

**ZEBRA BALIĞINDA TELOMERAZ ENZİMİ
AKTİVİTESİNİN İKİ ORGANİK BİLEŞİKLE
İNİBİSYONUNUN İNCELENMESİ**

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Abdulkerim BİLGİNER

Danışman:

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU

Mart, 2015

BURDUR



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Abdulkerim BİLGİNER tarafından **Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU** yönetiminde hazırlanan “**Zebra Balığında Telomeraz Enzimi Aktivitesinin, İki Organik Bileşikle İnhibisyonunun İncelenmesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

..../..../....

(İmza)

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Kurumu

Başkan

(İmza)

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Kurumu

Jüri Üyesi

(İmza)

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Kurumu

Jüri Üyesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve Sayılı kararı ile kabul edilmiştir

(İmza)

Ünvanı, Adı ve Soyadı

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Telomerlerin Yapısı ve Fonksiyonu	2
1.2. Telomeraz	4
1.3. Kanser Kemoterapisi	8
1.3.1. Adjuvan Kemoterapi	9
1.3.2. Neoadjuvan Kemoterapi	9
1.3.3. Kemoterapi Toksikitesi ve Yaygın Kullanılan Ajanlar	9
1.4. Enzim İnhibisyonu Temeline Dayanan Tedaviler	11
1.4.1. Ubikitin- Proteozom İnhibisyonu	11
1.4.2. Topoizomeraz İnhibisyonu	13
1.4.3. Glikoliz İnhibisyonu	14
1.4.4. Matrix Metalloproteinaz İnhibisyonu	16
1.4.5. Glutasyon S Transferaz İnhibisyonu	17
1.4.6. Telomeraz İnhibisyonu	18
1.5. Model Organizma Organizma Olarak Zebra Balığı	23
2. MATERYAL ve YÖNTEM	25
2.1. Materyal	25
2.2. Yöntem	27
2.2.1. Hücre Ekstrelerinin Hazırlanması ve PCR	28
2.2.2. PCR Amplikasyonu (TRAP reaksiyonu) işleminin Yapılması	29
2.2.3. Hibridizasyon ve ELİSA İşleminin Yapılması	29
2.2.4. İstatistik	31
2.2.5. RTA Değerlerinin Hesaplanması	31
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
3.1. Tüm Gruplar için İstatistiksel Olarak Uygulanmış Mann-Whitney Testi Sonuçları	33
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
5. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	45

ÖZET

Yüksek Lisans

Zebra Balığında Telomeraz Enzimi Aktivitesinin, İki Organik Bileşikle İnhibisyonunun İncelenmesi

Abdulkerim BİLGİNER
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Kanser hastalığının henüz, tüm kanserler için etkili olabilecek net bir tedavisi bulunmamıştır. Dolayısıyla bu hastalık insanlar için önemli bir sağlık sorunudur. Son yıllarda dünyada yeni tedavi stratejileri üretmek üzerine araştırmalar yapılmıştır. Genel anlamda enzim inhibisyonu temeline dayanarak 6 farklı yöntem geliştirilmiştir. Tüm bu bahsedilen enzimlerin doğrudan ya da dolaylı olarak kanser hastalığının gelişimi ve yayılmasında çok etkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada hücrelerin kanserleşmesinde çok önemli rol oynayan telomeraz enziminin, daha önceden sentezlenmiş ve yapısal olarak telomeraz enzimi inhibisyonu yapabileceği düşünülen, iki imidazo[1,2-a]pirazin türevi kimyasal maddeyle etkileşimi incelenmiştir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında zebra balıklarına uygulanan 2n kodlu 6-(4-Metilfenil-8-(4-klorofenil)imidazo[1,2-a]pirazin ($C_{19}H_{14}N_3Cl$) isimli bileşiğin telomeraz enzimi inhibisyonu gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Enzim inhibisyonu, Telomeraz, Antikanser ilaçlar, Zebra Balığı
Danışman: Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi BAP (Bilimsel Araştırma Projesi) tarafından 0214-YL-14 no'lu projeden desteklenmiş

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigation of Inhibition of Telomerase Enzyme Activity in Zebrafish by Two Organic Compounds

Abdulkerim BİLGİNER
Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Sciences
Department of Biology

A clear treatment could not discovered for the cancer disease. Therefore, this disease is a major health problem for people. In recent years, research on generating new treatment strategies in the world are made. Inhibition of enzymes in general different methods, have been developed on the basis of. All the mentioned enzymes directly or indirectly in the development and spread of cancer is thought to be very effective. In this study, the telomerase enzyme inhibition will be investigated that created by two organic compounds which are derivatives imidazo[1,2-a] pyrazine.

As a result in this thesis, The applied zebrafish 2n coded 6- (4-methylphenyl)-8- (4-chlorophenyl) imidazo [1,2-a] pyrazine (C₁₉H₁₄N₃Cl) from compound were determined show inhibition of telomerase.

Keywords: Enzyme inhibition, Telomerase, Anticancer drugs, Zebrafish

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU, Mehmet Akif Ersoy University Art and Sciences Faculty, Department of Biology

The present M.Sc. thesis was supported by BAP under the project no of 0214-YL-14

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın hazırlanması ve planlanmasında, bilgilerini ve tecrübelerini aktararak bana yol gösteren değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Ayşe Göl MUTLU'ya, çalışmada kullandığım organik bileşikleri temin eden değerli hocam Doç. Dr. İsmail KAYAGİL'e ve çalıőmama bizzat katılarak emek sarf eden sevgili arkadaőım yüksek lisans öğrencisi Hülya YILDIZ'a teőekkürlerimi sunarım. Tez çalıőmamın gerçekleőebilmesi için yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. őeref DEMİRAYAK hocama da teőekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca alıőma boyunca bana maddi manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme ve değerli dostlarıma çok teşekkür ederim. Tezin yapılabilmesi için maddi kaynak sağlayan BAP yönetim birimine ve çalıőanlarına da teőekkürlerimi sunarım.

Abdulkerim BİLGİNER
BURDUR, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kromozom üzerinde floresan boyayla işaretli telomer bölgeler.....	1
Şekil 1.2. İnsanda telomer yapısı ve telomerle ilişkili proteinler.....	2
Şekil 1.3. Telomer yapısı ve shelterin protein kompleksinde bulunan proteinler..	3
Şekil 1.4. Telomeraz yapısı ve bileşenleri	4
Şekil 1.5. Telomerik DNA ve telomeraz bağlantısı.....	5
Şekil 1.6. Telomer sonunda bulunan G-çıkıntı (overhang).....	6
Şekil 1.7. Normal, germ ve kanser hücrelerinde telomeraz aktivasyonuna bağlı telomer uzunluğu.....	7
Şekil 1.8. Hücrede yaşlanmada M1 ve M2 evreleri ve kanserleşme.....	8
Şekil 1.9. Proteozom yapısı.....	11
Şekil 1.10. Ubikitin-Proteozom sistemi.....	12
Şekil 1.11. Topoizomeraz yapısı.....	13
Şekil 1.12. Glikoliz basamakları.....	15
Şekil 1.13. Glikoliz basamaklarında görevli önemli enzimler inhibe eden maddeler mavi ile gösterilmiştir.....	15
Şekil 1.14. Matriks metalloproteinazların genel yapısı.....	16
Şekil 1.15. Telomeraz hedefli kemoterapi ve normal kemoterapi.....	18
Şekil 1.16. Telomeraz gen terapi.....	20
Şekil 1.17. Telomeraz inhibisyonunda G-dörtlüsü (quadruplex) ligandları ve bağlandıkları telomer bölgeler.....	21
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan örnek bir birey.....	25
Şekil 2.2. Çalışmada uygulanan buz anestezisi.....	26
Şekil 2.3. Mikroenjeksiyonla organik kimyasal maddelerin bireylere enjekte edilmesi.....	26
Şekil 2.4. Çalışmada kullanılan mikroenjeksiyon.....	27
Şekil 2.5. TMB substrat çözeltisi konulan kuyucuklarda renk gelişimi.....	30
Şekil 2.6. ELİSA prosedürü gereğince durdurucu solüsyon uygulanmış okumaya hazır plate.....	30
Şekil 3.1. Relatif telomerazın ortalama değerlerini tüm gruplar için gösteren grafik.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

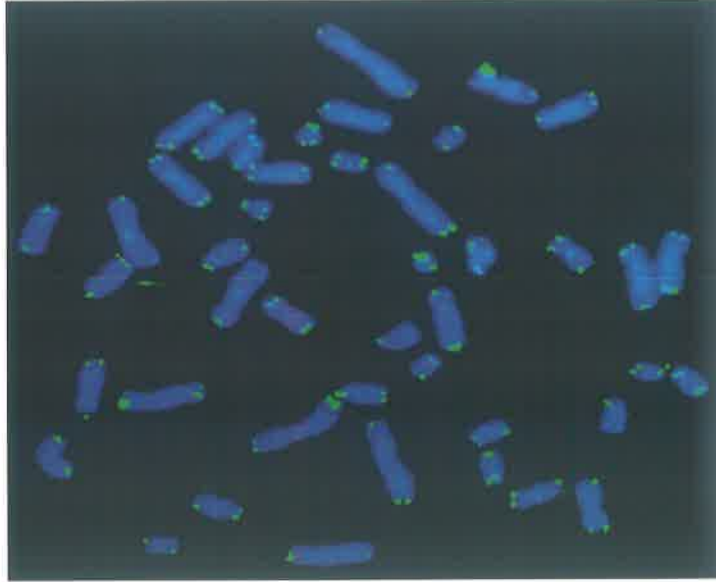
	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Kemoterapide yaygın kullanılan ajanlar.....	10
Çizelge 1.2. Telomeraz inhibitörlerinin mekanizmaları ve hedef bölgeleri.....	23
Çizelge 3.1. RTA değerlerinin ortalaması ve standart hata tablosu.....	32
Çizelge 3.2. Tüm grupların Mann-Whitney Testi sonucu oluşan p değerleri.....	34

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	Dimetilsülfoksit
D-loop	Tek şeritli telomer döngüsü
ELİSA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
GST	Glutasyon S transferaz enzimi
MMP	Matriks metalloproteinaz enzimi
hTERT	İnsan telomerazının katalitik alt brimi
hTERC	İnsan telomerazının şablon olarak görev yapan RNA komponenti
PCR	Polimeraz zincir eaksiyonu
POT1	Telomer koruma proteini 1
RTA	Relatif telomeraz aktivitesi
T-loop	Çift şeritli telomer döngüsü
TRAP	Telomerik tekrarlıma amplikasyon protokolü
TRF1	Telomerik tekrarlıma bağlayıcı faktör 1
TRF2	Telomerik tekrarlıma bağlayıcı faktör 2

1. GİRİŞ

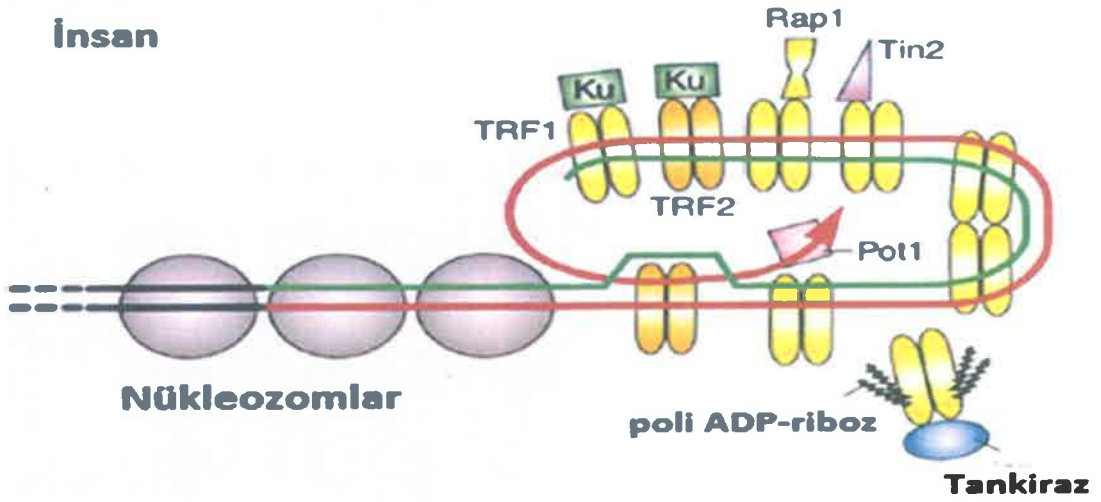
Sayırsız genetik ve epigenetik değişiklikler, normal hücrelerin kötü huylu tümörlere doğru değişmesinde etkilidir. Birçok kanser hücresi, büyümek için gerekli biyolojik yetenekleriyle yayılmak için birçok sinyal yolunu komuta eder ve bunun gibi somatik olayları kullanır böylelikle ana organizmanın zarar görmesine ve hatta ölümüne yol açar. Kanser genomları yüksek derecede yeniden düzenlenmiş, karmaşık translokasyonlar ve bölgesel kopya sayısındaki değişikliklerle karakterizedir. Kanser genomunun istikrarsız olmasının altında yatan mekanizmaları ortaya çıkarmak için çaba sarf edilmiş, bu bağlamda telomerlerin önemli bir rolü ortaya çıkmıştır (Şekil 1.1) (Artandi ve Di Pinho, 2009).



Şekil 1.1. Kromozom üzerinde floresan boyayla işaretli telomer bölgeler (Hsu'dan, 2014).

1.1. Telomerlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Telomerler; kromozom uçlarını koruma ve genomik stabilite için gerekli olan, kromozom uçlarında bulunan deoksiribonükleoprotein kompleksleridir. Telomerler, “sheltherin” olarak bilinen 6 proteinden oluşan komplekse bağlı Guanin (G) bazı bakımından zengin DNA dizisinin bir biri ardına tekrarından oluşur (Şekil 1.2) (Donate ve Blasco, 2011). Telomerler lineer kromozomların uçlarıdır. Memeli kromozomlarının ucu bir TTAGGG dizisinin tekrarı şeklinde sekansa sahiptir (Garcia ve diğ., 2008).

