

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SMN2 GEN İFADESİ ÜZERİNDE KAFEİK ASİT VE BÜTANOİK ASİT
ESTER TÜREVLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gözde UZUNALLI

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2010

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SMN2* GEN İFADESİ ÜZERİNDE KAFEİK ASİT VE
BÜTANOİK ASİT ESTER TÜREVLERİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gözde UZUNALLI

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**


**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hayat ERDEM YURTER**

**2010
ANKARA**

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Meral Özgüç
Hacettepe Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. Hayat Erdem Yurter
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Serap Emre
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. C. Ömer Kalaycı
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Yar. Doç. Dr. Didem Dayangaç Erden
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

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



Prof. Dr. Hakan S. ORER

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sırasında her konuda desteğini sevgi ve sabrını benden esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Hayat ERDEM YURTER'e; tez çalışmamın değerlendirilmesinde bana yol gösteren Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ'e, Prof. Dr. Serap EMRE'ye, Yar. Doç. Dr. Didem DAYANGAÇ ERDEN'e, Prof. Dr. C. Ömer Kalaycı'ya ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine; çalışmalarım sırasında deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan başta Gamze BORA TATAR olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma; değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Mutlu HAYRAN'a ve Dr. Deniz YÜCE'ye; hayatımda oldukları andan itibaren koşulsuz sevgi, anlayış ve desteklerini hep hissettiren aileme içtenlikle teşekkür ederim.

ÖZET

Uzunallı, G. *SMN2* gen ifadesi üzerinde kafeik asit ve bütanoik asit ester türevlerinin etkisinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010.

Otozomal resesif geçiş gösteren Spinal kaslar atrofi'den sorumlu olan *SMN* (*survival motor neuron*) geninin *SMN1* ve *SMN2* olmak üzere iki kopyası bulunmakta ve *SMN1* kopyasındaki homozigot delesyon hastalığa yol açmaktadır. *SMN2* geninden *splicing* hatası nedeniyle yetersiz miktarda ifade edilen tam uzunluktaki *SMN* (FL-*SMN2*) proteini hastalığın ortaya çıkmasını engelleyemese de *SMN2* kopya sayısı hastalığın şiddetini değiştirebilmektedir. Henüz uygulanabilir bir tedavisi bulunmamakla birlikte tedavi yaklaşımı olarak histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri ile *SMN2* geninden ifade edilen FL-*SMN2* seviyesinin artırılması yönünde araştırmalar yapılmaktadır. Ancak bugüne kadar tanımlanan HDAC inhibitörlerinin sahip oldukları olumsuzluklar araştırmacıları yeni bileşik arayışına yönlendirmiştir. Bu tez çalışmasında *SMN2* gen ifadesini artırdığı bilinen kafeik asit ve bütanoik asit bileşiklerinden yola çıkılarak tasarlanan ve yüksek HDAC inhibisyon aktivitesi bulunan bileşiklerin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile *SMN2* gen ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İncelenen bileşikler (*E*)-metil 4-(3,4-dihidroksifenil)-2-okzobüt-3-enoat (**türev 1**), α -o-kafeoil-3,4-dihidroksifenil-laktik asit (**türev 2**), 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon (**türev 3**) ve (*E*)-4-(4-metoksifenil)-1-(2,6-dimetilmorfolino) büt-3-en-1,2-dion (**türev 4**)'dur. SMA'lı hücre hattına türev 1 uygulandığında en yüksek artış 80 μ M konsantrasyonda 1,3 kat; türev 2 uygulandığında ise 50 μ M konsantrasyonda 1,9 kat olarak saptanmıştır. Türev 3 ve 4, ilk iki türeve oranla daha etkili bulunmuş ve iki farklı SMA'lı hücre hattına uygulanmıştır. Türev 3 her iki hücre hattında da en yüksek artışları 20 μ M konsantrasyonda 3,1 kat ve 4,4 kat; türev 4 ise 160 μ M konsantrasyonda 5,5 kat ve 2,8 kat olarak göstermiştir. Araştırılan türevlerin hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkisine rastlanmamıştır. Türev 3'ün HDAC aktivitesinin %50'sini inhibe ettiği IC_{50} değeri 647 μ M ve türev 4'ün IC_{50} değeri ise 527 μ M olarak hesaplanmış, köken aldığı bileşiklerden daha güçlü HDAC inhibisyonu yaptıkları gösterilmiştir. Çalışmamız sonucunda; türev 3 ve türev 4 potansiyel ilaç adayları olarak değerlendirilmiş *in-vivo* ve farmakolojik yöntemlerle ileri araştırmalara değer bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Gerçek zamanlı PZR, HDAC inhibitörleri, Spinal kaslar atrofi, *SMN*

ABSTRACT

Uzunalli, G. Investigation of the effect of caffeic acid and butanoic acid's ester derivatives on *SMN2* gene expression. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master Thesis in Medical Biology, Ankara, 2010. *SMN* gene that is responsible for the autosomal recessively inherited spinal muscular atrophy has two copies, namely *SMN1* and *SMN2*. Homozygous deletion of the *SMN1* copy causes the disease. Although insufficient amount of expression of full-length SMN protein produced by *SMN2* gene due to splicing defect cannot prevent the disease, variable numbers of *SMN2* copies modulate the disease severity. There is no applicable cure for SMA yet, nonetheless there are researches in the direction of elevating FL-*SMN2* mRNA levels generated by *SMN2* using HDAC (histone deacetylase) inhibitors as a therapeutic strategy. However, some disadvantages regarding the HDAC inhibitors identified so far have directed researchers to look for new compounds. In this thesis, the effect on the *SMN2* gene expression of compounds with high HDAC inhibition activity and designed based on caffeic acid and butanoic acid compounds, which are known to increase *SMN2* gene expression, is investigated via real-time polymerase chain reaction method. Compounds are (*E*)-metil4-(3,4-dihidroksifenil)-2-okzobüt-3-enoat (**derivative 1**), α -o-kafeoil-3,4-dihidroksifenil-laktikasit (**derivative2**), 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavin (**derivative 3**) ve (*E*)-4-(4-metoksifenil)-1-(2,6-dimetilmorfolino) büt-3-en-1,2-dion (**derivative 4**). The highest increase in the amount of FL-*SMN2*, when derivative 1 was applied to SMA cell line, was 1.3 fold with 80 μ M concentration and was 1.9 fold with 50 μ M concentration when derivative 2 was applied. Derivative 3 and 4 were found more effective than the other two and treated to two different SMA cell lines. In both of the cell lines, for derivative 3 the highest increases with 20 μ M concentration appeared as 3.1 fold and 4.4 fold and for derivative 4 with 160 μ M concentration as 5.5 fold and 2.8 fold. There are no negative effects of the investigated derivatives on the cell viability. The inhibition of HDAC activity by derivative 3 and derivative 4 at a ratio of 50% is calculated as IC_{50} : 647 μ M and IC_{50} : 527 μ M, respectively. It is shown that these compounds perform more powerful HDAC inhibition than the compounds that they are originate from. In conclusion, derivative 3 and 4 are evaluated as potential drug candidates, and appreciated for future research with in-vivo and pharmacologic methods.

Key Words: Real-time PCR, HDAC inhibitors, Spinal muscular atrophy, SMN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Spinal Musküler Atrofi	2
2.2 SMA'nın Moleküler Genetik Temeli	4
2.3 <i>Splicing</i> ve SMA	6
2.4 SMN Proteini	7
2.5 Histon Proteinleri ve DNA paketlenmesi	9
2.5.1 Histon Asetilasyonu	10
2.5.2 Histon Deasetilaz Enzimleri	11
2.5.3 Histon Deasetilaz İnhibitörleri	13
2.6 Spinal Müskuler Atrofide Tedavi	13
2.6.1 <i>SMN2</i> Bağımlı Tedavi Yaklaşımları	15
2.6.1.1 <i>SMN2</i> Gen Transkripsiyonu ve <i>Splicing</i> 'inin Değiştirilmesi	15
2.6.1.1.1 Histon Deasetilaz İnhibitörleri	15
2.6.1.1.2 HDAC İnhibitörleri Dışında Kalan İlaçlar	17
2.6.1.2 <i>SMN2</i> Translasyonunun ve Protein Stabilizasyonunun Artırılması	18
2.6.1.3 Ekson Atlanma Hatasının Düzeltilmesi	19
2.6.2 <i>SMN2</i> Bağımsız Tedavi Yaklaşımları	20
2.6.2.1 Nörorejenerasyon	20
2.6.2.2 Nöron Korunumu	21
2.7 Tez Çalışmasında Kullanılan Bileşikler ve Kökenleri	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23

3.1 Gereçler	23
3.1.1 Hücre Kültürü	23
3.1.2 Çalışmada Kullanılan HDAC İnhibitörleri	23
3.1.3 Hücre Stoğu Hazırlanması	24
3.1.4 RNA İzolasyonu	24
3.1.5 cDNA Sentezi	24
3.1.6 Hipoksantin Fosforibozil Transferaz (<i>HPRT</i>) ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
3.1.7 Agaroz Jel Elektroforezi	25
3.1.8 Gerçek Zamanlı (<i>Real-Time</i>) Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
3.1.9 Hücre Canlılık Testi	26
3.1.10 DAPI Boyaması	26
3.1.11 HDAC Aktivitesinin IC_{50} Değerinin Hesaplanması	26
3.2 Yöntemler	27
3.2.1 Hücre Kültürü	27
3.2.2 Türev Uygulamaları	28
3.2.3 Hücre Stoğu Hazırlanması	28
3.2.4 RNA İzolasyonu	28
3.2.5 RNA Konsantrasyon Ölçümü	29
3.2.6 cDNA Sentezi	29
3.2.7 cDNA'ların Hipoksantin Fosforibozil Transferaz (<i>HPRT</i>) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Kontrolü	30
3.2.8 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	31
3.2.9 Hücre Canlılık Testi	33
3.2.10 DAPI Boyaması	34
3.2.11 HDAC Aktivitesinin IC_{50} Değerinin Hesaplanması	35
3.3 Verilerin Değerlendirilmesi	35
3.3.1 Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	35
3.3.2 Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi	36
4. BULGULAR	37
4.1 Elde Edilen RNA'ların Konsantrasyon ve Saflıkları	37

4.2 cDNA'ların Hipoksantin Fosforibozil Transferaz (HPRT) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Kontrolü	38
4.3 Türev 1 Uygulamasının Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları	39
4.4 Türev 2 Uygulamasının Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları	40
4.5 Türev 3 Uygulamasının Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları	41
4.5.1 Türev 3'ün HDAC Aktivitesinin IC 50 Değeri	43
4.6 Türev 4 Uygulamasının Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları	45
4.6.1 Hücre Canlılığı	47
4.6.2 Türev 4'ün HDAC Aktivitesinin IC 50 Değeri	49
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	58
EK	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTB	β -aktin
AFU	<i>Arbitrary Fluorescence Unit</i>
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetra asetikasit
Ex	<i>Excited</i>
Em	<i>Emitted</i>
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
FCS	Fötal dana serumu
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat kinaz
HAT	Histon asetiltransferaz
HDAC	Histon deasetilaz
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
<i>HPRT</i>	Hipoksantin fosforibozil transferaz
IC ₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
LDH	Laktat dehidrogenaz
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitor protein</i>
OSH	Ortalama standart hata
PBA	Fenil bütirat
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
SMA	Spinal musküler atrofi
SMN	<i>Survival Motor Neuron</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
snoRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein</i>
TSA	Trikostatın A

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 SMA histopatolojisi	2
A. Sağlıklı omurilik ön boynuz bölgesi	
B. SMA'lı omurilik ön boynuz bölgesi	
C. Sağlıklı infantil kas lifi	
D. SMA'lı infantil kas lifi	
Şekil 2.2 SMA gen bölgesi	4
Şekil 2.3 <i>SMN1</i> ve <i>SMN2</i> genleri arasındaki farklar	5
Şekil 2.4 SMA hastalarında <i>SMN1</i> ve <i>SMN2</i> genleri	5
Şekil 2.5 <i>SMN1</i> ve <i>SMN2</i> genlerinin pre-mRNA <i>Splicing</i> 'i	7
Şekil 2.6 SMN kompleksi	8
Şekil 2.7 Asetilasyon ve deasetilasyonun transkripsiyonel düzenlenme üzerindeki etkisi	10
Şekil 2.8 Sağlıklı HAT/HDAC dengesi	11
Şekil 2.9 SMA tedavisine temel oluşturan mekanizmalar	13
Şekil 2.10 SMA'da tedavi Yaklaşımları	14
Şekil 3.1 cDNA Sentezi	30
Şekil 3.2 Gerçek Zamanlı PZR	32
Şekil 4.1 <i>HPRT</i> PZR ile yapılan cDNA kontrolüne ait örnek jel fotoğrafı	38
Şekil 4.2 Türev 1 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	39
Şekil 4.3 Türev 2 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	40
Şekil 4.4 GM03813 hücre hattına türev 3 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	41
Şekil 4.5 GM09677 hücre hattına türev 3 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	42
Şekil 4.6 Türev 3'ün GM03813 ve GM09677 hücre hatlarındaki etkisinin karşılaştırılması	43
Şekil 4.7 Türev 3'ün HDAC aktivitesi üzerindeki IC ₅₀ grafiği	44

Şekil 4.8 GM03813 hücre hattına türev 4 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	45
Şekil 4.9 GM09677 hücre hattına türev 4 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	46
Şekil 4.10 Türev 4'ün GM03813 ve GM09677 hücre hatlarındaki etkisinin karşılaştırılması	47
Şekil 4.11 SMA'lı fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü A. Kontrol B. 200 µM konsantrasyonda türev 4 uygulaması	48
Şekil 4.12 SMA'lı fibroblastlarda DAPI ile çekirdek boyaması A. Kontrol B. 200 µM konsantrasyonda türev 4 uygulaması	48
Şekil 4.13 Türev 4'ün HDAC aktivitesi üzerindeki IC ₅₀ grafiği	50

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1 RNA konsantrasyon ve saflıkları	37
Tablo 4.2 Türev 1 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	39
Tablo 4.3 Türev 2 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	40
Tablo 4.4 GM03813 hücre hattına türev 3 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	41
Tablo 4.5 GM09677 hücre hattına türev 3 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	42
Tablo 4.6 Türev 3 IC ₅₀ verileri	44
Tablo 4.7 GM03813 hücre hattına türev 4 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	45
Tablo 4.8 GM09677 hücre hattına türev 4 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları	46
Tablo 4.9 Türev 4 IC ₅₀ verileri	49

1. GİRİŞ

Spinal musküler atrofi (SMA), omurilikteki motor nöronları etkileyen nörodejenereatif bir hastalıktır (1,2). Hastalığa neden olan *survival motor neuron* geni *SMN1* ve *SMN2* olmak üzere iki kopya halinde bulunmaktadır. SMA hastalarının %93-96'sında *SMN1* geni homozigot delesyonu ve en az bir adet *SMN2* kopyası vardır. *SMN2* kopya sayısı artışına bağlı olarak hastalığın şiddeti azalmaktadır (3,4). *SMN1* ve *SMN2* genleri %99 oranında benzer olsalar da bazı farklılıklar içerirler (9). Bu farklılıklardan biri olan ekson 7'deki sitozinin timine transisyonu, ekson 7'nin atlanmasına neden olmaktadır (8). *SMN2* geninden %80-90 oranında oluşan bu kısa mRNA, oligomerize ve stabil protein üretemezken, bu genden %10-20 oranında oluşan tam uzunluktaki protein işlevseldir (1). Bu nedenle *SMN2* geninden oluşan tam uzunluktaki mRNA miktarının artırılması SMA için tedavi yaklaşımı olmuştur. Dolayısıyla ekson 7 atlanmasını önleyen ya da *SMN2* promotörünü aktive eden histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin, SMA tedavisinde aday bileşikler olabileceklerini gündeme getirmiştir (10).

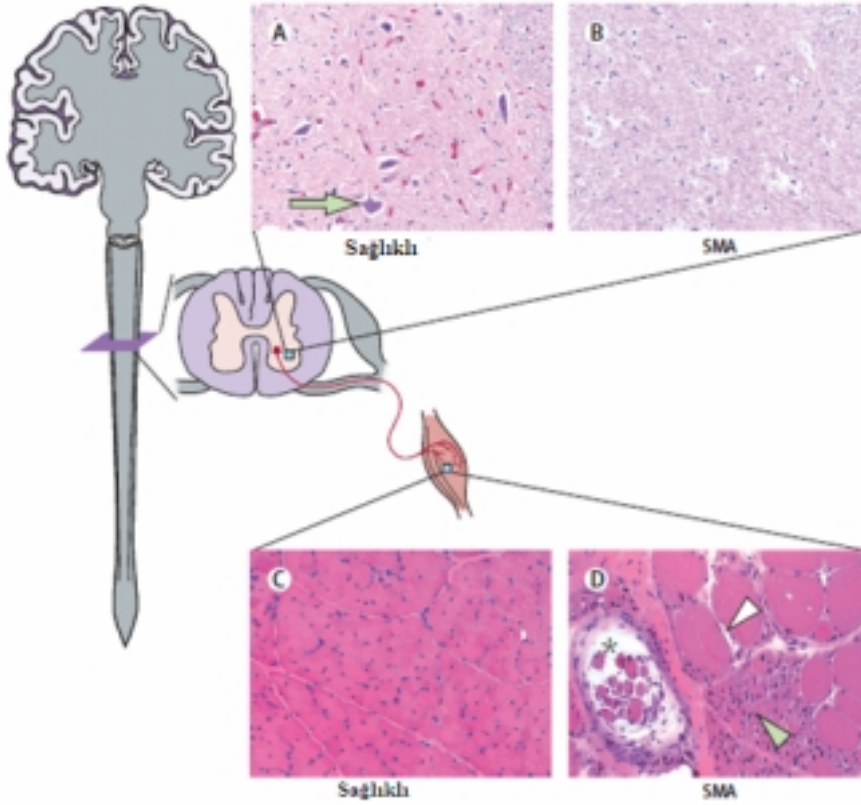
Bu tez çalışmasında daha önce Anabilim Dalımızda tamamlanmış olan "RNA *Splicing* Hatalarının Neden Olduğu Kalıtsal Hastalıklarda İlaç Araştırma Geliştirme Çalışmaları (TÜBİTAK-KAMAG Proje No: 105G014)" başlıklı proje kapsamında HDAC inhibisyon aktivitesi yüksek olarak tanımlanan bileşiklerden teröpatik olarak önemli olduğu düşünülen dört bileşik incelenmiştir. Bu bileşiklerden [(*E*)-metil 4-(3,4-dihidroksifenil)-2-okzobüt-3-enoat (türev 1) ve (*E*)-4-(4-metoksifenil)-1-(2,6-dimetilmorfolino) büt-3-en-1,2-dion (türev 4) bütenoik asitten türevlendirilmiş ve sentezlenmiştir. α -o-kafeoil-3,4-dihidroksifenil-laktik asit – rosmarinik asit (türev 2) ve 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon – kuersetin (türev 3) ise kafeik asit türevleridir. Çalışmamızda yüksek HDAC aktivitesi bulunan bu dört bileşiğin, tip I SMA'lı fibroblastlara uygulanması sonucunda *SMN2* mRNA miktarlarındaki değişikliğin analiz edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Spinal Musküler Atrofi

Spinal msküler atrofi (SMA), omurilikte ön boynuz motor nöron hasarı ve ilerleyen iskelet kası denervasyonu ile tanımlanmaktadır. Kistik fibrozisten sonra en sık görülen otozomal resesif hastalıktır ve toplumda taşıyıcılığı 1/35, görülme insidansı ise 1/6000'dir (1,2).

Hastalığın teşhisi elektromiyogram ve kas biyopsisiyle konulmakta ve genetik testlerle kesinleştirilmektedir. Biyopsi örneklerinde atrofik gruplar ve hipertrofik kas lifleri görülmektedir (4,8) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 SMA histopatolojisi (4)

(A) Sağlıklı (yeşil ok: motor nöron) ve (B) SMA'lı omurilik ön boynuz bölgesini, (C) sağlıklı ve (D) SMA'lı infantil kas lifini göstermektedir. (Beyaz ok: hipertrofik lifler, yeşil ok: atrofi grubu)

Hastalığın SMA Konsorsiyumu tarafından belirlenen dört tipi vardır. Bu grupta, hastalığın görülmeye başladığı yaşa ve gerçekleştirilebilen motor fonksiyonlarına bağlıdır.

SMA Tip I (Werdning-Hoffman Hastalığı): Hastalığın en ağır seyreden formudur. Çoğu çocuk doğduğunda asemptomatiktir¹. Hastalık ancak 2-4. aylarda kendini gösterir ve iki yıl içinde ölümlerle sonlanır. Hastalarda belirgin bir şekilde hipotoni, kas zayıflığı, yutma ve nefes problemleri vardır. Hastaların baş kontrolü yoktur ve yardımsız oturamazlar (4).

SMA Tip II: Ara ya da kronik infantil form olarak bilinir. Hastalık kendini 7-18. aylarda gösterir. Hastalar desteksiz oturabilirler. Çok az bir kısmının bacakları üzerinde durabilmesi söz konusuysen yürümeleri mümkün değildir. Yaşam süresi tip I'e göre uzundur fakat hastalar çocukluk döneminde solunum problemleri nedeniyle kaybedilir (8).

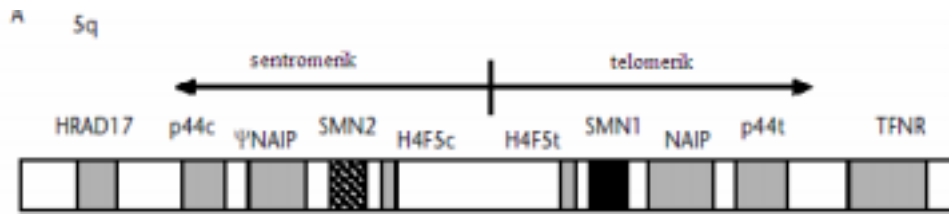
SMA Tip III (Kugelberg-Welander Hastalığı): SMA'nın en hafif seyreden formudur. 18. aydan itibaren semptomatik olmaya başlar. Hastalık 3 yaşından önce görülüyorsa tip IIIa, sonra görülüyorsa tip IIIb olarak adlandırılır. Bacak ve omuzdaki kaslarda güçsüzlük görülür. Tip IIIa SMA hastalarının %44, tip IIIb SMA hastalarının ise %90'ında yirmili yaşlara kadar yürüyebilme becerisi vardır (4).

