

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTESİNİN
FLOROMETRİK YÖNTEMLE GÖSTERİLMESİ

Gamze BORA

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2006

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTESİNİN
FLOROMETRİK YÖNTEMLE GÖSTERİLMESİ

Gamze BORA

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI:
Prof.Dr.Hayat ERDEM YURTER

ANKARA

2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak Kabul Edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Şükrüye AYTER (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Hayat Erdem YURTER (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Serap EMRE (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sevim DALKARA (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Yard. Doç. Çetin KOCAEFE (imza)
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafında uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(imza)
Prof. Dr. Hakan S. ORER
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan, sevgi ve anlayış gösteren danışmanım Sayın Prof. Dr. Hayat ERDEM YURTER'e, bilgisini, deneyimini ve fikirlerini benimle paylaşarak, her konuda bana sonsuz anlayışla yol gösteren Sayın Dr. Didem DAYANGAÇ ERDEN'e, tez çalışmamın değerlendirilmesinde bana zaman ayırıp yardımcı olan Sayın Yard. Doç. Çetin KOCAEFE'ye, fikir ve katkılarını esirgemeyerek eğitimimde büyük yerleri olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma, tez çalışmama yaptıkları katkılardan dolayı Sayın Prof.Dr.Ediz DEMİRPENÇE'ye, Sayın Prof.Dr.Kamer KILINÇ'a, Sayın Prof.Dr.Ayhan DEMİR'e ve Sayın Prof.Dr. Sevim DALKARA'ya, bütün zamanımı birlikte geçirdiğim, laboratuvarıda birlikte çalıştığım ve bana her zaman destek olan tüm arkadaşlarıma, abla ve abilerime, tüm hayatım boyunca koşulsuz sevgisini ve desteğini hep arkamda hissettiğim babama, canım kardeşime ve tüm aileme ve arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK tarafından desteklenmekte olan 105G014 no'lu projenin bir parçasıdır.

ÖZET

BORA, G. Histon Deasetilaz İnhibitör Aktivitesinin Florometrik Yöntemle Gösterilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2006. DNA paketlenmesinin temel birimi olan histonların amino kuyruklarında bulunan lizin amino asitlerinin asetilasyonu, en önemli post-translasyonel modifikasyonlardan birisidir. Histon asetil transferazlar (HAT) histonlara asetil grubu takarak kromatinde lokal bir gevşemeye neden olmakta, böylece transkripsiyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Histon deasetilaz enzimleri (HDAC) ise histonlardan asetil grubunu çıkartarak kromatinin sıkı paketlenmesini sağlamakta ve transkripsiyonu baskılanmaktadır. HDAC'ların histon olmayan proteinlerin de deasetilasyonundan sorumlu olması ve büyük protein kompleksleriyle birlikte bulunmaları biyolojik fonksiyonlarının çeşitliliğini göstermektedir. Son yıllarda, HDAC'ları inhibe edebilen farklı yapıda bileşikler tanımlanmış ve hücre bölünmesini durdurucu, apoptoz ve farklılaşmayı indükleyici etkilerinin olduğu, ayrıca gen ekspresyonunu %2-5 oranında değiştirdiği gösterilmiştir. Bu nedenle HDAC inhibitörleri tüm dünyada çeşitli kalıtsal hastalıkların ve kanserin tedavisine yönelik çalışmalarda araştırılmaya başlanmıştır. Laboratuvarımızda yürütülmekte olan "RNA *Splicing* Hatalarının Neden Olduğu Kalıtsal Hastalıklarda İlaç Araştırma Geliştirme Çalışmaları" başlıklı proje kapsamında HDAC inhibitörlerinin modifikasyonu ve sentezi ile *splicing* hatalarını düzeltebilecek etkili bileşikler araştırılmaktadır. Tez çalışmamız bu projenin bir parçası olup, inhibitör olarak bilinen trikostatın A (TSA), 4-fenil bütirik asit (FBA), 4-fenil bütirik asit sodyum tuzu (NaFBA) ve sodyum bütirat (NaBA)'ın inhibisyon aktivitelerinin hücre dışı bir sistemde tayin edilmesini böylece ileriki aktivite tayini çalışmaları için tarama sisteminin hazır hale getirilmesini amaçlamıştır. "HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kiti" kullanılarak gerçekleştirilen aktivite tayini deneylerinde HeLa çekirdek özütüne 11,75 µM, 23,5 µM, 47 µM, 1000 µM, 2000 µM TSA ile 23,5 µM, 47 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM FBA, NaFBA ve NaBA uygulanmış ve floresan değerlerde TSA: %92,8 NaBA: %29,6, FBA: %25,5 ve NaFBA: %24,8 oranında azalma sağlamıştır. Floresans değerlerdeki azalma HDAC aktivitesindeki azalmayı dolayısıyla inhibisyonun gücünü göstermektedir. Analizlerimiz inhibisyon aktivitesi en yüksek bileşiğin TSA, sonra sırasıyla NaBA, FBA ve NaFBA olduğunu, ayrıca inhibisyon aktivitesinin doza bağlı olarak arttığını göstermiştir. Bu inhibitörlerle sistemin hazır hale getirilmesini takiben inhibitör adayı olarak düşünülen dört bileşiğin (2-fenil-vinil boronik asit (BİL 1), 3-morfolin-propen-sülfonik asit (BİL 2), gallik asit (BİL 3), 4-kinolin karboksilik asit (BİL 4)) inhibisyon aktiviteleri 11,75 µM, 23,5 µM, 47 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM konsantrasyonda araştırılmış, floresan değerlerde BİL 1: %9,5, BİL 2: %2,2, BİL 3: %46,5, BİL 4'ün ise %11,2 oranında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. BİL 1, 2 ve 4'ün inhibisyon aktivitelerinin bilinen inhibitörlerden daha fazla olmadığı gösterilmiştir. BİL 3'ün inhibisyon aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmasına karşın, 47 µM konsantrasyondan sonra meydana gelen mavi-yeşil rengin sağlıklı okumayı engellemesi nedeniyle farklı bir tarama sisteminde araştırılmasının uygun olacağına karar verilmiştir. Gerçekleştirilen aktivite tayinleri, etkili inhibitör geliştirilmesi için yapılan çalışmalarda ön tarama sistemi oluşturarak araştırmalara hız kazandıracaktır.

Anahtar sözcükler: Histon deasetilaz inhibitörleri, HDAC inhibisyon aktivite tayini
Destekleyen kuruluş: TÜBİTAK (105G014 no'lu projenin bir parçasıdır)

ABSTRACT

BORA, G. Investigations of Histone Deacetylase Inhibitory Activity with Fluorescence-based Technique. Hacettepe University Institute of Health Sciences, MSc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2006. Histones are major proteins of chromatin and amino terminal tails of histones are subject to acetylation, which is the most important post-translational modification of chromatin. Histone acetyl transferases (HAT) transfer acetyl group to the histones, which results in local expansion of chromatin so transcription occurs. Histone deacetylases (HDAC) catalyze the removal of acetyl groups from histones leading to chromatin condensation and transcriptional repression. These enzymes function in multiprotein complexes and they also regulate the acetylation pattern of non-histon proteins so they possess diverse biological activities. Recently, many compounds have been indentified and shown to inhibit the activities of HDACs. These inhibitors induce cell growth arrest, differentiation and/or apoptosis and they alter the expression of small number of genes (%2-5). Several studies have been initiated for the treatment of some inherited diseases and cancer as well. Our laboratory participated in a project which is called “Drug Research and Development Studies for Hereditary Diseases Caused by RNA Splicing Defects”. This project proposes to modify and synthesize HDAC inhibitors and to develop potential HDAC inhibitor compounds to correct splicing defects. This thesis is a part of the project and we proposed to test and compare activities of known inhibitors such as trichostatin A (TSA), 4-phenylbutyric acid (PBA), 4-phenylbutyric acid sodium salt (NaPBA), sodium butyrate (NaBA) in a cell-free, fluorensence-based system and to make the system ready for further investigations. We utilized “HDAC Inhibitor Drug Screening Kit” for screening and applied TSA (11,75 μ M, 23,5 μ M, 47 μ M, 1000 μ M and 2000 μ M), PBA, NaPBA and NaBA (23,5 μ M, 47 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M and 5000 μ M) on HeLa nuclear extract. We observed that fluorescence signals decreased as TSA: 92,8 %, NaBA: 29,6 %, PBA: 25,5 % and NaPBA: 24,8 % after applying the inhibitor. Decreasing fluorescence signal shows HDAC activity so if the inhibitor is effective, fluorensence signal should decrease. According to our analysis, we showed that TSA is the most effective inhibitor and decreasing HDAC inhibitory activities are NaBA, PBA and NaPBA, respectively. We also showed that the HDAC inhibitory activities increased at higher concentrations of inhibitors. After screening activities of known inhibitors, we investigated four candidate compounds such as 2-phenyl vinyl boronic acid (Comp 1), 3-morpholine-propene-sulphonic acid (Comp 2), gallic acid (Comp 3), 4-quinoline carboxylic acid (Comp 4). 11,75 μ M, 23,5 μ M, 47 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M and 5000 μ M concentrations of these compounds were applied and decreasing fluorescence signals were observed as Comp 1: 9,5 %, Comp 2: 2,2 %, Comp 3: 46,5 %, Comp 4: 11,2 %. Comp 1, 2 and 4 were found less effective than known HDAC inhibitors. Unexpected blue-green color were seen after 47 μ M concentration with Comp 3 so, in contrast to the statistical analyses, which is significant for Comp 3 among candidate compounds, we decided to test the activity by using another non-fluorescence-based system. Screening the activities of inhibitors/compounds by using this system will contribute to the investigations of effective drug development.

Key Words: Histone deacetylase inhibitors, HDAC inhibitory activity screening
Supported by: TÜBİTAK (This thesis is a part of a project no 105G014)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. DNA'nın Paketlenmesi	2
2.2. Histonların Post-Translasyonel Modifikasyonları	5
2.3. Histonların Asetilasyonu	6
2.4. Histon Asetil Transferazlar	7
2.5. Histon Deasetilazlar	8
2.6. Histon Deasetilaz İnhibitörleri	10
2.7. Histon Deasetilaz İnhibitörlerinin Etki Mekanizmaları	11
2.8. Histon Deasetilaz ve İnhibitör Etkileşimi	13
2.9. Histon Deasetilaz İnhibitörleri ile İlgili Klinik Çalışmalar	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereçler	18
3.1.A. Çalışmada Kullanılan HDAC İnhibitörleri ve Uygulanan Konsantrasyonlar	18
3.1.B HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kiti (Biovision)	19
3.2 Yöntem	20
3.2.A. HDAC İnhibitör Dilüsyonlarının Hazırlanması	20
3.2.B. HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kitinin Çalışma Prensipleri	20
3.2.C. Standart Eğrinin Oluşturulması	22
3.2.D. İnhibitörlerin Aktivite Tayini	22
3.2.E. İstatistiksel Analiz	23

4. BULGULAR	24
4.1. Standart Eğrinin Oluşturulması	24
4.2. Aktivite Tayin Deneyleri	28
4.2.A. Önceden Tanımlanmış olan İnhibitörlerin Aktivite Tayini Çalışmaları	28
4.2.B. İnhibitör Adayı Bileşiklerin Aktivite Tayini Çalışmaları	34
5. TARTIŞMA	40
SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR	47
EKLER	
EK 1: Histon Deasetilaz İnhibitör Listesi	54
EK 2: Floresan Okumalar Sonucu Ölçülen Değerler ve İstatistiksel Hesaplamalar	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFU	Arbitrary Fluorescence Unit
Asetil KoA	Asetil koenzim A
BİL 1-4	Bileşik 1-4
BA	Bütirat
CBHA	Cinnamic acid bihydroxamic acid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ESE	Exonic Splicing Enhancer
ESS	Exonic Splicing Silencer
FBA	4-fenil bütirik asit
HAT	Histon Asetil Transferaz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HDAC	Histon Deasetilaz
HDACi	Histon Deasetilaz İnhibitorleri
HDLP	Histone Deacetylase-like protein
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
MEF 2	Myocyte Enhancer Factor 2
NaBA	Sodyum bütirat
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NaFBA	4-fenil bütirik asit sodyum tuzu
nM	Nanomolar

nm	Nanometre
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SIRT	Sirtuin
SMN	Survival Motor Neuron
SR	Serin-Arjinin
TSA	Trikostatin A

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. DNA'nın paketlenmesi	3
A) Histon oktameri ve nükleozom yapısı	
B) Paketlenme ile kromozom oluşumu	
2.2. Histon proteinleri	4
A) Histon proteinlerinin yapısı	
B) Oktamer oluşumu	
2.3. Histonların amino kuyruklarında bulunan lizin amino asitinin asetilasyonu	6
2.4. Histon deasetilazların şematik gösterimi	10
2.5. HAT, HDAC ve HDAC inhibitörleri arasındaki ilişki	12
2.6. HDAC ve inhibitör etkileşimi	14
A) HDAC inhibitörlerinin temel yapısı	
B) HDAC 8-TSA etkileşiminin üç boyutlu görüntüsü (<i>Ribbon</i> diagramı)	
C) HDLP-TSA etkileşiminin üç boyutlu görüntüsü (<i>Space-filling</i> model)	

3.1. HDAC inhibitör ilaç tarama kiti çalışma prensibi	20
3.2. İnhibitör etki gösteren bileşiğin mekanizmaya etkisi	21
4.1 Deasetile lizin miktarlarını gösteren standart eğri	24
4.2 İnhibitör etkisi olan bileşiklerin uygulaması ile elde edilen deasetile lizin miktarları A) TSA B) FBA C) NaFBA D) NaBA	26
4.3. TSA uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri	29
4.4. FBA uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri	30
4.5. NaFBA uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri	31
4.6. NaBA uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri	32
4.7. TSA, FBA, NaFBA ve NaBA'nın HDAC inhibisyon aktivitelerinin karşılaştırılması	33
4.8. BİL 1 uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri	35
4.9. BİL 2 uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri	36
4.10. BİL 3 uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri	37
4.11. BİL 4 uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri	38
4.12. BİL 1, 2, 3 ve 4 HDAC inhibisyon aktivitelerinin karşılaştırılması	39

TABLÖLAR

Sayfa

2.1. I., II. ve III. sınıf histon deasetilaz enzimleri

8

4.1. Standart eğri kullanılarak hesaplanan deasetile lizin miktarları

25

1.GİRİŞ

DNA paketlenmesinin temel proteinleri olan histonların amino kuyrukları çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirmektedir. Bu modifikasyonlar histonların elektrostatik yükünü değiştirerek histon olmayan proteinler için tanıma bölgesi oluşturmakta ve DNA replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi biyolojik olayları kontrol etmektedir. Asetilasyon, en çok çalışılan modifikasyon olup, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri tarafından düzenlenmektedir. HAT'lar asetil grubunun, asetil koenzim A'dan histonların amino kuyruklarına ve histon olmayan proteinlere transferini katalizleyen enzimlerdir. HDAC'lar ise bu asetil gruplarını çıkartmakla görevlidir. Histonların asetilasyonu ile kromatinde lokal bir gevşeme meydana gelerek transkripsiyon gerçekleşmekte, deasetilasyon ile kromatinin sıkı paketlenmesi sağlanarak transkripsiyon baskılanmaktadır (1). HAT ve HDAC'ların düzgün fonksiyon görmesi, sorunsuz hücre büyümesi için gereklidir. Son yıllarda HDAC'ları inhibe edebilen bileşikler (HDACi) tanımlanmıştır. HDAC'ların biyolojik fonksiyonlarının çeşitli olması nedeniyle, HDAC inhibitörlerinin etkileri kalıtsal hastalıklarda ve kanser türlerinde araştırılmakta, inhibitörler bu hastalıkların tedavisi için potansiyel ilaç adayları olarak görülmektedir (2).

Tez kapsamında HDAC inhibitörlerinin etkilerinin hücre dışı sistemde gösterilmesi, bu etkilerin birbirleriyle karşılaştırılması ve rasyonel tasarımla modifiye edilecek/yeni sentezlenecek olan HDAC inhibitörlerinin araştırılmasına imkan yaratılması amaçlanmıştır.

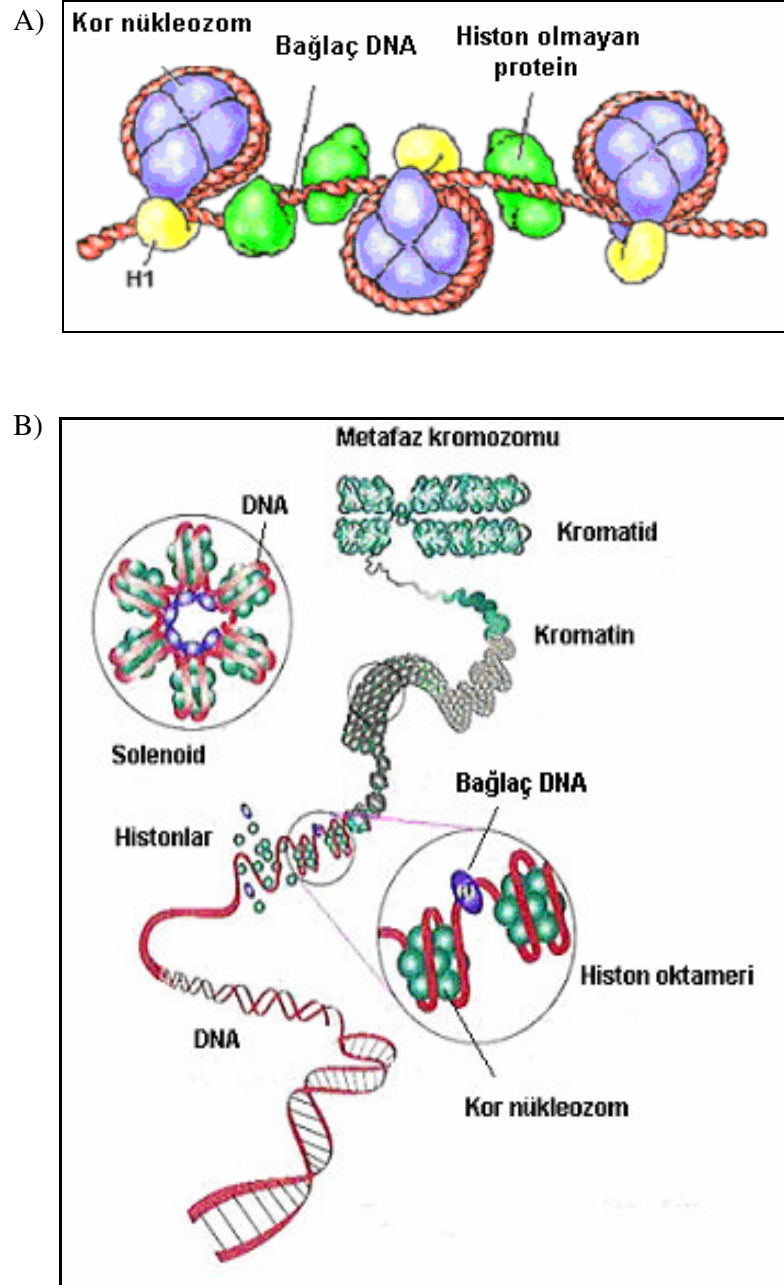
Çalışmamızın ilk aşamasında inhibitör etkisi olduğu bilinen bileşiklerden trikostatin A (TSA), 4-fenil bütirik asit (FBA), 4-fenil bütirik asit sodyum tuzu (NaFBA) ve sodyum bütirat (NaB)'ın farklı konsantrasyonlardaki inhibisyon etkinlikleri değerlendirilmiş, ikinci aşamasında ise bu bilgi kullanılarak "RNA *Splicing* Hatalarının Neden Olduğu Kalıtsal Hastalıklarda İlaç Araştırma Geliştirme Çalışmaları" başlıklı, 105G014 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında ilaç adayı olarak düşünülen dört bileşiğin inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DNA'nın Paketlenmesi:

Ökaryotik canlılardaki kromozom sayıları ve boyutları türler arasında değişebilmesine rağmen, kromozomun temel yapısı tüm ökaryotik canlılarda aynıdır. Ökaryotik kromozomlar hücrede birden fazla olup doğrusal DNA molekülünden oluşurlar. Ökaryotik hücrelerdeki DNA, histon ve histon olmayan proteinlerle sıkıca paketlenmiş halde çekirdek içerisinde bulunur. DNA ve proteinlerin oluşturduğu bu komplekse kromatin adı verilir. Kromatinin yapısında bulunan histon olmayan proteinler DNA replikasyonu ve gen ekspresyonu gibi biyolojik olaylarda görev alırlar (3,4). Kromatinin major proteinleri ise histonlardır. Histonlar lizin ve arjinin amino asitlerince zengin olup, bazik yapıda, 102-135 amino asit içeren küçük proteinlerdir ve pozitif yükleri sayesinde negatif yüklü olan DNA'ya kolayca bağlanabilirler. H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere beş tip histon proteini vardır. Bu proteinler tüm ökaryotik canlılar arasında benzerlik göstermekte olup, türler arasında en çok korunmuş olanlar H3 ve H4, en az korunmuş olan ise H1 proteindir (3).

