



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



WRN HELİKAZ AKTİVİTESİNİN  
TESPİTİ VE WRN PROTEİNİNİN HEDEFLİ  
YIKIMI İLE POTANSİYEL ANTI-KANSER  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Aliye Beyza ÖZÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Kasım-2024  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

Aliye Beyza Özçelik tarafından hazırlanan “WRN Helikaz Aktivitesinin Tespiti ve WRN Proteininin Hedefli Yıkımı ile Potansiyel Anti-Kanser Etkisinin Araştırılması.” adlı tez çalışması 26/11/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

#### Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur Aslan

#### Danışman

Doç. Dr. Sündüs Erbaş Çakmak

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Seçer Çelik

### İmza

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ....../.../20.. gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havva Nur UÇBEYİAY  
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından 23GAP15004 nolu proje ile desteklenmiştir.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Aliye Beyza Özçelik

Tarih: 26.11.2024

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# WRN HELİKAZ AKTİVİTESİNİN TESPİTİ VE WRN PROTEİNİNİN HEDEFLİ YIKIMI İLE POTANSİYEL ANTI-KANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Aliye Beyza ÖZÇELİK

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Sündüs Erbaş Çakmak

2024, 74 Sayfa

Jüri

Doç.Dr. Sündüs Erbaş Çakmak  
Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur Aslan  
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Seçer Çelik

WRN proteini DNA'nın çift zincirinin 3'-5' yönünde ATP bağımlı olarak çözülmesini sağlayan bir helikaz enzimidir (Shen, 2000). DNA'nın alternatif yapıları olan DNA-RNA hibritlerini, çatallanmış DNA'yı, D-looplarını, baloncuk ve parçalı dubleks DNA'ları, tripleks DNA oluşumlarını ve DNA G4 kuadrupleks (G dördlüsü) adı verilen DNA'nın oluşturduğu kompleks yapıların da açılımını sağlayabilen bir helikazdır (Ozgenç & Loeb, 2006). Bu özelliklere sahip olmaları nedeniyle rekombinasyon ile bağlantılı olan DNA tamir mekanizmalarında, replikasyon ve transkripsiyon proseslerinde aktif rol almaktadır (Luo, 2010; Bohr, 2008). Bunun yanında iki veya daha fazla gendeki değişikliklerin hücreyi ölüme götürmesi anlamına gelen sentetik letalite kavramı WRN mutasyonları ile de ilişkilendirilmektedir. Hem DNA tamir mekanizmalarında aktif rol alıyor olması hem de sentetik letalite için bir hedef olması WRN'yi kanser çalışmalarında ön plana çıkarmaktadır. Bu çalışmada, proteozomal yolak aracılığıyla hedefli WRN proteini yıkımının, tasarlanan PROTAC molekülü ile gerçekleştirilmesi ve mikrosatellit instabilitesine sahip kolon kanseri hücrelerinde degradasyona bağlı sentetik letal etki elde edilmesi hedeflenmiştir. İnhibitörlerin ve kemoterapi ilaçlarının birçok yan etkiye sahip olması ve ilaç dirençliliğine neden olması, bilim insanlarını kanser için alternatif tedavi yöntemlerinin arayışına itmiştir. PROTAC'lar, inhibitörlere ve diğer gen susturma yöntemlerine alternatif olarak değerlendirilmektedir. Hücrede tekrar kullanılabilir olması, düşük dozlarda etki etmesi toksisitenin önüne geçilmesini sağlamaktadır. Bunlara bağlı olarak bu çalışmada, bir ucu WRN proteinine bağlanan ve diğer ucu E3 ligaz enzimine tutunan ve WRN proteininin degradasyonunu sağlayacak olan bir molekül tasarlanmış olup, mikrosatellit instabilitesine sahip HCT-116 ve mikrosatellit stabilitesine sahip SW480 kolon kanseri hücre hatlarıyla çalışılmıştır. Üretilen WRN-PROTAC molekülünün WRN degradasyonuna bağlı olarak mikrosatellit instabilitesine sahip hücrelerde sentetik letalite gösterdiği kanıtlanmıştır. Tez kapsamında ayrıca, G-kuadrupleks yapısına sahip ve WRN substratı olarak bilinen SHOX geninin bir bölgesinin sentetik oligomerinin Förster Tipi Enerji Transferi (FRET) yöntemi ile WRN aktivitesinin tespiti için kullanım potansiyeli incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** PROTAC, Seçici protein yıkımı, Sentetik letalite, MSI, WRN Proteini.

**ABSTRACT****MS THESIS****DETECTION OF WRN HELICASE ACTIVITY AND INVESTIGATION  
OF POTENTIAL ANTI-CANCER EFFECTS OF TARGETED WRN PROTEIN  
DEGRADATION****Aliye Beyza ÖZÇELİK****THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS****Advisor: Assoc.Prof.Dr. Sündüs Erbaş ÇAKMAK****2024, 74 Pages****Jury****Assoc.Prof.Dr. Sündüs Erbaş ÇAKMAK****Asst. Prof. Tuğba Nur Aslan****Asst. Prof. Fatma Seçer Çelik**

WRN Protein is an helicase enzyme responsible for ATP-dependent unwinding of double stranded DNA in the direction of 3' -5' (Shen, 2000) Alternative DNA structures such as DNA-RNA hybrids, DNA forks, D-loops, bubbles, partial duplex DNA, triplex DNA, G- quadruplexes (G-quartets) are substrates of this helicase (Ozgenç & Loeb, 2006) Because of these properties, enzyme is involved in various processes including DNA damage repair associated with recombination, replication and transcription ((Luo, 2010); (Bohr, 2008)). In addition, the concept of synthetic lethality, which means that changes in two or more genes leading to cell death, is associated with the WRN mutations. Both its active role in DNA repair mechanisms and being a target for synthetic lethality bring WRN to the forefront in cancer studies. In this study, it was aimed to perform targeted WRN protein degradation via proteasomal pathway with the designed PROTAC molecule and to obtain synthetic lethal effect due to degradation in colon cancer cells with microsatellite instability. The fact that inhibitors and chemotherapy drugs have many side effects and cause drug resistance has led scientists to search for alternative treatment methods for cancer. PROTACs are evaluated as alternatives to inhibitors and other gene silencing methods. PROTACs can be reused in the cell, they can be effective at low doses with minimal toxicity. Accordingly, in this study, a molecule that binds to WRN protein at one end and E3 ligase enzyme at the other end and provides degradation of WRN protein was designed and studied with HCT-116 colon cancer cell line with microsatellite instability and SW480 colon cancer cell line with microsatellite stability. It has been proven that the produced WRN-PROTAC molecule shows synthetic lethality in cells with microsatellite instability due to WRN degradation. In addition, using the Förster Energy Transfer (FRET) method, potential use of synthetic SHOX oligomer, a G-quadruplex bearing WRN substrate, for the detection of WRN enzyme activity was investigated in the thesis.

**Keywords:** PROTAC, Selective protein degradation, Synthetic lethality, MSI, WRN Protein.

## ÖNSÖZ

Bu proje TUBİTAK'ın 2210-A Yurtiçi genel yüksek lisans burs programınca desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TUBİTAK' a teşekkürlerimi iletiyorum.

Danışmanım Doç.Dr. Sündüs Erbaş Çakmak hocama geçiş sürecimdeki anlayışlarından, tez sürecimdeki bilgi, tecrübe aktarımlarından ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bana her zaman destek olan ve mentörlük yapan Dr. Safaa Altveş hocama teşekkür ederim.

Laboratuvar arkadaşlarım; Emin Şahin, Beyza Başar, Ayşe İlayda Boyacı ve Betül Altunkaynak'a maddi ve manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Her daim beni destekleyen ve yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Aliye Beyza Özçelik  
KONYA-2024

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>ÖNSÖZ .....</b>	<b>3</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>4</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>6</b>
<b>ŞEKİLLER TABLOSU .....</b>	<b>9</b>
<b>GİRİŞ.....</b>	<b>11</b>
<b>1. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>12</b>
1.1. WRN Geni .....	12
1.2. Werner Sendromu .....	14
1.3. İlgili Mutasyonlar .....	15
1.4. Post Translasyonel Modifikasyonlar .....	16
1.5. Hedefli Protein Yıkımı.....	18
1.6. WRN'nin Hücrenel Rolü.....	21
1.7. WRN Aktivite Sensörleri.....	22
1.8. Werner Sendromu ve Kanser .....	24
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>30</b>
2.1. Bileşiklerin Tasarımı.....	30
2.2. Bileşiklerin Sentezi .....	31
2.2.1. 1 Nolu bileşiğin sentezi.....	31
2.2.2. 2 Nolu Bileşiğin Sentezi .....	32
2.2.3. 3 Nolu Bileşiğinin Sentezi .....	32
2.2.4. 4 Nolu Bileşiğin Sentezi .....	33
2.2.5. PROTAC Bileşiğinin Sentezi .....	34
2.3. Hücre Kültürü Deneyleleri .....	35
2.3.1. Sitotoksisite Analizi .....	36
2.3.2. Akış Sitometri Analizi .....	37
2.3.3. Işık Mikroskopunda Görüntüleme .....	38
2.3.4. Floresan Görüntüleme.....	38
2.4. FRET.....	39
2.4.1. FRET Emisyon Analizi.....	39
2.4.2. FRET Melting Analizi .....	39
<b>3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>41</b>
3.1. Bileşiklerin Sentezi .....	41

3.2. Hücre Kültürü Deneyleri .....	41
3.2.1. Sitotoksosite Analiz Sonuçları.....	41
3.2.2. Işık Mikroskopunda Görüntüleme .....	43
3.2.3. Akış Sitometri Sonuçları.....	45
3.2.4. Spektroskopik Sonuçlar .....	59
3.2.5. Floresan Görüntüleme Sonuçları .....	61
<b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>63</b>
4.1 Sonuçlar .....	63
4.2 Öneriler .....	63
<b>5. KAYNAKLAR .....</b>	<b>64</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>69</b>
EK-1. 1 Nolu bileşiğin <sup>1</sup> H NMR Spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	69
EK-2. 2 Nolu bileşiğin <sup>1</sup> H NMR Spektrumu (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	69
EK-3. 3 Nolu bileşiğin <sup>1</sup> H NMR spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). .....	70
EK-4. 3 Nolu bileşiğin aromatik bölgesi genişletilmiş <sup>1</sup> H NMR spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). .....	70
EK-5. 3 Nolu bileşiğin alifatik bölgesi genişletilmiş <sup>1</sup> H NMR spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). .....	71
EK-6. 3 Nolu bileşiğin <sup>13</sup> C NMR spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 101 MHz). .....	71
EK-7. 3 Nolu bileşiğin QTOF-LCMS spektrumu. ....	72
EK-8. 4 Nolu bileşiğin <sup>1</sup> H NMR Spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	72
EK-9. 4 Nolu bileşiğin aromatik bölgesi genişletilmiş <sup>1</sup> H NMR Spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). .....	72
EK-10. 4 Nolu bileşiğin <sup>13</sup> C NMR Spektrumu (101 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	73
EK-11. 4 Nolu bileşiğin QTOF-LC/MS spektrumu. ....	73
EK-12. PROTAC bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). ....	73
EK-13. PROTAC bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR Spektrumu (101 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	74
EK-14. PROTAC bileşiğinin QTOF-LC/MS spektrumu. ....	74
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>75</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

mL: mililitre

$\mu$ L: mikrolitre

nm: nanometre

$\mu$ M: Mikromolar

mM: Milimolar

MHz: Mega Hertz

### Kısaltmalar

ATP: Adenozin trifosfat

BF: Aydınlık Alan (Bright Field)

CO<sub>2</sub>: Karbondioksit

CRBN: Cereblon

CRISPR: Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats)

DKM: Diklorometan

DIPEA: N, N-Diisopropiletilamin

DMF: Dimetil Formamid

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EDCI: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid

FAM: 5(6)-karboksifluoresin

FBS: Fetal Serum Albumin

FITC: Fluoresin izotiyosiyanat

FRET: Förster Rezonans Enerji Transferi

FSC: İleri Saçılma (Forward Scattered)

G4: G-kuadrupleks

HCl: Hidroklorik Asit

HCT-116: İnsan Kolon Kanseri Hücresi

HG-DMEM: High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium

HOBt: Hidroksibenzotriazol  
HRMS: Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometri  
LiOH: Lityum Hidroksit  
MgCl<sub>2</sub>: Magnezyum Klorid  
MMR: Yanlış Eşleşme Tamiri (Mismatch Repair)  
mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit  
MS: Mikrosatellit  
MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi  
MSI-H: Mikrosatellit İnstabilitesi Yüksek  
MSS: Mikrosatellit Stabilitesi  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür  
NaN<sub>3</sub>: Sodyum Azid  
NaNO<sub>3</sub>: Sodyum Nitrat  
NMR: Nükleer Manyetik Rezonans  
n.s.: Not significant, anlamlı değil  
PARP: Poli(ADP-Riboz) Polimeraz  
PBS: Fosfat Salin Tamponu (Phosphate Saline Buffer)  
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)  
PI: Propidyum İyodür  
Prep TLC: Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi  
PROTAC: Proteoliz Hedefli Kimera  
QTOF-LC/MS: Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Quadrupole time-of-flight Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)  
RNA: Ribonükleik Asit  
ROS: Reaktif Oksijen Türleri  
RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Realtime Polymerase Chain Reaction)  
SD: Standart Deviation (Standart Sapma)  
SSC: Yan Saçılma (Side Scattered)  
SW480: İnsan Kolon Kanser Hücresi  
TAMRA: 5(6)-Karboksitetrametilrodamin  
THF: Tetrahidrofuran  
TLC: İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography)  
T<sub>m</sub>: Erime Sıcaklığı

Ub: Ubikitin

UV: Ultraviyole

VHL: Von Hippel–Lindau

WRN: Werner Sendrom Helikaz

WS: Werner Sendrom



## ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1.1. WRN'nin substratı olan alternatif DNA formları (Ozgenç & Loeb, 2006). ..	12
Şekil 1.2. RecQ helikaz ailesi üyelerinin farklı canlılar için verilmiş domainleri.....	13
Şekil 1.3. Homozigot null mutasyonlara sahip bir Werner sendromu hastasının 8-56 yaşları arasında kaydedilen görüntüleri.. ..	15
Şekil 1.4. Werner sendromuna sahip bireylerde, WRN geninin domainleri üzerinde çeşitli patojenik mutasyonlar. ....	16
Şekil 1.5. PROTAC ile preteozomal degradasyon (Kelm vd., 2023).....	18
Şekil 1.6. Förster Rezonans Enerji Transferi sistemi.. ..	23
Şekil 1.7. Mikrosatellit instabilitesi.....	24
Şekil 1.8. Sentetik letalite konsepti.. ..	26
Şekil 1.9. MSS ve MSI ya sahip hücrelerde WRN geninin fonksiyon modeli.....	27
Şekil 2.1. Hedefli WRN yıkımı sağlayacak olan molekülün yapısı ve çalışma mekanizması.. ..	30
Şekil 2.2. PROTAC bileşiğinin sentez şeması. ....	31
Şekil 2.3. 1 Nolu bileşiğin sentez şeması. ....	31
Şekil 2.4. 2 Nolu bileşiğin sentez şeması.. ..	32
Şekil 2.5. 3 Nolu bileşiğin sentezi.. ..	32
Şekil 2.6. 4 Nolu bileşiğinin sentez şeması.. ..	33
Şekil 2.7. PROTAC bileşiğinin sentez şeması.. ..	34
Şekil 3.1. 2,5 µM ve 80 µM aralığında PROTAC maddesi uygulanmış HCT-116 hücre hattının MTT yöntemi kullanılarak elde edilen hücre canlılığı analiz sonuçları.. ..	42
Şekil 3.2. 2,5 µM ve 80 µM aralığında PROTAC uygulanmış SW480 hücre hattının MTT yöntemi kullanılarak elde edilen hücre canlılığı analiz sonuçları.. ..	42
Şekil 3.3. PROTAC uygulanmış HCT-116 hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü. ....	44
Şekil 3.4. PROTAC uygulanmış SW480 hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü.. ..	45
Şekil 3.5. HCT-116 hücre hattında PROTAC uygulanmamış kontrol numunesinin akış sitometri grafikleri.. ..	47
Şekil 3.6. HCT-116 hücre hattında 20 µM'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri.. ..	48
Şekil 3.7. HCT-116 hücre hattında 40 µM'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri.. ..	49
Şekil 3.8. HCT-116 hücre hattında 80 µM'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri.. ..	50
Şekil 3.9. HCT-116 hücre hattında 120 µM'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. ....	51
Şekil 3.10. SW480 hücre hattında PROTAC uygulanmamış kontrol numunesinin akış sitometri grafikleri.. ..	53
Şekil 3.11. SW480 hücre hattında 20 µM'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri.. ..	54
Şekil 3.12. SW480 hücre hattında 40 µM'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri.. ..	55
Şekil 3.13. SW480 hücre hattında 80 µM'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri.. ..	56
Şekil 3.14. SW480 hücre hattında 120 µM'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri.. ..	57

<b>Şekil 3.15.</b> HCT-116 ve SW480 hücre hattında farklı derişimlerde <b>PROTAC</b> uygulandığında akış sitometrisi Q1-UR kuadrantındaki normalize hücre yüzdelerinin karşılaştırılması.....	58
<b>Şekil 3.16.</b> 2,5 µM <b>Prob</b> ve farklı derişimlerde WRN enzimi ile (0-24 nM) 24 saat muamelesi sonrasında elde edilen spektrum.....	59
<b>Şekil 3.17.</b> 2,5 µM prob ve farklı derişimlerde (0-24 nM) WRN enzimi ile 24 saat muamelesi sonrasında elde edilen spektrum.....	59
<b>Şekil 3.18.</b> Probun farklı WRN enzimi varlığında 16 dakika ve 90 dakika boyunca inkübasyonu ile 30-37 °C sıcaklıklarda RT-PCR cihazı ile elde edilen FAM emisyon grafiği.....	60
<b>Şekil 3.19.</b> G-kuadrupleks yapısı (A), Prob bileşiminin çalışma prensibi (B), <b>Prob</b> molekülünün tek başına (mavi) ve 5 µM G4-stabilizatörü varlığında (turuncu) elde edilen FRET erime eğrisi (C), deneyde kullanılan G4 stabilizatörünün kimyasal yapısı (D).....	60
<b>Şekil 3.20.</b> HCT-116 hücre hattında 40 ve 80 µM'lık <b>PROTAC</b> uygulanan numunenin floresan mikroskop görüntüleri.....	61
<b>Şekil 3.21.</b> SW480 hücre hattında 40 ve 80 µM'lık <b>PROTAC</b> uygulanan numunenin floresan mikroskop görüntüleri.....	61

## GİRİŞ

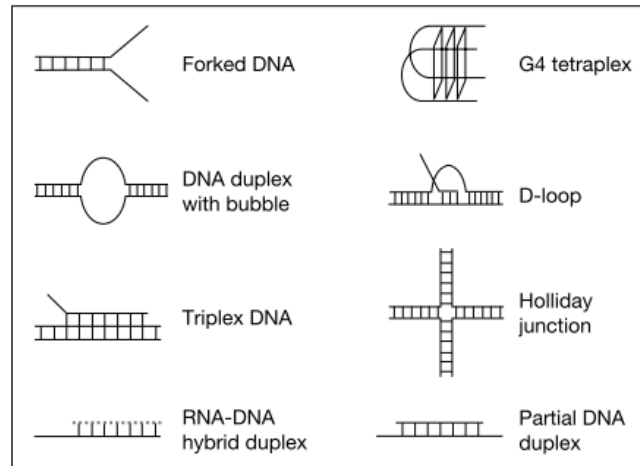
Bu çalışmada WRN proteininin proteozomal degradasyonuna bağılı olarak mikrosatellit instabilitesine sahip kolon kanseri hücrelerinde sentetik letal etkinin incelenmesi hedeflenmiştir. Kanser çalışmalarında son dönemde MSI-WRN sentelik letal partnerliğinin önemi çalışmalarda ortaya konulmuştur. Bununla beraber PROTAC adı verilen proteozomal degradasyon sağlayan çift uçlu ligand içeren moleküller kanser çalışmalarında aktif olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, WRN geninin degradasyonu için PROTAC molekülü tasarlanmış olup, MSI ve MSS olan iki kolon kanseri hücre hattı için uygulamalar yapılmıştır.

Bunun yanında iki floroforun arasındaki mesafeye bağılı olarak çalışan Förster Enerji Transfer Sistemi kullanılarak WRN helikaz aktivitesinin anlaşılması hedeflenmiştir. Bununla ilgili kavramlar ve kaynak araştırması sunulmuştur.

## 1. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 1.1.WRN Geni

Werner sendrom geni olarak adlandırılan WRN geni, RecQ helikaz ailesinin bir üyesidir. İnsanda birçok dokuda ekspresyona sahip olup, özellikle endometriyum ve kemik iliği dokularında yüksek ekspresyona sahip olduğu gösterilmiştir (WRN RecQ like helicase (*WRN WRN RecQ like helicase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI, t.y.*) WRN geni 8. Kromozomda lokalize olup 8p12 şeklinde haritalandırılır. İnsan WRN geni, E.coli RecQ helikazı ile homoloji gösterir ve aktif DNA RecQ helikazı olan proteini kodlar. Bir DNA helikazı olarak WRN, DNA'nın çift zincirinin 3'-5' yönünde ATP bağımlı olarak çözülmesini sağlayan bir enzimdir (Shen, 2000). Bunun yanında, sadece çift DNA zincirlerini değil aynı zamanda Şekil 1.1'de gösterilen DNA'nın alternatif yapıları olan DNA-RNA hibritlerini, çatallanmış DNA'yı, D-looplarını, baloncuk ve parçalı dubleks DNA'ları, tripleks DNA oluşumlarını ve DNA G4 Kuadruplex (G dörtlüsü) adı verilen DNA'nın oluşturduğu kompleks yapıların da açılımını sağlayabilen bir helikazdır (Ozgenic & Loeb, 2006).



Şekil 1.1. WRN'nin substratı olan alternatif DNA formları (Ozgenic & Loeb, 2006).

RecQ ailesi; RecQ1, WRN, BLM, RecQ4 ve RecQ5 helikazlarını içerir. Bunlardan WRN ve BLM erken yaşlanma ve çeşitli kanser türlerine yatkınlık ile ilişkilendirilen resesif aktarıma sahip olan nadir genetik hastalıklar ile bağlantılıdır. Pek çok canlı türünde farklı domainlere sahip olabilen RecQ ailesinde, helikaz aktivitesi



rekombinasyon prosesleri gerçekleşir. Bunun yanında, RAD52 WRN'yi modüle ederek holliday bağlantılarını çözme yeteneğini engelleyebilir. WRN'nin homolog rekombinasyonda birçok önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Alternatif uç birleştirme süreçlerinde de etkili olduğu bilinmektedir (Lu & Davis, 2021). WRN proteininin böyle önemli proseslerde görev alması, gende var olan mutasyonların büyük sorunlara yol açmasına sebep olur. WRN genindeki çeşitli mutasyonlar, Werner sendromu olarak adlandırılan erken yaşlanma ve kanser yatkınlığına sebep olmaktadır.

## 1.2. Werner Sendromu

Werner sendromu (WS), 1985'te doktora öğrencisi olan Otto Werner tarafından keşfedilmiştir. Werner'e gelen dört kardeşin hepsinin 30'lu yaşlarda; katarakt, saç kaybı, saçlarda erken grileşme ve ciddi cilt problemlerine sahip olması, hastalığın genetik kaynaklı olduğunu düşündürmüştür. Erken yaşlarda bir belirtinin görülmemesi hastalığın genetik bağlantısı hakkında düşündürse de bu hastalığın dejeneratif bir süreç olabileceği belirtilmişti. Otto Werner, "Skleroderma İlişkili Katarakt" olarak yayınladığı bu tezi, sonraki dönemde yapılan çalışmalarla birlikte yazarlar tarafından "Werner Sendromu" olarak adlandırılmıştır (Werner, 1985).

Werner sendromu, otozomal resesif kalıtıma sahip olan nadir bir genetik hastalıktır. WRN geninde meydana gelen çeşitli mutasyonların, genomda kararsızlıklar oluşturduğu ve bu bozuklukların kromozomal yeniden düzenlemelerin arttırdığı bilinmektedir (Huang vd., 2006). WS erken yaşlanma ile karakterize olup, vücutta yaşlanmaya dair pek çok belirtiyeye sebep olur. Bu sendroma sahip bireyler; ergenlik çağına kadar herhangi bir belirti göstermeyip, 20'li 30'lu yaşların başlarında hızlandırılmış yaşlılık sürecine girdikleri gözlemlenmiştir. Bunun yanında, bu hastaların tiroid ve cilt kanseri gibi bazı kanser türlerine yatkınlık gösterdiği çalışmalarda kanıtlanmıştır (GARD, 2024).

Werner sendromlu olan bireyler, genotipteki mutasyonların ve bozuklukların sonucu olarak, fenotipte çok çeşitli semptomlara sahiptirler. Werner sendromuna sahip bireylerde saçlarda incelme ve grileşme, bilateral katarakt gelişimi, hipogonadizm, cilt ülseri, kemik anomalileri olan osteoporoz ve aşil tendonunda kalsifikasyon gibi yaşlılıkla ortaya çıkan fenotiplerin görüldüğü ve karakterize edildiği çalışmalarda gösterilmiştir (Mohaghegh, 2004). Bunların yanında, bu bireyler anormal yağ ve şeker metabolizmasına

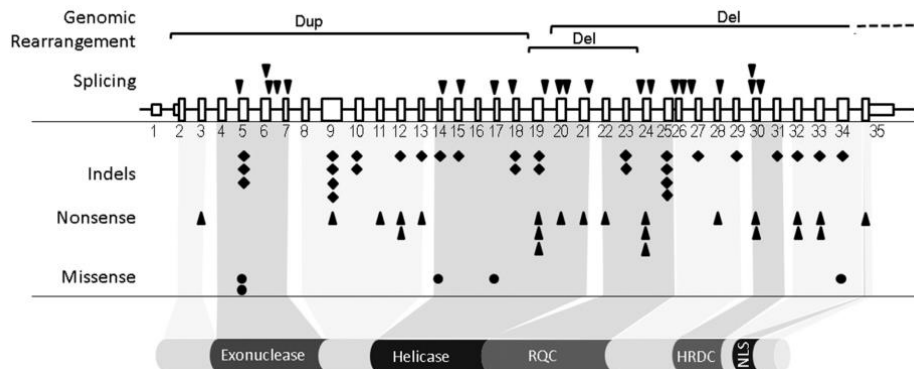
sahiptirler. Tip 2 diyabet, şeker toleransının farklılık göstermesi ve kolesterol gibi metabolizma bozukluklarının geliştiği görülmektedir. Fiziksel özellikleri de etkileyen WS; kısa boy, düşük vücut kütlesi, kuş-benzeri yüz görünümü, atopik cilt tipi ve yüksek perdeli anormal ses gibi semptomlara da sahiptir (Rincón vd., 2019; Takemoto vd., 2013)



**Şekil 1.3.** Homozigot null mutasyonlara sahip bir Werner sendromu hastasının 8-56 yaşları arasında kaydedilen görüntüleri. 8 yaşında tamamen normal fenotipe sahip olan bireyin, ilerleyen yaşlarda sendromun belirtilerine sahip olduğu yaşam döngüsü içinde görülmektedir (Hisama vd., 2006).

