

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖZGÜN HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN GLUTATYON
TRANSFERAZ P1-1 İNHİBİTÖRLERİ OLARAK ARAŞTIRILMASI
VE İNSAN MEME KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Yaman MUŞDAL

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yasemin AKSOY

ANKARA
2012

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyokimya

Program: Biyokimya

Tez Başlığı: Özgün Heterosiklik Bileşiklerin Glutatyon Transferaz P1-1
İnhibitörleri Olarak Araştırılması ve İnsan Meme Kanseri
Hücreleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Öğrenci Adı-Soyadı: Yaman Muşdal

Savunma Sınavı Tarihi: 31.10.2012

Bu çalışma jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Ediz Demirpençe

(Hacettepe Üniversitesi)

Tez danışmanı:

Doç. Dr. Yasemin Aksoy

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Nuhan Puralı

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Nuray Uluşu

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Tülin Güray

(O.D.T.Ü.)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm eğitimim süresince göstermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı akademik çalışanları, asistan ve öğrencilerine teşekkür ederim.

Tez danışmanım Doç.Dr. Yasemin Aksoy'a doktora eğitimim süresince gösterdiği destek ve ilgiden dolayı, Prof. Dr. Kamer Kılınç'a doktora başlamamdaki desteğinden dolayı, Doç. Dr. Güneş Esendağlı, Öğretim görevlisi Dr. Hande Canpınar ve Araştırma görevlisi Deniz Ceyhan'a tez çalışmalarımındaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın bir bölümü için gittiğim Uppsala Üniversitesi Biyokimya ve Organik Kimya bölümünde bulunan Prof. Dr. Bengt Mannervik'e hem bilimsel, hem kişisel ilgisi ve Usama Hegazy ve diğer labratuvar çalışanlarına arkadaşlıkları ve güzel bir ortam sağlamaları nedeniyle teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca daima yanımda olan ve beni destekleyen anne ve babama teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (Proje No:109S362) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Muşdal, Y. Özgün heterosiklik bileşiklerin glutatyon transferaz P1-1 inhibitörleri olarak araştırılması ve insan meme kanser hücreleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Doktora Tezi, Ankara, 2012. Bu çalışmanın amacı GST P1-1'e yönelik inhibitör bileşiklerin tasarlanması ve bu moleküllerin meme kanseri hücrelerinde in vitro etkinliğinin incelenmesidir. Bu amaçla lipofilik özellikte benzoksazol, benzimidazol, benzotiyazol türevi bileşikler sentezlendi. İnhibisyon kinetiği çalışmalarında E.coli'de eksprese edilip saflaştırılan rekombinant hGST P1-1 kullanıldı. Bileşikler içerisinde yaklaşık 10 µM IC₅₀ değeri ile en etkili inhibitör olarak bileşik-75 (N-[2-(4-kloro-benzil)-benzooksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamit) seçildi. Kinetik çalışmaları sonucunda bileşik-75'in GSH'a göre karışık ($K_i^{GSH} = 6.05 \mu M$), CDNB'ye göre unkompetitif tip inhibisyon ($K_i^{CDNB} = 11.83 \mu M$) gösterdiği saptandı. Hücre grubu olarak GST P1-1 eksprese eden MCF-12A ve MDA-MB-231 ve etmeyen MCF-7 ve MDA-MB-468 hücre dizileri seçildi. Bu hücrelerde etken bileşiğin ve referans molekül dosetakselin tek ve kombine olarak değişik hücre tiplerindeki subtoksik dozu belirlendikten sonra apoptoz, hücre siklusu, ve proliferasyonu üzerine etkileri incelendi. Bunun yanısıra hücrelerde GST aktivitesi değerlendirildi. Bileşik-75 ve dosetakselin tüm hücrelerde canlılığı azalttığı, bileşik-75'in subtoksik dozlarda dosetaksel ile birlikte uygulamalarında ise yalnızca MCF-12A ve MCF-7'de aditif bir etkisinin olduğu gözlemlendi. Hücre döngüsü deneylerinde ise, yalnız başına dosetaksel ve kombine uygulamalarının MDA-MB-468 hariç tüm hücrelerde, bileşik-75'in ise MCF-12A ve MCF-7'de G1 ve S basamaklarını etkileyerek hücre döngüsünde duraklamaya neden olduğu saptandı. Dosetaksel'in MDA-MB-231 hücrelerinde %19.7, kombine uygulamaların ise MDA-MB-231'de %20 ve MCF-7'de %21 oranında apoptotik etki gösterdiği bulundu. Bu sonuçlar apoptotik etkinin GST P1-1'den bağımsız olarak farklı yollardan meydana geldiğinin göstergesi olarak kabul edildi. Bileşik-75 ile inkübe edilen hücrelerde kontrole göre total protein miktarında % 45'lik, enzim spesifik aktivitesinde ise % 40'lık bir azalma saptandı. Hücre lizati enzim spesifik aktivitesindeki bu değişimin gözlenmesiyle etken bileşiğin hücre içine girerek GST ile etkileşime girdiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Glutatyon transferaz, inhibitör, meme kanseri, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, apoptoz

Destekleyen kurum: TÜBİTAK Proje No: 109S362

ABSTRACT

Muşdal, Y. The investigation of heterocyclic compounds as inhibitors of Glutathione transferase P1-1 and evaluation the effects on human breast cancer cells. Hacettepe University Institute of Health Sciences Biochemistry Program PhD Thesis, Ankara, 2012. The aim of this project is to design inhibitors for GST P1-1 and test their effectiveness on breast cancer cells. For this purpose benzoxazole, benzimidazole, benzothiazole derivative compounds were synthesized. Recombinant hGST P1-1 expressed in E.coli were purified and used in the inhibition kinetics studies. The most effective inhibitor for hGST P1-1 was selected and named as compound-75 (N-[2-(4-Chloro-benzyl)-benzoxazol-5-yl]-4-nitro-benzene-sulfonamide) with an approximately 10 μM IC_{50} value. This compound shows mixed inhibition for GSH and uncompetitive inhibition for CDNB with the K_i 6.05 μM and 11.83 μM respectively. For the cell culture studies, GST P1-1 expressing MCF-12A and MDA-MB-231 and not expressing MCF-7 and MDA-MB-468 cell lines were selected. After determining the subtoxic dose of compound-75 and reference molecule docetaxel for each cell, apoptosis, cell cycle and proliferation effects and GST activities were observed. In all cell lines, compound-75 and docetaxel decreased cell viabilities and in combined use of compound-75 with subtoxic dose of docetaxel there is additive effect on MCF-12A and MCF-7 cells. In cell cycle experiments, cell cycle arrest is detected for docetaxel and combined use of drugs in all cell lines except MDA-MB-468 and for the compound-75 in MCF-12A and MCF-7. According to apoptosis results, single use of docetaxel in MDA-MB-231 and combined use of docetaxel-effective compound in MCF-7 showed %19.7 and %21.35 apoptosis in sub G1 peaks, respectively. These results suggest that apoptosis is occurred in different ways independently from the GST P1-1. The total protein content of cells incubated with the active compound was decreased %45 and the enzyme specific activities were also decreased %40 compared to controls. To observe this change in specific activity of enzyme cell lysate, the effective-compound should enter the cell, accumulate and effect GST P1-1 level.

Keywords: Glutathione transferases, inhibitor, cancer, cell proliferation, cell cycle, apoptosis

Supported by TÜBİTAK Project No: 109S362

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Enzimler	2
2.2. Biyolojik Detoksifikasyon	3
2.2.1. Glutasyon	3
2.3. Glutasyon Transferazlar	4
2.3.1. Genel Bilgi	4
2.3.2. Sitozolik Glutasyon Transferazlar	6
2.3.2.1. Sınıflandırılmaları	6
2.3.2.2. Yapıları	6
2.3.2.3. Katalitik Mekanizma ve Diğer Fonksiyonları	8
2.4. Kanser	9
2.4.1. Kanser Hücrelerinde İlaç Direnci	11
2.4.2. GST'nin Sinyal İletimindeki Rolü	12
2.4.3. GST İnhibitörleri	13
3. YÖNTEMLER	17
3.1. Benzoksazol ve Benzotiyazol Türevi Bileşiklerin Sentezi	17
3.1.1. Benzotiyazol Türevi Bileşiklerin Sentezleri	17
3.1.2. Nitrobenzoksazol Türevi Bileşiklerin Sentezleri	17
3.1.3. Nitrobenzensulfonamido benzoksazol Türevi Bileşiklerin Sentezi	19
3.1.4. Benzilidenamino benzoksazol Bileşiğinin Sentezi	19

3.1.5. Benzoksazol- asetamid/benzamid Türevlerinin Sentezi	20
3.2. İn vitro GST P1-1 Analizi	22
3.2.1. GST P1-1'in Ekspresyonu ve Saflaştırılması	22
3.2.2. Bileşiklerin GST P 1-1 Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi	23
3.3. Hücre Lizatlarının Hazırlanması	24
3.3.1. Hücre Kültürü	24
3.3.2. Hücre Lizatı	24
3.4. Western Blot Analizi	24
3.5. MTT Yöntemi	25
3.6. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	26
3.7. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Saptanması	27
3.8. Etken Bileşik (Bileşik-75)'in hücre(ler)deki İnhibisyon Analizi	28
3.9. Veri Analizi	29
4. BULGULAR	29
4.1. Bileşiklerin İn vitro İnhibisyon Analizi	29
4.2. GSTP1-1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	33
4.3. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi	34
4.4. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi	43
4.5. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Değerlendirilmesi	46
4.5.1.Hücre Döngüsü Analizi	46
4.5.2. Apoptoz Analizi	52
4.6. Hücrelerde GST Aktivitesinin Değerlendirilmesi	53
5. TARTIŞMA	57
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	67
EKLER	69
KAYNAKLAR	83

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA:	Bovine serum albumin (sığır serum albümini)
CDNB:	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CFSE:	Karboksifloresan süksinimidil ester
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF:	Dimetil formamid
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DTT:	Ditiyotreitol
EA:	Etakrinik asit
ECL:	Yükseltilmiş Kemillüminesans
E.coli:	Escherichia coli
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
GSH:	Glutasyon
GST:	Glutasyon transferaz
IPTG:	İzopropil-beta-D-tiyogalaktopiranozit
JNK:	c-Jun-N-terminal-kinaz
MAPK:	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MTT:	Metil-tiyazol-tetrazolyum
NMR:	Nükleer manyetik rezonans
PBS:	Phosphate buffered saline (fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi)
PMSF:	Fenilmetansülfonilflorit
PPA:	Polifosforik asit
PVDF:	Poliviniliden florür
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SDS:	Sodyum dodesil sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Glutasyonun kimyasal yapısı.	4
Şekil 2.2. Dimerik GST P1-1'in etakrinik asit ile beraber kristal yapısı.	6
Şekil 2.3. Alfa, Mu, Pi ve Teta GST sınıflarında GSH bağlanma bölgeleri.	8
Şekil 2.4. İndirgenmiş glutasyonun elektrofilik CDNB'ye konjugasyonu.	8
Şekil 2.5. GST P1-1'in sinyal yollarında etkileşimi.	13
Şekil 2.6. Glutasyon transferaz P1-1 üzerinde inhisyon gösteren bileşikler.	16
Şekil 3.1. 2-(4-Aminofenil) benzotiyazol bileşiğinin elde edilmiş denklemi.	17
Şekil 3.2. 2-[4-(4-Süstitüefenilasetamido) fenil]-benzotiyazol türevi bileşiklerin elde edilmiş denklemi.	18
Şekil 3.3. 2-(4-süstitüefenil)-5(veya 6)-nitrobenzoksazol türevi bileşiklerin elde edilmiş denklemi.	18
Şekil 3.4. 2-(p-Süstitüefenil/benzil)-5-(p-nitrobenzensulfonamido) benzoksazol türevi bileşiklerin elde edilmiş denklemi.	19
Şekil 3.5. 2-(p-Etilfenil)-5-aminobenzoksazol bileşiklerinin elde edilmiş reaksiyonu.	20
Şekil 3.6. 2-(4'-Etilfenil)-5-(2''-hidroksibenzilidenamino) benzoksazol bileşiğinin elde edilmiş reaksiyonu.	20
Şekil 3.7. N-[2-(2-Bromo/metilfenil)-benzoksazol-5-il]-2-(p-süstitüefenil) asetamid/ benzamid türevlerinin elde edilmiş reaksiyonu.	22
Şekil 4.1. Bileşik-75'in (N-[2-(4-kloro-benzil)-benzooksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamid) kimyasal yapısı.	29
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda bileşik-75 ile hGST P1-1'in inhibisyon profili.	30
Şekil 4.3. Bileşik-75 ile hGST P1-1'nin glutatyona bağlı inhibisyon grafiği.	31
Şekil 4.4. Bileşik-75 ile hGST P1-1'nin CDNB'ye bağlı inhibisyon grafiği.	31
Şekil 4.5. Etakrinik asit ile hGST P1-1'in inhibisyon profili.	32
Şekil 4.6. Etakrinik asit ile hGST P1-1'nin glutatyona bağlı inhibisyon grafiği.	32
Şekil 4.7. Çeşitli meme kanser hücre lizatlarında GST P1-1'in western blot analizi.	33

Şekil 4.8. Dosetakselin MCF-12A hücrelerinde sitotoksik etkisi.	35
Şekil 4.9. Bileşik-75'in MCF-12A hücrelerinde sitotoksik etkisi.	35
Şekil 4.10. Dosetaksel ve kombine bileşiklerin MCF-12A hücrelerinde sitotoksik etkisi.	36
Şekil 4.11. Sabit konsantrasyonlarda bileşiklerin MCF-12A hücrelerinde sitotoksik etkileri.	36
Şekil 4.12. Dosetakselin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi.	37
Şekil 4.13. Bileşik-75'in MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi.	37
Şekil 4.14. Dosetaksel ve kombine bileşiklerin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi.	38
Şekil 4.15. Sabit konsantrasyonlarda bileşiklerin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkileri.	38
Şekil 4.16. Dosetakselin MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkisi.	39
Şekil 4.17. Bileşik-75'in MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkisi	39
Şekil 4.18. Dosetaksel ve kombine bileşiklerin MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkisi.	40
Şekil 4.19. Sabit konsantrasyonlarda bileşiklerin MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkileri.	40
Şekil 4.20. Dosetakselin MDA-MB-468 hücrelerinde sitotoksik etkisi.	41
Şekil 4.21. Bileşik-75'in MDA-MB-468 hücrelerinde sitotoksik etkisi.	41
Şekil 4.22. Dosetaksel ve kombine bileşiklerin MDA-MB-468 hücrelerinde sitotoksik etkisi.	42
Şekil 4.23. Sabit konsantrasyonlarda bileşiklerin MDA-MB-468 hücrelerinde sitotoksik etkileri.	42
Şekil 4.24. Hücre çoğalması analizlerinin değerlendirilmesi.	43
Şekil 4.25. MCF-12A hücrelerinde proliferasyonun değerlendirilmesi.	44
Şekil 4.26. MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyonun değerlendirilmesi.	44
Şekil 4.27. MCF-7 hücrelerinde proliferasyonun değerlendirilmesi.	45
Şekil 4.28. MDA-MB-468 hücrelerinde proliferasyonun değerlendirilmesi.	45
Şekil 4.29. MCF-12A'da hücre döngüsünün değerlendirilmesi.	46
Şekil 4.30. MCF-12A'da hücre döngüsü analizinin akım sitometri çıktısı.	47
Şekil 4.31. MDA-MB-231'de hücre döngüsünün değerlendirilmesi.	48

Şekil 4.32. MDA-MB-231’de hücre döngüsü analizinin akım sitometri çıktısı.	48
Şekil 4.33. MCF-7’de hücre döngüsünün değerlendirilmesi.	49
Şekil 4.34. MCF-7’de hücre döngüsü analizinin akım sitometri çıktısı.	50
Şekil 4.35. MDA-MB-468’de hücre döngüsünün değerlendirilmesi.	51
Şekil 4.36. MDA-MB-468’de hücre döngüsü analizinin akım sitometri çıktısı.	51
Şekil 4.37. Meme kanser hücrelerinde apoptoz analizi.	53
Şekil 4.38. Hücre lizatlarında GST aktivitesinin değerlendirilmesi.	54
Şekil 4.39. Hücre sayına bağlı GST aktivitesinin doğrusal korelasyonları	55
Şekil.4.40. Hücre lizatlarında total protein ve GST spesifik aktivite değişimleri.	56

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. İnsan sitoplazmik glutatyon transferazların sınıflandırılması.	5
Tablo 4.1. GST P1-1 üzerindeki inhibisyon etkileri bakılmış bileşikler.	69
Tablo 4.2. Bileşiklerin IC ₅₀ , Ki ve inhibisyon türü sonuçları.	33

1. GİRİŞ

Dünya geneline bakıldığında kadınlarda görülen kanser tipleri içerisinde önemli bir yüzdeyi oluşturan meme kanserinin ülkemizde de görülme sıklığı oldukça yüksektir. Pek çok kanser türünde olduğu gibi meme kanseri tedavisinde de karşılaşılan önemli sorunlardan biri hücrenin davranış değişikliğidir. Bunların en başında hücre döngüsü ve proliferasyonunu etkileyen proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler yer almakta ve bu durum tedavinin seyrini etkilemektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar, kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen ilaç direnci ile birlikte glutatyon ve glutatyona bağlı enzim düzeylerinin de değiştiğini göstermektedir. Bu grup içerisinde yer alan glutatyon transferaz (GST) enzim ailesinden GST P1-1 izoziminin kanser hücrelerinde ekspresyon düzeyinin oldukça yüksek olduğu gözlenmektedir. Enzimin aşırı üretiminin kemoterapötik ajanları inaktive ederek ilaç direncini indüklediği, diğer yandan hücrenin apoptotik yola girmesini de engellendiği bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda GST P1-1 inhibitörlerinin geliştirilmesi ve bununla beraber alkilleyici ajanlar gibi çeşitli kanser ilaçlarının hücre içindeki etkinliklerinin araştırılması önem kazanmıştır.

Literatürde kuvvetli GST P1-1 inhibisyonu gösteren sayılı inhibitör bulunmaktadır. Bunların birçoğu toksik etkilerinden dolayı kanser hücrelerinde kullanımları kısıtlıdır. Bu amaçla çalışmamız kapsamında GST P1-1 için olası inhibitör bileşikler tasarlanmış ve bu moleküllerin enzim üzerindeki etkinlikleri in vitro olarak incelenmiştir. Ardından efektif inhibitör bileşiğin farklı tipte meme kanseri hücre hatlarında ve tümörjenik olmayan transforme meme epiteli hücre dizisinde enzim aktivitesi, hücre döngüsü, proliferasyonu ve apoptoz üzerindeki etkinlikleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Metabolik tepkimeler canlılarda hayatın sürdürülebilmesi için gerekli kimyasal tepkimelerin seri bir şekilde birbirleri ile etkileşimlerine bağlıdır. Bu süreçte tüm canlıların gereksinimi olan biyolojik moleküllerin evrimsel süreç içinde sürekli değişime uğradığı bilinmektedir. Enzim, kelime olarak ortaçağ Yunancada *enzymes* kelimesinden türetilmiştir. 19. yüzyılın ikinci yarısında Kühne adlı bir bilim adamı tarafından maya ekstrelerinde keşfedilmiş, o zamanlar *enzymos* denilip, ekmeğin mayalanması işlevi olarak adlandırılmıştır (1).

Enzimler proteinlerin oldukça özelleşmiş formları olup, canlı sistemlerde olağanüstü katalitik güce sahiptirler. Bilinen tüm yaşam formlarında bulunan bu moleküllerin ağırlıkları 12.000 ila yaklaşık 1 milyon dalton arasında değişmekte, büyüklükleri ise onlarca olabildiği gibi birkaç bin dizi amino asit uzunluğunda da olabilmektedir (2).

Bugün X-ışını difraksiyon analizi, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve diğer tekniklerin gelişimi proteinlerin 3 boyutlu yapılarının belirlenmesini olası kılmaktadır. Bu yöntemler ile enzim katalizinde yer alan önemli amino asit dizileri saptanabilmekte, diğer proteinlerle yapısal olarak karşılaştırılarak olası farklı fonksiyonları belirlenebilmekte ve ayrıca aktif bölgelere uygun yeni moleküller sentezlenerek metabolik fonksiyonlarında değişiklikler veya inhibisyon sağlanabilmektedir.

Biyolojik tepkimeleri büyük etkinlik ile katalizleyen enzimler, substrat olarak adlandırılan enzimin aktif bölgelerine bağlanabilen moleküllerle tepkimeye girerek fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Aktif bölgeyi bloke eden veya şeklini değiştirebilen herhangi bir substrat enzim aktivitesini de etkilemektedir. Bazı enzimler yalnızca bir, bazıları da birden fazla substrata özgüllük (spesifite) göstermektedirler. Örneğin glutatyon transferazlar (GST) çok geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olan ve organizmalardan zararlı bileşikleri detoksifiye eden bir enzim ailesidir (3).

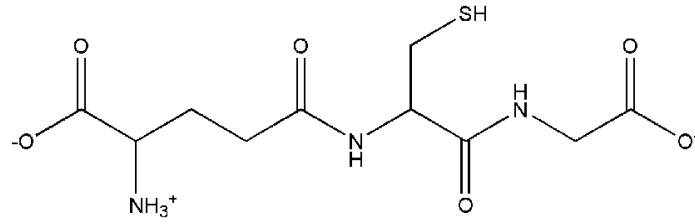
2.2. Biyolojik Detoksifikasyon

Tüm canlılar günlük yaşamlarında zararlı kimyasal maddelere maruz kalmaktadırlar. Bu maddeler organizmada metabolik tepkimeler sonucu üretilen endojen kaynaklı bileşikler olabileceği gibi, kirli hava, ilaç, herbisit, pestisit gibi eksojen kaynaklı kimyasallar da olabilir. Büyük bir kısmı lipofilik olan bu kimyasalları ortadan uzaklaştırmak için canlılar detoksifikasyon sistemine sahiptirler.

Roger Williams tarafından 1947 yılında detoksifikasyon için iki mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan Faz I mekanizması, işlevsel bir tepkime olup oksijen atomu kullanılarak detoksifiye edilecek molekülde reaktif bir grubun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Karaciğerde yüksek derişimlerde bulunan sitokrom P450 sistemi başlıca Faz I tepkimeleri arasında yer almaktadır. Faz II tepkimeleri ise konjugasyon tepkimeleri olarak adlandırılmakta ve genelde Faz I tepkimelerini takiben oluşmaktadır. Bu fazda glukuronidasyon, hidroksilasyon, sülfasyon ve glutatyonilasyon işlevleri ile suda çözünebilir bir grup reaktif gruba eklenmekte ve bu yolla toksik madde çözünebilir hale gelmekte ve böylece vücuttan atılmaktadır. Glutatyon transferazlar faz II tepkimelerinde görev alan önemli bir enzim ailesidir ve bileşiklere konjugasyon için glutatyonu kullanmaktadırlar (3,4).

2.2.1. Glutatyon

Glutatyon (GSH) ilk defa 1921 yılında Sir Frederick Hopkins tarafından kas kasılması çalışmaları sırasında keşfedilmiştir. Bileşiğın kimyasal yapısı keşfinden ancak 15 yıl sonra belirlenebilmiştir. GSH tripeptit yapısında bir molekül olup glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşmaktadır. Molekülün ortasında bulunan sistein amino grubu ile glutamatın yan zincirinde bulunan karboksile, karboksil grubu ile de glisine bağlıdır. Glutamat ve sistein arasındaki olağandışı bu bağ, molekülü hücre içerisinde peptidazlara karşı korumaktadır (şekil 2.1) (3).



Şekil 2.1. Glutatyonun (γ-L-glutamyl-L-sisteinil-glisin) kimyasal yapısı.

Tüm aerobik canlılarda bulunan GSH değişik canlılarda (bitkilerde homoglutatyon, mikobakterilerde ve streptomiseste mikotiyol gibi) farklı formlarda bulunabilmektedir. Memeli hücrelerinde milimolar (mM) derişimlerde bulunan, tiyol grubu içeren, protein yapısında olmayan bir bileşiktir. Vücudumuzda normalde günde 10 g kadar üretilmekte olup vücudun farklı bölgelerinde değişik oranlarda (hepatositlerde 10 mM, eritrositlerde 2 mM ve bağırsak lüminal mukusunda 0.3 mM kadar) GSH bulunmaktadır (3,5).

GSH karboksil grubundan gelen iki negatif, amino grubundan gelen bir pozitif yük sayesinde suda çözünebilir. Molekülün en önde gelen özelliği sisteine bağlı tiyol (-SH) grubudur. Bu grup molekülü elektrofilik bileşiklerle etkileşebilecek iyi bir nükleofil haline getirmektedir. Deneysel koşullarda tiyol grubunun pKa'sı 9.2 civarındadır.

Hücre içerisinde GSH, başta savunma ve metabolizma olmak üzere pek çok role sahiptir. Glutatyon peroksidazlar ve bazı peroksiredoksinler aracılığı ile peroksidazların indirgenmesindeki ana rollerinin yanında, glutatyon transferazlar aracılığı ile ksenobiyotiklerin konjugasyon tepkimelerini sağlamaktadır. Bunların dışında kalsiyum homeostazının düzenlemesi, amino asitlerin taşınımı ve sinyal yollarında da görevlidir (6,7).

2.3. Glutatyon Transferazlar

2.3.1. Genel Bilgi

Glutatyon transferazlar (GST) 1960'ların başlarında iki farklı grup tarafından sıçan karaciğer hücre lizatlarında GSH'ın bazı ksenobiyotikleri konjuge edici aktivitesi çalışmaları sırasında tanımlanmıştır (8,9). İlerleyen

zamanlarda bu enzim için birden fazla elektrofilik bileşiğin substrat olarak tanımlanması ile GST'lerin birden fazla formunun bulunduğu dair ilk ipuçları elde edilmiştir. Bu enzimler, canlılarda toksik bileşikleri elimine etmek için GSH'ı elektrofilik bileşiklere konjuge ederek evrimleşmişlerdir. Başlangıçta GSH S-transferaz; GSH S-alkiltransferaz; GSH S-ariltransferaz vs gibi farklı isimler kullanılmış fakat en sonunda Enzim Komisyonu bu enzimi glutatyon transferaz (GST; EC 2.5.1.18) olarak adlandırmıştır.

GST'lerin adlandırılması Mannervik ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Sınıflar Alfa, Mu, Pi vs gibi Yunan harfleri ile belirlenmiş, A, M, P vs gibi Roman baş harfleri ile kısaltılmıştır. GST'den önce yazılan küçük harf orijini ve sonra yazılan arap numaralandırma ise protein altbirimini göstermektedir. Örneğin hGST P1-1 homodimerik protein olup iki tane insan GSTP1 altünitesi içermektedir (10,11).

Memelilerden, bitkilere ve hatta bazı prokaryotlara kadar tüm canlılarda bulunan GST'lerin sitozolik, membran bağlı mikrozomal ve bakteriyel formları mevcuttur. Bu tez kapsamında sitozolik (çözünür) formlarından bahsedilecektir.

Tablo 2.1. İnsan sitoplazmik glutatyon transferazların sınıflandırılması (12).

Enzim	Sınıf	Gen	Kromozom bandı
GST A1-1	Alfa	GSTA1	6p12
GST A2-2	Alfa	GSTA2	6p12
GST A3-3	Alfa	GSTA3	6p12
GST A4-4	Alfa	GSTA4	6p12
GST A5-5	Alfa	GSTA5	6p12
GST M1-1	Mu	GSTM1	1p13
GST M2-2	Mu	GSTM2	1p13
GST M3-3	Mu	GSTM3	1p13
GST M4-4	Mu	GSTM4	1p13
GST M5-5	Mu	GS M5	1p13
GST P1-1	Pi	GSTP1	11q13
GST T1-1	Teta	GSTT1	22q11.2
GST T2-2	Teta	GSTT2	22q11.2
GST Z1-1	Zeta	GSTZ1	14q24.3
GST O1-1	Omega	GSTO1	10q24.3
GST O2-2	Omega	GSTO2	10q24.3
PGD2/GST S1-1	Sigma	PGD2	4q22.3

2.3.2. Sitozolik Glutasyon Transferazlar

2.3.2.1. Sınıflandırılmaları

Sitozolik GST'ler bu enzim ailesinin çözümlü formları olup dizi tanımlamalarına göre izomerik formlara ayrılmaktadır. Memelilerde yedi tane (alfa, mu, pi, sigma, zeta, omega ve teta) dimerik yapıda sitozolik GST tanımlanmıştır (11). Herbir formun da kendi aralarında altbirimleri bulunmaktadır (Tablo 2.1). Amino asit dizileri sınıflar içerisinde en az % 50, sınıflar arasında ise % 30'dan daha az benzerlik göstermektedir. Kappa GST, sitozolik GST'lerin bir başka formu olup, mitokondri sitoplazmasında bulunmaktadır. Yapısal olarak sitozolik formlara benzerlik göstermese de katalitik aktiviteleri bakımından benzer özellikler göstermektedir (13).



Şekil 2.2. Dimerik GST P1-1'in etakrinik asit (EA) ile beraber kristal yapısı. Mavi renkli bölgeler EA'nın her iki altbirimde aktif bölgeye bağlandığını göstermektedir (PDB kodu: 2GSS).

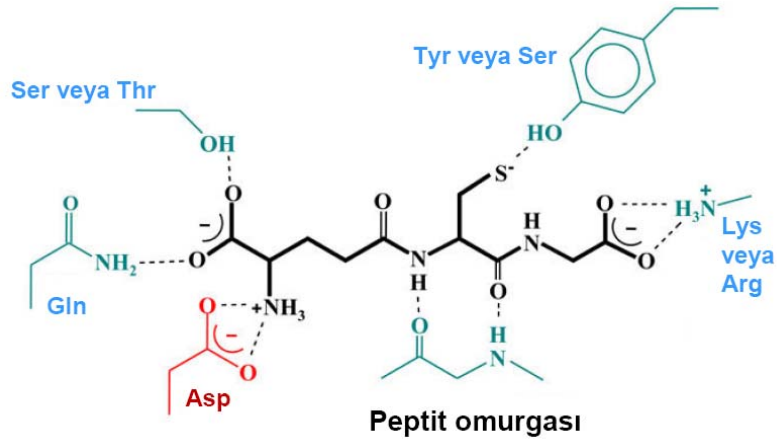
2.3.2.2. Yapıları

GST'nin birçok formunun üç boyutlu yapısı X-ışını kristalografisi ile açığa çıkartılmıştır (şekil 2.2). Bu verilere protein veri bankasından kolayca ulaşılabilmektedir (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). GST'ler homodimerik proteinler olup, herbir altbirimi yaklaşık olarak 24 ila 29 kDa moleküler ağırlığında ve yaklaşık olarak da 210 amino asit uzunluğundadır.

Sınıflar arası dizi benzerliği % 30'un altında bile olsa, hepsi yapıca benzerdir ve benzer protein katlanmalarına sahiptirler. Enzim, korunumlu dizileri içeren GSH bağlama bölgesi (G-bölgesi) ve farklı substratları bağlayabilen hidrofobik bölge (H bölgesi) olmak üzere iki bölge içermektedir (14-16). Herbir altbirimde de iki domain bulunmaktadır. Yaklaşık 80 rezidü uzunluktaki N-terminal domaininde α/β yapısal birimleri hakimdir. Bu domain tiyoredoksin bağlama bölgesi olarak ta bilinen ve sistein amino asidini bağlama özelliği olan $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ yapısal motifini içermektedir. Tüm GST sınıflarında bu domain dizileri GSH'ı spesifik olarak bağlamak için korunmuşlardır (şekil 2.3). C-terminal domain ise tamamen α -helikal yapılardan oluşmaktadır. Hidrofobik bağlanma bölgesi (H-bölgesi) iki domain arasında olup çoğu hidrofobik bileşik bu bölge ile etkileşmektedir (17,18).

GST'lerin hidrofobik aktif bölgelerinde bulunan bazı yapısal farklılıklar substratlara bağlanmalarında farklılıklar yaratmaktadır. Örneğin GST alfa sınıfı aktif bölgesinde bulunan ekstra bir α -heliks (α_9) yapısı, aktif bölgeyi çevreleyen solventten korumaktadır. Mu sınıfı β_2 ve α_2 arasında esnek uzun bir döngüye sahipken, Pi sınıfı aktif bölgesinde kısa bir heliks yapısı olup substratların bağlanmasına daha açık bir bölge oluşturmaktadır (15,16).

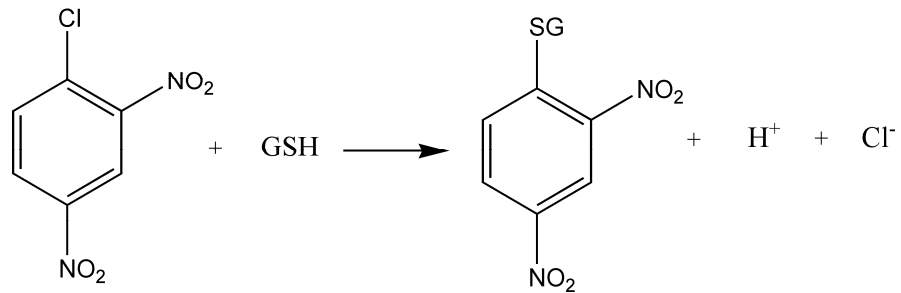
Günümüzde GST'lerin kristal yapıları sayesinde korunumlu amino asit dizileri açığa çıkartılmıştır. Tyr-7, Pro53, Asp57, Ile68, Gly145 ve Asp152 tüm GST'lerde bulunan evrim süresince değişikliğe uğramamış dizilerdir. Bunların ilk ikisi GSH bağlamada anahtar bir rol oynarken, son üçünün proteinin iç kısmına gömülü ve protein katlanmasında rol alabileceği ileri sürülmektedir. Asp57'nin fonksiyonu ise hala belirsizdir (19).



Şekil 2.3. Alfa, Mu, Pi ve Teta GST sınıflarında GSH bağlanma bölgeleri (3).

2.3.2.3. Katalitik mekanizma ve diğer fonksiyonları

Faz II enzim ailesinin bir üyesi olan GST'lerin bilinen ana fonksiyonu ksenobiyotik veya endojen olarak üretilen zararlı bileşiklerin vücuttan detoksifiye edilmesidir. Biyokimyasal olarak ifade edilecek olursa GST'ler indirgenmiş GSH'nin (tiolat formunda) elektrofilik merkezli bileşiklere nükleofilik atağını kataliz ederler. Katalizde, GSH'nin tiyol grubunun pKa'sı sulu ortamda 9 iken proteine bağladığı zaman 7'nin altına inmektedir (20). Elektrofilik merkez, karbon atomu dışında, nitrat esterlerde olduğu gibi nitrat, tiyosiyanatlarda kükürt ve organik hidropersitlerde oksijen atomu da olabilir (19,21). GST'nin en yaygın kullanılan substratlarından biri olan elektrofilik merkeze sahip olan CDNB etkisini GSH'a konjuge olarak göstermektedir (şekil 2.4).



