

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ YENİDEN KONUMLANDIRMA YAKLAŞIMI İLE
ALFA TÜBÜLİN ASETİLASYONUNU ARTTIRABİLECEK
BİLEŞİKLERİN ARAŞTIRILMASI

Özge ÇETİN

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Gamze BORA

ANKARA

ONAY SAYFASI

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı ([kağıt](#)) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

29 /12/2020

Özge ÇETİN

¹"**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**"

- (1) Madde 6.1. Lisansüstü teze ilişkin patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve **ensetül anabilim dalının uygun görüşü** üzerine **ensetül veya fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6.2. Yeni teknik, materyal ve metodların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç **imkanı** oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve **ensetül anabilim dalının uygun görüşü** üzerine **ensetül veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı** ile atri ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7.1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum tarafından** verilir. Kurum ve kuruluşlarla yapılan **işbirliği** protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **ensetül veya fakültenin uygun görüşü** üzerine **üniversite yönetim kurulu tarafından** verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
- Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince **ensetül veya fakülte tarafından** gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

² Tez danışmanının önerisi ve **ensetül anabilim dalının uygun görüşü** üzerine **ensetül veya fakülte yönetim kurulu tarafından** karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Doç.Dr. Gamze BORA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince her anlamda yanımda olan, bilimsel ve teknik anlamda kendisinden çok şey öğrendiğim danışmanım Doç.Dr. Gamze BORA'ya, her konuda değerli bilgisi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren hocam Prof. Dr. Hayat YURTER'e,

Tez çalışmamı okuyarak değerli yorumlarını benimle paylaşan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Kemal YELEKÇİ' ye, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ'ye, Prof. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE ve Prof. Dr. Hayat YURTER'e,

Tez öncesi dönemde gerçekleştirilen moleküler kenetleme çalışmalarındaki katkılarından dolayı Dr. Öğretim Üyesi Suat SARI' ya

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve tez çalışmam süresince bana katkıda bulunan tüm hocalarıma, sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman bana destek olan, eğitimim için her türlü fedakarlığı gösteren aileme,

En içten duygularla teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2020-18598).

ÖZET

Çetin, Ö., İlaç Yeniden Konumlandırma Yaklaşımı İle Alfa Tübülün Asetilasyonunu Arttırabilecek Bileşiklerin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020.

İlaç yeniden konumlandırma, ilaçların orijinal endikasyonları dışındaki yeni endikasyonlarının belirlenmesi yaklaşımı olup, henüz tedavisi bulunmayan nörodejeneratif hastalıklarda etkili olabilecek bileşiklerin araştırılmasında kullanılmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda ortak olarak aksonal transport hataları saptanmaktadır. Aksonal transporttan sorumlu mikrotübüllerin yapısını oluşturan α -tübülün proteinleri post-translasyonel modifikasyonlar geçirmekte olup nörodejeneratif hastalıklara ait modellerde, α -tübülün asetilasyonundaki azalma ile transport hataları ilişkilendirilmekte, asetilasyon arttırılarak hatalar düzeltilebilmektedir. Tübülün asetilasyonu, HDAC6 enzimi inhibe edilerek arttırılabildiği için HDAC6 potansiyel ilaç hedefi olarak düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, yeniden konumlandırma yaklaşımı kullanılarak klinikte kullanım onayı bulunan bileşikler arasından, HDAC6'yı etkileyerek α -tübülün asetilasyonunu arttırabilecek bir bileşiğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmalarına FDA onaylı 7 bileşik ile başlanmış, moleküler kenetleme, kemoinformatik ve karşılaştırmalı yapısal analizleri içeren *in silico* çalışmalar sonucunda 3 bileşiğin aktivitesi *in vitro* olarak araştırılmış, rutin ve riboflavin'in HDAC6'yı inhibe edebildiği gösterilmiştir. Bileşiklerin NSC34 hücrelerine uygulanması sonrası gerçekleştirilen Western blot çalışmalarında, riboflavin'in α -tübülün asetilasyonunu arttırmadığı, ancak 24 saat süreyle 100 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda uygulanan rutin'in α -tübülün asetilasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Bu tez çalışmasıyla rutin'in HDAC6'yı inhibe ettiği ve α -tübülün asetilasyonunu arttırabildiği ilk kez gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: İlaç yeniden konumlandırma, moleküler kenetleme, α -tübülün asetilasyonu.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2020-18598).

ABSTRACT

Çetin, Ö., Investigation of Compounds Inducing Alpha Tubulin Acetylation by Drug Repurposing Approach, Hacettepe University Graduate School of Health Science, Master Thesis of Medical Biology Programme, Ankara, 2020.

Drug repurposing approach is used to identify new indications of drugs outside the scope of their original indications. This approach has been used to identify effective compounds for neurodegenerative diseases. Axonal transport defects are one of the common molecular findings in neurodegenerative diseases and the transport involves microtubules. α -tubulin, a structural protein of microtubules, are subjected to several post-translational modifications. In model systems of neurodegenerative diseases, reduced α -tubulin acetylation are associated with impaired axonal transport, which could be restored by increasing α -tubulin acetylation via histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibition. Therefore, HDAC6 is considered as a potential drug target. In this thesis, among clinically approved compounds, it was aimed to determine a compound capable of increasing α -tubulin acetylation by affecting HDAC6 using drug repurposing approach. The thesis was initiated with 7 FDA-approved compounds and the activity of 3 compounds was investigated *in vitro* as a result of *in silico* studies, involving molecular docking, chemoinformatics and comparative structural analysis. Among them, rutin and riboflavin was found to inhibit HDAC6 activity. Compounds were applied to NSC34 cells and subsequent western blot studies showed no alterations in α -tubulin acetylation in riboflavin-treated cells. However, α -tubulin acetylation was significantly increased in 24 hours rutin-treated cells at 100 and 1000 μ M concentrations. In conclusion, it has been shown for the first time that the rutin inhibits the activity of the HDAC6 and increases the acetylation of α -tubulin. Further studies will be valuable to determine the impacts of rutin on axonal transport defects.

Keywords: Drug repositioning, molecular docking, α -tubulin acetylation

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TYL-2020-18598).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İlaç Yeniden Konumlandırma	3
2.2. İlaç Yeniden Konumlandırma Yaklaşımının Temeli ve Kullanılan Metodolojiler	6
2.2.1. Üç Boyutlu Moleküler Kenetleme Çalışmaları	7
2.2.2. Kemoinformatik Analizler	10
2.3. Nörodejeneratif Hastalıklarda İlaç Yeniden Konumlandırma	11
2.4. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Aksonal Transport Hataları	14
2.4.1. Mikrotübül Yapısı ve Organizasyonu	15
<i>HDAC6 enzimi</i>	19
2.4.2. Aksonal Transport	20
2.4.3. Alfa Tübülün Asetilasyonu, HDAC6 ve Aksonal Transport Hataları	22

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	24
3.1. GEREÇLER	24
3.1.1. <i>In silico</i> Analizler	24
3.1.2. <i>In vitro</i> HDAC6 İnhibisyon Aktivitesi Analizi	24
3.1.3. Hücre Kültürü ve Bileşik Uygulama Çalışmaları	24
3.1.4. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	27
3.1.5. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blot	28
3.2. YÖNTEMLER	33
3.2.1. <i>In silico</i> Analizler	33
3.2.2. <i>In vitro</i> HDAC6 İnhibisyon Aktivitesi Analizi	41
3.2.3. Hücre Kültürü ve Bileşik Uygulama Çalışmaları	42
3.2.4. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	45
3.2.5. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blot	47
3.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	49
4. BULGULAR	50
4.1. <i>In silico</i> Analizler	50
4.1.1. Moleküler Kenetleme Çalışmaları	50
4.1.2. Kemoinformatik Analizler	57
4.1.3. Bilinen HDAC İnhibitörleri ile Karşılaştırmalı Yapısal Analizler	58
4.2. <i>In vitro</i> HDAC6 İnhibisyon Aktivitesinin Florometrik Yöntemle Analizi	60
4.3. Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin MTS Yöntemi ile Analizi	62
4.4. Tubastatin A'nın NSC34 hücrelerinde α -Tübülin Proteinlerinin Asetilasyon Düzeyine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi	63
4.5. Riboflavin'in NSC34 hücrelerinde α -Tübülin Proteinlerinin Asetilasyon Düzeyine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi	64

4.6. Rutin'in NSC34 hücrelerinde α -Tübülin Proteinlerinin Asetilasyon Düzeyine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi	66
5.TARTIŞMA	68
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	75
6.1. Sonuçlar	75
6.2. Öneriler	77
7. KAYNAKLAR	78
8.EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
9.ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
+TIP	Mikrotübül pozitif uç proteinleri
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µm²	Mikrometre kare
°C	Derece santigrat
AF488	<i>Alexa Fluor 488</i>
APS	Amonyum persülfat
ATCC	<i>American Type Cell Culture Collection</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Sığır serum albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CLASP2	<i>CLIP-associated protein 2</i>
CLIP-170	<i>Cytoplasmic linker protein 170</i>
CO₂	Karbondioksit
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dH₂O	Distile su

dk	Dakika
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
EB	<i>End Binding Protein</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetikası
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
ESS	<i>Exonic splicing silencer</i>
FBS	Fetal sığır serumu
g	Gram
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HDAC	Histon deasetilaz
HRP	<i>Horseradish</i> peroksidaz
kDa	Kilo dalton
MAP	<i>Microtubule associated protein</i>
MAP2	<i>Microtubule associated protein 2</i>
MgCl₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i>
NaCl	Sodyum klorür

PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehit
RNAi	RNA interferans
SDS	Sodyum dodesil sülfat
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween20</i>
TEMED	N,N,N,N' Tetrametilendiamin
TTL	<i>Tubulin tyrosine ligase</i>
WB	Western Blot
α-tübülün	Alfa tübülün
αTAT1	<i>Alpha tubulin acetyltransferase 1</i>
HDAC6	Histon deasetilaz enzim 6
SIRT2	Sirtuin2
SIRT5	Sirtuin5
β-tübülün	Beta tübülün

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Swanson'ın ABC modelinin şematik gösterimi	6
2.2. Mikrotübül yapısı, organizasyon ve polimerizasyon-depolimerizasyon olaylarının şematik gösterimi	16
2.3. Tübülün proteinlerinin amino ve karboksil uçlarında gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlar	17
2.4. Tübülün asetilasyonu ve deasetilasyonunda görev alan enzimler	19
2.5. HDAC6 proteininin yapısındaki domainler	20
2.6. Kinesin ve dinein motor proteinleri aracılı gerçekleşen antrograde ve retrograde aksonal transport	21
4.1. HDAC6 proteininde, (A) moleküler kenetleme yapılan DD2 katalitik domaininin gösterimi, (B) DD2 domaininin kristal yapısı	50
4.2. AutoDock Vina, SwissDock ve Glide-Schrodinger programları ile elde edilen moleküler kenetleme skorlarına ait karşılaştırmalı grafik	52
4.3. Moleküler kenetleme sonrası analizler	54
4.4. Bileşiklerin iki boyutlu kimyasal yapı analizleri	58
4.5. <i>In vitro</i> HDAC6 inhibisyon aktivitesi analiz sonuçları	60
4.6. Hücre canlılık analizi sonuçları	62
4.7. Tubastatin A'nın NSC34 hücrelerinde α -tübülün asetilasyonu düzeyine etkisi	63
4.8. Riboflavin'in NSC34 hücrelerinde α -tübülün asetilasyonu düzeyine etkisi	64
4.9. Rutin'in NSC34 hücrelerinde α -tübülün asetilasyonu düzeyine etkisi	65