DNA'nın paketlenmesi birden fazla aşamada gerçekleşen bir olaydır. Çift iplikli, doğrusal DNA'nın paketlenmesi nükleozom oluşumuyla başlamaktadır. Nükleozom paketlenmenin temel birimi olup, DNA'da yaklaşık 200 nükleotide bir tekrarlayan birimler halinde bulunmaktadır. Nükleozom, kor nükleozom ile bağlaç DNA'dan meydana gelmektedir. Kor nükleozom, 146 baz çiftlik DNA'nın 1,65 dönüş yaparak histon oktameri üzerine sarılmasıyla oluşan bir yapıdır. Histon oktameri ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4'ten oluşmaktadır. H1 ise yaklaşık 80 baz çiftinden oluşan bağlaç DNA ile oktamer arasında bulunmaktadır (Şekil 2.1.A). DNA histon proteinleriyle paketlenerek altı kat kısaltılır ve hücre döngüsünün interfaz evresinde çekirdek içinde 30 nm çaplı kromatin formunda dağılmış halde bulunur. Hücre bölünmesi sırasında kromatin kısalıp kalınlaşarak, iskelet proteinlerinin de devreye girmesiyle kromozomları oluşturmaktadır (1, 3, 4) (Şekil 2.1.B).

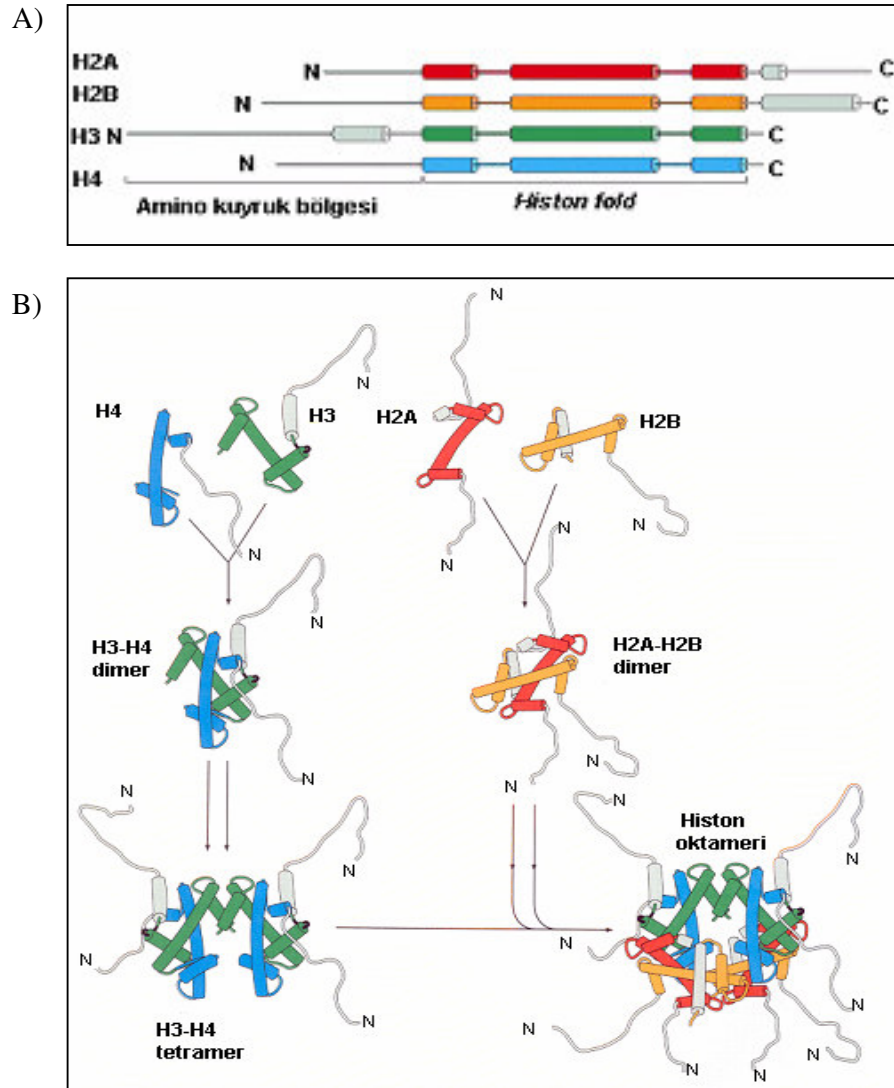


Şekil 2.1. DNA'nın paketlenmesi:

A) Histon oktameri ve nükleozom yapısı—Cooper diğ. (3)'den alınmıştır

B) Paketlenme ile kromozom oluşumu—Klung ve diğ. (9)'den alınmıştır

Histon proteinleri *histone fold* motifi içeren globular yapıda karboksil ve amino kuyruk bölgelerini içermektedir (5, 6). Bu motifte 3 tane α -heliks 2 ilmek (*loop*) ile bağlanmış halde bulunmaktadır (Şekil 2.2.A). Nükleozom oluşumu sırasında öncelikle H3-H4 ve H2A-H2B proteinleri birbirlerine bağlanarak dimerleri oluşturmakta, H3-H4 dimerlerinin tetramer formunu almasından sonra H2A-H2B tetrameri ile birleşerek histon oktamerni oluşturmaktadır (1,5) (Şekil 2.2.B).



Şekil 2.2. Histon proteinleri: A) Histon proteinlerinin yapısı

B) Oktamer oluşumu-Alberts ve diğ. (1)'den alınmıştır

Histone fold bölgesi diğer histonlarla ve DNA ile etkileşime giren kısımdır. DNA ve histon kor kompleksi arasındaki bağlanmada hidrojen bağları rol oynamakta, ayrıca hidrofobik etkileşimler ve tuz köprüleri de histonlar ile DNA'yı birarada tutmaktadır (1). Nükleozomu oluşturan histon proteinlerinin amino kuyruk bölgeleri nükleozomun dışarısında kalarak diğer proteinler için etkileşim yüzeyi oluşturmakta ve çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirerek biyolojik olaylarda görev almaktadır (7).

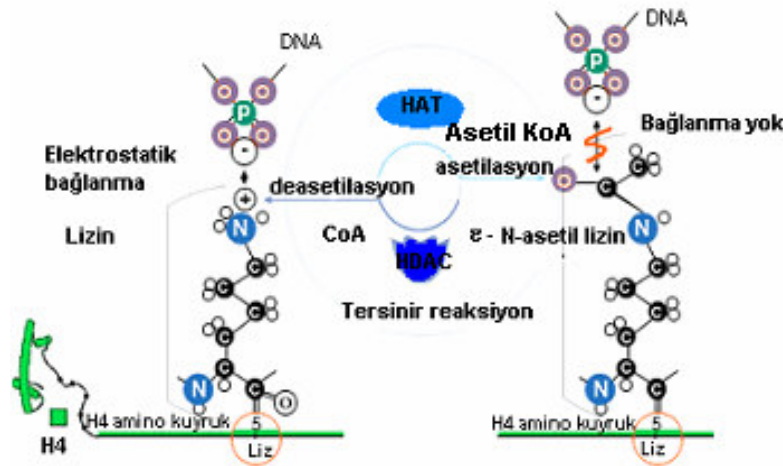
2.2. Histonların Post-Translasyonel Modifikasyonları

İnsan genomunda yaklaşık 20,000-25,000 protein kodlayan gen bulunmaktadır (8). Bir genin ifade edilebilmesi için kromatin yapısının gevşemesi ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanması gerekmektedir. Gen ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi, kromatinin yeniden modellenmesi ve histon modifikasyonları ile sağlanmaktadır (9).

Histonların amino kuyruk bölgelerinde gerçekleşen farklı tipteki modifikasyonların, kromatine değişik görevler yüklemesine *histone code* hipotezi adı verilmektedir. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikutinasyon, ADP-ribozilasyon olmak üzere çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar bulunmaktadır. Bu modifikasyonlar birbirleriyle ilişkili olarak ve diziye özgül bir biçimde gerçekleşmektedir. Örneğin; 3. histonun 10. serin amino asitinden fosforilasyonu 14. lizin asetilasyonunu stimüle etmekte, 14. lizin deasetilasyonu ise 9. lizinin metilasyonuna neden olmaktadır. Modifikasyonların histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirdiği ve protein kompleksleri için tanıma bölgesi oluşturduğu düşünülmektedir. Böylece histon-DNA ve histon-histon ilişkisi etkilenmekte, DNA paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olay kontrol edilebilmektedir. (7,10-12) .

2.3. Histon Asetilasyonu

Histon modifikasyonlarından üzerinde en çok çalışılan histon asetilasyonudur (7). Negatif yüklü asetil grubunun amino kuyruk bölgesine takılmasıyla pozitif yüklü lizin amino asiti yükünü kısmen kaybetmekte, kromatinde gevşeme meydana gelmekte, transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotör bölgelerine ulaşmaları kolaylaşmakta ve bu sayede transkripsiyon gerçekleşmektedir. Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olaydır. Lizin amino asitinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondense olmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır (10,13) (Şekil 2.3). Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması, o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olduğunu gösterirken, deasetile olması transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir. Histon asetilasyonu transkripsiyonel düzenlenmenin yanında epigenetik kalıtım ve DNA replikasyonu gibi biyolojik olaylarda da görev almaktadır (7,14).



Şekil 2.3. Histonların amino kuyruklarında bulunan lizin amino asitinin asetilasyonu (13).

Histon kuyruklarında asetile edilecek olan lizinin yakınındaki amino asit dizisinin, asetilasyon enzimlerinin özgül bağlanması rolü vardır. Asetilasyon her zaman aynı amino asitlerden gerçekleştirilmektedir. Örneğin, histon 3 özellikle 9., 14., 18. ve 23., histon 4 ise 5., 8., 12. ve 16. pozisyonlardaki lizin amino asitlerinden asetillenmektedir (7,15).

Histonların asetilasyonu histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri tarafından düzenlenmektedir. Bu iki aile transkripsiyonun düzenlenmesi, genlerin sessizleştirilmesi, hücre döngüsü, kas ve lenfosit farklılaşması, nöronal fenotipin düzenlenmesi, DNA replikasyonu ve DNA hasarına karşı cevabın oluşturulmasında rol oynamaktadır (16). Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki denge normal hücre büyümesi ve fonksiyonu için gereklidir.

2.4. Histon Asetil Transferazlar

Histon asetil transferazlar; asetil koenzim A'daki asetil grubunun, histonların amino kuyruklarındaki lizinin ϵ -amino grubuna transferini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 2.3). Günümüze kadar HAT aktivitesine sahip, substrat özgüllüğü olan 30 protein gösterilmiştir. Bu proteinler dizi benzerliklerine göre farklı sınıflara ayrılmakta ve multiprotein kompleksleriyle birlikte transkripsiyon koaktivatörü olarak fonksiyon görmektedir. HAT'lar histon proteinlerinin yanı sıra histon olmayan proteinlerin de asetilasyonundan sorumludur (6,14).

HAT enzimlerinde meydana gelen mutasyonların fötal gelişim bozukluklarına, çeşitli hematolojik, epiteliyal, kolorektal ve gastrik kanserlere neden olduğu gösterilmiştir (6,17).

2.5. Histon Deasetilazlar

Histon deasetilazlar, histonların amino kuyruklarındaki lizin amino asitlerinden ve histon olmayan proteinlerden asetil gruplarını çıkartan enzimlerdir (Şekil 2.3). Histonların deasetilasyonu kromatinin kondanase olmasını, böylece gen ifadesinin baskılanmasını sağlarken, histon olmayan proteinlerin deasetilasyonu DNA replikasyonu, hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesinde görevlidir (18,19). Bugüne kadar 18 insan HDAC enzimi tanımlanmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. I., II. ve III. Sınıf histon deasetilaz enzimleri

Sınıf	Enzim	Amino asit sayısı	Kromozomal Lokalizasyon
I	HDAC 1	428	1p34.1
	HDAC 2	488	6q21
	HDAC 3	428	5q31.1-5q31.3
	HDAC 8	377	Xq21.2-Xq21.3/ Xq13
II	HDAC 4	1084	2q37
	HDAC 5	1122	17q21
	HDAC 6	1215	Xp11.23
	HDAC 7	855	12q13.1
	HDAC 9	1011	22q13.31-13.33
	HDAC 10	>700	3p25.1
III	SIRT 1	747	10q22.2
	SIRT 2	373	19q13
	SIRT 3	399	11p15.5
	SIRT 4	314	12q
	SIRT 5	310	6p22.3
	SIRT 6	355	19p13.3
	SIRT 7	400	17q
HDAC 11 I. ve II. sınıf deasetilazların her ikisiyle de homoloji göstermektedir.			

HDAC enzimleri üç sınıf altında incelenmektedirler.

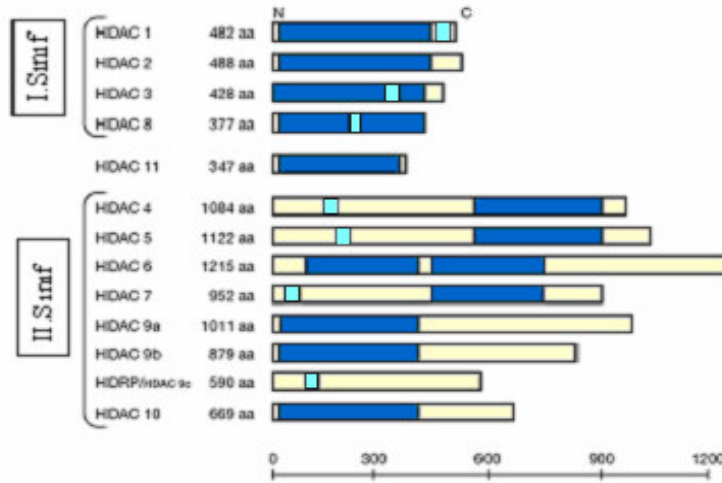
I. Sınıf Deasetilazlar: Maya Rpd3 proteinine homolog olup, HDAC 1, 2, 3 ve 8 enzimlerini kapsamaktadır. Bu enzimlerin moleküler ağırlıkları 22-55 kDa'dur ve katalitik bölgeleri homoloji göstermektedir. Hücrelerde sürekli eksprese olan I. sınıf deasetilazlar, çoğunlukla çekirdekte bulunarak transkripsiyonu düzenlemektedir. Örneğin, HDAC 1'in p53 regülasyonunda görev aldığı, ayrıca MyoD ile kompleks oluşturarak miyoblastların bölünmesini baskıladığı, HDAC 3'ün ise başka bir transkripsiyon faktörü olan TFII-1'nin fonksiyonunu düzenlediği bilinmektedir (17).

II. Sınıf Deasetilazlar: Maya Hda1 proteinine homoloji gösteren ve HDAC 4, 5, 6, 7, 9 ve 10 enzimlerini kapsayan sınıftır. HDAC 6 ve 10 iki adet katalitik bölge içerdikleri için ayrı bir alt sınıf olarak değerlendirilmektedir. Bu grup enzimler, I. sınıf deasetilazlara göre yapısal olarak daha büyük olup moleküler ağırlıkları 120-130 kDa'dur. Dağılımlarının dokuya özgül olması ve çeşitli hücrel sinyallere göre çekirdekle sitoplazma arasında gidip gelmeleri, hücrel gelişim ve farklılaşmada değişik görevleri olduğunu göstermektedir (20,21,22). HDAC 4, 5 ve 9'un kalp, iskelet kası ve beyinde, HDAC 7'nin CD4/CD8 pozitif timositlerde, HDAC 6'nın testislerde, HDAC 10'un ise karaciğer, dalak ve böbreklerde fazla eksprese oldukları gösterilmiştir (21). Ayrıca HDAC 4'ün sadece embriyonik dönemde eksprese olması ve HDAC ekspresyonlarının embriyonik gelişim süresince değişiklik göstermesi, HDAC'ların embriyogenezin değişik evrelerinde görev aldığını düşündürmektedir (20).

I. ve II. sınıf deasetilazlar DNA ve histonlara direkt olarak bağlanamazlar. Çoğunlukla büyük transkripsiyon faktör komplekslerinin bileşeni olarak bulunurlar. Farklı proteinlerle kompleks oluşturmaları, fonksiyonlarının da farklı olduğunu göstermektedir. Örneğin; HDAC 4, 5 ve 7 MEF2'yi inhibe ederek kas hücre farklılaşmasını baskılamakta (20), HDAC 6 yanlış katlanmış proteinlere karşı stress cevabının oluşturulmasında rol oynamakta, HDAC 7 ise timuste T hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde görev almaktadır (17, 18, 20).

III. Sınıf Deasetilazlar: NAD bağımlı-Sirtuin enzim ailesini kapsamakta ve maya Sir2 proteini ile homoloji göstermektedir. Sirtuinler I. ve II. sınıf deasetilazlarla homoloji göstermeyen 275 amino asitlik korunmuş bir katalitik bölge içermektedir. Sir 2 ailesiyle yapılan araştırmalar, bu sınıfın üyelerinin primer substratlarının histonlar olmadığını göstermiştir (16).

I. ve II. sınıf deasetilazların yaklaşık 390 amino asitlik korunmuş bir katalitik bölgeleri bulunmaktadır. Bu bölge içinde ve çevresinde bulunan yapısal bazı farklılıklar, substrat seçimi gibi fonksiyon değişikliklerine neden olmakta, bu sayede özgül HDAC inhibitörleri geliştirilebilmektedir (23) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Histon deasetilazların şematik gösterimi-Ruijter ve diğ.(19)'den alınmıştır.