Şekil 2.4. İndirgenmiş glutatyonun elektrofilik CDNB'ye konjugasyonu.

GST'lerin üç boyutlu yapıları ile elde edinilen bilgiler GST'lerin evrimsel gelişimleri ve fonksiyonları hakkında bilgiler sunmaktadır. Aktif bölgelerin esnek yapıda olduğunun ortaya çıkartılması ve farklı sınıflarda farklı substratlarla etkileşimlerinin olması, GST'lerin fonksiyonlarında yeni ufuklar açmıştır. Detoksifikasyon dışında çift bağ izomerizasyon tepkimelerini de katalizlediği bilinmektedir. Örneğin, GST A3-3 steroid seks hormonlarının sentezinde bir basamak olan Δ^5 -androst-3,17-dion'un Δ^4 -androst-3,17-dion'a izomerizasyonunu (22), GST P1-1, 13-sis retinoik asitin all-trans retinoik asite dönüşümünü (23), GST Z1-1'de tirozin ve fenilalanin amino asitlerinin katabolizmasındaki son basamağı katalizlemektedirler (24).

GST'lerin katalitik aktivitelerinin dışında non-katalitik aktiviteleri de vardır. Ligandin olarak fonksiyon gösterebilirler. Hem, bilirubin, steroid ve safra tuzları gibi non-substrat bileşiklerin hücrelerarası taşınımı GST'ler aracılığı ile gerçekleştirilmektedir (18,25,26).

2.4. Kanser

Normal hücreler kontrollü bir şekilde doğarlar, büyürler, çoğalırlar ve ölürlür. Buna karşılık, kanserli hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalma, apoptozdan kaçma ve diğer dokulara metastaz yaparak onları işgal edebilme eğilimindedirler. Kanser gelişiminde hücrelerde meydana gelen bu değişiklikler DNA'nın hasarı sonucu metabolik süreçler ve sinyal letim yollarında yer alan bir takım proteinlerin değişikliklerine bağlı olarak meydana gelmektedir.

Kanser oluşumu süresince değişikliğe uğrayan proteinlerin uyarıcı ve baskılayıcı etkileri bulunmaktadır. Uyarıcı etkiler onkogenler ve baskılayıcı etkiler tümör baskılayıcı genlerdeki değişimler sonucu meydana gelmektedir. Onkogenler; büyüme faktörleri ve reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü kontrolünde görevli siklin ve siklin bağımlı kinazları ve bazı antiapoptotik proteinleri kodlar. Bu genlerde bozukluk olduğunda proteinlerin ekspresyonlarında artışa ve kontrolsüz bir şekilde aktif olmasına neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise hücre büyümesi ve çoğalması yollarını

baskılayan proteinleri kodlayarak etkisini göstermektedir. Bu genlerde bozukluk olduğunda ise tümör baskılayıcı proteinin sentezlenemez ya da fonksiyonel olarak bozukluğuna sebep olur (27,28).

Kanserin başlaması ve ilerlemesinde epigenetik değişimlerin de işlev gördüğü gösterilmiştir. Epigenetik değişiklikler, bir genin işlevini o geni kodlayan nükleotit dizisinde değişiklik olmaksızın etkiler. Bu da kromatin yapısının değişmesiyle olur. Bu mekanizmada DNA metilasyonu ve histonların kovalent modifikasyonları rol alır. Kanser hücrelerinin DNA'sında global bir hipometilasyon ve gen ya da promotora özgü hipermetilasyonlar olur (29).

Hücre çoğalmasını düzenleyen mekanizmalardaki değişiklikler çoğunlukla büyüme faktörlerinin sinyal iletim yollarında oluşmaktadır. Hücre dışından gelen büyüme uyarısı büyüme faktörleri aracılığıyla reseptör tirozin kinazları uyararak fosforilasyon reaksiyonları ile mitojenlerle aktifleşen protein kinaz (MAP kinaz) veya fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI-3 kinaz) yollarını aktive eder. MAP kinazların hedefi olan proteinler ise DNA'ya bağlanabilen transkripsiyon faktörleridir. Bu proteinlerin aktifleşmesi sonucu transkripsiyon hızlanır ve hücrede bol miktarda protein sentezlenir. Protein miktarının artması ile hücre büyür ve hücre döngüsünün başlaması uyarılır. PI-3 kinaz enzim yolunun başlıca hedef proteini ise protein kinaz B (PKB) olarak adlandırılan bir serin-treonin kinazdır. PKB'nin aktifleşmesi ile hücrede apoptoz baskılanarak hücrenin sağkalımı sağlanır. Bu sinyal yollarındaki proteinlerin aşırı yapımı ya da yapısal değişiklik sonucu aşırı aktif olmaları kanserleşmeye sebep olur (30).

Apoptozda yer alan proapoptotik ve antiapoptotik mekanizmalarda görevli proteinler hedeflenerek yapılan çalışmalar kanser tedavisinde umut verici gelişmeler olarak görülmektedir. Örneğin ölüm reseptörleri tarafından algılanan sinyaller, rekombinant olarak oluşturulmuş bazı ligandlar veya agonistik antikolar tarafından taklit edilebilmektedir. Kaspazlar küçük molekül ağırlıktaki ilaçlar kullanılarak aktive veya inhibe edilirken, kanser hücrelerinin sağkalımı ise antisens oligonükleotitler veya diğer stratejiler

kullanılarak azaltılabilmektedir. Kaspaz aktivitesini ve Ras sinyal yolunu hedefleyen bileşikler, Bcl-2 kontrol noktası ve TRAIL ligandına müdahale eden moleküller, p53/Mdm-2 agonistleri gibi bazı potansiyel ilaçlar geliştirme aşamasındadır. Bu moleküllerin tek başına ya da kombine olarak terapötik ajanlarla birlikte kullanımı kanser tedavisi için önerilmektedir (31,32).

2.4.1. Kanser hücrelerinde ilaç direnci

Sitotoksik ajanlara karşı kanser hücrelerinin direnç geliştirmesinde çeşitli mekanizmalar söz konusudur. Bu mekanizmaları şu şekilde sıralamak mümkündür (33):

1. Hücre yüzeyinde reseptör kaybı veya ilaçları hücre dışına pompalayan taşıyıcıların aşırı ekspresyonu sonucu hücre içi ilaç düzeyinin azalması,
2. Apoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişim,
3. Hücresel hedeflerdeki değişiklikler,
4. İlacın biyoaktivasyonunda azalma,
5. İlaçla oluşan hasarın iyileşmesinde toleransın gelişmesi,
6. Hücresel ilaç detoksifikasyonundaki artış, örneğin; hücre içi GSH ve GST düzeylerinde artış.

GST'nin ilaç direnci üzerindeki rolünü ise iki şekilde açıklamak mümkündür:

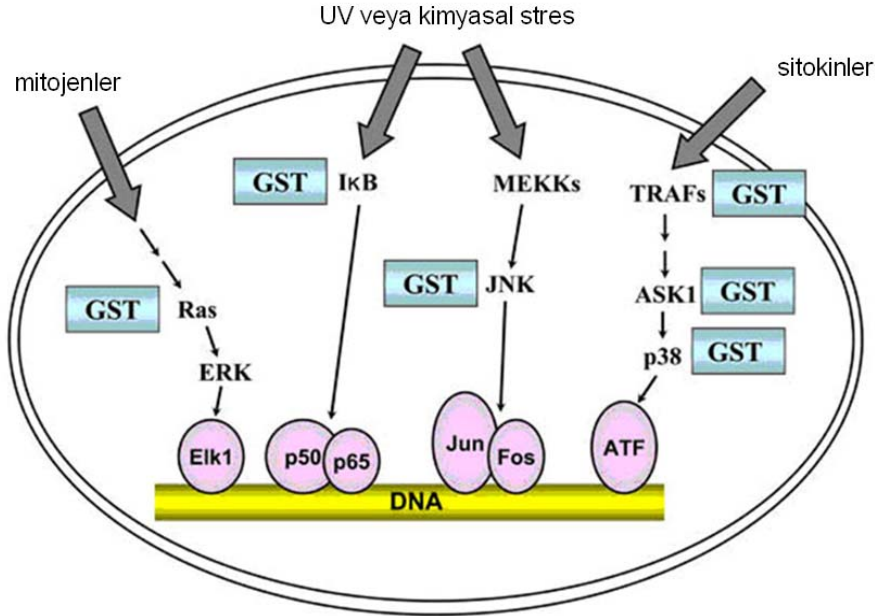
1. Enzimin ve ilaç direnci proteinlerinin ekspresyonlarındaki ortak artış,
2. Enzimin sinyal iletimindeki rolü.

Tümör hücrelerine antikanser ajanın girmesiyle birlikte hücre içinde GSH düzeyinde ve GST enziminin ifadesinde artış olmaktadır (34). Enzim, GSH'ın ksenobiyotikler (örneğin; anti-kanser ilaçlar) ile konjugasyonunu kataliz ederek çeşitli pompalar aracılığı ile dışarı atılmasına neden olmaktadır. Artan GST aktivitesi ile birlikte ilacın hücre içinde uzun süre kalması bu nedenle zorlaşmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinde GSH'ın yüksek düzeylere ulaşmasının ve GST'nin aşırı ekspresyonunun çoklu ilaç direnci (MDR) gelişimiyle paralel gittiği yönündedir. Meme, akciğer, kolon, pankreas kanserlerinde gelişen ilaç direncinin, GST P1-1 ekspresyonu ile doğrudan ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (35-37).

2.4.2. GST'nin Sinyal İletimindeki Rolü

Normal şartlar altında hücreler zamanı geldiğinde ölmelidirler. Bunu sağlayan fizyolojik işlem programlı hücre ölümü, yani apoptozdur. Kanserli hücrelerde bu işlev bozulmaktadır (38). Bu duruma neden olan faktörlerden biri de GST'nin apoptotik yolda üstlendiği roldür. Apoptotik yolların işleminde, yani sinyal iletiminde programlı hücre ölümünü düzenleyen proteinler görev almaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimlerle hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevleri kontrol altında tutulmaktadır. Bunlar içerisinde yer alan mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK)'lar hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarımında rol oynamaktadır (39). Bir çok antikanser ilacın GSH konjugatlarının oksidatif stres ve ksenobiyotik varlığında oluşması, bunların hücresel stresin indikatörleri olarak kullanılmasını akla getirmektedir. Gerçekten de GSH-konjugatlarının GST izoenzimleri aracılığıyla stresle aktive olmuş sinyal yolağını düzenledikleri bulunmuştur. Son çalışmalar alfa, mü ve pi izoenzimlerinin hücre canlılığında ve ölüm sinyalinde rol oynayan MAPK yolunda düzenleyici rol oynadığını göstermektedir (40). Bu kinaz ailesinin bir üyesi olan c-jun N-terminal kinaz (JNK) kemoterapötiklerin hücreyi uyarmasıyla birlikte aktive olmaktadır. JNK aktivasyonunu takiben bir transkripsiyon faktörü olan aktivatör protein-1 (AP-1)'in komponenti olan c-Jun fosforile olmakta, bu sayede AP-1 indüklenmekte ve apoptotik genleri hedef almaktadır (41). MAP kinaz yolağını protein-protein ilişkisi yoluyla düzenleyen GST P1-1, apoptoz ve proliferasyonda rol alan JNK1'in endojen inhibitörü olarak davranmaktadır (şekil 2.5) (42,43). Stres altında olmayan hücrelerde oluşan GST P1-1 - JNK heterokompleksi sayesinde apoptotik sinyal baskı altında tutulmaktadır. Bununla birlikte oksidatif stres altında bu kompleksin birbirinden ayrılması ve GST P1-1 oligomerizasyonu apoptoz indüklenmektedir. Söz konusu olan iki proteinin birbirinden ayrılması farklı mekanizmaları da beraberinde getirmekte ve hücrenin akibetini değiştirmektedir (44). İlaç tedavisi sırasında artan GST ile birlikte JNK üzerindeki baskının kalkması zorlaşmaktadır. Bu nedenle antineoplastik ajanların sitotoksik etkilerini artırmak ve anti kanser ilaçlara hücresel direnci düzenlemek için spesifik GST inhibitörleri geliştirilmektedir.

Bu ilaç adaylarını iki grupta toplamak mümkündür: 1. Glutatyona yapıca benzer bileşikler (peptido mimetikler); (45,46) 2. In vivo şartlarda GSH konjugatı oluşturabilen elektrofilik fonksiyonel gruba sahip inhibitörler (47,48).



Şekil 2.5. GST P1-1'in sinyal yollarında etkileşimi (3). c-JUN N-terminal kinaz (JNK), "extracellular signal-regulated" kinaz (ERK), 38 kDa protein kinaz (p38), "apoptosis signal-regulating" kinaz-1 (ASK1), "tumor necrosis factor receptor-associated" faktör (TRAF).

2.4.3. GST İnhibitörleri

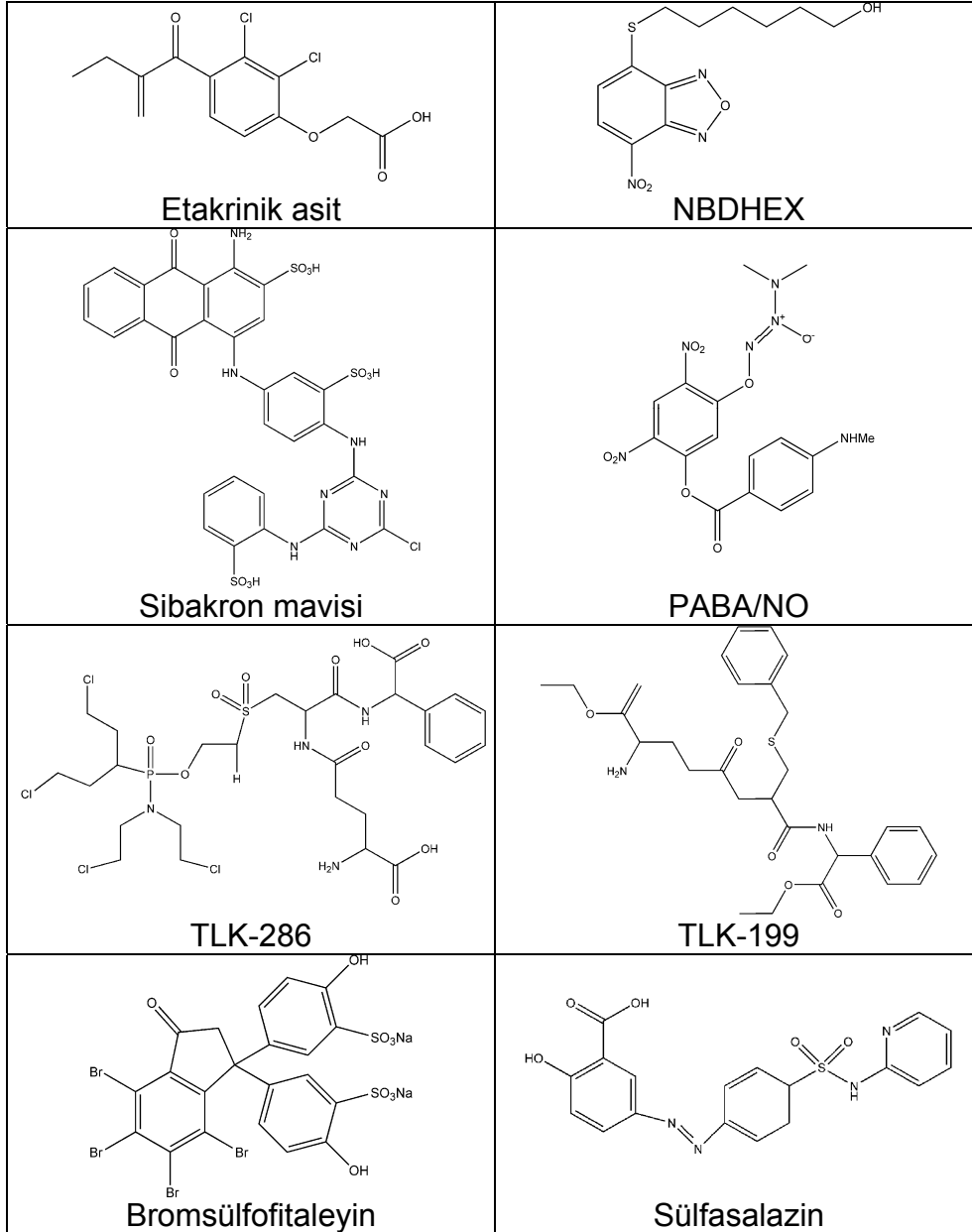
Antikanser ajanlara karşı gelişen hücre direncini ortadan kaldırmak için bugüne kadar birçok GST inhibitörü geliştirilmiştir (şekil 2.6). GSH'a yapıca benzer bileşikler (peptidomimetikler, GSH analogları) GSH bağlanma bölgesinin kompetitif inhibitörleri olarak bilinmektedir. Bu bileşiklerin kullanılmasındaki amaç ya izozim seçiciliğini ya da ilacın stabilitesini artırmaktır. Bu amaçla sentezlenen bileşiklerden TLK-199 [γ -glutamil-S-(benzil)sisteinil fenil glisil dietil ester] miyeloproliferatif bir ajandır. 5-florourasil (5-FU) ile indüklenen nötropeni sonrası lökosit sayısında artışa neden olduğu ve nötrofil iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. TLK-199'un HT-29 insan kolon adenokarsinoma ve SKOV-3 (insan over karsinoma) hücrelerinin

adriyamisine karşı duyarlılığını artırırken, mitomisin C'ye karşı etkisiz olduğu tespit edilmiştir (49). Diğer yandan bileşiğin etil esterinin meme kanser hücrelerinde tiyotepa, sisplatin ve doksorubisine karşı gelişen direncini geri çevirdiği gözlenmiştir (40). Diğer bir GSH analogu bileşik TLK-117 [γ -glutamil-S-(benzil)sisteinil-R(-)-fenilglisin]'nin ise alkilleyici ajanlar kadar melfalan, klorambusil gibi bileşiklerin etkinliğini artırdığı rapor edilmektedir (49). Diğer yandan TLK-177'nin bir analogu olan UrPhg'nin seçici bir GST P1-1 inhibitörü olduğu ve adeno karsinoma hücre dizisinde GSTP1-1 oligomerizasyonunu indükleyerek hem JNK hem de c-jun fosforilasyonunu artırdığı saptanmıştır. Bu tepkime sayesinde hücreler apoptotik yola girebilmişlerdir (44). GSH türevleri GST'lerin iyi birer inhibitörleri olmalarına karşın spesifik eksport pompaları aracılığıyla dışarı atıldıkları için kanser hücrelerinde etkilerini gösterememektedirler. Kanser hücrelerinde GSTP1-1 derişimi 0.05×10^{-3} M'a kadar ulaşmaktadır. Bu düzeydeki bir enzimi inhibe etmek için ya eşit ya da daha yüksek derişimlerde kullanılacak inhibitör hücre içinde birikecek, bu da MDR proteini açısından sorun yaratacaktır. Bu problemin üstesinden gelmek için GST'ye etkin bir şekilde bağlanabilen, fakat GSH türevi olmayan ve hücre membranını kolaylıkla geçebilen lipofilik özelliklere sahip yeni moleküllerin tasarımı yoluna gidilmektedir (47). Enzimin G-bölgesinin (fizyolojik substratı glutatyonu bağlayan bölge) yanısıra GSH'nin türevlerini tanıyabilen, değişik hidrofobik kosubstratlar ile interaksiyona girebilen H-bölgesi farklı topografi ve substrat spesifitesine sahiptir. GST alfa, pi ve mü izozimlerinde mikromolar, hatta nanomolar düzeyde Km değerleri ile ılımlı afinite gösteren bileşiklere ihtiyaç vardır (46,50). Bu amaçla farklı benzoksazol, benzotiyazol türevi bileşikler üretilme yoluna gidilmekte ve özgün, GST spesifik, geri dönüşümsüz inhibitörler sentezlenmektedir (51).

Özgün bileşikler tasarlanırken spesifik pompalar aracılığıyla hücreden atılım gibi sorunlardan kaçınmak gereklidir. Bunun için üretilecek antikanser ajanın ABC transporterlerinin substratı olmaması, yüksek influks hızı ve lipofilik özelliklere sahip olması önem kazanmaktadır. Bu amaçla, GST için güçlü inhibitör etkileri gözlenen 7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (NBD) gibi non-GSH peptidomimetik türevleri (GSH konjugatları) sentezlenme yoluna

gidilmiştir. Bu NBD tiyoeterleri GST alfa, pi ve mü izoenzimlerine yüksek afinite ile bağlandıkları bildirilen hidrofobik bileşiklerdir (52). NBD'lerin JNK-GSTP1-1 kompleksinin ayrılmasıyla apoptozu başlattıkları gösterilmiştir (52,53). Bunlar içerisinde 6-merkaptohexanol türevi, NBDHEX'in lösemi, hepatik karsinoma, küçük hücreli akciğer karsinomalarında GSTM2-2 ve GSTP1-1'e karşı güçlü inhibitör etki gösterdikleri saptanmıştır. Diğer yandan bu bileşiğin iki farklı melanoma hücre dizisinde (Me501 ve A375) apoptozu indüklediği, in vivo olarak da efektif olduğu ve melanoma modellerinde tümör büyümesinde % 70 azalmaya yol açtığı da rapor edilmiştir (54).

GSH konjugatları içerisinde en iyi bilinen ve kanser tedavisinde en çok kullanılan bileşiklerden biri olan doksorubisin (GSH-DXR), GSTP1-1'in nonkompetitif inhibitörüdür. Art arda yapılan çalışmalar GSH-DXR'nin GSTP1-1'e bağlanmasının sadece enzimatik aktiviteyi baskılamadığı, aynı zamanda JNK aktivasyonunda da artışa neden olduğu gösterilmiştir (55). GST inhibitörü olarak üzerinde en çok çalışılan molekül ise etakrinik asittir. GST P1-1'in geri dönüşümlü inhibitörü olan bu molekül enzimin H bölgesine düşük afinite ile bağlanmakta, GSH ile konjuge halde hücreden dışarı kolaylıkla atılmaktadır. Ancak Faz I çalışmalarında diürez, metabolik anomaliler, miyelosüpresyon gibi çeşitli sorunlarla karşılaşılması ve izozim spesifik olmaması nedeni ile etkinliği kısıtlı kalmıştır (56). Sitotoksisite için JNK yolunu kullanarak tümör hücresinin apoptoza gitmesini sağlayan ilaçlar (dosetaksel gibi antimikrotübül ilaçlar, topoizomeraz I ve II inhibitörleri, mitomisin C, adriyamisin ve sisplatin) için zaman içerisinde oluşabilecek ilaç direncini ortadan kaldırmada, GST inhibitörlerini beraberinde tedaviye sokmak yararlı olacaktır.



Şekil 2.6. Glutasyon transferaz P1-1 üzerinde inhisyon gösteren bileşikler.

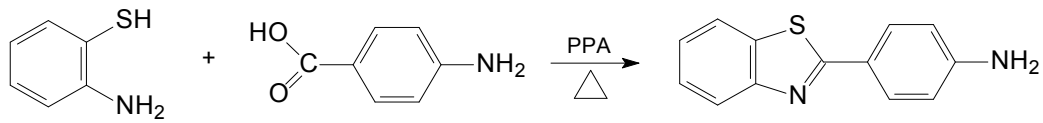
3. YÖNTEMLER

3.1. Benzoksazol ve Benzotiyazol Türevi Bileşiklerin Sentezi

Bileşikler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında sentezlendi.

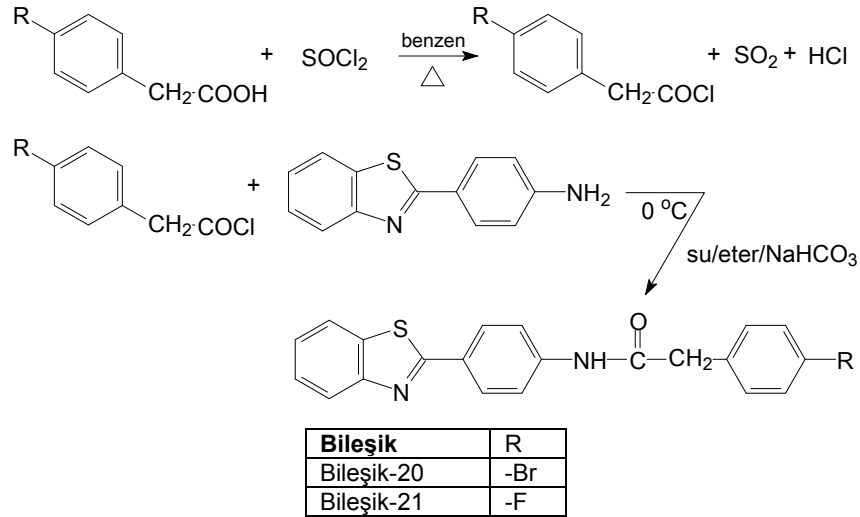
3.1.1. 2-[4-(4-Süstitüefenilasetamido)fenil]-benzotiyazol Türevi Bileşiklerin Sentezleri

Hedeflenen bileşiklere ulaşmak üzere öncelikle 2-(4-aminofenil) benzotiyazol bileşiği sentezlendi. Bunun için 1 mmol 4-amino benzoik asit, 1 mmol 2-aminotiyofenol ve 2.4 g polifosforikasit (PPA) içerisinde 200°C'de 4 saat soğutucu altında karıştırıldı. Bu süre sonunda tepkime içeriği buza döküldü ve % 10'luk NaOH çözeltisi ile ortam alkali yapıldı. Ortamın alkali olması ile çözelti içerisinde oluşan çökelek düz süzgeç kağıdından süzülerek alındı. Bakiye, etanol-su karışımından kristallendirildi.



Şekil 3.1. 2-(4-Aminofenil) benzotiyazol bileşiğinin elde edilış tepkimesi.

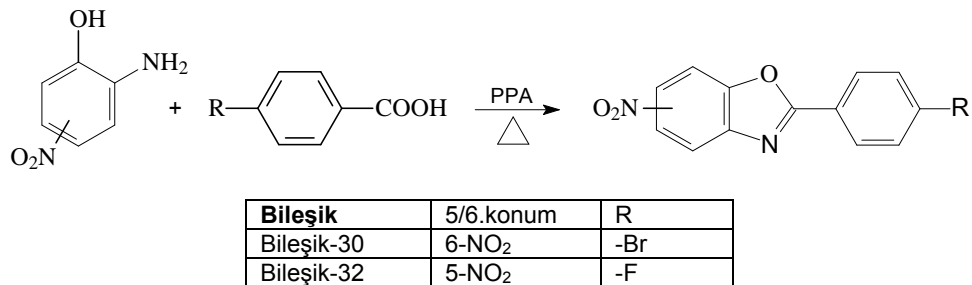
Hedeflenen bileşiklere ulaşmak üzere uygun karboksilik asit (1 mmol) tiyonil klorür (0.3 ml) ve benzen (0.5 ml) içerisinde geri çeviren soğutucu altında 80°C'de 3 saat süre ile manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süre bitiminde çözücü ve tiyonil klorürün fazlası uzaklaştırıldı. Bakiye, dietil eter (1 ml) içinde çözüldü. Elde edilen çözelti, buz banyosunda soğutulan 2-(4-aminofenil) benzotiyazol (1 mmol), sodyum bikarbonat (2 mmol), eter (1 ml) ve sudan (1 ml) oluşan karışım üzerine damla damla ilave edildi. Karışım bir gece buz banyosunda karıştırıldı ve süzüldü. Bakiye, sırasıyla su, 2N HCl, su ve eter ile yıkandıktan sonra etanolden kristallendirildi.



Şekil 3.2. 2-[4-(4-Süstitüe fenilasetamido) fenil]-benzotiyazol türevi bileşiklerin elde edilmiş tepkimesi.

3.1.2. 2-(4-Süstitüefenil)-5 (veya 6-) nitrobenzoksazol Türevi Bileşiklerin Sentezleri

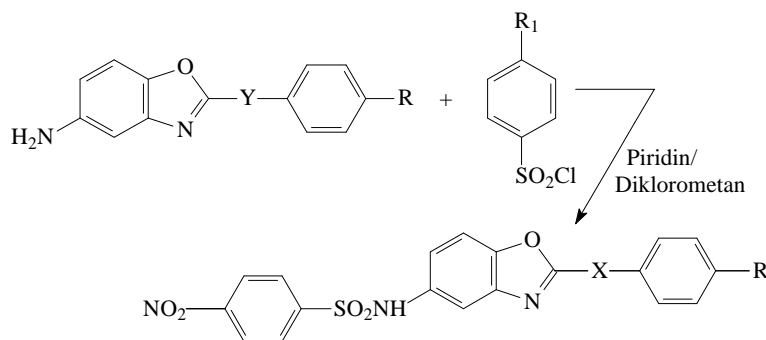
0,01 mol 2-amino-4-(veya 5-) nitrofenol, 0.01 mol uygun karboksilik asit ve 24 g polifosforikasit (PPA) içerisinde 200°C'de 4 saat geri çeviren dik soğutucu altında karıştırıldı. Bu süre sonunda tepkime içeriği buza döküldü ve % 10'luk NaOH çözeltisi ile ortam alkali yapıldı. Alkali çözelti etil asetat ile ayırma hunisinde 3 kez ekstre edildi. Etil asetatlı fazlar turnusol kağıdına nötr tepkime verinceye kadar distile su ile yıkandı, etil asetatlı fazlar birleştirilerek susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarıldı. Daha sonra vakumda kuruluğa kadar uçuruldu. Bakiye etanol-su karışımından kristallendirildi.



Şekil 3.3. 2-(4-süstitüefenil)-5 (veya 6-) nitrobenzoksazol türevi bileşiklerin elde edilmiş tepkimesi.

3.1.3. 2-(*p*-Süstitüefenil/benzil)-5-(*p*-nitrobenzensulfonamido) benzoksazol Türevi Bileşiklerin Sentezi

0.048 mmol 2-(*p*-süstitüefenil/benzil)-5-aminobenzoksazol türevi bileşikler 2 ml diklorometan ile çözülerek üzerine 0.95 mmol piridin ve 0.52 mmol *p*-nitro benzen sülfonil klorür ilave edilerek manyetik karıştırıcıda oda ısısında 16 saat karıştırıldı. Tepkime bitiminde çökmüş haldeki madde süzüldü ve önce bakır sülfatın sudaki doygun çözeltisi ile sonra da sodyum bikarbonatın sudaki doygun çözeltisi ile yıkandı. Son olarak etil asetat: *n*-hekzan karışımı ile rekristalizasyon işlemi uygulandı.

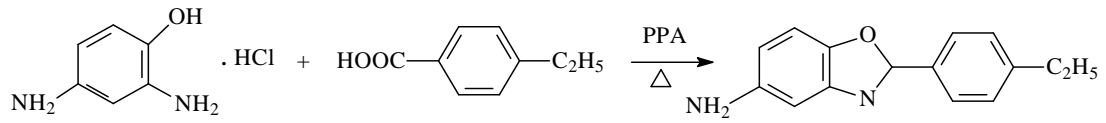


Bileşik	X	R
Bileşik-68	-	
Bileşik-70	-	F
Bileşik-75	-CH ₂	Cl
Bileşik-77	-CH ₂	Br

Şekil 3.4. 2-(*p*-Süstitüefenil/benzil)-5-(*p*-nitrobenzensulfonamido) benzoksazol türevi bileşiklerin elde edilmiş tepkimesi.

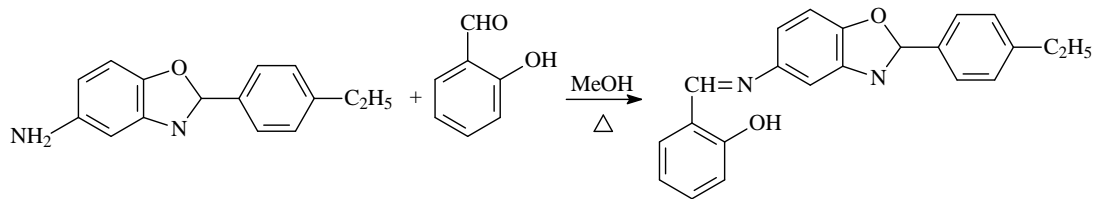
3.1.4. 2-(4'-Etilfenil)-5-(2''-hidroksibenzilidenamino) benzoksazol Bileşiğinin Sentezi

Hedeflenen bileşiklere ulaşmak üzere öncelikle 2-(4-etilfenil)-5-aminobenzoksazol bileşiğini sentezlendi. Bunun için 0.01 mol 2,4-diaminofenol dihidroklorür ve 0.01 mol uygun karboksilik asit, 24 g polifosforik asit içerisinde 180°C'de 3 saat geri çeviren soğutucu altında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Tepkime bitiminde, tepkime içeriği buza döküldü ve % 10'luk NaOH çözeltisi ile ortam alkali yapıldı. Çökelek süzülerek alındı, nötr olana dek distile su ile yıkandı, etanolden kristallendirildi.



Şekil 3.5. 2-(*p*-Etilfenil)-5-aminobenzoksazol bileşiklerinin elde ediliş tepkimesi.

Hedeflenen bileşiğe ulaşmak üzere 0.001 mol 2-(*p*-etilfenil)-5-amino benzoksazol türevi bileşik yaklaşık 30 ml metanol içinde çözününceye kadar manyetik karıştırıcılı ısıtıcıda, geri soğutucu altında 45-50 °C'de 15-20 dakika kadar karıştırıldı. Daha sonra karışıma 0.004 mol salisilaldehit eklendi. Tepkime sonunda elde edilen katı ürün süzülerek tepkime ortamından alınarak soğuk metanol ile yıkandı ve elde edilen bileşik soğuk metanol ile yıkanarak vakum etüvünde kurumaya bırakıldı.



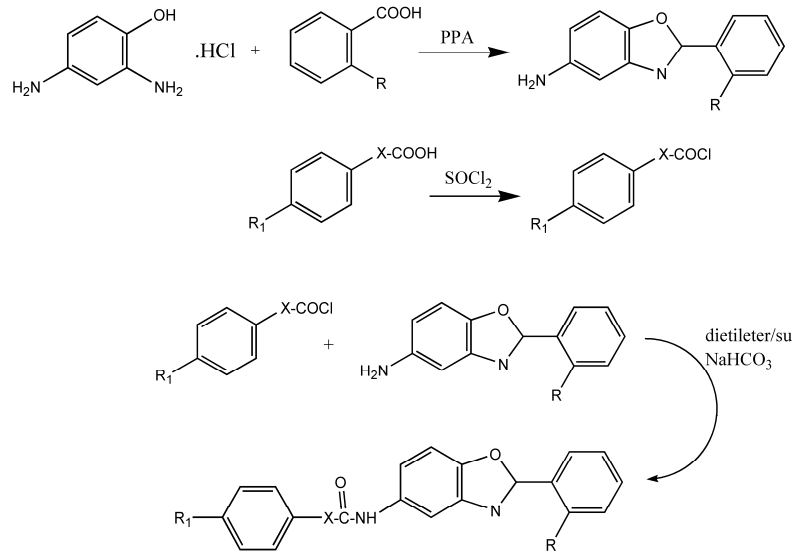
Şekil 3.6. 2-(4'-Etilfenil)-5-(2''-hidroksibenzilidenamino) benzoksazol bileşiğinin elde ediliş tepkimesi.