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Yeniden konumlandırma yaklaşımı ile orijinal endikasyonu dışında yeni endikasyonu tanımlanmış klinikte kullanılan ilaç örnekleri	4
3.1.	<i>In silico</i> analizleri gerçekleştirilen bileşiklere ait <i>smiles</i> kodları	34
3.2.	Bileşiklerin iki boyutlu kimyasal yapıları	38
3.3.	Protein miktar tayininde standart eğri çizilmesi için gerekli BSA konsantrasyonları	46
4.1.	Moleküler kenetleme çalışmaları sonucu elde edilen skorlar	52

1.GİRİŞ

İlaçların bilinen hedefleri dışındaki yeni hedeflerinin tanımlanmasını amaçlayan "ilaç yeniden konumlandırma" yaklaşımı, *de novo* ilaç geliştirmeye oranla başarı şansının daha yüksek olması, daha güvenli olması, zaman ve maliyet açısından daha uygun olması gibi nedenlerle birçok hastalık için etkili bir tedavi stratejisi olarak öne çıkmaktadır. Bu yaklaşımla bir ilacın yeni bir hedefinin tanımlanmasında, biyoinformatik ve kemoinformatik araçlar, biyolojik ve kimyasal bilgilerin erişilebildiği veri tabanları ve *in silico* ilaç tasarımı önemli rol oynamaktadır.

Nörodejeneratif hastalıklar, ilerleyici nöron kaybı görülen ve moleküler düzeyde kompleks patomekanizmaları olan bir hastalık grubudur. Henüz tedavilerinin bulunmuyor olması ve görülme sıklıklarının giderek artması nedeniyle acil tedavi ihtiyacı duyulmakta olup yeniden konumlandırma yaklaşımı ile tedavide etkili olabilecek bileşikler araştırılmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojileri farklı olmakla birlikte moleküler düzeyde bazı ortaklıklar görülmekte olup bu ortaklıklardan biri aksonal transport hatalarıdır. Mikrotübül-aracılı olarak gerçekleşen aksonal transportta, mikrotübüller, motor proteinlerin kargoları taşıyacağı yollar oluşturmaktadır. Bu nedenle, mikrotübül yapı ve stabilitesindeki değişiklikler aksonal transport hataları ile ilişkilendirilmektedir.

Mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentler gibi hücre iskeletinin temel elemanlarından biridir. Mikrotübüllerin yapısını oluşturan tübülün proteinlerinin amino ve karboksil ucunda post-translasyonel modifikasyonlar gerçekleşmekte ve bu modifikasyonlar mikrotübülün stabilitesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Asetilasyon, α -tübülünün amino ucunda bulunan 40. lizin (K40) amino asitinden gerçekleşen bir post-translasyonel modifikasyon olup stabil mikrotübüllerde asetilli α -tübülün miktarı fazladır.

Aksonal transport hatalarının farklı nedenleri olmakla birlikte, nörodejeneratif hastalıklara ait model sistemlerde α -tübülün asetilasyonunda azalma saptanmış, asetilasyonunun artırılması yolu ile aksonal transportun düzeltilebildiği gösterilmiştir. Asetilasyon artışı, deasetilasyonda görevli temel enzim olan histon

deasetilaz 6'nın (HDAC6) farmakolojik olarak inhibe edilmesi yoluyla sağlanabilmektedir. Bu nedenle HDAC6, bu hastalık grubu için potansiyel bir tedavi hedefi olarak düşünölmektedir.

Bu tez çalışmasında, ilaç yeniden konumlandırma yaklaşımı kullanılarak, klinikte kullanım onayı bulunan bileşikler arasından, HDAC6 aktivitesini inhibe edebilen ve α -tübölün asetilasyonunu arttırabilen bir bileşğin tanımlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Yeniden Konumlandırma

İlaç yeniden konumlandırma (*Drug repurposing*), ilaçların orijinal tıbbi endikasyonlarının kapsamı dışındaki yeni kullanımlarının belirlenmesi yaklaşımıdır. Bu yaklaşımda, onaylanmış, geri çekilmiş, arşivlenmiş ya da klinik faz çalışmaları yürütülmekte olan ilaçların/bileşiklerin, daha önceden tanımlanmış hedefleri dışındaki hedefleri belirlenmekte, böylece başka hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılabilme potansiyelleri araştırılmaktadır (1). İlaçların yeniden konumlandırılması; ilacın moleküler keşfi ve sentezinin yapılmış olması, fizikokimyasal özelliklerinin optimize edilmiş olması, formülasyonlarının hazırlanmış olması, faz I aşamalarını geçmiş olması, bu nedenle etkinlik ve güvenlik profillerinin biliniyor olması nedenleri ile *de novo* ilaç geliştirilmesine kıyasla zaman, maliyet ve başarı açısından avantajlıdır. Bu nedenle kanser, hipertansiyon, astım gibi yaygın hastalıkların yanı sıra nadir hastalıkların tedavisi amacıyla da yeniden konumlandırma yaklaşımı benimsenerek araştırmalar yürütülmekte, bu şekilde yeni endikasyonları tanımlanan ilaçlar klinikte kullanılmaktadır (2). Yeniden konumlandırma yaklaşımı ile yeni endikasyonları tanımlanmış ve klinikte kullanılan ilaçlara örnekler Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Yeniden konumlandırma yaklaşımı ile orijinal endikasyonu dışında yeni endikasyonu tanımlanmış klinikte kullanılan ilaç örnekleri.

İlaç Adı	Orjinal Endikasyonu	Yeni Endikasyonu
Celecoxib	Ağrı/ inflamasyon	Kalın bağırsak/rektum kanseri
Atomoxetine	Parkinson hastalığı	Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu
Duloxetine	Depresyon	Stres tipte idrar kaçırma
Rituximab	Çeşitli kanserler	Romatoid aritit
Raloxifene	Osteoporoz	Meme kanseri
Fingolimod	Organ Nakli	Multiple skleroz
Dapoxetine	Depresyon	Erken boşalma
Ketoconazole	Mantar enfeksiyonu	Cushing sendromu
Aspirin	Analjezik	Kolorektal kanser

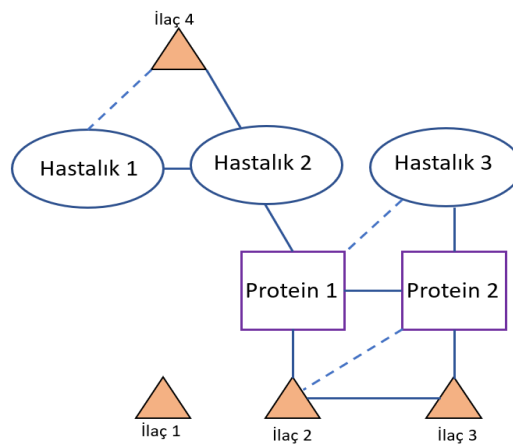
İlaç yeniden konumlandırma, ilaçların yan etkileri nedeniyle tesadüfen ortaya çıkmış bir yaklaşımdır. Örneğin, anjina hastalığının tedavisi amacıyla klinik çalışmaları yürütülen sildenafil, beklenmeyen bir yan etki olarak ereksiyonu tetiklemiş, klinik çalışmaların odak noktası değiştirilerek erektil disfonksiyon endikasyonu için 1988 yılında klinik kullanım onayı almıştır. Ayrıca sildenafil, pulmoner arteriyel hipertansiyon endikasyonu için de 2005 yılında klinik kullanım onayı almış, böylece iki kez yeniden hedeflendirilmiştir (3). Benzer şekilde, ülser tedavisi için etkinliği araştırılan minoxidil'in, hayvan deneyleri sırasında kan basıncında uzun süreli düşüşe neden olduğu saptanmış, anti-hipertansif ilaç olarak etkinliğinin araştırıldığı klinik çalışmalarda saç dökülmesini önlediği görülmüştür. Bu nedenle minoxidil, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından 1979 yılında anti-hipertansiyon, 1988 yılında ise androjenik alopesi tedavisi için onaylanmış olup, ilk endikasyonu dışında iki farklı hastalık için tedavi imkanı sunmaktadır (2). Yeniden konumlandırılan ilaçlara bir diğer örnek talidomid'dir. İlk olarak 1957'de sakinleştirici olarak ve hamilelerde mide bulantısının tedavisi amacıyla bazı ülkelerde kullanım onayı bulunan talidomid, hamileliğin ilk üç ayında kullanıldığında

çocuklarda görülen ciddi iskeletsel doğum kusurları (fokomeli), ardından konjenital kalp hastalığı, iç ve dış kulakta malformasyonlar ve oküler anormallikler gözlenmesi nedeniyle 4 yıl içinde geri çekilmiştir. Bununla birlikte, talidomid, 1998 yılında, cüzzam ve 2006 yılında ise multipl miyelom hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır (4).

İlaç yeniden konumlandırma yaklaşımının, *de novo* ilaç geliştirme olarak bilinen yeni aday bileşiklerin keşfi ve geliştirilmesine göre bazı avantajları bulunmaktadır. *De novo* ilaç geliştirme maliyetli, riskli ve uzun zaman gerektiren bir süreçtir. Yeni ilaç geliştirmenin ortalama maliyeti 2-3 milyar Amerikan doları arasında değişmekte olup en az 13-15 yıl sürmektedir. Ayrıca, *de novo* ilaç geliştirme yöntemi ile elde edilen kimyasal bileşiklerin, toksik etkilerinin saptanması ya da etkin bulunmaması, tedavi için onaylanma oranlarını azaltmaktadır. Faz I klinik araştırmalardaki bileşiklerin sadece % 10'unun onaylandığı, diğer bileşiklerin ise etkisiz bulunmaları veya advers ilaç reaksiyonları nedeniyle başarısız olduğu bildirilmiştir (1). İlaç yeniden konumlandırma yaklaşımı ise *de novo* ilaç geliştirmeye göre daha az risk içermekte, maliyet avantajı sağlamakta ve kısa sürede tamamlanabilmektedir (3). Bu yaklaşımda başarısızlık riskinin daha düşük olmasının sebebi, ilk endikasyonu için bir ilacın, prelinik modellerde ve klinik faz çalışmalarında güvenli olduğunun tespit edilmesi, başka bir ifade ile, erken aşamaların tamamlanmış olmasıdır. İlaç formülasyonlarının hazır olması, ayrıca, prelinik ve klinik çalışmalarla etkinlik ve uygun ilaç uygulama yolu gibi verilerin önceden biliniyor olması, ilaç geliştirme sürecini kısaltmakta ve maliyetini daha uygun hale getirmektedir. İlaç geliştirme sürecinin kısalması, nadir hastalıklar gibi hızlı tedavi gerektiren hastalıklar için özellikle avantaj sağlamaktadır (5). Yeniden konumlandırma yaklaşımının maliyet açısından sunduğu kazanç ise özellikle prelinik, klinik faz I ve II aşamalarında ortaya çıkmakta, faz III maliyetleri *de novo* ilaç geliştirmeye yakın olmaktadır (4). İlaç yeniden konumlandırma yaklaşımı ile maliyetin ortalama olarak 300 milyon Amerikan dolarına düşeceği tahmin edilmektedir (6).