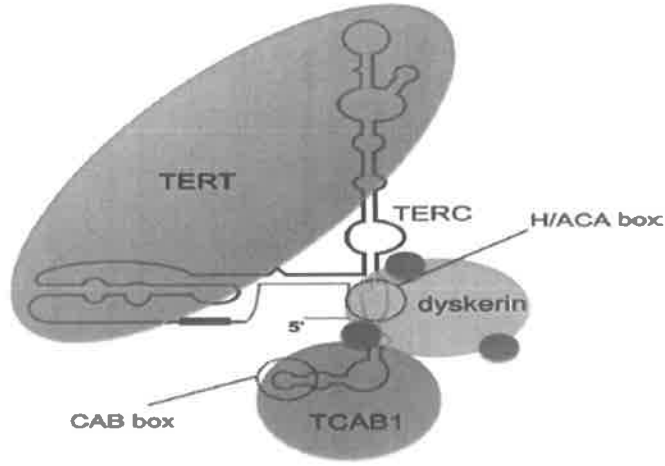


Şekil 1.2. İnsanda telomer yapısı ve telomerle ilişkili proteinler. (Blacburn'den, 2001).

Memeli hücrelerinde çift şeritli telomerik tekrarlar, komplekse yardımcı enzimlerden biri olan tankiraz bulunduran “sheltherin” ya da “telozom” olarak bilinen multiprotein kompleksine bağlıdır. Shelterin kompleksi; telomerik tekrarlama bağlayıcı faktör 1 (TRF1), telomerik tekrarlama bağlayıcı faktör 2 (TRF2), TRF1-etkileşimci protein 2 (TIN2), bastırıcı-aktivatör proteini 1 (Rap1), telomerler koruma proteini 1 (POT1) ve TPP1 (eski isimle ptop / Pip1 / TINT1) olmak üzere 6 proteinden oluşur. Telomer, çift kollu bir T-loop ve tek şeritli D-loop oluşturacak şekilde kendi üstüne

1.2. Telomeraz

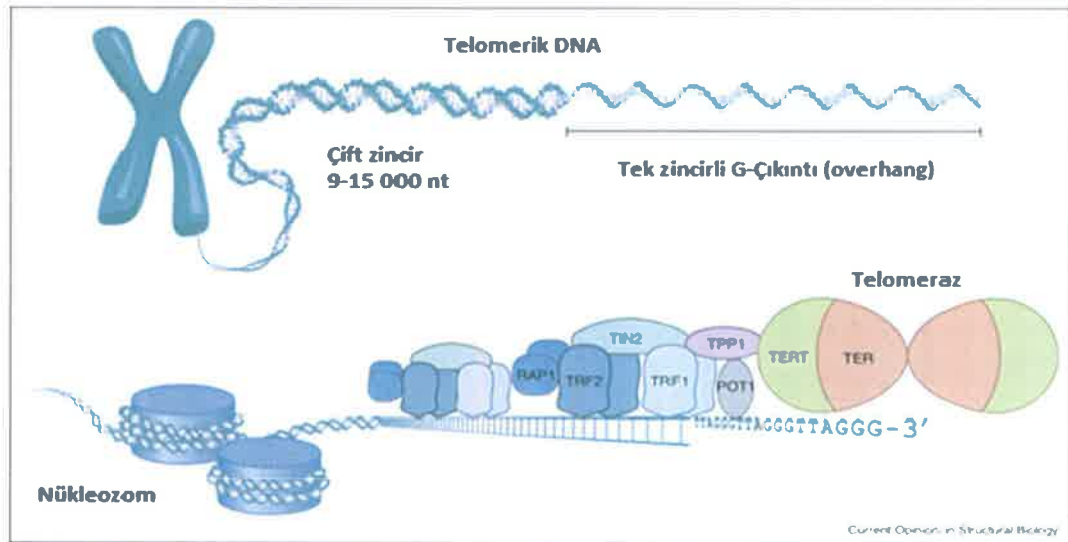
Telomerlerin kısalması, hücre bölünmesi sırasında DNA polimerazın kromozom uçlarını çoğaltmadaki yetersizliğinden dolayı ‘uç replikasyon problemi’ olarak bilinen sorunla ilişkilidir. Telomeraz, yıpranmış telomere TTAGGG tekrarlı dizisini kendiliğinden ileri dönük kromozom ucuna ekleyerek telomer kaybını telafi edebilen hücresel bir enzimdir (Şekil 1.4) (Donate ve Blasco, 2011).



Şekil 1.4. Telomeraz yapısı ve bileşenleri (Artandi ve Di Pinho'dan, 2009).

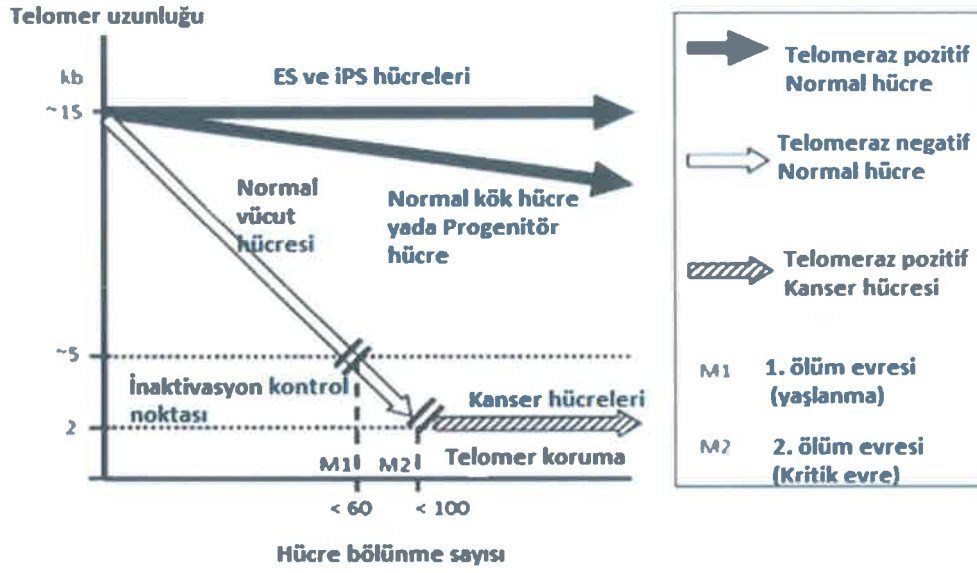
Telomeraz ters transkriptaz aktivitesi (TERT) olan bir katalitik alt birimi, DNA sentezi için bir şablon olarak hareket eden bir RNA komponenti (TERC) ve buna bağlanan stabilize eden protein olan dyskerin (Dkc1)'i kapsar (Şekil 1.4) (Donate ve Blasco, 2011). Omurgalılarda TERC'e ait 3' ucu, telomeri uzatmak için gereken dizi motiflerini bulundurur. Bu bölgede, fare ve insanda TERC kodlama-RNA'lar belirli bir sınıfı tanımlar ve bir H / ACA dizisi motifine sahiptir. Bu H / ACA RNA'lar, diğer hücresel RNA'ların modifikasyonu için kılavuz olarak hareket eder ve iki gruba ayrılır. H / ACA kutusu küçük nükleolar RNA'ları (snoRNAs) çekirdekçikte biriktirir ve ribozomal RNA'ların modifikasyonunda yer alırlar. Diğer grup, H/ ACA ile ilişkili

terminal ucundan sürekli genetik bilgi kaybı olur. Bu hücrenel yaşlılık (senesens) olarak açıklanır. Telomeraz aktif hücrelerde, her bölünmede telomer sonu kayıplar ters transkriptaz etkisiyle eklendiğinden bu sorun yaşanmaz (Şekil 1.6) (Blackburn, 2001). Son yıllarda yapılan çalışmalar, telomeraz aktivitesinin normal insan somatik hücrelerinde sınırlı fakat kanser ve ölümsüzleştirilmiş hücrelerde de yüksek olduğunu göstermiştir (Buseman ve diğ., 2012). Yetişkin dokularda fare transgeni kullanılarak aktiveleştirilen telomerazla ilgili yapılan çalışmada, yaşlanmayı önleyici bir etkisi olduğu kesin olarak kanıtlanmış ancak kanser görülme sıklığı artmıştır (Jesus ve Blasco, 2012).



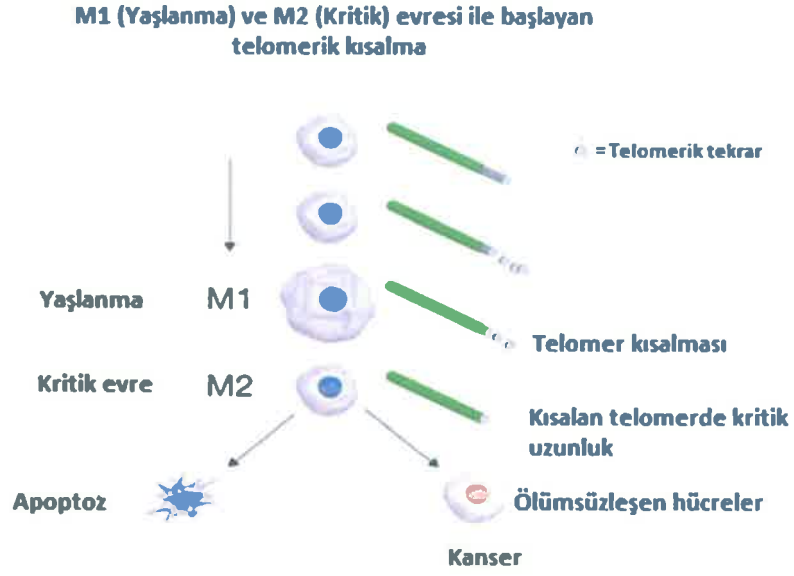
Şekil 1.6. Telomer sonunda bulunan G-çıkıntı (overhang). Telomere bağlanarak TTAGGG dizilerini ekleyen telomeraz etkileşimi (Sandin ve Rhodes'dan, 2014).

Her ne kadar telomeraz aktivitesi yetişkin kök hücrelerde bulunsa da en iyi en güçlü telomeraz aktivitesi, pluripotent kök hücreler ve embriyonik gelişimin erken evrelerinde görülür (Şekil 1.7). Ancak yetişkin dokularda telomeraz aktivitesi yaşlanma ile ilişkili telomer kısalmasını önlemek için yeterli değildir (Donate ve Blasco, 2011).



Şekil 1.7. Normal, germ ve kanser hücrelerinde telomeraz aktivasyonuna bağlı telomer uzunluğu. Vücut hücrelerinde bulunan telomerler her bölünmede kısalır ve M1 denilen yaşlanma otaya çıkar kısalma devam edip kritik uzunluğa ulaşınca M2 denen kriz noktası oluşur. Hücre bu evreden sonra ya apoptozise uğrar yada kanserleşir. Ayrıca şekilde progenitör ve kök hücrelerde telomeraz aktivitesi olduğu belirtilmiştir (Buseman ve diğ.'den., 2012).

Hücresinin geleceği telomer uzunluğunun düzenlenmesine bağlıdır. Telomerlerin korunması açısından telomeraz aktivitesi ana mekanizmadır (Garcia ve diğ.,2008). Telomeraz bulunmayan hücrelerde yada telomeraz ifade eksikliğinde, hücre her bölünmede telomer bölgelerden kısalacak ve kritik uzunluğa gelince ki bu yaşlılıkla ilişkilendirilir (Şekil 1.8), DNA hasarı sinyali gibi algılanıp bununla ilgili apoptozis mekanizması devreye girecektir (Blackburn, 2001).



Şekil 1.8. Hücrede yaşlanmada M1 ve M2 evreleri ve kanserleşme (Shay ve Wright'dan, 2010).

1.3. Kanser Kemoterapisi

Tümör supresor genlerdeki mutasyon, biriken DNA hasarı ve aktifleşen telomerazla birlikte hücrenin kanserleştiğiyle ilgili kanıtlar mevcuttur (Boccardi ve Paolisso, 2013). Bu nedenle 1950 ve 1960'lı yıllarda kemoterapinin gelişmesiyle belirli kimyasal maddelerin kanser hücrelerine uygulanması, hematolojik kötü huylu tümörlerin ve gelişmiş katı tümörlerin çeşitli türleri olan hastalar için iyileştirici tedavi stratejileriyle sonuçlanmıştır (DeVita, 2010). Kemoterapi normal hücrelere nispeten, tümör hücrelerini öldürmeyi amaçlamaktadır (Greenhalgh ve Symonds, 2010). Kemoterapi ilaçları hücre bölünmesi süreçleri dahil biyokimyasal mekanizmalara müdahale ederek etkilerini gösterirler. Erken evrede kanser hastalığında, düşük riskli hastalar sıklıkla tek başına cerrahi olarak tedavi edilir, ama birçok durumlarda tedavilerin bir kombinasyonu gereklidir (Caley ve Johns, 2012). Halen kemoterapi klinik olarak 4 uygulamada kullanılmaktadır;

- I. İlerlemiş kanser hastalığı için birincil indükleme tedavisi
- II. Bir ameliyat veya radyasyon tedavisinin tek başlarına yetersiz kalması durumunda hastalar için neoadjuvant kemoterapi

- III. Yerel tedavi metotları cerrahi veya radyasyon dahil olmak üzere adjuvant tedavi
- IV. Kanser yığınları bölgelerine direkt aşılama veya vücudun kanserden etkilenen özel bölgelerine doğrudan perfüzyon (DeVita, 2010).

1.3.1. Adjuvan Kemoterapi

Kanser tedavisinde cerrahiden sonra lokal bölgeye, çeşitli kemoterapötik ilaçların kombinasyon oluşturarak birlikte verilmesi şeklinde uygulanan kemoterapi yöntemidir. Hastalığı kesin olarak ortadan kaldırmayı amaçlar (Caley ve Johns, 2012).

1.3.2. Neoadjuvan Kemoterapi

Mümkün olduğunca erken adjuvan tedavi verilmesinin potansiyel avantajları vardır. Bu yöntem ameliyattan önce verildiğinde, 'neoadjuvan' adını alır. Mikrometastaz yapabilen tümörlere yöneliktir (Caley ve Johns, 2012).

1.3.3. Kemoterapi Toksisitesi ve Yaygın Kullanılan Ajanlar

Kemoterapötik ilaçlar hücreleri öldürerek çalışır. Ancak kemoterapide en büyük handikap kanser hücrelerinin yanında, normal sağlıklı hücreler üzerinde de toksik etki oluşturmasıdır. Bu yüzden ilaçlar uygun dozda ve planlı şekilde kullanılmalıdır (DeVita, 2010). Tüm geleneksel anti-kanser ilaçları toksik etki gösterir. Kemoterapide yaygın kullanılan ve DNA'ya en çok hasar veren ajanlar farklı yan etkilere neden olacaktır (Çizelge 1.1) (Makin, 2013).