3.1.5. *N*-[2-(2-bromo/metilfenil)-benzoksazol-5-il]-2-(*p*-süstitüe fenil) asetamid/benzamid Türevlerinin Sentezi

0.01 mol 2,4-diaminofenol dihidroklorür ve 0.01 mol 2-bromobenzoik asit molekülleri, 24 g polifosforik asit içerisinde 200°C'de 4 saat karıştırıldı. Tepkime bitiminde % 10'luk NaOH çözeltisi ile ortam alkali yapıldı. Alkali çözelti 20 ml kloroform ile ayırma hunisinde 3 defa ekstre edildi. Kloroformlu fazlar turnusol kağıdına karşı nötr olana dek distile su ile yıkandı. Daha sonra kloroformlu fazlar birleştirilerek susuz sodyum sülfat ile vakumda kurutuldu. Bakiye, etanol-su karışımında kristallendirildi. Kristaller süzülerek alındı.

Daha sonra 5-amino-2-(2-bromofenil)-benzoksazol/5-amino-2-(2-bromofenil)-benzoksazol bileşikleri ile tepkimeye girecek olan asitlerin asit klorürlerini hazırlamak üzere, kullanılacak asitler (0.015 mol) ve 3 ml tiyonil klorür bileşiği 5 ml benzen içerisinde geri çeviren soğutucu altında, 3 saat 80°C'de karıştırıldı. Süre sonunda tiyonil klorürün fazlası uzaklaştırıldı. Bakiye 25 ml dietil eter içerisinde çözüldü. Elde edilen çözelti, buz banyosunda soğutulan 0.01 mol 5-amino-2-(2-sübstitüefenil)-benzoksazol, 0.015 mol sodyum bikarbonat, 25 ml dietil eter ve 25 ml distile sudan oluşan karışım üzerine damla damla ilave edildi. Elde edilen karışım çözelti 24 saat buz banyosunda manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Süre bitiminde tepkime içeriği süzüldü, bakiye sırasıyla su, 2N hidroklorik asit çözeltisi, su ve eter ile yıkandı. Daha sonra bakiye etanolden kristallendirildi.

Sentezlenen bileşiklerin saflıkları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kontrol edildikten sonra, erime dereceleri saptanmıştır. Bileşiklerin yapıları IR, ¹H-NMR, Kütle ve Elementel Analiz Yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin IR analizleri, Jasco FT/IR-420 spektrofotometre cihazında KBr diski kullanılarak yapılmıştır. NMR analizleri, ¹H-NMR spektrumları şeklinde, Varian Mercury 400 High Performance Digital FT-NMR Spektrometre cihazı ile 400 MHz.'de yapılmıştır. İç standart madde olarak tetrametilsilan (TMS), çözücü olarak DMSO ve kloroform kullanılmıştır. Kütle analizleri, Waters 2695 Alliance Mikromass ZQ marka LC/MS spektrometre cihazında, Elektrosprey İyonizasyonu (ESI) yöntemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin erime noktası tayini, Electrothermal 9100 cihazı kullanılarak, kapiller yöntem ile belirlenmiştir. Elementel analizler, CHNS-932 (LECO) Elementel Analiz cihazı kullanılarak yapılmıştır. Sentez çalışmaları sırasında, tepkimelerdeki gelişmeyi izlemek, elde edilen maddelerin saflık derecelerini saptamak amacıyla, ince tabaka kromatografisinden yararlanılmıştır. Bu amaçla SilicaGel 60 GF₂₅₄ alüminyum plaklar (Merck) kullanılmıştır. Sentez edilen maddelerin uygun çözücü sisteminde sürüklenme işlemi tamamlandıktan sonra plaklar açık havada kurutulmuştur. Lekelerin belirlenmesi için 254 ve 366 nm dalgaboyundaki UV ışığı veren Camag UV Lambasından faydalanılmıştır.



Bileşik	R	X	R1
Bileşik-93	Br	CH ₂	H
Bileşik-95	Br	CH ₂	Cl
Bileşik-96	Br	CH ₂	Br
Bileşik-106	Br	-	Cl
Bileşik-107	Br	-	Br
Bileşik-111	Br	-	C ₂ H ₅
Bileşik-115	CH ₃	CH ₂	Cl
Bileşik-117	CH ₃	CH ₂	F
Bileşik-118	CH ₃	CH ₂	CH ₃

Şekil 3.7. N-[2-(2-Bromo/metilfenil)-benzoksazol-5-il]-2-(p-sübstitüefenil)asetamid/ benzamid türevlerinin elde ediliş tepkimesi.

3.2. İn vitro GST P1-1 Analizi

3.2.1. Rekombinant hGST P1-1'in Ekspresyonu ve Saflaştırılması:

pKXHP1 plazmidi içeren E. coli XL-1 Blue, 50 ml 2TYA besiyerinde (0.5 g tripton, 0.25 g maya ekstraktı, 0.5 g NaCl / 50 ml) bir gece büyütüldükten sonra, 500 ml lik ekspresyon besiyerine (20 g tripton, 15 g maya ekstraktı, 5 g NaCl, 10 g gliserol ve 50 mg ampisilin /litre) 5 ml'si aktarılarak 37 °C'de OD₆₀₀ 0.35 oluncaya dek bırakıldı. Ardından kültür ortamına 0.2 mM izopropil-β-D-tiyo-galaktozid eklenerek, GST P1-1 eksprese edildi (15-18 saat). Santrifüj (7000 xg 5 dak.) ile elde edilen pelletler -80 °C'de yarım saat tutuldu. Hücreler lizis tamponu (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0.2

mM ditiyothreitol (DTT) pH 7.0 ve proteaz inhibitör kokteyli, 0.2 mg/ml lizozim) içerisinde yavaşça karıştırılarak (4°C'de 30 dak.) yeniden süspansiyon hale getirildi. Hücreleri parçalamak için sonikasyon (3×10 sn) yapıldı. Çözünür fraksiyonlar santrifüj (25.000 xg 4°C'de 50 dak.) edilerek sitozole fenilmetansülfonilflorit (PMSF) (170 µM) eklendi.

Epoksi ile aktive edilmiş S-hekzilglutasyon-Sefaroz 6B afinite matriksi saflaştırma için kullanıldı. Enzim lizati, bağlanma tamponu (tampon A) ile dengelenmiş matrikse uygulandı ve 40 dakika boyunca buz üzerinde yavaşça karıştırıldı. GST bağlı matriks tampon A (10 mM Tris HCl pH 7,8 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl, 0.2 mM DTT) ile yıkanarak bağlı olmayan proteinler elimine edildi. Matriks, tampon A ile dengelenmiş Sefadex G-25 kolonuna (Pharmacia; 4 x 40 cm) yüklendi. Bağlı proteinler tampon B (10 mM Tris HCl pH 7.8, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl, 0.2 mM DTT, 5 mM S-hekzilglutasyon) ile elüe edildi. GST aktivitesi içeren fraksiyonlar buz üzerinde konsantre (M_r 10.000; Spectrum, Houston, TX) edildi ve sonra içerisinde NaCl içermeyen tampon A'ya karşı diyaliz edildi. Elde edilen enzimin saflığı SDS-PAGE ile belirlendi (57,58).

3.2.2. Özgün Bileşiklerin Glutasyon S-transferaz P 1-1 Enzimi Üzerindeki İnhibitör Etkilerinin Saptanması

Enzim aktivitesi ölçümü: Enzim aktivitesi 1-klor-2,4-dinitrobenzen'in (CDNB) konjuge edici aktivitesi üzerinden saptandı (59). Deney ortamı içerisinde 1 mM EDTA içeren 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5), 1 mM GSH, 1 mM CDNB, ve % 5 etanol içerecek şekilde hazırlandı ve ortamın sıcaklığı 30°C olarak belirlendi. Konjugat oluşumu 340 nm'de absorpsiyon artışı üzerinden 1 dakika boyunca izlendi. Spesifik aktivite $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ absorpsiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı ve $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{mg}$ protein olarak ifade edildi.

İnhibisyon analizi: Bileşiklerin GST P1-1 üzerindeki inhibisyon etkisine farklı derişimlerde (1-50 µM) standart enzim ölçüm yöntemi kullanılarak bakıldı ve

IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀, saf enzim aktivitesinin % 50'sini inhibe eden bileşimin derişim değeridir. İnhibisyon tipi analizi, inhibitörün farklı miktarlarının varlığında ve farklı GSH (0.5-20 mM) ve CDNB (0.1-2.0 mM) derişimlerinde, "double reciprocal plot" aracılığıyla saptandı. Kinetik veriler (IC₅₀, Km ve Vm) GraphPad 4.0 yazılımı ile belirlendi.

3.3. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

3.3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda MCF-7, MDA MB-231, MDA MB-468 meme kanseri hücre dizileri ve normal meme epiteli hücre dizisi olan MCF-12A % 10 fetal dana serumu, % 1 L-glutamin ve % 1 penisilin/streptomisin içeren besiyeri (hücre tipine göre RPMI-1640, DMEM veya Leibovitz's L15) içerisinde büyütüldü. İki boyutlu hücre kültürlerinin tek tabaka (*monolayer*) olarak % 80 yaygınlığa (*confluency*) ulaşmasıyla tripsin-EDTA kullanılarak pasajlandı.

3.3.2. Hücre Lizatı

Her bir hücre dizisi uygun besiyeri içeren T-75 plaklar içerisinde % 80 doyunluğa ulaşıncaya kadar büyütüldükten sonra fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (*phosphate buffered saline*; PBS) ile yıkandı. Ardından tripsin-EDTA ile kaldırılarak 3000 xg, +4°C de 3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen peletler 500 µl lizis tamponu (1000 µl RIPA tamponu, 100 µl proteaz inhibitör kokteyli ve 5 µl PMSF) ile ependorf içerisinde pipetle alt üst edildi. Elde edilen süspansiyon soğuk odada 30 dakika rotator ile yavaşça çevrildikten sonra, 13000 xg +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen supernatantlar -80°C'de saklandı.

3.4. Western Blot Analizi

GST P1-1 ekspresyonlarının belirlenmesi için hücre ekstraktları kullanıldı. Hücre lizatlarındaki protein derişimleri BCA Protein Assay Reagent (Pierce, ABD) ile belirlendi. Hücreler 100 µl 1X SDS yükleme tamponunda (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 4 SDS, % 0.004 bromfenol mavisi ve % 20 gliserol) hazırlandı ve 10 dakika 70 °C'de inkübe edildi. Herbir kuyuya 100 µg

protein olacak şekilde protein yüklendi ve % 10'luk SDS-poliakrilamid jel kullanılarak örnekler 1 saat süreyle 100 voltta yürütüldü. Proteinlerin membrana aktarılmasında PVDF membranlar (0.45 mikron) kullanıldı. Membranlar kullanılmadan önce etanol ile ıslatılarak aktive edildi. Proteinler 25 volt 10 dakikada Fast Semi-Dry Blotter (Thermo Scientific, Pierce) kullanılarak membrana aktarıldı. Membran % 5 yağsız süt tozu içeren PBS-Tween 20 (PBS-T; % 0.1 vol / vol) ile 1 saat bloke edildi. Membran GST P1-1 için primer fare antikoru (1:1000; Cell Signalling) ile bir gece ve ertesi gün anti-fare IgG (1:2500; Thermo Scientific) ile 1 saat inkübe edildi. Döngüler arasında 3 kez 10'ar dakika süreyle PBS-T ile yıkama yapıldı. Protein bantlarının görüntülenmesinde Enhanced Chemilluminescence (ECL) (Amersham, USA) kullanıldı. Herbir kuyuya eşit miktarlarda protein yüklemesi yapıldığı β -aktin ile doğrulandı.

3.5. MTT Yöntemi

Hücrelerin GST P1-1 inhibitörü olarak belirlenen bir benzoksazol türevi olan etken bileşik (bileşik-75) ile, dozetaksele olan duyarlılığı, MTT (metil-tiyazol-tetrazolyum) canlılık testi ile incelendi. Bu amaçla, hücreler % 10 fetal sıgır serumu (FBS) ve 2 mM L-Glutamin içeren DMEM ve/veya RPMI 1640 besiyeri içinde (50 μ l hacimde) 96 kuyulu plaklara ekilerek, adezyon için bir gece % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelerin üzerine farklı derişimlerde eklenen ajanlarla (50 μ l hacimde) 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelere 25 μ l MTT (5 mg/ml) çözeltisi eklenerek ile 4 saat süreyle bekletildi ve daha sonra kuyulara 80 μ l % 45'lik dimetilformamid (DMF) içinde çözülmüş % 23 sodyum dodesilsulfat çözeltisi (SDS) (pH 4.7) eklenerek plaklar bir gece etüvde bırakıldı. Ertesi gün spektrofotometrik olarak 570 nm'de ekstraksiyon tamponuna karşı absorbans değerleri okundu. Aynı koşullarda ilaçsız olarak inkübe edilen hücreler kontrol grubu olarak ele alındı. Bu sürenin sonunda ajana bağlı sitotoksik etki kantitatif olarak değerlendirildi. Bu sonuçlara göre, tümör hücrelerinde GST P1-1 inhibitörü olarak etkinliği saptanan bileşik-75 ve alkilleyici ajan dozetakselin ayrı ve kombine olarak normal meme epiteli ve meme kanseri

hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirildi ve doz-cevap ilişkisi tanımlandı. Hücre canlılığı yüzde olarak (örnek absorbans değeri/kontrol absorbans değeri $\times 100$) her bir ilaç örneği için üçer kez yapıldı ve yüzde değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları hesaplanarak grafik çizildi. Deneyler her bir ilaç derişimi ve ilacın çözüldüğü solusyon (mock; DMSO) için üçer kez tekrarlandı.

3.6. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Uygun bir besiyeri içerisinde süspansiyon halinde bulunan hücreler (6×10^6) santrifüj (1800 xg, 5 dk) edildi ve elde edilen pelet serumsuz bir besiyerinde yeniden süspansiyon haline getirildi. 5 dakika 37°C 'de inkübasyondan sonra karanlık ortamda deneye devam edildi. Hücreleri (6×10^6) boyamak için 6 μl karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE, 5 μM) eklendi ve iyice vortekslenerek karıştırıldı. İnkübasyondan (37°C , 15 dk) sonra besiyerinden 10 ml eklenerek karıştırıldı. Buz üzerinde 5 dakika inkübasyonun ardından santrifüj (1800 xg, 5 dak) edildi. Pelet besiyeri (~10 ml) ile yeniden süspanse edilerek yıkandı. Ardından tekrar inkübasyon (buz üzerinde 5 dak) ve santrifüj (1800 xg, 5 dak) edildi. Elde edilen pelet, 3 ml besiyeri ile süspanse edildi. Hücreler her bir kuyuda 4×10^5 hücre olacak şekilde 6-kuyulu plaklara duplike olarak ekildi. Her bir hücre için kontrol grubu, dosetaksi ve bileşik-75 seçilen subtoksik dozlarda ekildi ve 48 saat 37°C etüvde inkübe edildi. Kontrol grupları bileşiklerin çözüldüğü DMSO miktarında besiyeri-DMSO karışımı ilave edilerek oluşturuldu. 48 saat sonunda 1xPBS ile yıkayıp, tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler 2-3 ml besiyeri ile süspanse edilerek akım sitometri tüplerine aktarıldı ve santrifüj edildi. Peletler 300 μl 1xPBS ile dağıtıldı ve akım sitometri cihazında 488 nm argon lazer ile okuma yapıldı. Elde edilen ortalama floresan değerleri kullanılarak hücrelerin farklı koşullardaki çoğalma durumu hakkında bilgi elde edildi. Hücre proliferasyonu sonuçları ters orantı ile hesaplandı, (kontrol ortalaması $\times 100$ / örnek ortalaması) sonuçlar yüzde olarak ifade edildi. Her deneyde örnekler ikişer kez çalışıldı ve birbirinden bağımsız üç farklı deney yapılarak ortalamaları alındı.

3.7. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Saptanması

Meme kanseri hücre dizileri 1×10^6 hücre/ml'de olacak şekilde T-75 plaklara ekildi. Her bir hücre dizisi için uygun sitotoksik dozlarda dosetaksel, bileşik-75 ve dosetaksel-bileşik-75 karışımı ayrı ayrı plaklara uygulandı ve 48 saat boyunca hücreler 37°C etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler tripsinize edildi ve hücreler üzerine 1 ml PBS eklendi ve takiben vorteks üzerinde karıştırılarak damla damla 2.5 ml soğuk % 99'luk etanol eklendi ve $+4^\circ\text{C}$ 'de bir gece bekletildi. Çalışma yapılacağı zaman, fikse edilen hücreler üzerine 2 ml PBS eklendi ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra hücreler üzerine 70 μl RNaz ve 50 μl propidium iyodür eklendi, karıştırıldı ve daha sonra 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 37 μm 'lik "nylon mesh"den süzüldü ve akım sitometri cihazında (EPICS XL MCL, Beckman Coulter, USA) 10.000 hücre sayılarak hücre döngüsü, DNA analizi ve apoptotik pik analizi yapıldı. Hücre döngüsü için G0/G1, Sentez ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı apoptozis için de subG1 pik oranı MCYCLE (Phonex System, USA) programı kullanılarak analiz edildi.

3.8. Etken Bileşik (Bileşik-75)'in Hücredeki İnhibisyon Analizi

96 kuyulu hücre kültür plaklarına kuyu başına 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve hücreler 24 saat inkübe edildi. Ardından bileşik-75 hücrelere belirlenen IC_{50} değerlerinde uygulandı ve 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon periyotları sonunda (0, 24, 48 saat) etken madde uygulaması yapılan ve kontrol olarak hazırlanan kültür plakalarından besiyerleri uzaklaştırıldı ve sonra 2 kez 300 μl PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası lizat tamponu ile muamele edilen hücrelere 2 mM GSH, 2 mM CDNB içeren 100 mM potasyum fosfat aktivite tamponu (pH 6.5) ilave edilerek spectramaxM2'de SoftMax Pro 4.8 programının "Temel Kinetik Protokolü"ne göre okuma yapıldı.

3.9. Veri Analizi

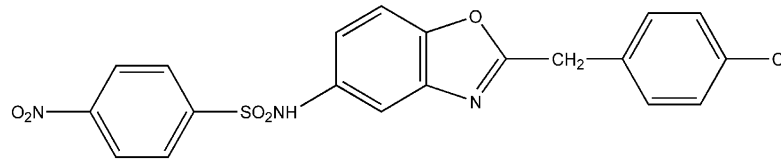
Tüm veriler en az üçer kez tekrarlanan deney sonuçlarını göstermektedir. Enzim kinetiği çalışmalarında Michaelis-Menten, Lineweaver Burk grafiklerinin çizimi ve IC₅₀ ve K_i değerlerinin sonuçları Graphpad Prism 4.0 yazılımı kullanılarak elde edildi. Kinetik grafiklerindeki herbir nokta üç farklı ölçümün ortalamasının standart hatasını (\pm S.E.) göstermektedir.

Hücre canlılığı deneylerinde gruplar arasındaki istatistiksel farklılık *Student's t-testine* göre Microsoft Office 2007 Excel (12.0.4518.1014) yazılımı ile değerlendirildi. P<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Bileşiklerin İn vitro İnhibisyon Analizi

Sentezlenen benzoksazol ve benzotiyazol türevi bileşiklerin listesi ve GST P1-1 izozimi için inhibisyon etkilerinin sonuçları Tablo 4.1.de gösterilmektedir. Tablo tezin son kısmında kaynaklardan sonra yer almaktadır. Sentezlenen bileşikler için önce standart koşullarda (100 mM sodyum fosfat, pH 6.5, 1 mM GSH, 1 mM CDNB içeren ortam) GST P1-1 analizi yapıldı. İnhibisyon etkisi gözlenen bileşiklerden IC₅₀ değeri 10 µM altında olanlar inhibisyon kinetiği çalışmalarına alındı. Bu amaçla farklı GSH ve farklı CDNB derişimlerinde etken bileşiğin kinetik parametreleri (V_m, K_i değerleri) ve inhibisyon tipi çalışmaları gerçekleştirildi. Bu döneme kadar yaptığımız çalışmalarımız sonucunda tablo 4.1 ve şekil 4.1’de gösterilen 75 numaralı bileşik (bileşik-75; N-[2-(4-kloro-benzil)-benzooksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamit) en uygun inhibitör bileşik olarak seçildi. Sonuçlarımıza göre bileşik-75 GST P1-1 üzerinde yaklaşık 10 µM’lık IC₅₀ değerine sahiptir (şekil 4.2).

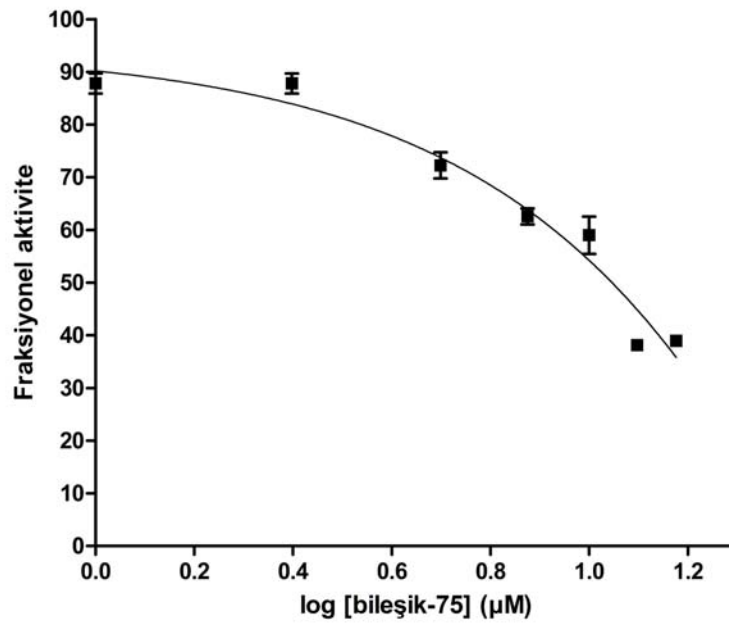


Şekil 4.1. Bileşik-75’in (N-[2-(4-kloro-benzil)-benzooksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamit) kimyasal yapısı.

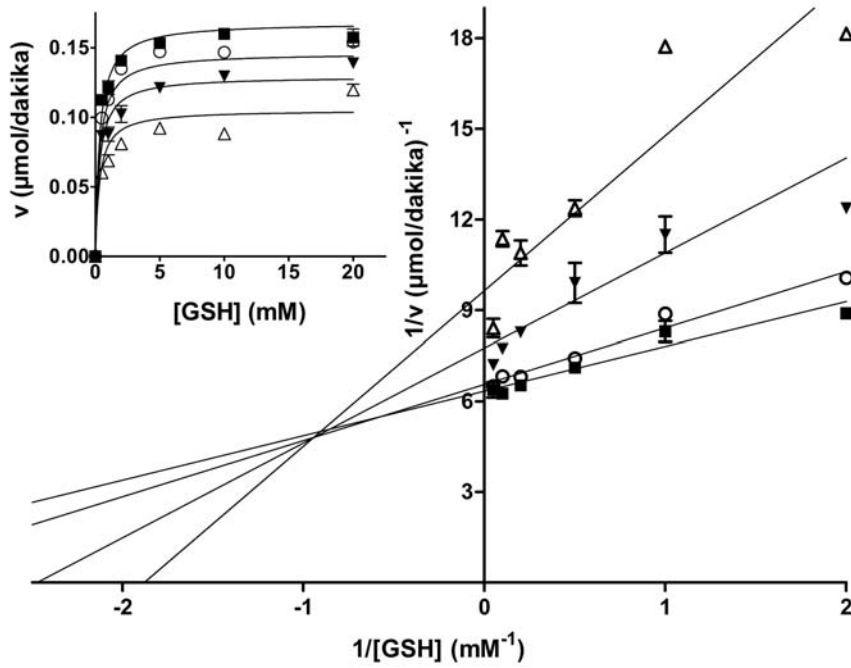
Bileşik-75’in GST P1-1’e nasıl bağlandığını belirlemek için değişen GSH ve CDNB derişimlerinde ölçümler yapıldı. Bileşik-75, GSH substratına göre, 6.05 µM K_i değeri ile karışık tip inhibisyon, CDNB substratına göre 11.83 µM K_i değeri ile unkompetitif inhibisyon gösterdiği bulundu (şekil 4.3 ve 4.4). Karşılaştırmalı referans inhibitör olarak kullandığımız etakrinik asitin GST P1-1 için IC₅₀ değeri 10.37 µM’dır (şekil 4.5). Etakrinik asitin, GSH substratına göre 2.2 µM K_i değeri ile karışık tip inhibisyon gösterdiği saptandı

(şekil 4.6). Bileşiklerin kinetik verileri karşılaştırmalı olarak tablo 4.2'de gösterilmektedir.

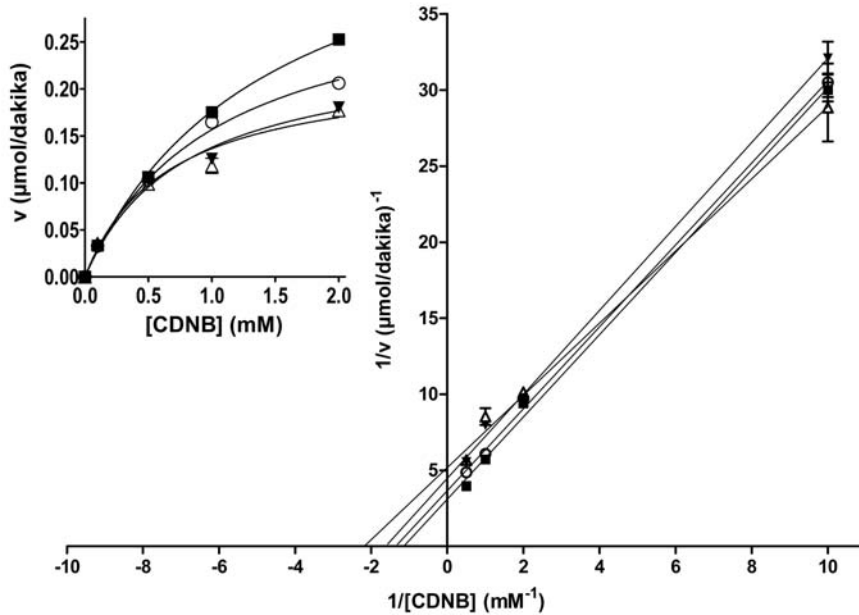
Bu bileşiğin detaylı enzim kinetiği analiz çalışmaları şekil 4.3-4.4'de gösterilmektedir. Bu deneyler sırasında GST P1-1 inhibitörü olarak daha önceden etkinliği saptanmış ve literatürlerde kabul görmüş bileşik etakrinik asit de kontrol molekül olarak çalışılmıştır. Sonuçlar şekil 4.5-4.6'da gösterilmektedir.



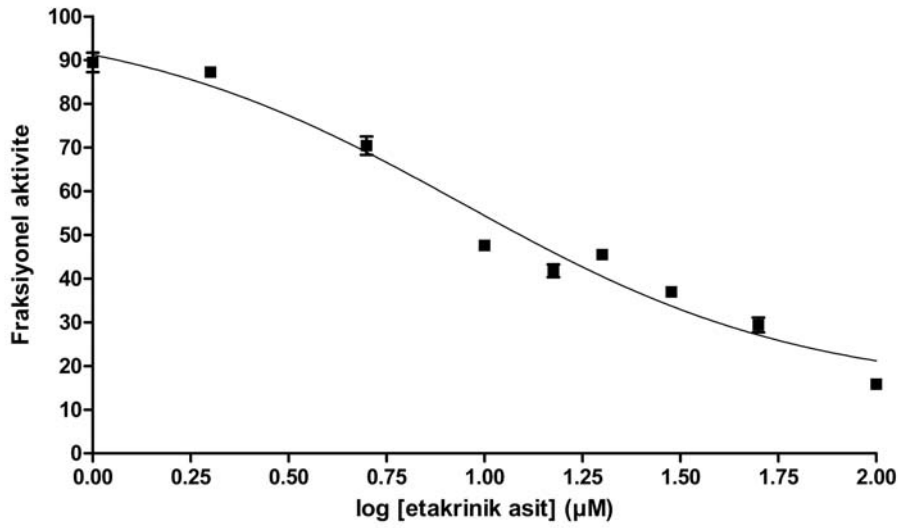
Şekil 4.2. Farklı derişimlerde bileşik-75 ile hGST P1-1'in inhibisyon profili. Enzim aktivitesi 1 mM GSH ve 1 mM CDNB substratları varlığında 340 nm dalga boyunda 30 °C'de 1 dakika boyunca absorbans değişimi ölçülerek belirlendi.



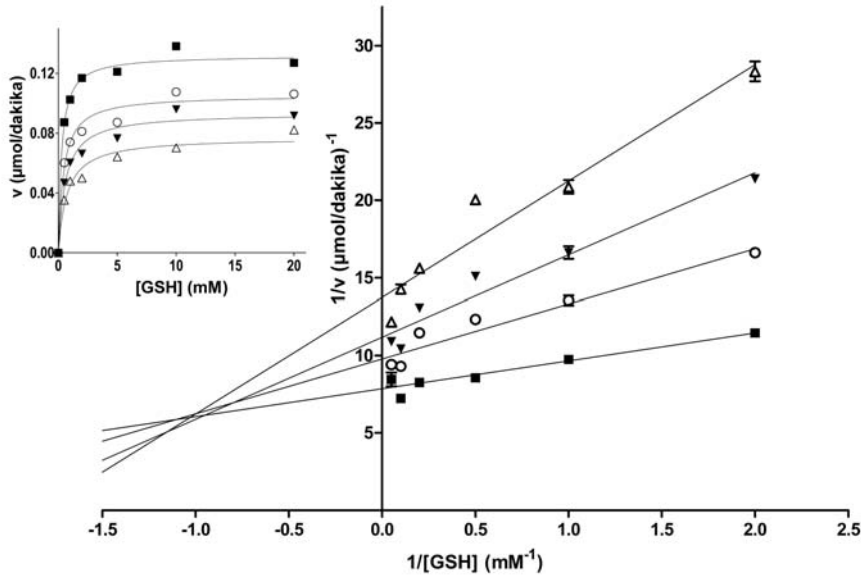
Şekil 4.3. Bileşik-75 ile hGST P1-1'nin glutatyona bağlı inhibisyon grafiği. Enzim aktivitesi değişen derişimlerde GSH, 1 mM CDNB ve (■) 0 µM, (○) 2.5 µM, (▼) 5 µM ve (Δ) 10 µM bileşik-75 varlığında ölçüldü.



Şekil 4.4. Bileşik-75 ile hGST P1-1'nin CDNB'ye bağlı inhibisyon grafiği. Enzim aktivitesi 5 mM GSH, farklı derişimlerde CDNB ve (■) 0 µM, (○) 5 µM, (▼) 10 µM ve (Δ) 15 µM bileşik-75 varlığında ölçüldü.



Şekil 4.5. Farklı derişimlerde etakrinik asit ile hGST P1-1'in inhibisyon profili. Enzim aktivitesi 1 mM GSH ve 1 mM CDNB varlığında 340 nm dalga boyunda 30 °C'de 1 dakika boyunca absorbans değişimi ölçülerek belirlendi.



Şekil 4.6. Etakrinik asit ile hGST P1-1'in glutatyona bağlı inhibisyon grafiği. Enzim aktivitesi farklı derişimlerde GSH, 1 mM CDNB ve (■) 0 µM, (○) 5 µM, (▼) 10 µM ve (Δ) 20 µM etakrinik asit varlığında ölçüldü.

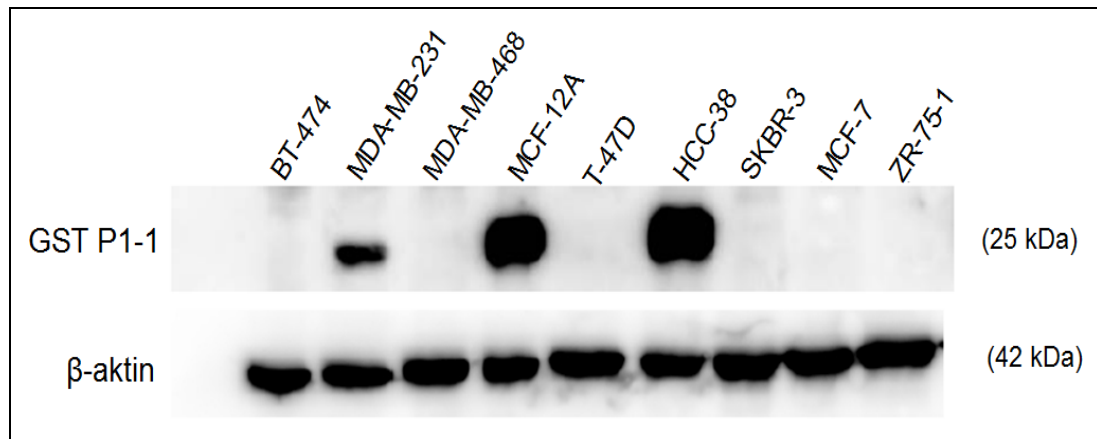
Tablo 4.2. Bileşiklerin IC₅₀, K_i ve inhibisyon türü sonuçları.

Bileşik	K _i ^{GSH} (μM)	K _i ^{CDNB} (μM)	İnhibisyon türü	
			GSH	CDNB
Bileşik-75	6.05	11.83	karışık	unkomp.
Etakrinik asit	2.2	* -	karışık	* -

* - (deney yapılmadı)

4.2. Western Blot Analizi ile GSTP1-1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Laboratuvarımızda bulunan tüm meme kanseri hücre dizileri GSTP1-1 ekspresyonunu değerlendirme açısından çalışmaya alındı. Hücre lizatlarında (MCF-7, BT-474, MDA-MB-231, SKBR-3, HCC-38, ZR-75-1, T47D, MDA-MB-468 meme kanseri hücre dizileri ve normal meme epiteli hücre dizisi MCF-12A) GST P1-1 miktarları değerlendirildi. MDA-MB-231 hücrelerinde düşük, MCF-12A ve HCC-38 hücrelerinde yüksek miktarda enzim miktarı gözlemlendi. Bu hücrelerden MDA-MB-231 ve MCF-12A GST P1-1 pozitif (+), MDA-MB-468 ve MCF-7 hücreleri ise GST P1-1 negatif (-) hücreler olarak belirlendi ve bu hücrelerle deneylere devam edildi (şekil 4.7).