2.2. İlaç Yeniden Konumlandırma Yaklaşımının Temeli ve Kullanılan Metodolojiler

İlaç yeniden konumlandırma yaklaşımının temeli Swanson'ın ABC modeline dayanmaktadır. Swanson'un ABC modeli, ilaçlarla moleküler hedefler veya hastalıklar arasındaki gizli bağlantıları ortaya çıkarmak için uygulanan bir yaklaşımdır. Bu modele göre, A – B ve B – C arasındaki bağlantılar kanıtlanmış ise, henüz ortaya çıkmamış olsa bile A – C arasında muhtemelen doğrudan bir bağlantı olabileceği varsayılmaktadır (2). Hastalıklar açısından bu model değerlendirildiğinde; hastalık 1 ile hastalık 2 arasında doğrudan bir bağlantı olması durumunda, hastalık 2'nin tedavisinde kullanılan bir ilacın hastalık 1'in tedavisi için de kullanılabileceği varsayılmaktadır (Şekil 2.1). İlaç 2 ve protein 2 arasındaki olası bağlantı, ilaç 2 ve ilaç 3 arasındaki bilinen bağlantıdan, moleküler kenetlenme ya da kemoinformatik araçlardan yararlanılarak ortaya çıkartılabilir. Aynı gizli bağlantı, protein 1 ve protein 2'nin biyoinformatik araçlarla analizi sonucu da ortaya çıkarılabilmektedir (Şekil 2.1). Örneğin, depresyon ve kronik inflamatuvar yanıt arasında gösterilen bağlantı, anti-inflamatuvar ilaçların majör depresif bozukluk tedavisindeki etkinliklerinin araştırılmasına temel teşkil etmiştir. Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların depresif semptomları hafiflettiği ve seçici serotonin geri alım inhibitörleri gibi klinik kullanımda olan antidepresan ilaçların terapötik etkilerini arttırdığı saptanmıştır (7, 8).



Şekil 2.1. Swanson'ın ABC modelinin şematik gösterimi (2). Doğrudan bağlantılar sürekli çizgilerle, gizli ve dolaylı bağlantılar kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Yeniden konumlandırma yaklaşımında, hastalık - biyolojik hedef - ilaç arasındaki bağlantıların tanımlanması amaçlanmaktadır. Bu nedenle bağlantıların ortaya çıkarılmasında sıklıkla bilgisayar destekli yaklaşımlardan faydalanılmaktadır. Bilgisayar destekli yaklaşımlar; üç boyutlu moleküler kenetleme çalışmalarını, ilaçların etki ettiği/edebileceği proteinlerin/yolakların veya -omik değişikliklerin saptanması için kemoinformatik analizleri, klinik faz çalışmalarından elde edilen verileri, farmakovijilans çalışmalarını içermektedir. Daha önce tanımlanmış ve veri tabanlarında bulunan bu veriler kullanılarak belirlenen aday ilaçların/bileşiklerin aktiviteleri çeşitli *in vitro* ve *in vivo* deneysel yöntemlerle araştırılmaktadır.

2.2.1. Üç Boyutlu Moleküler Kenetleme Çalışmaları

İlaç yeniden konumlandırma çalışmalarında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, bilgisayar destekli üç boyutlu moleküler kenetlemedir. Moleküler kenetleme, moleküler tanıma ilişkilerinde bağlanma şekillerini ve afinitelerini tahmin etmek için kullanılan, oldukça hızlı ve ekonomik bir hesaplama aracıdır. Moleküler kenetleme, biyolojik makromoleküllerin birbirleriyle veya çeşitli ligandlarla yüksek özgüllük ve afinite ile etkileşerek non-kovalent bağlar aracılığı ile belirli bir kompleks oluşturma prensibine dayanmaktadır. Makromoleküller arasında proteinler, hücrelerde yapısal, mekanik ve biyokimyasal işlevler görmeleri nedeniyle ön plana çıkmaktadır. Ligand ise, proteinlere yüksek afinite ile spesifik olarak bağlanabilen nükleik asit, substrat veya küçük moleküller olabilmektedir (10).

Protein ile ligandın etkileşimini etkileyen fizikokimyasal mekanizmalar vardır (11);

- *Bağlanma kinetiği*; protein ve ligandın birbirine bağlanma hızına bağlı olarak iki molekül arasındaki etkileşimi incelemektedir. Yavaş ayrılma hızı ve hızlı bağlanma sonucunda düşük bir ayrılma sabiti ve yüksek bir bağlanma sabiti ortaya çıkmakta, bunun sonucunda etkileşimin yüksek bir bağlanma afinitesi vereceği öngörülmektedir.

- *Termodinamik ilişkiler;* Bir protein-ligand-çözücü sistemi, çözünen (protein ve ligand) ve çözücünden (sıvı ve tampon iyonları) oluşan termodinamik bir sistemdir. Bu maddeler arasındaki ilişki ve ısı transferinin çeşitli enerji değişimleriyle nasıl ilişkili olduğu termodinamik yasaları tarafından belirlenmektedir. Sonuç olarak, protein ve ligand arasındaki ilişkiyi belirleyen itici kuvvetler, protein, ligand, su ve tampon iyonları arasındaki çeşitli etkileşimlerin ve enerji alışverişlerinin bir sonucudur. Bir termodinamik sistemin sabit bir sıcaklık ve basınçta maksimum veya geri dönüşümlü çalışma yapma kapasitesini ölçen bir termodinamik potansiyel olan Gibbs serbest enerjisi, itici güçlerin karakterizasyonu için en önemli termodinamik değişkenlerden biridir. Protein-ligand ilişki boyutu, negatif ΔG (Gibbs)'nin büyüklüğü ile belirlendiğinden, ΔG 'nin herhangi bir protein-ligand kompleksinin stabilitesini veya alternatif olarak bir ligandın belirli bir alıcıya bağlanma afinitesini belirlediği düşünülmektedir (11).
- *Bağlayıcı Sürüş Kuvvetleri ve Entalpi-Entropi Kompensasyonu*
Sistemin serbest enerjisindeki değişim negatif olduğunda protein-ligand bağlanması kendiliğinden meydana gelebilir. Kompleks haldeki enerjileri ile bağlanmamış serbest durum arasındaki serbest enerji farkının büyüklüğü (bağlanma üzerine negatif serbest enerji değişiminin büyüklüğü) kompleksin kararlılığını belirler. Hem protein katlaması hem de protein-ligand bağlanma süreçleri, sistemin toplam Gibbs serbest enerjisindeki değişim tarafından yönlendirilir.

Protein-ligand etkileşiminde farklı bağlanma modelleri mevcuttur;

- *Anahtar kilit ilişkisi;* protein ve ligand hareketsizdir ve bağlanma ara yüzleri mükemmel şekilde eşleşmelidir.
- *Uyarılmış uyum;* proteindeki bağlanma bölgesi esnektir ve etkileşen ligand, bağlanma bölgesinde konformasyonel bir değişikliğe neden olur.

- *Konformasyonel seçim*; çoğu protein doğası gereği dinamikdir ve konformasyonel seçim modeli bu doğal esnekliği hesaba katar.

Moleküler kenetleme çalışmalarında farklı algoritmalara sahip programlar kullanılmakta olup iki temel bileşen içermektedir. Bileşenlerden ilki "arama algoritması" olup belirli bir hedef protein için farklı ligand konformasyonları ve yönelimleri aranır. Protein-ligand bağlanması için araştırma alanı, bağlanmamış formda olan protein ve ligandın tüm olası şekillerini içerir. Diğer bir ifade ile belirli bir protein konformasyonu içinde ligandın tüm olası oryantasyon ve konformasyonlarını, bunun sonucunda ligandın tüm olası biçimleriyle eşleştirilmiş proteinin tüm olası oryantasyon ve konformasyonlarını kapsamaktadır (12). Örneğin, kenetleme programlarından bir olan Autodock programının arama alanı algoritmasında, protein katı cisim olarak ele alınır ve ligandın altı derecelik dönme ve dönüşüm özgürlüğü sınırlarında olası konformasyonları incelenir. Seçilen algoritma, olası konformasyonları tahmin ederken, bir sonraki poz için daha düşük enerjili kompleksi arayan genetik algoritma ligand pozlarını skorlar. Kenetleme programlarının diğer bileşeni ise, "skorlama fonksiyonudur". Bu fonksiyon, eşleşmeden sonra protein ve ligand arasındaki her bir poz için ayrı ayrı bağlanma afinitesini, genellikle kovalent olmayan etkileşimlerin gücünü ölçerek değerlendirmek için kullanılan matematiksel bir yöntemlerdir. Pozlar için tahmin edilen bağlanma afiniteleri sıralanarak ligandın belirlenen hedefe en uygun bağlanma modları belirlenmektedir (10). Skorlama fonksiyonları, kuvvet alanına dayalı, deneysel tabanlı ve bilgi tabanlı (istatistiksel potansiyel) olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Kuvvet alanına dayalı yaklaşımlarda, bağlanma afinitelerini tahmin etmek için deneylerden ve kuantum mekaniksel hesaplamalardan türetilen fiziksel tabanlı fonksiyonel formlar ve parametreler (kuvvet alanları) kullanılmaktadır. Karmaşıklığı azaltmak için, genellikle sadece kompleksteki moleküller arası kovalent olmayan etkileşimlerin güçleri (entalpik katkı) tahmin edilmektedir (13).