Çizelge 1.1. Kemoterapide yaygın kullanılan ajanlar (Caley ve Johns'dan, 2012).

İlaç sınıfı	Etki Mekanizması	Örnekler
Alkilizan ajanlar	Proteinler, DNA ve RNA gibi önemli moleküller üzerinde kovalent bağlar oluşturarak hücre fonksiyonunu bozabilir. Kimyasal yapıları ve kovalent bağlama mekanizması ile sınıflandırılmıştır.	Sisplatin, karboplatin, klorambusil, siklofosamid, ifosfamid
Anti-metabolitler	DNA ve RNA sentezinde rol oynayan doğal olarak oluşan metabolik yapısal analoglarıdır. Normalde DNA ya da RNA'ya katılabilir, ya da anahtar bir enzimin katalitik bölgesine bağlanır.	5-Fluorourasil, metotreksat, pemetreksed, merkaptopurin, gemsitabin
Anti-tümör antibiyotikler	Liflerin kırılmasına neden olan serbest radikalleri oluşturarak belli dizilerde birleşir Antrasiklinler, mantar ürünü olan , <i>Streptomyces</i> da topoizomerez aksiyon mekanizmasına sahiptir. Çoğaltma sırasında, DNA'nın sarmal oluşturmaması için gereklidir.	Bleomisin, antrasiklinler (örneğin doksorubisin, epirubisin)
Topoizomerez inhibitörleri	Topoizomerezları DNA 'nın topolojik yapısına etki eden enzimlerdir. Topoizomerez inhibitörleri DNA'nın sarmal yapısının oluşturmamasından sorumlu maddelerdir.	Topoizomerez I - irinotekan, topotekan Topoizomerez II - etoposid
Tubulin bağlama ilaçlar	Vinca alkaloidleri tubuline bağlanırlar ve mitoz sırasında önemli olan mikrotübül oluşumunu önlerler. Tubulinler aynı zamanda, hücre şekli ve hücre içi ulaşım ve aksonal fonksiyon için gereklidir.	Vinca alkaloidleri - vinkristin, vinorelbin Taksoitler - dosetaksel, paklitaksel

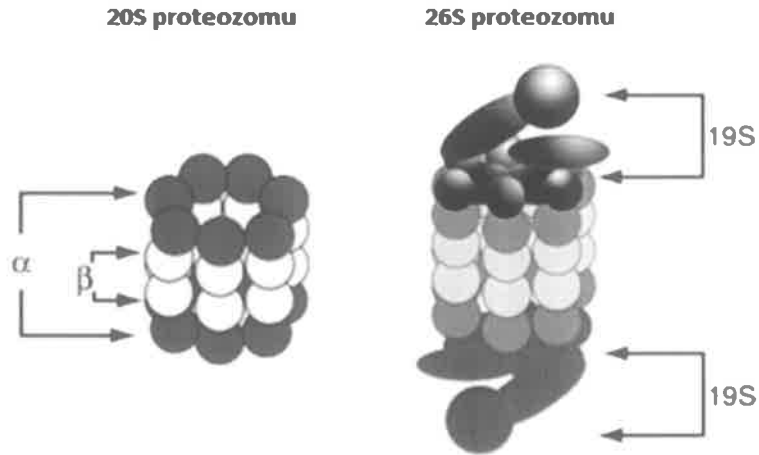
1960 ve 1970'li yılların başlarında, klinik etkileri bilinen kullanılabilir antikanser ilaçlarının yerine biyokimyasal mekanizmalara dayalı ilaç kombinasyonları kullanılmaya başlanmıştır (De Vita, 2010). Son çalışmalarda büyük gelişmeler elde edilmiş daha spesifik tedaviler geliştirilmiştir. Bu hedefler büyüme faktör reseptörleri, sinyal molekülleri, hücre döngüsü proteinleri, apoptoz ve kanser hücrelerine özel anjiyojenezin modülatörlerini içerir (Greenhalgh ve Symonds, 2010). Ayrıca kanserle ilişkili enzimleri hedef alan inhibitör maddeler geliştirilerek örneğin, anti-kanser antikorumları, tirozin-kinaz inhibisyonu gibi enzim inhibisyonu temeline dayanan tedaviler bulunmuştur (Makin, 2013).

1.4. Enzim İnhibisyonu Temeline Dayanan Tedaviler

1.4.1. Ubikitin-Proteozom İnhibisyonu

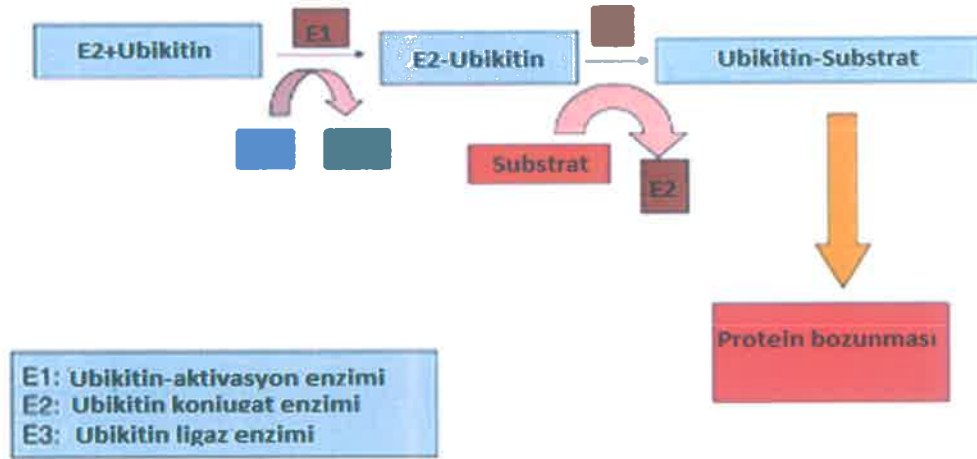
Hemen hemen tüm hücrel fonksiyonlar proteozom tarafından düzenlenir. Örneğin, hücre döngüsünün ilerlemesi sırasında mitoz için G2 fazında, siklin B ve cdc2'den oluşan mitoz destekleyici faktör (MPF), birçok mitoz düzenleyen proteinleri fosfatlar. DNA transkripsiyonu, DNA onarımı, ve anjiyogenez gibi diğer hücrel fonksiyonlar sadece fizyolojik homeostazda değil, aynı zamanda karsinogenezdeki hücrel olaylar, ubikitin-proteozom yolu tarafından düzenlenir (Voutsadakis ve Papandreu, 2010).

26S proteozomu, bir 19S düzenleyici bir bileşen ile bir ya da her iki ucundan kapatılmış bir 20S çekirdek katalitik bileşen (20S proteozomu) içeren bir 2000 kDa multisubunit silindirik bir komplekstir (Şekil 1.9) (Adams, 2003).



Şekil 1.9. Proteozom yapısı (Adams'dan, 2003)

Bu sistemin çalışması için öncelikle hedef proteinin ubiquitine bağlanması gerekir. Bu sistem 3 adımda gerçekleşir. İlk olarak, ADP-ATP dönüşümünden enerji kullanarak, E1 adı verilen ubiquitin-aktive edici enzim, ubiquitinine bağlanır. Daha sonra, ikinci aşamada, E1-bağlanmış ubiquitin, ubiquitin-bağlayıcı enzim veya E2 olarak adlandırılan ikinci bir konjugat enzime aktarılır. Son olarak, üçüncü bir enzim, bir ubiquitin ligaz veya E3, hedef proteine E2 ubiquitini transfer eder (Şekil 1.10). Ubiquitin tarafından proteinler, 19S veya düzenleyici parçacık olarak adlandırılan proteozom silindirin dış kısmının belirli alt-birimleri tarafından tanınır. Bu parçacık ubiquitin ve 20S proteozom, 3 farklı proteolitik aktivitelere sahip proteozom silindirin orta kesiminde, hedef proteini ayrıştırır (Ande ve diğ., 2009).



Şekil 1.10. Ubiquitin-Proteozom sistemi (Voutsadakis ve Papandreu'dan, 2010).

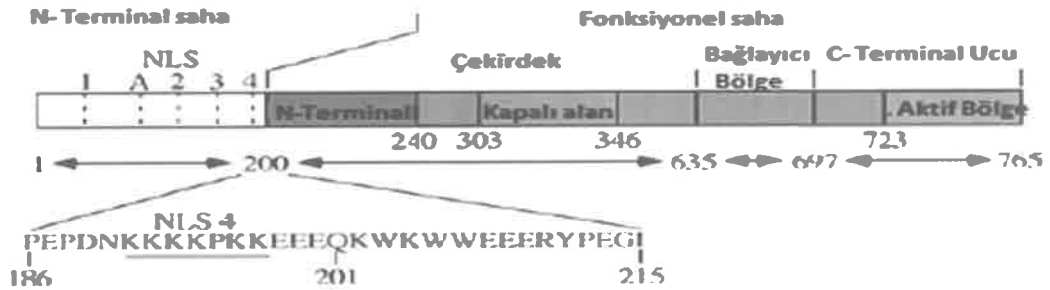
Ubiquitin-proteozom yolu, hücre döngüsünü düzenleyici proteinleri de dahil olmak üzere diğer hücre proteinlerinin yok edilmesinde önemli bir rol oynar. Bu yollar tüm hücrelerin proliferasyonu ve hayatta kalması için kritik önem taşır. Özellikle de kanserli hücrelerde, proteozom inhibisyonu potansiyel olarak bir anti-kanser terapi için gereklidir (Adams, 2003). Ubiquitin sistemindeki bileşenleri hedef alan küçük molekül inhibitörleri potansiyel anti-kanser ilaç olarak kullanılabilir. Şimdiye kadar, birkaç

proteozom inhibitörleri; peptid aldehydler, boronatlar, sülfonatlar, peptid epoksi ketonlar ve beta-laktonlar olmak üzere geliştirilmiştir. Bortezomib (Velcade® adı altında piyasada bulunmaktadır) ile spesifik olarak in vitro ve in vivo koşullarda, hem de normal hücreleri sağ bırakarak, tümör hücrelerini öldüren bir dipeptid boronat klinikte kombinasyon kemoterapi ilaçlarıyla beraber kullanılmaktadır (Ande ve diğ., 2009).

1.4.2. Topoizomeraz İnhibisyonu

Topoizomerazlar esas olarak, DNA topoloji kontrolü ile ilişkili olan hepsi prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan yüksek düzeyde korunmuş bir enzim familyasındandır. İnsan *TOP1* geni kromozom 20q11.2-13.1 yer almaktadır ve 100 kDa'lık bir proteini kodlar. Protein, ATP-bağımsız bir şekilde DNA tek zincirini endonükleolitik aktivitesi aracılığıyla keser ve sonra iki zincir ucunu birleştirir. (Tomicic ve Kaina, 2013).

TOP1, 765 amino asitten oluşur. 200 amino asit içeren yapısal olmayan N-terminal bölgesini, 565 amino asitlik yapılandırılmış bir fonksiyonel sahaya bağlanan ve düğüm bölgelerinden DNA'yı rahatlatan bir enzimdir (Şekil 1.11) (Laco ve Pommier, 2008).



Şekil 1.11. Topoizomeraz yapısı. Topoizomerazda bulunan N-terminal, fonksiyonel kısım ve C-terminal ucunda bulunan aktif bölge (Laco ve Pommier'den, 2008).

İnsan genomunda nükleer topoizomerazı kodlayan yedi topoizomeraz geni vardır. Bunlar Topoizomeraz I (*TOP 1*), mitokondriyal topoizomeraz I (*TOP 1 mt*), II α ve β (*TOP2 α / β*) topoizomerazlar III α ve β (*TOP3 α / β*) ve eşey hücrelerinde kısıtlı Spo11 topoizomerazlardır (Tomicic ve Kaina, 2013). Topoizomerazların, hücre döngüsü, DNA replikasyonu, transkripsiyon ve çoğalma gibi hücre için kritik olaylarda önemli rolü vardır (Costenaro ve diğ., 2007). Topoizomeraz I, DNA replikasyonu sırasında oluşan düğümü çözmek için, aktif olan tirozin bölgesiyle DNA zincirindeki fosfat omurgaya bağlanır sonucunda DNA zincirinin 3' ucunda tirozin-fosfat bağı oluşarak zinciri keser ve ayırır. 5' OH ucu serbest kalarak düğüm çözülür ve replikasyon işlemi sorun yaşamadan devam eder (Laco ve Pommier, 2008). Bu sebeplerle topoizomeraz I inhibitörleri, anti-tümör maddeleri için yeni bir ilaç ailesini oluşturmaktadır. Kamptotesin'in türevi olan topotecan ve irinotecan insan kanseriyle mücadele için yeni bir silahtır. Bu iki ilaç topoizomeraz I - DNA kompleksi düzeyinde, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesinde etki gösterir. Bu etki mekanizması, kamptotesin ile sınırlı değildir. Örneğin, Hoechst 33258 ve bu benzofenantridin alkaloidler ve indolokarbazol türevleri gibi DNA interkalatörler, DNA minör açıklık bağlayıcı maddeler de dahil olmak üzere çok sayıda topoizomeraz I inhibitörleri keşfedilmiş ve geliştirilmiştir (Bailly, 2000).

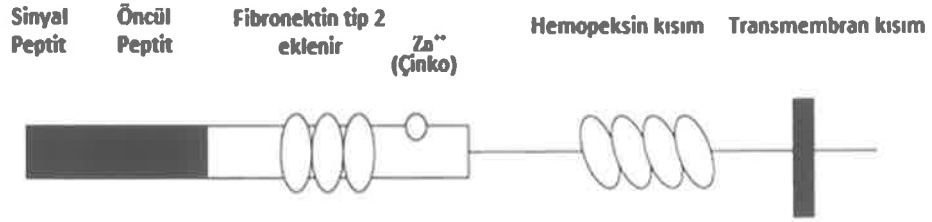
1.4.3. Glikoliz İnhibisyonu

80 yıl önce Warburg, kanser hücrelerinin enerji ihtiyaçlarını karşılamak yani ATP üretimi için glikoliz metabolik yoluna büyük ölçüde bağlı olduğunu keşfetmiştir (Şekil 1.12) (Xu ve diğ., 2005).