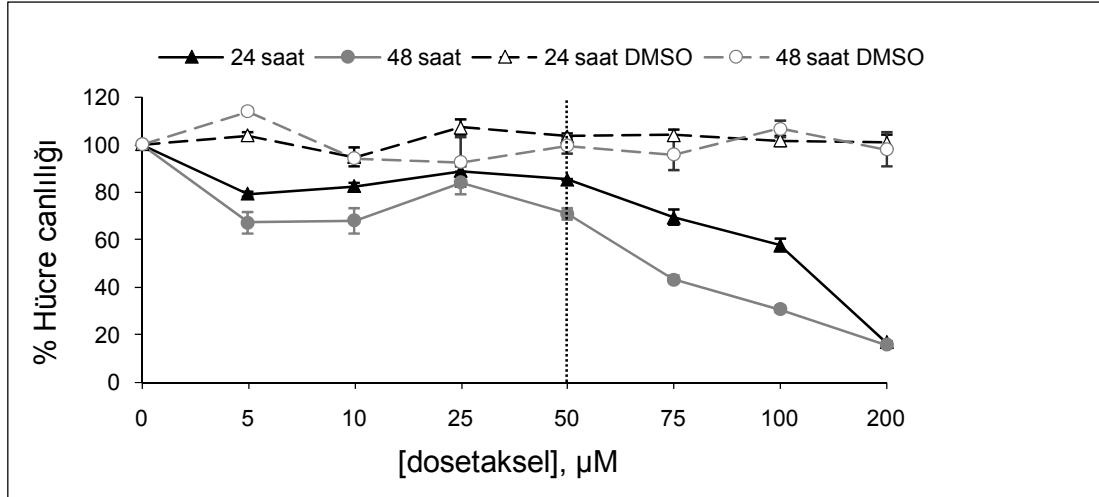
Şekil 4.7. Çeşitli meme kanser hücre lizatlarında GST P1-1'in western blot analizi.

4.3. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

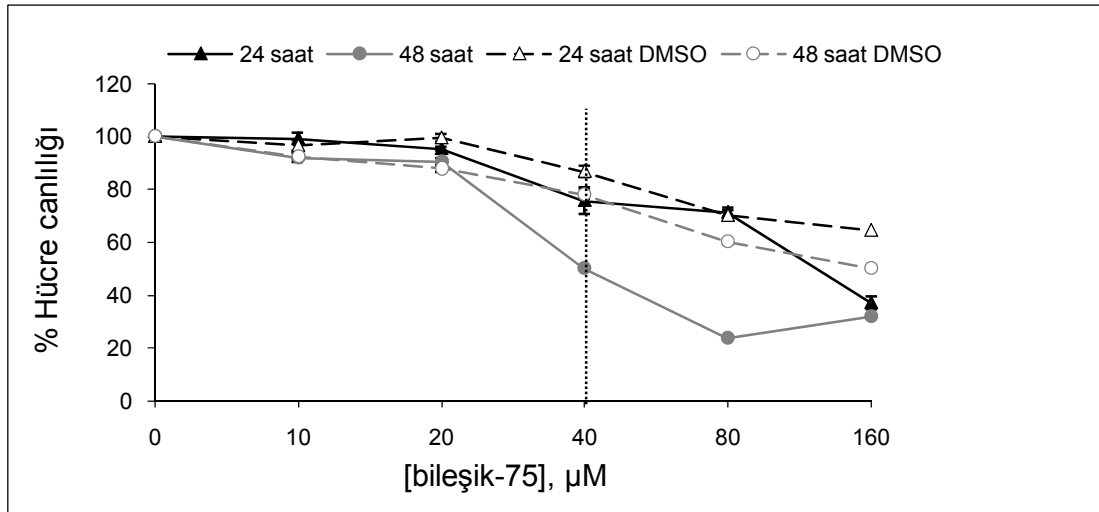
Sitotoksitenin değerlendirilmesi hücre canlılık testi metil-tiyazol-tetrazolyum (MTT) ile yapıldı. Hücre olarak GST P1-1 (+) olan MCF-12A ve MDA-MB-231 ve GST P1-1 (-) MCF-7 ve MDA-MB-468 hücreleri kullanıldı. Deneyler her bir hücre hattı için 24 ve 48 saat dozetaksel, bileşik-75 ve kombine dozetaksel-bileşik-75 uygulanarak gerçekleştirildi. Öncelikle her bir hücre hattında dozetaksel ve bileşik-75 için subtoksik doz belirlendi. Subtoksik doz, hücrelerin % 60-80 arasında canlı olduğu değer olarak kabul edildi. Dozetaksel için bulunan subtoksik doz ve farklı derişimlerde bileşik-75 ile hücreler 24 ve 48 saat muamele edilerek, bileşik-75'in hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi. Saptanan en düşük sitotoksik etkili dozlar, hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü analizi deneyleri içinde kullanıldı.

Dozetaksel sub-toksik dozu; MCF-12A için 50 µM, MDA-MB-231 için 50 µM, MDA-MB-468 için 1.2 nM, MCF-7 için 5 µM, olarak belirlendi. Benzer şekilde bileşik-75 sub-toksik dozu; MCF-12A için 40 µM, MDA-MB-231 için 20 µM, MDA-MB-468 için 5 µM, MCF-7 için 20 µM olarak saptandı.

GST P1-1'i yüksek düzeyde eksprese eden normal meme epiteli hücre hattı, MCF-12A deneylerinde, dozetaksel için 50 µM, bileşik-75 için 40 µM derişimler sitotoksik doz olarak seçildi (şekil 4.8 ve 4.9). MTT kombine ilaç deneyinde 50 µM dozetaksel değeri sabit tutuldu.



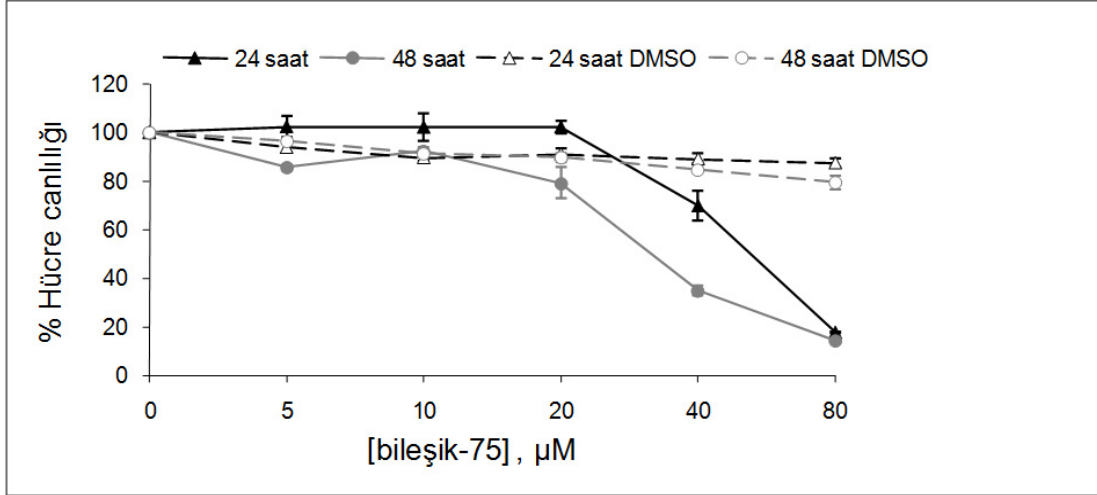
Şekil 4.8. Farklı derişimlerde dozetaksel ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-12A hücrelerinin sitotoksik etki düzeyleri. Kesikli gri çizgi belirlenen sub-toksik doza işaret etmektedir.



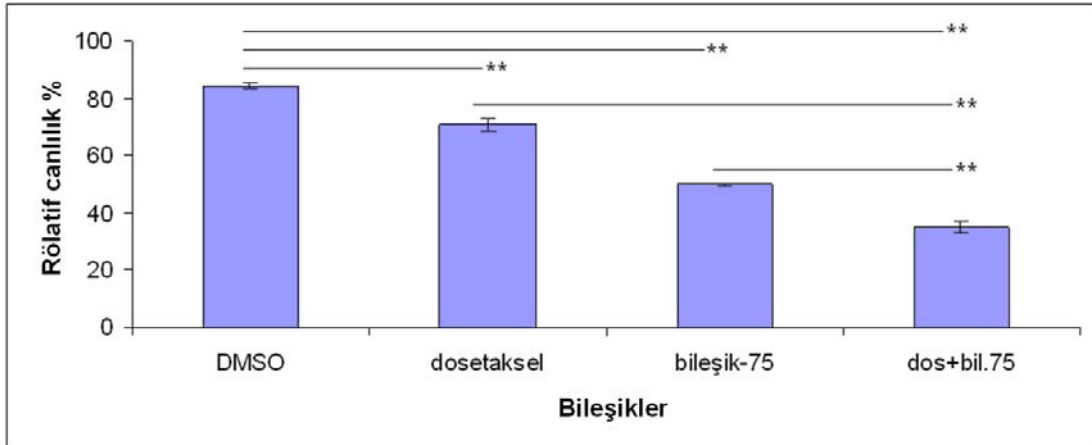
Şekil 4.9. Farklı derişimlerde bileşik-75 ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-12A hücrelerinin sitotoksik etki düzeyleri. Kesikli gri çizgi belirlenen sub-toksik doza işaret etmektedir.

Kombine ilaç kullanımında 48'inci saatte 40 μM ve üzerinde bileşik-75 kullanımı MCF-12A hücreleri üzerinde additif etki yapmaktadır. Hücre canlılığı 24 saat 40 μM 'da % 70'e, 80 μM 'da % 30 seviyelerine inmektedir. 48'inci saatte ise bu oran 40 μM 'da % 35, 80 μM 'da ise % 20 seviyelerine

düşmektedir (şekil 4.10). Bu sonuçlara istatistiksel olarak bakıldığında anlamlı bir etki ($P<0.05$) olduğu bulunmuştur (şekil 4.11).

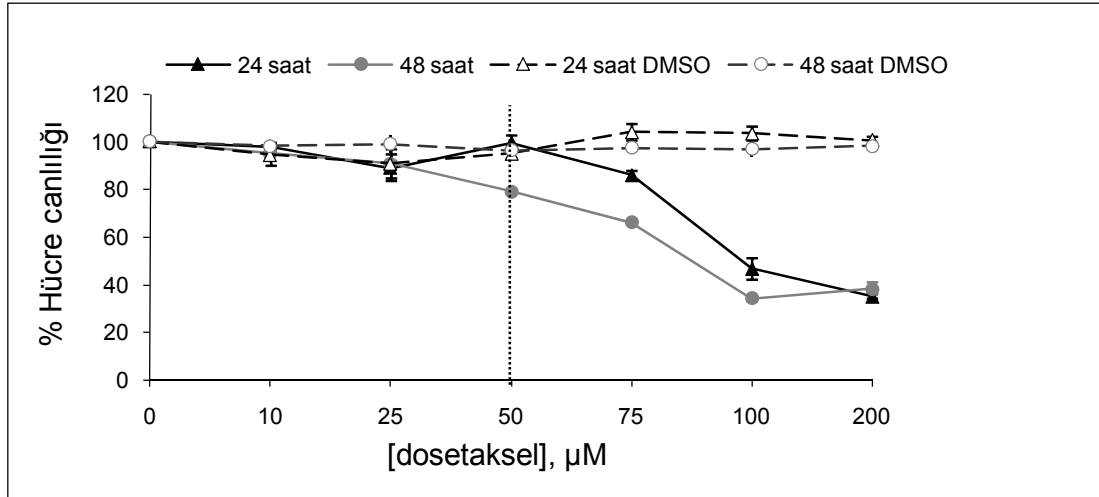


Şekil 4.10. Subtoksik dozda dozetaksel (50 µM) ile farklı derişimlerde bileşik-75'in beraber olarak MCF-12A hücrelerinde canlılık üzerine etkisi. Hücreler kombine olarak bileşikler ile 24 ve 48 saat inkübe edildi.

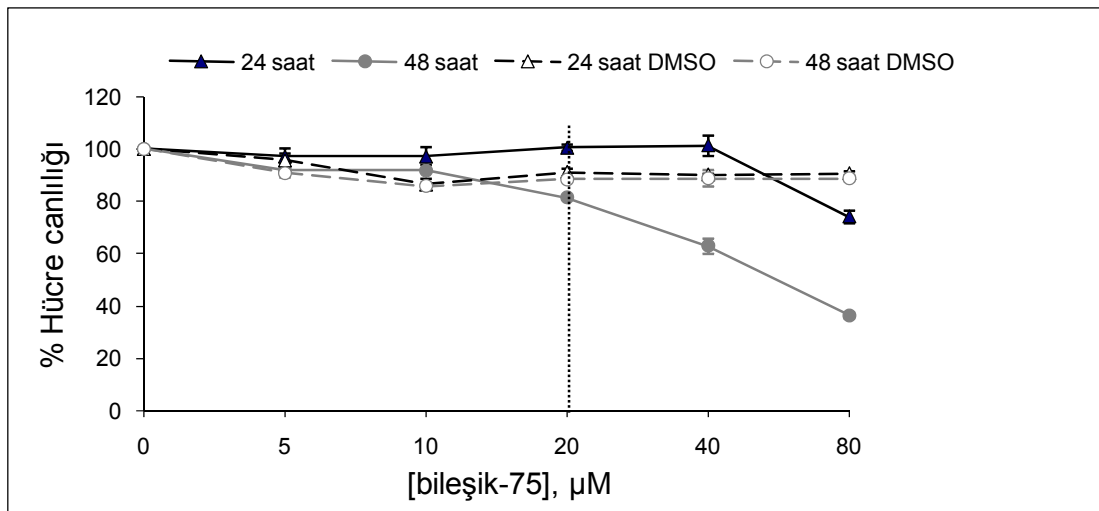


Şekil 4.11. Sabit derişimlerde dozetaksel (50 µM), bileşik-75 (40 µM) ve kombine dozetaksel (50 µM) - bileşik-75'in (40 µM) MCF-12A hücreleri üzerinde 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Bileşiklerin çözüldüğü solusyon olan DMSO kontrol olarak kullanıldı (** $P<0.05$, * $P>0.05$).

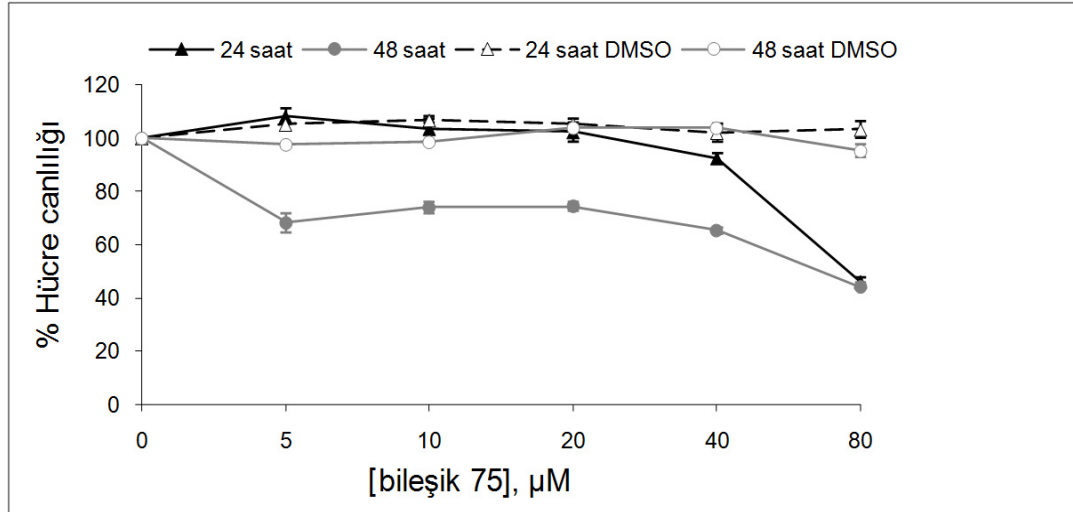
MDA-MB-231 için sitotoksik doz dosetaksel için 50 μ M (şekil 4.12), bileşik-75 için ise 20 μ M (şekil 4.13) olarak seçildi. Kombine ilaç kullanımında 24 ve 48'inci saatte herhangi bir additif etki gözlenmedi (şekil 4.14). Bu sonuçlara istatistiksel olarak bakıldığında anlamlı bir etki ($P < 0.05$) saptanmadı (şekil 4.15).



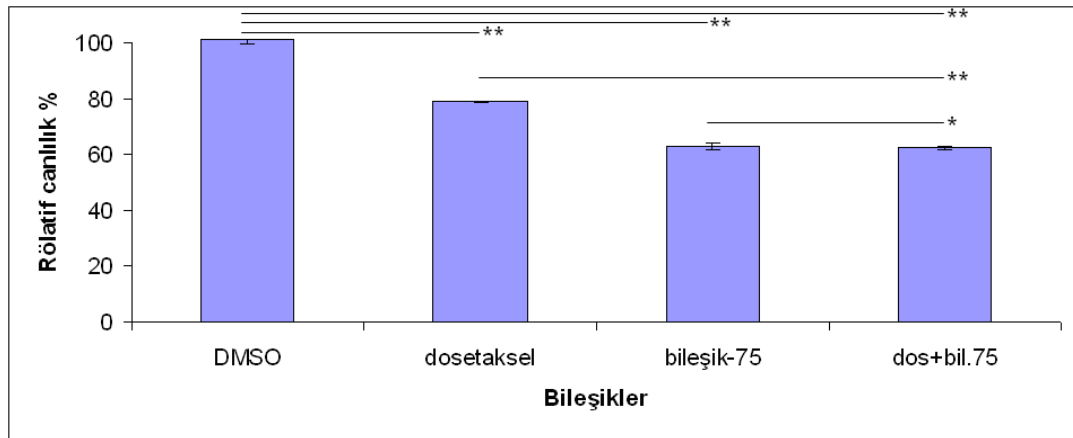
Şekil 4.12. Farklı derişimlerde dosetaksel ile 24 ve 48 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin sitotoksik etki düzeyleri. Kesikli gri çizgi belirlenen sub-toksik doza işaret etmektedir.



Şekil 4.13. Farklı derişimlerde bileşik-75 ile 24 ve 48 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin sitotoksik etki düzeyleri. Kesikli gri çizgi belirlenen sub-toksik doza işaret etmektedir.



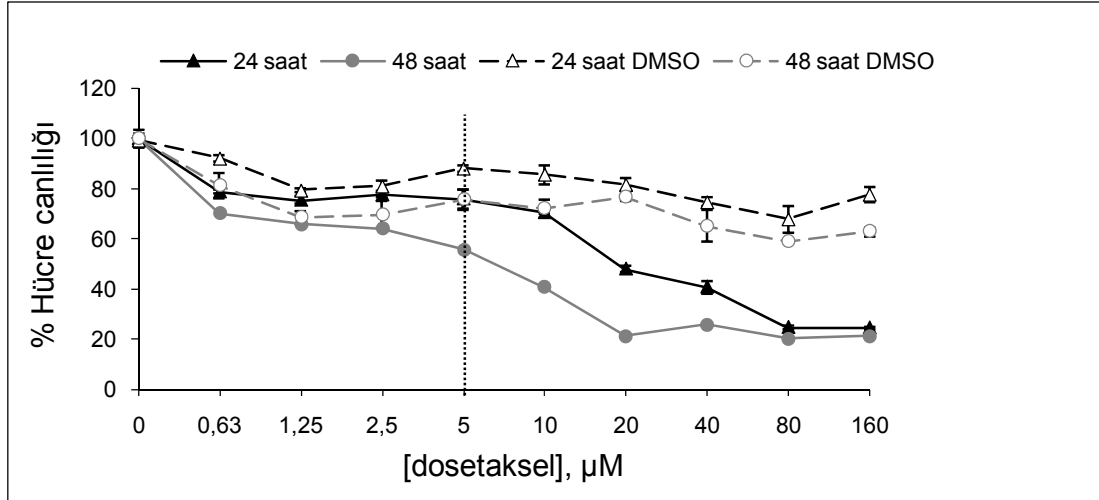
Şekil 4.14. Subtoksik dozda dozetaksel (50 µM) ile farklı derişimlerde bileşik-75'in beraber olarak MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık üzerine etkisi. Hücreler kombine olarak bileşikler ile 24 ve 48 saat inkübe edildi.



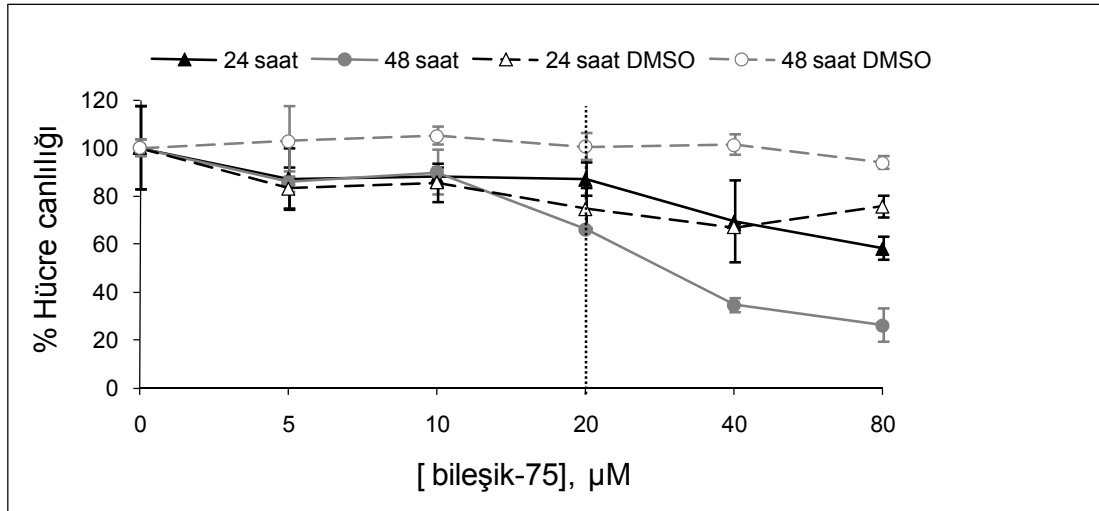
Şekil 4.15. Sabit derişimlerde dozetaksel (50 µM), bileşik-75 (40 µM) ve kombine dozetaksel (50 µM) ve bileşik-75'in (40 µM) MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Bileşiklerin çözüldüğü DMSO kontrol olarak kullanıldı (**P<0.05, *P>0.05).

GST P1-1 (-) olan MCF-7 hücrelerinde dozetaksel için 5 µM, bileşik-75 için 20 µM subtoksik dozları seçildi (şekil 4.16 ve 4.17). Kombine ilaç kullanımında bileşik-75 belirgin bir additif etki göstermemektedir. 24 saat MTT deneylerine göre hücre canlılığı yalnızca 80 µM bileşik-75'in

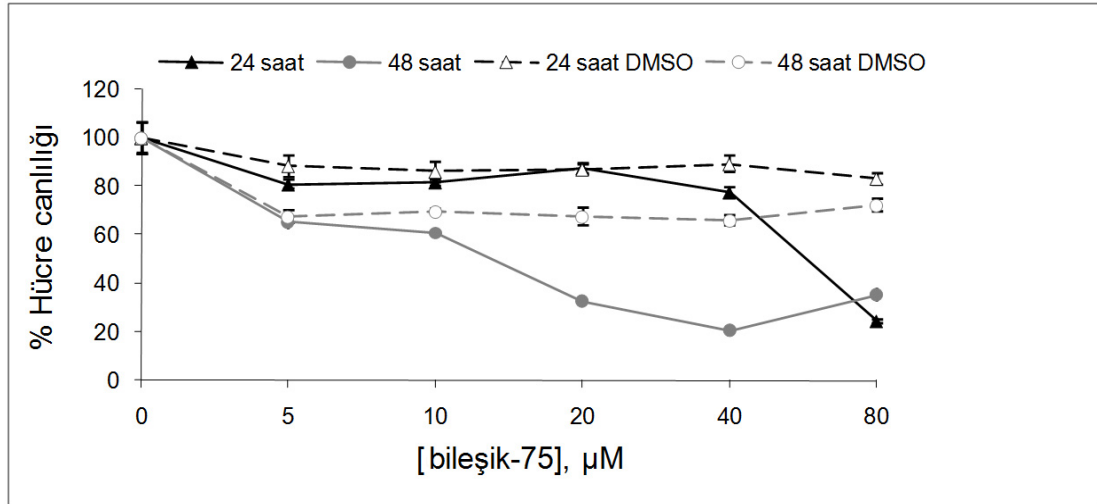
kullanımında % 30 seviyelerine gerilemektedir. 48 saatteki sonuçlara göre ise 10 μM 'dan itibaren bileşik-75 aditif bir etki göstermektedir (şekil 4.18). Bu sonuçlara istatistiksel olarak bakıldığında anlamlı bir etki ($P<0.05$) olduğu bulunmuştur (şekil 4.19).



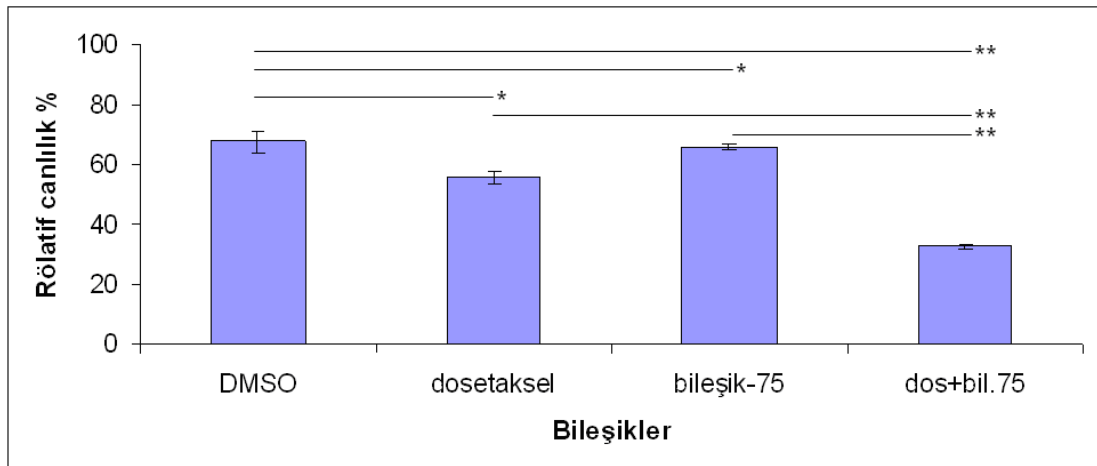
Şekil 4.16. Farklı derişimlerde dosetaksel ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin sitotoksik etki düzeyleri. Kesikli gri çizgi belirlenen sub-toksik doza işaret etmektedir.



Şekil 4.17. Farklı derişimlerde bileşik-75 ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin sitotoksik etki düzeyleri. Kesikli gri çizgi belirlenen sub-toksik doza işaret etmektedir.



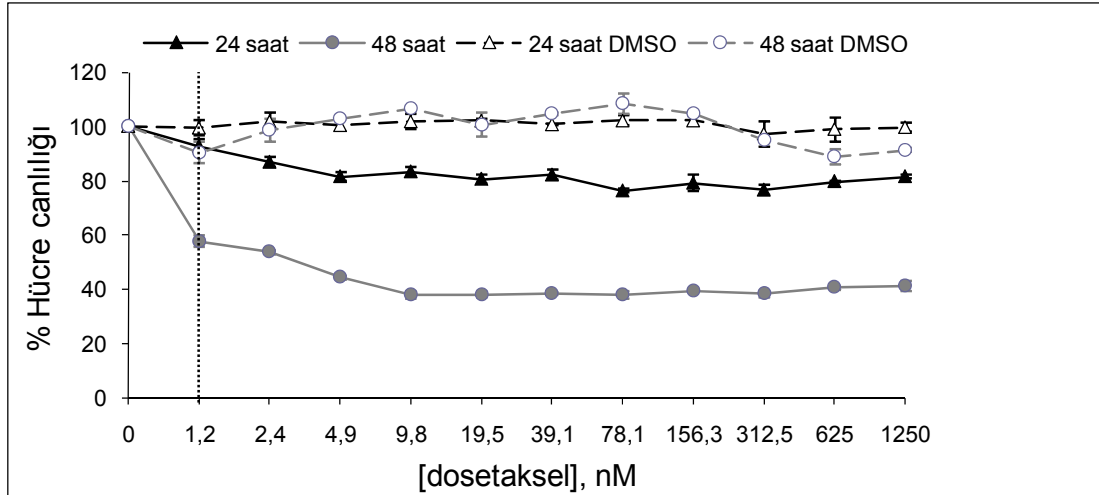
Şekil 4.18. Subtoksik dozda dosetaksel (5 µM) ile farklı derişimlerde bileşik-75'in beraber olarak MCF-7 hücrelerinde canlılık üzerine etkisi. Hücreler kombine olarak bileşikler ile 24 ve 48 saat inkübe edildi.



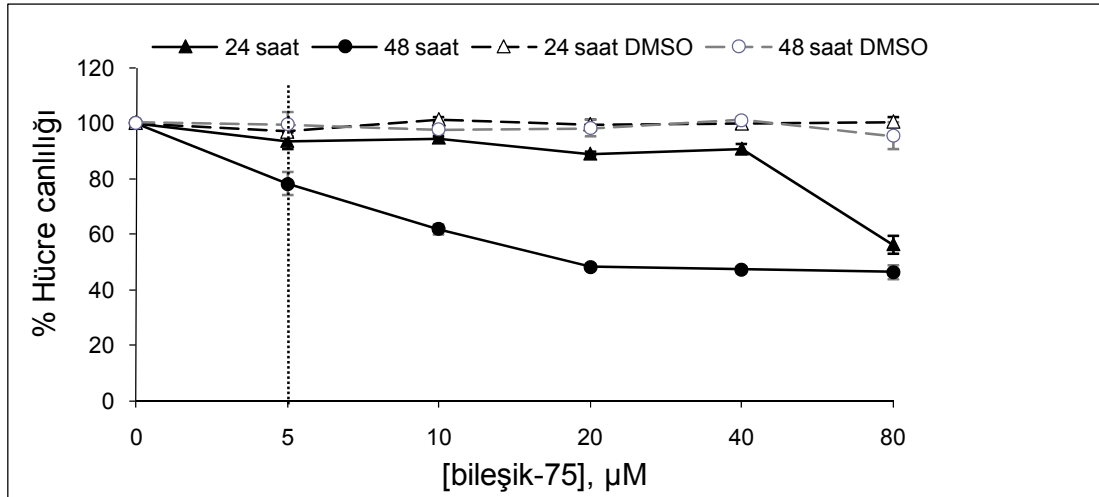
Şekil 4.19. Sabit derişimlerde dosetaksel (5 µM), bileşik-75 (20 µM) ve kombine dosetaksel (5 µM) ve bileşik-75'in (20 µM) MCF-7 hücreleri üzerinde 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Bileşiklerin çözüldüğü DMSO kontrol olarak kullanıldı (**P<0.05, *P>0.05).

GST P1-1 (-) olan MDA-MB-468 hücrelerinde dosetaksel için 1.2 nM, bileşik-75 için 5 µM derişimler etkili subtoksik dozlar olarak seçildi (şekil 4.20 ve 4.21). Kombine ilaç deney sonuçlarına göre ise bileşik-75, 24'üncü saatte bir etki göstermezken 48'inci saatlerde hücre canlılığı % 40 seviyelerine

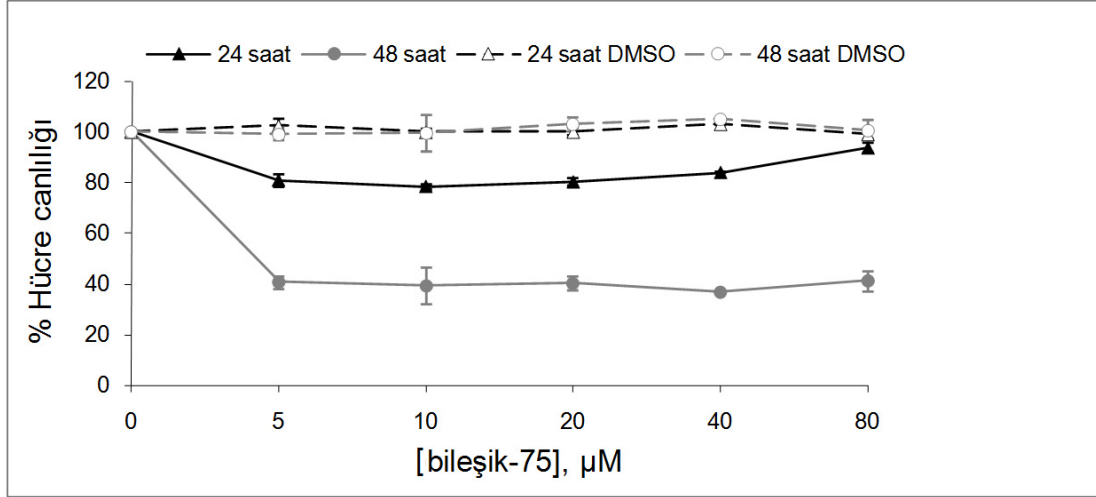
gerilediği gözlenmektedir (şekil 4.22). Bu 48'inci saat sonuçlara istatistiksel olarak bakıldığında anlamlı bir etki ($P < 0.05$) olduğu bulunmuştur (şekil 4.23).



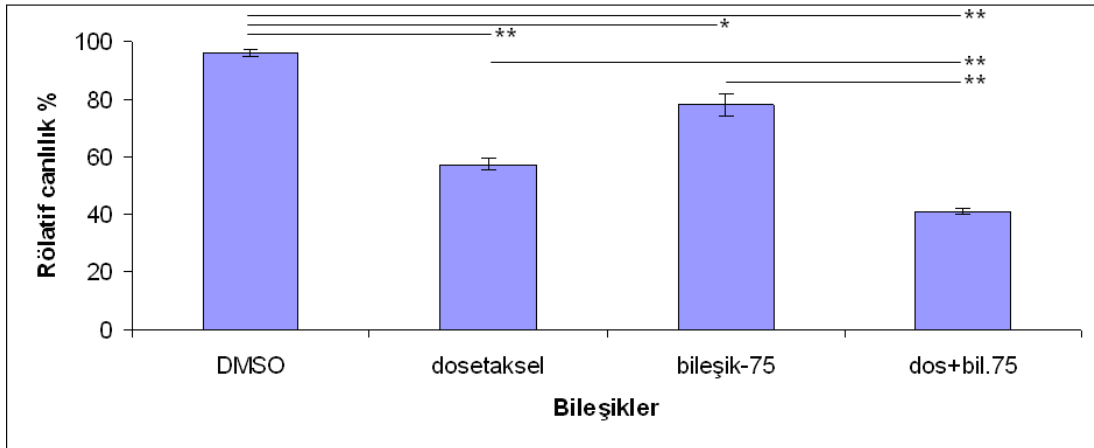
Şekil 4.20. Farklı derişimlerde dozetaksel ile 24 ve 48 saat muamele edilen MDA-MB-468 hücrelerinin sitotoksik etki düzeyleri. Kesikli gri çizgi belirlenen sub-toksik doza işaret etmektedir.



Şekil 4.21. Farklı derişimlerde bileşik-75 ile 24 ve 48 saat muamele edilen MDA-MB-468 hücrelerinin sitotoksik etki düzeyleri. Kesikli gri çizgi belirlenen sub-toksik doza işaret etmektedir.