SMA Tip IV: Hastalığın nadir görülen yetişkin formudur. Hastalık kendini otuzlu yaşlarda gösterir. Yaşam süresi kısalması söz konusu değildir (4,8).

¹ Hastalar bazen doğduklarında da semptomatik olabilmektedir. Bu durum bazı araştırmacılar tarafından SMA Tip 0 olarak adlandırılır (1).

2.2 SMA'nın Moleküler Genetik Temeli

1990 yılında SMA gen bölgesi bağlantı analiziyle kromozom 5q11.2-13.3'da haritalanmıştır. Bu bölge inversiyon ve duplikasyonların bulunduğu, 500kb'lık bir alana karşılık gelmekte ve sentromerik/telomerik (*SMN2/SMN1*) kopyalara sahip *SMN* (*survival motor neuron*), *NAIP* (*Neuronal apoptosis inhibitor protein*), *p44* (bazal transkripsiyon faktör alt ünitesi) ve *H4F5* genlerini bulundurmaktadır (11,12) (Şekil 2.2).

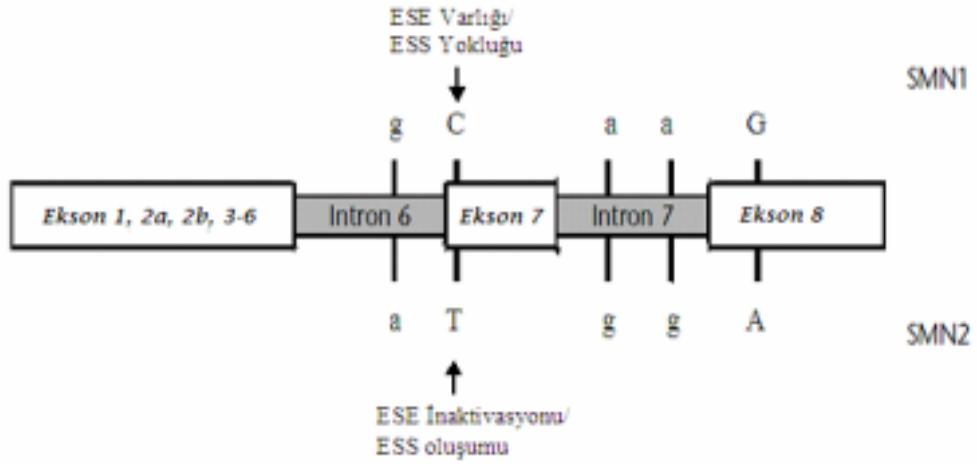


Şekil 2.2 SMA gen bölgesi. (6)

1995 yılında *SMN* geninin telomerik kopyasındaki homozigot delesyonun hastalığa neden olduğu saptanmıştır. Bu bölgede bulunan diğer genlerdeki mutasyonların hastalarda tek başına bulunmaması ancak *SMN* delesyonu varlığında hastalığa yol açması nedeniyle, bu genlerin SMA ile ilişkili olsalar bile hastalıktan sorumlu gen olmadıklarını göstermiştir (13).

Evrimsel olarak, *SMN* gen duplikasyonu primatların rodentlerden ayrıldığı noktada meydana gelmiştir. *SMN* geni farelerde sadece bir kopya olarak bulunmaktadır. Şempanzelerde ise birden çok *SMN* kopyası bulunmasına rağmen *SMN2* yoktur, *SMN2* insana özgüdür (4). *SMN2*, sağlıklı insanların %5-10'unda bulunmamasına rağmen, hastalarda en az bir adet bulunmaktadır (5,6).

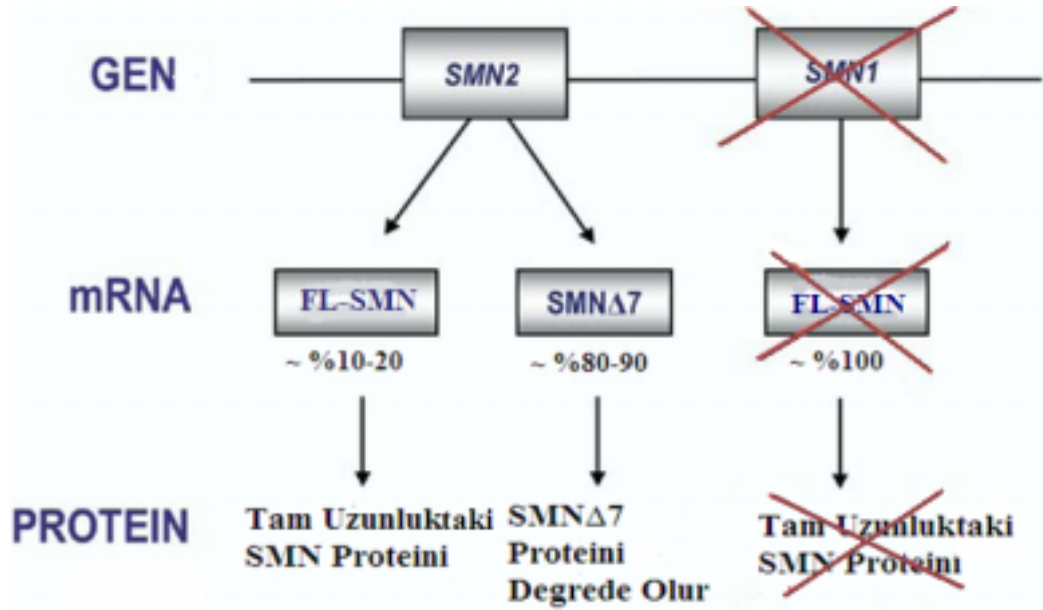
SMN geni 9 ekson (ekson 1, 2a, 2b, 3-8) ve 8 introndan oluşmaktadır (14). *SMN1* ve *SMN2* genleri %99 oranında benzerlik göstermesine (9) ve aynı promotora sahip (15) olmasına rağmen, birbirlerinden 5 bazlık bir farklılıkla ayrılmaktadır. Bu farklılıklardan en önemlisi 7. eksonun 6. pozisyonundaki sitozinin timin (C>T) transisyonudur (8) (Şekil 2.3). Bu transisyon, sessiz bir mutasyon olmasına rağmen *SMN* geninin alternatif olarak işlenmesi (alternatif *splicing*) sırasında 7. eksonun atlanmasına neden olmaktadır.



Şekil 2.3 SMN1 ve SMN2 genleri arasındaki farklar (6)

ESE: *exonic splicing enhancer*, ESS: *exonic splicing silencer*

SMN2 geninde ekson atlanması nedeniyle %80-90 oranında kısaltılmış (SMN Δ 7) mRNA, %10-20 oranında ise tam uzunluktaki (FL-SMN) mRNA meydana gelmektedir (8) (Şekil 2.4). SMN Δ 7 transkribinden oluşan protein, FL-SMN'den oluşana göre 16 aminoasit daha kısadır (16). Bu durum SMN Δ 7 proteinin oligomerizasyon yeteneğine zarar verir ve stabil olmayan bu protein hızlı bir şekilde degrades olur.



Şekil 2.4 SMA hastalarında SMN1 ve SMN2 genleri (11)

Hastalarda *SMN1* geninin olmayışı hastalığın ciddiyetindeki farkın *SMN2*'ye bağlı olduğunu göstermektedir. SMA tip I hastalarında iki ya da üç kopya olarak bulunan *SMN2* geni normal seviyenin ancak %9'u kadar FL-SMN üretebilmektedir. SMA tip II hastalarında bulunan üç ya da daha fazla kopya ise normal seviyenin ancak %14'ü kadar FL-SMN üretimi yapmaktadır. SMA tip III hastalarının sahip oldukları dört ya da sekiz kopya onlara normal SMN proteinin yaklaşık %18'ini sağlamaktadır. SMN protein seviyesi normalin %23'lük kısmına ulaştığında, motor nöronlar normal fonksiyona sahip olurlar (1). Ayrıca *SMN1* homozigot delesyonuna sahip asemptomatik bireyler de bulunmaktadır. Bu bireylerin platin 3 gen ifadesinin, SMA fenotipi gösteren bireylerden daha yüksek ve nöritlerin daha uzun olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle hastalığın ciddiyetini etkileyen platin 3 geni, modifiye edici gen olarak kabul edilmektedir (11,17).

2.3 *Splicing* ve SMA

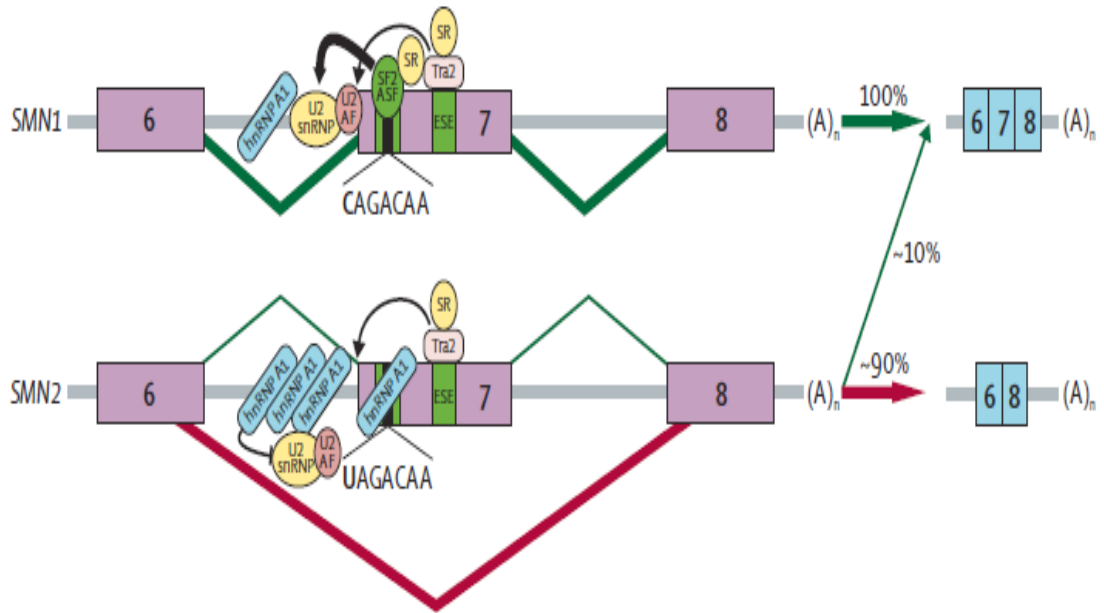
Genetik bilgi akışı; DNA'daki bilginin transkripsiyon ile mRNA'ya ve onu takiben translasyon ile proteine dönüşmesiyle sağlanmaktadır. Bilgi akışı sırasında öncül mRNA, başlıklama (5' ucuna 7-metil guanozin takılması), poliadenilasyon (3' ucuna 150-250 adenin takılması) ve *splicing* modifikasyonları ile olgunlaştırılmaktadır (18).

Splicing, öncül mRNA'daki intronların çıkarılıp ekson dizilerinin birleştirilmesi işlemi olup ve 5 adet *small nuclear ribonucleoprotein*'nin (snRNP) çok sayıda protein ile oluşturduğu *spliceosome* kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir. Intronların çıkartılmasını *exonic splicing enhancer* (ESE) ve *exonic splicing silencer* (ESS) gibi *cis* ve onlarla etkileşime giren *trans* elementler kontrol etmektedir (16,19,20).

Öncül mRNA transkriptinin *splicing*'i sonucunda, *SMN1* geninden tam uzunlukta, *SMN2* geninden ise ekson 7'yi içermeyen daha kısa bir transkript meydana gelmesinin nedeni *SMN1* geni ekson 7 içinde bulunan ESE dizisidir. Bu dizi SF2/ASF proteinleri tarafından tanınmakta ve diğer birçok faktörün de yardımıyla ekson 7 etkilenmeksizin sadece intron 6'nın çıkarılmasına, böylece

splicing işleminin doğru olarak gerçekleşmesine olanak vermektedir. *SMN1*'deki ESE dizisinin 5' yönünde tanımlanan AG'ce zengin ikinci bir ESE bölgesine Htra2- β 1 gibi proteinlerin bağlanması ile, ekson 7'nin dahil edilmesi kolaylaşmaktadır (11).

Ancak *SMN2*'deki C>U transisyonu ekson 7 içindeki ESE dizisine denk geldiğinden ekson 7'nin atlanması durumu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.5). Söz konusu durumun işleyişini açıklamak üzere iki farklı görüş ortaya atılmıştır. ESE inaktivasyonu olarak adlandırılan birinci görüşe göre, baz değişimi nedeniyle SF2/ASF ESE dizisine bağlanamamakta ve ekson 7 olgun mRNA'ya dahil olamamaktadır. Diğer görüş ise C>U transisyonunun ESS oluşumuna neden olduğu yönündedir. Oluşan ESS'nin hnRNP A1 proteini ile etkileşime girerek ekson 7'nin dahil edilmesini önlediği düşünülmektedir (4,11).



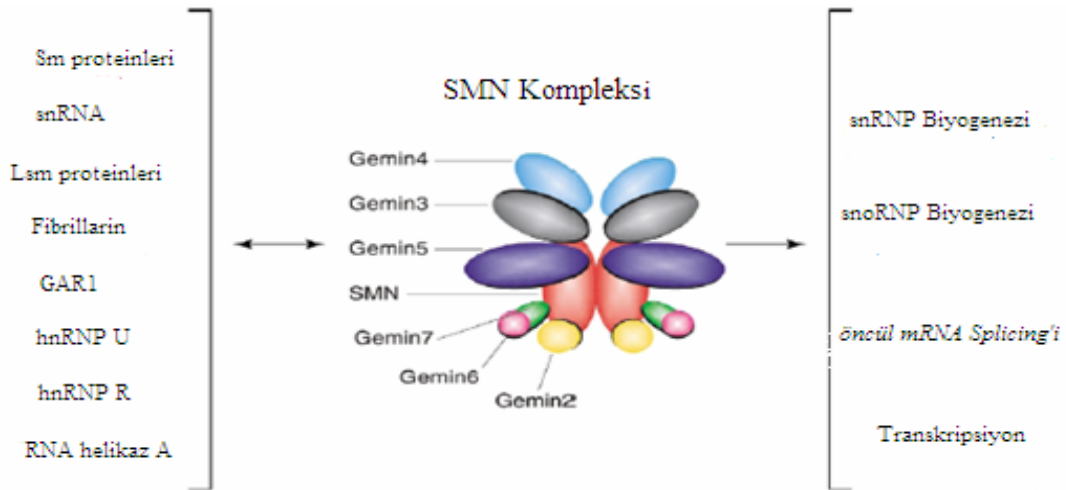
Şekil 2.5 *SMN1* ve *SMN2* genlerinin pre-mRNA *Splicing*'i (4)

2.4 SMN Proteini

SMN proteini 294 amino asit içeren, 38kD ağırlığında metazoalardan insana kadar ifade edilen, sitoplazma ve çekirdekte yerleşim gösteren bir proteindir (21). Çekirdekte SMA şiddetiyle ilişkili olduğu bilinen *gem* yapıları içinde yoğunlaşmış halde bulunmaktadır. SMN proteini tip I SMA'lı hastalarda

azalmakta veya hiç bulunmamaktadır. Oligomerize formdaki bu proteinin, *gemin* proteinleriyle kompleks oluşturması stabilitesini artırıcı bir etkidir. Hastalarda görülen SMN Δ 7'nin ise oligomerizasyon sorunu nedeniyle stabil kalamadığı bilinmektedir (11).

SMN kompleksi *gemin* proteinleri dışında da birçok proteinle ilişki içindedir. Bu kompleks ribonükleoprotein biyogenezi, metabolizması ve taşınımında rol oynadığı gibi öncül mRNA *splicing*'i ve transkripsiyon mekanizmalarında da görev almaktadır (Şekil 2.6) (22,23). Ayrıca *β -aktin* mRNA'sının 3' kodlanmayan bölgesine hnRNP R proteini bağlanmasına, böylece *β -aktin* mRNA'sının nöronların aksonlarına ve büyüme konilerine taşınmasına olanak vermektedir. SMN proteini eksikliğinde motor nöron aksonlarının kısa ve büyüme konilerinin küçük olduğu bildirilmiştir (4,21,23).



Şekil 2.6 SMN kompleksi (22)

Sol sütun: SMN kompleksinin etkileşime girdiği proteinler, sağ sütun: görev aldığı biyolojik olayları göstermektedir.

SMN protein düzeyi gelişimsel döneme göre farklılık göstermekte, embriyonik dönemde fazla olan SMN miktarı erken postnatal dönemde azalmaktadır. İnsan, fare, *C. elegans*, *S. Pompe* üzerinde yapılan araştırmalar SMN proteinin bulunmadığı durumlarda embriyonik letalite olduğunu göstermiştir (21).

2.5 Histon Proteinleri ve DNA paketlenmesi

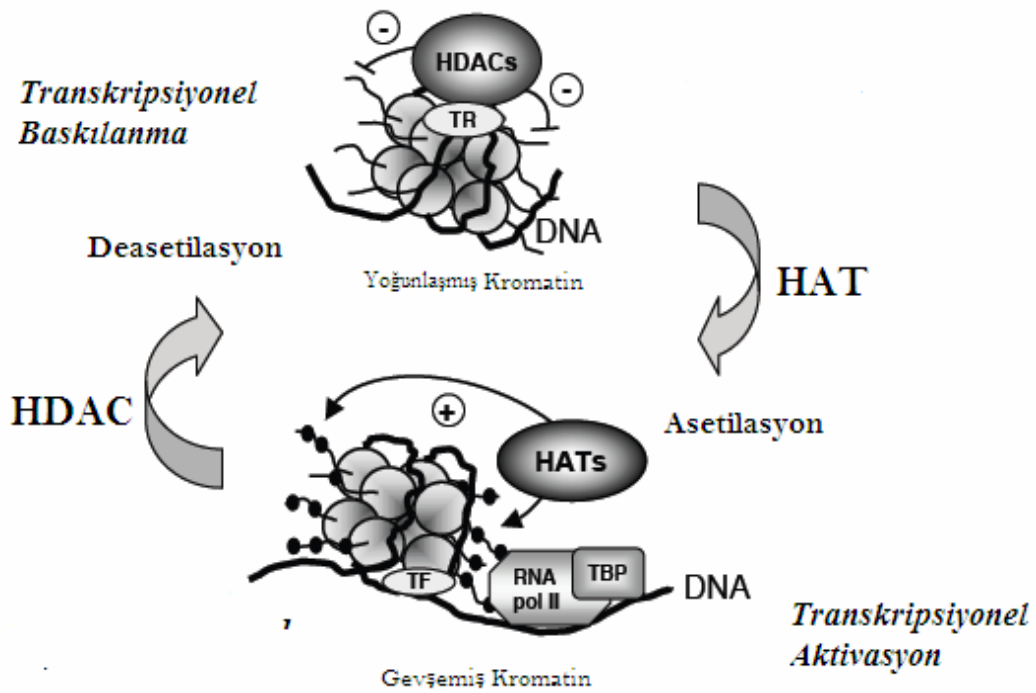
DNA, çekirdek içinde kromatin yapısı halinde bulunmaktadır. Kromatin içindeki DNA, düzenli ve kondanse halini histon ve histon olmayan proteinler yardımıyla sağlamaktadır. Histonlar ökaryotlarda son derece korunmuş olan, hücrede fazla miktarda bulunan, lizin ve arjinin amino asitlerince zengin, pozitif yüklü proteinlerdir. H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere beş tipi mevcuttur (18).

Sıkı paketlenmiş kromatin yapısı birbiri ardına sıralanan nükleozomlardan meydana gelmektedir. Nükleozomlar histon kor oktameri, oktamer etrafındaki 146 baz çiftlik DNA ve bağlayıcı DNA'dan oluşmaktadır. Oktamer yapısı ilk önce H3-H4 dimerinin H2A-H2B dimeriyle birleşmesi ve ardından oluşan tetramerin, aynı yolla oluşan başka bir tetramer ile kompleks oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Bağlayıcı DNA ise iki nükleozom arasındaki yaklaşık 80 baz çifti içeren DNA parçasıdır (18). Paketlenme; DNA'nın histon koruna sarılıp nükleozomları oluşturması, H1 proteininin bu kompleks etrafına tutunarak daha sıkı bir yapı oluşumuna yol açması ve bunu takiben nükleozomların kendi üzerilerine katlanması ile oluşmaktadır (18,24).

Nükleozom yapısı oluşurken histonlar amino ucu kuyrukları dışarıda kalacak şekilde yerleşmektedir. Bu durum histonların protein-protein etkileşimlerine olanak tanıdığı gibi, amino ucundaki belirli amino asitlerin asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, sumolasyon, ubikütinasyon ve ADP-ribosilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara açık olmasına imkan tanıyarak kromatinin epigenetik olarak düzenlenmesini sağlamaktadır. Çeşitli histon modifikasyonlarının etkileşimleri histon kodu hipotezini doğrulamıştır. Bu hipoteze göre, farklı modifikasyonların sinerji içindeki hareketleri transkripsiyonel baskılanma ya da açılma şeklinde kromatinin yeniden düzenlenmesine neden olmakta ve böylece kromatinde heterokromatin ve ökromatin bölgeleri belirlenmektedir (25,26).

2.5.1 Histon Asetilasyonu

Bugüne kadar histonlar üzerinde en çok çalışmanın yapıldığı modifikasyon tipi asetilasyondur (24). Geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bu olay, hücrede histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) ile dengede tutulmaktadır (27). Histonların lizin amino asidinin ϵ -amino grubuna HAT enzimleri tarafından negatif yüke sahip asetil grubu eklenmesiyle, lizin amino asidi pozitif yükünü kısmi olarak kaybetmektedir. Pozitif yükü sayesinde bağlandığı negatif yüklü DNA fosfat omurgası arasında elektrostatik çekim azalmakta, böylece daha gevşek kromatin bölgesi oluşmakta ve genlerin promotor bölgelerine bağlanabilmektedir. HDAC'lar ise eklenen asetil grubunu çıkarıp kromatinin tekrar kondanse hale gelmesini sağlayarak transkripsiyonu baskılamaktadır (24) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Asetilasyon ve deasetilasyonun transkripsiyonel düzenlenme üzerindeki etkisi. (28)

(TR: transkripsiyonel baskılayıcı, TF: transkripsiyon faktörü, TBP: TATA-bağlanan protein, HAT: histon asetil transferaz, HDAC: histon deasetilaz)

Hücresel asetilasyon dengesinin bozulması hiperasetilasyon ya da hipoasetilasyona neden olur ki, iki durum da hücre için ölümcüldür. Örneğin nöronlarda normalde sessiz olan bir bölgenin hiperasetilasyonu veya transkripsiyonel olarak aktif bir bölgenin hipoasetilasyonu, ALS (Amyotrofik lateral skleroz) gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöron ölümüyle sonuçlanmaktadır (28) (Şekil 2.8).

