

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ANTİKANSER ETKİLİ BAZI NİTROREDÜKTAZ / İLAÇ ÖNCÜ
BİLEŞİMLERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

NELİN HACIOĞLU

BALIKESİR, ARALIK - 2018

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ANTİKANSER ETKİLİ BAZI NİTROREDÜKTAZ / İLAÇ ÖNCÜ
BİLEŞİMLERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

NELİN HACIOĞLU

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Mehmet AY

Prof. Dr. Berrin TUNCA

Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Doç. Dr. Aylin ER

BALIKESİR, ARALIK - 2018

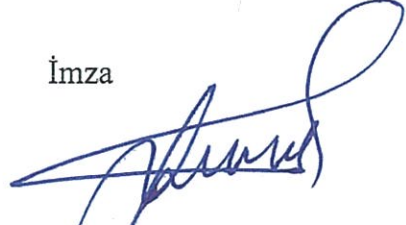
KABUL VE ONAY SAYFASI

NELİN HACIOĞLU tarafından hazırlanan “ANTİKANSER ETKİLİ BAZI NİTROREDÜKTAZ / İLAÇ ÖNCÜ BİLEŞİMLERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ BELİRLENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 24.12.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR



Üye
Prof. Dr. Mehmet AY



Üye
Prof. Dr. Berrin TUNCA



Üye
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM



Üye
Doç. Dr. Aylin ER



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2017/024 nolu ve TÜBİTAK tarafından 113Z706 nolu projeler ile desteklenmiştir.

ÖZET

**ANTİKANSER ETKİLİ BAZI NİTROREDÜKTAZ / İLAÇ ÖNCÜ
BİLEŞİMLERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ BELİRLENMESİ
DOKTORA TEZİ
NELİN HACIOĞLU
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, ARALIK - 2018

Nitrolu bileşikler kanserli hücreler üzerinde yüksek hücre ölümü oluşturan ve nitroredüktaz adı verilen enzimler ile etkin hale gelebilen bileşiklerdir. Nitroredüktaz enzimi aracılığıyla ilaç öncüllerinden elde edilen etkin metabolitler ile hedefe özgü ilaçlar oluşturularak kemoterapide yan etkilerin azaltılabileceği öngörülmektedir.

Bu tez kapsamında, sentezlenen ve biyokimyasal karakterizasyonları yapılan nitrolu bileşiklerin hem kendilerinin hem de Ssap-NtrB enzimi ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkan reaksiyon ürünlerinin etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda ilk olarak tüm bileşiklerin sitotoksik koşullarının belirlenmesi için Hep3B, PC3, HT-29, Saos-2 ve HUVEC hücre hatlarına uygulanmış olup, sonuçlar MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Zehirli ve zehirli olmayan olarak iki gruba ayrılan bileşiklerden zehirli olanların enzim ile birleştirmeden "ilaç" olarak uygulanabilirliğinin kontrolü için moleküler mekanizmaları aydınlatılmıştır. mRNA seviyesinde etkileri, metastatik-hücresele etkileri ve ölüm mekanizmalarında izledikleri yol belirlenmiştir.

Zehirli olmayanlar için *S. saprophyticus* 'tan izole edilerek üretilen Ssap-NtrB enziminin hücre içinde denemelerine geçilmiştir. Bu nedenle ilk olarak gen, pCDNA3.1/V5/HisB ökaryotik ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Klonlamanın kontrolü için uygulanan geçici transfeksiyon sonrası mRNA seviyesinde ifade olduğu belirlenmiştir. Aynı ifade akım sitometri ve İmmunfloresan metotları ile de doğrulanmıştır. İlaç öncülü olabilme potansiyeli olan bileşikler Hep3B hücre hattına uygulanmıştır.

Tez kapsamında çalışılan toplam 20 nitrolu grup içeren bileşikten; 706-2b, 706-2f, 706-2g, 706-2h, 706-2j, 754-3c, 754-3e, 754-3h bileşikler kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olan intihar gen tedavisinde kullanılabilme potansiyeli olan aday ilaç öncül bileşikler olarak belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Nitrolu bileşikler, nitroredüktaz, Hep3B, Ssap-NtrB, ilaç öncülü, intihar gen tedavisi

ABSTRACT

**DETERMINATION OF MOLECULAR MECHANISM OF SOME
NITROREDUCTASE / PRODRUG COMBINATIONS ANTI-CANCER-
EFFECTIVE
PH.D THESIS
NELIN HACIOGLU
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: PROF.DR.FERAY KOCKAR)

BALIKESİR, DECEMBER 2018

Nitro-compounds are compounds that form high cell death on cancerous cells and can be activated by enzymes called nitroreductase. It is predicted that side effects can be reduced in chemotherapy by forming target-specific drugs with active metabolites derived from drug precursors through the enzyme nitroreductase.

Within the scope of this thesis, synthesized and performed biochemical characterization of Nitro compounds, both of themselves and Ssap-NtrB resulting interactions with the enzyme reaction products. These mechanisms at the cellular and molecular level, we aimed to determine the effects they have done in terms of death and metastatic.

First of all, to determine the cytotoxic conditions of all compounds, substances were applied to Hep3B, PC3, HT-29, Saos-2 and HUVEC cell lines. The results were determined by MTT method. The compounds were divided into two groups as toxic and non-toxic. The toxic ones were elucidated by molecular mechanisms for administration as a drug without coupling with the enzyme. At mRNA level, the pathways, metastatic and cellular effects, and their pathway in the death mechanisms were determined.

For non-toxic Ssap-NtrB enzyme produced by isolating *S. saprophyticus* was studied in cell. Therefore, the gene was first cloned into the pCDNA3.1 / V5 / HisB eukaryotic expression vector. Expression at the level of mRNA was determined after transient transfection for control of cloning. The same expression was confirmed by flow cytometry and Immunofluorescence methods. Compounds with potential to be pro-drugs were administered to the Hep3B cell line.

A total of 20 nitro group containing compounds were studied. 706-2b, 706-2f, 706-2g, 706-2h, 706-2j, 754-3c, 754-3e, 754-3h compounds were identified as prodrug compounds with the potential to be used in suicide gene therapy, a novel approach to cancer treatment .

KEYWORDS: nitro substituent compounds, nitroreductase, Hep3B, Ssap-NtrB, prodrug, suicide gene therapy

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖNSÖZ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Nitrolu Bileşikler	1
1.2 Nitroredüktaz Enzimleri	2
1.3 Nitroredüktazların Sınıflandırılması	2
1.4 Nitroredüktazlar ve Metabolik Yolaklar	6
1.5 Nitroredüktazların Çevre ve İnsan Üzerindeki Rollerini	7
1.6 Nitroredüktazların Klinik Önemi.....	9
1.7 İlaç Öncül Maddeler	11
1.8 İlaç Öncül Maddeler ve Tedaviler.....	12
1.9 İlaç Öncül Madde: CB1954	13
1.10 İlaç Öncül ve Nitroredüktaz Enzim Uygulamasının Etkileri.....	16
1.11 Seyirci (By-stander) etkisi olan ve olmayan etki mekanizması ile hücre ölümü	17
2. ÇALIŞMANIN AMACI	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1 Materyal	21
3.1.1 Çalışmalarda Kullanılan Makine Teçhizat Listesi	21
3.1.2 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar.....	23
3.1.3 Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Vektörler	26
3.2 Yöntem.....	28
3.2.1 Hücre Kültürü ve Nitro Gruplu Bileşiklerin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	28
3.2.1.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	28
3.2.1.2 Hücrelerin Açılması, Büyütülmesi ve Dondurulması	29
3.2.1.3 Nitrolu Bileşiklerin Hazırlanması	30
3.2.1.4 Hücrelerin Sayılması ve Deneyin Tasarımı	30
3.2.1.5 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları.....	30
3.2.1.6 MTT Yöntemi	31
3.2.1.7 Reaksiyon Deneyleri ve SRB yöntemi.....	33
3.2.2 Klonlama ile İlgili Teknikler.....	35
3.2.2.1 Ssap-NtrB geninin biyoinformatik analizi ve primer tasarımı	35
3.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile genin çoğaltılması	35
3.2.2.3 Jelden DNA'nın geri kazanımı.....	37
3.2.2.4 Restriksiyon Endonükleaz Kesimi	37
3.2.2.5 Ligasyon	38
3.2.2.6 Transformasyon Öncesi Hazırlıklar	38
3.2.2.7 Transformasyon.....	39
3.2.2.8 Plazmit İzolasyonu.....	39
3.2.2.9 Kalsiyum – Fosfat Çöktürmesi ile Geçici Transfeksiyon	40
3.2.2.10 İlaç Öncüllerinin Hücre İçi Etkinliğinin Belirlenmesi	40

3.2.3	Metastatik Etkilerinin Belirlenmesi.....	41
3.2.3.1	Yaralanma Deneyi	41
3.2.3.2	Koloni Oluşum Deneyi	41
3.2.4	Ölüm Mekanizmalarının Moleküler Düzeyde Belirlenmesi	42
3.2.4.1	mRNA Seviyesinin Belirlenmesi.....	42
3.2.4.2	Protein Seviyesinin Belirlenmesi.....	50
4.	BULGULAR.....	56
4.1	Nitro Gruplu Maddelerin Bileşik Yapıları.....	56
4.2	Nitro Gruplu Bileşiklerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	59
4.2.1	754-3 serisi bileşiklerin sitotoksik etkileri.....	60
4.2.2	706-2 serisi bileşiklerin sitotoksik etkileri.....	76
4.3	Nitro Gruplu Bileşiklerin Ssap-NTR Enzimiyle Reaksiyonu Sonrası Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi - Hücre Dışı Reaksiyon Deneyleri	86
4.3.1	754-3 Serisi Bileşiklerin Ssap-NTR Enzimiyle Reaksiyonu Sonrası Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	88
4.3.2	706-2 Serisi Bileşiklerin Ssap-NTR Enzimiyle Reaksiyonu Sonrası Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	102
4.4	Nitro Gruplu Bileşiklerin Ssap-NtrB Geni Taşıyan Hücrelerdeki Hücre Canlılığına Etkilerinin Belirlenmesi–Hücre İçi Reaksiyon Deneyleri.....	110
4.4.1	Ssap-NtrB Geninin Biyoinformatik Analizi ve Primer Tasarımı	111
4.4.2	Ssap-NtrB Prokaryotik Geninin Ökaryotik Ekspresyon Vektörü olan pCDNA3.1/V5/His B Vektörüne Klonlanması.	112
4.4.3	Ssap-NtrB Geni İçeren Vektörün Hep3B Hücrelerine Geçici Transfeksiyonu ve Gen ifadesinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi.....	116
4.4.4	Ssap-NtrB ifadesinin Protein seviyesinde Western Blotting Analizi İle Gösterilmesi.....	118
4.4.5	Ssap-NtrB ifadesinin protein seviyesinde akım sitometri analizi ile gösterilmesi	118
	Şekil 4.66: NTR- ve NTR+ Hep3B hücrelerinde His-Tag antikoruna boyanması sonrası Akım Sitometri analiz görüntüsü	119
4.4.6	NTR+ hücrelerde Ssap-NtrB ifadesinin protein seviyesinde IFC analizi ile gösterilmesi	119
4.4.7	İlaç öncül maddelerin Ssap-NtrB transfekte hücrelere uygulanması ve zehirli etkilerinin SRB analizi ile belirlenmesi	121
4.5	Nitro Gruplu Bileşiklerin Hep3B Hücrelerinde Oluşturduğu Metastatik Etkinin Belirlenmesi.....	126
4.5.1	Yaralanma Deneyi	126
4.5.2	Koloni Oluşumu Deneyi	134
4.6	Nitro Gruplu Bileşiklerin Hep3B Hücrelerinde Oluşturduğu Ölüm Mekanizmalarının Belirlenmesi.....	140
4.6.1	Bileşiklerin apoptotik genlerin mRNA seviyesinde etkilerinin belirlenmesi.....	140
4.6.2	Protein seviyesinde etkilerinin gösterilmesi.....	144
4.6.3	Nitrolu bileşiklerin Seçtiği Ölüm Yolunun Akım Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi.....	148
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	154

6. KAYNAKLAR	166
--------------------	-----

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Tip I ve Tip II nitroredüktazların indirgenmesi	4
Şekil 1.2: ADEPT, GDEPT ve VDEPT etki mekanizması	13
Şekil 1.3: Seyirci etkisinin mekanizması	17
Şekil 2.1: Tez çalışmasına ait işlem şeması	20
Şekil 3.1: pET-14b vektörüne ait harita .. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	21
Şekil 3.2: pGEM-T Easy vektörüne ait harita	27
Şekil 3.3: pcDNA3.1/V5/HisB vektörüne ait harita	27
Şekil 3.4: Nitro gruplu bileşiklerin etkilerini belirlemek amacıyla kullanılan hücre hatlarının mikroskop görüntüleri	31
Şekil 3.5: MTT tuzunun formazan kristaline dönüşümü	32
Şekil 4.1: 754-3 serisi bileşiklerin isimlendirmesi ve molekül kütleleri	58
Şekil 4.2: 706-2 serisi bileşiklerin isimlendirmesi ve molekül kütleleri	59
Şekil 4.3: 754-3a bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	63
Şekil 4.4: 754-3b bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	64
Şekil 4.5: 754-3c bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	65
Şekil 4.6: 754-3d bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	66
Şekil 4.7: 754-3e bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	67
Şekil 4.8: 754-3f bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	68
Şekil 4.9: 754-3g bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	69
Şekil 4.10: 754-3h bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	70
Şekil 4.11: 754-3i bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	71
Şekil 4.12: 754-3i' bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	72
Şekil 4.13: 754-3j bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	73
Şekil 4.14: 754-3k bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	74
Şekil 4.15: 706-2a bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	78
Şekil 4.16: 706-2b bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	79
Şekil 4.17: 706-2f bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	80
Şekil 4.18: 706-2g bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	81
Şekil 4.19: 706-2h bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	82
Şekil 4.20: 706-2j bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	83
Şekil 4.21: 706-2p bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	84
Şekil 4.22: 706-2s bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri	85
Şekil 4.23: 754-3a maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	90
Şekil 4.24: 754-3b maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	90
Şekil 4.25: 754-3c maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	91
Şekil 4.26: 754-3d maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	91
Şekil 4.27: 754-3e maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	92
Şekil 4.28: 754-3f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	92
Şekil 4.29: 754-3g maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	93
Şekil 4.30: 754-3i maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	93

Şekil 4.31: 754-3i' maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	94
Şekil 4.32: 754-3j maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	94
Şekil 4.33: 754-3k maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	95
Şekil 4.34: 754-3a maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu	96
Şekil 4.35: 754-3b maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu	96
Şekil 4.36: 754-3c maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	97
Şekil 4.37: 754-3d maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	97
Şekil 4.38: 754-3e maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	98
Şekil 4.39: 754-3f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	98
Şekil 4.40: 754-3g maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu	99
Şekil 4.41: 754-3h maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	99
Şekil 4.42: 754-3i maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	100
Şekil 4.43: 754-3i' maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	100
Şekil 4.44: 754-3j maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	101
Şekil 4.45: 754-3k maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	101
Şekil 4.46: 706-2a maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu.	103
Şekil 4.47: 706-2f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	104
Şekil 4.48: 706-2g maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	104
Şekil 4.49: 706-2i maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	105
Şekil 4.50: 706-2j maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	105
Şekil 4.51: 706-2k maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	106
Şekil 4.52: 706-2p maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu	106
Şekil 4.53: 706-2b maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	107
Şekil 4.54: 706-2g maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	107
Şekil 4.55: 706-2f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	108
Şekil 4.56: 706-2f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	108
Şekil 4.57: 706-2j maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	109

Şekil 4.58: 706-2k maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	109
Şekil 4.59: 706-2p maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu.	110
Şekil 4.60: Ssap-NtrB geninin klonlama yolu.....	113
Şekil 4.61: Ssap-NtrB geni içeren pET-14b geninin amplifikasyonu	114
Şekil 4.62: Ssap-NtrB genini taşıyan pGEM-T Easy vektörünün kesim sonucu.....	115
Şekil 4.63: SsapNtrB genini içeren pCDNA3.1.HisB vektörünün Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu.....	116
Şekil 4.64: Ssap-NtrB Gen ifadesinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi	117
Şekil 4.65: Ssap-NtrB ifadesinin protein seviyesinde Western Blot ile Gösterilmesi.....	118
Şekil 4.66: NTR- ve NTR+ Hep3B hücrelerinde His-Tag antikoru ile boyaması sonrası Akım Sitometri analiz görüntüsü	119
Şekil 4.67: NTR+ ve NTR- Hep3B hücrelerinin His-Tag antikoru boyaması sonrasında immunfloresan görüntüsü.....	120
Şekil 4.68: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan CB1954 bileşığının hücre canlılığı grafikleri.....	122
Şekil 4.69: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan CB1954 ve NADH bileşığının hücre canlılığı grafikleri	122
Şekil 4.70: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 754-3e bileşığının hücre canlılığı grafikleri	123
Şekil 4.71: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 754-3c bileşığının hücre canlılığı grafikleri	123
Şekil 4.72: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 754-3h bileşığının hücre canlılığı grafikleri.....	124
Şekil 4.73: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 706-2f bileşığının hücre canlılığı grafikleri.....	124
Şekil 4.74: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 706-2g bileşığının hücre canlılığı grafikleri.....	125
Şekil 4.75: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 706-2h bileşığının hücre canlılığı grafikleri.....	125
Şekil 4.76: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 706-2j bileşığının hücre canlılığı grafikleri.....	126
Şekil 4.77: 754-3a, 754-3b ve 754-3c bileşığının 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.	127
Şekil 4.78: 754-3a, 754-3b ve 754-3c bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi.....	128
Şekil 4.79: 754-3d, 754-3f ve 754-3g bileşığının 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.	128
Şekil 4.80: 754-3d, 754-3f ve 754-3g bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi.....	129
Şekil 4.81: 754-3h, 754-3i ve 754-3i' bileşığının 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi	129

Şekil 4.82: 754-3e, 754-3j ve 754-3k bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.	130
Şekil 4.83: 754-3e, 754-3j ve 754-3k bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi	130
Şekil 4.84: 706-2a, 706-2b ve 706-2f bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.	131
Şekil 4.85: 706-2a, 706-2b ve 706-2f bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi.....	131
Şekil 4.86: 706-2g, 706-2h ve 706-2j bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.	132
Şekil 4.87: 706-2g, 706-2h ve 706-2j bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi.....	132
Şekil 4.88: 706-2p ve 706-2s bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.....	133
Şekil 4.89: 706-2p ve 706-2s bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi	133
Şekil 4.90: Hep3B hücrelerinde koloni oluşum testi için hücre sayısı optimizasyonu	135
Şekil 4.91: 754- 3 serisi bileşik uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu	135
Şekil 4.92: 754- 3 serisi bileşik uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu	136
Şekil 4.93: 754- 3 serisi bileşik uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu	136
Şekil 4.94: 754- 3 serisi zehirli etkili olmayan bileşikler uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu	137
Şekil 4.95: 706- 2 serisi bileşikler uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu	138
Şekil 4.96: 706- 2 serisi bileşikler uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu	138
Şekil 4.97: 706- 2 serisi bileşikler uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu	139
Şekil 4.98: 754-3 serisi bileşiklerin koloni oluşumunun değerlendirilmesi.....	139
Şekil 4.99: 706-2 serisi bileşiklerin koloni oluşumunun değerlendirilmesi.....	140
Şekil 4.100: RNA jel görüntüsü	141
Şekil 4.101: Klasik PCR agaroz jel görüntüsü	142
Şekil 4.102: Bcl-2 geninin 754-3 serisi ilaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinde mRNA seviyesindeki etkisi	142
Şekil 4.103: Bax geninin 754-3 serisi ilaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinde mRNA seviyesindeki etkisi	143
Şekil 4.104: Bcl-2 geninin 706-2 serisi ilaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinde mRNA seviyesindeki etkisi	143
Şekil 4.105: Bax geninin 706-2 serisi ilaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinde mRNA seviyesindeki etkisi	144
Şekil 4.106: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde etkilerinin belirlenmesi..	145
Şekil 4.107: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde (Bax) etkilerinin grafiklendirilmesi.....	145
Şekil 4.108: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde (Bcl-2) etkilerinin grafiklendirilmesi.....	146
Şekil 4.109: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde etkilerinin belirlenmesi..	147
Şekil 4.110: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde (Bax) etkilerinin grafiklendirilmesi.....	147
Şekil 4.111: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde (Bcl-2) etkilerinin grafiklendirilmesi.....	148
Şekil 4.112: 754-3 serisi Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi.....	149

Şekil 4.113: 754-3 serisi Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi.....	150
Şekil 4.114: 754-3 serisi Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi.....	151
Şekil 4.115: Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi	151
Şekil 4.116: Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi.....	152
Şekil 4.117: Nitrolu bileşiklerin PI ile analizi	153
Şekil 6.1: DNA büyüklük belirteci	182

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: Önemli nitroredüktazlar	4
Çizelge 3.1: Kullanılan Cihaz Listesi.	21
Çizelge 3.2: Kullanılan Kimyasal Listesi	23
Çizelge 3.3: Klonlama çalışmalarında kullanılan vektörler	26
Çizelge 3.4: MTT testinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	32
Çizelge 3.5: Bileşikler için oluşturulan reaksiyon deney planı	34
Çizelge 3.6: CB1954 Ticari ilaç adayı için oluşturulan reaksiyon deney planı	34
Çizelge 3.7: Gen çoğaltmada kullanılan PCR koşulları.....	36
Çizelge 3.8: Klonlama PCR koşulları.....	36
Çizelge 3.9: Restriksiyon kesim koşulları	37
Çizelge 3.10: Ligasyon koşulları.....	38
Çizelge 3.11: Formaldehit İçeren Agaroz Jel Elektroforez tampon hazırlanması.....	44
Çizelge 3.12: cDNA eldesinde kullanılan koşullar ve deney planı.....	45
Çizelge 3.13: PCR bileşenleri ve kullanım miktarları	46
Çizelge 3.14: dNTP karışımının hazırlanma koşulları	46
Çizelge 3.15: Ssap- NtrB genine ait özgü primer dizileri	47
Çizelge 3.16: Normalizasyon primerine ait bilgiler	47
Çizelge 3.17: PCR deney koşulları	47
Çizelge 3.18: DNA agaroz jel elektroforezi sırasında kullanılan kimyasallar ..	48
Çizelge 3.19: qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerler ve dizileri listesi ...	49
Çizelge 3.20: Western Blot yönteminde kullanılan kimyasallar	50
Çizelge 3.21: Ayırma ve yığma jellerinin hazırlanması	52
Çizelge 4.1: 754-3 serisi bileşiklerin özet sitotoksosite değerleri.....	75
Çizelge 4.2: 706-2 serisi bileşiklerinin özet sitotoksosite değerleri.....	86
Çizelge 4.3: Ssap-NtrB Genine ait Primer Dizileri.....	111

KISALTMA LİSTESİ

NTR	:	Nitroredüktaz
KD	:	Kilodalton
NADH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidroksi
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
FAD	:	Flavin Adeninnükleotit
FMN	:	Flavin Mononükleotit
TNT	:	Trinitrotoluen
Ssap – NtrB	:	<i>S. Saprophyticus</i> ' Tan Elde Edilen Nitroredüktaz Enzimi
GDEPT	:	Gen Yönlendirmeli Enzim Terapi
ADEPT	:	Antikor Yönlendirmeli Enzim
VDEPT	:	Virüs Yönlendirmeli Enzim Terapi
DNA	:	Deoksi Ribonükleik Asit
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RPM	:	Dakikadaki Dönüş Sayısı
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
O.D	:	Optik Dansite
mg	:	Miligram
µg	:	Mikrogram
ng	:	Nanogram
PBS	:	Phosphate-Buffered Saline
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	:	Fetal Bovine Serum
mL	:	Mililitre
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
nM	:	Nanomolar
bç	:	Baz Çifti
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
dNTP	:	Deoksiribonükleotidtrifosfat

ÖNSÖZ

“Bilgi, hayatta en kıymetli şeydir.” sözüyle yola çıktığım doktora eğitimim boyunca öğrettiği her bir bilgi için minnettar olduğum, tanıdığım ilk günden itibaren bilimin ışığından ayrılmadan ilerlemenin önemini anlatan, sonsuz emek ile oluşturduğu tüm imkânları ardına kadar bize sunan, her defasında beni cesaretlendiren çok değerli hocam ve danışmanım sayın Prof. Dr. Feray KÖÇKAR’a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında katkıları büyük olan, tüm tez izleme süreçlerim boyunca derin organik kimya bilgisi ile yönlendirmesinden büyük mutluluk duyduğum sayın hocam Prof. Dr. Mehmet AY’a,

Çalışmalarım esnasında her türlü sorunda bana destek olan kıymetli bilgi ve yorumları ile beni yönlendiren çok değerli hocalarım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM’a, Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU’na ve Dr. Öğr. Üyesi Meltem ALPER’e ,

Genetiğin mutfağı olan laboratuvar çalışmaları sırasında birlikte çalışmaktan ve yardımlaşmaktan mutluluk duyduğum tüm değerli ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ve son teşekkürlerim hayatımı güzelleştirenlere.. Sonsuz sevgisini her zaman hissettiğim canım kardeşim Aygen SEV’e ve elimi bir gün olsun bırakmayan arkamda oluşuyla verdiği güven duygusu çok kıymetli olan dedem Sadık SEV’e teşekkür ederim. Akademik hayata bugüne kadar kazandırdığı tüm öğrencileri gibi beni de yönlendiren, hep yanımda olduğunu hissettiğim canım babam Prof. Dr. Necdet HACIOĞLU’na, aile kavramının içini herşeyi ile dolduran, eli hep üzerimizde ve desteği sonsuz olan, kalbinin pamukluğu ile beni sarıp sarmalayan canım annem Semra HACIOĞLU’na herşey için sonsuz teşekkür ederim. Onlar olmasaydı bu süreç bu derece sarsıntısız olamazdı. Ve benim güzel minik ailem.. Uzaktan gördüğümde hayalini kurduğum aileyi bize yaşamayı nasip ettiren, üzerine yüklediği tüm sıfatların hakkını sonuna kadar veren ve hep yanımda olan canım eşim Levent HACIOĞLU’na ve her doğan güneşle bir mucize olabileceğinin en güzel örnekleri olan canlarım Ömer Alp ve Elif’e sevgileri, destekleri, varlıkları için teşekkürler..

Bu tezi canım çocuklarım Ömer Alp ve Elif’e ithaf ediyorum...

1. GİRİŞ

1.1 Nitrolu Bileşikler

Nitrolu bileşikler; bir ya da daha fazla nitro işlevsel grubu (NO₂) içeren organik bileşiklerdir. Yapısal olarak benzer özellikteki nitrat iyonunu içeren inorganik tuzlar, nitratlar olarak bilinmektedir [1]. Kimyasal olarak nitro gruplarının özgün bazı özellikleri vardır. Nitro grupları elektron çekicidir, küçük ve polardır [2]. Hidrojen bağları oluştururlar. Nitro gruplarında oksijen ile azot arasındaki bağ polardır. Çünkü oksijen azota göre daha fazla elektronegatifdir, azot elektronlarına kısmi olarak negatif ve pozitif kutup olmasını sağlarlar. Pozitif kutup elektron çekimine neden olur. Bu yüzden indirgenmeye gidebilecek bir özelliği vardır [3]. Ayrıca nitro grupları enzimatik indirgenme tepkimeleri ile etkinleşebilirler ve böylece etkin türler oluşturabilirler. Pek çok durumda bu etkin türler nitrolu ilaçların biyolojik etkilerinden sorumludur. Nitroaromatik bileşikler bu yüzden ilaç öncülü olarak hareket ederler [4, 5].

Nitroaromatik bileşikler bir ya da iki nitrolu grup içeren ve aromatik halka sistemine bağlı moleküllerdir. Kloramfenikol, nitroioluteorin, oksipirolnitrin ve fidolopin gibi nitroaromatik bileşenlerin çok azı doğal ürünlerdir. *Astragalus* gibi bazı bitkiler de savunma mekanizması için nitroglikozit sentezlerler. Poliüretanlar, pestisitler, TNT, pikrik asit gibi pek çok nitroaromatik bileşen endüstriyel işlemler sonucunda üretilir [5].

Nitroaromatik bileşikler küçük molekül inhibitörleri olarak bir ya da daha fazla moleküler hedefe bağlanarak oluştururlar. Nitro grupları işlevsel grup olarak doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanırlar. Ayrıca nitroaromatiklerin enzimatik olarak indirgenemeleri hücrel toksisite de farklı bir mekanizma oluşturur [6].

Nitro gruplarının indirgenmesi nitroredüktazlar tarafından katalizlenir. Enzimatik indirgenme nitro bileşiklerin terapötik ve sitotoksik etkilerini oluşturmak için gereklidir [7].

1.2 Nitroredüktaz Enzimleri

Nitroredüktazlar (NTR); nitrobileşiklerin (nitrofurozan, nitrobenzen, nitrofiren ve nitrofurantoin) taşıdığı nitro gruplarının indirgenmesini sağlayan oksidoredüktaz sınıfına ait flavoenzimlerdir [7].

Tüm nitroredüktazlar yaklaşık olarak benzer biyokimyasal özellikler gösterirler. Hepsi genellikle homodimerik proteinlerdir. Moleküler ağırlıkları yaklaşık 30 kDa olup geniş substrat özgünlüğüne sahiptirler [8, 9].

Nitroredüktazlar öbakterilerde ilk olarak keşfedilen, korunmuş dizilere sahip bir protein ailesidir. Nitroredüktaz proteinleri öbakterilerde yaygındır fakat nitroredüktaz benzeri proteinler arke ve ökaryotlardada bulunabilirler. Bu enzimler flavin mono nükleotit (FMN) ya da flavin adenin nükleotit (FAD)'i prostetik grup olarak kullanırlar. Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ya da nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'ı indirgeyici ajan olarak kullanırlar [9, 10].

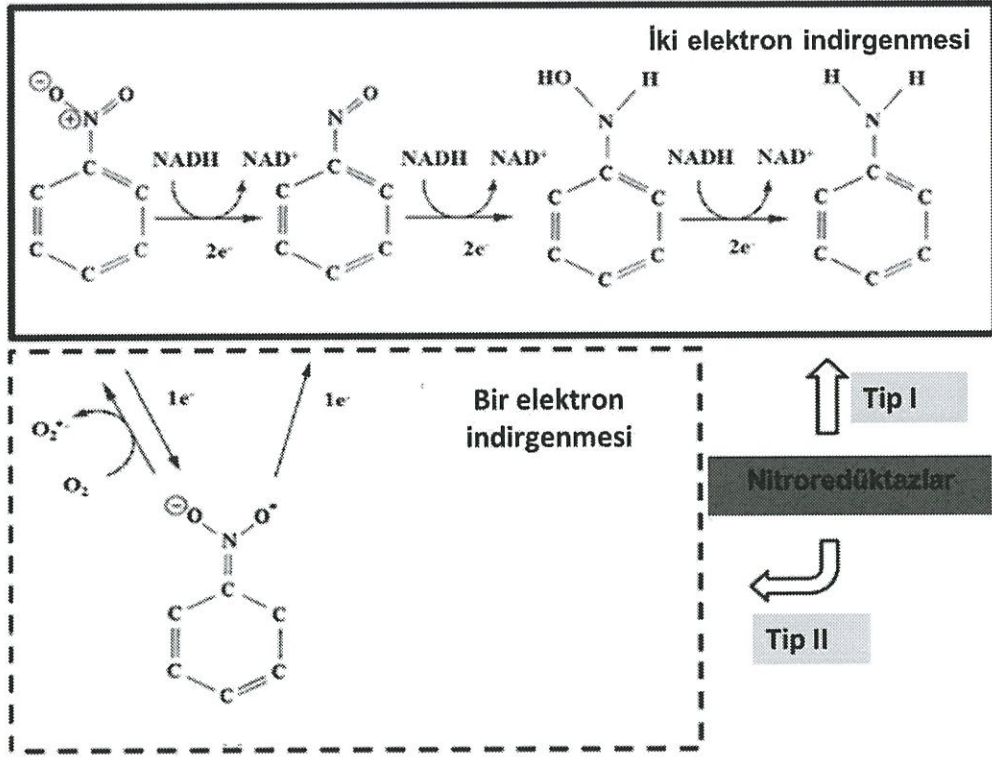
1.3 Nitroredüktazların Sınıflandırılması

Nitroaromatik bileşiklerde oksijen ve azot atomları arasında polar bağ bulunur. Oksijenin sahip olduğu elektronegativite azot grubundan fazladır ve bu nedenle kısmi pozitif ve negatif kutuplar oluştururken azot grubunun elektronlarını çeker. Bu kuvvet değişimi de ortamı indirgenmeye uygun hale getirir [3]. Nitro gruplarının indirgenmesini de nitroredüktaz enzimleri gerçekleştirir [11].

Nitroredüktazlar bir ya da iki elektron aktarımı yaparlar. Bu yüzden nitroredüktazlar oksijen varlığına ve bir elektron ya da iki elektron aktarımına göre iki gruba ayrılır.

Tip 1; oksijen hassasiyeti olmayan nitroredüktazlar olarak adlandırılır. NADPH'tan nitro gruplara sıralı 2 elektron aktarımı yaparlar (Şekil 1.1). Oksijen varlığında ya da yokluğunda bunu yapabilirler. Sonuç olarak nitroza ve hidrosiaminleri ara grup olarak oluşturup en son aşamada ise aminleri oluştururlar. Nitroaromatikler ve aminler oldukça karardır. Genelde Tip 1 nitroredüktazlar 2 elektron aktarımı yaparlar. Hidroksilamin ara ürünlerinin oluşumu oldukça iyi anlaşılmıştır. Fakat nitrozo ara ürünleri oldukça etkindir ve ikinci elektron aktarımı birinci elektron aktarımından daha hızlıdır [1, 10, 12]. Ara ürünler zehirli ve mutajenik etki oluştururlar. Hidroksil aminlerin etkin nitrenyum iyonlarına dönüştüğü ve DNA ile etkileşime girdiği önerilmektedir [12]. Tip 1 nitroredüktazlar çok çeşitli nitrolu bileşiklerin indirgenmesine katılırlar. Örnek olarak nitrofuranlar, nitrobenzenler, nitrofenoller, nitrobenzoat, nitrotoluenler (TNT) ve nitroimidazoller dahil olmak üzere çeşitli nitrolu bileşenler verilebilir [13].

Tip 2 ise; oksijen hassasiyeti olan nitroredüktazlardır. Nitrolu grubunun 1 elektron aktarımını oksijen varlığında katalizleyebilirler (Şekil 1.1). Bir elektron aktarımı yapan nitrolu gruplar nitro radikal anyonları oluştururlar. Bu anyonlar kararlı değildir ve oksijenli koşullar altında geri yükseltgenirler. Bunun sonucu olarak da etkin süperoksit anyonuna dönüştürürler. Bu olaya futil döngüsü denir ve bazı durumlarda nitrolu bileşiklerin zehirli etkilerinden sorumludur. Futil döngüsü çok fazla süperoksit oluşturduğu için oksidatif stres oluştururlar [14].



Şekil 1.1: Tip I ve Tip II nitroredüktazların indirgenmesi [13]

Çizelge 1.1: Önemli nitroredüktazlar [13]

Organizma	Nitroredüktazlar		
	Tip I Grup A	Tip I Grup B	Yeni Gruplar
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	YwrO		
<i>Bacillus licheniformis</i>		YfkO	
<i>Bacillus subtilis</i>	NfrA1 (YwcG)		
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NitA, NitB		
<i>Enterobacter cloacae</i>		NR	
<i>Escherichia coli</i>	NfsA	NfsB	
<i>Helicobacter pylori</i>	RdxA		
<i>Klebsiella sp</i>		NTR I	
<i>Pseudomonas</i>	NbzA		

<i>pseudoalcaligenes</i>			
<i>Pseudomonas putida</i>	PnrA	PnrB	
<i>Rhodobacter capsulatos</i>		NprA, NprB	
<i>Salmonella typhimurium</i>	SrnA	Cnr	
<i>Staphylococcus aureus</i>	NfrA		NtrA
<i>Synechocystis sp</i>	DrgA		
<i>Vibrio fischeri</i>		FRaz I	
<i>Vibrio harveyi</i>	Frp		
<i>Homo sapiens</i>	iyototirozin deiyodinaz		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			Frm2, Hbn1

Prokaryotlarda ve ökaryotlarda izole edilen pek çok nitroredüktaz enzimi bulunmaktadır (Çizelge 1.1). Önemlerinden dolayı pek çok nitroredüktaz, klonlanmış yapısal analiz ve işlevsel analizleri yapılmıştır. Bu enzimlerden bazıları *H.pylori*'den izole edilen RdxA [15], *E. coli*'den ayrılıp saflaştırılan NTR [8, 10, 16, 17], *Vibrio fischeri*'den ayrılıp saflaştırılan FRazI [18], *B. amyloliquefaciens*'den ayrılıp saflaştırılan YwrO [19] ve *S. saprophyticus*'dan ayrılıp saflaştırılan Ssap-NtrB'dir [20]. Ssap-NtrB'nin CB1954'ü etkinleştirdiği belirlenmiştir [21].

Ökaryot hücrelerde nitroredüktazların varlığı ile ilgili bir kaç kayıt vardır. Memelilerde tip 1 nitroredüktazlara işlevsel olarak benzeyen bazı enzimler bulunmuştur. Bunlar NAD(P)H kuanin oksidoredüktaz (DT-diaforaz) ve ksantin dehidrogenazdır. Fakat bu enzimler birbirleri ile filogenetik olarak ilgili değildirler. Bu ailenin domain özelliklerini göstermezler. Benzer şekilde tip 2 enzimleri ile işlevsel olarak ilgili nitroredüktaz enzimleri çeşitli organizmalarda bulunur. Bunlar aldehit oksidaz, sitokrom c oksidaz ve NADPH sitokrom P-450 redüktazdır [14]. İnsanlarda iyototirozin deiyodinaz, mono- ve diiodotirozinin deiyonasyonunu katalizler ve bir NfsA nitroredüktaz bölgesi içerir [22].

Son zamanlarda *Saccharomyces cerevisiae*' da Frm2 ve Hbn1 olarak adlandırılan nitroredüktaz benzeri proteinler tanımlanmıştır. Bu proteinler yeni bir nitroredüktaz ailesine aittir ve birçok bakteri ve mantarda da homologları bulunmaktadır [23].

E.coli'de farklı nitroredüktazlar izole edilmiştir. Bunlar NfsA (grup A) ve NfsB (grup B) dir. Bunlar ana ve yan oksijen duyarsız nitroredüktazlardır [10].

NfsA ana oksijen duyarsız nitroredüktaz olup elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanır. NfsB ise elektron kaynağı olarak NADH ya da NADPH kullanan redüktazdır [16, 24].

1.4 Nitroredüktazlar ve Metabolik Yolaklar

Nitroredüktaz proteinlerinin biyolojik işlevi büyük bir şekilde bilinmemektedir. *E.coli* nitroredüktazı NfsB'nin proteinlerdeki 3-nitrozin (3-NT) gruplarını indirgeyebildiği gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda nitroredüktazların oksidatif stres cevabıyla ilgili olduğu önerilmektedir [25].

Bazı nitroredüktazların farklı metabolik yolaklarla ilgili olduğu bulunmuştur. Örnek olarak nitroredüktaz benzeri bir protein olan BluB enzimi verilebilir. Bu enzim NADH/flavin mono nükleotit (FMN) - bağımlı nitroredüktaz ailesindedir. *Selenomonas ruminantium*, *Sinorhizobium meliloti* ve *R. capsulatus* da bulunur. B12 biyosentezinde görev aldıkları önerilmiştir. B12 hayvanlarda, protistalarda ve bazı prokaryotlarda bazı reaksiyonlarda kofaktör olarak görev yapar. Örneğin yağ asitleri, nükleotit ve metionin aminoasiti sentezinde görev alırlar [26]. *Siyanobakter Synechocytis* DrgA proteini ve *E.coli* NfsB enzimi demir indirgeyici etkisi vardır. Demir metabolizmasında görevlidir [27].

E.coli' den elde edilen NfsB proteini demir metabolizması için önemli olan ferrik redüktaz etkinliğine sahiptir. Fenton mekanizmasını katalizlerler.

Fenton mekanizmasında demir ve hidrojen peroksitin etkileşime girdiği reaksiyondur [28]. *S.cerevisiae'* den elde edilen Frm2p ise önemli bir yolak olan lipit yolağında görevlidir. *Vibrio fischeri'* de bulunan nitroredüktaz FRase1 enzimi biyoluminesans özellikle ilgilidir. Bu enzim lusiferaz reaksiyonu için gerekli olan flavini indirgenmiş hale getirir. Bunu da NADPH tarafından FMN'nin indirgemesi ile yapar [17, 18, 24].

Nitroredüktazların evrimsel önemi ile ilgili Roldan ve arkadaşları (2008) bir öneride bulunmuştur. Bu enzimlerin ilk fizyolojik işlevlerini kaybettikleri ve farklı nitroaromatik ve nitroheterosiklik bileşikleri indirgemek üzere değiştiklerini önermiştir. Bu sayede bakteriler kirletilmiş çevrede canlı kalabilecek bir üstünlük kazanırlar. Nitroredüktazların bu avantajı ve metabolik yollarda oynadıkları işlevler bu enzimleri biyoteknolojik ve klinik açısından önemli kılmaktadır[5].

1.5 Nitroredüktazların Çevre ve İnsan Üzerindeki Roller

Nitroaromatik grupların zehirli etkileri oldukça iyi tanımlanmıştır. Bu bileşiklerin çoğunun zehirli, mutajenik ve karsinojenik olduğu rapor edilmiştir [29]. Fakat nitroaromatik bileşiklerden nitrofuran, nitrobenzen ve diğerleri ilaç endüstrisinde antimikrobiyal ajan olarak, yiyecek katkı maddesi olarak, pestisit, patlayıcı, boya ve daha birçok endüstrilerde ham madde olarak yaygın kullanım alanı bulunmaktadır. Bu proteinler çevre mühendisliğinde çok popülerdir. Özellikle nitroaromatik zehirliliğinin önlenmesinde önemli rolleri vardır. Bu nedenle biyoremediasyon ve biyokataliz olaylarında kullanılır. Sonuç olarak çevrede çok yaygındır ve önemli kirleticilerin büyük bir grubunu oluşturmaktadır [3, 30].

Bazı nitrolu bileşikler çevrede bulunmaktadır. Özellikle bazıları fosil yakıtlarının uygunsuz kullanımı ile oluşur. Endüstriyel işlemlerde, boya olarak, sentetik ara ürünler olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda mutajenik aromatik nitrolu bileşikler fotokopilerde, şehir atmosferinde, otomobil egzozunda ve sigaralarda bulunur [3, 5, 29]. Bu yüzden insanoğlu çevrede sürekli nitrolu bileşiklere solunumla, besinle ve cilt teması ile maruz

kalmaktadır. Bu nitrolu bileşikler bu durumda oldukça büyük bir sağlık problemi oluştururlar [3, 29].

Ayrıca pek çok nitrolu bileşik etkin azot oksit türlerini oluşturup biyolojik moleküllere zarar verecek durumdadır. İnsan vücudunda nitrolu bileşiklerin metabolizması bağırsak florasında gerçekleşir. Bağırsak mikroflorasında zorunlu anaerob türler özellikle *Clostridium* vardır [31]. Mikroflora özellikle çevresel ve kimyasal ürünleri metabolize etmede rol oynayan çok çeşitli metabolik aktiviteler gösterir. Bu yüzden mikrofloradaki bakteriler insan sağlığında ve hastalıklarda öneme sahiptir. Bu anlamda bağırsak mikrobiyal topluluklarında varolan nitroredüktazlar dışarıdan alınan nitroaromatik kimyasalları metabolize etmede rol oynarlar. Bu biyotransformasyon ürünleri konakçı için zehirli olabilir [32-34].

Bağırsak mikroflorası antibiyotiklere maruz kaldığı zaman metabolik etkinlikleri değişir. Örneğin l-nitropiren önemli bir çevresel kirleticidir. Mutajenik ve tümörejenik olduğu gösterilmiştir. l-nitropiren oksijensiz insan ortamında, maymun ve fare bağırsak mikrofloralarında aromatik aminlere indirgenebilir. Aromatik aminlerde daha büyük toksisite içerebilir [34].

Nitroredüktazlar son günlerde oldukça büyük ilgi alanı oluşturmuştur. Bazıları biyosensör olarak bazıları ise biyoremediasyonda kullanılır. Özellikle çevresel kirleticilerin izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [35], [36].

Nitroredüktazlar pek çok kirletici bileşiği örneğin TNT'yi parçalayabilir. TNT 1902 yılından beri kullanılan patlayıcı, boya ve fotoğraf endüstrisi kimyasallarının ara ürünü olan nitroaromatik bir bileşiktir [3, 34]

Özellikle kirliliğin yok edilmesinde bitkilerin kullanımı son yıllarda ön plana çıkmıştır. Fitoremediasyon denilen bu işlem düşük maliyetli, düşük çevresel etkili ve kolay çalışan bir sistemdir [37]. Fakat bitkiler bakteri ve memelilerde olan enzimatik çeşitliliğe sahip değildir. Bunun için transgenik bitkiler geliştirilmiştir. Örneğin sürekli olarak Nfs1 nitroredüktaz genini ifade eden tütün bitkisi elde edilmiştir. Bu transgenik bitkiler nitroaromatik bileşikleri parçalayabilir [38, 39].

1.6 Nitroredüktazların Klinik Önemi

Nitroredüktazların özellikle kanser tedavisinde ve antibiyotik dirençte önemli rolleri vardır. Aynı zamanda tıp alanında ilaç öncüllerini aktive edecek ajanlar olarak da önemlidirler. Ayrıca pek çok çalışma nitroredüktazların antibiyotiklere karşı duyarlılığı ile ilgilidir [7, 40, 41].

Kemoterapi, hastalıkların tedavisinde kimyasal ajanların kullanılmasıdır. İlk kimyasal özellikteki antikanser ilaç hardal gazından geliştirilmiştir. İkinci dünya savaşında kimyasal silah olarak kullanılmıştır. Bu gaza maruz kalan askerlerin kemik iliği ve lenf dokuları baskılanmıştır. Bu durum kötü huylu lenfomaların oluşumuna sebep olmuştur. Kanser tedavisinde kemoterapinin çok fazla yan etkisi vardır. İlaça karşı dirençli hücreler oluşturabilir. Enzim ilaç öncül terapisi bu problemi cevaplayacak bir stratejidir [41]. Yalnız bu ilaç öncüllerinin tümör hücrelerinde daha yüksek ifade olan enzim sistemleri ile aktive olması gerekir. Böylece tümöre özgü ya da hedefe spesifik bir tedavi yaklaşımı mümkün olacaktır. Hâlbuki insanda *E.coli* nitroredüktazlara seçenecek olabilecek bir enzim sistemi yoktur. İlaç öncüllerinin etkinleştirilmesinde bakteriyel kaynaklı nitroredüktazların kullanımı gündeme gelmiştir.

E.coli nitroredüktazı ya da genleri, tümör hücrelerini ilaç öncülüne karşı duyarlı hale getirir. Bunu bakteriyel enzimin ilaç öncülünü yüksek sitotoksik hidroksilamin türevlerine dönüştürmesi ve bu ara ürünün tümör hücrelerini öldürücü etki göstermesi ile gerçekleştirir [42]. Bu yüzden bu enzim sistemlerini taşıyabilecek farklı gen tedavileri gündeme gelmiştir. Bu genlerin kodladığı enzimler ilaç öncüllerini zehirli hale getirirler. Örneğin, kanser gen tedavisinde kullanılan ve *E.coli* 'de NfsB geni ile kodlanan nitroredüktaz (NTR), 5-aziridinil-2,4-dinitrobenzamidi (CB1954) etkinleştirir. Etkin olan türlerde potansiyel bir DNA alkilleme aracı ortaya çıkar ve yüksek sitotoksik etki ile DNA çapraz bağlanmaları yapar [43]. CB1954 bölünebilen ve bölünemeyen hücrelerin ikisini de öldürür. Hedef hücreler kısa sürede çoğalamayacağı için bu bir avantajdır [42]. Zehirli olmayan ilaç öncüllerinin enzimler ile yüksek sitotoksik etki göstermesi sonucunda seçilen kanser tiplerinde genellikle bir viral vektör kullanılarak yapılan gen aktarımı ile kanser gen tedavisi yapılır. Çok farklı enzim-ilah öncül bileşimleri vardır. Herpes Simpleks virüsünden elde edilen Timidin kinaz, Gansiklovir ilaç öncülünü

etkinleştirir. Sitozin deaminaz ise 5-florositozini 5-floro-urasile çevirir. Bu sistemler de DNA sentezini inhibe ederek, çoğalan hücrelerin ölümüne sebep olur [44].

Nitroredüktazlar antibiyotik direncinde özellikle metronidazole karşı önemli rol oynarlar. Metronidazol ilk defa *Trichomonas* enfeksiyonlarını tedavi etmek için geliştirilmiştir. Fakat pek çok parazitik enfeksiyonlarda, *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. Metronidazole karşı direnç özellikle *H.pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde ciddi bir problemdir. Bu yüzden antibiyotiğe direcin moleküler mekanizmasını anlamak oldukça önemlidir. *H.pylori* 'deki metronidazole dirençte oksijene duysız NADPH nitroredüktazı kodlayan rdxA genindeki mutasyonlar önemlidir.

Aynı zamanda NADPH flavin oksidaredüktaz genini kodlayan frxA genindeki mutasyonlarda rapor edilmiştir. RdxA nitroredüktazı metronidazolü ilaç öncülünden mutajenik hidroksilamine çevirir. Bu da DNA hasarı oluşturarak hücre ölümüne neden olur. frxA hücrel indirgenme potansiyelini indirekt etkiler. Metronidazolün indirgenme ile etkinleşmesi hedef hücrenin redoks sistemine bağlıdır. Bu yüzden bu iki enzimin etkinliklerindeki kayıp ve azalma metronidazole dirence neden olur. Klinik olarak nitroredüktazlar nitroimidazol temelli tedaviler için ilginç bir hedeftir. *H.pylori* soyları 3 yolla dirençli hale gelir. (1) rdxA geninin etkinleşmemesi (2)rdxA ve frxA nın her ikisinde etkinleşmemesi (3) çok nadiren frxA nın yalnız başına etkinleşmemesi. Nitrofuran kökenli nitrofurazon ve nitrofurantoin gibi antibiyotikler özellikle genital bölge ve üriner sistem rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Bu bileşikler nitroredüktazlar tarafından aktive edilmelidir. Antibiyotik direnç mekanizmasının anlaşılmasıyla birlikte daha etkili antibiyotik bileşenlerinin tasarımı gibi yeni stratejilerin geliştirilmesi ortaya çıkmıştır [15].

Nitroaromatik bileşikler tipik bir ilaç molekülünde var olmayan bir mekanizma ile hücrel zehirlilik gösterirler. Bu yüzden de pek çok nitroaromatik bileşenin taranması ve böylece hücrel bazlı deneylerin yapılması gerekmektedir. Bu yüzden pek çok nitroaromatik bileşik inceleme aşamasındadır. Örneğin anti parazitik nitazanide ve nifurtimoks Hepatit-C [45], pediatrik nöroblastoma [46] için klinik denemelerdedir.

1.7 İlaç Öncül Maddeler

İlaçların fizikokimyasal özelliklerini değiştirip, geçici olarak uygunluğunu arttıran ya da zehirliliğini düşüren, farmakolojik olarak etkin olmayan olan kimyasal türevlere "prodrug" ya da ilaç öncülü adı verilmiştir [47].

İlaç öncülleri tasarlanırken bazı dikkat edilmesi gereken noktalar bulunmaktadır. Bunlar;

- Enzim – substrat ilişkisine uygun enzime özel ilaç öncül olmalı [48]
- Hücre içinde etkin olabilmesi için kanser hücrelerinde dağılabilmeli
- Hücre dışında etkin hale geliyorsa, hücre kanallarından kolaylıkla geçebilmeli [49]
- Sistemik olarak zehirlilik yaratmamak için sağlıklı dokuda etkinliği olmamalı
- Fizyolojik koşullarda var olan kimyasal yapısı bozulmamalı [41]
- Etkin hale gelen ilaç öncül madde ve oluşturduğu zehirliliğin yarılanma süresi enzimin etkin olmadığı bölgelere de ulaşabilecek uzunlukta olmalı
- Lenf ve kan dolaşımına kaçak yapabilmesine imkan vermeyecek kadar kısa bir yarılanma süresi olmalı
- Etkin hale gelerek tedavi edici özelliğe ulaşan ilaç, öncül ilaç halinden yüz kat etkili olmalı şeklinde sıralanabilir [49].

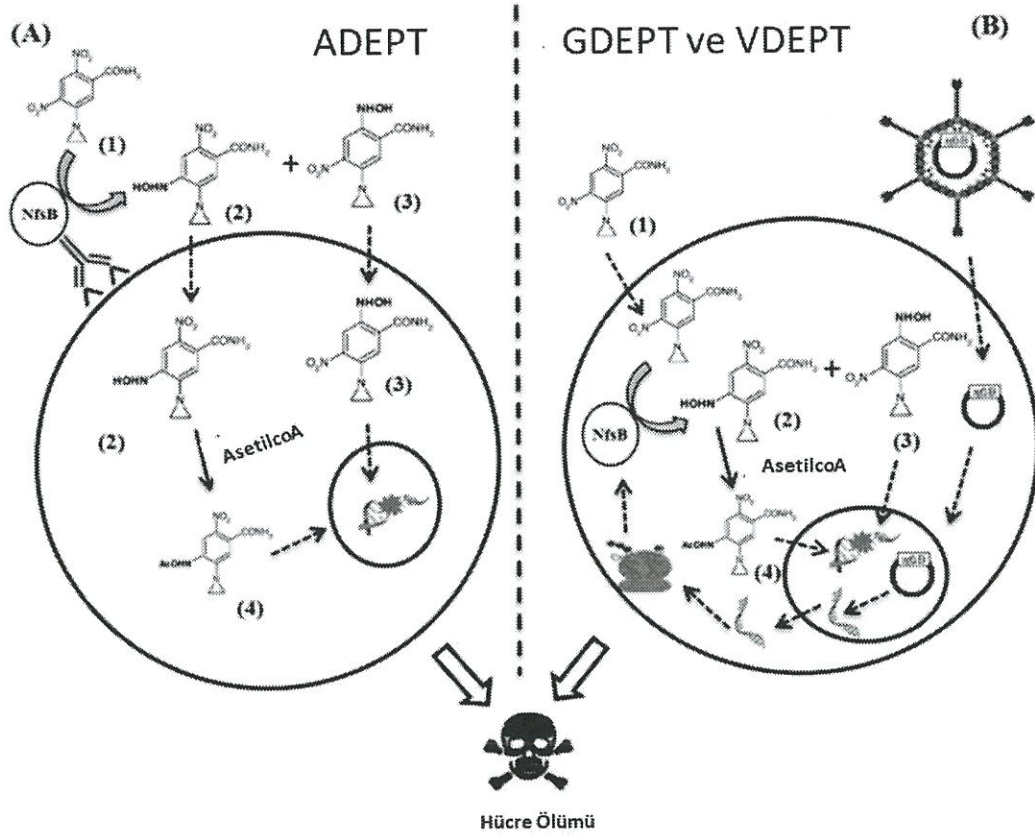
İlaç öncülleri farmokodinamik ve zehirli olarak etkisiz fakat potansiyel ilaç haline gelebilen kimyasallardır. Bu ilaç öncülleri özel enzimler ile etkinleştirilir ve normal hücrelerden bu özel enzimlerin tümör hücrelerinde normal hücrelere göre daha fazla ifade olmasına neden olur. Bu durum hücreler arasında farklılıklara neden olur ve kemoterapinin özgünlüğünü kuvvetlendirir. Bu ilaç öncüllerini aktive eden enzim seviyeleri tümörlerde oldukça nadirdir. Bu yüzden yeni tedaviler önerilmiştir [41].

1.8 İlaç Öncül Maddeler ve Tedaviler

İlaç öncü maddelerin istenilen hedef bölgelere iletilmesinde kullanılan pek çok tedavi yöntemi vardır. Gen yönlendirmeli enzim ilaç öncül tedavisi ya da virüs yönlendirmeli enzim ilaç öncülü tedavisi (GDEPT ya da VDEPT) ve antikör yönlendirmeli enzim ilaç öncül tedavisi (ADEPT) bunlara örnek olarak verilebilir [44].

GDEPT, DNA bileşimlerinin *Clostridia* ya da virüs kökenli vektörleri enzimi kodlayan genin tümör hücrelerine taşınması için kullanılır [50]. Bu enzim zehirli olmayan ilaç öncülünü sitotoksik metabolite çevirir. Sitotoksik metabolitte tümör hücrelerini öldürür. ADEPT sistemi de enzim tümör hücresine özel bir antikora bağlanır. Böylece enzim doğrudan tümörü hedefler. Antikörün tümör yüzeyindeki proteine bağlandıktan sonra organizmaya verilir. Antikora bağlanmış enzim ilaç öncülü metabolize eder. Zehirli molekül tümör hücresine girer ve sitotoksik etki oluşturur [49].

GDEPT sistemiyle etkili olabilen dört ilaç öncül sınıfı bulunmaktadır. Bunlar dinitroaziridinilbenzamidler, dinitrobenzamidler, 4-nitrobenzilkarbamatlar ve nitroindolinlerdir. Nitroredüktazlar ile birlikte GDEPT için kullanılan en başarılı ön ilaç, 5-aziridinil-2,4-dinitrobenzamid (CB 1954) tir. İlaç öncüllerinde dinitrobenzamid ailesinin prototipidir [51].



Şekil 1.2: ADEPT, GDEPT ve VDEPT etki mekanizması [13]

1.9 İlaç Öncül Madde: CB1954

CB1954 (5- aziridinil 2,4- dinitrobenzamid) Chester Beatty Laboratuvarı tarafından 1960'ların sonunda sentezlenmiştir. CB1954' ün antitümör aktivitesi Fare Walker 256 karsinomada gösterilmiştir [52].

CB1954 (5-aziridinil 2,4-dinitrobenzamid) bu ilaç öncüllerinin (dinitrobenzamidin) prototipidir. Bunlar kanser tedavisinde gittikçe popüler olmuş bir gruptur. Bu öncüller DT-diasphere tarafından etkinleşir. CB1954 klinik denemelere geçmiştir. Fakat insanda daha az aktive olduğu ve daha az antitümör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Rat ve insan enzimleri arasındaki fark buna neden olmuştur. *E.coli* nitroredüktaz NfsB' nin ilaç öncülü CB1954' ü daha iyi etkinleştirdiği gözlenmiştir. Bu da CB1954'ün ADEPT ve GDEPT yöntemleri ile tedavide kullanılabileceğini göstermektedir [41, 52].

E.coli nitroredüktazı CB1954 nitro indirgediğinde sitotoksik 4-hidroksil amini oluşturur. Bu da tiyoesterler ile reaksiyona girer. Örnek olarak Asetil coA ile girer ve DNA' ya bağlanan bir ajan oluştururlar. Bu ajan DNA zincirlerine bağlanarak yüksek sitotoksisite oluşturur. İki nitro grubun iki hidroksil gruba ya da iki amin gruba indirgememesi potansiyel sitotoksik bileşikler de oluşturur. Oysa dt- diasfor enzimi sadece 4-nitro bağıını indirger. DNA' ya bağlanan bu kompleksler tamir edilemez ve bölünen ve bölünmeyen hücreleri p53 bağımsız yolla apoptoza yollar [41, 52, 53].

Etkinleşmiş CB1954 hücre döngüsünden bağımsız olarak hücreleri öldürür. Bu da bölünmeyen hücrelerin hedef olmasını sağlar. Başka bir avantajı pek çok ilaç öncülü yanındaki hücrelerin de ölümüne de neden olurlar. Bu sistem böyle bir etkiye sahip değildir. Bu tedavinin kanser potansiyeli faz 1 ve faz 2 prostat kanserli vakalarda denenmiştir [41, 54].

Teropatik NfsB ve CB1954 kullanımının bazı yetersiz yönleri vardır. Nitroredüktazlar ilaç öncüllerine düşük etkiye sahip olduğu için düşük reaksiyon hızı vardır. Böylece diğer substratların kullanımı ya da diğer organizmalardaki nitroredüktazlar araştırılmalıdır. Diğer nitroredüktazların CB1954 'ü de etkinleştirdiği gösterilmiştir. Örneğin *B. amyloliquefaciens* ve *P. pseudoalcaligenes* den elde edilen NbzA enzimleri, bu enzimlerin her ikisi de *E.coli* NfsA nitroredüktaz ile yüksek homoloji gösterir ve NfsB' ye göre düşük bir Km'si vardır [16, 55].

CB1954'ün metabolitleri hem bölünen hem de bölünmeyen kanser hücrelerini öldürme yeteneğinde olan alkilleyici araçlardır. Bu, sadece bir tür hücreyi hedef alan diğer bazı GDEPT sistemlerine kıyasla bir üstünlüktür. Aynı zamanda metabolitlerin yüksek hücre geçirgenliğine sahip olması, seyirci etkisi ile komşu tümör hücrelerinde de etkinlik göstermesini sağlar [56]. Patel ve ark., CB1954 ve GDEPT sisteminin bu etkinliğini, karaciğer ve prostat kanserlerinin tedavisi için etkisini birkaç klinik çalışmada göstermişlerdir [54].

Bu çalışmada da referans olarak alınan CB1954 maddesi haricinde SN23862 [57] ve PR-104 [58] gibi dinitrobenzamid mustardları (DNBM) da önem kazanmıştır. PR-104 ilaç öncü maddesi başarılı olmuş, klinik deneyleri aşamasına geçmiştir [59]. Yapılan çalışmada PR-104'ün lipofilik DNBM alkolü olan PR-104A'ya dönüştüğü, PR-104A'ün amin ve hidroksilamin ürünlerinin

DNA çapraz bağlayıcı araç olarak rol oynadığı, hücre bölünmesini engelleyerek sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [60]. PR-104, miyelotoksik etki gösterdiği için klinik deneylerde bir sonraki aşamaya geçilememiş olsa da [61], kanser tedavisi için önemini korumakta ve ikinci nesil PR-104A analogları ile alakalı çalışmalar devam etmektedir [62, 63].

Kanser tedavisinde kullanım amaçlı, klinik faz 3 aşamasında [63, 64] olan evofosfamide (TH-302) de önemli ilaç öncülerden bir tanesidir [65].

Bir diğer potansiyel ilaç-öncü bileşik ailesi de nitro-kloro-metil-benzindolin (nitro-CBO)lerdir. Green ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *P.aeruginosa* ve NfsB/nitro-CBI-DEI birleşiminin, *E.coli* NfsB/CBI-DEI birleşiminden 4,5 kat daha etkin olduğu bulunmuştur [66].

Diğer bir ilaç öncü aday bileşik türü CNOB'lerdir. Ancak bileşiğin poliaromatik yapısından dolayı çözünürlükleri ve dokuya nüfuzu sınırlı olduğu için kanserli dokuyu hedef alan mikrovesiküller içerisine enkapsülasyon yapılarak klinik uygulamalarda kullanılabilir [67].

Nitroredüktazlar, 5-nitroimidazol antibiyotikleri ile de etkileşime girdikleri için bu antibiyotikler de potansiyel ilaç öncüler olabilirler. Bu kapsamda, Prosser ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pek çok bakteriyel tip 1 nitroredüktazın metronidazolu potansiyel sitotoksinlere dönüştürdüğü görülmüştür [68].

Tip 1 nitroredüktazlar aynı zamanda kinon redüktazı oldukları için kinon ilaç öncüleri de kanser tedavisinde kullanılabilir [63].

Kanser tedavisinde kullanım amaçlı geliştirilen enzim ilaç-öncü birleşimleri arasında en yaygın olarak bilinen *E.coli* NTR/CB1954 sistemi klinik

deneme aşamasına geçmesine rağmen [54], E.coli NfsB nin CB1954 üzerindeki etkisinin düşük olduğu, bu nedenle ileri faz denemelere devam edilemediği bilinmektedir [54]. Bu nedenle öncelikle CB1954 üzerinde daha etkin olacak yeni nitroredüktaz enzimleri keşfedilmeye başlanmıştır [19, 20, 52, 66]. Öte yandan var olan nitroredüktazların ilaç öncü molekülleri üzerindeki etkilerinin artırılmasına yönelik protein mühendisliği ile mutasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, E.coli NfsB'nin CB1954 üzerindeki k_{cat}/K_M 'ini 2,4 kat [8], 48 kat [63], 25 kat [69], 8,4 kat [70] arttırabilmişlerdir.

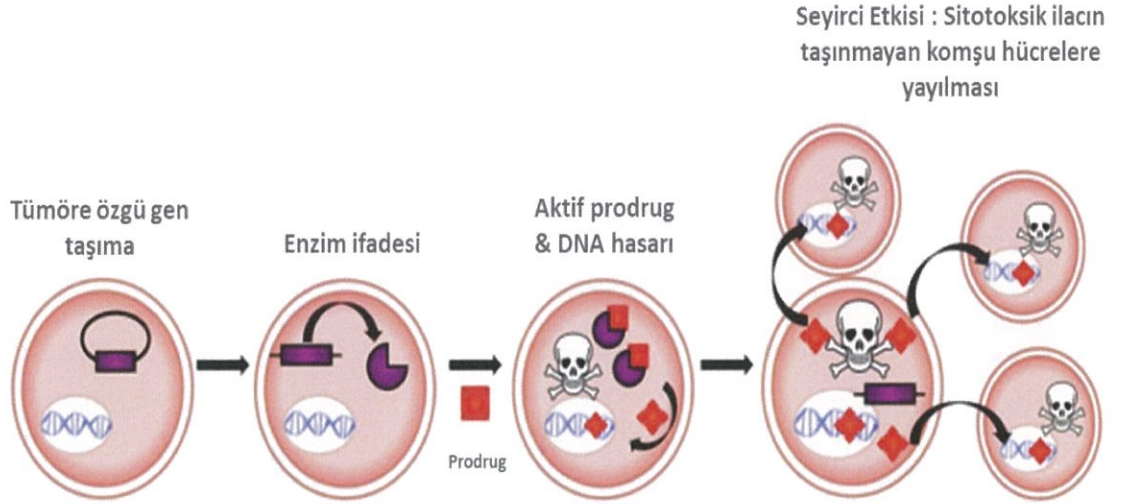
1.10 İlaç Öncül ve Nitroredüktaz Enzim Uygulamasının Etkileri

Hücrelerde ölüm mekanizmaları çok farklı şekillerde olabilmektedir. Nitroredüktaz ve CB1954 ikilisinin uygulanması sonucunda, CB1954 maddesi nitroredüktaz enzimi tarafından indirgenir ve DNA ile çapraz bağ yapar. Oluşan bu çapraz bağların onarılması zordur ve bu nedenle hücrelerde p53 bağımlı olmayan apoptoz yolu ile hücre ölüm mekanizmasını etkin hale getirirler [53]. Ntr / CB1954 uygulandıktan sonra oluşan DNA kırıkları ile timosit ve epitel hücrelerindeki değişim incelenmiştir. Bu hücrelerde apoptozun tetiklendiği belirlenmiştir.