### 1.3. İlgili Mutasyonlar

WS için literatürde 83 farklı patojenik mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar; 29 ekleme-silme, 23 uçbirleştirme, 23 anlamsız (nonsense), 3 genomik yeniden düzenleme, 5 yanlış anlamlı (missense) mutasyonu olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyonların çoğu proteinin kesilmesi ve gen ürününün işlev kaybına sebep olan null mutasyonlar ile sonuçlanır (Yokote vd., 2017). 35 ekzon bölgesine sahip olan WRN geninde; ekzonükleaz, helikaz, RecQ helikaz, nükleer lokalizasyon sinyali ve C-terminal



domainleri üzerinde bahsedilen çeşitli mutasyonlar görülmektedir. Şekil 4 üzerinde domainlere özgü çeşitli mutasyon türlerini takip etmek mümkündür (Oshima vd., 2018).

**Şekil 1.4.** Werner sendromuna sahip bireylerde, WRN geninin domainleri üzerinde çeşitli patojenik mutasyonlar (Oshima vd., 2018).

WS'ye sebep olan mutasyonlar genellikle WRN proteininin C-terminal domaininde gerçekleşen ve nükleer lokalizasyon sinyalini etkileyen, ekleme-silme ve uç birleştirme mutasyonlarıdır. Bunun yanında, proteinin ekzonükleaz domaini içerisinde gerçekleşen p.Lys125Asn ve Lys135Glu mutasyonları, proteinin stabilizasyonunu ve fonksiyonunu bozan boş mutasyonlar için örnektir (Yokote vd., 2017). Genin helikaz domainindeki p.Gly574Arg ve p.Arg637Trp mutasyonlarının da proteinin temel fonksiyonu olan helikaz aktivitesini bozduğu kanıtlanmıştır (Yokote vd., 2017). Ayrıca etnik olarak incelendiğinde WS'nin; Japon, Sardunya, Türk, Fas ve Hollanda kökenlerine özgü mutasyonlar içerdiği kaydedilmiştir (Saha vd., 2013). Bu spesifik mutasyonların yaygınlığının akrabalık ilişkilerinin yakınlığı ile çeşitlendiği bilinmektedir (Oshima vd., 2017).

#### **1.4. Post Translasyonel Modifikasyonlar**

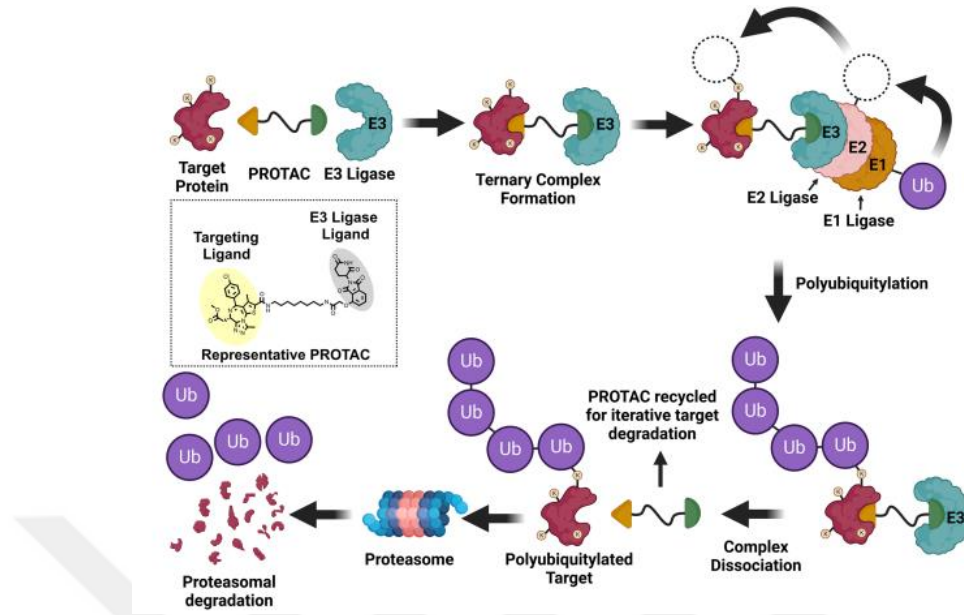
Post translasyonel modifikasyonlar proteinlerin amino asit zincirlerinde meydana gelen modifikasyonları tanımlar ve çok çeşitli modifikasyonların olması proteinin yapısı ve birçok fonksiyonu üzerinde önemli etkilere sahip olmasını sağlar. Modifiye edici grupların amino asitlere eklenmesi ile gerçekleşen modifikasyon prosesleri; fosforilasyon, ubikitinasyon, asetilasyon, metilasyon gibi çeşitli şekillerde sağlanabilir. Post translasyonel modifikasyonlar biyolojik ve mekanik süreçler üzerinde önemli etkilere sahiptir. Sinyal iletimi, gen ekspresyonunun regülasyonu, gen aktivasyonu, DNA tamir mekanizmaları, modifikasyonlarla ilişkilendirilen önemli proseslerden bazılarıdır (Ramazi & Zahiri, 2021). Fosforilasyon en yaygın çalışılan modifikasyonlardan biridir ve geri döndürülebilir bir prosese sahiptir. Bu özelliğiyle enzim aktivitelerinin düzenlenmesi gibi bazı biyolojik süreçler için bir kapat-aç fonksiyonu sağlar. Genellikle serin ve treonin amino asitleri üzerinde lokalizedir (Virág vd., 2020). Ubikitinasyon ise hedef proteinin N-terminaline ubikitin polipeptiti eklenmesi ile proteozom tarafından

tanınmasını sağlayan modifikasyonudur. Proteozomun tanınmasıyla ubikitinlenen proteinin degradasyonu sağlanmış olur (Santos & Lindner, 2017). Çok yönlü bir modifikasyondur ve 20 amino asitle de gerçekleşebilir. Fakat genellikle lizin amino asiti tercih edilir ve bir enzim kompleksi ile ubikitinleme gerçekleşir. Ubikitinleme modifikasyonu hücrel anlamda önemli fonksiyonlara sahiptir ve proliferasyon, transkripsiyonun regülasyonu, DNA tamir ve replikasyonu, protein degradasyonu ve apoptoz bu önemli fonksiyonlardan bazılarıdır (Ramazi & Zahir, 2021).

Erken yaşlılıkla ilişkilendirilen ve DNA tamir mekanizmalarında önemli rollere sahip olan WRN proteininde de çeşitli post translasyonel modifikasyonlar gerçekleşir. Fosforilasyon, WRN için en yaygın olan modifikasyonlardan biridir ve DNA çift zincir kırıklarında ATM kinaz bağımsız DNA-PK yolağını veya ATM kinaz bağımlı c-Abl yolağını kullanarak fosforile edilebilir. Bu modifikasyonlar WRN'nin ekzonükleaz ve helikaz aktivitesini inhibe edebilir (Kusumoto vd., 2007). Bunun yanında, ATR temelli WRN fosforilasyonunun replikasyonla ilişkili çift zincir kırıkları ve genom stabilitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. ATR kinaz tarafından yapılan WRN'nin S1141 fosforilasyonunun, DNA çift zincir kırıklarının tamirinin gerçekleştirilmesini ve daha sonra ubikitinlemeyi sağlayarak fonksiyonunu tamamlayan WRN proteininin degradasyonunu ve RAD51'in ayrılmasını sağlar. Böylece çift zincir kırığının tamirinin gerçekleştirildiği ve genom stabilitesinin sağlanmış olduğu kanıtlanmıştır (Su vd., 2016).

Yapılan çalışmalardan yola çıkarak, WRN için gerçekleşen post translasyonel modifikasyonların WRN'nin hücrel fonksiyonlarını önemli ölçüde etkilediğini ve mekanizmasının post translasyonel modifikasyonlar ile kontrol edilebileceği anlaşılmaktadır. Günümüzde ubikitinleme modifikasyonunun planlanarak, enzim kompleksi ile hedeflenen proteinin yıkımını sağlayan sistemler stratejik tedavi yöntemleri olarak kullanılmaktadır.

## 1.5. Hedefli Protein Yıkımı



Şekil 1.5. PROTAC ile preteozomal degradasyon (Kelm vd., 2023).

Protein degradasyonu, gen transkripsiyonu, DNA eşlenmesi, hücre siklusunun kontrolü ve apoptoz gibi hücresel anlamda önemli birçok prosesin parçasıdır. Proteoliz Hedefli Kimera (PROTAC), protein degradasyonunda kullanılan teknolojilerden biridir ve hedeflenen proteini ubikitinleyip ubikitin proteazom sistemini aktifleştirerek hedeflenen proteinin yıkımını sağlar. Proteoliz hedefli kimeralar, hedefli protein yıkımı sağlayan çift başlı moleküllerdir. Bu moleküller, hedeflenen protein ligandının ve proteinlerin parçalanmasını sağlayan E3 ubikitin ligaz ligandının bir linker aracılığıyla birleşmesinden oluşan özel ilaç molekülleridir. Seçilen hedef protein için proteozomal degradasyon sağlar ve antikanser terapiler için umut vadetmektedir (X. Li vd., 2022).

Ubikitin proteazom temelli çalışan PROTAClar, 2 temel aşamaya sahiptir ve bunlar; hedeflenen proteinin poliubikitinlenmesi ve 26S proteolitik enzim kompleksi ile proteinin yıkılmasıdır. Ubikitin proteazom, E1, E2, E3 ligaz olmak üzere üçlü bir enzim kompleksini ifade eder ve ubikitin bağlayıcı bu enzimler ATP'yi kullanarak ubikitin transferi sağlarlar. Bu işlem tekrarlanarak poliubikitinleme gerçekleşir ve proteinin ubikitinlenmesi, 26S proteazom tarafından hedef proteinin tanınmasını sağlar ve degradasyon sağlanır (Şekil 5) (Qi vd., 2021; Kelm vd., 2023). Bu sistem seçici protein degradasyonu sağladığı için günümüzde kanser gibi önemli hastalıklarda hedefe spesifik stratejik ilaç tasarımları çalışılmaktadır. Ayrıca hücrede geri dönüştürülüp tekrar kullanılabilme özelliğine sahiptirler (Kelm vd., 2023). Bu strateji, gen ekspresyonunun

düzenlenmesi, overeksprese olan proteinlerin yıkımının sağlanması, protein agregatlarının parçalanması, direnç mutasyonlarının giderilmesi gibi proseslerin gerçekleşmesini sağlayarak bu patolojilere sahip hastalıkların tedavisi için önemlidir (Békés vd., 2022).

Günümüze kadar çeşitli PROTAC tasarımları yapılmış olup farklı hastalıklarla bağlantılı proteinlere yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu yüzden peptit temelli, küçük molekül temelli, RNA-PROTAC ve DNA PROTAC gibi nükleotit temelli, FotoPROTAC ve CLIPTAC gibi farklı PROTAC çeşitleri mevcuttur. Başlangıçta peptit temelli olarak başlayan PROTAC çalışmaları, bu moleküllerin sindirim enzimlerince kolaylıkla parçalanması, düşük stabiliteye ve zayıf hücre geçirgenliğine sahip olması gibi uygulamada zorluklara sahip olması, bilim insanlarını yeni tasarımlara yöneltmiştir. Yeni tasarımlarla birlikte zaman içerisinde, afinitenin artırılması, hedeflendirmenin güçlendirilmesi, biyouyumluluğun artırılması ve ilaç ile hedeflenemeyen (undruggable) olarak düşünülmüş hedeflere yönelik çalışmaların yapılmasına odaklanılmıştır(X. Li vd., 2022).

İlaç teknolojisinde spesifite ve hedeflendirme en önemli konulardan biridir. İlacın hedef dışı etkileşimleri ile yüksek doz uygulamaları istenmeyen ve tehlikeli yan etkileri doğurabilir. PROTACların içerdiği ilgili protein ligandı ve E3 ligaz ligandı ile hedeflendirme seçiciliği sağlaması ve bu modüllerin çeşitlendirilebiliyor olması etkili bir protein degradasyonu sağlıyor. Aynı zamanda inhibitörler gibi bazı ilaç moleküllerinde karşılaşılan ilaç dirençliliği problemini de aşabiliyor. PROTAClar ilaç dirençli meme kanserinde östrojen reseptörüne hedeflendirilmiş olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bununla beraber sadece kanser için değil, aynı zamanda hepatit C gibi ilaç dirençliliği görülen başka hastalıklarda da kullanılmıştır (Graham, 2022).

PROTAClar hücre zarı reseptörlerine yönelik tasarlanabilir. Bu moleküller reseptör aracılı olarak hücre zarından endositoz ile sitoplazmaya alınarak aktif hale getirilir ve hedef protein için yıkımı gerçekleştirirler. FOLR1 reseptörüne yönelik Folat-Kafesli-PROTAC, HER2 reseptörü ile bağlantılı tümör hücreleri için geliştirilmiş olan Antikor-PROTAC ve oligomerlerin alımını sağlayan ve immunojenisitesi olmayan nükleolin proteini ile ilişkili Aptamer-PROTAC gibi geliştirilmiş ve antikanser stratejileri destekleyen PROTAC stratejileri de çalışılmaktadır (Sincere vd., 2023).

PROTAClar, küçük-moleküllü inhibitörler, RNA interferans molekülleri ve monoklonal antikorlar gibi proteine yönelik terapötik ilaç moleküllerine göre çeşitli avantajlara sahiptir. Genellikle küçük moleküllü inhibitörler için hedef proteinin inhibisyonu için

aktif bölgenin gerekliliği ve proteine bağlanan diğer ligandlarda yarışması, hücrelerde ilaç dirençliliğinin gelişmesi ve hedef dışı etkilerin görülmesi gibi önemli problemler ortaya çıkabilir. Bunun yanında monoklonal antikor kullanımında hedef proteine yüksek afinite gösterse de zayıf hücre geçirgenliği, oral kullanıma müsait olmaması ve yüksek bütçeli oluşu kullanımını zorlaştırıyor. RNA interferans moleküllerinde ise mRNA ile genin susturulması indüklenebilir ama monoklonal antikorda olduğu gibi, hücreye zayıf penetrasyon, hedef dışı etkileşimlerin görülür. Diğer yöntemlerden farklı olarak PROTAClar, oral kullanıma uygun olması, ilgili protein ve E3 ligazı ile düşük afinite gösterse bile hedefe yönelik degradasyonu gerçekleştirmesi ve tekrar kullanılabilir olması, bağlanmada aktif bölge gerekliliğinin olmaması, ilaç yapılamayacak hedeflere etki edebilmesi ve ilgili proteine hedeflendirilmesi açısından öne çıkmaktadır (Liu vd., 2022).

İnsan vücudunda 600'den çok E3 ligaz proteini kodlansa da hedeflenmiş protein degradasyonu için kullanılacak E3 ligaz komplekslerinin tanımlanması gerekir. Kanser çalışmaları için tasarlanan PROTAClarda Von Hippel-Lindau (VHL) ve Cereblon (CRBN) E3 ligaz ligandları yaygın olarak kullanılır. VHL, elongin B ve C ve RBX-1 proteinlerinin oluşturduğu bir E3 ubiquitin ligaz protein kompleksidir (Han & Sun, 2023). CRBN ise Cullin-4-RING (CRL4) E3 ubiquitin ligaz kompleksini ve DNA hasarı bağlayıcı protein 1 (DDB1)'i içeren bir proteindir. Pek çok kanser türü için CRBN E3 ligazıyla beraber hedeflendirilmiş 30'dan fazla PROTAC tasarımı çalışılmıştır. CRBN temelli PROTAC moleküllerinin içinde ağızdan alım için en uygun PROTACTır ve klinik çalışmalar için kolaylık sağlar ve ümit vadeder.

PROTAClar immün sistem bozuklukları, viral enfeksiyonlar nörodejeneratif hastalıklarda kullanılmakla beraber, kanser çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Farklı kanser türleri için, kanserin türüne ve mekanizmasına yönelik proteininin hedeflenmesi ile global olarak çeşitli şirketler ve bilim insanları tarafından çalışmalar yürütülmektedir. 2019 yılında Arvinas şirketi tarafından CRBN ligandı ve androjen reseptörüne yönelik tasarlanan ve dirençli prostat kanserinde kullanılan ARV-11 (NCT04072952) ve östrojen reseptörüne hedeflendirilmiş metastatik meme kanseri için kullanılan ARV-471 faz 2 çalışmaları yürütülmektedir (ClinicalTrials.gov, t.y.). Bunun yanında 2021 yılında LYNK tarafından akut miyeloid lösemi için Ras ve GTPaz hedefli LNK-01002, 2022 yılında ise C4 Therapeutics tarafından CFT8919 isimli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri için ilaçlar üretilmiştir (He vd., 2022) .

Doğrudan WRN'ye bağlanarak bu proteinin yıkımını tetikleyen bir PROTAC geliştirilmemiş olmakla beraber, Rouse araştırma grubunun 2024'te yayınladığı çalışmada WRN lokusu bromodomain ile birleştirilmiş ve proteinin bromodomain ile birlikte üretilmesi sağlanmıştır. Bromodomain hedefleyen PROTAC aracılığıyla yıkıma uğratılan füzyon proteinlerin mikrosatellit instabil kanser hücrelerinin hücre siklusunu bozduğu gösterilmiştir (Tejwani vd., 2024).

### 1.6. WRN'nin Hücresel Rolü

WRN helikazı hücre içinde pek çok göreve sahip olmakla birlikte, özellikle DNA tamir mekanizmalarında ve replikasyon çatalının açılmasında önemli görevlere sahiptir. WRN helikazları normalde hücre çekirdeğinde lokalize olup, hücrede DNA hasarı olduğunda yer değiştirir ve ekzonükleaz aktivitesi ile replikasyon çatalının açılmasında bazı proteinlerle beraber rol oynar. DNA'nın çift zincir kırığının olduğu bölge için replikasyon çatalı durdurulur ve WRN proteini bağlanır. MRE11 proteininin aktivasyonu sağlar ve böylece RAD51'i stabilize ederek, DNA degradasyonunu engelleyerek, replikasyon çatalını yapılandırır (Tsuge & Shimamoto, 2022). Eğer WRN fonksiyon göstermezse replikasyon çatalında ve DNA tamir mekanizmalarında hataya sebep olur, bunlar anormal kromozom yapıları ve DNA da silinmeler ile sonuçlanır. DNA çift zincir kırıklarının tamirinden sorumlu olan homolog olmayan uç birleştirmede Ku faktörünün ve MRN kompleksinin görev aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, WRN proteininin de Ku faktörüne bağlandığı ve homolog olmayan uç birleştirme tamir mekanizmasında rol oynadığı kanıtlanmıştır (Tsuge & Shimamoto, 2022; Kusumoto vd., 2007; Mendoza vd., 2016)

WRN proteininin, RNA polimeraz ile bir kompleks oluşturarak çekirdekte ribozomal RNA transkripsiyonunu desteklediği bilinmektedir. Ancak çalışmalar sınırlı olup, normal bireylerde rDNA ile ilgili dizilimlerin düzenli ve belirli bir şemaya sahip olduğu ve WS'li bireylerde rDNA dizilimlerinin ise mutasyonlu kopya sayısının yüksek olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarla, WRN'deki rDNA mutasyonların WS'deki erken yaşlılığın sebeplerinden biri olabileceği düşünülmektedir (Tsuge & Shimamoto, 2022).

WS hastalarında öne çıkan bir başka özellik, telomer anomalilerinin olmasıdır. Erken yaşlanma belirtileri görülen WS hastalarından alınan fibroblastlarda, telomer bozuklukları gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, WS hastalarından alınan fibroblastlara

telomerez enziminin verilmesinin telomer uzunluğunu artırdığı ve erken yaşlanmanın önleildiği gözlemlenmiştir. Böylece, WRN'nin telomer bakımında önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır. Ayrıca telomere bağlanan shelterin proteinlerinden TRF1, TRF2 ve POT1 ile WRN proteininin bağlandığı ve telomer dengesinde rol oynadığı da bilinmektedir (Tsuge & Shimamoto, 2022).

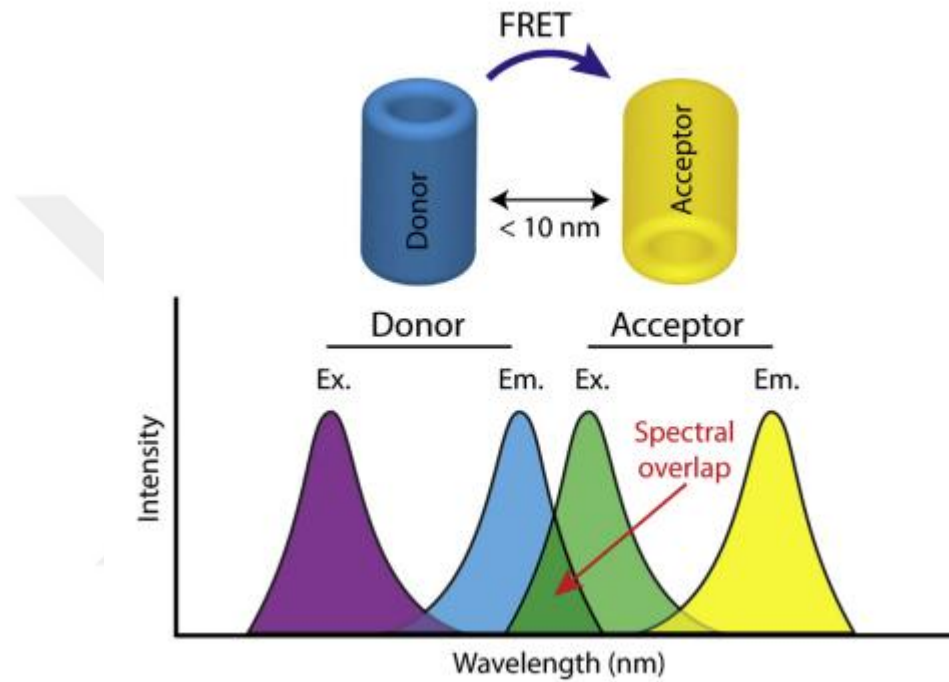
DNA'nın guanince zengin bölgelerinden olup, paralel ve anti-paralel yönlü bir katlanmanın gerçekleşmesi ile oluşan ve DNA'nın düğümleri olarak görülen G-kvadrupeks bölgelerinin açılımında WRN proteini önemli bir role sahiptir. Genomda oldukça yaygın olduğu düşünülen G4 sekansları, genomda rastgele bir dağılım göstermeyip, gelişmiş ökaryotlarda özellikle replikasyon orijininde bulunmaktadır. G4 sekanslarının replikasyon orijinine yakın bölgelerde bulunması, bilim insanlarına bu bölgelerin transkripsiyonel düzenlemede ve replikasyonun başlamasında görev aldığını düşündürmektedir. Stabil bir yapıya sahip olan ve bunu korumaya çalışan G4 yapıları transkripsiyonun inhibisyonunda etkilidirler. Bunun yanında bazı proteinlerle etkileşime girerek transkripsiyonun baskılanmasında ve stimüle edilmesinde de etkilidirler. WRN helikazı, G4 bölgelerinin tanınmasını ve açılmasını sağlayan bir proteindir. Böylece, G4 DNA bölgeleri WRN'nin bir substratı olarak değerlendirilir ve bu stabil bölgelerin çözülmesinde önemli bir role sahiptir (Mendoza vd., 2016).

Ayrıca, WS'li zebra balığı modellerinde, WS'de görülen boy kısalığının kemik gelişimi ile ilgisi araştırılmıştır. Kısa boy ve kemik gelişim bozuklukları ile ilişkilendirilen SHOX geninin, WRN proteininin doğrudan hedefi olduğu gösterilmiştir. WRN'nin SHOX geninin transkripsiyonel regülasyonunu sağladığı ve kemik gelişiminde rol oynadığı kanıtlanmıştır (Tian vd., 2022).

### 1.7. WRN Aktivite Sensörleri

WRN aktivitesinin belirlenmesi için ticari olarak temin edilebilir problar vardır. Bu problar etiketli çift sarmal DNA'nın helikaz aktivitesine bağlı olarak açılmasına veya dolaylı olarak ATP kullanımına dayanır. Etiketli DNA'da floresan bileşik ve sönmülendirici yer alır ve sarmal açıldığında sönmülendiricinin uzaklaşması ile floresan bileşiğin emisyonu gözlemlenir (<https://bpsbioscience.com/wrn-helicase-activity-assay-kit-78852>). Proje kapsamında üretilecek olan prob enerji transfer mekanizmasını kullanacaktır. Förster Rezonans Enerji Transfer (FRET) metodu moleküllerin mesafesine bağlı olarak çalışan foto fiziksel bir prostestir. Radyasyon olmaksızın dipol-dipol

birleştirme mekanizmasıyla uyarılmış donör florofordan uygun bir alıcı proteine veya florofora enerji transferinin gerçekleşmesi ile çalışır. Rezonans temelli bir interaksiyon olmasıyla interatomik mesafelerde gerçekleşir. FRET, 1-10 nm lık yakın mesafelerde çalışır, çünkü 1 nm nin altında donör ve alıcı arasındaki çarpışma üstün gelirken, 10 nm nin üstündeki mesafelerde ise donör ve alıcının kendi emisyonu baskın olur (Shrestha vd., 2015).

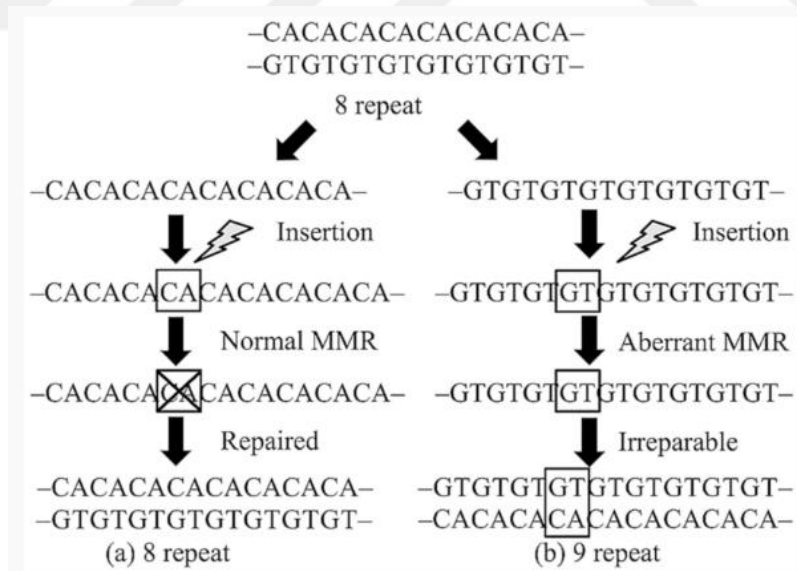


**Şekil 1.6.** Förster Rezonans Enerji Transferi sistemi. Uyarılmış donör molekülünden, akseptör molekülüne enerji transferi gerçekleşir. Ex. ‘excitation’ ı ifade edip donörün uyarılması anlamına gelir. Em. ise emisyon anlamına gelen ‘emission’ kelimesini açıklamaktadır. Mavi renkle ifade edilen donör emisyonu ile, yeşil renkle gösterilen akseptör uyarımı grafiklerinin çakışması (overlap) beklenir ( (Broussard & Green, 2017).

FRET temelli çalışmalar nano ilaç interaksiyonlarının ve biyolojik sistemlerin moleküler sinyal görüntüleme mekanizmalarında başarıyla kullanılır. Yüksek hassasiyete, iyi seçiciliğe sahip olması ve radyoaktif olmaması ilaç stratejileri için önemlidir. FRET, spektroskopik bir cetvel olarak görülür ve donör ve alıcı floroforlar arasındaki mesafeye duyarlıdır (Chen vd., 2019). Enerji transferindeki verim iki birim arasındaki uzaklıkla ters orantılıdır. Bu özelliği dikkate alınarak önerilen proje kapsamında üretilecek prob tasarlanmıştır. WRN helikazı ile işlenen G-kuadrupleks yapısı bozulur ve prob yapısındaki iki florofor arasındaki uzaklık artar. Uzaklığın artmasıyla donör emisyonunun artması ve WRN'nin helikaz aktivitesinin tespiti sağlanabilir.