(Katalitik bölgeler koyu renk ile gösterilmiştir)

2.6. Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Potansiyel ilaç hedefi olmaları nedeniyle, tıbbi açıdan önemli olan HDAC'ları inhibe edebilen birçok molekül geliştirilmiştir. HDAC inhibitörleri (HDACi) yapısal özelliklerine göre hidroksamatlar, siklik tetrapeptidler, benzamidler, elektrofilik ketonlar ve kısa zincirli yağ asitleri olmak üzere beş sınıfa ayrılmakta (Bkz. Ek1), I.

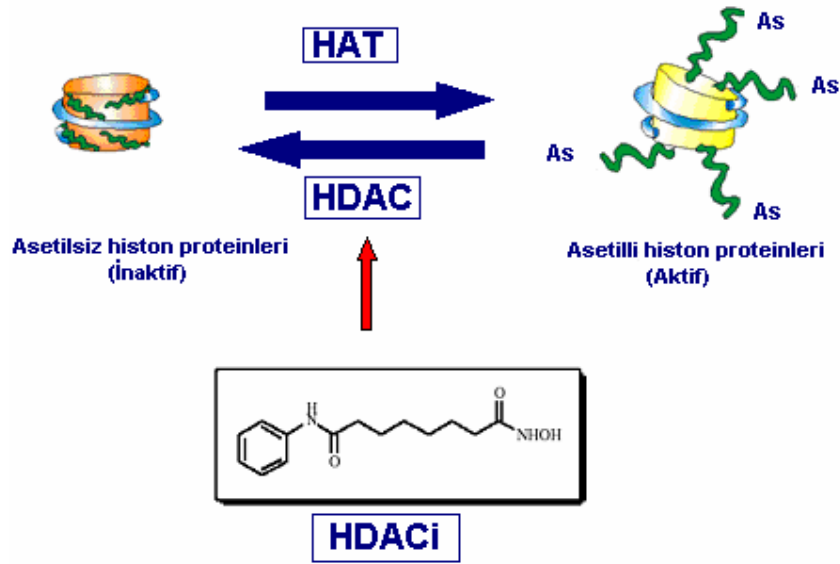
ve II. sınıf deasetilazları inhibe etmektedir. HDAC inhibitörleri nanomolardan milimolar konsantrasyona kadar değişik etkinlik düzeylerine sahiptir. (24,25,26)

Hidroksamatlar en kuvvetli inhibitör grubunu, siklik tetrapeptidler ise yapısal olarak en kompleks inhibitör grubunu oluşturmaktadır. Her iki grubun üyeleri de nM konsantrasyonda etkili, kuvvetli inhibitörlerdir. Benzamid ve elektrofilik keton grubuna giren inhibitörler, hidroksamat ve siklik tetrapeptidlerden daha az etkili olup μ M konsantrasyonda etki göstermektedir.

Kısa zincirli yağ asitleri mM konsantrasyonda etki gösteren en zayıf inhibitör grubunu oluşturmaktadır. Bu grupta bütirat (BA), sodyum bütirat (NaBA), fenil bütirik asit (FBA), fenil asetik asit (FAA) ve valproik asit (VPA) bulunmaktadır. Bütirat ilk tanımlanan HDAC inhibitörü olup, sadece HDAC'lara değil, DNA/protein metilasyonu ve fosforilasyonu üzerine de etkilidir. Kısa zincirli yağ asitlerinin toksisiteleri az olmakla birlikte yarı ömürleri kısadır. Kanser araştırmaları için, plazmadaki yarı ömürlerinin kısa olması ve yüksek konsantrasyonda etki göstermeleri nedeniyle diğer inhibitör grupları kadar uygun bileşikler değildir (17,24-26). *Splicing* mutasyonlarının neden olduğu kalıtsal hastalıkların tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda bu grup inhibitörler tercih edilerek (27, 28), inhibisyon etkilerinin ve yarı ömürlerinin artırılması için çeşitli modifikasyonlar geliştirilmeye çalışılmaktadır.

2.7. Histon Deasetilaz İnhibitörlerinin Etki Mekanizmaları

HDAC inhibitörleri, histon asetilasyonunu sağlayarak bazı genlerin ifadesini değiştirebileceği gibi, transkripsiyon faktörleri ve tümör baskılayıcı proteinler gibi histon olmayan bazı proteinlerin asetilasyonunu arttırarak da biyolojik aktiviteleri etkilemektedir (24,29). HDAC inhibitörleri uygulanarak histonların deasetilasyonu engellenmekte, histonlar asetilli halde kalmakta ve transkripsiyonun sürekliliği sağlanmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HAT, HDAC ve HDAC inhibitörleri arasındaki ilişki

HDAC inhibitörü uygulanan hücrelerde genlerin %2-5'inin ekspresyon düzeyi değişmektedir (24). Bu değişikliğin nedenleri kesin olarak açıklanamamakla birlikte histon veya transkripsiyon faktörü gibi histon olmayan proteinlerdeki asetilasyon artışından ve/veya asetilasyonun indirekt etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

HDAC inhibitörleri, transkripsiyonel etkilerinin yanı sıra, kanser hücrelerinde hücre döngüsünün inaktif olan G2 kontrol noktasını aktif hale getirerek hücre bölünmesini durdurmakta ve apoptozu uyarmaktadır (30,31). Kanser hücrelerinin HDAC inhibitörleri tarafından indüklenen apoptoza karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (29,32). Ayrıca, HDAC inhibitörlerinin, kanser hücre büyümesinin inhibisyonunda görev alan genlerin asetilasyonunu arttırdığı ve bu sayede hücre büyümesini durdurucu etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Splicing mekanizması bozukluğu nedeniyle oluşan kalıtsal hastalıklarda HDAC inhibitörleri kullanılarak tedaviye yönelik araştırmalar yapılmaktadır (27, 28). Histon deasetilaz inhibitörleri grubundan olan kısa zincirli yağ asitleri ile yapılan çalışmalar ümit vaat etmektedir. mRNA'nın olgunlaşması için gerekli bir

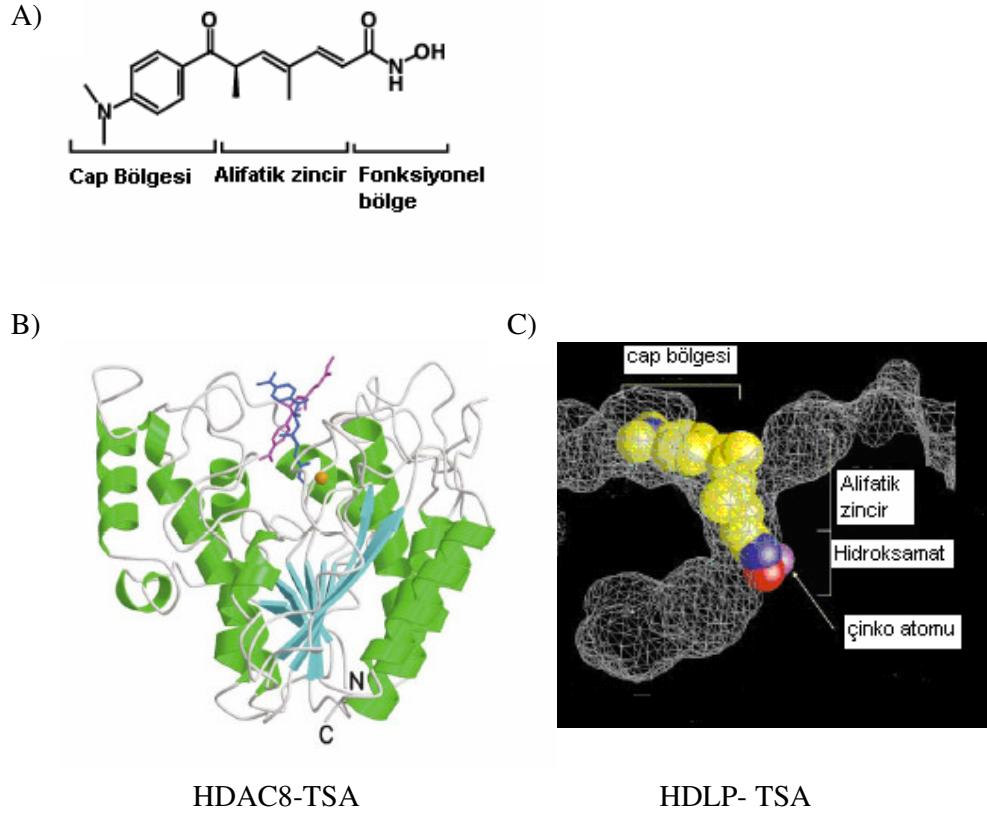
mekanizma olan *splicing*; intron dizilerinin çıkartılması ve protein kodlayan diziler olan ekzonların biraraya getirilmesi işlemidir (33). Çıkması gerekli olan intronun çıkartılamaması (*intron retention*), introna komşu ekzonun çıkartılması ile gerçekleşen ekzon atlanması (*exon skipping*) veya *spliceosome* kompleksinin doğru bir şekilde kurulamaması gibi nedenlerle *splicing* hatası meydana gelmektedir. *Splicing*'in doğruluğunu kontrol eden baz dizilerine *Exonic Splicing Enhancer* (ESE) ve *Exonic Splicing Silencer* (ESS) adı verilmektedir (34). ESE dizilerine SR protein ailesi bağlanmaktadır. ESS dizileri ise, içinde bulundukları ekzonun atlanmasını sağlayarak *splicing*'i kontrol etmektedir (35)

HDAC inhibitörlerinin etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, SR proteinlerinin miktarını arttırdığı ve ekzon *skipping*'i engelleyerek *splicing*'in doğru gerçekleşmesini sağladığı kabul edilmektedir (36). Diğer bir hipotez ise, HDAC inhibitörlerinin transkripsiyon faktörlerini aktive ettiği, fonksiyonel olmayan gen promotörüne bağlanmasını sağladığı ve tam uzunlukta RNA oluşumunu indüklediği üzerine kurulmuştur (37,38).

2.8. Histon Deasetilaz ve İnhibitör Etkileşimi

HDAC ve inhibitörler arasındaki yapısal ilişki, bir memeli HDAC homologu olan ve *Aquifex aeolicus* bakterisinden elde edilen HDLP (*Histone deacetylase-like protein*)'nin kristal yapısının, TSA ve suberoylanilid hidroksamik asit (SAHA) inhibitörleri kullanılarak açığa çıkartılmasıyla elde edilmiş ve HDLP'nin, TSA ve SAHA ile direkt olarak etkileştiği gösterilmiştir (39) (Şekil 2.6.C).

HDLP ile yapılan çalışmanın ardından insan HDAC 8'i hidroksamat grubu inhibitörleri ile çalışılmış, böylece kristal yapısı ortaya çıkartılarak katalitik bölgenin üç boyutlu yapısı gösterilmiştir (Şekil 2.6.B). Her iki çalışmada da katalitik bölgede bulunan çinko atomu ile inhibitörün direkt etkileşiminin olduğu ve inhibisyonun gerçekleşmesi için çinko atomunun gerekliliği gösterilmiştir (39,40,41)



Şekil 2. 6. HDAC ve inhibitör etkileşimi

- A) HDAC inhibitörlerinin temel yapısı-Grozinger ve diğ.(23)'den alınmıştır.
- B) HDAC 8-TSA etkileşiminin üç boyutlu görüntüsü (*Ribbon diagramı*)-Finnin ve diğ.(39)'den alınmıştır.
- C) HDLP-TSA etkileşiminin üç boyutlu görüntüsü (*Space-filling model*)-Somoza ve diğ.(40)'den alınmıştır.

Kristal yapısı ilk aydınlatılan enzim olan HDLP, 16 tane α heliks ve 8 tane paralel dizilmiş β tabakadan oluşan bir proteindir. α heliks ve β tabakaların katlanmaları sonucunda bir ucu kapalı, dar ve tüp şeklinde bir yapı oluşmaktadır. Tüpün uç kısmı en dar bölgesidir ve çinko atomunun bulunduğu kısımdır.

HDAC inhibitörleri yapısal olarak üç bölge içermektedir (Şekil 2.6.A). Fonksiyonel bölge metal bağlayıcı kısım olup enzimin aktif bölgesine yani tüpün uç kısmına bağlanmakta, alifatik zincir enzim yapısındaki tüp boyunca uzanmakta, *cap* bölgesi ise yüzey tanımadan sorumlu olup tüpün giriş kısmı ile etkileşmektedir. HDLP ile TSA'nın etkileşimi incelenerek, TSA alifatik zincirinin tüp yapısı içerisine doğru uzandığı, hidroksamat grubunun ise aktif bölgedeki çinko ile etkileştiği gösterilmiştir. (23, 39, 42).

Kristal yapı düzeyinde açıklanabilen HDAC ve inhibitör etkileşimlerinden yararlanılarak diğer HDAC enzimlerinin yapılarını aydınlatmaya yönelik olarak araştırmalar devam etmektedir (46).

2.9. Histon Deasetilaz İnhibitörleri ile İlgili Klinik Çalışmalar

Çeşitli kalıtsal hastalıklar, kanser, paraziter enfeksiyonlar ve diyabette HDAC inhibitörü kullanılmasına yönelik araştırmalar yürütülmektedir.

Çocukluk çağı en sık görülen kalıtsal hastalıklarından olan Spinal Musküler Atrofi'den sorumlu olan *Survival Motor Neuron* (SMN) geni üzerinde yapılan çalışmalarda NaBA, FBA ve VPA'in *splicing* hatasını düzelttiği ve fonksiyonel protein düzeyini arttırdığı bildirilmiştir (27, 28, 44).

Kalıtsal bir poliglutamin tekrar hastalığı olan Huntington Hastalığı'nın moleküler patogeneze nedeninin transkripsiyon regülasyon bozukluğu olabileceği düşünülerek yapılan fare çalışmalarında SAHA'nın kan beyin bariyerini geçerek beyinde histon asetilasyonunu arttırdığı ve fare beyinde görülen motor bozukluklarını düzelttiği gösterilmiştir (45).

Diyabet araştırmalarında, hidroksamat grubu inhibitörlerinden olan skriptid'in kas hücrelerine özgül olarak glukoz alımını arttırdığı, ayrıca, TSA ve NaBA uygulanmasını takiben, H4 asetilasyonunu ve insulin geni transkripsiyonunu arttığı gösterilmiştir (46, 47).

Siklik tetrapeptid inhibitör grubunun bir üyesi olan apicidin'in *cryptosporidiosis*, *toxoplasmosis*, *sarcocystis* ve *coccidiosis* hastalıklarına neden olan apikompleksan ailesine ait protoza türlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle ilaç dirençliliği gösteren durumlarda yeni ilaçların araştırılması/geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir (48).

HDAC inhibitörleri ile yapılan in vivo çalışmalar tümör büyümesini ve metastazı önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Örneğin, kısa zincirli yağ asitlerinden BA'lar kolon, prostat, endometriyal ve servikal karsinomlarda, VPA meme karsinomlarında, hidroksamat grubu üyesi olan SAHA prostat, sinnamik asit bihidroksamik asit (CBHA) ise nöroblastoma tipi kanserlerde çalışılmıştır (25). NaBA ve FBA, kanserli hastalarda hücre siklusunu etkileyerek bölünmeyi durdurmuş, farklılaşma ve apoptozu uyarmıştır. Kanser araştırmalarında kullanılan, hidroksamat grubu üyesi olan LAQ824'ün in vitro ve in vivo çalışmalarda anti-tümör etkisinin bulunduğu, p21 geninin promotörünü aktive ederek tümör hücre büyümesini inhibe ettiği, hücre döngüsünün G2/M evresinde bölünmeyi durdurduğu ve kaspazları aktive ederek apoptozu indüklediği bildirilmiştir (49). Ayrıca, HDAC inhibitörlerinin tüm organ sistemlerini etkilemediği, toksik etkilerinin sadece tümör hücreleri üzerine olduğu da gösterilmiştir (26).

HDAC inhibitörleriyle ilgili olarak yapılan araştırmalardan bazılarında klinik uygulama aşamasına geçilmiş ve bu hastalıklarda faz I/II uygulamaları başlatılmıştır. Örneğin, miyelodisplastik sendrom, periferik T-lenfoma, Non-Hodgkin lenfoma, tekrarlayan Hodgkin lenfoma, multiple miyelom, HIV enfeksiyonları ve tekrarlayan meme kanserlerinde faz II çalışmaları yürütülmektedir (50). HDAC inhibitörlerinin yan etkileri ve uygulanacak doz miktarları inhibitörlere göre farklılık göstermekte, bu inhibitörler tek başlarına ya da çeşitli sitotoksik ajanlarla birlikte uygulanmaktadır. Örneğin; HDAC inhibitörleri kemoterapötik ilaçlarla sinerjetik ya da kümülatif etki göstermekte, kromatini gevşeterek kanserli hücrede DNA hasarını arttırmaktadır (17).

HDAC inhibitörleri ile yapılan ilaç araştırma-geliştirme çalışmalarının tüm dünyada hız kazanması, aday bileşiklerin aktivitelerinin kolay ve hızlı bir şekilde analizini zorunlu kılmıştır. İnhibisyon etkilerinin gen düzeyinde kantitatif ekspresyon çalışmalarıyla gösterilmesinin zaman alıcı ve masraflı olması nedeniyle, birçok bileşiğin aynı zamanda taranmasına olanak sağlayan ve hücre dışı sistemde uygulanabilen aktivite tarama kitlerinin kullanımı tercih edilmektedir. Böylece aktif moleküller inaktif olanlardan, hassas, orta/yüksek ölçekli çalışmalara uygun ve maliyeti çok olmayan sistemler kullanılarak ayrılabilir. Hücre dışı sistemler, zaman ve maliyet kazancı sağlaması açısından orta/yüksek ölçekli çalışmalar için daha çok tercih edilmesine rağmen, hücre dışı sistemde inhibisyon aktivitesi gösteren bir bileşik, hücrede her zaman aynı aktiviteyi göstermemekte, bu nedenle etkili bulunan bileşiklerin hücre kültüründe de bu etkilerinin gösterilmesi gerekmektedir. Hücre-dışı sistemler, izotopik ve non-izotopik olmak üzere iki ana alt başlıkta toplanmaktadır. İzotopik sistemlerde taramalar radyoaktivite ile yapılmakta olup radyoaktif ölçümler için gerekli işlemlerin uzun sürmesi, ayrıca laboratuvarında çalışan personelin radyoaktiviteye maruz kalması ve atıkların uzaklaştırılmasındaki zorluklar nedeniyle orta/yüksek ölçekli çalışmalar için uygun sistemler olarak görülmemektedir. Non-izotopik sistemlerde ise taramalar floresans ışıma takibiyle yapılmakta olup, spektrofotometrik ölçümlere bağlı kalınması, sadece son-nokta (*end-point*) ölçümlerinin yapılabilmesi ve kullanılan substratların vizkoziteleri nedeniyle pipetaj hatalarının meydana gelmesi gibi dezavantajları vardır (51).