Nitroredüktaz enzim aracılı oluşan hücre ölümünde p53 tümör baskılayıcıya ihtiyaç olmamaktadır. Hücrelerde oluşan ölüm mekanizmaları hücre çoğalmasından bağımsız olarak gerçekleşir. Etkin haldeki CB1954'ün DNA'ya çapraz bağlanması ile apoptoz mekanizmasında oluşan kaskat etkin hale gelir. Bu oluşumla hücre ölüm yoluna girer. Cui ve ark., *in vivo* fare denemelerinde p53 etkin olmayan olan hücrelerde, CB1954 verilmesinden 7 saat geçtiğinde p53-bağımlı olmayan hücre ölümünün gözlemlendiğini belirlemiştir [53].

1.11 Seyirci (By-stander) etkisi olan ve olmayan etki mekanizması ile hücre ölümü

Seyirci (By stander) etkisi, hücrelerde enzim ifade olduktan sonra oluşan toksinlerin çevredeki hücreleri de öldürmesi olarak çalışmalarda ifade edilir (Şekil 1.3). Bizim yapmış olduğumuz hücre dışı reaksiyon çalışmalarında, nitroreduktaz enzimi ve substratının bir araya getirildikten sonra oluşan zehirli metabolitlerin hücre içerisine verilmesi seyirci etkisini taklit amacıyla gerçekleştirilmiştir. Seyirci etkisi olmayan mekanizma ise enzimin tümörlü hücrelerde ifade ettirilip sadece o hücrelerin ölümüne sebep olacak zehirleri sağlamasıdır. Bu sistemde önemli olan enzimin yeterli sayıda tümör hücresine verilmesi işlemidir. Gen aktarımı etkinliğinin artırılması klinik olarak büyük önem arz etmektedir [71].



Şekil 1.3: Seyirci etkisinin mekanizması [71]

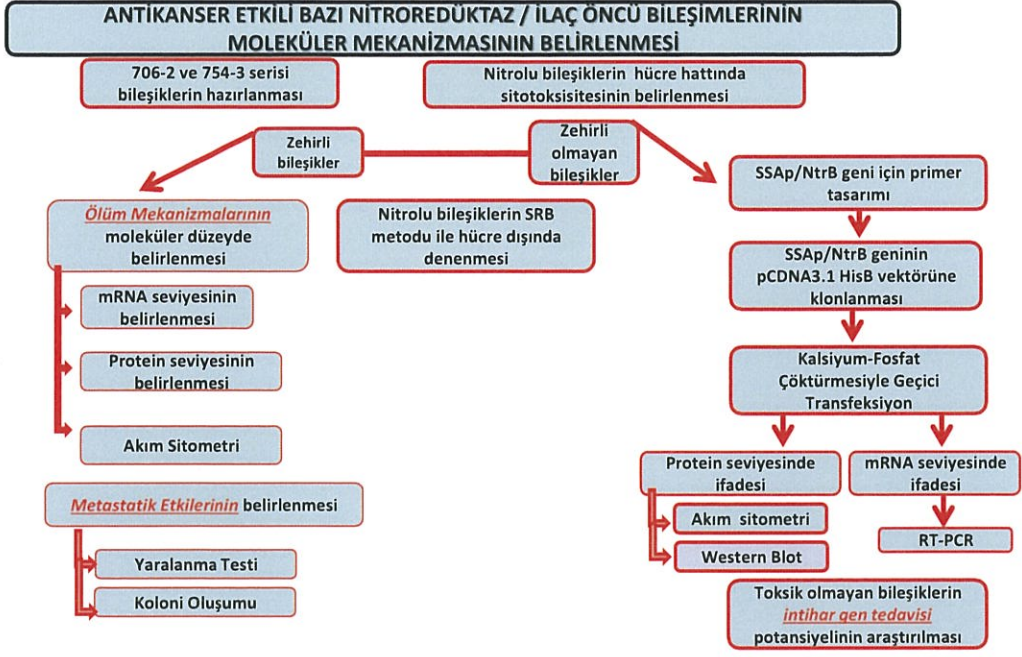
2. ÇALIŞMANIN AMACI

Tez konusunu oluşturan nitrolu bileşikler kanserli hücreler üzerinde yüksek hücre ölümü oluşturan ve nitroredüktaz adı verilen enzimler ile etkin hale gelebilen bileşiklerdir. Son zamanlarda nitroredüktaz enzimlerinin önemi klinik alanda artmıştır. Elde edilen ümit verici çalışmalara rağmen bu alanda tam bir başarı hala elde edilememiştir. Bu yüzden pek çok yeni nitrolu bileşiklerin sentezine ve onu *in vivo*'da etkin hale getirecek ve bu bileşiklere ilgi gösterecek nitroredüktazların bulunmasına ihtiyaç vardır. **Amaç; normal dokuya zarar vermeyen, sadece kanserli dokuda ifade olan enzim sistemleri tarafından etkin hale getirilen ve çoğunlukla hücre ölümü oluşturan ilaç öncüllerinin geliştirilmesidir.**

Bu çalışma ile kanser tedavilerine yönelik olarak sentezlenmiş potansiyel ilaç öncüllerinin ve Ssap-NtrB enziminin birleştirilerek Nitroredüktaz/ilah öncü bileşimlerinin elde edilmesi, bu bileşimin hücre içi ve hücre dışı sistemlerde oluşturdukları etkilerinin moleküler mekanizmalar ile aydınlatılması düşünülmüştür. Tez kapsamında yapılan bu çalışmalar, akış diyagramında ayrıntılı bir şekilde belirtilmiştir (Şekil 2.1). Bu plana göre;

- i) Nitro grubu içeren tüm bileşikler öncelikle uygun koşullarda 5 farklı derişimde hazırlanmıştır. Ardından gösterdikleri zehirli etkilerin belirlenebilmesi amacıyla seçilen farklı kanser hücre hatlarında (Hep3B, PC3, Saos-2, HT-29, HUVEC) denenmiş ve sonucunda sitotoksosite durumunun belirlenmesi için MTT deneyine tabi tutulmuştur.
- ii) MTT deneylerinden elde edilen sonuçlara göre seçilen zehirli olmayan bileşiklerin enzim ile denemelere gidebilecek özellikte olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle seçilen bileşikler ile Ssap-NtrB enziminin dâhil olduğu hücre dışı reaksiyon denemeleri 6 farklı derişimde uygulanmıştır.

- iii) Zehirli olmayan bileşiklerin hücre içi sistemlerde denemesi için, hücrede ifadesi gerekli olduğundan pEt14b vektörüne aktarılmış olarak bulunan Ssap-NtrB geninin ökaryotik ekspresyon vektörü olan pCDNA3.1/V5/HisB' ye klonlaması gerçekleştirilmiştir.
- iv) Klonlamanın doğruluğu için geçici transfeksiyon uygulanmış ve bunun ardından ilk olarak mRNA seviyesinde, ardından İmmunfloresan yöntemiyle ve son olarak ise akım sitometri yöntemiyle kontrolü sağlanmıştır.
- v) Hücre içinde enzimin ve ilaç öncül bileşiklerin etkinliklerinin görülebilmesi için ise öncelikle geçici transfeksiyon uygulanmış ve ardından seçilen ilaç öncü bileşikler uygulanarak oluşturdukları etki değerlendirilmiştir.
- vi) Zehirli olan bileşiklerin ise hücre ölümünü apoptotik mekanizmalar ile gerçekleştirip gerçekleştirilmeyeceği belirlenmiştir. Bu çerçevede pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ifadeleri mRNA düzeyinde belirlenmiş ve devamında Nicel Gerçek Zaman (Real Time) PCR analizi ile gen ifadesi gözlemlenmiştir.
- vii) Aynı etkinin protein düzeyinde etki oluşturup oluşturmadığı Western Blot analizleri ile doğrulanmıştır.
- viii) Ayrıca bileşiklerin hücreler üzerindeki metastatik etkilerinin belirlenmesi için koloni oluşturma ve yaralanma denemesi yapılmış olup, bu sonuçlar zehirli olarak gruplandırılan bileşikleri doğrulamıştır.
- ix) Zehirli etki gösteren bileşiklerin hücre döngüsüne etkileri de Akım Sitometri analizi ile belirlenmiştir. Bu amaçla iki farklı analiz yapılmıştır. Birincisi Anneksin V uygulanarak hücrelerin seçtiği ölüm yolu belirlenmiştir. İkincisi ise propidyum iyodür uygulanarak hücrelerin hücre döngüsünde tutuklandıkları aşama belirlenmiştir.



Şekil 2.1: Tez çalışmasına ait işlem şeması

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmalarda Kullanılan Makine Teçhizat Listesi

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar ve markalarına ait bilgiler Çizelge 3.1 ile gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Kullanılan Cihaz Listesi.

Cihazın Adı	Markası
Elektronik Terazı	Sartorius, Almanya
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Buz Makinesi	Fiocchetti, İtalya
-20°C ve +4 °C Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Elektroforez Tankı	Biorad,
Elektroforez İçin Güç Kaynağı	Biorad,
Manyetik Karıştırıcı (Isıtmalı)	Velp Scientifica, İspanya
pH metre	WTW, Almanya
Isıtıcı Blok	FALC, İtalya

Çizelge 3.1: (devamı)

PCR	Techne Progene, İngiltere
Mikrosantrifüj	Sigma Laborzentrifügen, Almanya
Sıcak Su Banyosu	Elektromag, Türkiye
Isı Ayarlamalı Çalkalamalı Etüv	GFL, Almanya
Santrifüj	Hettich Zentrifügen, Almanya
Qubit Florimetre	İnvitrogen
Saf Su Cihazı	Destilasyon 3.1/(Comecta Sa)
Otoklav	Hirayama
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuair
Horizantal Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Laminar Air Flow	TelstarBIOII/ İspanya
UVP Jel Görüntüleme	UVP
Flow Sitometri	Guava
Otomatik pipetler	Finnpipette, Thermo
SDS PAGE Aparatları	BioRad

3.1.2 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Deneyler sırasında kullanılan kimyasallar güvenlik sertifikalarına (MSDS) uygun şekilde saklanmış, kullanılmış ve yine aynı kurallara uygun olarak atık dönüşümüne maruz bırakılmıştır. Çalışmalarda kullanılan bu kimyasallar Çizelge 3.2 ile gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: Kullanılan Kimyasal Listesi

DNA Tabanlı Tekniklerde Kullanılan Kimyasallar	
LB Agar Besiyeri	Pronadisa
LB Broth Besiyeri	Pronadisa
T4 DNA Ligaz Enzimi	NEB, Fermentas
Ligaz Tamponu	NEB, Fermentas
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Fermentas
Antibiyotik (Amfisilin)	Sigma
<i>Taq</i> DNA polimeraz Enzimi	Thermo Scientific
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	Thermo Scientific
Etidyum Bromür	Sigma
pGEM-T Easy Vektör sistemi	Promega
Plazmit izolasyon kiti (Küçük ve büyük ölçekli)	Fermentas
Jelden geri kazanım kiti	Fermentas

Çizelge 3.2: (devamı)

Proteinaz K	Sigma
Doygun Amonyum asetat (NaAc)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
EDTA	Sigma
Tris bazi	Sigma
Kuartz 96 kuyucuklu plaka	Sigma
Borik asit	Merck
MgCl ₂ (25mM)	Fermentas
Taq+KCl Tamponu	Fermentas
Taq polimeraz	Fermentas
Betain	Sigma
7-deaza GTP	İnvitrogen
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
Kalsiyum klorür	Merck
Gliserol	Merck
6X yükleme boyası	Fermentas

Çizelge 3.2: (devamı)

RNA Tabanlı Tekniklerde Kullanılan Kimyasallar	
RNA Safılaştırma Kiti	Thermo Scientific
Reverse Transkriptaz Enzimi	Biolab
Dietil pirokarbonat (≥97%) (DEPC)	Sigma
SYBR® Green PCR Master Karışımı	Sigma
4-Morfolin propan sulfonik asit (MOPS)	Merck
Formaldehit (36.5-38% in H ₂ O)	Sigma
2-Mercaptoethanol (≥99.0%)	Sigma
Protein Tabanlı Tekniklerde Kullanılan Kimyasallar	
Etilendiamintetraasetik asit	Sigma
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Biorad
Trizma	Sigma
Amonyum persülfat	Merck
Borik Asit (≥99.5%)	Sigma
0,45 µm Polivinilidin diflorür (PVDF) Membran	Merck Millipore
Bcl-2 Antikoru	Santa Cruz
Beta-Aktin Antikoru	Abcam

Çizelge 3.2: (devamı)

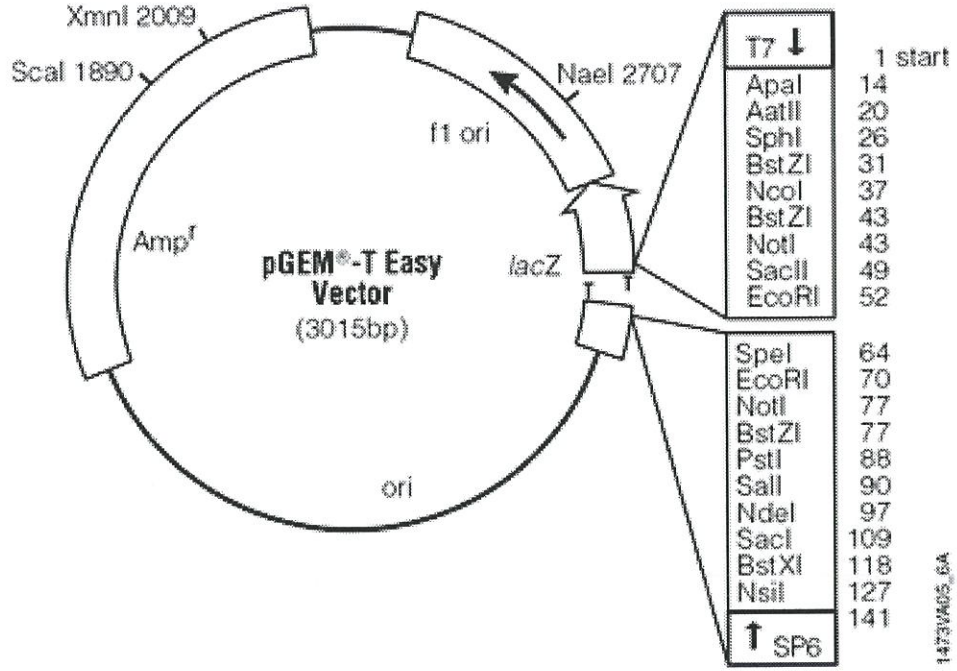
Sekonder antikor (tavşan karşıtı) ve (fare karşıtı)	Santa Cruz
Proteaz inhibitör tabletleri	Roche26
10-180 kDa arası Protein İşaretleyici (26617)	Thermo Scientific
Pierce™ ECL Western Blot Çözeltisi	Thermo Scientific

3.1.3 Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Vektörler

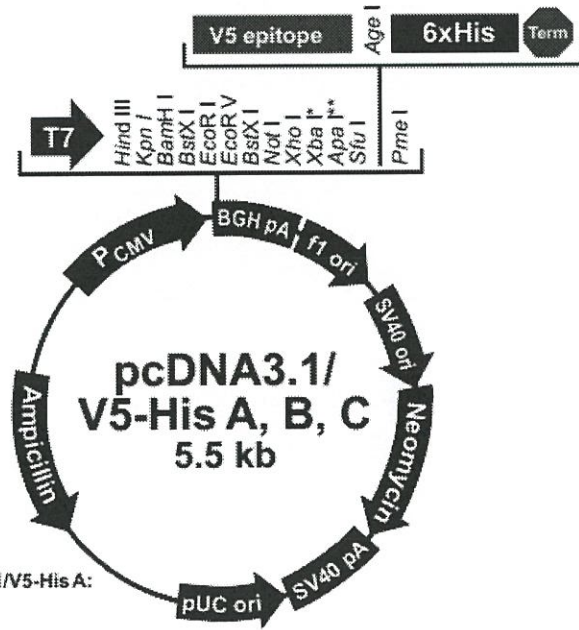
Klonlama çalışmalarında kullanılan vektörler ve satın alındıkları firmaların isimleri Çizelge 3.3 ile belirtilmiştir. Ayrıca, Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 ile vektör haritaları gösterilmiştir.

Çizelge 3.3: Klonlama çalışmalarında kullanılan vektörler

Vektör	Firma
pGEMT®easy	Promega
pcDNA™3.1/V5/HisB	Life Technologies



Şekil 3.1: pGEM-T Easy vektörüne ait harita



Şekil 3.2: pcDNA3.1/V5/HisB vektörüne ait harita

3.2 Yöntem

Bu bölümde seçilen kanser hücrelerinin kültür çalışmalarında kullanılan protokoller, alt kültür basamakları, dondurulması ve saklanması, gerektiğinde çözülme aşamasındaki protokoller, enzim / ilaç öncüllerinin hazırlanması ve *in vitro* uygulanması, enzimi içeren genin klonlanması, tüm bu uygulamaların hücreler üzerinde oluşturduğu ölüm mekanizmalarının belirlenmesi, metastatik etkilerinin belirlenmesi ve intihar gen tedavisi potansiyelinin araştırılmasındaki kullanımı anlatılmıştır.

3.2.1 Hücre Kültürü ve Nitro Gruplu Bileşiklerin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

3.2.1.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

Hücre kültürü deneyleri sırasında çalışmada kullanılan hücre hatları için ortam olarak ticari olarak alınan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanıldı. Bu besiyeri bazı hücre hatları için yüksek Glukoz içerirken, bazı hücre hatları için de düşük Glukoz içermektedir. Ayrıca her iki besiyerinde de yüksek miktarda Glutamin bulunmaktadır. Bu besiyerlerinin içerisine yine seçilen hücre hattına bağlı olarak %5-%10 oranında FCS %10 eklenmiştir.

Hücrelerin büyümesinde etkili olan FCS veya FBS (Fetal Sığır Serumu) hazırlanırken kullanmadan önce 1 saat boyunca 56 °C 'de ısı ile etkisizleştirildi. Etkisizleştirildikten sonra eğer filtreliyse kullanıma devam edildi, eğer filtrelenmeden geldiyse 0,22 µm 'luk filtreden geçirilerek steril edildikten sonra küçük hacimlerde bölünerek -20°C'de kullanılmak üzere muhafaza edildi.

Hücrelerin ortamları uzaklaştırıldıktan sonra yıkamalarda kullanılan PBS hazırlanırken tablet halinde olan 1 adet PBS (Phosphate Buffered Salin)

(Sigma) 100ml suya eklenerek çözüldü ve ardından steril hale gelen PBS kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmalarını sağlayan Tripsin Edta tamponu hazırlanırken % 0,05 hacimde Tripsin ve 0,5 mM hacimde EDTA daha önceden hazırlanan PBS çözeltisine ilave edildi. Ardından otoklavlanarak kullanılmak üzere depo çözeltiler -20°C'de saklandı.

3.2.1.2 Hücrelerin Açılması, Büyütülmesi ve Dondurulması

Hep3B (İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı), PC3(İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı) ve HUVEC (İnsan Sağlıklı Endotelial Hücre Hattı) hücre hatları -80 °C derin dondurucudan alındıktan sonra 37 °C su banyosunda ılıtılarak eritildi. Önceden hazırlanan medyum eklenerek 15 mL falkonlar içerisinde 1000 devir/dk.'da 5 dk süresince çöktürüldü. Hücre peleti % 10 FCS içeren 5 mL DMEM+Glutamin ile çözümlenerek 75 cm²'lik büyük flaslara aktarıldı. Flaslardaki medyum çözeltisi hacmi 15 mL'ye tamamlanarak % 5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de büyümeye bırakıldı.

Büyüyen hücreler ilk olarak 10 mL PBS ile yıkandıktan sonra, 2-3 mL Tripsin- EDTA eklenerek yüzeyden kalkmaları sağlandı. Yeterli süre sonunda Tripsin EDTA'nın üzerine %10 FCS'li DMEM eklenerek Tripsin-EDTA etkisiz hale getirildi. 15 mL'lik falkona ortam alındı ve 1000 devir/dk.'da 5 dk boyunca çöktürüldü. Hücre pelleti üç adet 75 cm²'lik flaska paylaşım üzere tekrar hazırlanan ortam ile çözüldü. Flask hacmi 15 mL'ye ortam ile tamamlandı. Bu pasajlama işleminden sonra hücrelerin pasaj numarası 'pasaj 1' olarak değiştirildi. Deneyler genellikle pasaj sayısı 3'e gelmiş hücre grubuyla yapıldı.

Hücrelerin dondurulması basamağında ise ilk olarak flask içindeki ortam uzaklaştırıldı. Ardından hücreler 10 mL PBS ile yıkandıktan sonra, 2-3 mL Tripsin- EDTA eklenerek yüzeyden kalkmaları sağlandı. Yeterli süre sonunda flask içine 6 mL %10 FCS'li DMEM eklenerek Tripsin-EDTA etkisizleştirildi. Pelet 900 µL FCS ve 100 µL DMSO karışımı ile çözümlenerek ependorf içersine alındı ve bir peçeteye sarılarak dik konumda -80 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.1.3 Nitrolu Bileşiklerin Hazırlanması

TBAG-110T754 ve TBAG-113Z706 nolu projeler kapsamında Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Prof. Dr. Mehmet AY ve ekibi tarafından sentezlenen nitrolu grup içeren maddeler, içerdikleri gruplar ve yapıları göz önünde bulundurularak bu tez kapsamında çalışılmak üzere 20 bileşik olarak belirlenmiştir. Bu nitrolu bileşikler derişimi 15 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözülerek hazırlandı. Depo çözelti yarı yarıya seyreltilerek 75 mM, 39 mM, 18 mM ve 9 mM olacak şekilde 5 farklı derişimde hazırlandı. 150 µM, 75 µM, 39 µM, 18 µM ve 9 µM olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara paylaştırılmış olan hücreler üzerine uygulandı. Ayrıca, tüm bileşikler % 100 DMSO'da çözüldüğü için uygulanan bileşiklerin hacminde (2 µL) DMSO kontrol olarak uygulanmıştır. Çözücü kontrolü ve deney grupları 5 tekrarlı olarak yapılmıştır.

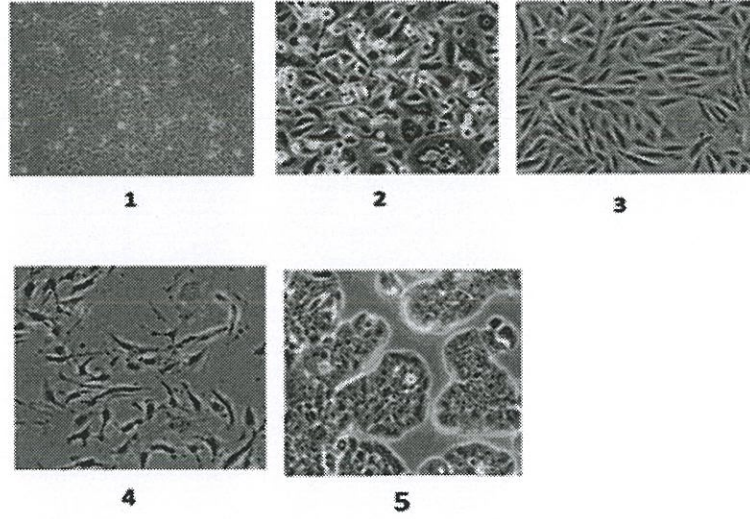
3.2.1.4 Hücrelerin Sayılması ve Deneyin Tasarımı

Pasaj 3' sayısına erişmiş olan ve % 98 flask yüzeyini kaplayan hücreler ortam boşaltıldıktan sonra 10 mL PBS ile yıkandı. 2-3 mL Tripsin EDTA eklenerek 5 dk bekletildi. Yüzeyden kalkan hücreler % 10 FCS'li DMEM içerisinde 15 mL'lik falkonlara aktarıldı ve 1000 devir/dk'da 5 dk süresince çöktürüldü. Pelet % 10 FCS içeren DMEM içerisinde çözüldü. 1,5 mL ependorf içerisine 1:1 oranda tripan mavi boyası ve hücre çözeltisi koyuldu. 5 dakika belettikten sonra hücre sayım lamı (Thoma lamı) kullanılarak sayım işlemi gerçekleştirildi. Tripan mavi boyası sayesinde ölü olan hücreler boyanır ancak canlı olanlar boyanmadan kalır. Boyanmamış olan hücrelerin sayılması ile 1 mL'deki hücre miktarı hesaplanır. [1mL'de bulunan hücre sayısı = Hücre sayısı $\times 2 \times 10^4$] formülüyle belirlendi. 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına hücre sayısı 50.000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı ve kuyucuk hacmi 200 µL'ye ortam çözeltisi eklenerek tamamlandı.

3.2.1.5 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Bu çalışmada kullanılan Hep3B (İnsan Hepatosellüler Karsinomu) hücre hattı ve Saos-2 (İnsan Kemik Karsinomu) Cardiff Üniversitesi Dr.

Ramji'den sağlanmıştır. PC3 (İnsan Prostat Karsinomu) hücreleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünden Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz'dan sağlandı. HT-29 (İnsan Kolorektal Adenokarsinom Hücreleri) ise Yeditepe Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Kullanılan bütün hücre hatları (Hep3B, PC3, HT-29, HUVEC, Saos-2) 75 cm² 'lik flasklarda, içerisinde 0,2 mM hacimde L- Glutamine ve %10 hacimde FCS ihtiva eden 15mL DMEM medyumunda hücrelerin büyümeleri takip edilerek yapılan pasajlamalar ile üretilmiştir.

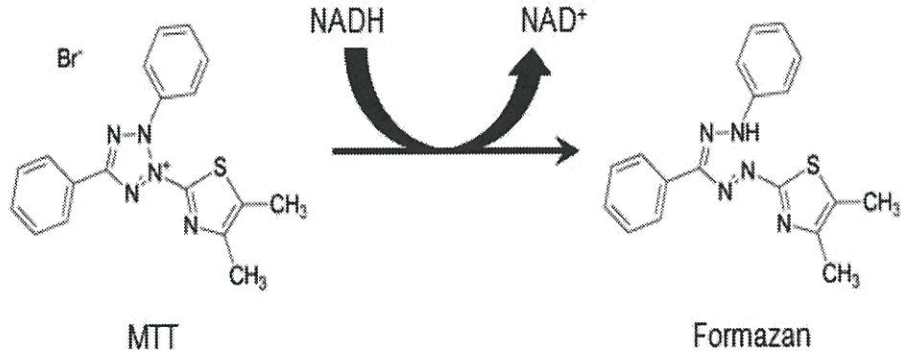


Şekil 3.3: Nitro gruplu bileşiklerin etkilerini belirlemek amacıyla kullanılan hücre hatlarının mikroskop görüntüleri

(1) Hep3B (İnsan Karaciğer Karsinomu), 2) PC3 (İnsan Prostat Karsinomu), 3) Saos-2 (İnsan Kemik Karsinomu), 4) HUVEC (İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre), 5) HT-29 (İnsan Kolon Karsinomu))

3.2.1.6 MTT Yöntemi

MTT; hücre canlılığı, çoğalması ve sitotoksisite ölçümü amacıyla kullanılan nicel olarak görülebilen renk değişimine dayanan bir yöntemdir. Bu metotta canlılığı devam eden hücrelerin bir tetrazolium tuzu olan MTT 'yi formazan kristali haline dönüştürmesi esasına dayanır.



Şekil 3.4: MTT tuzunun formazan kristaline dönüşümü

İlaç öncü maddeler 150 μ M, 75 μ M, 39 μ M, 18 μ M ve 9 μ M olmak üzere 5 farklı derişimde Hep3B, HT-29, Saos-2, PC3 ve HUVEC hücre hatlarına 3 tekrarlı olarak uygulandı. 24 ve 48 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildikten sonra hazırlanmış olan MTT çözeltisi 20 μ L olarak kuyucuklara uygulandı ve 4 saat boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. 4 saat sonrasında önce medyum uzaklaştırıldı, sonrasında % 0,004 M HCl içeren izopropanol çözeltisinde kristaller çözülerek 550 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu plaka okuyan spektrofotometrede ölçümler alındı. Sonuçların analizinde ve grafiklendirilmesinde Microsoft Excel programı kullanıldı [72].

Çizelge 3.4: MTT testinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Çözeltilinin Adı	Hazırlanışı
MTT çözeltisi	Liyofilize olarak ticari alınan MTT 0,25 g tartılıp, 50 mL steril PBS içinde çözülür. +4 °C'de ve ışık almadan saklanır.
0,004 M HCl ihtiva eden izopropanol	500 mL izopropanolden (2- Propanol) 210 μ L çekilir ve ardından 210 μ L HCl içerisine eklenir ve oda sıcaklığında saklanır.

3.2.1.7 Reaksiyon Deneyleri ve SRB yöntemi

Hücre dışı reaksiyon denemelerinde kullanılan bir yöntem olan SRB metodunda hem nitrolu bileşikler hem de kontrol grubu olarak CB1954 ile deneyler yapılmıştır. Nitrolu bileşikler Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Prof. Dr. Mehmet AY ve ekibinden ve CB1954 bileşiği ise Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Dr. Ayhan ÇELİK'ten temin edilmiştir. Bu metotta kullanılan SRB boyası bazik protein aminoasit dizilerine elektrostatik ve pH bağımlı olarak bağlanır. TCA (Trikloro asetik asit) ile bağlanmış hücrelere asidik koşullar altında SRB bağlanır. Hücre sayısına bağlı olarak toplam protein değerini verir [73]. İlaç etkisi denemelerinde duyarlı ve uygun bir yöntemdir. SRB deneyi MTT'ye seçenek olarak denendi. MTT tekniği NADH bağımlı olduğu için reaksiyon deneylerinde ortama eklenen NADH substratı dolayısıyla elde edilen verilerde sorun teşkil etmekteydi. Bu nedenle reaksiyon denemelerinde SRB metodu kullanılmıştır.

Reaksiyon deneylerinde kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.5' de verildiği gibidir. CB1954 ticari ilaç adayı için reaksiyon deneyi planı ise Çizelge 3.6 'de verildiği gibidir. 96 Kuyucuklu plakalara paylaştırılmış olan hücreler üzerine hazırlanan olan karışım (100 µL) uygulandı. 24, 48 ve 72 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinden sonra SRB protokolü gereği, kuyucuklara 25 µL % 50 soğuk TCA hücrelere eklenerek 1 saat +4 °C'de bekletildi. Kuyucuklar 4 defa distile su ile yıkandı ve plakanın açık havada kuruması sağlandı. 50 µL % 0,4 SRB boyası eklendi ve yarım saat oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda kuyucuklar % 1 asetik asit ile yıkandı. Bağlanmamış fazlalık boya uzaklaştırıldı ve plaka açık havada kurumaya bırakıldı. Proteinlere bağlanmış boyayı çözmek için 10mM Tris-HCl çözeltisinden her kuyuya 100 µL ilave edildi. Tamamen çözünme gerçekleşinceye kadar çalkalayıcıda inkübe edildi. 492 nm dalga boyunda ölçüm alındı. Hücre sayısı çalışılan hücreye göre değişmektedir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda Hep3B hücreleri için 30.000 hücre sayısı yeterli olurken, HUVEC ve PC3 hücreleri 10.000 hücre sayısı ile en uygun hale getirildi [21].

Çizelge 3.5: Bileşikler için oluşturulan reaksiyon deney planı

Bileşenler	Depo çözelti	Reaksiyon	Kontrol 1	Kontrol 2	Son Derişim
Tampon	25 mM Tris/HCl	68	98	78	
Substrat	15 mM	2	2	2	150 µM
Ssap-NtrB	0,31 mg/mL	20	-	20	31 µg/mL
NADH	12 mM	10	-	-	600 µM
Toplam	µL	100	100	100	

Çizelge 3.6: CB1954 Ticari ilaç adayı için oluşturulan reaksiyon deney planı

Bileşenler	Depo çözelti	Reaksiyon	Kontrol 1	Kontrol2	Son Derişim
Tampon	25 mM Tris/HCl	53	98	68	
Substrat	15 mM	2	2	2	150 µM
Ssap-NtrB	0,31 mg/mL	30	-	30	31 µg/mL
NADH	12 mM	15	-	-	600 µM
Toplam	µL	100	100	100	

% 50 inhibisyon değerinin hesaplanabilmesi için reaksiyon deneylerinde kullanılan substrat 150, 39 ve 9 μM olacak Şekilde 3 farklı derişimde uygulanmış ve Ssap-NTR enziminin zararsız olduğu daha önceki çalışmalarda teyit edildiği için sadece Kontrol 1 adı altında sadece substratın toksisitesi çalışılmıştır.

Ayrıca elde edilen veriler doğrultusunda reaksiyon deneylerinin daha düşük derişimlerde hazırlanmasına karar verilerek substrat 180 μM , 18 μM ve 1,8 μM olarak uygulanmıştır. % 50 inhibisyon değeri Origin Pro 8.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.2 Klonlama ile İlgili Teknikler

3.2.2.1 Ssap-NtrB geninin biyoinformatik analizi ve primer tasarımı

Ssap-NtrB genine ait nükleotit dizisinin NCBI'dan taraması yapıldı. Genin ekzon ve intronlarını gösteren kısımlar açılarak iki ekzon arasına bir intron girecek Şekilde ileri ve geri primerleri tasarlandı. Primerlerin iki ucuna istenilen enzim bölgeleri eklendi. Primerlerin TM'si birbirine yakın olarak ayarlandı. Primerler tasarlandıktan sonra NCBI'dan primer blast ve nükleotit blast ile analiz edildi.

3.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile genin çoğaltılması

oğaltılması istenen bölgeye özgü olarak tasarlanan primerler liyofilize olduğundan steril Şartlarda belirtilen miktarda su ilavesi ile derişimi 100 ng/ μL olacak Şekilde sulandırıldı. Bu primerler kullanılarak izelge 3.7 belirtildiği gibi bir karışım hazırlandı. Ayrıca kullanılan dNTP karışımının hazırlanışı izelge 3.14 ile anlatılmıştır. Kullanılan PCR koşulları da izelge 3.8 ile gösterilmiştir. PCR sonrasında Bölüm 3.2.4.1.6 ' da anlatıldığı gibi ürünler yürütülmüştür.

Çizelge 3.7: Gen çoğaltmada kullanılan PCR koşulları

Plazmit DNA	3 µL
Ssap-NtrB İleri Primer	1 µL
Ssap-NtrB Geri Primer	1 µL
10 X Taq Tamponu	5 µL
Taq polimeraz enzimi (5 U/µL)	0,5 µL
dNTP	1 µL
MgCl ₂	4 µL
dH ₂ O	34,5 µL
Toplam Hacim :	50 µL

Çizelge 3.8: Klonlama PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Süre
1	94	1	3 dk
2	94	35	1 dk
	58-60		45 sn
	72		1 dk
3	72	1	10 dk

3.2.2.3 Jelden DNA'nın geri kazanımı

Jelden geri kazanım Thermo marka kitin önerdiği koşullar gözönünde bulundurularak gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak PCR ürünlerinin yüklendiği agaroz jelde bulunan DNA parçacıkları uzun süreli UV ışık altında bekletilmeden bir bıçak yardımıyla kesilerek önceden ağırlıkları tartılan ependorflara alındı. Dara hesabı yapıldıktan sonra ortaya çıkan jel miktarına uygun miktarda bağlanma tamponu ependorflardaki jellerin üzerine konuldu. Bu ependorflar 55°C-65°C arasında erimeye bırakıldı. Tamamen eridiği kontrol edildikten sonra kit kolonuna 700 µL'si yüklendi ve 1 dk 13.500 rpm' de santrifüj edildi. Alt kısma geçen süzüntü atıldı, geriye kalan erimiş jel çözeltisi bitenen kadar kolona yüklenip santrifüj yapılmaya devam edildi. Kolona 500 µL yıkama tamponu ilave edilip, 1 dk boyunca santrifüj yapıldı. Aynı işlem kolona madde eklemeyen, etanol kalıntısından kurtulmak için tekrarlandı. Kolon yeni bir ependorfa alınıp, üzerine önceden ısıtılan sudan 35-40 µL eklendi. Son santrifüj ile jelden geri kazanım tamamlanmış oldu.

3.2.2.4 Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

Jelden geri kazanım ile elde edilen plazmit ve vektör, primer tasarımı sırasında seçilen uygun enzimlerle kesildi.

Çizelge 3.9: Restriksiyon kesim koşulları

Plazmit Kesimi		Vektör Kesimi	
Plazmit	25 µL	Vektör	10 µL
KpnI	1 µL	KpnI	1 µL
Apal	1 µL	Apal	1 µL
Tampon	5 µL	Tampon	5 µL
dH ₂ O	17 µL	dH ₂ O	33 µL

3.2.2.5 Ligasyon

Restriksiyon kesimi sonunda elde edilen plazmitin, vektöre klonlama işlemi ligasyon basamağı ile sağlandı (Çizelge 3.10). Deney sırasında kullanılan T4 Ligaz enziminin protokolüne uygun koşullarda gerçekleştirildi.

Çizelge 3.10: Ligasyon koşulları

Ürün	Miktar
Vektör	3 µL
Plazmit	23 µL
T4 DNA Ligaz enzimi	1 µL
Tampon	3 µL
Son hacim	30 µL

3.2.2.6 Transformasyon Öncesi Hazırlıklar

Transformasyon sırasında kullanılmak için seçilen vektörün taşıdığı antibiyotik direnç genine uygun şekilde antibiyotikli besi yeri hazırlandı. Bu amaçla Difco Luria agar önerdiği miktarda damıtık su ile çözüldü ve otoklavda steril hale getirildi. Önceden ayarlanan su banyosunda 45°C'ye kadar soğuduktan sonra ampisilin stokundan eklendi. Homojen karışımı sağlandıktan sonra bek alevinin yanında petrilere döküldü ve polimer hale gelmesi beklendi. Ters çevrilip parafilmlelendikten sonra +4 °C buzdolabına kaldırıldı.

Sıvı besi yeri hazırlanırken yine üretici firmanın belirttiği miktarda besi yeri tartılarak dH₂O'da çözüldü ve otoklavlandı.

Transformasyonda kullanılacak bakteri soyunun hazır hale getirilmesi için XL1Blue hücreleri hazırlanan LB sıvı besi yerine ekildi ve 16 saat inkübe edildi. Hazırlanan bu ön kültürden 100 mL sıvı besiyerine aşılama yapıldı ve OD₆₀₀ değerinin 0,5-0,6 aralığına ulaşması sürekli ölçümler ile takip edildi. Yeterli değere ulaşan bakteri süspansiyonu soğutmalı santrifüjde 3000 rpm'de 5 dk süresince santrifüjlendi. Supernatant kısım uzaklaştırılıp, kalan kısım 0,1 M CaCl₂ ile sakince bir pipetleme ile çözüldü. Çözülen karışım 30 dk buz üzerinde bekletildi. 3000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendi. Kalan pellet yine CaCl₂ ile çözülerek yaklaşık 4 saat boyunca buz üzerinde bekletildikten sonra 1/1 hacimde % 40'lık gliserol eklenerek ependorflara paylaştırıldı. Kullanıma hazır hale gelen bakteriler -80 °C 'de saklandı.

3.2.2.7 Transformasyon

Hazırlanan XL1Blue soyuna ait kompetant hücreler buza alınarak çözülmesi beklendi. 200 µL kompetant hücrenin üzerine, ligasyon ürününe 10 µL eklendi ve buz üzerinde 40 dk boyunca dokunmadan inkübasyona bırakıldı. Bu sırada su banyosu 42 °C'ye ayarlandı. 40 dakikanın sonunda hücrelere ısı şoku uygulandı. Bu amaçla önce 2 dakika 42 °C su banyosunda, ardından hiç beklemeden 2 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından oda sıcaklığındaki sıvı besi yeri son hacim 1000 µL olacak şekilde ilave edildi. 2 saat boyunca 37 °C çalkalamalı inkübatörde bırakıldıktan sonra 5000 rpm'de 5dk santrifüj yapıldı. Elde edilen pellet 100 µL LB sıvı besi yeri ile çözülüp, önceden hazırlanan katı besi yerine yayıldı. İyice ekilen kültürü emmesi beklendikten sonra ters çevrilerek 37 °C'de 16 saat boyunca inkübasyona konuldu. Ertesi gün oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığı, bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıp kurulan restriksiyon endonükleaz kesimi sonrasında belirlendi.

3.2.2.8 Plazmit İzolasyonu

Tek koloniden ekilerek bir gece inkübe edilen ön kültürden öncelikle gliserol stok hazırlandı. Bunun için % 40'lık gliserol çözeltisinden önkültür ile eşit hacimde ependorflara aktarıldı. Oluşan stoklar -80 °C'de saklandı.

Geriye kalan kültür 10000 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet kitin önerdiği şekilde sırasıyla resüspansiyon, lizis ve nötralizasyon tamponları eklenerek çözüldü. 13500 rpm'de 5 dk boyunca yapılan santrifüjden sonra elde edilen süpernatant kolona yüklendi. Ardından yıkama basamakları gerçekleştirildi. Son olarak kolon yeni bir ependorfa aktarılarak, oda sıcaklığında bekletilen ılık su ile 40 µL ile elüsyonu alındı.

Transfeksiyon deneylerinde ise endotoksin olmayan, daha yüksek derişimde ve daha saf olan plazmit DNA'nın saflaştırılarak izole edilmesinde ise büyük ölçekli plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Protokol Thermo maxiprep kitinin™ önermiş olduğu haliyle yapıldı.

3.2.2.9 Kalsiyum – Fosfat Çöktürmesi ile Geçici Transfeksiyon

25 cm² lik küçük flaslara 2.000.000 hücre olacak şekilde paylaştırılan Hep3B hücrelerine uygulanacak olan, klonlaması Bölüm 3.2.2 ile anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen Ssap-NtrB genine ait DNA ve 2 M'lık CaCl₂ uygun miktarlarda bir ependorfta hazırlandı. Ardından pastör pipeti ile baloncuklar yapılarak 2 X Hapes tamponu mikropipet yardımıyla damla damla eklendi. Oluşan bu karışım gerekli çökeltmenin olması için yarım saat hiç yerinden oynatmadan oda sıcaklığında bekletildi. Yarım saatin sonunda oluşan DNA : Kalsiyum fosfat çökeltisi flaslara mikropipet ile damlalar haline eklendi. Yavaşça bir rotasyon yapıldıktan sonra inkübatöre kaldırıldı. 6 saatin sonunda medyum değişimi yapıldı.

3.2.2.10 İlaç Öncüllerinin Hücre İçi Etkinliğinin Belirlenmesi

Klonlanan Ssap-NtrB geni ile daha önceden ilaç öncülü olabilme adayı olarak belirlenen bazı bileşikler transfeksiyonun ardından Hep3B hücrelerine uygulandı. Bunun için transfeksiyondan 24 saat geçtikten sonra tripsinizasyon ile flaslardan ayrılan hücreler sayıldı ve 96 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı. Ardından üzerilerine ilaç öncüllerinden ve kontrol maddesi olan CB1954'ten 2 µL eklendi. Sonuçlar SRB yöntemiyle değerlendirildi.

3.2.3 Metastatik Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.3.1 Yaralanma Deneyi

Zehirli olan bileşiklerin yara kapatmasının gözlenmesi için Hep3B hücreleri 12 kuyucuklu plakalara 250.000 hücre / kuyucuk olacak şekilde paylaştırıldı. 24 saat hücrelerin tutunması ve tüm yüzeyi kaplaması beklendikten sonra %50 inhibisyon değerlerine uygun miktarda ilaç öncülü uygulandı. Kontrol grubuna sadece DMSO uygulandı. Kuyucuklara 10 µL pipet yardımıyla artı şeklinde çizikler yapıldı.

İlk uygulama anı (0. Saat) görüntülendi. Sonrasında ise hücrelerin aradaki çizik alana doğru hücre göç hızının hesaplanabilmesi için 3.saat, 6. saat ve 24. saatlerde kuyucuklar Nikon marka mikroskop ile görüntülendi. Sonuçlar Imaje J programı ve MRI Wound Healing Tool eklentisi kullanılarak analiz edildi.

3.2.3.2 Koloni Oluşum Deneyi

Hep3B hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 2000 hücre olacak şekilde bölündü. Bir gece inkübatörde beklendikten sonra %50 inhibisyon değerlerine uygun miktarda ilaç öncülü uygulandı. Bu uygulamadan sonra hücrelerin büyümesi mikroskop ile takip edildi. 10 gün sonra deney sonucu alınacak hale gelen hücrelerin medyumları uzaklaştırıldı. PBS ile yıkandıktan sonra, koloniler 5 dk boyunca Kristal Viyole ile boyandı. Saf su ile 5 dk süren 3 yıkamadan sonra görüntülemeleri yapıldı. Analizleri için ise kolonilerin sayılmasını sağlayan bir program olan ClonoCounter kullanıldı. Kuyucuklardaki tüm alana ait hücre sayıları belirlendikten sonra sonuçlar Microsoft Excel programı ile grafiklendirildi [2].

3.2.4 Ölüm Mekanizmalarının Moleküler Düzeyde Belirlenmesi

3.2.4.1 mRNA seviyesinin belirlenmesi

3.2.4.1.1 RNA izolasyonu

İlaç öncü madde uygulanmış hücrelerden mRNA düzeyinde gen ifadesini belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için, Hep3B hücreleri madde uygulandıktan 48 saat sonunda tripsinizasyonla kaldırıldı. Elde edilen peletten Fermentas RNA saflaştırma kitinin önerdiğine uygun olarak RNA saflaştırılması yapıldı. Kitin basamakları ise aşağıda anlatıldığı gibidir.

RNA saflaştırmasına başlamadan önce lizis tampon içerisine β -merkaptotanol veya DTT eklenmesi gerekmektedir. 1 mL lizis tamponu için 20 μ L 14,3 M β -merkaptotanol veya 2 M DTT eklendi. Pellet halindeki hücrelerin üzerine her bir örnek için 600 μ L Lizis tamponu eklendi ve 10 s vorteks yapıldı. Daha sonra 360 μ L etanol (% 96-100) eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı. Kullanılacak kolonlar hazırlandı. Kitin önerdiğine uygun olarak maksimum 700 μ L elde edilen lizattan kolona aktarıldı. 1 dk boyunca 13.500 devir/dk'da çöktürüldü. Kolonun altına geçen çökelti atıldı. Kolona geride kalan bütün lizat bitene kadar örnekler çöktürülmeye devam edildi. Ardından kolon etanolden uzaklaşmak için, 2 mL'lik yeni ependorfa yerleştirildi. Kolonun üzerine 700 μ L yıkama tamponu-1 eklendi. 1 dk 13.500 devir/dk'da santrifüj yapıldı. Kolonun alt kısmına geçen çökelti atıldı. 600 μ L yıkama tamponu-2 eklendi. Yine 1 dk süresince 13.500 devir/dk'da santrifüj yapıldı ve çökelti atıldı. 250 μ L yıkama tampon-2 eklendi ve bu kez 13.500 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Kalan etanolün uzaklaştırılması için hiçbir çözelti eklenmeden ependorflar ilave 1 dk 13.500 devir/dk'da santrifüjlendi. Kolon yeni bir ependorf içerisine alındı. Önceden oda ısısına getirilmiş 35-40 μ L damıtık dH_2O eklenerek 2 dk inkübasyona bırakıldı. 13.500 devir/dk'da 1 dk santrifüj yapıldı. Elüsyonları alınan RNA'lar oda ısısında beklemeden buza alındı. RNA'lar daha sonraki çalışmalarda kullanmak üzere -80 °C dolaba kaldırıldı.

3.2.4.1.2 RNA miktarının ölçülmesi

İzole edilen RNA'ların miktarının ölçümünde Thermo MultiskanGo μ Drop™ Plate Reader kullanıldı. Bunun için her bir RNA örneğinden 2 μ L alındı ve kör olarak 2 μ L damıtık dH₂O konularak ölçüm yapıldı. RNA derişimi hesaplanırken aşağıda bulunan formül kullanıldı. Normal küvette ışık yolu 10 mm kabul edilirken, daha küçük hacimin sahip olduğu alanın daha az olması sebebiyle microdrop'ta ışık yolu 0,49 mm'dir. Microdrop cihazına 2 μ 'lik DNA/RNA örneği direk seyreltilmeden konulur. Işık yolunun daha kısa olması sebebiyle derişim hesabı yapılırken şu formül kullanılır:

$$\text{RNA derişimi } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times (10 \text{ mm}/0,49 \text{ mm})$$

3.2.4.1.3 RNA Jel elektroforezi

İzolasyonları yapılan RNA örnekleri ile çalışmadan önce, kullanılacak olan cam malzemeler, elektroforez tankı ve su RNaz enziminden arındırıldı. Bunun için ilk olarak tüm deneylerde kullanılacak su, 1 mL Dietilpirokarbonat (DEPC) içerecek şekilde 1000 mL olarak hazırlandı. 37°C'de 12 saat bekledikten sonra, 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Elde edilen % 0,1'lik DEPC'li su içerisinde tüm cam malzemeler 12 saat bekletilip, otoklavlandı. Yürütmede kullanılacak olan elektroforez tankı ise % 0,5 'lik SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi ile muamele edildi. Ardından içerisinde RNaz bulunmayan su ile arındırıldı. En son olarak saf etanolden geçirilip, oda ısısında kurumaya bırakıldı.

RNA Jeli yaparken 0,5 g agaroz tartılıp Çizelge 3.11' de belirtildiği şekliyle hazırlanan 10X FA tampondan 5 mL alınarak çözüldü. DEPC'li su ile son hacim 50 mL'ye tamamlandıktan sonra kaynatıldı. Buharlaşma bitip, 50 °C'ye gelene kadar beklendikten sonra içerisine 900 μ L % 37'lik (12,3 M) formaldehit eklendi. 10 mg/mL Etidyum Bromür stok solüsyonundan 1 μ L eklendi ve kasete istenen taraklar yerleştirilip hazırlanan jel dökülerek polimerleşmeye bırakıldı.

Jel polimerleşirken kullanılacak olan RNA örneklerinden 3 µL ve 3 µL 2X yükleme boyasına ısı şoku uygulandı. Bunun için ilk olarak 70 °C'ye getirilmiş su banyosunda 10 dk boyunca tutularak denatüre olması sağlanır ardından örnekler 10 dk boyunca buzda bekletilir. Yüklemeye hazır hale gelen örnekler polimerleşen jele yüklenip, 1X FA tampon içeren tankta 80 V'ta 30dk yürütüldü.

Çizelge 3.11: Formaldehit İçeren Agaroz Jel Elektroforez tampon hazırlanması

10X FA jel tamponu	Depo Solüsyon	10X için son derişim
MOPS (pH: 7)	1 M	0,2 M
EDTA (pH: 8)	0,5 M	0,05 M
NaAc	1 M	0,01 M

Son hacmi 1litre olacak şekilde DEPC içeren su ile karıştırılıp pH'ı 7'ye ayarlanıp, sterilizasyonu otoklavda yapıldı.

3.2.4.1.4 Ters Transkriptaz (RT)-Reaksiyonu

İzole edilip ölçümü yapılan RNA'lar kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu işlem 2 basamak halinde yapılmış olup, Çizelge 3.12 ile deney koşulları gösterilmiştir.

Çizelge 3.12: cDNA eldesinde kullanılan koşullar ve deney planı

I. Basamak		
Kalıp RNA	(1 µg/mL)	70 °C 'de 5 dk. ön inkübasyon
OligodT primeri (200 pmol)	1 µL	
dH ₂ O	Son hacim 12,5 µL	
II. Basamak		
5X Reaksiyon Tamponu	4 µL	5 dk 25 °C, 60 dk 42 °C ve 5 dk 70 °C'de inkübasyon
25 U/µL Ribolock inhibitör stoktan 5 µL (20 U/mL)	0,5 µL	
10 mM dNTP karışım stoğundan	2 µL (1 mM)	
Reverse transkriptaz enzimi	1 µL	
Son Hacim	20 µL	

Hazırlanan cDNA'lar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C de saklandı.

3.2.4.1.5 Yarı nicel RT-PCR

İlaç öncül maddeler uygulanarak elde edilen kalıp cDNA'lar kullanılarak Ssap-NtrB genine ait sentezlenen primerler (Çizelge 3.15) ve kontrol amaçlı

olarak kullanılan normalizasyon primerleri (Çizelge 3.16) kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.13: PCR bileşenleri ve kullanım miktarları

PCR bileşenleri	Derişim
cDNA	1 µg
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM
10X Taq polimeraz tamponu	1 X
dNTP karışımı	0,2 mM
İleri primer (100 ng/µL)	2 ng/µL
Geri primer (100 ng/µL)	2 ng/µL
Taq DNA polimeraz enzimi (5 U/ µL)	0.05 U/ µL
dH ₂ O	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Çizelge 3.14: dNTP karışımının hazırlanma koşulları

Malzemenin Adı	Hazırlanışı
dNTP karışımı (10 mM)	10 µL her bir nükleotitten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) alındıktan sonra steril dH ₂ O eklenerek son hacim 100 µL'ye tamamlanır.

Çizelge 3.15: Ssap- NtrB genine ait özgü primer dizileri

	Nükleotit Dizisi	Elle TM (°C)
Ssap-NtrB İleri Primer	5'AAGGTACCACCATGATAAATAATAATTTTGA3'	62
Ssap-NtrB Geri Primer	5'-TTGGGCCCTCAACGTATTTAGTCACA-3'	58

Çizelge 3.16: Normalizasyon primerine ait bilgiler

	Nükleotit Dizisi	Baz çifti
İnsan β-mikroglobulin İleri Primer	5' TTT CTG GCC TGG AGG CTA TC 3'	315
İnsan β-mikroglobulin Geri Primer	5' CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC T 3'	315

PCR bileşenleri uygun koşullarda hazırlandıktan sonra program 3 basamak halinde gerçekleştirildi. Bu koşullar Çizelge 3.17 ile belirtilmiştir.

Çizelge 3.17: PCR deney koşulları

Basamak Adı	Süre	Sıcaklık	Döngü Sayısı
Denatürasyon	3 dakika	94 °C	1
Bağlanma	1 dakika	94 °C	X 35
	30 saniye	58 °C	
	30 saniye	72 °C	
Uzama	10 dakika	72 °C	1

3.2.4.1.6 % 1 'lik Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'yı jelde görüntülemek için % 1 lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla çalışmamıza uygun olarak seçilen jel elektroforez kasetinin hacmine uygun olacak şekilde Agaroz tartıldı. Tartılan agaroz 0,5X TBE tamponunda çözüldü ve kaynatıldı. Oda sıcaklığına kadar ılınması beklenip 2-3 µL Et-Br dikkatlice ilave edildi. Etidyum bromür homojen dağıldıktan sonra lastikleri ve tarakları takılan jel kasetine döküldü.

Jelin polimerleşmesinin ardından taraklar ve lastikler çıkartılarak tankın içine yerleştirildi. Tank yeterli seviyeye kadar 0,5X TBE tamponu ile dolduruldu. Örnekler DNA yükleme boyası ile boyandıktan sonra kuyucuklara yüklendi. 90 V akımda 40 dakika boyunca yürütüldü ve görüntüldü. Jel elektroforezi sırasında kullanılan solüsyonlar Çizelge 3.18 ile belirtilmiştir.

Çizelge 3.18: DNA agaroz jel elektroforezi sırasında kullanılan kimyasallar

Malzeme Adı	Hazırlanışı
DNA marker	50 µL DNA marker, 100 µL DNA yükleme boyası ve 100 µL steril dH ₂ O ile homojen olarak karıştırıldı.
5 X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Tamponu	Tris Base, Borik Asit ve EDTA tartılarak son hacim 1L'ye tamamlandı. Otoklavlanarak sterilizasyonu sağlandı.
0.5 X TBE Tamponu	Hazırlanan 5 X TBE tamponu 10 kat sulandırıldı. pH'sı ayarlandıktan sonra otoklavlandı.
Etidyum Bromür Stok Çözeltisi	Son derişimi 10 µg/µL olacak şekilde tartıldı ve dH ₂ O ile çözüldü. Işık almayan şişede +4°C' de saklandı.

3.2.4.1.7 qRT-PCR (Nicel Gerçek Zaman (Quantitative Real Time) PCR)

Gerçek zaman PCR çalışmaları için 5 µL SYBR® Green PCR karışım çözeltisi, 1 µL ilaç öncüllerinden elde edilen cDNA, seyreltme sonucu elde edilen 100 ng/µL 'lik ileri ve geri primerlerden 0,5'er µL alınır. Son hacim 10 µL'ye dH₂O ile tamamlandı. Sonuçların değerlendirilmesinde Livak yöntemi kullanıldı. Deney planı her bir cDNA üç tekrarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu amaçla seçilen gene ait primerleri ve normalizasyon (internal kontrol) insan β-2-mikroglobulin primerleri ile çalışıldı (Çizelge 3.16). Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. İnternal kontrol genin Ct ortalamasından çalışılan genin Ct ortalaması çıkarıldığında elde edilen değer 2 'nin üssü olacak şekilde kuvveti alındı. Önceden elde edilen kontrol grubu kendine bölündü ve 1 sayısına ulaşıldı. Daha sonra ilgili saatte çalışılan deney sonucu kontrol değerine bölündü ve 1 'in katı şeklinde sonuçlar elde edildi ve bu sonuçlar kullanılarak sütun grafiği çizildi.

Çizelge 3.19: qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerler ve dizileri listesi

Primer Adı	Dizisi
Bcl-XL	İleri: 5'-GATCCCCATGGCAGCAGTAAAGCAAG-3' Geri: 5'-CCCCATCCCGGAAGAGTTCATTCACT-3'
BAK	İleri: 5'-ACC AGC CTG TTT GAG AGT GG-3' Geri: 5'- AGT GAT GCA GCA TGA AGT CG-3'
Bax	İleri: 5-'TTT GCT TCA GGG TTT CAT CC-3' Geri: 5'-TCC TCT GCA GCT CCA TGT TA-3'
HB2	İleri: 5'TTTCTGGCCTGGAGGCTATC -3' Geri: 5'CATGTCTCCATCCCCTTAACT- 3'

3.2.4.2 Protein Seviyesinin Belirlenmesi

3.2.4.2.1 Western Blot Yönteminde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Western Blot deneyleri sırasında kullanılan tüm çözeltiler, hazırlanma şekilleri ve derişimlerine ait bilgiler ile verilmiştir.

Çizelge 3.20: Western Blot yönteminde kullanılan kimyasallar

Madde Adı	İçeriği
RIPA Çözeltisi	Tris-HCl, SDS, EDTA, EGTA, Triton X100, NaCl ve proteaz inhibitörü
Örnek Yükleme Boyası	1,4 g Tris, 4 g SDS, 20 g Sukroz, 4 mg bromfenol mavisini karıştırıldı. pH: 6,8 'e ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL olacak şekilde hazırlandı.
SDS PAGE Ayırma Jeli Çözeltisi	1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8), %10 (k/h) SDS
SDS PAGE Yığıma Jeli Çözeltisi	1 M Tris-HCl (pH: 6,8), %10 (k/h) SDS
SDS PAGE Yürütme Çözeltisi	25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0,1 (k/h) SDS
Uzaklaştırma Çözeltisi	Hacimce %7,5 Asetik Asit, %5 Metanol ve %87,5 damıtık su içeren şekilde hazırlandı.
Transfer Çözeltisi	25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 (h/h) Metanol olacak şekilde hazırlandı.
10X Tris Buffered Saline (10X TBS)	10 mM Tris-HCl ve 20 mM NaCl içerir.
Ponceau Boyası	20 mL saf suya 600 µL glasiyel asetik asit, 0,066 g Ponceau boyası koyuldu ve damıtık su ile son hacim 60 mL yapıldı.

3.2.4.2.2 Yüklenecek Proteinlerin Ön Hazırlığı

İlaç öncülü uygulanan maddelerden elde edilmiş olan protein pelletleri ilk olarak soğuk PBS ile yıkandı. Başlamadan 2 saat önce buz üzerine alınan RIPA solüsyonunun kendiliğinden çözülmesi sağlandı. Deney kurulurken belirlenen hücre sayısına uygun olacak miktarda 500 µL RIPA tamponu ile pellet soğutulmuş ependorfta çözüldü. 45 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu bekleme sırasında birkaç kez hafif pipetaj yapıldı. Süre dolduğunda önceden soğutulan santrifüjde 12.000 g'de 10 dk boyunca çökmesi sağlandı. Dikkatlice alt kısma çöken pelletten ayrılan üst kısım yeni bir ependorfa aktarıldı.

Protein derişimi Qubit (Invitrogen)TM protein miktar tayini kiti ile florimetrik olarak belirlendi. Kitin önerdiğine uygun olarak içinde bulunan protein tamponundan 199 µL ve protein reagenttan 1 µL alınarak bir reaksiyon tamponu oluşturuldu. Cihaza örnekten önce protein standartı okutuldu ve bir standart eğri olması sağlandı. Ardından hazırlanan reaksiyon tamponu ile protein örnekleri 40 kat sulandırılarak son hacmi 200 µL olan karışımlar hazırlandı. Bu karışım 15 dakika boyunca oda ısısında bekletildi ve ardından ölçüm yapıldı.

3.2.4.2.3 SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması, Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Jel hazırlanmasına geçmeden önce elektroforez aparatları, camlar ve taraklar sırasıyla su, etanol (%70 'lik) ve ardından izopropanol çözeltisi ile muamele edildikten sonra temiz bir kurutma kâğıdının üzerinde kurumaya bırakıldı.

Çizelge 3.20 ile gösterdiğimiz miktarlara uygun olarak hazırlanan % 10 'luk ayırma jeli Biorad jel yükleme sistemdeki camlar sıkıştırıldıktan sonra, 1000 µL pipet yardımıyla üstten 2-3 cm boşluk kalacak şekilde dikkatlice döküldü. Yüzeyde hava kabarcığı olmaması için hızlıca %90 'lık izopropanol eklendi. Ardından dökülen jelin polimerleşmesi için 20-30 dk beklendi. Polimerleştikten sonra izopropanol Whatman kağıdı ile uzaklaştırıldı. Sürenin sonunda hazırlanan yığılma jeli de döküldü ve hızlıca 1mm'lik taraklar

yerleştirildi. Önceden miktarı belirlenen protein örnekleri kullanılarak son hacmi 30 µL olan bir karışım hazırlandı. Bu karışıma 7 µL 2X protein yükleme boyası ve 30-50 µg'a karşılık gelecek miktarda protein lizatından koyularak son hacime Yığıma Jeli Tamponu ile tamamlandı. Hazırlanan karışım kuyucuklara yüklendi. 90 V akımda 15 dk yürütüldükten sonra, 120 V akımda Protein Belirtecinin (Thermo 26616) açılma durumu takip edilerek yaklaşık 1,5 saat yürütüldü.

Çizelge 3.21: Ayırma ve yığıma jellerinin hazırlanması

Malzemeler	%10 Ayırma Jeli	Üst Yığıma Jeli
Alt jel (Ayırma) Tamponu	2,5 mL	-
Üst jel (Yığıma) Tamponu	-	1,25 mL
Akrilamit Bisakrilamit (oran : 37:1)	2,5 mL	0,625 mL
ddH ₂ O	5 mL	3,07 mL
%10 Amonyum Persülfat	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

3.2.4.2.4 Polivinilidindiflorür (PVDF) Membrana Aktarma ve Antikorlarla Muamele İşlemi

Transferde kullanılacak olan membran 1 dk boyunca metanolde bekletilerek etkin hale getirildi. Ardından soğuk transfer tamponunda 5 - 10 dk arasında bekletildi. Bu esnada aynı tamponda sünger ve kurutma kağıdı da ıslatıldı. Devamında sünger-kurutma kağıdı-jel-membran-kurutma kağıdı-sünger olacak şekilde sıralandı ve transfer tankının içine dikkatlice yerleştirildi.

Transfer tankının içi transfer tamponu ile doldurulduktan sonra 15 V akımda gece boyu +4°C'de yürütüldü.

Transferden alınan membran % 5 süt tozu ihtiva eden 1 X TBS – Tween20 bloklama tamponu ile 1 saat süresince muamele edildi. Bu işlemden sonra 3 kez 5-10 dk boyunca 1 X TBS – Tween20 tamponu ile yıkamalar gerçekleştirildi. Seçilen antikorun hazırlık kısmında önerdiğine uygun olacak şekilde seyreltmeler yapıldı. Ayrıca normalizasyon amacıyla kullanılacak olan Beta Aktin antikoruna 1 / 10000 seyreltmede uygulandı. Uygun sürelerde antikor muamelesinden sonra yine 3 defa 5-10 dk boyunca 1 X TBS – Tween20 tamponu ile yıkamalar gerçekleştirildi. Kullanılan primer antikora uygun olarak seçilen Antimouse / Antirabbit sekonder antikorları 1 saat süresince uygulandı ve belirtilen yıkamalar yapıldı.

3.2.4.2.5 Membranların Görüntülenmesi ve Analizi

Membrana bağlanan antikorlarla istenilen işaretli proteinlerin görüntülenmesini sağlayan ECL Western Blotting Substrat'ı ile 1-2dk boyunca bekletildi. Membranlar cihazın tepsisine yerleştirildi ve görüntülendi.

Sonuçların densitometrik olarak değerlendirilmesinde Image J programı kullanıldı. Normalizasyon için kullanılan β -Aktin proteini tüm deney ve kontrol gruplarında çalışıldı. Bu sayede elde edilen bantlar birbiri ile kıyaslanarak analiz edildi.