HAT ve HDAC enzimleri gen aktivitesini belirlemelerinin yanı sıra histon olmayan proteinleri de modifiye ederek farklılaşma, apoptoz, hücre döngüsü, sinyalizasyon ve DNA tamiri gibi diğer hücresel yolları etkilemektedirler (25).



Şekil 2.8 Sağlıklı HAT/HDAC dengesi (28)

2.5.2 Histon Deasetilaz Enzimleri

Histon deasetilazlar bakterilerden hayvanlara kadar geniş spektrumda yer alan enzimlerdir. Görevleri gereği ilk başlarda sadece çekirdekte bulunduğu düşünülen bu enzimlerin, sitoplazma ve mitokondri gibi histonların bulunmadığı ortamlarda da tanımlanmış olmaları, histon olmayan substratlarının olduğunu ve evrimsel süreçte histon proteinlerinin yokluğunda evrimleştiklerini göstermektedir (29).

HDAC enzimleri DNA bağlanma aktivitelerinin zayıf olması nedeniyle, DNA'ya bazı transkripsiyonel aktivatör veya baskılayıcılarla birlikte bağlanmaktadır. Bu nedenle transkripsiyonel faktörlerdeki değişiklikler HDAC aktivitesini etkileyebilmektedir (30).

Memelilerde tanımlanmış olan 18 adet HDAC'ın sınıflandırılmaları dizi benzerliklerine ve kofaktör bağımlılıklarına göre yapılmaktadır (31). Farklılıkları

enzimatik fonksiyonlarından, yapılarından, hücre içi yerleşimlerinden ve ifade düzeylerinden gelmektedir. HDAC'ların çoğu Zn^{+2} bağımlı katalitik bölge içermekte ve taşıdıkları birbirinden farklı bölgeler sayesinde hedef özgüllüğü ve hedefe uygun regülasyon özelliği kazanmaktadırlar (32).

I. Sınıf HDAC'lar: HDAC 1, 2, 3 ve 8'den oluşan bu sınıf nöronal gelişim, farklılaşma, nöron sağ kalımı ve tümörögenizde rol oynamaktadır (24,30). HDAC 1 ve 2 sadece çekirdek yerleşim sinyali bulundurmakta, HDAC 3 bu sinyal yanında sahip olduğu çekirdek dışına gönderim sinyali ile sitoplazma-çekirdek arasında taşınmaktadır (33). HDAC 1, 2 ve 3'ün DNA'ya bağlanan proteinlerle kompleks oluşturarak promotor bölgeleri etkilemeleri, hedef gene özgü çalışabildiklerini göstermektedir. HDAC 8'in sınıf içi dizi benzerliği azdır ve kristal yapısı ilk aydınlatılan enzim olduğundan diğerlerinin katalitik aktivitesi hakkında bilgi sağlamıştır. Bu enzimin başka proteinlerle kompleks oluşturmadığı ve aktin ile etkileşerek düz kas kasılmasının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (34,35).

II. Sınıf HDAC'lar: IIa ve IIb olmak üzere iki sınıfa ayrılan bu gruptaki enzimler I. sınıf ile yapısal olarak benzerler. IIa alt grubunda olan HDAC 4, 5, 7 ve 9 enzimlerinin ifadeleri dokular arasında farklılık göstermektedir. HDAC 4,5 ve 7 çekirdek-sitoplazma arasında taşınırken, HDAC 9 çoğunlukla olarak çekirdekte bulunmaktadır (30-33). Sınıf IIb enzimlerinden olan HDAC 6, diğer HDAC'lardan farklı olarak iki katalitik bölgeye sahiptir. Bu bölgelerden birinin histon deasetilasyonundan sorumlu olduğu diğerinin ise tübül deasetilasyonu yaparak mikrotübül bağımlı hücre hareketinde görevli olduğu bilinmektedir. IIb'ye ait diğer bir enzim olan HDAC 10'un hücre döngüsü regülasyonunda rol aldığı bilinmektedir (27,35).

III. Sınıf HDAC'lar: Öncelikli substratları histonlar olmayan bu aile, kofaktör olarak NAD^{+} 'yi kullanan yedi adet SIRT enziminden oluşmaktadır (31).

IV. Sınıf HDAC'lar: Yapısal olarak sınıf I ve II'den farklıdır ve sadece fonksiyonu tam olarak anlaşılmamış ve çoğunlukla çekirdekte yerleşim gösteren HDAC 11 enzimini içermektedir (30).

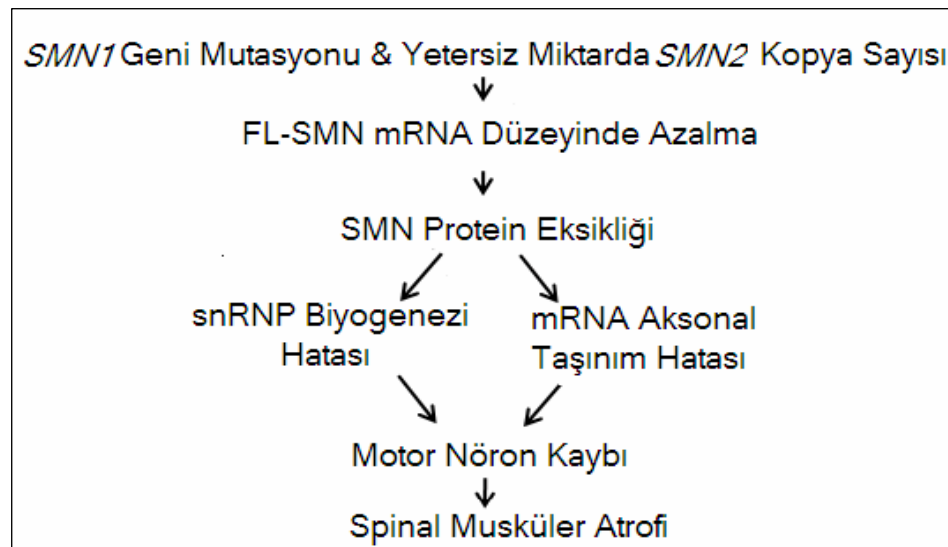
2.5.3 Histon Deasetilaz İnhibitörleri

HDAC enzimleri histon olan ve olmayan substratlarını deasetile ederek gen ifadesi ve hücre çoğalmasının kontrolü, farklılaşma, hücre göçü ve hücre ölümü gibi önemli hücresel yollarda görev almaktadır (36). Bu bileşiklerin inhibe edilmeleri histon proteinlerinin asetilli kalmasına ve böylece transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya daha kolay bağlanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle HDAC inhibisyonu sağlayan bileşikler potansiyel ilaç hedefleri olarak düşünülmektedir (33).

HDAC inhibitörlerinin hastalık tedavisinde kullanılmasının en önemli nedeni *in vivo* şartlarda iyi tolere edilebilmeleridir. Çünkü HDAC inhibitörleri HDAC'ların içinde bulunduğu komplekslere zarar vermeden sadece enzimatik aktiviteyi baskılamaktadır (33).

2.6 Spinal Musküler Atrofi Tedavi

SMA için henüz yeterli bir tedavi yöntemi bulunmamakla birlikte hastalık mekanizması (Şekil 2.9) hakkında edinilen bilgiler ışığında tedavi yöntemi olabilecek ilaç adayları ve tedavi yaklaşımları tanımlanmıştır (Şekil 2.10) (5).



Şekil 2.9 SMA tedavisine temel oluşturan mekanizmalar (5)



Şekil 2.10 SMA'da tedavi Yaklaşımları

2.6.1 *SMN2* Bağımlı Tedavi Yaklaşımları

SMA hastalarında *SMN2* geni kopya sayısı fazlaştıkça hastalık şiddetinin azaldığı ve fare modellerindeki çalışmalarda semptom görülmeden önce *SMN2* protein seviyesi artırıldığında motor nöron fonksiyonlarının korunabildiği (3,7) yönündeki bilgiler *SMN2* bağımlı yaklaşımları önemli kılmaktadır.

2.6.1.1 *SMN2* Gen Transkripsiyonu ve *Splicing*'inin Değiştirilmesi

2.6.1.1.1 Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Günümüzde HDAC inhibisyonu yapan birçok bileşik tanımlanmıştır. Bu inhibitörlerin, genlerin %7-10'nun ifadesini değiştirdiği ve birçok farklı biyolojik yolakta rol aldığı bilinmektedir. Bugüne kadar tanımlanmış inhibitörler yapısal özelliklerine göre hidroksamik asitler, karboksilik asitler, siklik tetrapeptidler, benzamidler ve elektrofilik ketonlar olarak beş sınıfa ayrılmaktadır (37). Karboksilik asit, hidroksamik asit ve benzamid sınıflarının *SMN2* geni üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (38).

Sodyum bütirat: Karboksilik asitler sınıfından sodyum bütirat, *SMN* ifadesini arttırdığı gösterilen ilk bileşiktir. Küçük moleküler ağırlığa sahip olduğundan, kan-beyin bariyerini aşabilen sodyum bütirat kısa zincirli yağ asitlerindedir (7). *SMN* mRNA'sını *SMN2* promotorunu aktive etmek yoluyla artırmaktadır. Ayrıca SR proteinlerinin ifadesini artırarak mRNA'ya ekson 7 dahil edilmesini düzenlemektedir. SMA tip II ve III farelere uygulandığında klinik tabloyu hafifleterek yaşam süresini uzatmıştır (39). Sodyum bütirat, serumdaki yarı ömrünün kısa olması, özgül olamaması ve etkisini milimolar dozda göstermesi gibi olumsuz özellikler taşımaktadır (7,35).

Valproik Asit: Karboksilik asit grubunda olan ve epilepsi tedavisinde kullanılan bir diğer bileşik valproik asittir. Sodyum bütirata göre serum yarı ömrü daha uzundur ve serumdaki miktarın %15'i kan-beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemine ulaşmaktadır (8,25). Yapılan çalışmalarda valproik asidin hem *SMN2* promotorunu aktive ederek, hem de *splicing*'i etkileyerek ekson 7 dahil

edilmesini sağladığı ve bu yolla FL-SMN miktarını artırdığı gösterilmiştir (40,41). Bunun yanında HDAC2'nin proteozomal yıkımını artırdığı ve DNA demetilasyonunu tetiklediği bilinmektedir (25,31,42). *Food and Drug Administration (FDA)* tarafından onaylı olan bu bileşik faz II aşamasındadır (4).

Fenil bütirat: SMA tedavisi için aday gösterilen diğer bir bileşik fenil bütirattır. Diğer karboksilik asit türevleri gibi FL-SMN2 transkriptini, protein miktarını (43) ve aynı zamanda da *gem* sayısını artırmaktadır (4). FDA onaylı olan bu ilacın iyi tolere edilebilen ve yarı ömrü kısa olan zayıf bir HDAC inhibitörü olduğu bilinmektedir (5,7).

Polifenoller: Karboksilik asitlerin bir grubu olan polifenolik bileşikler de birçok genetik hastalık için ilaç adayı olmuştur. Bu bileşiklerden resveratrol, kurkumin ve EGCG (*epigallocatechin galate*) uygulamaları polifenolik bileşiklerin SMA'lı fibroblastlarda *SMN2* ifadesini, SMN protein miktarını ve *gem* sayısını artırdığını kanıtlanmıştır (38,44).

TSA: Trikostatin A (TSA) diğer inhibitörlere göre en kuvvetli grubu oluşturan hidroksamik asit grubu üyesidir. TSA, *Streptomyces*'lerden elde edilen antifungal bir bileşiktir (4,28). HDAC inhibitörü olan bu bileşiğin farklılaşma ve hücre döngüsünü baskıladığı, apoptozu indüklediği bilinmektedir (27). SMA'lı farelerde yapılan çalışmalarla TSA'nın H3 ve H4 histonlarının asetilasyonunu sağladığı, *SMN2* genini aktive ettiği, sağ kalım ve motor nöron korunumunu artırdığı bildirilmiştir (45).

SAHA: Yapısal olarak TSA'ya benzeyen SAHA (vorinostat- süberoylinid hidroksamik asit) ise FDA onayı ile kanser çalışmalarında kullanılan bir ilaçtır (46). Mikromolar altı dozlarda etkili olan SAHA, iyi tolere edilmekte ve kan-beyin bariyerini geçebilmektedir (7). SAHA'nın *in vitro* ve *ex vivo* uygulamaları SMN mRNA ve proteininde artışa yol açmış (47), *in vivo* uygulamalarında ise farelerde sağ kalımı artırdığı, SMA'dan kaynaklanan kilo ve motor nöron kaybını azalttığı, motor gelişimlerini düzelttiği ve kas fibrillerini artırdığı gözlenmiştir (48).

Panobinostat: Kanser tedavisinde kullanılan, kan-beyin bariyerini geçebilen ve bir hidroksamik asit türevi olan panobinostat (LBH589) FDA tarafından onaylanmıştır. Panobinostat, *gem* sayısında ve SMN protein miktarında

artışa neden olmaktadır. FL-SMN2 mRNA miktarını artırırken, SMN Δ 7 miktarını azaltması veya değiştirmemesi ayrıca *splicing* faktörü olan Htra2- β 1 miktarını artırması, *splice* hatasını düzelttiğini göstermektedir (49).

Tüm olumlu bulgulara rağmen, hidrosamatların toksisiteleri, zayıf farmakolojik özellikleri ve seçici olmamaları tedavide kullanılabilmesi açısından sorun teşkil etmektedir (37).

M344: HDAC inhibitörlerinin benzamid grubu üyesidir. SMA tedavisinde aday bileşik olarak gösterilmiş (47,50) ve FL-SMN2 ifadesinde, SMN protein seviyesinde, *gem* sayısında ve *splicing*'de görevli Htra2- β 1 ve SRp20 proteinlerinde artışa neden olmuştur. Ancak bu bileşiğin yüksek konsantrasyonunun toksik olması ve artışların her hücre hattında görülmemesi gibi olumsuz özellikleri bulunmaktadır (50).

2.6.1.1.2 HDAC İnhibitörleri Dışında Kalan İlaçlar

Aklarubisin: Kanser tedavisinde kullanılan antibiyotiklerindendir. Transkripsiyon faktörlerinin ifadesini artırdığı ve motor nöron gelişiminde rol oynayan tip II DNA topoizomerazlar ile etkileşime girdiği bilinmektedir (7). Fibroblastlarda yapılan çalışmalar akklarubisinin *splicing*'i etkilediği, *gem* sayısını artırdığı ve ayrıca *SMN2* ifadesini artırdığı bilinen Stat5 (*signal transducer and transcription activator 5*) proteininin aktivasyonunu sağladığı bildirilmiştir (51,52).

Albuterol (Salbutamol): β_2 -adrenerjik agonisti olan bu bileşik kronik bronşit ve astım tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. *In-vitro* çalışmalarda FL-SMN2 miktarını, SMN proteinini ve *gem* sayısı artırıcı gösterilmiştir (53).

Hidroksiüre: Hidroksiüre, orak hücre anemili ve kanserli hastalarda kullanılan düşük toksisiteli ve kan-beyin bariyerini geçebilen ribonükleotid redüktaz inhibitörüdür. SMA tedavisi amacıyla *in-vitro* ve *in-vivo* araştırmaları bulunmaktadır. SMA'lı lenfositlerde yapılan çalışmalarda *splice* hatasını düzeltmek suretiyle ekson 7 içeren mRNA'da ve *gem* sayısında artış gözlenmiştir. Bu etkisini ekson dahil edilmesini baskılayan hnRNP A1 protein miktarını düşürerek gösterdiği bilinmektedir (54).

İnterferon: *SMN1* ve *SMN2* genlerinin promotorlarında *interferon-stimulated response element* (ISRE) ve *interferon regulatory factor element* (IRF-E) motifi bulunması nedeniyle interferon β ve γ 'nın etkisi araştırılmıştır. İnterferon uygulamaları ardından her iki *SMN* geninin de ifadesi hızla indüklenmiş ve *SMN* protein miktarı artmıştır (55).

Kuinazolinler: Kanser ve malarya tedavisinde kullanılan ilaçlardır. İyi tolere edilebilmeleri, kan-beyin bariyerini geçebilmeleri ve yüksek oral biyoyararlanımları insan denemeleri için onları uygun hale getirmiştir. Kuinazolin türevlerinin *SMN* geni üzerine etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda birçok türevin promotoru aktive ettiği, *splicing*'ini düzenlediği, *SMN* protein miktarını artırdığı, sağ kalım ve motor fonksiyonları etkilediği bildirilmiştir. Bunun yanında bazı türevlerin DcpS (*the scavenger decapping enzyme*) inhibisyonu yaparak *SMN2* mRNA yıkımında rol oynadığı ve mRNA yarı ömrünü uzattığı bildirilmiştir (56,57).

Sodyum vanadat: Sodyum vanadat, diyabet tedavisinde kullanılan ve nöron sağ kalımı üzerinde etkili olan bir tirozin fosfataz inhibitörüdür (7). Yüksek konsantrasyonlarda toksik olan bu bileşiğin ekson 7'nin dahil edilmesi yönünde etkili olduğu gösterilmiştir (58).

Tirotropin Salgılatıcı Hormon: Hipotalamustan salınan tirotropin salgılatıcı hormon epilepsi tedavisinde, omurilik yaralanmalarında ve spinoserebellar atakside kullanılan bir hormondur. Omurilik ön boynuz hücreleri tetikleyen bu hormonun uygulaması ile SMA'lı deneklerde motor fonksiyon artışı görülmüştür (59).

2.6.1.2 *SMN2* Translasyonunun ve Protein Stabilizasyonunun Artırılması

SMN Δ 7 stabilize olamayan, oligomerizasyon kapasitesini düşük bir proteindir. Bu nedenle stabil kalabilen veya oligomerizasyonu kısmen de olsa sağlayabilen protein miktarının artırılması tedavi yöntemi olarak düşünülmüştür.

Aminoglikosidler: Kanser tedavisinde de kullanılan, prokaryotik ribozomların işlevini bozan antibiyotiklerdir. Bu ilaçların dur kodon tanımasını

baskılaması, bazı genetik hastalıklar için tedavi edici olarak kullanılacaklarını düşündürmüştür. *SMN* geni üzerinde ekson 7 sonunda bulunan dur kodonunun atlanması ve transkripsiyonun ekson 8'in dur kodonuna kadar devam etmesi sonunda mRNA'ya fazladan dokuz aminoasit daha eklenmektedir. Bu şekilde elde edilen uzatılmış protein *SMN Δ 7*'ye göre daha stabildir ve daha fonksiyoneldir (60).

Bu amaçla bugüne kadar amikomisin, tobramisin, gentamisin, genetisin, lividomisin, streptomisin, neomisin türevleri ve kanamisin türevlerinin *SMN* geni üzerindeki etkileri araştırılmıştır (60,61). Bu gruptaki bazı bileşiklerin *gem* sayısında artış sağlaması, motor nöron sayısını artırması ve sağkalım üzerindeki etkisi bildirilmekle birlikte toksik olduklarından tedavi için uygun bulunmamışlardır (48,60-62).

İndoprofen: Siklooksijenaz inhibitörü olan bu ilaç, steroid olmayan anti-inflamatuar bir ilaçtır. Yapılan çalışmalarda *SMN* geni üzerinde olumlu etkileri görülmesine rağmen ciddi yan etkilerinden dolayı kullanıma uygun bulunmamıştır (7,63).

Proteozom İnhibitörü: Ökaryotik hücrelerde *SMN* proteini yıkımı ubiquitin/proteozom yoluyla üzerinden gerçekleşmektedir. *SMN Δ 7*'nin FL-*SMN*'den iki kat daha hızlı degrade olması nedeniyle, proteozom inhibitörü kullanarak *SMN Δ 7* yıkımının geciktirilmesi hedeflenmiştir. Proteozom inhibitörü olan MG132 denemelerinde, *SMN* protein miktarının ve *gem* sayısının arttığı kanıtlanmıştır (64,65).

2.6.1.3 Ekson Atlanma Hatasının Düzeltilmesi

SMN2 genine ekson 7'nin dahil edilmesini sağlayacağı düşünülen bir yaklaşım da antisens oligonükleotitlerin kullanılmasıdır. Bu oligonükleotitler *splicing*'de görevli proteinleri ya da onların bağlandıkları mRNA dizilerini hedef alabilmektedirler (66).

Ekson atlanmasında rol oynayan hnRNP A1 proteinin baskılanması veya bu proteinin bağlandığı, *intronic splicing silencer* (ISS) dizisinin kapatılması ekson 7'nin mRNA'ya dahil edilmesine ve *SMN* protein miktarında artışa neden

olmuştur (66,67). ISS dizisinin farelerde baskılanması sonucunda ise yukarıdaki bulguların yanı sıra vücut ağırlığında artış ve daha hızlı vücut pozisyonu alma yönünde iyileşme bildirilmiştir (68).

ESE bölgelerini hedef alan antisens oligonükleotid uygulamaları da vardır. Ekson 7 içindeki ESE bölgesini hedef alarak tasarlanan oligonükleotitlerin ekson atlanmasını düzelttiği gösterilmiştir (69). Bunun yanı sıra, ESE dizisini taklit eden kuyruk içeren oligonükleotitlerle yapılan çalışmalar *gem* sayısı, FL-SMN mRNA'sı ve proteininde artış sağlamıştır (70).

2.6.2 SMN2 Bağımsız Tedavi Yaklaşımları

2.6.2.1 Nörörejenerasyon

Kök hücre tedavisi: SMA'da motor nöron kaybının kök hücre kullanımı ile engellenebileceği görüşü hastalık tedavisine yeni bir yaklaşım getirmiştir. Kök hücreler kendilerini yenileyebilen, sınırsız bölünebilme yeteneğini olan ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir (71). Sağlıklı farelere embriyonik kök hücre transplantasyonu yapıldığında, hücrelerin motor nöronlara farklılaştığı, akson ve nöromusküler bağlantıların oluştuğu, oluşan motor nöronların kas kasılmasını tetiklediği gözlenmiştir (72). SMA'lı farelere yapılan nöral (73) ve embriyonik kök hücre (74) uygulamaları ise ömür uzunluğunda, motor fonksiyonlarda, vücut ağırlığında ve nörotrofik faktör salgılanmasında artış sağlamıştır. Araştırmaları devam eden kök hücre tedavisi taşıdığı riskler nedeniyle henüz uygulanamamaktadır.