2.2.2. Kemoinformatik Analizler

Kemoinformatik, kimyasal yapılardan anlamlı verilerin çıkarılması, işlenmesi ve bilinen verilerden bilinmeyene odaklanan *in silico* yaklaşımlara dayanan bir disiplindir. Bu verilerin analizi, kimyasal yapı, kimyasal özellikler ve moleküler aktivite arasındaki ilişkinin incelenmesine olanak sağlamaktadır (14). Kemoinformatik analizlerde farklı veri tabanlarından yararlanılabilmektedir. Bu veri tabanlarından olan;

ChEMBL, küçük moleküllere ait biyoaktivite verilerini temel alarak geliştirilen bir veritabanı olup, 1,8 milyondan fazla bileşik hakkında bilgi, ayrıca biyolojik sistemler üzerindeki etkilerine ilişkin 15 milyondan fazla teste ait veri içermektedir. *ChEMBL*, küçük moleküllerin protein hedefleriyle nasıl etkileşime girdiğine, bu bileşiklerin hücreler ve organizmanın bütünü üzerindeki etkilerine (ör; emilim, dağılım, metabolizma, boşaltım ve toksisite) dair bilgiler içermektedir. Ayrıca, *ChEMBL* veri tabanında bileşiklerin iki boyutlu yapıları, hesaplanan moleküler özellikleri (ör. LogP, moleküler ağırlık, Lipinski 'Beş Kuralı' parametreleri) ve biyoaktivite verileri (ör; bağlama sabitleri ve farmakoloji vb.) yer almaktadır (15).

SwissTarget veri tabanı, bileşiklerin biyolojik hedeflerinin hesaplamalı tahminlerine olanak sağlayarak test edilecek potansiyel hedefler kümesinin daraltılmasına, ayrıca bilinen moleküllerin/ilaçların hedef dışı etkilerinin tahmin edilmesine yardımcı olmaktadır. Bu veri tabanında, kimyasal ve şekil benzerliğini birleştiren orijinal bir hedef tahmin algoritmasına dayanarak ligandlara ait yeni protein hedeflerinin tahmini yapılabilmektedir (16).

Library of Integrated Network-based Cellular Signatures (LINCS) veri tabanı; bağlanma seçiciliği, yapısal çeşitlilik, hücre-temelli deneylerden elde edilen aktivitelerdeki benzerliklere ait molekül kitaplıkları ve küçük bileşik kütüphanelerini içeren bir veri tabanıdır. *LINCS* veri tabanı, doz ve yanıt arasındaki ilişkinin, hücresel cevaplar arasındaki varyasyonun nedenlerinin, ilaç duyarlılığı ve direncinin moleküler temellerinin açıklanabilmesi ile ilgili çalışmalarda kullanılabilmektedir (17).

Connectivity Map (cMAP); bileşik uygulamaları sonucu farklı hücre hatlarındaki genom boyu transkriptomik değişikliklere ait verilerin elde edilebildiği bir veri tabanıdır. Orijinal cMap veri tabanı, beş farklı insan hücre hattına (MCF7, PC3, SKMEL5, HL60 ve ssMCF7) 164 küçük molekülün uygulanması ile oluşturulmuş olup 564 gen ekspresyon profili çermektedir. İlaç uygulama öncesi ve sonrası gen ekspresyon profilleri analiz edilerek ilaca ait spesifik transkriptomik imzalar ortaya çıkarılmaktadır (18).

2.3. Nörodejeneratif Hastalıklarda İlaç Yeniden Konumlandırma

Nörodejeneratif hastalıklar, ilerleyici yapısal ve fonksiyonel nöron kayıpları görülen bir hastalık grubu olup hareketlerde ve beyin fonksiyonlarında problemlere yol açmaktadır. Bu grupta yer alan hastalıklar arasında Alzheimer, Parkinson, ve Huntington hastalıkları, Charcot-Marie Tooth hastalığı, Multipl skleroz, Spinoserebral ataksi, Amyotrofik lateral skleroz ve nadir hastalıklardan olan Spinal müsküler atrofi bulunmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığı, ortalama yaşam uzunluğunun artmasına paralel olarak artış göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü, 20 yıl içerisinde motor fonksiyonları etkileyen nörodejeneratif hastalıkların, kardiyovasküler hastalıklardan sonra kanserin de önüne geçerek en yaygın ikinci ölüm nedeni haline gelmesini öngörmekte olup 2050 yılına kadar dünya çapında 115 milyondan fazla demans hastası olacağı tahmin edilmektedir (19). Nörodejeneratif hastalıkların henüz kesin tedavileri bulunmamakta olup semptom giderici tedaviler uygulanmaktadır. Bu nedenle, bu hastalıkların tedavisine acil ihtiyaç duyulmaktadır (20).

Nörodejeneratif hastalıkların farklı patofizyolojileri bulunmakla birlikte, moleküler düzeyde bazı ortaklıklar bulunmakta ve nöron dejenerasyonu görülmektedir. İlaç geliştirme çalışmaları, bu nedenle, hastalıkta spesifik olarak görülen hataların düzeltilmesine (ör; TAU birikimi, α -sinüklein oluşumu vb), ya da tüm nörodejeneratif hastalıklarda ortak olarak saptanan moleküler değişikliklere (ör; aksonal transport hataları, oksidatif stres vb) yönelik olarak veya nöron

sağkalımının arttırılması amacıyla gerçekleştirilebilmektedir (20). Bu hastalık grubu için tedavi yaklaşımları arasında; semptomların hafifletilmesi, hastalık progresyonun yavaşlatılması, semptom başlangıç yaşının geciktirilmesi ve nihayi olarak hastalığın önlenmesi yer almakta olup ilaç yeniden konumlandırma yaklaşımı etkili olabilecek ilaçların/bileşiklerin araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

Alzheimer hastalığı, yanlış katlanmış amiloid peptitlerden oluşan amiloid plaklar ve hiperfosforile TAU proteini içeren nörofibriller yumaklar ile karakterize olan, nöron/sinaps kaybı görülen bir hastalıktır. Bu hastalık için 2003 yılından beri FDA tarafından yeni onaylanmış bir ilaç bulunmamakla birlikte yeniden konumlandırma çalışmaları yürütülmektedir. Alzheimer hastalarında bir nörotransmitter olan asetilkolin seviyesinin düşük olması nedeniyle, asetilkolini parçalayan asetilkolinesteraz inhibitörleri, hastalığın semptomatik tedavisi için kullanılmaktadır. Klinik kullanım için onay almış olan donepezil, rivastigmin ve galantamin kullanımı ile asetilkolin seviyesindeki azalmanın önlenmesi amaçlanmaktadır. Donepezil'e yapısal olarak benzerlik gösteren FDA onaylı ilaçların tarandığı *in silico* çalışmalarda, yüksek afinite ile kolinesteraza bağlanabilme potansiyeli bulunan ilaçlar arasından, ülser tedavisinde kullanılan cinitapride'in etkili olabileceği saptanmış, cinitapride'in *in vitro* çalışmalarda aktivitesinin saptanması üzerine Alzheimer hastalığı açısından tedavi potansiyeli bulunduğu bildirilmiştir (21). Başka bir çalışmada, kan-beyin bariyerini geçebilen, lipofilik ve düşük oranda iyonize küçük molekül olan carmustine'in aktivitesi araştırılmıştır. Carmustine, beyin kanseri tedavisinde kullanılan antineoplastik özellikli alkilleyici ilaçların bir alt grubu olan nitrozoüre grubuna dahildir. Amiloid- β protein öncüsünü aşırı ifade eden hücrelerde, carmustine'in toksik olmayan bir dozda amiloid üretiminde büyük oranda bir azalma sağladığı gösterilmiştir (22).

Parkinson hastalığı, beyinde dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy cisimcikleri olarak bilinen, çözünmeyen α -sinüklein agregatları ile karakterize olan, motor ve motor olmayan semptomlar görülen nörodejeneratif bir hastalıktır. 2015 yılı

verilerine göre, 6.2 milyon kişi Parkinson hastalığı tanısı almış olup hastalık genellikle 60 yaşın üzerindeki bireylerde görülmektedir. Parkinson hastalığının kesin tedavisi bulunmamakta olup, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmayı/durdurmayı amaçlayan ilaçların geliştirilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. İlaç yeniden konumlandırma yaklaşımı kullanılarak, tetrasiklin grubu antibiyotiklerin Parkinson hastalığının tedavisi için umut verici adaylar olabileceği bildirilmiştir. Tetrasiklinlerin nöroprotektif etkilerinin olduğu; proinflamatuvar molekül üretimini, matriks metalloproteaz aktivitesini, mitokondriyal disfonksiyonu, hatalı protein katlanmasını ve mikrogliyal aktivasyonu inhibe ederek etki ettikleri bildirilmiştir (23). Tetrasiklinler ile yapılan bir başka çalışmada, antibiyotik amaçlı kullanılan daha düşük dozların bakteri duyarlılığını değiştirmedeğini, nöroinflamasyonu düzenleyerek Parkinson modellerinde nörodejenerasyonu önledikleri gösterilmiştir. Ayrıca doksisisiklin'in, α -sinüklein oligomerlerinin yapısını değiştirerek β -plakaların paralel düzenlenmesini sağlaması ve fibril oluşumunu engellenmesi nedeniyle de nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (24).

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), beyin ve omurilikte bulunan alt ve üst motor nöronlarda ilerleyici dejenerasyon ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır. ALS hastalığının patomekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte hatalı katlanmış protein birikimi, mitokondri işlev kaybı, oksidatif stres ve nörofilament birikimi görülmektedir. Günümüzde, ALS hastalığının ilerleyişini yavaşlatabilmek amacıyla riluzole ve edaravone kullanılmakla birlikte, hastalığın kesin tedavisi bulunmamaktadır. İlaç yeniden konumlandırma çalışmaları ile, kronik myeloid lösemi tedavisinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinden bosutinib'in, sporadik ALS hastalarının pluripotent kök hücrelerinden farklılaştırılan motor nöronlara uygulandığındanöron sağkalımını arttırdığı bildirilmiştir (25). ALS tedavisi için araştırılan bir diğer ilaç retigabine'dir. Retigabine, epilepsi tedavisinde kullanım için onaylanmış bir ilaç olup voltaj kapılı potasyum kanallarına bağlanarak membran hiperpolarizasyonuna yol açmaktadır. Bu ilacın ALS tedavisi için faz II klinik

çalışmaları devam etmekte olup ALS hastalarında üst ve alt motor nöron uyarılabilirliğini azalttığı ve motor nöron sağkalımını arttırdığı gözlenmiştir (26).