3.2.4.2.6 İmmunfloresan Yöntemi ile Apoptotik Genlerin Hücre İçerisindeki Konumunun Belirlenmesi

Deneyde kullanılacak olan özel yuvarlak cam lameller herhangi bir kontaminasyon olmaması için yerleştirilmeden önce alkol ile steril edildi. 24 kuyucuklu plakalara (250.000/kuyucuk) Hep3B hücreleri eşit olacak şekilde paylaştırıldı ve steril cam lameller yerleştirildi. Bir gece inkübe olduktan sonra, ilaç öncülü maddeler daha önceden hesaplanan % 50 inhibisyon değerine

uygun olarak kuyucuklara uygulandı. Bu uygulamadan 48 saat sonra medyum uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS ile 2 defa yıkandı. Fiksasyon için hücreler %4 'lük paraformaldehit çözeltisinde oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara üç-dört defa PBS yıkaması yapıldı. Ardından kuyucuklardaki hücreler %0,1 (k/h) Triton X-100 ihtiva eden PBS içinde 5 dk bekletildikten sonra tekrar yıkandı. İstenmeyen olası bağlanmalar olmaması için %10 oranında BSA içeren PBS ile bloklama işlemi yapıldı. 30 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra yıkama yapıldı ve ardından 1/100 oranında %1 BSA içeren PBS ile seyreltilerek hazırlanan Primer Antikorlar uygulandı. Primer antikor içeren hücreler gece boyu +4 °C'de ışık geçirmeyen ve nemli bir ortama sahip bir kutuya dikkatlice konuldu ve inkübasyonu sağlandı. 16 saat sonra primer antikorlar uzaklaştırıldı ve 3 kez 5 dk. boyunca PBS ile yıkandı. Kullanılan primer antikora uygun olarak seçilen Antirabbit / Antimouse sekonder antikor %1 BSA ihtiva eden PBS ile 1/100 kat seyreltildi. Bu basamaktan sonra uygulamalara karanlık ortamda devam edildi. Nem çemberi oluşturulan kabın içerisinde oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 saat süresince inkübe olması sağlandı. Sürenin dolmasıyla hücrelere PBS ile 5 dk.lık 3 yıkama yapıldı. Hücre zarından geçip çekirdeği boyayan bir floresan boya çeşidi olan DAPI solüsyonu (4',6-diamidin-2-fenilindol) hücrelere 1 µg/mL oranında uygulandı. Ardından hücreler PBS ile yıkandı.

Görüntüleme için kullanılmak üzere lamların üzerine ticari olarak satın alınan ve uzun sürelerde floresan ışımının kaybolmasını engelleyen antifade tampondan bir damla damlatıldı. Plakaların içine yerleşmiş olan yuvarlak lameller dikkatlice çıkartılıp hücre yüzeyinin tampon ile birleşmesini sağlayacak şekilde ters bir biçimde kapatıldı.

Immunfloresan deneyinin görüntülemeleri Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan ED200 floresans50 ataçmana sahip Olympus BX51 marka mikroskop ile yapıldı. DP2-BSW programı ile yakalanan görüntüler Image J programı ile analiz edildi.

3.2.4.2.7 Akım Sitometri Yöntemi

Hücrelerin hangi ölüm mekanizmasını seçtiğini belirlemede kullanılan bir yöntem olan Annexin V Guava Nexin kiti ve Propidyum İyodür (PI) kullanılarak çalışılmıştır. Bu amaçla Hep3B hücreleri 12 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı. 1 gece boyunca inkübe edildikten sonra ilaç öncü maddeler uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra medyum uzaklaştırıldı. Kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra Tripsin-Edta ile hücreler kaldırıldı. Elde edilen pellet % 1 BSA içeren medyuma alındı ve kitin önerdiğine uygun hale getirildi. Her bir örnekten 100 µL yeni bir ependorfa alındıktan sonra üzerlerine 100 µL Guava Nexin Solüsyonu eklendi. Karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk. bekletildikten sonra Guava Flow Sitometri cihazı ile analiz edildi.

3.2.5 İstatistik Değerlendirme

Tekrarlı olarak çalışılan verilerin değerlendirilmesinde Minitab 18 programı kullanıldı. Buna göre yaralanma deneyi verileri, hücre içi uygulama denemeleri, koloni oluşumu deneylerinin p ve standart sapma değerleri belirlendi ve belirlenen değerler ile sütun grafikleri çizildi. Western metodu verileri, fotoğrafları IMAGE J programı kullanılarak değerlendirildi ve grafikler oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1 Nitro Gruplu Maddelerin Bileşik Yapıları

Bu tez kapsamında etkisi incelenen bileşikler; 2,4,6 trinitrofenil türevlerinden oluşan ve Tübitak 113Z706 ve 110T754 nolu projelerde sentezlenen bileşiklerdir. Bu nedenle adlandırmaları buna uygun olarak yapılmaktadır. Bileşiklerin bazıları pikril klorür ile çeşitli alifatik ve aromatik diamin bileşiklerinin nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir. Diğer gruptakiler ise pikril klorür ve bazı aromatik ve heterohalkalı olan aminlerin reaksiyonu ile elde edilmiştir.

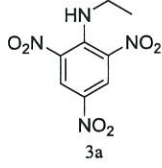
Projelerde, bu ilaç öncül bileşiklerin *S. Saprophyticus* 'tan elde edilen Ssap-NtrB enzimi ile gerçekleştirilen reaksiyonunun zamana karşı HPLC analizine bakılmıştır. Aynı zamanda bileşiklerin Ssap-NtrB enzimi tarafından substrat kabul edilip edilmediği araştırılmıştır. Bu analizlerde sentezlenen ilaç öncüllerinin ara ve son ürünleri belirlenmiştir. Örneğin 706-2h maddesinin substratının 5 dakikada neredeyse tamamının tükendiği ve başlıca 3 adet ürüne (P1, P2, P3) dönüştüğü ve bu ürünlerin kararlı olduğu gözlenmektedir. Ssap-NtrB 706-2h substratını çok hızlı bir şekilde indirgeyip ürüne dönüştürdüğü için bu substrat üzerinde etkinliğinin yüksek olması beklenmektedir.

Bunun yanında bu ilaç öncül maddelerin hesaplamalı moleküler modelleme analizleri yapılarak, deneysel çalışmalar doğrultusunda moleküllerin taşıdığı kimyasal ve fiziksel özellikleri arasındaki bağlantı, kimyasal yapı ve gösterdiği üç boyutlu yapı anlamaya çalışılmıştır.

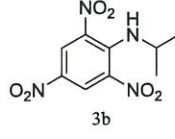
Bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesinde uygulan basamaklar Şekil 2.1 'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Özet olarak,

- (i) Öncelikle bileşiklerin kendilerinin toksisiteleri bir sağlıklı model olan HUVEC hücrelerinde olmak üzere 3 serisi bileşiklerde 4 farklı dokulardan köken almış kanser hücreleri (Hep3B, Saos-2, PC3 ve HT-29) ve 2 serisi bileşiklerde ise 2 farklı kanser hücre hattı (PC3 ve Hep3B) kullanılarak belirlenmiştir. Bu aşamada, sitotoksik aktivitelerin belirlenmesi dokuya özgü cevap göstereceği için farklı sayıda kanser hücreleri seçilmiştir.
- (ii) Zehirli olmayan ve ilaç öncülü olarak belirlenen bileşikler hücre içi ve hücre dışı reaksiyon deneyleri ile Ssap-NtrB enzimi ile etkileştirilmiştir. Bu sayede intihar gen tedavisi yaklaşımıyla *in vitro* hücreler üzerinde terapötik potansiyelleri belirlenmiştir.
- (iii) Zehirli bileşikler için hücrelerde oluşturdukları ölüm mekanizmaları, hücresel düzeyde (Koloni oluşturma ve çizik testi) belirlenmiştir. Ayrıca, Akım sitometresiyle apoptotik hücreler belirlenerek, Propidyum İyodür analizi ile bileşiklerin hücrelerin hücre siklusuna etkileri analiz edilmiştir. . Moleküler düzeyde, bileşiklerin apoptotik genlere mRNA ve protein düzeyinde etkileri de ayrıca belirlenmiştir.

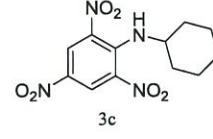
754-3 serisi



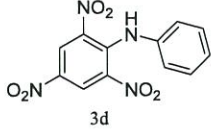
N-etil-2,4,6-trinitroanilin
MA: 256,17 g/mol



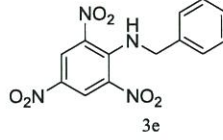
N-izopropil-2,4,6-trinitroanilin
MA: 270,20 g/mol



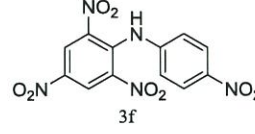
N-sikloheksil-2,4,6-trinitroanilin
MA: 310,26 g/mol



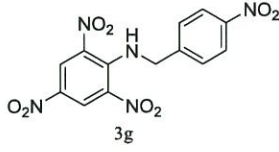
2,4,6-trinitro-*N*-fenilanilin
MA: 304,22 g/mol



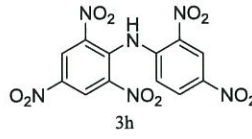
N-benzil-2,4,6-trinitroanilin
MA: 318,24 g/mol



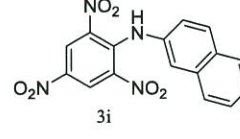
2,4,6-trinitro-*N*-(4-nitrofenil)anilin
MA: 349,21 g/mol



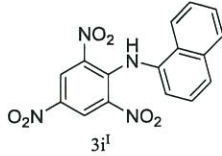
2,4,6-trinitro-*N*-(4-nitrobenzil)anilin
MA: 363,24 g/mol



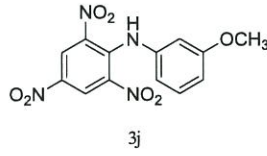
N-(2,4-dinitrofenil)-2,4,6-trinitroanilin
MA: 394,21 g/mol



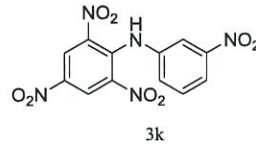
N-(2,4,6-trinitrofenil)naftalin-2-amin
MA: 354,27 g/mol



N-(2,4,6-trinitrofenil)naftalin-1-amin
MA: 354,27 g/mol



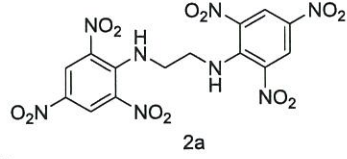
N-(3-metoksifenil)-2,4,6-trinitroanilin
MA: 334,24 g/mol



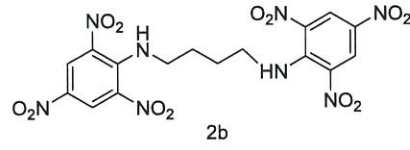
2,4,6-trinitro-*N*-(3-nitrofenil)anilin
MA: 349,21 g/mol

Şekil 4.1: 754-3 serisi bileşiklerin isimlendirmesi ve molekül kütleleri

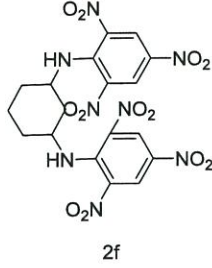
706-2 serisi



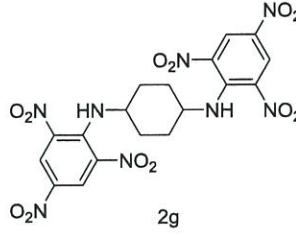
*N*¹,*N*²-bis(2,4,6-trinitrofenil)etan-1,2-diamin
MA: 482,28 g/mol



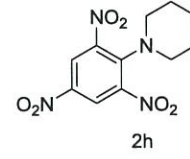
*N*¹,*N*⁴-bis(2,4,6-trinitrofenil)bütan-1,4-diamin
MA: 510,33 g/mol



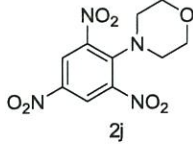
*N*¹,*N*³-bis(2,4,6-trinitrofenil)sikloheksan-1,3-diamin
MA: 536,37 g/mol



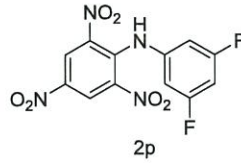
*N*¹,*N*⁴-bis(2,4,6-trinitrofenil)sikloheksan-1,4-diamin
MA: 536,37 g/mol



1-(2,4,6-trinitrofenil)piperidin
MA: 296,24 g/mol



4-(2,4,6-trinitrofenil)morfolin
MA: 298,21 g/mol



N-(3,5-diflorfenil)-2,4,6-trinitroanilin
MA: 340,20 g/mol



5-metil-*N*-(2,4,6-trinitrofenil)isoksazol-3-amin
MA: 309,19 g/mol

Şekil 4.2: 706-2 serisi bileşiklerin isimlendirmesi ve molekül kütleleri

4.2 Nitro Gruplu Bileşiklerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Nitro gruplu maddelerin hücreler üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.1.3 ile belirtildiği gibi maddeler uygun seyreltmelerde hazırlandı. Maddelerin etkinliğinin belirlenebilmesi için farklı kanser hücre hatlarında ve sağlıklı hücre modelinde 5 farklı derişimde ve 2 farklı zaman aralığında test edilmiştir. Kanserli model olarak İnsan Kolon kanseri hücre hattı (HT-29), İnsan Karaciğer kanseri hücre hattı (Hep3B), İnsan Prostat kanseri hücre hattı (PC3), İnsan Kemik Karsinoma (Saos-2) ve sağlıklı model olarak ise İnsan Göbek Kordon Bağı hücre hattı (HUVEC) hücreleri kullanıldı. Bileşikler DMSO ile çözüldükten sonra 5 farklı derişimde (150 µM, 75 µM, 38 µM, 18 µM ve 9 µM) ve 3 tekrarlı olacak şekilde hücrelere

uygulandı. Kontrol grubu olarak ise son derişim % 2 olacak şekilde kuyucuklara DMSO uygulandı. 24 ve 48 saat sürelerince maddelerle inkübe olan hücreler MTT metodu uygulanarak hücre yaşayabilirliği incelendi. Bu zaman aralıkları ön çalışmalarla belirlenmiştir. 72. Saatte bazı bileşiklerde sitotoksik etkinin çok fazla olması nedeniyle, zaman aralığından çıkarılmıştır. 550 nm dalga boyunda spektrofotometrede alınan değerler, Excel programı kullanılarak grafiklendirildi.

Zehirli olan bileşiklerin IC₅₀ değerleri Origin Pro 8.5 programı kullanılarak belirlendi. Bu sonuçlara göre bileşikler zehirli olmayan (TD), az zehirli olan (AT) ve IC₅₀ değeri hesaplatacak kadar zehirli olmak üzere 3 kategoriye ayrılmıştır. Bu çerçevede, Az Zehirli (AT) olan grup tüm derişim ve zaman dilimlerinde en az bir defa hücre canlılığı %80- % 60 aralığında olanlardır. Zehirli olmayan grup değerlendirilmesinde, hücre canlılığı %100 - % 80 hücre canlılığı aralığında olanlar değerlendirilmiştir. Zehirli olan bileşiklerde, IC₅₀ değerleri % 50' nin altında hücre ölümüne neden olan derişim hesabı yapılabilenler olarak belirlenmiştir.

4.2.1 754-3 serisi bileşiklerin sitotoksik etkileri

754-3a, 754-3b, 754-3c, 754-3d, 754-3e, 754-3f, 754-3g, 754-3h, 754-3i, 754-3j, 754-3k bileşiklerini içerir. 3 serisi bileşikler 4 farklı kanser hücresinde, İnsan hepatoma hücresi (Hep3B), İnsan Prostat kanser hücresi (PC3), İnsan osteosarkom hücresi (Saos-2), İnsan kolon kanser hücresi (HT-29) ve sağlıklı hücre modelinde insan göbek kordon bağı endotelial hücresinde (HUVEC) araştırılmıştır.

754-3a bileşiği Hep3B (IC₅₀: 46 µM) ve Prostat kanseri hücrelerine karşı zehirli etkilidir. PC3 hücreleri üzerine 24 saat için hesaplanan IC₅₀ değeri 46 µM, 48 saat için de 65 µM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Osteosarkoma ve kolon kanserinde az zehirli etki göstermişlerdir. Aynı şekilde sağlıklı model olan HUVEC hücreleri üzerine de az zehirli etkili olduğu Şekil 4.3 ile gösterilmiştir.

754-3b bileşimine ait sitotoksosite analizleri Şekil 4.4 'de verildiği gibidir. 754-3b bileşiği hepatoma IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (IC₅₀: 71 ve 66 µM). Prostat kanseri, kolon ve kemik hücrelerine karşı az seviyede zehirli etkilidir. Prostat kanseri hücrelerinde 48 saat için IC₅₀ değeri 123 µM ve kemik karsinomu için 24 saatte % 50 inhibisyon değeri 120 µM'dır (Çizelge 4.1).

754-3c bileşimine ait sitotoksosite grafikleri Şekil 4.5' te verildiği gibidir. 754-3c bileşiği Hepatoma hücrelerine ve prostat hücrelerine karşı zehirli etkili değilken, HUVEC hücrelerine karşı az zehirli etki göstermiştir (Çizelge 4.1).

754-3d bileşimine ait sitotoksosite grafikleri Şekil 4.6'da verildiği gibidir. 754-3d bileşiği Hepatoma hücrelerine karşı zehirli etki göstermiştir. 48 saat için IC₅₀ değeri 17 µM 'dır. Buna karşın prostat hücreleri üzerine etkisi bulunmamaktadır. HUVEC hücreleri üzerine ise az zehirli etkilidir (Çizelge 4.1).

754-3e bileşimine ait sitotoksosite analizleri Şekil 4.7'te gösterildiği gibidir. Hepatoma hücrelerine karşı gösterdiği %50 inhibisyon değeri 48 saat için 26 µM ve prostat hücrelerine karşı gösterdiği % 50 inhibisyon değeri 48 saat için 51 µM olarak tespit edilmiştir. Kolon karsinoma hücrelerine karşı zehirli etki göstermezken, göbek kordonu bağı hücrelerine karşı az zehirli etkili olduğu bulunmuştur. Kemik karsinomu üzerine gösterdiği % 50 inhibisyon değeri ise 24 saat için 54 µM'dır (Çizelge 4.1).

754-3f maddesine ait sitotoksik aktivite sonuçları Şekil 4.8 ile gösterilmiştir. 3f maddesi Hep3B, PC3, HUVEC, Saos-2 ve HT-29 hücreleri üzerine zehirli etkilidir. Hep3B hücreleri üzerine IC₅₀ değeri 48 saatte 56,82 µM iken, HUVEC hücrelerinde bu değer 78,92 µM olarak belirlenmiştir. HT-29 hücreleri üzerine 150 µM derişimde zehirli etki göstermiştir. Sırasıyla IC₅₀ değerleri Çizelge 4.1'de verildiği gibidir.

754-3g maddesine ait sitotoksik aktivite sonuçları Şekil 4.9'de gösterilmiştir. 3g maddesi Hepatoma hücreleri üzerine gösterdiği % 50 inhibisyon değeri 24 saat için 78 µM, 48 saat için ise 109 µM'dır. PC3 hücrelerine karşı 48 saat için IC₅₀ değeri 78 µM olarak belirlenmiştir. HUVEC için 24 saatte 45 µM ve Saos-2 hücreleri için 24 saatte 88 µM değerinde % 50

inhibisyon göstermiştir. Kolon kanseri hücrelerine karşı zehirli etkili olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

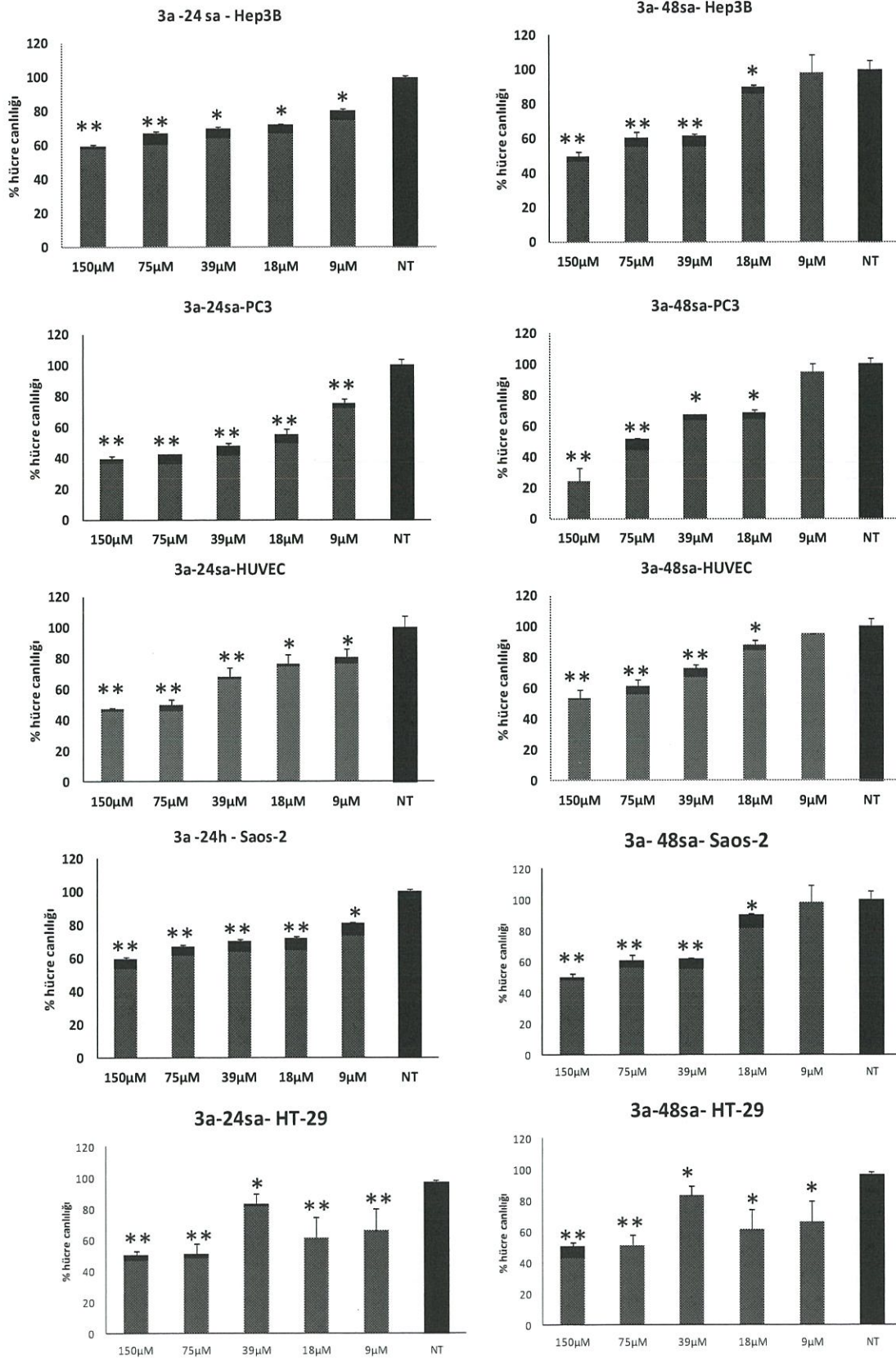
754-3h bileşiğine ait sitotoksik analizler Şekil 4.10 ile gösterildiği gibidir. 754-3h bileşiğinin hepatoma, prostat ve kemik karsinomu hücreleri üzerine az miktarda zehirli etkili olduğu bulunmuştur. HUVEC hücrelerine karşı 24 saat için elde edilen % 50 inhibisyon değeri 87 μM 'dır. Kolon kanseri hücrelerine karşı zehirli etkili olmadığı tespit edilmiştir.

754-3i maddesine ait sitotoksik aktivite sonuçları Şekil 4.11: 754-3i bileşiğine ait sitotoksikite grafikleri ile verilmiştir. 754-3i maddesi hepatoma ve prostat hücreleri üzerine 48 saatte zehirli etkilidir. IC_{50} değerleri sırasıyla 24 μM ve 7 μM 'dır. HUVEC hücrelerine karşı % 50 inhibisyon değerleri 24 saat için 83 μM , 48 saat için ise 20 μM olarak belirlenmiştir. HT-29 ve Saos-2 hücrelerine karşı az zehirli etki göstermiştir. Saos-2 hücrelerinde 48 saat için belirlenen IC_{50} değeri 72 μM 'dır.

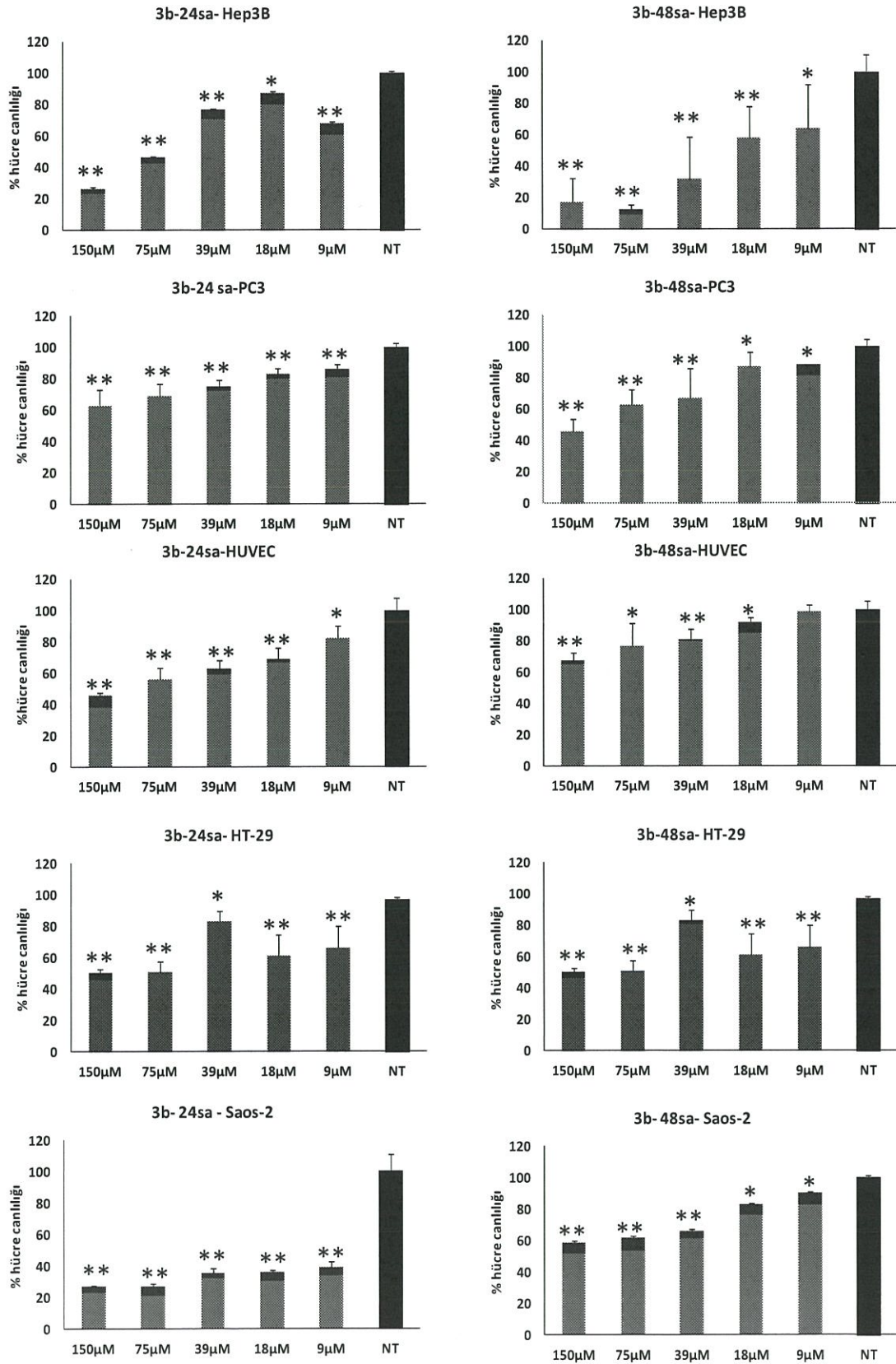
754-3i' maddesine ait sitotoksik aktivite sonuçları Şekil 4.12'de belirtildiği gibidir. Hep3B hücreleri üzerine zehirli etkili olup, IC_{50} değeri 48 saat için 18 μM 'dır. PC3 hücreleri için 24 ve 48 saatte sırasıyla 110 μM ve 127 μM değerinde % 50 inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Saos-2 hücrelerine karşı gösterdiği % 50 inhibisyon değerleri ise 24 ve 48 saat için sırasıyla 85 μM ve 88 μM 'dır. HUVEC ve HT-29 hücreleri üzerine az zehirli etkilidir.

754-3j bileşiğine ait sitotoksikite analizleri Şekil 4.13'te verildiği gibidir. 754-3j bileşiği Hepatoma hücrelerine karşı zehirli aktivite göstermiştir (IC_{50} : 38 μM ve 55 μM). HUVEC, Saos-2, PC3 ve HT-29 hücrelerine karşı ise az zehirli etki göstermiştir.

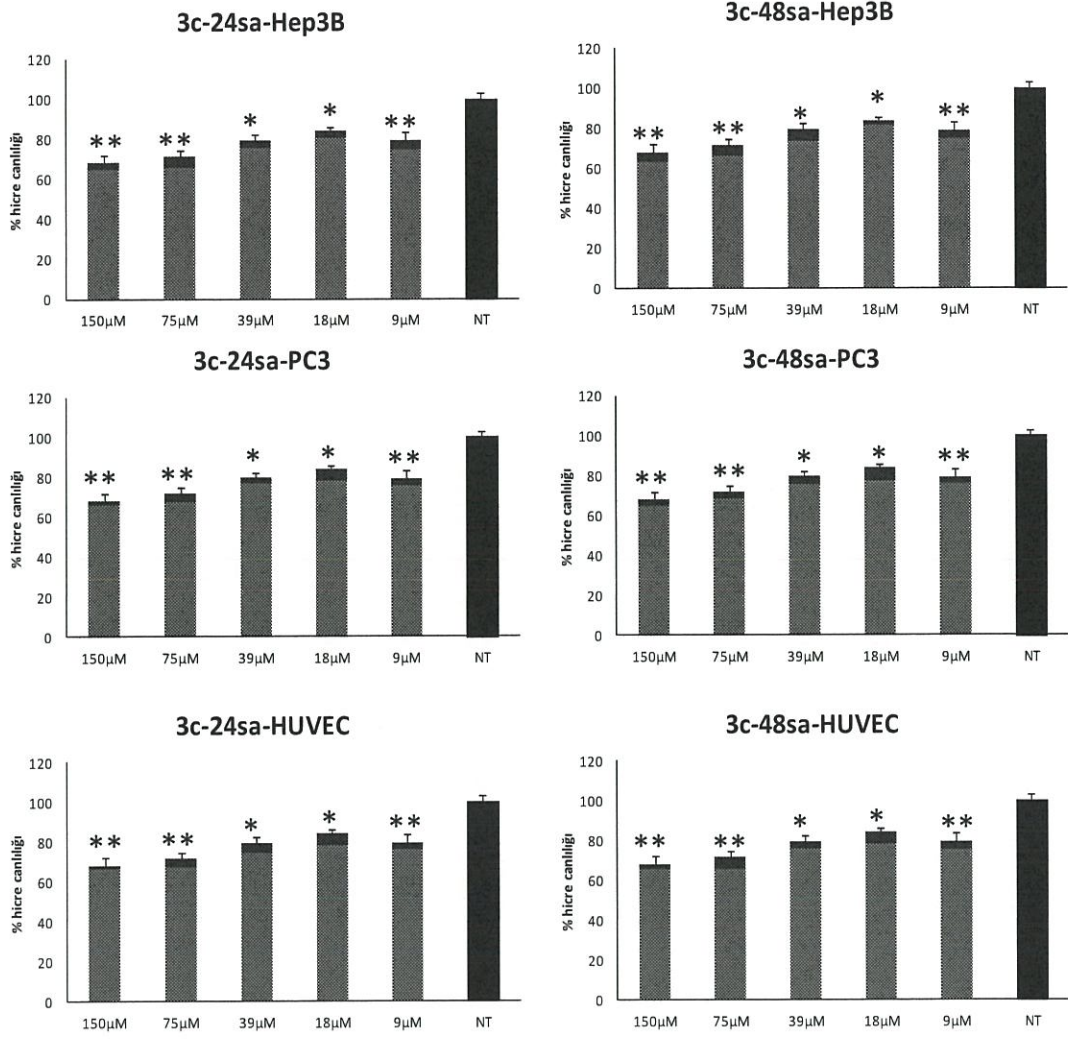
754-3k maddesine ait sitotoksik aktivite sonuçları Şekil 4.14 ile verilmiştir. 3k maddesi, Hepatoma hücreleri üzerine zehirli etki göstermiştir (24sa: IC_{50} : 66,76 ve 48 sa: IC_{50} :16,23 μM). Aynı şekilde HT-29, PC3, Saos-2 ve HUVEC hücrelerine karşı ciddi şekilde zehirli etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna göre PC3 hücrelerinde IC_{50} değerleri 24 ve 48 saatte sırasıyla 60 μM ve 87 μM olarak hesaplanmıştır. HUVEC hücrelerinde ise 48 sa: IC_{50} :34 μM olarak hesaplanmıştır.



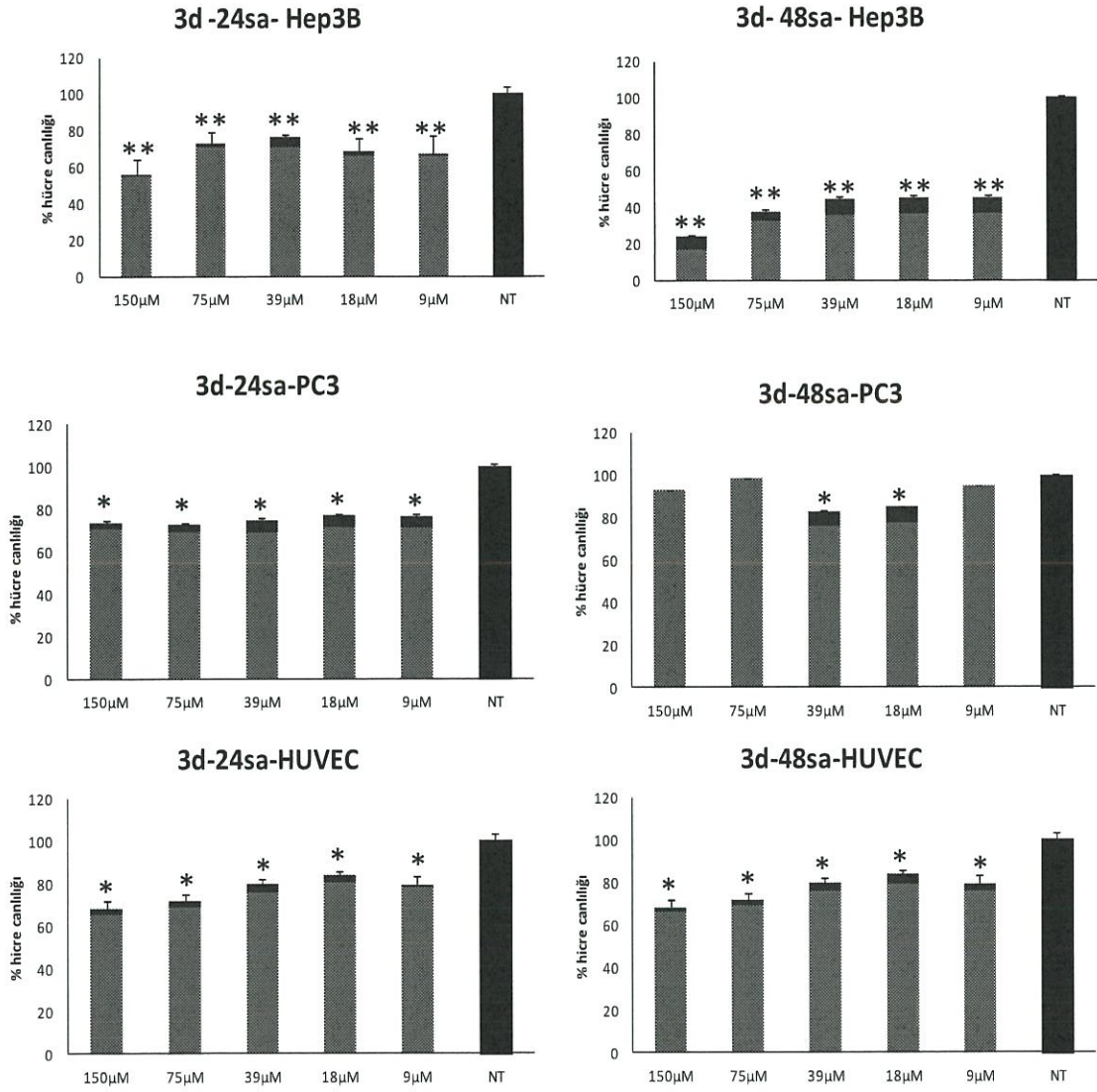
Şekil 4.3: 754-3a bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



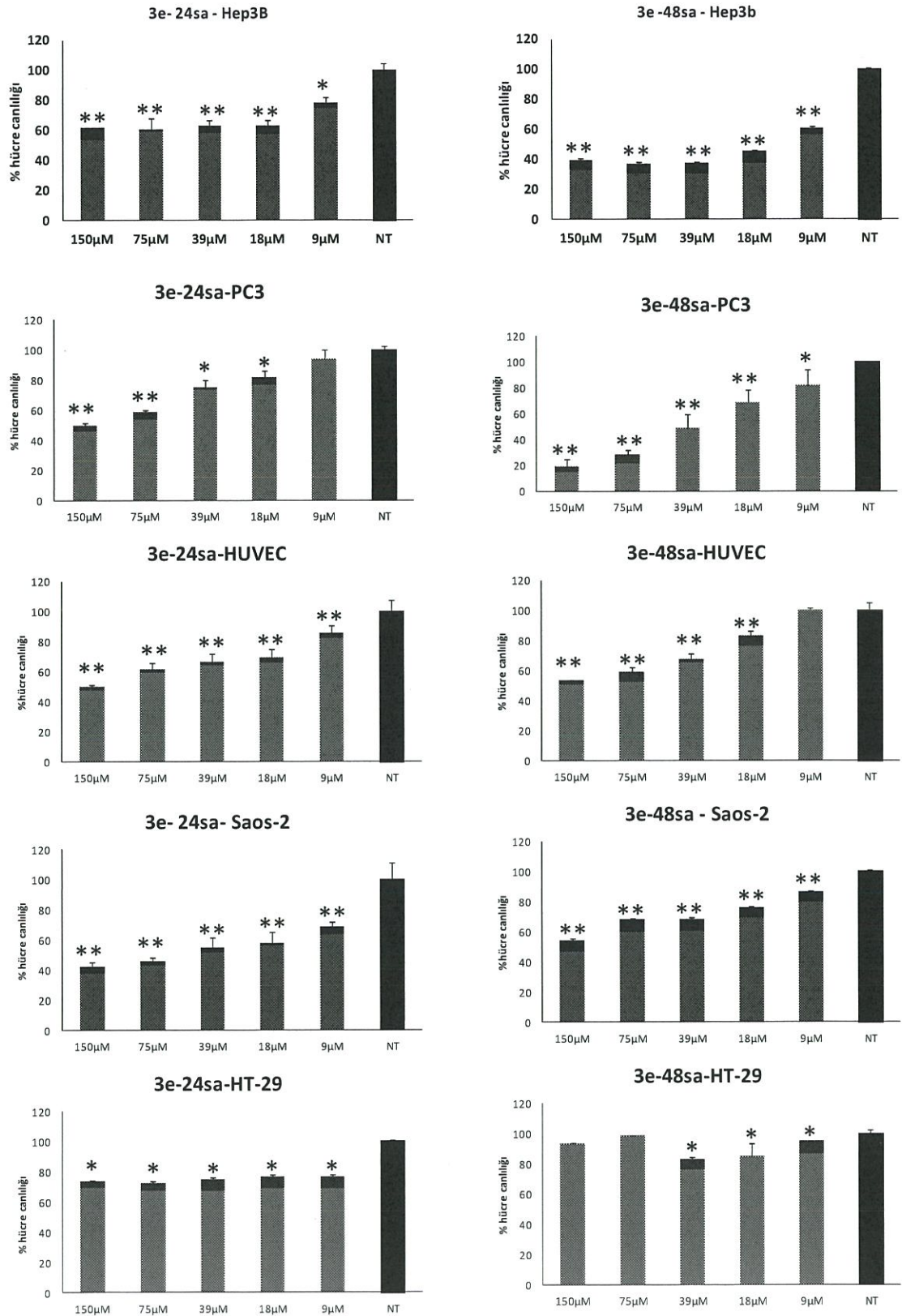
Şekil 4.4: 754-3b bileşiğine ait sitotoksisite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



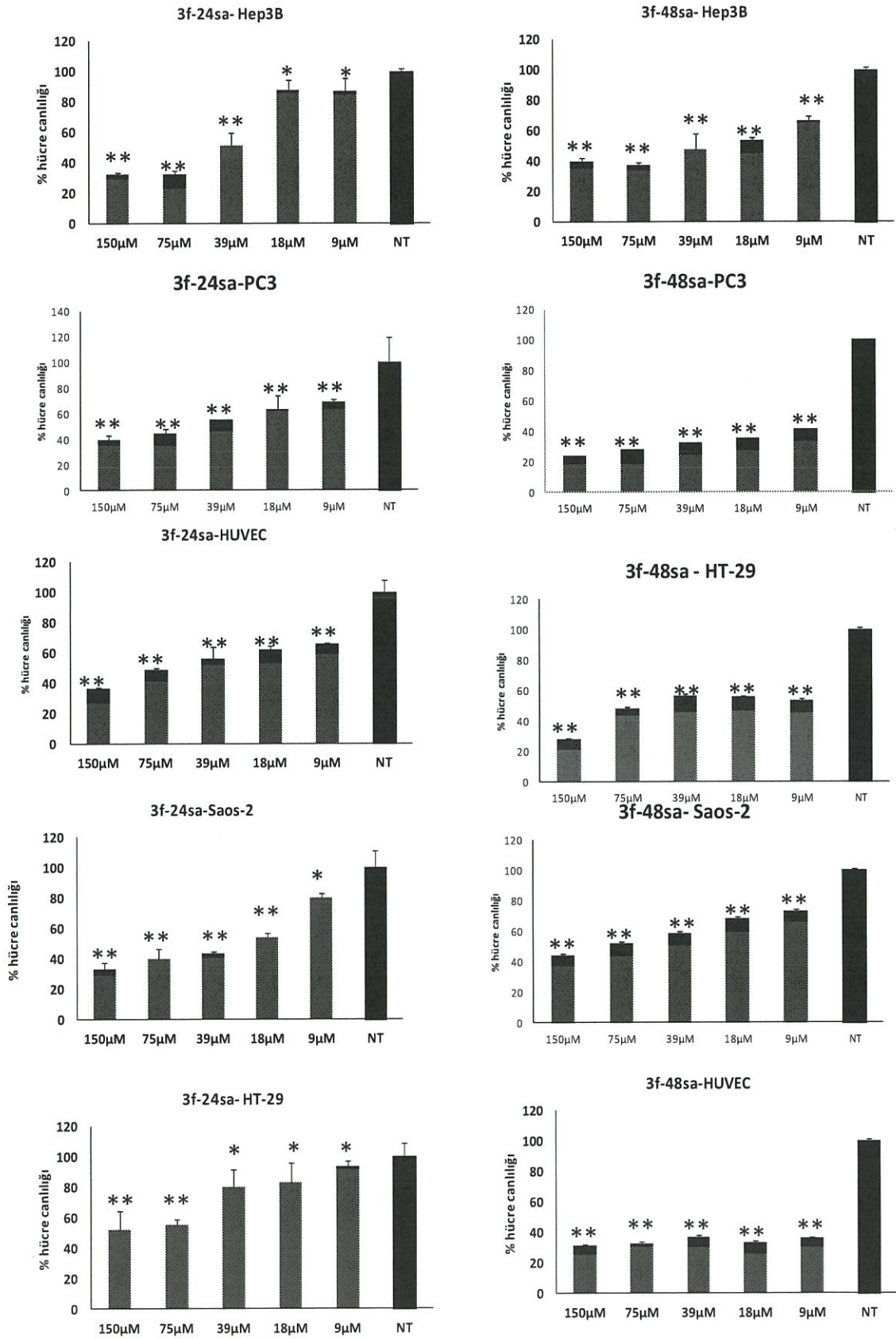
Şekil 4.5: 754-3c bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



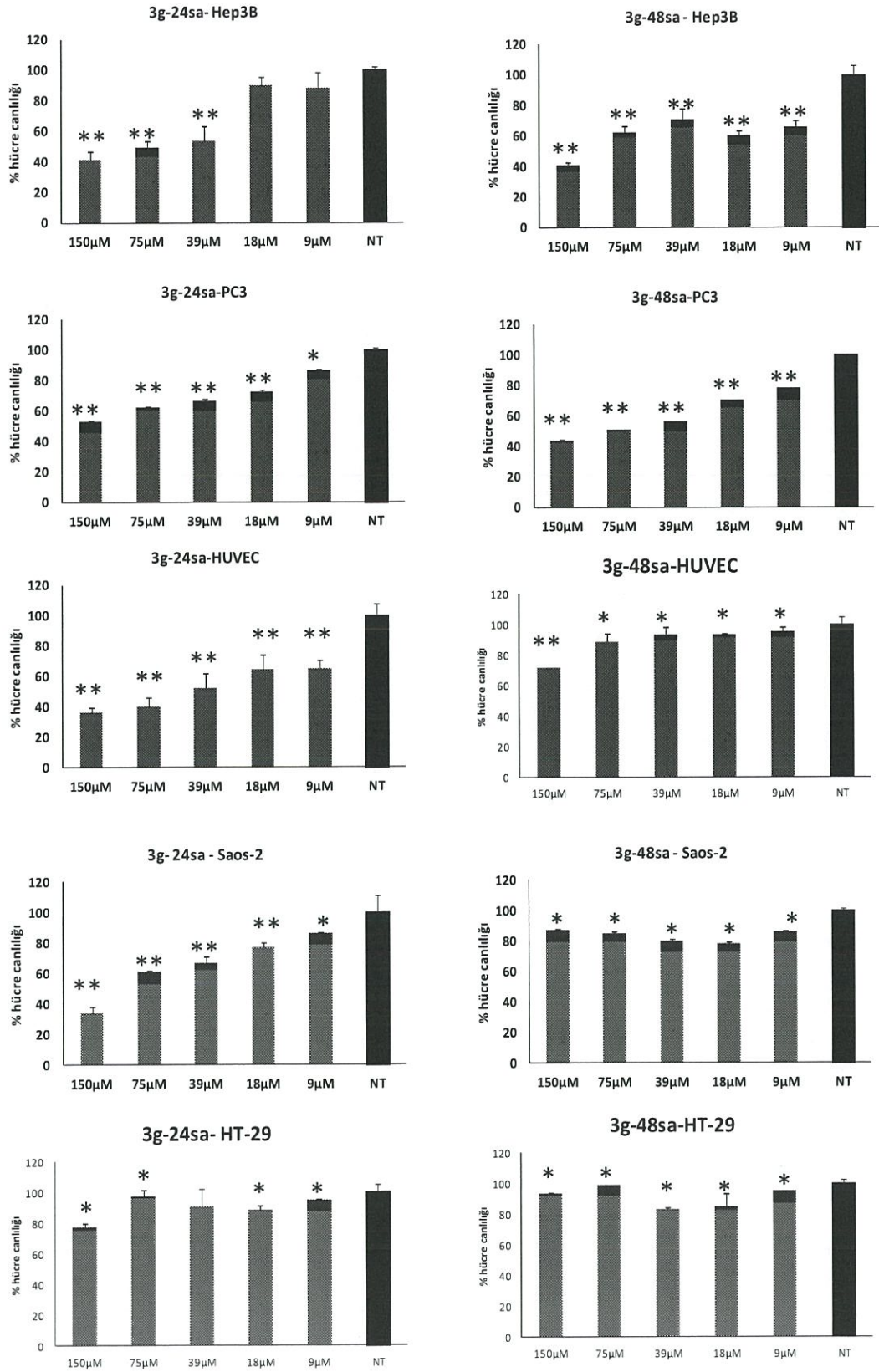
Şekil 4.6: 754-3d bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



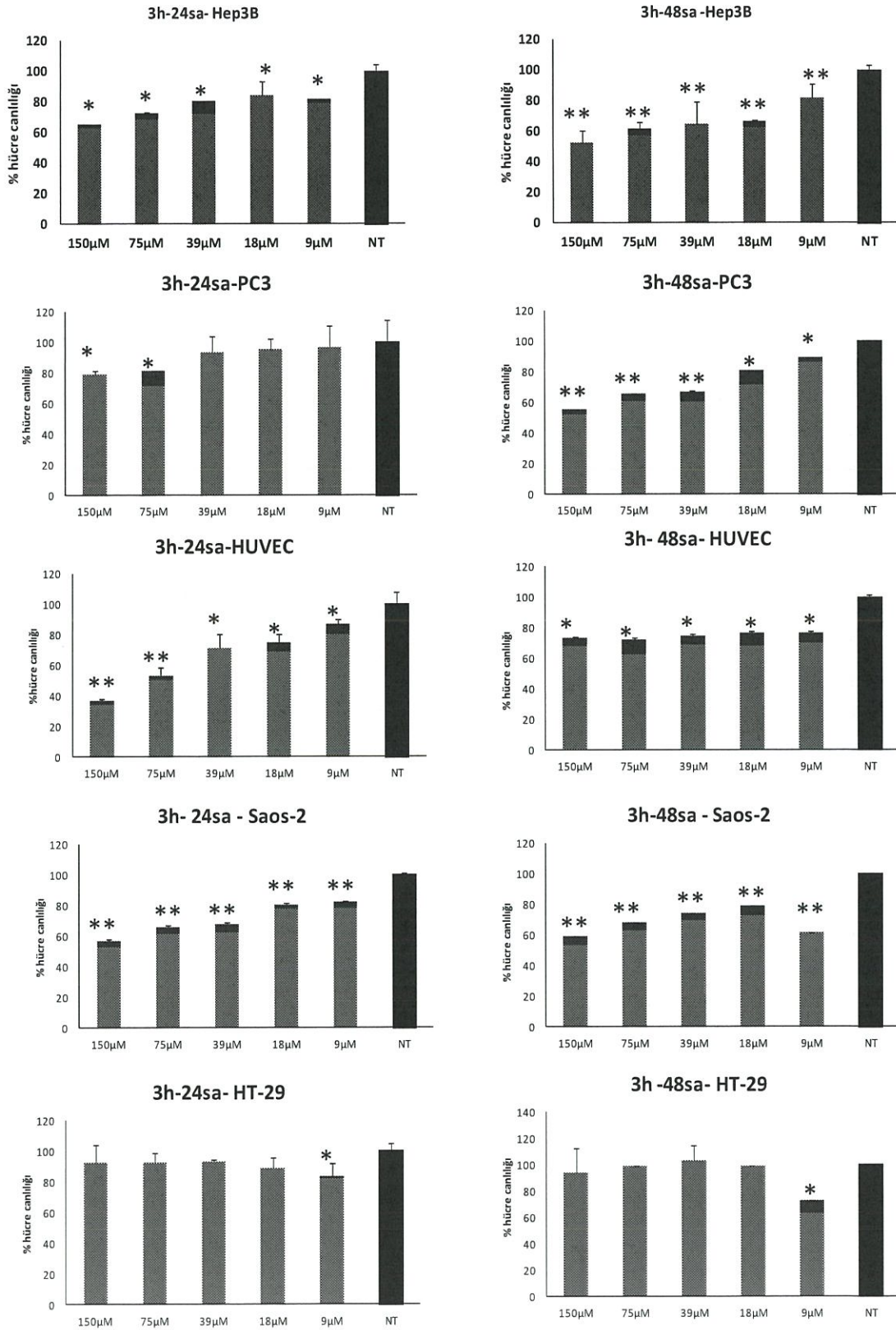
Şekil 4.7: 754-3e bileşiğine ait sitotoksite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



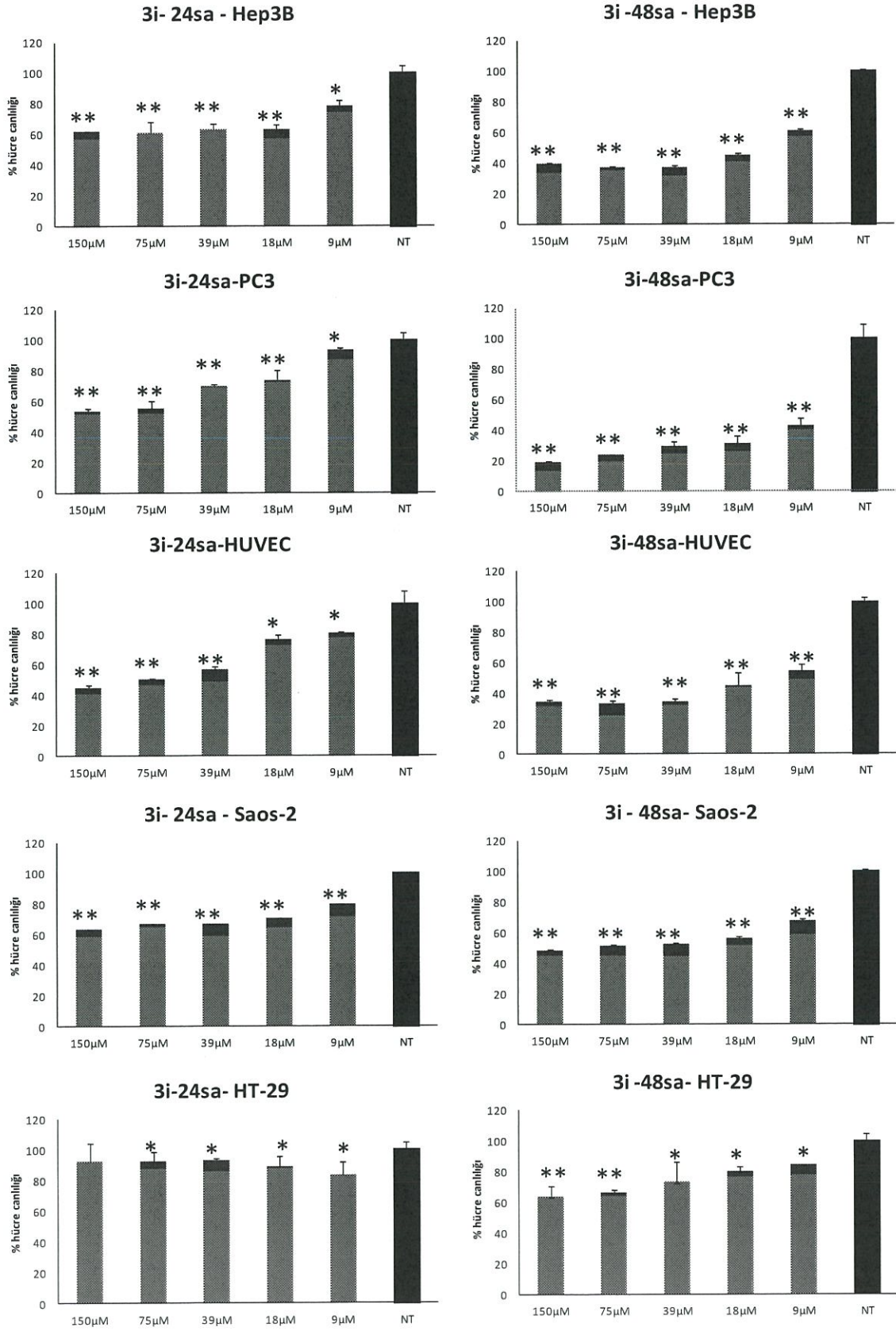
Şekil 4.8: 754-3f bileşiğine ait sitotoksisite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



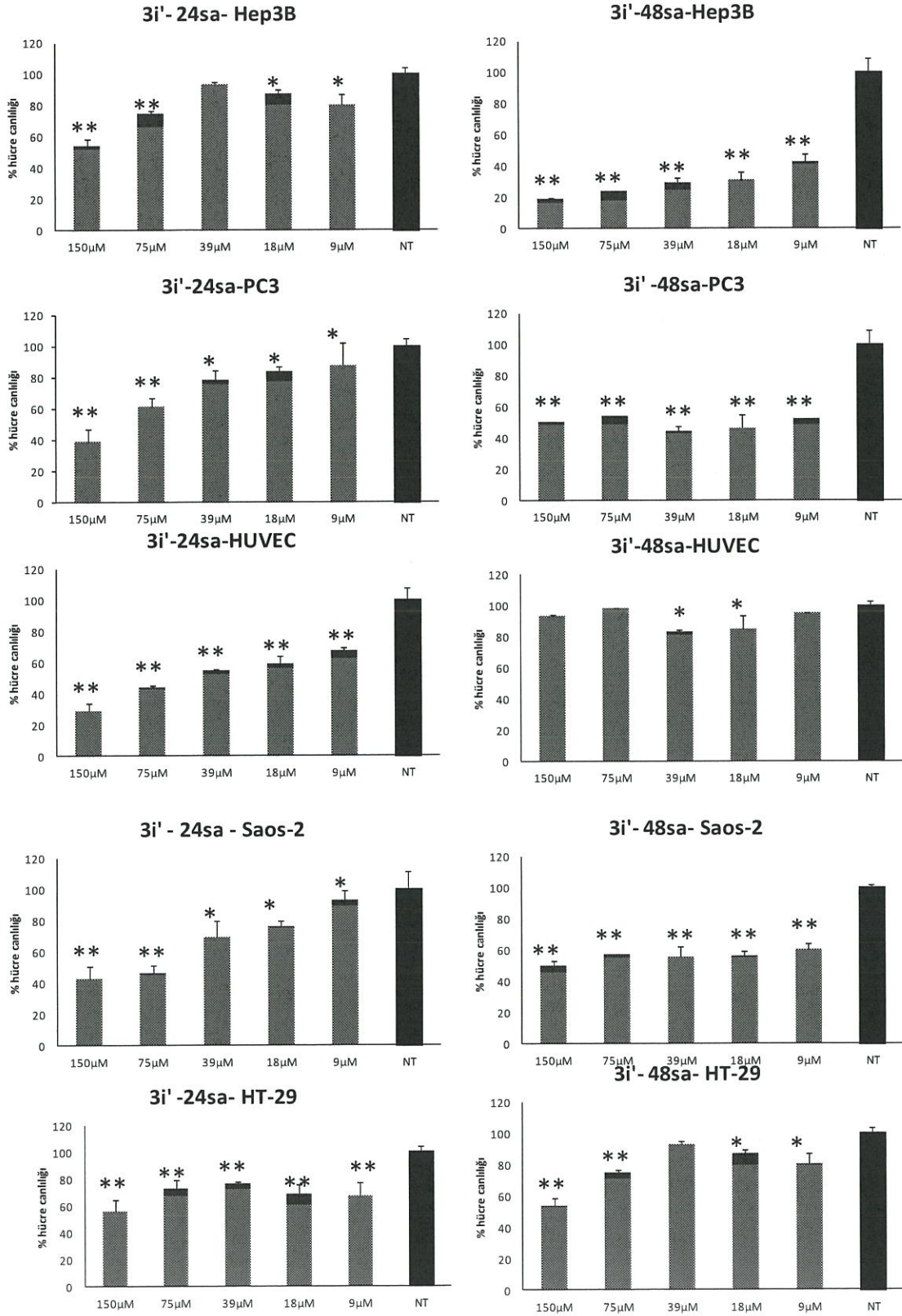
Şekil 4.9: 754-3g bileşiğine ait sitotoksite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile)



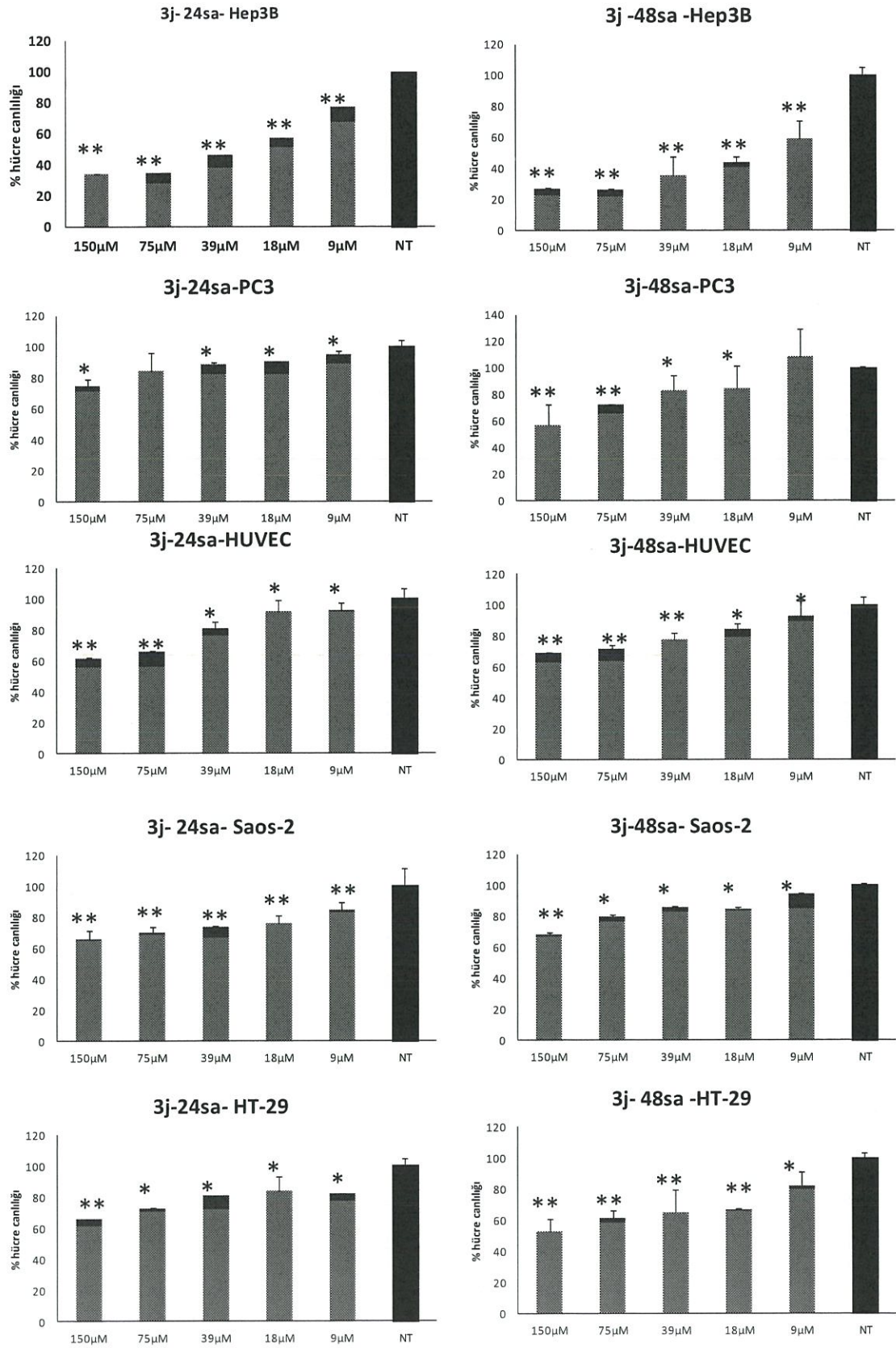
Şekil 4.10: 754-3h bileşimine ait sitotoksosite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



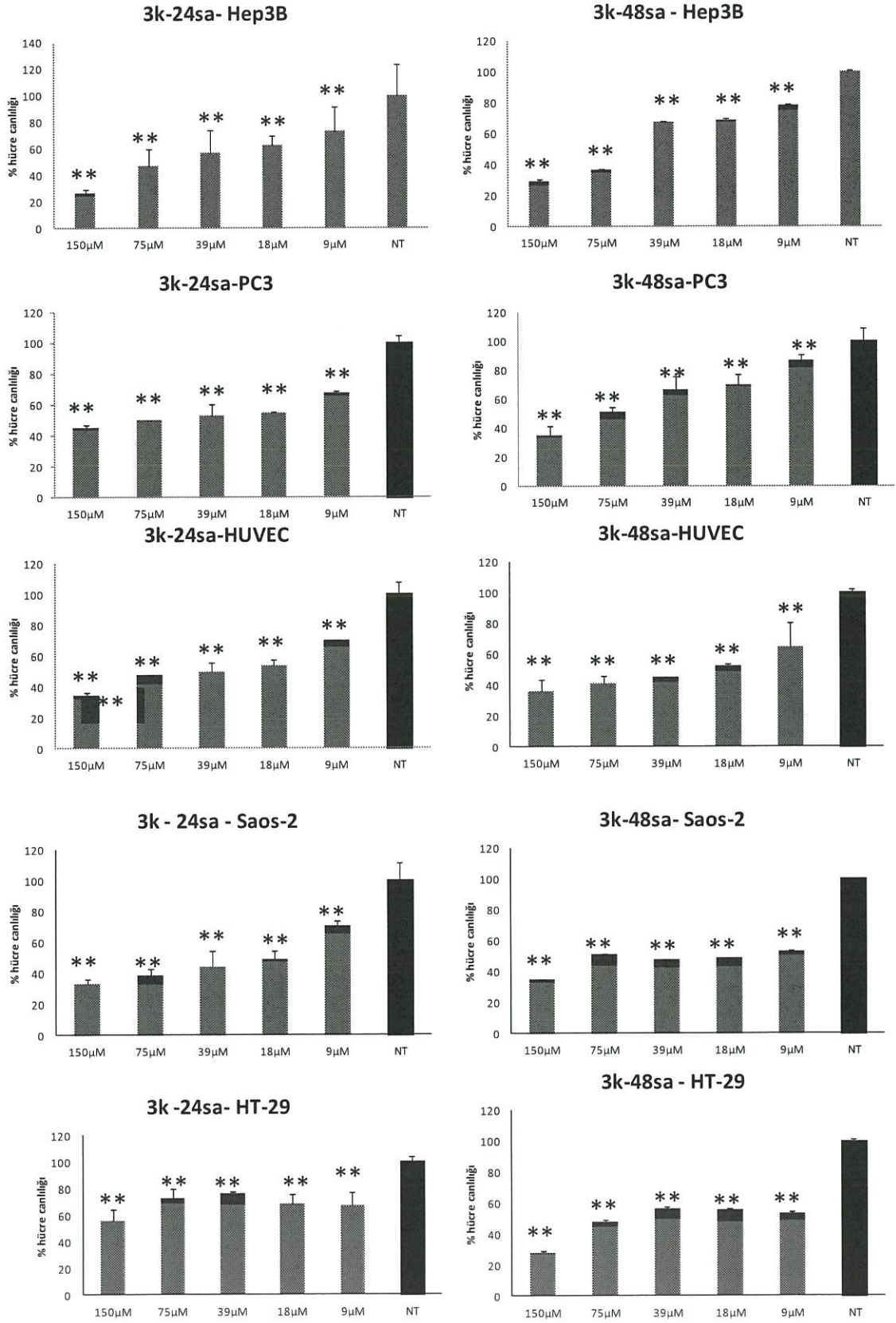
Şekil 4.11: 754-3i bileşiğine ait sitotoksite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.12: 754-3i' bileşiğine ait sitotoksinite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.13: 754-3j bileşiğine ait sitotoksiste grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.14: 754-3k bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)

Çizelge 4.1: 754-3 serisi bileşiklerin özet sitotoksisite değerleri

Zaman	Hep3B		PC3		HUVEC		Saos-2		HT-29	
	24sa	48sa	24sa	48sa	24sa	48sa	24sa	48sa	24sa	48sa
754-3a	AT	46 µM	46 µM	65 µM	AT	AT	AT	AT	AT	AT
754-3b	71µM	66 µM	AT	123 µM	AT	AT	120 µM	AT	AT	AT
754-3c	TD	TD	TD	TD	AT	AT	TD	TD	TD	TD
754-3d	AT	17 µM	TD	TD	AT	AT	TD	TD	TD	TD
754-3e	AT	26 µM	AT	51 µM	AT	AT	54 µM	AT	TD	TD
754-3f	52 µM	56 µM	56 µM	11 µM	72 µM	78 µM	37 µM	81 µM	138 µM	75 µM
754-3g	78 µM	109 µM	AT	78 µM	45 µM	AT	88 µM	AT	TD	TD
754-3h	AT	AT	AT	AT	87 µM	TD	AT	AT	TD	TD
754-3i	AT	24 µM	AT	7 µM	83 µM	20 µM	AT	72 µM	TD	AT
754-3i'	AT	18 µM	110 µM	127 µM	42 µM	TD	85 µM	88 µM	AT	AT
754-3j	38 µM	55 µM	TD	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT
754-3k	47 µM	16 µM	60 µM	87 µM	43 µM	34 µM	31 µM	34 µM	AT	120 µM

AT: Az Toksik %80- % 60 (Tüm derişim ve zaman dilimlerinde en az bir defa % 60 hücre canlılığına inenler), **TD:** %100-% 80 hücre canlılığı aralığında olanlar (Tüm derişim ve zaman dilimlerinde en az bir kez % 80 hücre canlılığına inenler), IC₅₀ değerleri: % 50 nin altında hücre ölümüne neden olan derişim hesabı yapılabilenler. [74]

4.2.2 706-2 serisi bileşiklerin sitotoksik etkileri

706- 2 serisi bileşikler 706-2a, 706-2b, 706-2f, 706-2g, 706-2h, 706-2j, 706-2p ve 706-2s bileşiklerini içerir. Hep3B, PC3 ve HUVEC sağlıklı hücre hattında hücre canlılığı deneyleri gerçekleştirilmiş olup, Çizelge 4.2'de bileşiklere ait IC₅₀ değerleri verilmiştir. Bu sonuçlara göre, zehirli etki göstermeyen ve ilaç öncü potansiyeli olan bileşiklerin hücre dışı ve hücre içi reaksiyon denemelerine görürülerek, intihar gen tedavisinde kullanıma potansiyeli araştırılmıştır.