Gen Tedavisi: Gen tedavisinde hedef, mutasyon içermeyen ve tam uzunluklu SMN proteini oluşturabilecek *SMN* geninin verilmesidir.

Bugüne kadar yapılan lentivirüs (75,76) ve adeno-asosiyel virüs aracılı (77) *SMN* geni aktarımında, farelerin SMN protein miktarlarında, yaşam sürelerinde, motor fonksiyonlarında artış ve nöromusküler bağlantılarda gelişme gözlenmiştir. Bununla beraber adeno asosiyel virüslerin primatlarda kan-beyin bariyerini aşmaları ileriki çalışmalar için önemli bir özelliktir (78). Ancak bu çalışmalarda immün yanıt görülmesi insan denemelerine olanak vermemektedir (76).

Kemik İliği Transplantasyonu: Kaslarında SMN Δ 7 delesyonu yaratılan farelere yapılan kemik iliği transplantasyonu sonucunda kas fibrillerinde artış gözlenmiş, satellit hücre aktivasyonu aracılığıyla miyopatik fenotip gerilemiştir. Fakat satellit hücrelerin füzyon ya da yer değiştirme yeteneklerinin az olması, *SMN* geni üzerindeki etkisinin bilinmemesi bu yöntemin tedavi için kullanılabilirliğini zorlaştırmaktadır (79).

2.6.2.2 Nöron Korunumu

Nörotrofik faktörler nöronların sağ kalımını ve nöron farklılaşmasını uyaran, (80) nöron koruyucu faktörler ise sinir sisteminde herhangi bir hasar sonucu nöronları apoptozdan ya da dejenerasyondan koruyan faktörlerdir. Her iki faktör de motor nöron hücre ölümünü ve aksonal yıkımı geciktirdiği için, motor nöron hastalıklarının tedavisinde denenmeye değer görülmüştür (81).

İnsanlarda yapılan nöron koruyucu faktör uygulamalarında riluzol ve gabapentin'in etkisinin düşük olduğu, asetil-L-karnitin ve kreatin'in ise etkisi olmadığı görülmüştür (10). Nörotrofik faktörlerden kardiotrofin-1'in SMA'lı fare modeli üzerinde etkisi araştırıldığında sağ kalımı az da olsa artırabildiği ve motor semptomların başlangıcını geciktirdiği tespit edilmiştir (10). Ancak nöron korunumu sağlayan tüm bu faktörlerle yapılan çalışmalar sonucunda yeterli etki görülmemiştir (7).

2.7 Tez Çalışmasında Kullanılan Bileşikler ve Kökenleri

Anabilim Dalı'mızda yürütülmüş olan "RNA Splicing Hatalarının Neden Olduğu Kalıtsal Hastalıklarda İlaç Araştırma Geliştirme Çalışmaları" projesi kapsamında *SMN2* gen transkripsiyonunun ve *splicing*'inin değiştirilmesi yöntemi üzerinden potansiyel ilaç adayı olabilecek bileşiklerin sentezi ve tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bileşik sentezinde kısa zincirli yağ asitleri temel alınarak, HDAC inhibitörü olduğu bilinen valproik asit ve bütanoik asit analogları kullanılmıştır. Tasarımı yapılan bileşiklerden SMA tedavisi için aday gösterilmiş ve zayıf bir HDAC inhibitörü olan sodyum bütiratın inhibisyon aktivitesinin

üzerine çıkabilen bileşikler saptanmış, yeni türevlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu proje kapsamında araştırılan bileşiklerden dört tanesinde yüksek HDAC inhibisyon aktivitesi saptanması üzerine detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmuştur.

Kafeik asidin, yüksek HDAC inhibisyonu göstermesi ve *SMN2* gen ifadesini artırması üzerine bu bileşiğin dimeri olan türev 2 (α -o-kafeoil-3,4-dihidroksifenil-laktik asit) (rosmarinik asit) ve siklik esteri olan türev 3 (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) (kuersetin) sentezlenmiştir. Ayrıca, fenol halkası içeren, yüksek HDAC inhibisyonu yapan ve *SMN2* gen ifadesini artıran (E)-metil 4-(4-metoksifenil)-2-okzobüt-3-enoat ve resveratrol bileşikleri baz alınarak bütanoik asit esterleri olan (E)-metil 4-(3,4-dihidroksifenil)-2-okzobüt-3-enoatın (türev 1) ve (E)-4-(4-metoksifenil)-1-(2,6-dimetilmorfolino) büt-3-en-1,2-dion (türev 4) elde edilmiştir.

Tez çalışmasında türev 1 ve 4 için uygulanan süre ve konsantrasyonlar (E)-metil 4-(4-metoksifenil)-2-okzobüt-3-enoatın, türev 2 ve 3 için uygulananlar ise kafeik asidin adı geçen proje kapsamında belirlenen konsantrasyon ve süreleri ile aynı olacak şekilde seçilmiştir. Bahsi geçen dört türevin SMA tedavisi için en uygun aday moleküller olarak düşünülmesi üzerine tez çalışması kapsamında *SMN2* geni ifadesi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1 Hücre Kültürü

GM03813 SMA tip I insan deri fibroblast hücreleri (Coriell Cell Repository)

GM09677 SMA tip I insan deri fibroblast hücreleri (Coriell Cell Repository)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biochrom AG)

Penisilin/Streptomisin (Biochrom)

Fötal dana serumu (FCS) (Biochrom)

L-Glutamin 200 mM (Biochrom)

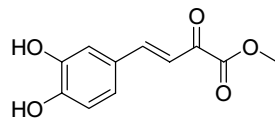
Tripsin/ EDTA (Biochrom)

Dimetil sülfoksit (hücre kültürüne uygun) (DMSO) (Applichem)

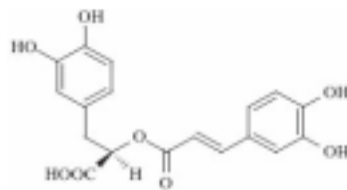
- ❖ Hücre kültür ortam içeriği: %10 fötal dana serumu, %1 Penisilin/Streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren DMEM
- ❖ Hücre dondurma ortamı: %90 fötal dana serumu ve %10 DMSO

3.1.2 Çalışmada Kullanılan HDAC inhibitörleri

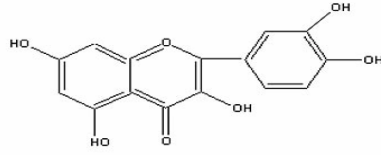
Türev 1 : (*E*)-metil 4-(3,4-dihidroksifenil)-2-okzobüt-3-enoat (Sentez ürünü)



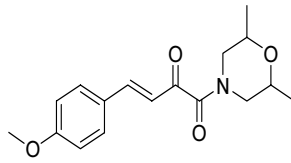
Türev 2: α -o-kafeoil-3,4-dihidroksifenil-laktik asit (Rosmarinik asit) (Aldrich)



Türev 3: 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon (Kuersetin dihidrat, %98 HPLC) (Sigma)



Türev 4: (*E*)-4-(4-metoksifenil)-1-(2,6-dimetilmorfolino)büt-3-en-1,2-dion (Sentez ürünü)



3.1.3 Hücre Stoğu Hazırlanması

RNA *protect* (Qiagen)

1X PBS (*phosphate buffer saline*)

3.1.4 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, *Rneasy® Plus* mini kit (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır.

3.1.5 cDNA Sentezi

cDNA sentezi, *QuantiTect® Reverse Transcription* kiti kullanılarak yapılmıştır.

gDNA *wipeout* Tamponu, 7x

Quantiscript Reverse Transkriptaz

Quantiscript RT Tamponu, 5x

RT Primer Karışımı

Rnaz İçermeyen Distile Su

3.1.6 Hipoksantin Fosforibozil Transferaz (*HPRT*) Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Taq DNA Polimeraz (Fermentas) (5 u/ μ l)

Taq DNA Polimeraz Tamponu (NH₄)₂SO₄ (Fermentas) (10x)

MgCl₂ (Fermentas) (25mM)

Deoksiribonükleotripeptidler (dNTP) (Fermentas) (2.5 mM dATP, 2.5 mM dCTP, 2.5 mM dGTP, 2.5 mM dTTP)

Primer dizileri F: 5' TGGCGTCGTGATTAGTGATG 3'

R: 5' AATCCAGCAGGTCAGCAAAG 3'

3.1.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Prona)	:Moleküler biyoloji kullanımı saflığında
Tris-asetat tamponu (TAE) (pH 8.0)	: Tris baz (Merck) 2M Glasiyal asetik asit (Merck) 1.14 ml Na ₂ EDTA (Merck) 0.5 M
Yükleme tamponu	: Gliserol (Merck) 5.5 ml 1X TAE tamponu (Merck) 4.5 ml <i>Orange G</i> boya (Merck) 0.01 gr
Etidyum bromür	: 10 mg/ ml distile su
Moleküler ağırlık belirleyicisi	: <i>Gene Ruler 50 bp DNA Ladder</i> (Fermentas)

3.1.8 Gerçek Zamanlı (*Real Time*) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TaqMan *Universal* PCR Master Karışımı (2X) (Applied Biosystems)

GAPDH prob (VIC-TAMRA) (20X) (Applied Biosystems)

β aktin prob (VIC-MGB) (20X) (Applied Biosystems)

SMN geni için primer dizileri:

e6F: 5'-GCTGATGCTTTGGGAAGTATGTTA-3' (38)

e7F : 5'-CAGCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTC-3' (38)

SMN2 ekzon 6 *TaqMan* prob dizisi: (1.25 pmol)

5'FAM-TTTCATGGTACATGAGTGGCTATCATACTGGCTATTAT-TAMRA 3'
(38)

3.1.9 Hücre Canlılık Testi

Canlılık testi *LDH-Cytotoxicity Assay Kit II* (Biovision) kullanılarak yapılmıştır.

3.1.10 DAPI Boyaması

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

1X PBS

%4 Paraformaldehit (PFA)

Distile su (dH₂O)

3.1.11 HDAC Aktivitesinin IC₅₀ Değerinin Hesaplanması

Türev 1 ve 4 için IC₅₀ değeri için HDAC inhibitör ilaç tarama kiti (Biovision) kullanıldı.

HDAC Substratı (Boc-Lys(Ac)-AMC, 4 mM),

10X HDAC Deney Tamponu,

Lizin *Developer*,

HDAC inhibitörü (Trikostatin A, 1mM),

HeLa Çekirdek Özütü (5 mg/ml),

Deasetile Edilmiş Standart (Boc-Lys-AMC, 4 mM)

3.2 Yöntemler

3.2.1 Hücre Kültürü

SMA nöronlar üzerinden etkisini gösteren bir hastalık olsa da, fibroblastlarda da *SMN* gen ifadesi bulunduğundan hastalık örnek dokusu olarak insan fibroblastları kullanılmıştır.

Çalışmamızda ticari olarak satın alınan GM03813 ve GM09677 hücre hatları kullanılmıştır. Bu iki hücre hattı 2 adet *SMN2* kopyasına sahip, tip I SMA fibroblast hücreleridir. GM03813 kas zayıflığı ve atrofisi semptomları taşıyan 3 yaşındaki erkek hastadan, GM09677 ise hipotoni, düşük kas hacmi, derin tendon reflekslerine sahip olmama semptomları taşıyan 2 yaşındaki erkek hastadan elde edilen primer kültürlerdir.

37°C'daki su banyosunda çözülen hücelere %10 FCS içeren DMEM ortamından 5 ml eklendi. 300 g'de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra üst faz atıldı ve çökeltiye 2 ml hücre kültür ortamı eklendi. Çökelti iyice çözüldükten sonra hücreler 75cm²'lik kültür kabına aktarıldı ve 5 ml hücre kültür ortamı eklenerek %5 CO₂ içeren 37°C etüvde çoğalmak üzere inkübasyona bırakıldı. Hücreler, hücre kabını tamamen doldurana kadar, gün aşırı 8 ml %10 FCS içeren kültür ortamıyla beslendi.

Hücreler, kültür kabını tamamen kaplayacak kadar çoğaldıklarında 15 mm'lik kültür kaplarına her birinde 5x10⁵ hücre olacak şekilde dağıtıldı. Hücrelerin kültür kaplarına dağıtılma işlemi aşağıdaki protokol ile gerçekleştirildi:

1. Kültür kabı içindeki hücre kültür ortamı boşaltıldı ve 10 ml PBS ile yıkandı.
2. 2 ml tripsin eklendi ve 2 dakika 37°C'deki etüve kaldırıldı.
3. Hücrelerin tamamı kalktıktan sonra tripsin inaktivasyonu için 5 ml hücre kültür ortamı eklendi. Küme halindeki hücrelerin dağılması için 2 ml'lik serolojik pipet yardımıyla pipetaj yapıldı.
4. Toplanan hücreler 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Üst faz atıldıktan sonra çökeltiye 4 ml hücre kültür ortamı eklendi
6. Hücreler 1/20 oranında hücre kültür ortamı ile sulandırıldı.

7. 10 µl alınıp hemositometre yardımıyla hücre sayısı belirlendi ve her birinde 5×10^5 hücre olacak şekilde kültür kaplarına aktarıldı.
8. Hücreler, yapışıp çoğalmaları için, %5 CO₂ içeren 37°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.2 Türev Uygulamaları

İnkübasyonun ardından türevler seri dilüsyonlar halinde hazırlanıp son hacimlerinde türev 1 ve 4 40 µM, 80 µM, 160 µM; türev 2 ve 3 20 µM, 50 µM, 100 µM olacak şekilde uygulanmıştır. Bileşik uygulanmayan fibroblast hücreleri kontrol olarak kabul edilmiştir. Türev 1 ve 4'ün ana stok dilüsyonları kuvvetli bir çözücü olan DMSO'da, ana stoktan hazırlanan seri dilüsyonlar ise %10 FCS içeren hücre kültür ortamı ile yapılmıştır. Türev 2 ve 3'ün dilüsyonları ise hücre kültür ortamı içinde çözünmemeleri nedeniyle DMSO kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon %5 CO₂ içeren 37°C etüvde 24 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Seçilen konsantrasyon ve süreler türevlerin köken aldıkları bileşikler ile aynı olacak şekilde seçilmiştir.

3.2.3 Hücre Stoğu Hazırlanması

Bu aşamadan sonra RNA izole edileceğinden RNA'ların zarar görmeden elde edilmesi için hücreler, 5 hacim *Qiagen RNA Protect* ve bir hacim PBS karışımından oluşan çözelti yardımıyla toplanmıştır. Hücre kültür ortamı pipet yardımıyla çekildikten sonra çözeltiden 2 ml kültür kaplarına eklenmiş böylece hücrelerin kaldırılması sağlanmıştır. *Scraper* yardımıyla kaldırılan hücreler -20°C' da saklanmıştır.

3.2.4 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, *Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit* aracılığıyla yapılmıştır.

1. Hücreler oda ısında çözüldükten sonra vorteks yardımıyla karıştırıldı.
2. 23°C 8000 g'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz dikkatlice

atıldı.

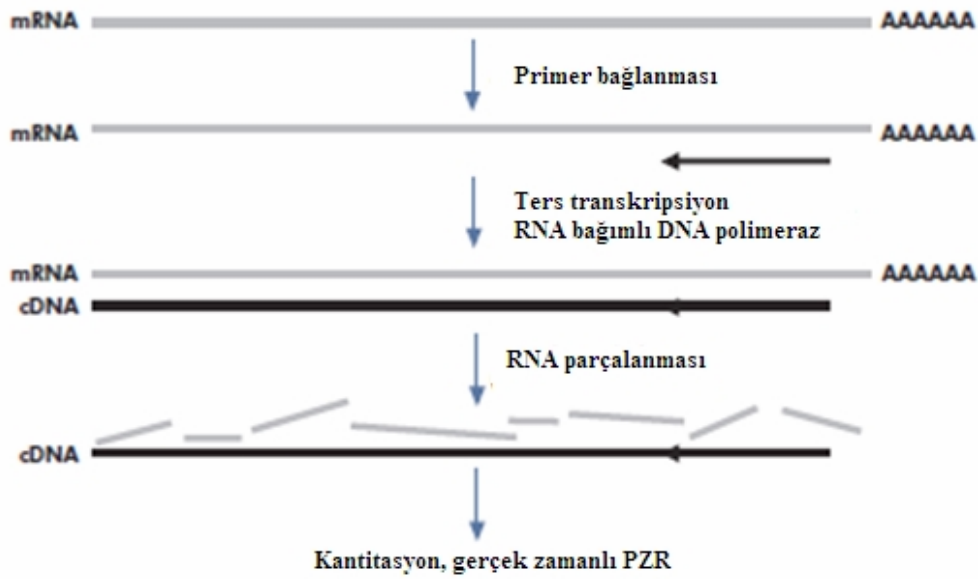
3. Çökelti üzerine 350 µl guanidin-izotiosiyonat içeren tampon eklenerek yaklaşık 1 dakika vorteks ile karıştırıldı. Ardından 0,9 mm'lik enjektörden geçirildi.
4. Lizat, gDNA eliminatör kolona alınarak 23⁰C 8000 g'de 40 saniye santrifüj edildi.
5. Kolondan toplanan örneğe 350 µl %70'lik etanol eklendi. *RNeasy spin* kolonda 23⁰C 8000 g'de 25 saniye santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı atıldı.
6. Kolona bağlanan RNA'lar önce 700 µl RW1 tamponu ardından da iki kez 500 µl RPE tamponu ile 23⁰C 8000 g'de 25 saniye santrifüj edilerek yıkandı.
7. Kolon temiz bir *ependorf* tüpüne alınarak üzerine 15 µl RNaz içermeyen su eklendi, 23⁰C 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Kolona 10 µl RNaz içermeyen su eklendi, 23⁰C 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Örnekler buza alındı.

3.2.5 RNA Konsantrasyon Ölçümü

RNA konsantrasyonları *NanoDrop ND1000 Spectrometer* cihazı yardımıyla ölçüldü. Cihaza 1,5 µl örnek yüklenerek konsantrasyon ve OD:260nm/280nm değerleri elde edildi.

3.2.6 cDNA Sentezi

cDNA sentezi *Qiagen Quantitech Reverse Transcription Kit* aracılığıyla yapılmıştır. Kitin çalışma prensibinin temelinde çok fonksiyonlu ters transkriptaz vardır. Bu enzim hem RNA bağımlı DNA polimeraz, hem de hibrit bağımlı ekzonükleaz (RNaz H) olarak görev yapar. İlk basamakta genomik DNA uzaklaştırılır. Rastgele primerler RNA kalıbına bağlandıktan sonra ters transkriptaz DNA parçası sentezini yapar, ardından RNaz H aktivitesiyle, RNA-DNA hibritindeki RNA'yı parçalar. Böylece tek zincirli cDNA elde edilmiş olur.



Şekil 3.1 cDNA Sentezi (82)

RNA son hacim 12 μ l olacak şekilde sulandırıldıktan sonra genomik DNA'yı uzaklaştırmak için 2 μ l gDNA *wipeout* solüsyonu eklenerek 42⁰C'da 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından RT primer karışımı, *reverse* transkriptaz ve RT tamponu (son hacimde 1X olacak şekilde) eklendi ve reaksiyon 25 μ l'ye tamamlandı. 30 dakika 42⁰C'da ve sonra 5 dakika 95⁰C'daki inkübasyonların ardından örnekler -20⁰C'a kaldırıldı.

3.2.7 cDNA'ların Hipoksantin Fosforibozil Transferaz (*HPRT*) Geni ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Kontrolü

Gerçek zamanlı PZR öncesi cDNA sentezinin kontrolü için *housekeeping* genlerden olan *HPRT* seçilmiştir. Çalışmada 0.625 u *Taq* DNA polimeraz, 0.1 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 0.1 μ M primer ve 1X tampon son hacim 12.5 μ l olacak şekilde kullanıldı.

Reaksiyon Koşulları:

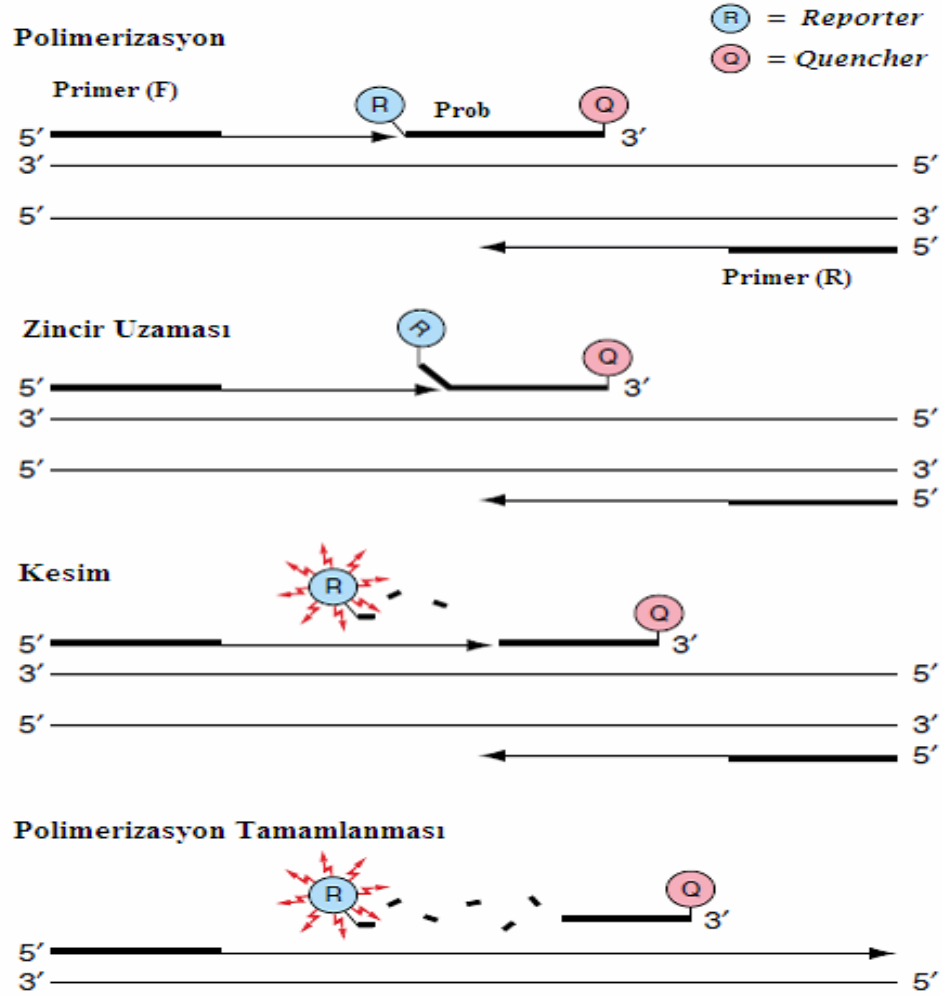
1. basamak: 94°C 2 dakika
 2. basamak: 94°C 30 saniye
 3. basamak: 58°C 45 saniye
 4. basamak: 72°C 45 saniye
 5. basamak: 94°C 2 dakika
- } 30 döngü

PZR ürünü %2'lik agaroz jelde, 120V'da elektroforeze edilerek görüntülenmiştir.