Bu tez kapsamında, bilinen inhibitörlerin etkileri non-izotopik yöntemle araştırılarak yeni sentezlenecek veya modifiye edilecek olan ilaç aday bileşiklerin etkilerinin değerlendirilebilmesi için alt yapı bilgisi oluşturulması ayrıca inhibitör aday olarak düşünülen trans-2-fenil vinil boronik asit (BİL 1), 3-morfolin-propen-sülfonik asit (BİL 2), gallik asit (BİL 3) ve 4-kinolin karboksilik asit (BİL 4) bileşiklerinin HDAC inhibisyon aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.A.Çalışmada Kullanılan HDAC İnhibitörleri ve Uygulanan Konsantrasyonlar

Önceden Tanımlanmış olan İnhibitörler

Trikostatin A (TSA)	: 11,75 μ M, 23,5 μ M, 47 μ M,
C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₃ (Biomol)	500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M
4-fenil bütirik asit (FBA)	: 23,5 μ M, 47 μ M, 500 μ M
C ₁₀ H ₁₂ O ₂ (Fluka)	1000 μ M, 2000 μ M, 5000 μ M
4-fenil bütirik asit sodyum tuzu (NaFBA)	: 23,5 μ M, 47 μ M, 500 μ M
C ₁₀ H ₁₁ O ₂ ·Na (Biomol)	1000 μ M, 2000 μ M, 5000 μ M
Sodyum bütirat (NaBA)	: 23,5 μ M, 47 μ M, 500 μ M
C ₄ H ₇ NaO ₂ (Merck)	1000 μ M, 2000 μ M, 5000 μ M

İnhibitör Adayı Bileşikler

Trans-2-fenil vinil boronik asit (BİL 1)	: 11,75 µM, 23,5 µM, 47 µM, 500 µM
$C_6H_5CH=CHB(OH)_2$ (Aldrich)	1000 µM, 2000 µM, 5000 µM
3-morfolin-propen-sülfonik asit (BİL 2)	: 11,75 µM, 23,5 µM, 47 µM, 500 µM
$C_7H_{15}NO_4S$ (Merck)	1000 µM, 2000 µM, 5000 µM
Gallik asit (BİL 3)	: 11,75 µM, 23,5 µM, 47 µM, 500 µM
$(HO)_3C_6H_2CO_2H$ (Aldrich)	1000 µM, 2000 µM, 5000 µM
4-kinolin karboksilik asit (BİL 4)	: 11,75 µM, 23,5 µM, 47 µM, 500 µM
$C_{10}H_7NO_2$ (Aldrich)	1000 µM, 2000 µM, 5000 µM

3.1.B HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kiti (Biovision)

- HDAC Substratı (Boc-Lys(Ac)-AMC, 4 mM),
- 10X HDAC Deney Tamponu,
- Lizin *Developer*,
- HDAC İnhibitörü (Trikostatin A, 1mM),
- HeLa Çekirdek Özütü (5 mg/ml),
- Deasetile Edilmiş Standart (Boc-Lys-AMC, 4 mM)

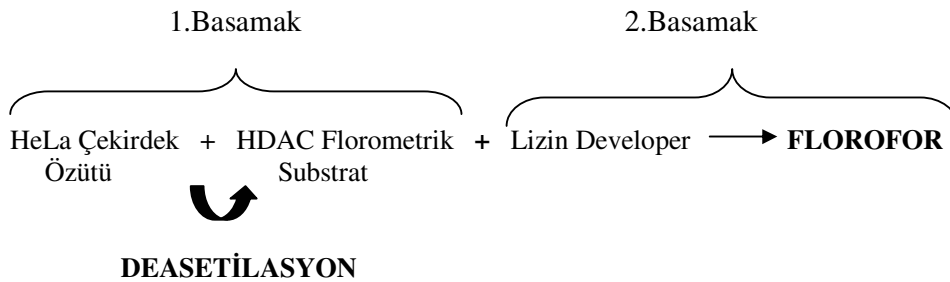
3.2 Yöntem

3.2.A. HDAC İnhibitör Dilüsyonlarının Hazırlanması

HDAC inhibitörleri ve aday bileşikler için farklı konsantrasyonlarda ana ve ara stoklar hazırlandı. TSA ve BİL 1, 2, 3, 4 DMSO (Applchem, Ambresco), FBA %70 etanol (Riedel-de Haen), NaFBA ve NaBA ise distile su kullanılarak sulandırıldı.

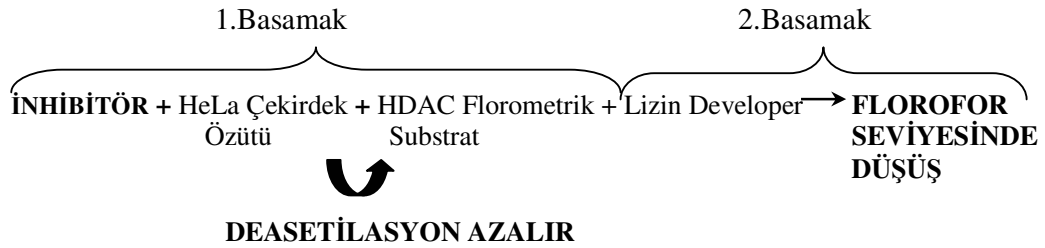
3.2.B. HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kitinin Çalışma Prensibi

HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kiti kullanarak gerçekleştirilen deneyler mikropılaka üzerinde uygulanan iki ana basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta, inhibisyon etkisi araştırılan bileşikler HeLa çekirdek özütü ve HDAC florometrik substrat ile karıştırılmaktadır. HeLa çekirdek özütünde tüm HDAC enzimleri bulunmakta, florometrik substrat ise asetilli lizin yan zinciri taşımaktadır. İkinci basamakta ise ortama lizin *developer* eklenerek birinci basamaktaki reaksiyon durdurulmaktadır. Çekirdek özütünde bulunan HDAC'lar florometrik substratta bulunan lizinlerden asetil grubunu çıkartmakta yani deasetilasyon gerçekleşmekte ve floresans ışımaya meydana gelmektedir. Bu şekilde elde edilen floresans sinyal en yüksek seviyededir ve tüm deneylerde pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. HDAC inhibitör ilaç tarama kiti çalışma prensibi

Ortamda HDAC inhibitör etkisi gösteren bileşik bulunduğu durumda ise, inhibitörün etki gücüne göre, HDAC'ların bir kısmı ya da hepsi inhibe olmaktadır. Bu nedenle deasetilasyon miktarı, dolayısıyla alınan floresans sinyal miktarı azalmaktadır (Şekil 3.2). Alınan floresans sinyal miktarı ile inhibitörün kuvveti arasında ters orantı bulunmaktadır. İnhibitör uygulandığı durumda alınan sinyal değerinin, pozitif kontrol kuyucuklarından alınan maksimum sinyal değerinden uzaklaşması inhibitörün kuvvetli olduğunu göstermektedir. Alınan sinyal miktarı azaldıkça inhibitörün kuvvetli olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 3.2. İnhibitör etki gösteren bileşiğin mekanizmaya etkisi

“HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kiti” kullanılarak yapılan tüm deneylerde 96 kuyucuklu mikropalakalar (Becton&Dickinson, Falcon Bottom-well microplate) kullanıldı ve tüm çalışmalar duplike olacak şekilde gerçekleştirildi. Sonuçlar floresans mikropalaka okuyucusu Molecular Devices SPECTRAmax kullanılarak elde edildi (Bkz.EK 2).

3.2.C. Standart Eğrinin Oluşturulması

HeLa çekirdek özütüne inhibitör etkisi araştırılan bileşiklerin uygulanması ile ortaya çıkan deasetile lizin miktarını saptayabilmek için kitte bulunan deasetile standart, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonlarda sulandırıldı.

1. Mikroplaka kuyucuklarına her bir dilüsyondan 90 μ l konularak üzerlerine 10 μ l 10X deney tamponu eklendi.
2. Her kuyucuğa 10 μ l lizin *developer* eklendi ve mikroplaka 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
3. Örnekler floresans okuyucuda, Ex: 350 nm Em: 440 nm dalga boylarında okunarak sonuçlar değerlendirildi.

3.2.D. İnhibitörlerin Aktivite Tayini

1. İnhibitör etkisi araştırılan her bir bileşik, toplam hacim 85 μ l olacak şekilde distile suyla dilüe edildi. Pozitif kontrol için kuyucuklara 85 μ l distile su, negatif kontrol için ise 83 μ l distile suya 2 μ l TSA eklenerek pipetaj yapıldı.
2. Her kuyucuğa 10 μ l 10X deney tamponu ve 2 μ l HeLa çekirdek özütü eklendi ve pipetaj yapıldı.
3. Her kuyucuğa 5 μ l HDAC florometrik substrat eklendi, pipetaj yapıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
4. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 10 μ l lizin *developer* eklendi, pipetaj yapıldı ve tekrar 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. Sonuçlar floresans okuyucu kullanılarak değerlendirildi.

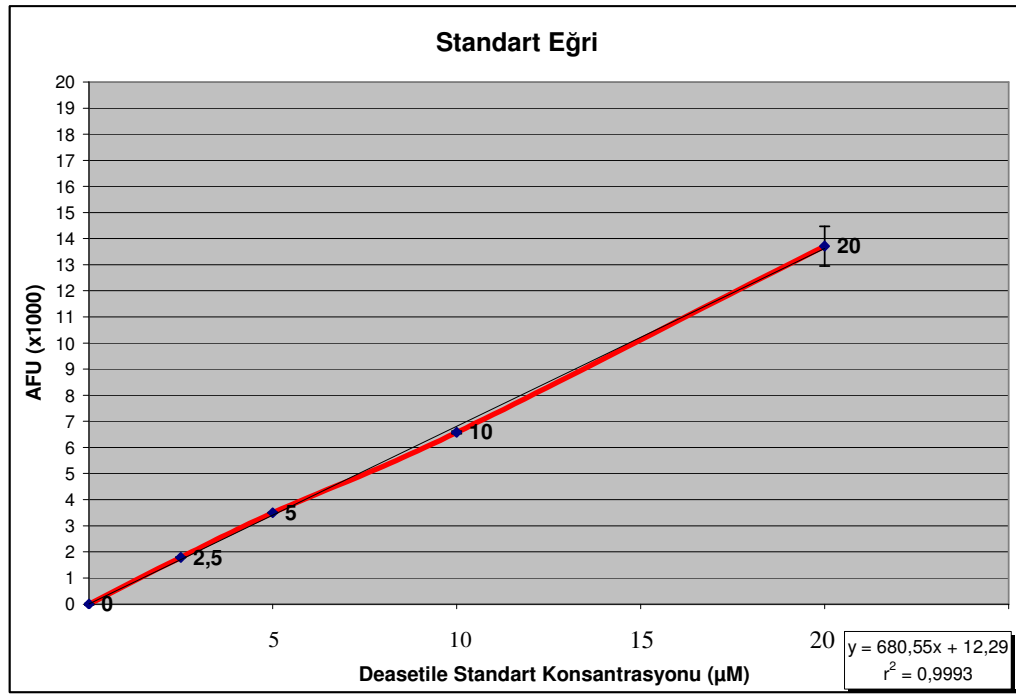
3.2.E. İstatistiksel Analiz

Floresans ölçüm-doz arasındaki ilişki, korelasyon analiz yöntemiyle istatistiksel olarak incelenmiş (MedCalc 8.1.0.0), yanılma olasılığı 0,05 ($p<0,05$) olarak alınmış ve bu değerin altındaki sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir (Bkz.EK 2).

4. BULGULAR

4.1. Standart Eğrinin Oluşturulması

İnhibiston etkisi araştırılan bileşiklerin uygulanmasıyla ortaya çıkacak deasetile lizin miktarını saptayabilmek için kit deasetile standardı 2,5 μM , 5 μM , 10 μM ve 20 μM konsantrasyonlarda kullanılarak “standart eğri” çizilmiştir (Şekil 4.1). Deasetile lizin miktarındaki düşüş inhibisyonun kuvvetli olduğunu göstermektedir. TSA, FBA, NaFBA ve NaBA uygulaması sonucu oluşan deasetile lizin miktarları, eğrinin formülü kullanılarak hesaplanmış ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir (Tablo 4.1)

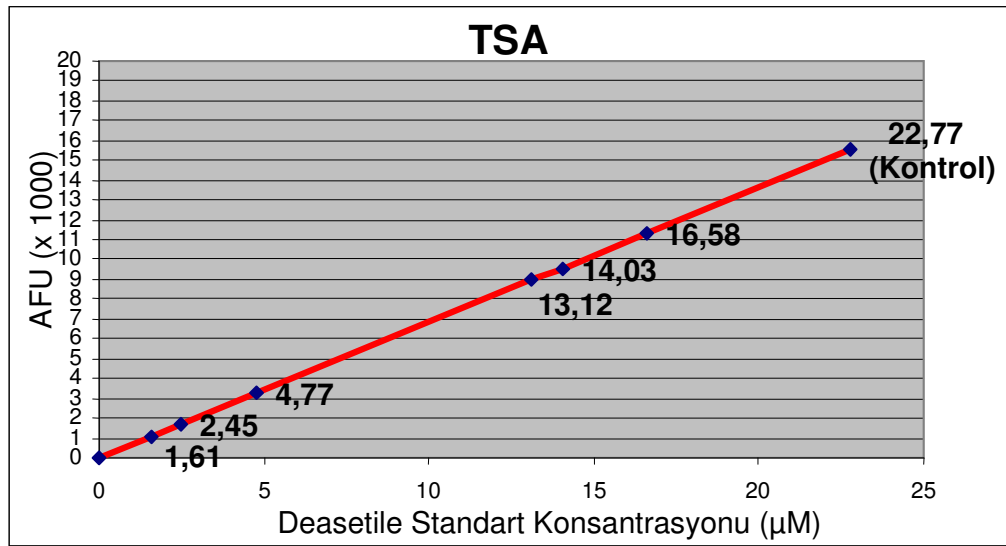


Şekil 4.1. Deasetile lizin miktarlarını gösteren standart eğri

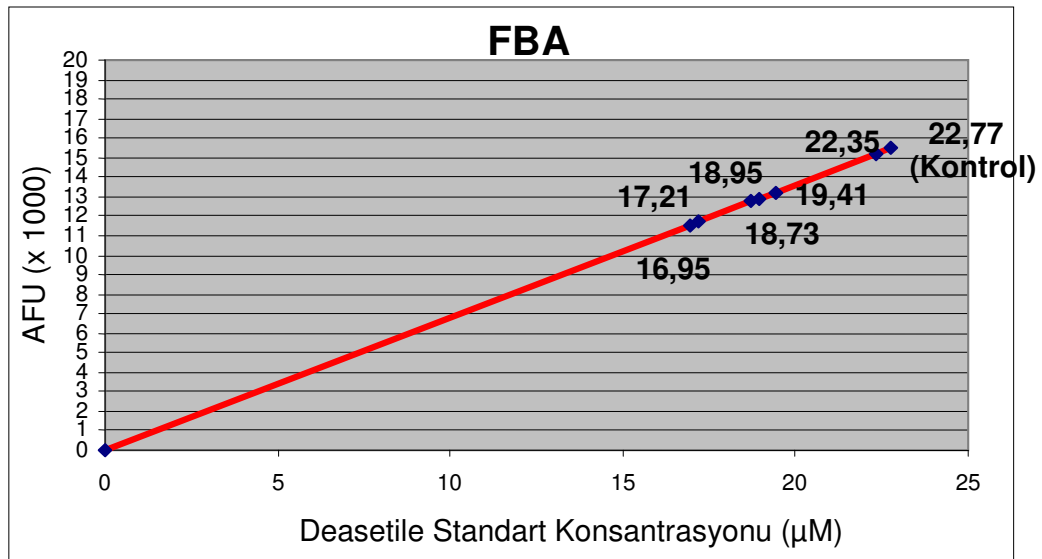
Tablo 4.1. Standart eğri kullanılarak hesaplanan deasetile lizin miktarları

Bileşik	Uygulanan Konsantrasyon (μM)	Deasetile Lizin Miktarı (μM)
Kontrol	-	22,77
TSA	11,75	16,58
	23,5	14,03
	47	13,12
	500	4,77
	1000	2,45
	2000	1,61
FBA	23,5	22,35
	47	19,41
	500	18,95
	1000	18,73
	2000	17,21
	5000	16,95
NaFBA	23,5	23,13
	47	20,05
	500	19,27
	1000	19,39
	2000	18,37
	5000	17,11
NaBA	23,5	22,13
	47	18,96
	500	17,48
	1000	17,12
	2000	16,25
	5000	16,01

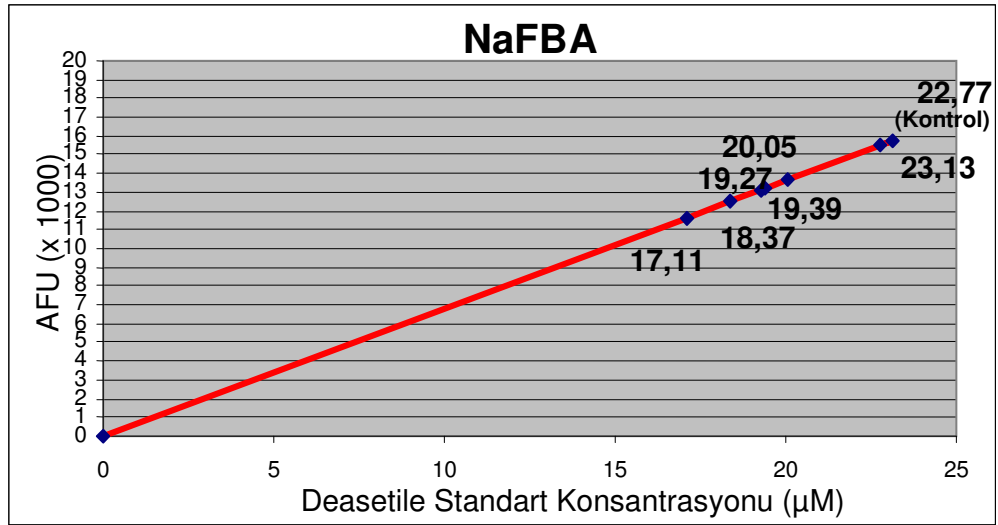
A)



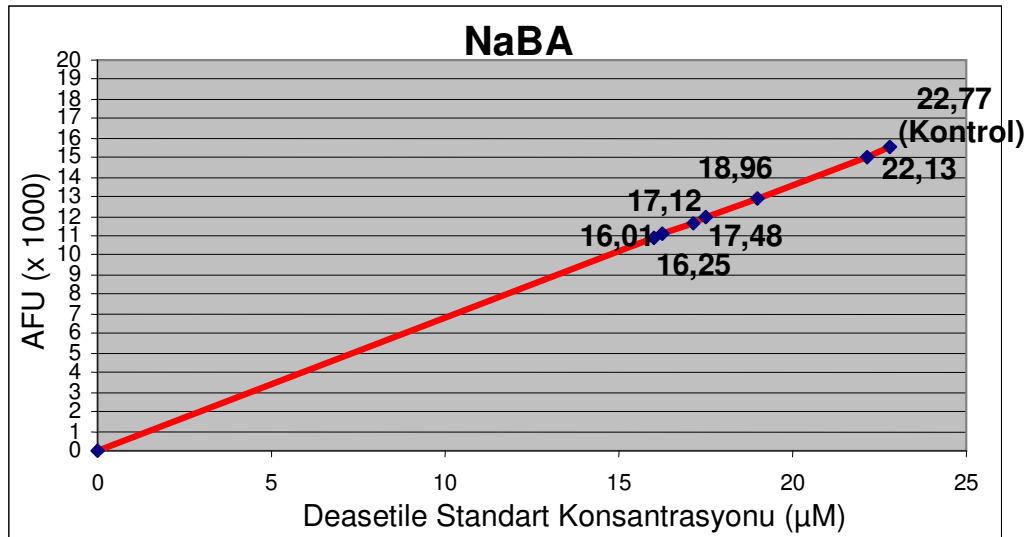
B)



