor) domaini, bağlayıcı (linker) domain ve C-terminal domainidir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İnsan topoizomeraz I enziminin yapısal domainleri (Champoux, 2001)

*N-terminal domaini (1-214 amino asit arası); zayıf olarak korunmuş, yüksek oranda yüküldür. Çok düşük oranda hidrofobik amino asit içerir ve büyük oranda düzensizdir. Bu bölge beş nükleer lokalizasyon dizisi ve hedefleyici sinyaller içerir (Alsner et al.,1992; Mo et al., 2000).

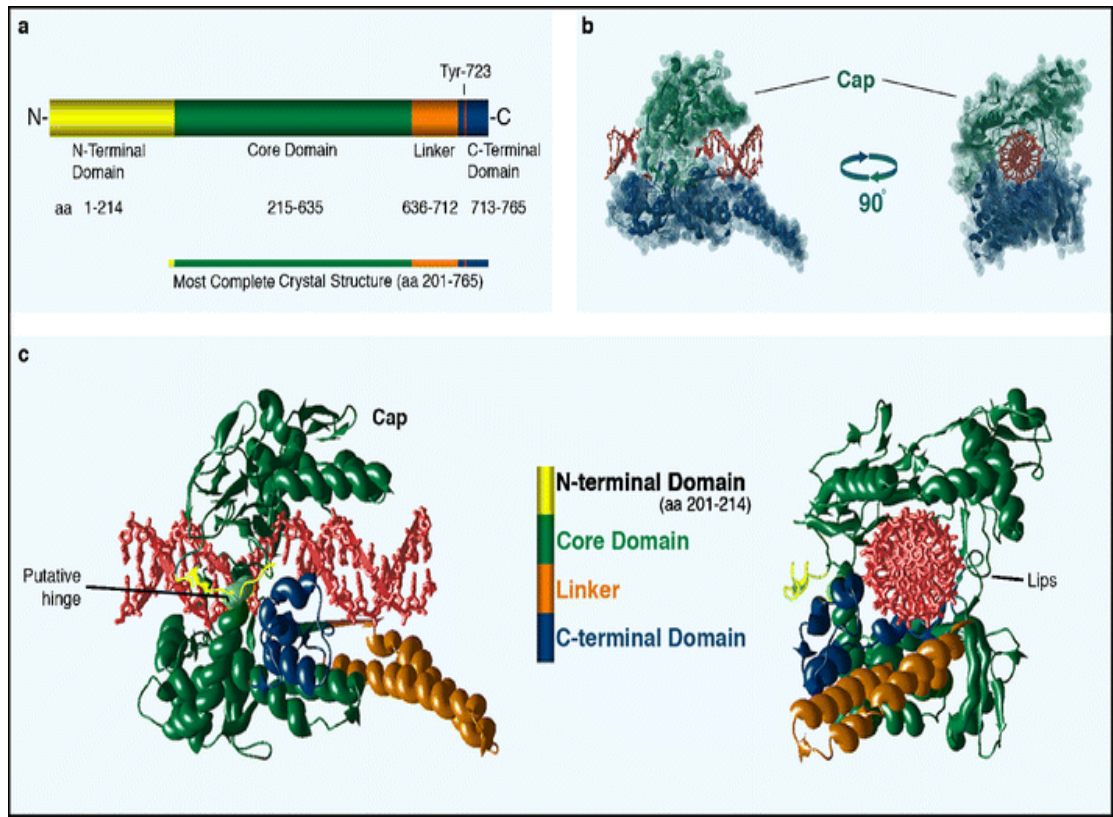
*Çekirdek (Kor) domaini (215-635 amino asit arası); yüksek oranda korunmuş ve DNA' ya bağlanması için gereklidir. Birçok katalitik dizi içerir.

*Bağlayıcı (linker) domain (636-712 amino asit arası); 77 aminoasitten oluşan bu domain düşük oranda korunmuştur, proteaz duyarlı ve enzimin katalitik aktivitesi için zorunlu değildir. Enzimin DNA' ya bağlanma afinitisini artırdığı bilinmektedir (Stewart et al.,1997).

*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 (tyr723) rezidüsünü içerir. Bu tirozin amino asidi, DNA'nın 3' ucu ile enzim arasında kovalent bir bağ oluşturur. Bu da zincir geçişine izin veren tek zincirli DNA kırıklarının (nick) oluşumunu sağlar (Larsen and 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. Bu iki domain; ökaryotik Tip I B grubu enzimleri arasında iyi korunmuş beş aktif bölge aminoasit rezidüsünü içerir (Stewart et al., 1997; Redinbo et al., 2000).

Hem kovalent bir şekilde hem de non kovalent bir şekilde DNA'ya bağlanan kısım topoizomeraz I' in 201-765 amino asitlik bölgesidir (Stewart et al.,1998). Enzim DNA molekülünü tamamen çevreleyen 2 parçalı kısıp şeklinde (Şekil 2.5-b) (Champoux, 2001). Kor domain ana yapısı I,II,III olarak adlandırılan 3 alt domaine ayrılmaktadır. Kıspacın üst bölgesi "Cap (Baş)" olarak adlandırılır ve kor domainin I ve II nolu alt domainlerinden oluşmaktadır ve "Nose Cone (koni burnu=koni ucu)" olarak adlandırılan 2 tekil sarmalı içerir (Redinbo et al., 1998). Alt kıskaç bölümü ise kor domainin III nolu alt domaini ve C-terminal domaininden meydana gelmektedir. Bu bölüm, baş bölgesine uzun α -helikslerle bağlanmıştır. DNA etrafında kıskaçın açılıp kapanmasına izin veren ve α -heliks'in en üst kısmına lokalize olmuş kısım "menteşe kısmı" dır.

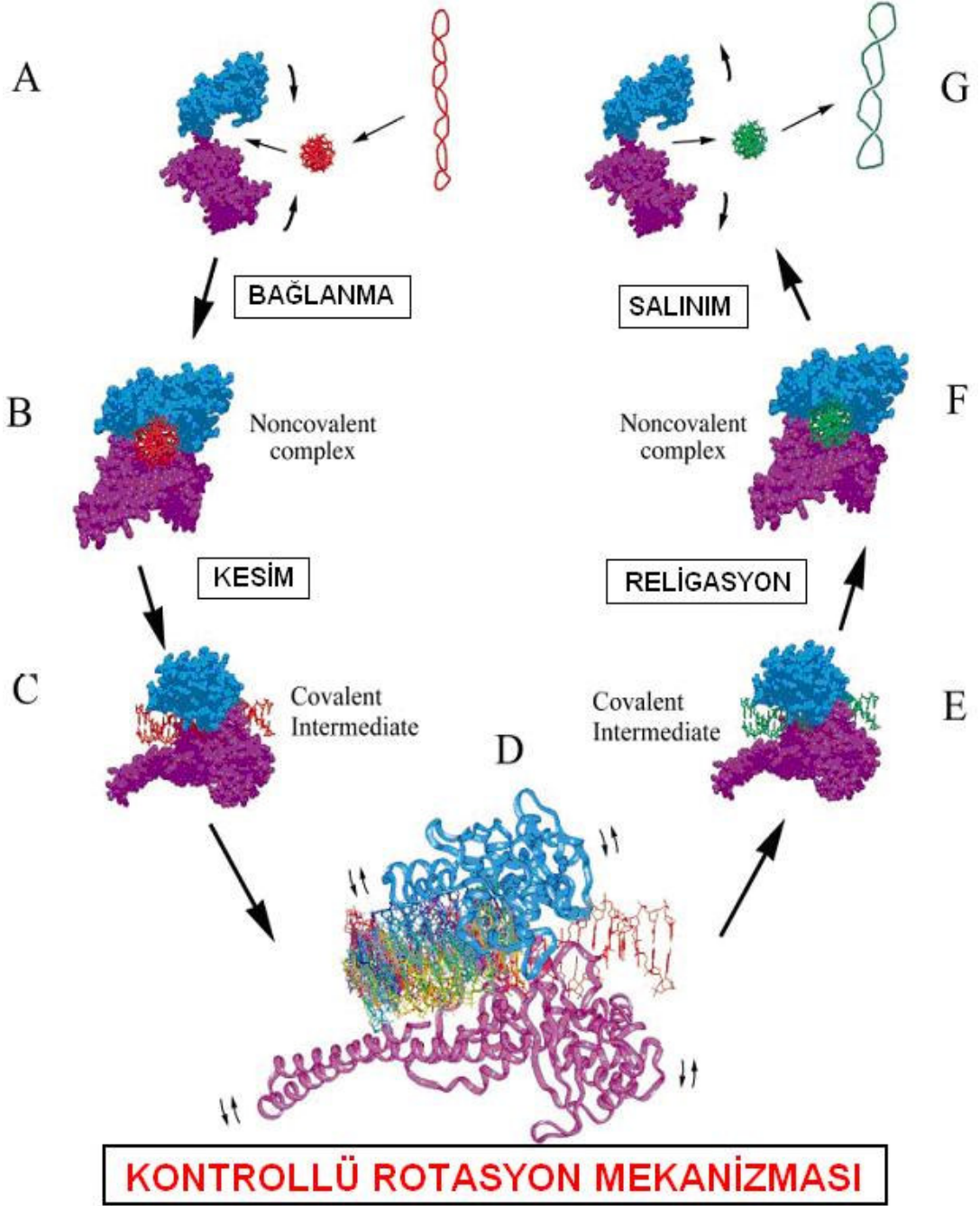


Şekil 2.5. İnsan DNA topoizomeraz enziminin moleküler yapısı ve domain organizasyonu (Leppard and Champoux, 2005)

Menteşe kısmının tam çaprazında bulunan ve enzimin "Lips (dudaklar)" olarak adlandırılan kısmı ise; proteinin alt bölgesini baş bölgesine yaklaştırmakla görevlidir. Bu etkileşim 6 adet aminoasit ve bir tek tuz köprüsü aracılığı ile olmaktadır. C-terminal domain, bağlayıcı domain aracılığıyla kor alt domain III'e bağlanır. C-terminal domain ise yapısında bulunan aktif bölge tirozini ile çift zincirli DNA'yı kısıkaç şeklinde sarar. Ayrıca enzimin DNA'yı sıkı bir şekilde sarabilmesinde DNA'nın fosfat iskeleti üzerine etkili bir çok protein-DNA etkileşimi de görev alır. Bu etkileşimlerin en çoğu -1 ve +1 nükleotit pozisyonları arasında meydana gelerek tanımlanan kesim ile kesim bölgesinin (-5 ten -1 e) 5 baz çiftlik ileri kısmında yoğunlaşmaktadır. Topoizomeraz I ile DNA sekansının etkileşime girmeyi tercih ettiği kısım; -1 pozisyonunda bulunan timin rezidusundaki ek parça ile 5'-(A/T).(G/C).(A/T).(T) 3' kısmını takip eden -4 den -1 e kadar olan nükleotit kısmıdır. Topoizomeraz I ayrıca daha az sıklıkla da olsa -1 pozisyonundaki sitozin rezidusunu da etkileşim için tercih etmektedir (Been et al.,1984; Tanizawa et al, 1993; Holden, 2001).

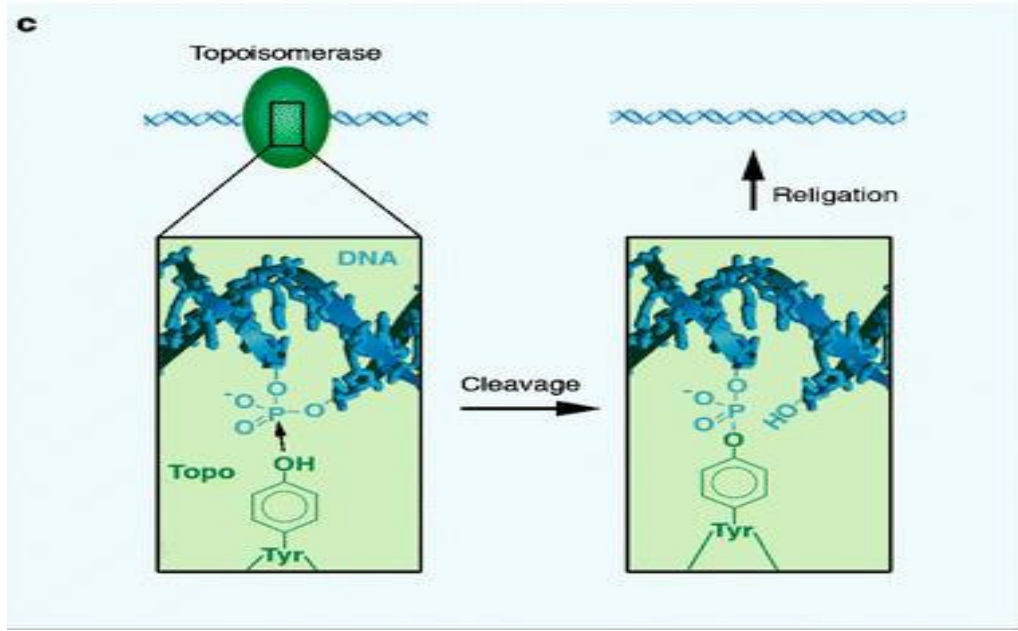
2.3.3.1.1.2. İnsan DNA Topoizomeraz I Enziminin Tepkime Mekanizması

Topoizomeraz I' in katalitik döngüsü; DNA'ya bağlanma, kesim, religasyon ve salınım basamaklarından meydana gelir. DNA relaxasyonu ise kesim ve religasyon basamakları arasında meydana gelir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. İnsan DNA topoizomeraz I' in kontrollü rotasyon mekanizması (Champoux, 2001; Wang, 1996, 2002)

Enzim DNA'yı kısıkaç şeklinde sardığı zaman enzimin aktif bölgesinde yer alan 5 amino asitten 4'ü (Arg-488, Lys-532, Arg-590 ve His-632) katalitik Tyr-723 tarafından yapılan nükleofilik atak süresince kesilebilir fosfatı pozisyonlamada rol oynar (Şekil 2.7). Reaksiyonun geçiş durumunun kararlılığı 3' fosfatın oksijen atomlarının köprülenememesi ve aktif bölge tetratı arasındaki etkileşimle sağlanabilir (Redinbo et al., 2000; Champoux, 2001).



Şekil 2.7. Topoizomeraz I enziminin DNA'ya bağlanması (Leppard and Champoux, 2005)

Enzim DNA'ya bağlanmak için genellikle kesim bölgesindeki -1 T/C bölgesini tercih eder. Lys-532; ilgili bazın oksijen atomu aracılığıyla hem -1 C hem de -1 T rezidularını içeren DNA ve enzim arasındaki bazı spesifik etkileşimlere aracılık etmektedir. Ayrıca Lys-532'nin; 5' oksijen uzaklaştırıcı gruba proton verdiği ve DNA replikasyonu tamamlandıktan sonra religasyon basamağına aracılık ettiği düşünülmektedir (Interthal et al., 2004). Arg-590 rezidusunun ise fenolat anyonunu stabil hale getirerek Tyr-723'ün nükleofilik yükünün artırılmasında rol oynadığı sanılmaktadır (Champoux, 2001).

Topoizomeraz I' in belirtilen kokristal yapıları DNA'ya bağlanır. Bu potansiyel DNA-enzim etkileşimleri ve bölgesel konformasyonel değişiklikler ile DNA rotasyonu gerçekleştirilmektedir. Enzimin bu elastikiyeti yani DNA'ya muhtemel yakınlığı pozitif yüklü aminoasitler aracılığıyla sağlanmaktadır. Bununla birlikte başın; enzimin dudak

bölgesinin alt kısmına çapraz bağlanmasıyla relaksasyonun kapalı kıskaç konformasyonda meydana geldiği düşünülmektedir (Redinbo et al.,1999; Leshner et al., 2002; Carey et al., 2003).

Ayrıca bağlayıcı ve N-terminal domainin bazı kısımları da rotasyonu etkiler. Bu kısımlar DNA ile etkileşime girdiği ve hatta enzimin aktif bölgesine uygulanan kıskaçın açık / kapalı halleriyle iletişim kurabilen bir sensor olarak rol oynadığı için topoizomeraz I tarafından meydana getirilen DNA relaksasyonu “kontrollü rotasyon mekanizması” ile meydana gelmektedir (Stewart et al., 1998).

2.4. Ökaryotik DNA Topoizomerazların Kromozom Ayrılması ve Mitozdaki Roller

DNA'nın çift zincirli yapısı, DNA'nın replikasyonu, transkripsiyonu ve kardeş molekülün ayrılması gibi metabolik işlemler sırasında önemli topolojik problemler doğurur. Örneğin, DNA molekülü boyunca replikasyon çatalı mekanizmasının ilerlemesi sırasında çatalın ilerisinde pozitif süpersarmal yapısı oluşur. Buna karşın, yeni replike olan atasal iplikler de negatif süpersarmal hale geçer (Cortes et al., 2003).

Çoğunlukla topoizomeraz I enzimleri DNA replikasyonu, transkripsiyon ve homolog rekombinasyonda görev alırken, bunlara ek olarak, topoizomeraz II enzimlerinin özgül ve eşsiz rolleri ise DNA replikasyonundan sonraki kardeş kromotitlerin ayrılması, kromozom yoğunlaşması ve mitoz sırasında anafazdan sonraki kromozom ayrılmasında görev almasıdır (Hatsuiker et al., 1998).

Topoizomeraz I ve topoizomeraz II β enzimleri hücre döngüsü sırasında miktar ve kararlılıkta herhangi bir değişim göstermez iken, topoizomeraz II α 'nın protein seviyesi, hücre döngüsünün pozisyonuna ve çoğalma basamağına bağlı olarak değişir. Topoizomeraz II α 'nın bu özel davranışı 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 gösterirler (Burden and Osheroff, 1998).

Topoizomeraz II α 'nın m-RNA seviyeleri S fazının sonu ve G2/M fazlarında artar ve G1 fazı hücrelerinde gözlenen miktardan birkaç kat daha fazladır. Topoizomeraz II α 'nın bu yüksek seviyeleri, şu iddiayı desteklemektedir; Topoizomeraz II α , çoğunlukla DNA replikasyonunun son aşamalarında gerekli olup, kromozomun çözülmesinde, yoğunlaşmasında ve mitotik ayrışmasında fonksiyon görür. Topoizomeraz II'nin aktivitesini önleyen çeşitli ilaçların farklı seviyeleri de endoreduplikasyon (DNA'nın miktarının ikiye katlamasının ardından, ayrışmanın ve hücre bölünmesinin olmamasından dolayı hücrenin kromozom sayısının ikiye katlanması) ve poliploidiyi uyarır. Bu da enzimin, kardeş kromotitleri ayırmak için gerekli olduğuna dair bir kanıttır (Kallio and Lahdetie, 1997; Cortes et al., 2003).

