



T.C. ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİTOKONDRIYEL BAZ EKSIZYON TAMİR AKTİVİTESİNİ  
İNİBE EDEN ANTİKANSER ÖZELLİĞE SAHİP YENİ  
MOLEKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU**

BERNA SOMUNCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Meltem Müftüoğlu

İSTANBUL-2017

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

## **BEYAN**

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum "Mitokondriyel Baz Eksizyon Tamir Aktivitesini İnhibe Eden Antikanser Özelliğe Sahip Yeni Moleküllerin Karakterizasyonu" başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Meltem Müftüoğlu'nun sorumluluğunda tamamladığımı, deneyleri ve analizleri Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

01.12.2017

Berna SOMUNCU

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında mitokondriyel BER yolağında görev alan DNA polimeraz  $\gamma$  proteinini hedefleyen küçük moleköl inhibitörlerinin, sentez aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, danıştığım her konuda bana kıymetli zamanını ayırıp sabrı, ilgisi, samimiyeti ve güler yüzüyle bana yol gösteren kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Meltem Müftüoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bana her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen Müftüoğlu Lab ekip arkadaşlarıma ve dostlarım Cansu Arslan ve Meltem Pak'a,

Hayatımda var oldukları için binlerce kez şükrettiğim, kardeşim kadar yakın ve içten sevgiler beslediğim dostlarım Elif Tıkr, Gülnihal Bozdağ ve Tuğçe Doğruel'e

Hayatım boyunca aldığım her kararda yanımda olan, sevgi ve güvenlerini her zaman hissettiğim, bu hayattaki en büyük şansım olan canım aileme en içten sevgilerimle sonsuz teşekkür ederim.

Sevgi ve Saygılarımla

Berna SOMUNCU

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Memeli Çekirdek ve Mitokondrisinde Gerçekleşen Baz Eksizyon Tamir Mekanizması.....	5
2.2. DNA Pol $\gamma$ Proteini.....	7
2.3. DNA Pol $\gamma$ Enzim İnhibitörleri.....	8
2.4. Baz Eksizyon Tamiri ve Kanser.....	9
2.5. Mitokondriyel Apoptoz.....	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	12
3.1. Polimeraz $\gamma$ DNA Sentez Aktivite Ölçümü.....	12
3.1.1. Radyoaktif işaretli bir nükleotidlik (1-nt) boşluk içeren dupleks 51mer DNA substratının hazırlanması.....	12
3.1.1.1. Oligodeoksinükleotidin [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP ile işaretlenmesi.....	12
3.1.1.2. Hibridizasyon (Annealing) Reaksiyonu.....	13
3.2. DNA polimeraz $\gamma$ 'nın DNA Sentez Aktivite Ölçüm Yöntemi.....	14

3.3. Küçük Molekül İnhibitörlerin Pol $\gamma$ 'nın DNA Sentez Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	14
3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) ile Hücre Proliferasyon Analizleri ve Sitotoksosite Deneyleri .....	15
3.5. Apoptoz Ölçümü .....	16
3.5.1. Hücre kültürü ve hücre ekstraktlarının hazırlanması .....	16
3.5.2. Bradford protein tayini .....	17
3.5.3. Western blot analizi .....	17
4. BULGULAR .....	19
4.1. Mitokondriyel BER Yolağında Pol $\gamma$ DNA Sentez Aktivitesinin Ölçümü .....	19
4.1.1. Radyoaktif işaretli DNA substratlarının hazırlanması .....	19
4.1.2. Küçük moleküllerin Pol $\gamma$ 'nın zinciri kaydırma (strand displacement) DNA sentez aktivitesi üzerine etkisi .....	20
4.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Sitotoksosite Deneyleri .....	22
4.3. Apoptoz .....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	25
6. KAYNAKLAR .....	27

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1: Memeli çekirdek ve mitokondrisinde gerçekleşen BER yolağı basamakları. 7
- Şekil 2: Pol  $\gamma$  proteinin 3-boyutlu yapısı ve domain organizasyonu..... 8
- Şekil 3: Radyoaktif işaretli bir nükleotidlik (1-nt) boşluk içeren DNA substratı. .... 13
- Şekil 4: Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminin (xCELLigence RTCA-DP) şematik diyagramı. .... 155
- Şekil 5: 5'-ucundan [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP ile işaretlenen DNA substratlarının jel görüntüsü. 1. kuyucuk, 25mer'lik tek zincir oligodeoksinükleotid; 2. kuyucuk, 1-nt boşluk içeren çift zincir substrat; 3. kuyucuk, primer/template substratı; 4. kuyucuk, 51mer çift zincir kontrol substratını göstermektedir. .... 19
- Şekil 6: Farklı Pol  $\gamma$  konsantrasyonlarında (5nm, 10 nm, 20 nm ve 40 nm) zincir kaydırma (Strand displacement) DNA sentez aktivitesi. 1. kuyucuk, 51mer'lik tek zincir oligodeoksinükleotid; 2. kuyucuk, 25mer'lik tek zincir substratı;3. kuyucuk, 5 nm Pol  $\gamma$ 'nın bulunduğu sentez reaksiyonu, 4. kuyucuk, 10 nm Pol  $\gamma$ 'nın bulunduğu sentez reaksiyonu, 5. kuyucuk, 20 nm Pol  $\gamma$ 'nın bulunduğu sentez reaksiyonu ve 6. kuyucuk, 40 nm Pol  $\gamma$ 'nın bulunduğu sentez reaksiyonunu göstermektedir..... 20
- Şekil 7: Konsantrasyonu 40 nm olan Pol  $\gamma$  enziminin zamana bağlı (10, 15, 20, 25 dakika) zincir kaydırma (Strand displacement) DNA sentez aktivitesi. 1. kuyucuk, 51mer'lik tek zincir oligodeoksinükleotid; 2. kuyucuk, 25mer'lik tek zincir substratı; 3. kuyucuk, DNA sentez reaksiyonunun 10 dakika, 4. kuyucuk, DNA sentez reaksiyonunun 15 dakika, 5. kuyucuk, DNA sentez reaksiyonunun 20 dakika ve 6. kuyucuk, DNA sentez reaksiyonunun 25 dakikada gerçekleştiği reaksiyonları göstermektedir..... 21
- Şekil 8: Pol  $\gamma$ 'ya bağlanan moleküllerin etkisiyle Pol  $\gamma$  enziminin zincir kaydırma (Strand displacement) DNA sentez aktivitesi. .... 21
- Şekil 9: Pol  $\gamma$ 'ya bağlanan moleküllerin etkisiyle Pol  $\gamma$  enziminin zincir kaydırma (Strand displacement) DNA sentez aktivitesine etkisinin dansitometrik analizi. .... 22
- Şekil 10: Pol  $\gamma$ 'ya bağlanan in siliko belirlenen, Prestwick kimyasal kütüphanesi® molekülü Phany28 20  $\mu$ M konsantrasyonunda HCT116 ve HCT116-chr3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi. Siyah ok: molekül ekleme zamanını gösterir. . 23
- Şekil 11: Phany28 nin HCT116 ve HCT116-chr3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi ve EC50/IC50 değeri..... 23

Şekil 12: HCT116-V1 ve HCT116 hücre hatlarında 20 µM Phany28 uygulamasıyla mitokondriyel apoptoz mekanizmasında yer alan proteinlerin miktarlarına etkisi... 24



## TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo: Oligodeoksinükleotidin [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP ile işaretleme reaksiyonu.....13



## KISALTMALAR

BER:	Baz Eksizyon Tamiri
MMR:	Yanlış Eşleşme Tamiri
MLH1:	MutL Homolog 1
MSH2:	MutS Homolog 2
Pol $\gamma$ :	Polimeraz Gama
Pol $\beta$ :	Polimeraz Beta
nBER:	Nükleer Baz Eksizyon Tamiri
mtBER:	Mitokondriyel Baz Eksizyon Tamiri
SP-BER:	Kısa Yamalı Baz Eksizyon Tamiri
LP-BER:	Uzun Yamalı Baz Eksizyon Tamiri
AP:	Apürinik\Apirimidik
APE1:	AP Endonükleaz 1
UNG:	Urasil-DNA Glikozilaz
OGG1:	8-Oksoguanin DNA Glikozilaz 1
NEIL1:	Endonükleaz 8 Benzeri 1
MYH:	MutY DNA Glikozilaz
SMUG:	Tek Zincir Seçimli Monofonksiyonel Urasil DNA Glikozilaz
PUA:	$\alpha,\beta$ -Doymamış aldehid
PNK:	Polinükleotid Kinaz
FapyG:	4,6-Diamino-5 Formamidopirimidin

LIG:	DNA Ligaz
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
ATP:	Adenozin Trifosfat
NRTI:	Nükleozid Analog Ters Transkriptaz İnhibitörleri
dRP:	Deoksiriboz Fosfat
OMM:	Mitokondrial dış membran
MOMP:	Mitokondriyel dış membran permeabilizasyonu
Bcl-2:	B-hücre lenfoma 2
APAF-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
Smac:	İkincil mitokondri türevli kaspaz
DIABLO:	Direkt apoptoz inhibitörü bağlayıcı protein
8-oksoG:	8-Okzoguanin

## ÖZET

DNA tamir yolağının aktif olmadığı kanserlerde, sentetik lethal ilişkili spesifik DNA tamir proteinlerinin inhibisyonu, sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerinin seçici olarak yok edilmesinde etkili bir hedeftir. Polipsiz kalıtsal kolorektal kansere (Lynch syndrome) yanlış eşleşme tamirinde (MMR) görev alan *MutL homolog 1 (MLH1)* genindeki mutasyonlar neden olur. MLH1 ile DNA polimeraz  $\gamma$  (Pol  $\gamma$ ) arasındaki sentetik lethal etkileşimde, Pol  $\gamma$  inhibisyonunu sağlayarak polipsiz kolorektal kanser hücrelerinin yok edilmesi mümkündür.

Bu tez çalışmasında, Prestwick kimyasal kütüphanesinden ve bilgisayar ortamında (in siliko) moleküler docking yaklaşımı ile belirlenen küçük moleküller arasından Pol  $\gamma$  proteinine doğrudan bağlandığı belirlenen bazı moleküller seçilerek Pol  $\gamma$  proteini üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. Ek olarak, Pol  $\gamma$  proteinin aktivitesini en fazla inhibe eden molekülün MLH1 proteini bulunmayan (HCT116) ve MLH1 proteini bulunan (HCT116-chr3) kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu küçük moleküllerden Phany28'in Pol  $\gamma$ 'nın DNA sentez aktivitesini inhibe ettiği ve HCT116-chr3 hücrelerine (IC<sub>50</sub>: 653 M) kıyasla HCT116 hücrelerine (IC<sub>50</sub>: 0.44 M) daha fazla sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, MLH1 mutasyonuna sahip kanser hücrelerinde seçici antikanser tedavisi için Phany28'in yeni bir ilaç olarak geliştirilebileceğini göstermektedir.