706-2a bileşiği, hepatoma ve göbek kordonu bağı hücrelerine karşı 48 saatte az zehirli etkilidir. Prostat kanseri hücrelerine karşı % 50 inhibisyon değeri 24 saatte 52,11 ve 48 saatte 40,8 µM'dır. Sonuçlara ait bilgiler Çizelge 4.2 ile gösterilmiştir.

706-2b bileşiğine ait sitotoksik aktivite grafikleri Şekil 4.16 ile verildiği gibidir. Prostat kanser hücreleri üzerine zehirli etkili değildir. Hepatoma ve HUVEC hücreleri üzerine ise az zehirli etkilidir.

706-2f bileşiği PC3 hücrelerine karşı zehirli etkili olmadığı, Hep3B hücrelerine karşı ise 48. saatte 150 µM derişimde % 45 büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur. HUVEC hücrelerine karşı 48 saatte, az zehirli etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.17).

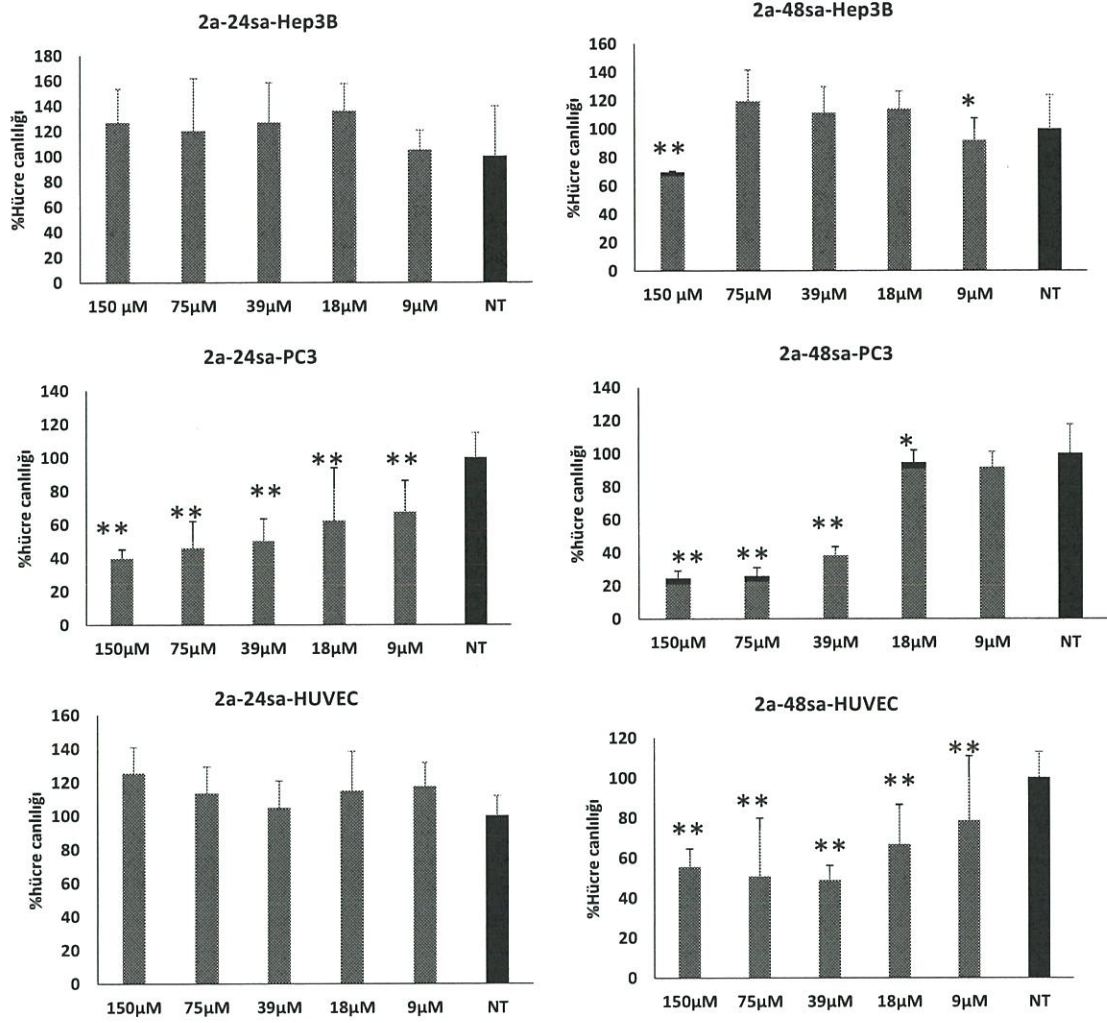
706-2g bileşiği Hep3B hücrelerinin büyümelerini 150 µM derişimde % 50 inhibe etmiştir. Prostat ve göbek kordonu hücreleri üzerine zehirli etkili değildir (Şekil 4.18).

Şekil 4.19 verildiği üzere, 706-2h bileşiği hepatoma hücrelerinin büyümesini en yüksek derişimde (150 µM) hem 24 hem de 48 saat sonrasında % 50 inhibe etmiştir. Bununla beraber PC3 hücrelerin % hücre canlılığı 150 µM'da % 70 olarak belirlenirken, HUVEC hücrelerinde bu değer % 41'lere düşmüştür. Dolayısıyla bu bileşiğin 48 saat sonrasında HUVEC hücreleri üzerine daha zehirli etki yaptığı söylenebilir.

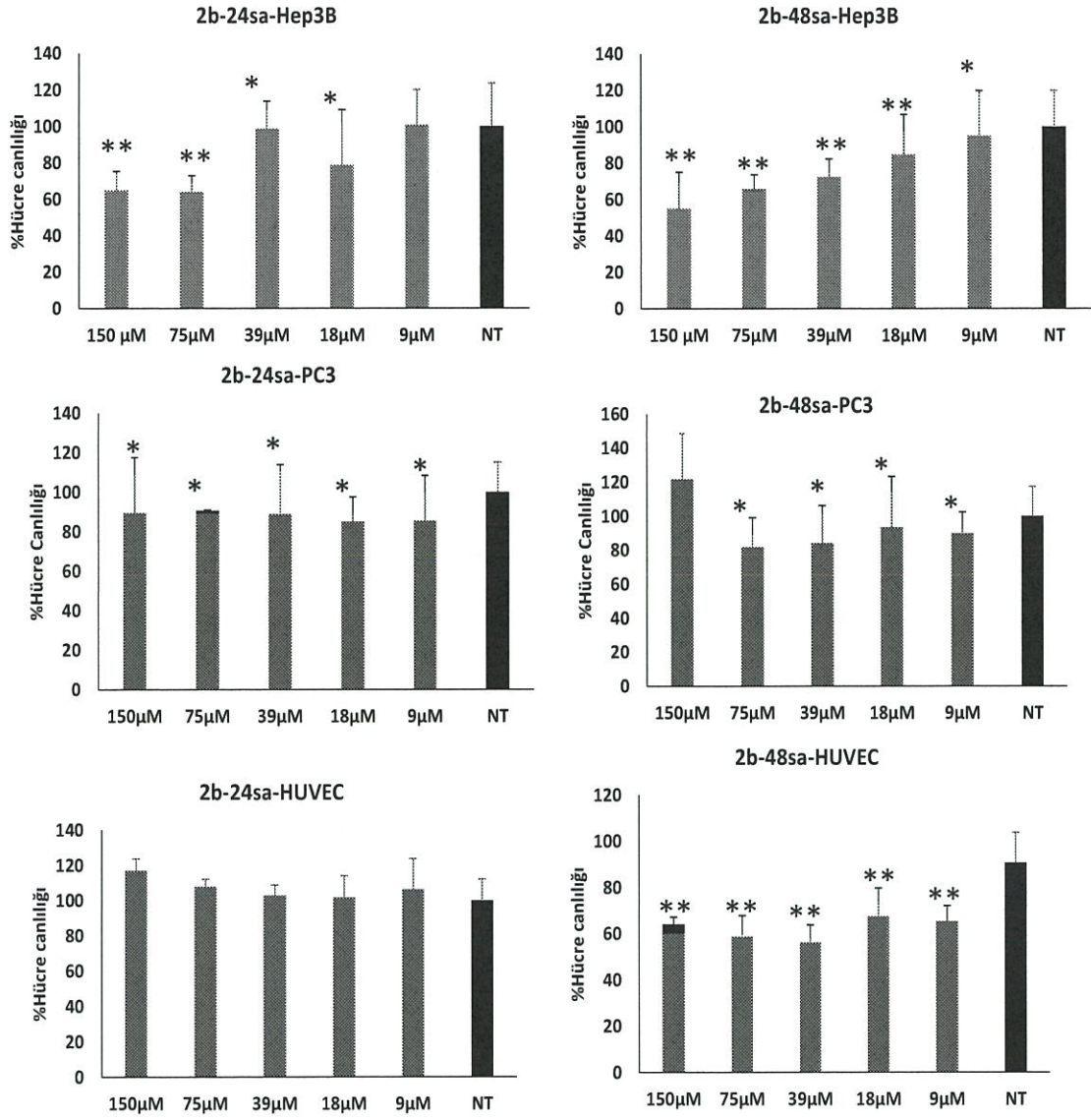
706-2j bileşigi HUVEC ve PC3 hücrelerinde, hücrelerin yaşayabilirliğini etkilememiştir. Hepatoma hücrelerinde ise az zehirli olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.20 ile gösterildiği gibidir.

706-2p bileşigi PC3 hücreleri üzerine az etki gösterirken, Hep3B ve HUVEC hücrelerine karşı zehirli etki göstermiştir. % 50 inhibisyon derişim değerleri Hep3B hücreleri için 31,95 μ M iken, HUVEC hücreleri için 9,42 μ M olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.21 'de gösterildiği gibidir.

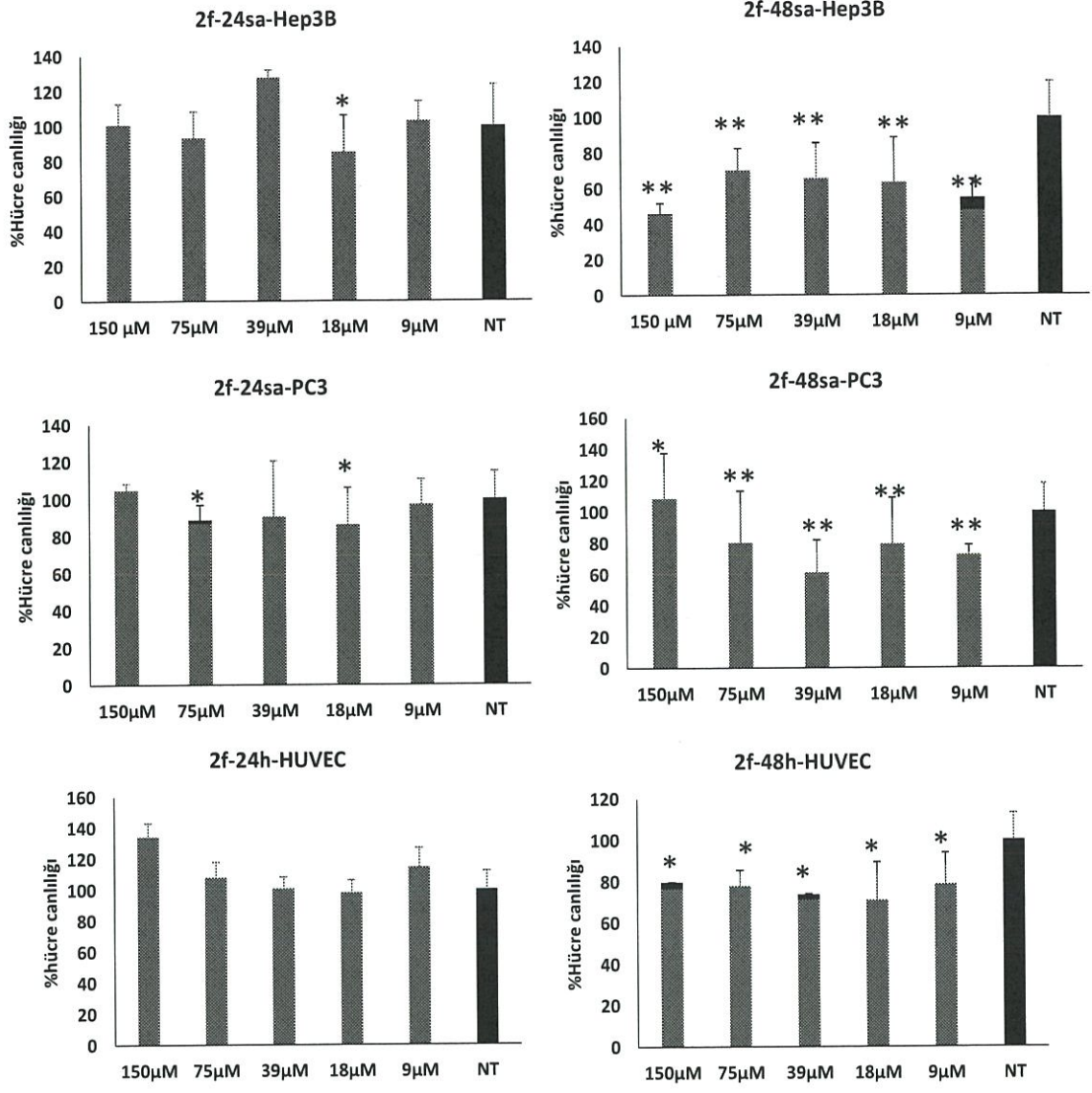
706-2s bileşigi Hep3B ve HUVEC hücrelerine zehirli etkili iken (48 saat sonrasında IC₅₀ değeri sırasıyla 58.53 μ M ve 25.88 μ M), PC3 hücrelerinin büyümesini etkilememiştir. Sonuçlar Şekil 4.22 ile gösterildiği gibidir.



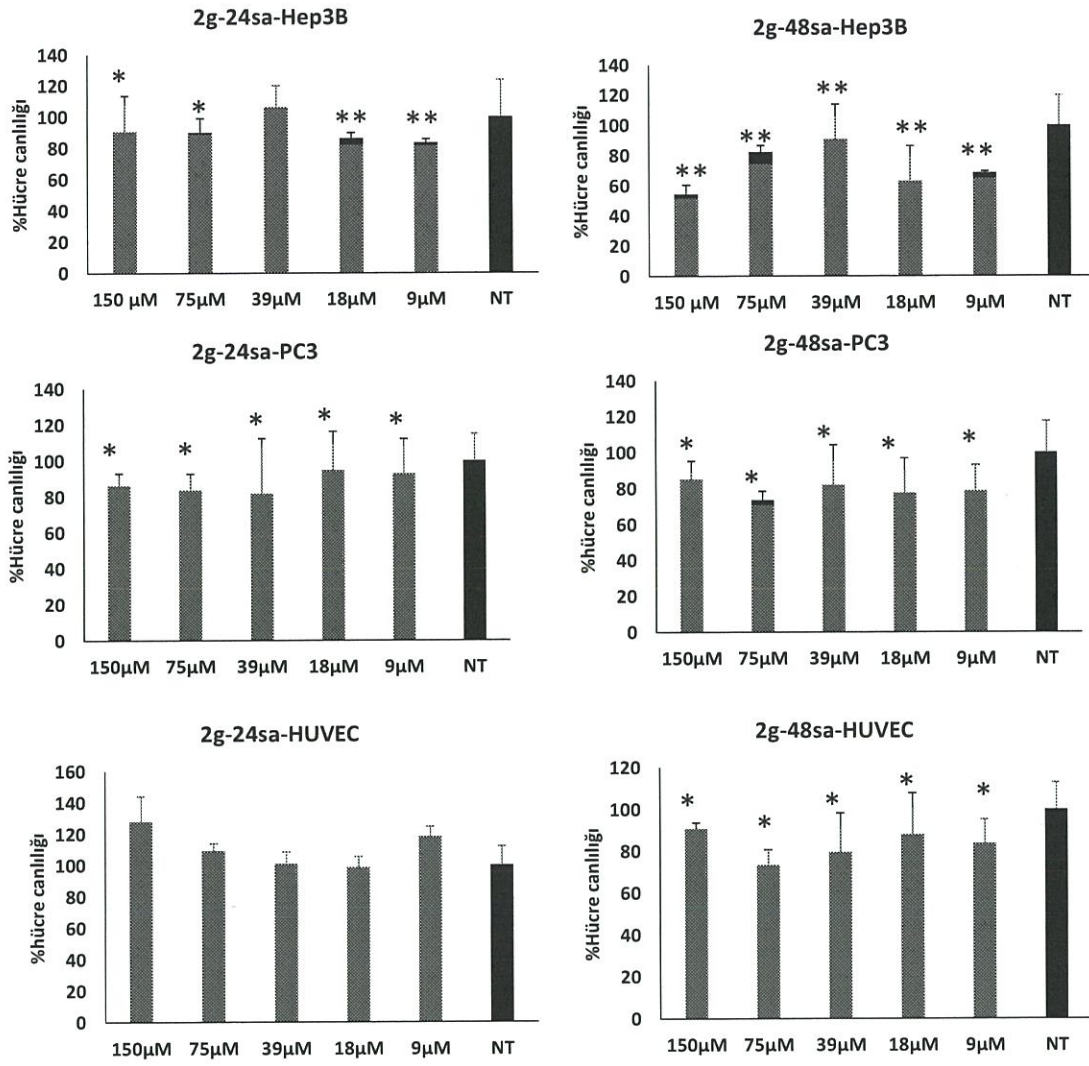
Şekil 4.15: 706-2a bileşiğine ait sitotoksinite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



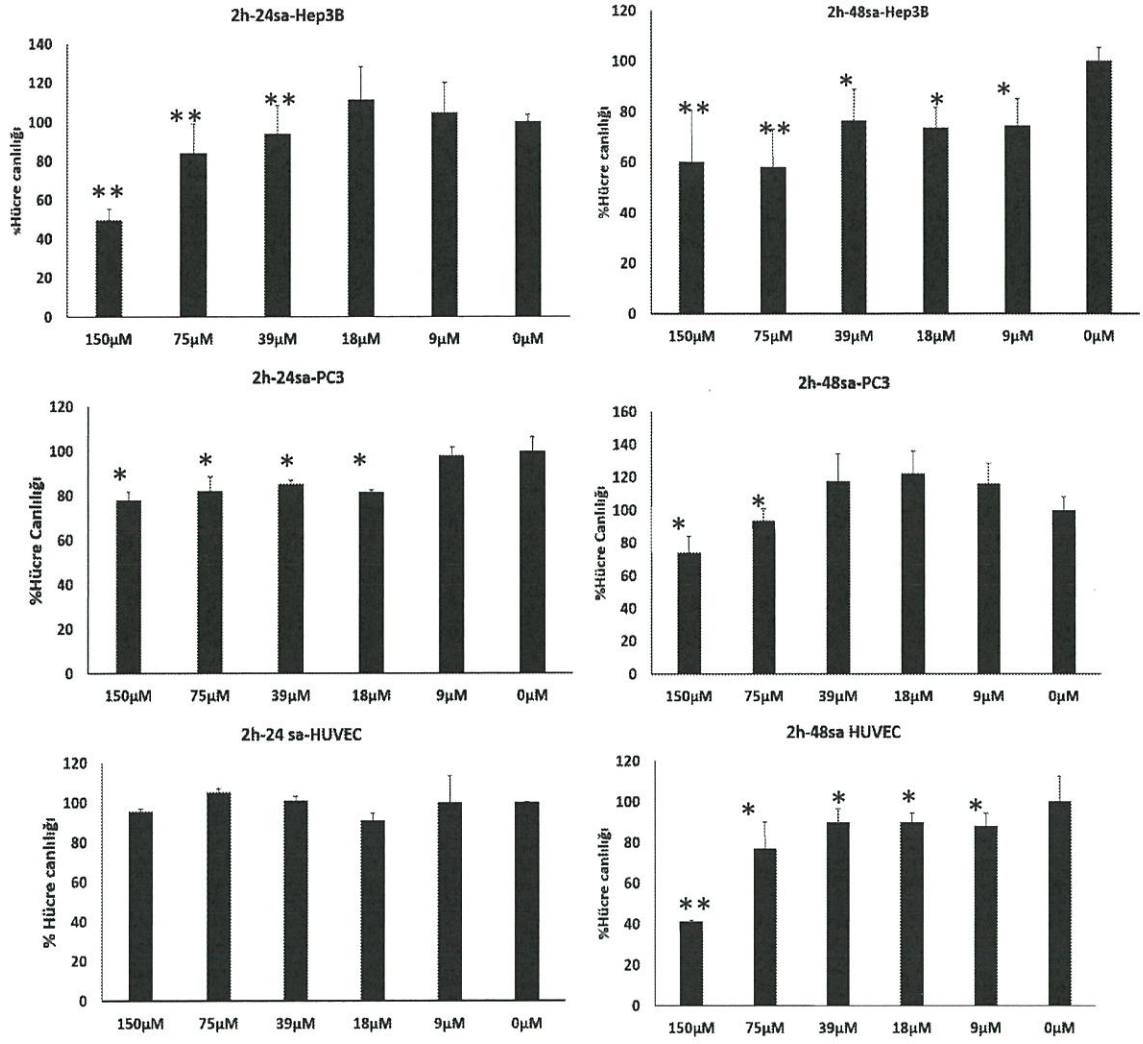
Şekil 4.16: 706-2b bileşiğine ait sitotoksinite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



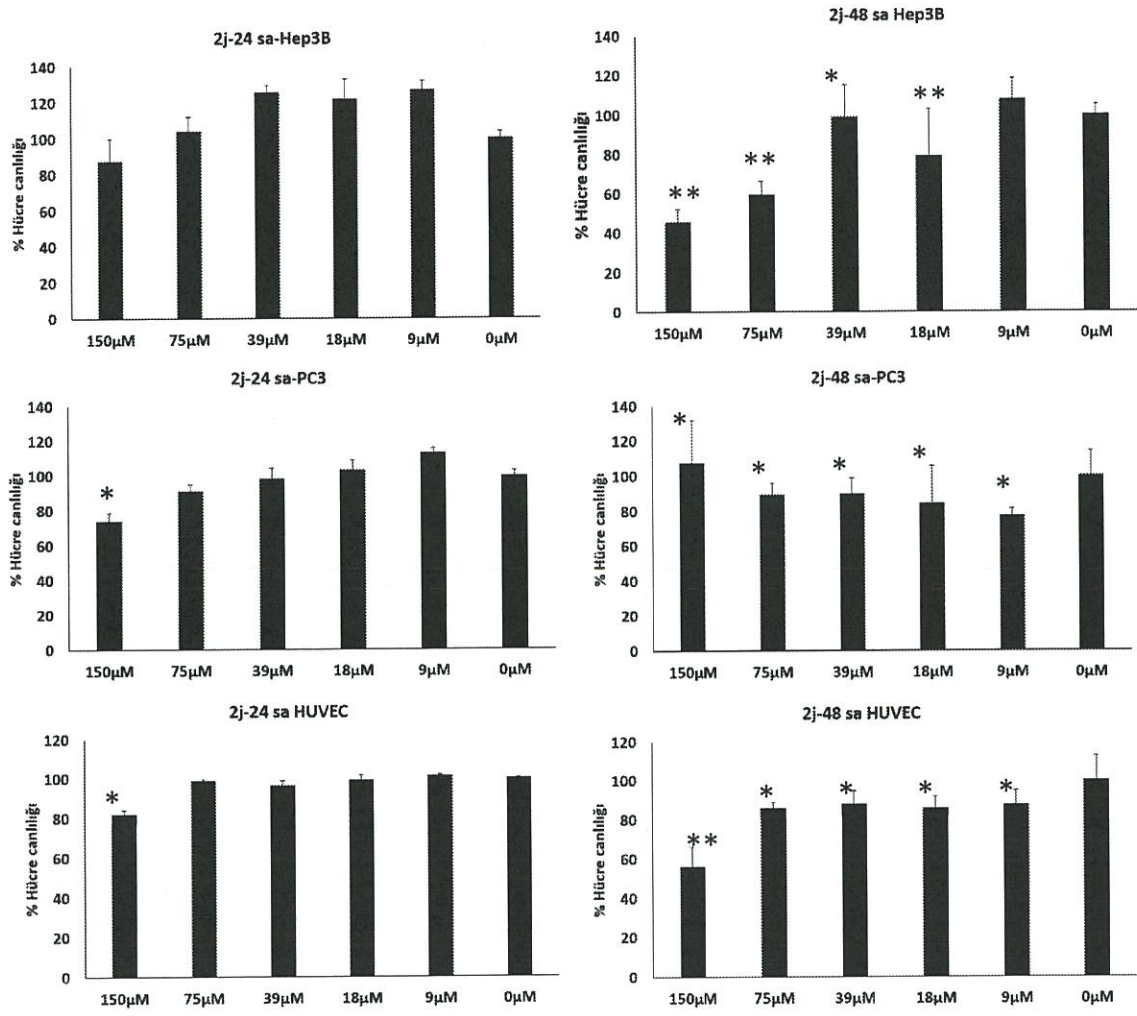
Şekil 4.17: 706-2f bileşimine ait sitotoksinite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



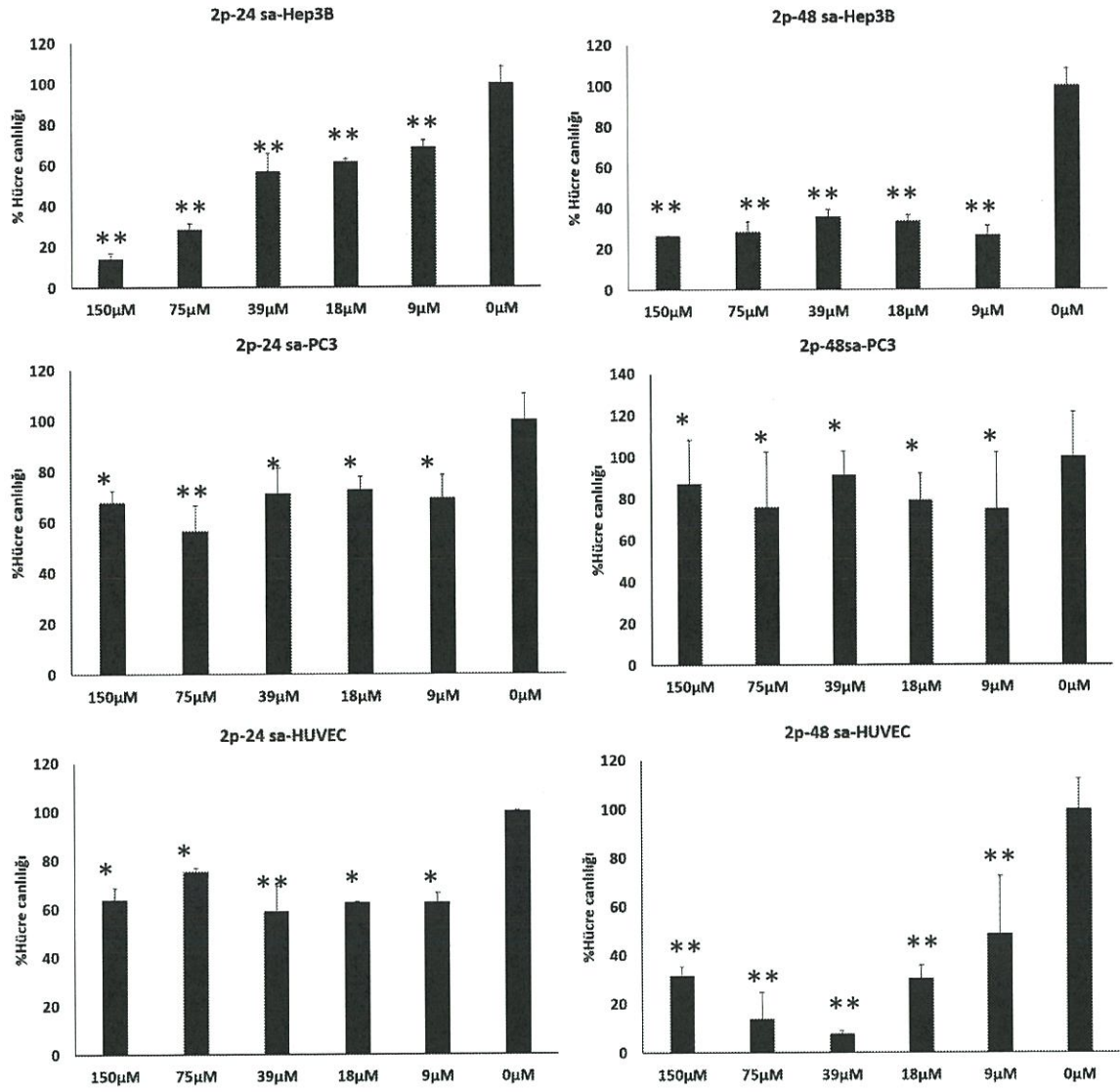
Şekil 4.18: 706-2g bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



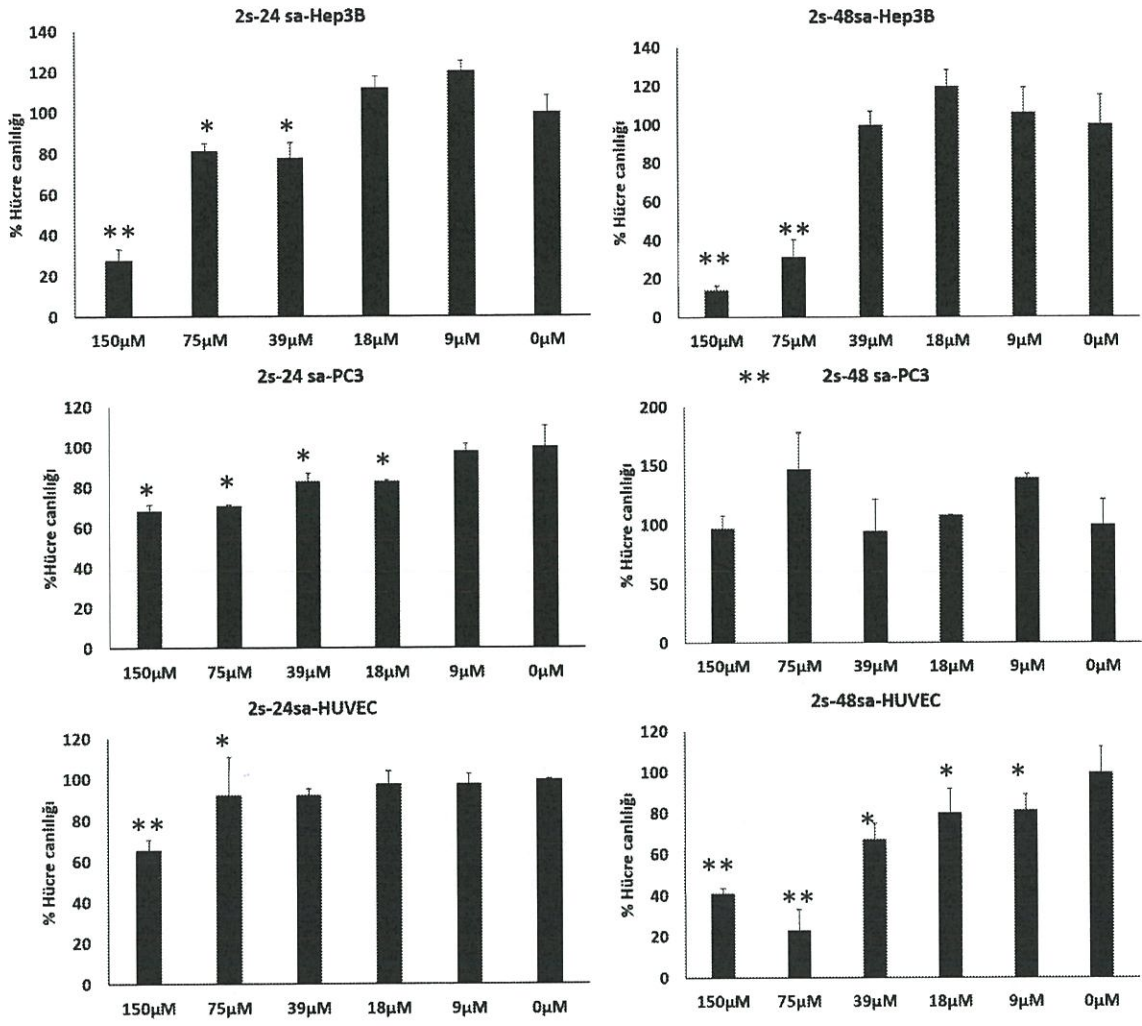
Şekil 4.19: 706-2h bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.20: 706-2j bileşimine ait sitotoksosite grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.21: 706-2p bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.22: 706-2s bileşiğine ait sitotoksosite grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)

Çizelge 4.2: 706-2 serisi bileşiklerinin özet sitoksisite değerleri

Zaman	Hep3B		PC3		HUVEC	
	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa
706-2a	TD	AT	51,1 µM	40,8 µM	TD	AT
706-2b	AT	AT	TD	TD	TD	AT
706-2f	TD	AT	TD	TD	TD	TA
706-2g	TD	AT	TD	TD	TD	TD
706-2h	AT	AT	TD	AT	TD	AT
706-2J	TD	AT	TD	TD	TD	TD
706-2p	31,9 µM	9,5 µM	AT	AT	AT	9,3 µM
706-2s	84,7 µM	58,5 µM	TD	TD	AT	57,4 µM

AT: Az Toksik %80-% 60 (Tüm derişim ve zaman dilimlerinde en az bir defa % 60 hücre canlılığına inenler), **TD** : %100- % 80 hücre canlılığı aralığında olanlar (Tüm derişim ve zaman dilimlerinde en az bir kez % 80 hücre canlılığına inenler) IC_{50} değerleri: % 50 nin altında hücre ölümüne neden olan derişim hesabı yapılanlar [74].

4.3 Nitro Gruplu Bileşiklerin Ssap-NTR Enzimiyle Reaksiyonu Sonrası Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi - Hücre Dışı Reaksiyon Deneyleri

Bölüm 4.12' de sonuçları verilen toksisite çalışmaları sonrasında kendileri zehirli olmayan yani ilaç öncül olma kapasitesi olan bileşikler

belirlenmiştir. Ancak bu bileşiklerin, enzim aktivite çalışmaları ile substrat olma potansiyeli Tübitak 113Z706 nolu proje kapsamında belirlenmiştir. Bu bağlamda zehirli etki gösteren bileşikler dâhil olmak üzere tüm bileşikler reaksiyon denemelerine tabi tutulmuştur (1001 sonuç raporu). Bu bileşikler Gebze Teknik Üniversitesi tarafından *E.coli*'de ifade ettirilip saflaştırılmış ve tarafımıza gönderilmiş Ssap-NtrB enzimi ile dışarıda reaksiyona sokularak hücreler üzerine uygulanmıştır. Bu enzim Dr. Ayhan Çelik ve ekibi tarafından *S. Saprophyticus* organizmasından izole edilip saflaştırılmış, bir nitroredüktazdır [20]. Bu çalışmada karaciğer kanseri hücreleri kullanılmıştır. Yapmış olduğumuz toksisite analizlerini değerlendirdiğimiz zaman hepatoma hücrelerinin daha az dirençli özellikte oldukları belirlenmiştir. Bu özellikten dolayı hücre dışı reaksiyon deneylerinde bu hücre soyu çalışılmıştır. Hücre dışı reaksiyon denemeleri Bölüm 3.2.1.7 ile belirtildiği gibi yapılmıştır.

Hücre dışı reaksiyon deneyleri gerçekleştirilirken, klinik denemelere geçmiş olan CB1954 bileşiği karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Eğer yapılan denemede CB1954 ile yarışabilir seviyede bir madde belirlenirse, yeni bir ilaç öncülü aday molekülün ortaya çıkması sağlanacaktır. CB1954 bileşiğinin reaksiyon denemeleri Çizelge 3.6 ile gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Kontrol1 olarak belirtilen denemelerde sadece substrat uygulanmıştır. Hiçbir madde uygulanmayan ancak substratın uygulandığı DMSO miktarı uygulanan hücrelerde NT olarak isimlendirilmiştir.

Hücre dışı reaksiyon deneyleri 2 basamaklı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1) Birinci basamakta, % 50 inhibisyon değerinin hesaplanabilmesi için, 150, 39 ve 9 μ M olacak şekilde 3 farklı derişimde çalışmalar başlanmıştır. Bu grup çalışmasında sadece kontrol grubu olarak substratın kullanıldığı Kontrol 1 tercih edilmiştir. NT grubu da DMSO kontrolü olarak dâhil edilmiştir.
- 2) İkinci basamakta ise, ayrıntılı IC₅₀ denemelerinde doygunluğa ulaşan bileşikler fark edilmiştir. Bazı bileşiklerin de K1 denemelerinde zehirli etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu nedenle daha az substrat uygulamasının reaksiyon denemelerinde fark oluşturabileceği hipotezinden yola çıkarak tüm bileşikler 3 alt

derişimde (180 nM, 18 nM ve 1,8 nM derişimler) hücre dışı denemelere götürülmüştür. Kontrol grubu olarak 180 nM sadece substrat uygulaması da denemiştir (Şekil 4.34 - 4.45 arası).

Sitotoksitate analizleri sonucunda seçilerek 3 farklı derişimde CB1954 ile yarışır halde reaksiyona sokulan Ssap-NtrB ve ilaç öncü bileşimlerine ait grafikler aşağıda verildiği gibidir.

Üç derişimde de CB1954 'e göre karşılaştırmalı sitotoksitelerine bakılmıştır. Bazılarının Kontrol 1 gruplarının kendilerine zehirli etki gösterdikleri anlaşılmaktadır. Sonuçların ifadesi % hücre canlılığı ile gösterilmiştir. Buna göre aşağıdaki formüle göre % hücre canlılığı hesaplamıştır.

Formül ;

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = (\text{Madde Ortalama} / \text{Kontrol Ortalama}) * 100$$

4.3.1 754-3 Serisi Bileşiklerin Ssap-NTR Enzimiyle Reaksiyonu Sonrası Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

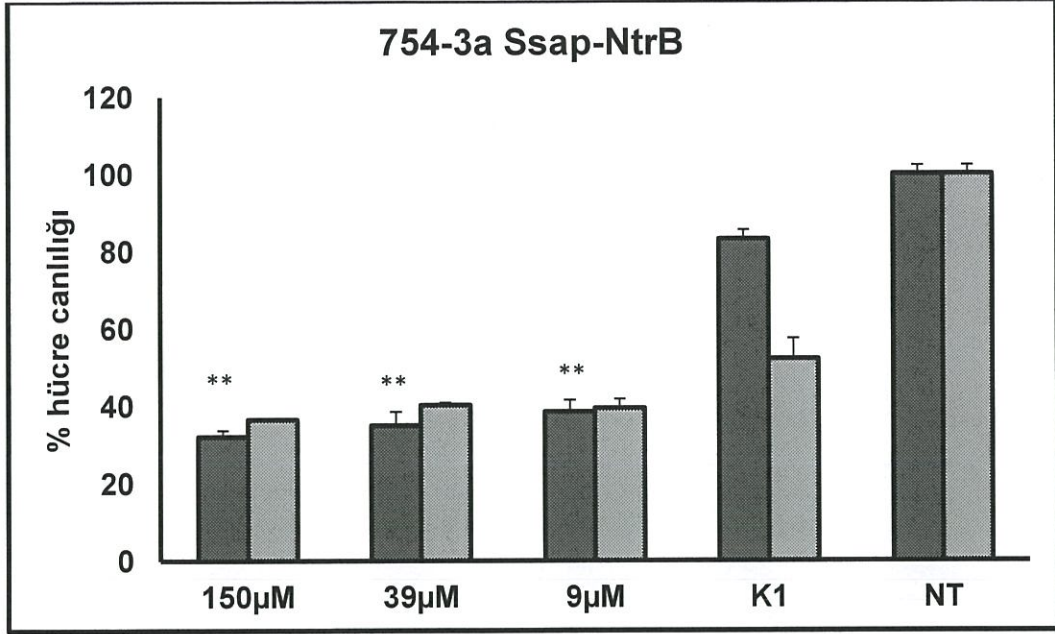
Buna göre, 754-3a maddesine ait hücre dışı reaksiyon denemesi sonucunda *in vitro*'daki reaksiyon denemeleri CB1954 bileşiği ile yarışır seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23).

754-3b, 754-3c, 754-3d, 754-3e, 754-3f, 754-3g, 754-3i, 754-3j, 754-3k maddelerine ait enzim etkileşimi denemesinin sonucunda bu maddelerin ilaç öncülü olabilme kapasitesinin zayıf olduğu anlaşılmıştır. Bu maddeler CB1954 kadar reaksiyon toksisiteyi göstermelerine rağmen, Kontrol1 'lerinde sadece substrat uygulamalarından elde edilen zehir etkisinin devam ettiği gözlemlenmiştir. Bu kapsamda ilaç öncülü olma potansiyelleri zayıf olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.24 – Şekil 4.33).

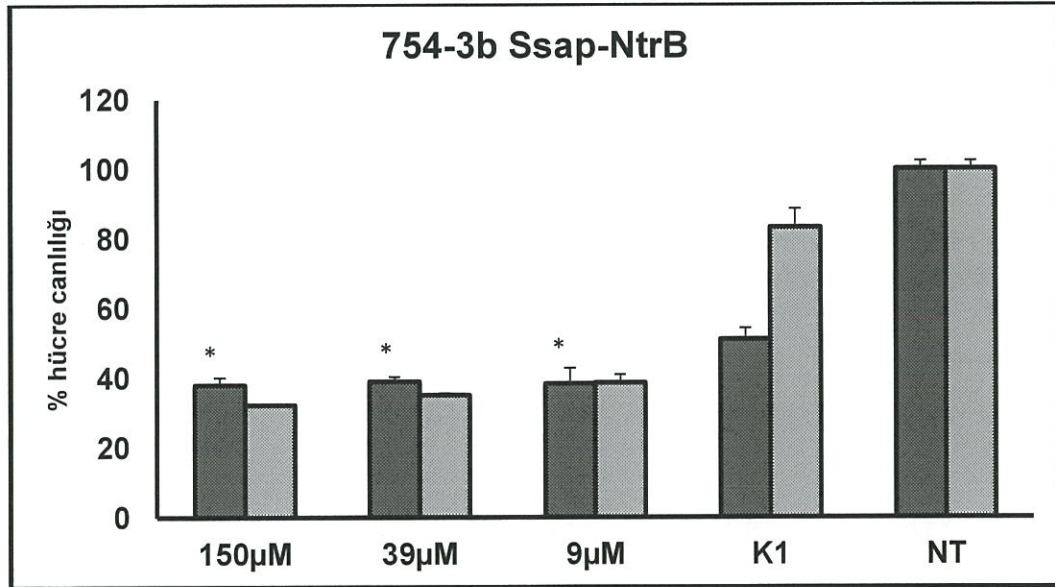
Yüksek derişimdeki denemelerinde CB1954 ile yarışabilir durumda olduğu belirlenen ancak, kontrol 1 denemelerinde substrattan gelen (150µM) zehirli etkileri devam eden tüm bileşiklerin düşük derişim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Düşük derişimlerde bileşiğin zehirli etkisinin de az olacağı hipotezi ile tüm bileşikler düşük derişimlerde reaksiyona tabi tutulmuştur. Bu bileşiklerin enzim / substrat denemelerinde substrat olabilme potansiyelleri yüksek bulunduğu için bu denemeler yapılmıştır. Ancak Kontrol 1 denemelerinde, sadece 180 nM substrat uygulanmıştır.

Bu deney planında aynı sistem yukarıda açıklandığı üzere CB1954 ile de gerçekleştirilmiştir.

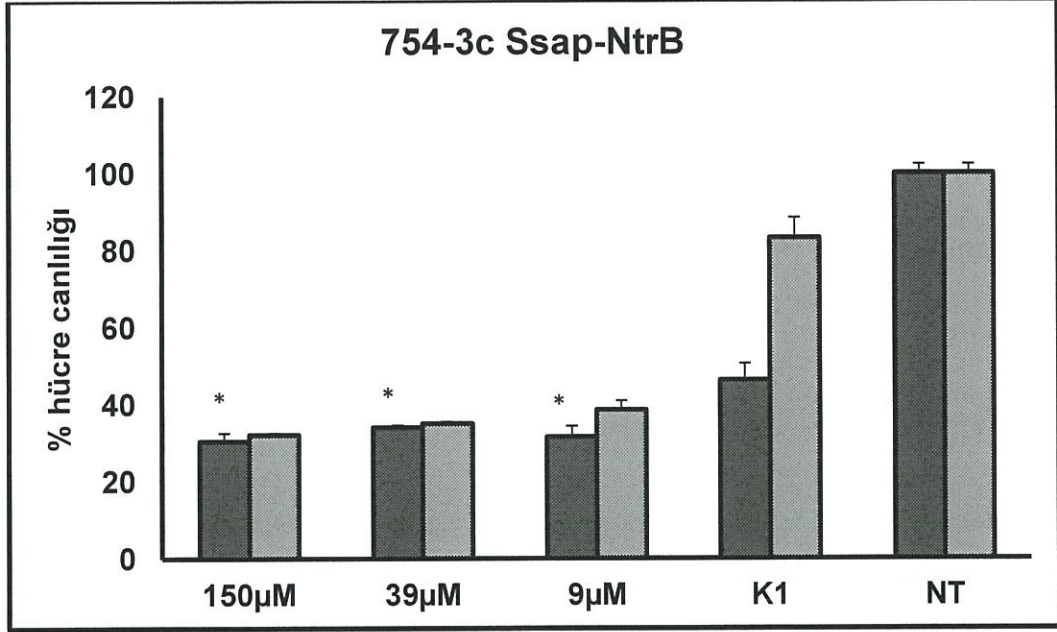
754-3a, 754-3b, 754-3c, 754-3e, 754-3g, 754-3i, 754-3i' ve 754-3k maddelerinin düşük derişimde hücre dışı denemelerde yeterince hücre ölümüne neden olmadığı ve IC₅₀ değerleri hesaplanamadığı görülmüştür (Şekil 4.23- Şekil 4.33) .



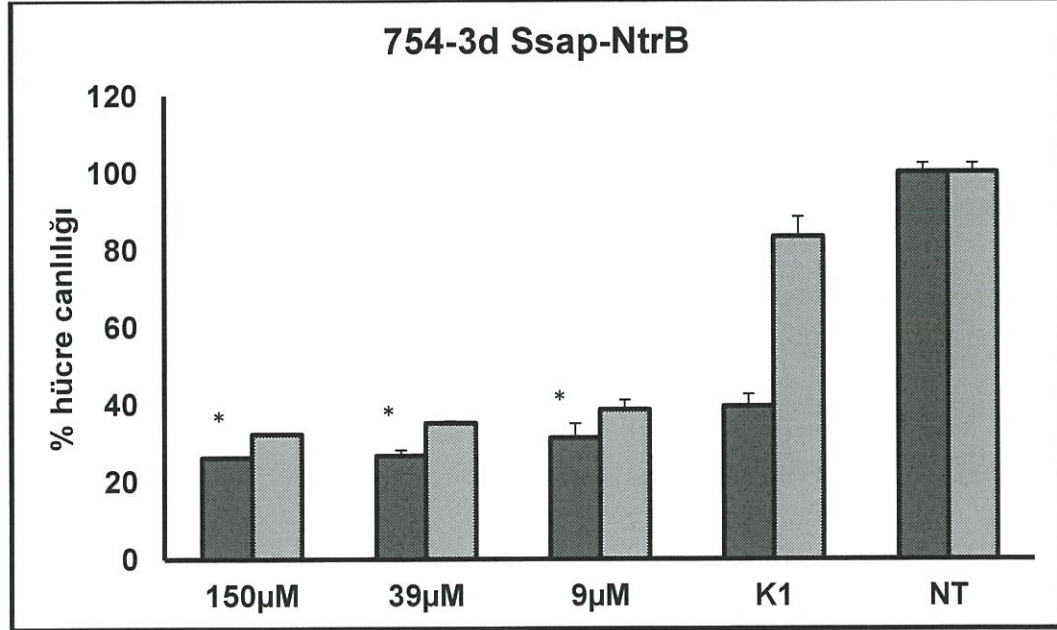
Şekil 4.23: 754-3a maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



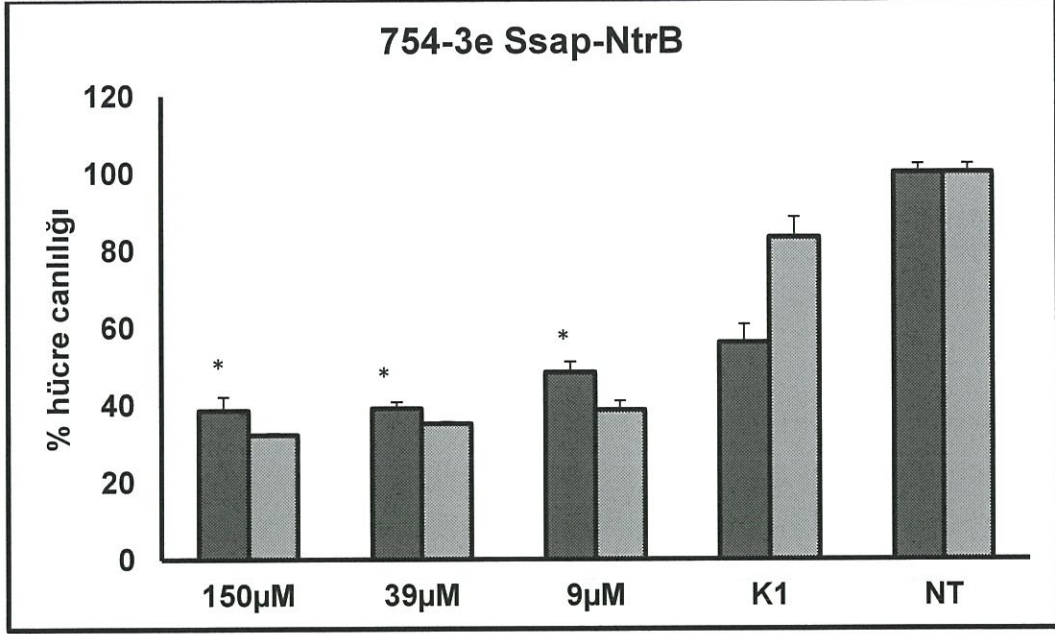
Şekil 4.24: 754-3b maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



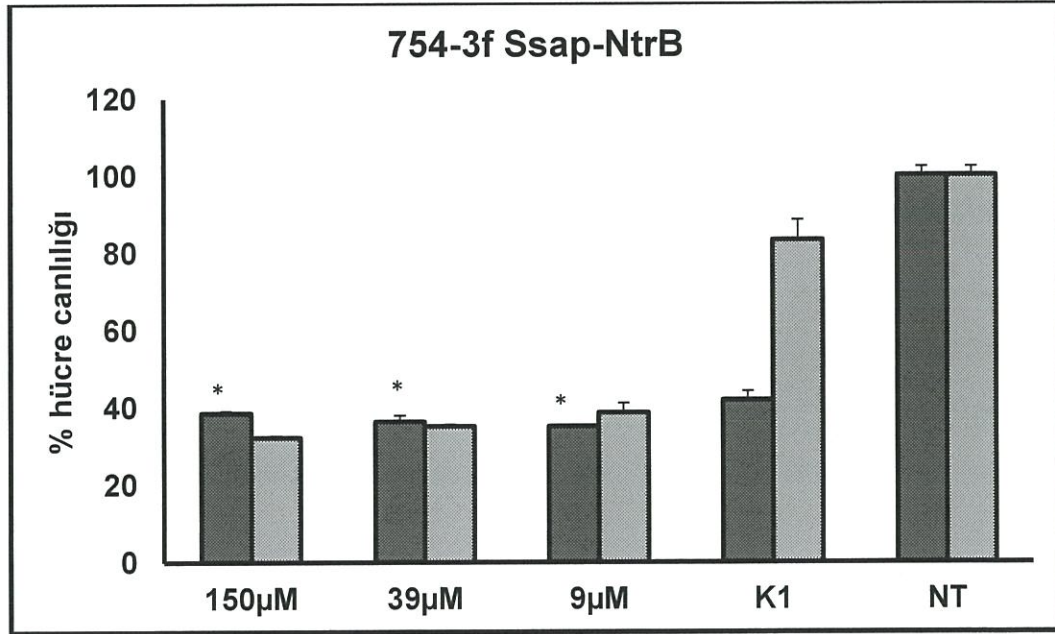
Şekil 4.25: 754-3c maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



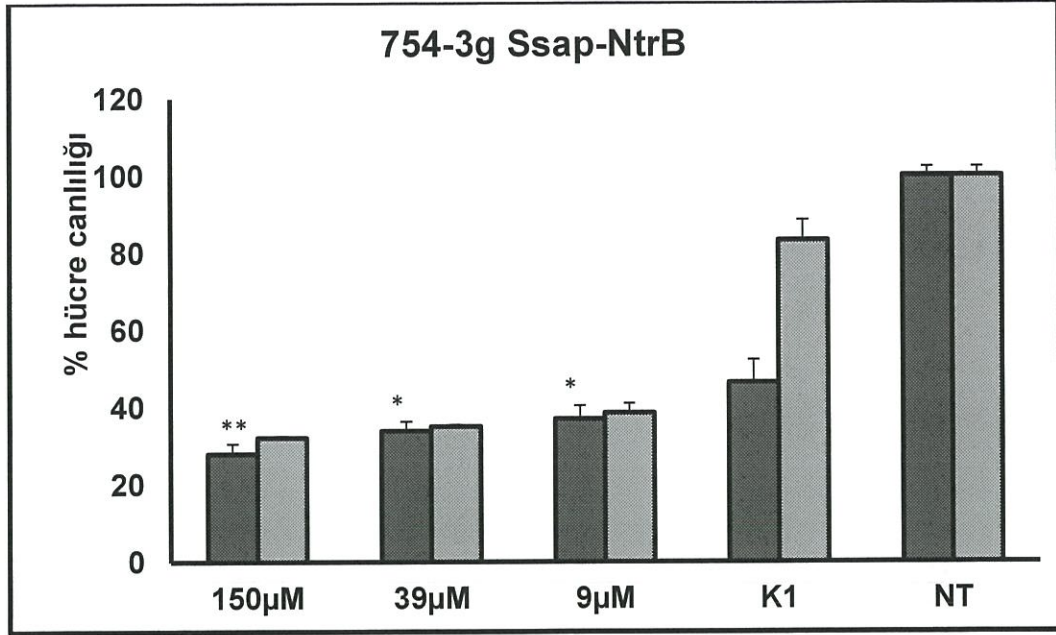
Şekil 4.26: 754-3d maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



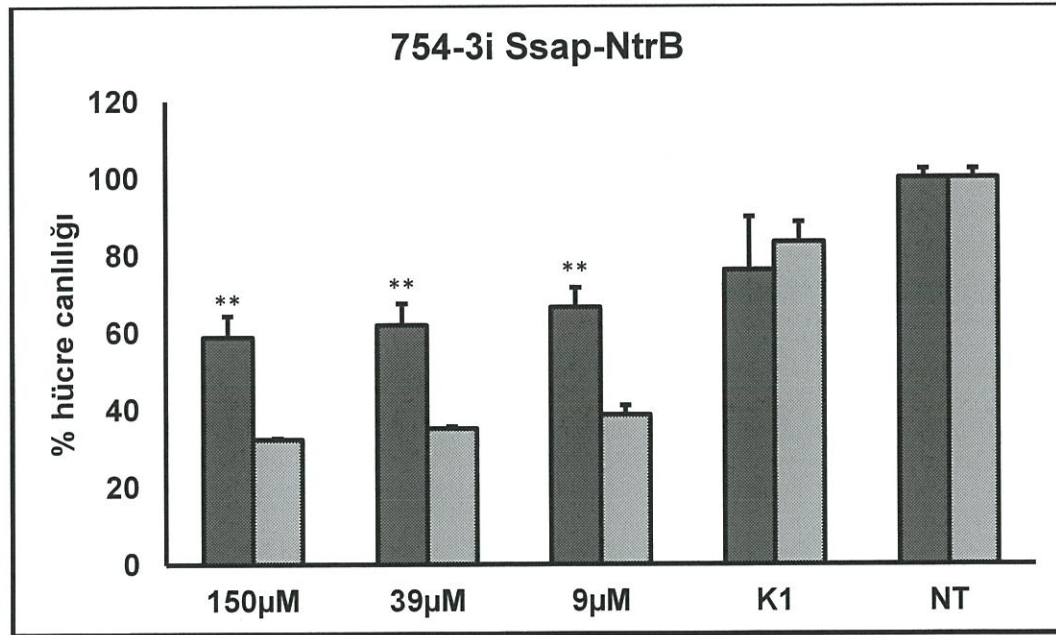
Şekil 4.27: 754-3e maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



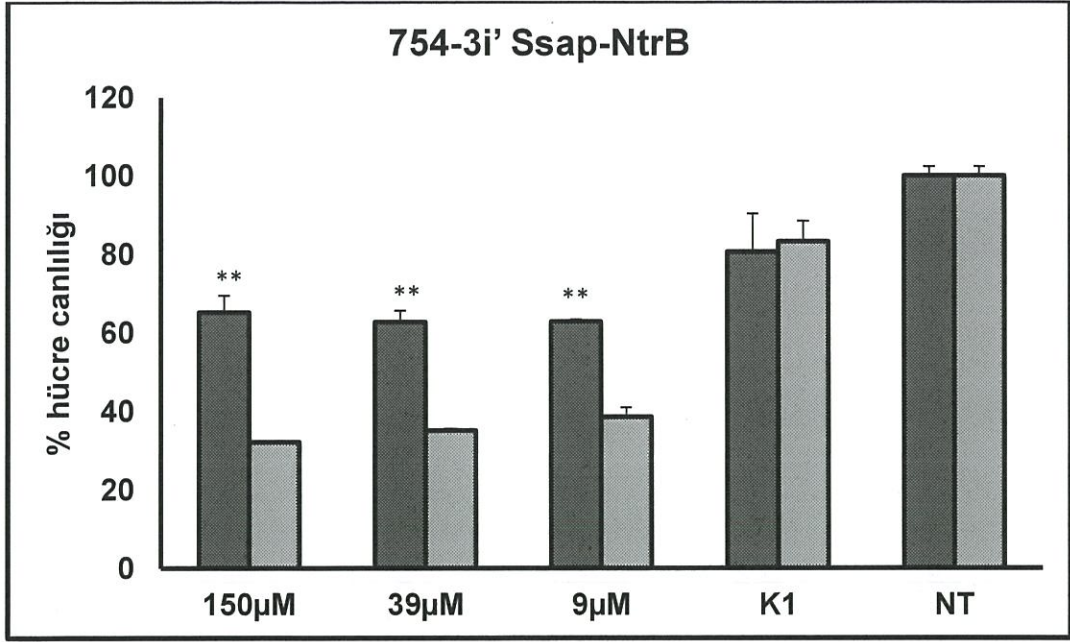
Şekil 4.28: 754-3f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



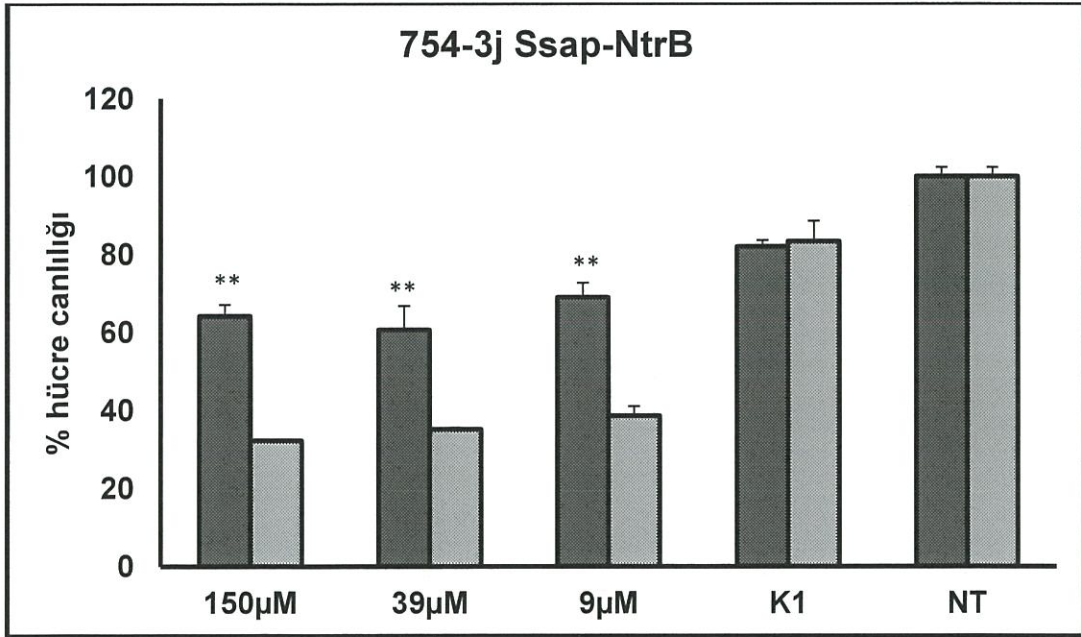
Şekil 4.29: 754-3g maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



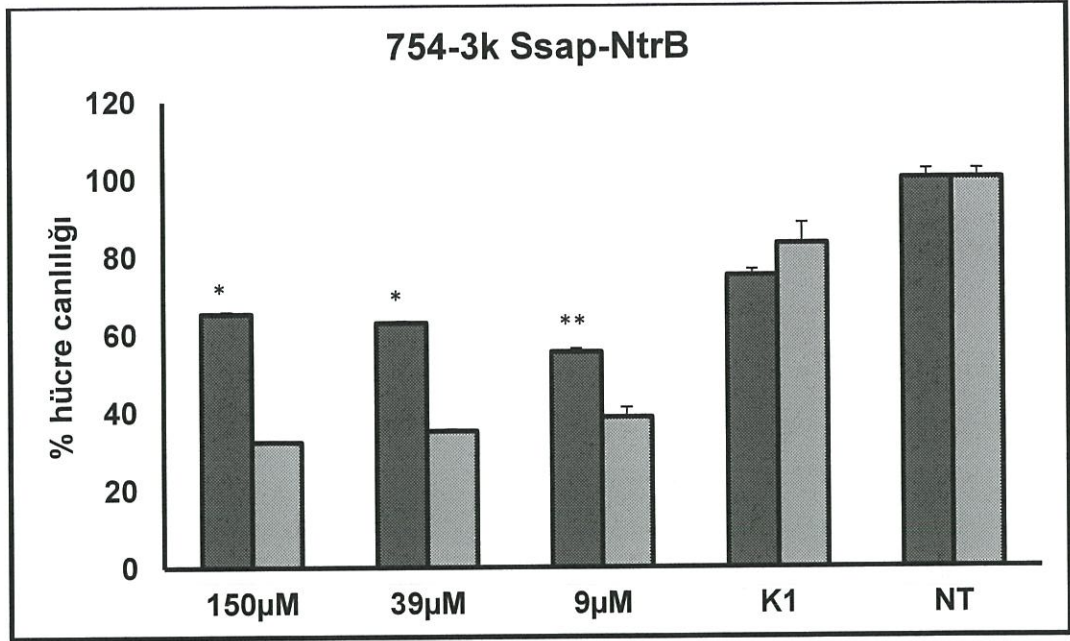
Şekil 4.30: 754-3i maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



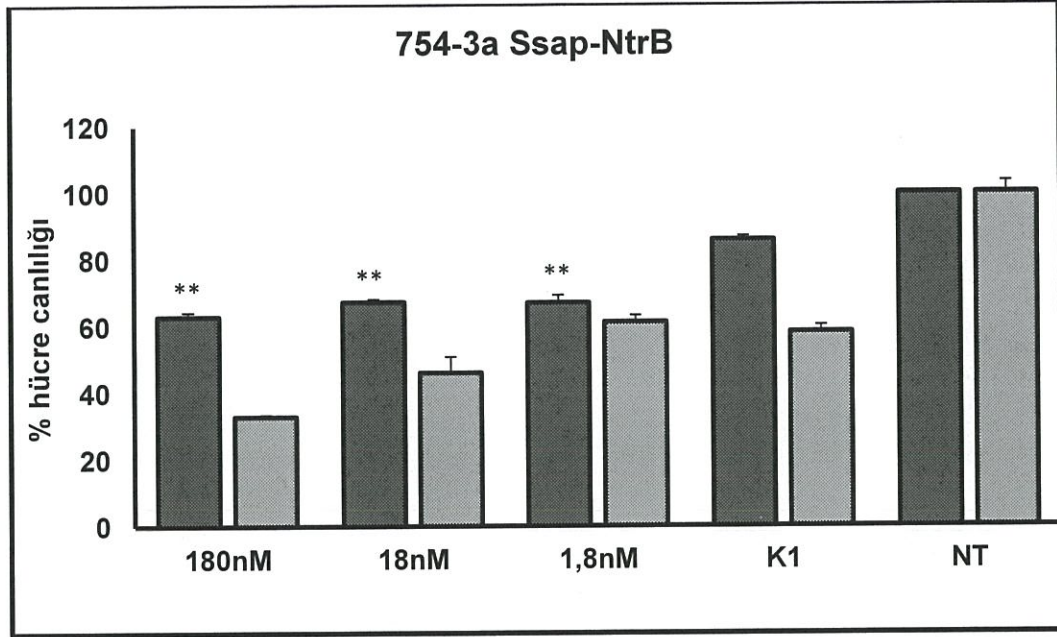
Şekil 4.31: 754-3i' maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