C)



D)



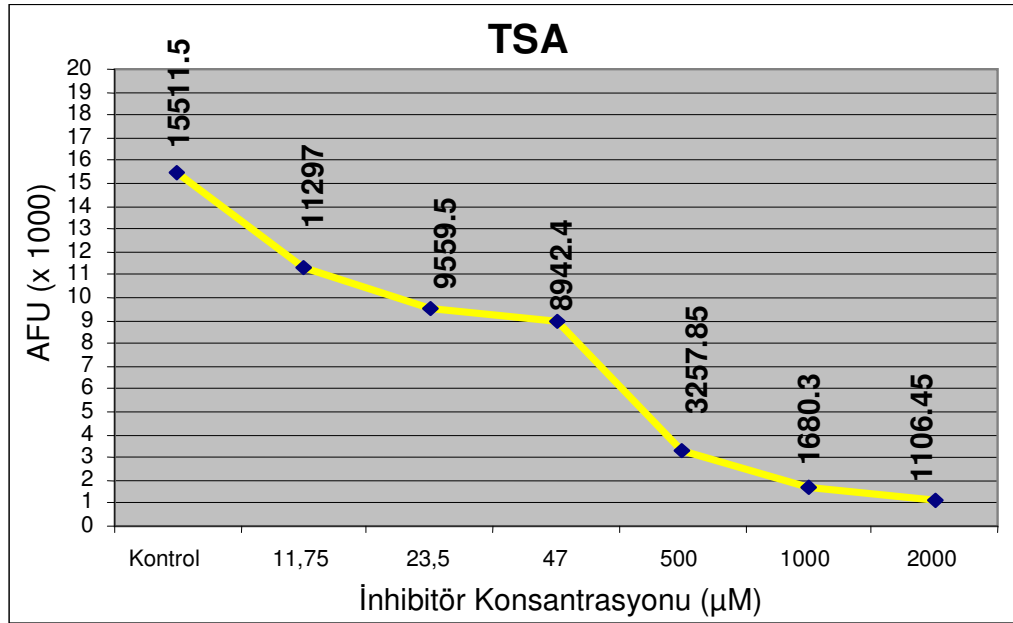
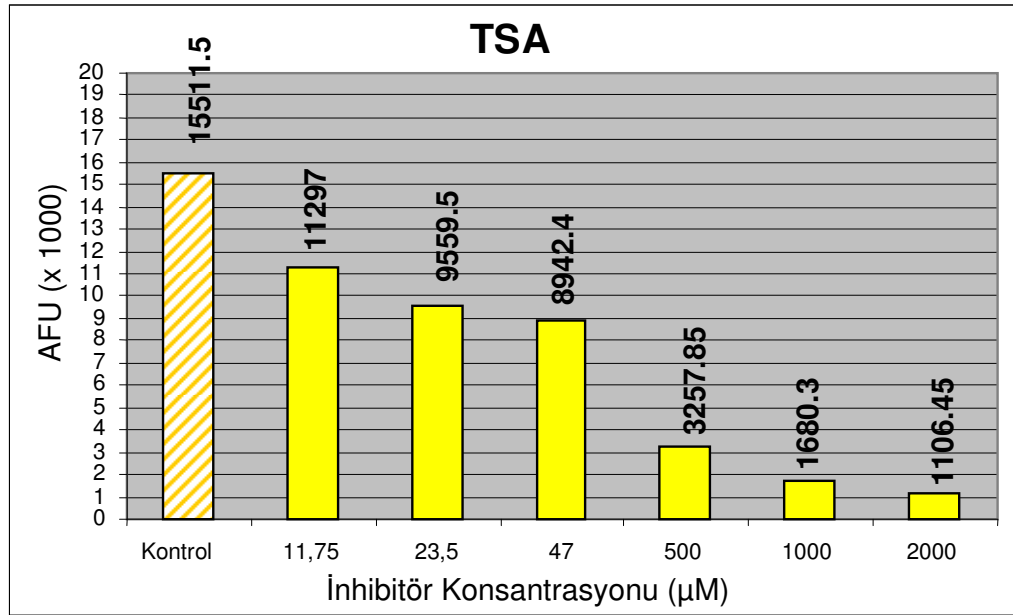
Şekil 4.2. İnhibitör etkisi olan bileşiklerin uygulaması ile elde edilen deasetile lizin miktarları A) TSA B) FBA C) NaFBA D) NaBA

4.2. Aktivite Tayin Deneyleri

İnhibitör etkisi olduğu bilinen TSA, FBA, NaFBA, NaBA ve inhibisyon etkisi araştırılacak olan 2-fenil vinil boronik asit (BİL 1), 3-morfolin-propen-sülfonik asit (BİL 2), gallik asit (BİL 3), 4-kinolin karboksilik asit (BİL 4) ile yürütülen tüm aktivite tayini deneyleri iki kez tekrarlanmış ve floresans okuma sonuçlarının ortalaması kullanılarak değerlendirilmiştir.

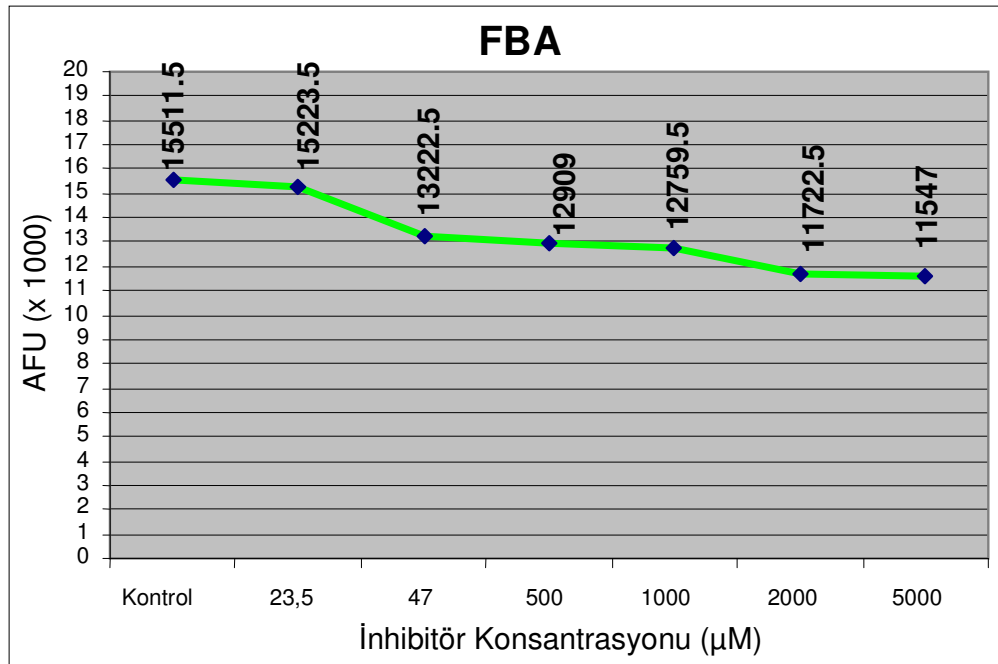
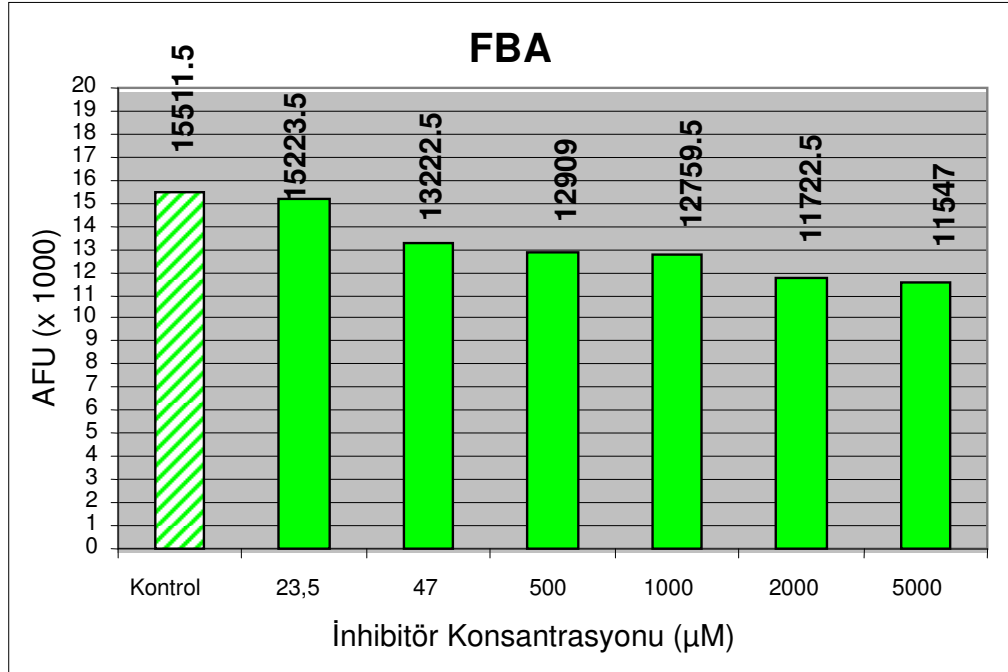
4.2.A. Önceden Tanımlanmış olan İnhibitörlerin Aktivite Tayini Çalışmaları

TSA, FBA, NaFBA ve NaBA'nın inhibisyon aktivitelerine ait çubuk ve çizgi grafikler sırasıyla Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'te, birbirleriyle olan karşılaştırmaları ise Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



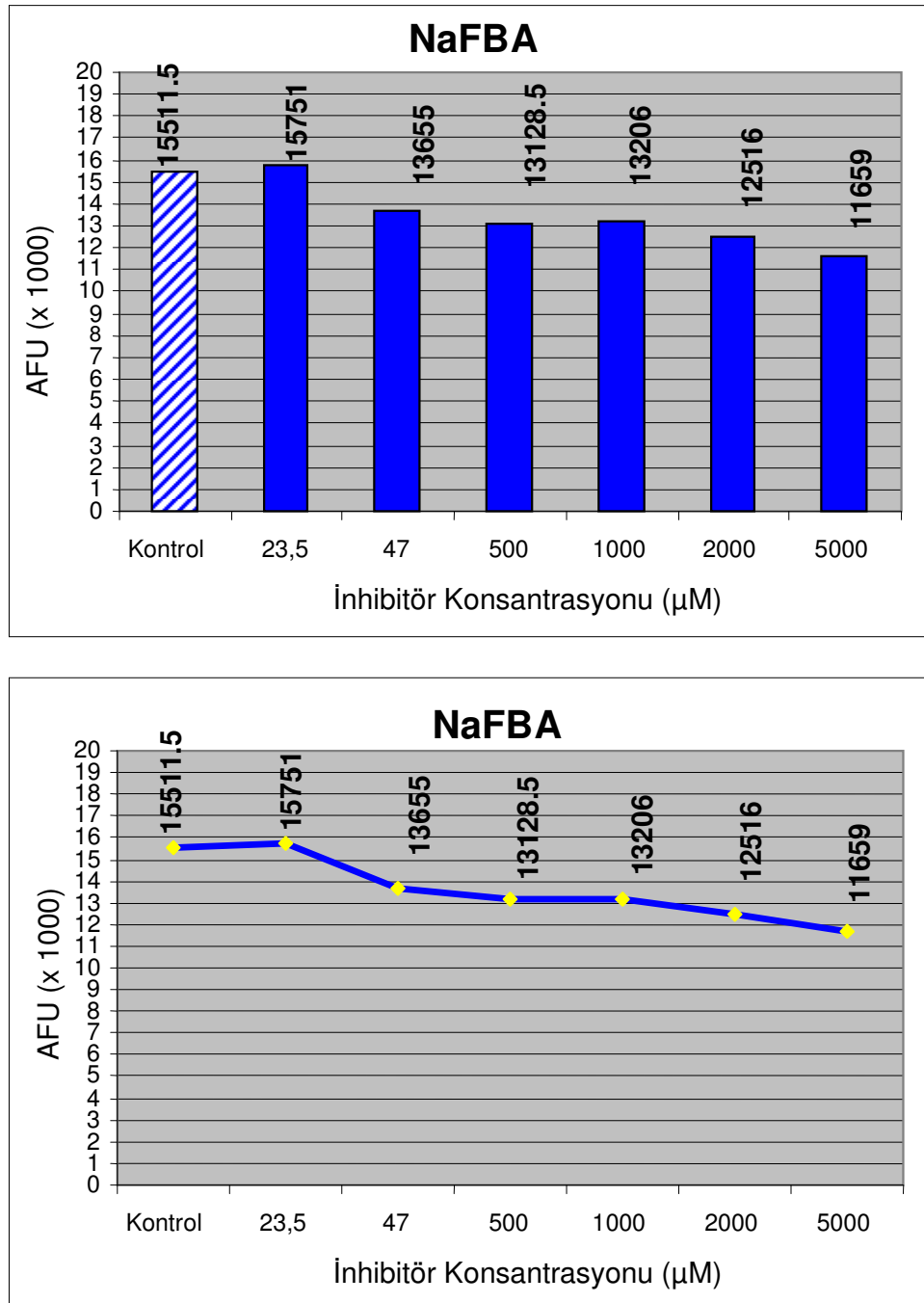
Şekil 4.3. TSA uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri.

TSA için floresans ölçüm-doza arasında $r = -0,8562$ 'lik bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,004$). Doz artışına bağlı olarak floresans sinyalin azalması anlamlıdır.



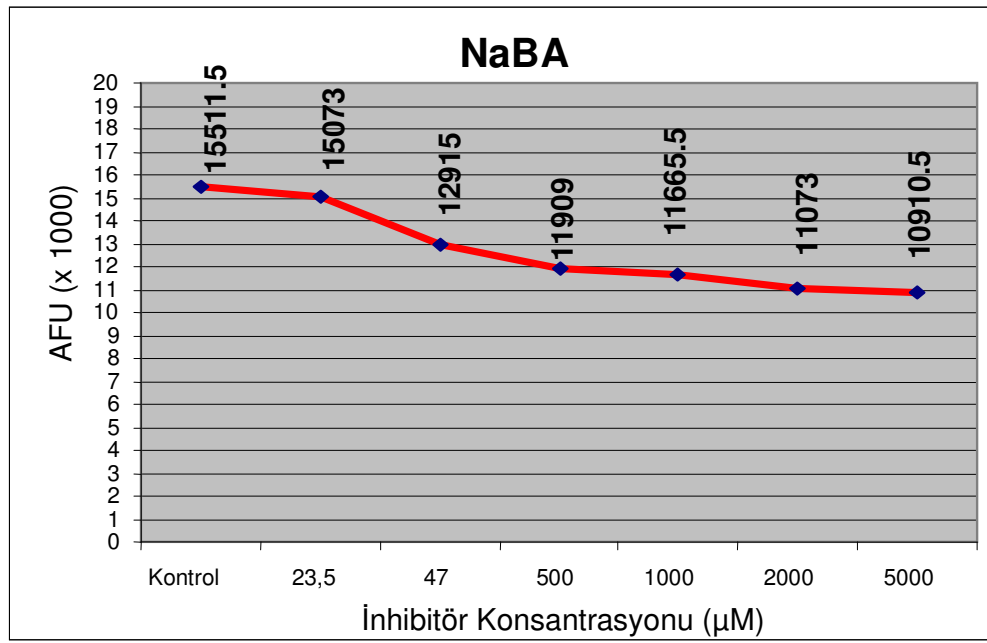
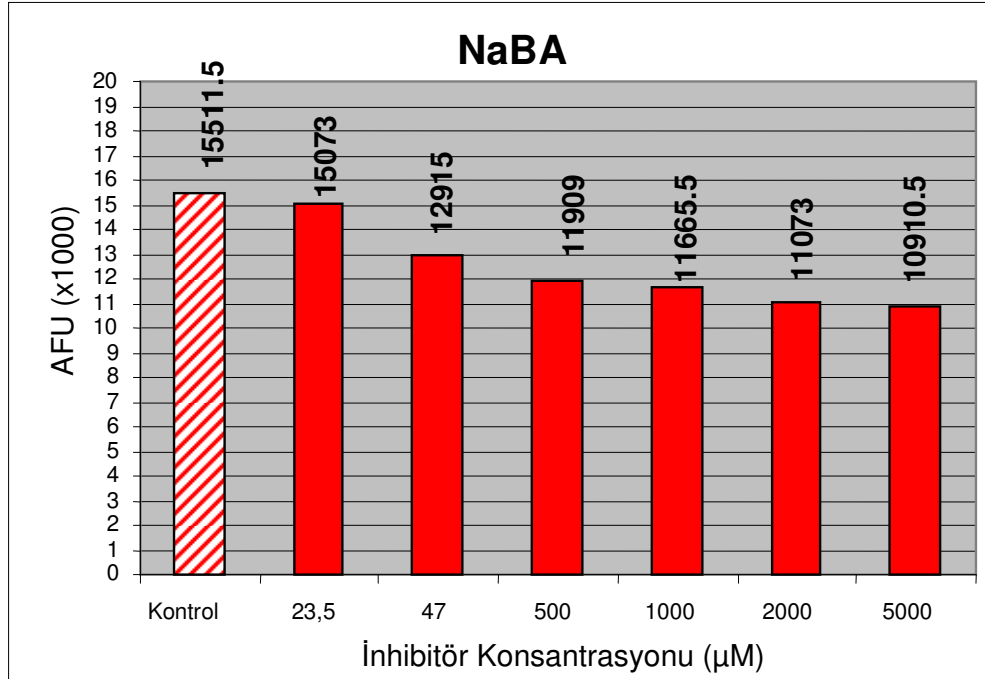
Şekil 4.4. FBA uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri.

FBA için floresans ölçüm-doza arasında $r = -0,6305$ 'lik bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,0279$). Doz artışına bağlı olarak floresans sinyalinin azalması anlamlıdır.



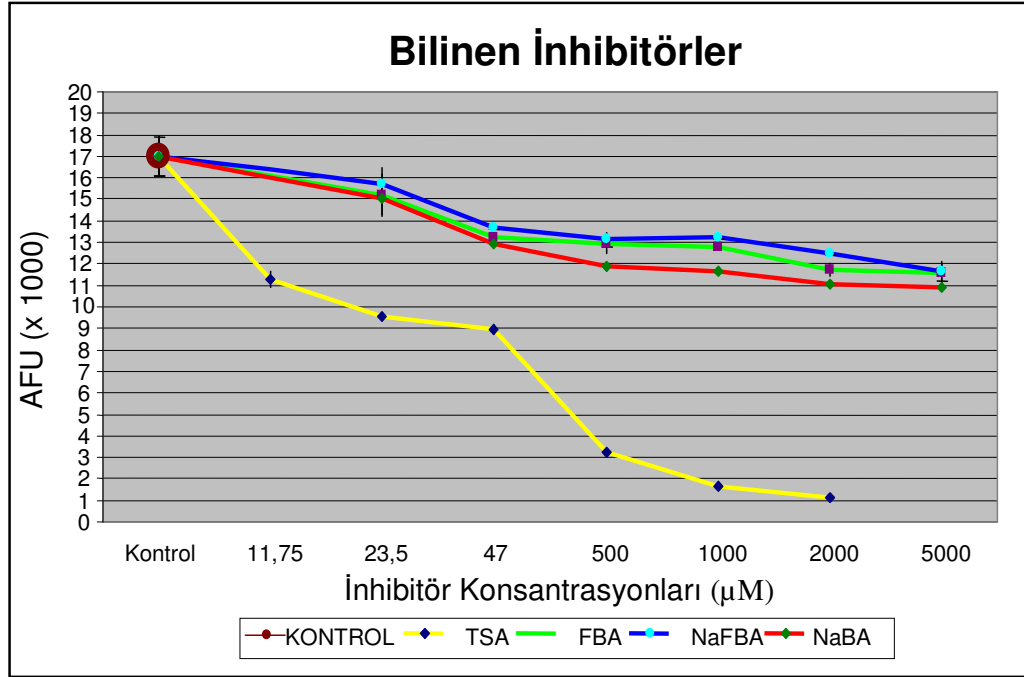
Şekil 4.5. NaFBA uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri.