3.2.8 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Türevlerin *SMN2* ifade miktarı üzerinde etkisinin araştırılmasında *BioRad IQCycler Real Time* cihazı kullanılarak kantitatif bir analiz yapılmıştır. Problardan alınan floresan ışımaya cihaz kamerası ile yakalanarak bilgisayara aktarılmakta ve böylece reaksiyon gerçekleşirken eş zamanlı olarak bilgisayarda izlenebilmektedir.

Deney sisteminde *TaqMan* problemleri kullanılmıştır. Bu problemlerin özelliği 5' ucunun *reporter* (FAMTM), 3' ucu da *quencher* (TAMRATM) boyalarla işaretli olmasıdır. Problemler bütün halinde herhangi bir ışımaya meydana gelmez. Çünkü *reporter*, *quencher* tarafından baskılanır. Primer ve prob kalıba bağlandığı durumda *TaqMan Universal PCR Master Mix* içinde bulunan *AmpliTaq Gold* DNA polimeraz, polimerizasyonu başlatır. Enzimin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesiyle *reporter* ve *quencher* birbirinden ayrıldığında ışımaya gerçekleşir (Şelik 3.2). *Reporter*'dan kaynaklanan ışımaya miktarı ile çoğalan örnek miktarı doğru orantılıdır.



Şekil 3.2 Gerçek Zamanlı PZR (R: *Reporter*, Q: *Quencher*) (83)

Başlangıçta reaksiyona konulan cDNA miktarı ne kadar fazlaysa ilk sinyal alınımı için gerekli döngü sayısı o kadar düşüktür ve bu değer logaritmik olarak hesaplanır. Bu yöntem *comparative threshold cycle* (Ct) olarak bilinir. En düşük Ct değeri alınan örnek en fazla cDNA'nın bulunduğu örnek olarak yorumlanır.

Deneyler 96 kuyucuklu mikropalakalarda 1.25 pmol prob, 1X *TaqMan Universal Master Mix*, 900 nM primer ve 15 ng cDNA kullanılarak 25 µl'de gerçekleştirildi. Örnekler üçlü tekrarlar halinde çalışıldı. Kantitatif analiz için internal kontrol olarak gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) ve β -*aktin* (*ACTB*) genleri kullanıldı. İnternal kontroller için de ayrı tüplerde kendi problemleriyle karışımlar hazırlanıp 96 kuyucuklu mikropalakaya dağıtıldıktan sonra cDNA'lar eklendi ve amplifikasyon gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR aşağıdaki koşullarda uygulandı:

1. basamak: 95°C 10 dakika
 2. basamak: 95°C 15 saniye
 3. basamak: 60°C 1 dakika
 4. basamak: 20°C 30 dakika
- } 40 döngü

3.2.9 Hücre Canlılık Testi

Bu tez çalışmasında kullanılan *LDH-Cytotoxicity Assay Kit*, hücre canlılığını belirlerken temel olarak laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin miktarını baz alarak ölçüm yapmaktadır. LDH laktat ve pirüvatın birbirlerine dönüşümlerini katalizleyen enzim olduğu için tüm hücrelerde bulunmaktadır.

Hücre zarında herhangi bir hasar meydana geldiğinde LDH hızla hücre dışına salınır, laktatı oksitleyerek NADH üretimine neden olur. Kit bileşenlerinin NADH ile oluşturduğu renk yoğunluğu, ölü hücre miktarı doğru orantılıdır.

1. Çalışma sırasında 96 kuyucuklu mikropalakalara 4×10^4 hücre eklenmiştir. Deney sistemi üçlü tekrarlardan oluşmaktadır. Hücreler kuyucuklara eklendikten sonra hücrelerin yeni ortamlarına uyum sağlayabilmeleri için 24 saat %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edilmişlerdir.
2. Kuyucuklara, incelenecek olan konsantrasyonlarda hazırlanan bileşikler ile pozitif kontrol için 10 µl hücre lizis solüsyonu eklenmiştir. Ardından 24 saat %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edilmişlerdir.

Background Kontrolü: Sadece 100 µl hücre kültür ortamı içerir. Bu kontrol hücre kültür ortamından ve kit bileşenlerinden kaynaklanan hataların giderilmesinde kullanılır.

Negatif Kontrol : 100 µl hacimde 4×10^4 hücre içerir.

Pozitif Kontrol : 100 µl hacimde 4×10^4 hücre ve 10 µl hücre lizis solüsyonu içerir. Bu solüsyon hücrelerin zarlarında hasar meydana getirerek maksimum LDH'ın açığa çıkmasını sağlar.

3. Kit bileşenlerinden WST substrat karışımına 1ml ddH₂O eklenmiş ve LDH reaksiyon karışımı hazırlanmak üzere 1/50 oranında tampon ile karıştırılmıştır.
4. İnkübasyonun ardından mikrolakaya 10 dakika 600g'de santrifüj edilmiştir.
5. 10 µl süpernatant yeni mikrolakaya aktarılıp üzerine 100 µl LDH reaksiyon karışımı eklenmiş ve 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonrası 450 nm'de (referans değeri 650 nm) absorbans ölçümü mikrolakaya okuyucu (Molecular Devices, Spectra max M2) ile yapılmıştır.

Canlılık hesaplanırken öncelikle üçlü tekrarların hepsi kullanılarak ortalama değerler elde edilmiştir. Daha sonra *background* kontrolünden kaynaklanan değer diğer tüm değerlerden çıkartılmış ve canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ canlılık} = 100 \times (\text{Test Örneği} - \text{Negatif Kontrol} / \text{Pozitif Kontrol} - \text{Negatif Kontrol})$$

3.2.10 DAPI Boyaması

DAPI, çift zincirli DNA'ya kuvvetli bir şekilde bağlanan mavi floresans bir boyadır. DNA'ya bağlanma özelliği nedeniyle çekirdek boyamasında kullanılır.

1. Hücreler 6 kuyucuklu mikrolakaya, 200 000 adet olacak şekilde aktarılıp 24 saat %5 CO₂ içeren 37⁰C etüvde inkübe edilmişlerdir.
2. 40, 80, 160 ve 200 µM türev 4, hücrelere eklenmiş toplam hacim 2 ml'ye tamamlanmış ve %5 CO₂ içeren 37⁰C etüvde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası ortam boşaltılmış, hücreler iki kez 1XPBS ile yıkanmış, %4 paraformaldehit eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında fiksasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır.
4. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 1XPBS ile 1/1000 oranında sulandırılan DAPI eklenmiş, bir dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra dH₂O ile DAPI uzaklaştırılmış ve hücreler görüntülenmiştir.

Hücre görüntülenmesi *Leica DMIL* mikroskopuyla, onluk büyütmede gerçekleştirilmiştir.

3.2.11 HDAC Aktivitesinin IC₅₀ Değerinin Hesaplanması

IC₅₀, bir bileşiğin *in vitro* ortamda %50 inhibisyon etkisi gösterdiği değerdir. IC₅₀ değerini hesaplamak için kullanılan HDAC inhibitör ilaç tarama kiti iki aşamalı deney sistemi sonucunda floresans değeri vermektedir. İlk aşama, içinde tüm HDAC enzimlerini barındıran HeLa çekirdek özütü ve asetilli lizin yan zincire sahip florometrik substrat belirlenen konsantrasyonlardaki bileşiklerle karıştırılarak inhibisyon oluşumundan meydana gelmektedir. Burada HDAC enzimleri asetilli lizine sahip olan substratın deasetilasyonunu sağlayarak floresans ışımaya oluşturmaktadır. İkinci aşamada lizin *developer* ile durdurulan reaksiyon 96 kuyucuklu mikropłaka okuyucuda Ex: 350nm ve Em: 440 nm dalga boylarında okunmuştur. Deney üçlü tekrarlar halinde gerçekleştirilmiş olup, bileşik eklenmeyen kuyucuklardan alınan değer %100 kabul edilmiştir.

IC₅₀ değerini hesaplamak için türev 1 ve 4'ün ile 1×10^{-7} , 3×10^{-7} , 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1×10^{-5} , 3×10^{-5} , 1×10^{-4} , 3×10^{-4} , 1×10^{-3} , 3×10^{-3} , 1×10^{-2} , 3×10^{-2} M konsantrasyonlardaki seri sulandırılmaları kullanılmıştır.

3.3 Verilerin Değerlendirilmesi

3.3.1 Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Verilerin değerlendirilmesi gerçek zamanlı PZR sonrasında gerçekleştirilmiş, bu amaçla $\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılmıştır. Üçlü tekrarlar halinde çalışılan örneklerden en fazla sapan Ct değeri dışarıda tutularak diğer iki örneğin ortalaması alınmıştır. Türevlerin uygulandığı ve uygulanmadığı örneklerin ortalama Ct değerleri, internal kontroller olan *GAPDH* ve *ACTB*'in ortalama Ct değerlerine göre normalize edilerek ΔCt (SMN Ct – internal kontrol Ct) değeri elde edilmiş ve çıkan sonuçlar türev uygulanmayan kontrollerle karşılaştırılmıştır

(Türev uygulanan: $\Delta Ct_+ = \Delta Ct_{SMN} - \Delta Ct_{KONTROL}$, türev uygulanmayan: $\Delta Ct_- = \Delta Ct_{SMN} - \Delta Ct_{KONTROL}$, $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_+ - \Delta Ct_-$)

İlgilenilen genin normalize edilen genlere göre kat artışı hesaplanırken, $\Delta \Delta Ct$ değerinin üstel fonksiyonu temel alınıp aşağıdaki formüle göre kat değişimi belirlenmiştir:

$$\text{Kat değişimi: } 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

3.3.2 Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS 17 (SPSS INC., Chicago, USA) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türevlerin belirlenen konsantrasyonları için anlamlılığının saptanmasında Kruskal Wallis testi kullanılmış, en yüksek kat artışının kontrole göre anlamlılığı ise Mann Whitney-U testi ile analiz edilmiştir. Konsantrasyona bağlı genel bir artış ya da azalış eğilimi görüldüğünde Jonckheere-Terpstra testi uygulanarak söz konusu eğilimin anlamlılığı sınanmıştır. Tüm analizlerde p değerinin 0,05'ten küçük olduğu değerler anlamlı kabul edilmiştir. Grafiklerin çizimi ve IC_{50} değerlerinin belirlenebilmesinde GraphPad Prism 5 programı kullanılmıştır. Grafiklerdeki hata çubukları ortalama standart hata ($\pm OSH$) değerini göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1 Elde Edilen RNA'ların Konsantrasyon ve Saflikları

Bileşik uygulanan hücrelerin RNA konsantrasyon ve saflikları spektrofotometre ile ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar tablo 4.1'de gösterilmiştir.

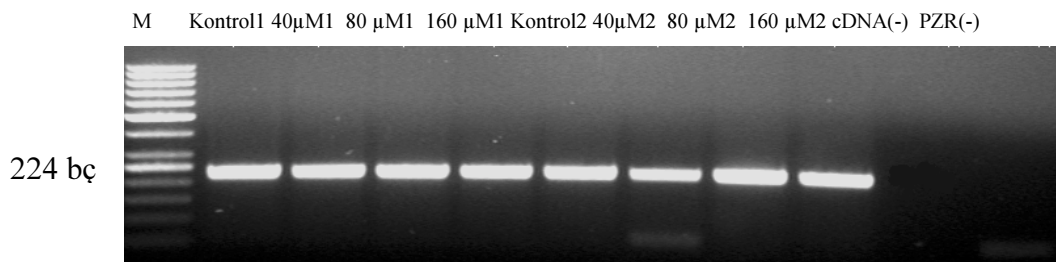
Tablo 4.1 RNA konsantrasyon ve saflikları

Hücre Hattı		Uygulanan Konsantrasyon	RNA Konsantrasyonu (ng/μl)	RNA Safliği (OD:260/280)
GM03813	Türev 1	Kontrol	88,0	2,04
		40 μM 1	147,9	2,06
		80 μM 1	80,3	2,04
		160 μM1	106,3	2,04
		Kontrol	98,7	2,08
		40 μM 2	124,4	2,06
		80 μM 2	124,3	2,04
		160 μM2	106,4	2,07
GM03813	Türev 2	Kontrol	168,7	2,11
		20 μM 1	133,1	2,04
		50 μM 1	98,0	2,01
		100 μM 1	95,9	2,01
		Kontrol	172,2	2,06
		20 μM 2	112,8	2,04
		50 μM 2	95,9	2,06
		100 μM 2	92,0	1,99
GM03813	Türev 3	Kontrol	86,1	1,85
		20 μM 1	55,4	2,03
		50 μM 1	124,7	2,59
		100 μM 1	76,3	2,05
		Kontrol	170,1	2,30
		20 μM 2	35,1	1,79
		50 μM 2	64,4	2,28
		100 μM 2	59,3	2,04
		Kontrol	50,1	2,07
		20 μM 3	52,5	2,06
		50 μM 3	57,8	2,08
		100 μM 3	65,0	2,00
GM09677	Türev 3	Kontrol	227,9	2,08
		20 μM 1	106,4	2,01
		50 μM 1	69,3	2,06
		100 μM 1	37,2	1,97

		Kontrol	194,6	2,06
		20 μ M 2	82,4	2,01
		50 μ M 2	49,5	1,97
		100 μ M 2	62,5	1,99
GM03813	Türev 4	Kontrol	132,2	2,10
		40 μ M 1	75,4	2,14
		80 μ M 1	81,9	2,11
		160 μ M 1	77,3	2,14
		Kontrol	83,2	2,11
		40 μ M 2	65,1	2,15
		80 μ M 2	120,9	2,12
		160 μ M 2	80,7	1,96
		Kontrol	92,0	2,07
		40 μ M 3	55,5	2,02
		80 μ M 3	55,0	2,06
		160 μ M 3	76,8	2,10
GM09677	Türev 4	Kontrol	164,6	2,08
		40 μ M 1	128,8	2,08
		80 μ M 1	164,4	2,07
		160 μ M 1	124,7	2,07
		Kontrol	152,6	2,07
		40 μ M 2	149,9	2,05
		80 μ M 2	132,4	2,08
		160 μ M 2	101,7	2,08
		Kontrol	112,8	2,04
		40 μ M 3	115,9	2,05
		80 μ M 3	87,2	2,05
		160 μ M 3	77,3	2,06

4.2 cDNA'ların Hipoksantin Fosforibozil Transferaz (*HPRT*) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Kontrolü

350-400 ng olarak sentezlenen cDNA'lar *HPRT* geni PZR ile kontrol edilmiş ve örnek fotoğraf şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 HPRT PZR ile yapılan cDNA kontrolüne ait örnek jel fotoğrafı

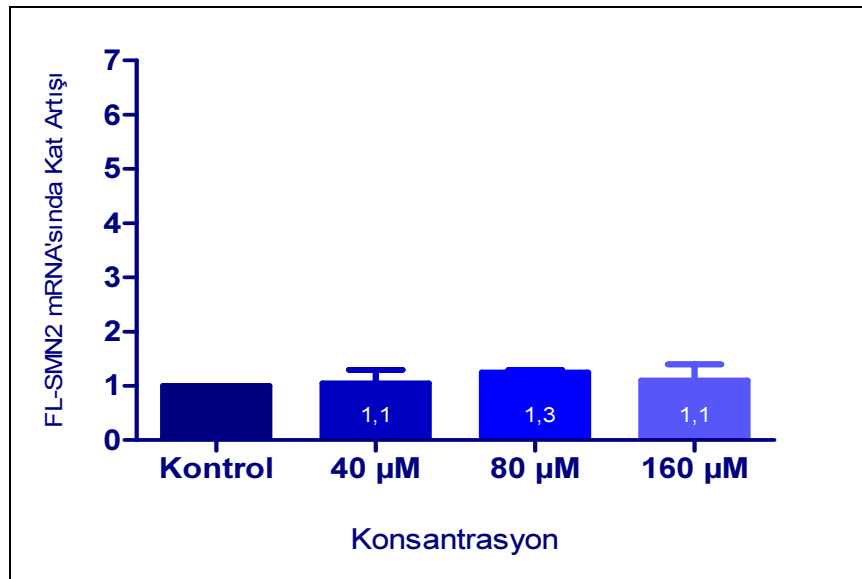
(M: 50bç moleküler ağırlık belirleyicisi)

4.3 Türev 1 Uygulamasının Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları

Türev 1 GM03813 hücre hattına 40, 80 ve 160 μM konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanmış, bu koşullardaki sitotoksik etkisi LDH testi ile incelenmiş ve hücre canlılığı %99 olarak saptanmıştır. Yapılan gerçek zamanlı PZR analizleri sonucunda FL-SMN2 mRNA'sındaki artışlar tablo 4.2'de, uygulamaların ortalaması alınarak hazırlanan grafik ise şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 Türev 1 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları

Türev 1	Kontrol	40 μM	80 μM	160 μM
1. uygulama	1,0	1,3	1,2	0,8
2. uygulama	1,0	0,9	1,3	1,4
Ortalama	1,0	1,1	1,3	1,1



Şekil 4.2 Türev 1 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları (Hata çubukları: $\pm\text{OSH}$)

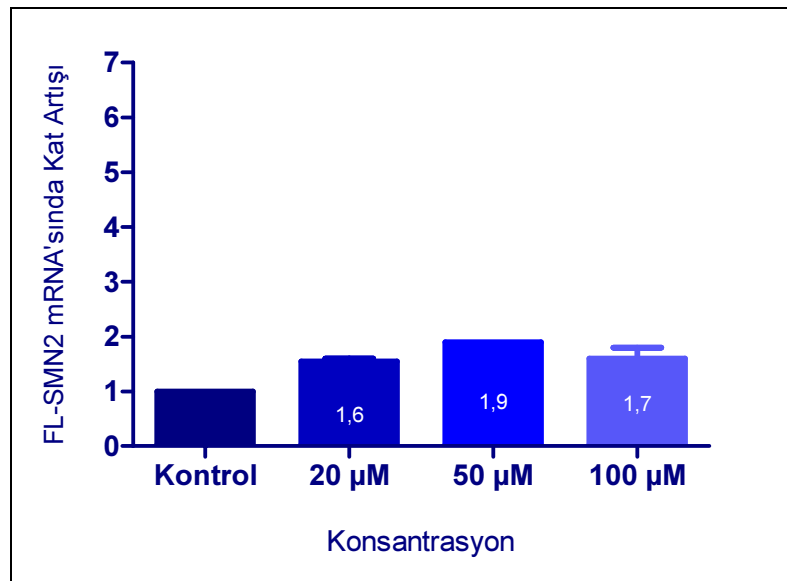
En fazla artış 80 μM konsantrasyonda 1,3 kat olarak saptanmasına rağmen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

4.4 Türev 2 Uygulamasının Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları

Türev 2 GM03813 hücre hattına 20, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanmış, bu koşulların sitotoksik olmadığı ve hücre canlılığının %100 devam ettiği gösterilmiştir. Yapılan gerçek zamanlı PZR analizleri sonucunda konsantrasyonlara göre *SMN2* mRNA'sındaki artışlar tablo 4.3'te, uygulamaların ortalama değer grafiği ise şekil 4.3 gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Türev 2 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları

Türev 2	Kontrol	20 μM	50 μM	100 μM
1. uygulama	1,0	1,6	1,9	1,4
2. uygulama	1,0	1,5	1,8	1,9
Ortalama	1,0	1,6	1,9	1,7



Şekil 4.3 Türev 2 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları (Hata çubukları: $\pm\text{OSH}$)

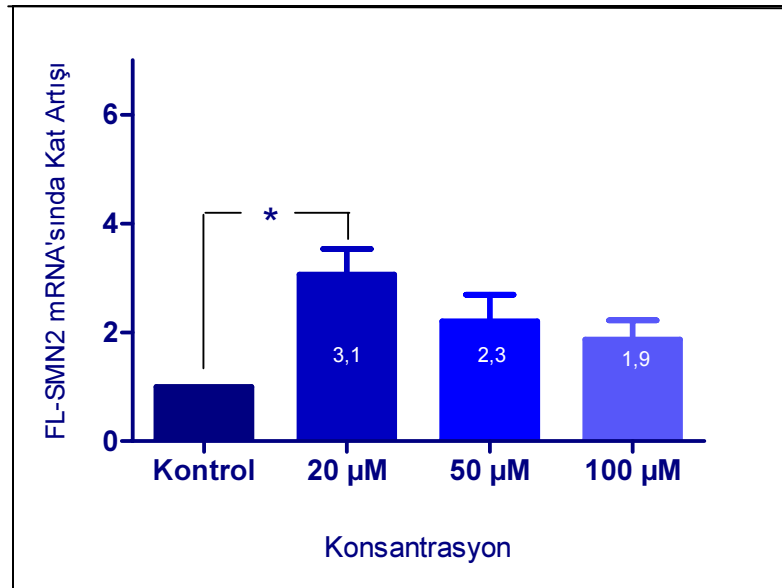
20 μM konsantrasyonda 1,6 ve 100 μM konsantrasyonda 1,7 katlık artışlar görülmüş olup en fazla artışın saptandığı 50 μM konsantrasyondaki 1,9 kat artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

4.5 Türev 3 Uygulamasının Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları

Türev 3 GM03813 hücre hattına 20, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Uygulama sonrası gerçek zamanlı PZR analizi sonuçları tablo 4.4'te ve uygulamaların ortalaması alınarak hazırlanan grafik şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4 GM03813 hücre hattına türev 3 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları

Türev 3	Kontrol	20 μM	50 μM	100 μM
1. uygulama	1,0	2,6	2,1	2,4
2. uygulama	1,0	2,6	1,4	1,2
3. uygulama	1,0	4,0	3,3	2,0
Ortalama	1,0	3,1	2,3	1,9



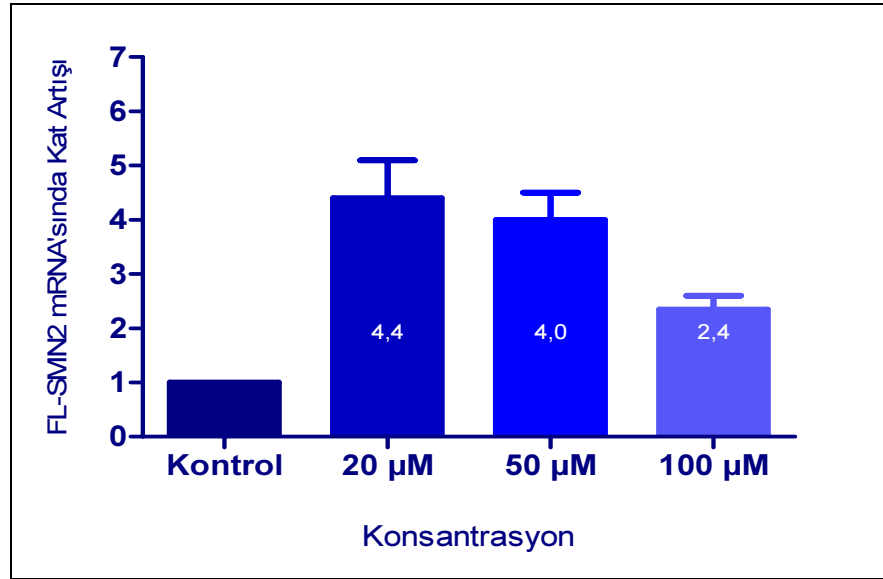
Şekil 4.4 GM03813 hücre hattına türev 3 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları (* $p=0,034$; Hata çubukları: $\pm\text{OSH}$)

En fazla kat artışının 20 μM konsantrasyonda 3,1 kat olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,034$) gösterilmiştir.