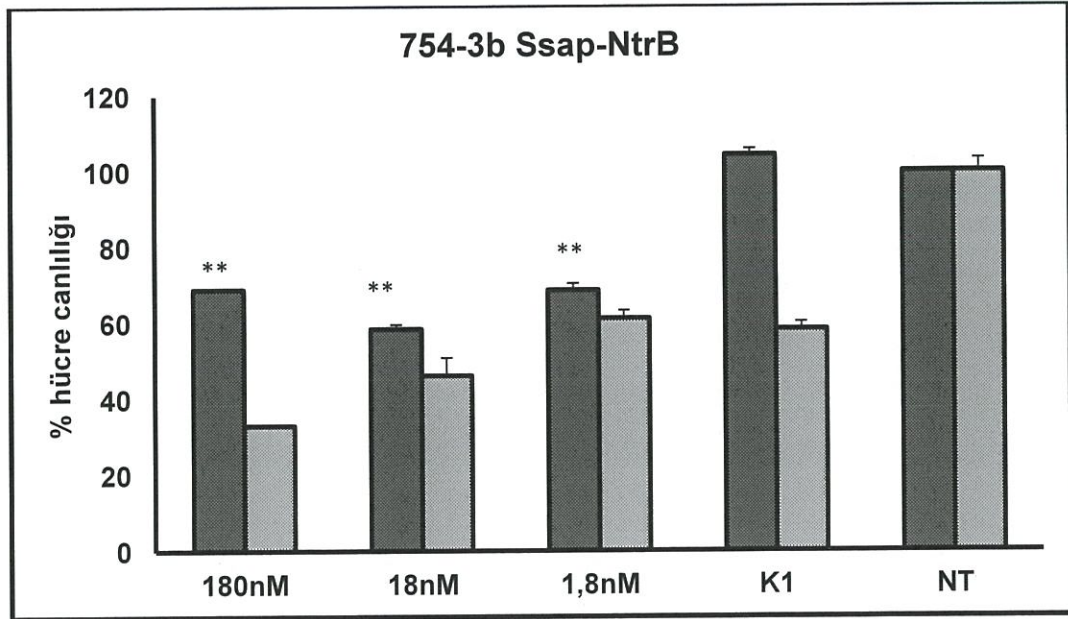
Şekil 4.32: 754-3j maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



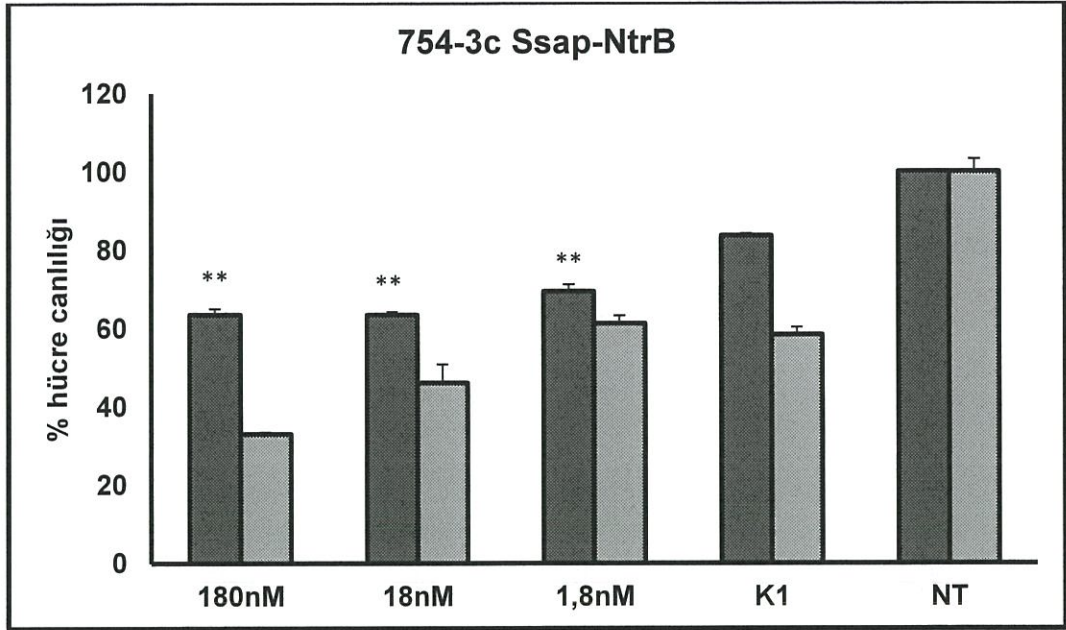
Şekil 4.33: 754-3k maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954)



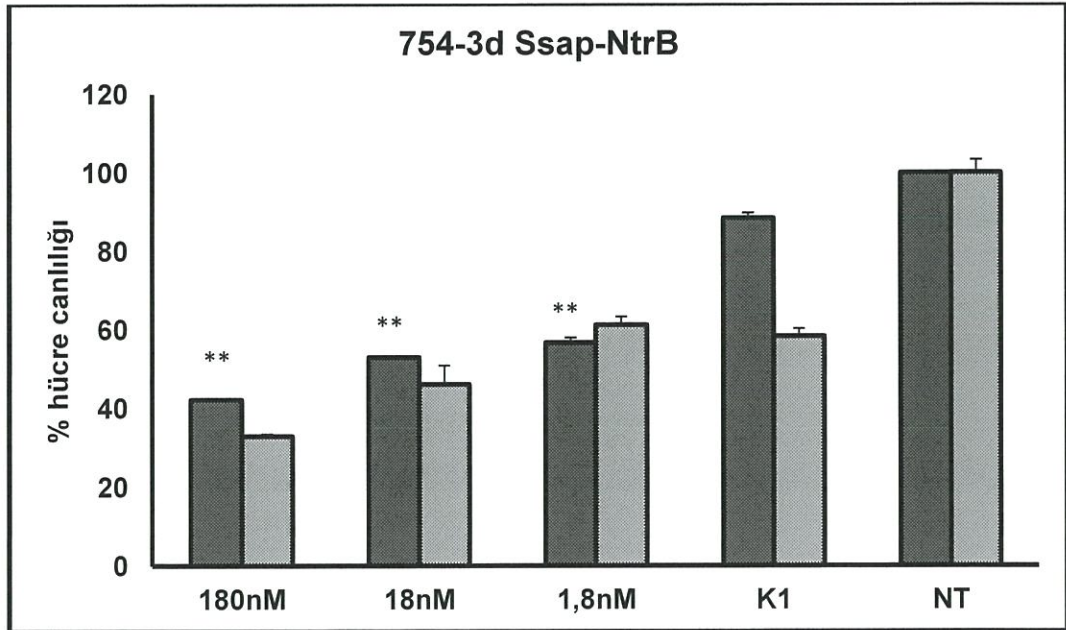
Şekil 4.34: 754-3a maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



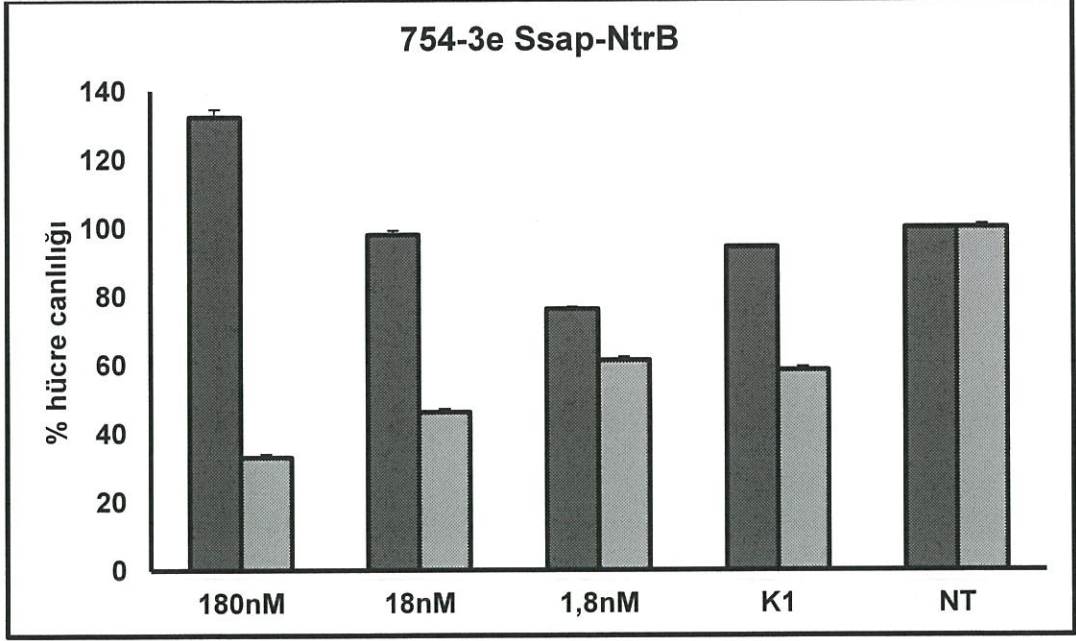
Şekil 4.35: 754-3b maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



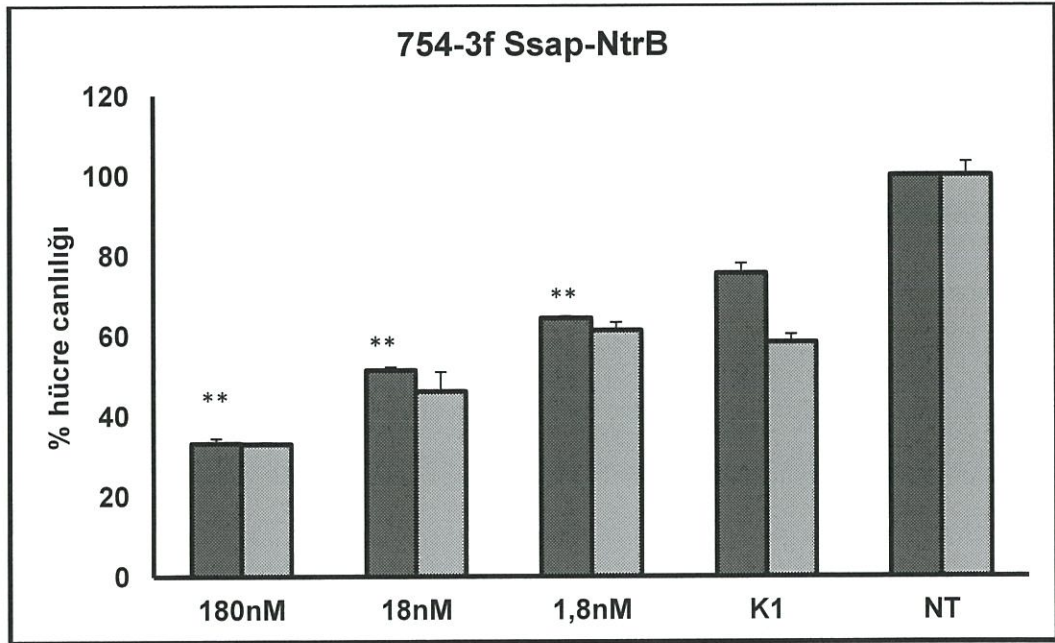
Şekil 4.36: 754-3c maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



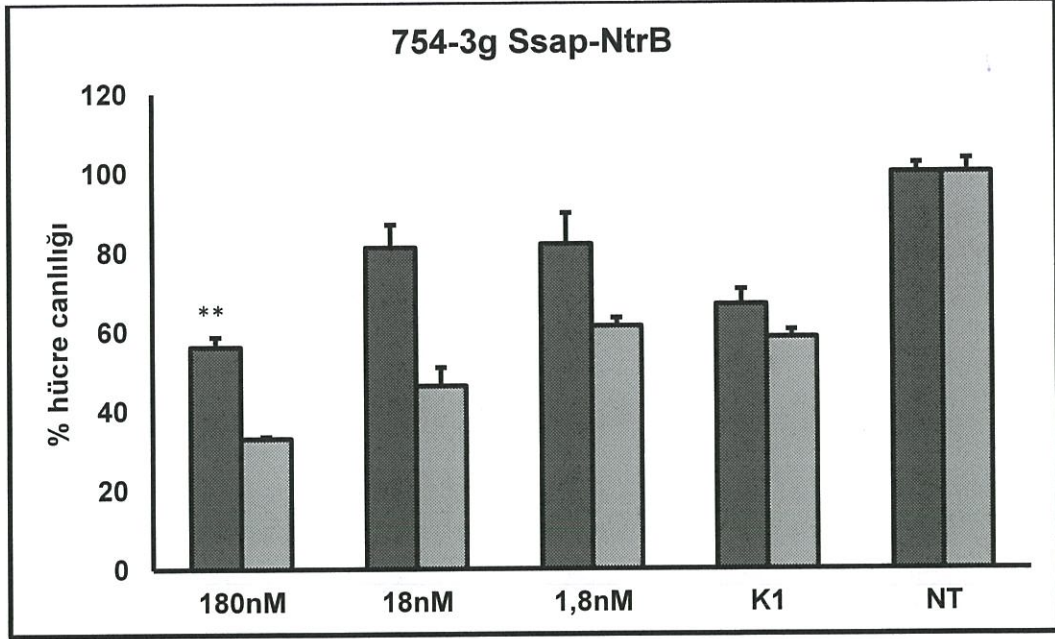
Şekil 4.37: 754-3d maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



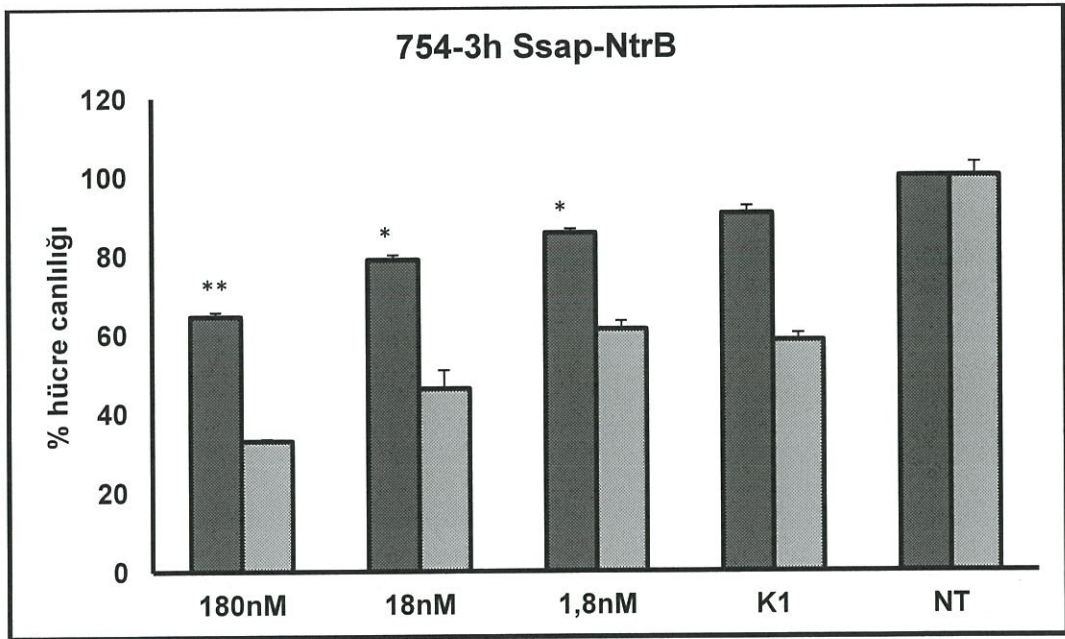
Şekil 4.38: 754-3e maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



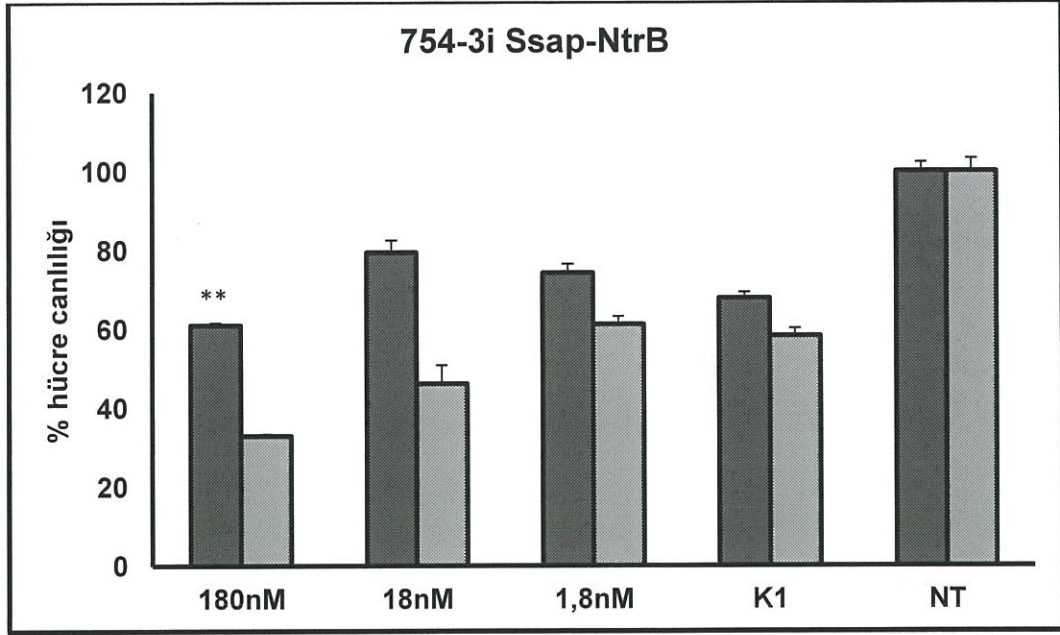
Şekil 4.39: 754-3f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



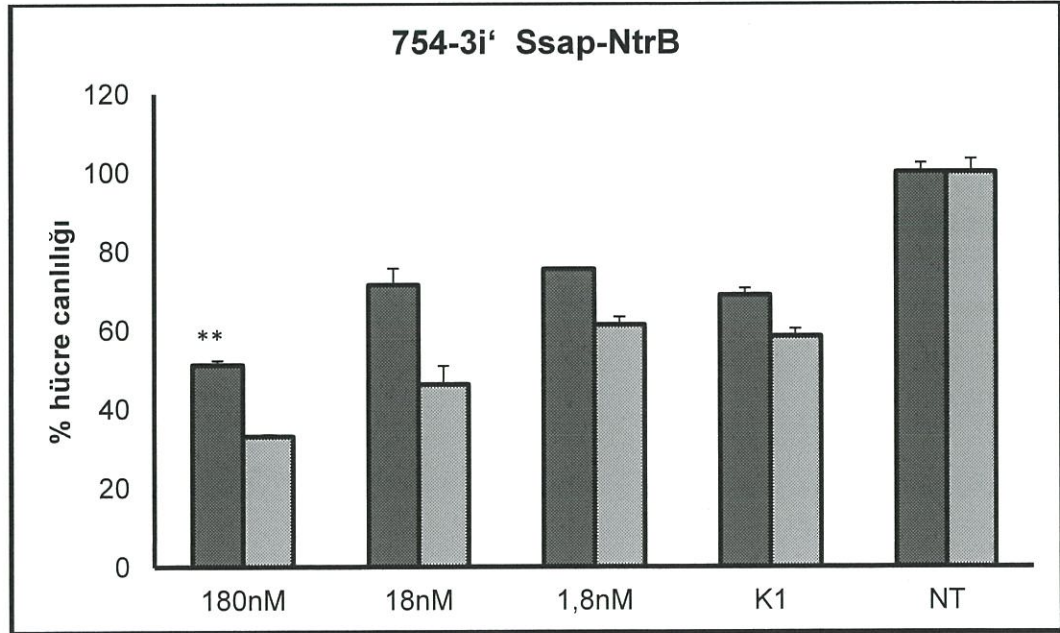
Şekil 4.40: 754-3g maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



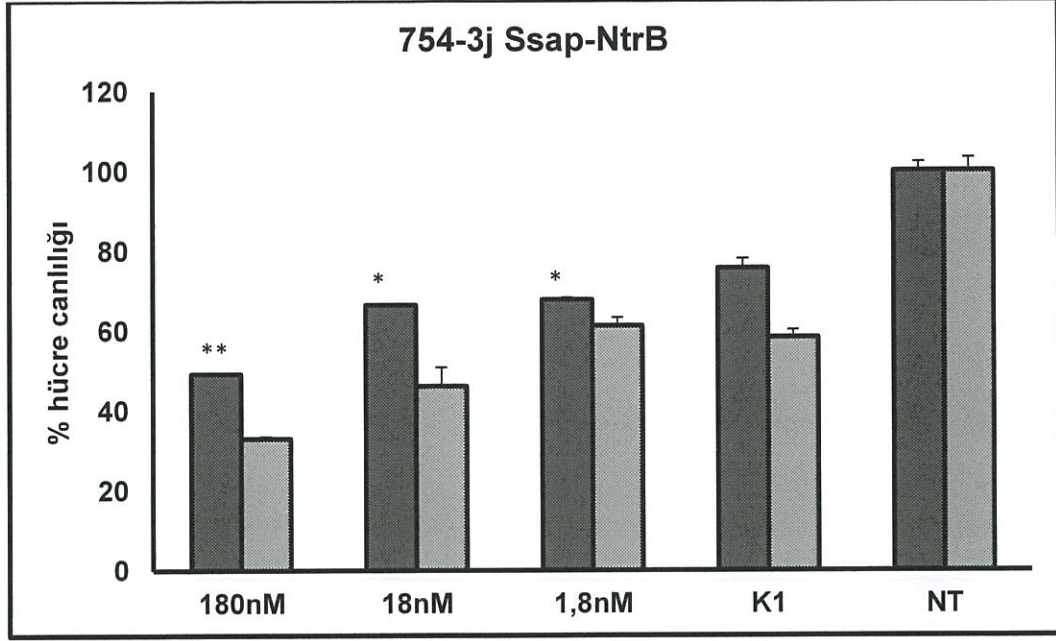
Şekil 4.41: 754-3h maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



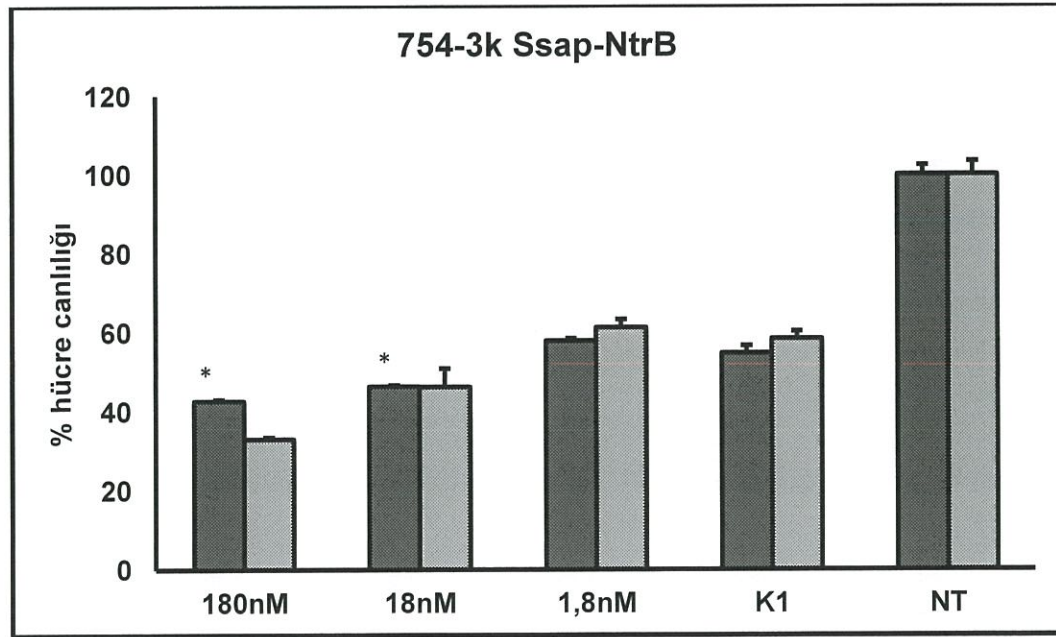
Şekil 4.42: 754-3i maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.43: 754-3i' maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.44: 754-3j maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.45: 754-3k maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)

4.3.2 706-2 Serisi Bileşiklerin Ssap-NTR Enzimiyle Reaksiyonu Sonrası Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

706-2 serisi bileşikler de hücre dışı reaksiyon deneylerine tabi tutulmuştur. Yukarıda açıklandığı üzere, klinik denemere geçmiş, CB1954 bileşiği karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Bu şekilde CB1954 ile yarışabilir seviyede bir madde belirlenmesi amaçlanmıştır. CB1954 bileşiğinin reaksiyon denemeleri Çizelge 3.6 gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Kontrol1 olarak belirtilen denemelerde sadece substrat uygulanmıştır. Hiçbir madde uygulanmayan ancak substratın uygulandığı DMSO miktarı uygulanan hücrelerde NT olarak isimlendirilmiştir.

Aynı 754- 3 serisi bileşikler için kullanılan 2 aşamalı hücre dışı denemeleri bu seri için de gerçekleştirilmiştir.

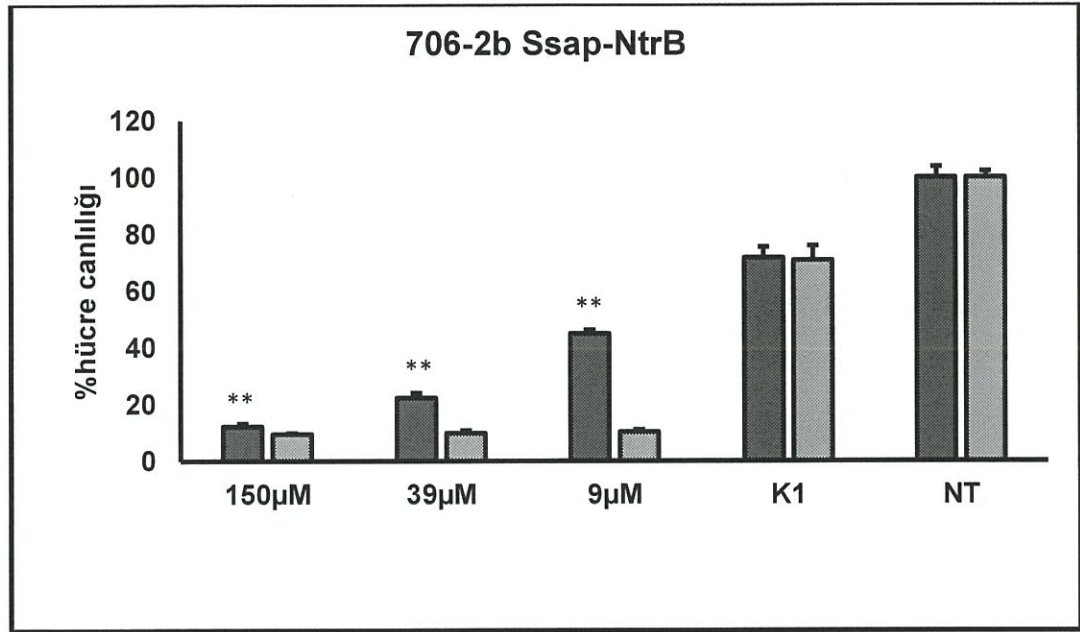
- 1) Birinci basamakta, 150, 39 ve 9 μ M olacak şekilde 3 farklı derişimde çalışmalar başlanmıştır. Kontrol grubu olarak sadece substratın kullanıldığı Kontrol 1 ve DMSO kontrolü olarak NT dâhil edilmiştir.
- 2) İkinci basamakta ise, daha az substart uygulamasının reaksiyon denemlerinde fark oluşturabileceği hipotezinden yola çıkarak tüm bileşikler 3 alt derişimde (180 nM, 18 nM ve 1,8 nM derişimler) hücre dışı denemelere götürülmüştür. Kontrol grubu olarak 180nM sadece substrat uygulaması ve DMSO kontrolü olarak NT dâhil edilmiştir.

Sonuçlar % Hücre canlılığı garfifleri ile değerlendirilmiştir. Buna göre,

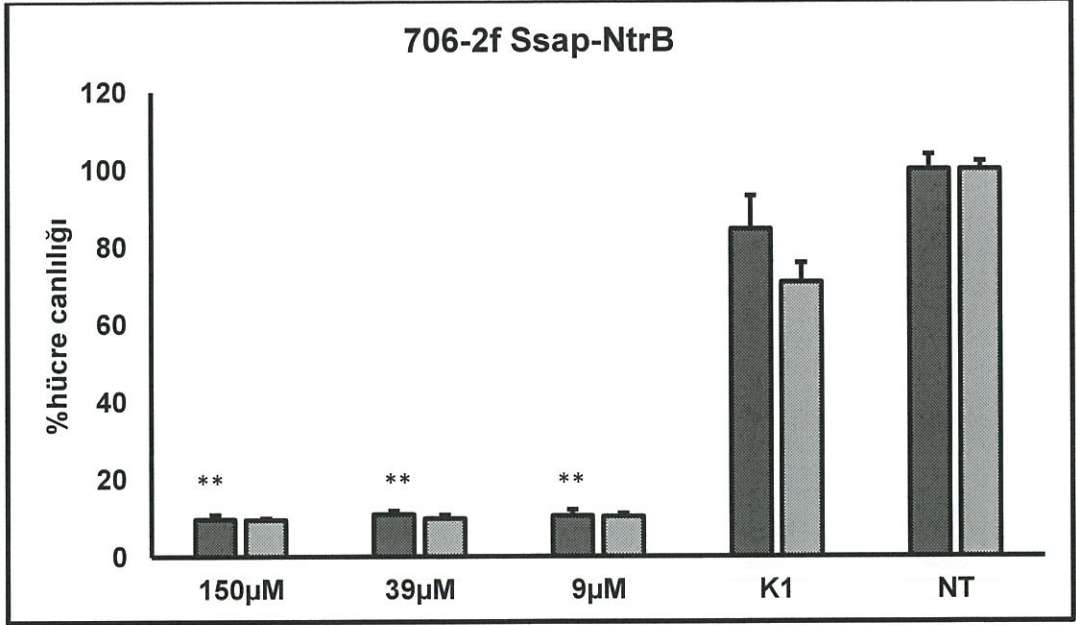
Buna göre, Yüksek derişimlerde, 706-2b, 706-2f 706-2g, 706-2i, 706-2j, 706-2k ve 706-2p maddelerine ait hücre dışı reaksiyon denemesi sonucunda *in vitro*'daki reaksiyon denemeleri CB1954 bileşiği ile yarışır seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24- Şekil 4.52).

Düşük reaksiyon denemelerine 180 nM, 18 nM ve 1,8 nM ile devam edilmiştir. Ancak, düşük derişim denemelerinde, IC_{50} değeri hesaplatacak zehirli etki gösterilememiştir (Şekil 4.53 – Şekil 4.59).

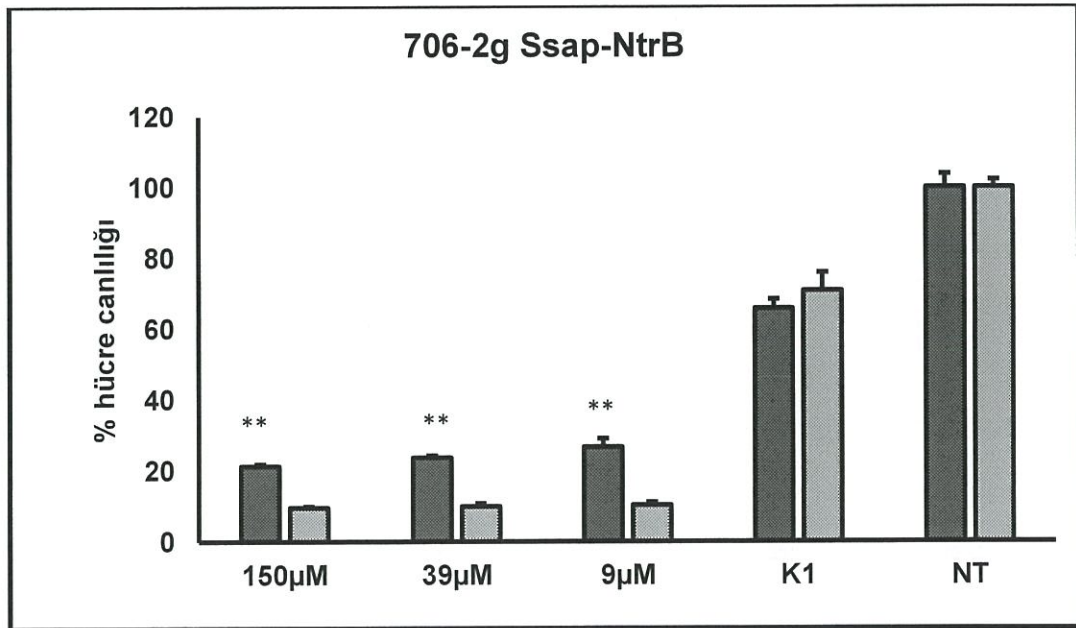
Yüksek derişimde denemeleri yapıldıktan sonra, uygulanan miktarlar düşürülerek nanomolar seviyelere getirilen diğer 706-2 serisi sonuçlarına baktığımız zaman; yüksek derişimde etkili bulunan bu bileşiklerin doz azalmasında aynı etkiyi göstermediği ve CB1954 ile yarışır halde olmadığı belirlendi.



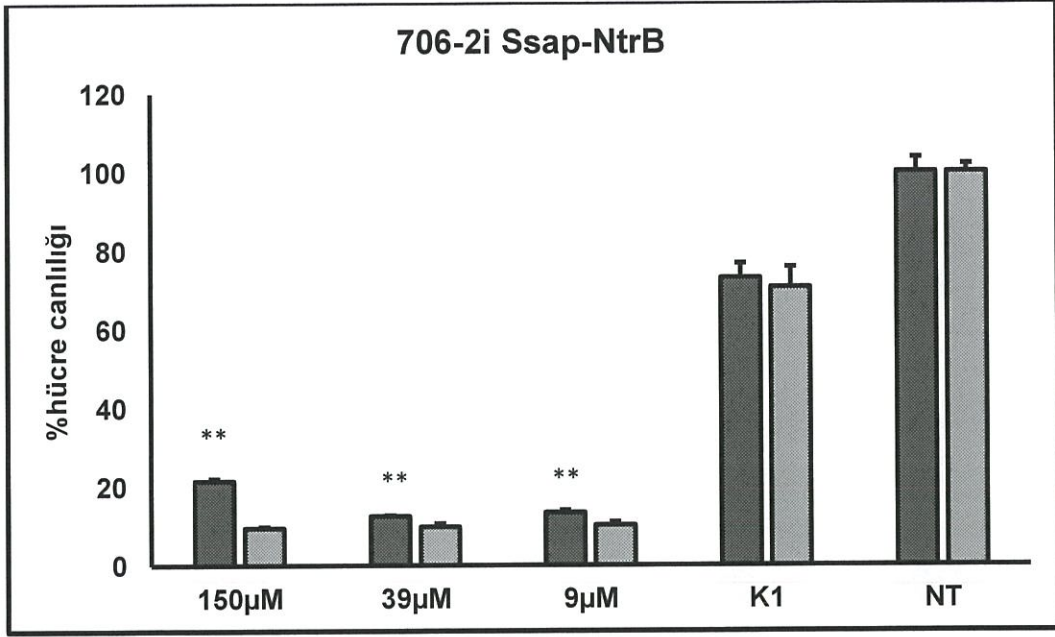
Şekil 4.46: 706-2a maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



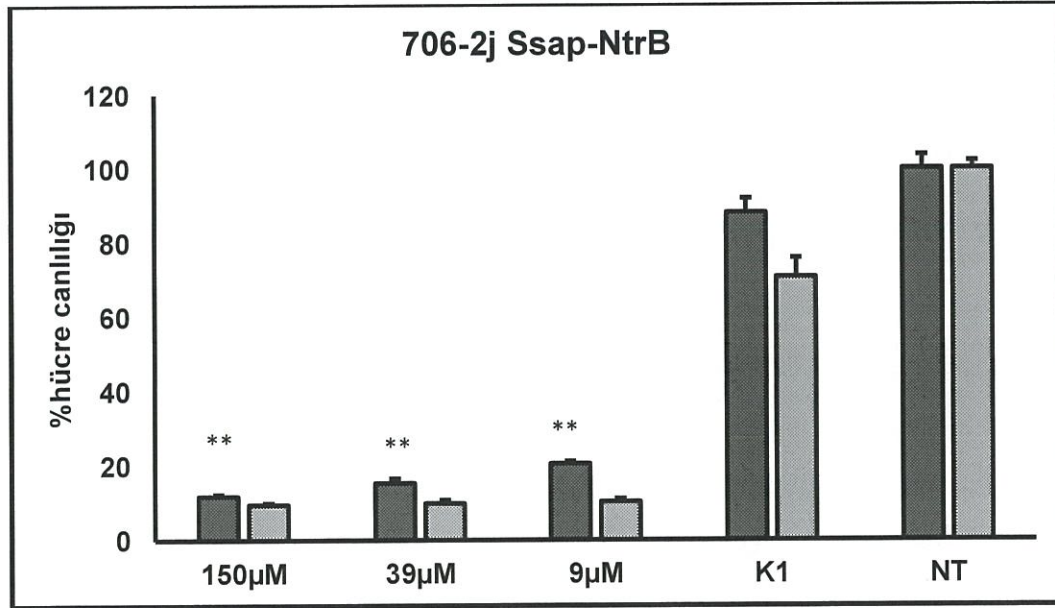
Şekil 4.47: 706-2f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



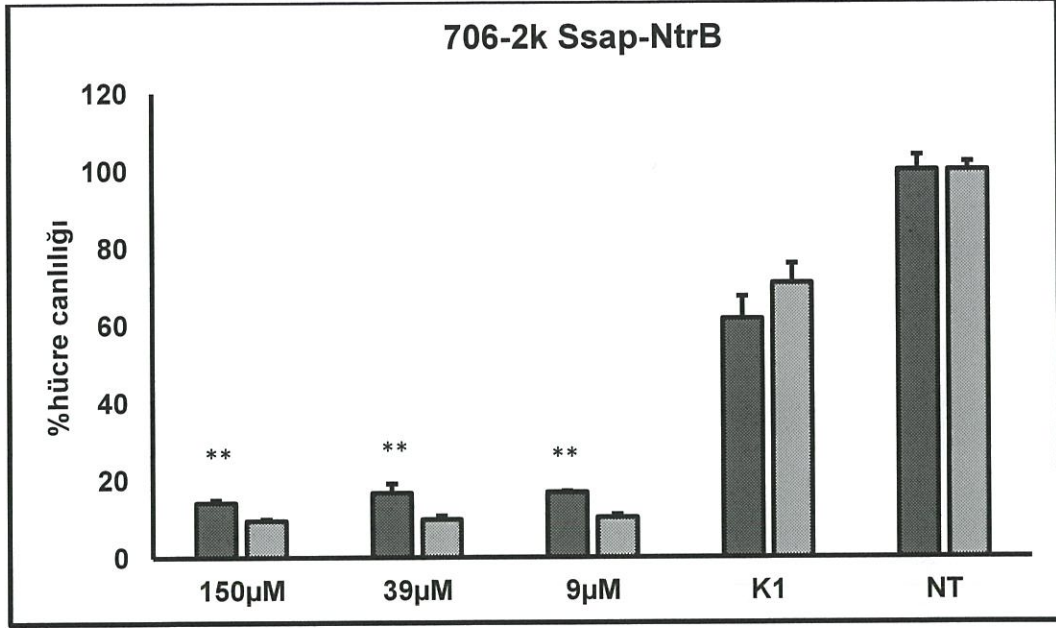
Şekil 4.48: 706-2g maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



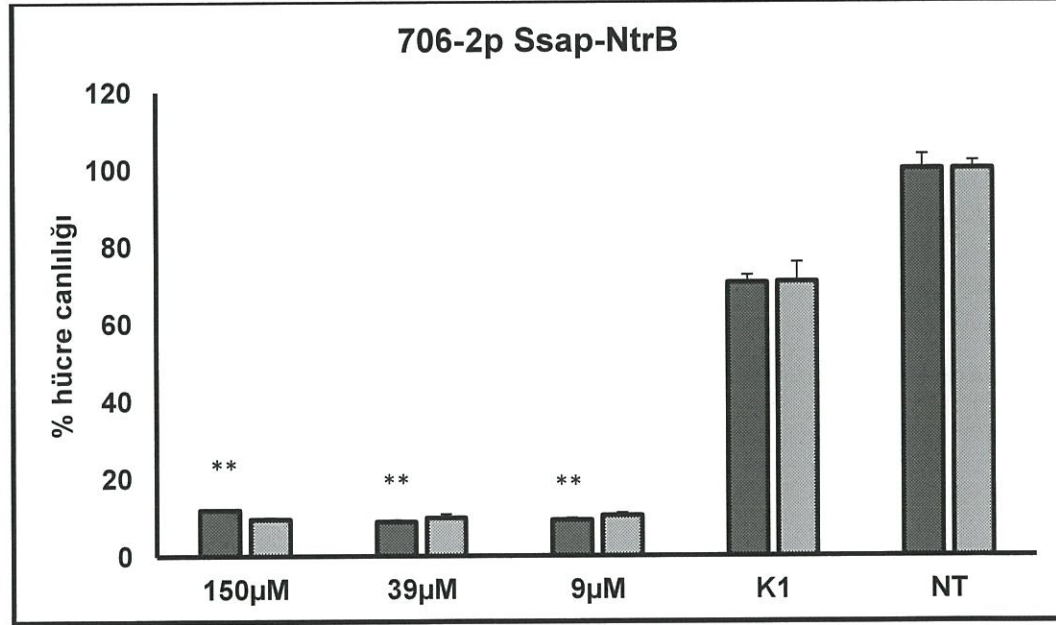
Şekil 4.49: 706-2i maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



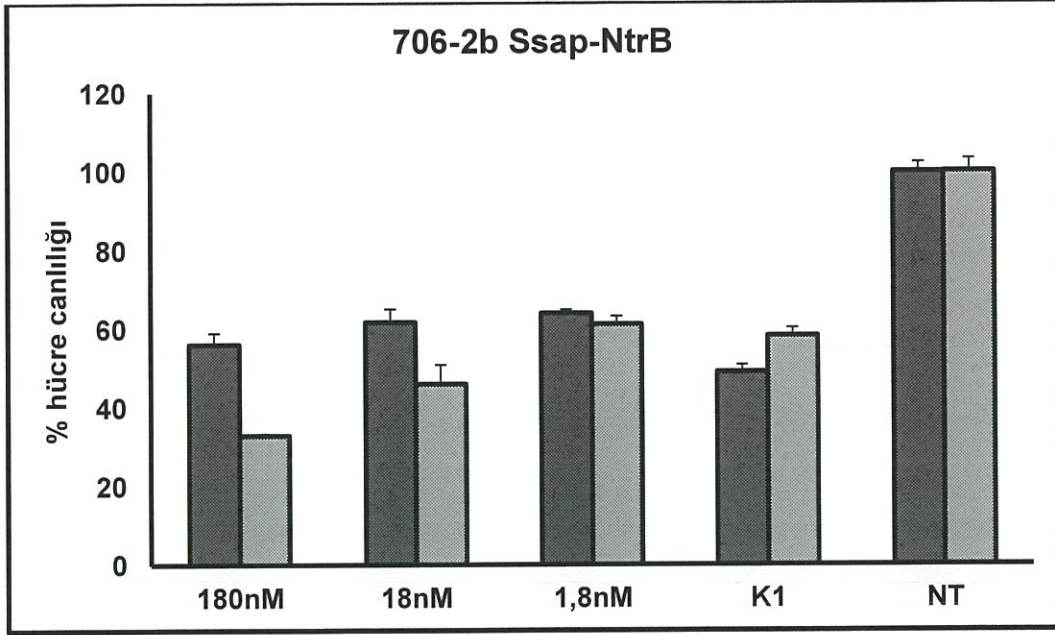
Şekil 4.50: 706-2j maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



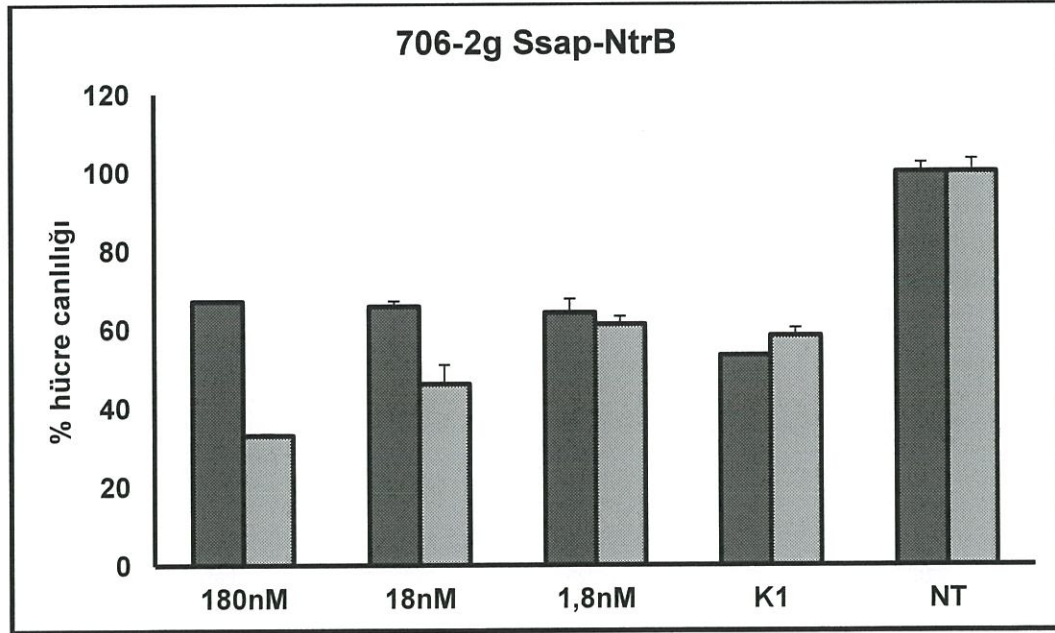
Şekil 4.51: 706-2k maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



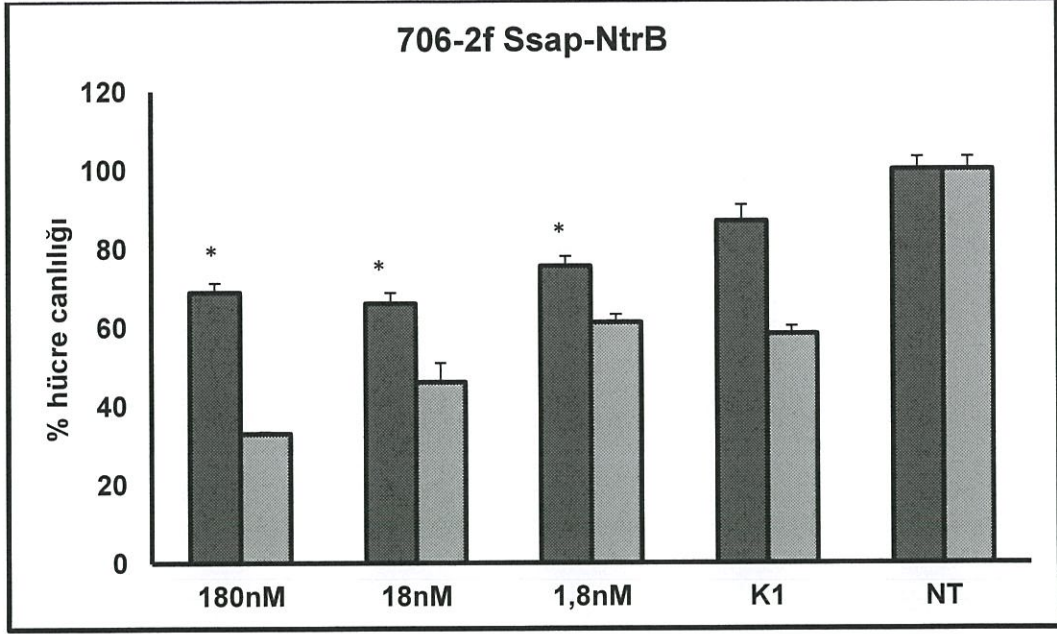
Şekil 4.52: 706-2p maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



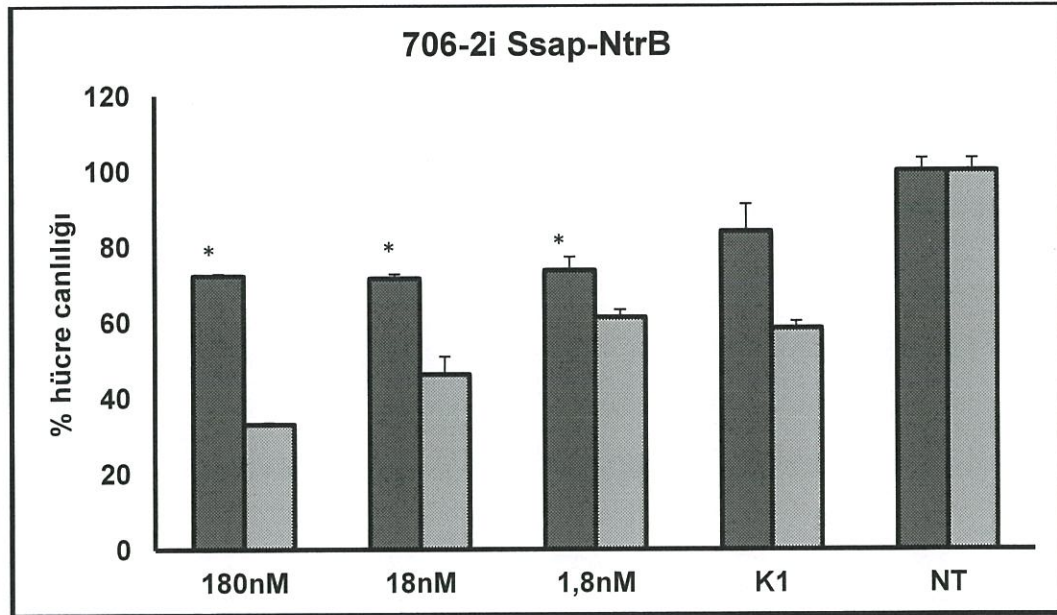
Şekil 4.53: 706-2b maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



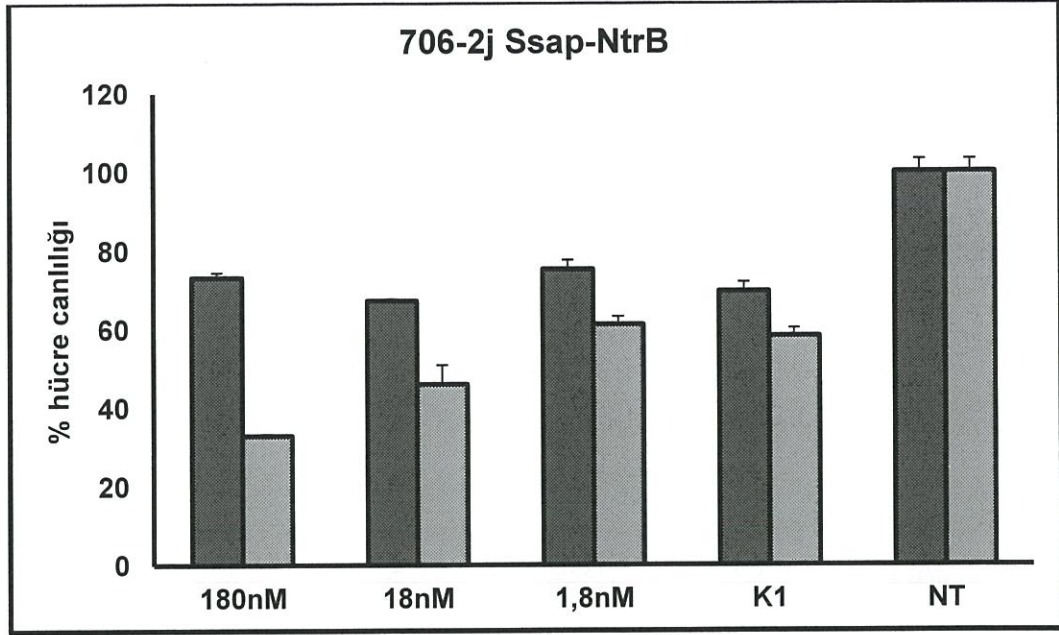
Şekil 4.54: 706-2g maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



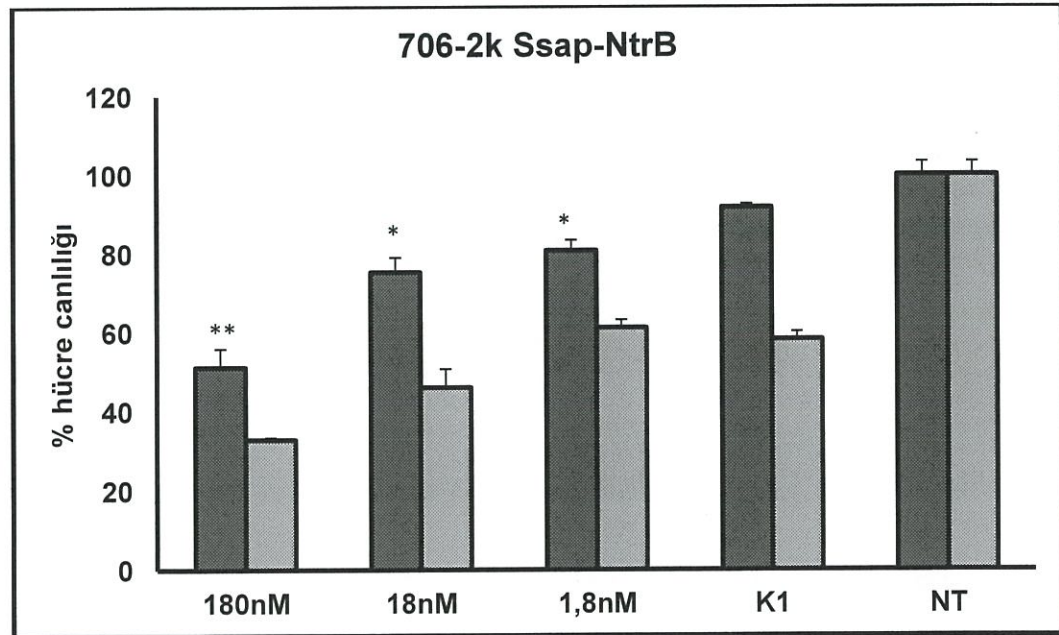
Şekil 4.55: 706-2f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



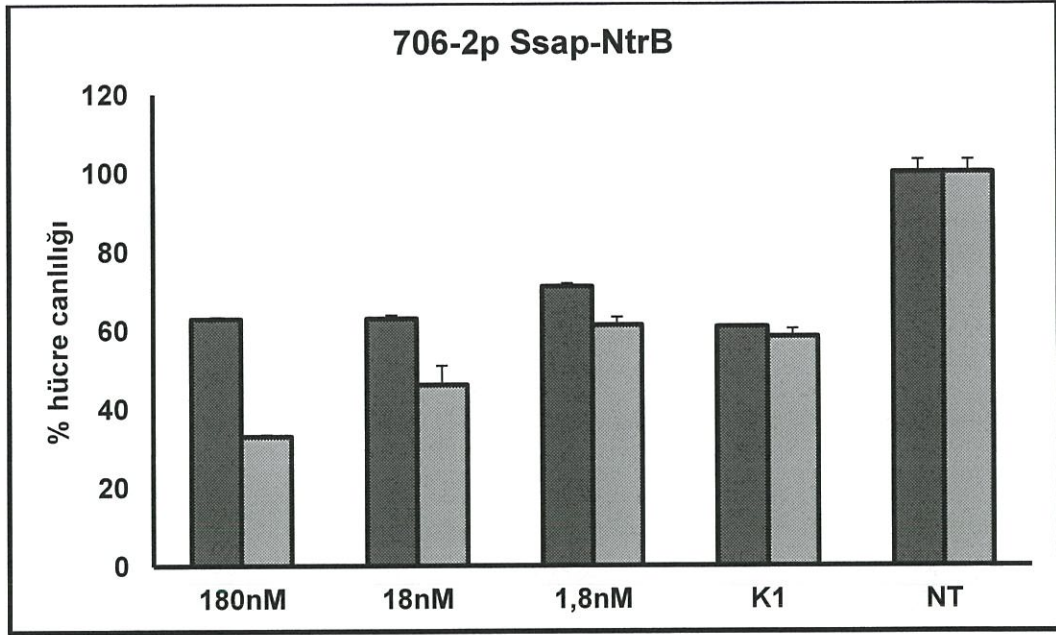
Şekil 4.56: 706-2f maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.57: 706-2j maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.58: 706-2k maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.59: 706-2p maddesinin Ssap-NtrB enzimi ile Hep3B hücrelerinde düşük derişimde hücre dışı reaksiyon sonucu. (Koyu gri: Madde, Açık gri: CB1954) ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)

4.4 Nitro Gruplu Bileşiklerin Ssap-NtrB Geni Taşıyan Hücrelerdeki Hücre Canlılığına Etkilerinin Belirlenmesi–Hücre İçi Reaksiyon Deneyleri

İntihar gen tedavisinin genel ilkesi olarak, ökaryot hücrelerimizde bulunmayan fakat sadece organizmaya gönderilecek ilaç öncüllerini işleyecek bir nitroredüktazın hücreye aktarılması gerekmektedir. Bu modeli taklit etmek üzere, Ssap-NtrB kaynaklı nitroredüktaz enzimini kodlayacak gen, insan kanser hücrelerine aktarılacaktır. İfade vektörü içinde aktarılan gen, hücrelerde transkripsiyon ve hücrenin protein sentezi birimi ile translasyona uğrayacaktır.

İlaç öncülleri NTR pozitif (NTR +) olarak adlandırılan bu vektörün geçici tranfeksiyonun ardından hücrelere uygulanacaktır. *In vitro* olarak hücre içinde kendiliğinden reaksiyona girecektir. Oluşan hücre ölümü gözlenecektir. Bu model hücre içi reaksiyon modeli olarak isimlendirilecektir. Bu çerçevede bu bölümde gerçekleştirilecek olan basamaklar aşağıda özetlenmiştir.

(i) *S. Saprophyticus* kaynaklı Ssap-NtrB geni prokaryot vektörü içine klonlanmıştır. Bu plazmid kullanılarak, pCDNA3.1/V5/His B vektörü içine alt klonlama yapılacaktır.

(ii) Bu ökaryot ekspresyon vektörü geçici olarak transfekte edilecektir.

(iii) Transfeksiyon sonrası ifade olan Ssap-NtrB geni mRNA ve protein düzeyinde ifade olduğunun doğrulanması

(iv) Transfekte olan Ssap-NtrB içeren NTR + ve NTR- hücrelere bileşiklerin uygulanması ve hücre canlılığı sonuçların alınması

4.4.1 Ssap-NtrB Geninin Biyoinformatik Analizi ve Primer Tasarımı

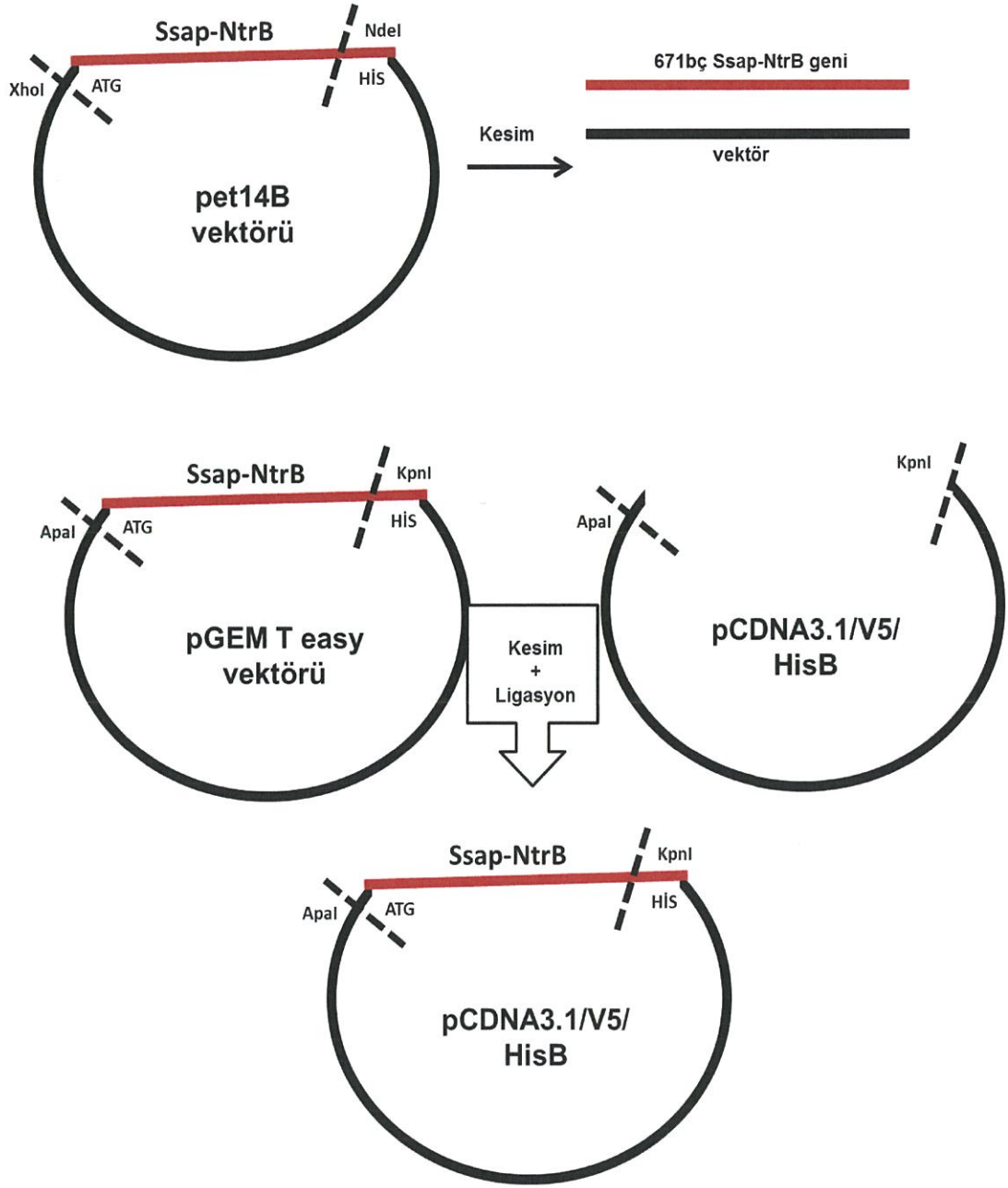
Ssap-NtrB genine ait mRNA dizisi ve baz bilgileri aşağıda verilmiştir. Buna uygun olarak Ssap-NtrB genine ait herhangi bir kesim bölgesi içermeyen ileri ve geri primerler tasarlandı. Bu primerlerin Tm hesaplamaları, olası % GC oranları, saç tokası yapısı oluşturup oluşturmadığı ve NCBI Blast ile analizleri yapıldı. Klonlamanın yapılacağı vektör sistemine doğru yerleşimde olabilmesi için, tasarlanan primerlerin 5' uçlarına EK 1 ile verilen analiz sonucu çıkan listeden seçilen enzimlerin tanıma dizileri eklendi. Ayrıca bağlanmanın güçlü olabilmesini sağlayan konsensüs diziler ilave edildi. Ssap-NtrB gen dizisine ait tasarlanan primerler KpnI ve ApaI kesim bölgelerini içerek şekilde tasarlanmıştır.

Çizelge 4.3: Ssap-NtrB Genine ait Primer Dizileri

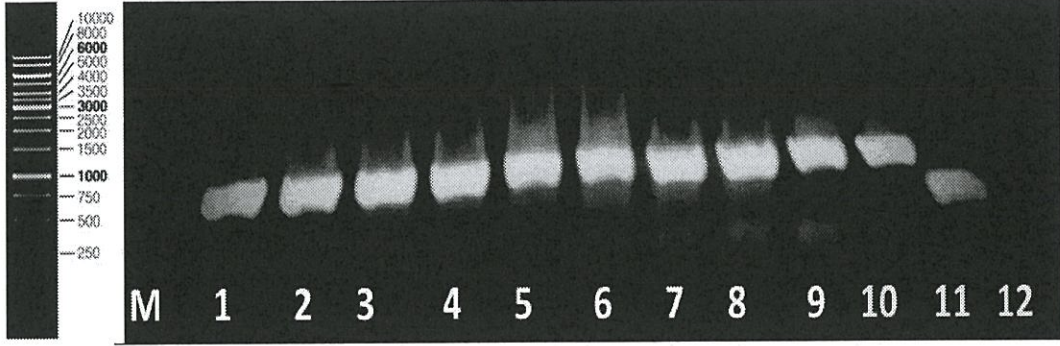
	Nükleotit Dizisi	Elle TM (°C)
Ssap-NtrB İleri Primer	5'-AAGGTACCACCATGATAAATAATAATTTTGA-3'	62
Ssap-NtrB Geri Primer	5'-TTGGGCCCTCAACGTATTTAGTCACA-3'	58

4.4.2 Ssap-NtrB Prokaryotik Geninin Ökaryotik Ekspresyon Vektörü olan pCDNA3.1/V5/His B Vektörüne Klonlanması

Ssap-NtrB prokaryotik geninin ökaryotik bir ekspresyon vektörü olan pCDNA3.1/V5/His B vektörüne klonlanması sırasında Şekil 4.60: Ssap-NtrB geninin klonlama yolu ile verilen yol izlenmiştir. Ssap-NtrB genini taşıyan pET14b vektörü Çizelge 3.15: Ssap- NtrB genine ait özgü primer dizileri ile belirtilen primerler kullanılarak Bölüm 3.2.2.2 ile anlatıldığı şekilde yapılan PCR sonucunda yaklaşık 680 baz çifti uzunluğundaki bölge başarılı bir şekilde çoğaltıldı. PCR sonucunda oluşan ürünler %1 'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.61: Ssap-NtrB geni içeren pET-14b geninin amplifikasyonu.