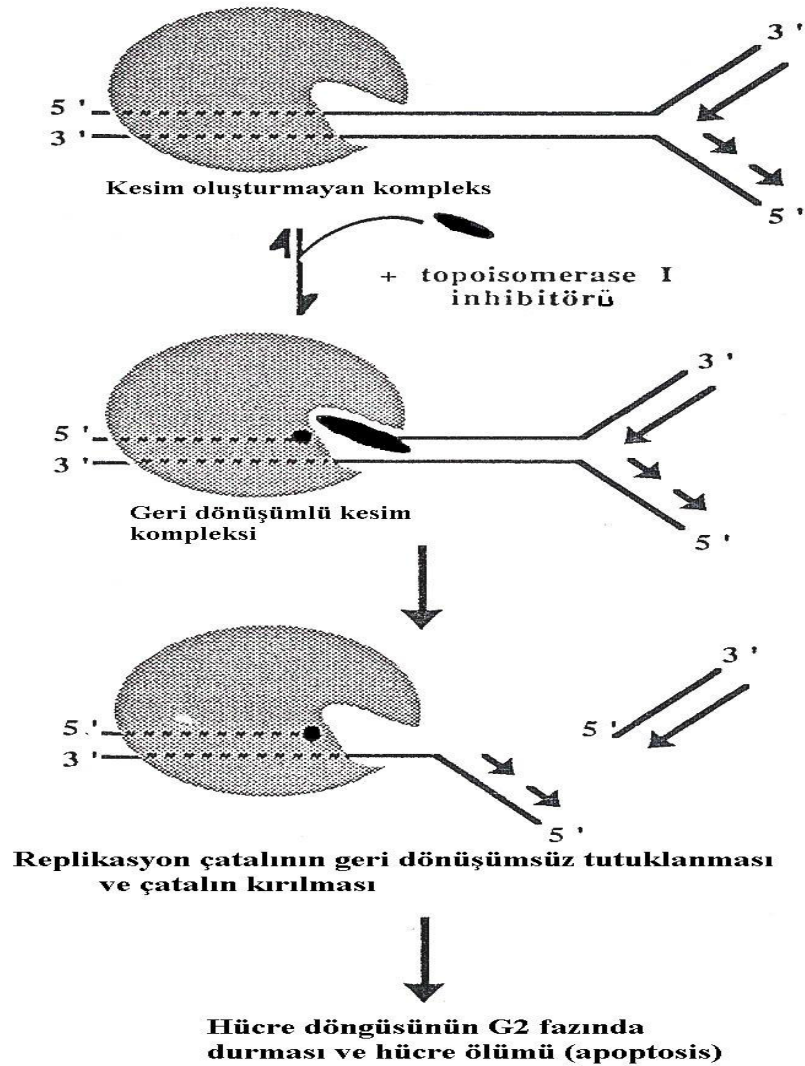
2.5. Topoizomeraz Enzimlerinin İnhibisyon Mekanizmaları

Topoizomeraz aktivitesini inhibe eden mekanizmalar oldukça farklıdır ve iki sınıfa ayrılır. Birincisi; **topoizomeraz zehirleri**, ikincisi; **katalitik inhibitörlerdir**. Topoizomeraz zehirleri, DNA-topoizomeraz enzim kompleksini stabilize eder ve DNA'da oluşan kırığın tekrar birleşmesini bloke ederler. Bu bileşikler, hücrelerde tek ya da çift zincir kırıklarını taşıyan DNA segmentlerinin birikmesine sebep olur ve buna bağlı olarak hücrede mutajenik olaylar ya da hücre ölümü (apoptozis) meydana gelir (Baguley and Ferguson, 1998). Topoizomerazların katalitik inhibitörleri ise; ya DNA'ya bağlanarak ya da topoizomerazlara bağlanarak DNA'nın enzime bağlanmasını önlerler. Ayrıca, topoizomeraz II enziminin katalitik döngüsü sırasında ATP'nin bağlanması veya serbest bırakılmasını engelleyen maddeler de bu sınıf inhibitörlere örnek olarak verilebilir (Fortune and Osheroff, 1998 ; Syrovets et al., 2000, Larsen et al, 2003).

Topoizomeraz I ve II enzimleri, klinikte kullanılan kemoterapötik ajanların moleküler hedefleridir. DNA topoizomerazlar, çekirdek enzimleri olup DNA'nın süperkırımlı yapısını çözerek onun replikasyonuna izin verir. Bunu yapmak için DNA'ya kovalent olarak bağlanır ve bir ara ürün olarak geçici *topoizomeraz-DNA kesim kompleksini* oluşturur. Enzim sonradan ya tek zincir (topoizomeraz I durumunda) ya da çift zincir (topoizomeraz II durumunda) kırıkları oluşturur ve kırıklardan DNA sarmalı geçer daha sonra da kırıkları tekrar birleştirir. Birbiri ardına gelen bu döngüler çift sarmalın topolojik yapısını yeterli bir şekilde değiştirerek DNA replikasyonu ve

transkripsiyonuna izin verir. Birçok antitümör ajan, bu geçici topoizomeraz-DNA kesim komplekslerini stabilize ederek topoizomerazları zehirler yani topoizomerazların geçici olarak kırılan DNA zincirlerini yeniden birleştirme aktivitesini yok eder ve böylece reaksiyon kesime doğru kayar (DNA molekülü durmadan kesilir). Bu topoizomeraz zehirleri aracılığıyla oluşan tek ve çift zincir kırıklarının birikmesi, sonuç olarak hücreyi ölüme (apoptozis) götürür (Şekil 2.8).

Katalitik inhibitörler ise topoizomeraz (I ve II)-DNA kesim komplekslerinin oluşumundan önceki basamakta topoizomerazların katalitik aktivitesini inhibe ederler (Kaina, 2003).



Şekil 2.8. Topoizomeraz I zehirlerinin etki mekanizması (Chen and Liu, 1994)

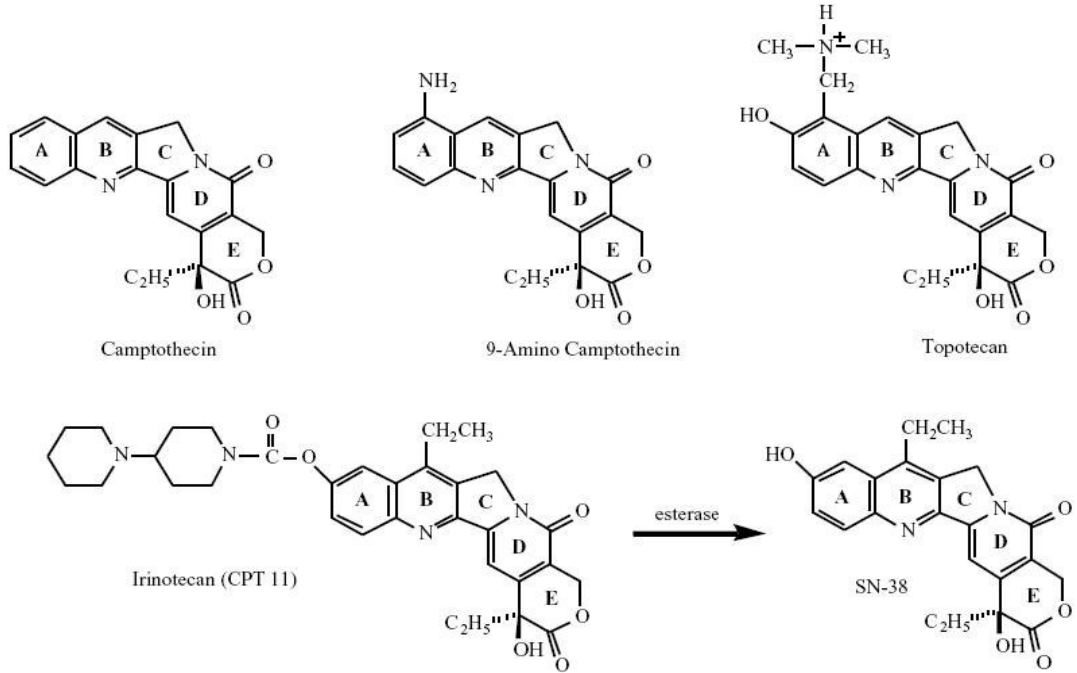
2.6. Topoizomeraz I Hedefli Kemoterapi

2.6.1. Topoizomeraz I Hedefli İlaçlar ve Bu İlaçlara Dirençlilik

2.6.1.1. Camptothecin (CPT)

Son zamanlarda, birçoğu anti-kanser özellik taşıyan ve ökaryotik topoizomeraz I ile etkileşim içinde bulunan birçok ilaç bulunmuştur. Bunlar birçok doğal ürünlerden ve antibiyotiklerden oluşur. Topoizomeraz I ile etkileşim içinde olan ilaçların sayısı her geçen gün artmakta ve her biri yeni bir makalenin ana konusunu oluşturmaktadır (Pommier, 1995; Bailly, 2000).

Şu anda kliniklerde kullanılan topoizomeraz I hedefli ilaçlar CPT türevidir (Şekil 2.9). Çin'de bulunan *Camptotheca acuminata* ağacından 1966 yılında izole edilen ilacın ilk çalışmalarda anti-kanser özelliklerinin saptanmasına rağmen klinik tartışmalar sonrası, kabul edilemez toksisitesi olduğu gösterilmiş ve üzerinde çalışılması durdurulmuştur. 1985 yılında topoizomeraz I in CPT'nin moleküler hedefi olduğu keşfedilmiştir (Hsiang et al., 1985). Daha sonra yapılan çalışmalarla da topoizomeraz I' in CPT'ler için tek moleküler hedef olduğu gösterilmiştir (Wall and Wani, 1996).



Şekil 2.9. CPT ve türevlerinin moleküler yapıları (Holden, 2001)

İnsan topoizomeraz I enziminin son kristalografik ve moleküler modelleme çalışmaları, CPT'e karşı oluşan hücresel duyarlılığın, enzimin ortamdaki seviyesine bağlı olduğunu göstermiştir. Topoizomeraz I in sekans özgüllüğü olmamasına rağmen, CPT genellikle kesik zincirin +1 pozisyonundaki G rezidusuna ilgi gösterir ve DNA dubleksinden 1+G rezidusunu uzaklaştırarak kesimden sonra enzimin DNA ile yeniden birleşmesini engellenmiş olur. CPT'nin DNA ve topoizomeraz I ile etkileşimini açıklayan mekanizma "ilaç yığılım mekanizması" olarak adlandırılır (Fan et al., 1998; Stewart et al., 1998).

Bu mekanizmaya göre CPT, topoizomeraz I ve +1 purin ile etkileşime girmektedir. CPT; enzim ile spesifik etkileşimini, yapısında içerdiği lakton E halkası ve S izomerik konfigürasyonundaki 20. hidroksil grubu ile sağlamaktadır. Ayrıca enzim aktivitesini ve ilaç direncini etkilediği bilinen topo I genindeki mutasyonlar, aktif bölgeyi çevreleyen amino asit rezidularını da etkilemektedir. Böylece CPT, kesimden sonra enzimin yeniden birleştirme aktivitesini engelleyerek nick atılmış DNA'nın yarı ömrünü uzatır. Bu olay tek başına hücre ölümüne sebep olmaz fakat ilacın stabilize ettiği DNA kırığı, bir replikasyon çatalı ile karşılaştığı zaman DNA zincir kırığı hücre ölümüne sebep olabilen çift zincir kırığına yol açar. CPT molekülü tarafından indüklenmiş DNA tek zincir kırıkları, replikasyon sırasında sadece kesiksiz zincirde oluşursa muhtemelen çift zincir kırıklarına dönüşürler. Böylece; bu tip ilaçlar topo I molekülünü DNA'ya hasar veren bir ajan haline çevirmiş olurlar. Bu duruma "stokiyometrik etkileşim" denilmektedir (Nitiss and Wang, 1996).

Sonuç olarak, bir topo I molekülü ile bir CPT molekülünün birleşimi her zaman bir DNA kırığı ile sonuçlanmaktadır ve bu durum hücrede her bir topo I molekülü için bir DNA kırığı potansiyelinin olmasının ve hücrelerin CPT'ye olan duyarlılığının neden topo I'in yüksek seviyesine bağlı olduğunun kanıtı olmaktadır. Yani daha fazla topo I, daha fazla DNA hasarı ve daha fazla hücreyi öldürme şansındır (Strumberg et al., 2000).

2.6.1.2. Topotecan ve İrinotecan

Topotecan ve İrinotecan suda çözülebilen CPT analoglarıdır. CPT molekülünün lakton halkası, enzimin aktif bölgesi ile tam olarak etkileşebilmesi için gereklidir. Fizyolojik pH'da lakton halkası, inaktif olan karboksilat formuna çevrilmek üzere hidrosillenir ve ayrıca en önemlisi CPT yüksek oranda çözünmez durumdadır. Topotecan ve irinotecan ise CPT'den daha çözünür halde ve lakton formları serumda daha kararlı durumdadır. Farklı substituentlerin değişik pozisyonlarda yapıya eklenmesi ile karboksilat formlarının insan serum albuminine bağlanması engellenmektedir (Mi and Burke, 1995; Burke, 1996). İnsan serum albumini, tercihen CPT'nin karboksilat formuna bağlanır. Böylece serumda lakton-karboksilat dengesinin, inaktif karboksilat molekülü lehine değişimi sağlanmış olur. İnsan serum albuminine, irinotecan ve topotecan molekülünün bağlanması ile oluşan direnç sonucu serumda yüksek oranda aktif lakton formu oluşmaktadır. Ayrıca flouourasil dirençli metastatik kolektoral kanser hastaları için irinotecan tedavisi, daha kaliteli bir hayat ve destekleyici tedavilerle karşılaştırıldığında daha uzun bir yaşam süresi sağladığı görülmüştür. Ayrıca irinotecanın inaktif olduğu malignansilerde SN-38 isimli aktif metaboliti oluşturularak daha etkili bir tedavi sağlanmaktadır (Cunningham et al., 1998; Rougier et al., 1998; Saltz et al., 2000).

Bu bileşiklerin son zamanlarda glisinat esterleri sentezlenmektedir. Bu esterler CPT nin aksine bileşiklerin suda çözünürlüklerini artırmakta, fizyolojik pH'da aktif ilaçlara hidrolize edilebilmekte ve daha az miktarda asetilkolin esteraz inhibisyonu göstermektedirler. Bu bileşiklerle yapılacak tedavi, tümör hücrelerinde DNA kırıklarının birikimini sağlayarak tümörlü hücrenin ölümünü kolaylaştırmaktadır (Wadkins et al., 1999).

Bu konu üzerine yapılan çalışmalar; topo I enziminin mayada ifade edilebilmesi hücre duyarlılığı ile, enzim ifadesinin engellenmesi ise ilaca karşı direnç ile sonuçlandığını göstermiştir (Bjornsti et al., 1989). Topo I geninde meydana gelebilecek mutasyonlar ilaca karşı direnci başlatır (Benedetti et al., 1993; Pommier et al., 1999).

2.7. Apoptozis ve Topo I - Hedefli İlaç Hasarının Onarımı

Topo I hedefli ilaçların oluşturduğu DNA hasarının, hücrenin ölümü üzerinde izlediği yolun işleyiş mekanizması daha tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen apoptozis yolu kullanılarak yapıldığı düşünülmektedir (Pantazis et al., 1999; Zhang et al., 1999). Bu yol için, p53 tümör süpresör geninin olması gerektiği düşünülmekte ve p53 proteini anti-kanser ilaçla indüklenen DNA hasarını apoptotik yol aracılığı ile hücre ölümüne yönlendirmektedir. p53 geninde mutasyon taşıyan kanserli hastaların da topo I hedefli kemoterapiye dirençli duruma geldiği bilinmektedir. Topo I'e karşı yürütülen ilaç tedavisinde hücre ölümünün p53'den bağımsız başka mekanizmalar tarafından da olabileceği belirtilmektedir (Lowe et al., 1993; McDonald and Brown, 1998).

Yapılan bir çalışmada; topo I ve DNA kovalent kompleksini tanıyabilen olası bir enzim aktivitesinin varlığı belirtilmiştir. Bu aktiviteyle topo I hedefli ilaçlarla oluşmuş hasarların tanınip onarıldığı düşünülmektedir. Bu enzim topo I üzerindeki aktif bölge tirozini ile kırık DNA zinciri arasında 3' fosfodiester tirozin bağı oluşturan tirozil-DNA fosfodiesterazdır. Bu topo I-DNA kompleksi, CPT analogları ile muamele edilen hücrelerde olması beklenen bir yapıdır. Bu enzimi kodlayan RAD9 geni mayadan izole edilmiştir. Çalışma sonucunda; RAD9 geninde mutasyon taşıyan ve ilaç indüklü DNA onarım mekanizmasına sahip olmayan mayaların, topo I hedefli ilaçlara karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. RAD9 gen aktivitesinin artması ile gözlenen bu durum, topo I hedefli ilaç tedavisine karşı oluşan olası bir direnç mekanizmasının varlığına işaret etmektedir (Pouliot et al., 1999).

Topo I hedefli ilaç toksisitesine dirençli olabileceği düşünülen başka bir mekanizma da CPT ile muamele edilen hücrelerin NF-kB (nükleer faktör kappa B) 'yi aktive etmesidir. NF-kB transkripsiyon faktörü olan bir protein kompleksi olup tüm hücrelerde bulunur ve oksidatif stres, serbest radikaller, sitokinler, UV. vb. etkilere karşı hücrel cevapta ve immün cevabın düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. Ayrıca retroviral onkoproteinlerle aynı homolojide olan bu kompleksin gen ifadesinin düzenlenmesi bozulduğunda kanserleşme ile ilgisi olabileceği düşünülmektedir (Albensi and Mattson, 2000; Gilmore, 2006). NF-kB' nin aktivasyonu; tüm anti-apoptotik etkileri olan genlerin ifadesini artırır. Bu durumun, CPT-indüklü apoptozise

karşı bir hücrenin doğal direnci olabileceği ve böylece tümör hücrelerinin topo I hedefli kemoterapiye karşı aşırı duyarlı hale gelebileceği belirtilmiştir (Wang et al., 1999).

Topo I hedefli anti-kanser ilaç tedavisine karşı kanser hücrelerinin oluşturacağı dirençleri araştırmada çok çeşitli mekanizmalar önemli roller oynamaktadır. İnsan kanserleri bazı konularda fare ksenograftlarından daha komplekstir. Ama her gün bir yenisi sentezlenen bu tip anti-kanser ilaçların topo I e aktif bir şekilde hedeflenebildiği gibi insan malignansilerine karşı da etkili oldukları kayda değer ve kanser tedavisinde umut verici bir durumdur. Topo I hedefli ilaçlar sadece laboratuvar çalışmalarında değil, tespit edilen etkili mekanizmalarından dolayı klinikte de yaygın bir şekilde kullanılmaya başlamıştır (Chen et al., 1999).

3. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLER

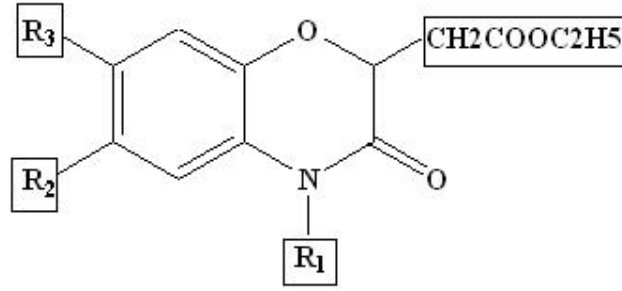
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan pBR322 plazmit DNA' sı MBL Fermentas'dan (SD0041), insan DNA topoizomeraz I enzimi Sigma' dan (T9069) sağlanmıştır.