Türev 3'ün GM03813 hücre hattında sağladığı artışın yüksek bulunması nedeni ile bir başka SMA hücre hattı olan GM09677 üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Türev 3 uygulamalarının sonuçları tablo 4.5'te ve uygulamaların ortalaması alınarak hazırlanan grafik ise şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5 GM09677 hücre hattına türev 3 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları

Türev 3	Kontrol	20 μ M	50 μ M	100 μ M
1. uygulama	1,0	5,1	3,5	2,1
2. uygulama	1,0	3,7	4,5	2,6
Ortalama	1,0	4,4	4,0	2,4

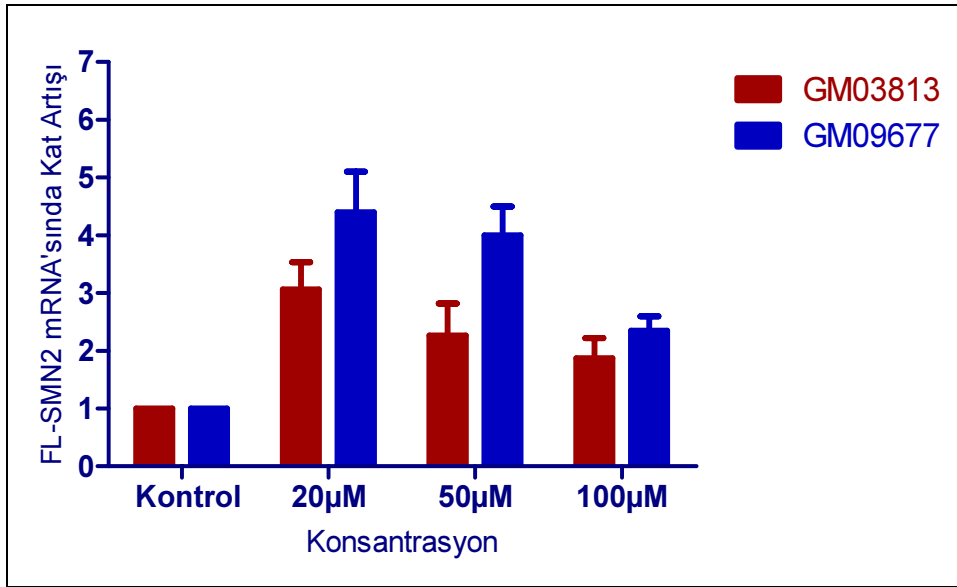


Şekil 4.5 GM09677 hücre hattına türev 3 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları (Hata çubukları: \pm OSH)

GM09677 hücre hattında araştırılan konsantrasyonlarda en yüksek artış 4,4 kat olarak 20 μ M konsantrasyonda görülmüştür. Bu hücre hattına yapılan

uygulama sayısı istatistiksel analiz için yeterli olmamıştır. Bununla birlikte artışın GM03813 hücre hattına oranla daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir.

Her iki hücre hattında benzer etki görülmüş ve en fazla kat artışı 20 μ M konsantrasyonda saptanmıştır (Şekil 4.6). Uygulanan türev 3 konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri her iki hücre hattında da araştırılmış ve hücre canlılığı %97-100 olarak saptanmıştır.



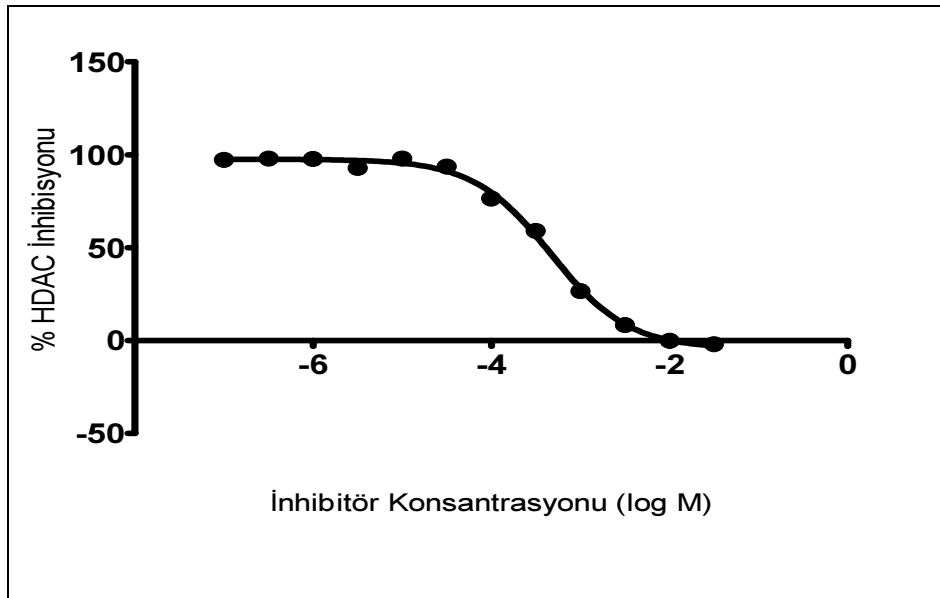
Şekil 4.6 Türev 3'ün GM03813 ve GM09677 hücre hatlarındaki etkisinin karşılaştırılması (Hata çubukları: \pm OSH)

4.5.1 Türev 3'ün HDAC Aktivitesinin IC₅₀ Değeri

Türev 3'ün HDAC aktivitesinin %50'sini inhibe ettiği IC₅₀ değerini hesaplamak için yapılan deneyin, spektrofotometrik okuma sonuçları tablo 4.6'da ve IC₅₀ grafiği şekil 4.6'da gösterilmiştir. Türev 3'ün HDAC aktivitesi üzerindeki IC₅₀ değeri 647 μ M olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.6 Türev 3 IC₅₀ verileri

Türev 3	1. okuma	2. okuma	3. okuma	Ortalama
Kontrol	5349	5282	5540	5390
1X10⁻⁷	5332	5276	5140	5249
3X10⁻⁷	5377	5104	5374	5285
1X10⁻⁶	5198	5381	5238	5272
3x10⁻⁶	5140	5033	4859	5011
1X10⁻⁵	5449	5149	5254	5284
3X10⁻⁵	4910	5319	4933	5054
1X10⁻⁴	4371	4096	3901	4123
3X10⁻⁴	3168	3256	3135	3186
1X10⁻³	1442	1446	1428	1438
3X10⁻³	497	440	415	451
1X10⁻²	27	28	-57	-1
3X10⁻²	-113	-80	-118	-104

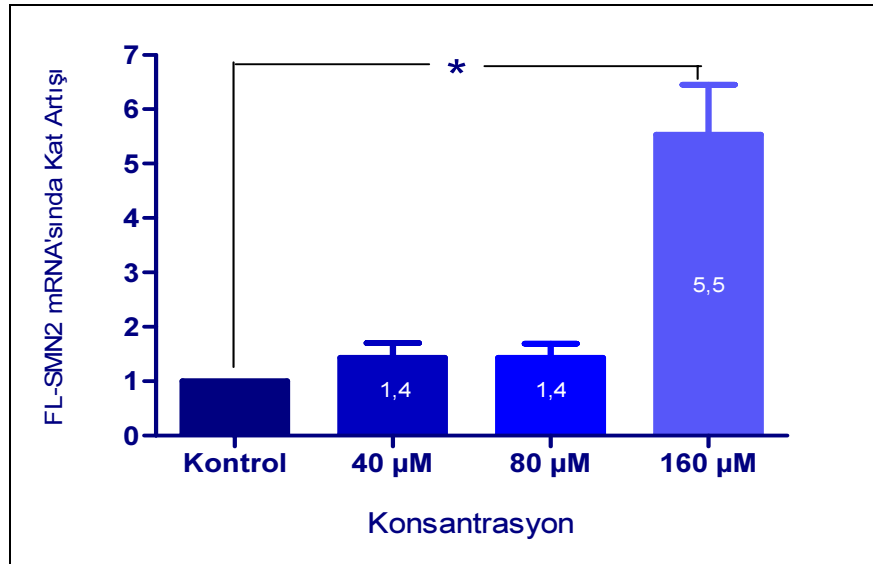
**Şekil 4.7** Türev 3'ün HDAC aktivitesi üzerindeki IC₅₀ grafiği (Hata çubukları: ±OSH)

4.6 Türev 4 Uygulamasının Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları

Türev 4 GM03813 hücre hattına 40, 80 ve 160 μM konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanmıştır. Uygulama sonrası gerçek zamanlı PZR analizi sonuçları tablo 4.7’de ve uygulamaların ortalaması alınarak hazırlanan grafik şekil 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7 GM03813 hücre hattına türev 4 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları

Türev 4	Kontrol	40 μM	80 μM	160 μM
1. uygulama	1,0	1,6	1,9	6,5
2. uygulama	1,0	0,9	1,0	3,7
3. uygulama	1,0	1,8	1,4	6,4
Ortalama	1,0	1,4	1,4	5,5



Şekil 4.8 GM03813 hücre hattına türev 4 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları (* $p=0,037$; hata çubukları $\pm\text{OSH}$)

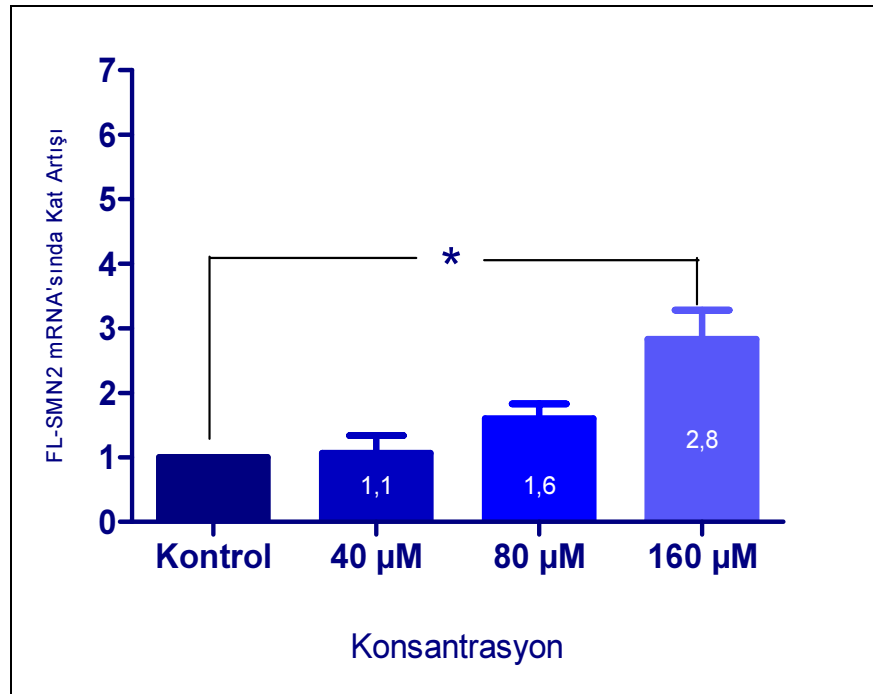
En fazla artışının 160 μM konsantrasyonda 5,5 kat olduğu bulunmuştur. Kruskal Wallis testi ile genel profilde anlamlılık bulunmasa da Mann Withney U

testi ile 160 μM konsantrasyondaki artışın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p=0,037$). Türev 4'ün konsantrasyona bağlı artış gösterdiği istatistiksel olarak Jonckheere-Terpstra testi ile sınıanmıştır. ($p= 0,007$).

Türev 4'ün GM03813 hücre hattında sağladığı artışın yüksek bulunması nedeniyle GM09677 hücre hattı üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Türev 4 uygulamalarının sonuçları tablo 4.8'de ve uygulamaların ortalaması alınarak hazırlanan grafik ise şekil 4.9'da gösterilmiştir.

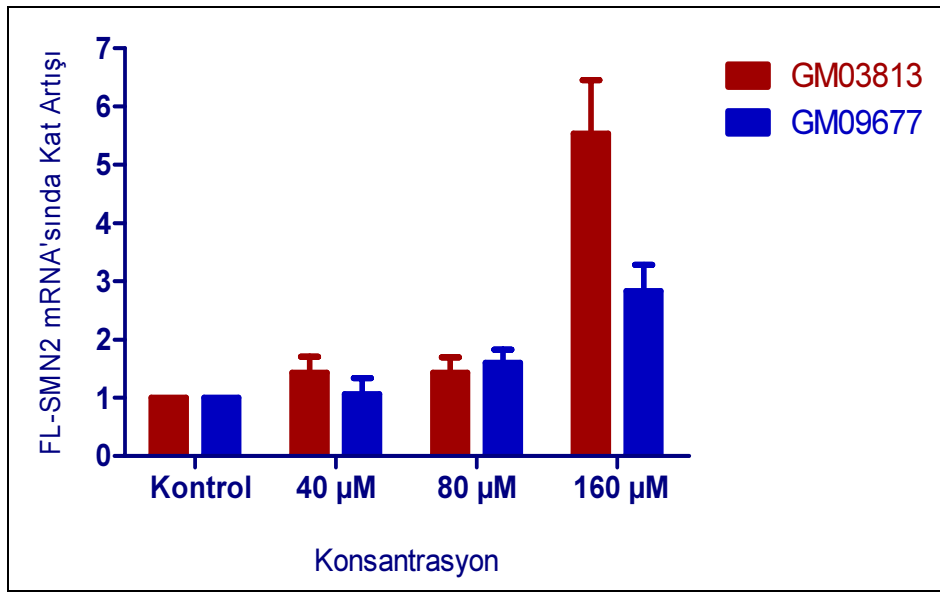
Tablo 4.8 GM09677 hücre hattına türev 4 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları

Türev 4	Kontrol	40 μM	80 μM	160 μM
1. uygulama	1,0	0,7	1,2	2,2
2. uygulama	1,0	0,9	2,0	2,6
3. uygulama	1,0	1,6	1,6	3,7
Ortalama	1,0	1,1	1,6	2,8



Şekil 4.9 GM09677 hücre hattına türev 4 uygulamaları sonucunda FL-SMN2 mRNA miktarında saptanan kat artışları (* $p=0,037$; hata çubukları $\pm\text{OSH}$)

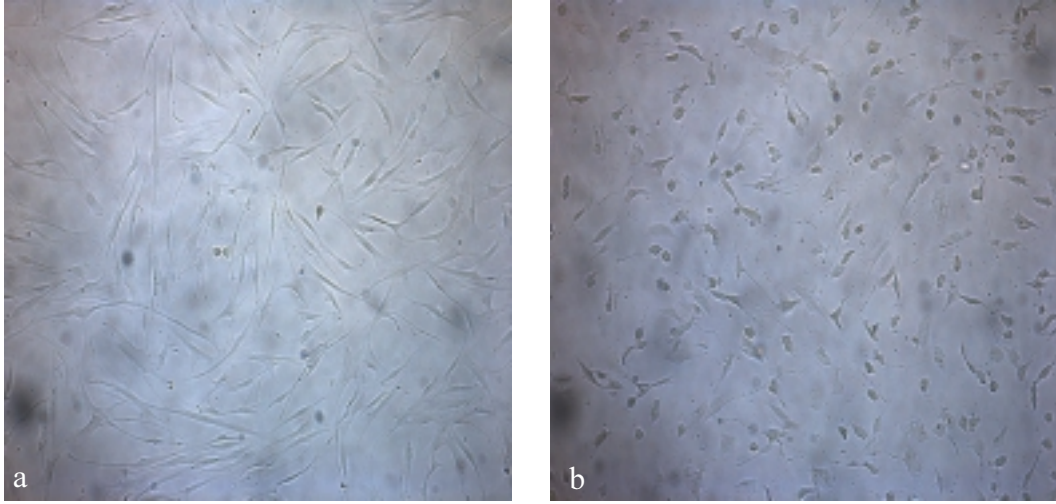
Türev 4'ün GM09677 hücre hattına uygulamalarında konsantrasyona bağlı olarak FL-SMN2 miktarında gösterdiği artış anlamlı ($p=0,005$) bulunmuş ve GM03813 hücre hattı ile benzer olarak (Şekil 4.10) en yüksek artış 160 μM konsantrasyonda saptanmıştır. 2,8 katlık bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,037$).



Şekil 4.10 Türev 4'ün GM03813 ve GM09677 hücre hatlarındaki etkisinin karşılaştırılması (Hata çubukları: $\pm\text{OSH}$)

4.6.1 Hücre Canlılığı

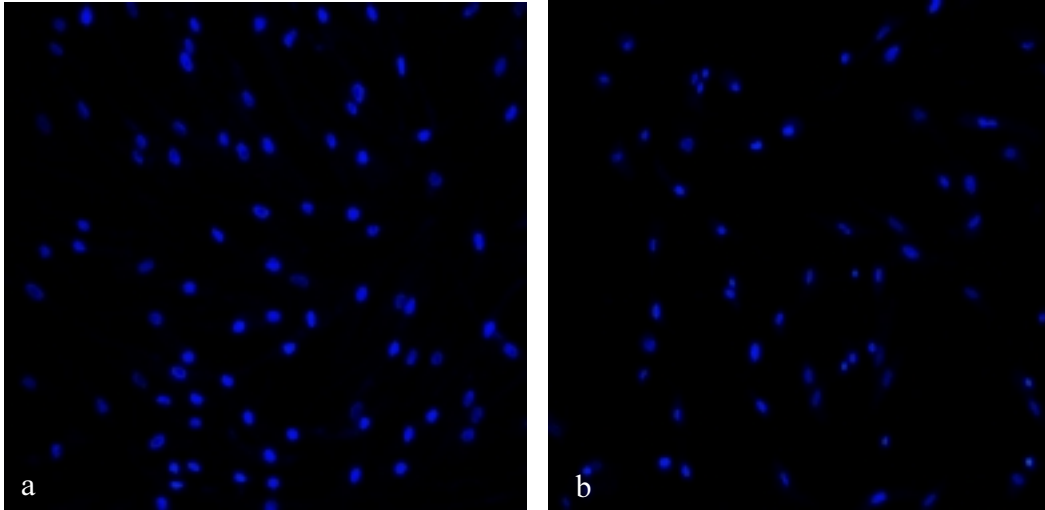
Türev 4'ün her iki hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi araştırıldığında canlılık %99-100 olarak saptanmıştır. Ancak GM03813 hücre hattına yapılan 200 μM uygulamada hücre morfolojilerinin bozulduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 SMA'lı fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.

a) kontrol, b) 200 µM türev 4 uygulaması

Ardından hücrelerin çekirdek morfolojilerini gözlemleyebilmek için DAPI ile çekirdek boyaması gerçekleştirilmiş ve hücre çekirdeklerinin kontrole göre küçüldüğü gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 SMA'lı fibroblastlarda DAPI ile çekirdek boyaması.

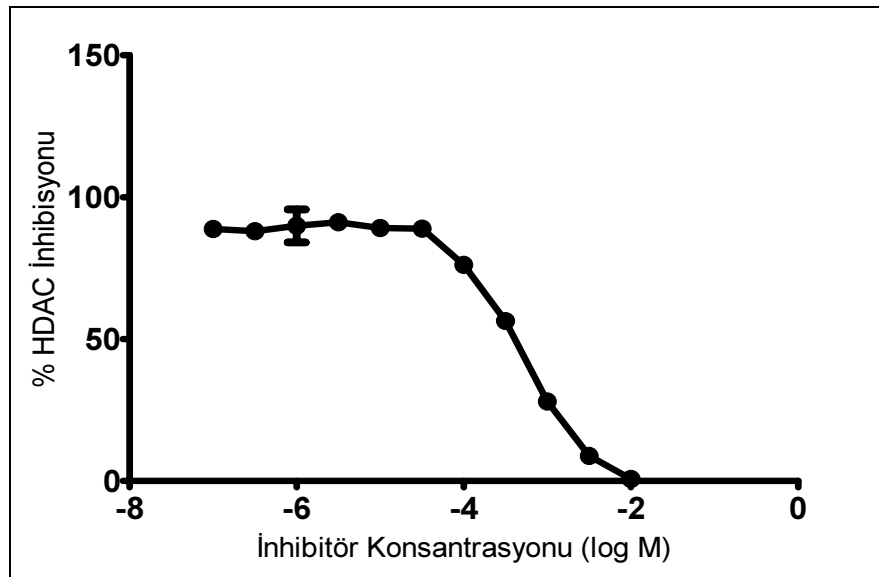
a) Kontrol, b) 200 µM türev 4 uygulaması

4.6.2 Türev 4'ün HDAC Aktivitesinin IC₅₀ Değeri

Türev 4'ün hesaplanan HDAC aktivitesinin IC₅₀ değeri verileri tablo 4.9'da, IC₅₀ grafiği ise şekil 4.13'te gösterilmiştir. Türev 4'ün HDAC aktivitesinin %50'sini inhibe ettiği değer 527 µM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.9 Türev 4 IC₅₀ verileri

Türev 4	1. okuma	2. okuma	3. okuma	Ortalama
Kontrol	6060	6347	6576	6328
1X10⁻⁷	5600	5493	5769	5621
3X10⁻⁷	5784	5588	5338	5570
1X10⁻⁶	6296	5028	5747	5691
3x10⁻⁶	5820	5776	5713	5770
1X10⁻⁵	5655	5684	5583	5641
3X10⁻⁵	5839	5698	5342	5626
1X10⁻⁴	4691	4920	4844	4818
3X10⁻⁴	3599	3537	3573	3569
1X10⁻³	1764	1757	1798	1773
3X10⁻³	570	546	556	557
1X10⁻²	60	60	18	46



Şekil 4.13 Türev 4'ün HDAC aktivitesi üzerindeki IC₅₀ grafiği (Hata çubukları: OSH)

5. TARTIŞMA

Spinal musküler atrofi, omurilikteki alfa motor nöronları etkileyen ve kistik fibrosisten sonra en sık görülen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Hastalığa neden olan *survival motor neuron* geni, *SMN1* ve *SMN2* olmak üzere iki kopyaya sahiptir (2). Hastalarda %93-96 oranında telomerik kopyanın homozigot delesyonu bulunmaktadır. *SMN2* geni hastalıktan sorumlu olmadığı halde kopya sayısı hastalığın ciddiyetini belirlemektedir. Çünkü *SMN2* geninin 7. eksonunda bulunan sitozinin timine transisyonu ESE dizi üzerinde değişikliğe yol açarak, *splicing*'te görevli faktörlerin bu bölgeye bağlanamamasına ve ekson 7 atlanmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda %80-90 oranında fonksiyonel olmayan SMN proteini üretilmektedir (3-6).