1.4.4. Matriks Metalloproteinaz İnhibisyonu

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), hücre-dışı matriksin bozulmasını sağlayan çinkoya bağlı proteinaz enzimlerdir (Sekil 1.14) (Hidalgo ve Eckhardt, 2001). MMP'ler embriyogenez, normal doku modellemesi, yarannın iyileşmesi, ve damar gelişimi gibi, birçok biyolojik süreçde, merkezi bir rol oynar (Visse ve Nagasse, 2002).

Ancak aynı zamanda, kanser hastalığında tümör büyümesi, istilası ve metastaz süreçlerine dahil edilmiş, malign tümörlerde aşırı salgılandığı ve kanserli hastalarda agresif habis bir fenotipe sahip olduğu bulunmuştur (Hidalgo ve Eckhardt, 2001).



Şekil 1.14. Matriks metalloproteinazların genel yapısı (Hidalgo ve Eckhardt'dan, 2001).

Şu anda, insan MMP gen ailesinin 21 üyesi bilinmektedir. Yapı ve alt-tabaka özgüllüğüne göre MMP'ler; kollajenazlar, stromelisinler ve stromelisin-benzeri MMP'ler, matrilizinler jelatinazlar, zar tipi MMP'ler (MT-MMP) ve diğer MMP' ler şeklinde alt gruplara ayrılmıştır (Vihinen ve Kahari, 2002). Ancak bunların tamamının hücre içinde fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılmasa da bu metalloproteinazlar için spesifik inhibitörlerin tasarımı kanserle mücadelede oldukça önemlidir (Visse ve Nagasse, 2002). İnsan kanserleri üzerine çalışmalarda çeşitli MMP'ler aynı organ, normal doku ya da iyi huylu tümörlere göre malign tümörlerde aşırı eksprese olduğunu göstermektedir. Bu sebeple son yıllarda, MMP'lerin küçük bir kısmına karşı seçici sentetik inhibitörler geliştirilmiştir. Şu anda, bu inhibitörler, bir çok kanser türlerine karşı klinik testlerden geçmektedir (Duffy ve diğ., 2009). MMP'lerin aşırı

ekspresyonun, çeşitli kötü huylu tümörlerin gelişmesinde ve büyümesinde önemli bir rol oynadığına ilişkin bulgular sentetik ve doğal MMP inhibitör maddelerin keşfedilmesini ve tedavide kullanılmasını sağlamıştır. 'Batimastat, Marimastat, Solimastat' inhibitör olarak kullanılan maddelerden bazılarıdır (Vihinen ve Kahari, 2002). Sonuç olarak, MMP'ler, kanser tedavisi için çekici bir hedefi temsil ederler ve MMP inhibitörü olan bileşiklerin herhangi bir kanser türünü tedavi edici olarak kullanışlı olup olmadığını belirlemek için, klinik denemeler sürmektedir (Hidalgo ve Eckhardt, 2001).

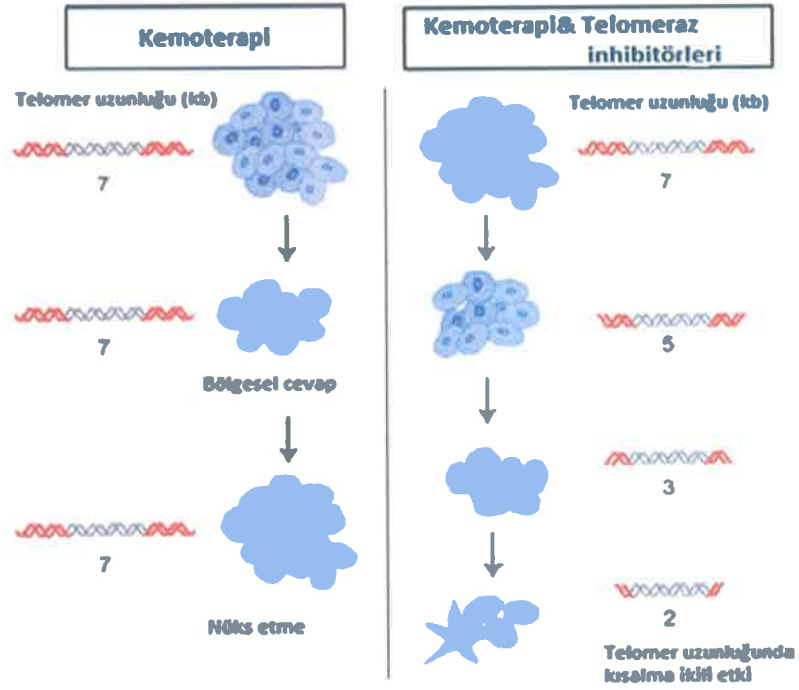
1.4.5. Glutasyon S Transferaz İnhibisyonu

Glutasyon S-transferazlar (GST'ler) reaktif elektrofiller tarafından gerçekleştirilen saldırılara karşı hücresel makromolekülleri korumak için işlev gören Faz II detoksifikasyon enzimleri ailesindedir. GST'ler zara-bağlı mikrozomal ve sitozolik olmak üzere ikiye ayrılır. Sitozolik GST'ler, insan popülasyonlarında belirgin genetik polimorfizm gösterir ve 7 gruba ayrılır (Townsend ve Tew, 2003). Alfa, Mu, Omega, Pi, Sigma, Teta ve Zeta şeklinde adlandırılır. Mikrozomal GST'ler 'eikosanoid ve glutasyon metabolizması membran-ilişkili proteinler' (MAPEGs) olarak belirlenmiştir (McIlwain ve diğ., 2006). Glutasyon ve glutasyon S-transferaz'ın (GST) ilaca dirençli hücrelerle karakterize olması çok önemlidir (Tew, 1994). Genel olarak, GST substratları hidrofobiktir ve elektrofilik merkezinde karbon atomuna sahiptir. Bununla birlikte, bir azot, oksijen ya da kükürt ihtiva etmektedir (Townsend ve Tew, 2003).

GST'ler; kemoterapi maddeleri, böcek öldürücüler, bitki öldürücüler, ve mikrobiyal antibiyotiklere karşı direnç gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Kanser hücrelerinde ilaç direnci gelişimi, kemoterapi başarısızlığında önemli bir unsurdur (Townsend ve Tew, 2003). Son üç yılda, kanser çalışmalarından elde edilen verilere bakıldığında kanser ilaçları dahil olmak üzere çeşitli kimyasallara karşı direnç gelişiminin, GST izozimlerinin anormal ifadesiyle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Kemoterapötik-dirençli tümör hücrelerinin GST izoenzimlerini aşırı ifade ettiği gösterilmiştir (McIlwain ve diğ., 2006). Bu sebeplerden dolayı GST'ler kanser hastalığı tedavisinde kemoterapötik ilaçların hedefi olabilir. Kanser hücrelerinde aşırı ifade edilmesi, GST izozimlerinin inhibisyonunu önemli kılar (Townsend ve Tew, 2003).

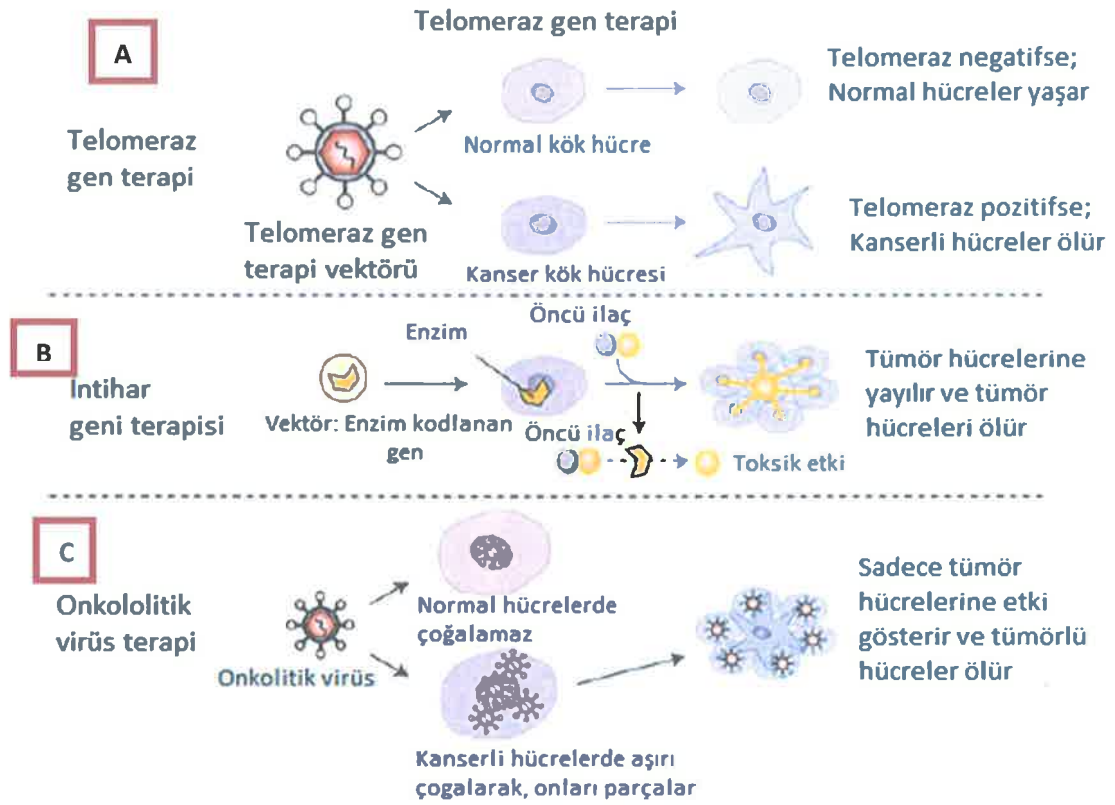
1.4.6. Telomeraz İnhibisyonu

Normal vücut hücrelerinin aksine, katı tümörlerde ve kanser hücrelerinin yaklaşık % 85'inde yüksek telomeraz aktivitesi belirlenmiştir. Bu nedenle, telomeraz daha seçici bir kanser terapisi için yeni ve umut vaat eden bir hedefdir. Telomeraz aktivitesi yüksek ise, kanser hücrelerinin çoğunda olduğu üzere, bu hücreler, ölümsüz hale gelir. Bu temel mekanizmaların keşfi, önemli derecede tıbbi etki oluşturmuş ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini teşvik etmiştir (Şekil 1.15) (Dong ve diğ., 2010). Telomeraz, sınırsız çoğalmayı sağlamak için kanser hücrelerinin büyük çoğunluğu tarafından kullanılan mekanizma olduğundan, insan kanserleri için neredeyse evrensel bir hedef olarak kabul edilir (Buseman ve diğ., 2012).



Şekil 1.15. Telomeraz hedefli ve normal kemoterapi. Telomeraz hedefli kemoterapinin, rutin uygulanan klasik kemoterapiye göre daha etkilidir (Buseman ve diğ' den., 2012).

Kanser kemoterapisi uygulandığında özellikle kanserli hücreleri hedef alır ancak normal ve sağlıklı hücreler üzerinde az veya çok etki gösterir. Telomerazı hedef alan terapiler daha spesifiktir. Telomeraz biyolojisi hedef alınarak geliştirilmiş olan maddelerin üç genel sınıfları vardır bunlar; Gen tedavisi, bağışıklık tedavisi ve küçük molekül inhibitörleri şeklindedir. Gen tedavisi, insan kanser hücrelerindeki telomerazın hTERT yada TERC kısımlarını hedef alan viral intihar vektörü kullanarak toksik etki yaratmayı amaçlar (Şekil 1.16) (Shay ve Wright, 2011). İmmünoterapi, tümör antijenine karşı hTERT hedefli peptid aşuların kullanılmasıdır. Bununla ilgili sitotoksik T hücrelerini aktive eden ve telomerazın TERT bölgesini hedef alan GV1001 aşısı geliştirilmiştir (Tian ve diğ., 2009). Küçük molekül inhibitörleri ise, telomeraz aktivasyonu sırasında telomerazın işlevini kolaylaştıran, çalışması için gerekli olan protein yapılarını yada sinyal yollarını hedef alan oligonükleotit yapıdaki inhibitör maddelerdir (Shay ve Wright, 2011). Son zamanlarda “T-Oligo” adı verilen telomerik DNA'nın terminal ucundaki nükleotit dizisine sahip bir oligonükleotit geliştirilmiştir. Birçok kanser hücrelerinin telomerindeki T-loop yapısını bozarak DNA hasarına sebep olmuş ve sitotoksik etki göstermiş inhibitör bir maddedir. Ayrıca BIBR1532 küçük nükleotik olmayan sentetik bileşik, nükleozidik bileşikler veya duyarlı oligonükleotitlerden farklı olarak rekabetçi olmayan inhibitör maddedir. BIBR1532 doğrudan telomerazın ana bileşenleri olan hTERC ve hTERT'i hedefler ve telomerazı engelleyerek, telomer kısalmasını sağlar. Kanser hücrelerinin büyümesini durdurur (Tian ve diğ., 2009).