Çalışmada ayrıca; fenil metil sülfonil florit (PMSF) (Sigma 7626), etil alkol (Sigma %99,5), dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck 802912), Tris-HCl (pH:7,5) (Genaxis GX12809), Tris bazı (AppliChem A1086), EDTA (AppliChem A1104), glasiyal asetik asit (Merck 100056), 6× yükleme boya çözeltisi (bromfenol mavisi + ksilen siyanol) (MBL Fermentas R0611), sodyum klorür (NaCl)(Sigma S925), β-merkaptoetanol (Merck 805740), agaroz (Sigma A5093), camptothecin (CPT) (Sigma C9911), sodyum dodesil sülfat (SDS) (L5750), etidyum bromür (Sigma) kullanılmıştır.

3.2. Test Edilen Kimyasal Bileşikler

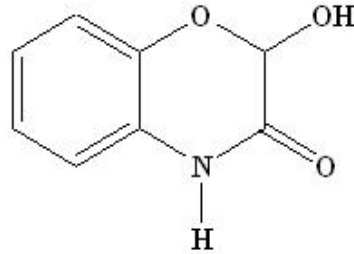
Test edilen 18 tane bileşikten 17 tanesinin (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17) benzoksazin halka yapıları ortak (Şekil 3.1), buna bağlı olarak R1, R2, R3 grupları ise birbirinden farklıdır. S18 kodlu benzoksazin bileşiği ise diğer bileşiklerden farklı bir yolla sentezlendiği için halka yapısı diğer 17 bileşiğinkinden farklıdır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. S1 – S17 bileşiklerin ortak halka yapıları

Çizelge 3.1. Test edilen kimyasal bileşikler

No	Kod	R ₁	R ₂	R ₃	Kapalı Formülü	Molekül Ağırlığı
1	S1	H	H	H	C ₁₂ H ₁₃ NO ₄	235
2	S2	H	CH ₃	H	C ₁₃ H ₁₅ NO ₄	249
3	S3	H	Cl	H	C ₁₂ H ₁₂ NO ₄ Cl	269
4	S4	H	COOC ₂ H ₅	H	C ₁₅ H ₁₇ NO ₆	307
5	S5	H	H	NO ₂	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₆	280
6	S6	H	H	NH ₂	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄	250
7	S7	H	Cl	NO ₂	C ₁₂ H ₁₁ NO ₆ Cl	314
8	S8	CH ₃	H	H	C ₁₃ H ₁₅ NO ₄	249
9	S9	CH ₃	CH ₃	H	C ₁₄ H ₁₇ NO ₄	263
10	S10	CH ₃	Cl	H	C ₁₃ H ₁₄ NO ₄ Cl	283
11	S11	CH ₃	COOC ₂ H ₅	H	C ₁₆ H ₁₉ NO ₆	321
12	S12	CH ₃	H	NO ₂	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₆	294
13	S13	CH ₃	Cl	NO ₂	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₆ Cl	328
14	S14	C ₂ H ₅	H	H	C ₁₄ H ₁₇ NO ₄	263
15	S15	C ₂ H ₅	Cl	H	C ₁₄ H ₁₆ NO ₄ Cl	297
16	S16	C ₂ H ₅	H	NO ₂	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₆	308
17	S17	C ₂ H ₅	Cl	NO ₂	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ O ₆ Cl	342



Şekil 3.2. S18 bileşiğinin halka yapısı

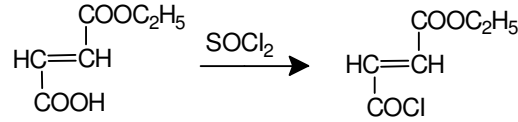
NO	KOD	KAPALI FORMÜL	Moleküler Ağırlığı
18	BS18	C ₈ H ₇ NO ₃	165

3.3. Benzoksazin Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri

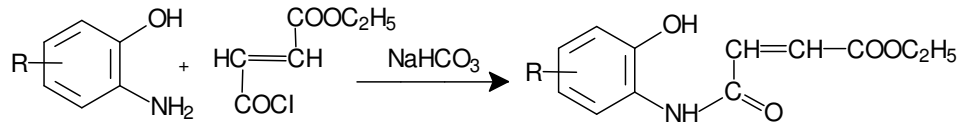
Tez çalışmasında DNA topoizomeraz I enzimi üzerinde inhibisyon etkilerinin olup olmadığı test edilen kimyasal bileşikler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasotik Kimya Anabilim dalından Prof. Dr. Esin Şener, Prof. Dr. İsmail Yalçın ve çalışma grubu tarafından sentezlenmiştir (Çizelge 3.1). Sentez yöntemleri aşağıda kısaca özetlenmiştir:

3.3.1. S1, S2, S3, S4, S5 ve S7 Bileşiklerinin Genel Sentez Yöntemi

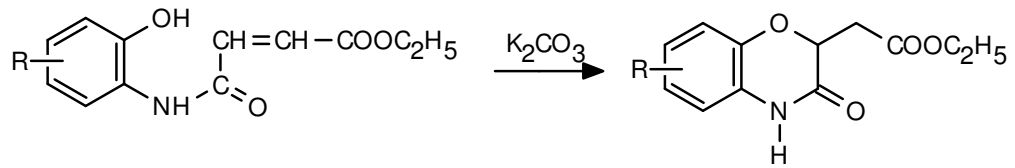
Monoetil fumarat, tiyonil klorür ile benzen içinde, ve geri çeviren soğutucu altında 3 saat süreyle 80 °C'da magnetik karıştırıcı üzerinde ısıtıldı. Reaksiyon bitiminde çözücü ve tiyonil klorürün aşırısı ortamdaki uzaklaştırıldı ve sıvı haldeki monoetil fumaril klorür elde edildi.



Elde edilen monoetil fumaril klorür, 4 veya 5-sübstitüe-2-aminofenol ve sodyum bikarbonatın dioksan içindeki çözeltisine ilave edildi ve karışım oda sıcaklığında 24 saat süre ile magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Reaksiyon süresi sonunda elde edilen karışım suya döküldü ve etil asetat ile ekstre edildi. Toplanan etil asetatlı faz su ile yıkanıp, susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek suyundan arındırıldı ve kuruluğa kadar uçuruldu. Bakiye etanolde çözülerek, soğukta kristallendirildi ve kristaller süzülerek toplandı.



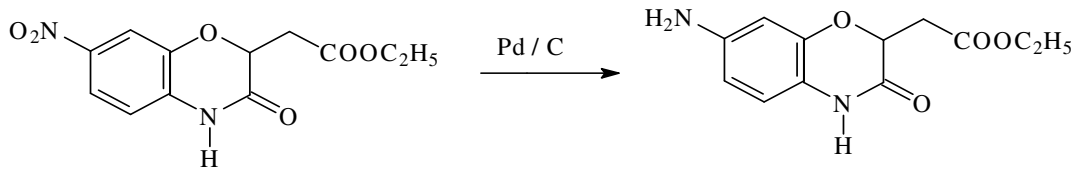
Böylece elde edilen etil 3-[(4 veya 5-sübstitüe-2-hidroksifenil)karbamoil] akrilat ve potasyum karbonat, etanol içerisinde oda ısısında 3 saat magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Reaksiyon süresi sonunda karışım su içine boşaltıldı ve etil asetat ile ekstre edildi. Toplanan etil asetatlı faz su ile yıkanıp, susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek sudan arındırıldı ve kuruluğa kadar uçuruldu. Bakiye etanolde çözülerek soğukta kristallendirildi. Kristaller süzülerek toplandı ve vakum etüvünde kurutuldu.



Bu sentez basamakları kullanılarak S4 bileşiğinin ilk kez sentezi yapılmıştır (Alper-Hayta S. et al., 2006). S1 ,S2, S3 bileşikleri (Masuoka et al., 1986), S5 ve S7 bileşikleri (Tekiner, 1997) ise farklı literatür bilgilerinden yararlanılarak sentezlenmiştir.

3.3.2. S6 Bileşiğinin Genel Sentez Yöntemi

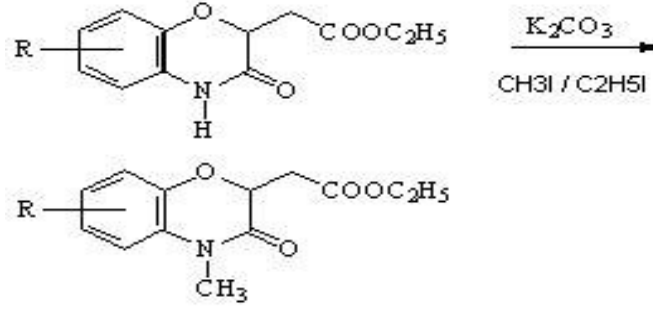
Etil 3,4-dihidro-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat bileşiği etanolde çözüldü. Parr apareyinde Pd / C katalizörlüğünde hidrojen gazı ile yarım saat muamele edilerek redüksiyona uğratıldı. Redüksiyon ürünü selit'ten süzüldü. Çözücü evaporatörde uçurulduktan sonra saf redüksiyon ürünü elde edildi. Bileşik vakum etüvünde kurutuldu.



Bu sentez basamağı kullanılarak S6 bileşiğinin ilk kez sentezi yapılmıştır (Alper-Hayta S. et al. ,2006).

3.3.3. S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16 ve S17 Bileşiklerinin Genel Sentez Yöntemi

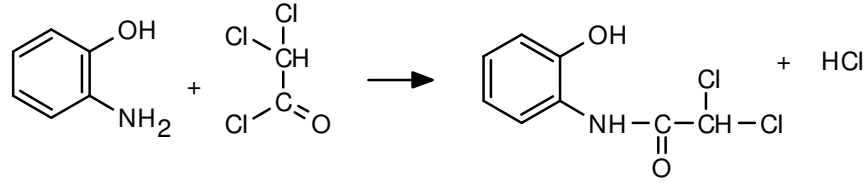
Elde edilen 3,4-dihidro-6- ve/veya 7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat türevleri vakum etüvünde kurutulduktan sonra potasyum karbonat ve metil / etil iyodür ile aseton içerisinde geri çeviren soğutucu altında 4 saat, 40°C 'de karıştırıldı. Reaksiyon bitiminde çözücü evaporatörde uçuruldu. Bakiye etil asetatla ekstre edilerek, su ile yıkandı. Daha sonra susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek suyundan kurtarıldı. Etil asetatlı faz evaporatörde kuruluğa kadar uçurulduktan sonra elde edilen yağimsı ürün eter:n-hekzan karışımından kristallendirildi. Kristaller süzülerek toplandı ve vakum etüvünde kurutuldu.



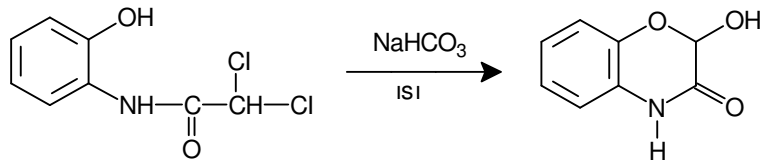
Bu sentez basamakları kullanılarak S8, S9, S10, S11, S12 ve S13 bileşiklerinin ilk kez sentezi yapılmıştır (Alper-Hayta S. et al., 2006).

3.3.4. BS18 Bileşiğinin Genel Sentez Yöntemi

Kuru eter içindeki 2-aminofenol çözeltisi üzerine damla damla dikloroasetil klorür süspansiyonu ilave edilerek, 1,5-2 saat süre ile oda ısısında magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Reaksiyon süresi bitiminde karışım, pileli süzgeç kağıdından süzülerek eterli çözelti ayrıldı ve soğukta kristalize edilerek erime noktası 132-133 °C olan N-dikloroasetil-2-aminofenol elde edildi.



Elde edilen N-dikloroasetil-2-aminofenol bileşiği, sulu sodyum bikarbonat içinde 1,5 saat kaynatıldı. Reaksiyon süresi bitiminde karışım soğutuldu ve sırasıyla 2N HCl ile asitlendirildi ve eter ile ekstre edildi. Bu ekstreler toplandı ve susuz sodyum sülfat ile muamele edilerek sudan arındırıldı ve kuruluğa kadar uçuruldu. Bakiye etanolde çözülerek, soğukta kristallendirildi. Kristaller süzülerek toplandı ve vakum etüvünde kurutuldu.



3.4. Benzoksazinlerin İnsan DNA Topoizomeraz I Enzimi Üzerine Etkileri

3.4.1. İnsan DNA Topoizomeraz I Enzim Aktivitesinin Kontrolü

Deneylerde, substrat olarak %90 süperkırımlı formda olan **pBR322 plazmid DNA'sı** ve ökaryotik enzim kaynağı olarak da insan DNA topoizomeraz (I) enzimi kullanıldı. Ticari olarak elde edilen pBR 322 plazmid DNA'sı 4361 baz çifti uzunluğunda, %90'dan daha fazla oranda süperkırımlı formda ve saflığı $A_{260}/A_{280} = 1.8$ (DNA saflık aralığı, 1.8 -2.0 'dir) olarak belirtilmiştir.

Çalışmada öncelikle, pBR322 plazmid DNA'sının DNA topoizomeraz I enzimi aracılığıyla relaks forma dönüştürülmesi test edilerek enzimin aktivitesinin kontrolü yapıldı ve daha sonra farklı konsantrasyonlardaki benzoksazin türevi bileşikler ile pBR322 plazmid DNA'sı, DNA topoizomeraz I enzimi ile inkübe edilip, bileşiklerin topoizomeraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin olup olmadığı yatay agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. DNA topoizomeraz I enzim aktivitesinin kontrolü için;

- enzim miktarı,
- substrat konsantrasyonu,
- reaksiyon ortamının miktarı
- enzim inkübasyon süresi,
- pozitif inhibitörün etkisi,

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

10 xTopoizomeraz I Reaksiyon Tamponu

100 mM Tris-HCl (pH : 7,5)
1000 mM NaCl,
10 mM PMSF (Fenilmetilsülfonilflorit),
10 mM 2-Merkaptoetanol

10xTris-Asetat-EDTA Yükleme Tamponu (pH:8.0)

48.4 g Tris baz
11.4 ml Glasiyel asetik asit
3.72 g EDTA
distile su ile 1000 ml' ye tamamlandı.

Reaksiyon tamponu içerisine farklı konsantrasyonlarda pBR322 plazmid DNA'sı ve değişik miktarlarda topoizomeraz I enzimi ilave edilerek toplam hacim distile su ile 10 µl 'ye tamamlandı. Reaksiyon tüpleri, topoizomeraz I'in maksimum aktivite gösterdiği

37°C sıcaklıktaki su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Enzim aktivasyonu tamamlandıktan sonra her bir tüpe 2µl 6x yükleme boya çözeltisi (bromfenol mavisi + ksilen siyanol) + 1µl SDS 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 jelde yürütüldü.

Substrat konsantrasyonu olarak 0.1 µg, 0.2 µg ve 0.3 µg DNA, enzim miktarı olarak da 1, 2 ve 3 ünite enzim (İnsan DNA topoizomerez I) konsantrasyonları denendi. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jeller ethidyum bromür (1µg/ml) ile boyandı ve UV lambası altında DNA bantları gözlenerek jellerin fotoğrafı çekildi. Substrat ve enzim konsantrasyonları belirlendikten sonra yukarıda belirtilen aynı deney ortamına toplam 18 adet benzoksazin türevi bileşiğin ayrı ayrı 6 farklı konsantrasyonu (4000, 5000, 6000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) ilave edildi ve bu moleküllerin topoizomerez I enziminin katalitik aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin olup olmadığı agaroz jel elektroforezinde incelendi (Çalışılan bileşiklerin tümü, %20'lik DMSO'da (%20 DMSO + %80 Etil alkol) çözüldü).

Topoizomerez I için ünite tanımı : 1 ünite enzim, 0,2 µg süperkırımlı DNA'yı, standart deney koşulları olan 37 °C sıcaklıkta ve 1 saat inkübasyon süresinde relaks hale dönüştürebilen enzim miktarıdır.

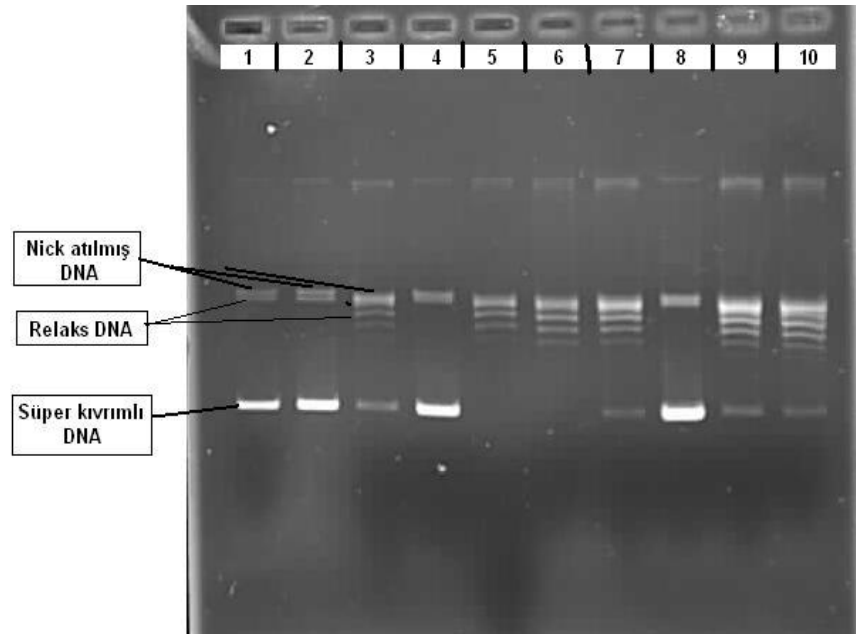
Deneylerde topoizomerez I enzimi için pozitif inhibitör olarak camptothecin (CPT) kullanıldı. Yukarıda belirtilen reaksiyon ortamına 40, 80 ve 120 µM konsantrasyonlarda camptothecin ilave edilerek aynı şekilde DNA bantları görüntülendi ve en etkili olan pozitif inhibitör konsantrasyonu 120 µM belirlendi.