## SUMMARY

The inhibition of synthetic lethal associated specific DNA repair proteins is an effective target for selective destruction of tumor cells without damaging healthy cells in cancer types in which the DNA repair pathway is not active. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer is caused by mutations in the *MLH1* gene involved in mismatch repair (MMR). It is possible to destroy nonpolyposis colorectal cancer cells by providing Pol  $\gamma$  inhibition with synthetic lethal interaction between MLH1 and DNA polymerase  $\gamma$  (Pol  $\gamma$ ).

In this thesis study, the effect of small molecule inhibitor(s) on Pol  $\gamma$  protein was investigated by testing some of the small molecules in the Prestwick Chemical Library and molecules predicted by molecular docking approach which are directly bind to the protein. In addition, the cytotoxic effect of the lead molecule that inhibits the activity of Pol  $\gamma$  was investigated in MLH1-deficient (HCT116) and MLH1-proficient (HCT116-chr3) cancer cell lines. Among the small molecules tested, it was found that the molecule, Phany28, inhibits the DNA synthesis acitivity of Pol  $\gamma$  and demonstrates selective cytotoxic effect on HCT116 cells (IC<sub>50</sub>: 0.44 M) compared to HCT116-chr3 cells (IC<sub>50</sub>: 653 M). This results showed that Phany28 might be developed further for selective anticancer therapies in cancer cells including mutation of MLH1.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ekzojen veya endojen kaynaklı ajanlar DNA baz hasarına neden olur (1). Bu tür DNA hasarları, DNA tamir yollarından biri olan baz eksizyon tamir (BER) yoluyla ile tamir edilir. Kanser hücrelerindeki aktif BER yoluyla DNA hasarlarına terapötik direnç göstererek hasarların öldürücü etkilerinden hücreyi koruyup genomik kararlılığı sağladığı için kanser tedavisinin önünde önemli bir engeldir. Bu yolların inhibisyonu tek başına antikanser tedavi yaklaşımı olarak kullanılabilir. Dolayısıyla, spesifik DNA tamir proteinlerine uygun küçük molekül inhibitörünün belirlenmesi ve bu yolla hedef DNA tamir yollarının inhibe edilmesi yeni kanser tedavileri için umut vadeden bir yaklaşımdır (2-4).

Bazı kanser türlerinde DNA tamir yolları aktif değildir. Yanlış eşleşme tamir mekanizmasında (MMR) görev alan *MLH1* genindeki mutasyonlar polipsiz kalıtsal kolon kanserine neden olur. *MLH1* promoterinin metilasyonu sporadik kolorektal kanserlere neden olmaktadır. *MLH1* gen hasarının neden olduğu kolorektal kanser hücrelerinde kemoterapötik faktörlerin verdiği DNA hasarı mitokondriyel BER yoluyla ile tamir edilerek hücre canlılığı sağlanmaktadır. DNA tamir yolları ve proteinleri arasındaki sentetik lethal ilişki ise kanser tedavisinde sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerinin seçici olarak yok edilmesinde önemli bir hedef oluşturur (9,10,11). Bu hücrelerde DNA polimeraz gama  $\gamma$ 'yı (Pol  $\gamma$ ) dolayısıyla mitokondriyel BER yoluyla inhibe edildiğinde ise hücre ölümü gerçekleşmektedir (9). Literatürde antikanser etkisi belirlenmiş Pol  $\gamma$  inhibitörleri ile ilgili çok sınırlı düzeyde çalışma bulunmaktadır (10,11) ve henüz bu proteine özgü bir antikanser özelliğe sahip bir inhibitör belirlenmemiştir.

Bu tez çalışmasında, Prestwick kimyasal kütüphanesinden ve bilgisayar ortamında (in siliko) moleküler docking yaklaşımı ile belirlenen küçük moleküller arasından Pol  $\gamma$  proteinine doğrudan bağlandığı belirlenen bazı moleküller seçilerek Pol  $\gamma$  proteini üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ek olarak, Pol  $\gamma$  proteinin aktivitesini en fazla inhibe eden molekülün *MLH1* proteini bulunmayan (HCT116) ve *MLH1* proteini bulunan (HCT116-chr3) kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin araştırılması da amaçlanmıştır. Böylece, sağlıklı hücreye zarar

vermeden kanser hücresine sitotoksik etki gösteren ilaç olma potansiyeline sahip yeni bir molekülün bulunmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Memeli Çekirdek ve Mitokondrisinde Gerçekleşen Baz Eksizyon Tamir Mekanizması

BER mekanizması deaminasyon, depürinasyon, oksidasyon veya metilasyon gibi baz hasarlarının düzeltilmesinde görev yapar (12-15). BER yolağı hem çekirdekte hem de mitokondride bulunur. BER yolağının birçok farklı adımı çekirdek ve mitokondrideki benzerdir, fakat bu mekanizmanın bazı basamaklarında farklı proteinler rol oynar (16).

Memeli çekirdek ve mitokondrisinde gerçekleşen BER yolağının kısaca dört basamağı vardır: (i) hasar gören bazın kesilmesi, (ii) apürinik/apirimidik (AP) bölgesinin AP endonükleaz 1 (APE1) ile işlenmesi, (iii) doğru nükleotidlerin eklenmesi ve (iv) DNA ligaz ile iplikçiğin ligasyonu (17).

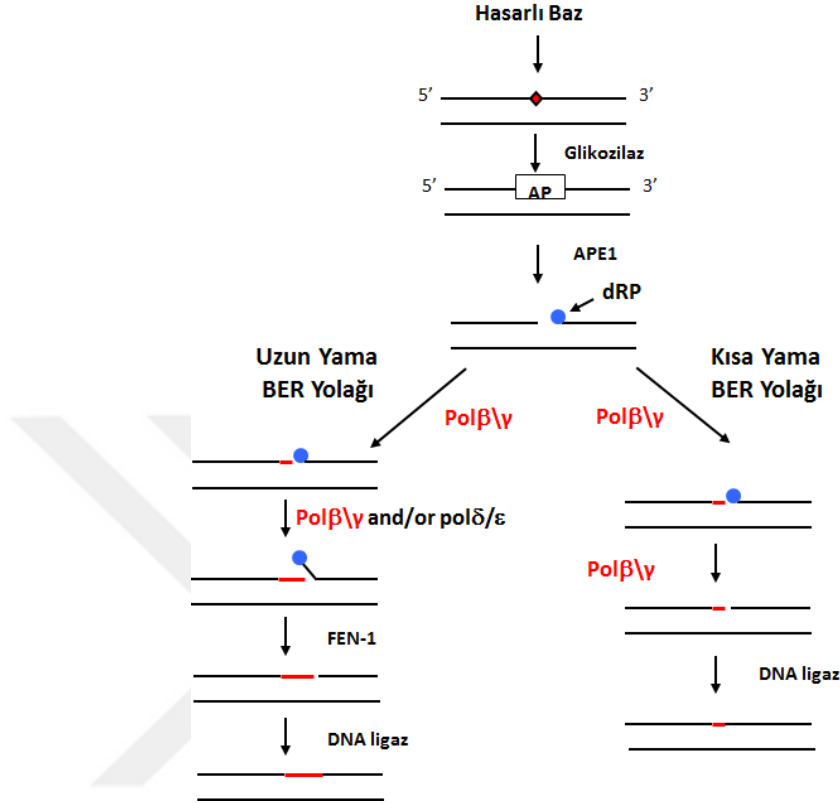
BER yolağının ilk basamağında hasarlı bölgenin tanınması ve kesilmesi gerçekleşir. Bu basamakta, şeker ile baz arasındaki N-glikozid bağımlı kesen DNA glikozilaz enzimleri görev alır. DNA glikozilaz enzimleri baz hasarına özgüdür (18). Örneğin; oksoguanin DNA glikozilaz 1 (OGG1) 8-oksoguanin (8-oksoG) baz hasarının, endonükleaz 8-benzeri 1 (NEIL1) ise 4,6-diamino-5 formamidopirimidin (FapyG) baz hasarına özgü temel glikozilazlardır (16). Glikozilaz enzimleri intrinsik liyaz aktivitesine sahip olmasına bağlı olarak monofonksiyonel veya bifonksiyonel olarak sınıflandırılır. Urasil DNA glikozilaz (UNG), mutY DNA glikozilaz (MYH) ve tek zincir seçimli monofonksiyonel urasil DNA glikozilaz (SMUG) gibi liyaz aktivitesine sahip olmayan monofonksiyonel DNA glikozilazlar N-glikozid bağımlı keser ve AP liyaz aktivitesine sahip bir başka enzimin varlığını gerektirir (16,18). Bifonksiyonel DNA glikozilazlar, örneğin OGG1 ve NEIL1 N-glikozidaz aktivitesinin yanı sıra DNA omurgasının kesen liyaz aktivitesine de sahiptir ve AP bölgesinin 3' ucuna  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehid (PUA) veya bir fosfat grubu ekleyerek 3' ucunda insizyon oluşturur. APE1 ve polinükleotid kinaz (PNK) enzimleri ise, sırasıyla 3' ucundaki doymamış aldehit ve fosfat gruplarını uzaklaştırır (19).

N-glikozid bağı kesilmesi sonrasındaki basamak AP bölgesinin çıkarılmasıdır (20). Fosfat omurgasını hidrolize etmek için APE1 işlevseldir (16). APE1 hem çekirdekte hem de mitokondride BER sürecinde yer alan memeli hücrelerindeki ana endonükleazdır (21). APE1 abazik bölgenin insizyonu için 5'-deoksiriboz fosfat (dRP) bırakır. Tamir yolağını bir sonraki adımında çekirdekte polimeraz  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) , mitokondride Pol  $\gamma$  tarafından 5'-dRP'nin uzaklaştırılması ve boşluğun doldurulması gerçekleşir (22). Bu basamakta BER yolağı kısa-yama BER (tek nükleotid sentezi; SP-BER) veya uzun-yama BER (birden fazla nükleotid sentezi; LP-BER) olmak üzere iki farklı yol üzerinden devam eder. Bir DNA lezyonunun LP-BER işlemi, SP-BER'den daha karmaşıktır. SP-BER sırasında, tek bir nükleotid polimeraz ile boşluğa dahil edilirken, LP-BER genellikle 2 ila 7 nükleotidin dahil elmesini içerir (17). LP-BER'de modifiye olan 5' ucuna çok sayıda nükleotidin eklenmesinde Pol  $\beta$  yerine polimeraz  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) ve polimeraz  $\epsilon$ 'nunda (Pol  $\epsilon$ ) yer aldığı bilinmektedir. Nükleotid eklenmesi sırasında 3' ucunda bükülmüş bir flap oluşur ve bu kısım flap endonükleaz-1 (FEN 1) tarafından uzaklaştırılır. BER'in son basamağında ise DNA ligaz çentiğın bağlayarak tamir yolağını bitirir (Şekil 1) (23).