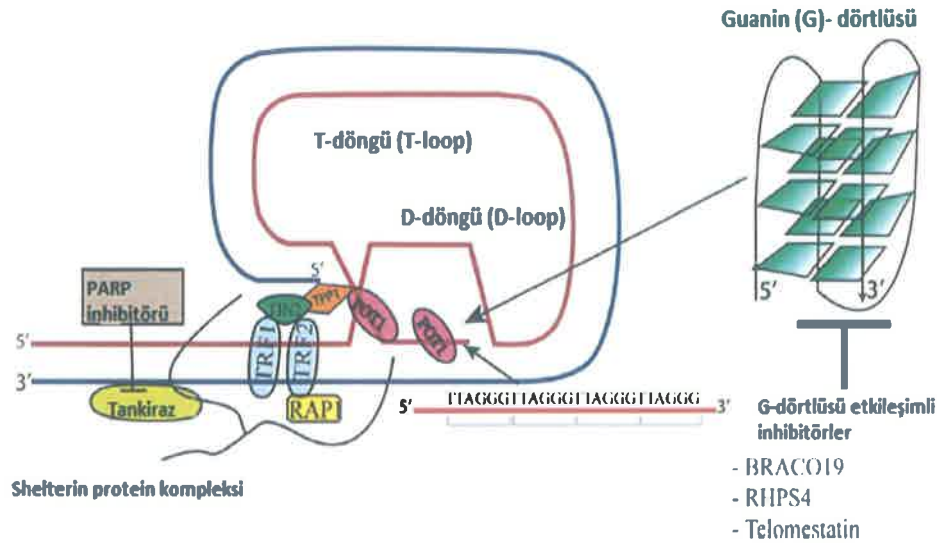
Şekil 1.16. Telomeraz gen terapi. A: siRNA aracılı bir vektör kullanılarak telomerazın hTERT geni hedef alınır. Telomeraz aktivasyonu yüksek olan kanser hücrelerini yok eder. B: Telomeraz hedefli bir vektör kullanılmış inaktif başka bir enzimle kombine edilmiştir. Bu inaktif enzim bir ön ilaç ile aktive edildiğinde sadece telomeraz aktivasyonu olan kanser hücrelerinde toksik etki yaparak onları öldürür. C: Onkolitik virüs bir vektör içinde aktarılır. Telomerazın aktivasyonu sırasında virüsler çoğalarak tüm hücrelere etki eder (Shay ve Keith'den, 2008).

Telomeraz çoğunlukla kanserli hücrelerde aktif olduğundan, normal somatik hücrelerde daha az ya da hiç aktivite göstermediğinden bu normal hücreler telomeraz hedefli kemoterapiden daha az etkilenecekler ve bu tedavi stratejisinin daha az yan etkisi oluşacaktır (Buseman ve diğ., 2012).

Farklı stratejiler tümör hücrelerin de telomerazı inhibe etmek için kullanılmıştır. hTERT veya hTERT farklı moleküller tarafından hedef olabilir. Bu peptid nükleik asitleri gibi, hTERT'e karşı stabilize antisens oligonükleotidler veya metillenmiş riboz şeker halkalarına (2'-O-metil-RNA) RNA oligomerleri bağlanır, hTERT'le hibrit oluşturur ve telomer uzamasını engeller. Telomeraz aktivitesi, hTERT için nükleozidik olmayan bileşiklerinin doğrudan bağlanmasıyla (örneğin, BIBR1532, TELIN) ya da G-

dörtlüsü (quadruplex) etkileşimli bileşikler tarafından tek şeritli telomerik ucunun G-dörtlüsü yapısının dengelenmesiyle (örneğin, BRACO19, TMPyP4) inhibe edilebilir (Dong ve diğ., 2010).

G-dörtlüsü ligandları, telomerlerin G-çıkıntı (overhang) bölgesine bağlanan onları kapatarak, açılmasını engelleyen yapılardır (Şekil 1.17). Bu yapılar oldukça kararlı ve çatal oluşturup çok katlı şekilde olduğundan, telomeraz, aktivasyonu sırasında bunları çözemez ve işlevsiz hale gelir (Güneş ve Rudolph, 2013). Ayrıca, hTERT immünojenik olduğu için, kanser immünoterapisi içinde uygun bir hedefdir. hTERT epitoplara karşı yönelmiş peptitler içeren birden fazla aşı formülasyonları ile ilk klinik çalışmalar, kanserin immun tedavisinin mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, GV-1001, bir biyolojik telomeraz peptid aşısıdır (Dong ve diğ., 2010). Anti-kanser telomeraz immünoterapi uygulanan klinik çalışmalarda elde edilen mevcut sonuçlar cesaret vericidir. Birden fazla aşı stratejileri geliştirilmiş ve melanom, akciğer, prostat, meme kanseri olan hastalarda test edilmiştir. Bu çalışmalar genel olarak hTERT'i pozitif tümör hücrelerine karşı, spesifik bir bağışıklık yanıtı doğurmuştur (Buseman ve diğ., 2012).



Şekil 1.17. Telomeraz inhibisyonunda G-dörtlüsü (quadruplex) ligandları ve bağlandıkları telomer bölgeleri (Ruden ve Puri'den, 2013).

Telomerlerdeki ‘‘shelterin’’ protein kompleksinin de görevli hTERT ile etkileşime giren POT1 ve TPP1, telomeraz aktivitesini de kontrol edebilir. POT1’in aşırı ekspresyonu telomerdeki telomeraz aktivitesini inhibe ederek telomerin kısalmasına yol açar (Artandi ve Dipinho, 2009).

Aktif telomeraz’ın anlık ifade edilmesinde esas olarak, birikmiş hTERC-Diskerin kompleksleri ile hTERT geninin bir araya gelmesi gereklidir. Bu birleşme işlemi HSP90 adlı proteinin varlığını gerektirir (Garcia ve diğ., 2008). HSP90 proteini, hücrede protein sentezinde son düzenlenmeler, fosforilasyon işlemi gibi fonksiyonel işlerde görev alır. Dolayısıyla bu proteinin inhibe edilmesi telomerazın aktif çalışma ortamını da etkileyecek ve inhibe edecektir (Mahalingam ve diğ., 2009).

Tüm bu potansiyel anti-kanser ajanlarını, tümör hücrelerine karşı güvenli ve etkili bir şekilde göndermek ve tümör hücrelerince alınmasını sağlamak önemli ancak zor bir iştir. Antisens bir oligonükleotid ile kombine edilmiş lipit parçası olan GRN163L biyo-bozunabilir nanopartiküller gibi çeşitli telomeraz inhibitörlerinin hücre içine verilmesi için etkili bir taşıma sistemi olarak kullanılabilir (Dong ve diğ., 2010). GRN163L dizisi (5'-palmitat-TAGGGTTAGACAA-NH₂-3') hTERT ile aktif bir kompleks oluşturup engelleyen, hTERC üzerinde 13 nükleotid bölgesini hedef alır. Yapılan çalışmalarda, GRN163L’ye maruz kalan hücrelerde telomerazın inhibe edildiği görülmüş ve beyin, meme, mesane, karaciğer, akciğer, prostat ve mide tümörleri de dahil olmak üzere çeşitli kökenlerden elde edilen kanser hücreleri hatlarında telomer kısalması sağlanmıştır (Buseman ve diğ., 2012).

Telomeraz inhibitörleri, başta tümör hücresi büyümesini etkilemez ama sonrasında telomerlerin kısalmasına neden olarak, belirli bir gecikme süresi sonunda düşük proliferasyon ve apoptoza neden olur. Dolayısıyla, telomeraz inhibitörleri ile kanser hastalarının tedavisinin, uzun süreli tedavi şeklinde olması gerekir. Bu ilaçların düşük yan etkileri vardır. Tümör hücreleri yanında, kök hücreler ve germ hücrelerinin telomeraz aktivitelerinde telomeraz inhibitörlerinden etkilenebilir (Dong ve diğ., 2010).

Kemoterapi, radyasyon ya da anjiyojenik inhibitörleri gibi diğer hedef ilaçlarla birlikte kullanıldığında, telomeraz inhibisyonu ile tedavi daha etkili olabilir. Sadece geleneksel kemoterapi odaklı yaklaşımlarda, tümörler genellikle uzun süren tedaviye direnç geliştirir ve en sonunda hastalığın tekrar nüks etme ihtimali vardır. Telomeraz inhibitörleri kullanımıyla, kemoterapi ilaçlarının ve radyasyonun düşük dozlarda etkin kullanımı sağlanır. Kemoterapi yada radyasyona duyarlılaştırıcı etki ortaya çıkar

(Buseman ve diğ., 2012). Hala daha spesifik kanser tedavisi için geçerli olacak etkili ve güvenli "antitelomeraz" ajanlarını içeren tam bir terapi bulunamasa da, telomeraz fonksiyonu ve yapısı ile ilgili keşifler, yeni bir ilaç hedefini ortaya çıkarmıştır (Çizelge 1.2). Ancak bu konuda hala bilgi edinilmesi ve araştırılması gereken noktalar vardır (Dong ve diğ., 2010). Ayrıca bu hedefleri gerçekleştirmek için, normal kök hücrelerinin ve kanser kök hücrelerinde bulunan telomerlerin, telomerazla ilgili kendini yenileme ve farklılaşmasını düzenleyen mekanizmaları hakkında daha fazla bilgi edinmek gerekir (Shay ve Wright, 2011).

Çizelge 1.2. Telomeraz inhibitörlerinin mekanizmaları ve hedef bölgeleri (Ruden ve Puri'den, 2013).

TEDAVİ EDİCİ YAKLAŞIMLAR	HEDEF	MEKANİZMA	İNHİBİTÖRLER
Küçük molekül inhibitörler	hTERT	Direkt olarak enzimin aktif bölgesine bağlanır.	BIBR1532
Anti-sense oligonükleotitler	hTERC	Telomerazın RNA bileşenine bağlanır.	GRN163L
İmmünoterapi	hTERT	Peptid aşılılarla CD4+ ve CD8+ hücrelerinin immün cevabını ortaya çıkarır.	GV1001, GRNVAC1/2 Vx-001
Gen Terapi	hTERT	hTERT promotor aracılı tümör hücrelerinin parçalamadır. Ön ilaçla aktiveleşir tümör hücrelerini indükler.	Telomelizin Ad-hTERT-NTR/CB1954 hTERT _p -HRP/IAA
G-dörtlüsü ligandları	G- dörtlüsü	Telomerin uc bölgesine bağlanarak telomerazın erişimini engeller.	BRACO19 RHP54 Telomestatin
Telomer ve telomerazla ilişkili proteinler	HSP90	Telomeraz telomere bağlanamaz ve işlevsiz hale gelir.	Geldanamisin(GA) Kurkumin
T- Oligo yolu	Tankiraz G-çıkıntı	Telomerin yapısını bozarak DNA hasarı oluşturur.	PARP inhibitörleri N/A

1.5. Model Organizma Olarak Zebra Balığı

Zebra balığı (*Danio rerio*) olarak bilinen canlı, küçük bir tropikal akvaryum balığıdır (Liu ve diğ., 2014). İlk olarak 30 yıl önce George Streisinger'in laboratuvar çalışması için seçilmiştir (Guo, 2004). 1990'larda Tübingen ve Boston büyük ölçekli

ileri genetik çalışmalarda erken dönemde embriyo gelişimini anlamak için, zebra balık sistemini daha da ileriye taşımıştır (Amatruda ve diğ., 2002).

Zebra balığının erken yaşam evrelerinde genellikle yetişkinler ve gençler ile karşılaştırıldığında zehirli bileşiklere karşı daha duyarlı oldukları gözlenmiştir (Liu ve diğ., 2014). Zebra balığı, sadelik ve karmaşıklığı iyi bir dengede olan diploit omurgalı bir canlıdır. 3-5 cm uzunluğunda, gayet iyi üreyebilen küçük bir balıktır. Diğer omurgalı modellere göre küçük bir alanda çok sayıda barınabilir. Bakımı kolay, maliyeti ucuzdur. Büyük çapta genetik veya biyokimyasal çalışmanın gerçekleştirilmesi için bu ön koşulları kolaylıkla sağlar (Guo, 2004). Balık ve insan evrimsel süreçte son ortak ata ayrılması 300 milyondan fazla yıl olmasına rağmen, kanser biyolojisi için bu iki organizma aynı metabolik özelliklere sahiptir (Amatruda ve diğ., 2002).

Memeli ve zebra balıkları arasında kanser hastalığında telomeraz ifadesinde gözlemlenen farklılıklara rağmen, her ikisinde de bağlanma yerleri göz önüne alındığında, ortak transkripsiyon faktörü tespit edilmiştir (Anchelin ve diğ., 2011).

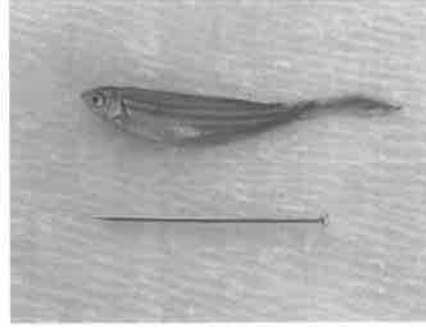
Doğal laboratuvar faresinin aksine zebra balığı, insan benzeri uzunlukta heterojen telomer yapısına sahiptir. Çeşitli dokularda telomeraz aktivitesinin tespit edilmesine rağmen, zebra balığındaki telomerler, insanlardaki gibi kısalmır ve balık yaşlanır (Henriques ve diğ., 2013).

Zebra balığının gelişim süreçleri ve organ fonksiyonları, insan hastalıklarının araştırılmasında büyük bir potansiyele sahiptir (Guo, 2004). Ayrıca insanda kötü huylu tümörlerin yayılmasını anlamak için, omurgalı modellere ihtiyaç duyulur (Amatruda ve diğ., 2002). Tüm bu sebeplerden dolayı zebra balığı, insan gelişimi ve hastalıklarını anlamaya yönelik çalışmalar için seçkin model organizmalardan biri haline gelmiştir (Howe ve diğ., 2012).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

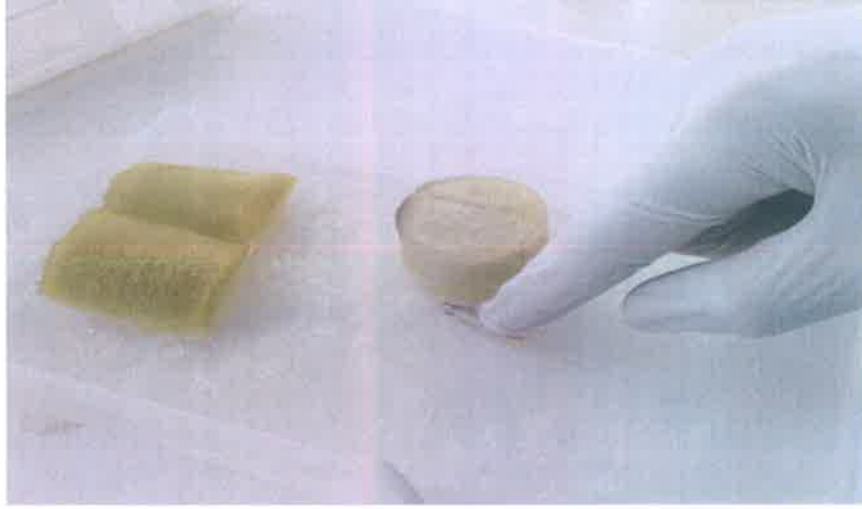
2.1. Materyal

Bu tez çalışmasında materyal olarak zebra balığı kullanılmıştır (Şekil 2.1). Balıklar CES Akvaryum İstanbul Kadıköy şubesinde 100 adet ergin birey olarak hizmet alımı şeklinde temin edilmiştir. Tatlı su akvaryumu içinde 26 ± 1 °C sıcaklıkta ve yeterli oksijen sağlanarak, 7,6 su PH'sında 10 gün aklimatizasyon için bekletilmiştir. Bu süre boyunca her gün, sabah ve akşam olmak üzere ince pul balık yemiyle beslenmişlerdir.