## 1.8. Werner Sendromu ve Kanser

Kansere yatkınlık ile ilişkilendirilen genler fenotipik olarak düşük ifade edilmeye sahip olsalar da kansere sebep olan mekanizmalar ile doğrudan ilişkilidirler. DNA tamir mekanizmaları, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü gibi kanser hücrelerinde etkilenmiş ve değiştirilmiş yolaklarda, bu yatkınlık gösteren genlerin etkileri görülmektedir. Genlerin, tümör yatkınlığı ile ilişkilendirilmiş varyantları mutasyon hızı üzerinde de etkilidir. Birçok gen ortak olarak çalışarak bireyde kansere yatkınlığı belirlemede rol oynar (Newman vd., 2020). İnsan genetik hastalıkları, kanserle ilişkilendirildiğinde DNA tamir mekanizmalarında bozukluklara sebep olan varyantlar önemlidir ve Werner sendromunda etkili olan WRN geninin varyantları da bu tamir mekanizmalarına etki ederek, yüksek oranda nadir kanserlere karşı yatkınlık oluşturur (Newman vd., 2020). Amerika, Japonya, Sardinya, Türkiye, Batı Avrupa gibi farklı bölgelerden Werner sendromuna sahip hastalarda melanoma, tiroid kanseri, meningioma, lösemi ve myelofibrozis gibi çeşitli nadir kanser türlerinin görüldüğü kaydedilmiştir (Goto vd., 1996). WS'nin kanserle olan bağlantısının anlaşılması için yapılan çalışmalarda mikrosatellitlerin etkisini araştırmışlardır.

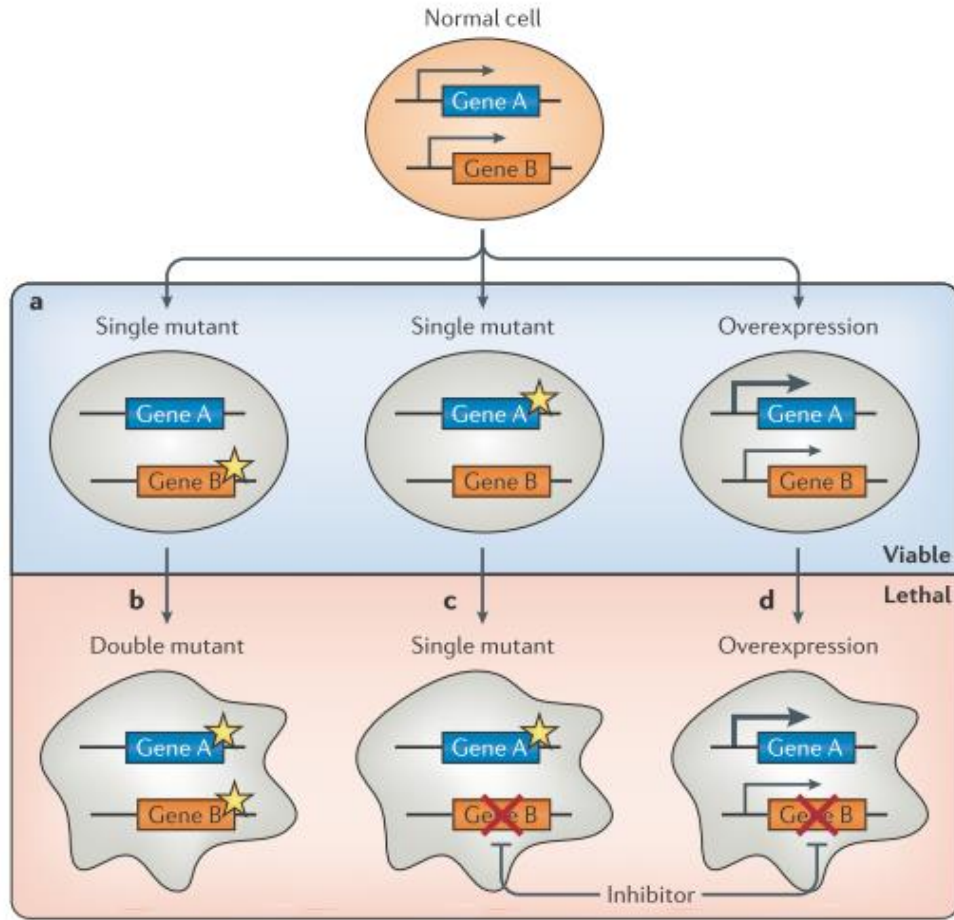


**Şekil 1.7.** Mikrosatellit instabilitesi. Baz tekrarlarından oluşan mikrosatellitlerde fazladan tekrarların eklenmesi durumu gerçekleşir, eğer tamir edilmezse instabiliteye sebep olur. Mikrosatellit instabilitesi Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR) genlerindeki mutasyonlar sonucu meydana gelir (Kunitomi vd., 2017).

Mikrosatellitler (MS) 1-9 nükleotit içeren kısa tekrar sekanslarıdır. Mikrosatellitler, intron ve kodlanmayan bölgelerde bulunabildiği gibi genellikle genin

kodlanan bölgesinde bulunurlar. Mutasyona açık olan bu bölgelerde, bazlarda silinme ve eklenme mutasyonları görülebilir. Şekil 1.7’de görüleceği üzere normalde meydana gelen bu mutasyonlar yanlış eşleşme tamir mekanizmaları ile düzeltilir, fakat WRN gibi tamirden sorumlu bu genlerde çeşitli mutasyonların olması DNA tamirinin gerçekleşmesini engeller. Bu yüzden tümör oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rol oynarlar. Genomik instabilitenin mikrosatellit bölgelerinde olması ise mikrosatellit instabilitesi (MSI) olarak adlandırılır (K. Li vd., 2020). Mikrosatellitlerin hipermutasyon bölgeleri olması ve yanlış eşleşme tamir yollarındaki bozukluklar, çeşitli kanserlerin oluşumunda önemlidir. Bu tip kanserler mikrosatellit instabilitesi yüksek (MSI-H) kanserler olarak tanımlanır ve kolorektal, gastrik ve endometrial kanserlerin bazı tipleri bunlara örnektir (Newman vd., 2020). WRN geninin, DNA tamir mekanizmalarında ve telomer bakımında etkili olmasıyla genomik stabilitenin önemli elemanlarından olduğu bilinmektedir. WRN geni, mikrosatellit instabilitesi görülen kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir (Futami vd., 2008). RNA interferans ve CRISPR teknikleri kullanılarak yapılan gen inaktivasyon çalışmaları ile WRN’nin helikaz aktivitesi MSI-H hücreler ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanında mikrosatellit stabilitesine sahip kanserlerde ve normal hücrelerde, WRN’nin susturulmasının tolere edilebildiği gözlemlenmiştir. Bu yüzden, WRN, MSI-H kanserlerin tedavisi için umut verici bir ilaç hedefi olarak değerlendirilir (Newman vd., 2020).

Bunun yanında WRN’nin kanser ile stratejik başka bağlantıları da vardır. Kanserde bir yolaktaki problem, hücrelerin yaşaması için ikinci bir yolağa ihtiyaç duyabilir. Böylece, ikinci yolağın inhibe edilmesi kanser hücrelerini ölüme gönderebilir ve bu strateji sentetik letal etki olarak adlandırılır (Mengoli vd., 2023). Sentetik letal etkileşimlerin keşfedilmesi, kanser tedavi stratejilerinde önemli bir potansiyel olarak görülmektedir. Sentetik letal etki, bir genin hücrenin canlılığını ikinci bir gene bağlı hale getirmesidir. Böylece, normal hücreleri etkilemeden, hücrede belirlenen ikinci gende ilgili mutasyonu oluşturarak kanser hücresinin ölümü sağlanabilir. Birçok kanser türü için bu ikili mutasyonlar araştırılmaktadır (van Wietmarschen vd., 2021). Sentetik letal etki iki veya daha fazla genin ekspresyonundaki bozuklukları ifade eder. Sadece genin inhibisyonu ile değil, aynı zamanda aşırı ekspresyon ve mutasyon durumları da hücreyi ölüme götürebilir. İnhibitörler genin susturulmasını hedefler ve mutasyonlu veya aşırı eksprese edilen sentetik letal partneriyle birlikte kanser hücresini ölüme götürür.

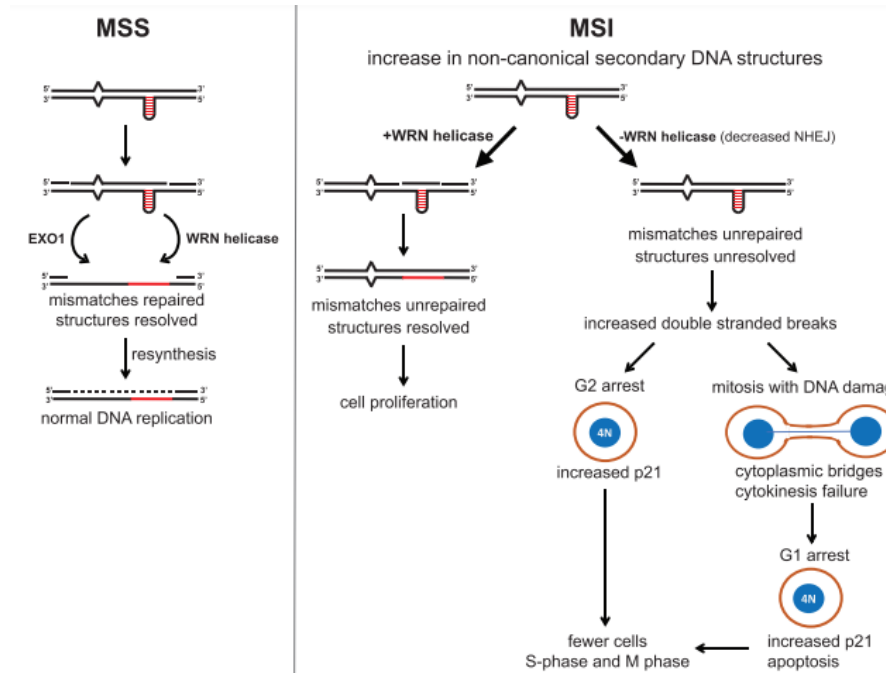


**Şekil 1.8.** Sentetik letalite konsepti. Sentetik letalite partneri olan A ve B genlerinin her ikisinde de mutasyon olması, birinde mutasyon varken diğerinin inhibe olması veya birinin aşırı eksprese olup diğerinin inhibe olması gibi durumlarda hücre ölümü gerçekleşir ve bu durum sentetik letalite olarak adlandırılır. Genlerden sadece birinin aşırı eksprese olması veya mutasyonu durumunda hücre canlılığını devam ettirebilir (O’Neil vd., 2017).

Temelde koşullu ve koşulsuz olmak üzere sentetik letalite ikiye ayrılır. Koşulsuz letalitede, letal partnerlerin mutasyonlu veya aşırı eksprese olma durumunda diğer genin inhibisyonu ile hücre ölüme gönderilir. Bundan farklı olarak koşullu letalite de mutasyon veya aşırı ekspresyon durumu olmasına rağmen ROS, hipoksi gibi bazı içsel koşulların olmasına veya radyasyon gibi DNA hasarına neden olacak dışsal faktörlerin olmasına ihtiyaç duyması durumudur (S. Li vd., 2020). Bunun yanında kanserin çok yönlü etkileşimleri ve yolakları olması farklı sentetik letal partnerlerin keşfedilmesinin yolunu açmıştır. Aynı zamanda mekanizmalarına ve etki alanlarına göre sentetik dozaj letalitesi, kolateral letalite ve diğerleri olarak sınıflandırılabilirler (S. Li vd., 2020)

Sentetik letalite temelli kanser tedavileri son zamanlarda en etkili kanser tedavilerinin arasında yer aldı. Poli ADP-Riboz polimeraz (PARP) DNA çift zincir kırıklarının tamirinde etkili olduğu bilinmektedir. PARP inhibitörlerinin sentetik letal partneri olan

BRCA2 mutasyonuna sahip hücreleri ve tümörleri DNA hasarına sebep olacak bir ajan kullanmadan ölüme götürdüğü kanıtlanmıştır. Bunun yanında MDA2 ve PP2A, sentetik dozaj letalitesine örnek olarak verilebilir. MAD2'nin aşırı ekspresyonu durumunda PP2A'nın inhibisyonunun gerçekleşmesiyle lenfoma, akciğer ve karaciğer tümörlerinde ölümle sonuçlandığı bilinmektedir (Topatana vd., 2020). Pek çok kanser türünde DNA tamir mekanizmalarında bozukluk olması sentetik letalite çalışmalarına potansiyel bir alan sağlamıştır. Homolog rekombinasyon, baz çıkarma tamiri ve homolog olmayan uç birleştirme mekanizmalarında etkili olan BRCA2-PARP1 sentetik letalite partnerliğinin PARP1 inhibitörü ile sentetik letalite de başarı sağlaması bu tutumu öne çıkarmıştır (Liu vd., 2024; Chan vd., 2019; Fang, 2014). RecQ DNA helikazı olan WRN'nin inhibisyonunun, yanlış eşleşme tamir mekanizmasında bozukluklar sonucu meydana gelen mikrosatellit instabilitesi (MSI) olan kanser türlerinde çift zincir kırıklarına sebep olarak kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü ve hücre siklusunda bozukluklara sebep olduğu kanıtlanmıştır (Chan vd., 2019). Kolon, gastrik, yumurtalık kanserleri gibi pek çok kanser türünde bulunan hipermutasyon bölgelerini ifade eden mikrosatellit instabilitesinin WRN ile ilişkili olduğu ve sentetik letalite partnerliği sunduğu görülmüştür (Chan vd., 2019). Kolon kanseri hücre hatlarında DNA instabilitesi çok yaygın olup, DNA yanlış eşleşme prosesleriyle ilişkili olarak mikrosatellit instabilitesi de %15 lik bir yüzdeye sahiptir (Berg vd., 2017; Ahmed vd., 2013).



**Şekil 1.9.** MSS ve MSI ya sahip hücrelerde WRN geninin fonksiyon modeli. MSS olan hücrelerde WRN helikazı zinciri açar ve MMR genleri tarafından yanlış eşleşme hataları tamir edilir. Bunun yanında, MSI

hücrelerde MMR genlerinde anormallikler olduğu için yanlış eşleşme hataları tamir edilmez, mutasyonla beraber replikasyon gerçekleşir ve hücre proliferasyonu devam eder. Bu MSI hücrelerde WRN helikazının inaktivasyonu ile çift zincir kırıkları artar ve hücre G1 veya G2'den apoptoza gönderilir (Kategoraya vd., 2019).

Aynı zamanda WRN helikazı, MSI kolon kanseri hücrelerinde p53 ve PUMA genleri ile sentetik letalite partnerliği yapmaktadır. WRN'nin RNA interferans kullanılarak inhibe edilmesiyle P53 ve PUMA aracılı apoptotik yolak MSI kolon kanseri hücrelerinde indüklenmektedir (Hao vd., 2022). WRN helikazının inhibisyonunun MSS ve sağlıklı hücrelerde etki göstermeyip, MSI kolon kanseri hücrelerinde sentetik letal etki göstermesi ilaç şirketleri için potansiyel bir alan doğurmaktadır. Novartis HRO761 kodlu WRN'nin ATPazını hedefleyen bir inhibitör geliştirmiştir. Bu inhibitör ile yan etkilerin azaltılması, ilaç dirençliliğinin önüne geçilmesi ve toksisite olmaması sağlanıp, MSI tümörlerde gerileme görülmüştür. Aynı zamanda İrinotecan ve Tislelizumab ilaçları ile ayrı olarak kombine tedaviler denenmektedir. 2020'de Vividion Therapeutics bir başka WRN inhibitörü olan VVD - 133214'ü geliştirmiştir. HRO761 ve VVD - 133214 WRN'nin allosterik bölgesine bağlanarak konformasyonunu değiştiren inhibitörlerdir ve HRO761 yüksek seçiciliğe sahiptir(Xie & Zhang, 2024) .

İnsan boyun ve kafa skuamöz hücreli karsinomlarında yüksek ekspresyona sahip olan RecQ1 ve WRN genlerinin beraber susturulmasının, karsinoma hücre hatlarında hücre büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Orlovetskie vd., 2017). Ayrıca, bir WRN inhibitörü olan NSC-19630 ile muamele edilen HeLa hücrelerinde WRN'nin DNA hasarı veya hücresel stres fonksiyonlarını etkileyerek hücre proliferasyonunu zayıflattığı ve apoptozu indüklendiği kanıtlanmıştır (Aggarwal vd., 2011).

Yapılan araştırmalar ilaca dirençli BRCA2 mutasyonuna bağlı kanser oluşumu gözlenen fare modellerinde WRN inaktivasyonunun kanser hücrelerinin ölümünü artırdığını göstermiştir (Datta, 2021). WRN'nin DNA replikasyonunu DNA hasarına rağmen devam ettirmesi kanserleşmenin önünü açmakta ve WRN inhibisyonu kanser hücrelerini ilaca karşı duyarlı hale getirmektedir.

Bunların yanında WRN, WS hastalarının yaşaması için temel bir protein değildir. WS hastaları ortalama 40-50 yıllık yaşam süresine sahiptirler. Bu bilim insanlarına WRN'nin kısa dönemli susturulmasının kanser hücrelerini öldürmesinin yanında, bireyin yaşamı için normal hücrelerde büyük bir değişikliğe sebep olmayacağını ve yan etkilerin çok az olacağını düşündürmüştür (Mengoli vd., 2023).

Projenin ikinci kısmında seçici WRN protein yıkımı sağlanacaktır. Bu amaçla WRN'ye bağlanarak onun poliubikitinlenmesine aracılık edecek PROTAC bileşigi (hedef molekül) sentezlenecektir. WRN bağlanan modül (mavi) ve E3 ligaza bağlanan CRBN modülü (turuncu) WRN'yi E3 ligaza yakınlaştıracaktır. Maleimid türevi mavi modül NSC-19630 olarak adlandırılan, WRN proteine bağlanarak inhibisyona sebep olduğu bilinen inhibitörden türevlendirilmiştir (Aggarwal, 2011). Ubikitin E3 ligaza bağlanarak WRN'yi bu enzime yakınlaştıracak olan molekül, bu proteinin etiketlenerek proteozomal degradasyonunun sağlanması istenmiştir. Hücrede WRN protein seviyesindeki azalma ve buna bağlı biyolojik tepki incelenmiştir.

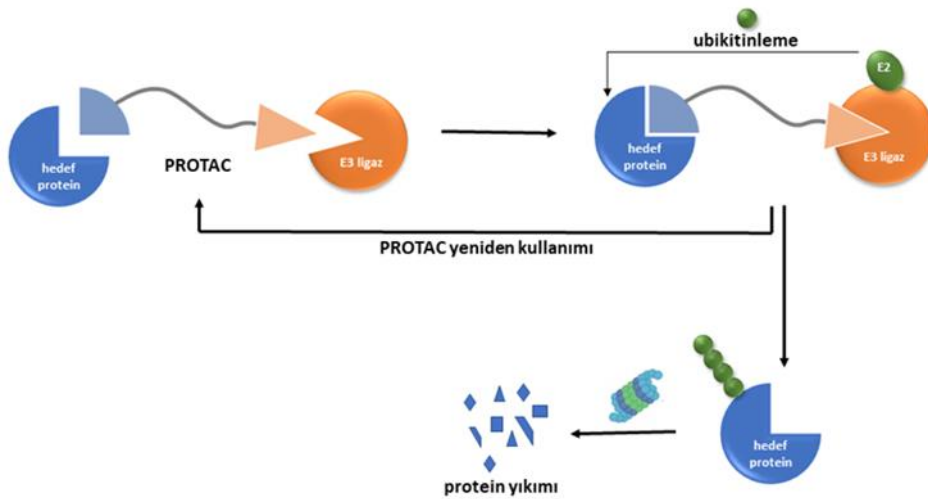


## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada WRN proteinine yönelik çalışması hedeflenen PROTAC molekülünün tasarımı, kimyasal sentezi ve  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometri yöntemi ve Yüksek Çözünürlüklü Kütle Analizi (HRMS, QTOF-LC/MS) kullanılarak yapı tayininin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bununla birlikte sentezlenen molekülün hücre kültürü çalışmaları için SW480 ve HCT-116 hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatları üzerinden molekülün sitotoksite analizi, hücre hatlarındaki protein seviyelerinin değişimlerinin anlaşılması için Akış Sitometri tekniği ve konfokal mikroskopunda analizi gerçekleştirilmiştir.

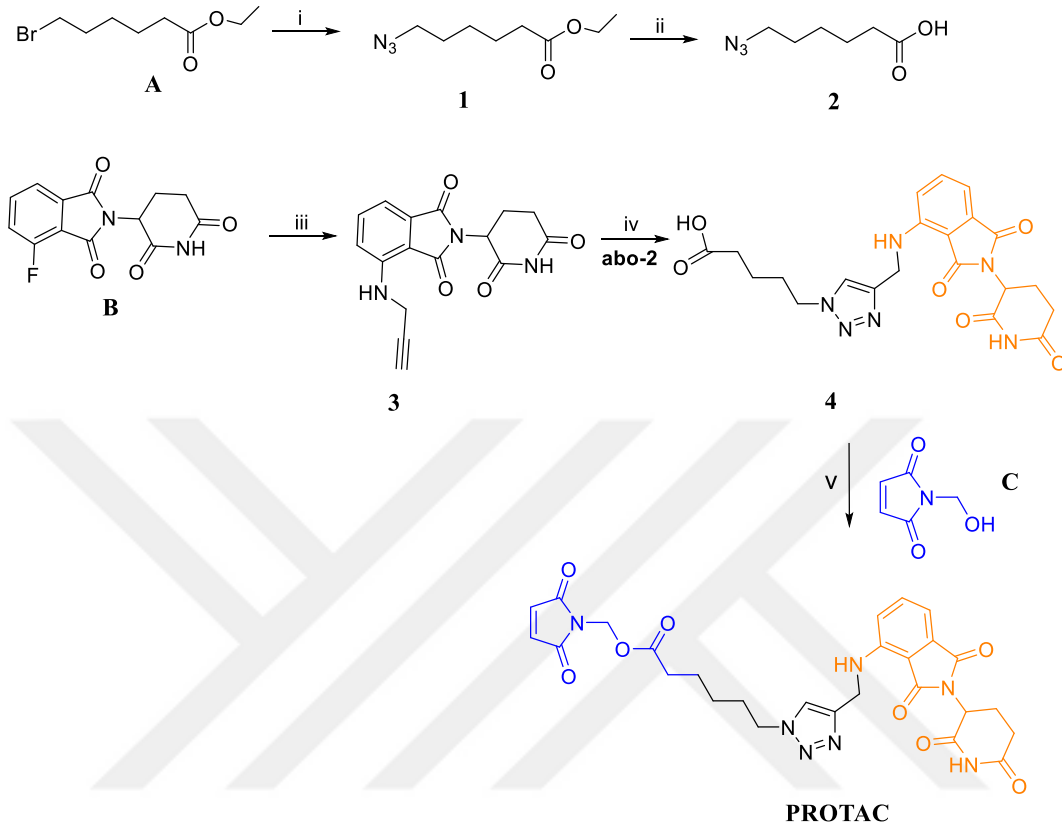
### 2.1. Bileşiklerin Tasarımı

Bu çalışmada WRN proteinine özgü bir PROTAC molekülü tasarlanmıştır. Molekülün tasarımında WRN proteinine hedeflendirilmiş bir modül ile ubiquitinleme yaparak protein yıkımını sağlayan E3 ligaz modülüne bir linker aracılığıyla bağlandığı bir tasarım gerçekleştirilmiştir. Böylece WRN modülü, hücredeki WRN proteinini tanıyıp, bağlı olduğu E3 ligaz modülü sayesinde ubiquitinleme ve proteinin yıkımını gerçekleştirmesi hedeflendi.



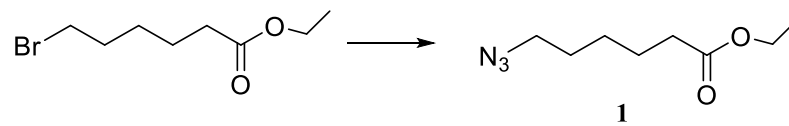
**Şekil 2.1.** Hedefli WRN yıkımı sağlayacak olan molekülün yapısı ve çalışma mekanizması. Mavi birim WRN'yi tanıyacak ve turuncu CRBN birimi E3 Ligaza bağlanarak ubiquitinlemeyi tetikleyecektir. Bu sayede proteozomal protein yıkımı gerçekleşecektir.

## 2.2. Bileşiklerin Sentezi



**Şekil 2.2. PROTAC** bileşiğinin sentez şeması. Tepkime koşulları: i) A,  $\text{NaN}_3$ , DMSO,  $60^\circ\text{C}$ ; ii)  $\text{LiOH}$ ,  $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ ; iii) propargil amin, DIPEA, DMSO,  $130^\circ\text{C}$ ; iv) tetrakis asetonitril bakır (I) hekzaflorofosfat, 2,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; v) N-maleimidomethanol (C), EDCI, HOBt,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

### 2.2.1. 1 Nolu bileşiğin sentezi



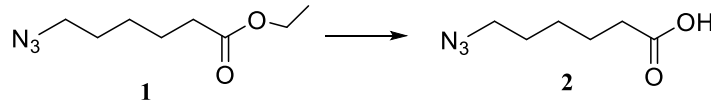
**Şekil 2.3. 1 Nolu** bileşiğin sentez şeması. Tepkime koşulları:  $\text{NaN}_3$ , DMSO,  $60^\circ\text{C}$ .

10 mmol, 2,23 g, 1,78 mL) Etil-6-bromoheksanoat (A) 10 mL DMSO içinde çözüldü. 1,5 eşdeğer, 15 mmol, 975 mg sodyum azid eklendi ve ağzı kapatılıp 3 saat  $60^\circ\text{C}$  de karışmaya bırakıldı. Süre sonunda karışım soğutuldu ve 200 mL dietil eter ve 200 mL su ile ekstraksiyon yapıldı. Üst faz olan dietil eter fazı toplandı ve birkaç spatül sodyum

sülfat ile kurutuldu. Filtre kağıdı ile filtrelenip balona aktarıldı. Çözücü vakum altında uçuruldu. Ürün kantitatif verimle elde edildi ve sonraki basamaklarda saflaştırılmaya ihtiyaç duyulmadan kullanıldı.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Kloroform-d)  $\delta$  4.09 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.21 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.26 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.38 (m, 2H), 1.21 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

### 2.2.2. 2 Nolu Bileşiğin Sentezi

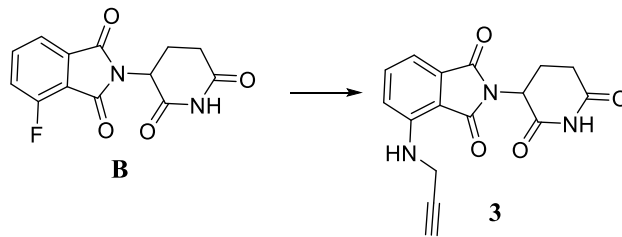


**Şekil 2.4.** 2 Nolu bileşiğin sentez şeması. Tepkime koşulları: LiOH, THF: H<sub>2</sub>O.

8 mmol, 1,5 g **1** nolu bileşiği 20 mL tetrahidrofuran (THF) içinde çözüldü. 16 mmol, 384 mg LiOH vial içinde 10 mL su ile çözülüp yavaşça çözeltiye eklendi. Oda sıcaklığında 12 saat tepkime karışmaya bırakıldı. Çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Diklorometan su ile ekstraksiyon sonrası organik faz sodyum sülfat ile kurutuldu. Çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Ürün 64% verimle elde edildi.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Kloroform-d)  $\delta$  3.22 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 2.31 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 1.99 – 1.45 (m, 2H), 1.43 – 1.21 (m, 1H).