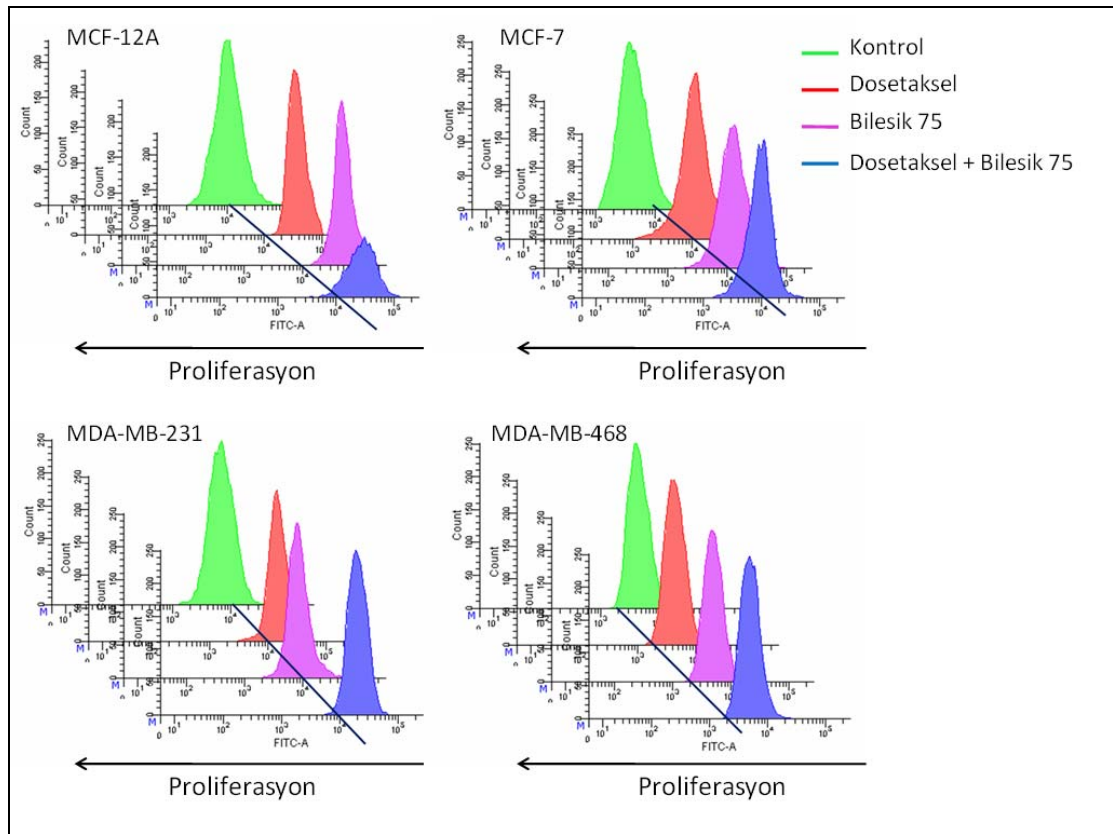
Şekil 4.22. Subtoksik dozda dozetaksel (1.2 nM) ile farklı derişimlerde bileşik-75'in beraber olarak MDA-MB-468 hücrelerinde canlılık üzerine etkisi. Hücreler kombine olarak bileşikler ile 24 ve 48 saat inkübe edildi.



Şekil 4.23. Sabit derişimlerde dozetaksel (5 µM), bileşik-75 (20 µM) ve kombine dozetaksel (5 µM) ve bileşik-75'in (20 µM) MDA-MB-468 hücreleri üzerinde 48 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Bileşiklerin çözüldüğü DMSO kontrol olarak kullanıldı (**P<0.05, *P>0.05).

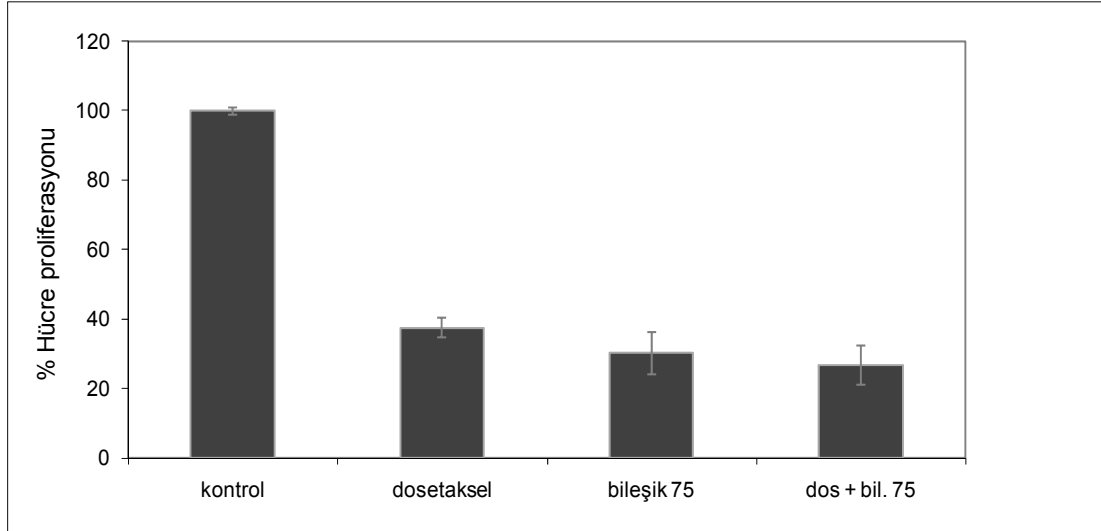
4.4. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Canlılığın belirgin şekilde etkilenmediğini gözlediğimiz ilgili sub-toksik dozlar hücre proliferasyonu analizleri için uygulandı. Hücreler CFSE boyası ile işaretlenerek ilgili ajanlarla 48 saat süre ile inkübe edildi ve karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) floresan ışımaya değerleri belirlendi. İlgili teknik hücrelerin çoğalmasına bağlı olarak floresan şiddetinin azalmasının akım sitometri ile hücre bazında ölçümüne dayanmaktadır (şekil 4.24).

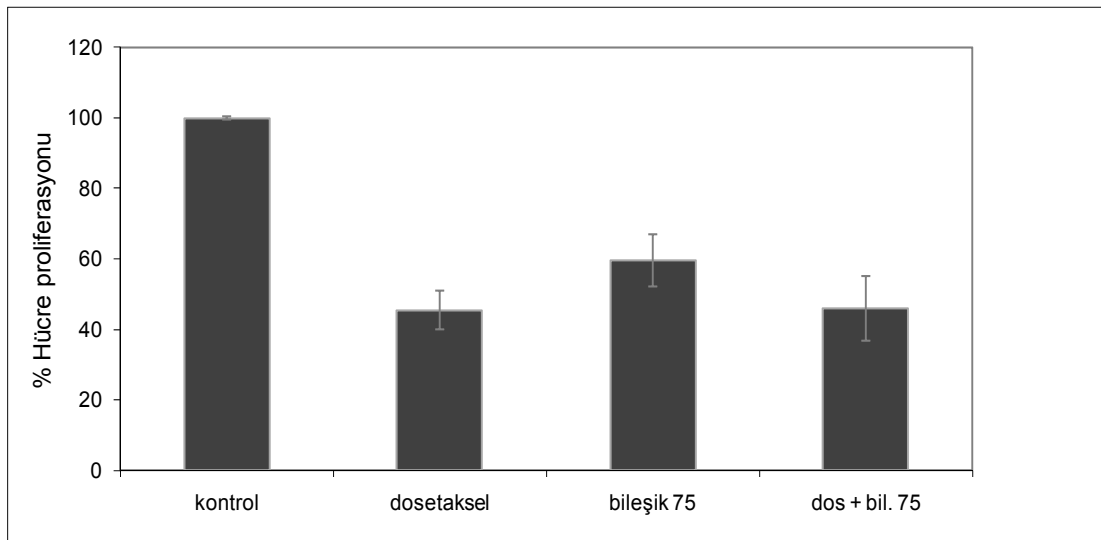


Şekil 4.24. Farklı hücre hatlarında dosetaksel, bileşik-75, ve kombinasyonunun hücre proliferasyonuna etkisinin akım sitometri yöntemi ile gösterilmesi.

Subtoksik dozlarda dosetaksel ve bileşik-75 GST P1-1 (+) MCF-12A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azaltırken, bileşik-75 ve dosetakselin beraber kullanımının hücre proliferasyonunu artırıcı veya azaltıcı herhangi bir etki göstermediği saptanmıştır (şekil 4.25 ve 4.26).

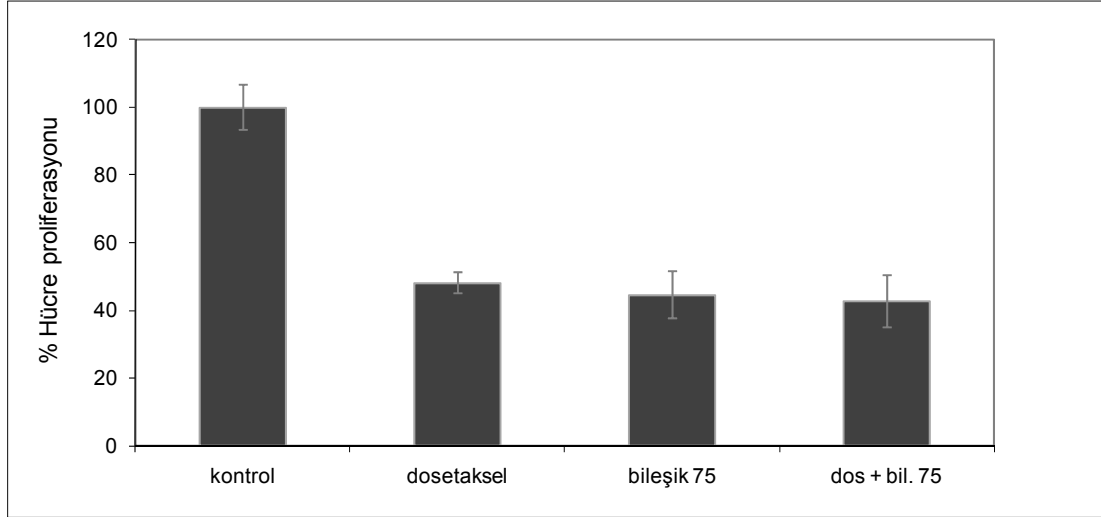


Şekil 4.25. MCF-12A hücrelerinin dosetaksel (50 μ M), bileşik-75 (40 μ M) ve kombine dosetaksel-bileşik-75 ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkileri.

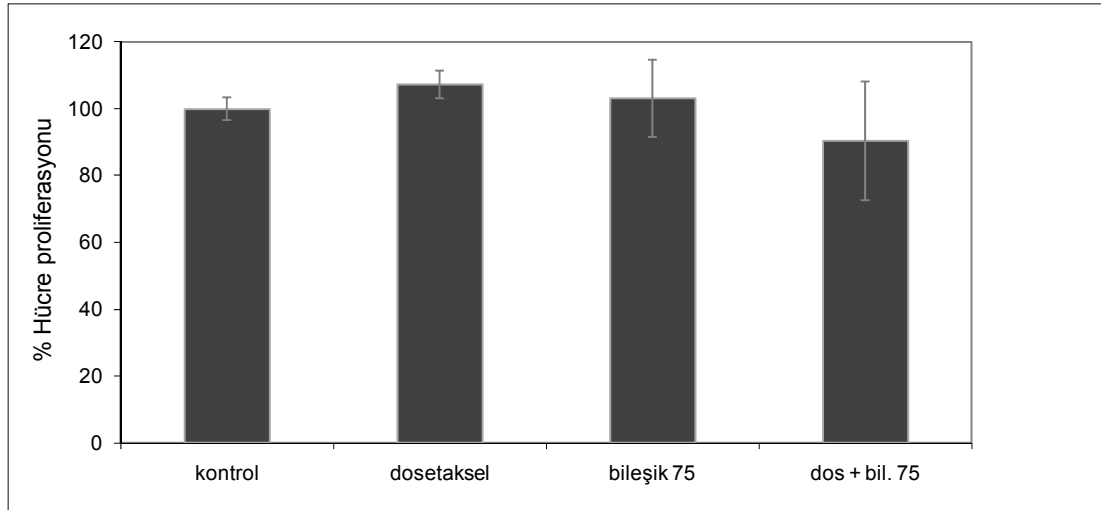


Şekil 4.26. MDA-MB-231 hücrelerinin dosetaksel (50 μ M), bileşik-75 (20 μ M), ve kombine dosetaksel-bileşik-75 ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkileri.

Dosetaksel ve bileşik-75 ayrı ayrı MCF-7 hücre hattında hücre proliferasyonunu azaltırken, bileşik-75'in dosetaksel ile beraber kullanımının hücre proliferasyonunu etkilemediği (şekil 4.27), MDA-MB-468 hücrelerinde ise ayrı ayrı ve beraber kullanılmalarının proliferasyonu etkilemediği görüldü (şekil 4.28).



Şekil 4.27. MCF-7 hücrelerinin dosetaksel (5 μ M) bileşik-75 (20 μ M) ve kombine dosetaksel-bileşik-75 ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkileri.



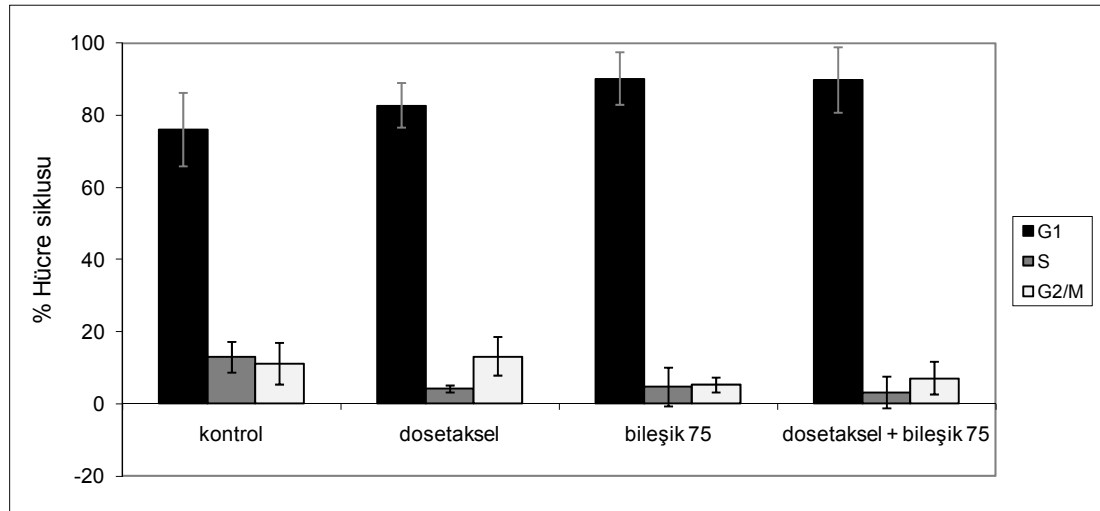
Şekil 4.28. MDA-MB-468 hücrelerinin dosetaksel (1.2 nM), bileşik-75 (5 μ M) ve kombine dosetaksel-bileşik-75 ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkileri.

4.5. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Değerlendirilmesi

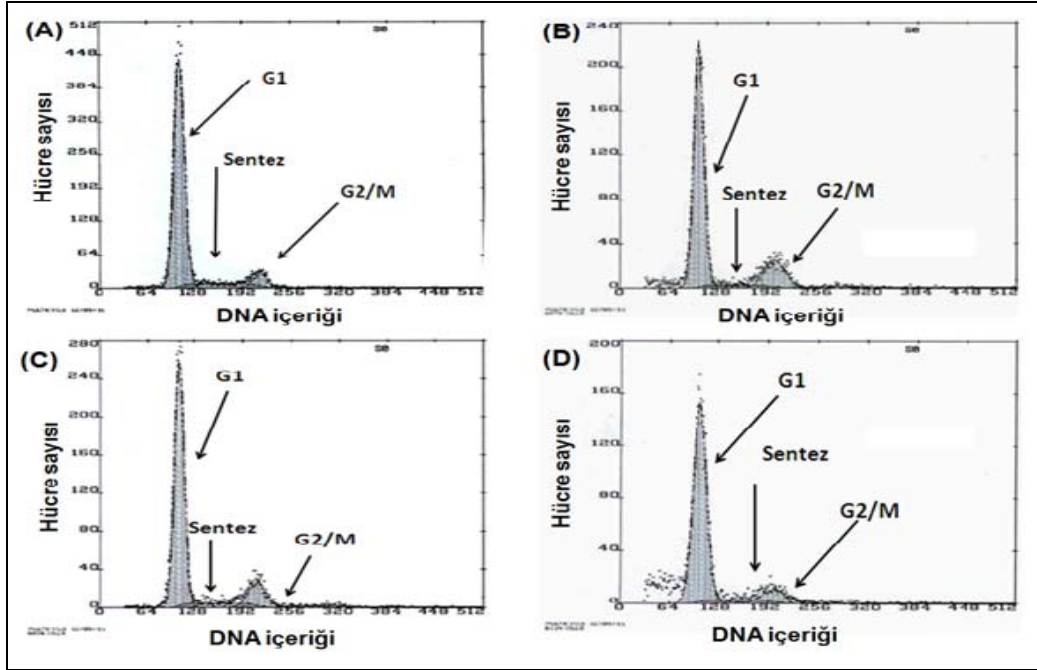
4.5.1. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü deneylerinde, meme kanser hücre dizileri olan MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468 ve normal meme epitel hücre dizisi MCF-12A hücreleri kullanıldı. Bu hücreler, dosetaksel, bileşik-75 ve dosetaksel+bileşik-75'in MTT deneyi sonucunda belirlenen subtoksik derişimlerinde 48 saat süreyle inkübe edildi ve hücre döngüsü üzerine olan etkileri incelendi.

MCF-12A hücrelerinin 50 μ M dosetaksel, 40 μ M bileşik-75 ve dosetaksel+bileşik-75 ile inkübasyonu sonucunda, G1 fazında artış olduğu ve hücre döngüsünde de duraklama olduğu bulundu. Şekil 4.29'da MCF-12A hücrelerinin dosetaksel, bileşik-75 ve dosetaksel+bileşik-75 ile inkübasyonu sonucundaki hücre döngüsü dağılımı gösterilmektedir. Şekil 4.30'da MCF-12A hücrelerindeki akım sitometrik analiz sonucu elde edilen hücre döngüsü dağılımını gösterilmektedir.



Şekil 4.29. MCF-12A hücrelerinde dosetaksel (50 μ M), bileşik-75 (40 μ M) ve kombine olarak dosetaksel-bileşik-75 ile 48 saat inkübasyonun hücre döngüsüne etkisi.

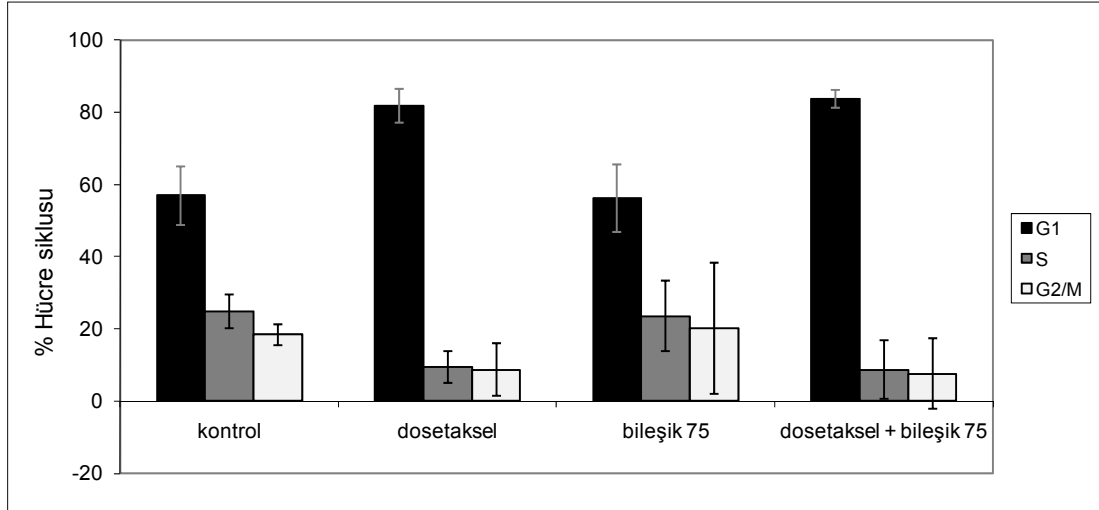


Şekil 4.30. Kontrol (A), 50 μ M dozetaksel (B), 40 μ M bileşik-75 (C) ve 50 μ M dozetaksel + 40 μ M bileşik-75 (D) ile inkübe edilen MCF-12A hücrelerinin hücre döngüsü analizi.

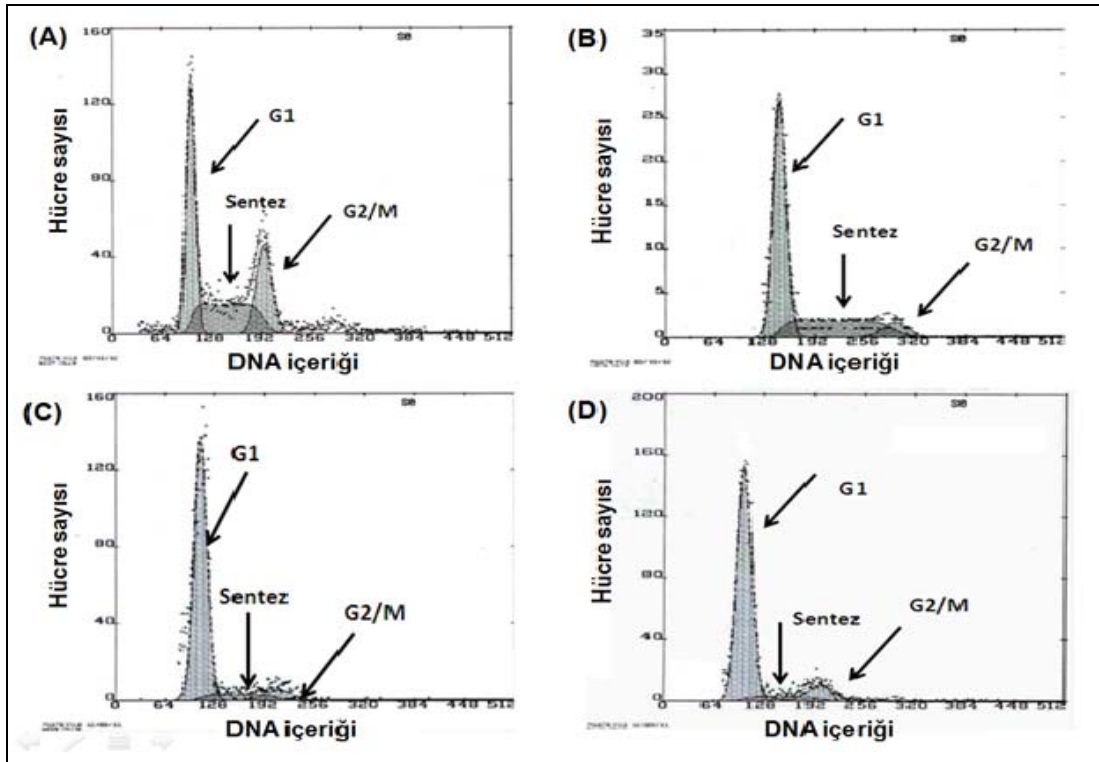
MDA-MB-231 hücrelerinin 50 μ M dozetaksel ile inkübasyonu sonucunda, G1 fazında artış olduğu ve hücre döngüsünü bu aşamada durdurduğu izlendi. 20 μ M bileşik-75 ile hücrelerin inkübasyonu sonucunda ise hücre döngüsü üzerine herhangi bir etkisi bulunamadı. Buna karşılık 50 μ M dozetaksel ve 20 μ M bileşik-75 ile hücrelerin birlikte inkübasyonu sonucunda G1 fazında artış ve hücre döngüsünde de duraklama olduğu bulundu.

Şekil 4.31'de MDA-MB-231 hücrelerinin dozetaksel, bileşik-75 ve dozetaksel+bileşik-75 ile inkübasyonu sonucundaki hücre döngüsü dağılımı gösterilmektedir. Şekil 4.32'de MDA-MB-231 hücrelerindeki akım sitometrik analiz sonucu elde edilen hücre döngüsü dağılımı görülmektedir.

GST P1-1 (+) olan MCF-12A ve MDA-MB-231 hücrelerinde dozetaksel hücre döngüsünün sentez fazında azalmaya neden olurken, bileşik-75 ve kombine dozlar sadece MCF-12A'da aynı etkiyi göstermektedir, bileşik-75'in MDA-MB-231 üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmemektedir (şekil 4.29 ve 4.31).

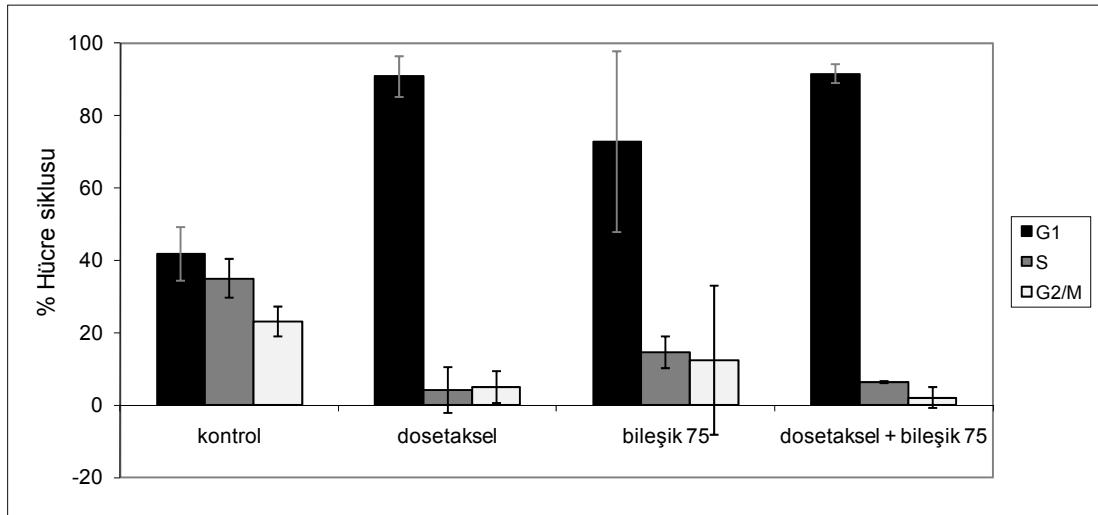


Şekil 4.31. MDA-MB-231 hücrelerinin dosetaksel (50 μ M), bileşik-75 (20 μ M) ve kombine dosetaksel-bileşik-75 ile 48 saat hücre döngüsüne etkisi.

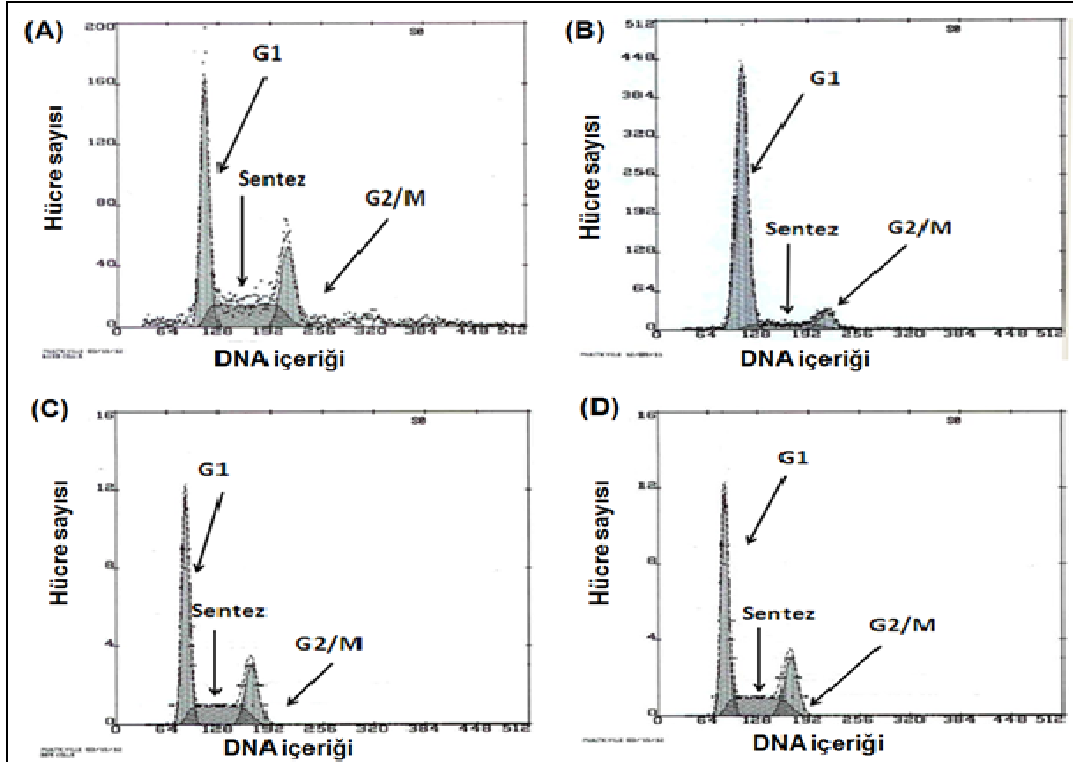


Şekil 4.32. Kontrol (A), dosetaksel 50 μ M (B), 20 μ M bileşik-75 (C) ve 50 μ M dosetaksel + 20 μ M bileşik-75 (D) ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi.

MCF-7 hücrelerinin yalnız başına 5 μ M dosetaksel veya 20 μ M bileşik-75 ile inkübasyonu sonucunda, G1 fazında artış olduğu ve hücre döngüsünün bu aşamada durdurduğu izlendi. Ayrıca, dosetaksel ve bileşik-75 ile hücrelerin birlikte inkübasyonu sonucunda G1 fazında artış ve hücre döngüsünde de duraklama olduğu bulundu. Şekil 4.33'da MCF-7 hücrelerinin dosetaksel, bileşik-75 ve dosetaksel+bileşik-75 ile inkübasyonu sonucundaki hücre döngüsü dağılımı gösterilmektedir. Şekil 4.34'de MCF-7 hücrelerindeki akım sitometrik analiz sonucu elde edilen hücre döngüsü dağılımı görülmektedir.



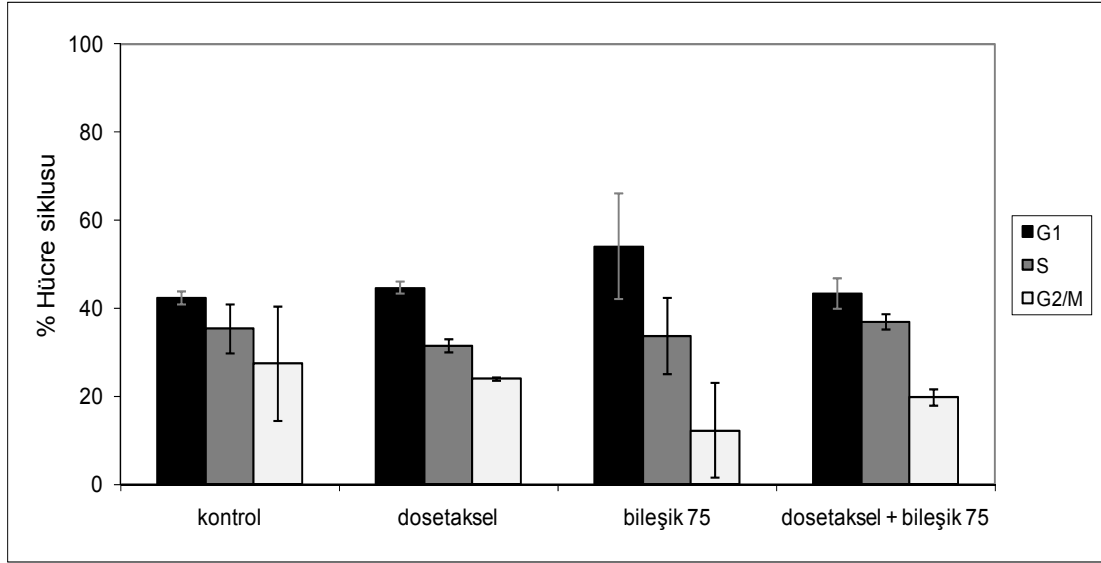
Şekil 4.33. MCF-7 hücrelerinin dosetaksel (5 μ M) bileşik-75 (20 μ M) ve kombine dosetaksel-bileşik-75 ile 48 saat hücre döngüsüne etkisi.



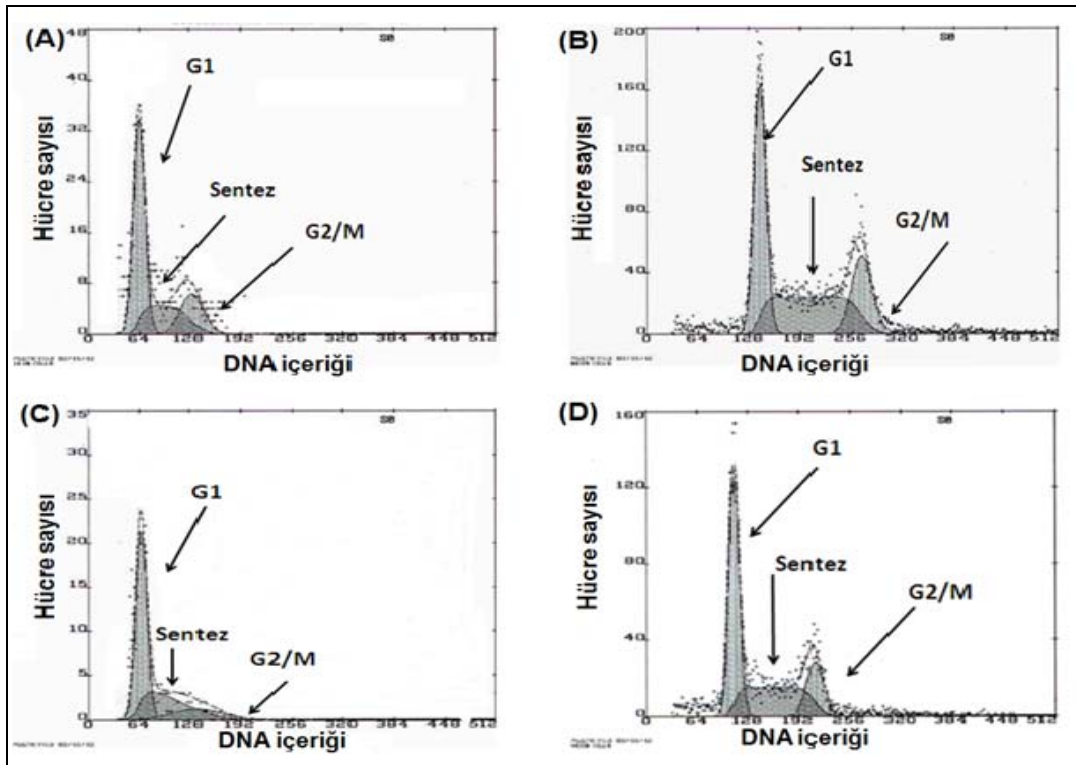
Şekil 4.34. Kontrol (A), 5 μ M dosetaksel (B), 20 μ M bileşik-75 (C) ve 5 μ M dosetaksel + 20 μ M bileşik-75 (D) ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsü analizi.