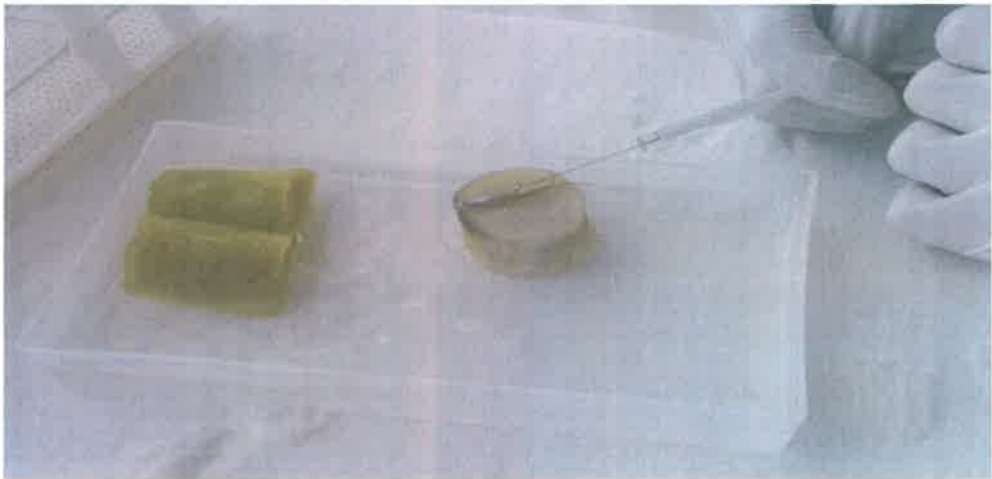
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan örnek bir birey

10 günlük alışma süresi sonunda, balıklar 4 gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan bir tanesi, kontrol grubu olarak hiçbir ekstra uygulamaya maruz bırakılmamış 2. ve 3. gruplara ise telomeraz inhibitörü olabileceği düşünülen iki organik bileşik uygulaması mikroenjeksiyon şeklinde yapılmıştır. Mikroenjeksiyon kullanılmadan önce kalibre edilmiş ve ultra saf suyla temizlenip, steril edilmiştir. Bu bileşikler, buzda anestezi (Şekil 2.2) uygulanan bireylere, üç farklı konsantrasyonda (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M) 7 μ L enjekte edilmiş (Şekil 2.3), etki göstermesi için 2 buçuk saat beklenmiştir. 4. grup, kimyasal maddenin içinde çözüldüğü çözücü olan dimetilsülfoksit'in (DMSO) balıklara uygulandığı 2. bir kontrol olarak yapılmıştır.



Şekil 2.2. Çalışmada uygulanan buz anestezisi

Bu süre sonunda bireylere tekrar buz anestezisi uygulandıktan sonra (Şekil 2.3), diseksiyon işlemi yapılmış ve balıkların dalakları çıkartılmış, örnek olarak ependorf tüplerine alınmıştır. Alınan dalak doku örnekleri uzun süre saklanması açısından, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ derin dondurucuya, daha kısa süreli bekletmeler için ise $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ derin dondurucuya koyulmuştur.



Şekil 2.3. Mikroenjeksiyon ile organik kimyasal maddelerin bireylere enjekte edilmesi

Enzim inhibisyonu için kullanılan kimyasallar, 6-(4-Metilfenil-8-(4-metoksifenil)imidazo[1,2-a]pirazin ve 6-(4-Metilfenil-8-(4-klorofenil)imidazo[1,2-a]pirazin'dir (Demirayak ve Kayagil, 2005).



Şekil 2.4. Çalışmada kullanılan mikroenjeksiyon

2.2. Yöntem

Çalışmada kullanılan ekipman listesi şöyledir:

- Mikrosantifirüj
- Termal döngü cihazı
- Steril PCR tüpü
- Steril pipet uçları
- Pipetler
- Steril ependorf tüpleri
- Steril ultra saf su
- Mikro plaka çalkalayıcı
- Mikro plaka okuyucu

Çalışmada dikkat edilen hususlar:

- RNaz/ DNaz kontaminasyonu olmamalı
- PCR işleminde ultra saf su kullanılmalı
- Kit solusyonları laboratuardaki diğer kimyasal ajanlardan uzak tutulmalı
- Kullanılacak cam malzemeler ve ekipman otoklavlanmalı
- Çalışma sırasında maske ve eldiven kullanılmalı
- Pipet uçları filtreli olmalı

Kullanılan çalışma solusyonları kit prosedürüne (Roche Telomerase PCR-ELİSA kiti kullanılmıştır) göre hazırlanmıştır:

- Solusyon 5 : Gerekli kadar ultra saf su ile seyreltildi (1:10) (1 ay stabil kalabilir)
- Solusyon 6 : 240 µL ultra saf su ile çözüp stok çözelti şeklinde hazırlandı. (6 ay stabil) Gerekli kadarını 'konjugat dilüsyon tampon'u ile 1:10 olacak şekilde seyreltip hemen kullanıldı
- Solusyon10 : Buzda, 20 µL ultra saf su ile çözüp karıştırıldı. Aliquotlara ayrıldı. (1 reaksiyon için 1-3 µL kullanıldı)

Diğer 7 solüsyon için kit prosedürüne göre herhangi bir ön işlem yapılmamıştır.

2.2.1. Hücre Ekstrelerinin Hazırlanması

Bundan sonraki aşamalarda, kullanılan Roche Telomerase PCR-ELİSA kiti içerisindeki talimatlara göre hareket edilmiştir. Kit talimatlarına göre; hücre ekstrelerinin hazırlanması için, donmuş dalak dokuları çıkartılmış ve küçük parçalara ayrıldıktan sonra ependorf tüplere alınmış ve üzerine 200 µL soğuk lizis tamponu eklenmiş, ultrasonik parçalayıcıda 5 kez 30 saniye süresince bekletilmiştir. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra, santifirüj işlemiyle süpernatant ve pellet kısımları ayrılıp, yeni bir tüpe aktarılmıştır. Elde edilen hücre özütünün bir kısmından Bradford yöntemiyle protein miktarı ölçülmüş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.2. PCR Amplifikasyonu (TRAP reaksiyonu) İşleminin Yapılması

PCR reaksiyonu başına PCR amplifikasyonu için uygun tüpler içine tepkime karışımı / hücre özütü 30 (25+5) µL olacak şekilde aktarılmıştır.

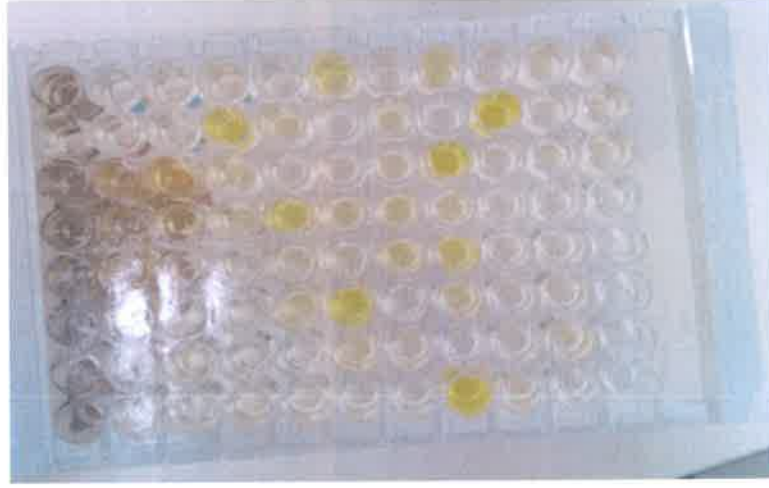
Tüp başına hücre özütü 1-3 µL, negatif kontrol: tüp başına gelen ısı işlem görmüş hücre ekstresi 1-3 µL, denetim şablonu: iki ayrı tüp içine 1 µL pipet kontrolü ve 1 µL lizis tamponu, 50 µL nihai bir hacme kadar, nükleaz içermeyen, iki kez damıtılmış su eklenmiştir.

Bir termal döngü için protokol ile kombine primer uzaması / amplifikasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesi: 25 °C de 10 dakika telomerazın işlev göstermesi ile primerin uzatılması aşaması ve 94 °C de 5 dakika telomerazın inhibe edilmesinden sonra, 94 °C de 30 saniye, 50 °C de 30 saniye, ve 72 °C de 90 saniye 25 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir.

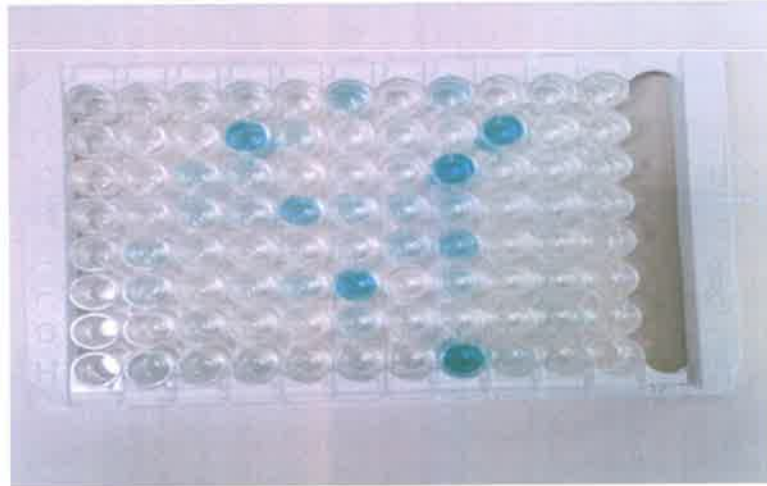
2.2.3. Hibridizasyon ve ELISA İşleminin Yapılması

Örnek başına, her reaksiyon tüpü için denatürasyon solüsyonu 20 µL uygulanmıştır. Kuyucuğa amplifikasyon ürününden 5 µL eklenir ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hibridizasyon tamponundan 225 µL eklenir ve sallamak suretiyle karıştırılıp pipetleme işlemi 100 µL olarak, her bir karışım başına streptavidin kaplı ve kendinden yapışkan folyo kapaklı mikro-titre plakalara yapılmıştır. 2 saat süre ile 37 °C'de çalkalama (shaker) 300 rpm'de mikro-titre plakada inkübe edilip ve hibridizasyon solüsyonunun uzaklaştırılması sağlanmıştır. 250 µL yıkama tamponu ile her bir yıkama arasında en az bir 30 saniye olacak şekilde üç kez yıkanmıştır. Anti-DIG-HRP 100 µL kuyucuklara eklenmiş ve oda ısısında (18-22 °C) 'de 300 rpm'de çalkalama sırasında kapağı folyo ile kaplanmış mikrotitre plaka ile 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Solüsyonun tamamen uzaklaştırılması sağlanmış bunun için her bir kuyu başına en az 30 saniye bekleyerek 250 µL yıkama tamponu ile beş kez durulanır ve yıkama tamponu uzaklaştırılmıştır. Oyuk başına, TMB substrat çözeltisi (oda sıcaklığında) folyo kapaklı kuyucuklara 100 µL eklenip ve 10-20 dakika 300 rpm çalkalama sırasında oda sıcaklığında (18-22 °C), renk gelişimi için inkübe edilmiştir. Reaksiyon substratını ortadan kaldırmadan, renk gelişimini durdurmak için durdurma

reaktifi 100 μ L eklenmiştir (Şekil 2.5). Bir ELISA okuyucu kullanarak, durdurma reaktifi ilave edildikten sonra 15 dakika içinde 450 ve 690 nm'de absorban ölçümü yapılmak suretiyle sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.5. TMB substrat çözeltisi konulan kuyucuklarda renk gelişimi



Şekil 2.6. ELISA prosedürü gereğince durdurucu solüsyon uygulanmış okumaya hazır plate

2.2.4. İstatistik

İstatistiksel değerlendirmelerin yapılması için Minitab 13.0 istatistik programı kullanılmış, Mann-Whitney Testi uygulanmıştır.