Tanımlanan ve karakterize edilen ilk tamir yolağı memeli mitokondrisinde bulunan BER yolağıdır (24). mtDNA, kısmen oksidatif fosforilasyonu katalizleyen solunum komplekslerini içeren iç membran ile ilişkilidir. Bu ilişki sonucu mtDNA, nDNA'ya göre birkaç kat fazla reaktif oksijen türleri (ROS) oksidasyonuna maruz kalır (25). Mitokondriyel BER oluşan oksidatif DNA hasarının onarımı için önemli bir kapasiteye sahiptir. Yakın zamana kadar, SP-BER'in hem çekirdekte hem de mitokondride oluştuğı ve LP-BER'in sadece çekirdekte gerçekleştiğı düşünölmekteydi. Bununla birlikte, mtDNA'nın radikallere sürekli maruz kalması göz önüne alındığında, mtDNA'da oksitlenmiş AP alanları gibi belirli lezyon tiplerinin önemli bir oranda üretildiğı tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalarda, SP-BER, mtDNA'ya uygulanan lezyonların tümü ile baş etmek için yetersiz kaldığı ve bu nedenle mitokondriyel BER'in de çekirdekteki gibi LP-BER ile ilerleyebileceğı gösterilmiştir (17).

BER yolağının son adımında çekirdekte iki DNA ligaz (I ve III) işlevselken, memeli mitokondrilerinde hem çoğalma hem de onarımda rol oynayan sadece DNA ligaz

III'tür. Etki mekanizması ve ayrıca DNA ligaz III'ün mitokondriyel varyantının diğer proteinleri ile etkileşimi halen belirsizdir (26).



Şekil 1: Memeli çekirdek ve mitokondrisinde gerçekleşen BER yolağı basamakları.

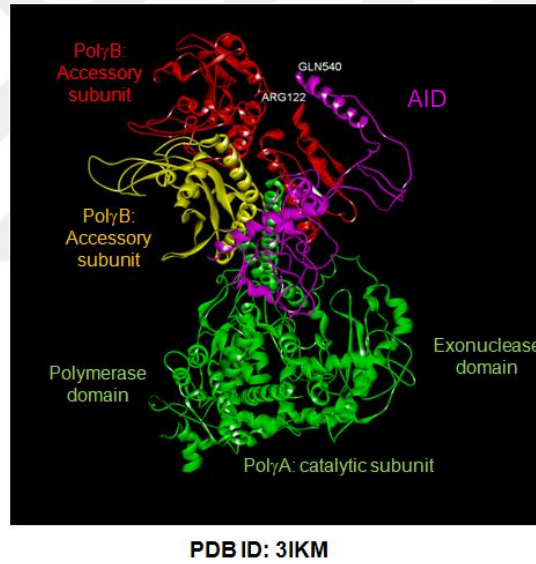
## 2.2. DNA Pol $\gamma$ Proteinini

Pol  $\gamma$ , mtDNA replikasyonu ve mitokondriyel BER mekanizmasında işlev gören tek enzimdir. Pol  $\gamma$  holoenzimi; 140 kDa katalitik altbirim (Pol $\gamma$ A) ve 55 kDa aksesuar altbirimden (Pol $\gamma$ B) oluşan bir heterodimerdir. Nükleer kromozomal lokus 15q25'de *PolG* tarafından kodlanan katalitik altbirim, 5'-3' DNA polimeraz, 3'-5' ekzonükleaz ve 5'-dRP liyaz aktivitelere sahiptir. Nükleer kromozomal lokus 17q24.1'de *PolG2* tarafından kodlanan aksesuar altbirim, katalitik altbirimin DNA'ya afinitesini arttırarak ilerleyen DNA sentezi için işlevsel rol oynar (27).

Pol $\gamma$ A ve Pol $\gamma$ B arasındaki dimerik bağlanma asimetrik şekilde gerçekleşir. Katalitik altbirim kısmen Pol $\gamma$ B'in çevresine uzanan aksesuar etkileşimli etken (AID) alt alanı olarak bilinen bir domain ile ilişkilidir. Replikasyon kompleksi oluşumunda Pol $\gamma$ B,

Pol $\gamma$ A'ya doğru döner ancak bu dönüş sırasında iki alt birim arasındaki proksimal domain değişmez. Bu dönüş sonrası Pol $\gamma$ B katalik alt birime göre monomere daha yakın olur. İki alt birimin birbiriyle oluşan etkileşimi, DNA polimerazın ve ekzonükleaz fonksiyonlarının daha fazla düzenlenmesine izin veren dinamik bir katkı sağlar (28).

Pol  $\gamma$ , mtDNA'yı replike etmek için mtDNA helikaz, Twinkle, mitokondriyel tek sarmal bağlama proteini (mtSSB), topoizomeraz, mitokondriyel RNA polimeraz (POLRMT), RNaz H1, mitokondriyal DNA ligaz III (mtLigIII) ve 5'-3' ekzonükleaz olan mitokondriyel genom onarım ekzonükleaz 1 (MGME1) ile birlikte çalışır (29). Pol  $\gamma$  ve mitokondride birlikte çalıştığı proteinleri kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar mitokondriyel hastalıkların temel nedenini oluşturmaktadır (30).



Şekil 2: Pol  $\gamma$  proteinin 3-boyutlu yapısı ve domain organizasyonu.

### 2.3. DNA Pol $\gamma$ Enzim İnhibitörleri

Pol  $\gamma$ , mitokondriyel BER mekanizmasının tek polimerazı ve mtDNA replizomunun en kapsamlı olarak çalışılan proteindir (1,2). DNA Pol  $\gamma$ , 3'-deoksi-3'-azidotimidin üç fosfat (AZT-TP), dideoksinükleotidler ve diğer antiviral nükleotid analogları gibi insan bağışıklık eksikliği virüsüne karşı (anti-HIV) nükleotid analogları tarafından

inhibisyona oldukça duyarlı olduğundan dolayı hücrel replikatif DNA polimerazları arasında benzersizdir (3).

İnsan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV) ve kronik hepatit B ve C enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan nükleozid analog ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI) yüksek etkili bir antiviral tedavi unsurudur (31). Bu tedavi sonucu oluşan klinik sonucun en önemlisi mitokondriyel toksisitedir. NRTI'lar mtDNA replikasyonu sırasında yeni sentezlenmiş olan mtDNA zincirine Pol  $\gamma$  ile eklenerek Pol  $\gamma$  aktivasyonunun inkorporasyon dışında doğrudan inhibisyonu veya yeni oluşmaya başlayan DNA sarmalının zincir-terminasyon analoglarının mtDNA'da inkorporasyonu ile mitokondriyel toksisiteye neden olmaktadır (32).

Anti-HIV nükleotid analogları dışında Pol  $\gamma$  inhibisyonunda bir başka etken vitamin K'nın sentetik formu olan vitamin K3 (menadione) olduğu gösterilmiştir. Literatürde, Vitamin K ailesinin anti-anjiyogenez ve özellikle sadece vitamin K3'ün Pol  $\gamma$ 'ya etkilerini göstererek potansiyel anti-kanser ajan olabileceğini kanıtlamıştır. Sasaki R. ve arkadaşları, radyasyona dirençli birçok hücre hattında menadione'nun doksoribusin, sisplatin ve taksol'e göre çok güçlü antikanser etkisi gösterdiğini belirlemiştir. Bu çalışmanın devamında ise menadione'nun farklı dozlarda kullanılarak seçici olarak redoks döngüsünün arttırdığını veya mtDNA tamiri ve replikasyonunu Pol  $\gamma$  aktivitesini etkileşime girerek inhibe ettiğini ispatlamıştır (10,33). Ancak tamir mekanizmasında Pol  $\gamma$ 'nın boşluk doldurma basamağında bir substrat olduğu ve bu nedenle Sasaki'nin yapmış olduğu çalışmanın sadece replikasyonu inhibe ettiğini kanıtlanır. Sonuç olarak literatürde vitamin K3'ün mitokondriyel BER aktivitesi üzerine etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır.

#### **2.4. Baz Eksizyon Tamiri ve Kanser**

Hücrelerde DNA hasarlarının oluşturduğu genomik kararsızlığın yok edilmesinin en önemli unsuru BER mekanizmasıdır. Kanser hücrelerindeki aktif BER yolu DNA hasarlarına terapötik direnç göstererek hasarların öldürücü etkilerinden hücreyi koruyup genomik kararlılığı sağladığı için kanser tedavisinin önünde çok önemli bir engeldir. Bu nedenle kanser tedavileri için aktif olan tamir yollarının inhibe edilmesi umut vadeden bir hedef oluşturur (1-4).

Kanser tedavisinde kullanılan ajanlar DNA tamir yollarının sorumlu olduğu DNA hasarlarını oluşturmaktadır. Radyoterapi ve iyonize edici radyasyon DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına neden olur. Bazı hasarları ve tek zincir kırıkları BER yoluyla, çift zincir kırıkları rekombinasyon tamir yoluyla (homolog rekombinasyon ve nonhomolog uç birleştirme (NHEJ)) ile tamir edilir. DNA tamir mekanizmaları, DNA hasarına özgü olmakla birlikte bazı DNA tamir mekanizmaları aynı DNA hasarının tamir edilmesinde de rol oynar. Örneğin, MMR proteinleri replikasyon hasarlarının yanı sıra oksidatif ajanların neden olduğu oksidatif DNA hasarlarının tamirinde de rol oynar. Oksidatif baz hasarını tamir eden temel mekanizma BER yoluyla (5).