MDA-MB-468 hücrelerinin 1.2 nM dosetaksel, 5 μ M bileşik-75 ve dosetaksel+bileşik-75 ile inkübasyonu sonucunda, hücre döngüsü üzerinde belirgin bir değişiklik izlenmedi. Kontrolle karşılaştırıldığında G1, S, G2/M fazlarının hiçbirinde değişiklik gözlenmedi. Şekil 4.35'de MDA-MB-468 hücrelerinin dosetaksel, bileşik-75 ve dosetaksel+bileşik-75 ile inkübasyonu sonucundaki hücre döngüsü dağılımı gösterilmektedir. Şekil 4.36'da MDA-MB-468 hücrelerindeki akım sitometrik analiz sonucu elde edilen hücre döngüsü dağılımı görülmektedir.

GST P1-1 (-) MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ve bileşik-75 hücre döngüsünde duraklamaya neden olurken, kombine olarak dosetaksel ve bileşik-75 kullanımı sentez basamağında hafif bir artışa neden olmaktadır (şekil 4.33). Buna karşın bileşikler tekli ve kombine olarak MDA-MB-468 hücreleri üzerinde sentez basamağında herhangi bir etki göstermemektedir (şekil 4.35).



Şekil 4.35. MDA-MB-468 hücrelerinin dosetaksel (1.2 nM), bileşik-75 (5 μ M) ve kombine ilaçlarla hücre döngüsüne etkisi.



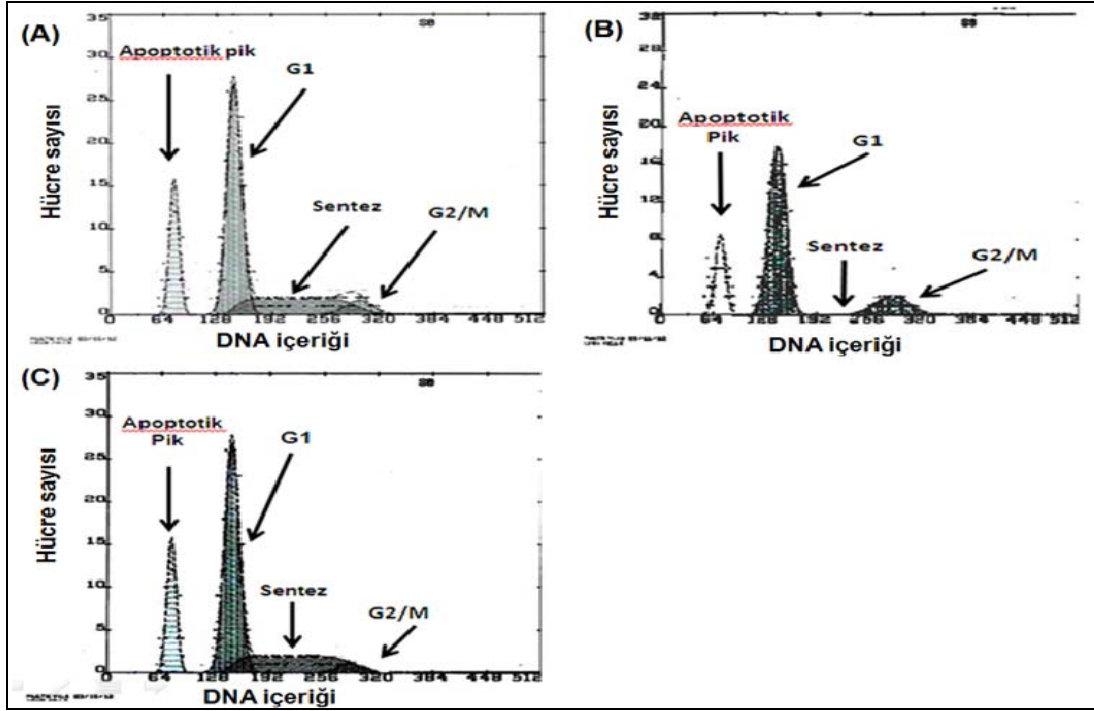
Şekil 4.36. Kontrol (A), 1.2 nM dosetaksel (B), 5 μ M bileşik-75 (C) ve 1.2 nM dosetaksel + 5 μ M bileşik-75 (D) ile inkübe edilen MDA-MB-468 hücrelerinde hücre döngüsü analizi.

Sonuç olarak, GST P1-1 (+) MCF-12A, MDA-MB-231 ve GST P1-1 (-) MCF-7 hücrelerinde dosetaksel hücre döngüsünde duraklamaya neden olurken, aynı oranda etki ile kombine olarak dosetaksel ve bileşik-75 kullanımının hücre döngüsünü G1 fazında duraklattığı, sentez fazındaki hücre sayısını azalttığı görüldü. Bileşik-75 ise bu hücreler içerisinde sadece MDA-MB-231’de herhangi bir etki göstermedi. Buna karşılık, bileşiklerin tekli ve kombine olarak MDA-MB-468 hücreleri üzerinde hücre döngüsünün hiçbir basamağında herhangi bir etki göstermediği saptandı (tüm histogramlar).

4.5.2. Apoptoz Analizi

Apoptoz deneylerinde de, meme kanser hücre dizileri olan MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468 ve normal meme epitel hücre dizisi olan MCF-12A hücreleri kullanıldı. Bu hücreler; dosetaksel, bileşik-75 ve dosetaksel+bileşik-75’in MTT deneyi sonucunda belirlenen subtoksik derişimlerinde 48 saat inkübe edildi ve akım sitometri yöntemiyle sub G1 pikinin varlığına göre apoptotik hücrelerin oranı belirlendi.

MDA-MB-231 hücrelerinin tek başına 50 µM dosetaksel ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda %19.7 oranında apoptozisi gösteren sub G1 piki bulundu. Hücrelerin, 50 µM dosetaksel+ 20 µM bileşik-75 ile birlikte 48 saatlik inkübasyonu sonucunda da % 20 oranında sub G1 piki bulundu (şekil 4.37 (A) ve (B)). Kontrolde ve tek başına bileşik-75 ile muamele edilen hücrelerde apoptotik pik gözlenmedi. MCF-7 hücrelerinin, 5 µM dosetaksel + 20 µM bileşik-75 ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda % 21.35 oranında apoptozisi gösteren sub G1 piki bulundu. Diğer koşullarda apoptoz tespit edilemedi. MDA-MB-468 ve normal meme epitel hücre dizisi olan MCF-12A hücrelerinde, apoptozisi gösteren sub G1 piki tespit edilemedi (şekil 4.37.C).



Şekil 4.37. Meme kanser hücrelerinde apoptoz analizi. MDA-MB-231 hücrelerinin (A) 50 µM dosetaksel (B) 50 µM dosetaksel + 20 µM bileşik-75 ve MCF-7 hücrelerinin (C) 5 µM dosetaksel + 20 µM bileşik-75 ile 48 saat inkübasyonu sonucu gözlenen sub G1 apoptotik pik analizi.

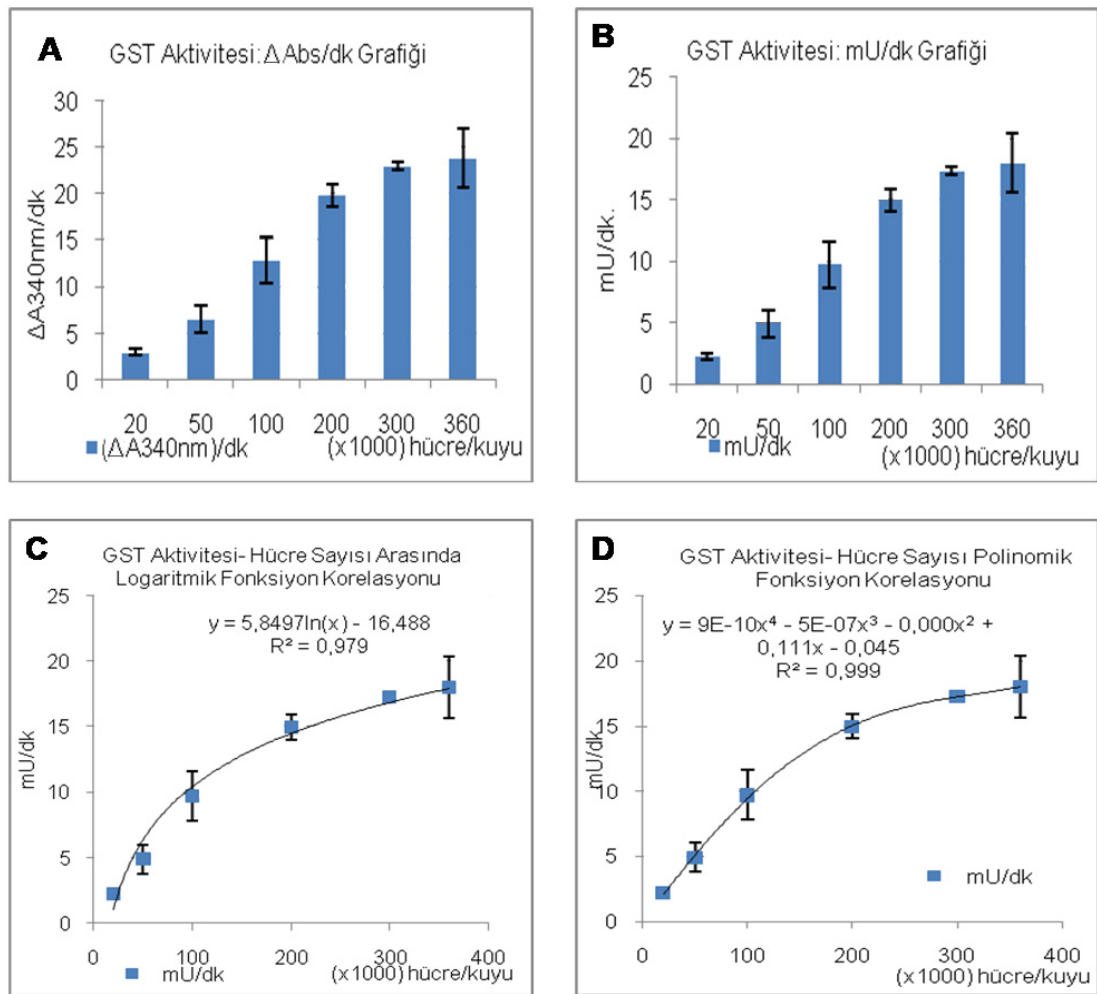
4.6. Hücrelerde GST Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda, 96-kuyulu plaklara ekilen hücrelerin lizatlarında GST aktivitesi ölçülebilirliği incelenmiştir. Şekil 4.38 A ve B’de görüldüğü gibi 20.000-100.000 hücre/kuyu koşullarında lizat GST aktivitesi düzgün bir şekilde artarken 200.000 hücre/kuyu koşullarında hız yavaşlamakta, 300.000 ve 360.000 hücre/kuyu koşullarında ise lizatlardaki GST aktivitesi neredeyse maksimum hıza ulaşmaktadır.

Hücre sayısı ile lizat - GST aktivitesi arasındaki logaritmik ve polinomik fonksiyon regresyonları da (sırasıyla, R^2 : 0.979 ve R^2 : 0.999) yine kuyu başına hücre sayısının 200.000 den sonra doygunluğa ulaşmaya başladığını göstermektedir (şekil 4.38. C,D).

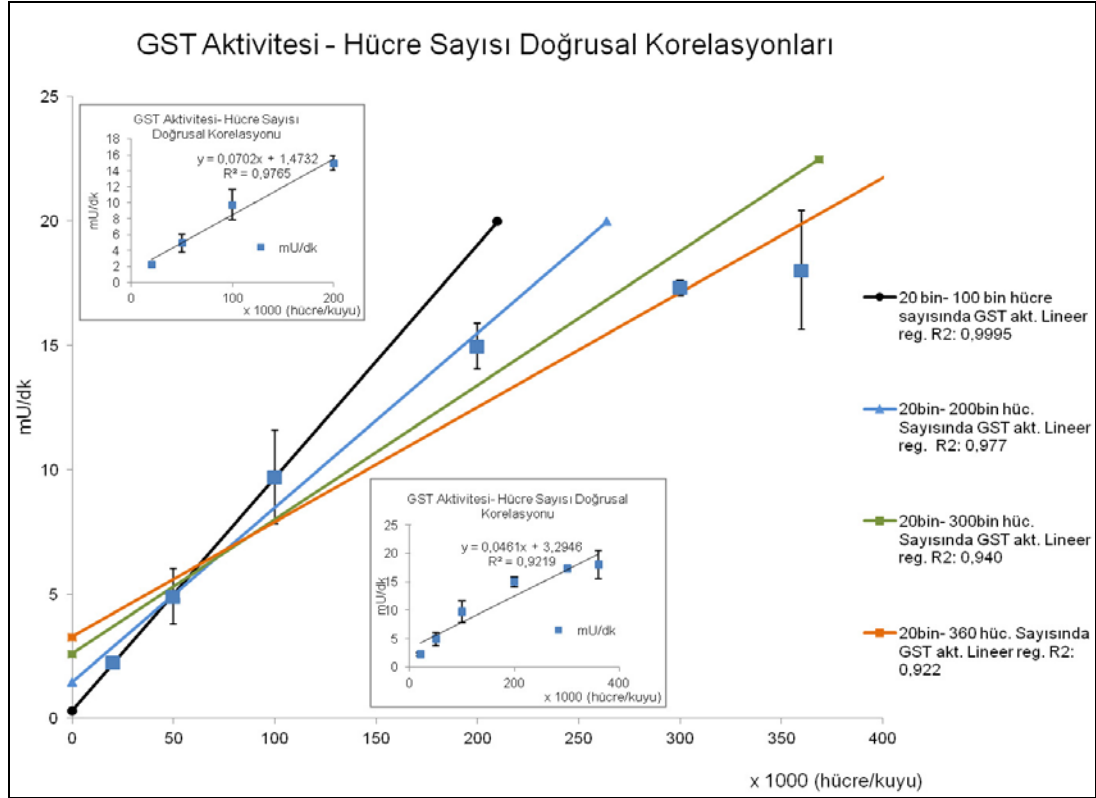
Bu çalışmada neticesinde, bölünme periyodu (doubling time) 20 saat civarında olan hücre hatlarında kısa süreli inhibisyon çalışmaları için, yani 24

veya 48 saatlik inkübasyonlarda, 96-kuyulu plaklarda hücre ekiminin, kuyu başına 20.000-50.000 arasındaki sayılarda yapılabileceği gösterilmiştir. 200.000 ve daha fazla sayıda hücre ekiminde lizat- GST aktivitesindeki doğrusal korelasyonun azalması, 96-kuyulu plakların kapasitesinin aşıldığının bir göstergesidir. Bu verilere göre, bundan sonra gerçekleştirdiğimiz bütün inhibisyon deneylerimizde 96-kuyulu plaklarda hücre ekimleri 20.000 hücre/kuyu olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 4.38. Hücre ekimi yapılan 96-kuyulu plakada, hücre sayısındaki artışa bağlı olarak lizatlarda GST aktivitesinin değerlendirilmesi. **A)** GST aktivitesi, Δ A340nm/dk **B)** GST aktivitesi, mU/dk **C)** Hücre sayısına bağlı lizat GST aktivitesinin logaritmik fonksiyonu; **D)** Hücre sayısına bağlı lizat GST aktivitesinin polinomik fonksiyonu.

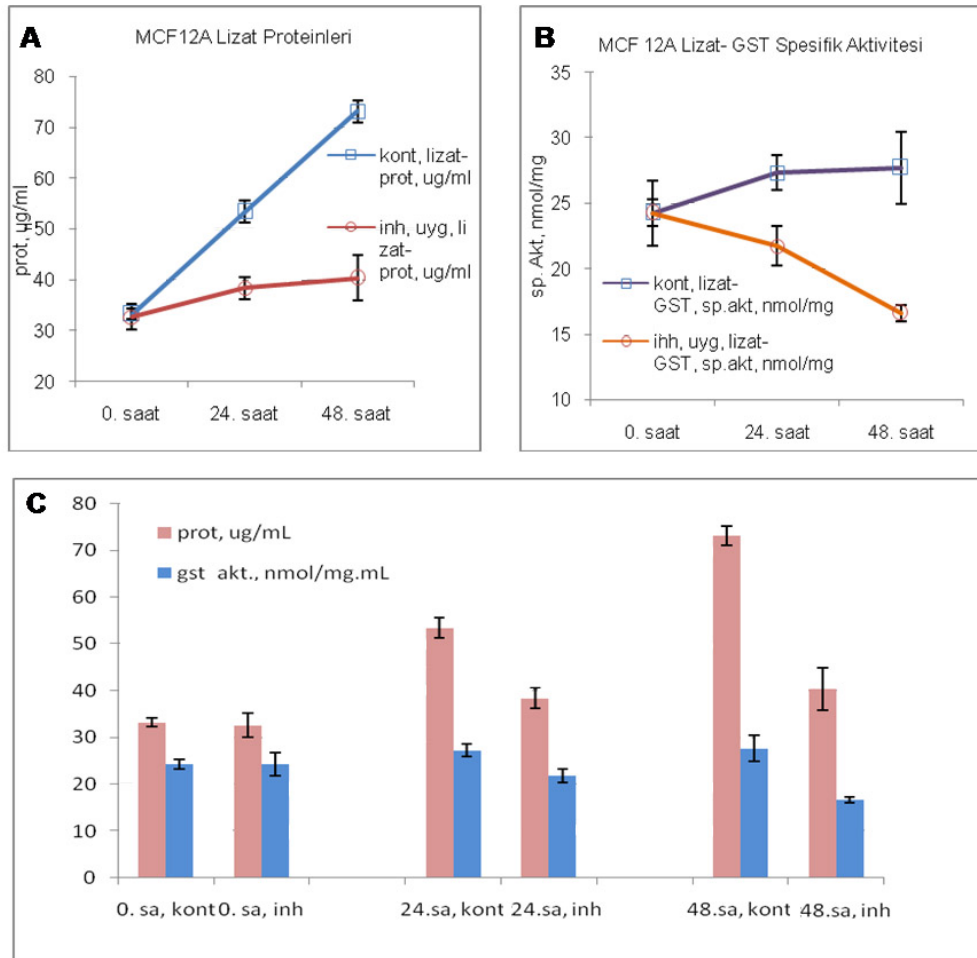
96-kuyulu plaklarda, kuyu başına 20.000 ile 100.000 arasındaki sayıda hücre ekimleri ve lizat GST aktivitesi arasında tam doğrusal pozitif bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir (şekil 4.39. R^2 : 0.999).



Şekil 4.39. Hücre sayısına bağlı lizat GST aktivitesinin doğrusal korelasyonları.

Bileşik-75 daha önce belirlenmiş olan, IC_{50} dozunda MCF-12A hücrelerine uygulanmış, 0., 24. ve 48. saatlerde, deney grubuna karşılık hazırlanan bileşik uygulaması yapılmamış kontrol grubuyla birlikte hücre lizat örnekleri elde edilmiştir. Bu örneklerden total protein miktarları ve GST spesifik aktivite değerleri belirlenmiştir. Şekil 4.40A ve C'de görüldüğü gibi kontrol grubu hücre lizatlarının protein miktarları düzgün bir şekilde artarak 24 saat inküsyonda yaklaşık % 61'lik, 48 saat inkübasyon sonunda ise yaklaşık % 120'lik bir artış göstermiştir. Bileşik-75 uygulanan hücre

gruplarında ise, lizat protein miktarları 24 saat inkübasyonda yaklaşık % 18'lik, 48 saat inkübasyon sonunda ise yaklaşık % 24'lük bir artış göstermiştir. Bileşik uygulanan grupların kendi kontrol gruplarına göre rölâtif protein değerleri, yani % deney grubu protein/kontrol grubu protein değerleri 0., 24. ve 48. saatlerde sırasıyla, yaklaşık % 98, % 72, % 55 şeklindedir. Şekil 4.40B ve C'de görüldüğü gibi, 0., 24. ve 48. saatlerde kontrol grubunun lizat - GST spesifik aktivitesi belirgin bir değişiklik göstermezken, bileşik-75 uygulanan grupta 24. ve 48. saatlerde oldukça belirgin bir spesifik aktivite azalışı mevcuttur. Öyle ki, 0., 24. ve 48. saatlerdeki her bir zaman diliminde, bileşik-75 uygulanan grubun, kendi kontrol grubuna göre rölâtif spesifik aktivite değerleri, sırasıyla, % 100, % 80, % 60'dır.



Şekil 4.40. Hücre lizatlarında total protein ve GST spesifik aktivite değişimleri. **A)** Total protein değişimleri; **B)** GST spesifik aktivite değişimleri; **C)** Hücre lizatlarındaki total protein ve GST spesifik aktivite değişimleri birlikte gösterimi

5. TARTIŞMA

Glutasyon transferazlar endojen ve eksojen kaynaklı ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlayan faz II enzim ailesinin bir üyesidir. GSH transferaz aktivitesi gösteren bu enzimler sitozolik, mitokondriyel ve mikrozomal olmak üzere üç gruptan oluşmaktadır. Sitozolik GST'ler için aminoasit dizi benzerlikleri, substrat özgüllükleri, immünolojik reaktivitelerine bağlı olarak günümüze kadar memelilerde 7 sınıf (alfa, mü, omega, pi, sigma, teta, zeta) tanımlanmıştır (11). Son yıllarda çeşitli GST izoenzimleri ile yapılan çalışmalar bu enzim grubunun yeni bir rolünü ortaya koymuştur. Özellikle alfa, mü ve pi izoenzimlerinin sinyal iletiminde rol oynadığı, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre ölümünü kontrol etmede önemli sinyal proteinleri ile interaksiyona girdikleri gösterilmiştir (60-62). GST izoenzimleri içerisinde özellikle GST P1-1'in birçok kanser hücresinde yüksek oranda eksprese olduğunun saptanması ve tümör hücrelerinde antikanser ilaçlara karşı direnç gelişimi ile ilişkilendirilmesi, araştırmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur (63). Bu amaçla GST P1-1 inhibisyonu gösteren ve hücre zarında yer alan ilaç taşıyıcıları ile interaksiyona girmeyen hidrofobik karakterli yeni pro-apoptotik ajanların tasarlanması önem kazanmıştır.

GST P1-1, apoptotik döngü kontrolünde rolü olan c-jun N-terminal kinaz (JNK) ve diğer bazı protein kinazların baskılayıcısı olarak da tanımlanmaktadır (60,64). Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar GST P1-1 inhibitörlerinin terapötik ajan olarak kullanılmasının yararlı olacağı yönündedir. Günümüze kadar bu amaçla üretilen olası inhibitör moleküllerle ilgili birçok çalışma mevcuttur (44,65). Bu çalışmada da benzoksazol, benzimidazol ve benzotiyazol türevi bileşikler sentezlenmiş ve GST P1-1'e yönelik potansiyel inhibitör etkileri araştırılmıştır. Bu tür bileşiklerin seçilme nedenlerinden biri daha önceki çalışmalarda benzotiyol türevi bileşiklerin farmakolojik mekanizmasının açıklanması, ancak meme kanseri hücrelerine karşı etkilerinin tespit edilmemiş olmasıdır (66). Sözkonusu bileşiklerin topoizomeraz inhibitörü ve antimikrobiyal etkiye sahip moleküller olduklarını gösteren çalışmalar da mevcuttur (67,68). Aynı zamanda literatürde bazı antimikrobiyal madde olarak kullanılan bileşiklerin

düşük de olsa GST'ler üzerinde inhibisyon gösterdiğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır (69).

Bu çalışma kapsamında benzotiyazol, nitrofenil, benzimidazol, benzoksazol halkası içeren, yan gruplarında değişkenlik gösteren benzer yapılarda 124 tane bileşik sentezlendi. Bu bileşiklerin GST P1-1 üzerindeki inhibitör etkilerine bakıldı (Tablo 4.1). Bu bileşikler içerisinde bazıları düşük ya da sıfır inhibisyon göstermeleri, substrat ile nonenzimatik etkileşime girmeleri, ölçüm ortamında türbidite oluşturmaları ve nitro grubu içeren bazı bileşikler de ölçüm ortamında sarı renk oluşturmaları gibi nedenlerden dolayı elendi. Enzim kinetiği çalışmalarında en iyi inhibisyon gösteren molekülün bir benzoksazol türevi olan bileşik-75 (N-[2-(4-kloro-benzil)-benzooksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamid) olarak adlandırdığımız, molekül olduğu tespit edildi. Enzim kinetiği sonuçlarına göre bileşik-75'in hGST P1-1 için yaklaşık 10 μM civarında IC_{50} değerine sahip olduğu saptandı. Literatürdeki GST P1-1 inhibitörlerinden hematin 5 μM , tribültin bromür 6 μM ve S-heksilglutatyon 20 μM IC_{50} değerine sahiptir (69). O nedenle, IC_{50} değeri oldukça düşük olduğundan ileri çalışmalar için bileşik-75 uygun bir inhibitör olarak seçildi. Molekülün enzimi ne şekilde inhibe ettiğini belirlemek için substratlarına göre inhibisyon tipi belirlendi. Bileşik-75, GSH'a göre 6.05 μM K_i değeri ile karışık tip inhibisyon, CDNB'ye göre 11.83 μM K_i değeri ile de unkompetitif inhibisyon göstermektedir. Diğer bir ifade ile bu bileşik inhibisyon etkisini enzimin GSH bağlanma bölgeleri dışında bir bölgeye bağlanarak gerçekleştirmektedir. Bu bulgu kendi tasarımı olan bileşik-75'in GST P1-1 için spesifik bir inhibitör olduğunu da ispatlamaktadır. Bu bulgular GST P1-1 için bilinen en iyi inhibitörlerden biri olan ve karşılaştırmalı referans molekülü olarak kullandığımız etakrinik asite yakın sonuçlardır. Etakrinik asit 10.37 μM IC_{50} değerine sahiptir ve 2.2 μM 'lık K_i değeri ile GSH'ye göre karışık tip inhibisyon gösterdiği saptanmıştır. Etakrinik asit iyi bir inhibitör olmasına rağmen literatürde kinetik çalışmalarıyla ilgili, özellikle inhibisyon tipi, IC_{50} ve K_i değerleri gibi verilerde çok farklı sonuçlar yer almaktadır (70,71), ancak toksisiteleri ve diüretik etkilerinden dolayı klinikte kullanımları son derece sınırlıdır (72). Bu yüzden GST P1-1'i kuvvetli inhibe eden, hücre

membranlarından kolayca geçebilecek hidrofobik karakterli bileşiklerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu projede GST inhibisyonu yönünden daha aktif olması ihtimali ile GSH ile konjuge olmayan, lipofilik özellikleri nedeniyle de hücre membranını kolaylıkla geçebilen bileşiklerin çalışılması uygun bulunmuştur. Bu nedenle daha önce heterosiklik çekirdek taşıyan yapıları sayesinde kemoterapötik aktiviteye sahip olan benzoksazol, benzimidazol, benzotiyazol türevi bileşikler sentezlenmiştir.

Kanser tedavisinde çoklu ilaç direncinin ortadan kaldırılabilmesi için, geliştirilen ilaçların tek veya ikili (kombine) olarak kanser hücreleri üzerinde etkileri incelenmektedir (73,74). Bu çalışmada meme kanser hücreleri üzerinde etkili olduğu kanıtlanmış dosetaksel ve GST P1-1 inhibitörü olarak ajanımız bileşik-75'in hücreler üzerinde etkileri araştırmıştır. Dosetaksel, taksan sınıfı bileşiklerin bir türevi olup meme kanseri tedavisi için kullanılan etkili antikanser ilaçlardan bir tanesidir. Etkisini, hücre içerisinde tübülünlerin mikrotübüllere toplanmasını artırmak ve depolimerizasyonu inhibe ederek serbest tübülünlerin oluşmasını engellemek suretiyle mikrotübülleri stabilize ederek göstermektedir (75,76). Literatürde benzer şekilde dosetakselin yalnız veya başka bileşiklerle beraber olarak uygulandığı pek çok çalışma yer almaktadır (77,78).

Kanser hücrelerinde GST pi, alfa ve mu izozimlerinin ekspresyonları antikanser ilaçlara karşı direnç gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (79,80). Özellikle GST P1-1 meme kanserleri ile ilgili yapılan pek çok çalışmada en fazla ekspresyonu olan izozim olarak bulunmuştur (81,82). Çalışmamızda meme kanser hücre dizileri olarak MCF-7, BT-474, MDA-MB-231, SKBR-3, HCC-38, ZR-75-1, T47D, MDA-MB-468 ve normal meme epiteli MCF-12A kullanıldı. Bu hücreler içerdikleri GST P1-1 miktarları açısından incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinde düşük, MCF-12A ve HCC-38 hücrelerinde yüksek miktarda protein bantları gözlemlendi. Armstrong ve arkadaşlarının verileriyle tutarlı olan sonuçlarımız neticesinde (81) daha sonraki çalışmalar için MCF-12A ve MDA-MB-231 hücreleri GST P1-1 ekspresyonu gösteren (GST P1-1 (+)), MDA-MB-468 ve MCF-7 hücreleri de GST P1-1 ekspresyonu göstermeyen (GST P1-1 (-)) hücreler olarak

araştırma kapsamına alındı. 1980'lerin sonlarında primer meme kanser hücreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda GST P1-1 ile östrojen reseptör proteini (ER) seviyesinin ters ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (83,84). Ancak literatürde ER ile GST P1-1 arasında hem protein seviyesinde hem de mRNA seviyesinde herhangi bir ilişkinin bulunmadığına dair veriler de bulunmaktadır (82). Klinik çalışmalarda da hormonal seviyede bu iki protein arasında bir ilişki bulunmadığına dair veriler vardır (82,85). Bizim çalışmamızda kullanılan hücreler içerisinde MCF-7, ZR-75-1, BT-474 ve T47D hücreleri ER ekspresyonu göstermekte, diğerlerinde ise ekspresyon bulunmamaktadır. Çalışmamızda ER ekspresyonu göstermeyen hücreler içerisinde yalnızca MCF-12A ve HCC-38'de yüksek GST P1-1 ekspresyonu, MDA-MB-231'de ise normal seviyelerde ekspresyon gözlenmiştir, fakat diğer hücrelerde herhangi bir ekspresyon bulunmamaktadır. Sonuçlarımıza göre protein seviyesinde ER ekspresyonu ile GST P1-1 ekspresyonu arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Başka bir ilginç nokta ise tümörjenik olmayan transforme meme epiteli hücreleri olan MCF-12A'da, diğer hücelere oranla daha fazla GST P1-1 ekspresyonu olmasıdır. Literatürde MCF-12A hücrelerinde GST P1-1 ekspresyonu ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır, ancak genel olarak kanser hücrelerinde özellikle GST P1-1'in normal hücelere oranla yüksek ekspresyona olduğu rapor edilmektedir (86). Bizim çalışmalarımız sonucunda ER ekspresyonu göstermediği halde MCF-12A hücrelerinde yüksek GST P1-1 ekspresyonu gözlenmiştir. MCF-12A hücreleri transforme hücrelerdir yani hücreler ortam koşullarına uygun hale gelebilmek için yapısal formunda değişikliğe giderek sürekli çoğalmaktadırlar ve bu şekilde bir bakıma yarı kanser hücresi karakteri kazanmış oldukları düşünülebilir (87). Belki bu şekilde çevresel şartlardan dolayı hücre proteinlerinde özellikle detoksifikasyondan sorumlu GST ailesinin ekspresyonlarında da değişim söz konusu olabilir.

GST izoenzimlerine spesifik inhibitörlerin, antineoplastik ajanların sitotoksik potansiyelleri üzerindeki etkilerini araştırmak için, yüksek düzeyde belirli bir GST izoenzimi ekspresyona eden hücre hatlarının geliştirilerek kullanılması gerekmektedir. Bu şekilde doksorubisine duyarlı hücelere GST

P1-1 ve GST A formlarını kodlayan cDNA'ların transfeksiyonu gerçekleştirildiğinde, bu hücrelerde doksorubisine karşı direncin geliştiği gözlenmektedir (88,89). Dirençli olarak izole edilen Adr^RMCF-7 (Adriamisine dirençli MCF-7) hücrelerinin, bilinen atasal MCF-7/wt hücrelerine göre 30-65 kat daha dirençli olduğu bulunmuştur. GST P1-1 ekspresyonunun antisens teknoloji ile azaltılması veya farmakolojik olarak geliştirilen inhibitörlerle GST aktivitesinin baskılanması ile doksorubisine duyarlılığın arttığı saptanmıştır (90,91).

Meme kanseri tedavisi için dosetaksel, tek veya doksorubisin gibi bileşikler ile kombine olarak uzun süredir kullanılmaktadır (78,92). Çalışmamızda MTT hücre canlılığı deneyi ile dosetaksel ve bileşik-75'in subtoksik dozları saptandı. Dosetaksel, MCF-12A ve MDA-MB-231 için 50 µM, MCF-7 için 5 µM ve MDA-MB-468 için 1.2 nM, bileşik-75 ise MCF-12A için 40 µM, MDA-MB-231 ve MCF-7 için 20 µM, MDA-MB-468 için 5 µM derişimleri subtoksik etkili dozlar olarak seçildi. Tek olarak dosetaksel veya bileşik-75 ile 48 saat inkübe edilmiş tüm hücrelerde belirlenen subtoksik dozların üzerine çıkıldığında hücrelerde canlılık azaldığı gözlemlendi. Hücre canlılığı sonuçlarına göre subtoksik dozda dosetaksel ve artan derişimlerde bileşik-75'in beraber olarak uygulandığı MCF-12A ve MCF-7 hücrelerinde aditif etki, MDA-MB-231 hücrelerinde antagonistik etki gözlenirken MDA-MB-468 hücrelerinde ise herhangi bir etki saptanmadı. İlginç olarak MDA-MB-468 hücrelerinde ise dosetaksel için bulunan subtoksik derişim olan 1.2 nM'da hücre canlılığı yaklaşık % 60 iken, 10 nM'da % 40 seviyelerine düştüğü ve deney 120 µM yani 10⁵ kat kadar yüksek derişimlere çıkılarak tekrarlandığında da canlılığın yine aynı seviyede sabit kaldığı gözlemlendi (sunulmamış veri). MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinin dosetaksele duyarlı olmalarının nedeni dosetakselin normalde ER negatif kanser hastalarında tedavi amaçlı kullanılmalarıdır (93,94). Yapılan bir çalışmada MDA-MB-468'de kinesin KIFC3 aşırı ekspresyonu ile tübülün seviyesi artırılmış ve bu şekilde hücrelerin dosetaksele olan duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (95). GST P1-1 ekspresyonu göstermeyen ER(+) MCF-7 hücrelerinde bileşik-75'in mikromolar seviyelerde hücre çoğalmasını inhibe edici etki göstermesi

bileşik-75'in bir antagonist ER ligandı gibi davranabileceği olasılığını düşündürmektedir. ER ligandı olan östradiolün GST inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir (96). Hidrofobik bir yapısı olan bileşik-75'in de ER'ye bağlanması ve antiöstrojen etkiye sebep olması beklenebilir. Daha sonraki çalışmalarda bileşik-75'in antiöstrojen etkisinin olup olmadığının araştırılması, bileşiğin moleküler hedeflerinin daha iyi tanımlanması açısından önemlidir.