2.2.5. Relatif Telomeraz Aktivitesi (RTA) Değerlerinin Hesaplanması

RTA değerleri hesaplanırken kullanılmış olan formül aşağıda verilmiştir.

$$A_{450 \text{ nm}} - A_{690 \text{ nm}} = \Delta A$$

$$\Delta A - \Delta \text{ Negatif} = X$$

$$100x \frac{X}{\text{mg/mL protein}} = \text{RTA}$$

Negatif örnek; RNaz uygulaması ile telomeraz aktivitesi tamamen yok edilmiş örnektir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

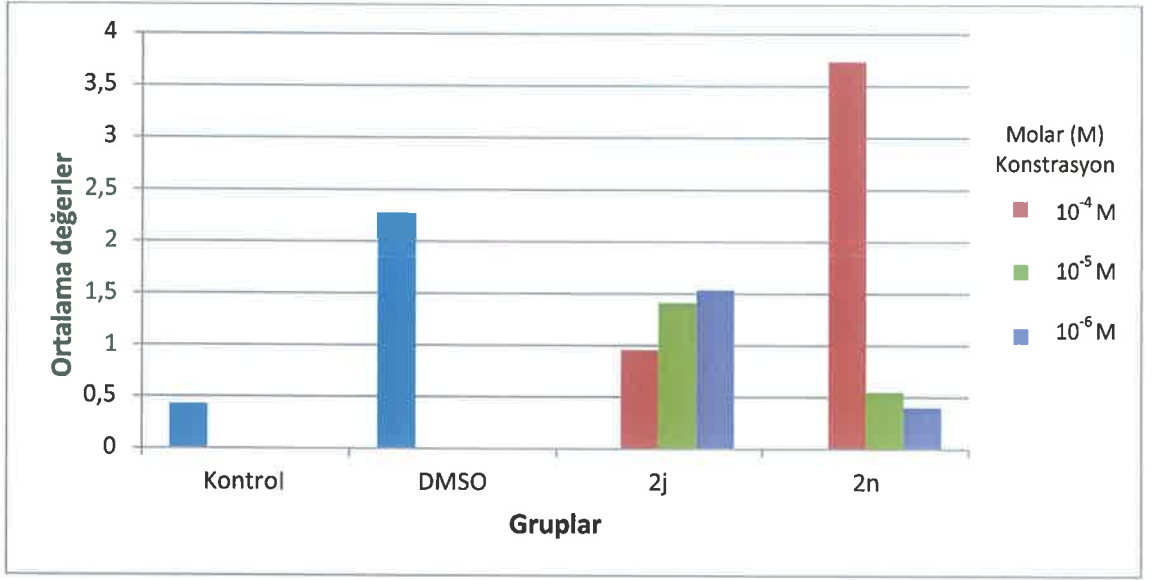
Kontrol ve uygulama gruplarının ortalama RTA değerlerini gsteren çizelge (Çizelge 3.1) aşığıdadır. Sonuçlarla ilgili grafik oluşturulmuştur (Şekil 3.1). Çalışmada kullanılan iki organik kimyasal madde ifade edilirken kolaylık olması açısından, $2n^1$ ve $2j^2$ olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 3.1. Relatif telomeraz aktivite (RTA) değerlerinin ortalaması ve standart hata tablosu

Gruplar	RTA ± SH
A (Kontrol)	0,428 ± 0,167
B (DMSO)	2,265 ± 0,770
$2j$ (10^{-4} M)	0,956 ± 0,343
$2j$ (10^{-5} M)	1,408 ± 0,430
$2j$ (10^{-6} M)	1,537 ± 0,480
$2n$ (10^{-4} M)	3,733 ± 1,279
$2n$ (10^{-5} M)	0,551 ± 0,182
$2n$ (10^{-6} M)	0,403 ± 0,098

$2n^1$; 6-(4-Metilfenil-8-(4-klorofenil)imidazo[1,2-a]pirazin ($C_{19}H_{14}N_3Cl$)

$2j^2$; 6-(4-Metilfenil-8-(4-metoksifenil)imidazo[1,2-a]pirazin ($C_{20}H_{17}N_3O$), (Demirayak ve Kayagil, 2005).



Şekil 3.1. Relatif telomerazın ortalama değerlerini tüm grupların farklı konsantrasyonları için gösteren grafik.

3.1. Tüm Gruplar için İstatistiksel Olarak Uygulanmış Mann-Whitney Testi Sonuçları

A grubu olarak belirlenen bireylere hiçbir uygulama yapılmamıştır. B grubu olarak belirlenen gruba ise kimyasal maddelerin çözücüsü olan dimetilsülfoksit (DMSO) maddesi uygulanmış ve 2. kontrol olarak belirlenmiştir. Mann-Whitney testinin tüm gruplarını içeren sonuçları aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. Tüm grupların Mann-Whitney Testi sonucu oluşan p değerleri. Aralarında istatistiksel olarak, anlamlı fark gözlenenler ($p < 0,05$) koyu renkle gösterilmiştir.

Karşılaştırılan gruplar	p Değeri
A : B	0,007
B: 2j (10^{-4} M)	0,148
B: 2j (10^{-5} M)	0,651
B: 2j (10^{-6} M)	0,651
B: 2n (10^{-4} M)	0,477
B: 2n (10^{-5}M)	0,033
B: 2n (10^{-6}M)	0,009
2j (10^{-4} M) : 2j (10^{-5} M)	0,353
2j (10^{-4} M) : 2j (10^{-6} M)	0,284
2j (10^{-5} M) : 2j (10^{-6} M)	0,936
2n (10^{-4}M) : 2n (10^{-5}M)	0,030
2n (10^{-4}M) : 2n (10^{-6}M)	0,012
2n (10^{-5} M) : 2n (10^{-6} M)	0,721
2j (10^{-4} M) : 2n (10^{-4} M)	0,074
2j (10^{-5} M) : 2n (10^{-5} M)	0,128
2j (10^{-6}M) : 2n (10^{-6}M)	0,012

A:B

Hiçbir uygulama yapılmayan deney grubu (Kontrol 1) ile DMSO uygulanan grup (Kontrol 2)'nin karşılaştırılmasında $p < 0,05$ olduğundan bu iki grupta elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak farklıdır (Çizelge 3.2). Tablodan anlaşıldığı üzere, B grubu olarak DMSO çözeltisinin uygulandığı bireylerde telomeraz aktivitesi artmıştır (Şekil 3.1).

B: 2n (10⁻⁵M)

DMSO uygulanan 2. kontrol grubuyla, İmidazo[1,2-a]pirazin türevi olan, 2n olarak adlandırılmış organik bileşiğin 10⁻⁵ M konsantrasyonu uygulanmış bireylerin karşılaştırılmasında, p<0,05 olduğundan bu iki grupta elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak farklıdır (Çizelge 3.2). 2n (10⁻⁵ M) grubunun DMSO kontrol grubuyla karşılaştırılmasından, telomeraz inhibisyonunu sağladığı anlaşılmaktadır (Şekil 3.1).

B: 2n (10⁻⁶M)

DMSO uygulanan kontrol grubuyla, 2n olarak adlandırılmış organik bileşiğin 10⁻⁶ M konsantrasyonu uygulanan bireylerin oluşturduğu grubun karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak p<0,05 seviyesinde bir fark olduğu görülmektedir (Çizelge 3.2). 2n (10⁻⁵M) grubunun DMSO kontrol grubuyla karşılaştırılmasından, telomeraz inhibisyonunu sağladığı anlaşılmaktadır (Şekil 3.1).

2n (10⁻⁴M) : 2n (10⁻⁵M)

2n Bileşiğinin 10⁻⁴ M konsantrasyonu uygulanan bireylerle, aynı bileşiğin 10⁻⁵ M konsantrasyonu uygulanan bireylerin oluşturduğu grupların karşılaştırılmasında p<0,05 olduğundan, elde edilen sonuçlara göre bu iki grup birbirinden istatistiksel olarak farklıdır (Çizelge 3.2). 2n (10⁻⁵M) grubu, 2n (10⁻⁴ M) grubuyla kıyaslandığında, daha fazla telomeraz inhibisyonu gerçekleştirdiği saptanmıştır (Şekil 3.1).

2n (10⁻⁴M) : 2n (10⁻⁶M)

2n Bileşiğinin 10⁻⁴ M konsantrasyonu uygulanan bireylerle, aynı bileşiğin 10⁻⁶ M konsantrasyonu uygulanan bireylerin oluşturduğu grupların karşılaştırılmasında, bu iki grubun istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.2). Buna göre, 2n (10⁻⁶ M) grubunun, 2n (10⁻⁴ M) grubuna göre, daha fazla telomeraz inhibisyonu sağladığı anlaşılmaktadır (Şekil 3.1).

2j (10⁻⁶M) : 2n (10⁻⁶M)

İmidazo[1,2-a]pirazin türevi olan ve 2j olarak adlandırılmış diğer bileşiğin 10⁻⁶ M konsantrasyonda uygulandığı bireylerin oluşturduğu grupta, 2n bileşiğinin aynı konsantrasyonda uygulandığı grubun karşılaştırılmasında p<0,05 olduğundan iki grup arasında elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak farklıdır (Çizelge 3.2) ve 2n (10⁻⁶ M) grubunun, 2j (10⁻⁶ M) grubuna göre, telomeraz inhibisyonunu daha fazla gerçekleştirdiği anlaşılmaktadır (Şekil 3.1).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tümör supresör genlerdeki mutasyon, biriken DNA hasarı ve aktifleşen telomerazla birlikte hücrenin, kanserleştiğiyle ilgili kanıtlar mevcuttur (Boccardi ve Paolisso, 2013). Normal vücut hücrelerinin aksine, katı tümörlerde ve kanser hücrelerinin yaklaşık % 85'inde yüksek telomeraz aktivitesi belirlenmiştir. Telomeraz aktivitesi yüksek ise, kanser hücrelerinin çoğunda olduğu üzere, kanser hücreleri ölümsüz hale gelir (Dong ve diğ., 2010). Telomerlerin uzamasını sağlayan telomeraz mekanizması, kanser hücrelerinin sınırsız çoğalması için kullanılan bir mekanizma olduğundan, telomeraz insan kanserleri için neredeyse evrensel bir hedef olarak kabul edilir (Buseman ve diğ., 2012). Fare üzerinde yapılan çalışmalarda, telomerazın aktive edilmesinin ardından, telomer disfonksiyonu ve malign tümör gelişimini teşvik ettiği belirlenmiştir (Güneş ve Rudolph, 2013). Telomerazın kanser gelişimi ile olan yakın ilişkisi, telomerazın kompleks yapısı, enzimatik aktivitesi ve yardımcı proteinlerin rolü hakkında daha detaylı bilgi sağlanmasını zorunlu kılmıştır (Sandin ve Rhodes, 2014).

Bu çalışmada araştırdığımız bileşiklerin, Demirayak ve Kayagil'in 2005'de yayınladıkları çalışmaya göre, melphalan ve cisplatin gibi kemoterapide rutin olarak kullanılan moleküllere göre, bazı kanser türlerinde daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Bileşiklerin çoğu, melphalandan daha iyi sitotoksikite sonuçları vermiştir. 2n Bileşiğinin meme kanseri, melanom, kalın bağırsak kanseri, lösemi ve böbrek kanserlerinde cisplatinden çok daha fazla sitotoksik etki göstermesi ayrıca dikkat çekicidir (Demirayak ve Kayagil, 2005). İmidazo[1,2-a]pirazin türevleri başta kanser, nörolojik hastalıklar ve sıtma hastalığı olmak üzere pek çok hastalığın tedavisi için denenmektedir. Kanser ve Nörolojik hastalıklar için alınmış pek çok patent internette bulunabilir (US7189723 B2, WO2002010170 A1, US7259164 B2, US7393848 B2 gibi).

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan iki molekül, 6,8-Diarilimidazo[1,2-a]pirazin türevleridir. Bu bileşiklerin sentezi ve sitotoksik etkileri, 2005 yılında Demirayak ve Kayagil tarafından yapılan makalede ortaya koyulmuştur. İmidazo[1,2-a]pirazin türevlerinin antikanser aktivitelerine dikkat çeken birçok başka araştırmalar da vardır. Myadaraboina ve arkadaşları, bazı türev moleküllerin antikanser etkilerini 4 kanserli hücre hattı üzerinde denemiş, elde ettikleri ön sonuçlara göre, bu bileşikleri

antikanser etkilerini arttıracak şekilde yeniden dizayn etmişlerdir. Bir İmidazo[1,2-a]pirazin türevinin sitotoksik etkisi, bu moleküle takılan yan gruplara (R grupları) göre değişmektedir (Myadaraboina ve diğ., 2010). Diarilimidazopirazinlerin ayrıca iyi antioksidanlar olduğu da yapılan bilimsel çalışmalarda gösterilmiştir (De Wael ve diğ., 2009). Leng ve arkadaşları, 2012 yılında yayınlanan makalelerinde, QSAR çalışması ile kantitatif yapı-etki ilişkisi kurmuşlar ve bazı İmidazo[1,2-a]pirazin türevlerinin Aurora A kinaz inhibitörleri olarak işlev görebileceğini önermişlerdir. Aurora A kinaz, mitotik ser/thr kinaz ailesinin bir üyesidir. Aurora kinazlar, kanser kemoterapisinde hedef molekül olarak düşünülmekte ve bu yüzden bu enzimleri inhibe edebilecek moleküllerin arayışı devam etmektedir (Keen and Taylor, 2004). Mitchell ve ekibi, İmidazo[1,2-a]pirazin diaril üre bileşiklerinin, reseptör tirozin kinaz inhibitörü olarak işlev gördüğünü göstermişlerdir. Bu gelişme, bu bileşiklerin kanser dahil pek çok hastalığın tedavisinde kullanımına dair umutları arttırmıştır (Mitchell ve diğ., 2010). Bu bileşiklere dair yapılan patent çalışmalarına bakıldığında, protein kinaz inhibitörü olarak alınmış pek çok patentin mevcut olduğu görülebilir (US7186832, US7709468 vb). Matthews ve arkadaşlarının çalışmasında 3,6-di(hetero)arilimidazo[1,2-a]pirazin türevlerinin pek çoğunun checkpoint kinaz 1 (CHK1) ve diğer başka kinazların inhibitörü olduğu belirtilmektedir (Matthews ve diğ., 2010). Bir başka checkpoint kinaz olan mTOR'u regüle eden sinyal yolları, insan kanserlerinde sıklıkla aktive edilmiş durumdadır. mTOR'un hücre döngüsünü ilerlettiği ve aynı zamanda anti-apoptotik etkisi olduğu düşünülmektedir. İmidazo[1,2-a]pirazin türevlerinin mTOR inhibitörü olarak kullanımı ile ilgili patent ve makaleler mevcuttur (Rosse, 2013). Dalak tirozin kinazı (SYK) inhibitörü olarak İmidazo[1,2-a]pirazin türevlerinin kullanımı ile ilgili de patent kayıtları mevcuttur (US20100152159 A1, US20120220582 A1). Bu enzim özellikle B hücre lenfomalarında önemli görülmektedir. B hücre reseptörü (BCR) sinyalleri SYK yi ve bazı bağlantılı yolları aktive eder. BCR ve aktive ettiği moleküller kanser tedavisi için önemli hedefler oluşturmaktadır (Chen ve diğ., 2013). Bazı kaynaklarda, İmidazo[1,2-a]pirazin türevlerinin topoizomeraz II yi inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediğine dair bilgiler mevcuttur (Baviskar ve diğ., 2011). Prevost ve ekibi 2006 yılında yayınladıkları çalışmalarında, bir İmidazo[1,2-a]pirazin türevi olan BIM-46174'ün, hücrede G protein reseptör kompleksinin bir inhibitörü olarak işlev gördüğünü ortaya çıkartmışlardır. Bu makale, kanserin tetiklenmesi ve ilerlemesinde

çok önemli bir role sahip olan G protein reseptörlerinin de İmidazo[1,2-a]pirazin türevleri tarafından hedef alınabileceğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında ortaya çıkan sonuçlara göre bazı İmidazo[1,2-a]pirazin türevleri, telomeraz inhibisyonu sağlamak amacıyla da kullanılabilir. 2n kodlu 6-(4-Metilfenil-8-(4-klorofenil)imidazo[1,2-a]pirazin ($C_{19}H_{14}N_3Cl$) bileşiğinin 10^{-5} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarının uygulamalarında, telomeraz aktivitelerini istatistiksel olarak anlamlı derece inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, bu bileşiğin daha detaylı araştırmalar sonucu bir anti-kanser ajan olarak kullanılabilme olasılığı ortaya çıkmıştır.