SMA için henüz bir tedavi yöntemi bulunmamakla birlikte hastalığın ilerleyişi ve moleküler genetik temeli anlaşıldıkça tedavi yöntemi olmaya aday birçok yaklaşım geliştirilmiştir. SMA tedavisinde; *SMN2* geninden bağımsız olan nöron korunması ya da nörorejenerasyon yaklaşımlarının yanı sıra *SMN2* geni *splicing* hatasının düzeltilmesi, promotör aktivasyonu ile FL-SMN2 miktarının artırılması, SMN proteininin stabilizasyonunun sağlanması gibi *SMN2* genine dayalı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunların içinde *SMN2* geninin sentezlediği tam uzunluktaki protein miktarının artırılması en uygun yaklaşım olarak görülmektedir. Bugüne kadar tam uzunluklu SMN2 mRNA miktarının artırılmasında HDAC inhibitörü olan ve olmayan birçok bileşik araştırılmıştır (7).

Anabilim Dalı'mızda yürütülmüş olan "RNA *Splicing* Hatalarının Neden Olduğu Kalıtsal Hastalıklarda İlaç Araştırma Geliştirme Çalışmaları" başlıklı projede SMA tedavisi için aday olabilecek bileşikler tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bu bileşikler içinde HDAC inhibisyon aktivitesi yüksek bulunan ve tam uzunluktaki mRNA miktarını artırdığı saptananlar türevlendirilmiştir. Türevlendirilen bileşiklerden dört tanesi SMA tedavisinde en uygun adaylar olarak düşünülmüş ve bu tez çalışmasına dahil edilerek *SMN2* geni üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda ticari olarak satın alınan GM03813 ve GM09677 tip I SMA insan fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Bileşiklerin uygulanacağı süre ve konsantrasyonlar türetildikleri bileşikler dikkate alınarak seçilmiş, türev 1 ve 4 için 40 μ M, 80 μ M ve 160 μ M, türev 2 ve 3 için ise 20 μ M, 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlar 24 saat süre ile uygulanmıştır. Uygulamaların ardından toplanan hücrelerden elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve *HPRT* geni PZR'si ile kontrolü yapılmıştır. Türev uygulaması sonrasında elde edilen bu cDNA'lar FL-SMN2 miktarını belirlemek amacıyla gerçek zamanlı PZR ile relatif olarak kantite edilmiştir. Çalışma sırasında internal kontrol olarak *GAPDH* ve β -*aktin* genleri kullanılmış ve mRNA kat artışları uygulamanın yapılmadığı örnek ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Bütanoik asit türevlerinden olan türev 1 GM03813 hücre hattına iki kez uygulanmış 40 μ M'da 1,1 kat, ve 160 μ M uygulamada 1,1 kat artış saptanmıştır. 80 μ M'da görülen ve en yüksek artış olan 1,3 kat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu türevin hücre canlılığı üzerindeki etkisi LDH canlılık testi ile gösterilmiş ve bileşik uygulanan hücrelerdeki canlılık oranı ~%99 olarak tespit edilmiştir.

Kanser tedavilerinde kullanılmak üzere araştırılan (84) bütanoik asitlerin diğer bir türevi olan türev 4, GM03813 hücre hattına uygulandığında FL-SMN2 mRNA miktarında artışa neden olmuş ve bu bileşik ile üç ayrı uygulama yapılmıştır. Yapılan uygulamalar sonucunda 40 μ M ve 80 μ M'da 1,4 katlık artışlar gözlenmiştir. 160 μ M'da gözlenen 5,5 katlık artış kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı ($p=0,037$) bulunmuştur. Türev 4 uygulamalarında en yüksek artışın 160 μ M'da görülmesi, bu konsantrasyondan fazla konsantrasyonlarda görülebilecek daha yüksek bir artışın gözden kaçırılmış olabileceğini gündeme getirmiştir. Bu nedenle daha yüksek konsantrasyon uygulanmadan önce sitotoksik etkisi araştırılmış ve 200 μ M konsantrasyonda canlılık testi yapılmıştır. LDH testi sonucunda canlılık 40 μ M, 80 μ M ve 160 μ M konsantrasyonlarda %100, 200 μ M konsantrasyonda ise %99 olarak saptanmıştır. LDH canlılık testi, ölen hücrelerden salınan LDH miktarını ölçen bir test olduğundan sadece hücre ölümü gerçekleştikten sonra bilgi vermektedir. Ancak

200 μM türev 4 uygulamasının mikroskopik görüntüsünde sitoplazmik uzantılara sahip fibroblast hücrelerinin mekik şekillerinin bozulduğu dikkati çekmiştir. LDH testinde görülme bile hücre canlılığının etkilenmeye başladığı düşünülerek yapılan DAPI boyaması ile de çekirdek morfolojisinin bozulduğu ve çekirdeklerin küçüldüğü gösterilmiştir. Bu nedenle 5,5 kat artışın görüldüğü 160 μM uygulamanın üzerinde bir konsantrasyonda araştırma yapılmamasına karar verilmiştir.

Türev 4'ün, 2 kattan fazla artışa neden olmasından dolayı ikinci bir hücre hattında daha denemesi uygun bulunmuş ve GM09677 hücre hattına da aynı konsantrasyon ve sürelerde uygulanmıştır. Araştırmamız sonucunda, konsantrasyon artışına paralel olarak FL-SMN2 mRNA miktarında artış saptanmış, 160 μM konsantrasyonda görülen 2,8 kat artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,037$). Daha yüksek bir kat artışını gözden kaçırmamak için 80-160 μM konsantrasyonların arasındaki değerlerin etkisinin de araştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Türev 4'ün uygulanan konsantrasyonlarında canlılık üzerinde herhangi bir olumsuz etkisine rastlanmamıştır.

Türev 4 GM03813 ($p=0,007$) ve GM09677 ($p=0,005$) hücreleri üzerinde konsantrasyona paralel olarak artan bir etki göstermiş ve bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. İki hücre hattında türev 4 uygulamalarına verilen cevaptaki farklılık, cevabın hücre hatlarına göre değişken olduğunu göstermiştir. Literatürde de bir bileşiğe verilen cevabın hücre hatları arasında değişebileceğini gösteren yayınlar bulunmaktadır (2,38,50). Kullandığımız her iki hücre hattının da ikişer adet SMN2 kopyası taşımaları bu farklılığın SMN2 kopya sayısından bağımsız olduğunu açıklamaktadır. Cevaptaki farklılık modifiye edici genlerin varlığından kaynaklanabileceği gibi ilaç metabolizmasında, taşınmasında veya ilaç hedeflerindeki genlerin polimorfizmlerinden de kaynaklandığı düşünülmektedir.

IC_{50} değeri, bir bileşiğin *in-vitro* ortamda biyolojik ya da biyokimyasal bir fonksiyonun %50'sini inhibe ettiği evrensel değerdir. Bu nedenle FL-SMN2 ifadesini artıran türev 4 için IC_{50} değeri araştırılmış ve 527 μM olarak hesaplanmıştır. Literatürde türev 4 gibi kısa zincirli yağ asitlerinden olup FL-

SMN2 miktarını artıran sodyum bütiratın IC_{50} değeri $800 \mu\text{M}$ ve valproik asidin ise $7240 \mu\text{M}$ olarak bildirilmektedir (47). Bu durum türev 4'ün SMA tedavisinde aday bileşikler olarak gösterilen sodyum bütirat ve valproik aside göre daha güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğunu görüşünü desteklemektedir.

Kafeik asit, fenolik bir karboksilik asittir (85). Bu bileşiğin anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-alerjik ve immunomodülasyon gibi birçok özelliğinin yanında (86) , idrarla sadece %11'lik kısmının atılması biyoyararlanımını kuvvetlendirmektedir (85). Bunlardan, kafeik asit dimeri olan türev 2'nin (rosmarinik asit) kafeik aside benzer etkilerinin yanı sıra (86), nöron koruyucu etkisi olduğu ve çeşitli hücre içi olaylarda rol oynadığı bilinmektedir (87). GM03813 hücre hattına yapılan türev 2 uygulaması sonucunda *SMN2* mRNA'sında en yüksek artış $50 \mu\text{M}$ konsantrasyonda 1,9 kat olarak gözlenmiştir. İki kez tekrarlanan çalışmadaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Daha yüksek konsantrasyona çıkılarak yapılan $100 \mu\text{M}$ uygulamadaki artışın düşmesi nedeniyle çalışma sonlandırılmıştır. Türev 2'nin uygulanan konsantrasyonlarında canlılık üzerinde herhangi bir olumsuz etkisine rastlanmamıştır.

Türev 3 olarak adlandırdığımız kuersetin ise kafeik asit esteri olup kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki göstermekte ve diyabetik nöropati semptomlarını azaltmaktadır (88). Sağlıklı hücre kültürlerinde hücre koruyucu etkisi bulunmakta, tümörlü hücrelerde hücre büyümesini inhibe etmekte ve hücre ölümünü tetiklemektedir (87). Türev 3 GM03813 hücrelerine üç kez uygulanmıştır. Yapılan analizlerle $20 \mu\text{M}$ konsantrasyonda hücre canlılığı ~%98 oranında bulunmuş ve bu konsantrasyonda 3,1 kat anlamlı artış gözlenmiştir ($p=0,034$). FL-SMN2 miktarında gözlenen bu artışın yüksek olması nedeniyle GM09766 hücre hattına da uygulanmış ve en yüksek artış yine $20 \mu\text{M}$ konsantrasyonda 4,4 kat olarak saptanmıştır. Uygulama sayısı yeterli olmadığı için bu artışın istatistiksel değerlendirmesi yapılamamasına karşın, GM03813 hücre hattına göre daha yüksek artış gösterdiği dikkati çekmiştir. Her iki hücre hattında da en yüksek artışların görüldüğü $20 \mu\text{M}$ konsantrasyonun yakınındaki değerlerin incelenmesi ile daha yüksek artışlar gözden kaçırılması

engellenebilecektir. Türev 3'ün hücre canlılığına olumsuz bir etkisi saptanmamıştır.

Türev 3 uygulamaları için iki hücre hattı arasındaki farklılığın bireyler arası polimorfizmlerden kaynaklandığı düşünülmüştür.

SMA'lı fibroblastlarda FL-SMN2 ifadesini artıran türev 3'ün HDAC aktivitesinin %50'sini inhibe ettiği IC₅₀ değeri 647 µM olarak hesaplanmıştır. Kafeik asit esteri olan türev 3'ün IC₅₀ değeri köken aldığı kafeik asitten (IC₅₀:2540 µM) daha düşük bulunmuş ve kafeik aside göre HDAC inhibisyon etkisinin daha güçlü olduğu saptanmıştır (37). SMA tedavisinde aday bileşikler olarak gösterilen hidroksamik asitler sınıfındaki TSA, SAHA ve panobinostatın IC₅₀ değerlerinin nanomolar düzeyde olması, bu bileşiklerin türev 3 ve 4'ten daha kuvvetli inhibitör olduklarını göstermektedir (47,89).

Sodyum bütirat SMN mRNA ve protein seviyesini artırdığı bildirilen ilk HDAC inhibitörüdür (39). Fakat serumdaki yarı ömrünün kısa olması araştırmacıları yeni bileşik arayışına götürmüştür (7). 2004 yılında Andreassi ve diğ. bütirat türevi olan fenilbütirat ile yaptıkları çalışmalarda FL-SMN2 ifadesini 1,6 kat kadar artırdığını göstermişlerse de (43), bunu takiben yapılan araştırmalarda beklenen başarı sağlanamamıştır (90,91).

SMA tedavisinde aday molekül olarak üzerinde çok sayıda araştırma yapılan diğer bir HDAC inhibitörü valproik asittir. Valproik asidin GM03813 hücre hattında FL-SMN2 ifadesini 2 kat artırdığı ancak GM09677 hücre hattında herhangi bir artışa neden olmadığı bildirilmiş ve valproik aside verilen cevapların kişiden kişiye değiştiği dikkat çekmiştir (40). Yine aynı yıl Almanya'daki bir grup araştırmacı 3 farklı SMA'lı hücre hattına yapılan uygulamalarda cevabın kişiye bağlı değişkenliğini göstermişlerdir (41). Valproik asidin *in vivo* çalışmaları da mevcuttur. 2008 yılında SMA'lı farelere uygulaması sonrasında motor fonksiyonlarda az da olsa iyileşme olduğu saptanmıştır (92). Brichta ve diğ.'nin klinik çalışmaları 7/10 taşıyıcı ve 7/20 hastada FL-SMN mRNA ve protein miktarında artış olduğunu göstermiştir (93). Ayrıca Washington Üniversitesi'nde

SMA tip III/IV hastalarının sekiz ay valproik asit ile tedavi edilmeleri sonucunda kas gücü ve fonksiyonunda artış saptanmıştır (94).

SMA tedavisinde kısa zincirli yağ asitlerinden başka hidroksamik asitler de araştırılmış ve TSA uygulandığında yaklaşık 2 kat, SAHA'da ise 2-3 katlık artışlar gözlenmiştir (45).

Histon deasetilaz inhibitörleri belli HDAC enzim sınıflarına seçicilik göstererek onların inhibisyonunu sağlamaktadır. *SMN2* promotorunun HDAC 1 ve 2 ile etkileşimde olduğu HDAC 3, 4 ve 5 ile etkileşmediği bilinmektedir. (95) Bununla beraber HDAC inhibitörlerinin pleiotrofik etkileri göz önünde bulundurulduğunda, türev 3 ve 4'ün HDAC izoenzimleri üzerindeki etkilerinin araştırılması ile etki mekanizmasının aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında türev 3 ve türev 4'ün bugüne dek etkili olduğu bildirilen HDAC inhibitörleri ile karşılaştırılmaları, SMA tedavisinde aday bileşikler arasına girebilecek potansiyele sahip olduklarını göstermiştir. Bir sonraki aşamada bu türevlerin SMN proteini üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ile hastalık modeli olarak seçilen fibroblast hücrelerine ilişkin çalışmalar tamamlanabilecektir. SMA'nın bir motor nöron hastalığı olması nedeniyle türev 3 ve 4'ün etkilerinin motor nöronlarda veya nöron benzeri hücrelerde araştırılmalarını takiben *in-vivo* çalışmaların başlatılabilmesi mümkün olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Yüksek HDAC inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bilinen bütanoik asit ester türevlerinden türev 1 ve türev 4, kafeik asit türevlerinden türev 2 ve 3 tip I SMA'lı fibroblast hücre hatlarına uygulanarak *SMN2* geninden ifade edilen FL-SMN2 mRNA miktarı gerçek zamanlı PZR ile saptanmıştır.
- Bütanoik asit türevi olan türev 1'in GM03813 hücre hattına 80 μ M uygulanması sonucunda FL-SMN2 miktarında görülen 1,3 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- Kafeik asit dimeri olan türev 2'nin GM03813 hücre hattına 50 μ M uygulanması sonucunda FL-SMN2 miktarında görülen 1,9 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.
- Kafeik asit esterleri olan türev 3 GM03813 hücre hattına uygulandığında FL-SMN2 miktarında 3,1 katlık anlamlı ($p=0,034$) artış görülmesi nedeniyle bir diğer SMA'lı hücre hattı olan GM09677'ye de aynı konsantrasyon ve sürelerde uygulanmış ve en yüksek artış 4,4 kat olarak bulunmuştur. Her iki hücre hattında da en yüksek artışlar 20 μ M konsantrasyonda gözlenmiştir.
- Türev 3'ün HDAC aktivitesinin %50'sini inhibe ettiği değer (IC_{50}) 647 μ M olarak saptanmış ve köken aldığı kafeik asit bileşiğinden daha güçlü inhibisyon özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir.
- GM03813 hücre hattına 160 μ M türev 4 uygulandığında görülen 5,5 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,037$) bulunmuş ve bu türev GM09677 hücre hattına da aynı süre ve konsantrasyonlarda uygulanmıştır. FL-SMN2 mRNA artışı konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak gözlenmiş ve yine en yüksek artış 160 μ M konsantrasyonda 2,8 kat olarak saptanmış ve istatistiksel anlamlı olduğu ($p=0,037$) gösterilmiştir.

- Türev 4 uygulamalarının konsantrasyona bağlı artış eğilimi gösterdiği istatistiksel olarak saptanmıştır (GM03818 p=0,037; GM09677 p=0,005).
- Araştırdığımız bileşiklerin hiçbirinin hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkisine rastlanmamıştır. Ancak 200 µM türev 4'ün hücre morfolojisini bozulduğu görülmüş, aynı konsantrasyonda yapılan DAPI ile çekirdek boyaması sonucunda ise çekirdeklerin küçüldüğü saptanmıştır. Bu nedenle 200 µM ve daha yüksek konsantrasyonlar gerçek zamanlı PZR yöntemi ile çalışılmamıştır.
- Türev 4'ün IC₅₀ değeri 527 µM olarak hesaplanmış ve bu değer SMA tedavisinde aday bileşikler olarak gösterilen sodyum bütirat ve valproik asit gibi bütanoik asit türevlerine göre daha düşük bulunmuştur.
- Türev 3 ve türev 4'ün en yüksek kat artışları sağlayan konsantrasyonlarına yakın olan diğer konsantrasyonlar incelenerek araştırmalar genişletilebilir.
- SMA'lı fibroblast hücrelerinin FL-SMN2 mRNA miktarında yüksek artışa neden olan türev 3 ve 4'ün SMN proteini üzerindeki etkilerinin gösterilmesini takiben in-vivo şartlarda ve farmakokinetik/farmakodinamik yönden araştırmaları önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- 1.Simic, G. (2008) Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol*, 116 (3), 223-234.
- 2.Monani, U.R. (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron*, 48 (6), 885-896.
- 3.Erdem, H., Pehlivan, S., Topaloglu, H.,Ozguc, M. (1999) Deletion analysis in Turkish patients with spinal muscular atrophy. *Brain Dev*, 21 (2), 86-89.
- 4.Lunn, M.R.,Wang, C.H. (2008) Spinal muscular atrophy. *Lancet*, 371 (9630), 2120-2133.
- 5.Sumner, C.J. (2006) Therapeutics development for spinal muscular atrophy. *NeuroRx*, 3 (2), 235-245.
- 6.Wirth, B. (2002) Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 3 (2), 87-95.
- 7.Wirth, B., Riessland, M., Hahnen, E. (2007) Drug discovery for spinal muscular atrophy. *expert Opin Drug Discovery*, 2 (4), 437-451.
- 8.Wirth, B., Brichta, L.,Hahnen, E. (2006) Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol*, 13 (2), 121-131.
- 9.Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H. ve diğerleri. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*, 8 (7), 1177-1183.
- 10.Swoboda, K.J., Kissel, J.T., Crawford, T.O., Bromberg, M.B., Acsadi, G., D'Anjou, G. ve diğerleri. (2007) Perspectives on clinical trials in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol*, 22 (8), 957-966.
- 11.Sumner, C.J. (2007) Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol*, 22 (8), 979-989.
- 12.Prior, T.W. (2007) Spinal muscular atrophy diagnostics. *J Child Neurol*, 22 (8), 952-956.
- 13.Lefebvre, S., Burglen, L., Frezal, J., Munnich, A.,Melki, J. (1998) The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 7 (10), 1531-1536.
- 14.Ogino, S.,Wilson, R.B. (2004) Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, 4 (1), 15-29.
- 15.Monani, U.R., McPherson, J.D.,Burghes, A.H. (1999) Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta*, 1445 (3), 330-336.
- 16.Faustino, N.A.,Cooper, T.A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, 17 (4), 419-437.
- 17.Oprea, G.E., Krober, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Muller, S., Krawczak, M. ve diğerleri. (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*, 320 (5875), 524-527.
- 18.Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. . (2002). *Molecular biology of the cell (fourth bs.)*: Garland Science.

19. Caceres, J.F., Kornblihtt, A.R. (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet*, 18 (4), 186-193.
20. Cartegni, L., Chew, S.L., Krainer, A.R. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*, 3 (4), 285-298.
21. Kolb, S.J., Battle, D.J., Dreyfuss, G. (2007) Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol*, 22 (8), 990-994.
22. Yong, J., Wan, L., Dreyfuss, G. (2004) Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends Cell Biol*, 14 (5), 226-232.
23. Burghes, A.H., Beattie, C.E. (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci*, 10 (8), 597-609.
24. Morrison, B.E., Majdzadeh, N., D'Mello, S.R. (2007) Histone deacetylases: focus on the nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 64 (17), 2258-2269.
25. Lunke, S., El-Osta, A. (2009) The emerging role of epigenetic modifications and chromatin remodeling in spinal muscular atrophy. *J Neurochem*, 109 (6), 1557-1569.
26. Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128 (4), 693-705.
27. Hauser, A.T., Jung, M. (2008) Targeting epigenetic mechanisms: potential of natural products in cancer chemoprevention. *Planta Med*, 74 (13), 1593-1601.
28. Echaniz-Laguna, A., Bousiges, O., Loeffler, J.P., Boutillier, A.L. (2008) Histone deacetylase inhibitors: therapeutic agents and research tools for deciphering motor neuron diseases. *Curr Med Chem*, 15 (13), 1263-1273.
29. Minucci, S., Pelicci, P.G. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 6 (1), 38-51.
30. Kazantsev, A.G., Thompson, L.M. (2008) Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 7 (10), 854-868.
31. Hahnen, E., Hauke, J., Trankle, C., Eyupoglu, I.Y., Wirth, B., Blumcke, I. (2008) Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, 17 (2), 169-184.
32. Abel, T., Zukin, R.S. (2008) Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol*, 8 (1), 57-64.
33. Haberland, M., Montgomery, R.L., Olson, E.N. (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*, 10 (1), 32-42.
34. Dowling, D.P., Gantt, S.L., Gattis, S.G., Fierke, C.A., Christianson, D.W. (2008) Structural studies of human histone deacetylase 8 and its site-specific variants complexed with substrate and inhibitors. *Biochemistry*, 47 (51), 13554-13563.
35. de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370 (Pt 3), 737-749.