### 2.2.3. 3 Nolu Bileşiğinin Sentezi



**Şekil 2.5.** 3 Nolu bileşiğin sentezi. Tepkime koşulları: proparjil amin, DIEA, DMSO, 130°C, 16 saat.

500 mg, 1.8 mmol 2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-4-fluoroisindolin-1,3-dion 5 mL dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. 5.4 mmol, 3 mol eşdeğer, 919 mL diisopropil etil amin (DIPEA) ve 1.98 mmol 1.1 eşdeğer, 74 mL proparjil amin sırasıyla tepkimeye eklendi. Tepkime 130 °C'de 16 saat karıştırıldı. Hekzan: Etil asetat mobil fazı kullanılarak

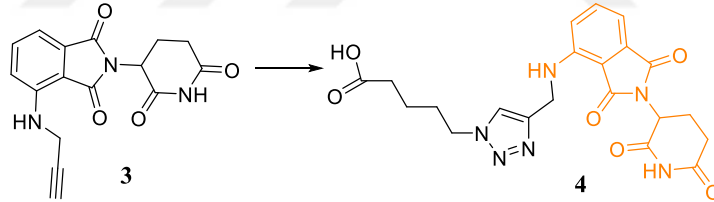
(1:1; v: v) TLC takibi yapıldı. Başlangıç bileşiği tamamen tükenene kadar takip edildi. Tepkime oda sıcaklığına soğutuldu. Su ve dietil eter kullanılarak ekstraksiyon yapıldı. Organik faz toplandı, sodyum sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ile kurutuldu ve çözücü basınç altında uzaklaştırıldı. Elde edilen malzeme silika jel kolon kromatografisi ile Hekzan: Etil asetat (1:1; v: v) mobil fazı kullanılarak saflaştırıldı. Ürün sarı katı olarak elde edildi (220 mg, 44%). NMR ve kütle spektrometresi analizlerine gönderildi. Sonuç istenen madde ile uyumlu olarak elde edildi.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Kloroform-*d*)  $\delta$  8.02 (s, 1H), 7.50 (dd,  $J = 8.5, 7.2$  Hz, 1H), 7.13 (dd,  $J = 7.2, 0.6$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.38 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 4.85 (dd,  $J = 12.2, 5.4$  Hz, 1H), 4.03 (dd,  $J = 6.1, 2.5$  Hz, 2H), 2.90 – 2.59 (m, 3H), 2.20 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 2.09 – 2.01 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.92, 169.25, 168.17, 167.44, 145.56, 136.15, 132.43, 117.18, 112.75, 111.41, 79.14, 72.19, 48.96, 32.32, 31.42, 30.94 (aseton piki), 22.77.

QTOF-LCMS: hesaplanan  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+ = 312.0984$ ; deneysel  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+ = 312.09749$ ,  $\Delta = 2.92$  ppm.

#### 2.2.4. 4 Nolu Bileşiğin Sentezi



**Şekil 2.6.** 4 Nolu bileşiğinin sentez şeması. Tepkime koşulları: tetrakis asetonitril hekzaflorofosfat, 6-azidohekzaanoik asit, DKM, 25°C, 16 saat.

1.55 mmol, 450 mg 3 Nolu bileşik ve 4,65 mmol, 360 mg 2 nolu bileşik 6 mL diklorometan içinde çözüldü. 0,68 mmol 255 mg Tetrakis (asetonitril) bakır (I) hekzaflorofosfat eklendi ve 1 gün boyunca oda sıcaklığında azot altında karıştırıldı. Su ve diklorometan ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Maddenin saflaştırılması için diklorometan içinde %7 dimetilformamid içeren mobil fazı kullanılarak silika kolon kromatografisi ile, veya preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırıldı ve en son

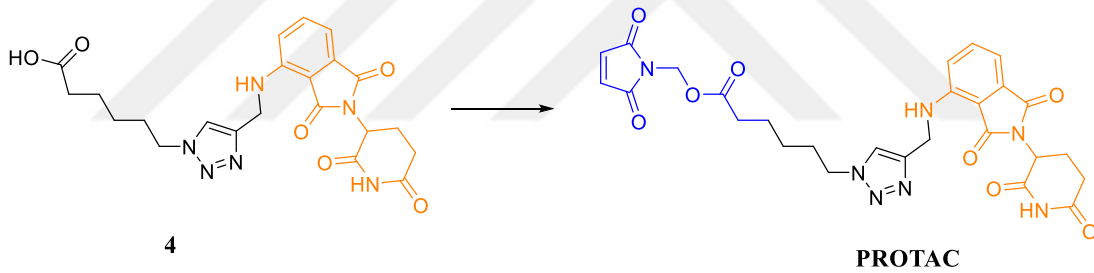
yürümeyen ürün spotu 50% DMF içeren diklorometan ile silikadan alındı. 69 mg olarak %10 verimle elde edildi.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, kloroform-*d*)  $\delta$  8.55 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.41 (dd,  $J = 8.5, 7.2$  Hz, 1H), 7.05 (dd,  $J = 7.1, 0.6$  Hz, 1H), 6.92 (dd,  $J = 8.6, 0.7$  Hz, 1H), 4.87 (dd,  $J = 12.0, 5.3$  Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.28 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.86 – 2.64 (m, 3H), 2.24 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.10 – 2.04 (m, 1H), 1.84 (p,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.57 – 1.48 (m, 2H), 1.25 (td,  $J = 8.0, 7.4, 4.1$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177.18, 171.65, 169.44, 169.05, 167.52, 146.16, 145.10, 136.25, 132.38, 121.99, 117.24, 112.27, 110.70, 60.42, 53.44, 50.02, 48.91, 38.60, 33.27, 31.39, 29.71, 25.63, 23.70, 22.76, 21.06, 14.20.

QTOF-LC/MS:: Teorik Kütle ( $\text{M}-2\text{H}+\text{Na}$ ) $^-$ : 489.15040, Deneysel Kütle ( $\text{M}-2\text{H}+\text{Na}$ ) $^-$ : 489.13814;  $\Delta=25$  ppm.

### 2.2.5. PROTAC Bileşiğinin Sentezi



**Şekil 2.7.** PROTAC bileşiğinin sentez şeması. Tepkime koşulları: EDCI, HOBt, N-maleimidometanol, DCM, 25°C, 16 saat.

16 mg 4 Nolu bileşik ve 105 mg, 0.83 mmol N-maleimidometanol, 3 mL diklorometan ve 0.3 mL DMF içinde çözüldü. 120 mg EDCI ve 96 mg HOBt eklendi ve 1 gün boyunca oda sıcaklığında karanlıkta karıştırıldı. Sodyum bikarbonat ile doyurulmuş su (pH:7) ve diklorometan ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz toplanarak sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Maddenin saflaştırılması için hacimce 1:1 oranında etil asetat ve aseton içeren mobil fazı kullanılarak silika kolon kromatografisi veya preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırıldı. 3,5 mg olarak %0,61 verimle elde edildi.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Kloroform-*d*)  $\delta$  8.15 (s, 1H), 7.99 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.82 – 7.73 (m, 1H), 7.67 (ddd,  $J = 8.6, 7.0, 1.0$  Hz, 1H), 7.56 – 7.38 (m, 2H), 7.14 (dd,  $J = 7.2, 0.6$

Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.68 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 6.25 (s, 2H), 5.01 – 4.80 (m, 1H), 4.64 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.29 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.91 – 2.65 (m, 3H), 2.34 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.17 – 2.06 (m, 1H), 2.00 – 1.82 (m, 2H), 1.79 – 1.56 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.43, 170.87, 168.26, 167.46, 146.14, 145.15, 136.26, 131.30, 124.99, 121.59, 117.13, 115.74, 112.35, 111.34, 67.42, 50.03, 48.93, 38.71, 33.33, 31.43, 29.75, 25.65, 23.72, 22.76.

QTOF-LC/MS: Teorik Kütle (M+K)<sup>+</sup>: 616.15527, Deneysel Kütle M+K)<sup>+</sup>: 616.22526.

### 2.3. Hücre Kültürü Deneyleri

Bu çalışmada hücre kültürü deneyleri için HCT-116 ve SW480 olmak üzere iki kolon kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmada sentezlenen **PROTAC** maddesinin sağladığı WRN proteini degradasyonu, mikrosatellit stabilitesine sahip olan ve olmayan iki farklı hücre hattında sentetik letal etki açısından incelenmiştir. HCT-116, 48 yaşında erkek bir hastadan primer tümörden elde edilmiş olup mikrosatellit instabilitesine sahiptir. SW480 ise 50 yaşında erkek bir hastanın primer tümöründen elde edilmiştir ve mikrosatellit stabilitesine sahip bir kolon kanseri hücre hattıdır (Berg vd., 2017; Ahmed vd., 2013). Benzer özellikleri taşıması ve mikrosatellit stabilitesi ile sentetik letal etki için kontrol sağlayacak gruplar olması nedeniyle bu çalışma da bu iki kolon kanseri hücre hattı tercih edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında besiyeri seçimi önemlidir ve bazı kriterlere dikkat edilmelidir. Hücrenin enerji kaynağı ve döngüsünün düzenlenmesi için temel büyüme gereksinimlerinin sağlanması gerekir. Bunun için L-glutamin gibi temel aminoasitlerin, vitamin ve minerallerin, ozmotik dengenin sağlanması için inorganik tuzların, enerji kaynağı olarak glikozun, büyüme faktörlerinin sağlanması ve besiyerinin zenginleştirilmesi için %2-10 serum, kontaminasyonun engellenmesi için uygun antibiyotik ve uygun pH şartlarının sağlanması gerekir. Serumun içinde albumin, transferrin gibi bağlayıcı proteinler ve fibronektin gibi tutunmayı destekleyen proteinler bulunur. Primer kültür için bazal besiyeri kullanılmaktadır. Optimal kültür koşullarının sağlanması ve pH'ın ayarlanması için CO<sub>2</sub> miktarının %5-10 arasında tutulması gerekir ve pH takibi genellikle fenol kırmızısı kullanılır. Düşük pH ta besiyerinin rengi sarıya döner ve değiştirilmesi gerekir (Arora, 2013) .

Uygun hücre kültürü koşullarının sağlanması için HCT-116 ve SW480 için Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco™ 41966029) bazal besiyeri kullanılmıştır. İçeriğinde 4.5 g/L D-glikoz, pirüvat ve L-glutamin ve fenol kırmızısı içermektedir. Besiyeri %10 Fetal sığır serumu (FBS) (Gibco™ A5256701) ve 1% gentamisin antibiyotiği ile desteklenmiştir. Hücreler 37° C' de, %5 CO<sub>2</sub> ve %21 O<sub>2</sub> için ayarlanmış olan inkübatörde kültüre edilmiştir.

Hücrelerin yıkama, ölü hücreleri uzaklaştırma ve tripsin öncesi besiyeri uzaklaştırma işlemleri PBS ile yapılmıştır. Hücrelerin pasajlanmasında ve toplanmasında Tripsin-EDTA (Gibco™ 25300054) kullanılmıştır.

### 2.3.1. Sitotoksosite Analizi

3-(4,5-Dimeilyltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) analizi hücre canlılığın anlaşılması için uygulanan hücre metabolik aktivitesini ölçen bir spektrometrik analiz yöntemidir. Tetrazolyum tuzları içeren bu analizde, pozitif yüklü tuzların membrandan geçişi sağlanır ve mitokondriye girişi sağlanır. Canlı hücreler metabolik olarak aktif oldukları için tuzların formazan kristallerine dönüşümünü sağlar. Canlı hücrelerin metabolik aktivitesi ile oluşan formazan kristali miktarı doğru orantılıdır. Suda çözünmeyen bu kristaller DMSO ile çözülerek, plaka okuyucu cihazında 540-690 nm arasında ölçüm alınır. Renk değişimi ile hücre canlılığına karar verilen bu metot kolorimetrik bir analizdir (Ghasemi et al., 2021).

Hücre canlılığının anlaşılması için yapılan bu analizde, hücreler tripsinize edilip toplandı. Toplanan SW480 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinin sayımı gerçekleştirilip 96-kuyulu plakada kuyu başı  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 10% FBS, 1% antibiyotik içeren DMEM besiyeri içinde 5% CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37°C'de kültüre edildi. Hücrelerin 24 saat inkübasyonu sonrası **PROTAC** bileşiği 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1.25 µM dozlarında kuyulara uygulandı, ajan eklenmeyen sadece besiyeri içeren hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. **PROTAC**'ın 4 mM'lık stok çözeltisi doğrudan DMSO içinde hazırlandı ve besiyeri ile uygun seyreltme yapıldı. 24 saat inkübasyon sonrasında MTT solüsyonu eklendi (5 mg/mL) ve 4 saat boyunca karanlıkta, 37°C de inkübe edildi. Süre sonunda, besiyeri uzaklaştırıldı ve oluşan kristaller DMSO ile çözülüp 570 nm de ELISA plaka okuyucu cihazında ölçüm alındı.

### 2.3.2. Akış Sitometri Analizi

HCT-116 ve SW480 hücre hatları kullanılarak iki farklı grup ile çalışıldı. Protein analizi için Abcam ekstraselüler ve intraselüler proteinler için olan flow sitometri protokolü (Abcam, 2023) uygulandı. Propidyum İyodür (PI) boyaması için Abcam PI boyama protokolü (Abcam, 2016) uygulandı. Hücrelerin farklı 6'lık plakalara, kuyu başına 500.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 37° C'de, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında iki hücre kontrolünün besiyeri tazeleni ve WRN için tasarlanmış **PROTAC** bileşiği besiyerinin içinde 120 µM, 80 µM, 40 µM ve 20 µM olarak her bir hücre hattı için ayrı olarak uygulandı ve 37° C'de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda ependorflar etiketlendi, PBS ile yıkandı ve tripsinize edilerek hücreler toplandı. Toplanan hücreler 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Daha sonra fiksasyon için saf etanol peletin üzerine düşük ayarda vortekslenerek eklendi ve 30 dk 4°C' de inkübe edildi. Numuneler süre sonunda 1000 rpm de 5 dk santrifüjlenerek pelet çöktürüldü ve etanol atıldı. PBS ile 2 defa yıkama yapıldı. Sıvıdan kurtulmak için 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Hücre kontrollerinden biri kompenzasyon için kullanılmak üzere ayrıldı ve 4°C'de muhafaza edildi. Antikor ve PI uygulaması öncesi çekirdekte yer alan proteine ulaşmak ve PI boyasının iyi etki etmesi için permeabilizasyon aşaması gereklidir. %0,5 Tween 20 içeren PBS hücrelere eklenerek 30 dk inkübe edildi. Süre sonunda 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve sıvı atıldı. Pelet PBS kullanılarak iki defa yıkandı ve 1000 rpm de 5 dk santrifüjlenerek yıkama sıvısı atıldı. Her örnek için 50 µg PI ve 50 µg RNaz içerecek şekilde PBS karışımı hazırlandı ve hücrelere eklendi. Karanlıkta ve oda sıcaklığında örnekler 30 dk karıştırıcıda bırakıldı. Daha sonra örnekler 1000 rpm de 5 dk santrifüjlenerek süpernatant atıldı. 2 defa PBS ile yıkama yapıp, 1000 rpm de 5 dk çöktürüldü, yıkama sıvısı atıldı. Bloklama için %10 FBS içeren PBS numunelere eklendi ve 30 dk karıştırıcıda bırakıldı. Süre sonunda 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek bloklama sıvısı döküldü. 1:500 oranında TBST ile hazırlanan primer WRN antikor (Affinity: DF8369) numunelere eklendi ve 1 saat karıştırıcıda bırakıldı. Daha sonra primer antikor toplandı 1000 rpm de 5 dk santrifüjlendi ve PBS ile iki defa yıkama yapıp sıvılar atıldı. Numunelere FITC işaretli anti-rabbit sekonder antikor eklendi ve 1 saat karıştırıcıda inkübe edildi. 1000 rpm de 5 dk santrifüjlenerek sekonder antikor toplandı ve 2 defa PBS ile yıkama yapıldı. 1000 rpm de 5 dk santrifüjlenerek kalan sıvı atıldı. 500'er µL PBS eklenerek peletler çözüldü. Hazırlanan numunelere PI ve FITC işaretli sekonder antikor etkileneceği için muameleler karanlıkta uygulandı. Beckman Coulter'ın

Cytoflex akış sitometri cihazında numuneler için PI ve FITC kanallarında 3 tekrarlı olarak okuma yapıldı. Fiksasyon sonrası ayrılan hücre kontrolleri ile kompenzasyon gerçekleştirildi. Daha sonra diğer numuneler için ölçümler alındı.

### 2.3.3. Işık Mikroskobunda Görüntüleme

HCT116 ve SW480 hücrelerinin her kuyuya 500.000 hücre içerecek şekilde 6'lık plakalara ekimi yapıldı ve 37° C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelere 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM ve 80 µM olarak **PROTAC** muamelesi yapıldı. Her bir hücre hattı için ayrıca hücre kontrollerinin besiyeri değiştirildi. 37°C'de 24 saat madde içeren besiyeri ile inkübe edildi. Süre sonunda maddenin etkisinin incelenmesi için 10X lens ile ışık mikroskobunda görüntüleme alındı.

### 2.3.4. Floresan Görüntüleme

Floresan görüntüleme için HCT116 ve SW480 hücrelerinin her biri için hücre kontrolü, 40 µM ve 80 µM'lık **PROTAC** uygulamaları için floresan görüntüleme için tasarlanmış olan polimer lamel içeren 35 mm'lik kuyulara (Ibidi-81156), kuyu başına 50.000 olacak şekilde hücre ekimi yapıldı, 37° C'de 24 saat inkübe edildi. Kontrol içeren örneğin besiyeri tazelendi. Diğerleri için 40 µM ve 80 µM **PROTAC** içeren besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyerleri numunelere uygulandı ve 3 saat 37° C'de inkübe edildi. Hücrelerin besiyeri çekildi ve PBS ile yıkandı. Fiksasyon için saf etanol kuyulara eklendi ve 4°C'de, 30 dk inkübe edildi. Daha sonra kuyulardan etanol çekilip atıldı ve PBS ile üç defa yıkandı. Permeabilizasyon için %0,5 Tween 20 içeren PBS eklendi ve hücreler 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 2 defa PBS ile yıkandı. %10 FBS içeren PBS eklendi ve 1 saat bloklama için karıştırıcıda bırakıldı. Bloklama sonrası sıvı uzaklaştırıldı ve 1:500 oranında primer WRN antikor (Affinity-DF8369) eklendi. 1 saat karıştırıcıda inkübasyon için bırakıldı. Primer antikor numunelerden toplandıktan sonra 2 defa PBS ile yıkama yapıldı. FITC işaretli anti-rabbit sekonder antikor kuyulara eklendi ve 1 saat karanlıkta inkübe edildi. Sekonder antikor toplandıktan sonra 2 defa PBS ile yıkandı ve PBS eklenerek ZEISS'ın konfokal mikroskobunda görüntüleme alındı.

## 2.4. FRET

### 2.4.1. FRET Emisyon Analizi

Donör ve akseptör floroforlarının arasındaki enerji transferine dayanan FRET analizi için tasarlanan FAM-TAMRA etiketli SHOX oligomeri olan prob ile WRN helikaz proteininin etkileşimini anlamak için kullanılması hedeflendi. Protein ve probun çalışması için gerekli olan tampon çözeltisi hazırlandı. Tampon çözeltisi 40 mM Tris-HCl (pH:8), 4 mM MgCl<sub>2</sub> tuzu, 5 mM merkaptoetanol, %10 gliserol, 100 µg/ml BSA ve 2 mM ATP içermektedir. Protein 96'lık plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde kontrol, 24 nM, 12 nM, 6 nM ve 3 nM olarak farklı derişimlerde eklendi. Hazırlanan tampon ve 2,5 µM probdan eklenerek ölçüme hazırlandı. Ölçüm slitleri 5-5 ve 5-10 olarak belirlendi, 490 nm den uyarıldı. Başlangıç dalga boyu 490 nm, bitiş dalga boyu 600 nm olarak emisyon ölçümleri alındı. WRN helikaz proteininin ve probun etkileşiminin zaman bağlı ölçümleri saatte bir olacak şekilde alındı. Probun sekansı aşağıda verilmiştir.

5' FAM – GGACGGTAACGGCGGAGGCGGAGGCGGCGGAGGTAAGAAGG – 3'  
TAMRA

Prob 5' ucundan enerji donörü FAM ile 3' ucundan ise enerji akseptörü TAMRA ile türevlendirilmiştir. Kırmızı ile gösterilen G4 sekanslarının G-kuadrupleks oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

### 2.4.2. FRET Melting Analizi

FRET melting analizi için tasarlanan FAM-TAMRA etiketli SHOX oligomeri olan probun erime eğrisi incelendi. Bunun için 0,2 µM prob, 10 mM'lık (10 mM sodyum kakodilat trihidrat, 0,1 M LiCl) kakodilat tampon çözeltisi ve G4 ligandı olduğu bilinen bileşik 1 µM, 5 µM ve 10 µM eklenerek, RT-PCR cihazında FRET melting prosedürü her örnek için 3 tekrarlı olarak uygulandı. Probun G4 bölgesinde etkisi ve erime eğrisi, G4 ligandı içeren ve içermeyen örnekler üzerinden incelendi.

Bunun yanında, 10 mM kakodilat tampon çözeltisi 2 mM ATP ve 4 mM MgCl<sub>2</sub> eklenerek hazırlandı. 2,5 µM prob, ve 10 mM lık hazırlanan kakodilat tamponundan eklendi. 14 nM WRN helikazı içeren ve içermeyen iki gruba ayrılarak 3 tekrarlı olarak, RT-PCR

cihazında her 15 dk da zamana bağlı ölçüm alındı. Enzimli ve enzimsiz olarak iki grupta erime eğrileri incelendi.

## 2.5. İstatistiki Analizler

Çalışmada gerçekleştirilen deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Veriler aritmetik ortalama değerleri hesaplanarak sunulmuş ve standart sapma (SD) grafik üzerinde gösterilmiştir. Elde edilen bulguların karşılaştırmalı analizleri GraphPad yazılımı kullanılarak öğrenci unpaired t testi ile yapılmıştır. P değeri 0.05 ve altı olan karşılaştırmalar istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.



### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

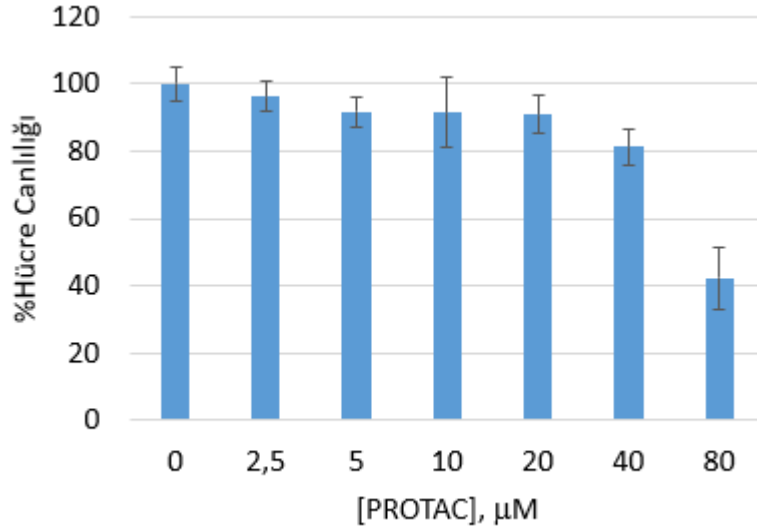
#### 3.1. Bileşiklerin Sentezi

Yapılan çalışmada sentezlenen bileşiklerin karakterizasyonu için  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve kütle spektrometrisi elde edilmiştir.  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR analizlerini Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (BİTAM) yapılmıştır. Bunun yanında kütle spektrometresi Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır. Eklerde 1-13 arasında verilerde kimyasal sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin karakterizasyon verileri eklenmiştir.

#### 3.2. Hücre Kültürü Deneyleri

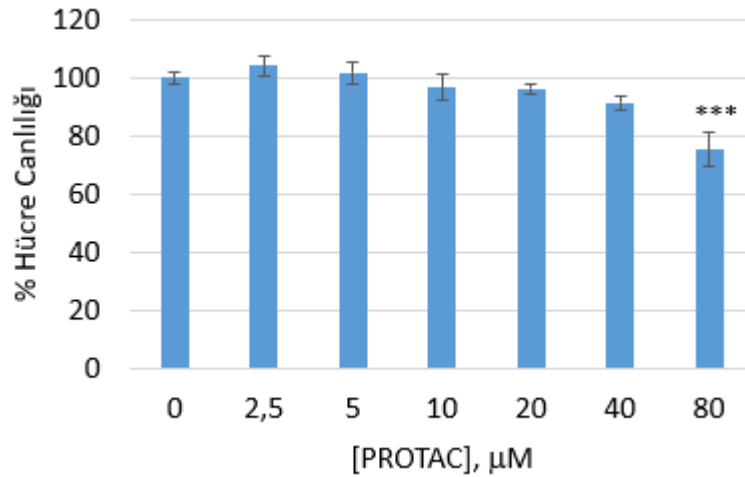
##### 3.2.1. Sitotoksikite Analiz Sonuçları

**PROTAC** bileşiğinin HCT-116 ve SW480 kolon kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisinin anlaşılması için MTT analizi seçilmiştir. Bu analizde **PROTAC** maddesinin bu hücreler üzerindeki etkisinin anlaşılması için 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  ve 80  $\mu\text{M}$  doz aralığı seçilmiş olup, iki hücre hattını da ayrı olarak uygulanmıştır. 24 saat boyunca, 37°C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen verilerin her biri hücre kontrolüyle normalize edilmiştir. ELISA mikropate okuyucuda 570 nm'de ölçüm alınmıştır. Şekil 17'de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** 2,5 µM ve 80 µM aralığında **PROTAC** maddesi uygulanmış HCT-116 hücre hattının MTT yöntemi kullanılarak elde edilen hücre canlılığı analiz sonuçları. n = 4, \*\*\*\* p < 0.0001.

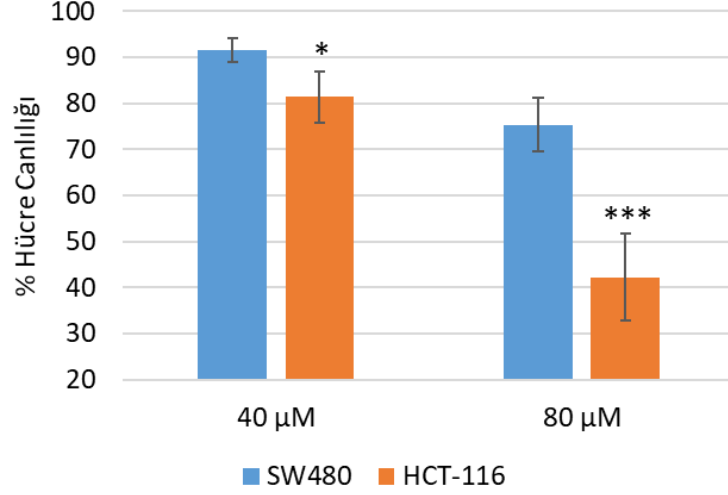
Şekil 3.1’de MTT sonuçlarından anlaşılacağı üzere 0-20 µM aralığında PROTAC uygulamasının HCT-116 hücre hattı için toksik etki göstermediği görülmektedir. Bununla beraber 80 µM’lık uygulama için yüzde canlılığın %42’ye düştüğü ve düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. PROTAC’ın bu doz için olan uygulamasında sentetik letal etkiye bağlı olduğu değerlendirilen ölüm görülmüştür.