2.4. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Aksonal Transport Hataları

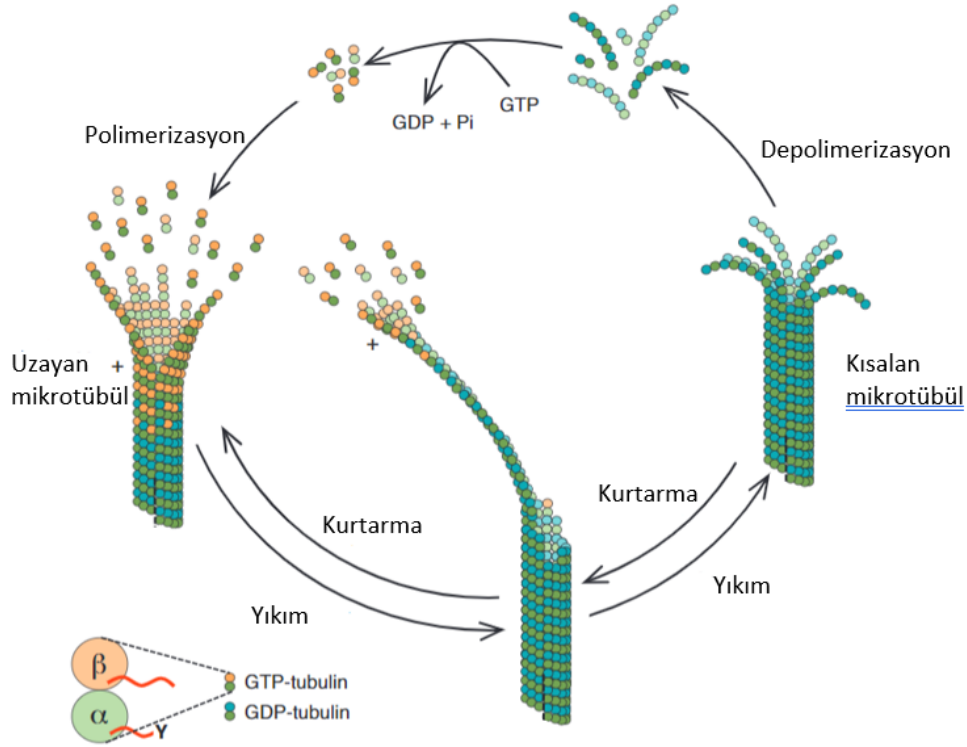
Nörodejeneratif hastalıklarda moleküler düzeyde saptanan ortaklıklardan bir tanesi aksonal transportta ortaya çıkan hatalar olup transport hatalarının düzeltilmesi bu hastalık grubu için tedavi stratejilerinden birisidir. Aksonal transport, sinaptik iletimin uygun şekilde sürdürülmesi için gerekli olan hücre içi trafik olaylarını ifade etmektedir. Aksonal transportun doğru gerçekleşmesi nöron morfolojisinin kurulması, korunması ve sinyal iletiminin gerçekleşmesi, dolayısıyla nöronların fonksiyonu ve sağkalımı için elzemdir. Aksonal transport ile organel (ör; mitokondri, lizozom), protein (ör; membran proteinleri, nörofilamentler), lipid, mRNA ve veziküllerin taşınması sağlanmakta, ayrıca hatalı katlanmış proteinler yıkıma yönlendirilmektedir (27).

Nörodejeneratif hastalıklarda aksonal transportun bozulması nedeniyle hücre gövdesinde, akzon başlangıcında ya da ucunda birikimler (ör; hücre iskeleti proteinleri, mitokondri) saptanmaktadır. Aksonal transport hatalarının nedeni henüz kesin olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, transportla ilişkili genlerdeki mutasyonlar, protein birikimleri, motor-kargo etkileşimindeki bozukluklar, mitokondri hasarı ve mikrotübül yapısındaki/stabilitesindeki değişiklikler ile ilişkilendirilmektedir (28).

2.4.1. Mikrotübül Yapısı ve Organizasyonu

Aksonal transport, hücre iskeleti elemanlarından biri olan mikrotübüller aracılığıyla gerçekleşmektedir. Mikrotübüller aksonal transportun yanı sıra hücre morfolojisinin kurulması, korunması, hücre bölünmesi ve sinyal iletiminde görev almaktadır. Mikrotübüller, alfa (α) ve beta (β) tübülün heterodimerlerinden oluşan içi boş, silindirik polimerler olup 13 adet protofilamentin paralel olarak etkileşmesiyle oluşmaktadır (29). Memelilerde α ve β tübülün genlerini kodlayan 9'ar adet gen tanımlanmış olup bu genlerden sentezlenen tübülün izotipleri 55 kDa ağırlığındadır. Tübülün izotiplerinin ifadeleri farklı hücre/dokularda değişiklik göstermektedir. Tübülün proteinlerinin mikrotübül yapısına eklenmesiyle mikrotübüller polimerize olmakta, yapıdan ayrılması ile depolimerize olmaktadır. Polimerize olan mikrotübüllerin depolimerize olması "yıkım", depolimerize olan mikrotübüllerin tekrar polimerize olması "kurtarma" olarak ifade edilmektedir. Mikrotübüllerde yıkım/yapım olayları döngüsel olarak gerçekleşmekte olup "dinamik instabilite" olarak adlandırılmaktadır (30). Dinamik *instabilite* sırasında, GTP bağlı β tübülün (GTP- β tübülün) içeren heterodimerler, mikrotübülün uzayan ucuna bağlanıp mikrotübülün polimerizasyonunu gerçekleştirirken, hidroliz sonucu oluşan GDP bağlı β tübülün (GDP- β tübülün) kararsız olmasından dolayı depolimerizasyon sonucu mikrotübül yapısından ayrılmaktadır (Şekil 2.2). Mikrotübülün, polimerizasyon/depolimerizasyon olaylarının daha fazla gerçekleştiği "pozitif ucu" ve daha az gerçekleştiği "negatif ucu" bulunmakta olup bu polarite, tübülün heterodimerlerinin belirli bir yönde ardışık olarak eklenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Mikrotübüllerin negatif uçları çoğunlukla, hücrelerdeki temel mikrotübül organizasyon merkezi olan sentrozoma bağlanmakta olup sentrozom, birbirine dik konumda bulunan iki adet sentriolden ve etrafındaki perisentriolar materyalden oluşmaktadır (31). Bazı hücrelerde mikrotübüllerin negatif uçlarının sentrozom dışında, Golgi cisimciğine ve çekirdek zarına da bağlandıkları bilinmektedir. Nöronlarda sentrozomda oluşmaya başlayan mikrotübüller, sentrozomdan ayrılmakta, akson boyunca taşınmakta ve negatif uçları hücre gövdesine, pozitif uçları ise akson ucuna dönük olacak şekilde yerleşim

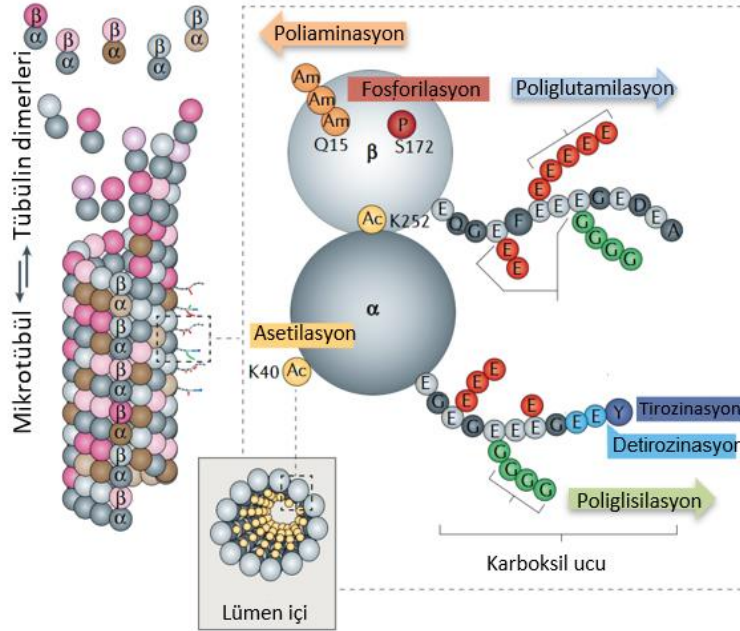
göstermektedir. Dendritlerde ise mikrotübüllerin pozitif ve negatif uçları aynı yönde olmayıp karışık bir düzende yerleşmektedir (32).



Şekil 2.2. Mikrotübül yapısı, organizasyon ve polimerizasyon-depolimerizasyon olaylarının şematik gösterimi (30).

Mikrotübüllerin yapısında polimerizasyon/depolymerizasyonun yavaş gerçekleştiği stabil kısımlar ve daha hızlı gerçekleştiği dinamik kısımlar bulunmakta olup, oranları hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Nöronlar gibi post-mitotik hücrelerde stabil mikrotübül yapısının varlığı, spesifik morfolojinin korunmasının yanı sıra aksonal transportun devamlılığı açısından elzemdir. Mikrotübüllerin stabil/dinamik özelliğini, mikrotübüle bağlanan proteinler kazandırmaktadır. Bu proteinlerin mikrotübül ile etkileşiminde, α ve β tübulin proteinlerinde sentez sonrasında gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlar rol oynamaktadır. Farklı

post-translasyonel modifikasyonlar tübülün izotipleriyle birlikte hücrelerde “tübülün kodunu” oluşturmakta olup bu kod mikrotübüllerin proteinlerle etkileşimini etkilemekte, böylece mikrotübüllerin yapısını ve fonksiyonlarını düzenlemektedir (33). Tübülün proteinlerde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlar arasında asetilasyon, detirozinasyon, poliglutaminasyon, fosforilasyon, poliglisilasyon, palmitolasyon, delta2/3 tübülün yer almakta olup bu modifikasyonlar geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olarak gerçekleşebilmektedir (Şekil 2.3). Nöronlarda mikrotübül stabilitesi ve aksonal transport ile ilişkilendirilen modifikasyonlardan biri asetilasyondur (34).

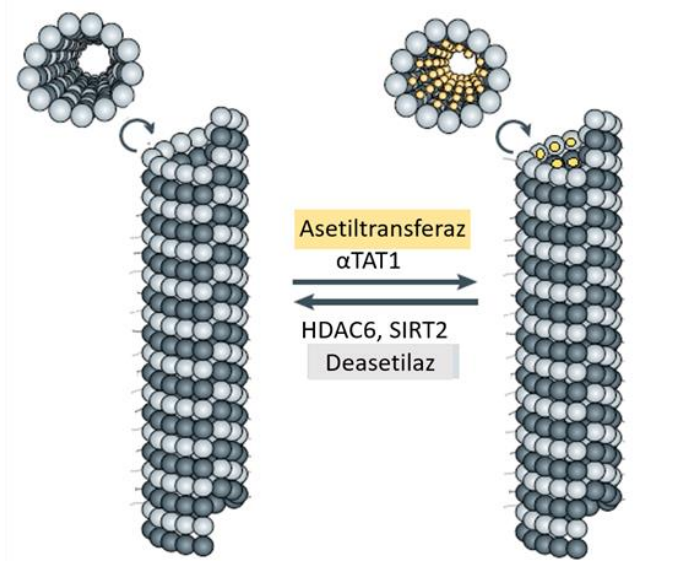


Şekil 2.3. Tübülün proteinlerinin amino ve karboksil uçlarında gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlar (33).