Hücrede iki gen veya protein arasındaki sentetik lethal ilişki, ilişkide yer alanlardan birinin fonksiyon kaybı yaşandığında ölümcül sonuçlar doğurabilir. Sentetik lethal ilişki kanser hücrelerine kemoteropötik yaklaşım oluşturmak için kullanılır. MLH1 ve MutS homolog 2 (MSH2) proteinleri MMR mekanizmasında görev alır. MLH1 ve MSH2 genlerindeki mutasyonlar polipsiz kalıtsal kolon kanserine neden olur. Tüm kolorektal kanserler arasında polipsiz kalıtsal kolon kanserinin görülme sıklığı %5'dir. Ek olarak, MLH1 promotörünün metilasyonu sporadik kolorektal kanserlere neden olmaktadır. MLH1 ve MSH2, tümör baskılayıcı genler olarak işlev görürler. Tümör hücrelerinde bu genlerin fonksiyonu kaybolurken normal hücrelerde bu genlerin en az bir fonksiyonel alleli kalır. Literatürde, MSH2 gen hasarının bulunduğu hücrelerde Pol  $\beta$  inhibisyonunun DNA hasarlarının birikmesine yol açtığı bildirilmiştir. Aynı şekilde MLH1 mutasyonuna sahip hücrelerde Pol  $\gamma$  inhibisyonu arasında da bir ilişki saptanmıştır (9). Yapılan bu çalışmalar ile hem çekirdek hem de mitokondriyel tamir mekanizmalarının kanser ile ilişkisi doğrudan gösterilmektedir.

## **2.5. Mitokondriyel Apoptoz**

Mitokondri, oksidatif fosforilasyon ile üretilen ATP formundaki metabolik enerjiyi hücreye verir ve buna ek olarak önemli metabolik reaksiyonları gerçekleştirir. Mitokondriyel DNA hasarı ve ROS tarafından apoptotik yol tetiklenmektedir. Apoptotik sinyalin akışında mitokondriden sitozole kaspaz bağımlı ve bağımsız sinyal olaylarını tetikleyen sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), ikincil mitokondri türevli kaspaz\direkt apoptoz inhibitörü bağlayıcı protein

(Smac\DIABLO) salınımı gerçekleşir. Bu proteinlerin salınması, mitokondrial dış membranın (OMM) bozulmasının bütünlüğünün bir sonucudur; bu süreç mitokondriyel dış membran permeabilizasyonu (MOMP) olarak adlandırılır. Mitokondriyel apoptoz için ilk basamak olan MOMP, proapoptotik B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi proteinleri tarafından kontrol edilmektedir. Bcl-2 ailesi üyeleri; pro-apoptotik, anti-apoptotik ve sadece BH3 domain içeren proteinleri olmak üzere yapı ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaktadır. Pro-apoptotik protein olan Bax sitozolde monomer halde bulunmaktadır, ancak apoptotik sinyal ile homodimerizasyon oluşturarak mitokondri membranına geçmektedir. Bax translokasyonu ve sitokrom c salınımı apoptozun iki önemli moleküler olayı olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, membran permeabilizasyonunun organizasyonu ve sitokrom c salınımının nasıl indüklediği hala net değildir (34).

Mitokondriyel apoptoz mekanizmasının ikinci adımında apoptozom kompleksi oluşmaktadır. Sitokrom c, mitokondriyel elektron taşıma zincirinin vazgeçilmez bir bileşenidir. Sitokrom c sitoplazmaya salındıktan sonra apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ve prokaspaz-9 ile apoptozom kompleksini oluşturarak kaspaz-3 ve -7'nin aktif hale gelmesi için proteolitik yıkımına neden olur. Buna ek olarak, sitokrom c salınımı AIF ve Smac/DIABLO gibi faktörlerin sitozole salınmasını sağlamaktadır. AIF proteini nukleusa geç eder ve DNA'nın parçalanmasına neden olurken, Smac\DIABLO ise apoptoz inhibitör etkilerini antagonize eder ve kaspaz aktivasyonunu arttırmaktadır. Bu mekanizmalar ile mitokondriyel apoptotik süreç gerçekleştirilmektedir (35).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Polimeraz $\gamma$ DNA Sentez Aktivite Ölçümü

Pol  $\gamma$  DNA sentez aktivite ölçüm yöntemi Pol  $\gamma$ 'nın tek nükleotidlik boşluk içeren dupleks oligodeoksinükleotid substratına bir veya birden fazla nükleotid sentezleyerek boşluğu doldurma prensibine dayanmaktadır. Bu tez çalışmasında, Pol  $\gamma$  sentez aktivite ölçümü için Pol  $\gamma$ 'nın sentez aktivitesini gösterebileceği radyoaktif işaretli bir nükleotidlik (1-nt) boşluk içeren dupleks 51mer DNA substratı kullanıldı.

##### 3.1.1. Radyoaktif işaretli bir nükleotidlik (1-nt) boşluk içeren dupleks 51mer DNA substratının hazırlanması

###### 3.1.1.1. Oligodeoksinükleotidin [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP ile işaretlenmesi

Radyoaktif işaretli bir nükleotidlik (1-nt) boşluk içeren dupleks 51mer DNA substratının hazırlanması için 3 oligodeoksinükleotid zinciri kullanıldı: i) 25mer'lik birinci oligodeoksinükleotid zincirinin (5'- GCT TAG CTT GGA ATC GTA TCA TGT A-3') 3'-ucunda Pol $\gamma$ 'nın nükleotid sentezi yapabilmesi için serbest 3'-OH-grubu bulunur. ii) 25mer'lik ikinci primer oligodeoksinükleotid zinciri (5'- A CTC GTG TGC CGT GTA GAC CGT GCC-3) iii) 51mer'lik kalıp oligodeoksinükleotid zinciri (5'-GGC ACG GTC TAC ACG GCA CAC GAG TGT ACA TGA TAC GAT TCC AAG CTA AGC-3'). Oligodeoksinükleotidler "DNA Technology A/S" (Danimarka) den temin edildi.

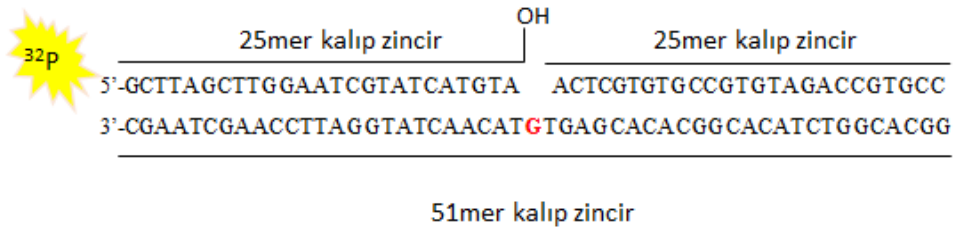
25mer'lik primer zincirini 5'-ucundan [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (Perkin Elmer, ABD) ile işaretlemek için kullanılan reaksiyon karışımı tabloda gösterilmektedir. 25mer'lik primer zincir, T4 polinükleotid kinaz tamponu ve T4 polinükleotid kinaz (New England Biolabs, ABD) reaksiyon karışımı ile 37<sup>0</sup> C'de 1 saat inkübe edildikten sonra kinaz enzimini inaktive etmek için 60<sup>0</sup> C'de 20 dakika inkübe edildi. 25mer'lik primere bağlanmamış [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP'yi reaksiyon ortamından uzaklaştırmak için reaksiyon karışımı Sefadex G-25 kolonuna (SigmaAldrich, ABD) uygulandı ve 700xg'de 1,5 dakika santrifüjden sonra 5'-ucu [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP ile işaretlenmiş primer eluatu toplandı.

Tablo: Oligodeoksinükleotidin [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP ile işaretlenme reaksiyonu.

Kinaz Reaksiyonu	Hacim	Son konsantrasyon
Birinci oligodeoksinükleotid (10 pmol/ $\mu$ l) 5'- GCT TAG CTT GGA ATC GTA TCA TGT A-3'	1 $\mu$ l	1 pmol/ $\mu$ l
T4 PNK (20 U)	1 $\mu$ l	2 U
10X TBE	1 $\mu$ l	1X
[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (10 $\mu$ Ci)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ Ci
dH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l	

### 3.1.1.2. Hibridizasyon (Annealing) Reaksiyonu

Hibridizasyon reaksiyonu için 36  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l 1 M LiCl ve 20 pmol (2  $\mu$ l, 10pmol/ $\mu$ l) ikinci ve tamamlayıcı oligodeoksinükleotidler (5'- A CTC GTG TGC CGT GTA GAC CGT GCC-3' ve 5'-GGC ACG GTC TAC ACG GCA CAC GAG TGT ACA TGA TAC GAT TCC AAG CTA AGC-3' ) bölüm 3.1.1.1'de hazırlanan [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP işaretli 25mer'lik primer zincir reaksiyon karışımına eklendi. Karışım 95<sup>0</sup> C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra ısı bloğu kapatılarak oligodeoksinükleotidler 4-5 saatlik periyot boyunca oda sıcaklığında soğutulurken primer bağlanması sağlandı. Hibridizasyonu sağlanmış DNA substratları 4<sup>0</sup> C saklandı. Bu şekilde, çift zincirli ve tek nükleotidlik boşluk oluşturan  $^{32}$ P ile işaretlenmiş dupleks DNA substratı hazırlandı (Şekil 3) (36).



Şekil 3: Radyoaktif işaretli bir nükleotidlik (1-nt) boşluk içeren DNA substratı.

### 3.2. DNA polimeraz $\gamma$ 'nın DNA Sentez Aktivite Ölçüm Yöntemi

Pol  $\gamma$  DNA sentez aktivitesi ölçüm yöntemi Pol  $\gamma$ 'nın tek nükleotidlik boşluk içeren dupleks 51mer oligodeoksinükleotid substratına bir veya birden fazla nükleotid ekleyerek boşluğu doldurma prensibine dayanmaktadır. Bu aktivite ölçüm deneyi için Pol  $\gamma$ 'nın sentez aktivitesini gösterebileceği radyoaktif işaretli 1-nt boşluk içeren dupleks 51mer DNA substratı hazırlandı (Şekil 3).