Jel analyzer system ile DNA bant yoğunlukları ölçüldü ve her kimyasal bileşik için % inhibisyon değeri = ilaç ile muamele edilen DNA 'nın yoğunluğu / kontrol DNA'nın yoğunluğu x100 formülü ile hesaplandı (Park et al., 2004). Bileşiklerin topoizomerez I üzerinde %50 inhibisyon etkisi gösterdikleri konsantrasyonları (IC50), probit programı kullanılarak her bileşik için elde edilen grafiğin eğiminden µM ve µg/µl cinsinden hesaplandı. Bileşiklerin yapı-aktivite (SAR) ilişkilerinin analizi, IC50 değerleri esas alınarak nitel olarak gerçekleştirildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Ökaryotik DNA Topoizomeraz I Enzimin Aktivite Sonuçları

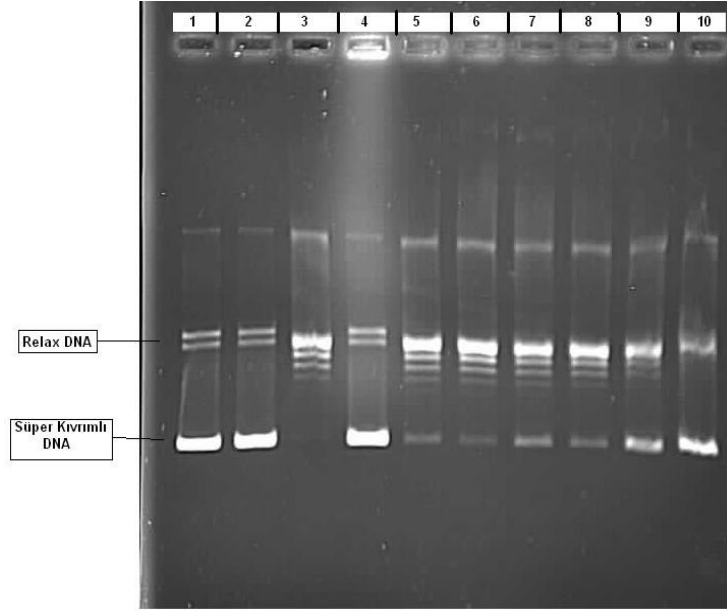
Topoizomeraz I enziminin aktivitesi, farklı miktarlarda enzim (1, 2 ve 3 ünit) ve değişik konsantrasyonlarda substrat (0.1, 0.2 ve 0.3 µg DNA) kullanılarak standart hale getirildi. Şekil 4.1'deki jel görüntüsüne göre, hem 1 ünit hem de 2 ünit enzimin 0.2 µg DNA'yı tam olarak relaks forma dönüştürebildiği belirlendi. Bu sonuçlara göre, bütün deneylerde enzim miktarı olarak 1 ünite enzim ve substrat konsantrasyonu olarak da 0.2 µg DNA kullanıldı. Deneylerimizde, topoizomeraz I için pozitif inhibitör olarak kullandığımız camptothecin'in 120 µM'lık konsantrasyonu uygulandı.



Şekil 4.1. Topoizomeraz I enzim aktivitesinin kontrolü

1. Kuyucuk : 0,1 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,1 µg DNA + 1 ünite Topo I
3. Kuyucuk : 0,1 µg DNA + 2 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 2 ünite Topo I
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 3 ünite Topo I
8. Kuyucuk : 0,3 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
9. Kuyucuk : 0,3 µg DNA + 1 ünite Topo I
10. Kuyucuk : 0,3 µg DNA + 2 ünite Topo I

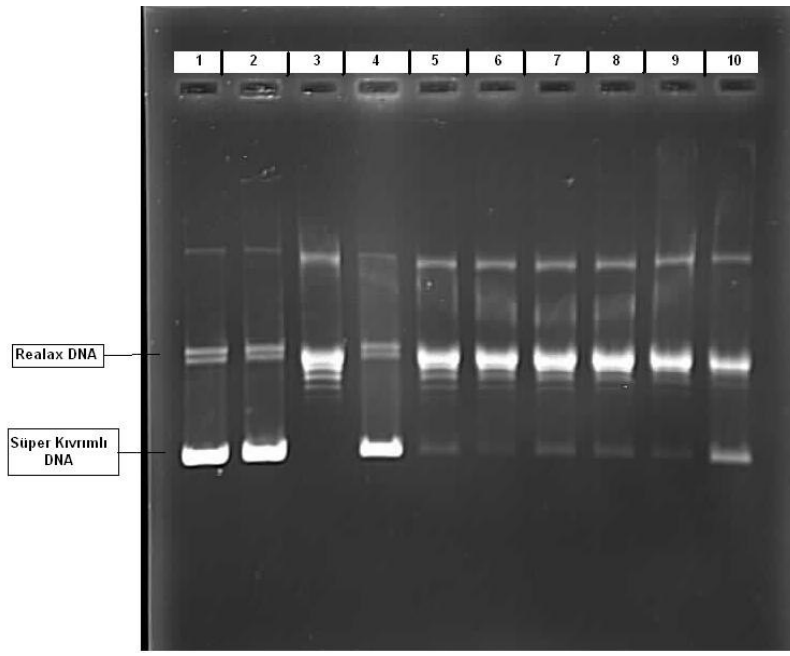
4.2. Benzoksazin Türevlerinin Topoizomeraz I İnhibisyon Etkilerinin Sonuçları



Şekil 4.2. S1'in Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S1)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S1)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S1)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S1)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S1)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S1)
- 10.Kuyucuk :0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S1)

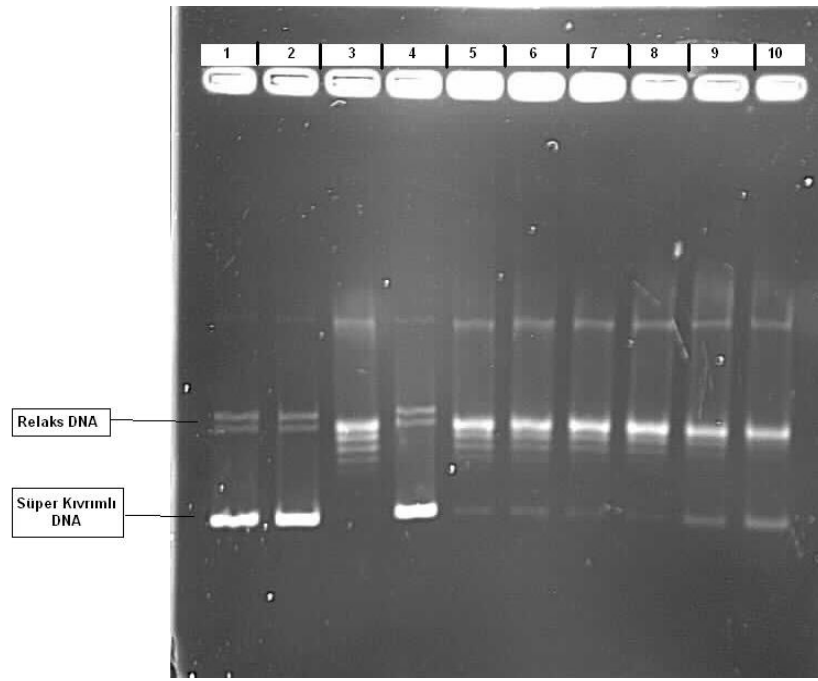
Şekil 4.2'de görüldüğü gibi, S1 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S1 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süperkırımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.3. S2'nin Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S2)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S2)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S2)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S2)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S2)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S2)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S2)

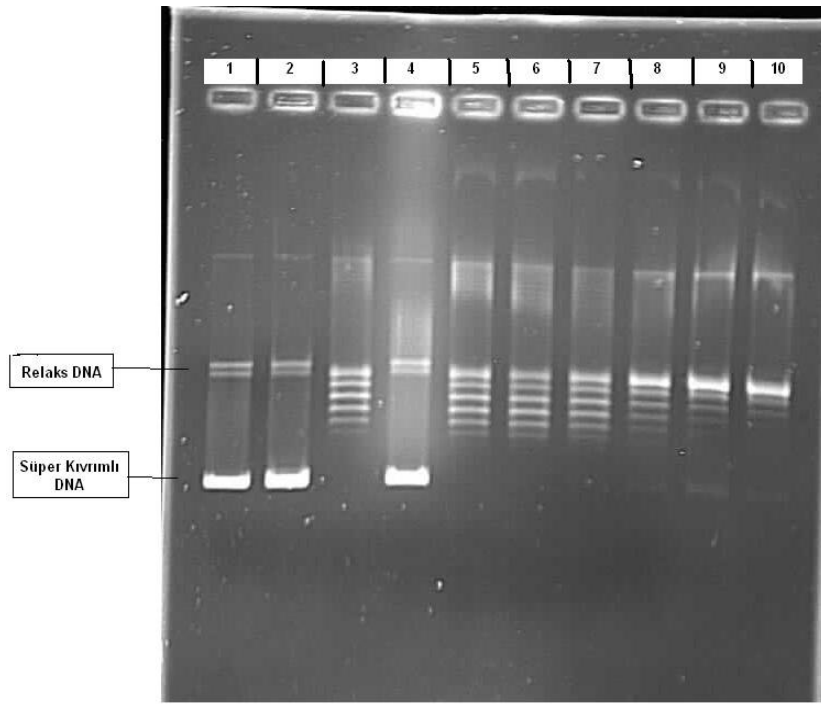
Şekil 4.3'de görüldüğü gibi, S2 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8.000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S2 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve özellikle 10.kuyucukta büyük kısmı süperkıvrımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.4. S3'ün Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S3)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S3)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S3)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S3)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S3)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S3)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S3)

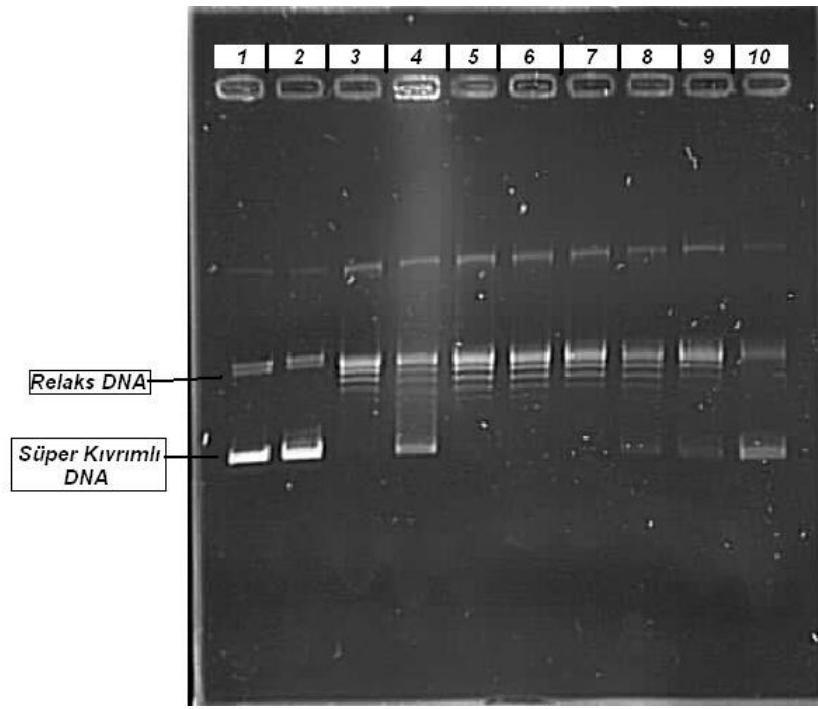
Şekil 4.4'de görüldüğü gibi, S3 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S3 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süperkırımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.5. S4'ün Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S4)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S4)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S4)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S4)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S4)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S4)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S4)

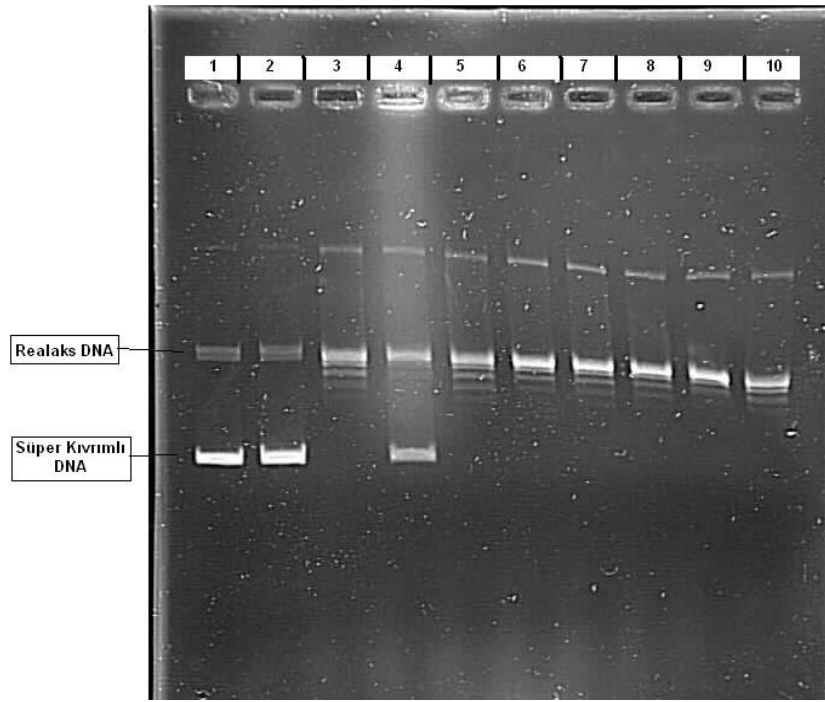
Şekil 4.5'de görüldüğü gibi, S4 bileşiğinin 8000, 10.000 ve 12.000 µM'lık konsantrasyonlarının DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 8.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S4 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve bir kısmı süperkırımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.6. S5'in Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S5)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S5)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S5)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S5)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S5)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S5)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S5)

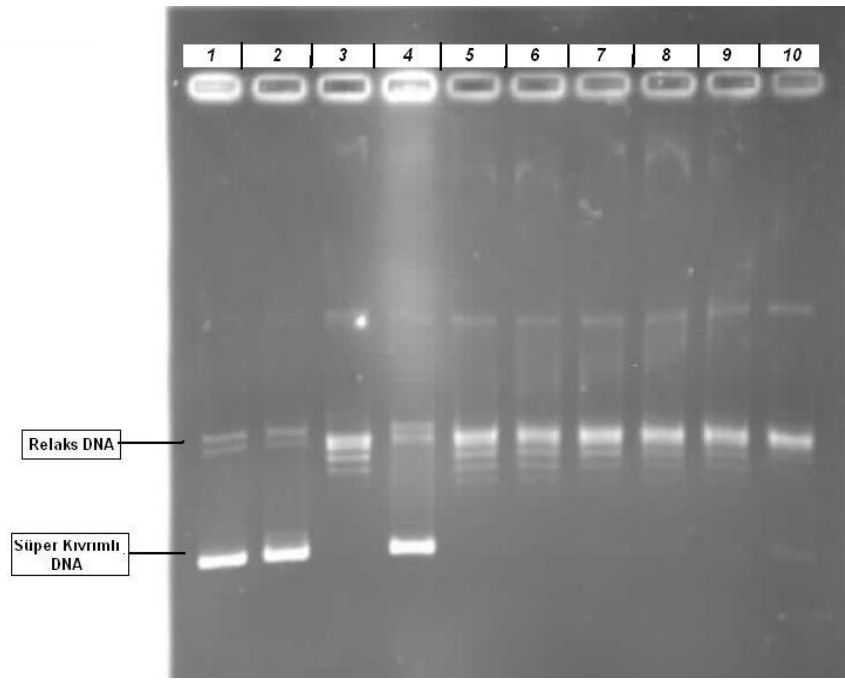
Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, S5 bileşiğinin 8000, 10.000 ve 12.000 µM'lık konsantrasyonlarının DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 8.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S4 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve özellikle 10. kuyucukta büyük bir kısmı süperkıvrımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.7. S6'nın Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S6)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S6)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S6)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S6)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S6)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S6)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S6)

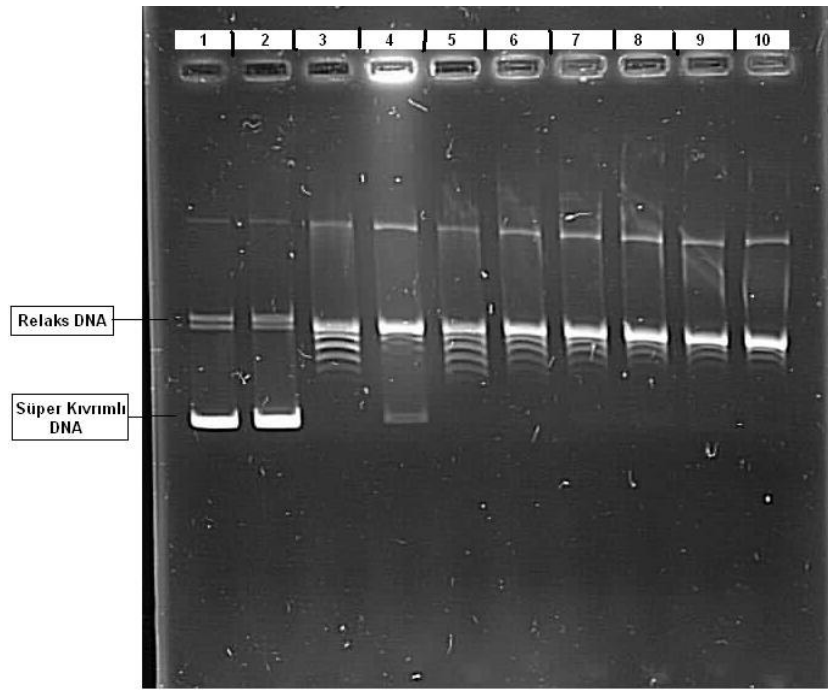
Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, S6 bileşiğinin denenen konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) hiçbirinin DNA topoisomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe etmediği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoisomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S6 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesinde bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Ortama S6 bileşiğinin denenmemiş artan konsantrasyonları eklendiği takdirde inhibisyonun daha etkili olabileceği düşünüldüğü için deney artan konsantrasyonlarla çalışılarak tekrar edilmiştir.