Tübülün Asetilasyonu

Tübülün post-translasyonel modifikasyonları arasından, mikrotübüllerin lümeninde gerçekleştiği bilinen tek modifikasyon asetilasyondur. Asetilasyonun, hem α hem de β tübülün proteinlerinde gerçekleştiği bildirilmiş olmakla birlikte, α

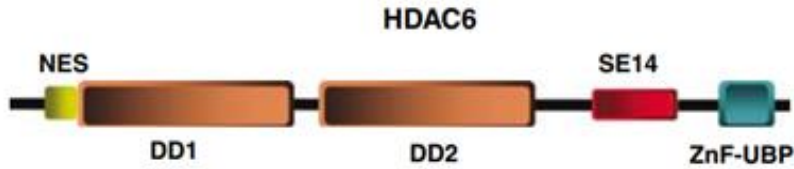
tübülün amino ucunda bulunan 40. lizin (K40) amino asitinde gerçekleşen asetilasyonu, uzun ömürlü ve stabil mikrotübüllerde dinamik mikrotübüllere oranla fazla görülmektedir. Asetilasyonun yapısal olarak mikrotübüllerin esnekliğini arttırdığı ve mekanik strese karşı koruduğu bildirilmiştir (35). Asetillenmiş mikrotübüllerin, tekrarlanan mekanik gerilme döngüleri sonrasında esnekliklerini ve uzunluklarını korudukları, deasetillenmiş mikrotübüllerin ise esnekliklerinin azaldığı ve kırılma ihtimallerinin arttığı bildirilmiştir (36). α -tübülün asetilasyonu, α -tübülün N-asetil transferaz (ATAT) enzimi tarafından katalizlenmektedir (Şekil 2.4). Tübülün asetilasyonu geri dönüşümlü bir modifikasyon olup deasetilasyonunda histon deasetilaz enzimlerinden HDAC6, HDAC5 ve sirtuin2 (SIRT2) proteinleri görev almaktadır (37 ,38). Hücrelerdeki major tübülün deasetilaz enzimi HDAC6 olup, tübülün deasetilaz (TDAC) olarak da ifade edilmektedir. SIRT2'nin sadece perinükleer alanda yerleşen mikrotübüllerin deasetilasyonunu, HDAC5'in ise peripheral nöron hasarı durumunda deasetilasyonu katalizlediği rapor edilmiştir (39, 40).



Şekil 2.4. Tübülün asetilasyonu ve deasetilasyonunda görev alan enzimler. α -TAT1; tübülün asetiltransferaz, HDAC6 ve SIRT2; tübülün deasetilaz (37).

HDAC6 enzimi

Histon deasetilazlar, histon ya da histon olmayan proteinlerden asetil gruplarının çıkartılmasını katalizleyen enzimler olup dört sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I, II ve IV çinko bağımlı, sınıf III enzimler ise NAD bağımlı olarak aktivite göstermektedir. HDAC6, sınıf IIb deasetilaz enzimlerinden biri olup çekirdekte ve çoğunlukla da sitoplazmada yerleşim göstermektedir. HDAC6, diğer HDAC sınıflarından farklı olarak, kuyruk domaini olarak adlandırılan uzun bir karboksil ucuna ve iki adet katalitik domaine (DD1 ve DD2) sahiptir. Her iki domainin de histon deasetilaz aktivitesi olduğu, ancak sadece DD2'nin tübülün deasetilasyonunu katalizlediği bildirilmiştir (41) (Şekil 2.5). DD1 ve DD2 domainleri arasındaki bölgenin de tübülün deasetilaz aktivitesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir (42). HDAC6 proteininin yapısında, ayrıca, proteinin çekirdekten çıkışını sağlayan *nuclear export* sinyali (NES), sitoplazmik lokalizasyonunu sağlayan SE14 domaini ve ubikutin bağlama domaini (ZnF-UBP) bulunmaktadır. SE14 domaini sadece insan HDAC6 enzimlerinde bulunmakta olup diğer domainler türler arasında korunmuştur (43).



Şekil 2.5. HDAC6 proteininin yapısındaki domainler (42).

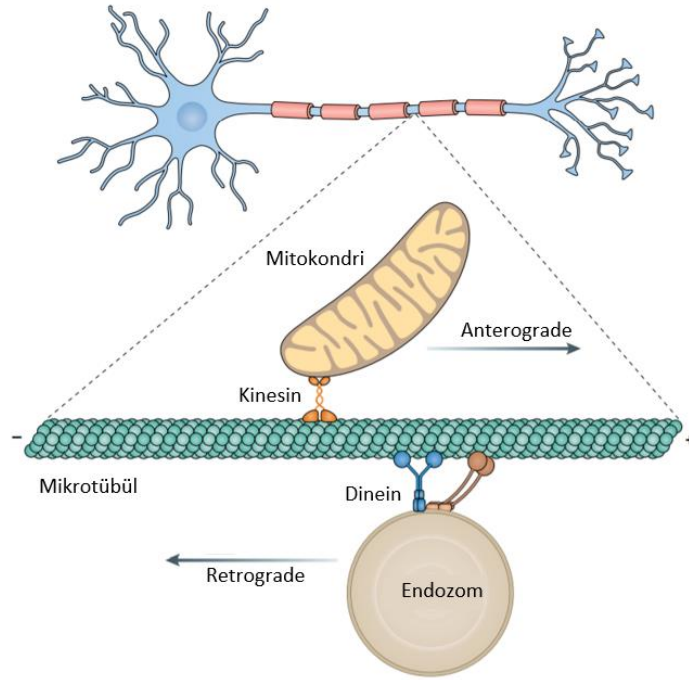
HDAC6 α -tübülün dışında aktine bağlanan proteinlerden cortactin'i ve şaperon proteinlerinden Hsp90'ı deasetile etmektedir. Ayrıca, mikrotübül asosiyasyon proteinlerinden TAU'ya bağlandığı gösterilmiştir. Bu nedenle hem mikrotübül hem de aktin iskeletinin düzenlenmesinde rol oynamakta, ayrıca şaperon-bağımlı otofaji mekanizmasında fonksiyon göstermektedir (44). HDAC6'nın α -tübülün

deasetilasyonunu katalizlemesi nedeniyle mikrotübül stabilitesinin düzenlenmesinde ve aksonal transportta rolü olduğu bilinmektedir (45, 46).

2.4.2. Aksonal Transport

Aksonal transport nöronlarda hücre gövdesinden akson ucuna (*anterograde*) ve akson ucundan hücre gövdesine (*retrograde*) doğru olacak şekilde iki yönlü olarak gerçekleşmektedir (47). Aksonal transport ile taşınan kargolar; hücre iskeleti proteinleri (ör; nörofilamentler, TAU vb), RNA'lar (ör; β aktin vb), organeller (ör; mitokondri, lizozom vb), veziküller (ör; otofagozom, nörosekretuar granüller vb) olabilmekte olup taşınma yönleri ve hızları farklılık göstermektedir. Örneğin, mitokondri gibi membranla çevrili organeller hızlı aksonal transport ile iki yönlü olarak taşınırken, nörofilamentler gibi hücre iskeleti proteinleri yavaş aksonal transportla, çoğunlukla *antrograde* yönde taşınmaktadır (48).

Mikrotübüller üzerinde gerçekleşen aksonal transportta motor proteinleri görev almakta olup ATP hidrolizinden elde edilen enerji ile hareket sağlanmaktadır. Motor proteinleri, mikrotübüllerin polaritesini tanıyarak seçici olarak pozitif veya negatif uç yönünde hareket etmekte ve kargoları taşımaktadır (49). Motor proteinlerden olan kinezin proteinleri çoğunlukla pozitif uç yönünde (*anterograde*), dinein proteinleri ise negatif uç yönünde (*retrograde*) gerçekleşen transportta görev almaktadır (50) (Şekil 2.6). İnsanlarda, sinir sisteminde ifade olan 38 adet kinezin proteini bulunmakta olup aksonal transport rol oynayan temel kinesinler, kinezin 1, 2 ve 3'tür. Kinesinler yapısal olarak 2'şer adet ağır ve hafif zincirden oluşmaktadır. Ağır zincirler mikrotübüle, hafif zincirler ise kargoya bağlanmaktadır. Benzer yapısal düzenlenme dinein proteinlerinde de bulunmakla birlikte *retrograde* taşımada, multiprotein kompleksi olan sitoplazmik dinein görev almaktadır. Dinein kompleksi 2 ağır, 2 hafif, 2 hafif-ara ve farklı sayıda ara zincirlerden oluşmakta, kargonun hafif ve ara zincirlere bağlanması dinein protein kompleksi tarafından sağlanmaktadır (51).



Şekil 2.6. Kinesin ve dinein motor proteinleri aracılı gerçekleşen anterograde ve retrograde aksonal transport (50).

Aksonal transportun kontrolünde, mikrotübül geometrisinin, motor proteinlerin ve kargoların fosforilasyonunun, mikrotübül ile ilişkili proteinlerin (ör; TAU) ve tübülün post-translasyonel modifikasyonlarının rol oynadığı bildirilmiştir. Örneğin, *in vitro* mikrotübül ağı kullanılarak yapılan bir çalışmada, mikrotübül demetlerinde α -tübülün asetilasyonunun fazla olduğu ve bu bölgelerde kinesin 1'in daha uzun mesafe hareket edebildiği gösterilmiştir (52). Mikrotübülün eğimli bölgelerine çoğunlukla bağlı olan TAU proteininin, kinesin 1'in hareketini engellediği, mikrotübül asosiye proteinlerden MAP7'nin ise kinesin 1'in mikrotübül bağlantısını ve hareketini aktive ettiği bildirilmiştir. MAP7 ve TAU'nun ayrıca kinesin 3 aracılı transportu inhibe ettiği bildirilmiştir (53).

2.4.3. Alfa Tübülün Asetilasyonu, HDAC6 ve Aksonal Transport Hataları

Farklı nörodejeneratif hastalıklara ait *in vitro* ve *in vivo* modellerle yapılan çalışmalarda ortak olarak aksonal transport hataları görülmektedir. Bu hataların bir kısmı α -tübülün asetilasyonundaki değişikliklerle; asetilasyon değişiklikleri ise bazı hastalıklarda HDAC6 protein düzeyi ile ilişkilendirilmektedir.