**Şekil 3.2.** 2,5 µM ve 80 µM aralığında **PROTAC** uygulanmış SW480 hücre hattının MTT yöntemi kullanılarak elde edilen hücre canlılığı analiz sonuçları. n = 4, \*\*\* p < 0.001.

HCT-116 da **PROTAC** uygulamalarının tersine Şekil 3.2’de, SW480 hücre hattı için hücre canlılığının etkilenmediğini, en yüksek doz olan 80 µM için bile canlılığın %75

olmasıyla **PROTAC** maddesinin SW480 hücre hattı için toksik veya öldürücü etkiye sahip olmadığı anlaşılmaktadır.

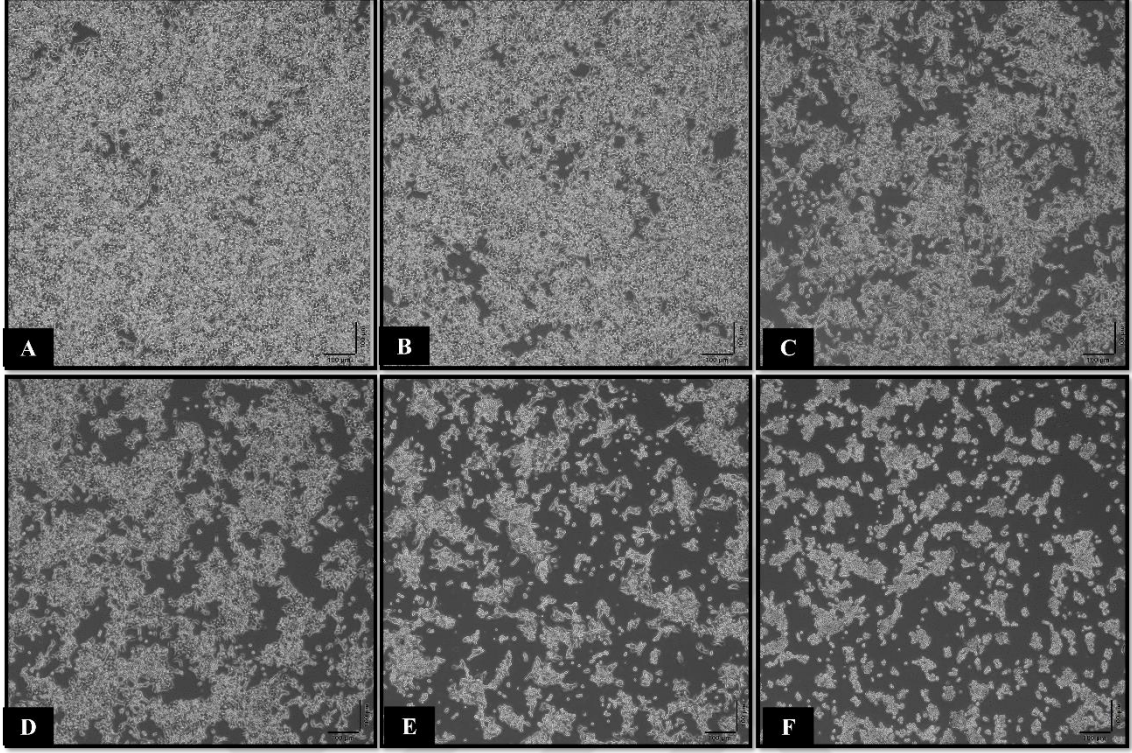


**Şekil 3.3.** 40 µM ve 80 µM **PROTAC** uygulanmış SW480 ve HCT-116 hücrelerinin MTT yöntemi kullanılarak elde edilen hücre canlılığı karşılaştırmalı analiz sonuçları. n = 4, \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001.

Bu iki hücre hattı için yapılan deneylerde MSS olan SW480 hücre hattı için toksik etki göstermeyen WRN **PROTAC**'ın, MSI özelliği taşıyan HCT-116 da ise 80 µM'lık uygulamada hücre canlılığının belirli bir oranda azalttığı gözlemlenmiştir. Hem 40 µM derişimde hem de 80 µM derişimde hücre hatlarının canlılıklarının karşılaştırması yapıldığında **PROTAC**'ın MSI olan HCT-116 hücrelerine toksik etkisi anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.3). Aynı maddenin ayırıcı özelliklere sahip olan bu iki hücre hattında uygulanması ve farklı canlılık oranlarına sahip olması, **PROTAC** ile WRN degradasyonunun gerçekleştiği ve sentetik letal etkiye bağlı olarak hücre ölümü gerçekleştiği söylenebilir.

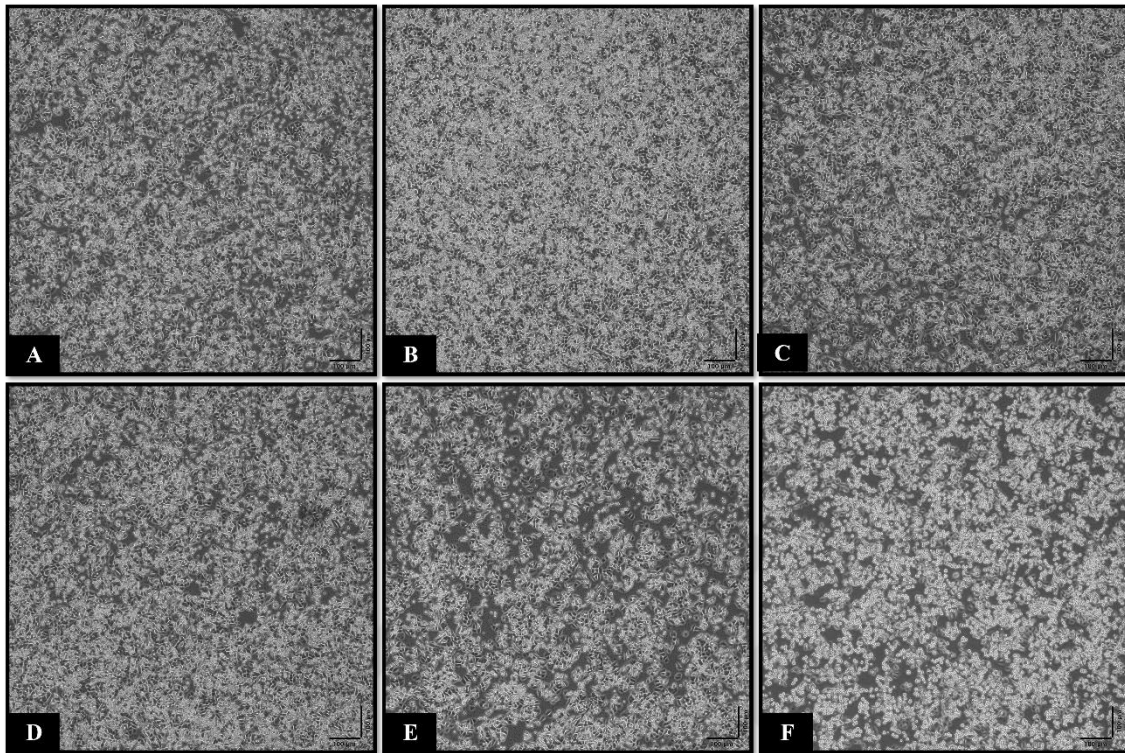
### 3.2.2. Işık Mikroskobunda Görüntüleme

Mikrosatellit stabilitesine göre seçilen HCT-116 ve SW480 hücre hatlarına, WRN-**PROTAC** olarak tasarlanmış olan **PROTAC** bileşiminin 24 saatlik inkübasyon sonrası hücre görüntüleri 10X çözünürlükte ışık mikroskobunda alınmıştır (Şekil 3.4-3.5).



**Şekil 3.4.** PROTAC uygulanmış HCT-116 hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü. Şekilde görülen A, B, C, D, E, F örnekleri sırasıyla 0, 5,10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC uygulamalarını göstermektedir.

Şekil 3.4'te HCT-116 hücre hattı için 0-80  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC uygulamaları görülmektedir. MSI gösteren bu hücre hattında, WRN degradasyonu ile sentetik letal etki görülmesi ve doza bağlı olarak hücre ölümünün gerçekleşmesi hedeflenmiştir. Madde uygulanmamış kontrol numunesi (Şekil 3.4.A) ve 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  ve 80  $\mu\text{M}$ 'lık (şekil 3.4.C-F) uygulamalarda hücre morfolojilerinin doza bağlı olarak bozulduğunu ve özellikle 80  $\mu\text{M}$  (Şekil 3.4.F) da hücre ölümünün arttığı gözlemlenmektedir.



**Şekil 3.5.** PROTAC uygulanmış SW480 hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü. Şekilde görülen A, B, C, D, E, F örnekleri sırasıyla 0, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC uygulamalarını göstermektedir.

Şekil 3.5'te PROTAC maddesinin MSS'ne sahip olan SW480 hücre hattı için olan uygulaması görülmektedir. Sırasıyla Şekil 3.5.A-F aralığında kontrol, 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  ve 80  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC'ın 24 saatlik inkübasyonu sonrası hücre canlılığını etkilemediği ve hücre morfolojilerinin korunduğu gözlemlenmiştir.

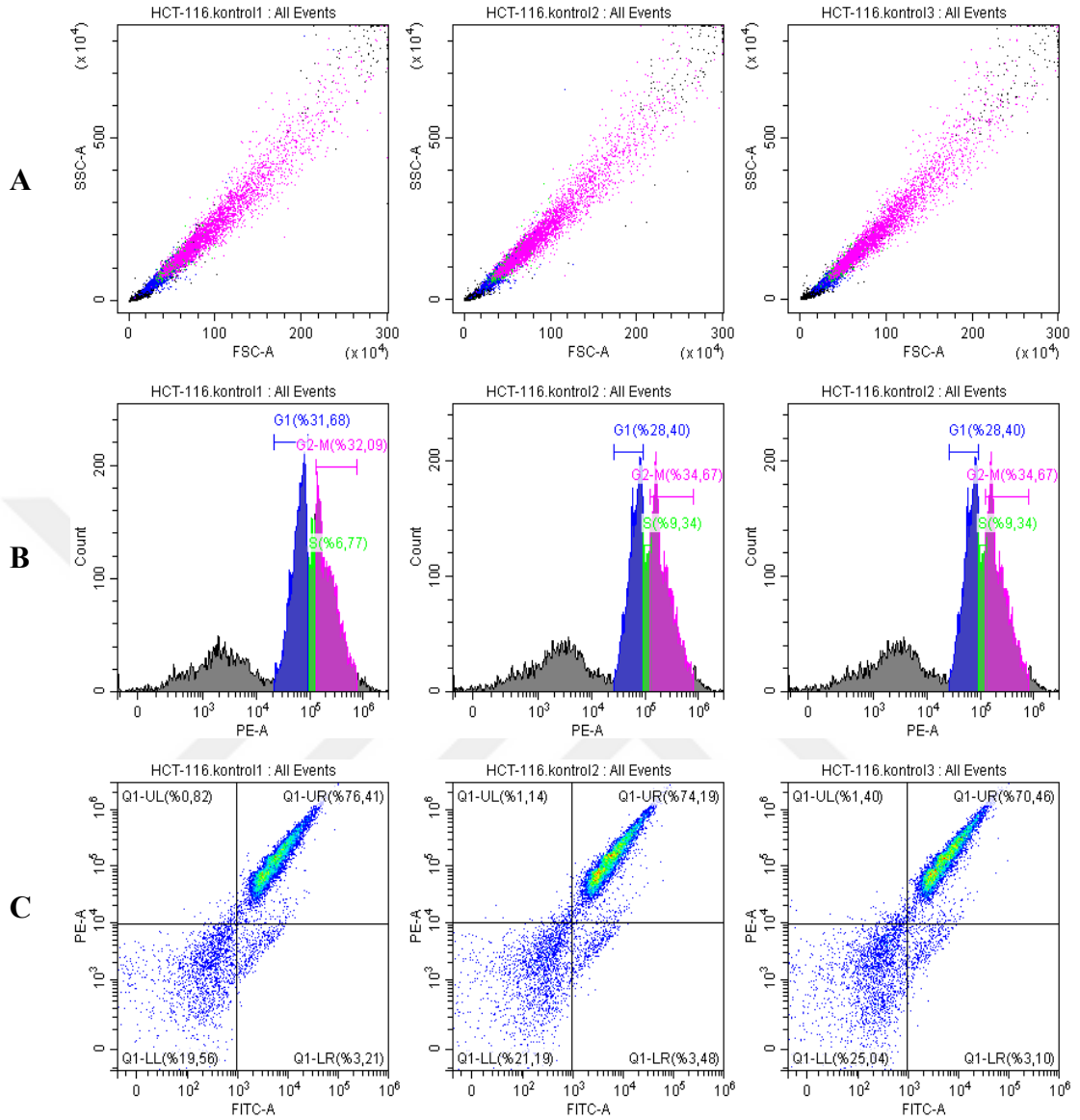
### 3.2.3. Akış Sitometri Sonuçları

HCT-116 ve SW480 hücre hatlarına PROTAC maddesi uygulaması yapılmamış kontrol grubu ile beraber, 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  ve 120  $\mu\text{M}$ 'lık derişimlerde uygulanmış olup, 24 saat inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrası toplanan hücreler için akış sitometri analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir hücre hattı için boyasız ve muamelesiz kontrol numunelerinden yayılım ve kompenzasyon ayarları belirlendikten sonra muamele edilmiş olan numunelerin FITC ve PI kanallarıyla okuması yapıldı.

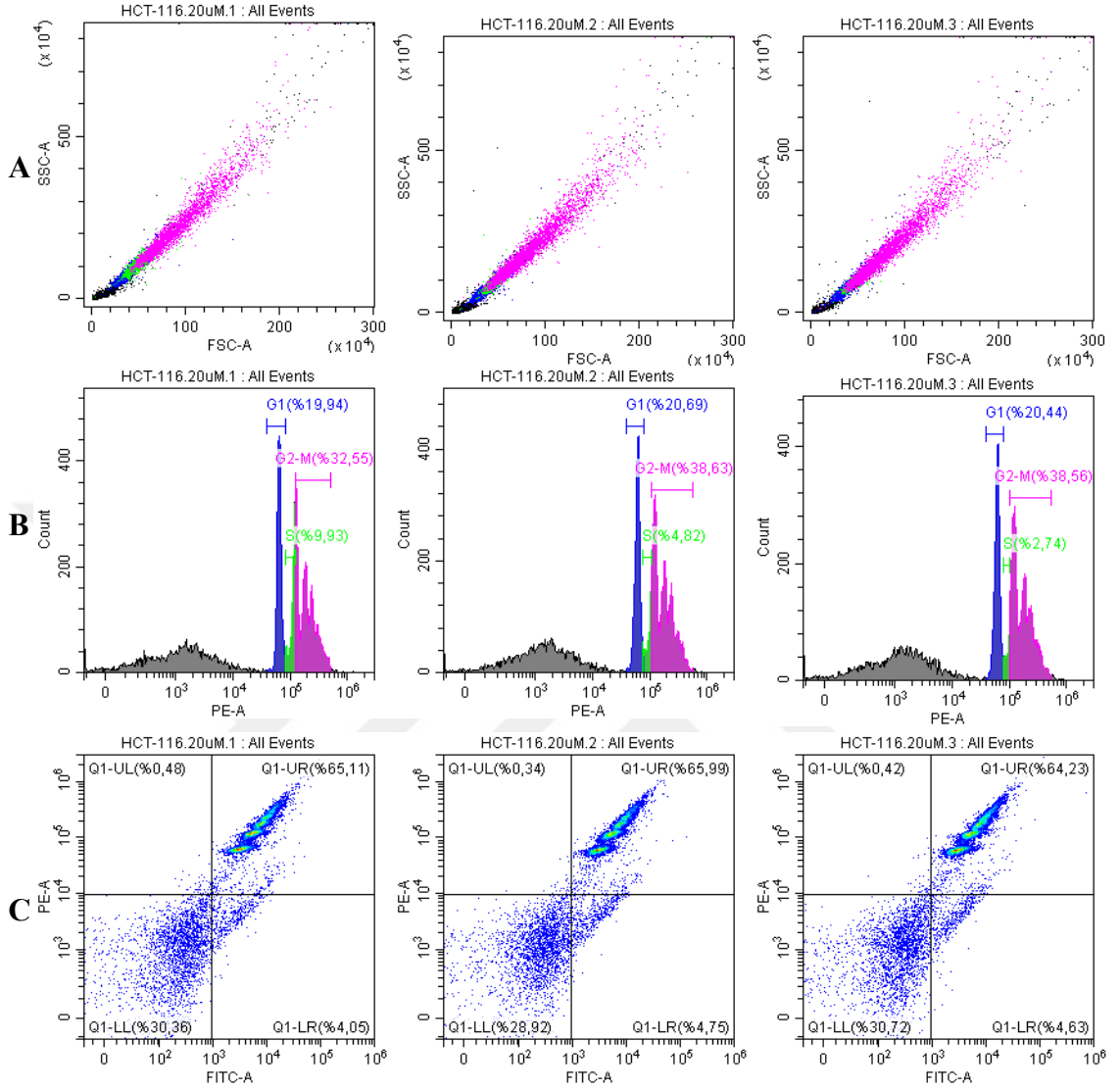
Her bir örnek için üç tekrarlı okumalar yapıldı. Öncelikle ileri saçılım (FSC) ve yan saçılım (SSC) grafikleri elde edildi ve hücrelerin dağılım gösterdiği aralık belirlendi.

Daha sonra propidium iyodür (PI) boyası uygulanmış örnekler için hücre döngüsü grafikleri elde edildi ve G1 (mavi), S (yeşil) ve G2-M (pembe) evreleri grafikler üzerinde işaretlendi. En son olarak, FITC işaretli WRN antikoru ile WRN'nin ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. Bu grafiklerde PI ve FITC grafiği alınıp, hem yaşayan ve ölü hücrelerin ayrımı hem de FITC alım oranları gözlemlendi. PE-FITC grafiklerinde sağa doğru gidildikçe FITC alımının arttığı, yukarı doğru çıktıkça PI alımının arttığı görülmektedir. PI ve FITC alım analizlerini anlayabilmek için kontrol numunesi üzerinden popülasyonu koruyacak şekilde kuadrant yerleştirildi ve bu yöntem bütün örnekler için tekrar edildi. Bu yüzden grafiğin Q1-UR olarak etiketlenen kısmı PI ve FITC almış hücreleri ifade etmektedir. Bu doğrultuda aşağıdaki şekillerde analizler sunulmuştur.

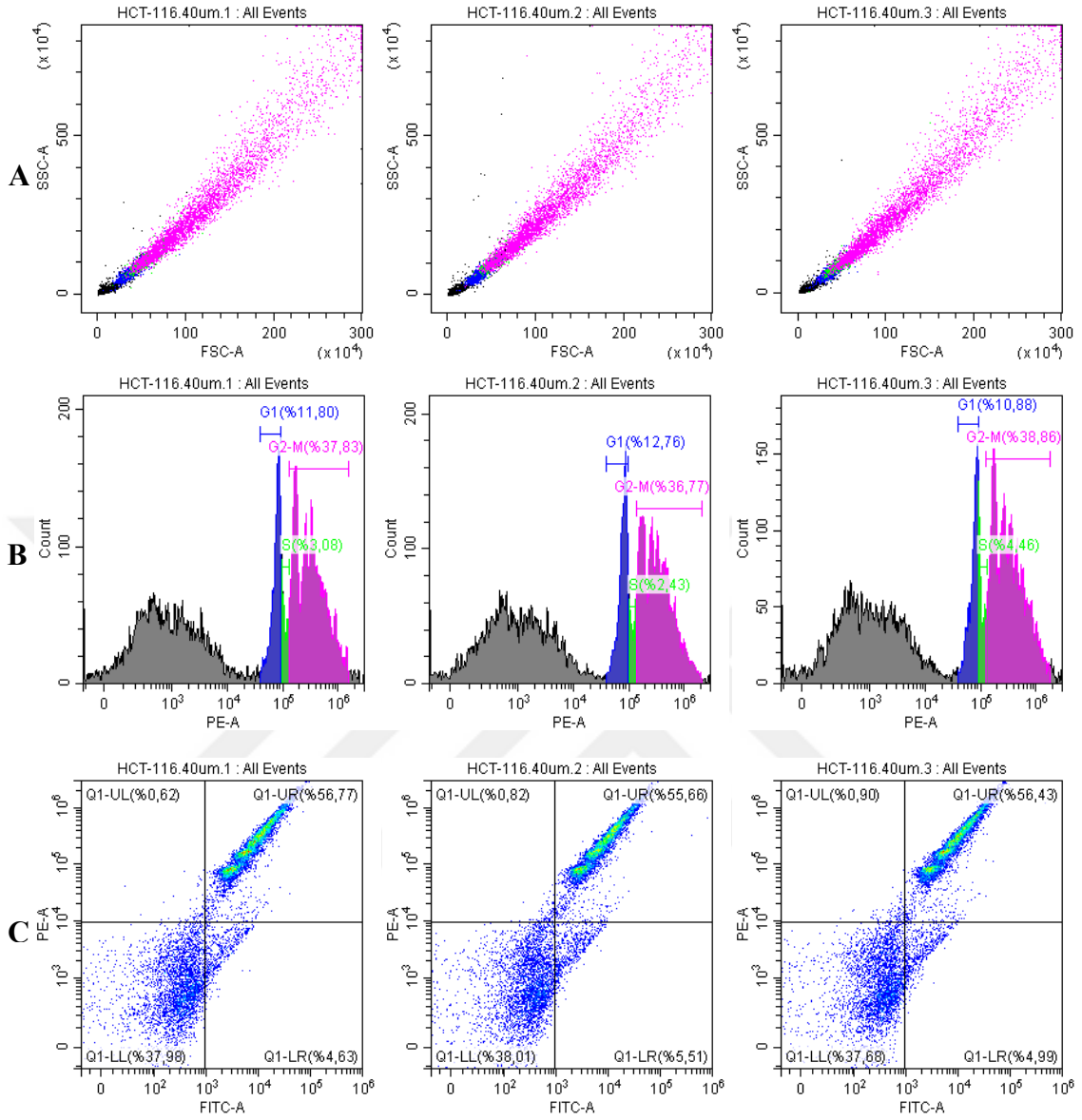




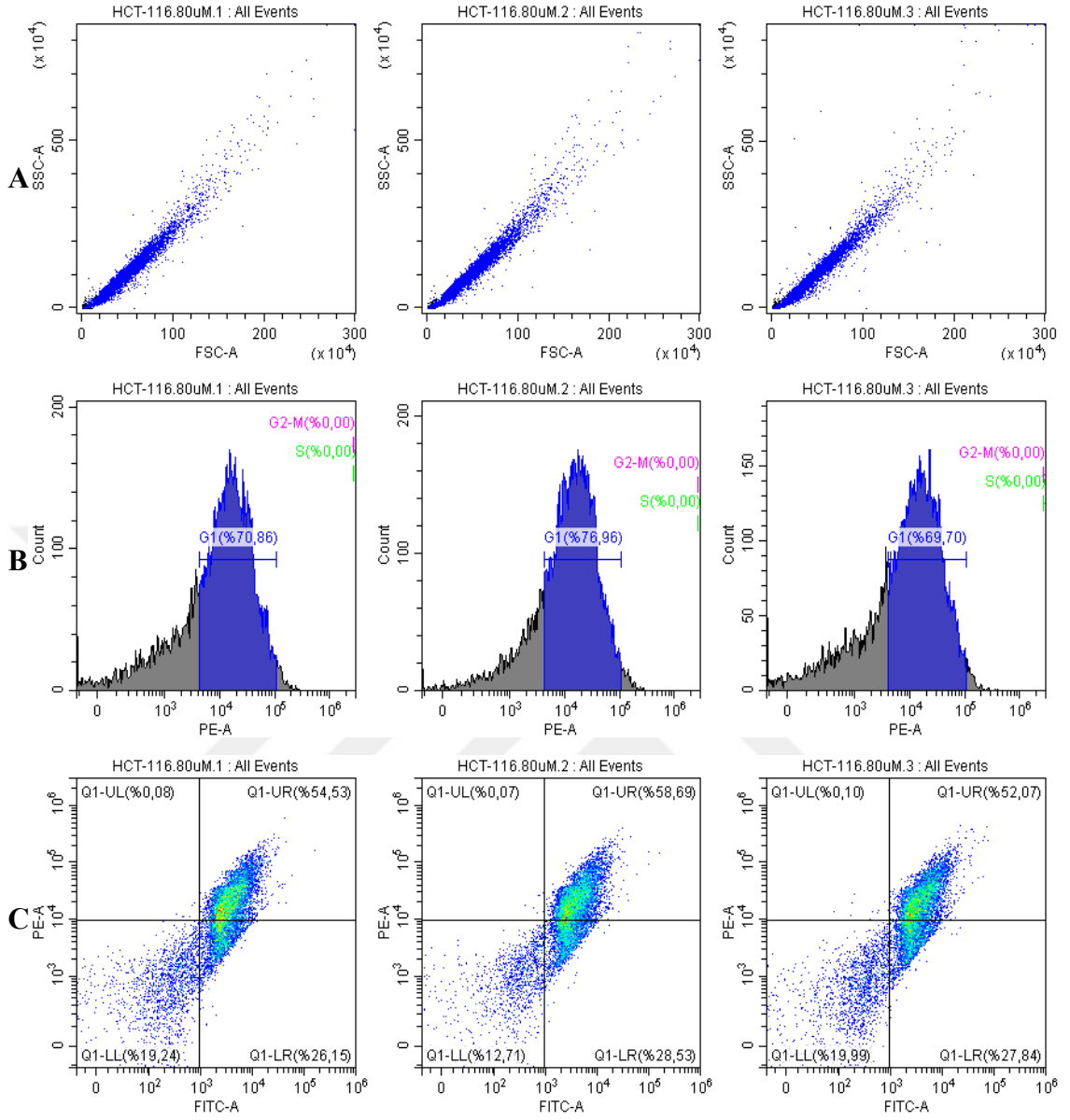
**Şekil 3.6.** HCT-116 hücre hattında **PROTAC** uygulanmamış kontrol numunesinin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi), aralık kısmı S fazındaki hücreleri (yeşil) ve ikinci peak G2-M evresindeki hücreleri (pembe) ifade eder. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Kuadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %73,69 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 3.01).