NaFBA için floresans ölçüm-doz arasında $r = -0,706$ 'lık bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,0103$). Doz artışına bağlı olarak floresans sinyalin azalması anlamlıdır.



Şekil 4.6. NaBA uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri.

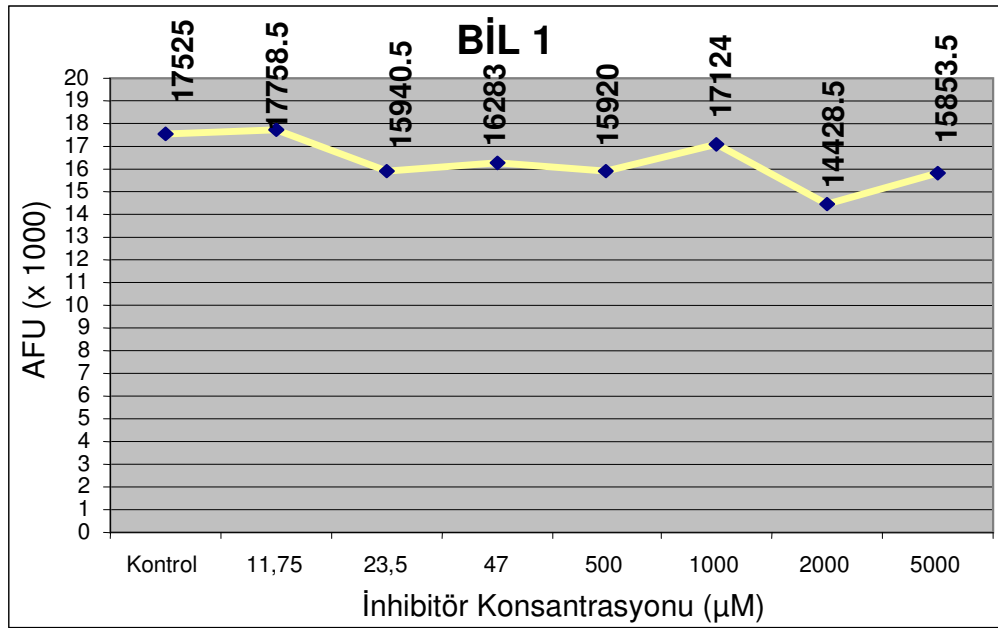
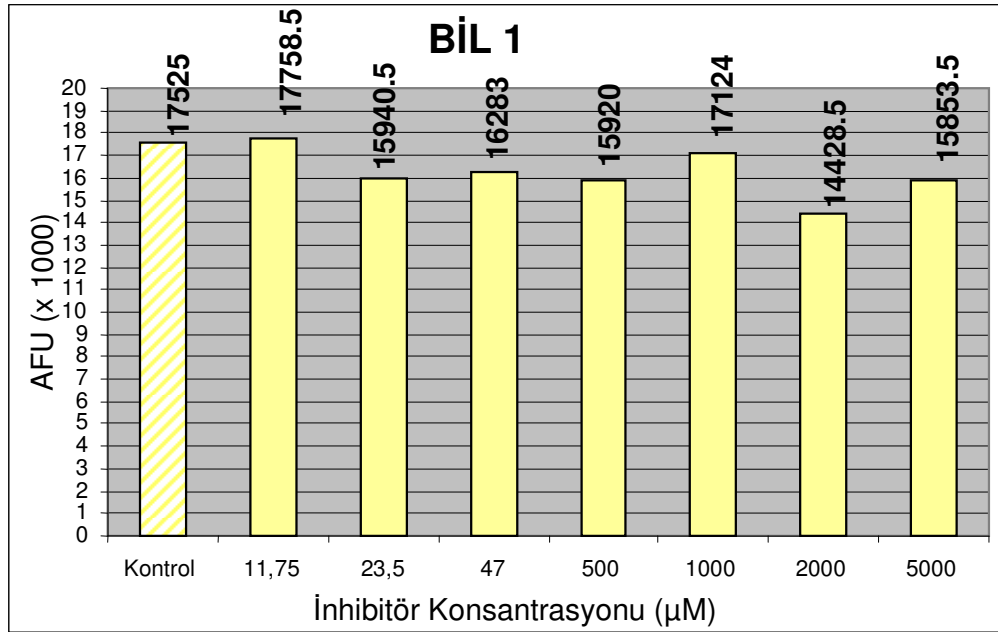
NaBA için floresans ölçüm-doza arasında $r = -0,6245$ 'lik bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,03$). Doz artışına bağlı olarak floresans sinyalin azalması anlamlıdır.



Şekil 4.7. TSA, FBA, NaFBA ve NaBA'nın HDAC inhibisyon aktivitelerinin karşılaştırılması

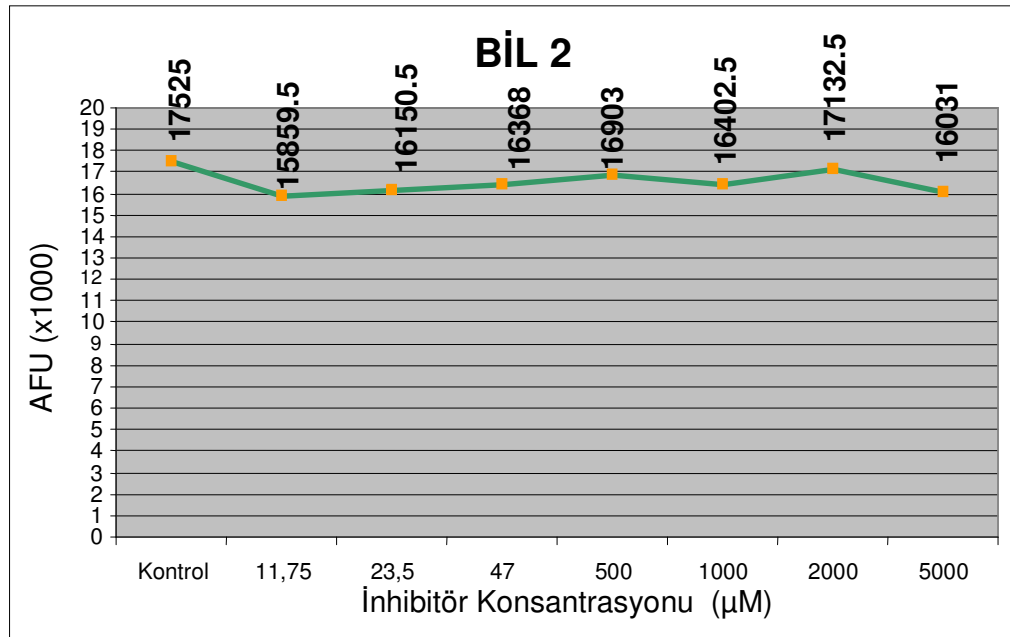
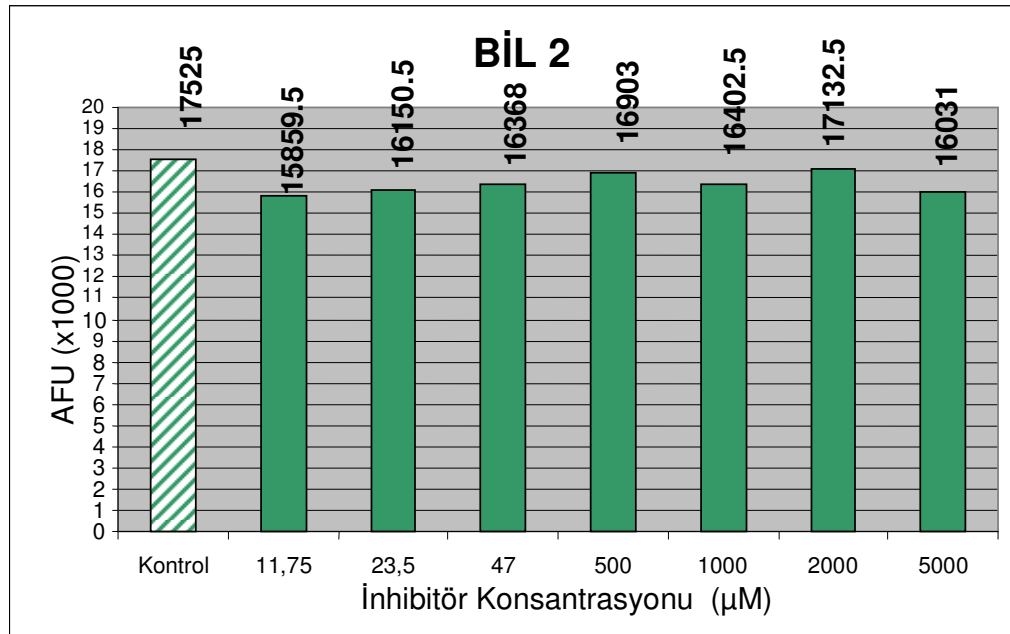
4.2.B. İnhibitör Adayı Bileşiklerin Aktivite Tayini Çalışmaları

BİL 1, 2, 3 ve 4'ün inhibisyon aktivitelerine ait çubuk ve çizgi grafikler Şekil 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11'de, aralarındaki inhibisyon aktivite farklılıkları ise Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



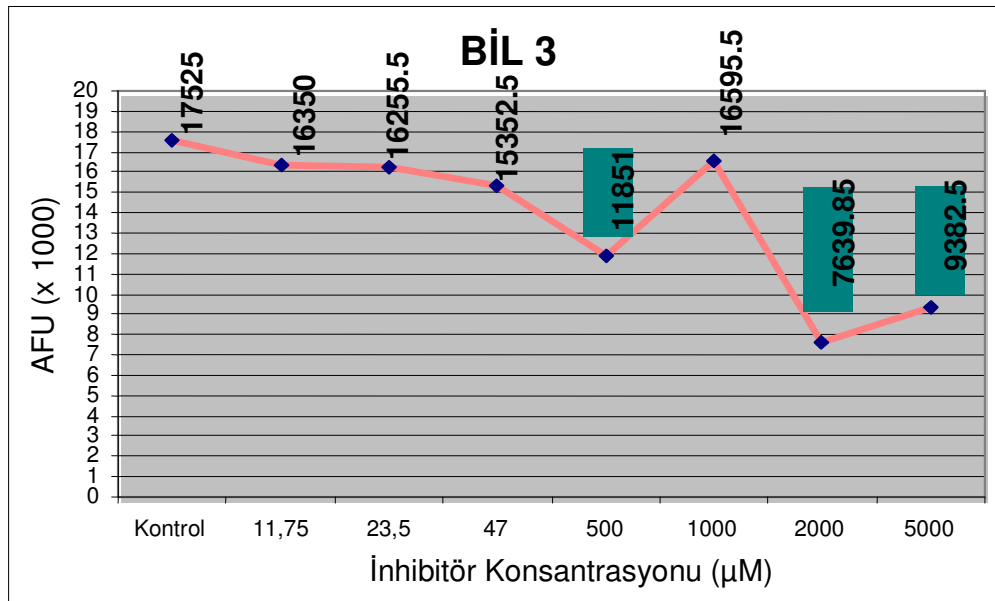
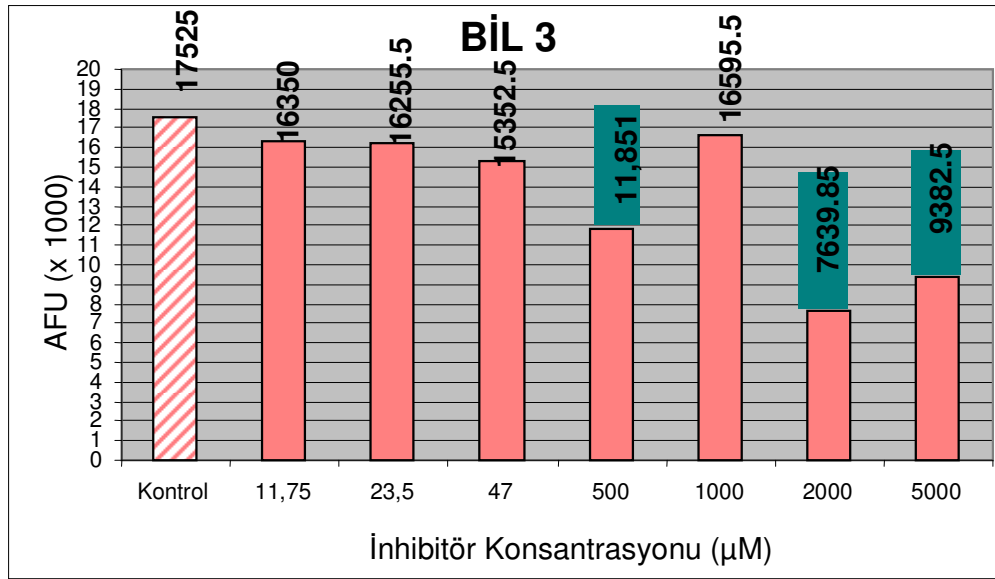
Şekil 4.8. BİL 1 uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri.

BİL 1 için floresans ölçüm-doz arasında $r = -0,3226$ 'lık bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,2606$). Doz artışına bağlı olarak floresans sinyalin azalması anlamlı değildir.



Şekil 4.9. BİL 2 uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri

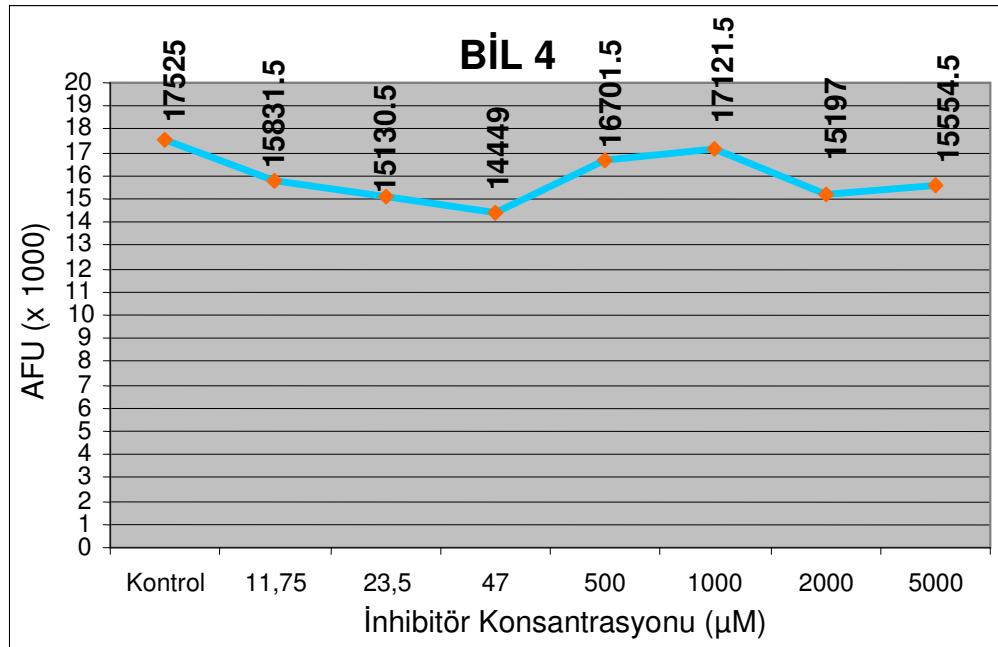
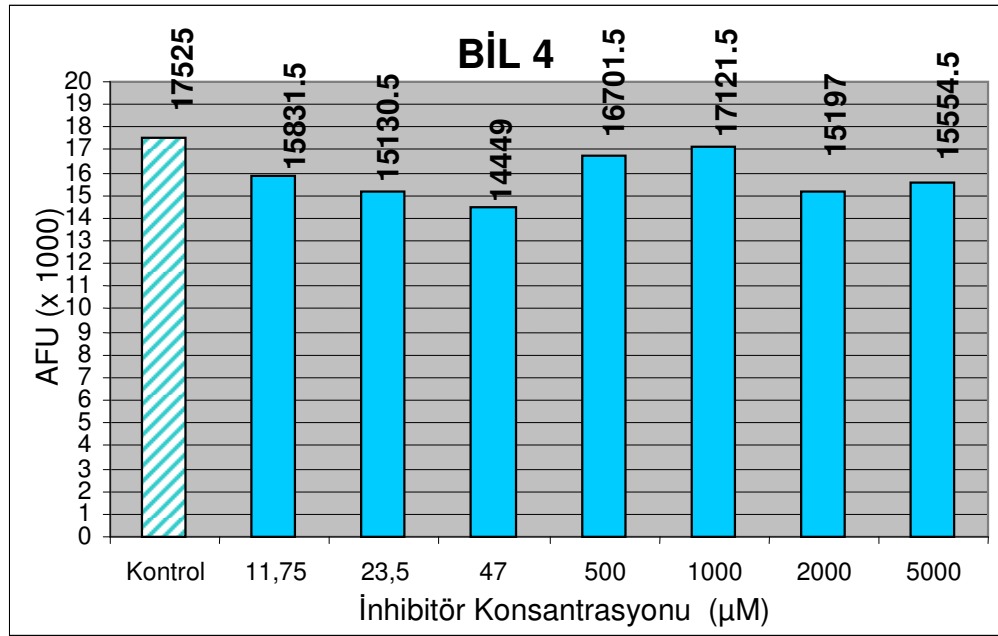
BİL 2 için floresans ölçüm-doz arasında $r = -0,0244$ 'lik bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,9339$). Doz artışına bağlı olarak floresans sinyalin azalması anlamlı değildir.



Şekil 4.10. BİL 3 uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri.