Şekil 4.8. S6'in artan konsantrasyonlarının Topoizomeraz I ' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 25.000 µM (S6)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 12.250 µM (S6)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 12.500 µM (S6)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 15.000 µM (S6)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 18.750 µM (S6)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 20.000 µM(S6)
10. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +25.000 µM (S6)

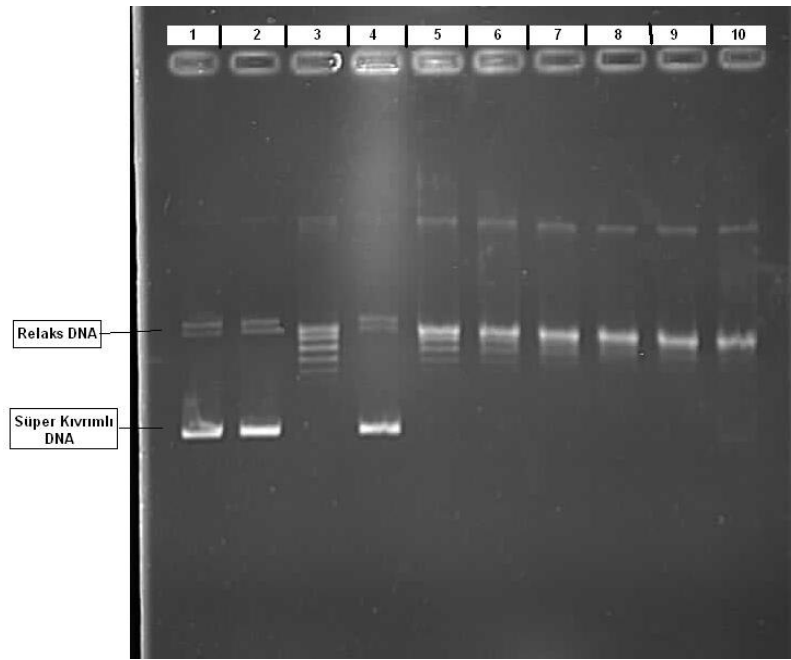
Şekil 4.8'de görüldüğü gibi, S6 maddesi ile ilgili deney daha önce denenmemiş artan konsantrasyonları (12.250, 12.500, 15.000, 18.750, 20.000 ve 25.000 µM) denenerek tekrar edilmiştir. Yeni denenen bu konsantrasyon aralığında, 25.000 µM konsantrasyondaki S6 bileşiğinin DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 2. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 10. kuyucukta ise, enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve bir kısmı süperkıvrımlı formda kalmaktadır



Şekil 4.9. S7'nin Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S7)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S7)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S7)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S7)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S7)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S7)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S7)

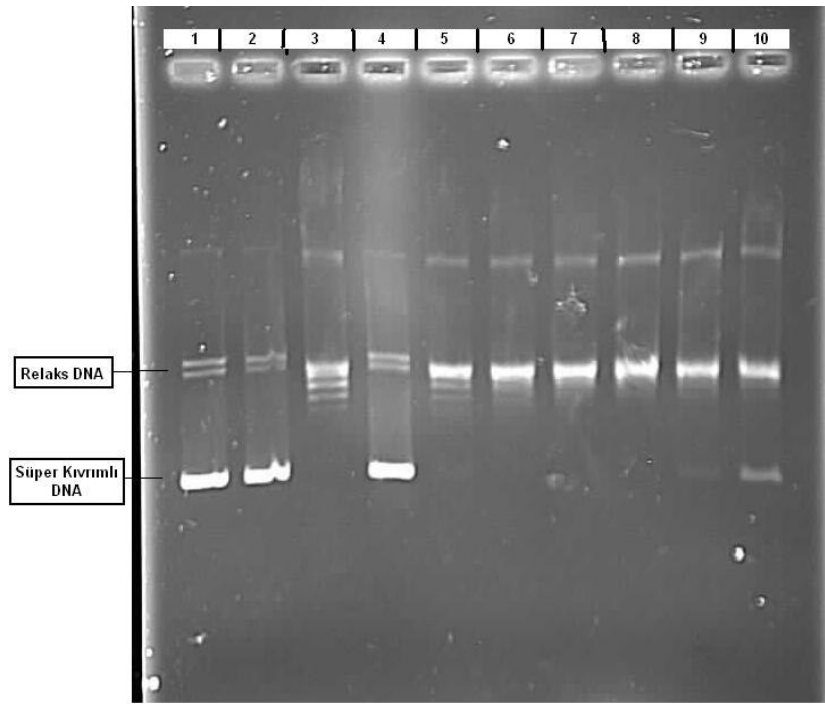
Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, S7 bileşiğinin 6.000, 8.000, 10.000 ve 12.000 µM'lık konsantrasyonlarının DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini çok az da olsa inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 7.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S7 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve çok az bir kısmı süperkıvrımlı formda kalmaktadır. S7 bileşiğinin artan konsantrasyonlarının denenmesi durumunda inhibisyon etkisinin daha da belirgin olarak görüleceği düşünülmektedir.



Şekil 4.10. S8'in Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S8)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S8)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S8)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S8)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S8)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S8)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S8)

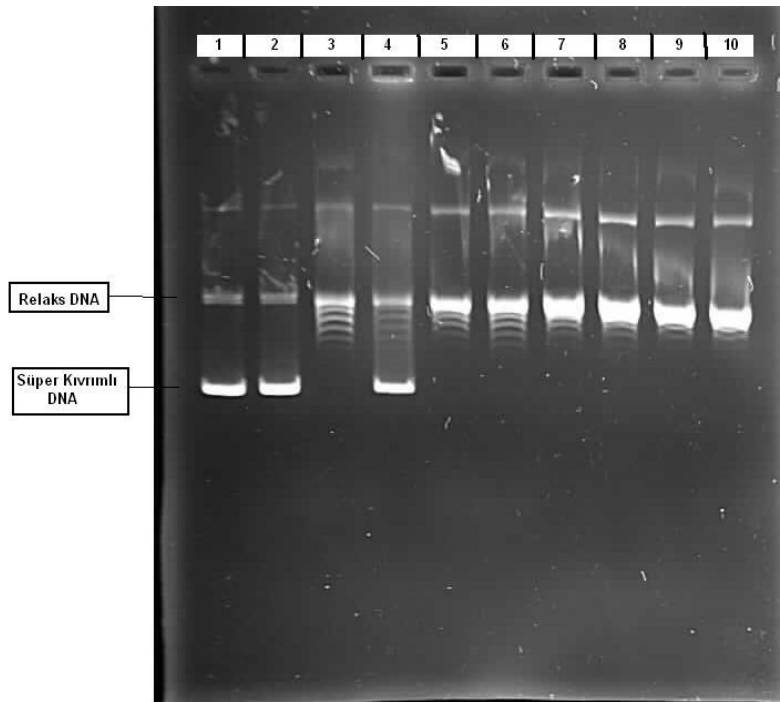
Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, S8 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonları içinde 12.000 µM'lık konsantrasyonunun DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 10. kuyucukda ise enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve bir kısmı süperkırımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.11. S9'un Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S9)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S9)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S9)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S9)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S9)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S9)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S9)

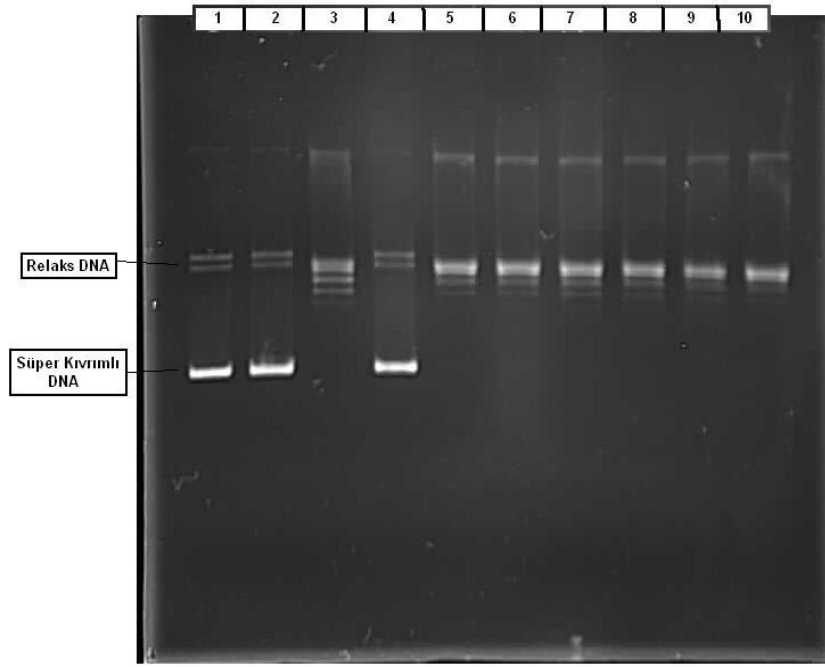
Şekil 4.11'de görüldüğü gibi, S9 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonları içinde 10.000 ve 12.000 µM'lık konsantrasyonlarının DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 9. ve 10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S9 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve özellikle 10. kuyucukta büyük bir kısmı süperkırımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.12. S10'un Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S10)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S10)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S10)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S10)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S10)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S10)
10. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 12.000 µM (S10)

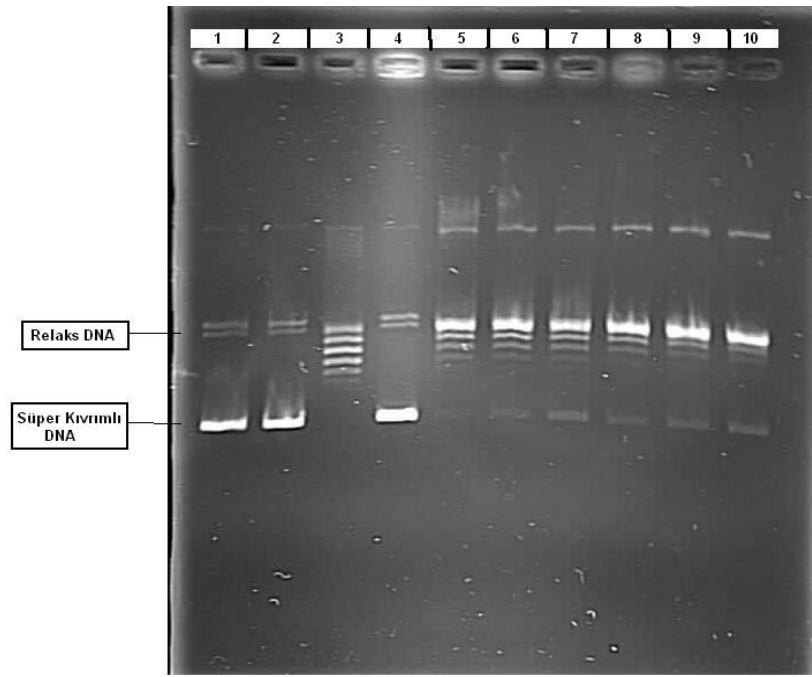
Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, S10 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği görülmektedir. 5.,6.,7.,8.,9. ve 10. kuyucuklarda, bileşik dozu arttıkça nick atılmış DNA bantının kontrole (1. kuyucuk) göre kalınlaştığı gözlenmektedir. S10 bileşiği, topo I enziminin tek zincirli DNA kırıklarını tekrar birleştirme aktivitesini inhibe ederek tek zincirli DNA kırıklarının (nick) artmasına neden olmakta ve topoizomeraz zehiri olarak güçlü inhibisyon etkisi göstermektedir.



Şekil 4.13. S11'in Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S11)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S11)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S11)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S11)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S11)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S11)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S11)

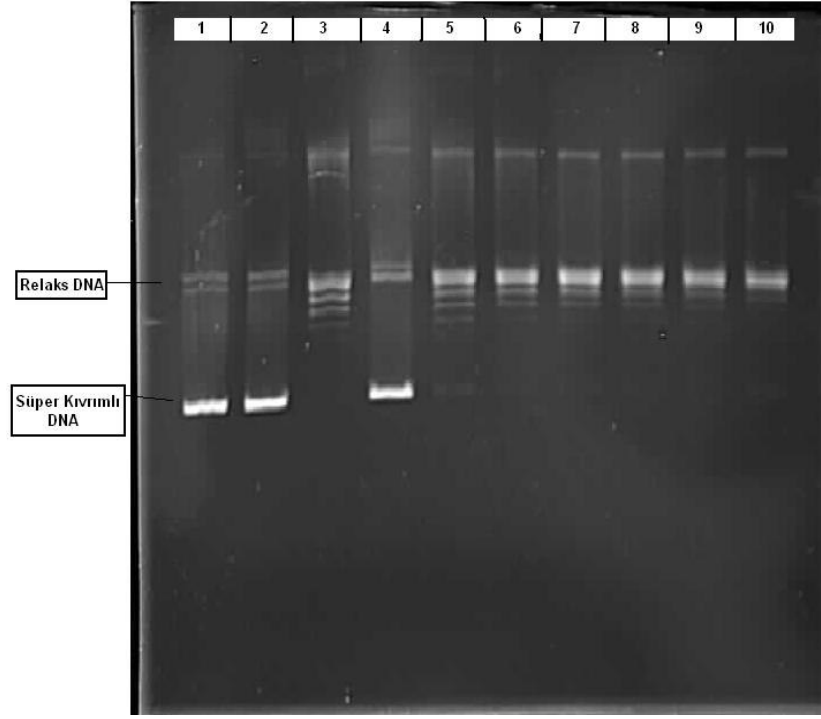
Şekil 4.13'de görüldüğü gibi, S11 bileşiğinin denenen konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) hiçbiri, DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermemiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.,6.,7.,8.,9. ve 10. kuyucuklarda ortama artan konsantrasyonlarda S11 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesinde bir değişiklik olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.14. S12'nin Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S12)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S12)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S12)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S12)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S12)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S12)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S12)

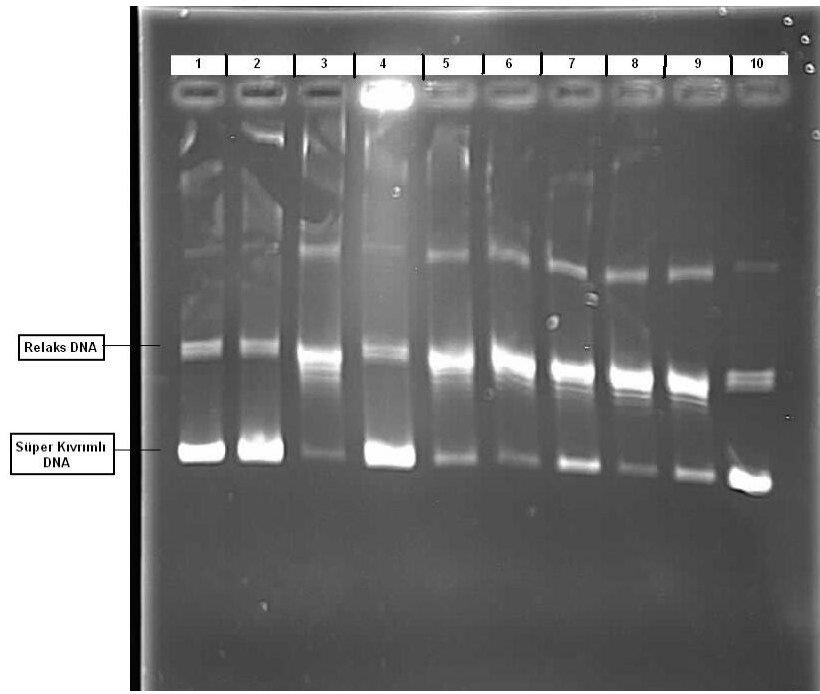
Şekil 4.14'de görüldüğü gibi, S12 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8.000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S12 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve özellikle son 4 kuyucukta bir kısmı süperkıvrımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.15. S13'ün Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S13)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S13)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S13)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S13)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S13)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S13)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S13)

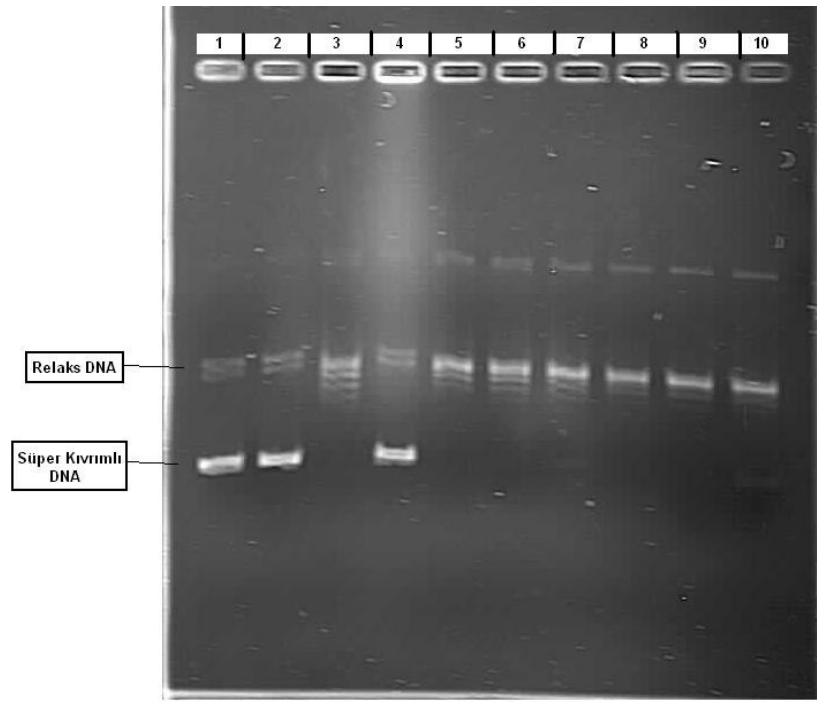
Şekil 4.15'de görüldüğü gibi, S13 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S13 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süperkırımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.16. S13'ün artan konsantrasyonlarının Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 25.000 µM (S13)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 12.500 µM (S13)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 15.000 µM (S13)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 18.750 µM (S13)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 20.000 µM (S13)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 25.000 µM(S13)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I (inkübe edilmiş)

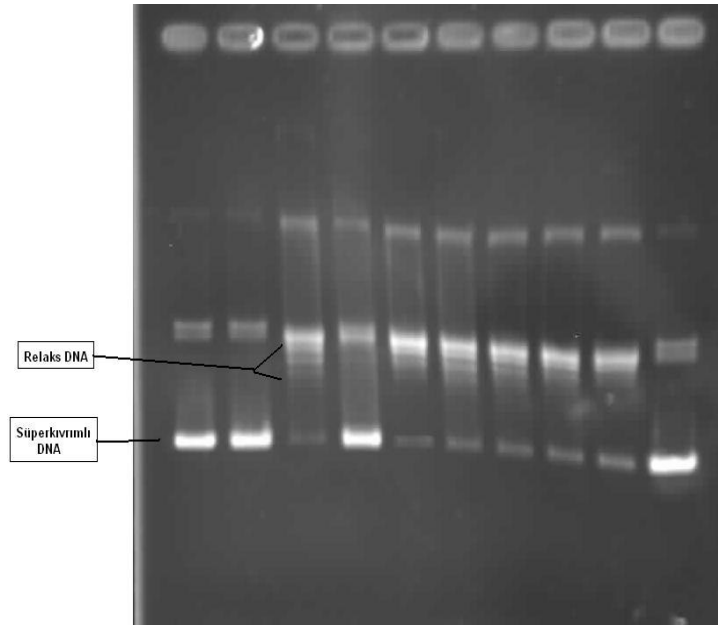
Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, S13 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoisomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoisomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S13 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süperkıvrımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.17. S14'ün Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S14)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S14)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S14)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S14)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S14)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S14)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S14)

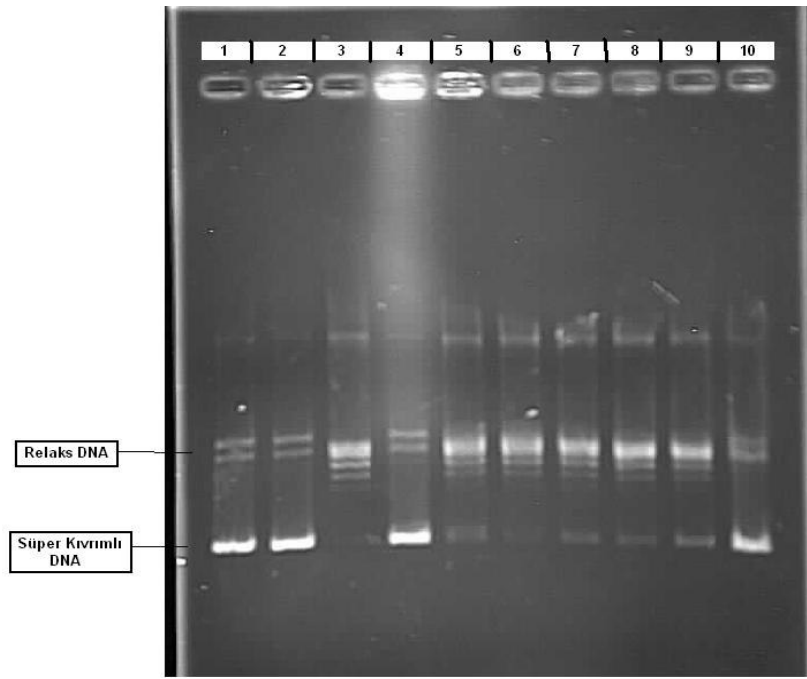
Şekil 4.17'de görüldüğü gibi, S14 bileşiğinin denenen konsantrasyonları içinde sadece 12.000 µM'lık konsantrasyonunun DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini çok az da olsa inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-9. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S14 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesinde bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Ortama S14 bileşiğinin denenmemiş artan konsantrasyonları eklendiği takdirde inhibisyonun daha etkili olabileceği düşünüldüğü için deney artan konsantrasyonlarla çalışılarak tekrar edilmiştir.