Pol  $\gamma$  proteini farklı konstrasyonlarda (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ve 40  $\mu$ M)  $^{32}$ P ile işaretlenmiş 1-nt boşluk içeren 20 nM 51mer DNA substratı, 50  $\mu$ M dNTP ve uygun tampon ortamı (20 mM HEPES-KOH pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, ABD), 100 mM KCl (Sigma Aldrich, ABD), 1 mM  $\beta$ -merkaptotanol (Bio-Rad, ABD), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, ABD), 0,1 mg/ml BSA (Bio-rad, ABD) ve 5% gliserol (Thermo Fisher Scientific, ABD) içeren reaksiyon karışımına eklenerek sentez aktivitesi için 37°C'de 25 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bu reaksiyona 20 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific, ABD), %95 formamid (Sigma Aldrich, ABD), %0,01 bromfenol mavisi (Bio-rad, ABD), %0,01 ksilen siyanol (Sigma Aldrich, ABD) içeren formamid jel yükleme boyası eklenerek reaksiyon durduruldu. Örnekler 95°C'de 10 dakika denatüre edildikten sonra %20'lik denatüre-poliakrilamid jel (%20 poliakrilamid + 7M üre) elektroforezinde yürütüldü. Bu deney sonucunda, Pol  $\gamma$  için 40 nM enzim konsantrasyonu sabit tutularak uygun inkübasyon zamanını belirlemek için zamana bağlı (10 dk, 15 dk, 20 dk ve 25 dk) aktivitesi ölçüldü. Sonuçlar Typhoon PhosphorImager cihazı (GE Healthcare, ABD) ile görüntüledi ve ImageQuant yazılımı ile Pol  $\gamma$ 'nın eklediği her nükleotidin intensitesi kantitatif olarak hesaplandı. Sentez aktivitesi şu şekilde hesaplandı: Toplamın yüzdesi = (her dNTP eklenmesiyle gözlenen radyoaktivite miktarı (ürünün radyoaktivite miktarı) / toplam radyoaktivite) X 100) (36, 37).

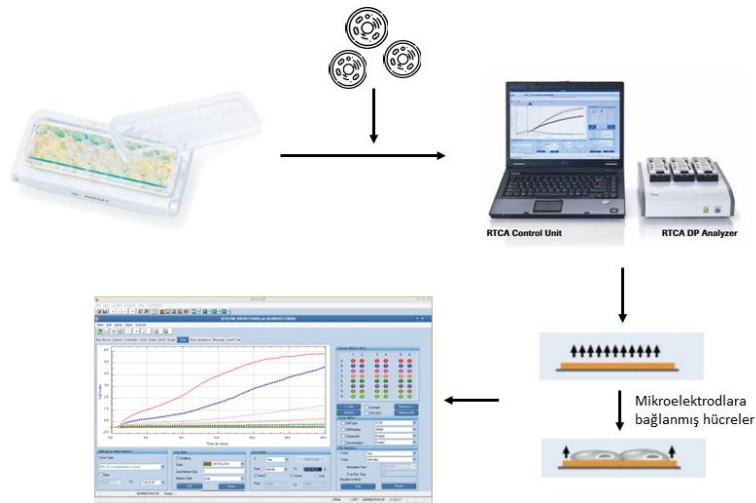
### 3.3. Küçük Molekül İnhibitörlerin Pol $\gamma$ 'nın DNA Sentez Aktivitesi Üzerine Etkisi

İnhibitörlü ve inhibitörsüz ortamda inkübasyondan sonra Pol  $\gamma$  proteini  $^{32}$ P ile işaretlenmiş 1-nt boşluk içeren 20 nM 51mer DNA substratı, 50  $\mu$ M dNTP ve uygun tampon ortamı (20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM  $\beta$ -

merkaptotanol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml BSA ve %5 gliserol) içeren reaksiyon karışımına eklenerek sentez aktivitesi için 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. Bölüm 3.2'de bahsedildiği gibi sonuçlar görüntülenip analiz edildi.

### 3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) ile Hücre Proliferasyon Analizleri ve Sitotoksisite Deneyleri

WST-1 hücre ölümü yöntemi, uç nokta sitotoksisite deneyi olduğu için, bu yöntemle ilacın sitotoksik etkisi sadece tek zaman noktasında ölçülebilmektedir. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemidir. Bu nedenle, WST1-deneyi yerine daha gelişmiş bir yöntem olan xCELLigence gerçek zamanlı hücre ölçüm yöntemi kullanılmıştır. Bu sistem, hücre popülasyonunun elektrot yüzeyinde büyüdüklerinde empedans dalgalanmalarını ölçmek için oluşturulan bir tekniktir (38). xCELLigence RTCA-DP (Roche, ABD), sisteme özgü 16 kuyucuklu tabakaların (E-plate16) her bir kuyusunun dibinde bulunan altın mikro elektrotlar sayesinde hücrelerin eklenmesiyle elektrik empedansındaki değişiklikleri gerçek zamanlı olarak göstermektedir. Sistemin çalışma prensibinde, kuyucuğa eklenen hücreler elektrot yüzeyine tutunur ve yayılırken elektrik empedansında bir artışa neden olur. Empedans, hücre indeksi olarak adlandırılan boyutsuz bir parametre olarak gösterilir; bu, hücre tarafından kaplanan kuyunun toplam alanı ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla, hücre indeksi, hücre yapışması, yayılması, morfolojisi ve hücre yoğunluğunu izlemek için kullanılmaktadır.



Şekil 4: Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminin (xCELLigence RTCA-DP) şematik diyagramı.

Hücre proliferasyonunun empedansa dayalı gerçek zamanlı analizi xCELLigence RTCA-DP sisteminin kullanım kılavuzuna göre yapıldı (Roche, ABD). xCELLigence RTCA-DP sistemine özgü 16 kuyulu tabakaların (E-plate16) her bir kuyusuna 100 µl DMEM\F:12 eklendi; 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra cihazda arka plan (backgorund) okuması yapıldı. Ekspansiyon büyüme fazında (Log fazı) bulunan hücreler tripsinize edilerek sayıldı. E-plate kuyularına 90 µl hacim içerisinde HCT116 ve HCT116-chr3 hücreleri için 20000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler log fazına geldiğinde (S-fazında) hücrelere farklı konsantrasyonlarda (10 µM, 20 µM, 40 µM ve 80 µM) Phany28 molekülü eklendi. Bu molekülün hücre proliferasyonu üzerine etkileri 30 dakika aralıklar ile 72 saat boyunca izlendi. EC50/IC50 değerleri xCELLigence ölçümleri ile elde edilen doz-yanıt eğrileri xCELLigence cihazının yazılımında kullanılarak belirlendi.

### **3.5. Apoptoz Ölçümü**

Mitokondriyel apoptoz yolağında mitokondriyel fonksiyon bozukluğu mitokondri dış membranının geçirgenliğine neden olur ve mitokondriden sitozole sitokrom c salınımını sağlar. Bu salınım apoptozu başlatarak kaspaz 9'u aktive eder (34,35). Mitokondriyel apoptozun belirleyicileri olan sitokrom c, PARP ve kaspaz 9 düzeyleri en etkin Pol  $\gamma$  inhibitörü ile inkübe edilen HCT116 hücrelerinden hücre ekstraktı hazırlandı. Hücre lizatlarının total protein miktarı Bradford metodu ile belirlendikten sonra SDS-PAGE jel elektroforezinde hücre ekstraktları protein miktarı ayarlanarak yürütüldü. Sitokrom c, PARP ve kaspaz 9 antikorları kullanılarak Western blot yöntemi ile bu proteinlerin miktarları belirlendi.

#### **3.5.1. Hücre kültürü ve hücre ekstraktlarının hazırlanması**

HCT116 ve HCT116-chr3 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve %1 penisilin/streptomisin (pen/strep) (Thermo Fisher Scientific, ABD) ilaveli DMEM\F12 (Thermo Fisher Scientific, ABD) ortamında 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde büyütüldü. HCT116-chr3 hücrelerinin büyüme ortamına seçici antibiyotiği genetisin (400 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific, ABD) eklendi. Hücre

ekstraktı hazırlamak için hücre kültürü ortamında büyütülen hücreler 2 kez soğuk 1X PBS ile yıkandıktan sonra 500xg'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı. Elde edilen hücre peletine uygun hacimde RIPA tamponu (50 mM Tris-HCl (SigmaAldrich, ABD), 150 mM NaCl (SigmaAldrich, ABD), 1 mM EDTA, 1 mM NaF (SigmaAldrich, ABD), 1 mM sodyum ortovanadat (SigmaAldrich, ABD), %0,5 NP-40 (Thermo Fisher Scientific, ABD), %0,5 Triton X-100 (SigmaAldrich, ABD), 0,5 mM PMSF (Roche, ABD), 1 mM DTT (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve 1X proteaz inhibitör tableti (Roche, ABD) eklenerek 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Hücre lizatı 5 pulse da 6 kez 1 saniye sonike edildikten sonra 14000xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant toplanarak Bradford protein analizinde kullanıldı.

### **3.5.2. Bradford protein tayini**

Bradford solüsyonu (Bio-Rad, ABD) kullanılarak ve üreticinin protokolü takip edilerek hücre ekstraktlarının protein miktarları tespit edildi. BSA (Bio-rad, ABD) farklı konsantrasyonlarda kullanılarak standart eğri elde edildi.

### **3.5.3. Western blot analizi**

Eşit protein miktarları içeren hücre ekstratları yükleme tamponu ile karıştırılarak 95°C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra %4-12 gradiyent SDS-PAGE (Thermo Fisher Scientific, ABD) jelde yürütüldü. Örnekler PVDF membranına (Bio-Rad, ABD) transfer edildikten sonra %5'lik süt tozu (Bio-Rad, ABD) ve %0.1'lik Tween-20 (Bio-Rad, ABD) içeren tris tampon çözeltisi (TBS-T) içinde çalkalamaya bırakıldı. Bu süre sonunda membran tercih edilen birincil antikor ile 4°C'de bir gece çalkalamaya bırakıldı. Bu çalışmada kullanılan birincil antikorlar: beta-aktin antikor (1:1000, Cell Signaling, ABD), Kaspaz 9 antikor (1:1000, Cell Signaling, ABD), sitokrom c antikor (1:500, Cell Signaling, ABD), PARP antikor (1:1000, Cell Signaling, ABD), COXIV antikor (1:1000, Thermofisher scientific, ABD). Ertesi gün, membran 3 kez 5'er dakika TBS-T çözeltisi ile yıkandıktan sonra birincil antikora uygun HRP-konjuge ikincil antikor (1:5000, Cell Signaling, ABD) ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalamaya bırakıldı. Membran 3 kez 15'er dakika TBS-T çözeltisinde yıkandıktan sonra ECL ile ChemiDoc MP (Bio-Rad, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi. Membranlar "Restore PLUS Western Blot

Stripping Buffer" (Bio-Rad, ABD) içinde 30 °C'de 1,5 saat inkübe edilerek "strip" yapılarak farklı birincil antikolar için kullanıldı.