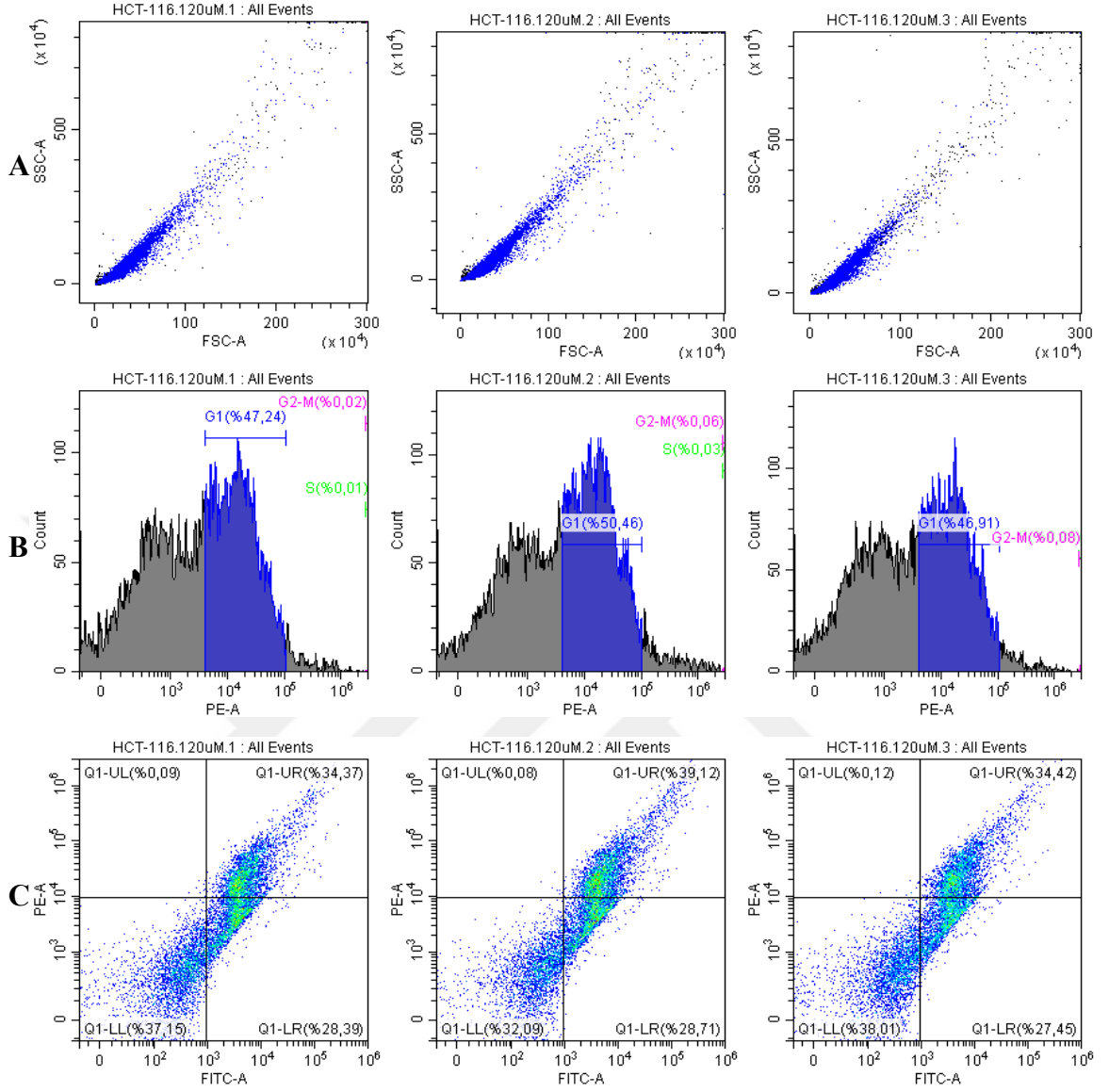
**Şekil 3.7.** HCT-116 hücre hattında 20  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi), aralık kısmı S fazındaki hücreleri (yeşil) ve ikinci peak G2-M evresindeki hücreleri (pembe) ifade eder. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Kuadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alınımı gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %65,11 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 0.88).



**Şekil 10.8.** HCT-116 hücre hattında 40  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayısı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi), aralık kısmı S fazındaki hücreleri (yeşil) ve ikinci peak G2-M evresindeki hücreleri (pembe) ifade eder. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Kuadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %56.29 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 0.57).

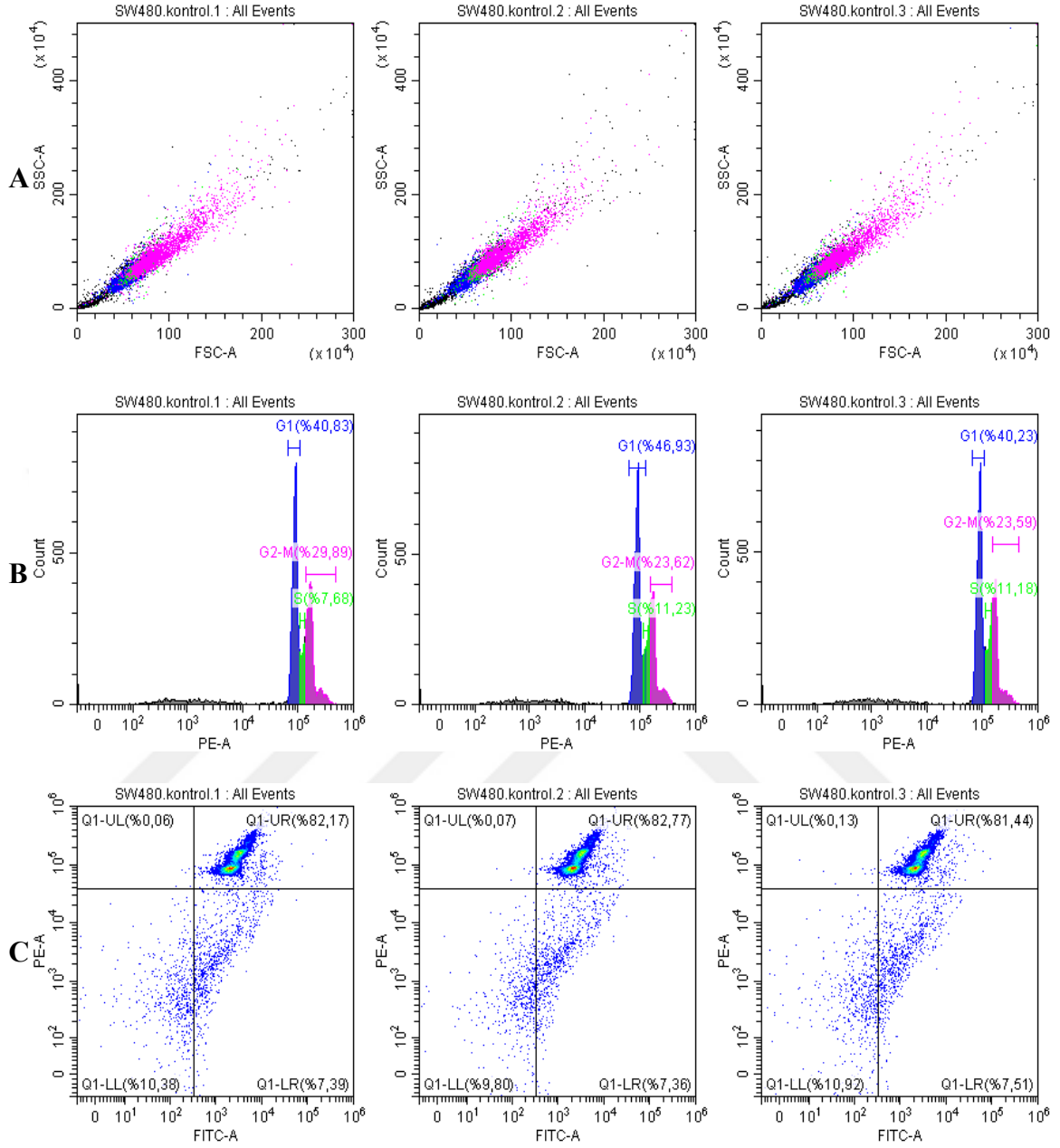


**Şekil 3.9.** HCT-116 hücre hattında 80  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri(mavi) ifade eder, bu dozda hücre döngüsü bozulmuş olup sadece G1 evresi gözlemlenmiştir. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Kuadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %55,09 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 3.35).

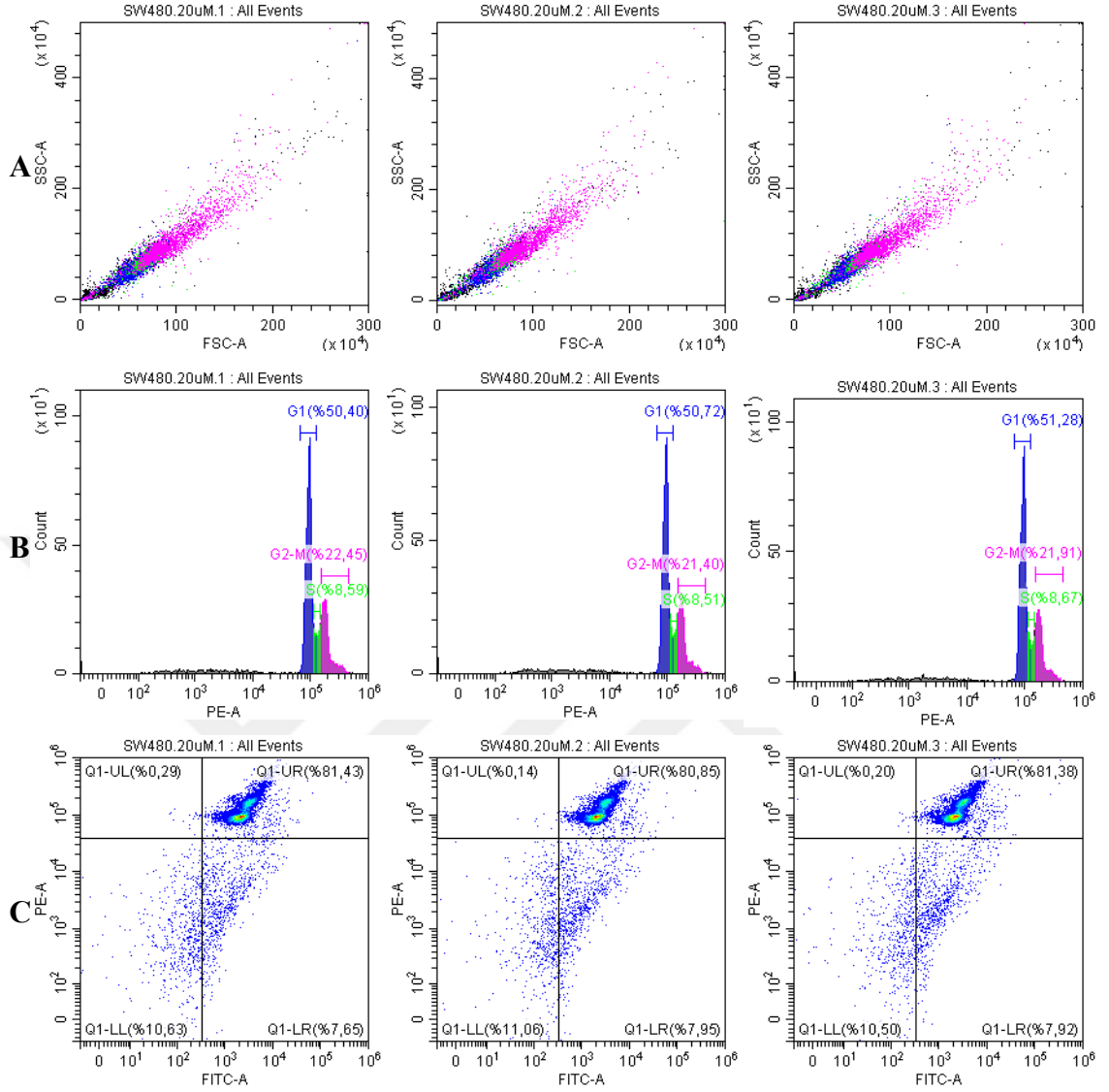


**Şekil 3.10.** HCT-116 hücre hattında 120  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi) ifade eder, bu dozda hücre döngüsü bozulmuş olup sadece G1 evresi gözlemlenmiştir. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Kuadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %35,97 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 2.73).

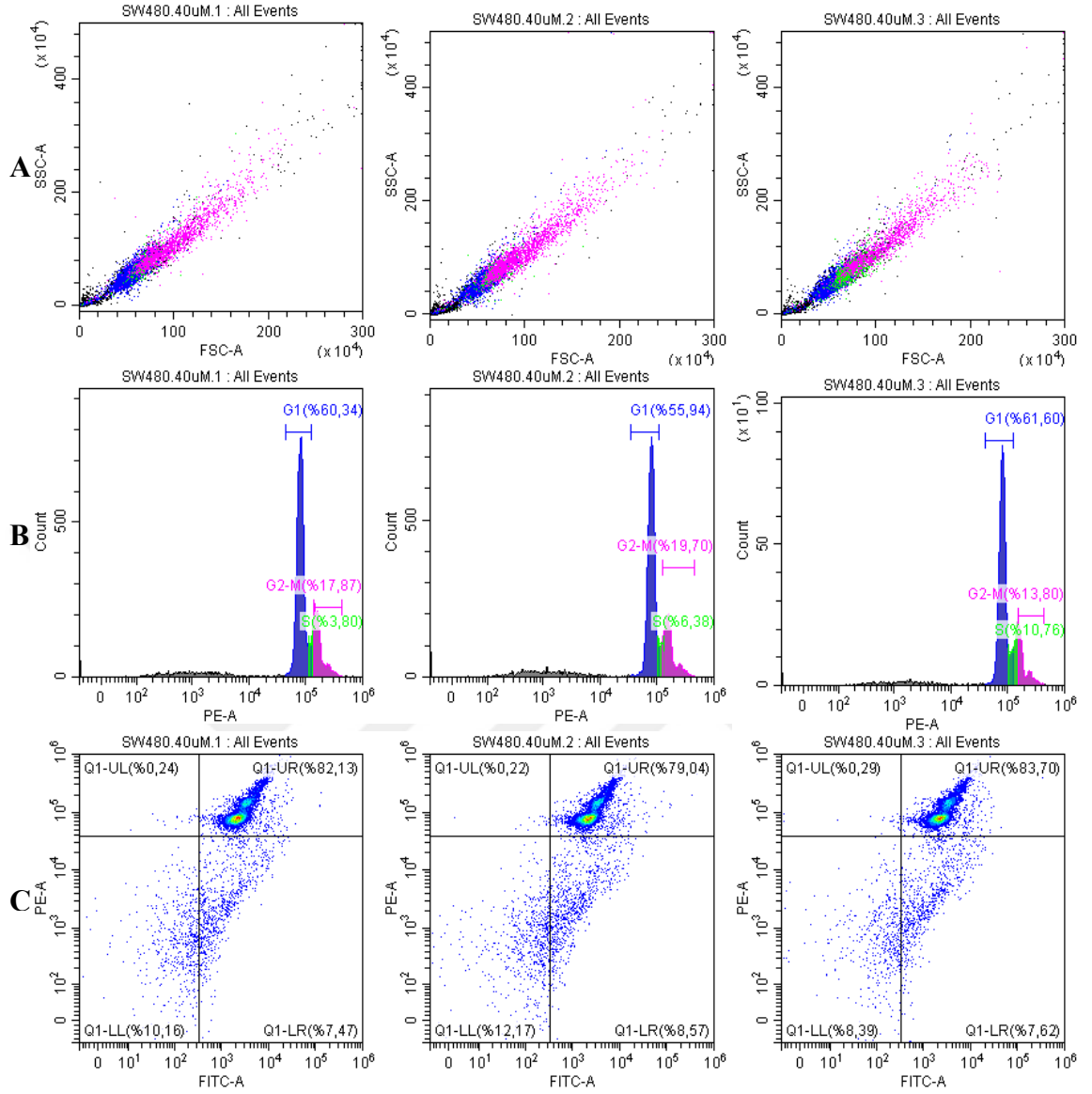
HCT-116 hücre hattında uygulanan **PROTAC** WRN-PROTAC'ı şekillerde görünen Q1-UR bölgesi PI-FITC alım yüzdeleri 0, 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  ve 120  $\mu\text{M}$  için sırasıyla %73,68, %65,11, %56,28, %55,09, %35,97 şeklinde elde edilmiştir. 0-40  $\mu\text{M}$  aralığında hücre döngüleri G1, S ve G2-M olarak düzgün şekilde elde edilmiştir. 80  $\mu\text{M}$  ve 120  $\mu\text{M}$ 'lık uygulamalarda HCT-116 hücre hattı için hücre döngüsünün bozulduğu ve hücrelerin ölüm oranının arttığı ve hücrelerin G1 evresinde kaldığı gözlemlenmiştir. Literatürde WRN ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak, DNA'nın çift zincir kırıklarının arttığı ve MSI hücrelerin sitokinezin engellenmesi sonucu G1 evresinde kaldığı veya apoptoza uğradığı kanıtlanmıştır (Kategaya vd., 2019). Böylece WRN degradasyonunun gerçekleştiği ve buna bağlı olarak hücrelerin G1 evresinde kaldığı veya öldüğü bu çalışmada kanıtlanmıştır. PI-FITC grafiklerinden anlaşılacağı üzere 80  $\mu\text{M}$  ve 120  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulamalarında, WRN'nin degradasyonunun gerçekleştiği ve FITC işaretli WRN antikorusunun verdiği ışımının azaldığı ve popülasyonun aşağı yönlü kayma gösterdiği gözlemlenmiştir. Kaymanın aşağı yönlü olması PI alımının azaldığını ve hücre ölümünün arttığını göstermektedir. MSI hücre hattı olan HCT-116 da **PROTAC** ile WRN degradasyonuna bağlı hücre ölümünün gerçekleşmesi sentetik letal etki gerçekleştiğini göstermiştir.



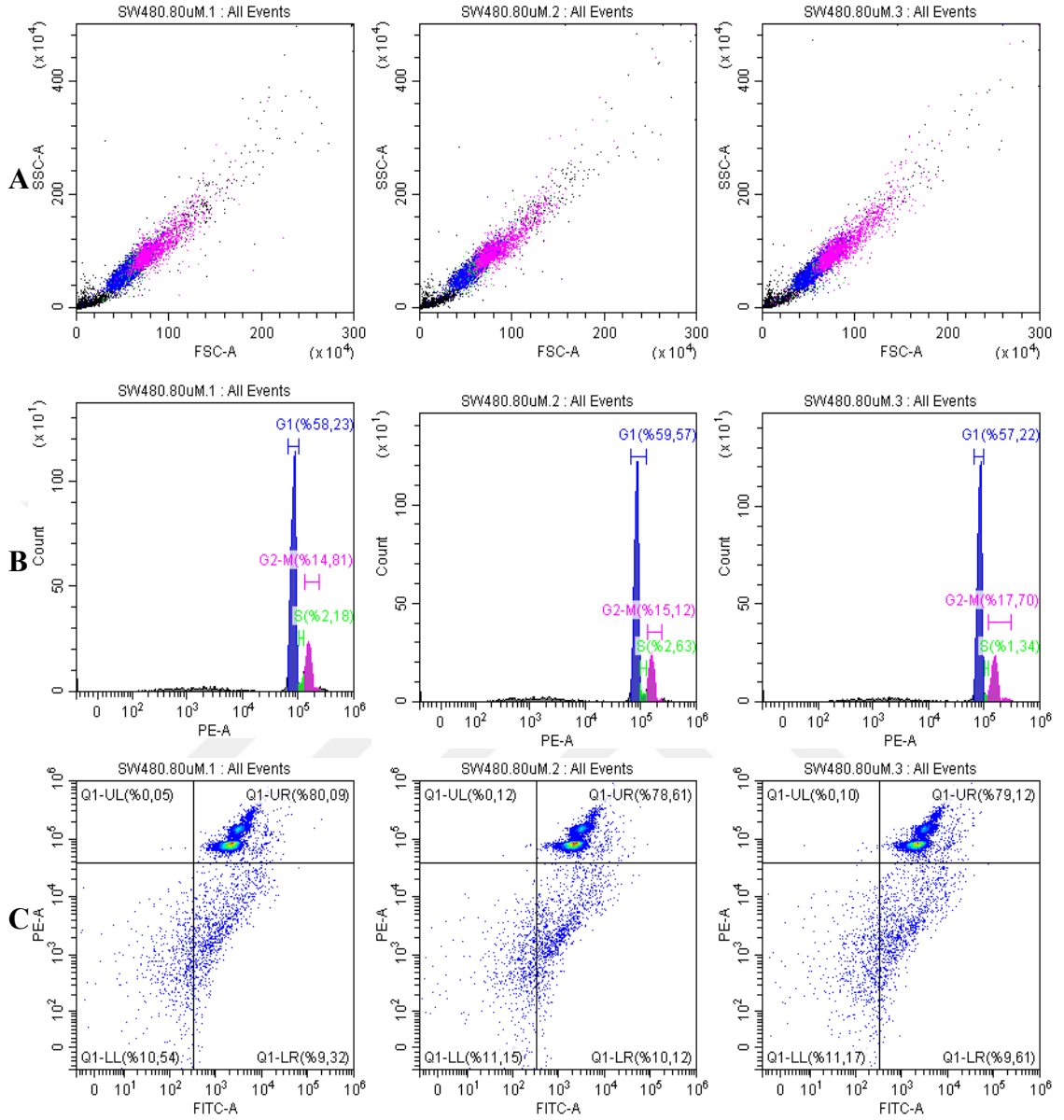
**Şekil 3.11.** SW480 hücre hattında **PROTAC** uygulanmamış kontrol numunesinin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi), aralık kısmı S fazındaki hücreleri (yeşil) ve ikinci peak G2-M evresindeki hücreleri (pembe) ifade eder. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Quadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %82,12 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 0.67).



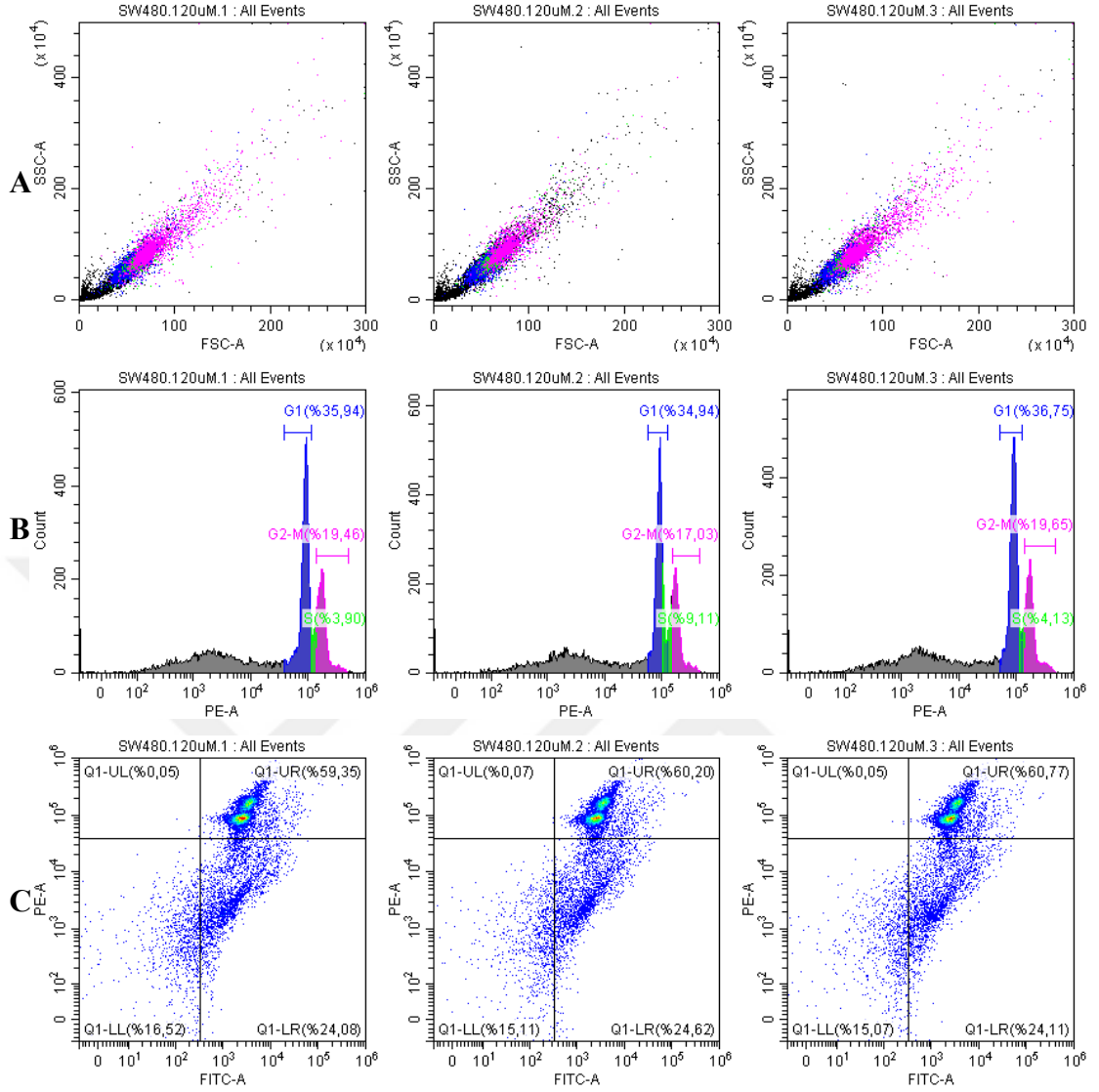
**Şekil 3.12.** SW480 hücre hattında 20  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi), aralık kısmı S fazındaki hücreleri (yeşil) ve ikinci peak G2-M evresindeki hücreleri (pembe) ifade eder. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Quadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %81,22 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 0.32).



**Şekil 3.13.** SW480 hücre hattında 40  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi), aralık kısmı S fazındaki hücreleri (yeşil) ve ikinci peak G2-M evresindeki hücreleri (pembe) ifade eder. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Quadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %81,62 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 2.37).



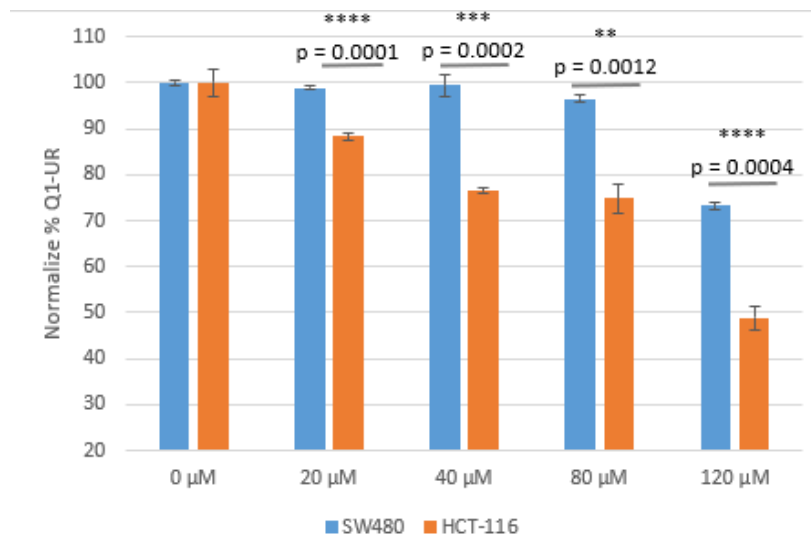
**Şekil 3.14.** SW480 hücre hattında 80  $\mu\text{M}$ 'lık PROTAC uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi), aralık kısmı S fazındaki hücreleri (yeşil) ve ikinci peak G2-M evresindeki hücreleri (pembe) ifade eder. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Quadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %79,27 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 0.75).