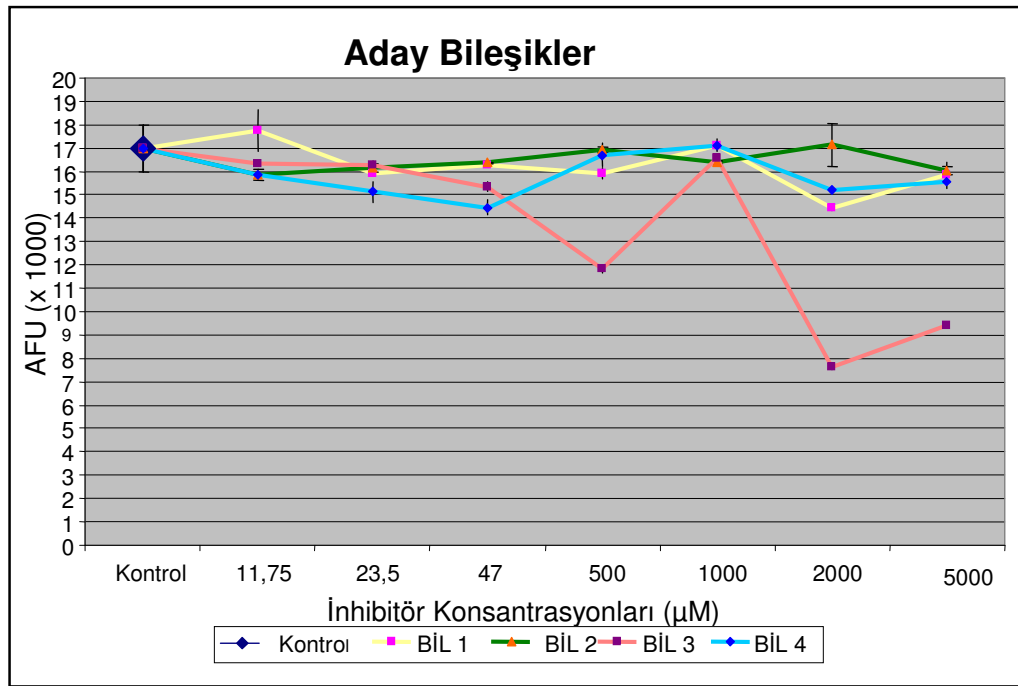
BİL 3 için floresans ölçüm-doz arasında $r = -0,7059$ 'lık bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,0048$). Doz artışına bağlı olarak floresans sinyalin azalması anlamlıdır. Bu azalma anlamlı gibi durmakla beraber, renk oluşumu nedeniyle anlamlı olmadığı kabul edilmiştir.

Mavi kutu içerisinde gösterilen noktalarda mavi-yeşil renk oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 4.11. BİL 4 uygulaması sonucu HDAC aktivite değişiklikleri

BİL 4 için floresans ölçüm-doz arasında $r = 0,0012$ 'lik bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,9968$). Doz artışına bağlı olarak floresans sinyalin azalması anlamlı değildir.



Şekil 4.12. BİL 1, 2, 3 ve 4 HDAC inhibisyon aktivitelerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Histon asetilasyonunun kromatin yapı ve fonksiyonunda rolü olduğunun açıklanmasından yirmi yıl sonra histon asetilasyonu ve transkripsiyon arasındaki direkt ilişki gösterilebilmiştir. Halen geçerliliğini koruyan *histone code* hipotezi, histonların amino kuyruklarında gerçekleşen farklı kombinasyonlardaki post-translasyonel modifikasyonların kromatine değişik görevler yüklediğini savunmaktadır (7,10).

Histon kuyruklarında bulunan lizin amino asitlerinin pozitif yükünün, asetilasyon ile nötralize edilmesi sonucunda kromatinde lokal bir gevşeme meydana geldiği kabul edilmekte ve bu gevşemenin histon/DNA ve histon olan/olmayan protein ilişkilerini etkilediği düşünülmektedir (1,3,4). Bu mekanizmanın aksini savunan bir görüş ise DNA ile histonlar arasındaki elektrostatik etkileşimin çok kuvvetli olduğu, sadece lizin amino asitlerine eklenen asetil gruplarının kromatinde gevşeme sağlayacak güçte olmadığı yönündedir (11). Mekanizma kesin olarak bilinmemekle birlikte asetilasyonun transkripsiyonel aktivasyona, deasetilasyonun ise represyona neden olduğu görüşü benimsenmektedir.

Histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki dengeyi HAT ve HDAC aileleri sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar HDAC'ları inhibe edebilen bileşiklerin hücre bölünmesinin durdurulması, apoptoz ve farklılaşmanın indüklenmesi gibi biyolojik olaylarda etkili olduğunu göstermiştir (18). HDAC inhibitörleri ile deasetilasyon inhibisyonunun sadece gen aktivasyonuna değil, inaktivasyona da neden olduğu, HDAC inhibitörleri uygulanan hücrelerde genlerin %2-5'inin ekspresyonunun arttığı veya azaldığı gösterilmiştir (24).

HDAC inhibitörlerinin farklı biyolojik fonksiyonları etkilemesi nedeniyle kanser (25,26,49), spinal müsküler atrofi (27,28,44), huntington hastalığı (45), diyabet (46,47) ve paraziter enfeksiyonlar (48) gibi değişik hastalık gruplarında araştırmalar yürütülmekte olup, HDAC enzimlerine karşı özgül inhibitör

geliştirilmesi amaçlanmaktadır. HDAC inhibitörleri potansiyel ilaç adayları olarak görülmekte olup bazı kanser türlerinde faz I ve II çalışmaları başlatılmıştır (50).

HDAC inhibitörleri ile yapılan çalışmalar, inhibitör adayı bileşiklerin aktivitelerinin kolay ve az maliyetle analizini sağlayan aktivite tarama sistemleri sayesinde hız kazanmaktadır. Bu amaçla izotopik ve non-izotopik hücre-dışı ilaç tarama sistemleri kullanılmaktadır (51). Non-izotopik sistemler homojen ve homojen olmayan iki grubu içermektedir. Radyoaktivitenin kullanılmaması nedeniyle daha uygun deney sistemleri olmakla birlikte homojen olmayan sistemler deasetile ürün ile kullanılan substratın, floresans ölçümlerden önce ayrıştırılması gerekliliği nedeniyle çalışmaları sınırlamaktadır.

Homojen sistemler ise kolay uygulanabilir olmaları, radyoaktif madde kullanılmaması, ürün ve substratın ayrıştırılmasına gerek olmaması ve daha ucuz olmaları nedeniyle orta/yüksek ölçekli çalışmalar için tercih edilmektedir (51,52, 53). Homojen sistemlerin analiz metodu kolorimetrik veya florometrik olabilmekte ancak florometrik yöntem kullanılarak daha hassas ölçümler yapılabilmektedir. Çalışmamızda kullanılan “HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kiti” bu gruba dahil olup, hücreden HDAC enzim izolasyonuna gerek kalmaması, florometrik yöntemin kullanılması ile sonuçlara hassas bir şekilde ulaşılması, hızlı, kolay uygulanabilir olması, maliyetinin az olması ve radyoaktivite kullanımına gerek kalmaması nedeniyle tercih edilmiştir. Bu sistem 2 basamaklı olup ilk basamakta substratın deasetilasyonu (HDAC reaksiyonu) başlatılmakta, ikinci basamakta ise HDAC reaksiyonu durdurularak, ürün enzimatik ya da kimyasal bir reaksiyon ile saptanmakta ve floresans ölçüm yapılmaktadır.

Çalışmamızın ilk aşamasında inhibisyon etkisi olduğu bilinen bileşiklerden TSA, FBA, NaFBA, NaBA kullanılmış ve farklı konsantrasyonlardaki etkileri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Kısa zincirli yağ asitleri grubuna ait inhibitörlerden olan FBA, NaFBA ve NaBA’nın 23,5 μ M, 47 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M ve 5000 μ M konsantrasyonlardaki aktiviteleri analiz edilmiştir. TSA ise hidroksamat grubuna ait bir inhibitör olması nedeniyle seçilmiş ve 11,75 μ M, 23,5 μ M, 47 μ M,

1000 μ M ve 2000 μ M konsantrasyonlardaki aktivitesi incelenmiştir. Tüm deneylerde 23,5 μ M TSA negatif kontrol olarak kullanılmış, bu sayede sistemin doğru çalıştığı kontrol edilmiş ve deneylerde uygulanan konsantrasyonlar 23,5 μ M esas alınarak belirlenmiştir. 5000 μ M FBA ve NaBA, yapılan in vitro bir çalışmada lenfoblastoid hücre hatlarına toksik etki göstermesi nedeniyle maksimum doz olarak kabul edilmiştir (54). İnhibitör aktivitelerinin sağlıklı bir şekilde karşılaştırılabilmesi amacıyla tüm bileşikler aynı konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Uygulanan konsantrasyonlar kısa zincirli yağ asitleri için, in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilen aktivite aralığı içerisinde olmakla birlikte, TSA konsantrasyonu bu aralığın üzerinde bulunmaktadır. TSA'nın nM konsantrasyonda optimal inhibisyon aktivitesi olduğunun bilinmesine rağmen deneylerimizde, kısa zincirli yağ asitleri ile aynı olacak şekilde, μ M-mM konsantrasyon aralığında kullanılmıştır.

TSA, FBA, NaFBA ve NaBA'nın HDAC inhibisyon aktivitelerinin karşılaştırılması grafiğinde görüldüğü gibi (Bkz. Şekil 4.7), analiz edilen inhibitörler arasında etkisi en fazla olan bileşiğin TSA, sonra sırasıyla NaBA, FBA, NaFBA olduğu tespit edilmiştir. Bu inhibitörler için yapılan floresans ölçüm-doz korelasyon analizi sonuçları istatistiksel olarak anlamlıdır. Floresans değerlerde TSA: %92.8, NaBA: %29.6, FBA: %25.5 ve NaFBA: %24.8 oranında azalma sağlamıştır. Bu azalma, HDAC aktivitesindeki azalmayı, dolayısıyla inhibitörün kuvvetini göstermektedir. Sonuçlarımız, hidroksamat grubunun kısa zincirli yağ asidi grubundan daha kuvvetli inhibisyon etkilerinin olduğu bilgisini desteklemiştir. Aktivite testleri ile daha önce etkinlikleri hiç karşılaştırılmamış olan kısa zincirli yağ asitlerinin (NaBA, FBA, NaFBA) karşılaştırılması çalışmamız sayesinde mümkün olmuş, inhibisyon aktivitesi en fazla olan bileşik NaBA olarak saptanmıştır. Analiz edilen tüm inhibitörlerde gözlenen etki doza bağlı olarak artmıştır.

HDAC'larla ilgili olarak yapılan çalışmalar, genellikle ilaç uygulamasını takiben hücrelerdeki HDAC aktivitesinin tayini amacıyla yapılmış olup, literatürde bileşiklerin HDAC inhibisyon aktivitelerinin taraması ile ilgili çok az çalışmaya rastlanılmıştır (55-58). Bileşik aktiviteleriyle ilgili çalışmalar, genellikle iki bileşik ve türevlerinin karşılaştırılması amacıyla, aktivite tarama kitleri kullanılarak

yapılmıştır. Örneğin; Gurvich ve diğ.nin (59) yaptıkları bir çalışmada, HeLa çekirdek özütüne uygulanan NaBA'nın inhibisyon etkisinin, başka bir kısa zincirli yağ asidi olan VPA ve türevlerinden daha fazla olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada ise Park ve diğ. (60) gastrik kanser hücrelerine hidroksamat grubundan TSA, benamid grubundan MS-275 ve bu iki bileşiğin hibritlerini uygulamış ve en etkili inhibisyonun TSA tarafından sağlandığını göstermiştir.

İnhibitör uyguladıktan sonra örneklerdeki deasetile lizin miktarını hesaplayabilmek amacıyla, deasetile standart 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonlarda uygulanarak standart eğri çizilmiştir. Alınan floresans değerler standart eğri üzerine yerleştirilerek (y-ekseni) örnekte bulunan deasetile lizin miktarı (x-ekseni) hesaplanabilmektedir. TSA, FBA, NaFBA ve NaBA için deasetile lizin mikları hesaplanmış ve konsantrasyon arttıkça deasetile lizin miktarının düştüğü saptanmıştır. İleriki çalışmalarda inhibisyon etkisi gösteren bileşik bulunduğu takdirde, standart eğri kullanılarak deasetile lizin miktarları hesaplanabilecek, inhibisyon etki gücü gösterilebilecek ve bu çalışmada elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilecektir.

HDAC enzimlerinin inhibitörlerle etkileşime girdiği tüp yapısının büyük bir kısmının aromatik amino asitlerden oluştuğu bilinmektedir. Bu aromatik halka sayesinde, inhibitörün enzim yapısına girmesinin kolaylaşacağı düşünülmektedir. HDAC enzimlerinin aktif bölgelerinde bulunan çinko atomunun ise HDAC inhibisyonu için gerekli olduğu bilinmektedir (39). Bu nedenle, yapısal olarak kısa zincirli yağ asidine benzeyen, aromatik halka içeren, farklı fonksiyonel gruba sahip, çinko ile etkileşime girebilecek ve basit yapılı olan asit türevi bileşikler seçilerek inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır.

Çalışmamızın ikinci aşamamasında farklı yapısal özelliklere sahip, inhibitör adayı olarak düşünülen 4 bileşiğin (BİL 1-4) aktiviteleri, tanımlanmış olan inhibitörlerle ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu bileşikler 11,75 μ M, 23,5 μ M, 47 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M ve 5000 μ M konsantrasyonlarda uygulanmıştır. BİL 1, tek halkalı bir sistem olup, boronik asit türevidir. Yapısındaki bor grubunun

çinko atomuyla etkileşime girebileceği düşünülmüş ve çalışılmıştır. BİL 2, ise başka bir tek halkalı sistem olup, sülfonik asit türevidir. Yapısındaki sülfürün çinko ile etkileşiminin araştırılması için çalışmaya dahil edilmiştir. BİL 3, fenil bütirik asite benzeyen, tek halkalı bir sistem olup karboksilik asit türevidir. Yapısında bulunan üç adet hidroksil grubunun enzimin çevre rezidüleriyle hidrojen bağı oluşturacağı düşünülmüş ve seçilmiştir. BİL 4 ise çift halkalı bir sistemdir. Yapısında bulunan azotun ve çift aromatik halkanın aktiviteye etkisinin araştırılması amacıyla seçilmiştir.

Aktivite tayini çalışmalarında elde edilen floresans değerlerde, BİL 1: %9.5, BİL 2: %2.2, BİL 3: %46.5, BİL 4 ise %11.2 oranında azalmaya neden olmuştur. Farklı yapısal özellikleri nedeniyle analiz edilen BİL 1, BİL 2 ve BİL 4 istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Araştırılan tüm bileşikler içerisinde BİL 2 aktivitesi en düşük bileşik olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak, sadece BİL 3 uygulamasına ilişkin floresans sinyaliindeki düşüş anlamlı bulunmuş, ancak BİL 3, analiz sırasında kit bileşenleri ile reaksiyona girerek mavi-yeşil renk oluşumuna neden olmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmasına karşın, okumaların renk oluşumu nedeniyle sağlıklı yapılamaması, florometrik olmayan başka bir tarama sisteminde çalışmanın tekrarlanmasının uygun olacağını düşündürmüştür. BİL 1-4'ün inhibisyon etkisinin çok zayıf olduğunun görülmesi üzerine deasetile izin miktarları hesaplanmamıştır.

İnhibisyon aktivitesi araştırılan kısa zincirli yağ asitlerinden FBA, NaFBA ve NaBA uygulamasıyla elde edilen floresans değerlerindeki düşüşün 23,5-47 μ M aralığında olduğu dikkat çekmiştir. Bunun üzerine BİL 1-4 için de 47 μ M konsantrasyona kadar olan floresans değerler incelenmiş ve BİL 3 ve BİL 4'ün bu aralıkta inhibisyon aktivitelerinin kısa zincirli yağ asitlerine yakın olduğu görülmüştür. BİL 4'ün yapısal özelliklerinden dolayı konsantrasyona bağlı olarak floresans verebileceği kabul edilerek, bu bileşik için de florometrik olmayan bir sistemin kullanılmasının daha güvenilir olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu iki bileşiğin üzerinde daha detaylı çalışma yapılmasının uygun olacağına karar verilmiştir.

Bu tez çalışması ile HDAC inhibitörü olan TSA, FBA, NaFBA ve NaBA'nın ve inhibitör adayı bileşikler olarak düşünülen 2-fenil vinil boronik asit, 3-morfolin-propen-sülfonik asit, gallik asit, 4-kinolin karboksilik asit'in inhibisyon aktiviteleri hücre dışı bir sistemde ilk kez gösterilmiş ve etkinlikleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar etkili HDAC inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalara temel oluşturacak ve çok sayıda yeni bileşiğin taranarak etkinliklerinin karşılaştırılmasına imkan sağlayacaktır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- HDAC inhibisyon aktivitesi olduğu bilinen TSA, FBA, NaFBA ve NaBA adlı dört inhibitörün aktivitesi hücre dışı bir sistem olan “HDAC İnhibitör İlaç Tarama Kiti” kullanılarak gösterilmiş ve sistem bundan sonraki çalışmalar için hazır hale getirilmiştir.
- İnhibisyon etkisi olduğu bilinen bileşiklerden, aktivitesi en yüksek olanın TSA, sonra sırasıyla NaBA, FBA ve NaFBA olduğu saptanmıştır.
- Yapısal olarak kısa zincirli yağ asitlerine benzeyen inhibitör adayı dört bileşikten, BİL 1 ve BİL 2’nin inhibisyon aktivitelerinin bilinen inhibitörlerden daha fazla olmadığı gösterilmiştir. BİL 3 ve BİL 4 için farklı tarama sistemleri kullanılmasının ve detaylı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğuna karar verilmiştir.
- HeLa çekirdek özütüne bileşik uygulaması sonucu ortaya çıkan deasetile lizin miktarının hesaplanabilmesi için standart eğri çizilmiş ve bilinen inhibitörler için deasetile lizin miktarları hesaplanmıştır. Aday bileşiklerin aktivitelerinin bilinen inhibitörlerden az olduğunun görülmesi üzerine deasetile lizin miktarının hesaplanmasına gerek kalmamıştır.
- Aktivite tarama testlerinde iki tekrarın az olduğu anlaşılmış ve istatistiksel değerlendirme yönünden ileriki çalışmalarda tekrar sayısının artırılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir.