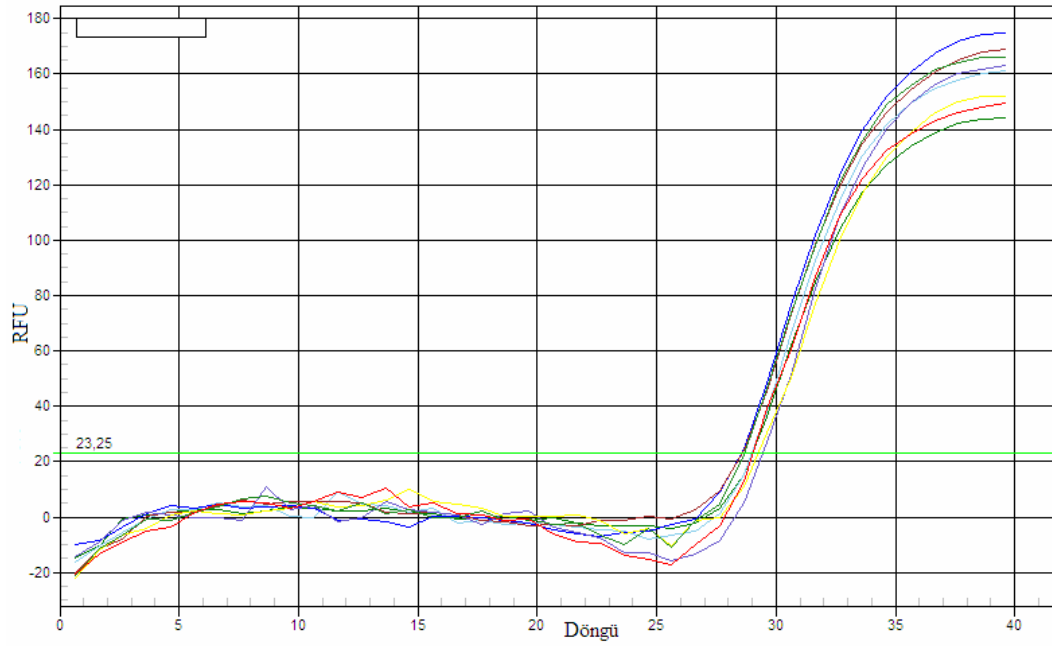
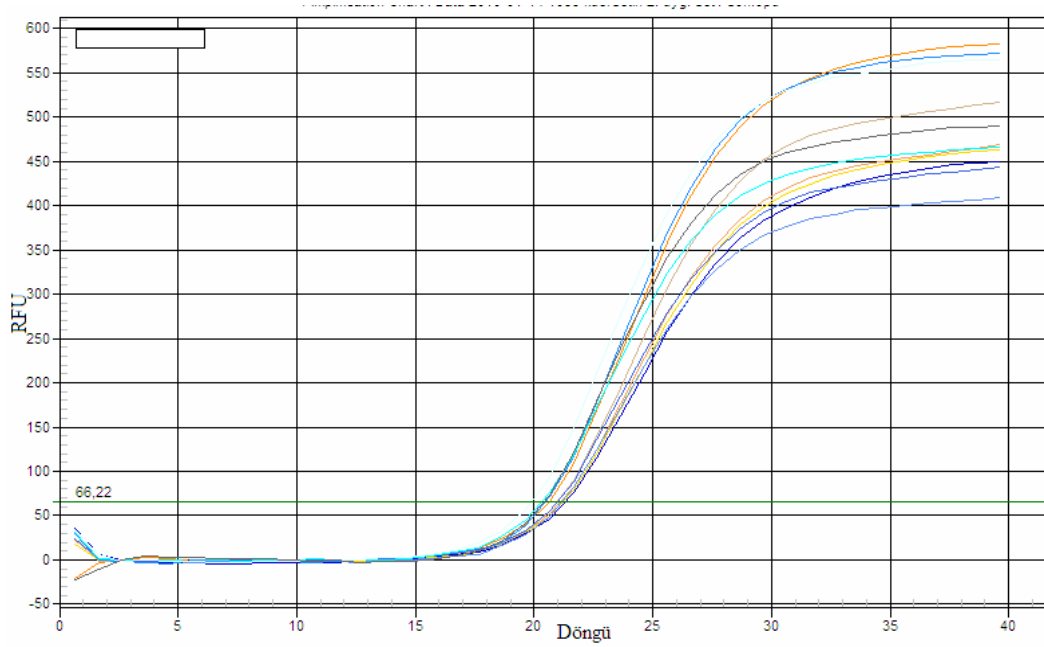
36. Marks, P.A., Xu, W.S. (2009) Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem*, 107 (4), 600-608.
37. Bora-Tatar, G., Dayangac-Erden, D., Demir, A.S., Dalkara, S., Yelekci, K., Erdem-Yurter, H. (2009) Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies. *Bioorg Med Chem*, 17 (14), 5219-5228.
38. Dayangac-Erden, D., Bora, G., Ayhan, P., Kocaefe, C., Dalkara, S., Yelekci, K. ve diğ erleri. (2009) Histone deacetylase inhibition activity and molecular docking of (e)-resveratrol: its therapeutic potential in spinal muscular atrophy. *Chem Biol Drug Des*, 73 (3), 355-364.
39. Chang, J.G., Hsieh-Li, H.M., Jong, Y.J., Wang, N.M., Tsai, C.H., Li, H. (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (17), 9808-9813.
40. Sumner, C.J., Huynh, T.N., Markowitz, J.A., Perhac, J.S., Hill, B., Coover, D.D. ve diğ erleri. (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol*, 54 (5), 647-654.
41. Brichta, L., Hofmann, Y., Hahnen, E., Siebzehnruhl, F.A., Raschke, H., Blumcke, I. ve diğ erleri. (2003) 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.
42. Carey, N., La Thangue, N.B. (2006) Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. *Curr Opin Pharmacol*, 6 (4), 369-375.
43. Andreassi, C., Angelozzi, C., Tiziano, F.D., Vitali, T., De Vincenzi, E., Boninsegna, A. ve diğ erleri. (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*, 12 (1), 59-65.
44. Sakla, M.S., Lorson, C.L. (2008) Induction of full-length survival motor neuron by polyphenol botanical compounds. *Hum Genet*, 122 (6), 635-643.
45. Avila, A.M., Burnett, B.G., Taye, A.A., Gabanella, F., Knight, M.A., Hartenstein, P. ve diğ erleri. (2007) Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*, 117 (3), 659-671.
46. Codd, R., Braich, N., Liu, J., Soe, C.Z., Pakchung, A.A. (2009) Zn(II)-dependent histone deacetylase inhibitors: suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A. *Int J Biochem Cell Biol*, 41 (4), 736-739.
47. Hahnen, E., Eyupoglu, I.Y., Brichta, L., Haastert, K., Trankle, C., Siebzehnruhl, F.A. ve diğ erleri. (2006) In vitro and ex vivo evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Neurochem*, 98 (1), 193-202.
48. Riessland, M., Ackermann, B., Forster, A., Jakubik, M., Hauke, J., Garbes, L. ve diğ erleri. SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*.
49. Atadja, P. (2009) Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. *Cancer Lett*, 280 (2), 233-241.
50. Riessland, M., Brichta, L., Hahnen, E., Wirth, B. (2006) The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Hum Genet*, 120 (1), 101-110.

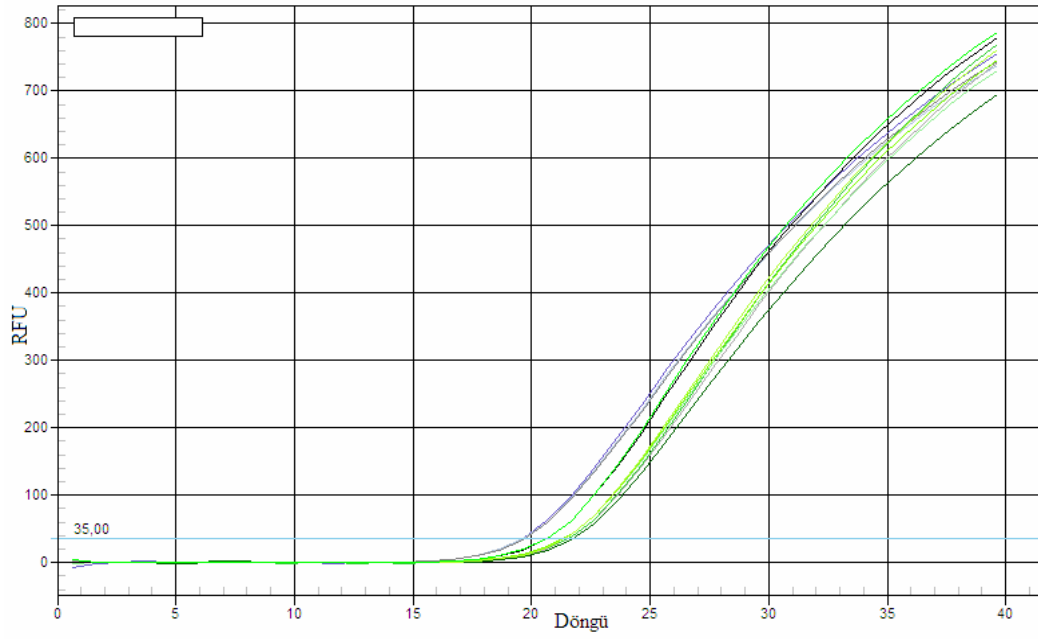
51. Andreassi, C., Jarecki, J., Zhou, J., Coovert, D.D., Monani, U.R., Chen, X. ve diğerleri. (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet*, 10 (24), 2841-2849.
52. Ting, C.H., Lin, C.W., Wen, S.L., Hsieh-Li, H.M., Li, H. (2007) Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 16 (5), 499-514.
53. Angelozzi, C., Borgo, F., Tiziano, F.D., Martella, A., Neri, G., Brahe, C. (2008) Salbutamol increases SMN mRNA and protein levels in spinal muscular atrophy cells. *J Med Genet*, 45 (1), 29-31.
54. Liang, W.C., Yuo, C.Y., Chang, J.G., Chen, Y.C., Chang, Y.F., Wang, H.Y. ve diğerleri. (2008) The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patients. *J Neurol Sci*, 268 (1-2), 87-94.
55. Baron-Delage, S., Abadie, A., Echaniz-Laguna, A., Melki, J., Beretta, L. (2000) Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol Med*, 6 (11), 957-968.
56. Singh, J., Salcius, M., Liu, S.W., Staker, B.L., Mishra, R., Thurmond, J. ve diğerleri. (2008) DcpS as a therapeutic target for spinal muscular atrophy. *ACS Chem Biol*, 3 (11), 711-722.
57. Butchbach, M.E., Singh, J., Thorsteinsdottir, M., Saieva, L., Slominski, E., Thurmond, J. ve diğerleri. Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 19 (3), 454-467.
58. Zhang, M.L., Lorson, C.L., Androphy, E.J., Zhou, J. (2001) An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA. *Gene Ther*, 8 (20), 1532-1538.
59. Tzeng, A.C., Cheng, J., Fryczynski, H., Niranjan, V., Stitik, T., Sial, A. ve diğerleri. (2000) A study of thyrotropin-releasing hormone for the treatment of spinal muscular atrophy: a preliminary report. *Am J Phys Med Rehabil*, 79 (5), 435-440.
60. Wolstencroft, E.C., Mattis, V., Bajer, A.A., Young, P.J., Lorson, C.L. (2005) A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels. *Hum Mol Genet*, 14 (9), 1199-1210.
61. Mattis, V.B., Rai, R., Wang, J., Chang, C.W., Coady, T., Lorson, C.L. (2006) Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts. *Hum Genet*, 120 (4), 589-601.
62. Heier, C.R., DiDonato, C.J. (2009) Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo. *Hum Mol Genet*, 18 (7), 1310-1322.
63. Lunn, M.R., Root, D.E., Martino, A.M., Flaherty, S.P., Kelley, B.P., Coovert, D.D. ve diğerleri. (2004) Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism. *Chem Biol*, 11 (11), 1489-1493.
64. Chang, H.C., Hung, W.C., Chuang, Y.J., Jong, Y.J. (2004) Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem Int*, 45 (7), 1107-1112.

65. Burnett, B.G., Munoz, E., Tandon, A., Kwon, D.Y., Sumner, C.J., Fischbeck, K.H. (2009) Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol*, 29 (5), 1107-1115.
66. Horne, C., Young, P.J. (2009) Is RNA manipulation a viable therapy for spinal muscular atrophy? *J Neurol Sci*, 287 (1-2), 27-31.
67. Singh, N.K., Singh, N.N., Androphy, E.J., Singh, R.N. (2006) Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol*, 26 (4), 1333-1346.
68. Williams, J.H., Schray, R.C., Patterson, C.A., Ayitey, S.O., Tallent, M.K., Lutz, G.J. (2009) Oligonucleotide-mediated survival of motor neuron protein expression in CNS improves phenotype in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Neurosci*, 29 (24), 7633-7638.
69. Cartegni, L., Krainer, A.R. (2003) Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol*, 10 (2), 120-125.
70. Skordis, L.A., Dunckley, M.G., Yue, B., Eperon, I.C., Muntoni, F. (2003) Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (7), 4114-4119.
71. Oskoui, M., Kaufmann, P. (2008) Spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics*, 5 (4), 499-506.
72. Harper, J.M., Krishnan, C., Darman, J.S., Deshpande, D.M., Peck, S., Shats, I. ve diğerleri. (2004) Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (18), 7123-7128.
73. Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Ronchi, D. ve diğerleri. (2008) Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*, 118 (10), 3316-3330.
74. Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Ronchi, D. ve diğerleri. Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Brain*, 133 (Pt 2), 465-481.
75. Azzouz, M., Le, T., Ralph, G.S., Walmsley, L., Monani, U.R., Lee, D.C. ve diğerleri. (2004) Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*, 114 (12), 1726-1731.
76. Azzouz, M., Kingsman, S.M., Mazarakis, N.D. (2004) Lentiviral vectors for treating and modeling human CNS disorders. *J Gene Med*, 6 (9), 951-962.
77. Passini, M.A., Bu, J., Roskelley, E.M., Richards, A.M., Sardi, S.P., O'Riordan, C.R. ve diğerleri. CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*, 120 (4), 1253-1264.
78. Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M. ve diğerleri. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol*, 28 (3), 271-274.
79. Salah-Mohellibi, N., Millet, G., Andre-Schmutz, I., Desforges, B., Olasso, R., Roblot, N. ve diğerleri. (2006) Bone marrow transplantation attenuates the

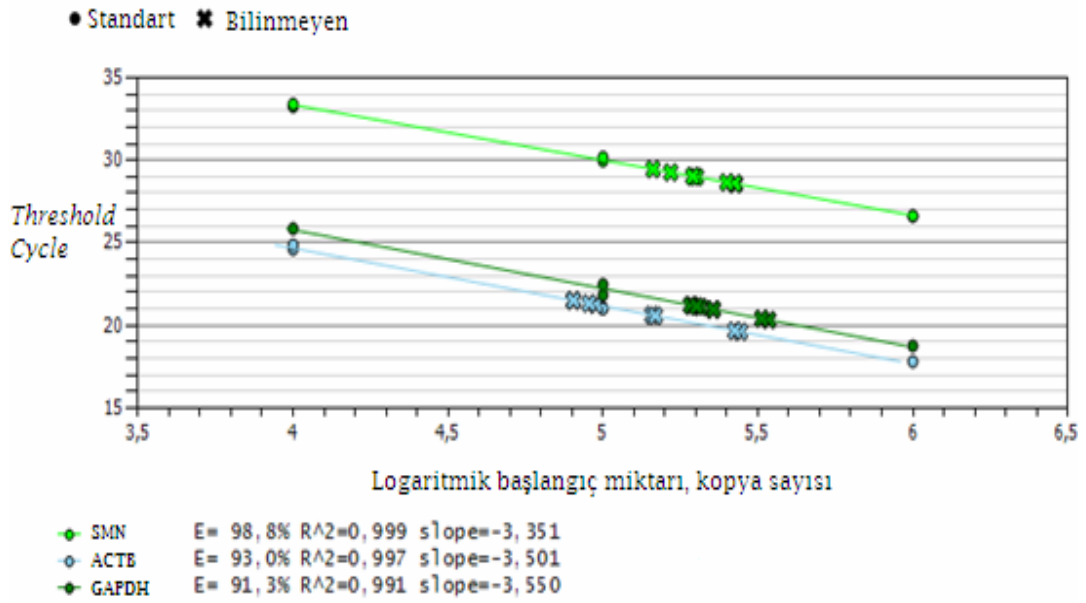
- myopathic phenotype of a muscular mouse model of spinal muscular atrophy. *Stem Cells*, 24 (12), 2723-2732.
80. Ekestern, E. (2004) Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis*, 1 (2-3), 88-100.
 81. Lesbordes, J.C., Cifuentes-Diaz, C., Miroglio, A., Joshi, V., Bordet, T., Kahn, A. ve diğeri. (2003) Therapeutic benefits of cadiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 12 (11), 1233-1239.
 82. QuantiTect® Reverse Transcription Handbook
 83. <http://www.dkfz.de/gpcf/lightcycler480.html>
 84. Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., Englyst, H.N. (2001) Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr*, 73 (suppl), 415-420
 85. Olthof, M.R., Hollman, P.C., Katan, M.B. (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr*, 131 (1), 66-71.
 86. Jiang, R.W., Lau, K.M., Hon, P.M., Mak, T.C., Woo, K.S., Fung, K.P. (2005) Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Curr Med Chem*, 12 (2), 237-246.
 87. Jaganathan, S.K., Mandal, M. (2009) Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 830616.
 88. Bischoff, S.C. (2008) Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11 (6), 733-740.
 89. Colussi, C., Illi, B., Rosati, J., Spallotta, F., Farsetti, A., Grasselli, A. ve diğeri. Histone deacetylase inhibitors: Keeping momentum for neuromuscular and cardiovascular diseases treatment. *Pharmacol Res*.
 90. Brahe, C., Vitali, T., Tiziano, F.D., Angelozzi, C., Pinto, A.M., Borgo, F. ve diğeri. (2005) Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients. *Eur J Hum Genet*, 13 (2), 256-259.
 91. Mercuri, E., Bertini, E., Messina, S., Solari, A., D'Amico, A., Angelozzi, C. ve diğeri. (2007) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology*, 68 (1), 51-55.
 92. Tsai, L.K., Tsai, M.S., Ting, C.H., Li, H. (2008) Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J Mol Med*, 86 (11), 1243-1254.
 93. Brichta, L., Holker, I., Haug, K., Klockgether, T., Wirth, B. (2006) In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate. *Ann Neurol*, 59 (6), 970-975.
 94. Weihl, C.C., Connolly, A.M., Pestronk, A. (2006) Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscle atrophy. *Neurology*, 67 (3), 500-501.
 95. Liu, H., Chen, Y., Cui, G., Zhou, J. (2005) Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26 (5), 603-609

EK

Şekil 1 *SMN2* geni amplifikasyon eğri örneğiŞekil 2 *GAPDH* geni amplifikasyon eğri örneği



Şekil 3 β -aktin geni amplifikasyon eğri örneği



Şekil 4 PZR etkinliği, R^2 değerleri ve eğim hesaplanmasında kullanılan standart eğri grafiği

Tablo 1 Gerçek zamanlı PZR'den elde edilen Ct değerleri örneği (GM03813 hücre hattına türev 3 uygulaması)

Gen	Konsantrasyon	Ct	Ortalama Ct
SMN2	Kontrol	28,99	29,01±0,021
	Kontrol	29,02	
	Kontrol	28,72*	
	20 µM	28,70*	28,58± 0,009
	20 µM	28,57	
	20 µM	28,58	
	50 µM	28,75*	29,37± 0,135
	50 µM	29,27	
	50 µM	29,46	
	100 µM	28,66*	29,17±0,261
	100 µM	29,30	
	100 µM	29,03	
	Standart 1	26,47	26,56±0,129
	Standart 1	26,65	
	Standart 2	29,75	29,86±0,153
	Standart 2	29,97	
	Standart 3	33,07	33,31±0,346
	Standart 3	33,56	
GAPDH	Kontrol	18,50*	21,04±0,101
	Kontrol	21,11	
	Kontrol	20,97	
	20 µM	19,91*	21,22±0,014
	20 µM	21,21	
	20 µM	21,23	
	50 µM	19,60*	21,06±0,138
	50 µM	20,96	
	50 µM	21,16	
	100 µM	20,33	20,37 ±0,058
	100 µM	19,37*	
	100 µM	20,41	
	Standart 1	17,79	17,92±0,183
	Standart 1	18,05	
	Standart 2	21,12	21,26±0,190
	Standart 2	21,39	
	Standart 3	24,75	24,72±0,035
	Standart 3	24,70	

ACTB	Kontrol	18,96*	19,65±0,045
	Kontrol	19,62	
	Kontrol	19,68	
	20 µM	21,51	21,51±0,002
	20 µM	21,51	
	20 µM	21,78*	
	50 µM	21,25	21,29±0,054
	50 µM	21,33	
	50 µM	21,59*	
	100 µM	20,62	20,60±0,028
	100 µM	20,58	
	100 µM	21,21*	
	Standart 1	17,84	17,77±0,102
	Standart 1	17,70	
	Standart 2	21,15	21,18±0,040
	Standart 2	21,21	
	Standart 3	24,77	24,88±0,156
	Standart 3	24,99	

(“*” ile gösterilen değerler ortalamaya katılmayan Ct değerleridir)