Şekil 4.60: Ssap-NtrB geninin klonlama yolu

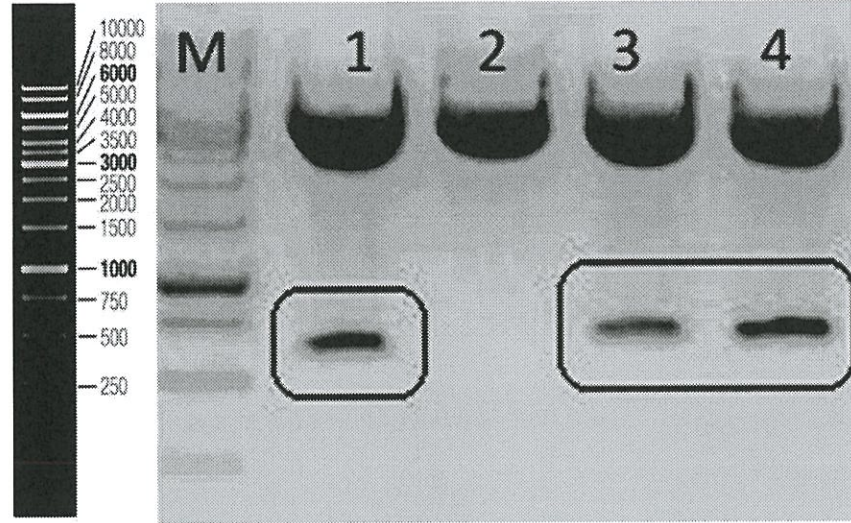


Şekil 4.61: Ssap-NtrB geni içeren pET-14b geninin amplifikasyonu

(M: SM0311 1kb marker, 1-10 SsapNtrB'nin pet14B vektörü ile amplifikasyonu, 11: Pozitif kontrol, 12: Negatif kontrol)

Jelde doğru baz bölgesinde görüntülenen Ssap-NtrB taşıyan pET-14b vektörü Bölüm 3.2.2.3'te anlatıldığı gibi geri kazanıldı. PCR metoduyla pGEM-T Easy içine klonlanması yapılacağı için primere ait olan KpnI/ApaI enzimleri ile kesim gerçekleştirildi.

5' uçları delesyona uğramış olan doğrusal DNA dizilerini kolayca ligasyona taşıyan pGEM-T Easy vektörü kullanılarak Bölüm 3.2.2.5 ile anlatıldığı şekilde ligasyon yapıldı. Ligasyondan sonra Bölüm 3.2.2.7 ile belirtildiği gibi önceden hazırlanan *XL1Blue* kompetant hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Ertesi gün katı besiyerinde üremesi görülen kolonilerden seçilenler sıvı besiyerine ekildi ve gece boyunca üremesi beklendi. Sıvı besiyerinde üreyen kolonilerin plazmit izolasyonu Bölüm 3.2.2.8 ile anlatılan koşullar göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi. Ssap-NtrB geninin varlığının kontrolü için bir kontrol kesimi kuruldu ve görüntüleme için %1 'lik agaroz jelde yürütüldü. Bu sonuç Şekil 4.62 ile gösterilmiştir.

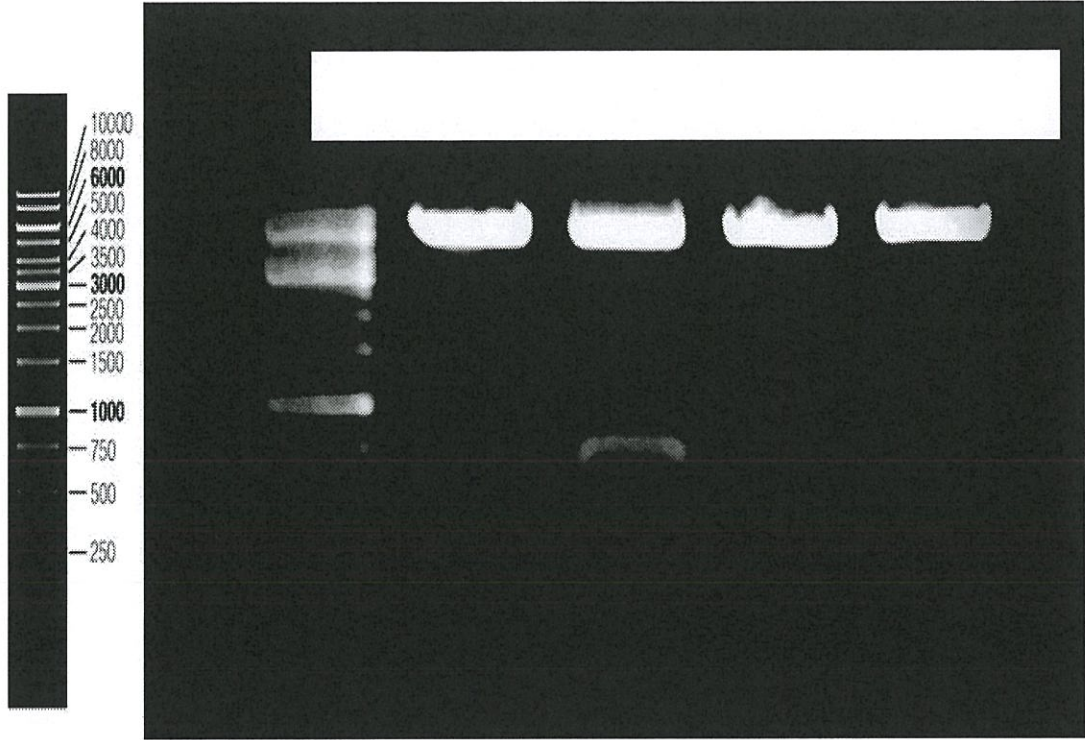


Şekil 4.62: Ssap-NtrB genini taşıyan pGEM-T Easy vektörünün kesim sonucu

(M: SM0311 1kb marker, 1-4 SsapNtrB genini taşıyan pGEM-T Easy vektörünün kontrol kesim sonucu)

Ssap-NtrB geni içeren pET14B vektörü ve pCDNA3.1 HisB vektörü KpnI ve Apal Bölüm 3.2.2.4'te belirtildiği şekilde kesim işlemine tabi tutuldu. Yapışkan uçların oluşmasından sonra Bölüm 3.2.2.5 ile anlatılan koşullarda ligasyon kuruldu. *XL1Blue* Yetenekli hücrelerine Bölüm 3.2.2.7 ile anlatıldığı gibi gerçekleştirilen transformasyon sonrasında Ampisilinli LB Agar'da büyüyen koloniler gözlemlendi. Bu kolonilerden seçilenler sıvı besiyerine aktarıldı ve ardından Bölüm 3.2.2.8'deki protokole uygun şekilde plazmit izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen plazmitlerin rekombinant olup olmadığı kontrol kesimi yapılarak gözlemlendi. Bu amaçla Ssap-NtrB genini içeren pCDNA3.1.HisB vektörü KpnI/Apal enzim çifti kullanılarak kesildi ve ardından agaroz jelde görüntüldü.

Şekil 4.63: SsapNtrB genini içeren pCDNA3.1.HisB vektörünün Restriksiyon ile gösterildiği üzere, Ssap-NtrB genini içeren pCDNA3.1.HisB vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucunda seçilen 4 koloniden 2. Kuyucukta bulunanın rekombinant olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.63: SsapNtrB genini içeren pCDNA3.1.HisB vektörünün Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu

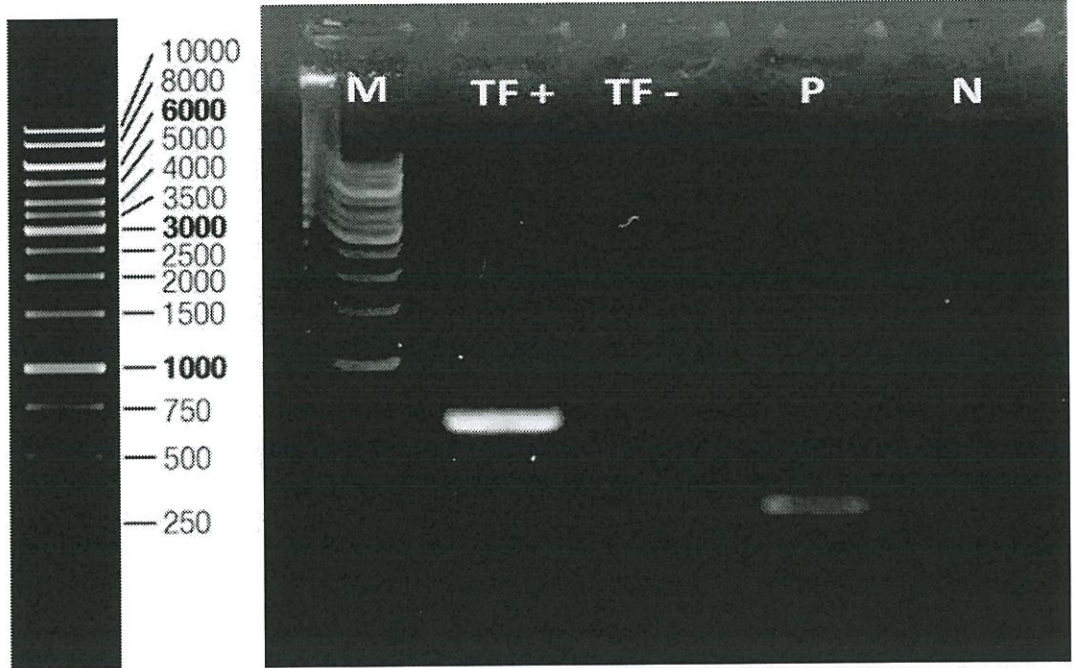
(M: SM0311 1kb marker, 1-4 SsapNtrB pCDNA3.1.HisB'nin *KpnI/ApaI* ile kesimi)

4.4.3 Ssap-NtrB Geni İçeren Vektörün Hep3B Hücrelerine Geçici Transfeksiyonu ve Gen ifadesinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi

Ssap-NtrB'nin hücrelerdeki ifadesinin olup olmadığının araştırılması için, ilk olarak Bölüm 3.2.1.2 ve 3.2.1.4 ile anlatıldığı şekilde Hep3B hücreleri 75 cm²'lik flasklarda büyütüldü. Hücrelerin flask yüzeyini kapladıkları ve durumları kontrol edildikten sonra 25 cm²'lik flasklar içerisine her bir flaskta 2 milyon hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Deney sırasında bir flask kontrol grubu Hep3B hücresi olarak etiketlenirken, diğeri Ssap-NtrB geni içeren pCDNA3.1 /V5/HIS B vektörü 2 µg olacak şekilde Kalsiyum fosfat yöntemi uygulanarak geçici transfekte edildi (Bknz. Bölüm 3.2.2.9). Geçici transfeksiyondan 24 saat sonra flasklardaki hücelere tripsinizasyon işlemi

uygulandı. Elde edilen pelletlerden Bölüm 3.2.4.1.1 ile anlatıldığına uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların kalıp olarak kullanılması ile Bölüm 3.2.4.1.4'teki gibi cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak Bölüm 3.2.4.1.5 'teki protokole uygun olarak Yarı Nicel PCR yöntemi yapıldı. PCR sonucunun görüntülenmesi Bölüm 3.2.4.1.6 'da anlatıldığı gibi yapıldı.

Bu sayede; kontrol grubu olarak seçilen ve sadece Hepatoma hücrelerini içeren grupta herhangi bir sonuç görülmedi. Bunun nedeni bu hücrelerde normal koşullar altında bu gen bulunmadığından, bu gene ait mRNA'da bulunmamaktadır. Buna karşın geçici transfeksiyon metodu kullanılarak ekspresyon vektörünü içeren Hepatoma hücrelerinde mRNA transkripsiyona uğradığı için ifadesi agaroz jelde gözlemlenmiştir (Şekil 4.64: Ssap-NtrB Gen ifadesinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi).

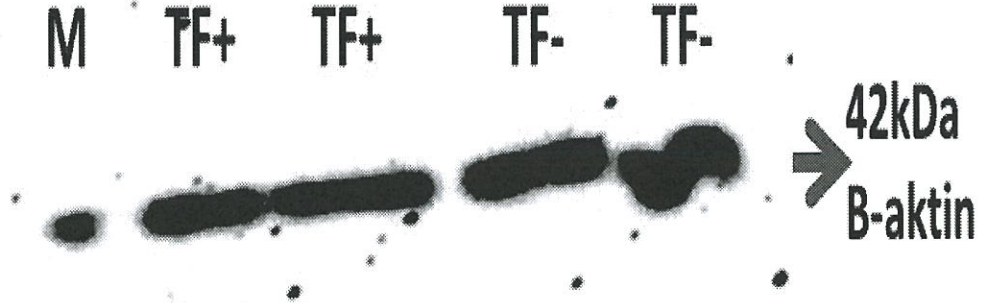


Şekil 4.64: Ssap-NtrB Gen ifadesinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi

(M: 1kb SM0311 Fermentas marker, TF+: Ssap-NtrB geni içeren vektörün transfekte edildiği Hep3B cDNA, 2: Boş hücre cDNA'sı, P: pozitif kontrol (Ssap-NtrB geni içeren vektörün kalıp olarak kullanıldığı), N: cDNA içermeyen diğer bütün PCR bileşenlerini içeren negatif kontrol)

4.4.4 Ssap-NtrB ifadesinin Protein seviyesinde Western Blotting Analizi İle Gösterilmesi

Bu amaçla Hep3B hücre hattı kullanılarak Bölüm 3.2.1.4 ile anlatılana uygun olacak şekilde 25 cm² lik küçük flasklarda deney planlandı. Elde edilen hücre pelletleri Bölüm 3.2.4.2.2' deki RIPA metodu kullanılarak jele yüklemeye hazır hale getirildi. Bölüm 3.2.4.2.3 ve 3.2.4.2.4' teki aşamalardan sonra 1/50 olacak şekilde His-Tag antikoru uygulandı. Bu antikorun seçilme nedeni klonlanan gende antikora ait bölgenin bulunuyor olmasıydı. Ancak normalizasyon amaçlı beta-aktin bantı gözlemlenirken, His-Taq antikorunun bantı elde edilemedi.



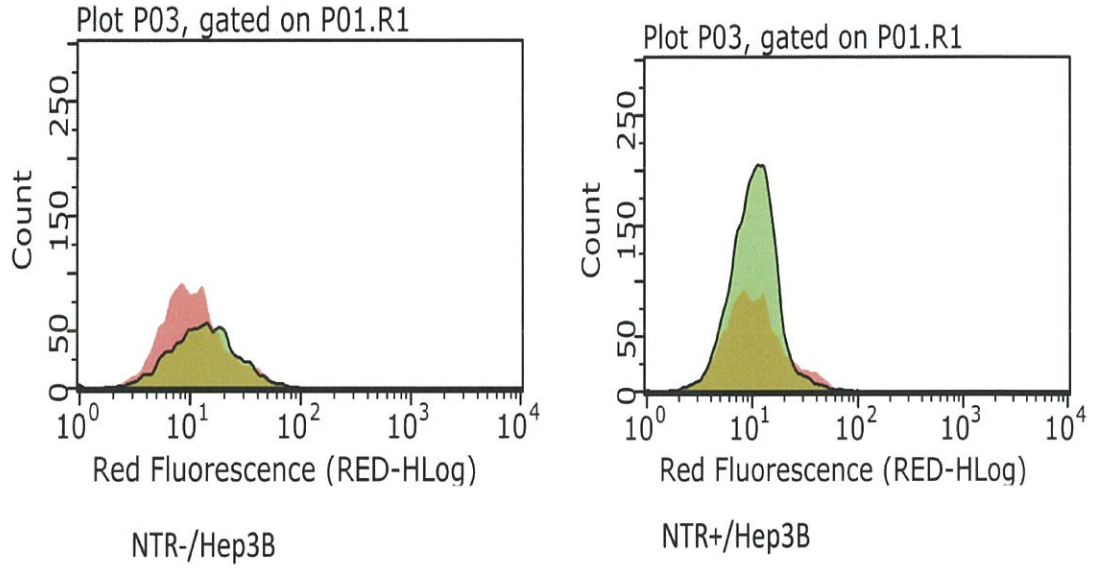
Şekil 4.65: Ssap-NtrB ifadesinin protein seviyesinde Western Blot ile Gösterilmesi

(M: PM Prestained Marker 26619, TF+: Tranfekte edilmiş Hep3B protein örneği, TF-: Transfekte edilmemiş Hep3B protein örneği)

4.4.5 Ssap-NtrB ifadesinin protein seviyesinde akım sitometri analizi ile gösterilmesi

Ssap-NtrB'nin protein düzeyindeki ifadesinden emin olunması için, protein ifadesinin doğrulanması için, Akım Sitometri analizi Bölüm 3.2.4.2.7'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre deneysel model olarak

Hepatoma hücreleri seçilmiştir. Bu hücelere geçici transfeksiyon metodu ile klonladığımız Ssap-NtrB içeren pCDNA3.1/V5/HisB transfekte edildi. Transfeksiyonun görüntülenebilmesi için gen bölgesinde bulunan Histidin kuyruğuna bağlanması için His-tag antikoru ile işaretleme yapıldı. Ayrıca ikincil antikor olarak Alekxa-Flor ile işaretleme yapılmıştır. Akım Sitometri analizleri ile de Ssap-NtrB'nin hücre içinde ifade olduğu ve klonlamanın başarıyla gerçekleştirildiği bir kez daha doğrulanmıştır.

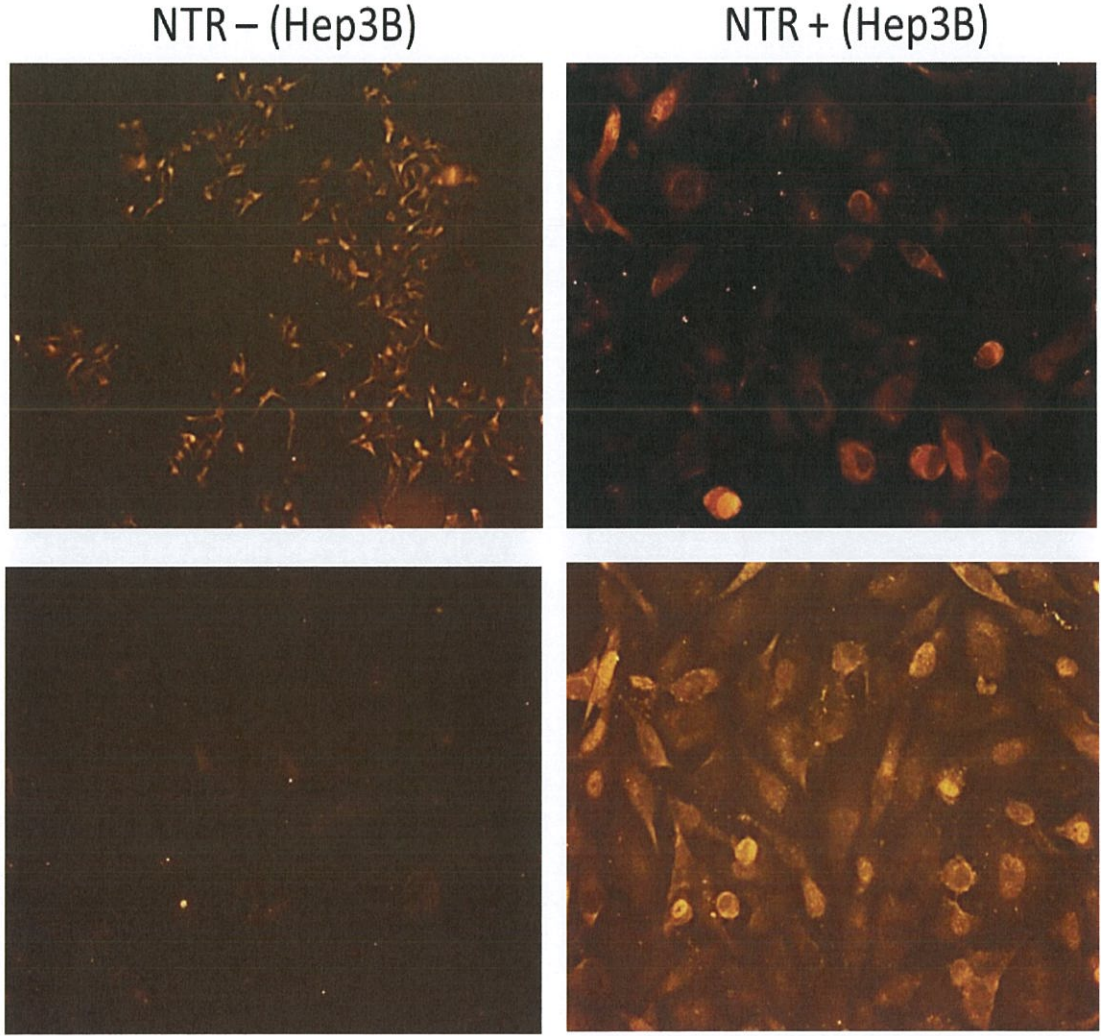


Şekil 4.66: NTR- ve NTR+ Hep3B hücrelerinde His-Tag antikoru ile boyaması sonrası Akım Sitometri analiz görüntüsü

4.4.6 NTR+ hücrelerde Ssap-NtrB ifadesinin protein seviyesinde IFC analizi ile gösterilmesi

Ökaryot ekspresyon vektöründe bulunan ve ekli olarak ifade edilen Histidin kuyruğu Ssap-NtrB geninin hücre içinde ifadesinin görüntülenmesi için kullanılmıştır. Bu amaçla Bölüm 3.2.4.2.6 ile anlatıldığı şekilde IFC metodu uygulanmıştır. Antikor olarak seçilen 1/50 His-Tag antikoru ile hücreler gece boyunca muamele edilmiştir. İkinci boyama olarak Anti Mouse Alekxa-Flour-568 ile boyandıktan sonra Olympus floresan mikroskobu ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

Buna göre NTR- ve NTR+ hücreler karşılaştırıldığında floresan boyanın NTR- hücrelerini de özel olmadan boyadığı anlaşılmaktadır. Ancak, hücresel boyutta çok az da olsa NTR+ hücrelerde floresan uyarılar artmaktadır. Bu da protein seviyesinin az miktarda da olsa ifade olduğunu bize göstermektedir.

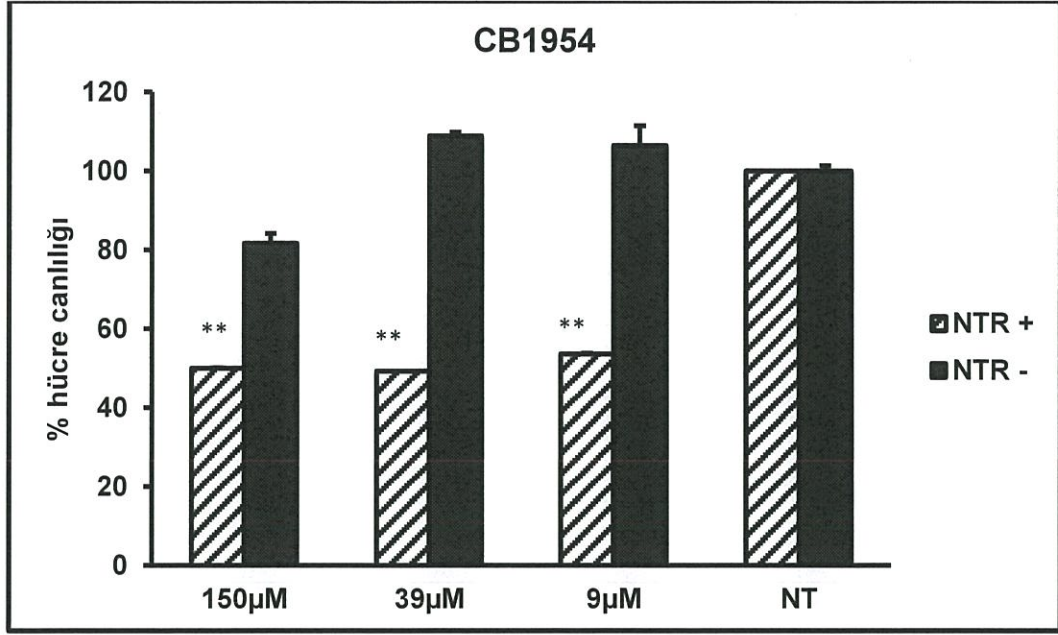


Şekil 4.67: NTR+ ve NTR- Hep3B hücrelerinin His-Tag antikoruna boyanması sonrasında immunfloresan görüntüsü

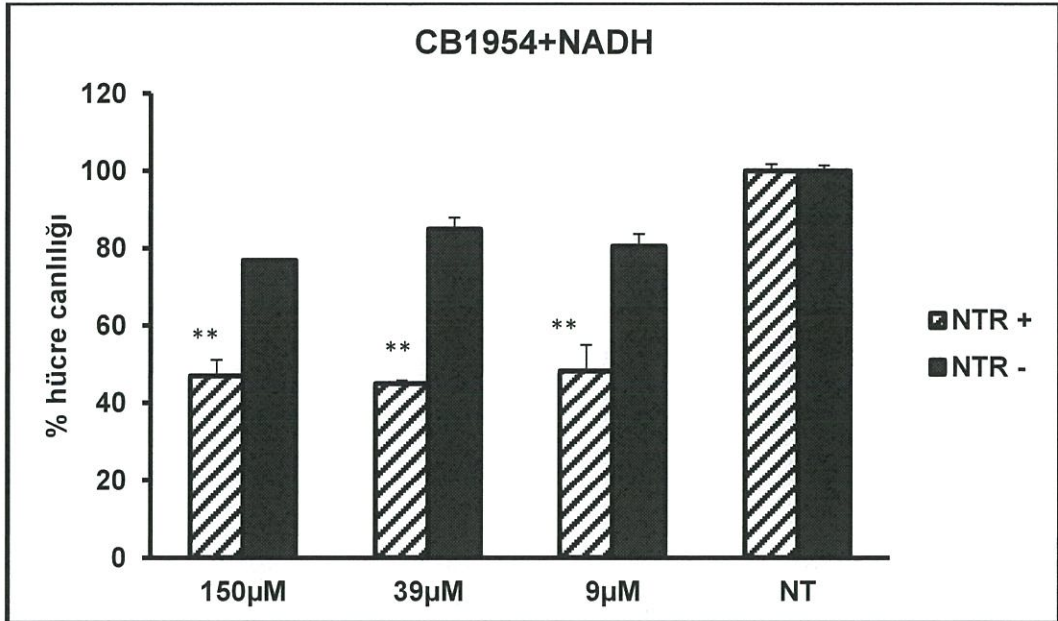
4.4.7 İlaç öncül maddelerin Ssap-NtrB transfekte hücrelere uygulanması ve zehirli etkilerinin SRB analizi ile belirlenmesi

Hücre içi denemelerde, öncelikli olarak hücre dışı reaksiyon deneylerinde de kullanmış olduğumuz Hep3B hücre hattına transfeksiyon yapıldı. Bu uygulamanın ardından transfeksiyon yapılan hücreler 24 saat geçtikten sonra 96-kuyucuklu plakalara paylaştırıldı. Aynı deney tasarımında hiç transfekte olmamış hücreler ve kontrol hücreleri de plakalara paylaştırıldı. 24 saat geçtikten sonra seçilen ilaç öncül maddeler 3 farklı derişimde (150 μ M - 39 μ M – 9 μ M) uygulandı. İlaç öncüllerine ilave olarak kıyaslama yapabilmek için ön klinik denemelerde kullanılan CB1954 'te uygulanmıştır. Tüm bileşikler hücre içi denemelere tabi tutulmamıştır. Özellikle toksisite denemelerinden, az zehirli etki gösteren bileşikler seçilmiştir. Hücre içi denemelere taşınan bileşikler, 754- 3e, 754- 3c, 754- 3h, 754- 2f, 754- 2g, 754- 2h ve 754- 2j bileşikleridir. Bu uygulamadan 24 saat sonra sonuçlar SRB metoduyla analiz edilmiştir. Analizlere ait grafikler sırasıyla Şekil 4.70, Şekil 4.71, Şekil 4.72, Şekil 4.73, Şekil 4.74, Şekil 4.75 ve Şekil 4.76 ile verilmiştir.

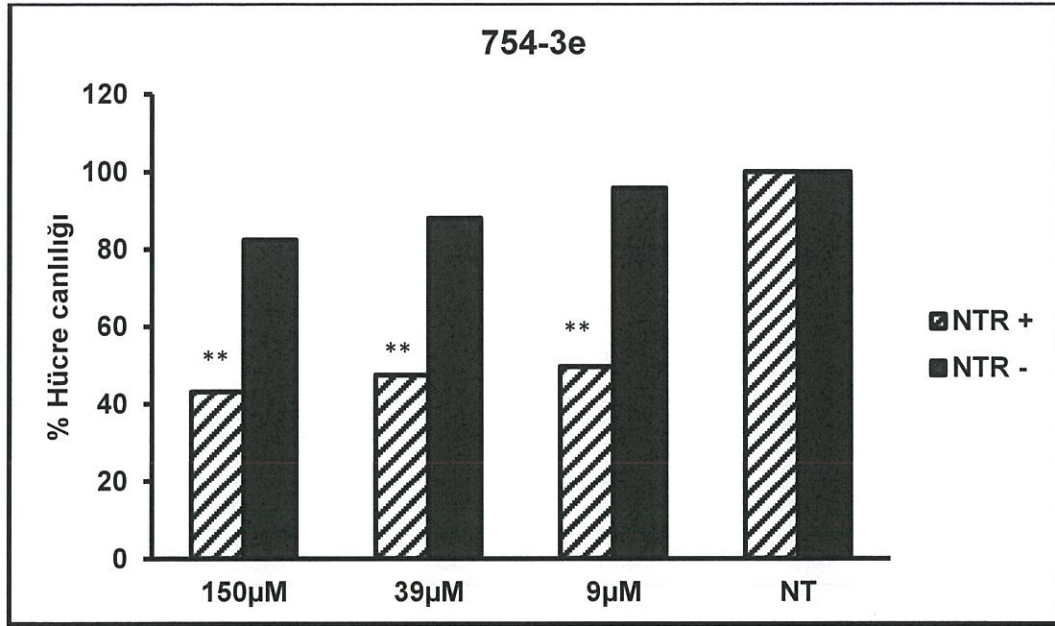
Hep3B hücre hattında Ssap-NtrB yönünden pozitif ve negatif olan gruplarda belirgin bir ifade değişimi görülmüştür. Aynı zamanda bu etki kontrol grubu olarak seçilen CB1954 denemelerinde de görülmüştür (Şekil 4.68: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan CB1954 bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri). Bu da bize ifade olan enzimin ilaç öncülleri ile daha etkili hale geldiğini göstermektedir. İlave olarak nitroredüktaz enziminin çalışmasında etkisinin olabileceği düşünülen NADH, CB1954 ilaç öncülü ile birlikte uygulanmış ve sonuç olarak etkiyi değiştirmedeği gözlemlenmiştir (Şekil 4.69). Bundan sonraki denemeler NADH ilave edilemeden gerçekleştirilmiştir.



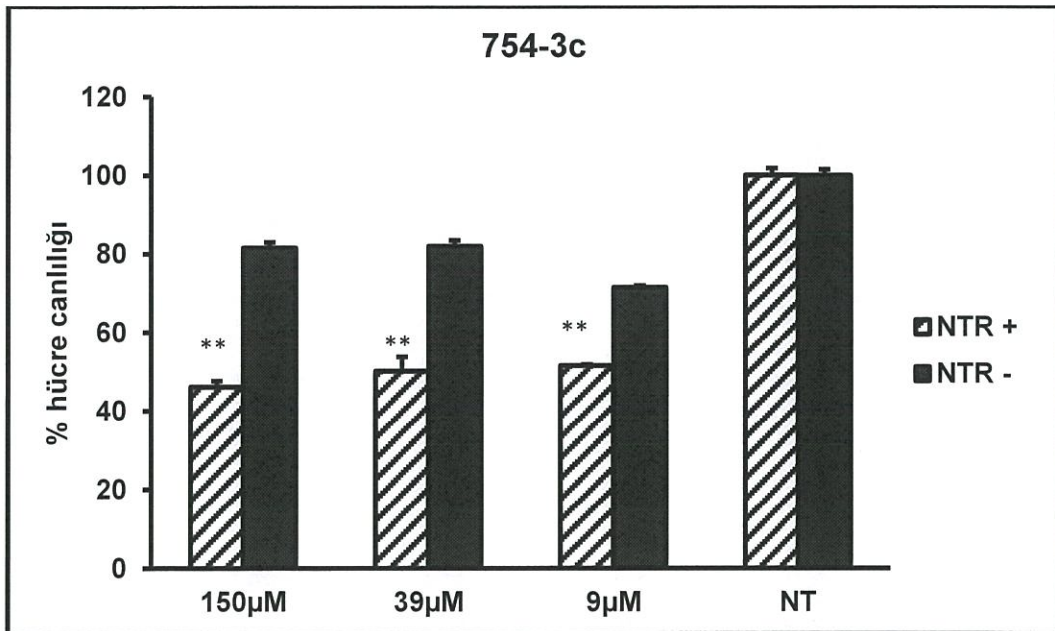
Şekil 4.68: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan CB1954 bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



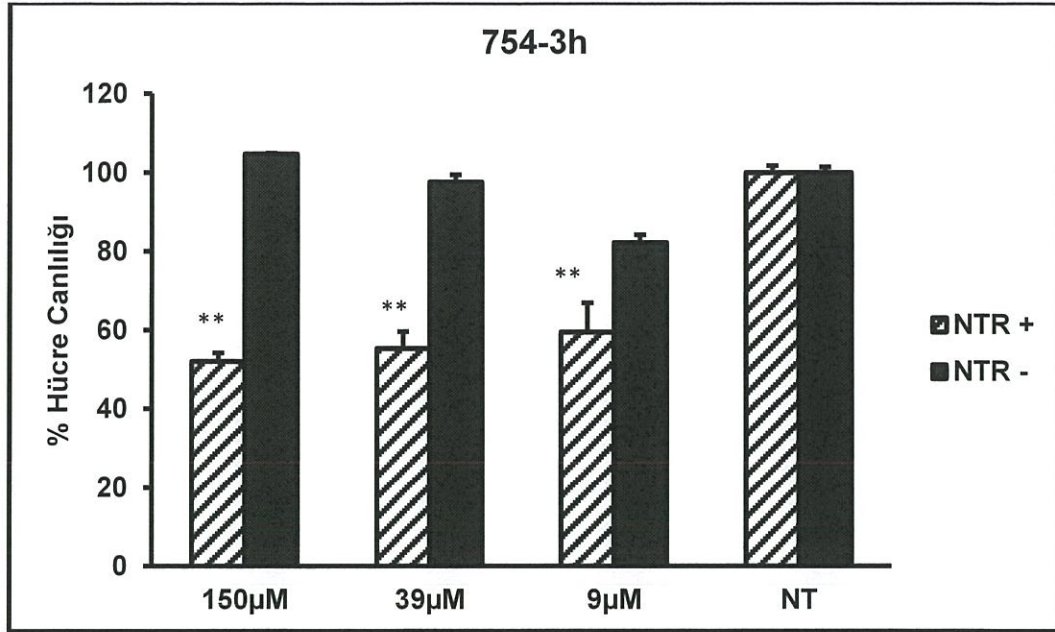
Şekil 4.69: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan CB1954 ve NADH bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



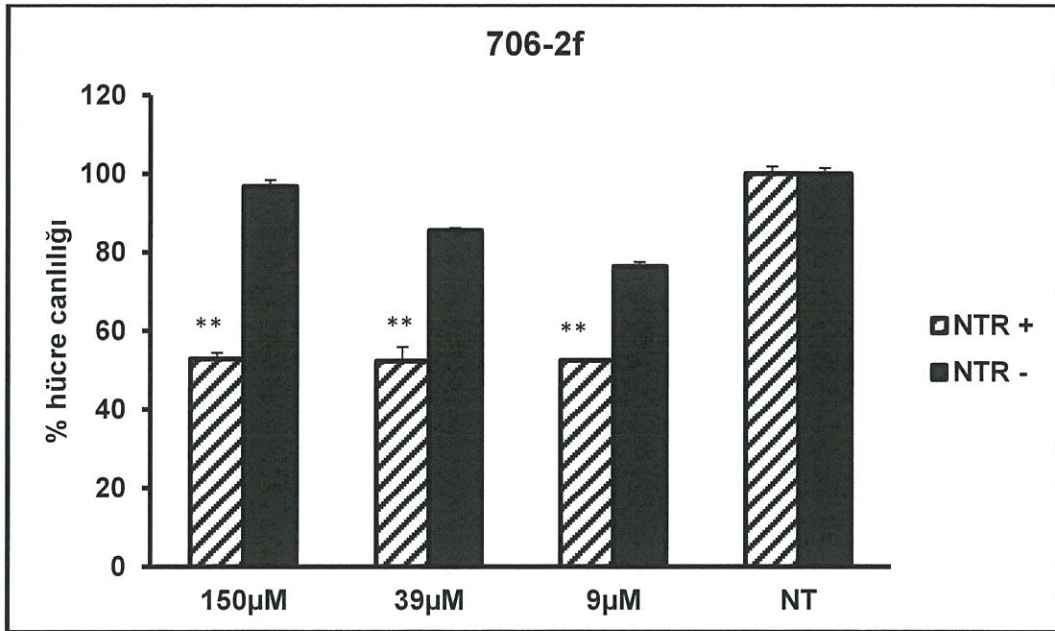
Şekil 4.70: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 754-3e bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



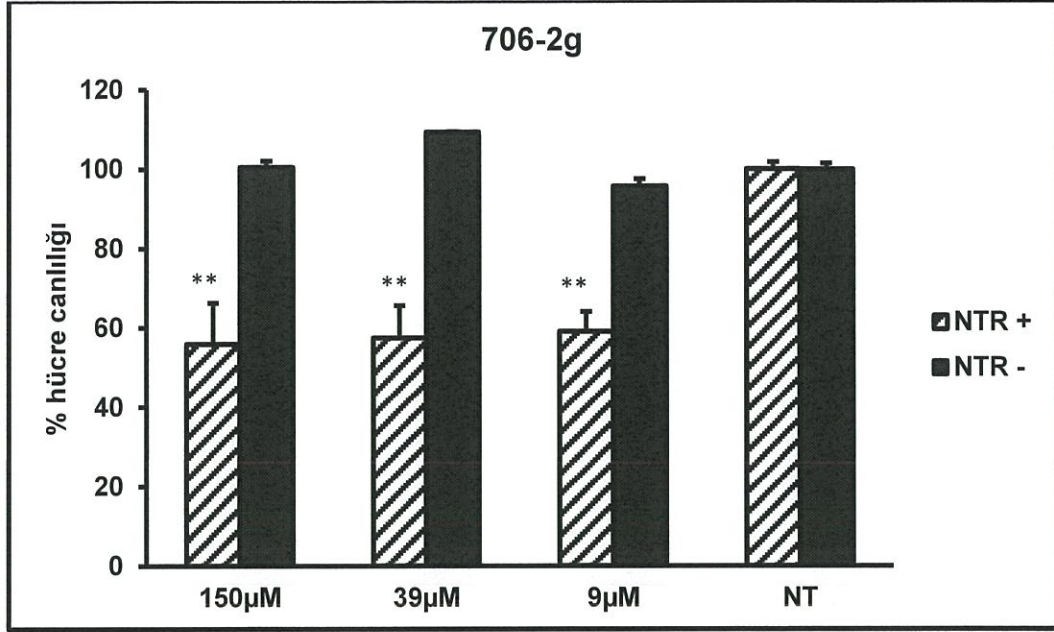
Şekil 4.71: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 754-3c bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



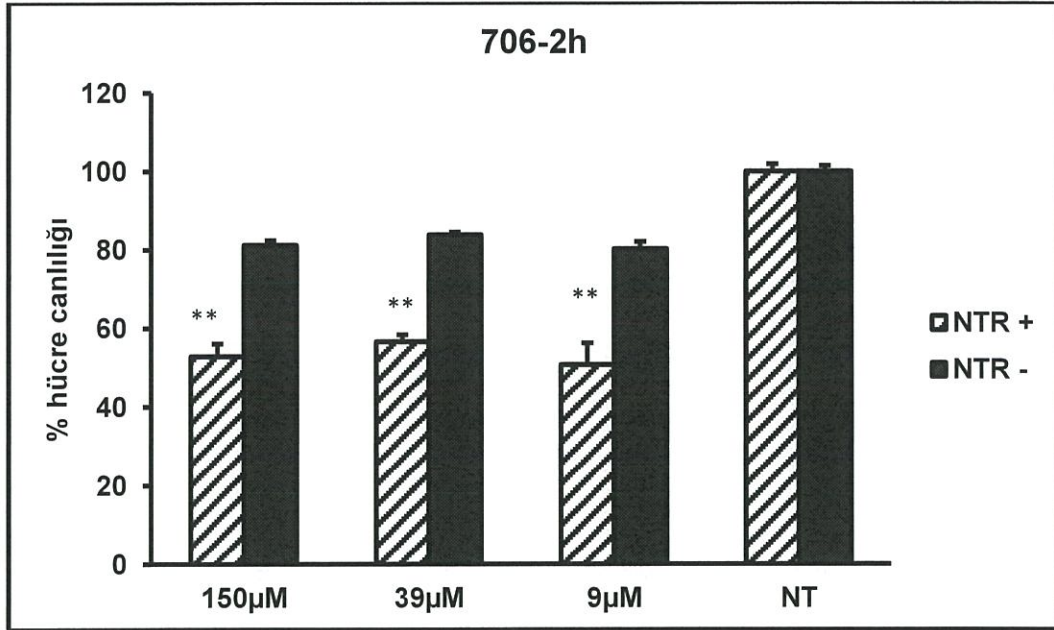
Şekil 4.72: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 754-3h bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



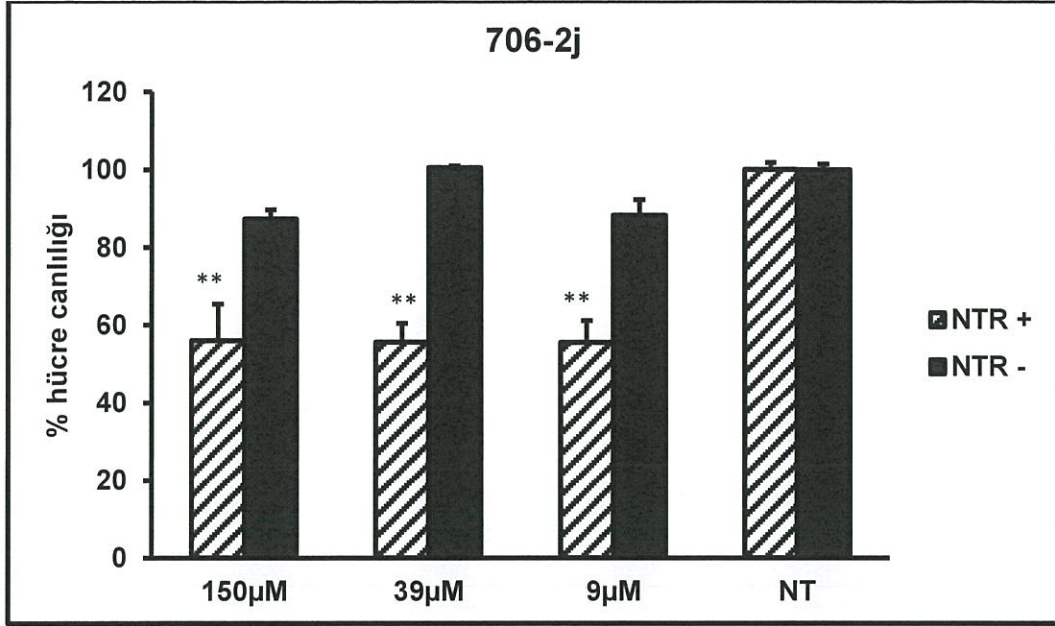
Şekil 4.73: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 706-2f bileşiğinin hücre canlılığı (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.74: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 706-2g bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.75: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 706-2h bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.76: Hep3B hücrelerinde Ssap-NtrB transfekte edilmiş NTR+ ve NTR- hücrelerine uygulanan 706-2j bileşiğinin hücre canlılığı grafikleri (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)

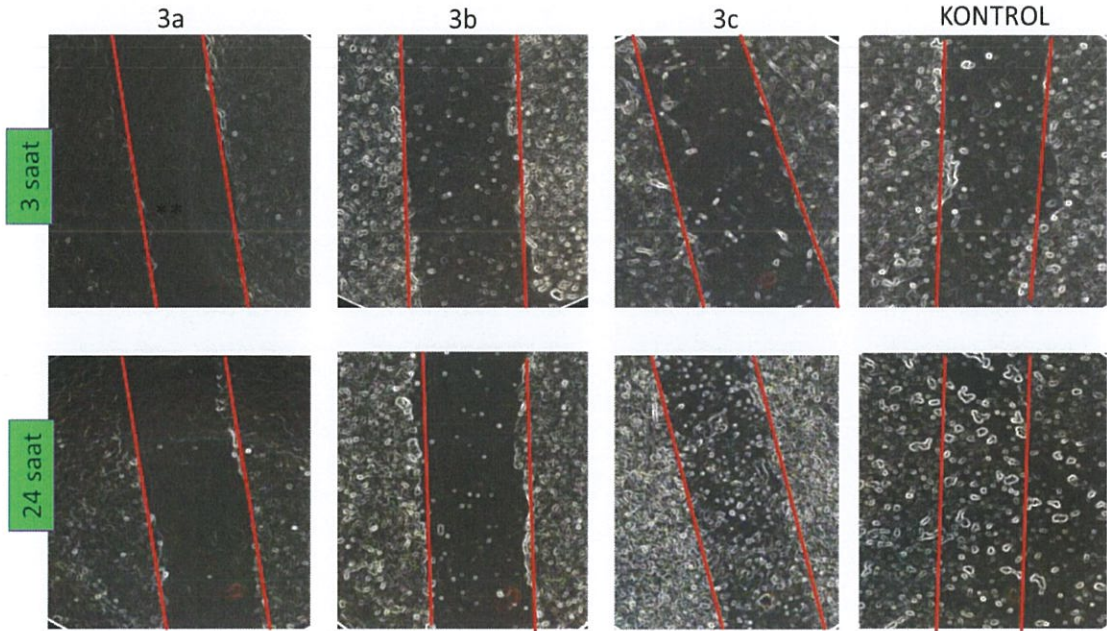
4.5 Nitro Gruplu Bileşiklerin Hep3B Hücrelerinde Oluşturduğu Metastatik Etkinin Belirlenmesi

4.5.1 Yaralanma Deneyi

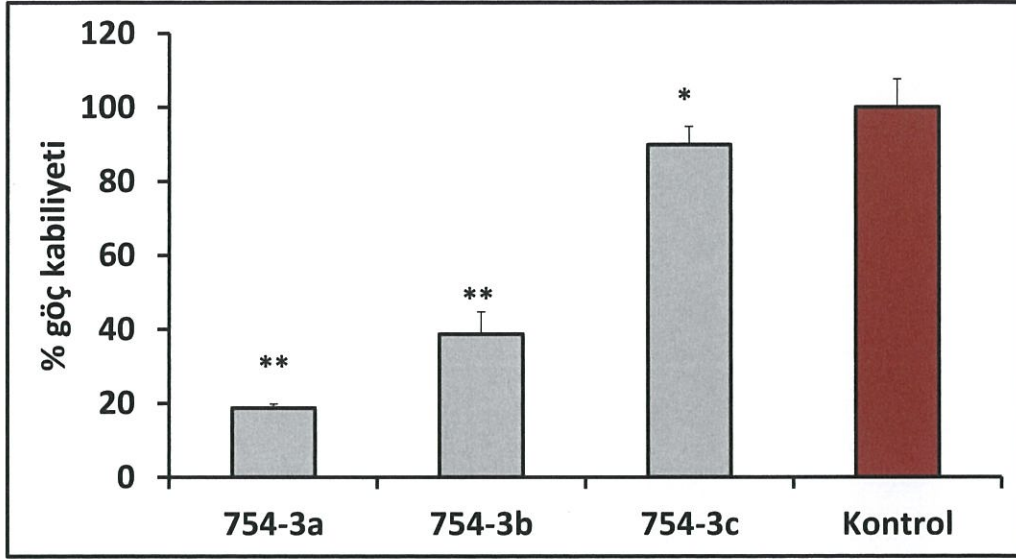
Toksisite durumuna bakılmadan nitro gruplu bileşiklerin Hepatoma hücrelerinin invazyon kabiliyetleri üzerine etkisi yaralanma testi ile belirlendi. Hep3B hücreleri 12 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda 250.000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Tutunmaları için 24 saat beklendikten sonra bileşikler belirlenen % 50 inhibisyon değerinde hesaplanarak kuyucuklara uygulandı. Kontrol grubuna sadece DMSO uygulandı. Bölüm 3.2.3.1 ile anlatıldığına uygun olarak elde edilen fotoğraflar Image J programı kullanılarak analiz edildi.

Yaralanma testinde toksisite durumuna bakılmadan tüm maddeler uygulanmış olup, çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde MTT sonuçları ile aynı doğrultuda sonuçlar elde edilmiştir.

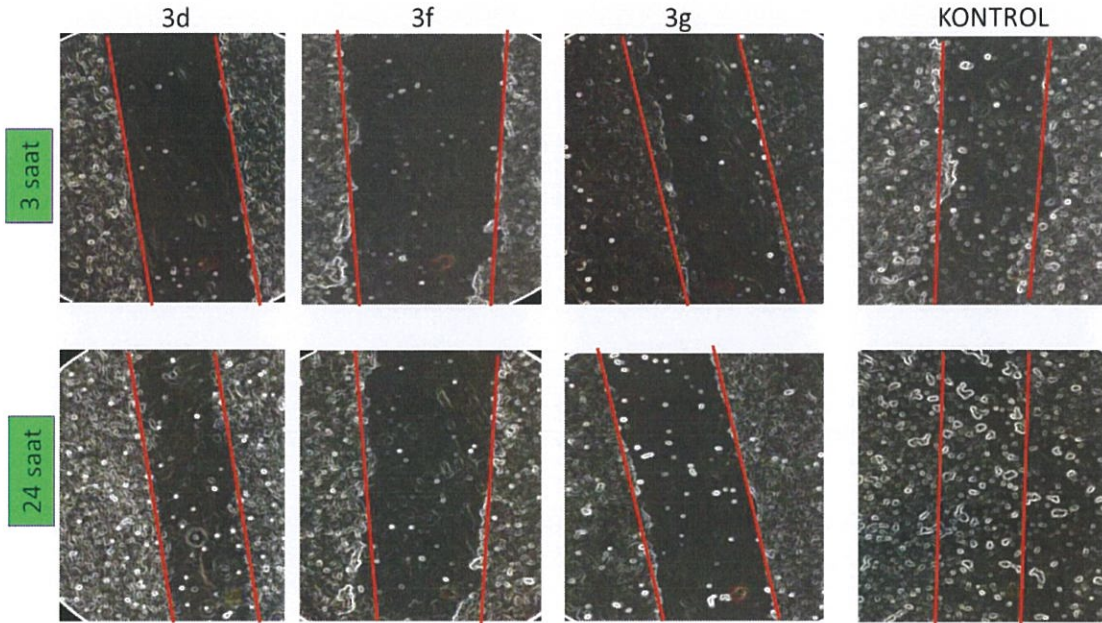
754- 3 serisinden 3c, 3e ve 3h bileşiklerinin zehirli etkili olmamasından dolayı yaralanma deneyinin sonunda bu etkileri gözlemlenmiştir. Aynı şekilde zehirli etkili olmayan ve 706 – 2 serisine ait olan 2b, 2f, 2g, 2h ve 2j bileşiklerinde de aynı etki gözlemlenmiştir.



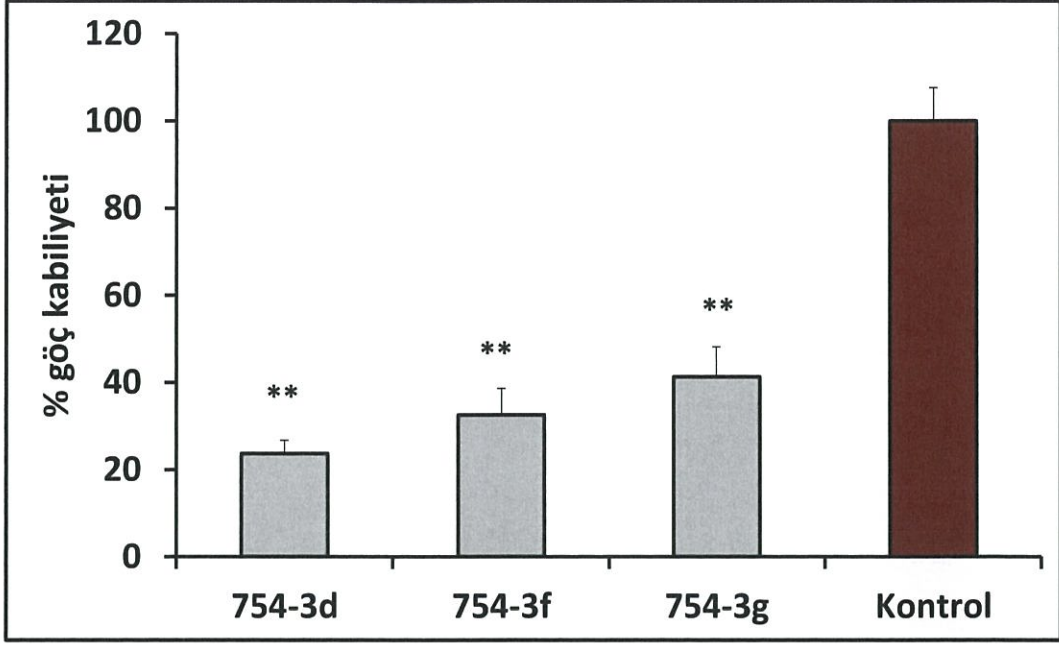
Şekil 4.77: 754-3a, 754-3b ve 754-3c bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.



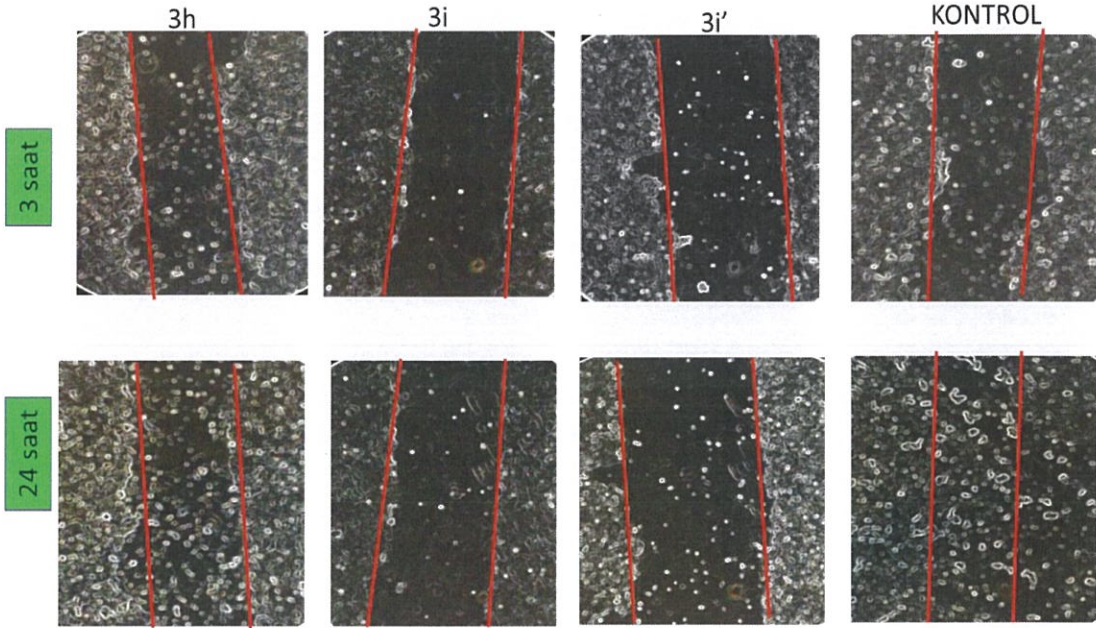
Şekil 4.78: 754-3a, 754-3b ve 754-3c bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



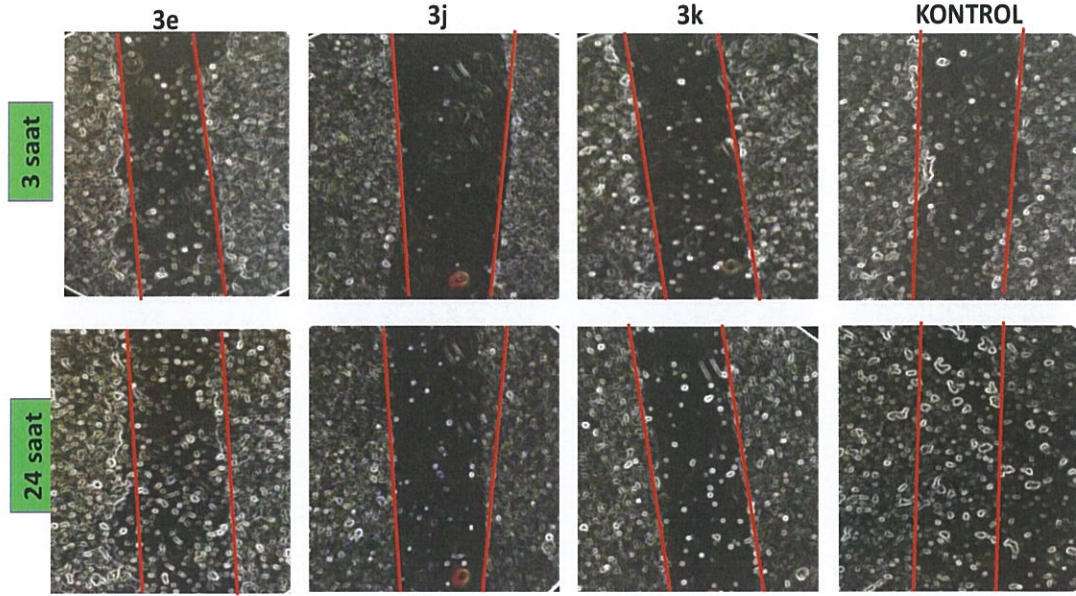
Şekil 4.79: 754-3d, 754-3f ve 754-3g bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



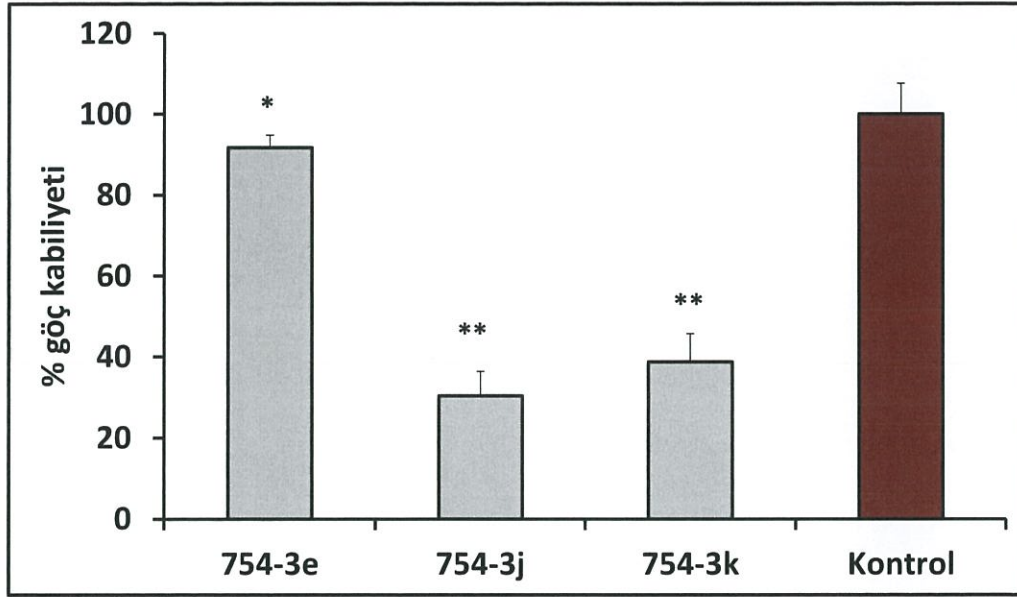
Şekil 4.80: 754-3d, 754-3f ve 754-3g bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



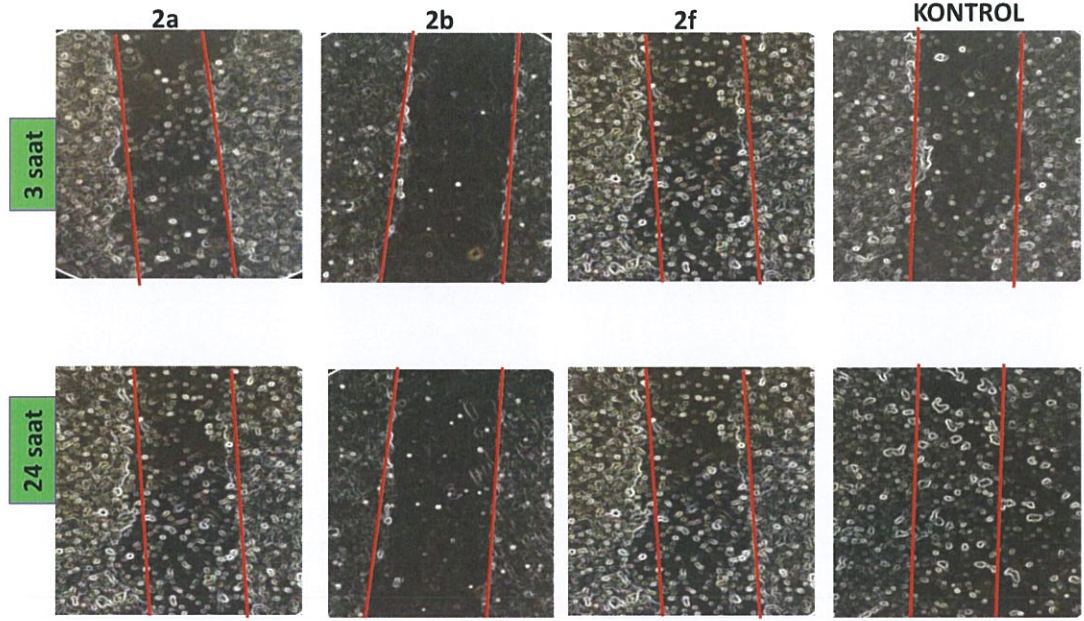
Şekil 4.81: 754-3h, 754-3i ve 754-3i' bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi



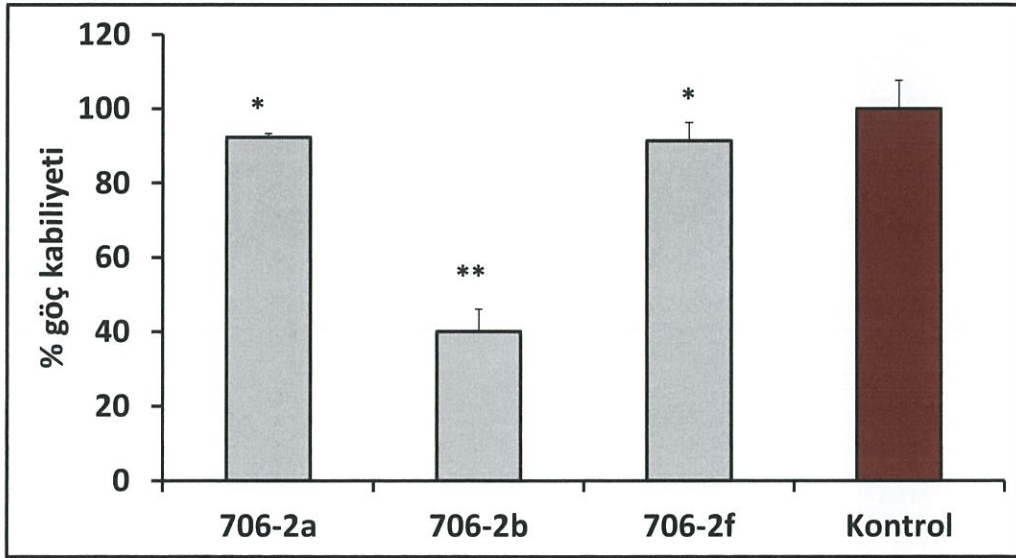
Şekil 4.82: 754-3e, 754-3j ve 754-3k bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.



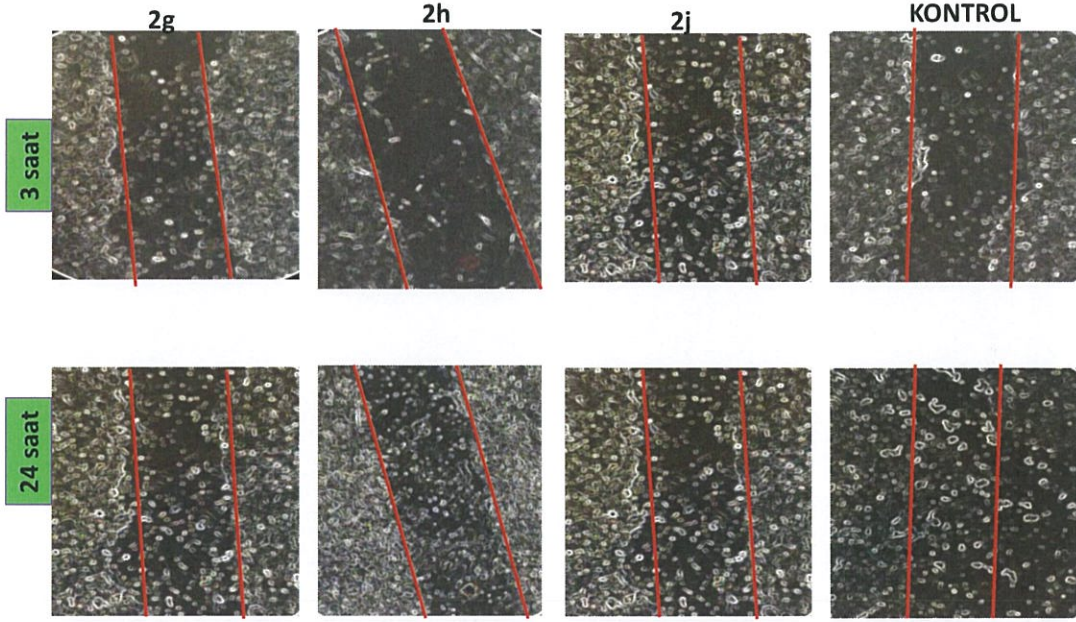
Şekil 4.83: 754-3e, 754-3j ve 754-3k bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi (p<0,05 olanlar * ile, p<0,01 olanlar ** ile belirtilmiştir.)