Telomeraz inhibisyonu sağlamak için en uygun hedef, telomerazın katalitik alt birimi olan hTERT genidir. Yapılan bir çalışmada telomerazın RNA bileşeninin engellenmesi (hTERT) insan prostat kanserinde, kanser hücrelerinin büyümesinin durması ve apoptoza uğramasını sağlamıştır (Mocellin ve diğ., 2013). Telomer/telomeraz protein komplekslerinin, en azından bazı bileşenlerinin inhibe edilmesiyle hücre döngüsünün kontrol edilebildiği, çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Blackburn, 2001). Bu konuyla ilgili dünya üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, telomeraz inhibisyonunun sağlanmasıyla kanser hücrelerini hedef alan etkili anti-kanser terapisinin keşfedileceği düşünülmektedir (Shay ve Wright, 2010). Telomeraz inhibitörleri olarak klinik çalışmalar şu anda: Imetelstat (GRN163L), doğrudan telomeraz antagonisti; gen tedavisi, telomeraz ifade eden hücreleri hedefleme; telomeraza özel peptit aşularla immünoterapi uygulamaları şeklinde, üç farklı yolla yapılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bazı telomeraz inhibitörleri, kemik iliği, prostat, beyin, göğüs ve pankreas kanseri hücreleri üzerinde denenmiş ve kanser hücrelerinin sayılarında azalma olduğu tespit edilmiştir (Buseman ve diğ., 2012).

Bu çalışmada telomeraz inhibisyonu yaptığını belirlediğimiz 2n kodlu 6-(4-Metilfenil-8-(4-klorofenil)imidazo[1,2-a]pirazin ($C_{19}H_{14}N_3Cl$) bileşiğinin hangi yolla bu etkiyi gösterdiği bilinmemektedir. Substrat analogu olarak kompetatif inhibisyon göstermesi olası olmakla birlikte, non-kompetatif inhibisyon da gösteriyor olabilir. Bu konunun açıklığa kavuşması için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Ayrıca çalışmamızda, kimyasal maddeleri çözmek için kullanılan dimetilsülfoksit (DMSO)'in telomeraz aktivitesini artırıcı etki gösterdiği gözlenmiştir.

De Mat ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, telomeraz aktivitesi olmadığı / düşük olduğu bilinen hücre hattının DMSO'ya maruz bırakılması sonucu, telomeraz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (De Mat ve diğ., 2001). Fare üzerinde embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada ise, her bireye dimetilsülfoksit (DMSO) muamelesi sonucunda TERT geni ifadesi yükselmiş ve telomeraz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Armstrong ve diğ., 2000).

Günümüzde en yaygın şekilde kullanılan kemoterapi ilaçlarının en önemli dezavantajı seçici olmamalarıdır. Böylelikle kanserli hücreyle beraber normal sağlıklı hücreler üzerinde de etki gösterirler. Telomeraz inhibisyonu stratejisi daha spesifik bir temel sağlar. Böylelikle telomeraz aktivasyonu sebebiyle sınırsız bölünebilen kanser hücreleri, telomeraz enziminin inhibe edilmesiyle bu özelliklerini kaybedebilirler. Ayrıca kanser hastalığının henüz, tüm kanserler için etkili olabilecek net bir tedavisinin bulunamaması, dolayısıyla bu hastalığın insanlar için önemli bir sağlık sorunu olması, yaptığımız çalışmanın literatüre katkı olması açısından önemini artırmaktadır.

KAYNAKLAR

- Adams J., 2003. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, 5, 417-421.
- Amatruda F.J., Shepard L.J., Stern M.H. and Zon I.L., 2002. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*, 1, 229-231.
- Ande R.S., Chen J., Maddika S., 2009. The ubiquitin pathway: An emerging drug target in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, 625, 199-205.
- Anchelin M., Murcia L., Pe' rez A.F., Garcí'a-Navarro M.E., Cayuela L.M., 2011. Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in zebrafish. *Plos One*, 6, 1-14.
- Armanios M., Blackburn E.H., 2012. Telomerase and telomere components involved in human monogenic telomere syndromes. *Nature Reviews Genetics*, 13, 693-704, from http://www.nature.com/nrg/journal/v13/n10/fig_tab/nrg3246_F1.html
- Armstrong L., Lako M., Lincoln J., Cairns M.P., Hole N., 2000. mTERT expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mechanisms of Development*, 97, 109-116.
- Artandi E.S. and Di Pinho A.R., 2009. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31, 9-18.
- Bailly C., 2000. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 39-58.
- Baviskar, A.T., Madaan, C., Preet, R., Mohapatra, P., Jain, V., Agarwal, A., Guchhait, S.K., Kundu, C.N., Banerjee, U.C., Bharatam, P.V., 2011. N-fused imidazoles as novel anticancer agents that inhibit catalytic activity of topoisomerase II α and induce apoptosis in G1/S phase. *J Med Chem*, 54(14), 5013-30.
- Blackburn H.E., 2001. Switching and signaling review at the telomere. *Cell*, 106, 661-673.
- Boccardi V., Paolisso G., 2014. Telomerase activation: A potential key modulator for human healthspan and longevity. *Ageing Research Reviews*, 15, 1-5.
- Buseman C.M., Wright W.E., Shay J.W., 2012. Is telomerase a viable target in cancer? *Mutation Research*, 730, 90-97.
- Caley A., and Jones R., 2012. The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery*, 30:4, 186-190.
- Chen, L., Monti, S., Juszczynski, P., Ouyang, J., Chapuy, B., Neuberg, D., Doench, J.G., Bogusz, A.M., Habermann, T.M., Dogan, A., Witzig, T.E., Kutok, J.L., Rodig, S.J., Golub, T., Shipp, M.A. 2013. SYK Inhibition modulates distinct PI3K/AKT dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas. *Cancer Cell*, 23, 826-838.
- Costenaro L., Grossmann J.G., Ebel C. and Maxwell A., 2007. Modular structure of the full-length DNA Gyrase B subunit revealed by small-angle X-Ray scattering. *Structure*, 15, 329-339.

- De Matte A.M.Y., Cheng J.Q., Kruk P.A., 2001. Ultraviolet irradiation- and dimethyl sulfoxide-induced telomerase activity in ovarian epithelial cell lines. *Experimental Cell Research*, 267, 13-27.
- Demirayak S., Kayagil I., 2005. Synthesis of some 6,8-diarylimidazo[1,2-a]pyrazine derivatives by using either reflux or microwave irradiation method and investigation of their anticancer activities. *J Heterocyclic Chem*, 42, 319-325.
- DeVita T. V. and Chu E.Jr., 2010. Principles of cancer chemotherapy. *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual*, 1, 1-14.
- De Wael F., Jeanjot P., Moens C., Verbeuren T., Cordi A., Bouskela E., Rees J., Marchand-Brynaert J., 2009. In vitro and in vivo studies of 6,8-(diaryl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones as new antioxidants. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 4336-4344.
- Donate L.E and Blasco M.A., 2011. Telomeres in cancer and ageing. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 366, 76-84.
- Dong M., Mürdter T.E., Klotz U., 2010. Telomeres and telomerase as novel drug targets: reflections on the 2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Eur J Clin Pharmacol*, 66, 1-3.
- Duffy J.M., McKiernan E., O'Donovan N. and McGowan M.P., 2009. Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin Cancer Res.*, 15, 1140-1144.
- Garcia F.I., Solarzono de O.C., Mantuenga M.L., 2008. Telomeres and telomerase in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 3, 1085-1088.
- Greenhalgh A.T. and Symonds P.R., 2014. Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*, 24:9, 259-265.
- Gunes C. and Rudolph L.K., 2013. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell*, 152, 390-393.
- Guo S., 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? *Genes, Brain and Behavior*, 3, 63-74.
- Henriques M.C., Carneiro C.M., Tenente M.I., Jacinto A., Ferreira G.M., 2013. Telomerase is required for zebrafish lifespan. *PLOS Genetics*, 9, 1-13.
- Hidalgo M. and Eckhardt G.S., 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 178-193.
- Howe D.G, Bradford Y.M, Conlin C., Kartal A.E, Fashena D., Frazer K., Şövalye J., Mani P., Martin R., Moxon S.A.T., Paddock H., Pich C., Ramachandran S., Ruef B.J., Ruzicka L., Schaper K., Shao X., Singer A., Sprunger B., Van Slyke C.E and Westerfield M., 2013. ZFIN, the zebrafish model organism database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic Acids Research*, 41, 854-860. from <http://nar.oxfordjournals.org/>.
- Hsu C., 2014. Brain Cancer Linked to Longer Telomeres. *Mental Health* update Jun 09, 07:05 from <http://www.counselheal.com/articles/10021/20140609/brain-cancer-linked-longer-telomeres.htm>
- Jesus de B.B. and Blasco A.M., 2012. Potential of telomerase activation in extending health span and longevity. *Current Opinion in Cell Biology*, 24, 739-743
- Keen, N., Taylor, S. 2004. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, 4, 927-936.
- Laco S.G. and Pommier Y., 2008. Role of a tryptophan anchor in human topoisomerase I structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 411, 523-530 (Printed in Great Britain).
- Lange de T., 2009. How telomeres solve the end-protection problem. *Science*; 326(5955)-948. from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2819049/>

- Liu L., Xu Y., Xu L., Wang J., Wu W., Xu L., Yan Y., 2014. Analysis of differentially expressed proteins in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to chlorpyrifos. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 167, 183-189.
- Mahalingam D., Swords R., Carew J.S., Nawrocki S.T., Bhalla K. and Giles F.J., 2009. Targeting HSP90 for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 100, 1523-1529.
- Makin G., 2013. Principles of chemotherapy. *Paediatrics and Child Health Symposium: Oncology*, 24 :4, 161-165.
- Matthews T.P., McHardy T., Klair S., Boxall K., Fisher M., Cherry M., Allen C.E., Addison G.J., Ellard J., Aherne G.W., Westwood I.M., Montfort R., Garrett M.D., Reader J.C., Collins I., 2010. Design and evaluation of 3,6-di(hetero)aryl imidazo[1,2-a]pyrazines as inhibitors of checkpoint and other kinases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 4045-4049.
- McIlwain C.C., Townsend M.D. and Tew K.D., 2006. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*, 25, 1639-1648.
- Mitchell S.A., Danca M.D., Blomgren P.A., Darrow J.W., Currie K.S., Kropf J.E., Lee S.H., Gallion S.L., Xiong J.M., Pippin D.A., DeSimone R.W., Brittelli D.R., Eustice D.C., Bourret A., Hill-Drzewi M., Maciejewski P.M., Elkin L.L., 2009. Imidazo[1,2-a]pyrazine diaryl ureas: Inhibitors of the receptor tyrosine kinase EphB4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 6991-6995.
- Mocellin S., Pooley K.A. ve Nitti D., 2013. Telomerase and the search for the end of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 19: 2, 125-133.
- Myadaraboina S., Alla M., Saddanapu V., Bommena V.R., Addlagatta A., 2010. Structure activity relationship studies of imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives against cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5208-5216.
- Pelicano H., Martin D.S., Xu R-H. and Huang P., 2006. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*, 25, 4633-4646.
- Pre'vost G.P., Lonchamp M.O., Holbeck S., Attoub S., Zaharevitz D., Alley M., Wright J., Brezak M.C., Coulomb H., Savola A., Huchet M., Chaumeron S., Nguyen Q., Forgez P., Bruyneel, E., Bracke M., Ferrandis E., Roubert P., Demarquay D., Gespach C., Kasprzyk P.G. 2006. Anticancer activity of BIM-46174, a new inhibitor of the heterotrimeric G α /G β γ protein complex. *Cancer Res*, 66(18), 9227-9234.
- Rosse, G., 2013. Imidazopyrazine Derivatives As Inhibitors of mTOR. *ACS Med Chem Lett*, 4(6), 498-499.
- Ruden M. and Puri N., 2013. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treatment Reviews*, 39, 444-456.
- Sandin S. and Rhodes D., 2014. Telomerase structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 25, 104-110.
- Shay W.J. and Keith N.W., 2008. Targeting telomerase for cancer therapeutics. *British Journal of Cancer*, 98, 677-683.
- Shay J.W. and Wright W.E., 2010. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *Febs Letters*, 584, 3819-3825.
- Shay W.J. and Wright E.W., 2011. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 21, 349-353.

- Tew K.D., 1994. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Research*, 54, 4313-4320.
- Tian X., Chen B. and Liu X., 2010. Telomere and telomerase as targets for cancer therapy. *Appl. Biochem Biotechnol*, 160, 1460-1472.
- Tomicic T.M. and Kaina B., 2013. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1835, 11-27.
- Townsend M.D. and Tew D.K., 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22, 7369-7375.
- Vihinen P. and Kahari M.V., 2002. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer*, 99, 157-166.
- Visse R. and Nagase H., 2003. Matrix Metalloproteinases and Tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res.*, 92, 827-839.
- Voutsadakis A.I. and Papandreou N.C., 2012. The ubiquitin-proteasome system in prostate cancer and its transition to castration resistance. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 30, 752-761.
- Wise R.D. and Thompson B.C., 2010. Glutamine addiction: A new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 427-433.
- Xu R-H, Pelicano H., Zhou Y., Carew S.J., Feng L., Bhalla N.K., Keating J.M., Huang P., 2005. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.*, 65: (2), 613- 621.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Abdulkerim BİLGİNER

Doğum Yeri ve Yılı: İstanbul/ Kadıköy - 01.01.1991

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce



Eğitim Durumu

Lise: Mahmutbey Lisesi (İstanbul), 2003-2006

Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (Burdur), 2008-2012

Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (Burdur), 2013- ?