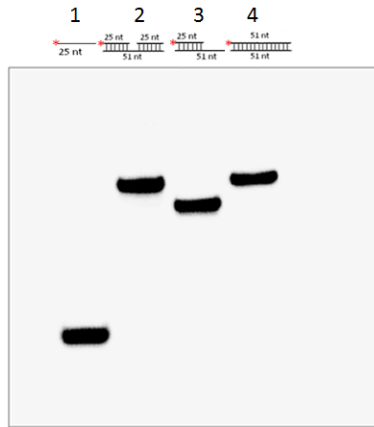
## 4. BULGULAR

### 4.1. Mitokondriyel BER Yolağında Pol $\gamma$ DNA Sentez Aktivitesinin Ölçümü

Hücre sitotoksisite deneyleri sonucunda *MLH1* genindeki mutasyonun neden olduğu MMR mekanizması hasarlı polipsiz kolon kanseri hücrelerini (HCT116) seçici olarak öldüren ancak *MLH1* proteini bulunan MMR mekanizması fonksiyonel (HCT116-*chr3*; *MLH1* geni bulunan ve sağlıklı hücre olarak kabul edilen) hücreye ise daha az sitotoksisite gösterdiği tespit edilen 6 molekülün (*phany28*, *hydcmx*, *ntfm27*, *prestw-272*, *prestw-304* ve *prestw-389*) Pol  $\gamma$ 'nın DNA sentez aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı (Şekil 8). HCT116-*chr3* hücre hattı Prof. Thomas Kunkel (NIEHS, NIH, ABD) den sağlandı. Menadion Pol  $\gamma$ 'nın kontrol inhibitörü olarak kullanıldı. Ek olarak, her iki hücrede de benzer sitotoksik etki gösteren *prestw-296*, *prestw-395* ve *prestw-285* moleküllerinin de Pol  $\gamma$ 'nın sentez aktivitesine etkisi incelendi (Şekil 8).

#### 4.1.1. Radyoaktif işaretli DNA substratlarının hazırlanması

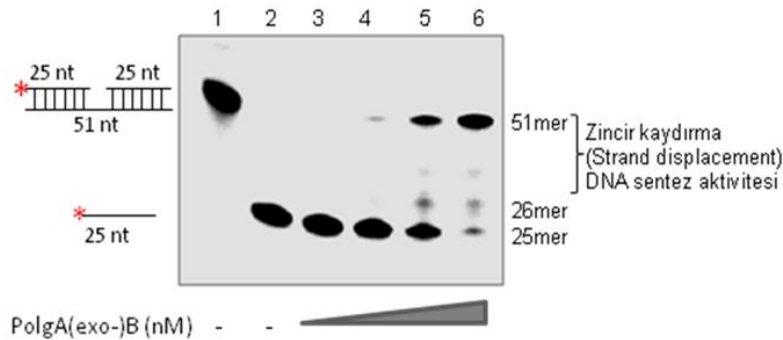
Hazırlanan DNA substratları 5'-ucundan [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP ile işaretlenip hazırlandıktan sonra %12 native poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek analiz edildi (Şekil 5). Şekil 5 substratların doğru olarak işaretlendiğini ve hazırlandığını göstermektedir.



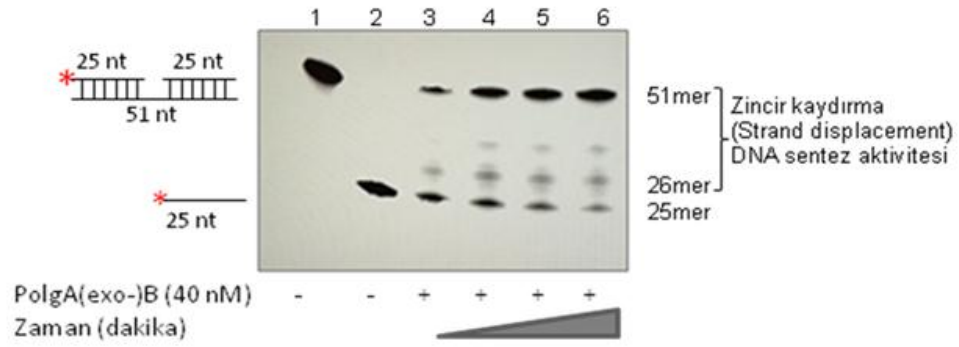
Şekil 5: 5'-ucundan [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP ile işaretlenen DNA substratlarının jel görüntüsü. 1. kuyucuk, 25mer'lik tek zincir oligodeoksiniükleotid; 2. kuyucuk, 1-nt boşluk içeren çift zincir substrat; 3. kuyucuk, primer/template substratı; 4. kuyucuk, 51mer çift zincir kontrol substratını göstermektedir.

#### 4.1.2. Küçük moleküllerin Pol $\gamma$ 'nın zinciri kaydırma (strand displacement) DNA sentez aktivitesi üzerine etkisi

Küçük moleküllerin Pol  $\gamma$  enziminin aktivitesi üzerine etkilerini araştırmadan önce, Pol  $\gamma$ 'nın sentez aktivite reaksiyon koşulları optimize edildi. Bu çalışmada kullanılan rekombinant Pol  $\gamma$  proteini Prof. Whitney Yin'in laboratuvarında (Texas University, Department of Pharmacology and Toxicology, ABD) saflaştırılarak grubumuza gönderildi (39). Farklı konsantrasyonlardaki Pol  $\gamma$  enzimi uygun reaksiyon koşullarında 37°C'de 25 dakika inkübe edildikten sonra yükleme tamponu eklenerek 95°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra %20'lik denatüre poliakrilamid jel (PAGE-7M üre) elektroforezinde 1XTBE (Tris-borat-EDTA) tamponu içerisinde 15 watt'da 2 saat 20 dakika yürütüldü. Elektroforezden sonra jel, fosfor görüntüleme kasetinde bir gece oda sıcaklığında bırakıldıktan sonra Typhoon Phosphorimager cihazında görüntüledi. Artan enzim konsantrasyonuna bağlı olarak Pol  $\gamma$ , DNA substratındaki boşluktan başlamak üzere nükleotid ekleyerek sentez aktivitesini gerçekleştirdi. Enzim konsantrasyonuna bağlı olarak Pol  $\gamma$  sentez aktivitesinin arttığı görülmektedir (Şekil 6). Bu deney sonucunda, Pol  $\gamma$  için 40 nM enzim konsantrasyonu seçildi ve proteinin bu konsantrasyonu sabit tutularak uygun inkübasyon zamanını belirlemek için zamana bağlı aktivitesi ölçüldü (Şekil 7). 40 nM enzim konsantrasyonunda zamana bağlı olarak Pol  $\gamma$  sentez aktivitesinin arttığı görülmektedir (Şekil 7). Sonuç olarak, Pol  $\gamma$  sentez aktivite deneyleri için, 40 nM enzim konsantrasyonu ve 20 dakika inkübasyon zamanı seçildi (Şekil 6 ve 7).

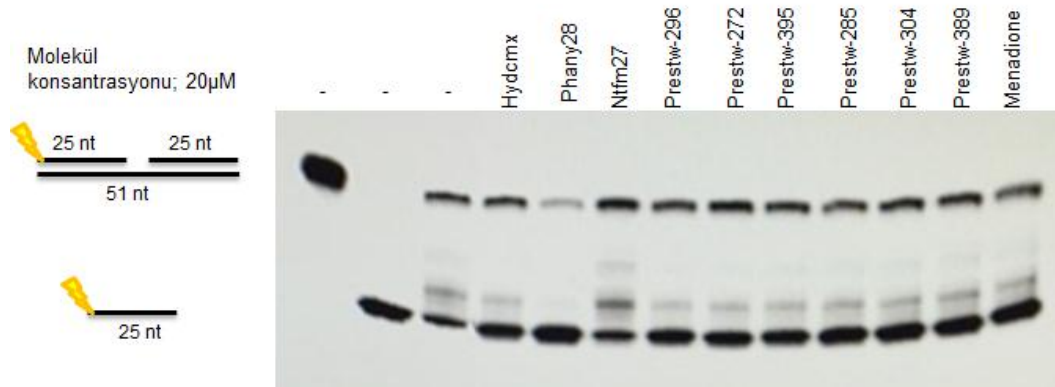


Şekil 6: Farklı Pol  $\gamma$  konsantrasyonlarında (5nM, 10 nM, 20 nM ve 40 nM) zincir kaydırma (Strand displacement) DNA sentez aktivitesi. 1. kuyucuk, 51mer'lik tek zincir oligodeoksinükleotid; 2. kuyucuk, 25mer'lik tek zincir substratı; 3. kuyucuk, 5 nM Pol  $\gamma$ 'nın bulunduğu sentez reaksiyonu, 4. kuyucuk, 10 nM Pol  $\gamma$ 'nın bulunduğu sentez reaksiyonu, 5. kuyucuk, 20 nM Pol  $\gamma$ 'nın bulunduğu sentez reaksiyonu ve 6. kuyucuk, 40 nM Pol  $\gamma$ 'nın bulunduğu sentez reaksiyonunu göstermektedir.



Şekil 7: Konsantrasyonu 40 nM olan Pol  $\gamma$  enziminin zamana bağlı (10, 15, 20, 25 dakika) zincir kaydırma (Strand displacement) DNA sentez aktivitesi. 1. kuyucuk, 51mer'lik tek zincir oligodeoksinükleotid; 2. kuyucuk, 25mer'lik tek zincir substratı; 3. kuyucuk, DNA sentez reaksiyonunun 10 dakika, 4. kuyucuk, DNA sentez reaksiyonunun 15 dakika, 5. kuyucuk, DNA sentez reaksiyonunun 20 dakika ve 6. kuyucuk, DNA sentez reaksiyonunun 25 dakikada gerçekleştiği reaksiyonları göstermektedir.