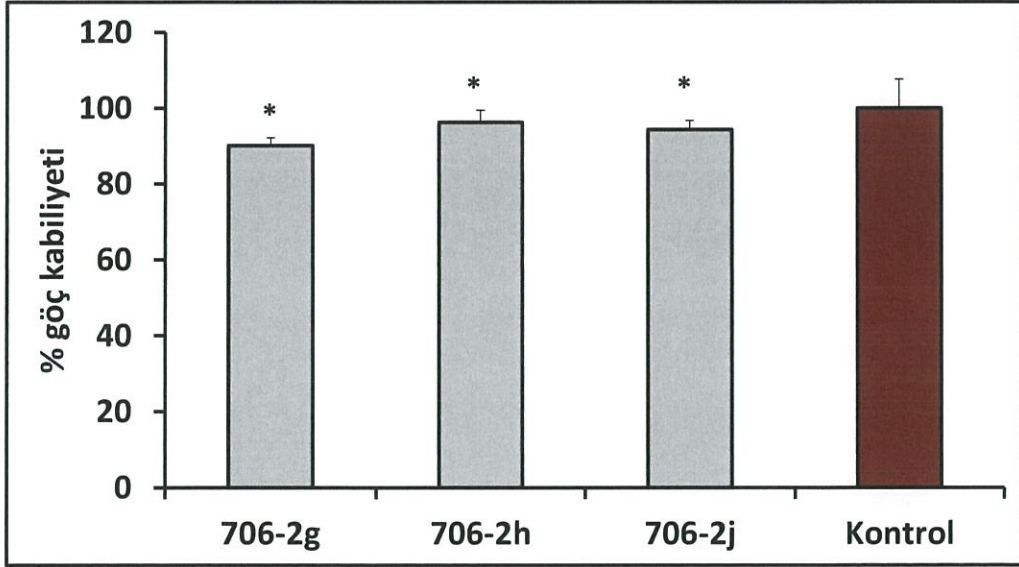
Şekil 4.84: 706-2a, 706-2b ve 706-2f bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.



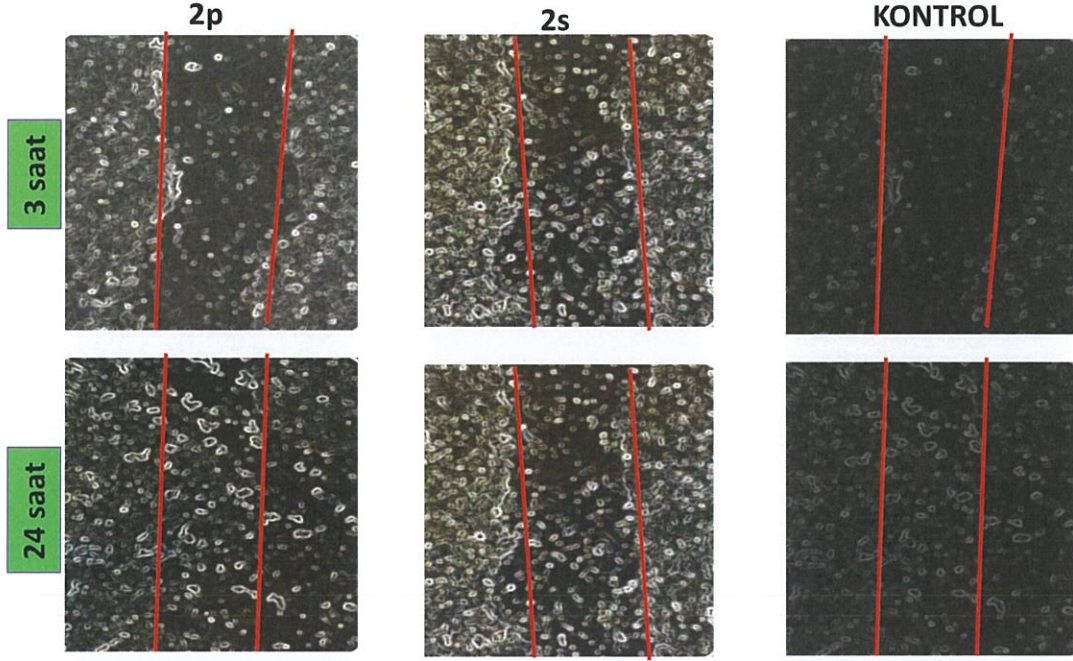
Şekil 4.85: 706-2a, 706-2b ve 706-2f bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



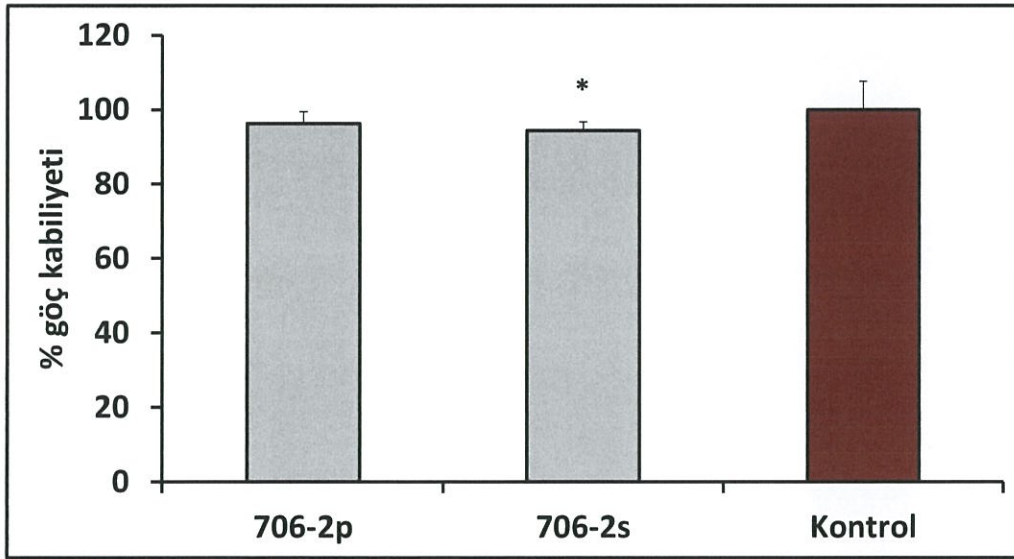
Şekil 4.86: 706-2g, 706-2h ve 706-2j bileşiminin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.



Şekil 4.87: 706-2g, 706-2h ve 706-2j bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.88: 706-2p ve 706-2s bileşiğinin 3 saat ve 24 saat sonunda yara kapatma kabiliyetinin gösterilmesi.



Şekil 4.89: 706-2p ve 706-2s bileşiklerinin yara kapatma kabiliyetinin grafik ile gösterilmesi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)

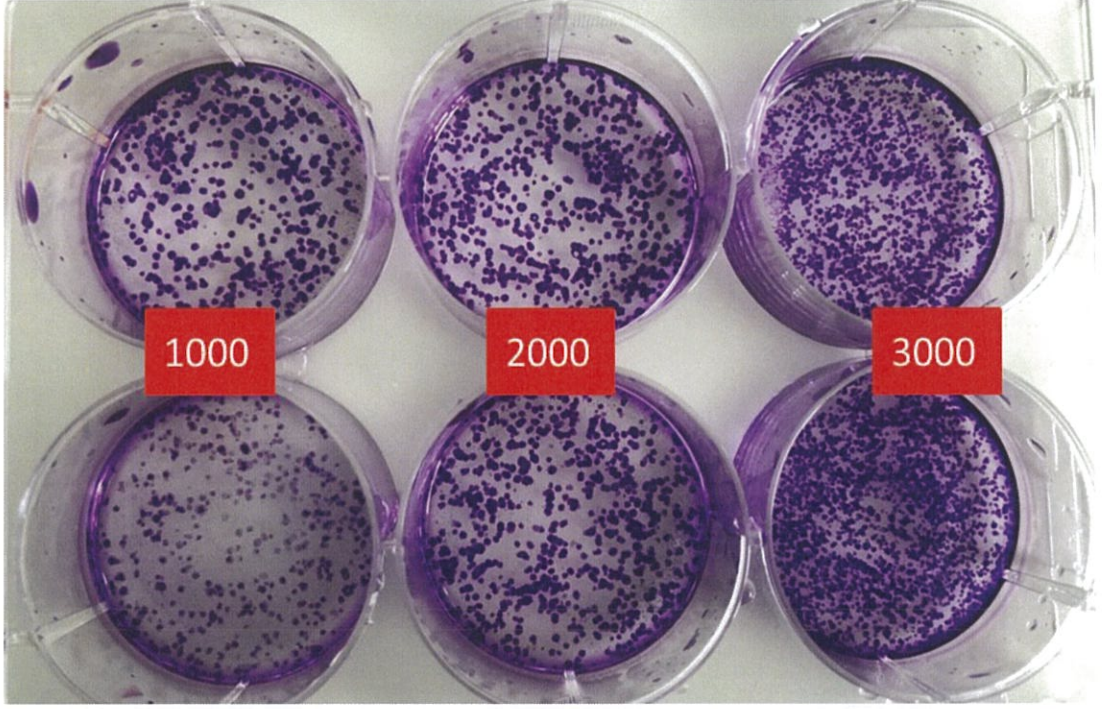
4.5.2 Koloni Oluşumu Deneyi

İlaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan bu yöntemde ilk basamak olarak kullanılacak hücre sayısının optimizasyonu yapıldı. Buna göre Şekil 4.90 ile de görüldüğü üzere deneylerde kullanılacak hücre sayısı kuyucuk başına 2.000 hücre olarak belirlendi.

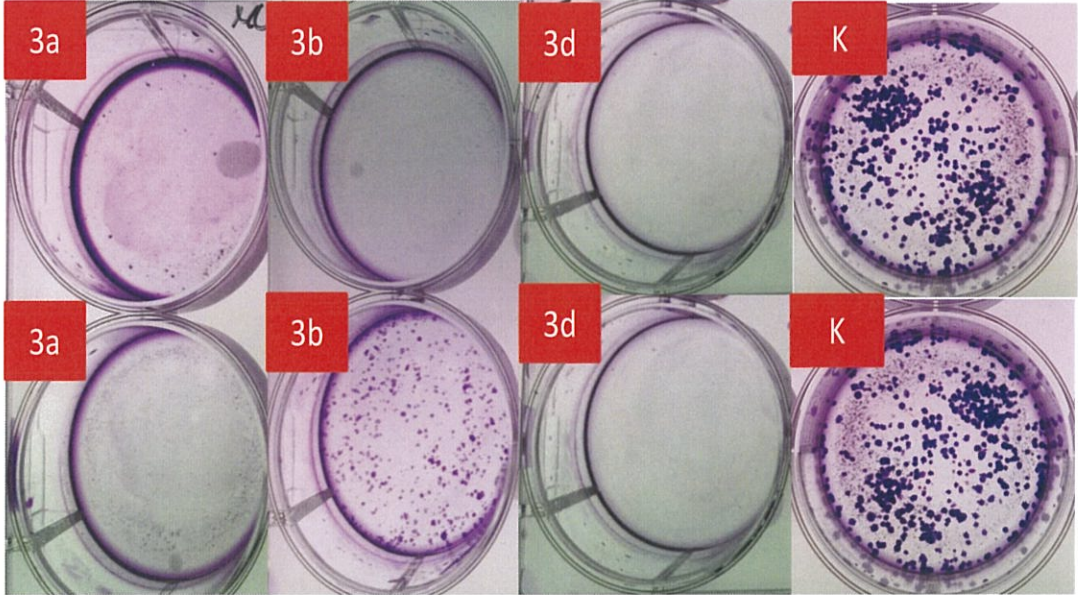
Hücre sayısının kuyucuk başına 2.000 olarak belirlenmesinin ardından Bölüm 3.2.3.2 ile anlatıldığı gibi deney kuruldu. Tüm nitro gruplu bileşikler % 50 inhibisyon değerine uygun hesaplama yapılarak Hep3B hücrelerine uygulandı. Yaklaşık olarak 10 gün beklemeden sonra hücreler PBS ile yıkandı ve ardından kristal viyole ile boyandı. Boya içerisinde 10 dk bekledikten sonra, distile su ile boya uzaklaştırıldı. Görüntüler ColonoCounter programı kullanılarak analiz edildi ve grafiklendirildi.

Zehirli etkisi bulunmayan bileşikler Hep3B hücrelerinin çoğalmasına izin vermiş olup, bu sonuç hem nitel hem de nicel olarak gözlemlenmiştir. 754-3 serisi bileşiklerden zehirli olmayan ve hücre içi denemelere de taşınan 754-3c, 754-3e ve 754-3h bileşiklerinin kontrol grubuna yakın olarak koloni oluşturma özellikleri gösterdikleri görülmektedir. Zehirli olarak değerlendirilen diğer bileşiklerin muhtemel hücre ölümüne dayalı olarak, koloni oluşturma özellikleri azalmış olduğu anlaşılmaktadır.

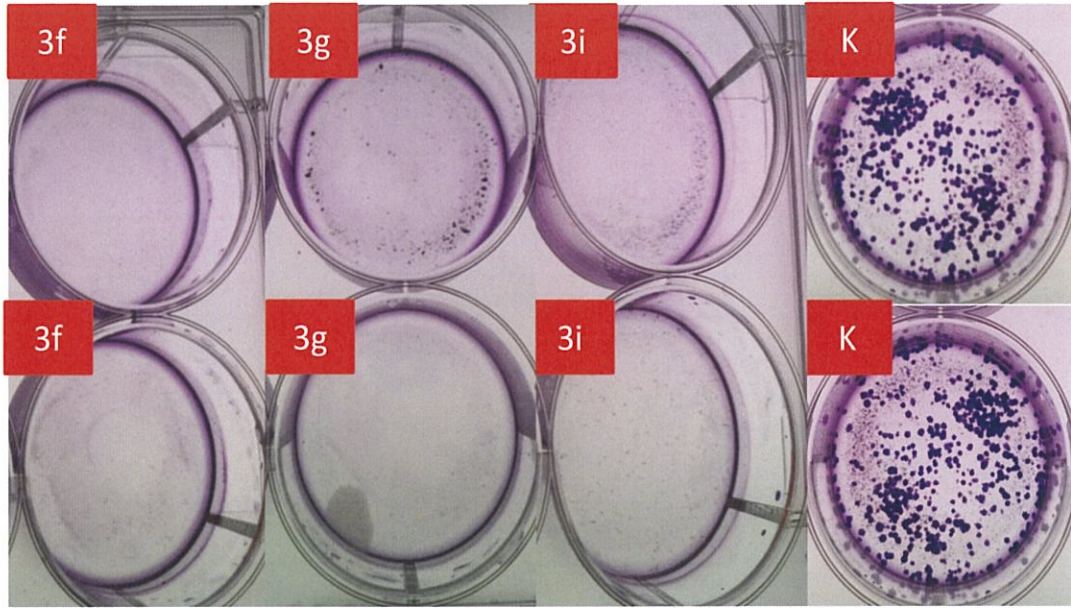
706-2 serisi bileşiklerden, 706-2a, 706-2b, 706-2f, 706-2h, 706-2g, 706-2p, 706-2j ve 706-2s koloni oluşumu deneyine tabi tutulmuştur. 706-2p, 706-2s ve 706-2a bileşiklerinin koloni oluşturma özelliği azalmıştır. Diğer bileşiklerin koloni oluşturma özellikleri, kontrol grubuna yakın olarak çıkmıştır.



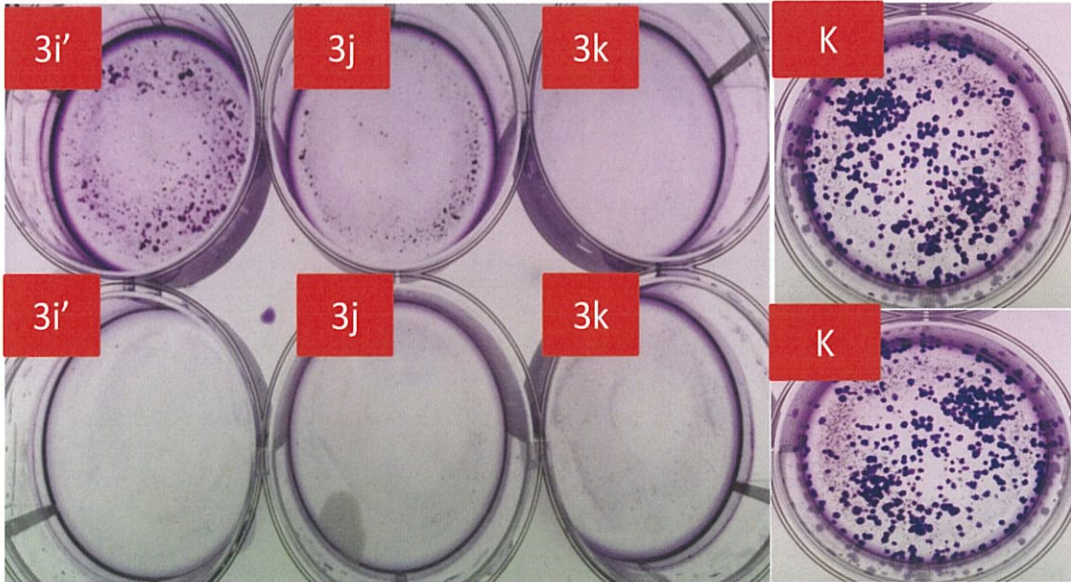
Şekil 4.90: Hep3B hücrelerinde koloni oluşum testi için hücre sayısı optimizasyonu



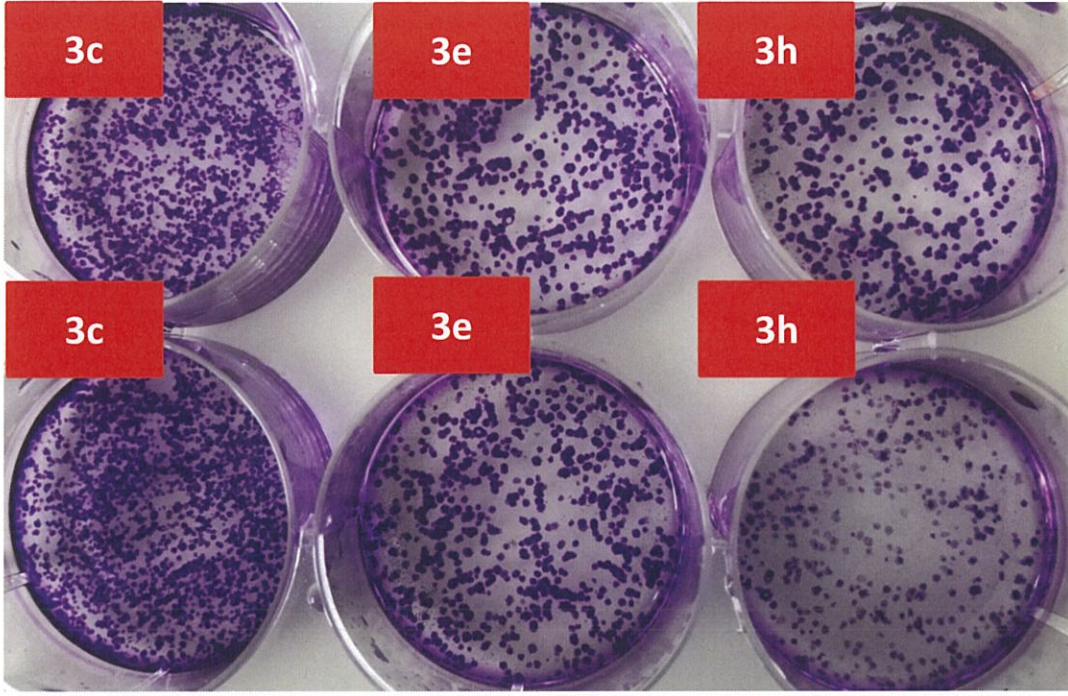
Şekil 4.91: 754- 3 serisi bileşik uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu



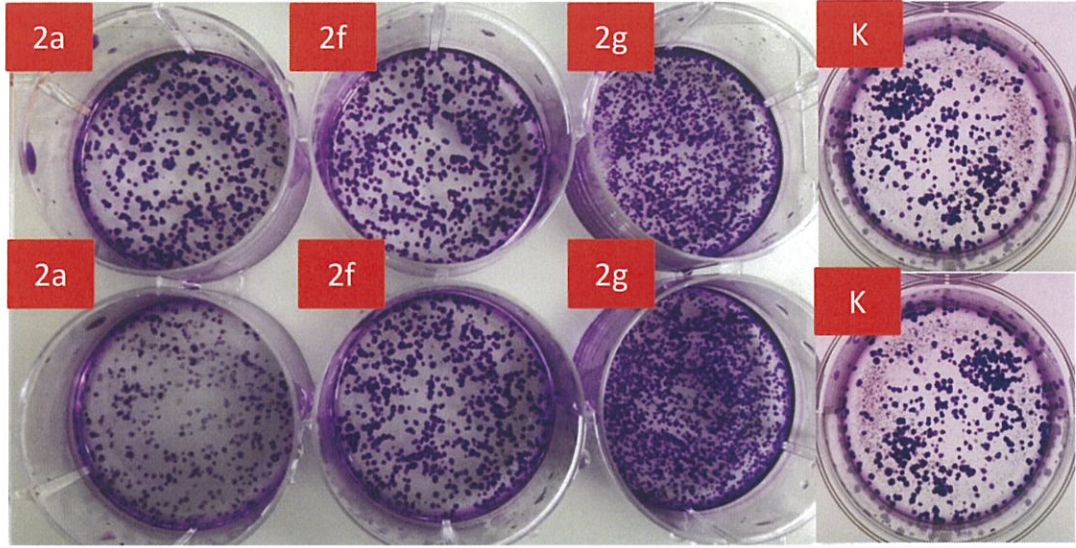
Şekil 4.92: 754- 3 serisi bileşik uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu



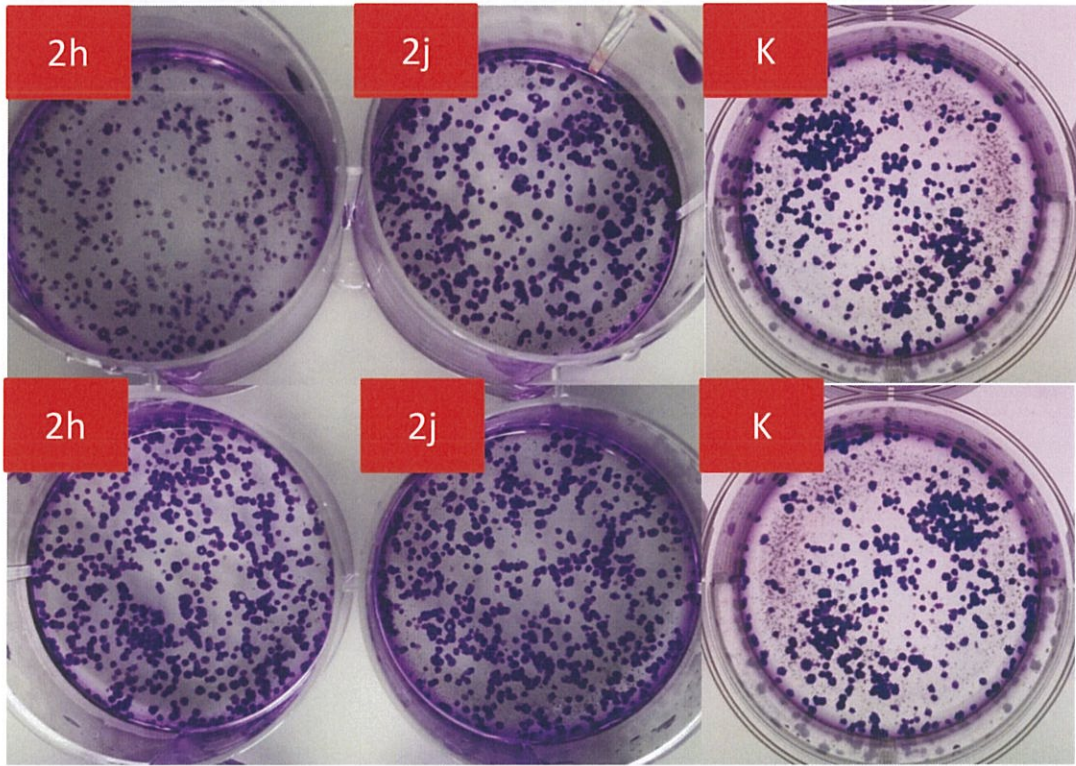
Şekil 4.93: 754- 3 serisi bileşik uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu



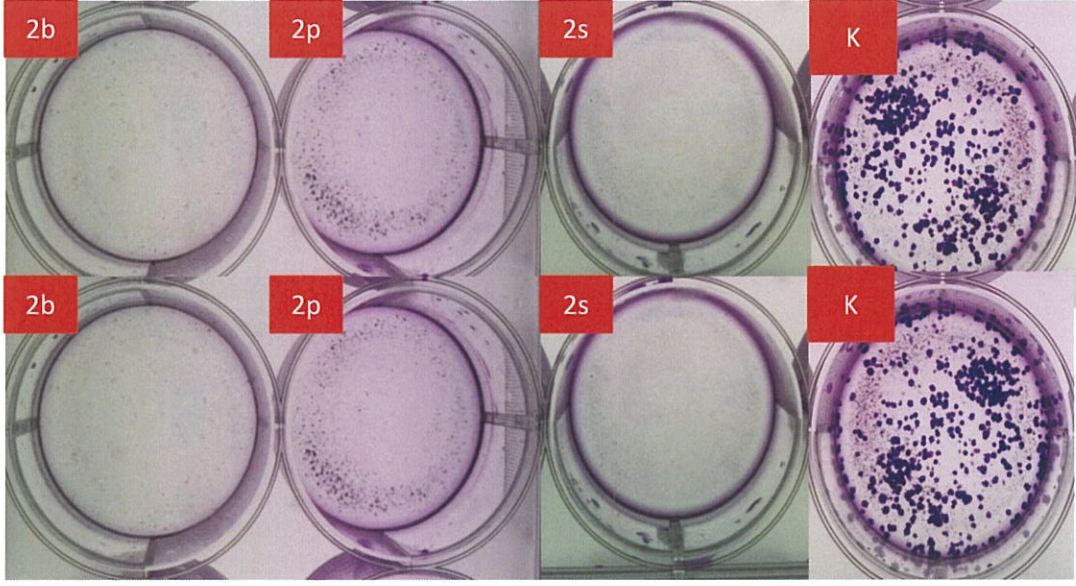
Şekil 4.94: 754- 3 serisi zehirli etkili olmayan bileşikler uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu



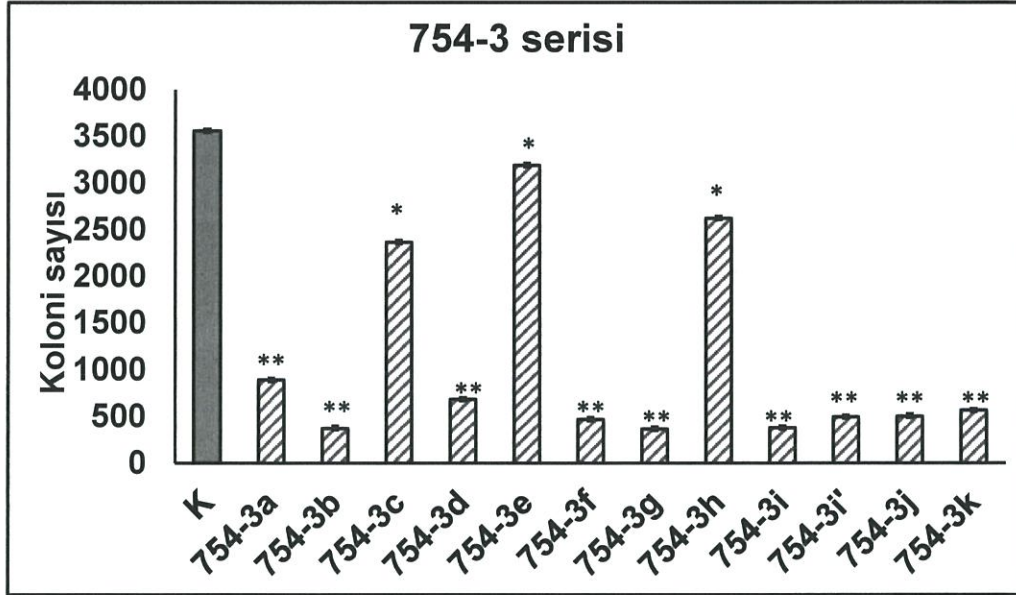
Şekil 4.95: 706- 2 serisi bileşikler uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu



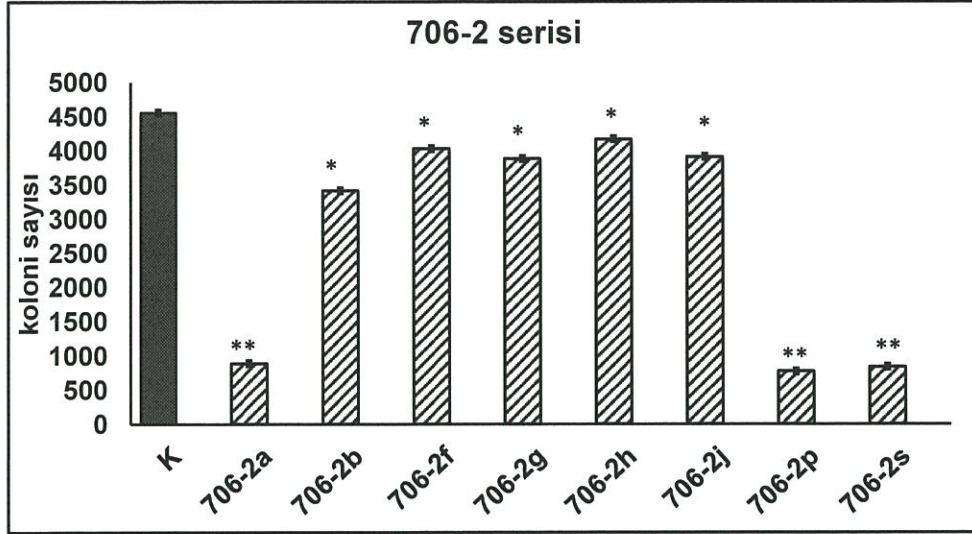
Şekil 4.96: 706- 2 serisi bileşikler uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu



Şekil 4.97: 706- 2 serisi bileşikler uygulandıktan sonra Hep3B hücrelerinde koloni oluşabilme durumu



Şekil 4.98: 754-3 serisi bileşiklerin koloni oluşumunun değerlendirilmesi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.99: 706-2 serisi bileşiklerin koloni oluşumunun değerlendirilmesi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)

4.6 Nitro Gruplu Bileşiklerin Hep3B Hücrelerinde Oluşturduğu Ölüm Mekanizmalarının Belirlenmesi

4.6.1 Bileşiklerin apoptotik genlerin mRNA seviyesinde etkilerinin belirlenmesi

İlaç öncül maddelerin Hep3B hücreleri üzerinde oluşturduğu ölüm mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla, ilk olarak hücrelerin 75 cm²'lik flaskları doldurması beklendi. Büyüyen kültür kontrol edildikten sonra hücreler 25 cm²'lik flaslara Bölüm 3.2.1.4 ile anlatıldığına uygun olarak paylaştırıldı. Tutunmaları için 24 saat beklendikten sonra ilaç öncülü maddeler belirlenen % 50 inhibisyon değerleri hesaplanarak uygulandı. 48 saat sonrasında flaskların medyum içeriği döküldü ve tripsinizasyon ile pellet alındı. Elde edilen pelletlerden Bölüm 3.2.4.1.1'de anlatıldığı gibi Thermo RNA izolasyon kitinin™ önerdiğine uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların durumu RNA jel eklektorezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.89). Miktarı hesaplanan RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı. cDNA kalitesinin kontrolü amaçlı insan beta mikroglobulin cDNA ları kullanılarak, kontrol PCR yapılarak, jel elektroforezinde yürütülmüştür (Şekil 4. 90). Bu elde edilen cDNA'lar

kullanılarak seçilen apoptotik süreçte görevli olan Bcl-2 ve Bax genlerine ait primerler (Çizelge 3.19) ve normalizasyon amacıyla insan β -2 mikroglobulin primeri (Çizelge 3.16) ile Bölüm 3.2.4.1.7 ile anlatılana uygun şartlarda Real Time PCR yapıldı. Programdan elde edilen cT değerlerinin, Δ ct metodu ile analizleri yapıldı. Analizlerinin istatistiki olarak ifadesi Minitab Anova (oneway) ile değerlendirildi. Bu programın verdiği sonuçlara göre $p < 0,05$ olan değerler anlamlı değer olarak kabul edildi.

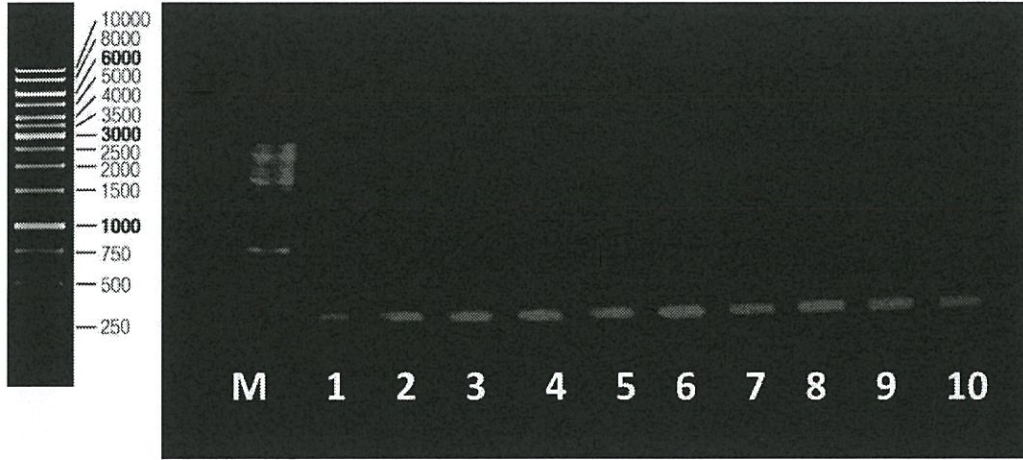
Buna göre, 754-3 serisi bileşiklerden (754-3a, 754-3b, 754-3d, 754-3f, 754-3g, 754-3i, 754-3j, 754-3k) yapılan uygulamalar sonrası proapoptotik Bax mRNA seviyesi artmış, antiapoptotik Bcl-2 mRNA seviyesi ise azalmıştır (Şekil 4.91 ve Şekil 4.92).

706-2 serisi bileşikler (706-2a, 706-2p ve 706-2s) bileşikler içinde Bax mRNA ları artmış ve Bcl-2 mRNA ları azalmıştır (Şekil 4.93 ve Şekil 4.94).



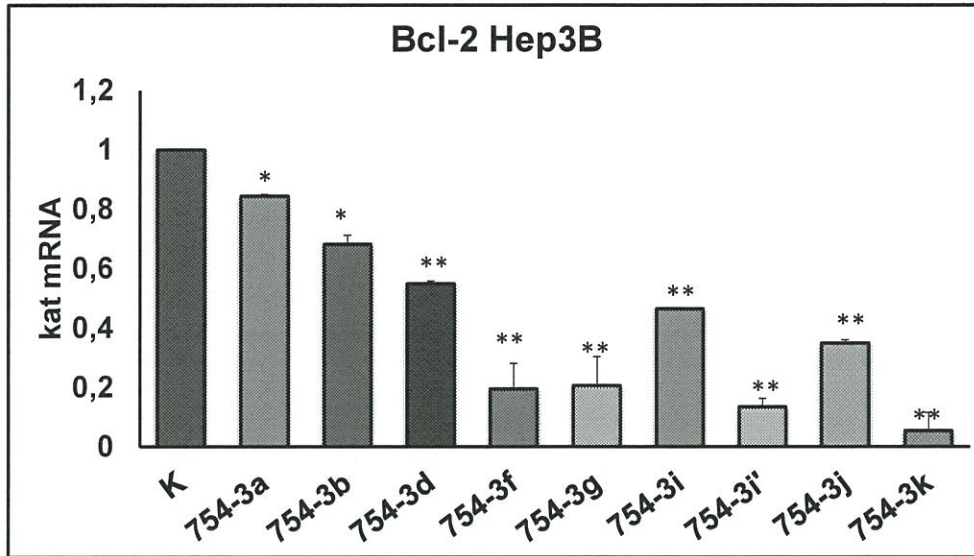
Şekil 4.100: RNA jel görüntüsü

(M: RiboRuler RNA Marker, 1-Kontrol Hep3B, 2-754-3a, 3-754-3b, 4-754-3d, 5-754-3f, 6-754-3g, 7-754-3i, 8-754-3j ve 9-754-3k)

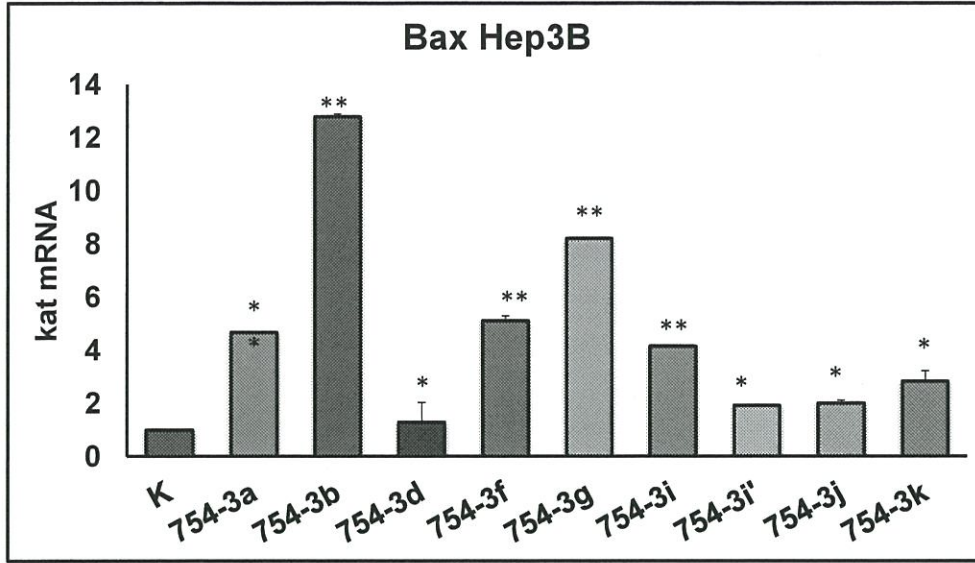


Şekil 4.101: Klasik PCR agaroz jel görüntüsü

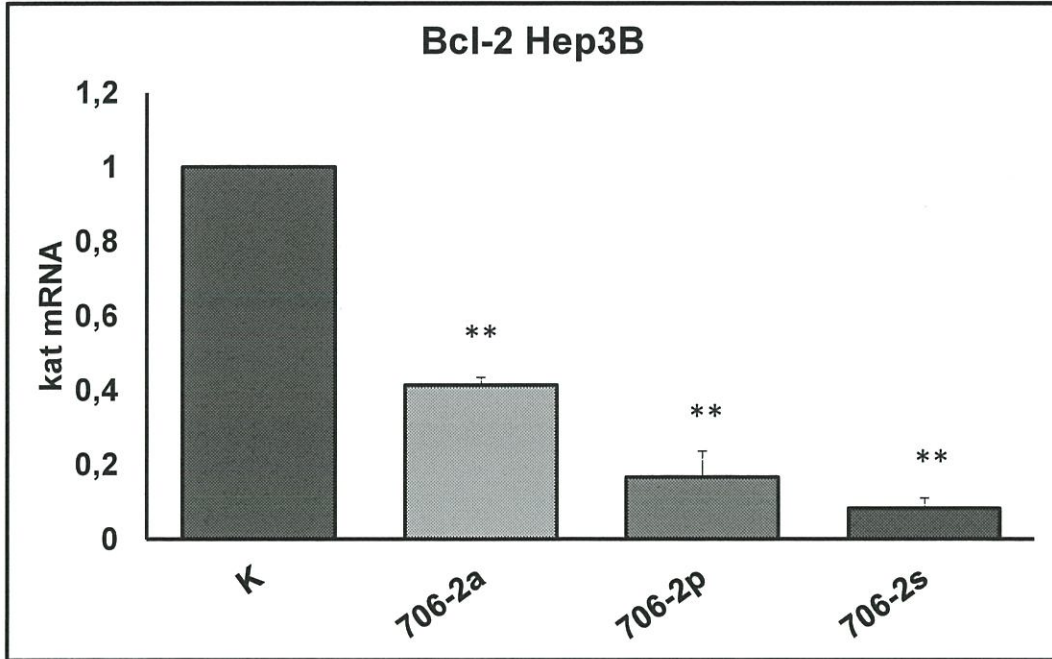
(M: DNA Marker, 1-Kontrol Hep3B, 2-754-3a, 3-754-3b, 4-754-3d, 5-754-3f, 6-754-3g, 7-754-3i, 8-754-3i', 9-754-3j ve 10-754-3k)



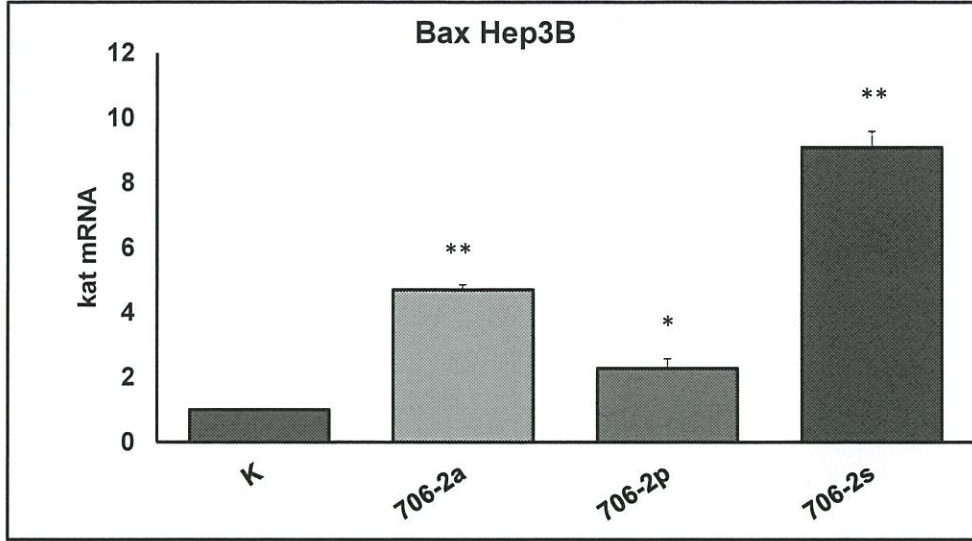
Şekil 4.102: Bcl-2 geninin 754-3 serisi ilaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinde mRNA seviyesindeki etkisi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



Şekil 4.103: Bax geninin 754-3 serisi ilaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinde mRNA seviyesindeki etkisi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



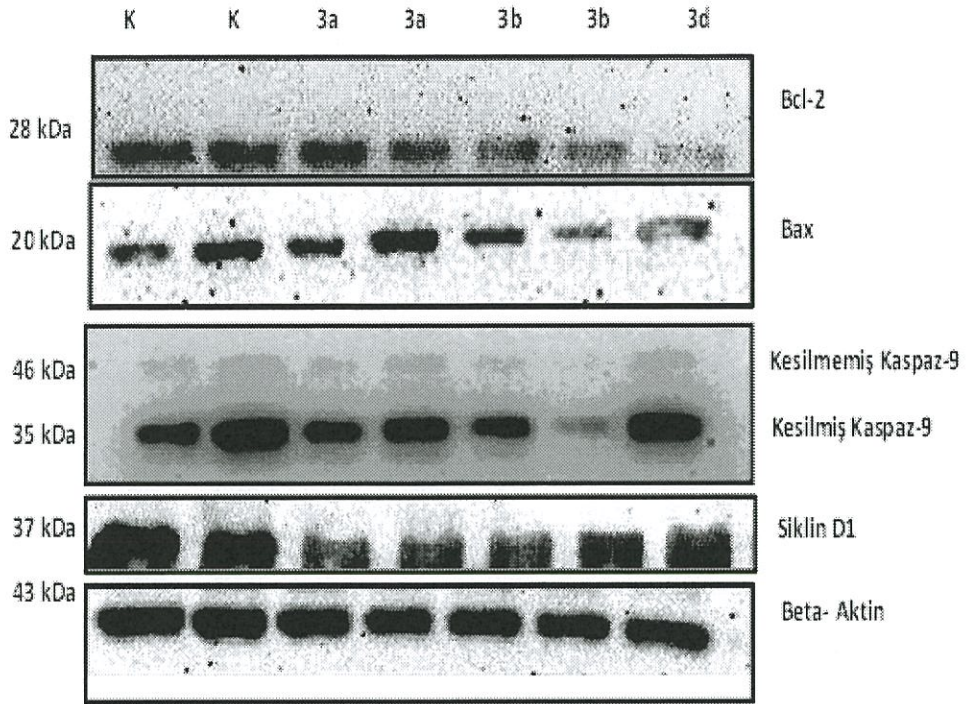
Şekil 4.104: Bcl-2 geninin 706-2 serisi ilaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinde mRNA seviyesindeki etkisi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)



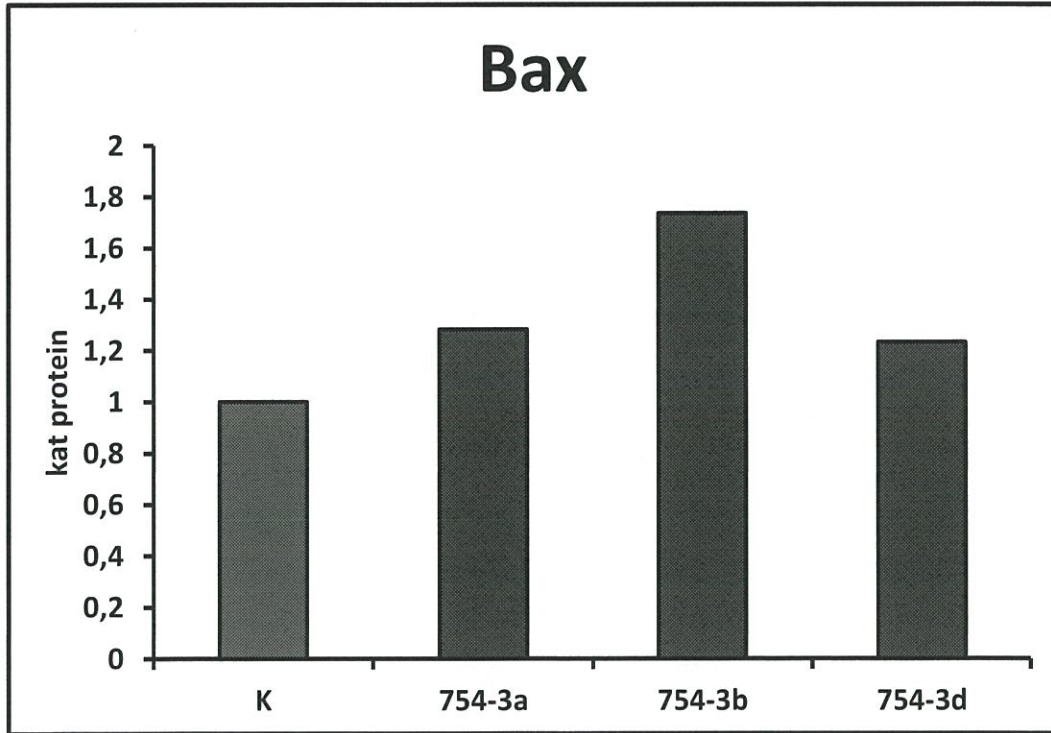
Şekil 4.105: Bax geninin 706-2 serisi ilaç öncülü uygulanan Hep3B hücrelerinde mRNA seviyesindeki etkisi ($p < 0,05$ olanlar * ile, $p < 0,01$ olanlar ** ile belirtilmiştir.)

4.6.2 Protein seviyesinde etkilerinin gösterilmesi

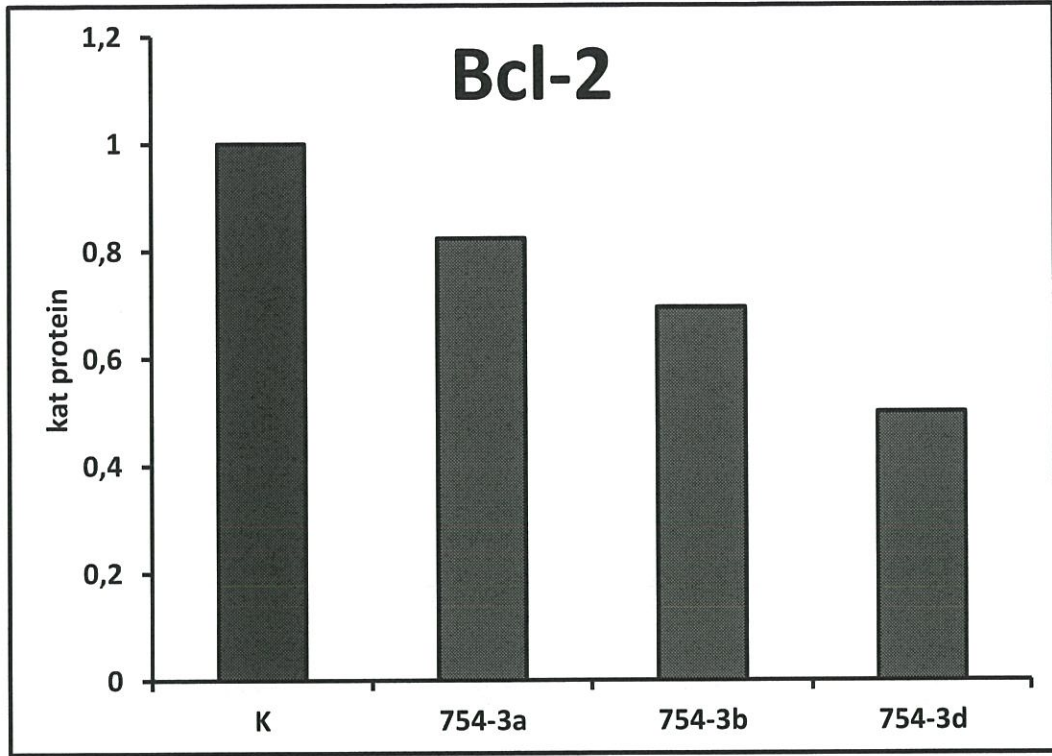
Bu amaçla Hep3B hücreleri flask başına 2milyon hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Daha önceden hesaplanmış olan IC_{50} değerlerine uygun olacak miktarlarda ilaç öncül maddeler uygulandı. Ayrıca kontrol grubu olarak yine ilaç öncülü uygulanmamış olan Hep3B hücreleri kullanıldı. Bu hücreler 48 saat süresince inkübasyona tabi tutulduktan sonra tripsinizasyon basamağından sonra Bölüm 3.2.4.2.2 ile belirtilene uygun olarak RIPA tamponunda çözülerek lizat haline getirildi. Bu lizatlar hazırlanan poliakrilamid jele yüklendi. 120 V akımda yaklaşık 2 saat boyunca yürütüldü. Fragmente olmuş proteinlerin PVDF membrana geçişinin sağlanması için gece boyunca $+4^{\circ}C$ 'de transfer işlemi gerçekleştirildi. Transferden sonra membran ticari olarak satın alınan Bcl-2 (1/1000), Bax (1/1000), Kaspaz-9 (1/100) ve SiklinD1 (1/100) antikorları 1 g BSA ile çözülmüş 20 mL 1 X TBST solüsyonunda ve normalizasyon için β -aktin antikorları (1/5.000) ile muamele edildi. Her iki antikor içinde ikincil antikor 1/5.000 dilüsyon oranında antirabbit antikorları kullanılarak işaretlendi. Ardından ECL ile muamele edilip, UVP sisteminde görüntüledi.



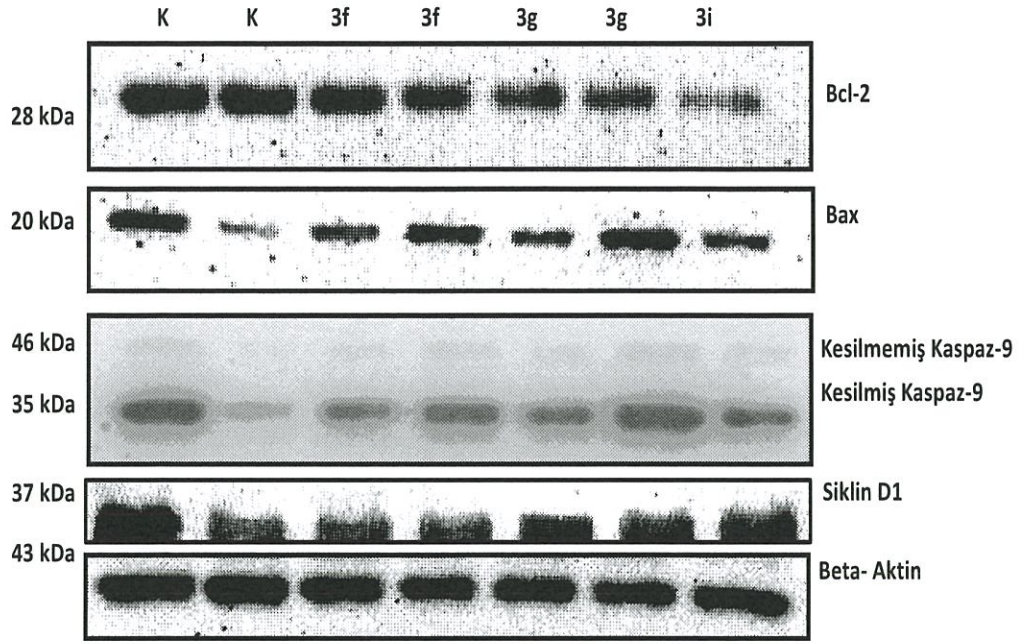
Şekil 4.106: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde etkilerinin belirlenmesi



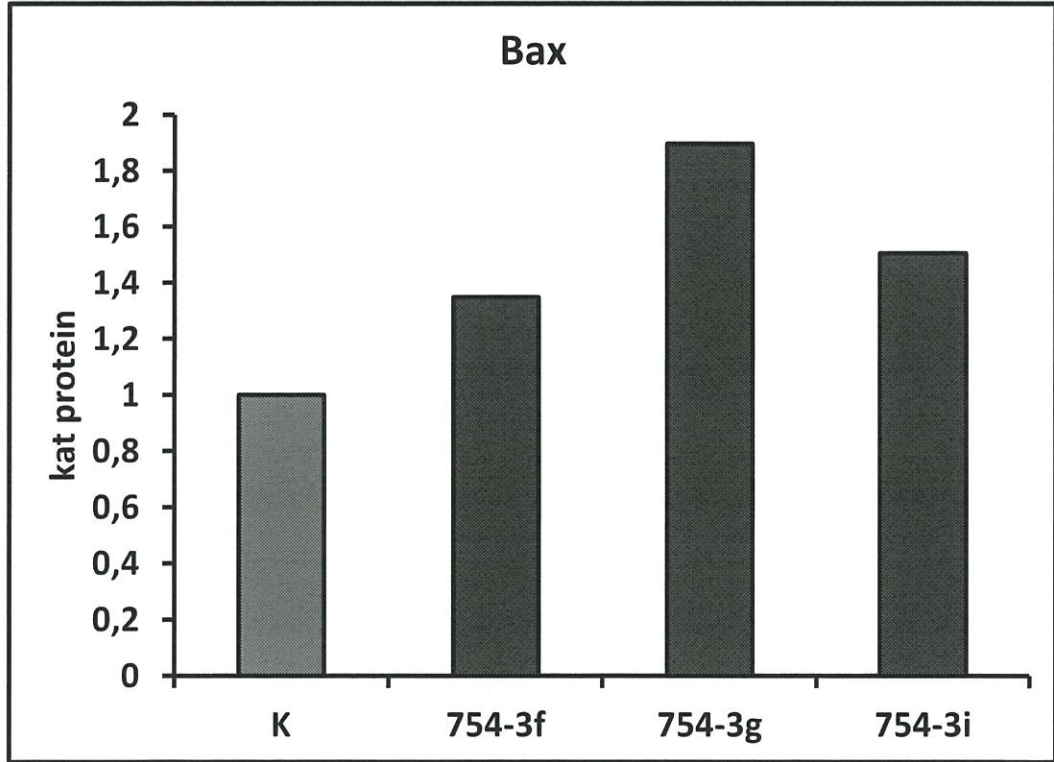
Şekil 4.107: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde (Bax) etkilerinin grafiklendirilmesi



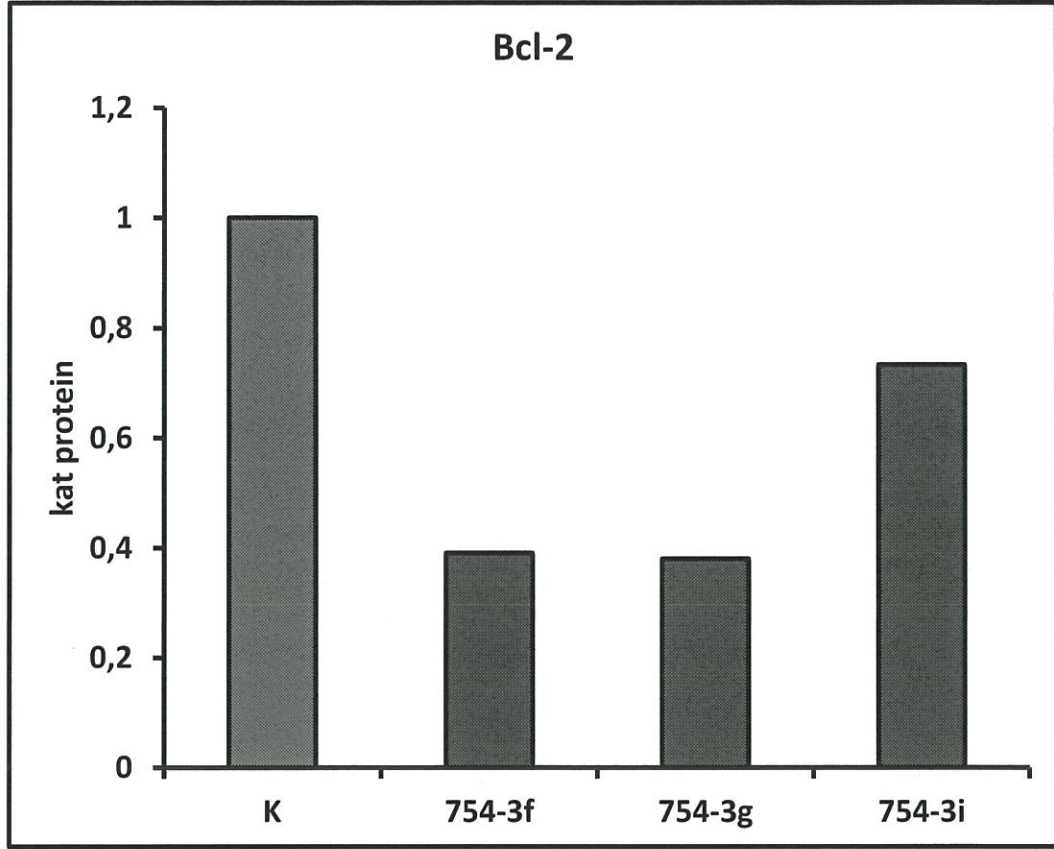
Şekil 4.108: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde (Bcl-2) etkilerinin grafiklendirilmesi



Şekil 4.109: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde etkilerinin belirlenmesi



Şekil 4.110: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde (Bax) etkilerinin grafiklendirilmesi

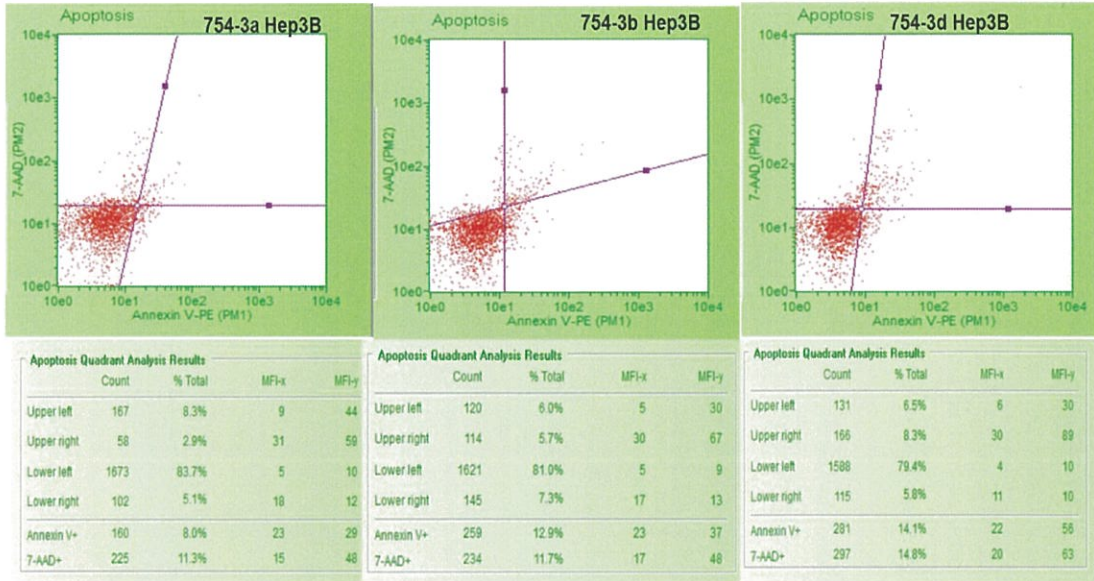


Şekil 4.111: Nitrolu bileşiklerin protein seviyesinde (Bcl-2) etkilerinin grafiklendirilmesi

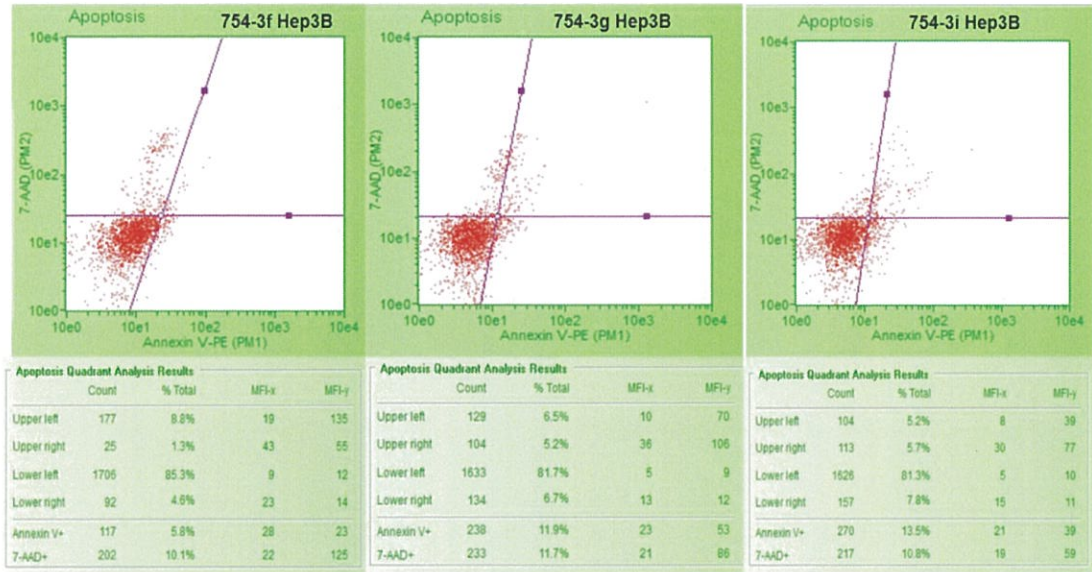
4.6.3 Nitrolu bileşiklerin Seçtiği Ölüm Yolunun Akım Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi

Bölüm 3.2.4.2.7 ile anlatılan Akım Sitometri yöntemi ile Guava Nexin kitinin önerdiği akışa uygun olarak deney planlandı. Buna göre daha önceden mRNA seviyesinde genler ile ifadeleri belirlenip yorumlanan bileşiklerin hangi ölüm yolunu seçtiğini belirlemek hedeflendi. Bölüm 3.2.1.2 ve 3.2.1.4 ile anlatılan şekilde Hep3B hücreleri 12-kuyucuklu plakaya paylaştırıldı. 24 saat tutunmaları beklendikten sonra % 50 inhibisyon değerine uygun olacak şekilde nitrolu bileşikler kuyucuklara uygulandı. 48 saat sonra hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı. Ardından kitin önerdiğine uygun olarak %1 BSA içeren medyuma alındı. Annexin V çözeltisi oda sıcaklığında bekletildikten sonra, stok hücreden

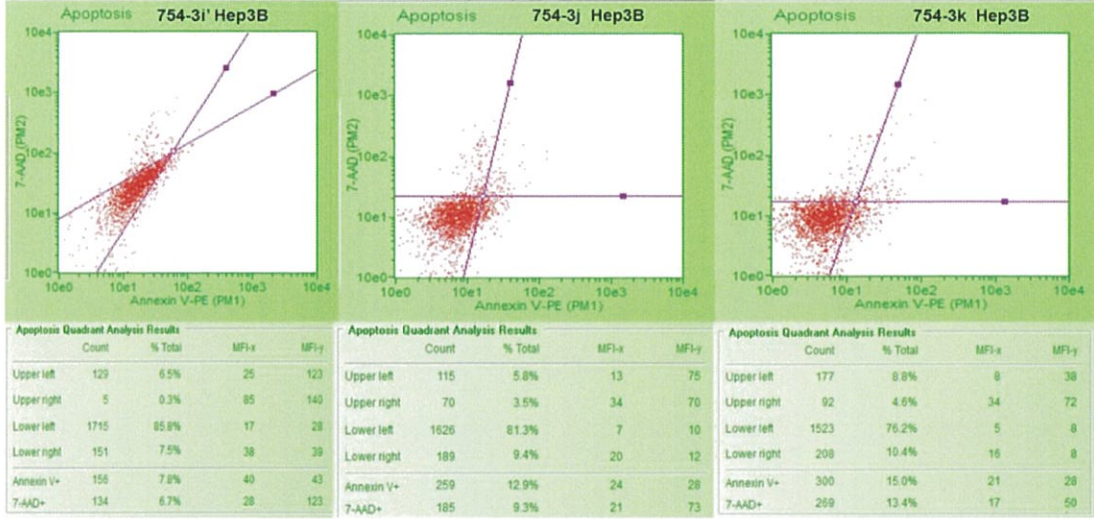
sayılarak belirlenen miktardan 100 µL alınarak temiz bir tüpe aktarıldı. Bu hücrenin üzerine 100 µL Annexin V eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Sürenin dolumunda Guava EasyCyte cihazı kullanılarak analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.115: Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi (Grafik nekroz, erken ve geç apoptozdaki hücre yüzdesini göstermektedir) . Cihazdan alınan grafikler sırasıyla Şekil 4.112, Şekil 4.113 ve Şekil 4.114 ile gösterilmiştir.