Şekil 4. 18. S14'ün artan konsantrasyonlarının Topoizomeraz I ' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 25.000 µM (S13)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 12.500 µM (S13)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 15.000 µM (S13)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 18.750 µM (S13)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 20.000 µM (S13)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 25.000 µM(S13)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I (inkübe edilmiş)

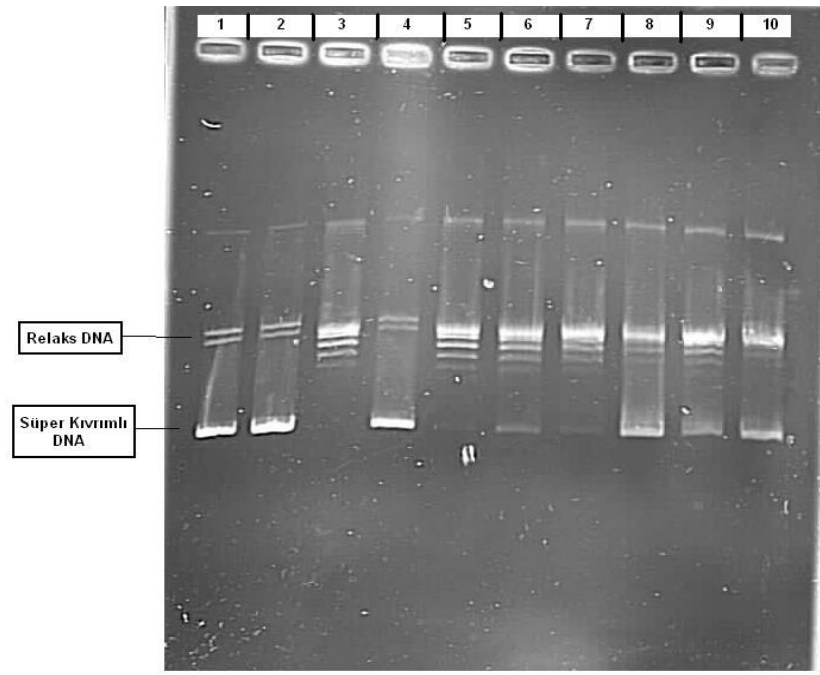
Şekil 4.18' de görüldüğü gibi S14 bileşiği ile ilgili deney daha önce denenmemiş artan konsantrasyonları (12.500, 15.000, 18.750, 20.000, ve 25.000 µM) denenerek tekrar edilmiştir. Yeni denenen tüm konsantrasyonların DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği ve özellikle son dört konsantrasyonda inbisyonun daha etkili olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.19. S15'in Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S15)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S15)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S15)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S15)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S15)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S15)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S15)

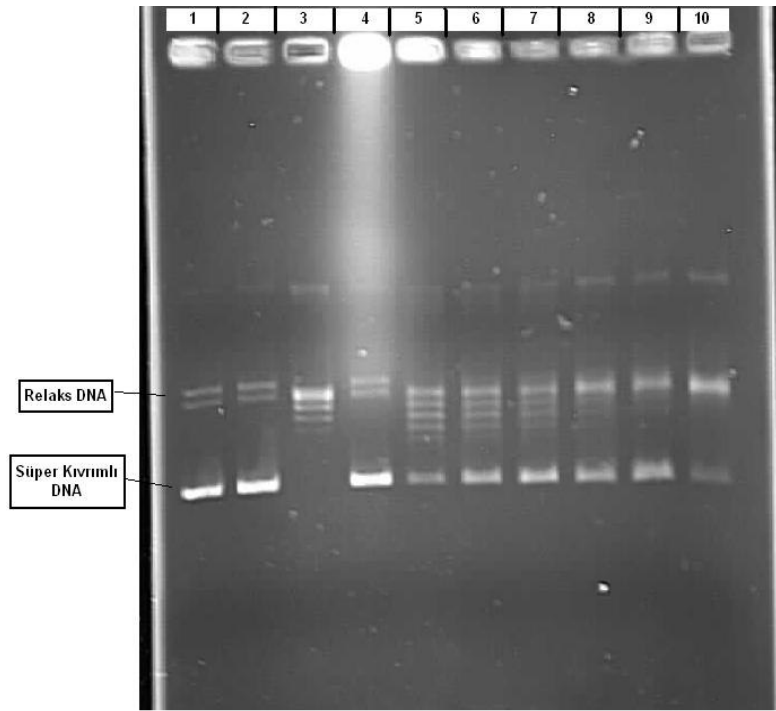
Şekil 4.19'da görüldüğü gibi, S15 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S15 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süperkıvrımlı formda kalmaktadır ve 4. kuyucuktaki pozitif kontrol göz önüne alındığı takdirde özellikle son konsantrasyonda inhibisyonun daha etkili olduğu görülmekte ve belirtilen konsantrasyonun pozitif kontrolle hemen hemen aynı etkiyi yaptığı düşünülmektedir.



Şekil 4.20. S16'nın Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S16)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S16)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S16)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S16)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S16)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S16)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S16)

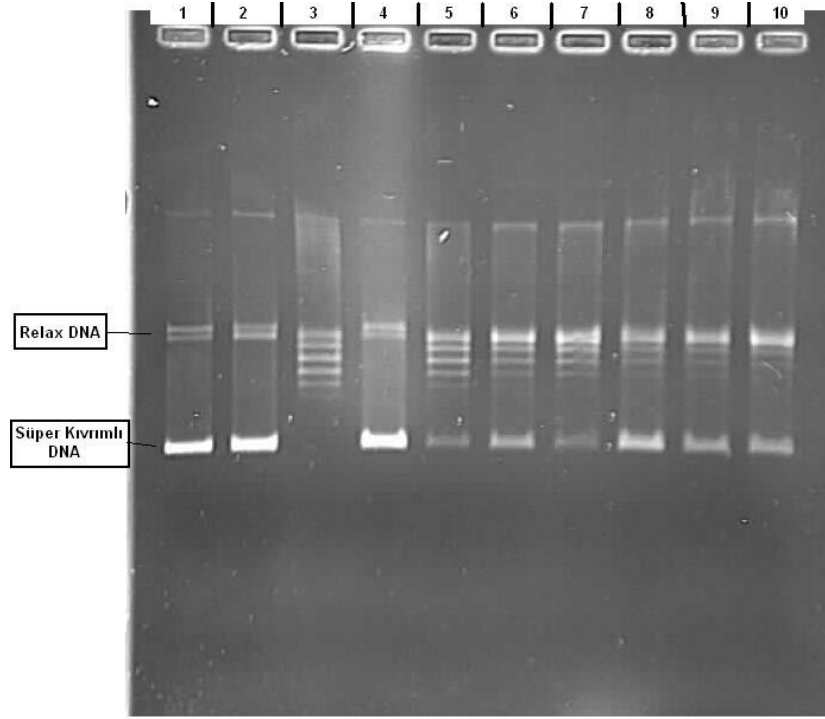
Şekil 4.20'de görüldüğü gibi, S16 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S16 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve özellikle 8., 9. ve 10. kuyucukta büyük kısmı süperkıvrımlı formda kalmaktadır.



Şekil 4.21. S17'nin Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S17)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S17)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S17)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S17)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S17)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S17)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S17)

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi, S17 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünit topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S17 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süperkırımlı formda kalmaktadır. Ve diğer bileşiklerle yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında S17 maddesinin hemen hemen tüm konsantrasyonlarında inhibisyonun daha etkili olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.22. S18'in Topoizomeraz I' e inhibisyon etkisi

1. Kuyucuk : 0,2 µg pBR322 plazmit DNA kontrol (enzimsiz)
2. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 12.000 µM (S18)
3. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I
4. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 120 µM CPT
5. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 4.000 µM (S18)
6. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 5.000 µM (S18)
7. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 6.000 µM (S18)
8. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 8.000 µM (S18)
9. Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I + 10.000 µM(S18)
- 10.Kuyucuk : 0,2 µg DNA + 1 ünite Topo I +12.000 µM (S18)

Şekil 4.22'de görüldüğü gibi, S18 bileşiğinin denenen tüm konsantrasyonlarının (4.000, 5000, 6.000, 8000, 10.000 ve 12.000 µM) DNA topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. 3. kuyucukta, 1 ünite topoizomeraz I enzimi 0.2 µg DNA'yı tamamen relaks hale getirmekte, 5.-10. kuyucuklarda, ortama artan konsantrasyonlarda S18 ilave edildiği zaman enzimin katalitik aktivitesi inhibe olarak DNA relaks hale dönüşmemekte ve büyük kısmı süperkırımlı formda kalmaktadır.

4.3. Benzoksazin Türevlerinin Topoizomeraz I Enzimi Üzerindeki %50 İnhibisyon (IC₅₀) Değerleri

Çizelge 4.1. Topoizomeraz I enzimi için bileşiklerin test edilen konsantrasyon aralığında verdikleri IC₅₀ değerleri

Bileşiğin kodu	Mikromolar (μM) olarak IC ₅₀ değerleri	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak IC ₅₀ değerleri
S1	8321,8	1,96
S2	31992,2	7,97
S3	33277	8,95
S4	80904	24,84
S5	17712	4,96
S6	4233950	1058,49
S7	29631041	9304,15
S8	69506	17,31
S9	61514	16,18
S10	0,6	0,00017
S11	1659114	532,58
S12	38404	11,29
S13	19702	6,46
S14	19654	5,17
S15	20736	6,16
S16	11790	3,63
S17	10839	3,71
S18	9770	1,61
Camptothecin	34,31	0,013

TARTIŞMA

Kanser, günümüzde ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Yüzyılın en önemli problemlerinden biri olan ve halen çözümlenemeyen bir çok kanser türünde kemoterapi ilk seçenektir.

Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasallar, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir. 1960'lı yıllara kadar kemoterapi palyatif amaçla, bazı klinik bulguların azaltılması ve hastanın yaşamını biraz daha uzatmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak 1960'lı yıllardan itibaren hücre kinetiği bilgileri ve kinetik kavramları kemoterapi protokollerinde uygulanmaya başlanılmıştır. Hücre kinetiği hakkında bilgiler arttıkça yeni ilaçlar laboratuvarlarda antikanser aktiviteleri açısından araştırılmaya başlanmıştır.

Normal hücrelerin gelişimi ve ölmesi kontrol altındaki bir süreçtir. Kanser ortaya çıktığında hasta hücrelerin büyüme, çoğalma ve ölümleri kontrolsüzleşir. Antikanser ilaçlar bu aşamada müdahale eder ve kanserli hücrelerin büyümesi ve çoğalmasını engeller. Bu ilaçlardan sağlıklı hücreler de etkilenebilir. Normalde de hızlı çoğalması gereken hücreler daha çok etkilenir. Ancak bu hücreler kendilerini tedavi sonrası yenileyebilir. Kemoterapide karşılaşılabilen bu tip güçlülere karşı artık günümüzde, bitkisel kaynaklı doğal ilaçlardan çok kimyasal bileşik kökenli sentetik ilaçlar araştırılıp oluşturulmakta ve klinik olarak kullanılan kemoterapötik ilaçların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Hande, 1998 ; Larsen et al., 2003 ; Christian, 2003).

Yapılan bir çalışmada, antitümör etkili bir antibiyotik olan auromomisinden esinlenerek 1,4-benzoksazin-3-on bileşikleri sentezlenmiş ve bu bileşiklerin metal iyonu (Cu^{2+}) varlığında DNA'yı iplikçiklerine ayırabildikleri belirtilmiştir (Shibuya et al., 1986). Takashi ve Kanjii (1989) yaptıkları bir araştırma sonucunda benzoksazin-3-on yapısındaki bazı bileşiklerin, kanser hücrelerinin antikanser ajanlara karşı olan duyarlılığını ve antikanser ajanların terapötik etkilerini artırdıklarını bildirmişlerdir. Bu tarihten sonrada benzoksazin bileşiklerinin antimikrobiyal ve antiterapötik etkileri üzerine araştırmalar hız kazanmıştır.

Benzoksazin yapısı içeren bileşiklerin aktivitelerinin değerlendirilmesi ilk defa Hietala ve Wahlross tarafından (1956) buğday ve mısır bitkilerinde antifungal etkili benzoksazolun türevi bir bileşiğin izole edilmesiyle başlamıştır. Yapılan bu çalışmada

izole edilen bileşiğin 6-metoksi-2-benzoksazolinon yapısı olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiğin, *Fusarium nivale* ve *Sclerotinia trifoliorum*'a karşı antifungal etkili olduğunu bildirmişlerdir (Virtanen et al., 1957).

Daha sonra aynı araştırmacılar (Virtanen and Hietala, 1960; Honkanen and Virtanen, 1960) elde edilen bu benzoksazolon yapısının, zarar görmemiş çavdar bitkisinde bulunan glikozit yapıdaki bir bileşiğin enzimatik parçalanması sonucu açığa çıkan aglikon kısmının dekompozisyonu ile oluştuğunu saptamışlardır. 2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on yapısının bu aglikon kısmı oluşturduğunun belirlenmesi dikkatleri daha sonra bu bisiklik halka sistemi üzerine yöneltmiştir.

Hashimoto ve ark. (1979) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, mısır ve buğday gibi tahıl bitkilerinde bulunan 2,4-dihidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on, 2,4-dihidroksi-7-metoksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on, ile 4-asetoksi-7-metoksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on ve 4-hidroksi-7-metoksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on yapısındaki türevlerin bakterilere karşı mutajenik etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar benzoksazin yapısındaki bu bileşiklerin, nükleik asit ve proteinlerin nükleofilik kısımları ile reaksiyona girdiklerini ve reaksiyon merkezinin benzoksazin halkasında yer alan azot atomu üzerinden olduğunu bildirmişlerdir.

Daha sonraları Ishizaki ve ark. (1982) yapmış oldukları çalışmada ise 1,4-benzoksazin yapısındaki bileşiğin guanin halkası taşıyan DNA molekülü ile kovalent bir bağ oluşturduğunu bildirmişlerdir. Buradaki bağlanma şeklinin DNA'nın karsinojenik 2-asetilaminofloren bağına benzer şekilde olduğu ileri sürülmektedir.

Shridhar ve ark. (1985), 6- veya 7-izotiyosiyano-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on ve 3-tiyon türevlerinin önemli derecede antihelmentik etkilere sahip olduklarını bildirmişlerdir. Test edilen bileşiklerden bazılarının *Ancylostoma ceylanicum*'un neden olduğu kancalı kurt enfeksiyonlarına ve fare tenyası olan *Hymenolepsis nana*'ya karşı önemli derecede etki gösterdikleri saptanmıştır.

Hogale ve ark. (1990) 4-hidrazito-1,4-benzoksazin-3(2H)-on ve bunların triazol türevlerinin de antibakteriyal etki gösterdiklerini, Bravo ve Lazo (1993) ise 2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on veya 4-hidroksi-1,4-benzoksazin-3-on yapısındaki bileşiklerin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans*'a karşı inhibe edici etkileri olduğunu bildirmişlerdir.

İlerleyen zaman içerisinde doğada pek çok 1,4-benzoksazin analogu bulunmuştur. 1,4-benzoksazin halka sistemi taşıyan çok az sayıda bileşiğin kemoterapötik aktivitesi çalışılmıştır. 1,4-benzoksazin halka sistemine sahip ofloksazin molekülü yapısında ilginç bir gözlemin, bu heterosiklik çekirdeğin klinik olarak kullanılan diğer antimikrobiyal ilaçlardan daha avantajlı bir yapı sunduğu ileri sürülmüş ve ofloksazin bileşiğinin DNA giraz inhibitörü olduğu tespit edilmiştir (Osada et al., 1987; Willmott and Maxwell, 1993). Ayrıca Young ve ark. (1994), 2,4-benzoksazin-3-on yapısındaki bir bileşiğin, HIV enfeksiyonlarında rol oynayan dirençli varyetelerin içerdiği HIV reverse transkriptaz enziminin inhibisyonunu sağladığını (IC50 : 29 nM/ağırlık) ve AIDS tedavisinde yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçların pek çoğu, DNA ve RNA sentezini bozarak etki etmektedir. Topoizomerazlar, DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon, kardeş kromotitlerin ayrılması, kromozom yoğunlaşması, genomik kararlılığın korunması ve mitoz bölünme sırasında doğru kromozom ayrışması için kesin gerekli enzimlerdir. Topoizomerazlar çok sayıda ve klinik açıdan yüksek değerlerde sitotoksik ilaçlar için önemli bir hedef olarak keşfedilince, 1980'lerden itibaren topoizomerazların aktivitelerini önleyici yeni ilaç sentez yolları aranmaya başlanmış, önemli gelişmeler kaydedilmiş ve günümüzde de bu tip çalışmalara halen büyük bir hızla devam edilmektedir (Kellner et al., 2002).

Virtanen ve Hietala. (1960) tarafından yapılan bir çalışma sonucunda çavdar bitkisinde benzoksazin halkasının metabolizma sonucu benzoksazole dönüştüğü saptanmıştır. Temiz Arpacı ve ark. (2006) da benzoksazol ve eşdeğeri halkaların ökaryotik DNA topoizomeraz I ve II enzimi üzerinde kayda değer derecede inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışması ile de ön ilaç (prodrug) olarak düşünülebilen benzoksazin halka sisteminin ökaryotik DNA topoizomeraz I enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmış ve bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile moleküler yapıları arasındaki ilişki incelenmiştir.