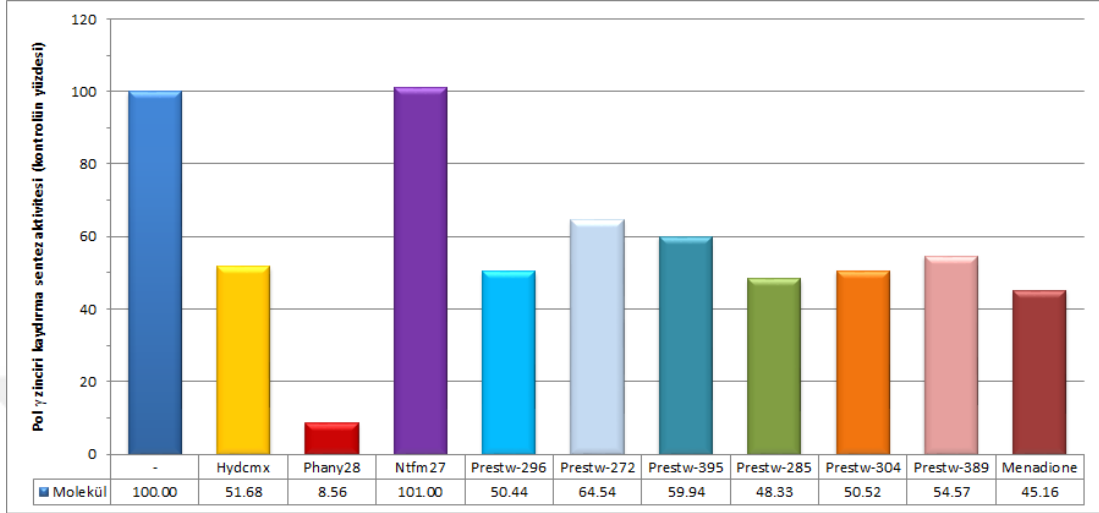
Bölüm 4.1'de bahsedilen küçük moleküller, tek bir konsantrasyonda (20  $\mu$ M) seçilerek Pol  $\gamma$  DNA sentez aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı (Şekil 8). Şekil 8'de rekombinant Pol  $\gamma$  aynı miktarda küçük moleküller ile inkübe edildi. Kullanılan küçük moleküllerin her birinin (Ntfm27 hariç) Pol  $\gamma$  enziminin zincir kaydırma DNA sentez aktivitesini inhibe ettiği tespit edildi. İncelenen küçük moleküllerin Pol  $\gamma$  DNA sentez aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin sonuçları Typhoon Phosphorimager'in ImageQuant yazılımı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edildi ve hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 8: Pol  $\gamma$ 'ya bağlanan moleküllerin etkisiyle Pol  $\gamma$  enziminin zincir kaydırma (Strand displacement) DNA sentez aktivitesi.

Şekil 8'de yapılan analiz sonucunda her bir küçük molekülün Pol  $\gamma$  enzimi üzerine inhibisyonu, inhibitörsüz enzimin aktivitesine oranlanarak yüzdesel olarak

hesaplandı (Şekil 9). Grafikte gösterildiği gibi Ntfm27 hariç tüm küçük moleküllerin kontrol olarak kullanılan menadione gibi yaklaşık olarak yarı yarıya enzim inhibisyonunu gerçekleştirdiği tespit edildi.

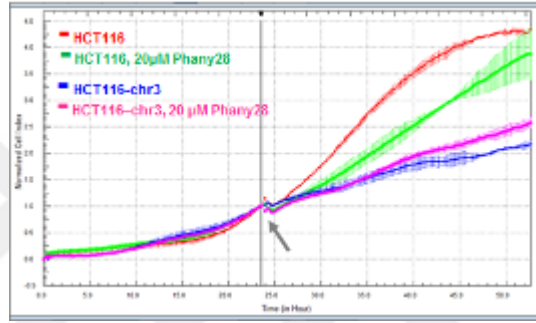


Şekil 9: Pol  $\gamma$ 'ya bağlanan moleküllerin etkisiyle Pol  $\gamma$  enziminin zincir kaydırma (Strand displacement) DNA sentez aktivitesine etkisinin dansitometrik analizi.

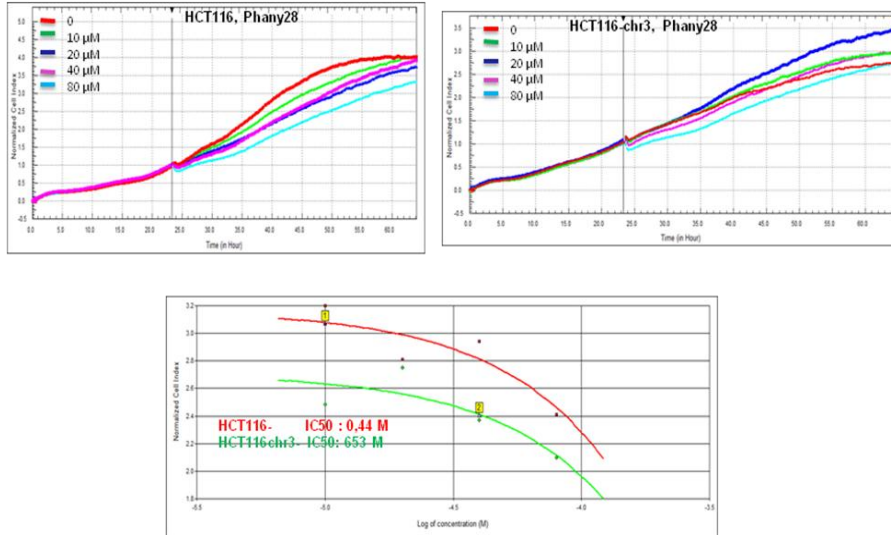
#### 4.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Sitotoksisite Deneyleri

Hücre sitotoksisite deneylerindeki amaç in silico ve SPR analizi ile Pol  $\gamma$  proteinine bağlandığı belirlenen moleküllerden, *MLH1* genindeki mutasyonun neden olduğu polipsiz kolon kanseri hücresi HCT116 (MMR mekanizması hasarlı) seçici olarak öldüren ancak *MLH1* proteini bulunan HCT116-chr3 (MMR mekanizması fonksiyonel) hücresinde ise daha az sitotoksisite gösteren bir molekül tespit etmektir. Bu amaçla, bilgisayar ortamında (in silico) Pol  $\gamma$  proteinine bağlanma kinetiği belirlenen her bir molekülün SPR bağlanma kinetiği sonucuna göre  $K_D$  si en küçük yani Pol  $\gamma$  proteinine bağlanma eğilimi en yüksek küçük moleküller seçildi. Prestwick kimyasal kütüphanesinin SPR analizi sonucunda Pol  $\gamma$  proteinine bağlandığı belirlenen moleküllerden ise 6 molekül DNA sentez aktivitesi gösterildikten sonra hücre sitotoksisite deneylerinde kullanılmak üzere aralarından seçildi. Seçilen küçük molekülün (Phany28) hücre proliferasyonuna etkisi gerçek

zamanlı hücre analiz cihazı ile belirlendi. İlk etapta küçük molekül 20  $\mu$ M'lık tek bir konsantrasyonunun HCT116 ve HCT116-chr3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi değerlendirildi (Şekil 10). Seçilen 20  $\mu$ M molekül konsantrasyonunda Phany28 molekülünün HCT116 hücrelerine HCT116-chr3 hücrelerinden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği Şekil 10'da gösterildi. HCT116-chr3 hücrelerine HCT116 hücrelerinden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği tespit edilen molekülün bu hücrelerin proliferasyonuna etkisi farklı inhibitör konsantrasyonları kullanılarak izlendi ve doza bağlı EC50/IC50 değerleri belirlendi (Şekil 11). EC50/IC50 değerleri xCELLigence cihazının yazılımı kullanılarak hesaplandı.



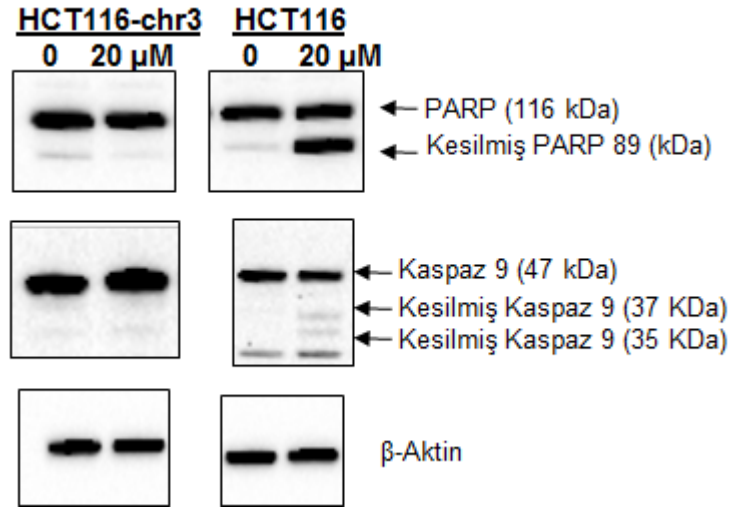
Şekil 10: Pol  $\gamma$ 'ya bağlanan in siliko belirlenen, Prestwick kimyasal kütüphanesi® molekülü Phany28 20  $\mu$ M konsantrasyonunda HCT116 ve HCT116-chr3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi. Siyah ok: molekül ekleme zamanını gösterir.



Şekil 11: Phany28 nin HCT116 ve HCT116-chr3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi ve EC50/IC50 değeri.

### 4.3. Apoptoz

HCT116 ve HCT116-chr3 hücreleri 20  $\mu$ M Phany28 molekölü ile inkübe edildikten sonra mitokondriyel apoptozun belirleyicileri olan PARP, kaspaz 9 ve sitokrom c protein düzeyleri Western blot yöntemi ile belirlendi (Şekil 12). HCT116 hücre hattında kontrol hücre hattına göre Phany28 uygulaması ile PARP ve kaspaz 9 proteinlerinin kesilerek aktif halde geldiği ve mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımının gerçekleşerek apoptozun indüklendiği gösterildi. Beta-aktin ve Kompleks IV sırasıyla sitoplazmik ve mitokondriyel yükleme kontrolü olarak her iki hücre hattı için kullanıldı. HCT116 hücrelerinde molekölün mitokondriyel apoptozu neden olduğu gösterildi (Şekil 12 B).



Şekil 12: HCT116-chr3 ve HCT116 hücre hatlarında 20  $\mu$ M Phany28 uygulamasıyla mitokondriyel apoptoz mekanizmasında yer alan proteinlerin miktarlarına etkisi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser hücrelerinde oluşan DNA hasarının onarımında aktif rol oynayan BER mekanizması, terapötik dirence neden olarak genomik kararlılığı sağladığı için kanser tedavisinin engellenmesinde önemli bir unsurdur. MMR genleri *MLH1* veya *MSH2*'deki germline mutasyonları, kalıtsal polipsiz kolorektal kansere (HNPCC) / Lynch sendromuna neden olur (40). *MLH1* homozigot mutasyonuna sahip olan kolorektal kanser hücrelerinde DNA hasarı mitokondriyel BER yolağı ile tamir edilerek hücre canlılığı korunmaktadır. MLH1 ve Pol  $\gamma$  arasındaki bu sentetik lethal ilişkiye istinaden mitokondriyel BER yolağının inhibe edilmesi kanser tedavisi için umut vadeden bir yaklaşım olarak kullanılabilir (9).