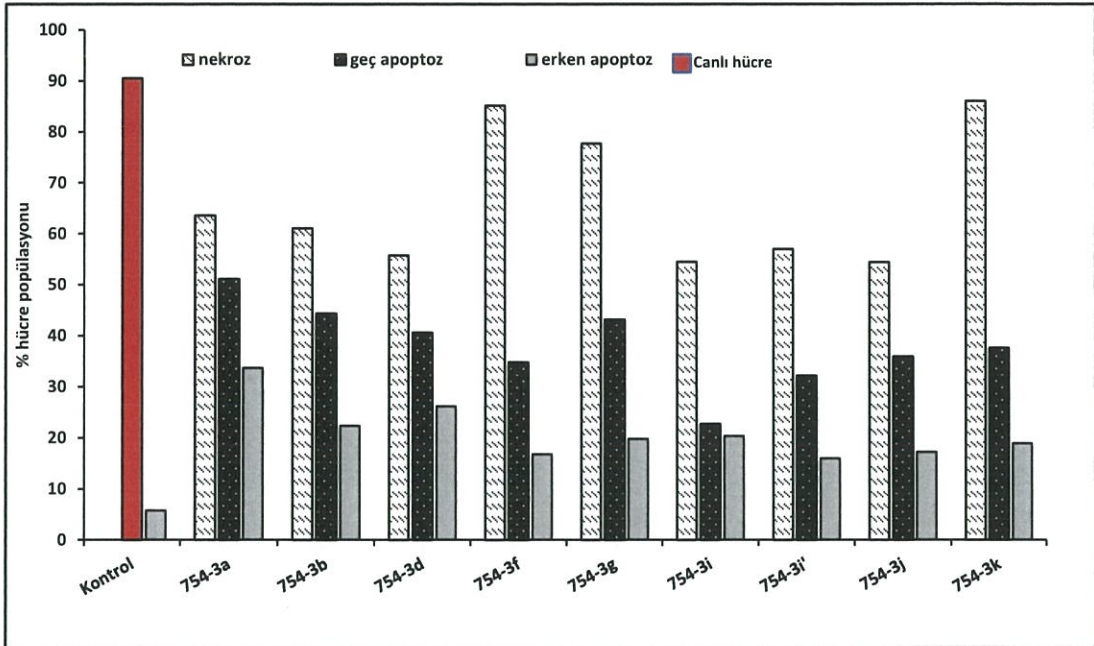
Şekil 4.112: 754-3 serisi Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi (754-3a, 754-3b ve 754-3d)



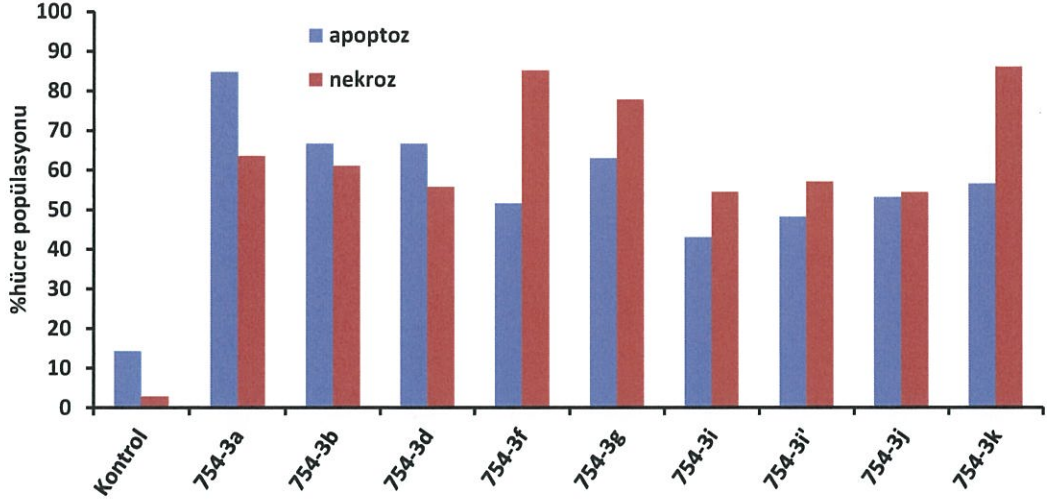
Şekil 4.113: 754-3 serisi Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi (754-3f, 754-3g ve 754-3i)



Şekil 4.114: 754-3 serisi Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi (754-3i', 754-3j ve 754-3k)

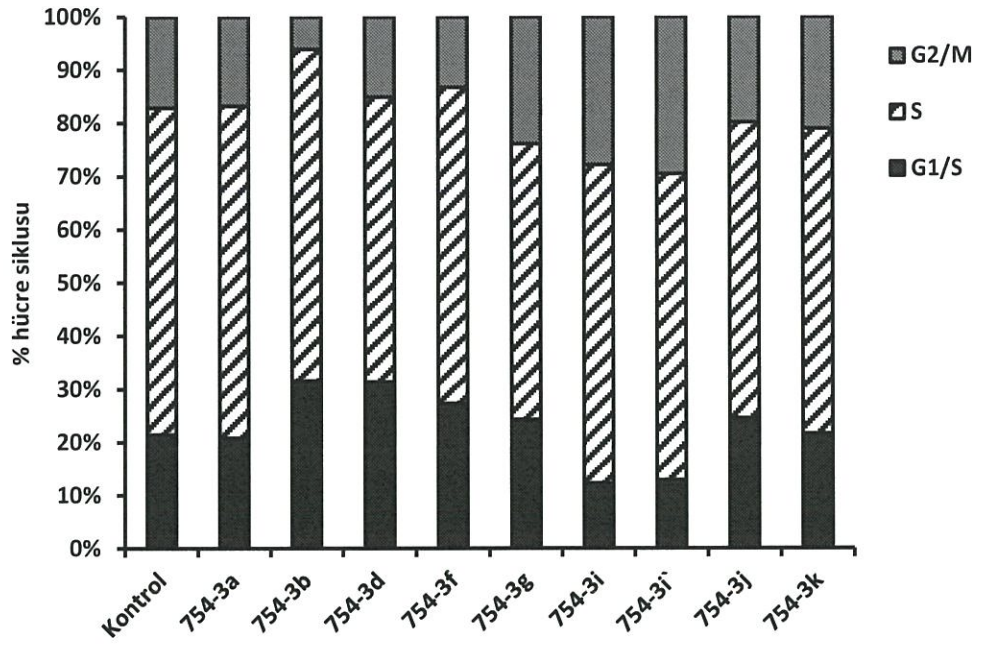


Şekil 4.115: Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi (Grafik nekroz, erken ve geç apoptozdaki hücre yüzdesini göstermektedir)



Şekil 4.116: Nitrolu bileşiklerin Annexin V ile analizi (Grafik nekroz ve apoptozdaki hücreleri göstermektedir)

Hücrelerin seçtikleri ölüm yolunun belirlenmesinin ardından aynı hücrelerin hücre döngüsünde tutuklandıkları aşamaları belirlemek amacıyla Akım Sitometri yönteminde Propidium İyodür (PI) analizi yapıldı. Bu amaçla Hep3B hücreleri 12 kuyucuklu plakalara bölündükten sonra tutunmaları için yeterli süre geçtikten sonra belirlenen % 50 inhibisyon değerlerine uygun miktarda ilaç öncülü ile muamele edildi. 48 saat boyunca CO₂'li inkübatörde bekletildikten sonra kuyucuklar PBS ile yıkandı. %95 'lik alkol ile 1 saat boyunca +4 °C'de bekletildikten sonra örnekler PI uygulandı ve yarım saat bekleme süresinin sonunda Guava EasyCyte cihazında ölçüm alındı (Şekil 4.117).



Şekil 4.117: Nitrolu bileşiklerin PI ile analizi (Grafik hücrelerin tutuklandığı hücre döngüsünün evrelerini göstermektedir)

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanser tedavisinde en önemli gelişmelerden biri sitotoksik kemoterapötik ajanların geliştirilmesi olmuştur [75-77]. Tümör oluşumunda yer alan moleküler ve genetik mekanizmaların daha iyi anlaşılması, daha fazla hedefe yönelik kemoteraplere doğru bir geçişe yol açmıştır [77]. Hedefe yönelik olarak tasarlanan küçük moleküller, son zamanlarda belirli kanser tiplerinde tedavi için onaylanmıştır [78]. Bu nedenle çok sayıda hedefe yönelik olan yönlendirilmiş enzim tedavileri geliştirilmiştir. GDEPT tedavilerinin tümünde, ekzojen olan bir ilaç öncülü ve enzim hedeflenen kanser hücrelerine iletilir. Bu sayede kanser hücresi bu ilaca karşı hassas hale gelmiş olur [79]. Bu tedavilerde karşımıza çıkan CB1954 ve nitroredüktaz enzimleri ön denemeleri geçtiğinden, bu alanda daha etkili ilaçların ortaya çıkma ihtiyacı doğmuştur.

Literatürde nitroredüktazlar ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda enzime uygun olarak sentezlenip, etkinliği kanser hücrelerinde denenmiş olan bileşiklere rastlanmamıştır. Bu amaçla CB1954 'ün avantajlı olmayan yönlerine iyileştirmeler yapılarak farklı moleküler yapılarda bileşiklerin sentezi gündeme gelmiştir. Nitro grup ihtiva ederek farklı grupların eklenmesiyle moleküler yapıları farklı ancak ana iskeletleri aynı olan 2,4,6-trinitroanilin grubu olarak adlandırılan 20 farklı bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin yapı – etkinlik tayinleri ve tanımlamaları yapıp, üç boyutlu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu tez kapsamında bu bileşiklerin kanser hücrelerinde yarattıkları etkiler aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu amaçla ilk olarak sentezi yapılan tüm nitro gruplu bileşiklerin seçilen hücre hatları olan PC3, Hep3B, HT-29, Saos-2 ve HUVEC üzerinde oluşturdukları sitotoksik etki belirlendi. Buna göre 754-3c, 754-3e ve 754-3h bileşikleri ve 706-2b, 706-2f, 706-2g, 706-2h ve 706-2j bileşiklerinin kendilerinin hücreler üzerinde herhangi bir zehirli etki oluşturmadığı ve bu yüzden ilaç öncülü olabileme potansiyellerinin olduğu düşünüldü. İlaç öncülünün tanımına uygun olarak; farmokodinamik ve zehir yönünden etkisiz fakat etkin ilaç haline gelebilen kimyasallar oldukları için enzim ile olan etkileşimleri değerlendirildi. Bu nedenle zehirli olmayan bu bileşikler ve S.

Saprophyticus' tan izole edilerek saflaştırılan Ssap-NtrB enzimi ile dışarıda reaksiyona sokulduktan sonra oluşan metabolitlerin karaciğer kanser hücreleri üzerine uygulaması çalışmaları gerçekleştirildi. Ön reaksiyon çalışmalarında Reaksiyon, Kontrol 1 ve Kontrol 2 olarak adlandırılan deney grupları bulunmaktadır. 'Reaksiyon' olarak tanımlanan deney grubunda reaksiyon oluşması için ortamda enzim, NADH ve nitrolu bileşik bulunurken, Kontrol 1 deney grubunda sadece nitrolu bileşik, Kontrol 2 deney grubunda ise sadece enzim ve nitrolu bileşik bulunmaktadır. Buradaki amaç, zehirli olmadığını bildiğimiz nitrolu bileşiğin enzimle reaksiyona girdikten sonra toksisitesini analiz etmektir. Ancak, hücre dışı denemelerde, tüm bileşikler enzim ile denenmiştir. Çünkü özellikle 754-3 serisi bileşiklerin tamamlanan 1001 projesinden aktivite denemelerinden pozitif sonuç alınmıştır. Reaksiyon denemeleri iyi olan bileşiklere ait % 50 inhibisyon değeri olan IC₅₀ değerlerini hesaplayabilmek için 3 farklı derişimde substrat uygulayarak reaksiyon denemelerine tabi tutuldu. Ön reaksiyon denemelerinde az etkili olan bileşikler ise derişim artışı aşamasına taşınmamıştır. 150 µM, 39 µM ve 9 µM derişim aralığında çok yüksek ölüm değeri veren bileşikler için ise daha düşük derişim değerlerinde (180 nM, 18 nM ve 1,8 nM) bileşik enzim ile buluşturularak IC₅₀ değerlerini hesaplamaya çalışıldı. Buna göre yaptığımız bu çalışma sonucunda referans madde olarak kullanılan CB1954 ile yarışır derecede olan çok önemli bulgular elde edildi. Bazı bileşiklerin nanomolar seviyede % 50 inhibisyon sağladığı belirlendi. Reaksiyon denemelerinde CB1954'e ait %50 inhibisyon değeri 0,86 nM olarak hesaplandı ve diğer bileşiklerin bu değer ile yarışabilirliği ölçülmüştür.

Aynı bileşiklerin bu kez enzimin hücre içinde ifade olduğu sistemde denemesi yapılmıştır. Bunun için öncelikle Ssap-NtrB geninin klonlanması yapılmıştır. Gebze Teknik Üniversitesi'nden temin edilen Ssap-NtrB bakteri ekspresyon vektörü olan pET14b 'ye klonlanmış halde bulunmaktaydı. Ancak kanser hücre sisteminde deneneceği için bunun bir ökaryotik ekspresyon vektörü olan pCDNA3.1/V5/HisB 'ye klonlanması başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Bu klonlama çalışmalarında kullanmak için genin 617bç uzunluğundaki dizisi esas alınarak bir ileri ve geri primer çifti dizayn edildi. Primer tasarlanırken mRNA'nın daha kolay bağlanmasını sağlayan kozak dizisi ilave edilerek ifadenin daha güçlü olması sağlandı.

Klonlama aşamasından sonra kalsiyum fosfat yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde aktarma işlemi gerçekleştirildi ve mRNA seviyesinde ifadesinin arttığı gösterildi. Ayrıca protein seviyesinde yapılan IFC ve hücre akım sitometri analizleri ile de protein ifadesinin doğrulanması sağlandı. Doğruluğundan emin olunduktan sonra kontrol grubu olarak CB1954'ün uygulandığı, ilaç öncüllerinin hücre içi denemeleri yapıldı. Bu sayede intihar gen tedavisine aday ilaç öncüllerinin belirlenmesi sağlandı.

Zehirli olduğu belirlenerek, kendisinin ilaç adayı olma özelliği olan bileşikler olan 754- 3a, 754-3b, 754-3d, 754-3f, 754-3g, 754-3i, 754-3i', 754-3j, 754-3k, 706-2a, 706-2p ve 706-2s ile moleküler düzeyde çalışmalara devam edildi. Bu kapsamda ilk olarak MTT denemelerinde toksisitenin daha fazla görüldüğü kanser hücre hattı olan Hepatoma hücreleri seçildi. Hep3B hücrelerine belirlenen %50 inhibisyon değerlerine uygun olarak nitro gruplu bileşikler uygulandı ve ilk olarak hücresel ve metastatik etkileri belirlendi. Hücrelerin göç kabiliyeti üzerine olan etkilerini gösteren bir yöntem olan yaralanma denemesi ile maddelerin MTT sonuçlarının doğrulama sağladığı belirlendi. Aynı nitro gruplu bileşiklerin koloni oluşturabilme kabiliyetlerinin değerlendirildiği koloni oluşturma denemesi tıpkı diğer iki yöntem ile aynı sonucu vermiştir.

Nitro gruplu bileşiklerin sahip oldukları zehirli etkinin hücre ölüm mekanizmaları olan ilişkisinin belirlenebilmesi için apoptotik olan ve olmayan genler ile ilişki düzeyleri ölçülmüştür. qRT-PCR metodu sayesinde Bcl-2 ve Bax genlerinin ifade seviyesi belirlenmiştir. Hücre yaşam geni olarak bilinen ve azaldığı durumlarda hücrede bir ölüm yolunun ortaya çıktığının bir belirteci olan Bcl-2 geni ile olan denemelerde genin ifade seviyesinin azaldığı görülmüştür. Apoptozun başladığının göstergesi olan bir gen olan Bax ifadesinin ise artış gösterdiği belirlenmiştir.

Apoptozun saptanmasının bir başka yolu ise akım sitometri yönteminde Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) uygulanmasıdır. Normal, sağlıklı bir hücre halindeyken zarın iç kısmında yer alan fosfotidilserin yapısı zarın yapısının bozulması sonucunda hücre zarının dış kısmına yerleşir. Bu yapının yer değiştirmesi sayesinde hücrelerde erken apoptozun belirlenmesi mümkün hale gelir [80]. Aynı zamanda bu yöntemde geç apoptoz ve nekroz yollarını seçen hücre sayıları da belirlenebilir. Ancak kanser tedavisinde nekrotik hücre ölüm

tipi istenmeyen bir olgudur. Bunun nedeni ise nekroza uğrayan hücrelerin yapısı parçalanır ve tüm içeriği kontrolsüz şekilde hücre içine dağılır. Bu dağılıma hücrede iltihabi durumlar oluşturabilir [81]. PI boyamasının sonucunda hücrelerin tutuklandıkları hücre döngüsü aşamaları belirlenmiştir. Aynı bileşiklerin Annexin V ile analizi sonucunda ise hücrede seçtikleri ölüm yolu anlaşılmıştır. Buna göre, hücre döngüsü analizi PI ile ölçülmüştür. 754-3b, 754-3d, 754-3f, 754-3j, 754-3k, 754-3g bileşikleri G1/S evresinde daha fazla kaldıkları anlaşılmıştır. Apoptotik hücre sayısını belirleyen Annexin V deneyi ise, en fazla apoptozun 754-3a, 754-3b, 754-3d, 754-3i ve 754-3j olduğunu göstermiştir.

Bu tez kapsamında sentezi yapılmış olan 20 farklı nitro gruplu bileşiğin mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu bileşiklerin tek tek değerlendirmesine bakıldığı zaman; 754-3a bileşiği literatürde poliklonal antikör karşıtı olarak [82] ve yüzey plazmon rezonans biyosensörü olarak [83] kullanımda karşımıza çıkmaktadır. Sentezi yapılmış olmasına rağmen kanser hücreleri üzerinde her hangi bir çalışması bulunmamaktadır. İlk sitotoksik analizler sonucunda 754-3a bileşiğinin Hepatoma (IC_{50} : 46 μ M) ve Prostat kanseri (IC_{50} : 46 μ M) hücrelerine yüksek seviyede etkili olduğu belirlenmiştir. 754-3a maddesine ait hücre dışı reaksiyon denemesi sonucunda *in vitro*'daki reaksiyon denemeleri CB1954 bileşiği ile yarışır seviyede olduğu belirlenmiştir. Devam eden deneyler olan yaralanma ve koloni oluşturma denemesinde de aynı etki gözlemlenmiştir. mRNA seviyesinde Bcl-2 seviyesinin azaldığı ve Bax seviyesinin ise arttığı görülmüştür. Protein düzeyinde ise Bcl-2 ifadesi azalırken, Bax genine ait ifadenin mRNA düzeyinde olduğu gibi artış gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda Kaspaz-9'un da desteklediği apoptotik sürece girdiği akım Sitometride Annexin V ve PI boyamaları sonucunda da gözlemlenmiştir. Bu nedenle bu bileşiğin kendi toksisitesinden yararlanılacak çalışmalarda kullanılabilirliği belirlendi.

754-3b olarak isimlendirilen nitro gruplu bileşiğin elektronik yapısı ve asit-baz özellikleri belirlenmiş olup [84], farklı bir çalışması yapılmamıştır. Sitotoksikite verilerine baktığımız zaman en yüksek etkinin Hepatoma hücrelerinde (IC_{50} : 71 ve 66 μ M) olduğu belirlenmiştir. Hücre dışı reaksiyon denemelerinde hem yüksek hem de düşük derişimde denenen bu bileşiğin,

istenen etkiyi gösteremediği belirlendi. Koloni oluşturma ve çizik denemesi sonucunda, koloni oluşumunu yavaşlattığı ve hücrelerin göç kabiliyetini azalttığı belirlendi. qRT-PCR sonucunda Bcl-2 geninin etkisini 0,4 kat azalttığı ve Bax geninin etkisini ise 12 kat arttırdığı görüldü. mRNA seviyesindeki gözlemlenen ifadeler Western analizi ile bir kez daha doğrulanarak Bcl-2 ifadesinin azaldığı, Bax ifadesinin ise arttığı görüldü. Annexin V ile muamelesi sonucunda ise hücreyi erken apoptoza götürdüğü belirlendi. qRT-PCR, Western Blot ve akım sitometri denemeleri birbirini destekler nitelikte olup hücrenin madde etkisiyle apoptotik sürece girdiği söylenebilir.

754-3c bileşiğinin çeşitli kimyasallar ile reaksiyonlarının [85] bulunduğu taramalarda bizim çalışmamıza benzer bir veriye rastlanmamıştır. Sitotoksisite denemesi sonucunda dört kanser hücre hattında (Hep3B, PC3, HT-29 ve Saos-2) ve bir sağlıklı hücre hattında hiçbir zehirli etkisi bulunmadığı belirlendi. Bu nedenle ilaç öncülü olabilme potansiyelinin araştırılmasına gidildi. pCDNA3.1/V5/HisB ökaryotik ekspresyon vektörüne klonlanmış olduğumuz Ssap-NtrB geni ile olan ifadeleri belirlendi. Bu amaçla ilk olarak dış ortamda oluşturulan reaksiyonlar sonucunda oluşan ürünler hücre dışı denemeler olarak Hep3B hücrelerine uygulandı ve sonucu SRB yöntemiyle belirlendi. Buna göre CB1954 ile yarışabilir seviyede olduğu görüldü ve bu kez hücre içindeki durumunun belirlenmesi düşünüldü. Klonlanmış olan Ssap-NtrB geni ile olan etkileşiminde enzimin hücrede ifade olduğu ve ilaç öncülü ile birleştiği zaman CB1954 ile yarışabilir seviyede bir etkiye sahip olduğu görüldü. Bu bileşik ilaç öncülü olarak değerlendirilebilir.

754-3d bileşiği ile ilgili çok sayıda sentez, kimyasal reaksiyon bilgisinin bulunduğu literatür taramasında madde etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan MTT testi sonucunda bu maddenin Hepatoma hücrelerinde 48 saatte IC₅₀: 17 µM ile zehirli etkili olduğu belirlendi. Çizik testi ve koloni oluşumu denemesinde beklendiği gibi etki göstererek koloni oluşumunu azaltıp, metastatik süreci yavaşlattığı görüldü. Maddenin hücrelerdeki moleküler analizi için yapılan çalışmalarda ise mRNA düzeyinde Bcl-2 seviyesinin normal hücreye göre yaklaşık olarak % 50 seviyesinde azaldığı ve buna karşılık olarak Bax seviyesinin arttığı görüldü. Aynı genlerin protein ifadesine bakıldığı zaman ise Bcl-2 seviyesinin azaldığı, Bax seviyesinin arttığı ve Kaspaz-9 seviyesinin de arttığı belirlendi. Hücrenin seçtiği ölüm mekanizmasını aydınlatmada bir belirteç olabilen Annexin V

analizi sonucunda hücrelerin apoptotik yolu daha fazla seçtiği belirlendi. Propidyum iyodür ile yapılan boyama sonrasında ise hücrelerin en fazla G1/S evresinde tutuklandığı belirlendi.

754-3e bileşiğinin Paik ve ark. tarafından antikorlar ile muamale işleminde kullanıldığı belirlenmiştir [86] . Farklı hücre hatlarına belirlenen miktarda uygulama yaptıktan sonra zehirli etkisini belirlediğimiz sitotoksikite denemesi sonucunda bileşiğin herhangi bir zehirliliğe neden olmadığı belirlendi. Bu nedenle ilaç öncülü olarak ileri denemelere taşındı ve ilk olarak dış ortamda uygun koşullarda reaksiyon hazırlanıp oluşan ürünleri Hepatoma hücrelerine uygulandı. Bu etkinin belirlenmesi için SRB yöntemi kullanıldı. Aynı bileşiğin hücre içinde ifade olan enzim ile olan etkileşimi de belirlendi. Buna göre CB1954 ile yarışabilir olduğu belirlendi. İlaç öncülü potansiyeli olan bileşik olarak değerlendirildi.

754-3f maddesinin yaprak fitopatojenleri ile ilgili [87] çalışmaları yapılmış olup farklı bir uygulamasına rastlanmamıştır. Tüm hücrelerde yüksek bir zehirliliğe sahip olan 754-3f maddesinin bu tanımı her bir deney uygulaması ile bir kez daha gözlemlendi. Buna göre 3f maddesi Hep3B, PC3, HUVEC, Saos-2 ve HT-29 hücreleri üzerine zehirli etkilidir. Hep3B hücreleri üzerine IC₅₀ değeri 48 saatte 56,82 µM iken, HUVEC hücrelerinde bu değer 78,92 µM olarak belirlendi. HT-29 hücreleri üzerine 150 µM derişimde zehirli etki gösterdiği belirlendi. Yaralanma ve koloni oluşturma denemesindeki etkisine bakıldığı zaman ise hücrelerin göçünü kuvvetli bir şekilde yavaşlattığı ve koloni oluşumunu azalttığı belirlendi. Aynı maddenin mRNA ve protein seviyelerin Bcl-2 ifadesinin kontrol grubuna göre azaldığı, ancak Bax seviyesinin ise artış gösterdiği görüldü. Annexin V analizi sonucunda ise hücrelerin nekrotik ölüm yolunu seçtikleri belirlendi. Propidyum iyodür ile yapılan muamele sonucunda ise G1/S evresinde hücrelerin çoğunluğunun tutuklandığı belirlendi. Tüm bu etkileri nedeniyle iyi bir ilaç olarak farklı kullanım alanlarında işlevsel olabileceği düşünülmektedir.

754-3g maddesi ile ilgili literatürde herhangi bir sentez bilgisine rastlanmamıştır. Sitotoksik denemeleri sonucunda Hepatoma hücreleri üzerine gösterdiği % 50 inhibisyon değeri 78 µM, PC3 hücrelerine karşı ise 78 µM olarak belirlenmiştir. HUVEC için 45 µM ve Saos-2 hücreleri için 88 µM değerinde % 50 inhibisyon göstermiştir. Ssap-NtrB enzimi ile hücre dışı

koşullarda gerçekleştirilen reaksiyon denemelerinde istenen CB1954 ile olabilecek yarışmayı sağlamamıştır. Bunun Kontrol1 grubunda da görülmesinden dolayı maddenin kendi substratından kaynaklı olabileceği belirlendi. Moleküler mekanizmasının aydınlatılabilmesi amacıyla yapılan qRT-PCR sonucunda Bcl-2 gen etkisini 0,2 seviyesine kadar azalttığı, Bax ifadesini ise yaklaşık olarak 8 kat arttırdığı belirlendi. Protein seviyesindeki ifadenin belirlenmesi amacıyla yapılan Western Blot deneyinde çalışılan Bcl-2 gen seviyesinin azaldığı, Bax gen seviyesinin ise arttığı görüldü. Kaspaz-9 seviyesinin değerlendirilmesi sonucunda hücrenin apoptotik sürece doğru yol aldığı belirlendi. PI ile yapılan boyama sonucunda hücrelerin büyük çoğunluğunun G1/S evresinde kaldığı belirlendi. Aynı şekilde yine akım sitometride Annexin V ile yapılan analiz sonucunda protein seviyesi Kaspaz-9 aktivitesinde olduğu gibi apoptotik süreçte etkili olduğu belirlendi.

754-3h bileşiği literatürde dumansız barut üretimi çalışmalarında [88] karşımıza çıkmaktadır. Yapmış olduğumuz toksisite denemeleri sonucunda hücrelere karşı zehirli etkili olmadığı belirlendi. Bu nedenle ilaç öncülü olabilme potansiyelinin araştırılması için ileri denemelere taşındı. İlk olarak dış ortamda uygun koşullarda reaksiyon hazırlanıp oluşan reaksiyon ürünleri Hep3B hücrelerine uygulandı. Bu etkinin belirlenmesi için SRB yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde hem yüksek derişim hem de düşük derişimde yapılan denemeler sonucunda bileşiğin etkisinin CB1954 ile yarışabilir seviyede olduğu belirlendi. Aynı bileşiğin hücre içinde ifade olabilmesi için klonlamış olduğumuz Ssap-NtrB enzimi ile olan etkileşimi de kalsiyum fosfat geçici tranfeksiyonu sonrasında hücrelere uygulanarak belirlendi. Buna göre de CB1954 ile yarışabilir olduğu belirlendi. Bu nedenle bu bileşik iyi bir ilaç öncülü olabilme potansiyeli taşımaktadır.

754-3i maddesinin çok sayıda sentez ve karakterizasyon bilgisinin bulunmasına karşılık herhangi bir hücrede ya da sistemde uygulanmış hali yoktur. 754-3i maddesi hepatoma ve prostat hücreleri üzerine 48 saatte zehirli etkilidir. IC₅₀ değerleri sırasıyla 24 µM ve 7 µM'dır. HUVEC hücrelerine karşı % 50 inhibisyon değerleri 24 saat için 83 µM, 48 saat için ise 20 µM olarak belirlendi. HT-29 ve Saos-2 hücrelerine karşı az zehirli etki gösterdiği belirlendi. Saos-2 hücrelerinde 48 saat için belirlenen IC₅₀ değeri 72 µM'dır. Yapılan moleküler karakterizasyon çalışmalarında mRNA seviyesinde Bcl-2 seviyesini 0,7 kat azalttığı görülürken, Bax seviyesini ise 4 kat arttırdığı görüldü.

Protein seviyesinde ise aynı genlerin ifadelerini tıpkı mRNA seviyesinde olduğu etki mekanizması ile değiştirdiği görüldü. Koloni oluşturma yeteneğinin belirlendiği bir yöntem olan koloni oluşturma denemesinde aynı yüksek etki ile koloni oluşumunu azalttığı belirlenirken, metastatik etkiyle ilgili ifadesinde de göç kabiliyetini azalttığı belirlendi. Bu sayede bileşiğin toksisitesi daha belirgin olarak gözlemlendi. Aynı bileşik Annexin V analizi sonucunda hücreyi yüksek miktarda apoptoza sürüklediği belirlendi. Bu nedenle zehirliliği tüm hücre hatlarında görüldükten sonra uygulama alanlarında ilaç olarak kullanılabilirliği düşünüldü.

754-3i' maddesi lityum iyonunun belirlenmesi için kullanılan bir bileşik olarak literatürde yer almaktadır [89]. Tez kapsamında çalışılan diğer bileşiklerde olduğu gibi kanserli hücreler üzerinde bu bileşikte herhangi bir denemesi yoktur. Yaptığımız zehirli durum değerlendirmesi sonucunda güçlü bir toksisitesinin olduğu belirlendi. Çok düşük seviyelerde dahi hücrelerde yüksek ölüm oranları oluşturduğu gösterildi. Hep3B hücreleri üzerine zehirli etkili olup, IC₅₀ değeri 48 saat için 18 µM'dır. PC3 hücreleri için 24 ve 48 saatte sırasıyla 110 µM ve 127 µM değerinde % 50 inhibisyon gösterdiği tespit edildi. Saos-2 hücrelerine karşı gösterdiği % 50 inhibisyon değerleri ise 24 ve 48 saat için sırasıyla 85 µM ve 88 µM'dır. HUVEC ve HT-29 hücreleri üzerine ise az zehirli etkili olduğu belirlendi. Bu bileşik ile yapılan yüksek ve düşük derişimlerdeki hücre dışı reaksiyon denemelerinde CB1954 ile istenilen yarışma etkisi gözlenemedi. Koloni formasyon ve çizik testi denemeleri sonucunda ise tüm hücre hatlarında zehirliliğinin olmasına uygun olarak hücresel oluşumları engellediği belirlendi. mRNA seviyesinde Bcl- 2 ifadesini 0,8 kat azalttığı, Bax seviyesini ise 2 kat arttırdığı görüldü. Annexin V ile yapılan ölüm yolu belirlenmesinde ise en fazla apoptoza yönelen hücrelerin olduğu görüldü.

Pneumocystis carinii, immün sistemi baskılayarak ciddi bir pnömونيye neden olan bir mantar karşıtıdır. P. cariniidihidrofolat redüktaz (DHFR) için yeni bir inhibitörü [90] olarak ise 754-3j olarak tanımladığımız bileşik ortaya çıkmıştır. Tüm sitotoksik denemelerimizde ilaç olarak kullanılabilme özelliğini taşıdığı ifade edilmiş olup, literatür bilgisini destekledi. 754-3j bileşiği Hepatoma hücrelerine karşı zehirli aktivite gösterdi (IC₅₀: 38 µM ve 55 µM). HUVEC, Saos-2, PC3 ve HT-29 hücrelerine karşı ise tüm zaman dilimlerinde az zehirli etki gösterdiği belirlendi. Koloni oluşumu ve çizik denemelerinde

zehirli etkisine bağlı olarak hücrelerin etkilerini azalttığı görüldü. mRNA seviyesinde Bcl-2 seviyesini 0,7 kat azalttığı ve Bax seviyesini ise 2 kat arttırdığı belirlendi. Annexin V analizi sonrasında hücrelerin nekrozdan daha çok apoptoz yolunu seçtikleri belirlendi. Aynı zamanda yapılan Propidiyum İyodür analizi sonrasında hücrelerin en çok G1/S fazında tutuklandıkları belirlendi. Farklı alanlarda kullanımı için ileri analizlerinin yapılmasına ve ilaç olarak doğrudan uygulanmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

754-3k maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ayırma etkeni olarak [91] ve yaprak fitopatojeni olarak [87] kullanıldığına dair bilgilere ulaştıktan sonra kanser hücrelerinde her hangi bir denemesinin olmadığı belirlendi. Bu amaçla yaptığımız toksisite çalışmasının sonucunda tüm hücre hatlarında yüksek etkide zehirlilik belirlendi. 3k maddesi, Hep3B hücreleri üzerine zehirli etki göstermiştir (24 saat: IC₅₀: 66,76 ve 48 saat: IC₅₀:16,23 µM). Aynı şekilde HT-29, PC3, Saos-2 ve HUVEC hücrelerine karşı ciddi şekilde zehirli etkili olduğu tespit edildi. Buna göre PC3 hücrelerinde IC₅₀ değerleri 24 ve 48 saatte sırasıyla 60 µM ve 87 µM olarak hesaplandı. HUVEC hücrelerinde ise 48 saat: IC₅₀: 34 µM olarak hesaplandı. mRNA seviyesinde proapoptotik ve antiapoptotik genlerin ifadelerin belirlenmesi sonucunda, % 90 oranında Bcl-2 seviyesini azaltırken Bax seviyesini ise arttırdığı görüldü. Aynı maddenin Propidiyum İyodür ile muamelesi sonucunda en fazla tutuklanmanın G1/S evresinde olduğu görüldü.

706-2a maddesinin nematositlerde bir analogu olduğu [92], monoklonal TNT antikoru olarak nitroaromatik bileşen olarak tanımlandığı [93], yün endüstrisinde sentetik lif yapımında kullanıldığı [94], pestisit kalıntı analizinde [95] kullanıldığı literatürde belirtilmiştir. 706-2a bileşiği, hepatoma ve göbek kordonu bağlı hücrelerine karşı 48 saatte az zehirli etkilidir. Prostat kanseri hücrelerine karşı % 50 inhibisyon değeri 24 saatte 52,11 µM ve 48 saatte 40,8 µM'dır. Gösterdiği toksisiteden dolayı reaksiyon denemesine taşınmamış olup, hücresel düzeyde yaptığı etkinin belirlenmesi için çizik testi ve koloni oluşum denemesi yapıldı. Bunların sonucunda da toksisitesine paralel olacak şekilde gelişimi kısıtladığı görüldü. Aynı zamanda mRNA seviyesinde Bcl-2 ifadesin 0,7 kat azalttığı görüldü. Bax seviyesinde ise artışa sebep olduğu belirlendi. Zehirliliği belirlendikten sonra moleküler analizleri yapılan bu maddenin, ilaç olarak kullanılabilirliği düşünölmüştür.

706-2b maddesinin kinetik yapısı ile ilgili çalışmalar yapılmış olup farklı bilgiler bulunmamaktadır. 706-2b bileşiğine ait sitotoksik aktivite çalışmaları değerlendirildiği zaman, prostat kanser hücreleri üzerine zehirli etkili olmadığı ve hepatoma ve endotel hücreleri üzerine ise az zehirli etkili olduğu belirlendi. İlaç öncülü olabileceği düşünüldüğü için hücre içinde Ssap-NtrB enzimin ifade ettirildiği geçici transfeksiyon uygulamasından sonra denemeleri yapıldı. Bu deneme sonucunda CB1954 ile yarışabilecek kadar etkili olduğu belirlendi. Bu nedenle iyi bir ilaç öncülü olarak denemelere devam edilebilir.

Sentez ve kinetik bazı çalışmaları ile literatür taramasında karşımıza çıkan 706- 2f bileşiğinin hücresel temelde bir çalışması bulunmamaktadır. Yapılan toksisite çalışmaları sonucunda PC3 hücrelerine karşı zehirli etkili olmadığı, Hep3B hücrelerine karşı ise % 45 büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur. HUVEC hücrelerine karşı ise az zehirli etkili olduğu bulunmuştur. Hücre dışı koşullarda kurulan reaksiyon ürünlerinin Hep3B hücrelerine uygulanması sonrasında ise CB1954 ile eş değerde bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Bu maddenin de iyi bir ilaç öncülü olabilme değerinin araştırılması gerekmektedir.

706-2g ve 706-2h bileşiklerinin her hangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu nedenle orijinallik açısından önem teşkil etmektedir. Toksisite analizleri neticesinde 706-2h bileşiğinin hepatoma hücrelerinin büyümesini en yüksek derişimde (150 µM) hem 24 hem de 48 saat sonrasında % 50 inhibe ettiği belirlenmiştir. Bununla beraber PC3 hücrelerin % hücre canlılığı 150 µM'da % 70 olarak belirlenirken, HUVEC hücrelerinde bu değer % 41'lere düşmüştür. Dolayısıyla bu bileşiğin 48 saat sonrasında HUVEC hücreleri üzerine daha zehirli etki yaptığı söylenebilir. Yapılan reaksiyon denemeleri sonrasında her iki bileşiğinde ilaç öncülü için iyi birer aday oldukları belirlendi.

706-2j bileşiğinin antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış olup başka herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Zehirli olarak hiçbir hücre hattında etki göstermediğinden dolayı aday ilaç öncülü olarak ileri aşama denemeleri yapıldı. Bu kapsamda düşük ve yüksek derişimlerde hücre dışı reaksiyon deneylerine tabi tutulan madde beklenildiği şekilde CB1954 ile benzer bir hücre canlılığı etkisi gösterdi. Hücre içinde yapılan geçici transfeksiyon

sonrasında enzim ile birleştiği zaman ise CB1954 kontrol grubuna yakın sonuçlar vererek iyi bir ilaç öncülü aday olabileceği belirlendi.

706-2p bileşiği PC3 hücreleri üzerine az etki gösterirken, Hep3B ve HUVEC hücrelerine karşı zehirli etki gösterdiği belirlendi. % 50 inhibisyon derişim değerleri Hep3B hücreleri için 31,95 μM iken, HUVEC hücreleri için 9,42 μM olarak belirlendi. Devamında yapılan koloni oluşturma ve çizik testinde de toksisitesine bağlı olarak hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini ve göç yeteneğini azalttığı belirlendi. mRNA seviyesinde Bcl-2 gen ifadesini azalttığı görülürken, Bax ifadesinde ise bir artışa neden olduğu gözlemlendi.

706-2s bileşiği Hep3B ve HUVEC hücrelerine zehirli etkili iken (48 saat sonrasında IC_{50} değeri sırasıyla 58,5 μM ve 25,88 μM), PC3 hücrelerinin büyümesini etkilememiştir. Hep3B hücrelerinde gösterdiği bu zehirli etki yapılan koloni ve göç denemelerinde devam etti ve iki deney grubunda da hücrelerin hareketini azalttı. Aynı maddenin Hep3B hücrelerinde yapılan mRNA seviyesindeki çalışmalarında Bcl-2 seviyesini 0,8 kat azalttığı görüldü. Apoptoz sürecinin bir belirteci olarak nitelendirilen Bax seviyesinin ise 9 kat arttığı görüldü.

Belirlenen tüm bu sonuçlar değerlendirildiği zaman çalışılan 20 nitrolu grup içeren bileşiğin 8 tanesi aday ilaç öncülü bileşik olarak, geri kalan 12 tanesi ise kendi zehirli etkilerinden çeşitli alanlarda yararlanılabilecek ilaçlar olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile literatürde ilk defa Ssap-NtrB geni bir ökaryotik ekspresyon vektörüne klonlanmış olup ifadesi doğrulanmıştır. Bu klonlamanın getirdiği avantaj ile normalde her hangi bir etkisi olmayan ancak enzim ile birleştiğinde yarattığı etki sayesinde gen terapisinde kullanıma aday olan bileşiklerin denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerden bazıları ilaç öncüllerinin prototipi olan ancak bazı eksikleri bulunan CB1954 ile yarışır seviyelerde sonuçlar vermiştir. Bu da bize yeni bir aday ilaç öncülünün olabilme ihtimalini düşündürmüştür.

Aynı zamanda taşınabilir sistemlerde istenen nanomolar seviyelerde denemeler yapılmış olup, bunda da başarı sağlanabileceği fikri ortaya

ıkmıştır. Elde edilen tüm bu sonuçların intihar gen tedavisi yöntemi için ileri çalışmalar ile denenebileceği öngörülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- [1] Patterson, S.ve Wyllie, S., "Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects", *Trends in Parasitology*, 30(6), 289-298, (2014).
- [2] Mesnil, M.ve Yamasaki, H., "Bystander Effect in Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase/Ganciclovir Cancer Gene Therapy: Role of Gap-junctional Intercellular Communication¹", *Cancer research*, 60(15), 3989-3999, (2000).
- [3] Spain, J.C., "Biodegradation of nitroaromatic compounds", *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 523-555, (1995).
- [4] Whitmore, G.veVarghese, A., "The biological properties of reduced nitroheterocyclics and possible underlying biochemical mechanisms", *Biochem Pharmacol* 1986, 35, 97-103, (2013).
- [5] Roldán, M.D., Pérez-Reinado, E., Castillo, F., Moreno-Vivián, C., "Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases", *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 474-500, (2008).
- [6] Hall, B.S.ve Wilkinson, S.R., "Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(1), 115-123, (2012).
- [7] Race, P.R., et al., "Structural and mechanistic studies of escherichia coli nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone reversed binding orientations in different redox states of the enzyme", *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13256-13264, (2005).
- [8] Race, P.R., et al., "Kinetic and structural characterisation of Escherichia coli nitroreductase mutants showing improved efficacy for

the prodrug substrate CB1954", *Journal of molecular biology*, 368(2), 481-492, (2007).

- [9] Bryant, C.ve McElroy, W., "Chemistry and biochemistry of flavoenzymes", *CRC Press Boca Raton, FL*, pp. 295-297,(1991).
- [10] Bryant, D., McCalla, D., Leeksma, M., Laneuville, P., "Type I nitroreductases of *Escherichia coli*", *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1), 81-86, (1981).
- [11] Chung, K.T., "Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes", *Journal of Environmental Science & Health Part C*, 18(1), 51-74, (2000).
- [12] Streeter, A.J.veHoener, B.-a., "Evidence for the involvement of a nitrenium ion in the covalent binding of nitrofurazone to DNA", *Pharmaceutical research*, 5(7), 434-436, (1988).
- [13] De Oliveira, I.M., Bonatto, D., Henriques, J.A.P., "Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance", *reactions*, 3(6)(2010).
- [14] Peterson, F.J., Mason, R.P., Hovsepian, J., Holtzman, J.L., "Oxygen-sensitive and-insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes", *Journal of Biological Chemistry*, 254(10), 4009-4014, (1979).
- [15] Goodwin, A., et al., "Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase", *Molecular microbiology*, 28(2), 383-393, (1998).
- [16] Zenno, S., et al., "Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase", *Journal of bacteriology*, 178(15), 4508-4514, (1996).

- [17] Zenno, S., Kobori, T., Tanokura, M., SAIGO, K., "Purification and characterization of NfrA1, a *Bacillus subtilis* nitro/flavin reductase capable of interacting with the bacterial luciferase", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(10), 1978-1987, (1998).
- [18] Zenno, S., Saigo, K., Kanoh, H., Inouye, S., "Identification of the gene encoding the major NAD (P) H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744", *Journal of bacteriology*, 176(12), 3536-3543, (1994).
- [19] Anlezark, G.M., et al., "Bacillus amyloliquefaciens orthologue of *Bacillus subtilis* ywrO encodes a nitroreductase enzyme which activates the prodrug CB 1954", *Microbiology*, 148(1), 297-306, (2002).
- [20] Çelik, A.ve Yetiş, G., "An unusually cold active nitroreductase for prodrug activations", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(11), 3540-3550, (2012).
- [21] Gungor, T., et al., "Prodrugs for Nitroreductase Based Cancer Therapy-1: Metabolite Profile, Cell Cytotoxicity and Molecular Modeling Interactions of Nitro Benzamides with Ssap-NtrB", *Medicinal Chemistry*, 14(5), 495-507, (2018).
- [22] Friedman, J.E., Watson, J.A., Lam, D.W.-H., Rokita, S.E., "Iodotyrosine deiodinase is the first mammalian member of the NADH oxidase/flavin reductase superfamily", *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2812-2819, (2006).
- [23] de Oliveira, I.M., Henriques, J.A.P., Bonatto, D., "In silico identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins", *Biochemical and biophysical research communications*, 355(4), 919-925, (2007).
- [24] Zenno, S., Koike, H., Tanokura, M., Saigo, K., "Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties

to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*", *The Journal of Biochemistry*, 120(4), 736-744, (1996).

- [25] Lightfoot, R.T., Shuman, D., Ischiropoulos, H., "Oxygen-insensitive nitroreductases of *Escherichia coli* do not reduce 3-nitrotyrosine", *Free Radical Biology and Medicine*, 28(7), 1132-1136, (2000).
- [26] Campbell, G.R., et al., "Sinorhizobium meliloti bluB is necessary for production of 5, 6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B12", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4634-4639, (2006).
- [27] Takeda, K., et al., "Synechocystis DrgA protein functioning as nitroreductase and ferric reductase is capable of catalyzing the Fenton reaction", *The FEBS journal*, 274(5), 1318-1327, (2007).
- [28] McHale, M.W., Kroening, K.D., Bernlohr, D.A., "Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *frm2* gene", *Yeast*, 12(4), 319-331, (1996).
- [29] Padda, R.S., Wang, C., Hughes, J.B., Kutty, R., Bennett, G.N., "Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds", *Environmental toxicology and chemistry*, 22(10), 2293-2297, (2003).
- [30] Traversi, D., et al., "Mutagenic properties of PM2.5 urban pollution in the northern Italy: the nitro-compounds contribution", *Environment International*, 35(6), 905-910, (2009).
- [31] Rafii, F.ve Hansen, E.B., "Isolation of nitrofurantoin-resistant mutants of nitroreductase-producing *Clostridium* sp. strains from the human intestinal tract", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(5), 1121-1126, (1998).
- [32] Guarner, F.ve Malagelada, J.-R., "Gut flora in health and disease", *The Lancet*, 361(9356), 512-519, (2003).

- [33] Davis, C.D.ve Milner, J.A., "Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention", *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(10), 743-752, (2009).
- [34] Kinouchi, T., Manabe, Y., Wakisaka, K., Ohnishi, Y., "Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria", *Microbiology and immunology*, 26(11), 993-1005, (1982).
- [35] Hannink, N., et al., "Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase", *Nature biotechnology*, 19(12), 1168, (2001).
- [36] Gwenin, C., Kalaji, M., Williams, P., Jones, R., "The orientationally controlled assembly of genetically modified enzymes in an amperometric biosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12), 2869-2875, (2007).
- [37] Van Aken, B., "Transgenic plants for enhanced phytoremediation of toxic explosives", *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 231-236, (2009).
- [38] Van Dillewijn, P., et al., "Bioremediation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by bacterial nitroreductase expressing transgenic aspen", *Environmental science & technology*, 42(19), 7405-7410, (2008).
- [39] Kurumata, M., et al., "Tolerance to, and uptake and degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) are enhanced by the expression of a bacterial nitroreductase gene in *Arabidopsis thaliana*", *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(3-4), 272-278, (2005).
- [40] Searle, P.F., et al., "Nitroreductase: a prodrug-activating enzyme for cancer gene therapy", *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 31(11), 811-816, (2004).
- [41] Xu, G.ve McLeod, H.L., "Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy", *Clinical Cancer Research*, 7(11), 3314-3324, (2001).

- [42] Montgomery, J.E., Parsons, M.J., Hyde, D.R., "A novel model of retinal ablation demonstrates that the extent of rod cell death regulates the origin of the regenerated zebrafish rod photoreceptors", *Journal of Comparative Neurology*, 518(6), 800-814, (2010).
- [43] Rajski, S.R.ve Williams, R.M., "DNA cross-linking agents as antitumor drugs", *Chemical reviews*, 98(8), 2723-2796, (1998).
- [44] Jaberipour, M., et al., "Testing double mutants of the enzyme nitroreductase for enhanced cell sensitisation to prodrugs: effects of combining beneficial single mutations", *Biochemical pharmacology*, 79(2), 102-111, (2010).
- [45] Hemphill, A., Mueller, J., Esposito, M., "Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections", *Expert opinion on pharmacotherapy*, 7(7), 953-964, (2006).
- [46] Sholler, G.L.S., et al., "A phase 1 study of nifurtimox in patients with relapsed/refractory neuroblastoma", *Journal of pediatric hematology/oncology*, 33(1), 25-30, (2011).
- [47] Albert, A., "Chemical aspects of selective toxicity", *Nature*, 182(4633), 421, (1958).
- [48] Han, H.-K.ve Amidon, G.L., "Targeted prodrug design to optimize drug delivery", *AAPS PharmSci*, 2(1), 48-58, (2000).
- [49] Greco, O.ve Dachs, G.U., "Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives", *Journal of cellular physiology*, 187(1), 22-36, (2001).
- [50] Niculescu-Duvaz, I., Spooner, R., Marais, R., Springer, C.J., "Gene-directed enzyme prodrug therapy", *Bioconjugate chemistry*, 9(1), 4-22, (1998).

- [51] Denny, W.A., "Nitroreductase-based GDEPT", *Current pharmaceutical design*, 8(15), 1349-1361, (2002).
- [52] Prosser, G., et al., "Discovery and evaluation of Escherichia coli nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954", *Biochemical pharmacology*, 79(5), 678-687, (2010).
- [53] Cui, W., Gusterson, B., Clark, A., "Nitroreductase-mediated cell ablation is very rapid and mediated by a p53-independent apoptotic pathway", *Gene therapy*, 6(5), 764, (1999).
- [54] Patel, P., et al., "A phase I/II clinical trial in localized prostate cancer of an adenovirus expressing nitroreductase with CB1984", *Molecular therapy*, 17(7), 1292-1299, (2009).
- [55] Streker, K., Freiberg, C., Labischinski, H., Hacker, J., Ohlsen, K., "Staphylococcus aureus NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response", *Journal of bacteriology*, 187(7), 2249-2256, (2005).
- [56] Bridgewater, J., Knox, R., Pitts, J., Collins, M., Springer, C., "The bystander effect of the nitroreductase/CB 1954 enzyme/prodrug system is due to a cell-permeable metabolite", *Human gene therapy*, 8(6), 709-717, (1997).
- [57] Singleton, M.R., Dillingham, M.S., Wigley, D.B., "Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases", *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 23-50, (2007).
- [58] Liu, S.-C., et al., "Optimized Clostridium-directed enzyme prodrug therapy improves the antitumor activity of the novel DNA cross-linking agent PR-104", *Cancer research*, 68(19), 7995-8003, (2008).
- [59] McKeage, M.J., et al., "A phase I trial of PR-104, a pre-prodrug of the bioreductive prodrug PR-104A, given weekly to solid tumour patients", *BMC cancer*, 11(1), 432, (2011).

- [60] Gu, Y., et al., "Roles of DNA repair and reductase activity in the cytotoxicity of the hypoxia-activated dinitrobenzamide mustard PR-104A", *Molecular cancer therapeutics*, 1535-7163. MCT-08-1209, (2009).
- [61] Abbattista, M.R., et al., "Pre-clinical activity of PR-104 as monotherapy and in combination with sorafenib in hepatocellular carcinoma", *Cancer biology & therapy*, 16(4), 610-622, (2015).
- [62] Wilson, W.H., et al., "Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma", *Nature medicine*, 21(8), 922, (2015).
- [63] Guise, C.P., et al., "Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia", *Chinese journal of cancer*, 33(2), 80, (2014).
- [64] Denny, W.A., "Hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy: progress to the clinic", *Future Oncology*, 6(3), 419-428, (2010).
- [65] Meng, F., et al., "Molecular and cellular pharmacology of the hypoxia-activated prodrug TH-302", *Molecular cancer therapeutics*, 11(3), 740-751, (2012).
- [66] Green, L.K., et al., "Pseudomonas aeruginosa NfsB and nitro-CBI-DEI—a promising enzyme/prodrug combination for gene directed enzyme prodrug therapy", *Molecular cancer*, 12(1), 58, (2013).
- [67] Thorne, S.H., et al., "CNOB/ChrR6, a new prodrug enzyme cancer chemotherapy", *Molecular cancer therapeutics*, 8(2), 333-341, (2009).
- [68] Guo, T., et al., "A highly sensitive long-wavelength fluorescence probe for nitroreductase and hypoxia: selective detection and quantification", *Chemical Communications*, 49(92), 10820-10822, (2013).
- [69] Vass, S., Jarrom, D., Wilson, W., Hyde, E., Searle, P., "E. coli NfsA: an alternative nitroreductase for prodrug activation gene therapy in combination with CB1954", *British journal of cancer*, 100(12), 1903, (2009).

- [70] Prosser, G.A., et al., "Creation and screening of a multi-family bacterial oxidoreductase library to discover novel nitroreductases that efficiently activate the bioreductive prodrugs CB1954 and PR-104A", *Biochemical pharmacology*, 85(8), 1091-1103, (2013).
- [71] Dachs, G., Hunt, M., Syddall, S., Singleton, D., Patterson, A., "Bystander or no bystander for gene directed enzyme prodrug therapy", *Molecules*, 14(11), 4517-4545, (2009).
- [72] Houghton, P., et al., "The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity", *Methods*, 42(4), 377-387, (2007).
- [73] Chabner, B.A.ve Roberts Jr, T.G., "Chemotherapy and the war on cancer", *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 65, (2005).
- [74] DeVita, V.T.ve Chu, E., "A history of cancer chemotherapy", *Cancer research*, 68(21), 8643-8653, (2008).
- [75] Williams, E.M., et al., "Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility", *Biochemical journal*, 471(2), 131-153, (2015).
- [76] Burotto, M., Manasanch, E.E., Wilkerson, J., Fojo, T., "Gefitinib and erlotinib in metastatic non-small cell lung cancer: a meta-analysis of toxicity and efficacy of randomized clinical trials", *The oncologist*, 20(4), 400-410, (2015).
- [77] Bagshawe, K.D., "Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer", *Expert review of anticancer therapy*, 6(10), 1421-1431, (2006).
- [78] Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutellingsperger, C., "A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using

- fluorescein labelled annexin V", *Journal of immunological methods*, 184(1), 39-51, (1995).
- [79] Gamrekelashvili, J., et al., "Necrotic tumor cell death in vivo impairs tumor-specific immune responses", *The Journal of Immunology*, 178(3), 1573-1580, (2007).
- [80] Nagatomo, K., et al., "Preparation of anti-dinitrotoluene polyclonal antibody and effect of the hapten spacer length in coating antigen on immunoassay sensitivity", *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 54(1), 165-171, (2009).
- [81] Sakai, T., et al., "Preparation of a polyclonal antibody and a bioassay for nitroaromatic compounds by an enzyme-linked immunosorbent assay technique and a surface plasmon resonance biosensor", *Sensors and materials*, 15(8), 439-452, (2003).
- [82] Covaci, I., et al., "1, 3-bis (2, 4, 6-trinitrophenylaminooxy) propane and its 4-cyano-2, 6-dinitrophenyl congener: Synthesis and properties", *Open Chemistry*, 1(1), 53-64, (2003).
- [83] Banjoko, O.ve Babatunde, I.A., "Catalytic effects of hydrogen-bond acceptor solvent on nucleophilic aromatic substitution reactions in non-polar aprotic solvent: reactions of phenyl 2, 4, 6-trinitrophenyl ether with amines in benzene–acetonitrile mixtures", *Tetrahedron*, 61(33), 8035-8040, (2005).
- [84] Paik, C., Murphy, P., Eckelman, W., Volkert, W., Reba, R., "Optimization of the DTPA mixed-anhydride reaction with antibodies at low concentration", *Journal of nuclear medicine*, 24(10), 932-936, (1983).
- [85] Dreikorn, B.A.ve Kramer, K.E., "2, 4, 6-Trinitrodiphenylamines for control of foliar phytopathogens", *Google Patents*,(1983).

- [86] Espinoza, E.O.N.ve Thornton, J.I., "Characterization of smokeless gunpowder by means of diphenylamine stabilizer and its nitrated derivatives", *Analytica chimica acta*, 288(1-2), 57-69, (1994).
- [87] Sugihara, H., Kajiwara, J.-i., Akabori, S., Hiratani, K., "Chromogenic 1, 10-phenanthroline for determination of lithium ion", *Chemistry letters*, 25(1), 15-16, (1996).
- [88] Gschwend, D.A., Sirawaraporn, W., Santi, D.V., Kuntz, I.D., "Specificity in structure-based drug design: Identification of a novel, selective inhibitor of *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 29(1), 59-67, (1997).
- [89] Kansas, L.ve Robertson, D., "Analysis of 2 Nitrodiphenylamine and its Major Derivatives in double and triple base propellants", *Propellants, explosives, pyrotechnics*, 19(4), 171-173, (1994).
- [90] Hresko, M., et al., "Pesticidal compositions and methods", *Google Patents*,(2005).
- [91] Zeck, A., Weller, M.G., Niessner, R., "Characterization of a monoclonal TNT-antibody by measurement of the cross-reactivities of nitroaromatic compounds", *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 364(1-2), 113-120, (1999).
- [92] Rossbach, V., Nissen, D., Zahn, H., "Simultaneous determination of primary and secondary amino groups in polyamide with 1 fluoro 2, 4 dinitrobenzene", *Die Angewandte Makromolekulare Chemie: Applied Macromolecular Chemistry and Physics*, 42(1), 1-20, (1975).
- [93] Crosby, D.veBowers, J., "Amine derivatives for pesticide residue analysis", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(5), 839-843, (1968).

EKLER

EK-A Ssap-NtrB ENZİM BİLGİLERİ

Name: Untitled

Conformation: linear

Overhang: five_prime, three_prime, blunt

Minimum Site Length: 5 bases

Maximum Number of Cuts: all

Included: all commercial, prototypes only

Noncutters: AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AcyI, AflIII, AgeI, AjuI, AlfI, AloI, ApaI, ApaLI, ArsI, AscI, AsuII, AvaI, AvaII, AvrII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BbvI, BbvCI, BcgI, BciVI, BfiI, BglI, BglIII, BplI, Bpu10I, BsaAI, BsaXI, BseMII, BsePI, BseRI, BseSI, BseYI, BsgI, BsmI, BsmAI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BsrI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtsI, CfrI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraII, DraIII, DrdI, Eam1105I, Eco31I, Eco47III, Eco57I, Eco57MI, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, Esp3I, Fall, Faul, FseI, FspAI, GsuI, HaeIV, HgaI, Hin4I, HindII, HindIII, HpaI, Hpy99I, KpnI, MauBI, MluI, MmeI, NaeI, NarI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, NspI, OliI, PacI, PasI, PfoI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, SacI, SacII, Sall, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SduI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TatI, TseI, TsoI, TspGWI, TspRI, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XhoII, XmnI

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>BsaBI</u>	GATNNNNATC	6	blunt	1	465
<u>BsrBI</u>	CCGCTC	6	blunt	1	194
<u>BtrI</u>	CACGTC	6	blunt	1	213
<u>MslI</u>	CAYNNNNRRTG	6	blunt	1	456
<u>AflIII</u>	ACRYGT	6	five_prime	1	210
<u>BccI</u>	CCATC	5	five_prime	1	129

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>BclI</u>	TGATCA	6	five_prime	1	490
<u>FokI</u>	GGATG	5	five_prime	1	103
<u>MfeI</u>	CAATTG	6	five_prime	1	471
<u>NcoI</u>	CCATGG	6	five_prime	1	577
<u>PleI</u>	GAGTC	5	five_prime	1	271
<u>SfaNI</u>	GCATC	5	five_prime	1	493
<u>StyI</u>	CCWWGG	6	five_prime	1	577
<u>Tsp45I</u>	GTSAC	5	five_prime	1	607
<u>AlwNI</u>	CAGNNNCTG	6	three_prime	1	605
<u>BsrDI</u>	GCAATG	6	three_prime	1	429
<u>EciI</u>	GGCGGA	6	three_prime	1	492
<u>HaeII</u>	RGCGCY	6	three_prime	1	121
<u>HphI</u>	GGTGA	5	three_prime	1	264
<u>PfiMI</u>	CCANNNNTGG	6	three_prime	1	578
<u>ApoI</u>	RAATTY	6	five_prime	2	23, 283
<u>AgsI</u>	TTSAA	5	three_prime	2	19, 485
<u>BdaI</u>	TGANNNNNNTC	6	three_prime	2	473,

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
	A		me		507
<u>PsrI</u>	GAACNNNNNNT AC	7	three_prime	2	516, 548
<u>TauI</u>	GCSGC	5	three_prime	2	234, 422
<u>TstI</u>	CACNNNNNNTC C	6	three_prime	2	173, 205
<u>TfiI</u>	GAWTC	5	five_prime	3	149, 222, 518
<u>MboII</u>	GAAGA	5	three_prime	5	31, 272, 291, 333, 412
<u>TspDI</u>	ATGAA	5	three_prime	7	46, 74, 107, 184, 214, 273, 401

EK-B Ssap-NtrB mRNA ve Aminoasit Bilgisi

ATGATA

M I
AATAATAATTTTGAAGAAATTTTAATGAATAGAAAGTCTGTAAAAGTATTTGATGAACAAGTGAAAATACCGAAAGCAG
AAATGGATGAA
N N N F E E I L M N R K S V K V F D E Q V K I P K A
E M D E
ATGATTAAGCAACGACAGCGCCATCATCAGTTAATATGCAACCGTGGAGATTCTTAGTAGTCGAAAGTGATGAAG
GTAAAGACACA
M I K K A T T A P S S V N M Q P W R F L V V E S D E
G K D T
TTACGTCGCTCATTTCGTTTTAACACACGTCAAATGATTCATCAGCGGCTATGGTCGTTATTTTGGTGATATGAAGA
GTCAAACAAAT
L R P L I R F N T R Q N D S S A A M V V I F G D M K
S Q T N
GCCGAAGAAATTTATGGTAATGCAGTTAAACATGATTTAATGCCGGAAGAAGTAAACAAGAAATGTTAAAAAAGTCA
TACCATTATAT
A E E I Y G N A V K H D L M P E E V K Q E M L K K V
I P L Y
GATAATGCACAAAAGAACAATGAATGACATTGTGAAGATTGATAGTAGTTTAGCCGCAATGCAATTTATGCTTGTG
CGAAAGCGCAT
D N A P K E Q M N D I V K I D S S L A A M Q F M L V
A K A H
GGATATGATACAAATCCAATTGGCGGATTTGAAAGTGATCAAATCGCAGATGCATTTGGTATAGATTTCAGAACGCTATG
TACCCGTACTA
G Y D T N P I G G F E S D Q I A D A F G I D S E R Y
V P V L
ATTGTTGGATTTGGTAAAGCTAAAAATCCAGCCCATGGTTCTTATAGATTACCAACAGAACTGTGACTAAATACGTTT
AA

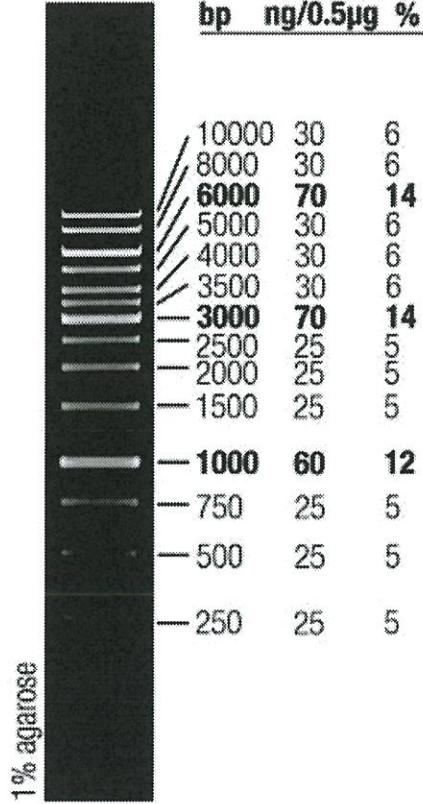
627 bç -208 aa

mRNA Dizisi

ATGATAAATAATAATTTTGAAGAAATTTTAATGAATAGAAAGTCTG
TAAAAGTATTTGATGAACAAGTGAAAATACCGAAAGCAGAAATGG
ATGAAATGATTAAGCAACGACAGCGCCATCATCAGTTAATAT
GCAACCGTGGAGATTCTTAGTAGTCGAAGTGATGAAGGTAAAGACA
CA TTACGTCGCTCATTTCGTTTTAACACACGTCAAATGATTCATCA
GCGGCTATGGTCGTTATTTTGGTGATATGAAGAGTCAAACAAATG
CCGAAGAAATTTATGGTAATGCAGTTAAACATGATTTAATGCCGGA
AGAAGTAAACAAGAAATGTTAAAAAAGTCATACCATTATATGATA
ATGCACAAAAGAACAATGAATGACATTGTGAAGATTGATAGTAG
TTTAGCCGCAATGCAATTTATGCTTGTGCGAAAGCGCAT GGATAT
GATACAAATCCAATTGGCGGATTTGAAAGTGATCAAATCGCAGATG
CATTTGGTATAGATTTCAGAACGCTATGTACCCGTACTAATTGTTGCG
ATTGGTAAAGCTAAAAATCCAGCCCATGGTTCTTATAGATTACCAA
CAGAACTGTGACTAAATACGTTTAA

EK-C DNA BÜYÜKLÜK BELİRTECİ (1KB)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

Şekil 6.1: DNA büyüklük belirteci -1 kb (SM0311 Fermentas)