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Alzheimer hastalığına yönelik araştırmalarda, hastalara ait beyin dokularında α -tübülün asetilasyonunda azalma ve HDAC6 protein miktarında artış saptanmıştır (54, 55). Benzer şekilde, hastalığa ait fare modeline ait beyin dokularında α -tübülün asetilasyonunda azalma saptanmıştır. Aynı modele ait primer hipokampal nöron kültüründe, HDAC6 aktivitesinin tubastatin A ile inhibisyonunun hatalı mitokondri transportunu düzelttiği bildirilmiştir (56). Parkinson hastalığına ait LRRK2 geni mutasyonu taşıyan fare modelinde de benzer şekilde, α -tübülün asetilasyonunun arttırılması yoluyla aksonal transport hatası düzeltilebilmiştir (57). Periferik sinir sistemi hastalıklarından olan Charcot-Marie-Tooth hastalığında ise, farklı genlerde mutasyon taşıyan fare modellerinde periferik nöronlarda azalan α -tübülün asetilasyonu HDAC6 inhibisyonu yoluyla arttırılabilmiş, mitokondri transport hatası düzeltilebilmiştir (58, 59). Amyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığı'na ait, farklı genlerde mutasyonu olan fare ve *Drosophila melanogaster* modelleri, ayrıca hastalara ait indüklenmiş pluripotent kök hücre kaynaklı motor nöronlarla yapılan çalışmalarda, aksonal transport hataları olduğu bildirilmiştir (60). Özellikle mitokondri taşınmasındaki hataların uzun süredir nöronal disfonksiyona katkıda bulunduğu, nöromusküler kavşaktaki enerji kaynağı ve kalsiyum tamponlama kapasitesini etkileyerek hastalık şiddetinde belirleyici rol oynadığı bilinmektedir (60). FUS geninde mutasyon bulunan hastalara ait indüklenmiş pluripotent hücre kaynaklı motor nöronlarla yapılan bir çalışmada, α -tübülün asetilasyon düzeyinde azalma saptanmış, HDAC6'nın tubastatin A ile inhibisyonu ile hatalı gerçekleşen mitokondri ve veziküler transportun düzeldiği bildirilmiştir (61). SOD1 geninde mutasyon bulunan ALS fare

modelinde, HDAC6 geni *knock out* edildiğinde omurilik motor nöronlarında α -tübülün asetilasyonunun arttığı ve farelerin yaşam sürelerinin uzadığı rapor edilmiştir (62). Aynı çalışmada SIRT2 geninin *knock out* edilmesi ile tübülün asetilasyon artışı sağlanamamış, farelerin ömür uzunluklarında anlamlı bir farklılık kaydedilememiştir. Başka bir çalışmada, aynı mutasyonu taşıyan fare modelinde HDAC6 protein miktarının az olduğu saptanmış olmakla birlikte, farklı mutasyonları olan ALS hastalarına ait post-mortem motor korteks ve omurilik dokularında HDAC6 protein miktarında kontrol dokulara göre bir değişiklik saptanmamıştır (63).

Nörodejeneratif hastalıklara ait *in vitro*, *in vivo* modeller, hasta örnekleri ile yapılan çalışmalar, HDAC6 aktivitesinin farmakolojik olarak inhibe edilmesi yoluyla α -tübülün asetilasyonunun arttırılabildiğini ve aksonal transport hatalarının düzeltilebildiğini göstermektedir. Bu nedenle HDAC6, nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik bir hedef olarak düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, ilaç yeniden konumlandırma yaklaşımı ile klinikte kullanım onayı bulunan bileşikler arasından, HDAC6 aktivitesini inhibe edebilecek ve bu yolla α -tübülün asetilasyonunu arttırabilecek bir bileşiğin belirlenebilmesi ve etkisinin hücre kültüründe gösterilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. *In silico* Analizler

Moleküler Kenetleme Çalışmalarında Kullanılan Programlar:

- AutoDock Vina
- SwissDock (web-tabanlı, <http://www.swissdock.ch/>)
- Discovery Studio Visualizer
- Pymol

Kemoinformatik Analizlerde Kullanılan Veri Tabanları:

- Protein Data Bankası (<https://www.rcsb.org/>)
- SwissTarget (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)
- ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)
- LINCS (<http://lincsportal.ccs.miami.edu/>)
- CMap (<https://clue.io/>)
- SwissSimilarity (<http://www.swissimilarity.ch/>)

3.1.2. *In vitro* HDAC6 İnhibisyon Aktivitesi Analizi

“HDAC6 *fluorometric drug screening kit*” (Enzo)

Spektrofotometre (Spectramax M2, Molecular Devices)

3.1.3. Hücre Kültürü ve Bileşik Uygulama Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında, Anabilim Dalı’mız Prof. Dr. Altan Günalp Araştırma Laboratuvarı stoğunda bulunan NSC34 fare motor nöron benzeri hücre hattı ile çalışılmıştır. NSC34 hücrelerinin kullanımı için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığı’na yapmış olduğumuz başvurumuzda (Tarih:17.01.2020 Karar No:72408932) çalışmanın etik kurul kapsamı dışında olduğu

bildirilmiştir (Bkz. Ek-1). NSC34 hücrelerinin kültürü aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Hücre Çoğaltma Ortamı:

DMEM 4,5 g/l D-glukoz (Gibco, Glutamax)	: 94 ml
Fetal sığır serumu (%5, Biowest)	: 5 ml
Penisilin/streptomisin (%1, Biowest)	: 1 ml

Hücre Dondurma Ortamı:

DMEM 4,5 g/l D-glukoz (Glutamax)	: 900 µl
Dimetil sülfoksit (DMSO, %10, Sigma)	: 100 µl

Hücre Farklılaştırma Ortamı:

DMEM 4,5 g/l D-glukoz (Glutamax)	: 98 ml
Fetal sığır serumu (%1, Biowest)	: 1 m
Penisilin/streptomisin (%1, Biowest)	: 1 ml

Hücre Pasajlama Ortamı:

Tripsin/EDTA (Biowest)	: 5 ml
1X PBS (Medicago)	: 5 ml

Hücre Sayımı:

Tripan mavisi (%0,4 , ThermoFisher)

Cedex XS Hücre Analiz Cihazı (Roche)

Hücre Canlılık Analizi:

MTS(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfopenil)- 2H-tetrazolyum) analiz kiti (Abcam)

SpektraMax M2 spektrofotometre (Molecular Devices)

Bileşikler ve Ana Stok Konsantrasyonları:

- Rutin : 25 mg/204.7 µl DMSO (163,8 mM)
(C₂₇H₃₀O₁₆, Selleckchem)
- Riboflavin : 9,75 mg/250 µl dH₂O (81,5 mM)
(C₁₇H₂₁N₄O₉P, Sigma-Aldrich)
- Cilastatin : 17,9 mg/250 µl DMSO (200 mM)
(C₁₆H₂₆N₂O₅S, Selleckchem)
- Tubastatin : 16,8 mg/250 µl DMSO (200 mM)
(C₂₀H₂₁N₃O₂, Selleckchem)

3.1.4. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

RIPA Tamponu:

Tris-HCL (pH:7.5, 20 mM, Sigma)	: 6 ml
NaCl (137 mM, Sigma)	: 2,4 gr
B-glukofosfat (25 mM, Sigma)	: 1,62 gr
EDTA (2 mM, Sigma)	: 1200 µl
Sodyum ortovanadat (1mM, Sigma)	: 1500 µl
Triton X-100 (%1, Sigma)	: 30 ml
Deoksikolat (%1, Sigma)	: 3 g
Proteaz inhibitör tablet (Roche)	: 1:50
Fosfataz inhibitör tablet (Roche)	: 1:20
dH ₂ O	: 105,65 µl

Soğutmalı santrifüj (Boeco)

Sonikatör (Sonics Vibra Cells, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)

Protein Konsantrasyon Tayini:

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific)

Spektrofotometre (SpectraMax M2, Molecular Devices)

3.1.5. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Western Blot

SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Ayırıcı Jel Hazırlama Tamponu (%12) :

Tris baz (Sigma) : 13 gr

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma) : 0,3 gr

dH₂O ile 100 ml' ye tamamlandı. pH: 8,8 HCL ile ayarlandı.

Toplayıcı Jel Hazırlama Tamponu (%5):

Tris baz (Sigma) : 4,54 gr

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma) : 0,6 gr

dH₂O ile 100 ml' ye tamamlandı. pH:6,8 HCL ile ayarlandı.

Amonyum persülfat (%10, APS):

Amonyum persülfat (Sigma) : 0,1 gr

dH₂O : 1ml

Akrilamid / Bisakrilamid (%40):

Akrilamid (Sigma) : 39,128 gr

Bisakrilamid (Sigma) : 1,072 gr

dH₂O ile 100 ml 'ye tamamlandı.

SDS- Poliakrilamid Jel İçerikleri:

Poliakrilamid jel (%5, toplayıcı jel):

Toplayıcı jel hazırlama tamponu	: 1 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	: 750 µl
TEMED (Sigma)	: 10 µl
APS	: 60 µl
dH ₂ O	: 4,25 ml

Poliakrilamid jel (%12, Ayırıcı jel):

Toplayıcı jel hazırlama tamponu	: 6 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	: 5,65 ml
TEMED (Sigma)	: 10 µl
APS	: 100 µl
dH ₂ O	: 6,35 ml

Yükleme Tamponu (5X Laemmli):

Tris baz, 1 M, pH:8 (Merck)	: 5 ml
Glisin (Merck)	: 5 ml
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)	: 1,5 gr
Brom Fenol Mavisi	: 5 mg

2-Merkaptoetanol (Sigma) : 2,5 ml

Western Blot

- Protein moleküler ağırlık belirleyicisi, *ColorBurst™ Electrophoresis Marker* (Sigma)
- Nitroselüloz membran (BioRad)
- Mini protean elektroforez sistemi ve güç kaynağı (Biorad)
- *Ponceau-S* (Sigma)
- *Coomassie Brilliant Mavisı* (Sigma)
- *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Merck)
- GeneGnome5 Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı (Syngene)

5X Yürütme (Elektroforez) Tamponu:

Tris baz, pH: 8 : 15,15 g

Glisin (Sigma) : 72 g

Sodyum dodesil sülfat (SDS) : 5 g

1X için 200 ml stoktan alındı, dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

5X Transfer Tamponu:

Tris baz, pH: 8 : 15,15 g

Glisin (Sigma) : 72 g

Metanol : %20

1X için 200 ml stoktan alındı. Üzerine, 200 ml metanol taze olarak eklendi ve toplam hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

10X TBS, (pH;7.6):

Tris baz (Sigma) : 24,4 g

NaCl (Sigma) : 80 g

dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Yıkama Tamponu (1X TBS-T) (pH:7.4):

10X TBS : 200 ml

Tween 20 (Sigma) : 1 ml

dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

% 5 Bloklama Solüsyonu:

Süt tozu : 1 g

TBS-T, % 0,1 : 20 ml

% 20 SDS, (pH : 7.2):

SDS : 20 g

dH₂O : 100 ml

Primer ve Sekonder Antikorlar:

Anti-asetil α -tübülün primer antikor (Fare monoklonal, Sigma) (1:1000)

Anti- α tübülün primer antikor,(Fare monoklonal, Sigma) (1:1000)

Anti-GAPDH primer antikor (Fare monoklonal, Sigma) (1:5000)

Anti-fare *horseradish* peroksidaz (HRP)-konjuge) sekonder antikor,
(Sigma) (1:8000)

Stripping Solüsyonu:

Tris HCl : 312 μ l

2-Merkaptoetanol : 37,5 μ l

SDS %20, pH:7.2 : 500 μ l

dH₂O : 4,15 ml

65 °C hibridizasyonfırınında 30 dk inkübe edildi.