Bu tez çalışmasında, Prestwick kimyasal kütüphanesinden ve bilgisayar ortamında (in siliko) moleküler docking yaklaşımı ile belirlenen küçük moleküller arasından Pol  $\gamma$  proteinine doğrudan bağlandığı belirlenen bazı moleküller seçilerek Pol  $\gamma$  proteini üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ek olarak, Pol  $\gamma$  proteinin aktivitesini en fazla inhibe eden molekülün MLH1 proteini bulunmayan (HCT116) ve MLH1 proteini bulunan (HCT116-chr3) kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin araştırılması da amaçlandı. Böylece, sağlıklı hücreye zarar vermeden kanser hücrelerine sitotoksik etki gösteren ilaç olma potansiyeline sahip yeni bir molekülün bulunmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Bugüne kadar Pol  $\gamma$  inhibitörleri ile sınırlı sayıda yapılan çalışmalarda bu proteine özgü inhibitörlerin mtDNA replikasyonları üzerine etkisi belirlenmiştir (10,33). Pol  $\gamma$ , mtDNA replikasyonu ve onarımında görev alan polimerazdır. Literatürde, VK3'ün mitokondriyel matrikste lokalize olan Pol  $\gamma$  inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. VK3 kanser hücrelerinde normal hücrelere göre süperoksit miktarını arttırdığı ve ikinci etki Pol  $\gamma$  inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (10). Kayahima'nın 2009 yılında yapmış olduğu çalışmaya göre HCT116 hücreleri üzerinde vitamin K3'ün türevi olduğu naftokuaninin güçlü bir şekilde anti-poliferasyon etkisini belirlemiştir. Zidovüdin (3'-azido-2', 3'-deoksitimidin) ve nükleosid analogları VK3 ile benzer şekilde mitokondriyel disfonksiyonlara ve maligniteye etki gösterdiği önerilmiştir (41). Ayrıca Martin ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada nükleozid revers

transkripsiyon inhibitörü (NRTI) tedavisi gören hastalarda mtDNA mutasyonları gösterdiği bildirilmiştir. Ancak günümüze kadar yapılan çalışmalarda sadece Pol  $\gamma$ 'ya özgü ve kanser hücrelerini seçici olarak öldüren bir inhibitör belirlenememiştir.

Bu tez çalışmasında ise küçük moleküllerin Pol  $\gamma$ 'nın zinciri kaydırma (strand displacement) DNA sentez aktivitesini inhibe ettiği dolayısıyla mitokondriyel BER yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 8, 9). Pol  $\gamma$ 'nın DNA sentez aktivitesini inhibe ettiği tespit edilen küçük moleküller arasından seçilen Phany28 hücreye seçici sitotoksik etkisi de gösterdiği ve mitokondriyel apoptoza neden olduğu tespit edildi (Şekil 10, 11,12). Elde edilen bulgular, yeni Pol  $\gamma$  inhibitörünün Pol  $\gamma$  ve MLH1 arasındaki sentetik letal ilişki nedeniyle sağlıklı hücreye zarar vermeden seçici olarak kolon kanseri hücrelerinin ölümüne neden olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, kanser tedavisinde ilaç gelişimine ve yeni ilaç hedeflerinin bulunmasına katkı sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

1. Kasai H, Chung MH, Jones DS, Inoue H, Ishikawa H, Kamiya H, Nishimura S. (1991). 8-Hydroxyguanine, a DNA adduct formed by oxygen radicals: its implication on oxygen radical-involved mutagenesis/carcinogenesis. *J. Toxicol. Sci.*, 95-105.
2. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. (2008). DNA Repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 193-204.
3. Sharma RA, Dianov GL. (2007). Targeting base excision repair to improve cancer therapies. *Mol. Aspects Med.*, 345-374.
4. Ding J, Miao ZH, Meng LH, Geng MY. (2006). Emerging cancer therapeutic opportunities target DNA-repair systems. *Trends Pharmacol. Sci.*, 338-344.
5. Bohr VA, de Souza-Pinto NC, Wilson III DM, Stevnsner TV. (2008). Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration. *DNA Repair*, 1098–1109.
6. Conklin KA. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr. Cancer Ther.*, 294-300.
7. Bohr VA, de Souza-Pinto NC, Croteau DL, Hudson EK, Hansford RG. (1999). Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. *Nucleic Acids Res.* , 1935–1942.
8. Bohr VA, Stuart JA, Mayard S, Hashiguchi K, de Souza-Pinto NC. (2005). Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic Acids Res.* , 3722-3732.
9. Ashworth A, Lord CJ, Martin SA, McCabe N, Mullarkey M, Cummins R, Kay E. (2010). DNA Polymerases as Potential Therapeutic Targets for Cancers Deficient in the DNA Mismatch Repair Proteins MSH2 or MLH1. *Cancer Cell*, 235–248.
10. Sasaki R, Suzuki Y, Yonezawa Y, Ota Y, Okamoto Y, Demizu Y, Mizushima Y. (2008). DNA polymerase  $\gamma$  inhibition by vitamin K3 induces mitochondria-mediated cytotoxicity in human cancer cells. *Cancer Sci*, 1040-1048.

11. Chen D, Wu Y, Li N, Zhang T, Wu H, Huang C. (2009). Mitochondrial DNA base excision repair and mitochondrial DNA mutation in human hepatic HuH-7 cells exposed to stavudine. *Mutat. Res.*, 28-38.
12. Krokan HE, Bjørås M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biology*, 5:a012583.
13. Asagoshi K, Yamada T, Terato H, Ohyama Y, Monden Y, Arai T, Ide H. (2000). Distinct Repair Activities of Human 7,8-Dihydro-8-oxoguanine DNA Glycosylase and Formamidopyrimidine DNA Glycosylase for Formamidopyrimidine and 7,8-Dihydro-8-oxoguanine. *The Journal of Biological Chemistry* , 4956–4964.
14. Zharkov DO, Rosenquist TA, Gerchman SE, Grollman AP. (2000). Substrate Specificity and Reaction Mechanism of Murine 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 28607–28617.
15. Girard PM, D’Ham C, Cadet J, Boiteux S. (1998). Opposite base-dependent excision of 7,8-dihydro-8-oxoadenine by the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carcinogenesis*, 1299–1305.
16. Maynard S, de Souza-Pinto NC, Scheibye-Knudsen M, Bohr VA. (2010). Mitochondrial base excision repair assays. *Methods*, 416–425.
17. Wallace SS, Murphy DL, Sweasy JB. (2012). Base Excision Repair and Cancer. *Cancer Letters*, 73–89.
18. Jacobs AL, Schär P. (2012). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*, 1-20.
19. Bailly V, Derydt M, Verly WG. (1989). Delta-elimination in the repair of AP (apurinic/aprimidinic) sites in DNA. *Biochemical Journal*, 707-713.
20. Doetsch PW, Cunningham RP. (1990). The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutation Research/DNA Repair*, 173-201.
21. Demple B, Harrison L. (1994). REPAIR OF OXIDATIVE DAMAGE TO DNA: Enzymology and Biology. *Annu. Rev. Biochem.* , 915-948 .

22. Bohr VA, Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 2–10.
23. de Souza-Pinto NC, Muftuoglu M, Mori MP. (2014). Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion*.
24. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. (2009). Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 981-993.
25. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson Jr JE. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Experimental Gerontology*, 575–591.
26. Gredilla R. (2011). DNA Damage and Base Excision Repair in Mitochondria and Their Role in Aging. *Journal of Aging Research*.
27. Ciesielski GL, Oliveira MT, Kaguni LS. (2016). Animal Mitochondrial DNA Replication. *The Enzymes*, 255-292.
28. Young MJ, Copeland WC. (2016). Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 52–62.
29. Oliveira MT, Kaguni LS. (2011). Reduced stimulation of recombinant DNA polymerase gamma and mitochondrial DNA (mtDNA) helicase by variants of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (mtSSB) correlates with defects in mtDNA replication in animal cells. *J. Biol. Chem.*, 40649–40658.
30. Copeland WC, Longley MJ. (2014). Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA Repair*, 190-198.
31. Brinkman K, Kakuda TN. (2000). Mitochondrial toxicity of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors: a looming obstacle for long-term antiretroviral therapy? *Curr. Opin. Infect. Dis.* , 5–11.
32. Lewis W, Day BJ, Copeland WC. (2003). Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 812-822.
33. Sasaki R, Suzuki Y, Ota Y, Yonezawa Y, Huang P, Yoshida K, Mizushima Y. (2007). Impact of Selective Mitochondrial DNA Polymerase Gamma Inhibition by Vitamin K

Compounds Against Human Cancer Cells and Radioresistant Clones. *I. J. Radiation Oncology*.

34. Youle RJ, Martinou JC. (2011). Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics. *Dev Cell.*, 92–101.
35. Aw TY, Circu ML. (2010). Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Systems and Apoptosis. *Free Radic Biol Med.*, 749–762.
36. Muftuoglu M, Sharma S, Thorslund T, Stevnsner T, Soerensen MM, Brosh RM, Bohr VA. (2006). Cockayne syndrome group B protein has novel strand annealing and exchange activities. *Nucleic Acids Res.*, 295–304.
37. Maynard JA, Marshall PA, Johnson JE, Harman S. (2010). Building resilience into practical conservation: identifying local management responses to global climate change in the southern Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, 381–391.
38. Giaever I, Keese CR. (1991). Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 7896-7900.
39. Yin WY, Lee YS, Kennedy DW. (2009). Structural Insight into Processive Human Mitochondrial DNA Synthesis and Disease-Related Polymerase Mutations. *Cell*, 312–324.
40. Fields JZ, Hassen S, Ali AA, Kilaparty SP, Al-Anbaky QA, Majeed W, Ali N. (2016). Interdependence of DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 in apoptosis in human colorectal carcinoma cell lines. *Mol Cell Biochem*, 297–305.
41. Kayashima T, Mori M, Yoshida H, Mizushina Y, Matsubara K. (2009). 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. *Cancer Letters*, 34-40.

# EK 1

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Berna	Soyadı	Somuncu
Doğum Yeri	Üsküdar	Doğum Tarihi	02\03\1993
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	41986274696
E-mail	bernasomuncu@gmail.com	Tel	+905303285128

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	2017
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi	2015
Lise	Kandilli Kız Lisesi	2011

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Araştırma asistanı	Acıbadem Üniversitesi	2015-2017

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

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	65							

# Başarılımış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

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

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	73,19247	73,07790	66,21268
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifika/Ödülleri/Diğer

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

**BERNA SOMUNCU**

**ACIBADEM MEHMET ALI AYDINLAR**

**ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS**

**İSTANBUL-2017**