TBAG – 105 T 081 no'lu projenin bir bölümünü içeren bu tez çalışmasında, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalınca sentezlenmiş olan 18 tane benzoksazin bileşiğinin ökaryotik topoizomeraz I enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Topoizomeraz enziminin aktivitesi üzerinde %50 inhibisyon etkisi gösterebilen bileşikler topoizomeraz inhibitörleri olarak kabul edilmektedir (Cho, et al., 2000; Park et al., 2004). Çalışmamızda, % inhibisyon değeri = ilaç ile muamele edilen DNA'nın yoğunluğu / kontrol DNA'nın yoğunluğu x100 formülü ile hesaplanarak topoizomeraz I ve II üzerinde etkili olan bileşiklerin %50 inhibisyon gösterdikleri konsantrasyon (IC_{50}) hem $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hem de μM cinsinden hesaplanmıştır. Bileşiklerin yapı-aktivite arasındaki ilişkileri ise, IC_{50} değerleri esas alınarak yorumlanmıştır. Bir bileşiğin %50 inhibisyon gösterdiği konsantrasyon ne kadar düşükse bu bileşik o kadar güçlü topoizomeraz inhibitörüdür.

Test edilen bileşiklerin DNA topoizomeraz I enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri incelendiğinde 15 bileşiğin (S1, S2, S3, S4, S5, S8, S9, S10, S12, S13, S15, S16, S17, S18) DNA topoizomeraz enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu bileşiklerden 14 tanesinin (S18 ($IC_{50}=1,61 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) > S1 > S16 > S17 > S5 > S14 > S15 > S13 > S2 > S3 > S12 > S9 > S8 > S4 ($IC_{50}=24,84 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)) topoizomeraz I enzimi üzerinde katalitik inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Bu bileşikler, enzim DNA'ya bağlanmadan önce, enzimin katalitik döngüsü boyunca ya DNA'ya ya da enzime bağlanıp enzimin katalitik aktivitesini engellemişlerdir. Ayrıca sadece bir bileşiğin (S10) zehir etkili olduğu ve üç bileşiğin (S11> S6> S7) ise enzim üzerinde inhibitör etkisi olmadığı saptanmıştır. Bileşiklerin enzim üzerindeki bu değişik inhibisyon etkilerinin DNA bölgelerine özgün olduğu sanılmaktadır (Shin,1990). Bileşiklerin göstermiş oldukları inhibisyon etkisi konsantrasyon bağımlı olduğu için konsantrasyon arttıkça inhibisyon etkisinin arttığı görülmüştür.

En etkili bileşik olarak bulunan S10 ($IC_{50}=0,00017 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) un, topoizomeraz I enzimi üzerinde zehir etki gösterdiği saptanmıştır. S10 bileşiği ayrıca deneylerde topoizomeraz I için pozitif inhibitör olarak kullandığımız ve enzim üzerinde katalitik inhibisyon yaptığı görülen CPT'den ($IC_{50}=0,013 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) bile çok daha güçlü inhibisyon etki gösterdiği saptanmıştır. Bu güçlü inhibisyon etkisini ise kovalent bağlı DNA-topoizomeraz I enzim-kesim kompleksini stabilize ederek DNA tek zincir kırıklarının tekrar birleşmesini önleyerek yaptığı ve böylece kalıcı DNA tek zincir kırıklarının birikimine sebep olduğu bulunmuştur.

İlaç etken maddesi araştırma çalışmalarında biyolojik aktivitesi gözlenecek olan kılavuz bileşiklerin moleküler yapıları ile biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişki iki şekilde

yorumlanabilmektedir. Bunlardan, SAR (Yapı-Aktivite İlişkisi) modeliyle, moleküllerin yapıları ile göstermiş oldukları biyolojik aktivite sonuçları arasındaki ilişki hakkında nitel olarak yorumlama yapılabilmektedir. QSAR (Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi) modeli ise, ilaç etken maddesi olarak tasarlanan kılavuz bileşiklerin moleküler yapısının kantitatif olarak belirlenmesinde kullanılan en işlevsel yöntemdir. QSAR tekniği ile moleküllerin hangi konumunda hangi özellikler olursa biyolojik etkinliğin artacağı hakkında yorum yapılabilmektedir. İlaç etken maddesi olarak kullanılan kimyasal bileşiklerin çoğunluğu organizmada reseptör (DNA, enzim vb.) olarak tanımlanan hedef bölgeleri uyararak, bloke ederek ya da inhibe ederek biyolojik etkinliklerini gösterirler. Biyolojik etkinin gözlenebilmesi için etken madde ile hedef bölge arasında moleküler düzeyde bazı etkileşmelerin olması gerekmektedir. Bu etkileşimlerin gerçekleşebilmesinde ilaç etken maddesinin 3 boyutlu sistem içerisinde fizikokimyasal özellikleri olan; çözünürlük, sterik ve elektrostatik özellikleri ile yapısal özellikleri önemli rol oynamaktadır. Biyolojik cevaplar olarak gözlenen bu etkinliklerin ortaya çıkışı ancak doğru ve gerekli grupları taşıyan ilaç etken maddelerinin biyolojik ortamdaki hedef bölgelere ulaştırılması ile mümkündür. Bu durumda ilaç etken maddesi olarak araştırılacak kimyasal bileşiklerin moleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleri önem kazanacak ve aranan biyolojik cevabı ortaya çıkaracak niteliklerle donanmış olması gerekmektedir. Bu donanımın niteliği hakkında gerekli bilginin üretilmesi ise üç boyutlu sistemler içerisinde çözümlenen moleküler düzeydeki 3-D QSAR (Üç Boyutlu Kantitatif Yapı Etki İlişkiler) analizleri ile gerçekleşebilmektedir (Şener and Yalçın, 2003).

Çalışmada kullanılan bileşiklerin topoizomeras I enzimi üzerindeki etkilerinden elde edilen IC₅₀ (µg/µl) verilerinin QSAR analiz yöntemi ile nicel olarak ön değerlendirilmesi yapılmış, bu verilerin QSAR yöntemi ile değerlendirilemeyeceği anlaşılmış ve bileşiklerin yapı-etki ilişkileri SAR modeliyle kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

Projenin bu basamağının sonucunda topoizomeras aktiviteyi araştırılan 1,4-benzoksazin türevlerinin kalitatif yapı-etki ilişkileri, etkisi tayin edilen bileşiklerin çoğunluğun durumuna bakılarak karar verilmiştir. Buna göre, benzoksazin halkasının 4. konumunda bulunan azot atomuna etil gruplarının bağlı olduğu türevler, aynı konumda metil veya hidrojen bağlı olan türevlerden daha etkilidirler. Ayrıca, benzoksazin halkasının 7. konumunda, elektron çekici özelliğe sahip nitro grubunun

bulunmasının aktiviteyi artırdığı gözlenmektedir. Nitro grubu nedeniyle molekülün elektron yoğunluğu azalmakla birlikte, hedef ile etkileşirken H- akseptörü olarak davranması da söz konusudur. Halkanın elektron yoğunluğunun azalmasının, hedef ile etkileşirken elektron yük transfer kompleksi (π - π etkileşmesi) oluşturmasında da önemli olduğu düşünülmektedir.

Bununla birlikte, 4. konumda alkil grubu taşıyan türevler, hidrojen taşıyan türevlerden daha etkilidirler. Çünkü alkil grupları elektron verici özelliklerinden dolayı azot atomunun elektron yoğunluğunu artırmakta ve azot atomunun daha güçlü bir hidrojen akseptörü olarak davranmasına sebep olmaktadır. S4 ve S11 kodlu bileşiklerde, etkinin düştüğüne bakılırsa; 6. konumda yer alan etil ester grubu sterik engel oluşturabilmesi, hedefe bağlanırken molekül için engel oluşturması ile yorumlanabilir.

Topoizomeraz I enzimi üzerinde katalitik etki yerine, zehir etkisi gösteren S10 kodlu bileşik için farklı bir etki mekanizması düşünüldüğünden yapı-etki ilişkileri değerlendirmelerinde dikkate alınmamıştır. Bu şekilde etki gösteren tek bileşik olduğu için de bileşiğin yapı-etki ilişkisinin, proje kapsamında araştırılacak yeni zehir etkili-benzoksazin türevleri arasında değerlendirilmesi düşünülmektedir.

Alper-Hayta ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada bu bileşiklerin antimikrobiyal etkileri incelenmiş ve MİK değerleri belirlenmiş, tüm bileşiklerin dikkate değer konsantrasyonlarda antibakteriyel (MİK :12,5-50 μ g/ml) ve antifungal (MİK : 6,25-50 μ g/ml) etkilere sahip oldukları görülmüştür. Antifungal etki yönünden, *Candida albicans*'a karşı S7, S8, S9, S11 ve S12 nolu bileşiklerin (12,5 μ g/ml), *C. krusei*'ye karşı S2, S4 ve S6 nolu bileşiklerin (6,25 μ g/ml), *C. glabrata*'ya karşı S2 ve S6 nolu bileşiklerin (6,25 μ g/ml) en etkili bileşikler olduğu saptanmasına rağmen bu bileşikler topoizomeraz I enzimi üzerinde zayıf inhibisyon etki göstermektedirler. Bu durumun aksine referans olarak kullanılan Gentamisin ile sentezlenen bileşiklerin etkileri kıyaslandığında, S1 nolu bileşiğin *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı referans ilaç ile aynı etkiye sahip olduğu ve benzer şekilde bu bileşiğin topoizomeraz I enzimi üzerinde güçlü inhibisyon etki gösterdiği saptanmıştır. Antifungal ve antibakteriyel aktiviteden sorumlu etkinin mekanizması araştırılmak istendiğinde; topoizomerazların inhibisyon etkisi bir parametre olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile;

1. Test edilen 18 bileşikten 17 tanesinin IC50 değerleri, deneylerde katalitik inhibisyon etki gösterdiği görülen ve DNA topoizomeras I için pozitif inhibitör olarak kullanılan CPT için saptanan IC50 değerine göre çok büyük olması nedeniyle kemoterapötik ilaç etken maddesi olamayacağı,
2. S10 bileşiğinin ise saptanan IC50 değerinin pozitif kontrole göre çok düşük olması nedeniyle kanser kemoterapisi için aktif ilaç-etken maddesi olarak oldukça umut veren bir bileşik olduğu saptanmış,
3. Farklı kombinasyonlarda ve daha çok sayıda sentezlenecek yeni bileşiğin enzim üzerinde inhibisyon etkileri çalışılarak, elde edilen bütün veriler topluca değerlendirilip QSAR analizlerinin gerçekleştirilmesi düşünülmekte,
4. Proje kapsamında;
 - Cleavage Assay kullanılarak inhibisyon yapan bileşiklerin DNA-enzim kompleksine (cleavage kompleks) bağlanıp bağlanmadığının belirlenmesi,
 - Elektroforetik Mobility Shift Assay kullanılarak etkili bileşiklerin DNA'ya bağlanıp bağlanmadığının belirlenmesi,
 - Unwinding Assay kullanılarak inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin farklı konsantrasyonlarının DNA'ya interkalate olup olmadığının belirlenmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Albensi, B.C., Mattson, M.P., 2000, Evidence for the involvement of TNF and NF- κ B in hippocampal synaptic plasticity, *Synapse*, 35,2: 151-9.
- Alper-Hayta S., Akı-Sener E., Tekiner-Gulbas B., Yıldız I., Temiz-Arpacı O., Yalcın I. and Altanlar N., 2006, Synthesis, antimicrobial activity and QSARs of new benzoxazine-3-ones, *European Journal of Medicinal Chemistry* 41, 1398-1404.
- Alsner, J., Svejstrup, J.Q., Kjeldsen, E., Sorensen, B.S., Westergaard, O., 1992, Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function, *J Biol Chem*, 267:12408–12411.
- Aravind, L., Leipe, D.D., Konin, E.V., 1998, Toprim: A conserved catalytic domain in type Ia and II topoisomerase, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins, *Nucleic Acids Res.*, 26: 4205-4213.
- Baguley, B.C., Ferguson, L.R., 1998, Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 213-222.
- Bailly, C., 2000, Topoisomerase I Poisons and Suppressors as Anticancer Drugs *Curr. Med. Chem.*, 7, 39.
- Barria, B.N., Copaja, S.V., Niemeyer, H.M., 1992, Occurrence of DIBOA in wild *Hordeum* species and its relation to aphid resistance, *Phytochemistry*, 31 (1): 89-91.
- Bauer P.I., Buki K.G., Comstock, J.A., Kun, E., 2000, Activation of topoisomerase I by poly [ADP-ribose] polymerase, *Int. J. Mol. Med*, 5: 533–540.
- Been, M.D., Burgess, R.R., Champoux, J.J., 1984, Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type 1 DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA, *Nucleic Acids Res.*, 12: 3097–3114.
- Benedetti, P., Fiorani, P., Capuani, L., Wang, J.C., 1993, Camptothecin resistance from a single mutation changing glycine 363 of human DNA topoisomerase I to cysteine, *Cancer Res.*, 53, 4343.
- Berger, J.M., Fass, D., Wang, J.C., 1998, Harrison S.C. Structural similarities between topoisomerases that cleave one or both DNA strands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 7876-7881.
- Bergerat, A., Gadelle, D., Forterre, P., 1994, Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus shibatae*: a thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features, *J. Biol. Chem.*, 269, 27663-27669.

- Bergerat, A., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., Forterre, P., 1997, An atypical topoisomerase II from archea with implications for meiotic recombination, *Nature*, 386, 414-417.
- Bharti A.K., Olson, M.O., Kufe, D.W., Rubin, E.H., 1996, Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I, *J. Biol. Chem.*, 271: P1993–P1997.
- Bjornsti, M.A., Benedetti, P., Viglianti, G.A., Wang, J.C., 1989, Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin , *Cancer Res.*, 49, 6318.
- Bjornsti, M.A., Osheroff, N., 1999, Introduction to DNA topoisomerases, "DNA topoisomerase protocols. DNA topology and enzymes" de Ed. Bornsti, M.A. and Osheroff N, Humana Pres, New Jersey, 1-8.
- Blattes, E., Lockhart, B., Lestage, P., Schwendimann, L., Gressens, P., Fleury, M-B., and Largeton M., 2005, Novel 2-Alkylamino-1,4-benzoxazine Derivatives as Potent Neuroprotective Agents: Structure-Activity Relationship Studies, *J. Med. Chem.*, 48, 1282-1286.
- Bravo, H.R., Lazo, W., 1993, Antimicrobial activity of cereal hydroxamic acids and related compounds, *Phytochemistry*, 33(3): 569-571.
- Bravo, H.R., 2000, New Products From the Decomposition of 2-Hydroxy-1,4 Benzoxazin-3-one (HBOA) A Natural Lactam From Ce-Reals And The 7-Nitroderivative (HNBOA), *Bol. Soc. Chilúim.*, v. 45 n.1 Concepción.
- Burden, D.A., Osheroff, N., 1998, Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drug targeted to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1400, 139-154.
- Burke, T.B., 1996, Chemistry of the camptothecins in the bloodstream. Drug stabilization and optimization of activity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 803, 29.
- Carey, J.F., Schultz, S.J., Sisson, L., Fazio, T.G., Champoux, J.J., 2003, DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100: 5640–5645.
- Champoux, J.J., Dulbecco, R., 1972, An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA-a possible swivel for DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69,143-146.
- Champoux, J.J., 2001, DNA Topoisomerases: structure, function and mechanism, *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 369-413.
- Chen, A.Y. and Liu, L.F., 1994, DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and Lethal Targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34, 191-218.
- Chen, A.Y., Choy, H., Rothenberg, M.L., 1999, DNA topoisomerase I-targeting drugs as radiation sensitizers, *Oncology*, 13 (10 suppl 5), 39.

- Chen, Y., Rice, P.A., 2003, New insight into site-specific recombination from Flp recombinase-DNA structures, *Ann. Rev. Biophys. Struct.*, 32, 135-159.
- Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N., Shuman, S., 1998, Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases, *Cell*, 92, 841-850.
- Cho, K.H., Pezzuto, J.M., Bolton, J.L., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Lee, S.K., Constantinou, A., 2000, Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity, *European Journal of Cancer*, 36, 2146-2156.
- Christensen, M.O., Krokowski, R.M., Barthelmes, H.U., Hock, R., Boege, F., Mielke, C., 2004, Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/ nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I, *J. Biol. Chem.*, 279: 21873–21882.
- Christian, B., 2003, Homocamptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs, *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 45, 91-108.
- Corbett, K.D., Berger, J.M., 2003, Structure of the topoisomerase VI-B subunit: implications for type II topoisomerase mechanism and evolution, *EMBO J.*, 22, 151-163.
- Corbett, K.D., Berger J.M., 2004, Structure, molecular mechanisms and evolutionary relationships in DNA topoisomerases, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 95-118.
- Corcuera, L.J., Woodward, M.D., Helgeson, J.P., Kelman, A., Upper, C.D., 1978, 2,3-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species, *Plant. Physiol.*, 61(5): 791-795.
- Cortés, F., Pastor, N., Mateos, S., Domínguez, I., 2003, Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis, *Mut. Res.*, 543, 59-66.
- Cunningham, D., Pyrhonen, S., James, R.D., Punt, C.J., Hickish, T.G., Heikkilä, R., Johannesen, T.B., Starkhammar, H., Topham, C.A., Awad, L., Jacques, C., Herait, P., 1998, *Lancet*, 352, 1413.
- Dutta, R., Inouye, M., 2000, GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily, *Trends. Biochem. Sci.*, 25, 24-28.
- Engel, R., Valkov, N.I., Gump, J.L., Hazlehurst, L., Dalton, W.S., Sullivan, D.M., 2004, The cytoplasmic trafficking of DNA topoisomerase II α correlates with etoposide resistance in human myeloma cells, *Experimental Cell Research*, 295, 421-431.

- Fan, Y., Weinstein, J. N., Kohn, K. W., Shi, L. M., Pommier, Y., 1998, Molecular modeling studies of the DNA - topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin, *J. Med. Chem.*, 41, 2216.
- Fortune, J.M., and Osheroff, N., 1998, Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II α by blocking DNA cleavage, *J. Biol. Chem.*, 273, 17643 -17650.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Nash, H.A., 1976, An enzyme that introduces superhelical turns into DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7024-7027.
- Gellert, M., 1981, DNA topoisomerases, *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 879-910.
- Gilmour, D.S., Pflugfelder, G., Wang, J.C., Lis, J.T., 1986, Topoisomerase I interacts with transcribed regions in *Drosophila* cells, *Cell*, 44, 401.
- Gilmour, D.S., Elgin, S.C.R., 1987, Localization of specific topoisomerase I interactions within the transcribed region of active heat shock genes by using the inhibitor camptothecin, *Molecul. Cell. Biol.*, 7, 141.
- Gilmore, T.D., 2006, Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives, *Oncogen*, 30, 25 (51): 6680-4.
- Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K., Riou, J.F., 1996, Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53, *Biochemistry*, 35: 5778–5786.
- Hadfield, J.A., Pavlidis, V.H., McGown, A.T., Whitworth, C., Perry, P.J., Fox, B.W., 1994, Structure-activity studies on 2-aryl-4H-3,1-benzoxazin-4-ones, *Anticancer Drugs*, 5(5): 533-8.
- Haluska, P. Jr., Saleem, A., Rasheed, Z., Ahmed, F., Su, E.W., Liu, L.F., Rubin, E.H., 1999, Interaction between human topoisomerase I and a novel RING finger/arginine–serine protein, *Nucleic Acids Res.*, 27: 2538–2544.
- Hande, R. K., 1998, Clinical application of anticancer drugs targeted to topoisomerase II, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 173-184.
- Hashimoto, Y., Ohta, T., Shudo, K., Okamoto, T., 1979, Reactions of 4-Acetoxy-2H-1,4-Benzoxazin-3-ones with Some Nucleophiles., *Tetrahedron Letters*, 18, 1611-1614.
- Hatsuiker, E., Bähler, J., Kohli, J., 1998, The role of topoisomerase II in meiotic chromosome condensation and segregation in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol. Biol. Cell*, 9, 2739-2750.
- Hayakawa, I., Atarashi, S., Yokohama, S., Imamura, M., Sakano, K., Fukawa, M., 1986, Synthesis and antibacterial activities of optically active Ofloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother*, 29 (1): 163-164.
- Hietala, P.K., Wahlroos, O., 1956, The Synthesis of 6-Methoxy-2 (3) benzoxazolinone., *Acta. Chem. Scand.*, 7, 1196-1197.