Bu tez çalışması, *splicing* hatalarını düzeltebilecek etkin bir ilacın geliştirilmesi konusundaki araştırmalara katkıda bulunacaktır. Elde edilen veriler, RNA *splicing* hatalarından kaynaklanan kalıtsal hastalıkların tedavisi amacıyla ilaç araştırma-geliştirme çalışmalarında, ilaç aktivitesine ilişkin ön bilgi sağlayarak yeni deneylerin planlanmasında önemli bir basamak oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Basic Genetic Mechanisms, "Molecular Biology of the Cell", 4. Baskı, Garland Science, London-New York, s. 208-230, 2002
2. Thiagalingam, S., Cheng, H-K., Lee, J.H, Mineva, N., Thiagalingam, A. ve Ponte, F. J., Histone deacetylases:unique players in shaping the epigenetic histone code, Ann.N.Y.Acad.Sci., 983, 84-100, 2003
3. Cooper, M. G., Hausman, E. R., The flow of genetic information, "The Cell a Molecular Approach", 3.Baskı., ASM press, USA, s. 150-154, 2004
4. Strachan, T., Read, P. A., Chromosome structure and function,"Human Molecular Genetics", 3.Baskı, Garland Science, London-New York, s. 34-38,2004
5. Khorasanizadeh, S., The Nucleosome:from genomic organization to genomic regulation, Cell, 116, 259-272, 2004
6. Marmorstein, R., Roth, Y. S.,Histone acetyltransferases:function, structure and catalysis, Curr. Opin. Genet. Dev., 11, 155-161, 2001
7. Strahl, D. B., Allis, D., The language of covalent histone modifications, Nature, 403,41-45, 2000
8. Oak Ridge National Laboratory, Human Genome Project Information, 26/05/2006. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml
9. Klung, S. W., Cummings, R. M., Ökaryotlarda gen ifadesinin düzenlenmesi, "Genetik Kavramlar (6. baskıdan çeviri-Concepts of Genetics)", Çev.Ed. Öner C., Palme yayıncılık, s 434-442, 2002
10. Grant, A. P., A tale of histone modifications, Genome Biol., 2, 4, 1-6, 2001
11. Peterson, L. C., Laniel, M., Histones and histone modifications, Curr.Biol., 14, 14, 546-551, 2004

12. Lizuka, M., Smith, M. M., Functional consequences of histone modifications, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 13, 154-160, 2003
13. NobelPrize.org, Nobel Prize in Medicine,
http://nobelprize.org/educational_games/medicine/dna/a/transcription/acetylation.html
14. Ogryzko, V. V., Mammalian histone acetyltransferases and their complexes, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 58, 683-692, 2001
15. Kimura, A., Horikoshi, M., How do histone acetyltransferases select lysine residues in core histones?, *FEBS*, 431, 131-133, 1998
16. Gray, G. S., Ekström, J. T., The human histone deacetylase family, *Exp. Cell Res.*, 262, 75-83, 2001
17. Marks, A. P., Richon, M. V., Miller, T., Kelly, K. W., Histone deacetylase inhibitors, *Adv. Cancer Res.*, 91, 137-168, 2004
18. Dokmanovic, M., Marks, A. P., Prospects: Histone deacetylase inhibitors, *J. Cell. Biochem.*, 96, 293-304, 2005
19. Glozak, A., M., Sengupta, N., Zhang, X., Seto, E., Acetylation and deacetylation of non-histone proteins, *Gene*, 363, 15-23, 2005
20. Ruijter, M. J. A., Gennip, H. A., Caron, N. H., Kemp, S., Kuilenberg, P. B. A., Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, *Biochem. J.*, 370, 737-749, 2003
21. Verdin, E., Dequiedt, F., Kasler, G. H., Class II histone deacetylases: versatile regulators, *Trends Genet.*, 19, 5, 286-293, 2003
22. Yang, JX., Gregoire, S., Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation and clinical implication, *Mol. Cell. Biol.*, 25, 8, 2873-2884, 2005
23. Grozinger, M. C., Schreiber, L. S., Deacetylase enzymes: Biological functions and the use of small-molecule inhibitors, *Chem. Biol.*, 9, 3-16, 2002
24. Marks, A. P., Miller, T., Richon, V., Histone deacetylases, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 3, 344-351, 2003

25. Lindemann, K. R., Johnstone, W. R., Histone deacetylase inhibitors: promising candidates for chemotherapeutic drugs, *Gene Ther. Mol. Biol.*, 8, 61-74, 2004
26. Kramer, H. O., Göttlicher, M., Heinzel, T., Histone deacetylase as a therapeutic target, *Trends Endocrinol. Metab.*, 12, 7, 294-300, 2001
27. Andreassi, C., Angelozzi, C., Tiziano, F. D., Vitali, T., Vincenzi, E. D., Boninsegna, A., Villanova, M., Bertini, E., Pini, A., Neri, G., Brahe C., Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: Relevance for treatment of spinal muscular atrophy, *Eur. J. Hum. Genet.*, 12, 1-7, 2003
28. Sumner ,C.J., Huynh, T.N., Markowitz, J.A., Perhac, J.S., Hill, B., Coover, D.D., Schussler, K., Chen, X., Jarecki, J., Burghes, A.H., Taylor, J.P., Fischbeck, K.H., Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells, *Ann. Neurol.*, 54, 5, 647–54, 2003.
29. Rosato, R. R., Grant, S., Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality, *Expert Opin. Ther. Targets*, 9, 4, 809-824, 2005
30. Taddei, A., Roche, D., Bickmore, W.A., Almouzni, G., The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anti-cancer therapy? *EMBO Reports*, 6, 6, 520–524, 2005.
31. Bernhard, D., Ausserlechner, M.J., Tonko, M., Löffler, M., Hartmann, B.L., Csordas, A., Kofler, R., Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts, *FASEB J.*, 13, 1991–2001, 1999
32. Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, M. E., Ferrara, F., Bresciani, F., Weisz, A., Lera, R. A., Gronemeyer, H., Altuccini, L., Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells, *Nat. Med.*, 11, 1, 2005
33. Strachan, T., Read, P. A., DNA structure and gene expression, “Human Molecular Genetics”, 3. baskı, Garland Science, London-New York, s. 19-22, 2004
34. Blencowe, B.J., Exonic splicing enhancers: Mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases, *Trends in Biochem. Sci.*, 25, 3, 106-110, 2000.

35. Kornblihtt, A.R., Cáceres, J.F., Alternative splicing: Multiple control mechanisms and involvement in human disease, *Trends in Genet.*, 18, 4, 186-193, 2002
36. Cartegni, L., Krainer, A.R., Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1, *Nat. Genet.*, 30, 4, 377–84, 2002
37. Wirth, B., Spinal muscular atrophy: state of the art and therapeutic perspectives, *ALS and other Motor Neuron Disorders* 3, 87-95, 2002
38. Kernochan, L.E., Russo, M.L., Woodling, N.S., Huynh, T.N., Avila, A.M., Fischbeck, K.H., Sumner, C.J., The role of histone acetylation in SMN gene expression, *Hum. Mol. Genet.*, 14, 9, 1171–82, 2005
39. Finnin, S. M., Donigian, R. J., Cohen, A., Richon, M. V., Rifkind, A. R., Marks, A. P., Breslow, R., Pavletich, P. N., Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors, *Nature*, 401, 188-193, 1999
40. Somoza, R. J., Skene, J. R., Katz, A. B., Mol, C., Ho, D. J., Jenninhs, J. A., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J. J., Chi, E., Tang, J., Sang, CB., Verner, E., Wynands, R., Leahy, M. E., Dougan, R. D., Snell, G., Navre, M., Knuth, W. M., Swanson, V. R., McRee, E. D., Tari, W. L., Structural snapshots of human HDAC 8 provide insights into the class I histone deacetylases, *Structure*, 12, 1325-1334, 2004
41. Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, C. E., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., Francesco, D. R., Gallinari, P., Steinkühler, C., Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC 8, complexed with hydroxamic acid inhibitors, *PNAS*, 101, 42, 15064-15069, 2004
42. Miller, A. T., Witter, J. D., Belvedere, S., Histone deacetylase inhibitors, *J. Med. Chem.*, 46, 24, 5097-5116, 2003

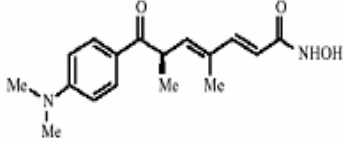
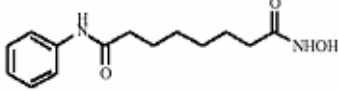
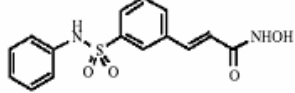
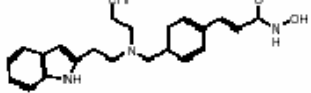
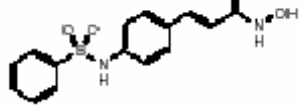
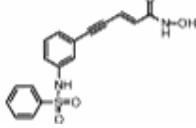
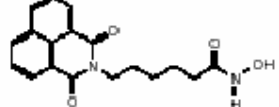
43. Wang, F.D., Helquist, P., Wiech, L. N., Wiest, O., Toward selective histone deacetylase inhibitor design: homology modelling, docking studies and molecular dynamics simulation of human class I histone deacetylases, *J. Med. Chem.*, 48, 6936-6947, 2005
44. Brichta, L., Hofmann, Y., Hahnen, E., Siebzehnruhl, F.A., Raschke, H., Blumcke, U., Eyupoglu, I.Y., Wirth, B., Valproic acid increases the SMN2 protein level: A well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy, *Hum. Mol. Genet.*, 12, 19, 2481-2489, 2003
45. Hockly, E., Richon, M. V., Woodman, B., Smith, L. D., Zhou, X., Rosa E., Sathasivam, K., Noori-Ghazi, S., Mahal, A., Lowden, S. A. P., Steffan, S. J., Marsh, L. J., Thompson, M. L., Lewis, M. C., Marks, A. P., Bates, P. G., Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease, *PNAS*, 100, 4, 2041-2046, 2003
46. Imamura-Takigawa, H., Sekine, T., Murata, M., Takayama, K., Nakazawa, K., Nakagawa, J., Stimulation of glucose uptake in muscle cells by prolonged treatment with scriptide, a histone deacetylase inhibitor, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 7, 1499-1509, 2003
47. Amber, L. M., Özcan, S., Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone H4, *J. Biol. Chem.*, 278, 22, 19660-19666, 2003
48. Colletti, L. S., Myers, W. R., Darkin-Rattray, J. S., Gurnett, M. A., Dulski, M. P., Galuska, S., Allocco, J. J., Ayer, B. M., Li, C., Lim, J., Crumley, M. T., Cannova, C., Schmatz, M. D., Wyvratt, J. M., Fisher, H. M., Meinke, T. P., Broad spectrum antiprotozoal agents that inhibit histone deacetylase structure-activity relationships of apicidine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 2, 107-111, 2001
49. Moradei, O., Maroun, R. C., Paquin, I., Vaisburg, A., Histone deacetylase inhibitors: latest developments, trends and prospects, *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 5, 529-560, 2005
50. U.S. National Institutes of Health, National Library of Medicine, <http://www.clinicaltrials.gov/>

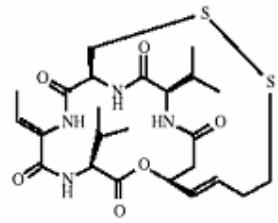
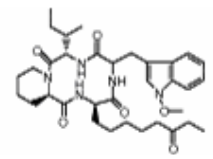
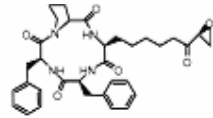
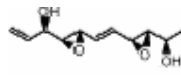
51. Wegener, D., Hildmann, C., Schwienhorst, A., Recent development of assays suited for histone deacetylase inhibitor screening, *Mol. Genet. Metab.*, 80, 138-147, 2003
52. Wegener, D., Hildman, C., Riester, D., Schwienhorst, A., Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-througput-screening applications, *Anal.Biochem.*, 321, 202-208, 2003
53. Wegener, D., Wirsching, F., Riester, D., Schwienhorst, A, A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throuhput acticity screening, *Chem. Biol.*, 10, 61-68, 2003
54. Dayangaç, D.,Spinal Müsküler Atrofi’de RNA İşlenme Hatasının ve Tedavinin Araştırılması, Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2005
55. Borja, G. C., Tsaprouni, L., Ito, K., Jazrawi, E., Adcock, M. I., Barnes, J. P., Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages, *J. Exp. Med.*, 200, 5, 689-695, 2004
56. Borja, G. C., Mann, B., Ito, K., Jazrawi, E., Barnes, J. P., Chung, F. K., Histone acetylase and deacetylase activity in alveolar macrophagges and blood monocytes in asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*,170, 141-147, 2004
57. Eyal, S., Yagen, B., Sobol, E., Altschuler, Y., Shmuel M., Bialer M., The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors, *Epilepsia*, 45, 7, 737-744, 2004
58. Myzak, C. M., Karplus, A. P., Chung, L.F., Dashwood, H. R., A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase, *Cancer Res.*, 64, 5767-5774, 2004
59. Gurvich, N., Tsygankova, M. O., Meinkoth, L. J., Klein, S. P., Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differantiation, *Cancer Res.*, 64, 1079-1086, 2004

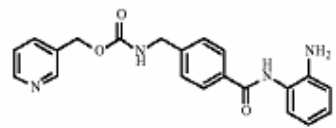
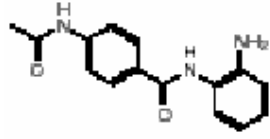
60. Park, H. J., Jung, Y., Kim, Y. T., Kim, G. S., Jong, S. H., Lee, W. J., Kim, K. D., Lee, S. J., Kim, K. N., Kim, Y. T., Bang, J. Y., Class I histone deacetylase-selective novel synthetic inhibitors potently inhibit tumor proliferation, Clin.Cancer Res., 10, 5271-5281, 2004

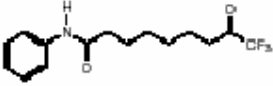
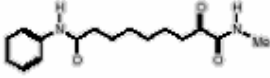
EKLER

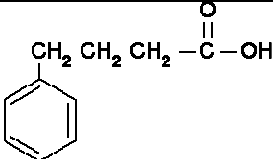
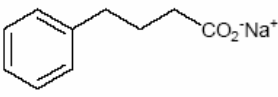
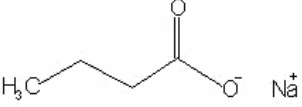
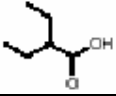
EK 1. Histon Deasetilaz İnhibitör Listesi

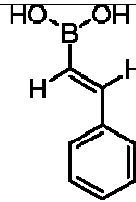
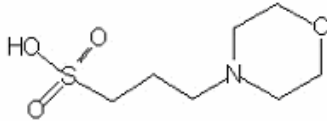
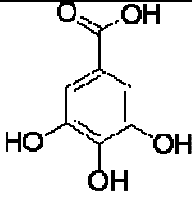
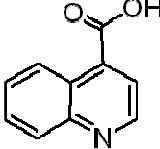
1. Hidroksamatlar	
İsim	Yapı
*TSA	
SAHA	
PDX-101	
LAQ-824	
CBHA	
Sülfonamid hidroksamik asit	
Okzamflatin	
Skriptaid	
HMBA	

2. Siklik Tetrapeptidler	
İsim	Yapı
Depsipeptid (FK-228)	
Apisidin	
Trapoksin	
Depusedin	

3. Benzamidler	
İsim	Yapı
MS-275	
CI-994	

4.Elektrofilik Ketonlar	
İsim	Yapı
Triflorometil ketonlar	
α –ketonamidler	

5. Kısa Zincirli Yağ Asitleri	
İsim	Yapı
Bütirik asit	CH_3 
* 4-Fenil bütirik asit	
* 4-Fenil bütirik asit sodyum tuzu	
*Sodyum bütirat	
Valproik asit	
Fenil asetik asit	

İlaç Adayı Bileşikler	
İsim	Yapı
*BİL 1 2-fenil vinil boronik asit	
*BİL 2 3-morfolin-propen-sülfonik asit (MOPS)	
*BİL 3 Gallik asit	
*BİL 4 4-kinolin karboksilik asit	

* : Aktivite tayini deneylerinde kullanılmıştır

EK 2. Floresan okumalar sonucu ölçülen değerler ve istatistiksel hesaplamalar

A) Standart eğrinin oluşturulmasında kullanılan değerler

Konsantrasyon	Floresan Değer 1*	Floresan Değer 2*	Aritmetik Ortalama	Standart Deviasyon
20 µM	14789	12636	13712,5	1522,40
10 µM	6640,5	6513,8	6577,15	89,59
5 µM	3491,7	3509,5	3500,6	12,59
2,5 µM	1773,4	1811,2	1792,3	26,73
0 µM	36,75	-37,39	-0,32	52,42

B) Aktivite tayini deneylerinde kullanılan değerler

İnhibitör/Bileşik	Konsantrasyon	Floresan Değer 1*	Floresan Değer 2*	Aritmetik Ortalama	Standart Deviasyon	F-Test
Pozitif Kontrol	-	16750	14273	15511,5	1751,50	-
Negatif Kontrol (TSA kit)	23,5 µM	8106	8908,8	8507,4	567,67	0,40
TSA	11,75µM	11816	10778	11297	733,98	0,51
	23,5µM	9572	9547	9559,5	17,68	0,01
	47µM	8636,8	9248	8942,4	432,18	0,31
	500µM	3310,7	3205	3257,85	74,74	0,05
	1000µM	1622,4	1738,2	1680,3	81,88	0,06
	2000µM	1118,7	1094,2	1106,45	17,32	0,01
FBA	23,5µM	16579	13868	15223,5	1916,97	0,94
	47µM	13299	13146	13222,5	108,19	0,08
	500µM	13535	12283	12909	885,30	0,60
	1000µM	12946	12573	12759,5	263,75	0,19
	2000µM	12146	11299	11722,5	598,92	0,42
	5000µM	10814	12280	11547	1036,62	0,68
NaFBA	23,5µM	16774	14728	15751	1446,74	0,88
	47µM	13682	13628	13655	38,18	0,03
	500µM	13632	12625	13128,5	712,06	0,49
	1000µM	13234	13178	13206	39,60	0,03
	2000µM	12705	12327	12516	267,29	0,19
	5000µM	11010	12308	11659	917,82	0,61
NaBA	23,5µM	16289	13857	15073	1719,68	0,99
	47µM	13091	12739	12915	248,90	0,18
	500µM	12101	11717	11909	271,53	0,20
	1000µM	11734	11597	11665,5	96,87	0,07
	2000µM	11018	11128	11073	77,78	0,06
	5000µM	10878	10943	10910,5	45,96	0,03

İnhibitör/Bileşik	Konsantrasyon	Floresan Değer 1*	Floresan Değer 2*	Aritmetik Ortalama	Standart Deviasyon	F-Test
Pozitif Kontrol	-	18927	16123	17525	1982,73	-
Negatif Kontrol (TSA kit)	23,5 µM	9253	9334	9293,5	57,28	0,04
BIL 1	11,75 µM	19027	16490	17758,5	1793,93	0,94
	23,5 µM	16125	15756	15940,5	260,92	0,17
	47 µM	16315	16251	16283	45,25	0,03
	500 µM	15557	16283	15920	513,36	0,32
	1000 µM	17498	16750	17124	528,92	0,33
	2000 µM	14610	14247	14428,5	256,68	0,16
	5000 µM	16645	15062	15853,5	1119,35	0,65
BIL 2	11,75 µM	15525	16194	15859,5	473,05	0,30
	23,5 µM	15904	16397	16150,5	348,60	0,22
	47 µM	16341	16395	16368	38,18	0,02
	500 µM	17064	16742	16903	227,69	0,15
	1000 µM	16483	16322	16402,5	113,84	0,07
	2000 µM	18459	15806	17132,5	1875,95	0,96
	5000 µM	15793	16269	16031	336,58	0,21
BIL 3	11,75 µM	16328	16372	16350	31,11	0,02
	23,5 µM	16499	16012	16255,5	344,36	0,22
	47 µM	15058	15647	15352,5	416,49	0,26
	500 µM	12109	11593	11851	364,87	0,23
	1000 µM	16650	16541	16595,5	77,07	0,05
	2000 µM	7786,1	7493,6	7639,85	206,83	0,13
	5000 µM	9480	9285	9382,5	137,89	0,09
BIL 4	11,75 µM	15964	15699	15831,5	187,38	0,12
	23,5 µM	15756	14505	15130,5	884,59	0,53
	47 µM	14894	14004	14449	629,33	0,39
	500 µM	17402	16001	16701,5	990,66	0,59
	1000 µM	16860	17383	17121,5	369,82	0,23
	2000 µM	15062	15332	15197	190,92	0,12
	5000 µM	15707	15402	15554,5	215,67	0,14

*Boş kuyucukların verdiği ortalama sinyal (900 AFU) çıkartılarak gösterilmiştir.