Hücre canlılığı deneylerinin sonuçları GST P1-1 (+) MCF-12A ve MDA-MB-231 hücrelerinin GST P1-1 (-) hücrelere oranla dozetaksel ve bileşik-75'e daha dayanıklı olduğunu göstermiştir. Bu dayanıklılık hücrelerin GST P1-1 ekspresyon seviyelerinin yüksek olması ve buna bağlı olarak da ilaç dirençli olmalarına bağlı olabilir.

Hücre proliferasyonu deneyleri 40.000 hücre kullanılarak ve subtoksik dozlardaki bileşiklerle 48 saatlik inkübasyon sonucunda akım sitometri cihazında hücre sayılarak yapıldı. Sonuçlara göre tek olarak dozetaksel ve bileşik-75 kullanımının MCF-12A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azalttığı, birlikte kullanımlarının ise hücre proliferasyonunu etkilemediği saptandı. İlginç olarak bileşiklerin hiçbirinin MDA-MB-468 hücrelerinin proliferasyonu üzerine ne tek, ne de kombine olarak etkisi gözlenmedi.

Dosetaksel mikrotübülleri stabilize edici bir ajan olup meme ve prostat kanserlerinde kullanımı kabul görmüş bir ajandır (97). Etkisini daha çok hücre canlılığı, hücre döngüsünde duraklama ve hücre ölümü gibi ana hücresel olayları etkileyerek göstermektedir (98). Hücre döngüsü sonuçlarına göre, MCF-12A, ve MCF-7 hücrelerinde dozetaksel ve bileşik-75 hücre döngüsünde duraklamaya neden olurken, aynı etkiyi kombine olarak dozetaksel ve bileşik-75 inkübasyonu sonucunda da göstermesi bu hücrelerin dozetaksel ve bileşik-75'e karşı sensitif olduklarını ve hücre büyümesi üzerinde inhibisyon yaptıklarını da düşündürmektedir. Literatürde, aynı hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda sitotoksik etkisi olan farklı bileşiklerin mikrotübül depolimerizasyonunu etkileyerek hücre döngüsünün G1 veya G2/M'de duraklamasına neden olduğu gösterilmiştir (99). Buna

karşılık MDA-MB-231’de dosetaksel hücre döngüsünde duraklamaya neden olurken, bileşik-75 herhangi bir etki göstermemektedir. MDA-MB-468 hücrelerinde de hücre döngüsü üzerinde bileşiklerin herhangi bir etki göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar da, bileşik-75’in MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde, dosetakselin ise yalnızca MDA-MB-468 hücrelerinde hücre döngüsünde duraklamaya sebep olmadığını gösterdi.

Birçok meme kanseri hücresi kanser ilaçlarının apoptotik etkisine direnç göstermektedir. Yalnız dosetaksel gibi taksan türevi bileşikler apoptotik etkiye neden olan nadir ajanlardan birisidir (100,101). Bu apoptotik etkiler daha çok hücreler içerisinde bcl-2, p21, p53 gibi genlerdeki değişimler ile farklılık göstermektedir (102-104). Bizim çalışmamızdaki sonuçlara göre bileşiklerin hücreler üzerinde apoptotik etkilerine bakıldığında dosetaksel ve bileşik-75’e duyarlı olan MDA-MB-231 hücrelerinde tek başına 50 µM dosetaksel ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda % 19.7 oranında apoptoz, 50 µM dosetaksel + 20 µM bileşik-75 uygulamasında % 20 oranında apoptoz gözlenmesi bileşik-75’in apoptoz gelişimine katkı sağlamadığını göstermektedir. MCF-7 hücrelerinin, 5 µM dosetaksel + 20 µM bileşik-75 ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda % 21.35 oranında apoptozu gösteren sub G1 piki gözlenirken, bu hücrede diğer koşullarda ve MDA-MB-468 hücrelerinde apoptoz tesbit edilmemiştir. Dosetaksel ve bileşik-75’e duyarlı olan MCF-12A hücrelerinde apoptotik etkinin tespit edilememesi oluşan hücre ölümünün farklı mekanizmalarla meydana gelebileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada dosetakselin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozdan farklı olarak kromozomların ayrışması ve anormal mitoz oluşumu ile karakterize edilen mitotik yıkım ile hücreleri öldürdüğü rapor edilmiştir (105). Bizim sonuçlarımızda yalnızca MCF-7 hücrelerinde bileşik-75 ve dosetakselin beraber kullanımının hücreleri apoptozise götürdüklerini göstermektedir.

Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümüne girmelerine engel olan nedenlerden biride JNK’nın bloke edilmesinde rolü olduğu düşünülen GST P1-1 izozimidir. JNK’lar çevresel stres, proinflamatuvar sitokinler, UV gibi faktörlere bağlı olarak c-JUN’un fosforilasyonu ile aktif hale gelmekte ve

hücreleri apoptoza götürmektedir (106,107). Literatürde GST P1-1 ile JNK arasındaki protein-protein etkileşimini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (65,108). Çalışmamızda GST P1-1 eksprese eden tüm hücrelerde c-jun ekspresyonu tespit edilememiş, bu nedenle GST-JNK etkileşimini gösteren immünopresipitasyon deneyleri yapılamamıştır. Araştırmacıların çoğu bu düşünceden yola çıkarak GST P1-1 inhibitörleri üretme çabasına girmişler ve bu yolla JNK üzerindeki baskıyı ortadan kaldırarak hücreleri özellikle kanser hücrelerini apoptoza sokmaya çalışmışlardır (52).

In vitro enzimatik kinetik deneylerinde GST P1-1 için etkili bir inhibitör olarak tanımlanmış olan bileşik-75'in, hücredeki GST aktivitesine etkisini belirlemek için, western blot çalışmalarında GST P1-1 proteinini eksprese ettiği tespit edilen MCF-12A hücreleri kullanılmıştır. Hücelere 40 µM bileşik-75 uygulaması neticesinde, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, lizat total proteinleri % 28 ve % 45 daha düşük bulunmuştur. Hücre lizat total-protein değerleri çoğalan hücre miktarlarıyla doğru orantılı olmalıdır ve bu nedenle protein değerleri sonuçlarına göre bileşik-75 MCF-12A hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde inhibe etmiştir. İlginç bir şekilde, 48. saatteki 40 µM bileşik-75 uygulamasında gerçekleşen, kontrole göre bu protein artışındaki azalma, tamamen farklı kantitatif yöntemlere göre ancak aynı koşullar altında yapılan MTT ölçümlerindeki proliferasyon gerilemesiyle yaklaşık aynı oranda gerçekleşmiştir. Buradan, protein düzeylerinin bileşik-75'in MCF-12A hücrelerinde proliferasyonu baskılaması sonucu ortaya çıktığı sonucuna da varılabilmektedir. 40 µM bileşik-75 uygulaması, MCF-12A lizat-GST spesifik aktivitesinin kontrollerine göre 24 ve 48. saatlerde, sırasıyla % 20 ve % 40 oranında azalmasına neden olmuştur. Hücre lizatı- enzim spesifik aktivitesindeki bu değişimin gözlenebilmesi için lipofilik özelliğe sahip bileşik-75'in, hücre içerisine girebilmesi, belirli derişime kadar birikmesi ve bu enzimle etkileşmiş olması gerekmektedir. Elde edilen sonuçlar genel olarak bunu desteklemektedir. Neticede, bileşik-75 ile 48 saat inkübe edilen hücrelerde total protein miktarında, kontrole göre % 45'lik, enzim spesifik aktivitesinde ise kontrole göre % 40'lık bir azalma saptanmıştır. Yapılan çalışmalara göre hücre lizatlarındaki GST aktivitesi ile protein değerleri

arasındaki değişimin korelasyon içerisinde olması meydana gelen etkinin GST üzerinden olabileceğini göstermektedir.

Anti-kanser ajanlara karşı ilaç direnci gelişiminde, ilaçlara karşı duyarlılık ile total sitoplazmik GST aktivitesi arasında ters korelasyonun olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur. İnsan meme kanseri hücre hatlarının, [Adr^RMCF-7, Hs578T, MDA-MB-231, T47D, MCF-7/wt (MCF-7 wild type) ve MDA-MB-468] alkilleyici bir ajan olan hepsulfama (1,7-heptanediol dislfamat) karşı duyarlılık analizlerinde, klonojenik deneylerde % 90 inhibisyon görülmektedir. Bu duyarlılık ile total sitoplazmik GST aktivitesinin özellikle GST P1-1 izoenzimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (109). Zhu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise antihepatik bir ajan olan bisikloln (4,4-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene-dioxy-2-hydroxymethyl-2'-carbonyl biphenyl), vinkristin ve çapraz olarak taksole dirençli insan somatik epidermal karsinom hücresi Vin^RKB ve adriyamisin dirençli insan meme karsinom hücresi Adr^RMCF-7 hücrelerindeki ilaç direncini büyük oranda geri çevirdiğini, Adr^RMCF-7 hücrelerindeki ilaç birikiminin arttırdığı ve her iki hücre tipinde de hücre lizat GST spesifik aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (110).

Bileşik-75 hücre proliferasyonu inhibisyonunu, GST aktivitesi inhibisyonundan bağımsız veya ilişkili bir şekilde gerçekleştirmiş olabilir. Bileşik-75'in MCF-12A hücre hattı proliferasyonundaki inhibisyon etkisini hangi oranda GST inhibisyonu üzerinden gerçekleştirdiği mevcut sonuçlara göre belli değildir. Canlı hücre miktarının azalması proliferasyon blokajından çok hücre sağkalımının azalmasına bağlanabilir. Ancak, bu azalış sadece GST P1-1 inhibisyonu ile ilgili olmayabilir, zira GST P1-1 (-) olan hücreler de (+)'ler gibi kombine dozetaksel ve bileşik-75 dozlarında efektif şekilde ölmüşlerdir. GST P1-1 (+)'lerde hücre ölümü daha belirgindir. Tüm bu sonuçlara göre literatüre yeni bir bileşik katılmıştır. Bu bileşik GST P1-1 için spesifik bir ajandır ve potansiyel antitümör ajan olarak çalışmalara dahil edilebilir. Bileşik-75'in hücre içerisinde birikimi, inhibisyonun moleküler mekanizmaları ve olası ikincil hedeflerle etkileşimlerinin belirlenmesi ileri çalışmaları gerektirmektedir.

İlaç geliştirme oldukça zaman alıcı ve zorlu bir süreçtir. Hücre içi hedef molekül belirlenmeden ilaç geliştirme programına başlanmamalıdır ve odaklanılacak hedefin mekanizmasının iyi bilinmesi önemlidir. İlaçların hedefleri reseptörler ve taşıyıcı proteinler gibi belirli proteinler olabilir. Genelde prelinik denemeleri yapılan 10.000 bileşikten yalnızca biri klinik denemelere ulaşabilmektedir. Bu amaçla yapılan en etken maddenin bulunması çalışmalarında çeşitli biyokimyasal teknikler ve bilgisayar programlarından faydalanılmaktadır. Bu aşamada ilgilenilen protein saf olarak elde edilip bileşikler varlığında proteinin aktivitesi ölçülür. Etken maddenin klinik deneyleri yapılmadan önce mutlaka in vitro ve hayvan deneyleriyle toksik etkilerinin belirlenmesi, doza ve zamana bağlı etkilerinin incelenmesi gerekir. Prelinik değerlendirme ile uygun bulunan maddeler sağlıklı ve hasta bireyler üzerinde denenmek üzere klinik çalışmalara verilir. Şu ana kadar bu tez kapsamında yaptığımız çalışmalar yukarıda anlatılan prelinik süreçlerin ilk kısmını kapsamaktadır. Yapılan çalışmaları daha ileriye götürebilmek için deney hayvanları üzerinde etkilerin incelenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasının, ilaç geliştirme projesi olarak Anabilim Dalımızda yapılan ilk tez olması bakımından ayrı bir önemi bulunmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bileşik-75 (N-[2-(4-kloro-benzil)-benzooksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamit) hGST P1-1'e karşı kuvvetli inhibisyon gösteren bir bileşiktir. Bileşiğin enzimin aktif bölgeleri dışındaki amino asitler ile de etkileşim gösterdiği ve GST'ler için iyi bir inhibitör olarak tanımlanan etakrinik asit kadar etkili sonuçlar verdiği saptandı. Bileşik-75'in etkilerinin karşılaştırmalı olarak bilgisayarda docking yazılımları ile desteklenmesi elde edilen sonuçları daha kuvvetli kılabilir.

2. Çalışmada toplam 124 tane benzoksazol, benzimidazol ve benzotiyazol türevi bileşik sentezlenmiş ve potansiyel inhibitör etkileri araştırılmıştır. İnhibisyon taramaları oldukça zaman alıcı bir deney işlemidir. Bu yüzden üç boyutlu bilgisayar programları (Chimera, Autodock vs.) kullanılarak ve protein data bankasından çalışılacak enzimin yapısı elde edilerek sanal olarak inhibisyon gösterebilecek moleküllerin etkilerine bakılabilir. Bu şekilde zamandan ve deneysel malzemedan tasarruf sağlanabilir.

3. Benzoksazol halkası taşıyan bileşik-75'in hGST P1-1 üzerinde kuvvetli inhibisyon göstermesi ve hidrofobik karakterli olması kanser hücreleri deneyleri için uygun bir bileşik olduğunu göstermiştir.

4. Hücreler GST P1-1 ekspresyonları açısından incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinde düşük, MCF-12A ve HCC-38 hücrelerinde yüksek miktarda GST P1-1 ekspresyonu olduğu saptanmıştır.

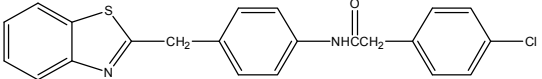
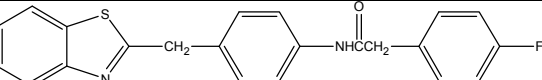
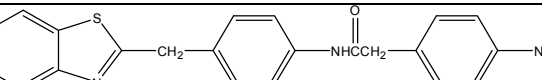
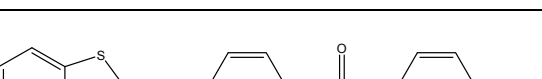
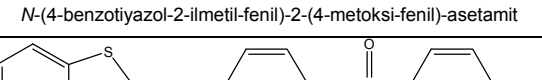
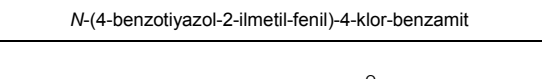
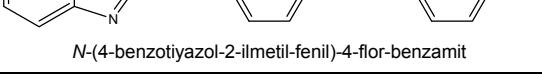
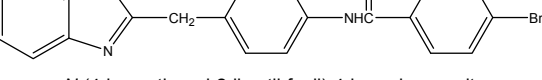
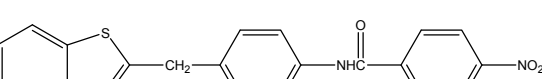
5. İncelenen tüm meme kanser hücrelerinde protein seviyesinde ER ekspresyonu ile GST P1-1 ekspresyonu arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Yanlızca meme kanseri hücresi olmayan MCF-12A'da gözlenen yüksek GST P1-1 ekspresyonu ER ekspresyon eksikliğine bağlanabilir.

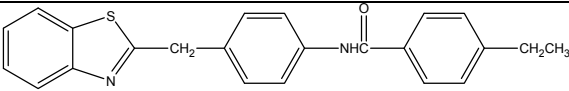
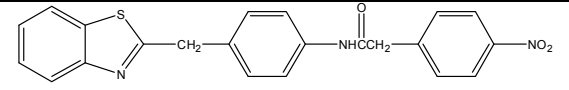
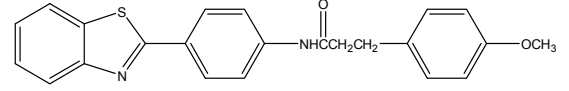
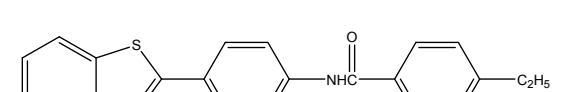
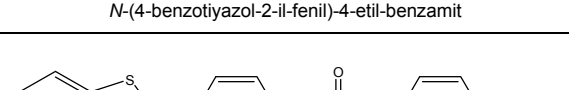
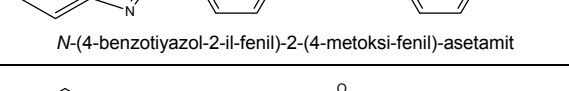
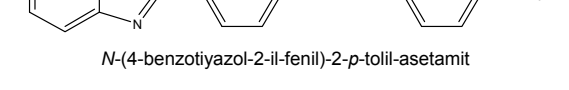
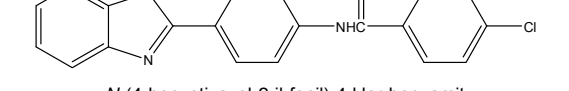
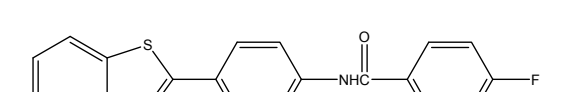
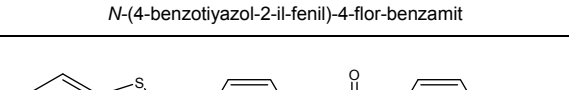
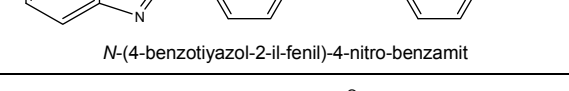
6. GST (+) MCF-12A, MDA-MB-231 ve GST (-) MCF-7 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında dozetaksel ve bileşik-75'in düşük dozlarda sitotoksik etki gösterdiği, ilaçların kombine uygulamalarında ise yalnızca MCF-12A ve MCF-7 üzerinde aditif etki gösterdikleri bulunmuştur. Sitotoksikite mekanizması incelendiğinde hücrelerin, kombine uygulamalarda MCF-7 hücrelerinde apoptotik yolla, MCF-12A hücrelerinde ise daha farklı yollarla ölüme gittikleri görülmüştür. Ancak hücre döngüsü ve apoptoz üzerine etkiler sadece akım sitometri yöntemi ile incelenmiştir. Farklı yöntemlerin uygulanması etki mekanizmasının daha iyi bir şekilde aydınlatılmasını sağlayabilir.

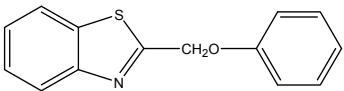
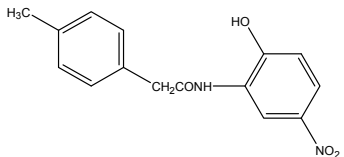
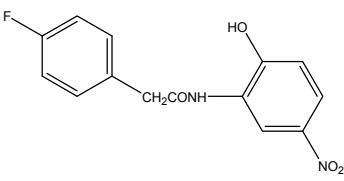
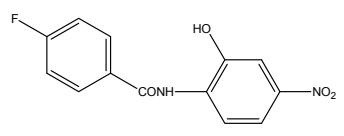
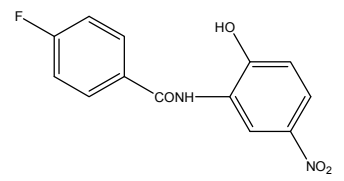
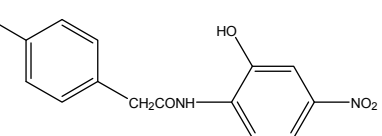
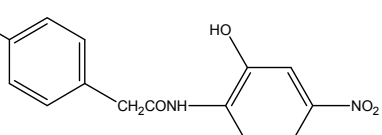
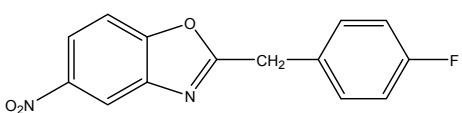
7. Bileşik-75 ile muamele edilmiş MCF-12A hücrelerinden elde edilen hücre lizatlarındaki protein seviyesinin azalmasının hücre proliferasyonunun baskılanması sonucu ortaya çıktığı düşünülmüştür. Lizatlardaki GST spesifik aktivitesinin aynı oranda azalması meydana gelen etkinin GST bağımlı olup olmadığını kesin olarak göstermemektedir.

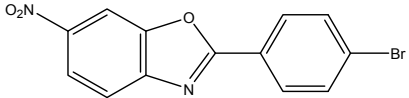
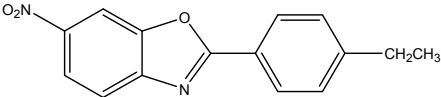
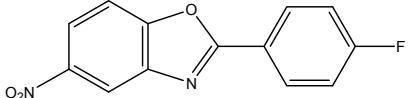
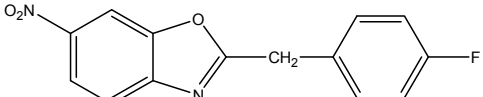
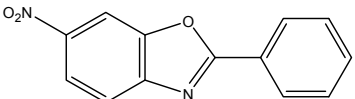
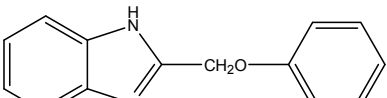
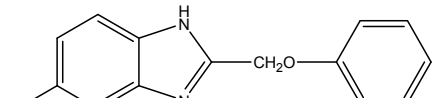
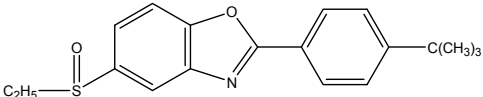
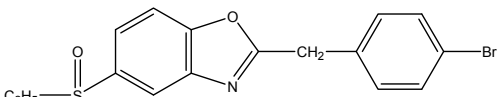
EKLER

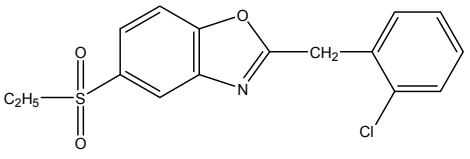
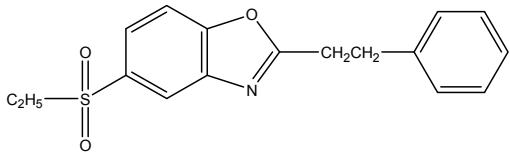
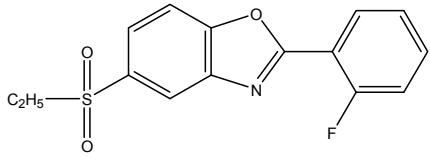
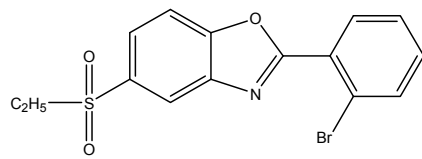
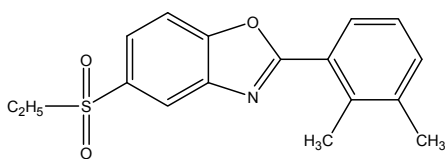
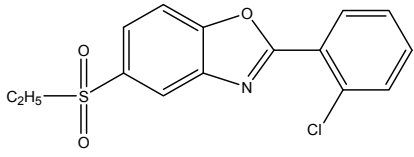
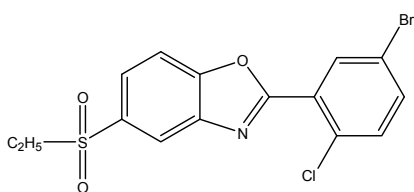
Tablo 4.1. İnsan GST P1-1 üzerindeki inhibisyon etkileri bakılmış benzoksazol, benzimidazol ve benzotiyazol halkası içeren bileşikler.

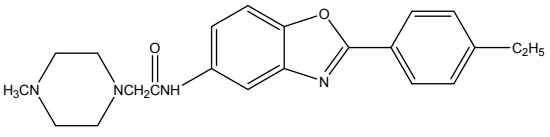
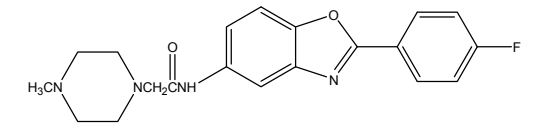
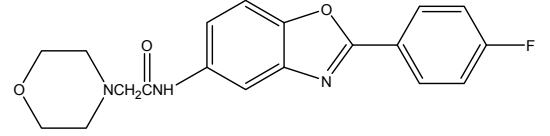
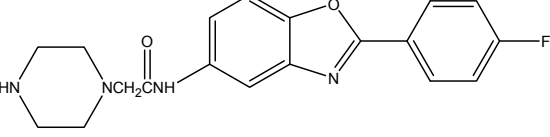
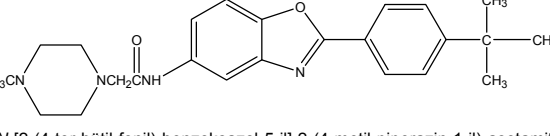
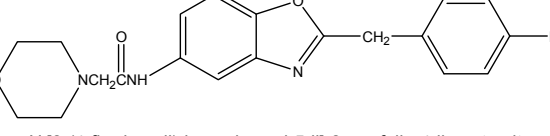
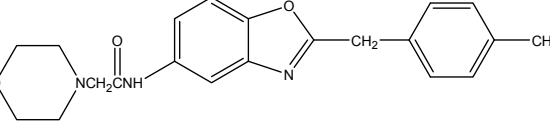
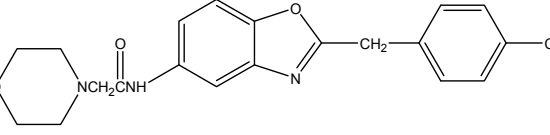
Kod	Molekül	GST P1-1 İnhibisyonu
1 MA 392	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-2-(4-kloro-fenil)-asetamid	Nonenzimatik tepkime var
2 MA 376.4	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-2-(4-flor-fenil)-asetamid	Nonenzimatik tepkime var
4 MA 403.4	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-2-(4-nitro-fenil)-asetamid	Nonenzimatik tepkime var
5 MA 388.4	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-2-(4-metoksi-fenil)-asetamid	Nonenzimatik tepkime var
6 MA 378	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-4-klor-benzamid	Nonenzimatik tepkime var
7 MA 362.4	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-4-flor-benzamid	Nonenzimatik tepkime var
8 MA 423.3	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-4-brom-benzamid	Nonenzimatik tepkime var
9 MA 389.4	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-4-nitro-benzamid	Nonenzimatik tepkime var
10 MA 416	 <i>N</i> -(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-4-sek-bütoksi-benzamid	Nonenzimatik tepkime var

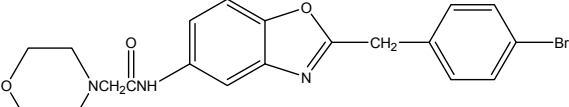
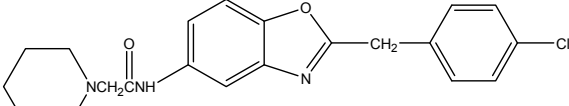
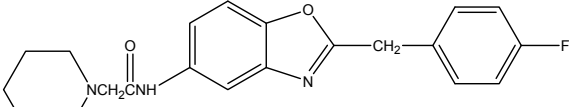
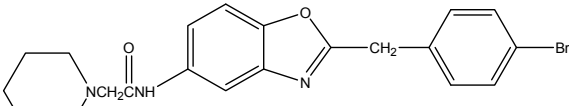
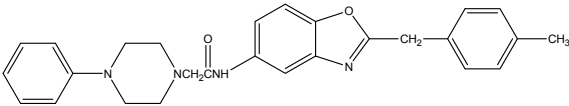
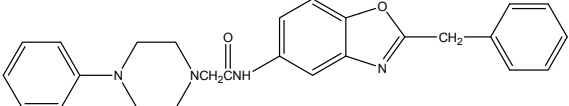
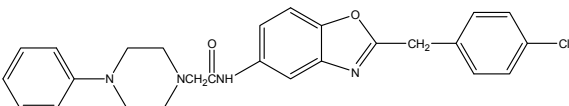
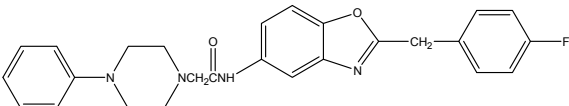
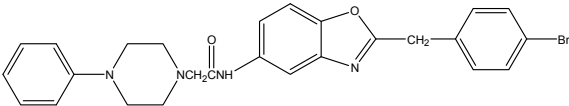
11 MA 372	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-4-etil-benzamit</p>	Nonenzimatik tepkime var
12 MA 389	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-ilmetil-fenil)-2-(4-nitro-fenil)-asetamit</p>	Nonenzimatik tepkime var
13 MA 388	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-3-(4-metoksi-fenil)-propionamit</p>	Nonenzimatik tepkime var
14 MA 358	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-4-etil-benzamit</p>	20 μ M \rightarrow % 56 inh. (türbidite var)
15 MA 374	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-2-(4-metoksi-fenil)-asetamit</p>	İnhibisyon yok
16 MA 358	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-2-<i>p</i>-tolil-asetamit</p>	İnhibisyon yok
17 MA 364.85	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-4-klor-benzamit</p>	İnhibisyon yok
18 MA 348.39	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-4-flor-benzamit</p>	İnhibisyon yok
19 MA 375.40	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-4-nitro-benzamit</p>	İnhibisyon yok
20 MA 423.33	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-2-(4-brom-fenil)-asetamit</p>	20 μ M \rightarrow % 60 inh.
21 MA 362.42	 <p><i>N</i>-(4-benzotiyazol-2-il-fenil)-2-(4-flor-fenil)-asetamit</p>	20 μ M \rightarrow % 58 inh.