- Hietala, P.K. and Virtanen, A. I., 1960, Precursor of Benzoxazolinone in Rye Plants II. Precursor I, The Glucoside, *Acta Chem. Scand.*, 2, 502-504.
- Hogale, M.B., Mulik, A.R., Nikam, B.P., 1990, Synthesis of some new 4-hydrazino-1,4-benzoxazine-3(2H)-ones and their triazido derivatives as possible antibacterial agents, *J. Indian Chem.Soc.*, 67 (11): 923-924.
- Holden, J.A., 2001, DNA Topoisomerases as Anticancer Drug Targets: From the Laboratory to the Clinic, *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, 1, 1-25.
- Honkanen, E. and Virtanen, A. I., 1960, The Synthesis of Precursor II of Benzoxazolinone Formed in Rye Plants, and The Enzymic Hydrolysis of Precursor I The Glucoside, *Acta Chem. Scand.*, 14 No. 2 , 504-507.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F., 1985, Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I, *J. Biol. Chem.*, 260, 14873.
- Hu, X., Machius, M., Yang, W., 2003, Monovalent cation dependence and preference of GHKL ATPases and kinases , *FEBS Letters*, 544, 268-273.
- Interthal, H., Quigley, P.M., Hol, W.G., Champoux, J.J., 2004, The role of lysine 532 in the catalytic mechanism of human topoisomerase I, *J. Biol. Chem.*, 279: 2984–2992.
- Ishizaki, T., Hashimoto, Y., Shudo, K., Okamoto, T., 1982, Reaction of 4-Acetoxy-2H-1,4-Benzoxazin-3-ones with DNA. Possible Chemical Mechanism for The Antifungal and Mutagenic Activities, *Tetrahedron Letters*, 23 (39), 4055-4056.
- Juan, C., Wang, J., Liu, A.A., Whang-Peng, J., Knutsen, T., Huebner, K., Croce, C.M., Zhang, H., Wang, J.C., Liu, L.F., 1998, Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 8910.
- Kaina, B., 2003, DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling, *Biochemical Pharmacology*, 66, 1547-1554.
- Kallio, M. and Lahdetie, J., 1997, Effects of DNA topoisomerase inhibitor membrane in male mouse meiotic divisions in vivo: cell cycle arrest and induction of aneuploidy, *Environ. Mol. Mutagen.*, 29, 16-27.
- Karayan, L., Riou, J.F., Seite, P., Migeon, J., Cantereau, A., Larsen, C.J., 2001, Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity, *Oncogene*, 20: 836–848.
- Kellner, U., Sehested, M., Jensen, P.B., Gieseler, F. and Rudolph, P., 2002, Culprit and victim- DNA topoisomerase II, *Lancet Oncol.*, 3, 235-43.

- Kirkegaard, K., Pflugfelder, G., Wang, J.C., 1984, The cleavage of DNA by type-I DNA topoisomerases, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 49, 411.
- Kirkegaard, K., Wang, J.C., 1985, Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single stranded loop., *J. Mol. Biol.*, 185, 625-637.
- Kunze, N., Yang, G., Dolberg, M., Sundarp, R., Knippers, R., Richter, A., 1991, Structure of the human type I DNA topoisomerase gene., *J. Biol. Chem.*, 268, 9610.
- Laine, J.P., Opresko, P.L., Indig, F.E., Harrigan, J.A., von Kobbe, C., Bohr, V.A., 2003, Werner protein stimulates topoisomerase I DNA relaxation activity, *Cancer Res.*, 63: 7136–7146.
- Larsen, A.K., Gobert, C., 1999, DNA Topoisomerase I in Oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde?, *Pathology Oncology Research*, 5, 171-178.
- Larsen, A. K., Escargueil, A.E., Skladanowski, A., 2003, Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy, *Pharmacology and Therapeutics*, 99, 167-181.
- Leppard, J.B and Champoux, J.J., 2005, Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control, *Chromosoma*, 114 (2): 75-85.
- Leshner, D.T., Pommier, Y., Stewart, L., Redinbo, M.R., 2002, 8-Oxoguanine rearranges the active site of human topoisomerase I, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 99:12102–12107.
- Levine, C., Hiasa, H., Marians, K.J., 1998, DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication and drug sensitivities., *Biochim. Biophys. Acta.* 1400, 29-43.
- Liu, L.F., Liu, C.C., Alberts, B.M., 1979, T4 DNA topoisomerase. A new ATP-dependent enzyme essential for the initiation of T4 bacteriophage DNA replication, *Nature*, 281, 456-61.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E., 1993, p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell*, 74, 957.
- Lu, H. and McKnight, T.D., 1999, Tissue-Specific Expression of the b-Subunit of Tryptophan Synthase in *Camptotheca acuminata*, an Indole Alkaloid-Producing Plant1, *Plant Physiology*, Vol. 120, pp. 43–51.
- Lynn, R., Giaever, G., Swanberg, S.L., Wang, J.C., 1986, Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase., *Science*, 233, 647-649.
- Macchiarulo, A., Castantino, G., Fringuelli, D., Vecchiarelli, A., Schiaella, F. and Fringuelli, 2002, 1,4-Benzothiazine and 1,4-Benzoxazine Imidazole Derivatives with Antifungal Activity: A Docking Study *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, 3415–3423.

- Mao, Y., Sun, M., Desai, S.D., Liu, L.F., 2000, SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: a possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 4046–4051.
- Masuoka, Y., Asako, T., Goto, G., Noguchi, S., 1986, Synthesis of 3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine-2-acetates and related compounds, *Chem. Pharm. Bull.*, 34 (1) : 130-139.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., 1996, *Nucleic acids, "biochemistry"* de second edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- McDonald, A.C., Brown, R., 1998, Induction of p53-dependent and p53-independent cellular responses by topoisomerase I inhibitors, *Br. J. Cancer*, 78, 745.
- Merino, A., Madden, K.R., Lane, W.S., Champoux, J.J., Reinberg, D., 1993, DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription, *Nature*, 365: 227–232.
- Meyers, F.H., Jawetz, E. and Goldfien, A., 1976, Part VII. Chemotherapeutic agents, *Review of Medical Pharmacology*, 5 th ed. pp. 470-522.
- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.V., Pearl, L.H., 2003, Structural and functional analysis of the middle segment of hsp 90: Implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions, *Mol. Cell.*, 11, 647-658.
- Mi. Z., Burke, T.G., 1995, Reduced Albumin Binding Promotes the Stability and Activity of Topotecan in Human Blood, *Biochemistry*, 34, 13722.
- Miller, K.G., Liu, L.F., Englund P.T., 1981, A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei, *J. Biol. Chem.*, 256, 9334-9339.
- Mo, Y.Y., Wang, C., Beck, W.T., 2000, A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I., *J. Biol. Chem.* 275: 41107–41113.
- Muller, M.T., Pfund, W.P., Mehta, V.B., 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. and Cox, M.M., 2000, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Third Edition, Worth Publishers, New York, USA, pp. 907.
- Niemeyer, H.M., 1988, Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), Defence chemicals in the Gramineae, *Phytochemistry*, 27 (11): 3349-3358.
- Nitiss, J.L., Wang, J.C., 1996, Mechanisms of cell killing by drugs that trap covalent complexes between DNA topoisomerases and DNA, *Mol. Pharmacol.*, 50, 1095.

- Nitiss, J.L., 1998, Investigating of biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1400, 63-81.
- Osada Y., Imamura, M., S. Shibamura, I. Hayakawa, 1987, Inhibition of DNA gyrase by optically active ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*, 31: 325–327.
- Osheroff, N., 2003, DNA Topology, Topoisomerases and Chemotherapy, IGP, Autumn.
- Otsuka, H., Hirai, Y., Nagao, T., Yamasaki, K., 1988, Antienflamatory activity of benzoxazinoids from roots of *Coix Lacryma-Jobi* Var, Ma-Yuen. *Journal of Natural Products*, 51 (1) : 74-79.
- Ozden, S., Ozturk, A.M., Goker, H., Altanlar, N., 2000, Synthesis and antimicrobial activity of some new 4-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3 (4H)-ones, *Il Farmaco* 55: 715-718.
- Pantazis, P., Chatterjee, D., Han, Z., Wyche, J., 1999, Differentiation of human malignant melanoma cells that escape apoptosis following treatment with 9-nitrocarnitine, *Neoplasia*, 1, 231.
- Park, H.J., Kim, Y-S., Kim, J-S., Lee, E-J., Yi, Y-J., Hwang, H. J., Suh, M-E., Ryu, C-K. and Lee, S. K., 2004, 6-Arylamino-7-chloro-quinazoline-5,8-diones as novel cytotoxic and DNA topoisomerase inhibitory agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14 (13), 3385-3388.
- Pindur, U. and Lemster, T., 1998, Antitumor drug design: DNA-binding ligands, which inhibit the topoisomerase I, *Pharmazie*, 53,2, 79-86.
- Pommier, Y., 1995, Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors, *Biochimie*, 80, 255.
- Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., Strumberg, D., 1998, Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochem. Biophys Acta.*, 1400, 83.
- Pommier, Y., Pourquier, P., Urasaki, Y., Wu, J., Laco, G., 1999, Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance, *Drug Resistance Update.*, 2, 307.
- Potmesil, M., Kohn, K.W., 1991, DNA topoisomerase in cancer, Oxford University Press, New York.
- Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., Nash, H.A., 1999, Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complex, *Science*, 286, 552.
- Ralph, R.K., Judd, W., Pommier, Y., Kohn, K.W., Neidle, S., Waring, M.J. (eds), 1994, DNA topoisomerases in molecular aspects and anticancer drug-DNA interaction. Vol. 2, p.1. Macmillan, London.

- Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J., Hol, W.G., 1998, Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA, *Science*, 279, 1504-1513.
- Redinbo, M.R., Stewart, L., Champoux, J.J., Hol, W.G., 1999, Structural flexibility in human topoisomerase I revealed in multiple nonisomorphous crystal structures, *J. Mol. Biol.*, 292: 685–696.
- Redinbo, M.R., Champoux, J.J., Hol, W.G., 2000, Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA, *Biochemistry*, 39: 6832–6840.
- Roca, J., Berger, J.M., Harrison, S.C., Wang, J.C., 1996, DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4057-4062.
- Rossi, F., Labourier, T., Forne, G., Divita, J., Derancourt, J.F., Riou, E., Antoine, G., Cathala, C., Brunel, and Tazi J., 1996, Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I, *Nature*, 381: 80-82.
- Rougier, P., Van Cutsem, E., Bajetta, E., Niederle, N., Possinger, K., Labianca, R., Navarro, M., Morant, R., Bleiberg, H., Wils, J., Awad, L., Herait, P., Jacques, C., 1998, *Lancet*, 352, 1407.
- Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirotta, N., Elfring, G.L., Miller, L.L., 2000, *N. Engl. J. Med.*, 343, 905.
- Shibuya, M., Sakurai, H., Maeda, T., Nishiwaki, E., Saito, M., 1986, Synthesis of the degradation product of auromycin chromophore and DNA-cleaving activities of its derivatives, *Tetrahedron Letters*, 27 (12): 1351-1354.
- Shin, C.G., 1990, Rapid evaluation of topoisomerase inhibitors: Caffeine inhibition of topoisomerase in vivo, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 10, 41-52.
- Shridhar, D.R., Srinivasa, Rao, K., Singh, A.N., Rastogi, K., Jain, M.L., GANDI, S.S., Kirishnan, V.S.H., Jogibhukta, M., 1985, Synthesis and Anthelmintic Activity of Some New 6- and 7-isothiocyanato-2H-1,4-benzoxa (thia)zin-3 (4H)-ones and Benzoxa (thia)zin-3 (4H)-thiones, *Indian Journal of Chemistry*, 24B,1263-1267.
- Stewart, L., Ireton, G.C., 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., Champoux, J.J., 1998, A model for the mechanism of human topoisomerase I, *Science*, 279,1534-1541.

- Straub, T., Grue, P., Uhse, A., Lisby, M., Knudsen, B.R., Tange, T.O., Westergaard, O., Boege, F., 1998, The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction, *J. Biol. Chem.*, 273: 26261–26264.
- Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L., Pommier, Y., 2000, Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 3977.
- Subramaniam, S., Tewari, A.K., Nunes-Duby, S.E., Foster, M.P., 2003, Dynamics and DNA substrate recognition by the catalytic domain of lambda integrase, *J. Mol. Biol.*, 329, 423-439.
- Syrovets, T., Büchele, B., Gedig, E., Slupsky, J.R., and Sımmet, T., 2000, Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerase I and II α , *Molecular pharmacology*, 58, 71-81.
- Şener, E., Yalçın, İ., 2003, *Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR)*, Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Tanizawa, A., Kohn, K.W., Pommier, Y., 1993, Induction of cleavage in topoisomerase I c-DNA by topoisomerase I enzymes from calf thymus and wheat germ in the presence and absence of camptothecin, *Nucleic Acids Res.*, 21: 5157–5166.
- Takashi, T., Kanjii, M., 1989, Benzothiazines and analogs as agents for improving the effect of anticancer drugs, their preparation, and formulations containing them. Japanese Foundation for Cancer Research, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho J.P.*, 112.
- Tekiner, B., 1997, 3,4-Dihidro-2-hidroksi-3-okso-2H-1,4-benzoksazin, 3,4-dihidro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetik asit ve bazı etil 3,4-dihidro-6 ve/veya 7-sübstitüe-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-asetat yapısındaki bileşiklerin sentezi, yapı aydınlatması ve mikrobiyolojik etkileri, A.Ü. Ecz. Fak. Farm. Kimya A.D., Yüksek Lisans Tezi.
- Temiz Arpacı, O., Oksuzoglu, E., Tekiner –Gulbas, B., Zafer, B., Yildiz, I., Diril, N., Aki-Sener, E., Yalçın İ., 2006, "Genotoxic activities and QSAR studies of some benzoxazoles and benzimidazoles", SAR 2006-12th International Workshop on Quantitative Structure-Activity Relationships in Enviromental Toxicology , Lyon, France, Abstract s O -67.
- Tse-Dinh, Y.C., 1998, Bacterial and archeal type I topoisomerases, 1400,19-27.
- Ullsperger, C., Cozzarelli, N.R., 1996, Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Esherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 271, 549-555.
- Virtanen, A.I., Hietala, P.K., Whalroos, Ö., 1957, Antimikrobiale Substanzen in Cereal und Fodder Pflanzen Arch., *Biochem. Biophys.*, 69, 486-500.

- Virtanen, A.I., Hietala, P.K., 1960, Precursor of benzoxazolinon in rye plants I. Precursor II The Aglucone, *Acta. Chem. Scand.*, 14 (2) : 499-502.
- Virtanen, A.I., 1961, Some aspects of factors in the corn plant with toxic effects on insect larvae, *Acta Chern. Scandn.*, 14: 1214.
- Voet, D., Voet, J.G., 1995, *Nucleic acid structures and manipulation, "biochemistry"* de second edition, John Wiley & Sons Inc., 848-914.
- Wadkins, R.M., Potter, P.M., Vladu, B., Marty, J., Mangold, G., Weitman, S., Manikumar, G., Wani, M.C., Wall, M.E., Von Hoff, D.D., 1999, Water soluble 20 (S)-glycinate esters of 10, 11, methylene dioxycamptothecins are highly active against human breast cancer xenografts, *Cancer Res.*, 59, 3424.
- Wall, M.E., Wani, M., 1996, Camptothecin. Discovery to clinic, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 803, 1.
- Wang, J.C., 1971, Interaction between DNA and an Escherichia coli Protein w.j., *Mol. Biol.*, 55, 523-533.
- Wang, J.C., 1996, DNA topoisomerases, *Annu.Rev. Biochem.*, 65: 635–692.
- Wang, C.Y., Cusack, J.C., Liu, R., Baldwin, A.S., 1999, Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B, *Nat. Med.*, 5, 412.
- Wang, J.C., 2002, Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 430–440.
- Williams, N.L., Howells, A.J., Maxwell, A., 2001, Locking the ATP-operated clamp of DNA gyrase: probing the mechanism of strand passage, *J. Mol. Biol.*, 306, 969-984.
- Willmott, C. J., and Maxwell, A., 1993, A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 126–127.
- Wu, J-H., Chang, F-R., Hayashi, K., Shiraki, H., Liaw, C-C., Nakanishi, Y., Bastow, K. F., Yu, D., Chen, I-S. and Lee, K-H., 2003, Antitumor Agents. Part 218: Cappamensin A, a New In Vitro Anticancer Principle, from Capparis sikkimensis, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 2223–2225
- Yang, G., Kunze, N., Baumgartner, B., Jiang, Z., Sapp, M., Knippers, R., Richter, A., 1990, Molecular structures of two human DNA topoisomerase I retrosequences, *Gene*, 91, 247.
- Young, S.D., Tran, L.O., Bricher, S.F., Lumma, W.C. Jr., Payne, L.S., 1994, Preparation of benzoxazinones as inhibitors of HIV reverse transcriptase, *Eur. Pat. Appl. Ep.* 582, 455.

- Zhang H, Wang J.C, Liu, L.F, 1988, Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1060–1064.
- Zhang, X.W., Qing, C., Xu, B., 1999, cellular, animal and clinical studies. J Steroid Biochem Mol. Biol. Apoptosis induction and cell cycle perturbation in human hepatoma hep G2 cells by 10-hydrox-yacamptothecin, Anticancer Drugs, 10, 569.
- Zubay G., 1993, Structures of nucleic acids and nucleoproteins, "biochemistry"de Third edition, Wm. C. Brown Publishers, 691-720.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Egemen FOTO

Doğum Yeri : Karaman

Doğum Yılı : 1980

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : Karaman Süper Lisesi

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : 2005 – 2006 Farma – İnterlab Lab.Malzemeleri Ltd.Şti. ' de
moleküler biyoloji ürünleri danışmanı ve İç Anadolu Bölge
sorumlusu olarak görev yaptım.