**Şekil 3.15.** SW480 hücre hattında 120  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulanan numunenin akış sitometri grafikleri. A) FSC-A/SSC-A grafiği, hücre popülasyonunun yayılımını gösterir. Her bir örnek için 10.000 hücre sayımı yapılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı olarak elde edilmiştir. B) PI histogram grafiği, PI boyaması yapılmış hücrelerin hücre döngüsünü gösterir. İlk yüksek pik G1 fazındaki hücreleri (mavi), aralık kısmı S fazındaki hücreleri (yeşil) ve ikinci peak G2-M evresindeki hücreleri (pembe) ifade eder. C) PI -FITC grafiği, popülasyonun PI ve FITC alımını ifade eder. Quadrantın bölgeleri canlılık ve FITC işaretli WRN antikorunun alımını gösterir. Q1-UR bölgesi PI alan canlı hücreleri ve FITC işaretli WRN antikorunu almış hücreleri gösterir. Bu örneklerde ortalama %60,1 oranında PI ve FITC alımı görülmüştür (SD: 0.72).

SW480 de FITC-PI grafiklerinde 0, 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  ve 120  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulamaları için sırasıyla %82,12, %81,22, %81,62, %79,27 ve %60,1'lik oranda hücrelerin PI ve FITC aldığı görülmektedir. 120  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulaması hariç doza bağlı önemli bir değişim görülmemiştir. MSS'ne sahip olan SW480 de popülasyonda aşağı yönlü kayma görülmemesi, PI alan canlı hücre sayısının değişmediğini ve sola doğru kayma görülmemesi FITC işaretli WRN antikoruyla işaretlenmiş protein seviyesinin değişmediğini göstermektedir. Bunun yanında, diğer dozlarla birlikte en yüksek doz olan 120  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulamasında bile hücre döngüsünün bozulmadığı görülmektedir.

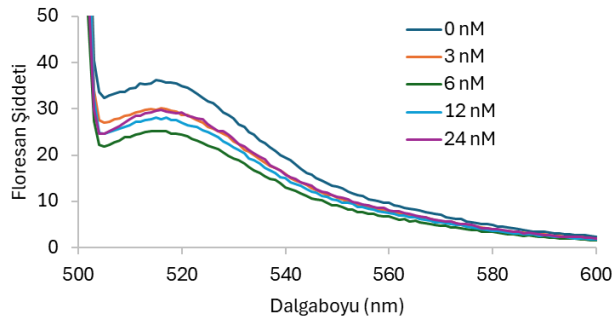
Böylece, bu çalışmada WRN degradasyonu için tasarlanmış olan **PROTAC** PROTAC molekülü için mikrosatellit instabilitesine bağlı olarak sentetik letal etkinin gerçekleştiği ve bunun yanında mikrosatellit stabilitesine sahip hücreleri etkilemediği kanıtlanmıştır. Ayrıca, 80  $\mu\text{M}$ 'ın üstündeki dozlarda SW480 hücrelerinin hücre döngüsünün etkilenmediği ve HCT-116 hücrelerinin maddenin etkisiyle hücre döngüsünde de bozulmalar meydana getirdiği görülmüştür. Şekil 3.16'de akış sitometrisi deney sonuçları iki hücrede karşılaştırılmıştır. Her hücre grubunda PI ve FITC ile boyanmış hücrelerin yer aldığı Q1-UR kuadrantı PROTAC uygulanmamış gruba göre normalize edilerek çizdirilmiştir. Her doz PROTAC uygulamasında ölü hücrelerdeki WRN sinyali azalması (Q1-UR kuadrantındaki hücre popülasyonu) HCT-116 hücrelerinde SW480'e göre anlamlı olarak düşük çıkmıştır. Bu sonuç MSI hücrelerde WRN yıkımının letal etkisine işaret etmektedir.



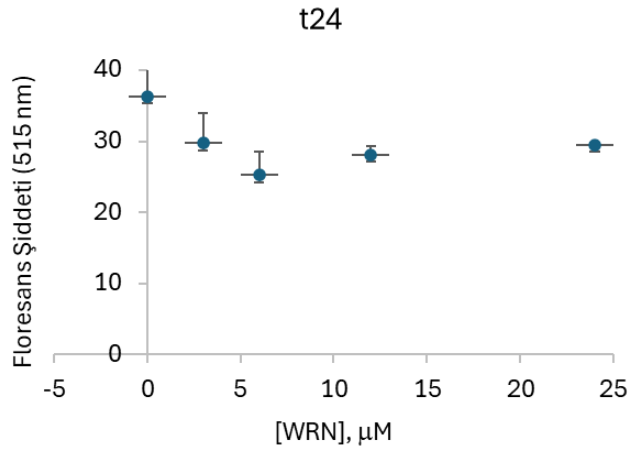
**Şekil 116.** HCT-116 ve SW480 hücre hattında farklı derişimlerde **PROTAC** uygulandığında akış sitometrisi Q1-UR kuadrantındaki normalize hücre yüzdelерinin karşılaştırılması. Bu kuadrant PI ve FITC ile boyanmış hücreleri temsil etmektedir. n = 3.

### 3.2.4. Spektroskopik Sonuçlar

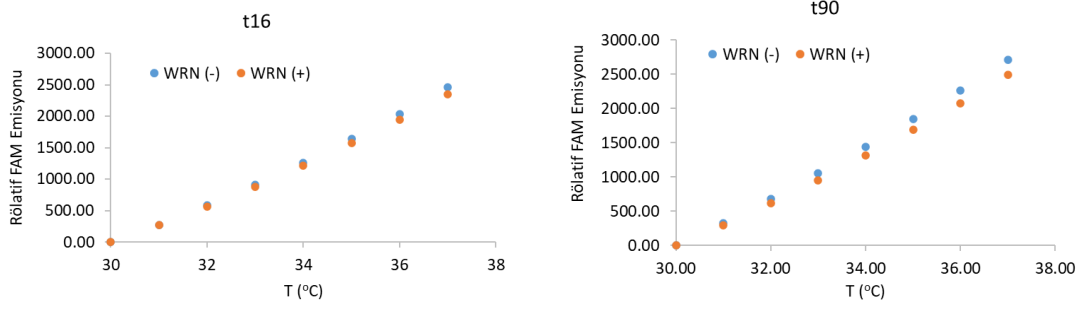
Yapısında FAM FRET donörü olan probun WRN helikaz miktarına bağlı olarak floresan artış oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için  $2,5 \mu\text{M}$ 'lık proba birlikte 0-24 nM aralığında WRN helikaz enzimine maruz bırakılmıştır. 96-kuyulu plakalarda 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen ölçümlerde floresan şiddetindeki değişim anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.17-3.18). RT-PCR cihazı kullanılarak 30-37 °C sıcaklık aralıklarında FAM floresan şiddeti incelendiğinde de bir değişim olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.17.  $2,5 \mu\text{M}$  Prob ve farklı derişimlerde WRN enzimi ile (0-24 nM) 24 saat muamelesi sonrasında elde edilen spektrum.

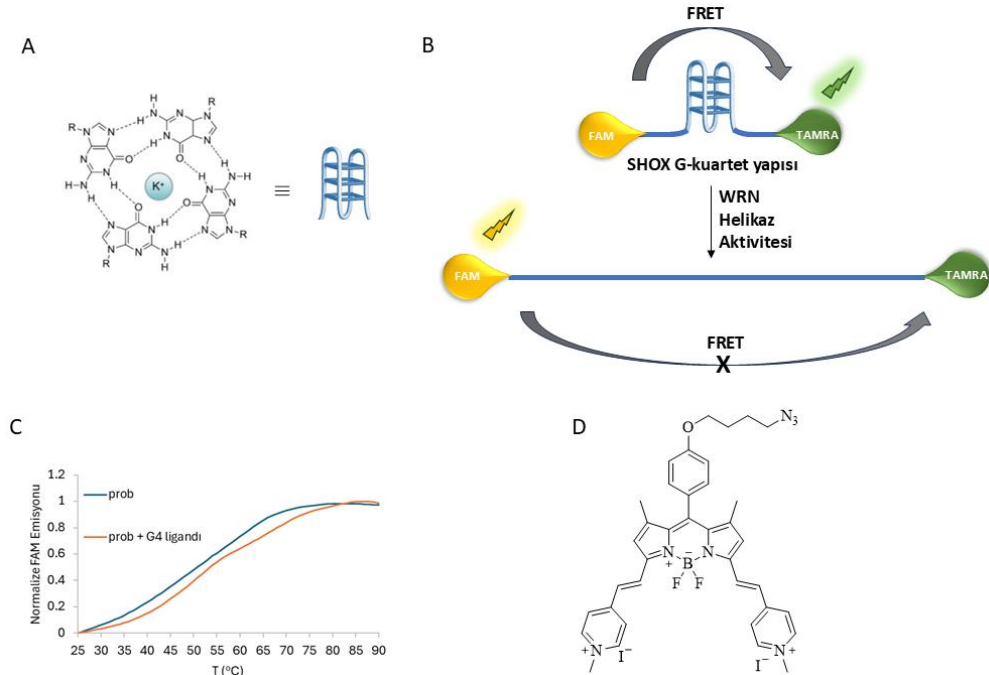


Şekil 3.18.  $2,5 \mu\text{M}$  prob ve farklı derişimlerde (0-24 nM) WRN enzimi ile 24 saat muamelesi sonrasında elde edilen spektrum.



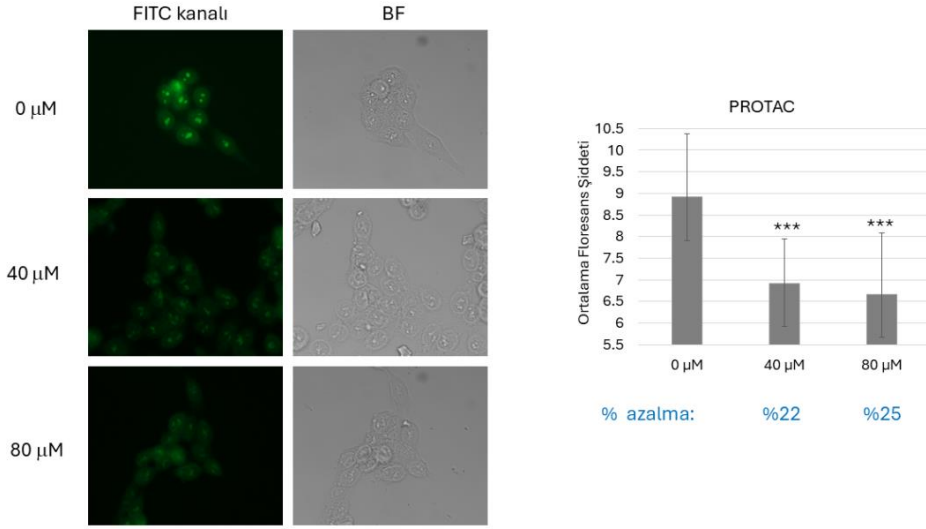
**Şekil 3.19.** Probun farklı WRN enzimi varlığında 16 dakika ve 90 dakika boyunca inkübasyonu ile 30-37 °C sıcaklıklarda RT-PCR cihazı ile elde edilen FAM emisyon grafiği.

Probun G-kuadrupleks yapısı oluşturup oluşturmadığını anlamak amacıyla G4 stabilizasyonu yapan ve danışman araştırma grubu tarafından etkinliği ispatlanmış, yapısı Şekil 3.20.D'de verilen G4 stabilizörü (Baser vd., 2023) varlığında FRET erime testi yapılmıştır. Probun  $T_m$  değeri 51°C olarak belirlenirken stabilizatör varlığında bu değer 53.5°C'ye kadar artmış ve sadece 2.5 derecelik bir fark oluşmuştur (Şekil 3.20). Bu ihmal edilebilir derecede az farkın oluşması, probun istenilen seviyede G4 yapısı oluşturamamış olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

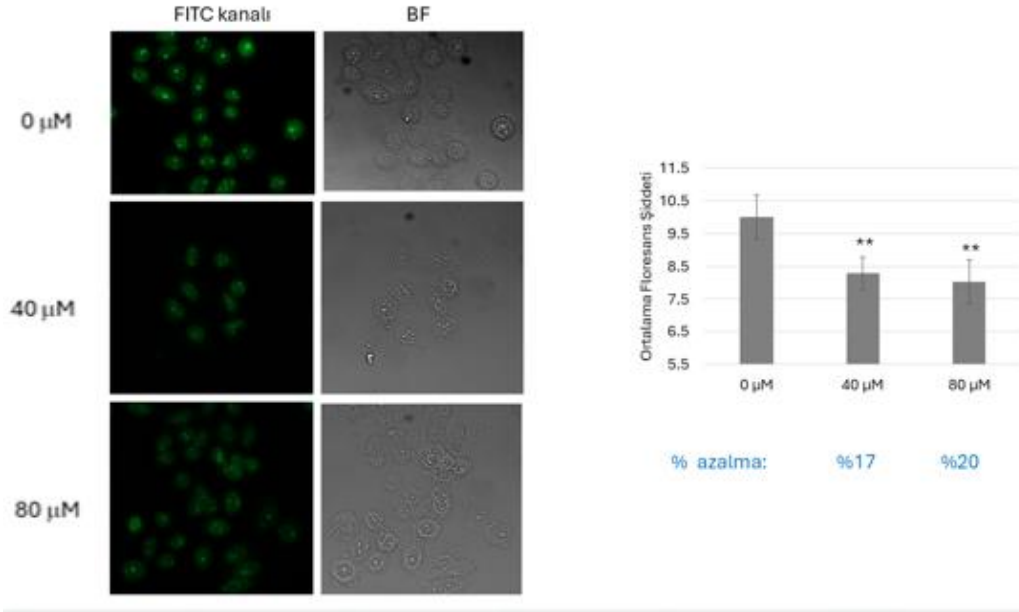


**Şekil 3.20.** G-kuadrupleks yapısı (A), Prob bileşiğinin çalışma prensibi (B), **Prob** molekülünün tek başına (mavi) ve 5 µM G4-stabilizatörü varlığında (turuncu) elde edilen FRET erime eğrisi (C), deneyde kullanılan G4 stabilizatörünün kimyasal yapısı (D).

### 3.2.5. Floresan Görüntüleme Sonuçları



**Şekil 3.21.** HCT-116 hücre hattında 40 ve 80  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulanan numunenin floresan mikroskop görüntüleri. 5 farklı hücre fotoğrafı ImageJ programı kullanılarak değerlendirilmiş ve GraphPad yazılımı öğrenci t testi ile karşılaştırılmıştır.



**Şekil 3.22.** SW480 hücre hattında 40 ve 80  $\mu\text{M}$ 'lık **PROTAC** uygulanan numunenin floresan mikroskop görüntüleri. 5 farklı hücre fotoğrafı ImageJ programı kullanılarak değerlendirilmiş ve GraphPad yazılımı öğrenci t testi ile karşılaştırılmıştır.

WRN helikazının yıkımını indüklemesi beklenen **PROTAC** bileşiğinin hücreye uygulanması ve sonrasında FITC etiketli WRN antikoru ile muamele sonrasında elde edilen bulgular Şekil 3.21'de sunulmuştur. Hücre canlılık analizi ile uyumlu şekilde

bileşimin 40 ve 80  $\mu\text{M}$  derişimlerde WRN seviyesinde sırasıyla %22 ve %25 oranında istatistiki olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu anlaşılmıştır. SW480 hücrelerinde 40 ve 80  $\mu\text{M}$  PROTAC uygulaması sırasıyla %17 ve %20 oranında floresan şiddeti azalmasına neden olmuştur (Şekil 3.22). WRN yıkımı iki hücrede de gerçekleşmiş görülmektedir.



## 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 4.1 Sonuçlar

Bu çalışmada WRN proteinine hedefli bir PROTAC molekülü tasarlanmış ve sentezlenmiş olup, WRN proteininin proteozomal yıkımı amaçlanmıştır. WRN proteininin yıkımına bağlı olarak mikrosatellit instabilitesine sahip olan kanserlerde sentetik letal etkinin elde edilmesi ve buna bağlı hücre ölümü planlanmıştır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda sentezlenen WRN hedefli **PROTAC** ile mikrosatellit stabilitesi olan SW480 hücre hattına göre mikrosatellit instabilitesine sahip HCT-116 hücre hattında sentetik letal etki oluşumu gözlemlenmiştir. MSS olan SW480 hücre hattında değişim olmazken, MSI olan HCT-116 hücre hattında 80 µM ve 120 µM da istenen sentetik letal etki elde edilmiştir. Floresan görüntüleme ve flow sitometri verileriyle, **PROTAC** molekülünün WRN degradasyonunu sağladığı ve sentetik letal etkiye sebep olduğu, bunun yanında hücre siklusunu da etkilediği kanıtlanmıştır. MSI olan HCT-116 hücre hattında etkili dozda hücre döngüsünün G1 fazında kaldığı kanıtlanmıştır. Bu çalışmada sentezlenen **PROTAC** molekülü potansiyel bir kanser ilacı olarak değerlendirilmeye beraber, ilaç direnci oluşturma gibi birçok problemin yaşandığı kanser çalışmalarına ışık tutabilir.

İlerleyen çalışmalarda, **PROTAC**'ın *in vitro* da çalışmalarının genişletilmesi ve *in vivo* çalışmalarının yapılması hedeflenmektedir. Bunun yanında istenen uzunlukta üretilmeyen ve WRN aktivitesine bağlı bir floresan değişim sergilemeyen **Prob** için alternatif sekansların belirlenmesi ve yeni bir tasarımla FRET yöntemini kullanarak WRN helikaz aktivitesinin yapılması hedeflenmektedir.

### 4.2 Öneriler

Projenin sonraki çalışmalarında, **PROTAC**'ın *in vitro* çalışmalarının genişletilmesi ve *in vivo* çalışmalarının yapılması, PROTAC'ın etkinliğinin daha iyi anlaşılması ve bir ilaç molekülü olarak değerlendirilmesi için önerilmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- Aggarwal, M., Sommers, J. A., Shoemaker, R. H., & Brosh, R. M. (2011). Inhibition of helicase activity by a small molecule impairs Werner syndrome helicase (WRN) function in the cellular response to DNA damage or replication stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1525-1530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006423108>
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. E., & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*, 3. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.175>
- Baser, A., Basar, B., Dogan, H. B., Sener, G., Ozsamur, N. G., Celik, F. S., Altves, S., & Erbas-Cakmak, S. (2023). Reprograming cancer cells by a BODIPY G-quadruplex stabiliser. *Chemical Communications*, 59(83), 12447-12450. <https://doi.org/10.1039/D3CC03453D>
- Békés, M., Langlely, D. R., & Crews, C. M. (2022). PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. İçinde *Nature Reviews Drug Discovery* (C. 21, Sayı 3, ss. 181-200). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>
- Berg, K. C. G., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Johannessen, B., Bruun, J., Danielsen, S. A., Bjørnslett, M., Meza-Zepeda, L. A., Eknæs, M., Lind, G. E., Myklebost, O., Skotheim, R. I., Sveen, A., & Lothe, R. A. (2017). Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Molecular Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0691-y>
- Bohr, V. A. (2008). Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. İçinde *Trends in Biochemical Sciences* (C. 33, Sayı 12, ss. 609-620). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.09.003>
- Broussard, J. A., & Green, K. J. (2017). Research Techniques Made Simple: Methodology and Applications of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(11), e185-e191. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2017.09.006>
- Chan, E. M., Shibue, T., McFarland, J. M., Gaeta, B., Ghandi, M., Dumont, N., Gonzalez, A., McPartlan, J. S., Li, T., Zhang, Y., Bin Liu, J., Lazaro, J. B., Gu, P., Pielt, C. G., Apffel, A., Ali, S. O., Deasy, R., Keskula, P., Ng, R. W. S., ... Bass, A. J. (2019). WRN helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers. *Nature*, 568(7753), 551-556. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1102-x>
- Chen, T., He, B., Tao, J., He, Y., Deng, H., Wang, X., & Zheng, Y. (2019). Application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and In Vivo biofate of nanomedicines. İçinde *Advanced Drug Delivery Reviews* (C. 143, ss. 177-205). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.009>
- Fang, B. (2014). Development of synthetic lethality anticancer therapeutics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(19), 7859-7873. <https://doi.org/10.1021/jm500415t>
- Flow Cytometry Protocol | abcam.* (t.y.). Geliş tarihi 17 Kasım 2024, gönderen [https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/protocols/flow-cytometry-for-intracellular-and-extracellular-targets?srsId=AfmBOori\\_5DHvFFtZWI7XCSdDDqU410Hcofk8pIT86UTSC60SISgjsy7](https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/protocols/flow-cytometry-for-intracellular-and-extracellular-targets?srsId=AfmBOori_5DHvFFtZWI7XCSdDDqU410Hcofk8pIT86UTSC60SISgjsy7)
- Flow cytometry with PI staining | abcam.* (t.y.). Geliş tarihi 17 Kasım 2024, gönderen <https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/protocols/flow-cytometry-with->

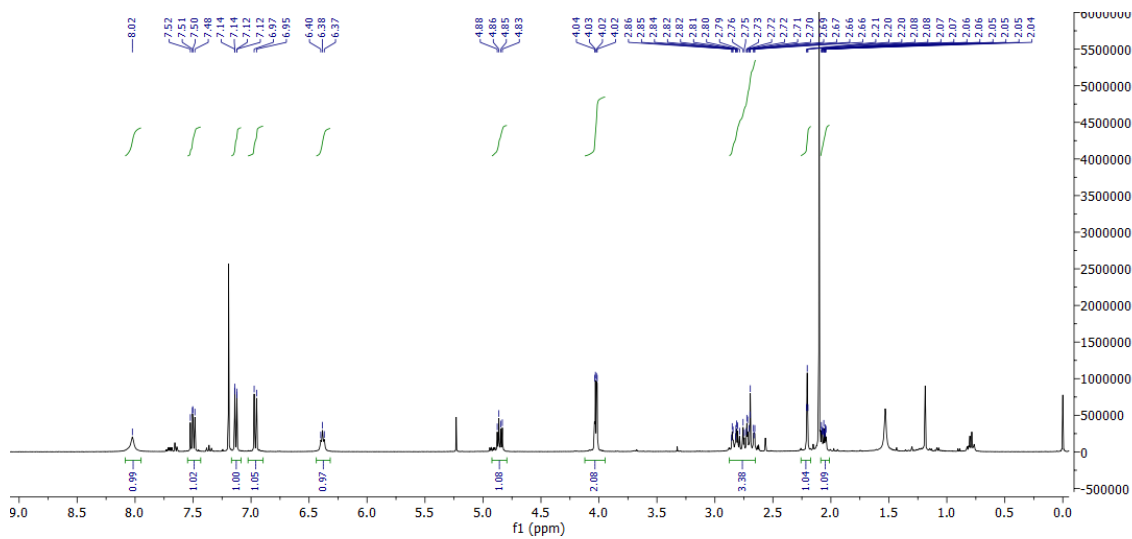
- propidium-iodide-staining?srsltid=AfmBOoofeEk33vocRqFF3AG\_HhiYDki52mekmxx9RDk9PzzZQko0uV1R
- Futami, K., Ishikawa, Y., Goto, M., Furuichi, Y., & Sugimoto, M. (2008). Role of werner syndrome gene product helicase in carcinogenesis and in resistance to genotoxins by cancer cells. *Çinde Cancer Science* (C. 99, Sayı 5, ss. 843-848). <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00778.x>
- Goto, M., Miller, R. W., Ishikawa, Y., & Sugano, H. (1996). *Excess of Rare Cancers in Werner Syndrome (Adult Progeria)* (C. 5). <http://aacrjournals.org/cebpa/article-pdf/5/4/239/2289022/239.pdf>
- Graham, H. (2022). The mechanism of action and clinical value of PROTACs: A graphical review. *Çinde Cellular Signalling* (C. 99). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110446>
- Han, X., & Sun, Y. (2023). PROTACs: A novel strategy for cancer drug discovery and development. *Çinde MedComm* (C. 4, Sayı 3). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mco2.290>
- Hao, S., Tong, J., Jha, A., Risnik, D., Lizardo, D., Lu, X., Goel, A., Opresko, P. L., Yu, J., & Zhang, L. (2022). Synthetical lethality of Werner helicase and mismatch repair deficiency is mediated by p53 and PUMA in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.2211775119>
- He, M., Cao, C., Ni, Z., Liu, Y., Song, P., Hao, S., He, Y., Sun, X., & Rao, Y. (2022). PROTACs: great opportunities for academia and industry (an update from 2020 to 2021). *Çinde Signal Transduction and Targeted Therapy* (C. 7, Sayı 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00999-9>
- Hisama, F. M., Bohr, V. A., & Oshima, J. (2006). WRN's tenth anniversary. *Science of aging knowledge environment : SAGE KE*, 2006(10). <https://doi.org/10.1126/SAGEKE.2006.10.PE18/ASSET/E4DF3D7E-89D9-4C9C-A23B-DD1BCDCC980A/ASSETS/GRAPHIC/102006PE18F3.JPEG>
- Huang, S., Lee, L., Hanson, N. B., Lenaerts, C., Hoehn, H., Poot, M., Rubin, C. D., Chen, D. F., Yang, C. C., Juch, H., Dorn, T., Spiegel, R., Oral, E. A., Abid, M., Battisti, C., Lucci-Cordisco, E., Neri, G., Steed, E. H., Kidd, A., ... Oshima, J. (2006). The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Human Mutation*, 27(6), 558-567. <https://doi.org/10.1002/humu.20337>
- Kategaya, L., Perumal, S. K., Hager, J. H., & Belmont, L. D. (2019). Werner Syndrome Helicase Is Required for the Survival of Cancer Cells with Microsatellite Instability. *iScience*, 13, 488-497. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.02.006>
- Kelm, J. M., Pandey, D. S., Malin, E., Kansou, H., Arora, S., Kumar, R., & Gavande, N. S. (2023). PROTAC'ing oncoproteins: targeted protein degradation for cancer therapy. *Çinde Molecular Cancer* (C. 22, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01707-5>
- Kunitomi, H., Banno, K., Yanokura, M., Takeda, T., Iijima, M., Nakamura, K., Iida, M., Adachi, M., Watanabe, K., Matoba, Y., Kobayashi, Y., Tominaga, E., & Aoki, D. (2017). New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer. *Oncology Letters*, 14(3), 3297. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6640>
- Kusumoto, R., Muftuoglu, M., & Bohr, V. A. (2007). The role of WRN in DNA repair is affected by post-translational modifications. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.010>

- Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., & Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: A review of what the oncologist should know. İçinde *Cancer Cell International* (C. 20, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1091-8>
- Li, S., Topatana, W., Juengpanich, S., Cao, J., Hu, J., Zhang, B., Ma, D., Cai, X., & Chen, M. (2020). Development of synthetic lethality in cancer: molecular and cellular classification. İçinde *Signal Transduction and Targeted Therapy* (C. 5, Sayı 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00358-6>
- Li, X., Pu, W., Zheng, Q., Ai, M., Chen, S., & Peng, Y. (2022). Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy. İçinde *Molecular Cancer* (C. 21, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01434-3>
- Liu, Q. W., Yang, Z. W., Tang, Q. H., Wang, W. E., Chu, D. S., Ji, J. F., Fan, Q. Y., Jiang, H., Yang, Q. X., Zhang, H., Liu, X. Y., Xu, X. S., Wang, X. F., Liu, J. Bin, Fu, D., Tao, K., & Yu, H. (2024). The power and the promise of synthetic lethality for clinical application in cancer treatment. İçinde *Biomedicine and Pharmacotherapy* (C. 172). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116288>
- Liu, Z., Hu, M., Yang, Y., Du, C., Zhou, H., Liu, C., Chen, Y., Fan, L., Ma, H., Gong, Y., & Xie, Y. (2022). An overview of PROTACs: a promising drug discovery paradigm. İçinde *Molecular Biomedicine* (C. 3, Sayı 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00112-0>
- Lu, H., & Davis, A. J. (2021). Human RecQ Helicases in DNA Double-Strand Break Repair. İçinde *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (C. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640755>
- Luo, J. (2010). WRN protein and Werner syndrome. İçinde *Am J Med Sci (Boston)* (C. 3, Sayı 4).
- Mendoza, O., Bourdoncle, A., Boulé, J. B., Brosh, R. M., & Mergny, J. L. (2016). G-quadruplexes and helicases. İçinde *Nucleic Acids Research* (C. 44, Sayı 5, ss. 1989-2006). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw079>
- Mengoli, V., Ceppi, I., Sanchez, A., Cannavo, E., Halder, S., Scaglione, S., Gaillard, P., McHugh, P. J., Riesen, N., Pettazoni, P., & Cejka, P. (2023). WRN helicase and mismatch repair complexes independently and synergistically disrupt cruciform DNA structures . *The EMBO Journal*, 42(3). <https://doi.org/10.15252/embj.2022111998>
- Mohaghegh, P. (2004). *Premature Aging Syndromes*.
- Newman, J. A., Gavard, A. E., Lieb, S., Ravichandran, M. C., Hauer, K., Werni, P., Geist, L., Böttcher, J., Engen, J. R., Rumpel, K., Samwer, M., Petronczki, M., & Gileadi, O. (2020). Structure of the helicase core of werner helicase, a key target in microsatellite instability cancers. *Life Science Alliance*, 4(1). <https://doi.org/10.26508/LSA.202000795>
- nrc1618*. (t.y.).
- O'Neil, N. J., Bailey, M. L., & Hieter, P. (2017). Synthetic lethality and cancer. İçinde *Nature Reviews Genetics* (C. 18, Sayı 10, ss. 613-623). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.47>
- Orlovetskie, N., Serruya, R., Abboud-Jarrou, G., & Jarrou, N. (2017). Targeted inhibition of WRN helicase, replication stress and cancer. İçinde *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (C. 1867, Sayı 1, ss. 42-48). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.11.004>
- Oshima, J., Hisama, F. M., & Monnat, R. J. (2018). Werner syndrome as a model of human aging. İçinde *Conn's Handbook of Models for Human Aging* (ss. 3-19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811353-0.00001-4>

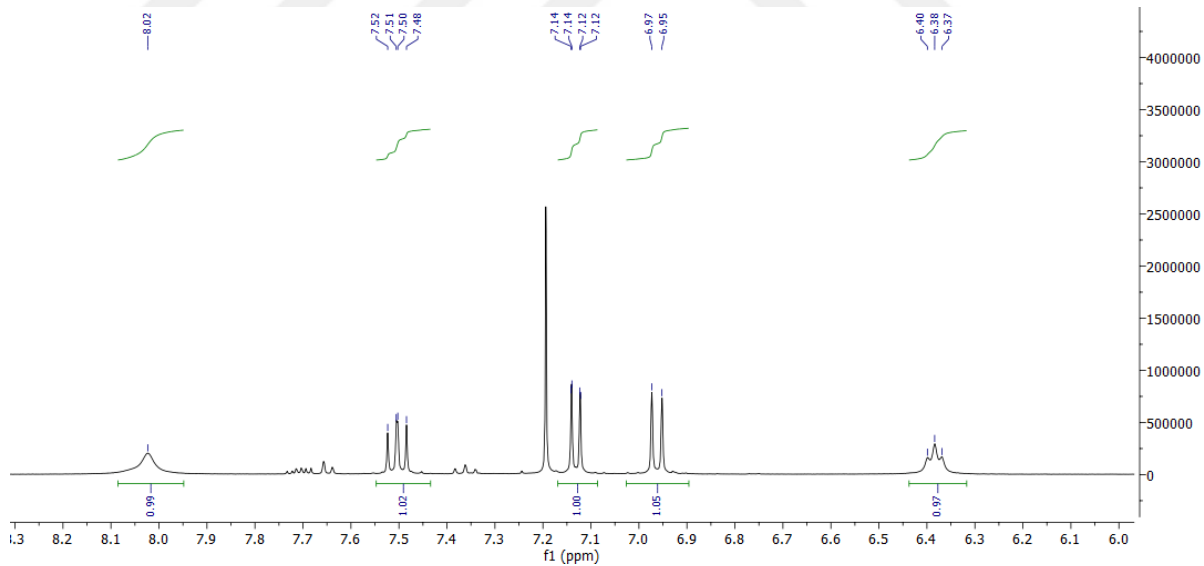
- Ozgenç, A., & Loeb, L. A. (2006). Werner Syndrome, Aging and Cancer. İçinde *Genome Dyn* (C. 1).
- Qi, S. M., Dong, J., Xu, Z. Y., Cheng, X. D., Zhang, W. D., & Qin, J. J. (2021). PROTAC: An Effective Targeted Protein Degradation Strategy for Cancer Therapy. İçinde *Frontiers in Pharmacology* (C. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.692574>
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods. İçinde *Database* (C. 2021). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>
- Rincón, A., Mora, L., Suarez-Obando, F., & Rojas, J. A. (2019). Werner's Syndrome: Understanding the Phenotype of Premature Aging—First Case Described in Colombia. *Case Reports in Genetics*, 2019, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2019/8538325>
- Saha, B., Lessel, D., Nampoothiri, S., Rao, A. S., Hisama, F. M., Peter, D., Bennett, C., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Martin, G. M., Kubisch, C., & Oshima, J. (2013). Ethnic-specific wrn mutations in south asian werner syndrome patients: Potential founder effect in patients with indian or pakistani ancestry. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 1(1), 7-14. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1>
- Santos, A. L., & Lindner, A. B. (2017). Protein Posttranslational Modifications: Roles in Aging and Age-Related Disease. İçinde *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (C. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/5716409>
- Shen, J.-C. (2000). *PII: S0168-9525(99)01970-8*.
- Shrestha, D., Jenei, A., Nagy, P., Vereb, G., & Szöllösi, J. (2015). Understanding FRET as a research tool for cellular studies. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 16, Sayı 4, ss. 6718-6756). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms16046718>
- Sincere, N. I., Anand, K., Ashique, S., Yang, J., & You, C. (2023). PROTACs: Emerging Targeted Protein Degradation Approaches for Advanced Druggable Strategies. İçinde *Molecules* (C. 28, Sayı 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28104014>
- Study Details | A Trial Using ARV-471 or Anastrozole in Post-Menopausal Women With Breast Cancer Prior to Surgery | ClinicalTrials.gov*. (t.y.). Geliş tarihi 14 Kasım 2024, gönderen <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05549505>
- Su, F., Bhattacharya, S., Abdisalaam, S., Mukherjee, S., Yajima, H., Yang, Y., Mishra, R., Srinivasan, K., Ghose, S., Chen, D. J., Yannone, S. M., & Asaithamby, A. (2016). Replication stress induced site-specific phosphorylation targets WRN to the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncotarget*, 7(1), 46-65. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6659>
- Takemoto, M., Mori, S., Kuzuya, M., Yoshimoto, S., Shimamoto, A., Igarashi, M., Tanaka, Y., Miki, T., & Yokote, K. (2013). Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatrics and Gerontology International*, 13(2), 475-481. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2012.00913.x>
- Tejwani, V., Carroll, T., Macartney, T., Bandau, S., Alabert, C., Saredi, G., Toth, R., & Rouse, J. (2024). PROTAC-mediated conditional degradation of the WRN helicase as a potential strategy for selective killing of cancer cells with microsatellite instability. *Scientific Reports 2024 14:1*, 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-71160-5>
- Tian, Y., Wang, W., Lautrup, S., Zhao, H., Li, X., Law, P. W. N., Dinh, N. D., Fang, E. F., Cheung, H. H., & Chan, W. Y. (2022). WRN promotes bone development and

- growth by unwinding SHOX-G-quadruplexes via its helicase activity in Werner Syndrome. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33012-6>
- Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Cao, J., Hu, J., Lee, J., Suliyanto, K., Ma, D., Zhang, B., Chen, M., & Cai, X. (2020). Advances in synthetic lethality for cancer therapy: Cellular mechanism and clinical translation. İçinde *Journal of Hematology and Oncology* (C. 13, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00956-5>
- Tsuge, K., & Shimamoto, A. (2022). Research on Werner Syndrome: Trends from Past to Present and Future Prospects. İçinde *Genes* (C. 13, Sayı 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes13101802>
- Van Wietmarschen, N., Nathan, W. J., & Nussenzweig, A. (2021). The WRN helicase: resolving a new target in microsatellite unstable cancers. İçinde *Current Opinion in Genetics and Development* (C. 71, ss. 34-38). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.06.014>
- Virág, D., Dalmadi-Kiss, B., Vékey, K., Drahos, L., Klebovich, I., Antal, I., & Ludányi, K. (2020). Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications. İçinde *Chromatographia* (C. 83, Sayı 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03796-9>
- Werner, O. (1985). *On Cataract in Conjunction with Scleroderma*. 1-14. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7853-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7853-2_1)
- WRN WRN RecQ like helicase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. (t.y.). Geliş tarihi 08 Ağustos 2023, gönderen <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7486#gene-expression>
- Xie, H., & Zhang, J. (2024). Targeting werner helicase with synthetic lethality in microsatellite instability cancers: Promising therapeutic approaches. *MedComm – Oncology*, 3(2). <https://doi.org/10.1002/mog2.82>
- Yokote, K., Chanprasert, S., Lee, L., Eirich, K., Takemoto, M., Watanabe, A., Koizumi, N., Lessel, D., Mori, T., Hisama, F. M., Ladd, P. D., Angle, B., Baris, H., Cefle, K., Palanduz, S., Ozturk, S., Chateau, A., Deguchi, K., Easwar, T. K. M., ... Oshima, J. (2017). WRN Mutation Update: Mutation Spectrum, Patient Registries, and Translational Prospects. *Human Mutation*, 38(1), 7-15. <https://doi.org/10.1002/humu.23128>

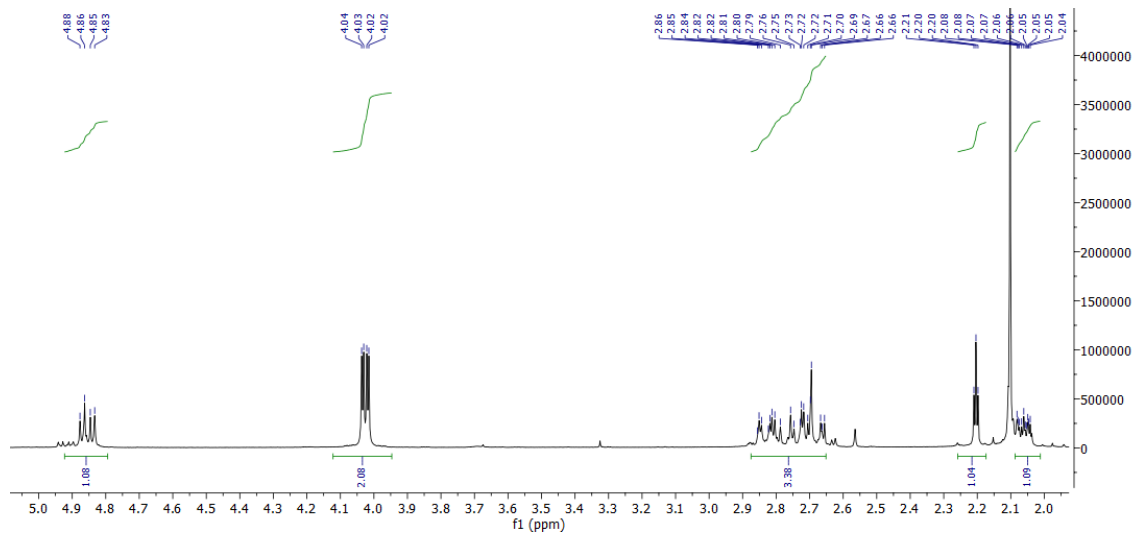




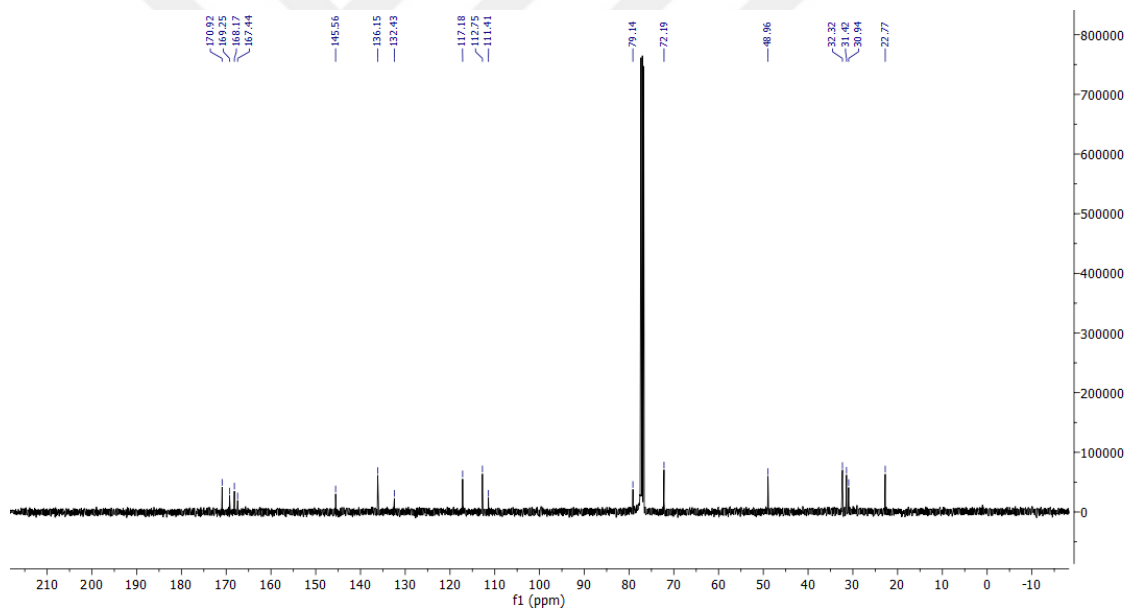
**EK-3. 3 Nolu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).**



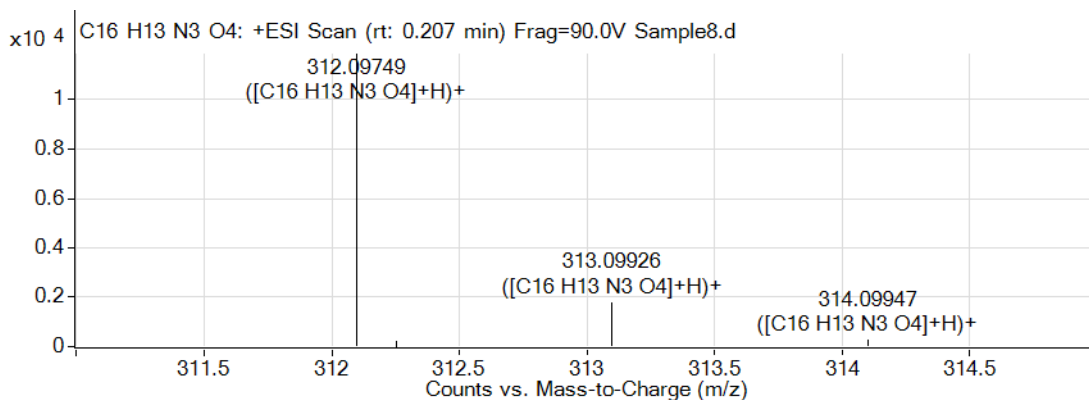
**EK-4. 3 Nolu bileşiğin aromatik bölgesi genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).**



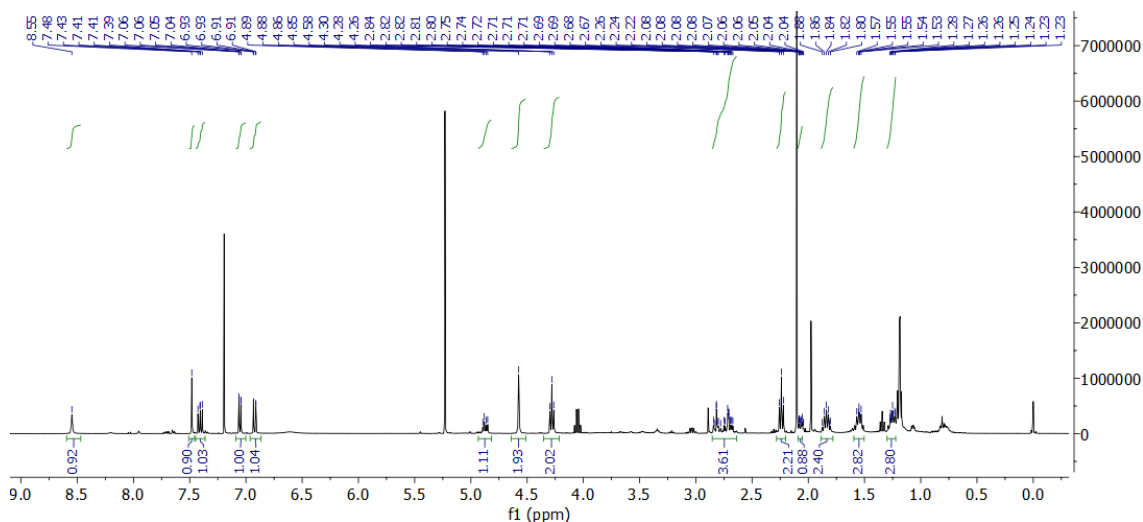
**EK-5. 3 Nolu bileşiğin alifatik bölgesi genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).**



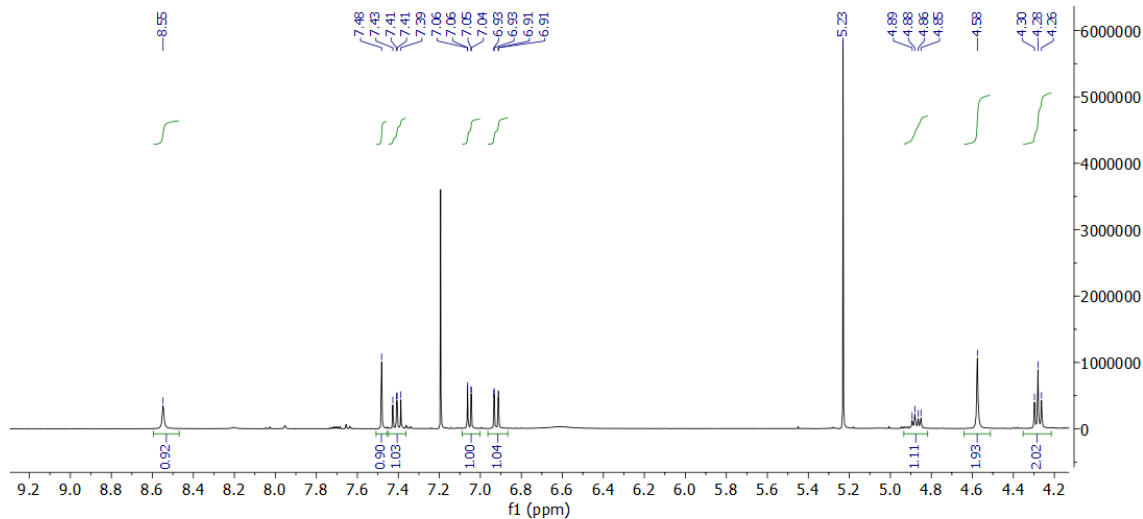
**EK-6. 3 Nolu bileşiğin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz).**



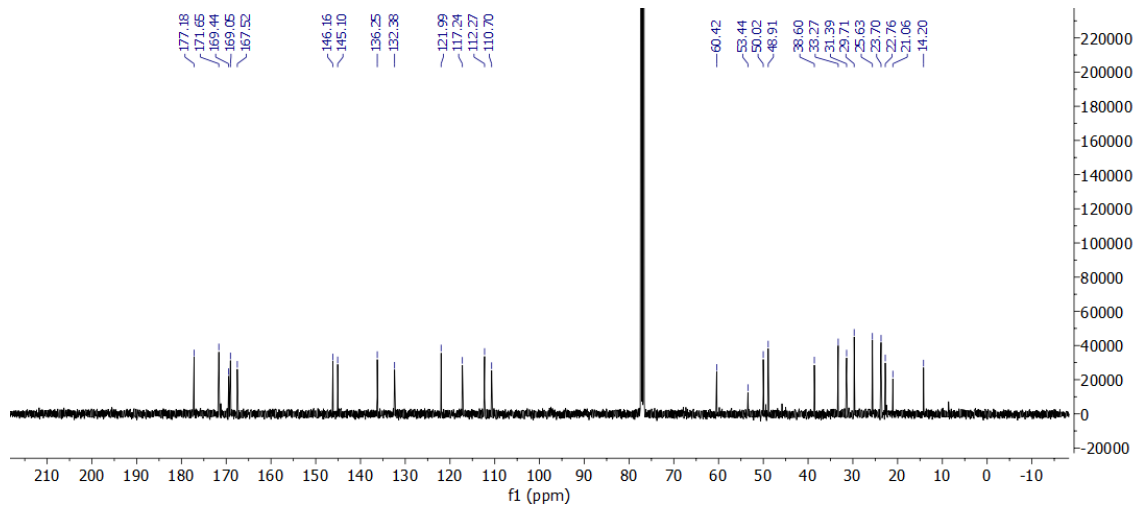
**EK-7. 3 Nolu bileşiğin QTOF-LCMS spektrumu.**



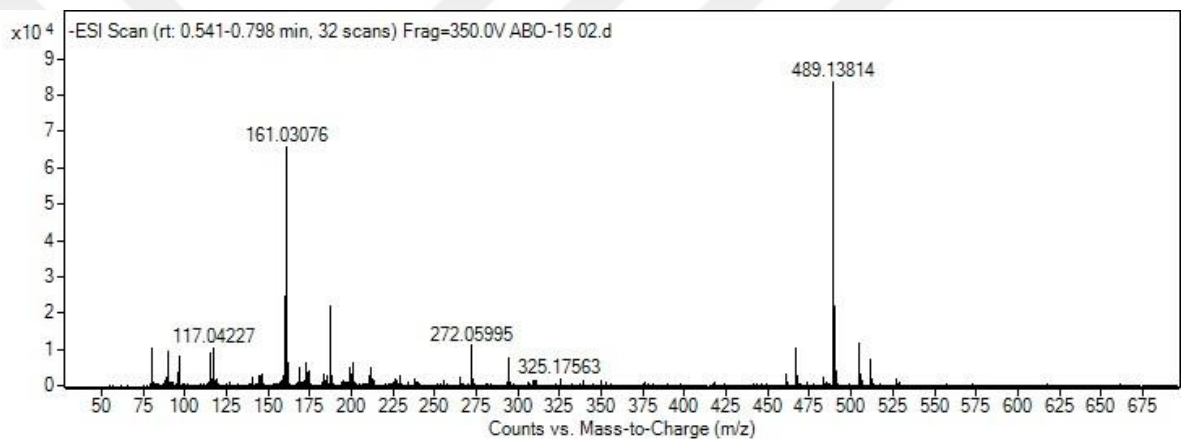
**EK-8. 4 Nolu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR Spektrumu ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).**



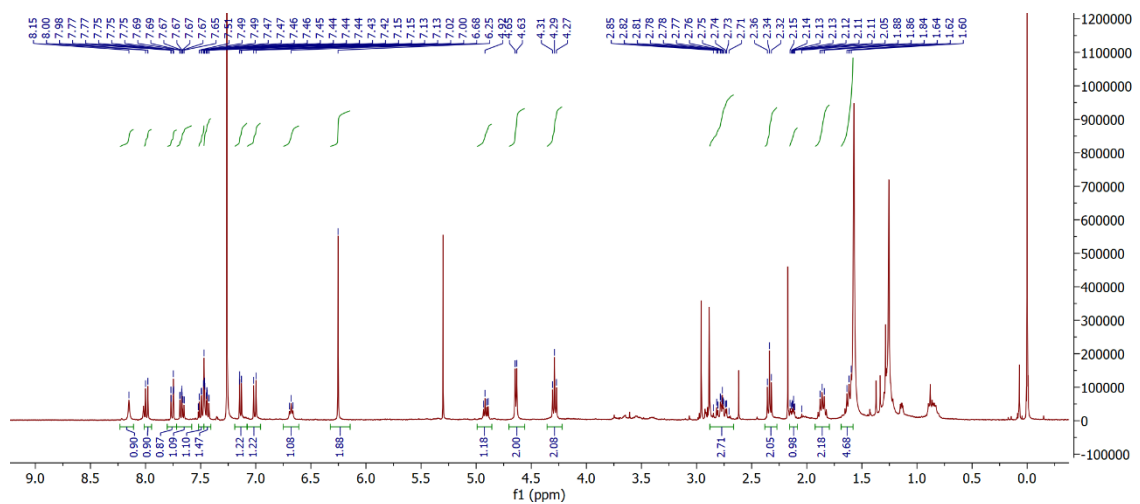
**EK-9. 4 Nolu bileşiğin aromatik bölgesi genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR Spektrumu ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).**



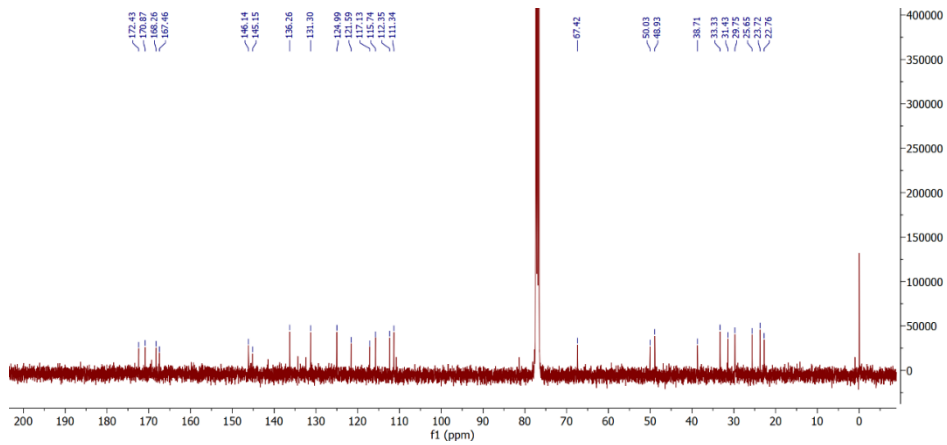
Ek-10. 4 Nolu bileşğin  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



EK-11. 4 Nolu bileşğin QTOF-LC/MS spektrumu.

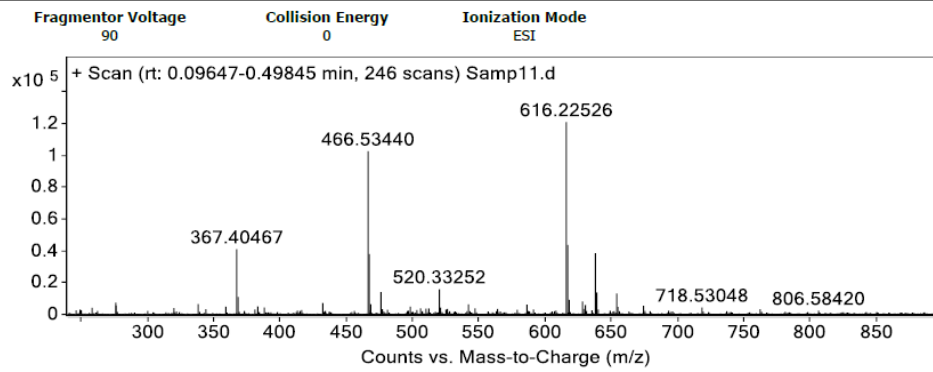


EK-12. PROTAC bileşğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



**EK-13. PROTAC bileşğinin  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

### Spectra



**EK-14. PROTAC bileşğinin QTOF-LC/MS spektrumu.**