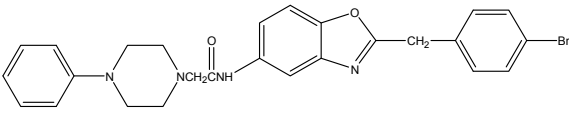
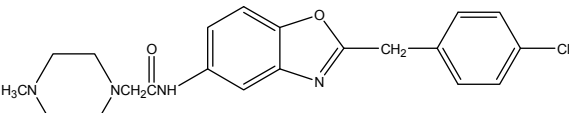
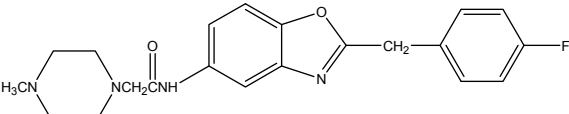
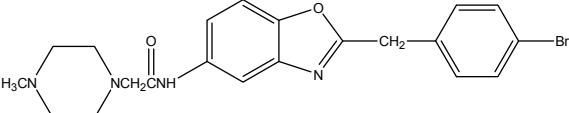
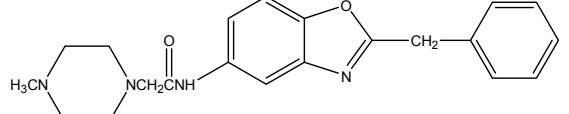
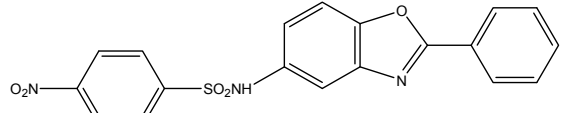
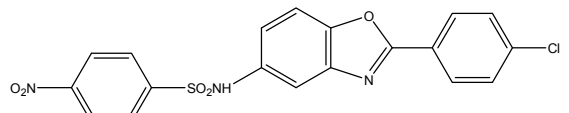
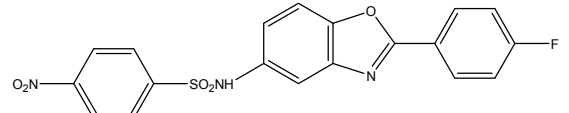
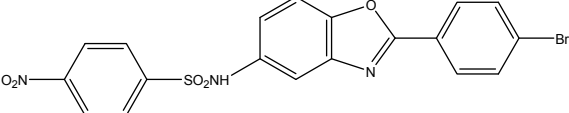
<p>22 MA 241</p>	 <p>2-fenoksimetil-benzotriazolol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>23 MA 286</p>	 <p><i>N</i>-(2-hidroksi-5-nitro-fenil)-2-<i>p</i>-tolil-asetamid</p>	<p>Yoğun sarı renkli çözelti; sonuç alınamadı</p>
<p>24 MA 290.25</p>	 <p>2-(4-flor-fenil)-<i>N</i>-(2-hidroksi-5-nitro-fenil)-asetamid</p>	<p>Yoğun sarı renkli çözelti; sonuç alınamadı</p>
<p>25 MA 276.22</p>	 <p>4-flor-<i>N</i>-(2-hidroksi-4-nitro-fenil)-benzamid</p>	<p>Yoğun sarı renkli çözelti; sonuç alınamadı</p>
<p>26 MA 276</p>	 <p>4-flor-<i>N</i>-(2-hidroksi-5-nitro-fenil)-benzamid</p>	<p>Yoğun sarı renkli çözelti; sonuç alınamadı</p>
<p>27 MA 286</p>	 <p><i>N</i>-(2-hidroksi-4-nitro-fenil)-2-<i>p</i>-tolil-asetamid</p>	<p>Yoğun sarı renkli çözelti; sonuç alınamadı</p>
<p>28 MA 290.25</p>	 <p>2-(4-flor-fenil)-<i>N</i>-(2-hidroksi-4-nitro-fenil)-asetamid</p>	<p>Yoğun sarı renkli çözelti; sonuç alınamadı</p>
<p>29 MA 272</p>	 <p>2-(4-flor-benzil)-5-nitro-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>

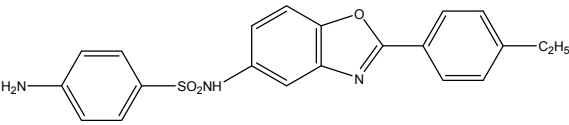
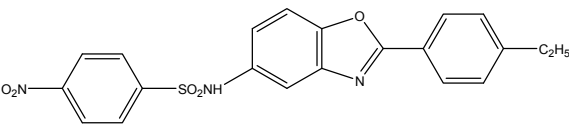
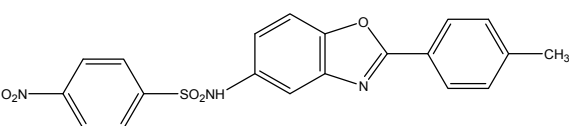
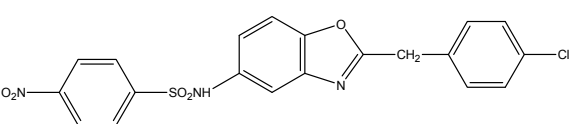
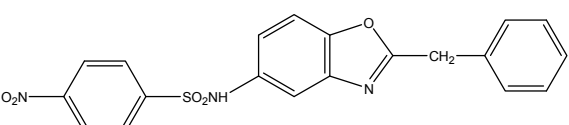
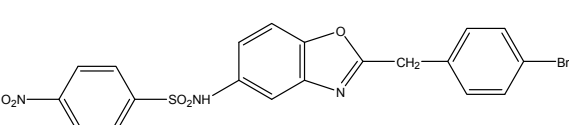
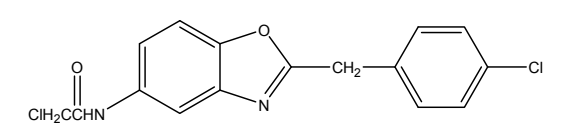
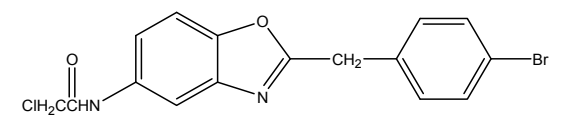
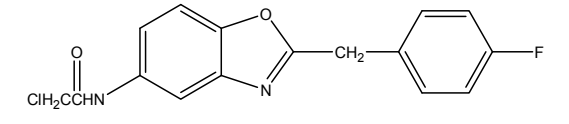
<p>30 MA 319.11</p>	 <p>2-(4-brom-phenil)-6-nitro-benzoksazol</p>	<p>20 μM \rightarrow % 55 inh.</p>
<p>31 MA 268</p>	 <p>2-(4-etil-phenil)-6-nitro-benzoksazol</p>	<p>20 μM \rightarrow % 25 inh.</p>
<p>32 MA 258.21</p>	 <p>2-(4-flor-phenil)-5-nitro-benzoksazol</p>	<p>20 μM \rightarrow % 35 inh.</p>
<p>33 MA 272</p>	 <p>2-(4-flor-benzil)-5-nitro-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>34 MA 240</p>	 <p>6-nitro-2-phenil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>35 MA 224</p>	 <p>2-fenoksimetil-1H-benzoimidazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>36 MA 258</p>	 <p>5-klor-2-fenoksimetil-1H-benzoimidazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>37 MA 343.44</p>	 <p>2-(4-ter-butil-phenil)-5-etansulfonil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>38 MA 380.26</p>	 <p>2-(4-brom-benzil)-5-etansulfonil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>

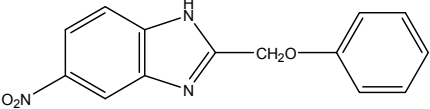
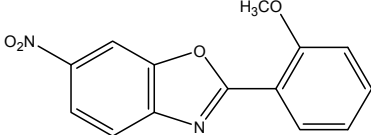
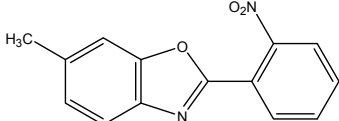
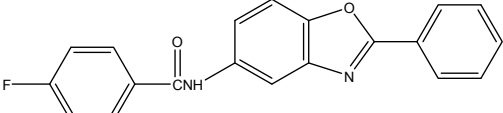
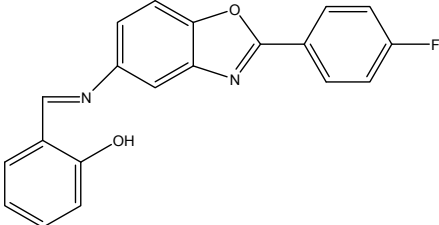
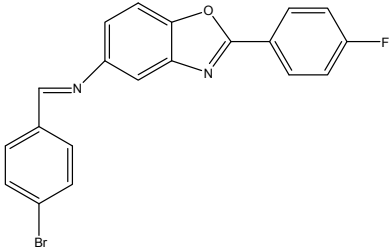
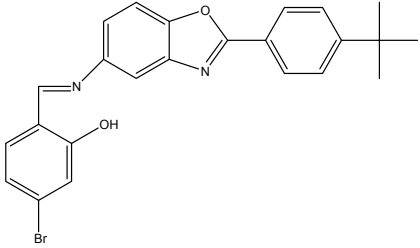
<p>39 MA 335.81</p>	 <p>2-(2-klor-benzil)-5-etansülfonil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>40 MA 315.39</p>	 <p>5-etansülfonil-2-fenetil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>41 MA 340.32</p>	 <p>5-etansülfonil-2-(2-flor-fenil)-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>42 MA 366</p>	 <p>2-(2-brom-fenil)-5-etansülfonil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>43 MA 315</p>	 <p>2-(2,3-dimetil-fenil)-5-etansülfonil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>44 MA 321</p>	 <p>2-(2-klor-fenil)-5-etansülfonil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>45 MA 400</p>	 <p>2-(5-brom-2-klor-fenil)-5-etansülfonil-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>

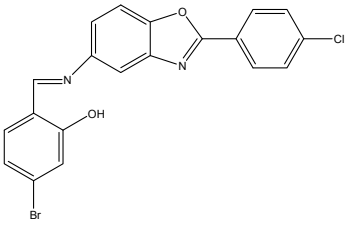
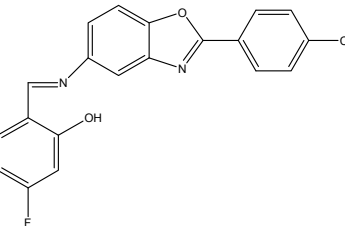
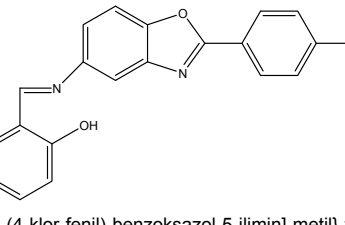
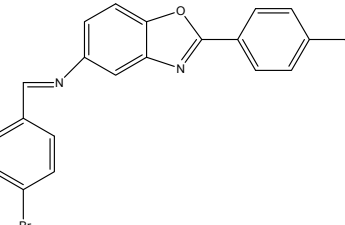
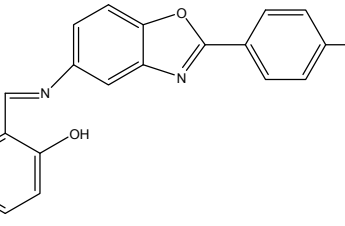
<p>46 MA 378.5</p>	 <p>N-[2-(4-etil-fenil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-metil-piperazin-1-il)-asetamid</p>	<p>Inhibisyon yok</p>
<p>47 MA 368.41</p>	 <p>N-[2-(4-flor-fenil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-metil-piperazin-1-il)-asetamid</p>	<p>Inhibisyon yok</p>
<p>48 MA 355</p>	 <p>N-[2-(4-flor-fenil)-benzoksazol-5-il]-2-morfolin-4-il-asetamid</p>	<p>Inhibisyon yok</p>
<p>49 MA 354.38</p>	 <p>N-[2-(4-flor-fenil)-benzoksazol-5-il]-2-piperazin-1-il-asetamid</p>	<p>Inhibisyon yok</p>
<p>50 MA 406</p>	 <p>N-[2-(4-ter-bütöl-fenil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-metil-piperazin-1-il)-asetamid</p>	<p>Inhibisyon yok</p>
<p>51 MA 369</p>	 <p>N-[2-(4-flor-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-morfolin-4-il-asetamid</p>	<p>Inhibisyon yok</p>
<p>52 MA 365</p>	 <p>N-[2-(4-metil-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-morfolin-4-il-asetamid</p>	<p>Inhibisyon yok</p>
<p>53 MA 334.03</p>	 <p>N-[2-(4-klor-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-morfolin-4-il-asetamid</p>	<p>Inhibisyon yok</p>

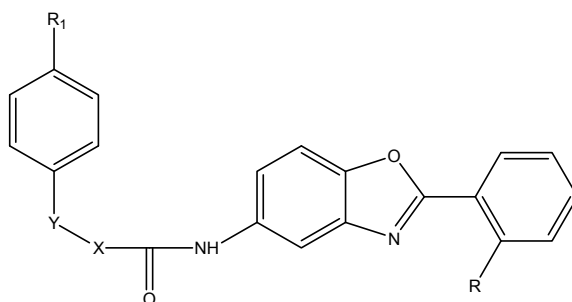
<p>54 MA 429.07</p>	 <p><i>N</i>-[2-(4-brom-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-morfolin-4-il-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>55 MA 383.14</p>	 <p><i>N</i>-[2-(4-klor-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-piperidin-1-il-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>56 MA 367.17</p>	 <p><i>N</i>-[2-(4-flor-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-piperidin-1-il-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>57 MA 427.09</p>	 <p><i>N</i>-[2-(4-brom-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-piperidin-1-il-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>58 MA 440</p>	 <p><i>N</i>-[2-(4-metil-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-fenil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>59 MA 426</p>	 <p><i>N</i>-(2-benzil-benzoksazol-5-il)-2-(4-fenil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>60 MA 460.17</p>	 <p><i>N</i>-[2-(4-klor-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-fenil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>61 MA 444.2</p>	 <p><i>N</i>-[2-(4-flor-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-fenil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>62 MA 504.12</p>	 <p><i>N</i>-[2-(4-brom-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-fenil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>

63 MA 505	 <p><i>N</i>-[2-(4-brom-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-fenil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	İnhibisyon yok
64 MA 398.15	 <p><i>N</i>-[2-(4-klor-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-metil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	İnhibisyon yok
65 MA 382.18	 <p><i>N</i>-[2-(4-flor-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-metil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	İnhibisyon yok
66 MA 442.01	 <p><i>N</i>-[2-(4-brom-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-(4-metil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	İnhibisyon yok
67 MA 364	 <p><i>N</i>-[2-(benzyl-benzoksazol-5-il)-2-(4-metil-piperazin-1-il)-asetamit</p>	İnhibisyon yok
68 MA 395.39	 <p>4-Nitro-<i>N</i>-(2-fenil-benzoksazol-5-il)-benzensülfonamit</p>	IC ₅₀ > 20 µM
69 MA 429.83	 <p><i>N</i>-[2-(4-klor-fenil)-benzoksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamit</p>	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
70 MA 413	 <p><i>N</i>-[2-(4-flor-fenil)-benzoksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamit</p>	IC ₅₀ > 20 µM
71 MA 474.29	 <p><i>N</i>-[2-(4-brom-fenil)-benzoksazol-5-il]-4-nitro-benzensülfonamit</p>	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı

<p>72 MA 393.46</p>	 <p>4-amino-N-[2-(4-etil-fenil)-benzoksazol-5-il]-benzenesülfonamit</p>	<p>$IC_{50} > 20 \mu M$</p>
<p>73 MA 423</p>	 <p>N-[2-(4-etil-fenil)-benzoksazol-5-il]-4-nitro-benzenesülfonamit</p>	<p>$IC_{50} > 20 \mu M$</p>
<p>74 MA 409.42</p>	 <p>4-nitro-N-(2-p-tolil-benzoksazol-5-il)-benzenesülfonamit</p>	<p>$IC_{50} > 20 \mu M$</p>
<p>75 MA 443.86</p>	 <p>N-[2-(4-klor-benzil)-benzoksazol-5-il]-4-nitro-benzenesülfonamit</p>	<p>$IC_{50} \sim 10 \mu M$</p>
<p>76 MA 409</p>	 <p>N-(2-benzil-benzoksazol-5-il)-4-nitro-benzenesülfonamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>77 MA 488.31</p>	 <p>N-[2-(4-brom-benzil)-benzoksazol-5-il]-4-nitro-benzenesülfonamit</p>	<p>$IC_{50} < 20 \mu M$</p>
<p>78 MA 335</p>	 <p>2-klor-N-[2-(4-klor-benzil)-benzoksazol-5-il]-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>79 MA 377.98</p>	 <p>N-[2-(4-brom-benzil)-benzoksazol-5-il]-2-klor-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>80 MA 318,06</p>	 <p>2-klor-N-[2-(4-flor-benzil)-benzoksazol-5-il]-asetamit</p>	<p>İnhibisyon yok</p>

<p>81 MA 269.26</p>	 <p>5-nitro-2-fenoksimetil-1<i>H</i>-benzimidazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>82 MA 270.24</p>	 <p>2-(2-metoksi-fenil)-6-nitro-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>83 MA 254.25</p>	 <p>6-metil-2-(2-nitro-fenil)-benzoksazol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>84 MA 332.33</p>	 <p>4-flor-N-(2-fenil-benzoksazol-5-il)-benzamid</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>85 MA 332.23</p>	 <p>2-[[2-(4-flor-fenil)-benzoksazol-5-ilimin]-metil]-fenol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>86 MA 395.13</p>	 <p>(4-brom-benziliden)-[2-(4-flor-fenil)-benzoksazol-5-il]-amin</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>87 MA 433.18</p>	 <p>5-brom-2-[[2-(4-ter-bütül-fenil)-benzoksazol-5-ilimin]-metil]-fenol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>

<p>88 MA 411.58</p>	 <p>5-brom-2-[[2-(4-klor-fenil)-benzoksazol-5-ilimin]-metil]-fenol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>89 MA 350.68</p>	 <p>2-[[2-(4-klor-fenil)-benzoksazol-5-ilimin]-metil]-5-flor-fenol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>90 MA 348.68</p>	 <p>2-[[2-(4-klor-fenil)-benzoksazol-5-ilimin]-metil]-fenol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>91 MA 405.15</p>	 <p>(4-brom-benziliden)-[2-(4-etil-fenil)-benzoksazol-5-il]-amin</p>	<p>İnhibisyon yok</p>
<p>92 MA 342.25</p>	 <p>2-[[2-(4-etil-fenil)-benzoksazol-5-ilimino]-metil]-fenol</p>	<p>İnhibisyon yok</p>



Kodu	R	X	Y	R1	GST P1-1, IC ₅₀ (μM)
93 MA 407	Br	CH ₂	-	H	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
94 MA 452	Br	CH ₂	-	NO ₂	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
95 MA 441	Br	CH ₂	-	Cl	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
96 MA 486	Br	CH ₂	-	Br	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
97 MA 425	Br	CH ₂	-	F	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
98 MA 421	Br	CH ₂	-	CH ₃	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı –
99 MA 451	Br	CH ₂	-	OC ₂ H ₅	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı

100 MA 423	Br	CH ₂	O	H	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
101 MA 457	Br	CH ₂	O	Cl	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
102 MA 441	Br	CH ₂	O	F	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
103 MA 439	Br	CH ₂	S	H	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
104 MA 393	Br	-	-	H	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
105 MA 438	Br	-	-	NO ₂	İnkübasyon ortamında bulanıklık sorunu var, çalışma yapılamadı
106 MA 427	Br	-	-	Cl	IC ₅₀ < 20 µM
107 MA 472	Br	-	-	Br	IC ₅₀ < 20 µM
108 MA 411	Br	-	-	F	IC ₅₀ > 20 µM
109 MA 423	Br	-	-	OCH ₃	IC ₅₀ > 20 µM
110 MA 407	Br	-	-	CH ₃	IC ₅₀ > 20 µM
111 MA 421	Br	-	-	C ₂ H ₅	IC ₅₀ > 20 µM

112 MA 449	Br	-	-	C(CH ₃) ₃	IC ₅₀ > 20 μM
113 MA 342	CH ₃	CH ₂	-	H	IC ₅₀ > 20 μM
114 MA 387	CH ₃	CH ₂	-	NO ₂	IC ₅₀ > 20 μM
115 MA 376	CH ₃	CH ₂	-	Cl	IC ₅₀ > 20 μM
116 MA 421	CH ₃	CH ₂	-	Br	IC ₅₀ > 20 μM
117 MA 360	CH ₃	CH ₂	-	F	IC ₅₀ > 20 μM
118 MA 356	CH ₃	CH ₂	-	CH ₃	IC ₅₀ > 20 μM
119 MA 372	CH ₃	CH ₂	-	OCH ₃	IC ₅₀ > 20 μM
120 MA 386	CH ₃	CH ₂	-	OC ₂ H ₅	IC ₅₀ > 20 μM
121 MA 358	CH ₃	CH ₂	O	H	IC ₅₀ > 20 μM
122 MA 392	CH ₃	CH ₂	O	Cl	IC ₅₀ > 20 μM
123 MA 376	CH ₃	CH ₂	O	F	IC ₅₀ > 20 μM
124 MA 374	CH ₃	CH ₂	S	H	IC ₅₀ > 20 μM

KAYNAKLAR

1. Copeland, R.A. (2000). *Enzymes : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (2nd bs.). New York ; London: Wiley.
2. Brocchieri, L.,Karlin, S. (2005) Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. *Nucleic Acids Res*, 33 (10), 3390-3400.
3. Josephy, P.D.,Mannervik, B. (2006). *Molecular toxicology* (2nd bs.). New York ; Oxford: Oxford University Press.
4. Liska, D., Lyon, M.,Jones, D.S. (2006) Detoxification and biotransformational imbalances. *Explore (NY)*, 2 (2), 122-140.
5. Chasseaud, L.F. (1979) The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res*, 29, 175-274.
6. Dickinson, D.A.,Forman, H.J. (2002) Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973, 488-504.
7. Estrela, J.M., Ortega, A.,Obrador, E. (2006) Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 43 (2), 143-181.
8. Booth, J., Boyland, E.,Sims, P. (1961) An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem J*, 79 (3), 516-524.
9. Combes, B.,Stakelum, G.S. (1961) A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J Clin Invest*, 40, 981-988.
10. Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B. ve diğerleri. (1992) Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J*, 282 (Pt 1), 305-306.
11. Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I.,Pearson, W.R. (2005) Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol*, 401, 1-8.

12. Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I., Pearson, W.R. (2005) Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, 1-8.
13. Ladner, J.E., Parsons, J.F., Rife, C.L., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N. (2004) Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry*, 43 (2), 352-361.
14. Raghunathan, S., Chandross, R.J., Kretsinger, R.H., Allison, T.J., Penington, C.J., Rule, G.S. (1994) Crystal structure of human class mu glutathione transferase GSTM2-2. Effects of lattice packing on conformational heterogeneity. *J Mol Biol*, 238 (5), 815-832.
15. Reinemer, P., Dirr, H.W., Ladenstein, R., Schaffer, J., Gallay, O., Huber, R. (1991) The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *EMBO J*, 10 (8), 1997-2005.
16. Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R. ve diğerleri. (1993) Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *J Mol Biol*, 232 (1), 192-212.
17. Armstrong, R.N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical research in toxicology*, 10 (1), 2-18.
18. Oakley, A. (2011) Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, 43 (2), 138-151.
19. Wilce, M.C., Parker, M.W. (1994) Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta*, 1205 (1), 1-18.
20. Armstrong, R.N. (1991) Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chem Res Toxicol*, 4 (2), 131-140.

21. Hayes, J.D., Judah, D.J., McLellan, L.I., Kerr, L.A., Peacock, S.D., Neal, G.E. (1991) Ethoxyquin-induced resistance to aflatoxin B1 in the rat is associated with the expression of a novel alpha-class glutathione S-transferase subunit, Yc2, which possesses high catalytic activity for aflatoxin B1-8,9-epoxide. *Biochem J*, 279 (Pt 2), 385-398.
22. Johansson, A.S., Mannervik, B. (2001) Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J Biol Chem*, 276 (35), 33061-33065.
23. Chen, H., Juchau, M.R. (1998) Recombinant human glutathione S-transferases catalyse enzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro. *Biochem J*, 336 (Pt 1), 223-226.
24. Blackburn, A.C., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Board, P.G. (1998) Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. *Cytogenet Cell Genet*, 83 (1-2), 109-114.
25. Litwack, G., Ketterer, B., Arias, I.M. (1971) Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature*, 234 (5330), 466-467.
26. Mannervik, B. (1985) The isoenzymes of glutathione transferase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 57, 357-417.
27. Lai, D., Visser-Grieve, S., Yang, X. (2012) Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Bioscience reports*, 32 (4), 361-374.
28. Orlando, D.A., Lin, C.Y., Bernard, A., Wang, J.Y., Socolar, J.E., Iversen, E.S. ve diğeri. (2008) Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature*, 453 (7197), 944-947.

29. Herman, J.G., Baylin, S.B. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England journal of medicine*, 349 (21), 2042-2054.
30. Gschwind, A., Fischer, O.M., Ullrich, A. (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 4 (5), 361-370.
31. Lu, T., Shao, N., Ji, C. (2012) Targeting microRNAs to modulate TRAIL-induced apoptosis of cancer cells. *Cancer gene therapy*.
32. Renehan, A.G., Booth, C., Potten, C.S. (2001) What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*, 322 (7301), 1536-1538.
33. Young, A.M., Allen, C.E., Audus, K.L. (2003) Efflux transporters of the human placenta. *Advanced drug delivery reviews*, 55 (1), 125-132.
34. Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., Caccuri, A.M. (2010) Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives of biochemistry and biophysics*, 500 (2), 116-122.
35. Coles, B., Ketterer, B. (1990) The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25 (1), 47-70.
36. Fournier, D., Bride, J.M., Poirie, M., Berge, J.B., Plapp, F.W., Jr. (1992) Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *The Journal of biological chemistry*, 267 (3), 1840-1845.
37. Piccolomini, R., Di Ilio, C., Aceto, A., Allocati, N., Faraone, A., Cellini, L. ve diğ erleri. (1989) Glutathione transferase in bacteria: subunit composition and antigenic characterization. *Journal of general microbiology*, 135 (11), 3119-3125.
38. Tchernev, G. (2009) Apoptotic Pathways, Cell Cycle Regulation and Cancer Progression: Review. *Turkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 29 (4), 952-958.

39. Laborde, E. (2010) Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell death and differentiation*, 17 (9), 1373-1380.
40. Burg, D., Riepsaame, J., Pont, C., Mulder, G., van de Water, B. (2006) Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTpi function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling. *Biochem Pharmacol*, 71 (3), 268-277.
41. Karin, M., Gallagher, E. (2005) From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB life*, 57 (4-5), 283-295.
42. Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D. ve diğ erleri. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO journal*, 18 (5), 1321-1334.
43. Tew, K.D., Townsend, D.M. (2011) Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug metabolism reviews*, 43 (2), 179-193.
44. Burg, D., Mulder, G.J. (2002) Glutathione conjugates and their synthetic derivatives as inhibitors of glutathione-dependent enzymes involved in cancer and drug resistance. *Drug Metab Rev*, 34 (4), 821-863.
45. Cui, H., Shen, J., Lu, D., Zhang, T., Zhang, W., Sun, D. ve diğ erleri. (2008) 4-Aryl-1,3,2-oxathiazolylum-5-olate: a novel GST inhibitor to release JNK and activate c-Jun for cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62 (3), 509-515.
46. Flatgaard, J.E., Bauer, K.E., Kauvar, L.M. (1993) Isozyme specificity of novel glutathione-S-transferase inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 33 (1), 63-70.
47. Ricci, G., De Maria, F., Antonini, G., Turella, P., Bullo, A., Stella, L. ve diğ erleri. (2005) 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases. Mechanism of

- action of potential anticancer drugs. *J Biol Chem*, 280 (28), 26397-26405.
48. Turella, P., Cerella, C., Filomeni, G., Bullo, A., De Maria, F., Ghibelli, L. ve diğerleri. (2005) Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors. *Cancer Res*, 65 (9), 3751-3761.
 49. Morgan, A.S., Ciaccio, P.J., Tew, K.D.,Kauvar, L.M. (1996) Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 37 (4), 363-370.
 50. Burg, D., Filippov, D.V., Hermanns, R., van der Marel, G.A., van Boom, J.H.,Mulder, G.J. (2002) Peptidomimetic glutathione analogues as novel gammaGT stable GST inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 10 (1), 195-205.
 51. Caccuri, A.M., Ascenzi, P., Antonini, G., Parker, M.W., Oakley, A.J., Chiessi, E. ve diğerleri. (1996) Structural flexibility modulates the activity of human glutathione transferase P1-1. Influence of a poor co-substrate on dynamics and kinetics of human glutathione transferase. *J Biol Chem*, 271 (27), 16193-16198.
 52. Pellizzari Tregno, F., Sau, A., Pezzola, S., Geroni, C., Lapenta, C., Spada, M. ve diğerleri. (2009) In vitro and in vivo efficacy of 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) on human melanoma. *Eur J Cancer*, 45 (14), 2606-2617.
 53. Tew, K.D. (2007) Redox in redux: Emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. *Biochem Pharmacol*, 73 (9), 1257-1269.
 54. Federici, L., Lo Sterzo, C., Pezzola, S., Di Matteo, A., Scaloni, F., Federici, G. ve diğerleri. (2009) Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione s-transferases. *Cancer Res*, 69 (20), 8025-8034.

55. Asakura, T., Sasagawa, A., Takeuchi, H., Shibata, S., Marushima, H., Mamori, S. ve diğerleri. (2007) Conformational change in the active center region of GST P1-1, due to binding of a synthetic conjugate of DXR with GSH, enhanced JNK-mediated apoptosis. *Apoptosis*, 12 (7), 1269-1280.
56. Tew, K.D., Dutta, S., Schultz, M. (1997) Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev*, 26 (2-3), 91-104.
57. Kolm, R.H., Stenberg, G., Widersten, M., Mannervik, B. (1995) High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA. *Protein Expr Purif*, 6 (3), 265-271.
58. Mannervik, B., Guthenberg, C. (1981) Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol*, 77, 231-235.
59. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249 (22), 7130-7139.
60. Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D. ve diğerleri. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J*, 18 (5), 1321-1334.
61. Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., Board, P. (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem*, 276 (5), 3319-3323.
62. Raffalli-Mathieu, F., Persson, D., Mannervik, B. (2007) Differences between bovine and human steroid double-bond isomerase activities of Alpha-class glutathione transferases selectively expressed in steroidogenic tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1770 (1), 130-136.
63. Tew, K.D. (1994) Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res*, 54 (16), 4313-4320.

64. Wang, T., Arifoglu, P., Ronai, Z., Tew, K.D. (2001) Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem*, 276 (24), 20999-21003.
65. Tew, K.D., Townsend, D.M. (2011) Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug Metab Rev*, 43 (2), 179-193.
66. Shi, D.F., Bradshaw, T.D., Wrigley, S., McCall, C.J., Lelieveld, P., Fichtner, I. ve diğerleri. (1996) Antitumor benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles and evaluation of their activities against breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *J Med Chem*, 39 (17), 3375-3384.
67. Ertan, T., Yildiz, I., Tekiner-Gulbas, B., Bolelli, K., Temiz-Arpaci, O., Ozkan, S. ve diğerleri. (2009) Synthesis, biological evaluation and 2D-QSAR analysis of benzoxazoles as antimicrobial agents. *Eur J Med Chem*, 44 (2), 501-510.
68. Oksuzoglu, E., Tekiner-Gulbas, B., Alper, S., Temiz-Arpaci, O., Ertan, T., Yildiz, I. ve diğerleri. (2008) Some benzoxazoles and benzimidazoles as DNA topoisomerase I and II inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 23 (1), 37-42.
69. Mannervik, B., Danielson, U.H. (1988) Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*, 23 (3), 283-337.
70. Phillips, M.F., Mantle, T.J. (1991) The initial-rate kinetics of mouse glutathione S-transferase YfYf. Evidence for an allosteric site for ethacrynic acid. *Biochem J*, 275 (Pt 3), 703-709.
71. Ploemen, J.H., van Ommen, B., van Bladeren, P.J. (1990) Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochem Pharmacol*, 40 (7), 1631-1635.

72. Tew, K.D., Bomber, A.M., Hoffman, S.J. (1988) Ethacrynic acid and piroprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res*, 48 (13), 3622-3625.
73. Carrassa, L., Chila, R., Lupi, M., Ricci, F., Celenza, C., Mazzoletti, M. ve diğeri. (2012) Combined inhibition of Chk1 and Wee1: in vitro synergistic effect translates to tumor growth inhibition in vivo. *Cell cycle*, 11 (13), 2507-2517.
74. Davies, K.D., Cable, P.L., Garrus, J.E., Sullivan, F.X., von Carlowitz, I., Huerou, Y.L. ve diğeri. (2011) Chk1 inhibition and Wee1 inhibition combine synergistically to impede cellular proliferation. *Cancer Biol Ther*, 12 (9), 788-796.
75. Kumar, N. (1981) Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J Biol Chem*, 256 (20), 10435-10441.
76. Ringel, I., Horwitz, S.B. (1991) Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst*, 83 (4), 288-291.
77. Lortholary, A., Maillard, P., Delva, R., Boisdron-Celle, M., Perard, D., Vernillet, L. ve diğeri. (2000) Docetaxel in combination with 5-fluorouracil in patients with metastatic breast cancer previously treated with anthracycline-based chemotherapy: a phase I, dose-finding study. *Eur J Cancer*, 36 (14), 1773-1780.
78. Trebunova, M., Laputkova, G., Slaba, E., Lacjakova, K., Verebova, A. (2012) Effects of docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide on human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res*, 32 (7), 2849-2854.
79. Hayes, J.D., Pulford, D.J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30 (6), 445-600.
80. Hayeshi, R., Chinyanga, F., Chenedza, S., Mukanganyama, S. (2006) Inhibition of human glutathione transferases by multidrug resistance

- chemomodulators in vitro. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 21 (5), 581-587.
81. Armstrong, D.K., Gordon, G.B., Hilton, J., Streeper, R.T., Colvin, O.M., Davidson, N.E. (1992) Hepsulfam sensitivity in human breast cancer cell lines: the role of glutathione and glutathione S-transferase in resistance. *Cancer Res*, 52 (6), 1416-1421.
 82. Shea, T.C., Clafin, G., Comstock, K.E., Sanderson, B.J., Burstein, N.A., Keenan, E.J. ve diğeri. (1990) Glutathione transferase activity and isoenzyme composition in primary human breast cancers. *Cancer Res*, 50 (21), 6848-6853.
 83. Howie, A.F., Miller, W.R., Hawkins, R.A., Hutchinson, A.R., Beckett, G.J. (1989) Expression of glutathione S-transferase B1, B2, Mu and Pi in breast cancers and their relationship to oestrogen receptor status. *Br J Cancer*, 60 (6), 834-837.
 84. Moscow, J.A., Townsend, A.J., Goldsmith, M.E., Whang-Peng, J., Vickers, P.J., Poisson, R. ve diğeri. (1988) Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (17), 6518-6522.
 85. Franco, R.L., Schenka, N.G., Schenka, A.A., Rezende, L.F., Gurgel, M.S. (2012) Glutathione S-transferase Pi expression in invasive breast cancer and its relation with the clinical outcome. *J BUON*, 17 (2), 259-264.
 86. Holmes, J., Wareing, C., Jacobs, A., Hayes, J.D., Padua, R.A., Wolf, C.R. (1990) Glutathione-s-transferase pi expression in leukaemia: a comparative analysis with mdr-1 data. *Br J Cancer*, 62 (2), 209-212.
 87. Freshney, R.I. (1987). Culture of animal cells : a manual of basic technique (2nd bs.). New York: A.R. Liss.
 88. Black, S.M., Beggs, J.D., Hayes, J.D., Bartoszek, A., Muramatsu, M., Sakai, M. ve diğeri. (1990) Expression of human glutathione S-

- transferases in *Saccharomyces cerevisiae* confers resistance to the anticancer drugs adriamycin and chlorambucil. *The Biochemical journal*, 268 (2), 309-315.
89. Nakagawa, K., Saijo, N., Tsuchida, S., Sakai, M., Tsunokawa, Y., Yokota, J. ve diğerleri. (1990) Glutathione-S-transferase pi as a determinant of drug resistance in transfectant cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 265 (8), 4296-4301.
90. Nagourney, R.A., Messenger, J.C., Kern, D.H., Weisenthal, L.M. (1990) Enhancement of anthracycline and alkylator cytotoxicity by ethacrynic acid in primary cultures of human tissues. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 26 (5), 318-322.
91. Nakanishi, Y., Matsuki, H., Takayama, K., Yatsunami, J., Kawasaki, M., Abe, M. ve diğerleri. (1997) Glutathione derivatives enhance adriamycin cytotoxicity in a human lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer research*, 17 (3C), 2129-2134.
92. Nabholz, J.M., North, S., Smylie, M., Mackey, J., Au, H.J., Au, R. ve diğerleri. (2000) Docetaxel (Taxotere) in combination with anthracyclines in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol*, 27 (2 Suppl 3), 11-18.
93. Henderson, I.C., Berry, D.A., Demetri, G.D., Cirrincione, C.T., Goldstein, L.J., Martino, S. ve diğerleri. (2003) Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21 (6), 976-983.
94. McGrogan, B.T., Gilmartin, B., Carney, D.N., McCann, A. (2008) Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1785 (2), 96-132.

95. De, S., Cipriano, R., Jackson, M.W., Stark, G.R. (2009) Overexpression of kinesins mediates docetaxel resistance in breast cancer cells. *Cancer research*, 69 (20), 8035-8042.
96. Mathew, N., Kalyanasundaram, M., Balaraman, K. (2006) Glutathione S-transferase (GST) inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16 (4), 431-444.
97. Crown, J., O'Leary, M. (2000) The taxanes: an update. *Lancet*, 355 (9210), 1176-1178.
98. Clarke, S.J., Rivory, L.P. (1999) Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacokinet*, 36 (2), 99-114.
99. Blajeski, A.L., Phan, V.A., Kottke, T.J., Kaufmann, S.H. (2002) G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *Journal of Clinical Investigation*, 110 (1), 91-99.
100. Saunders, D.E., Lawrence, W.D., Christensen, C., Wappler, N.L., Ruan, H., Deppe, G. (1997) Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells. *Int J Cancer*, 70 (2), 214-220.
101. Wang, L.G., Liu, X.M., Kreis, W., Budman, D.R. (1999) The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol*, 44 (5), 355-361.
102. Lock, R.B., Stribinskiene, L. (1996) Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res*, 56 (17), 4006-4012.
103. Rein, D.T., Schondorf, T., Breidenbach, M., Janat, M.M., Weikelt, A., Gohring, U.J. ve diğeri. (2000) Lack of correlation between P53 expression, BCL-2 expression, apoptosis and ex vivo chemosensitivity in advanced human breast cancer. *Anticancer Res*, 20 (6D), 5069-5072.

104. Wouters, B.G., Giaccia, A.J., Denko, N.C., Brown, J.M. (1997) Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism. *Cancer Res*, 57 (21), 4703-4706.
105. Morse, D.L., Gray, H., Payne, C.M., Gillies, R.J. (2005) Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 4 (10), 1495-1504.
106. Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., Davis, R.J. (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, 267 (5196), 389-393.
107. Ip, Y.T., Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, 10 (2), 205-219.
108. Thevenin, A.F., Zony, C.L., Bahnson, B.J., Colman, R.F. (2011) GST pi modulates JNK activity through a direct interaction with JNK substrate, ATF2. *Protein Sci*, 20 (5), 834-848.
109. Armstrong, D.K., Gordon, G.B., Hilton, J., Streeper, R.T., Colvin, O.M., Davidson, N.E. (1992) Hepsulfam sensitivity in human breast cancer cell lines: the role of glutathione and glutathione S-transferase in resistance. *Cancer research*, 52 (6), 1416-1421.
110. Zhu, B., Liu, G.T., Zhao, Y.M., Wu, R.S., Strada, S.J. (2006) Chemosensitizing multiple drug resistance of human carcinoma by Bicyclol involves attenuated p-glycoprotein, GST-P and Bcl-2. *Cancer biology & therapy*, 5 (5), 536-543.