Data Analiz Programları

Western Blot Kantitasyonu: Image J

Absorbans Ölçümü : Softmax Pro

İstatistiksel Analizler: Graphpad Prism 8.0.2

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. *In silico* Analizler

Tez çalışmasından önce gerçekleştirilen ön çalışmalarda, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı iş birliği ile Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından onaylanmış bileşiklere ait kütüphane *Drug Bank* veri tabanından elde edilmiştir. Yaklaşık 1500 bileşik içeren bu kütüphane, HDAC6 enzimine karşı, Glide (2019-4: Schrödinger, LLC, New York, NY) (Friesner vd. 2004, Friesner vd. 2006, Halgren vd. 2004) moleküler kenetleme programı kullanılarak sanal aktivite taramasına tabi tutulmuş ve bağlanma enerjileri -11 kcal/mol'den düşük olan 7 adet bileşik belirlenmiştir. Bu bileşikler, 5-O-phosphono-alpha-D-ribofuranosyl diphosphate, flavin mononucleotide (riboflavin), rutin, hesperidin, cilastatin, dopexamine ve sorbitol olup tez çalışmaları kapsamında bu 7 bileşik ile aşağıda belirtilen *in silico* analizler gerçekleştirilmiştir.

Moleküler Kenetleme Çalışmaları

Ligand Modellerinin Hazırlanması

- Tez kapsamında aktivitesi araştırılan 7 bileşiğin (5-O-phosphono-alpha-D-ribofuranosyl diphosphate, riboflavin, rutin, hesperidin, cilastatin, dopexamine ve sorbitolün) 3 boyutlu kristal yapıları ve kimyasal yapılarının bilgisayar komut dizisine dönüştürülmüş hali (*smiles* kodları) *Drug Bank* veri tabanından elde edildi (Tablo 1).
- Bileşiklere ait *smiles* kodları Chem3D 15.0 programına aktarıldı. Kuvvet alanları hesaplanarak, enerji minimizasyonu yapıldı ve bileşiklerin en düşük enerjili formları kaydedildi.
- Aynı basamaklar, spesifik HDAC6 inhibisyon aktivitesi bulunan riconostat, citanostat, tubacin ve tubastatin A için ve ayrıca pan-HDAC inhibisyon aktivitesi bulunan trikostatın A (TSA) için de gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. *In silico* analizleri gerçekleştirilen bileşiklere ait *smiles* kodları

Bileşik Adı	Smiles Kodu
5-O-phosphono-alpha-D-ribofuranosyl diphosphate	<chem>O[C@H]1[C@@H](O)[C@@H](OP(O)(=O)OP(O)(O)=O)[C@@H]1COP(O)(O)=O</chem>
Riboflavin	<chem>CC1=CC2=C(C=C1C)N(C[C@H](O)[C@H](O)[C@H](O)COP(O)(O)=O)C1=NC(=O)NC(=O)C1=N2</chem>
Rutin	<chem>C[C@@H]1O[C@@H](OC[C@H]2O[C@@H](OC3=C(OC4=CC(O)=CC(O)=C4C3=O)C3=CC(O)=C(O)C=C3)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]2O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]1O</chem>
Hesperidin	<chem>COC1=CC=C(C=C1O)[C@@H]1CC(=O)C2=C(O1)C=C(O[C@@H]1O[C@H](CO[C@@H]3O[C@@H](C)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]3O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]1O)C=C2O</chem>
Cilastatin	<chem>CC1(C)C[C@@H]1C(=O)N\C=C/C/C/C/CSC[C@H](N)C(O)=O)C(O)=O</chem>
Dopexamine	<chem>OC1=C(O)C=C(CCNCCCCCNCCC2=CC=CC=C2)C=C1</chem>
Sorbitol	<chem>OC[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H](O)CO</chem>
TSA	<chem>C[C@H](\C=C(/C)\C=C\C(=O)NO)C(=O)C1=CC=C(C=C1)N(C)C</chem>
Tubastatin A	<chem>CN1CCc2c(c3ccccc3n2Cc2ccc(C(=O)NO)cc2)C1</chem>
Tubacin	<chem>O=C(CCCCCC(=O)Nc1ccc([C@@H]2O[C@H](c3ccc(CO)c3)C[C@H](CSc3nc(-c4ccccc4)c(-c4ccccc4)o3)O2)cc1)NO</chem>
Ricolinostat	<chem>O=C(CCCCCCNC(=O)c1cnc(N(c2ccccc2)c2ccccc2)nc1)NO</chem>
Citarinostat	<chem>O=C(CCCCCCNC(=O)c1cnc(N(c2ccccc2)c2ccccc2Cl)nc1)NO</chem>

HDAC6 Proteininin Hazırlanması

Moleküler kenetleme çalışmalarında kullanılacak hedef protein olan HDAC6'nın kristal yapısı, Protein Data Bankası'ndan elde edildi. Veri tabanında bulunan HDAC6'ya ait kristal yapılar arasından, X ışını kırınım yapısı 2.79 Å çözünürlüğe sahip olan ve bir HDAC inhibitörü (trikostatın A; TSA) ile birlikte bulunan "5EDU" kodlu yapı seçildi. HDAC6'nın kristal yapısı moleküler kenetleme çalışmaları için *Discovery Studio* programı kullanılarak, aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

- HDAC6 proteininin kristal yapısında A ve B zincirleri bulunmakta olup B zincirinde bir amino asitin eksik olması nedeniyle bu zincir yapıdan çıkartıldı. Moleküler kenetleme çalışmaları A zinciri ile gerçekleştirildi.
- Zincir çıkarma işleminden sonra kristal yapıda bulunan; su molekülleri (aktif merkez dışında bulunan), TSA (pan-HDAC inhibitörü), maltoz (ilaç hazırlanmasında kullanılan yardımcı madde) ve aktif merkezden uzakta bulunan potasyum (K^+) metal iyonları çıkartıldı. Aktif merkezde bulunan ve enzimin aktivitesi için gerekli Zn^{+2} ise yapıda bırakıldı. Son olarak hidrojen bağları yapıya otomatik olarak eklendi.

Moleküler Kenetleme

- Moleküler kenetleme çalışmaları AutoDock Vina ve SwissDOCK programları kullanılarak yapıldı.
- Her iki programda, bileşiklerin (ligand) HDAC6 proteinine karşı en kararlı bağlanma pozunu ve bu pozda iken Gibbs enerjileri hesaplandı.
- Ligandın polar olmayan hidrojen atomları birleştirildi ve Gasteiger yükleri eklendi. Ligandlara ve proteine ait dosyalar PDBQT formatında kaydedildi.
- Arama alanı merkezi olarak HDAC6'nın kristal yapısındaki aktif merkezde bulunan TSA'nın merkezi koordinatları olan $x=17.206$, $y=44.564$ ve $z=101.809$ seçildi.

- Aktif merkez boyutu 60X60X60 Å olarak ayarlandı. Tüm ligandlar, hareketsiz yapıdaki HDAC6 enzimine kenetlendi.
- AutoDock kenetleme programında kenetleme, 50 koşturma olacak şekilde Lamarkian genetik algoritması kullanılarak yapıldı
- SwissDock programı, EADock kenetleme yazılımını içermekte olup algoritmasında enerji hesaplamaları ve koordinat belirlenmesi sırasında CHARMM kuvvet alanları kullanılmaktadır.

Moleküler Kenetleme Sonrası Analizler

- AutoDock Vina ve SwissDock programları kullanılarak gerçekleştirilen moleküler kenetleme sonuçları *Discovery Studio* programına aktarılarak bileşiklerin HDAC6 enziminin aktif merkezi ile kurduğu bağlantılar incelendi.
- Bağlantıların 3 boyutlu gösterimleri için *Pymol* programı kullanıldı. HDAC6 enziminin kristal yapısında yer alan TSA yapıda bırakılarak bileşiklerin aktif merkezdeki konumları, TSA ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Kemoinformatik Analizler

Tez kapsamındaki bileşikler kemoinformatik olarak analiz edildi. Analizlerde *SwissTarget*, *ChEMBL*, *LINCS* ve *CMap* veri tabanlarından yararlanıldı.

- **SwissTarget veri tabanı** ile, bileşiklerin *smiles* kodları kullanılarak bileşiklerin hedefi olabilecek proteinler; HDAC6, histon asetilasyonu/deasetilasyonu, α -tübülün asetilasyonu/deasetilasyonu ve mikrotübül ile ilişki yönünden değerlendirildi.
- **ChEMBL veri tabanı** ile biyoaktivite çalışmaları, yüzey alanları, molekül ağırlıkları ve yağ-partisyon katsayıları incelendi.
- **LINCS veri tabanı** ile farklı hücre hatlarında gerçekleştirilmiş biyoaktivite çalışmaları, olası hedef proteinleri ve transkriptomik verileri incelendi.

- **CMap veri tabanı** ile bileşiklerin bağlantılı olduğu gen ekspresyon paternleri incelenerek HDAC6 aktivitesi bilinen bileşiklerin ifade bağlantıları ile karşılaştırıldı.

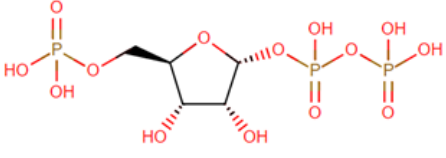
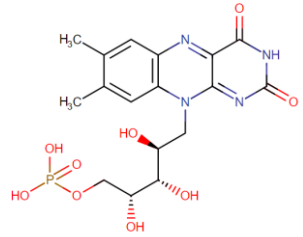
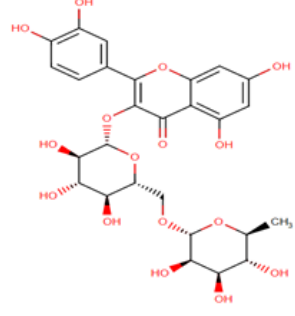
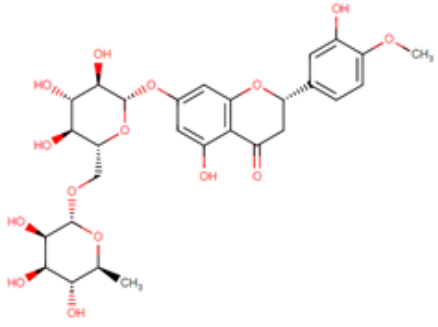
Bilinen HDAC İnhibitörleri ile Karşılaştırmalı Yapısal Analizler

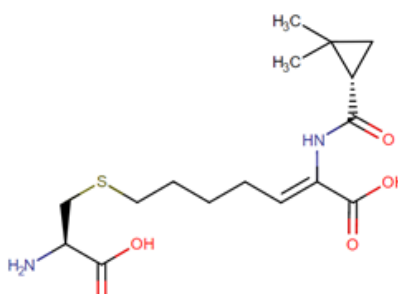
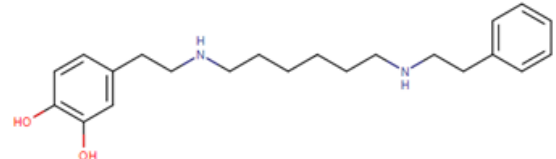
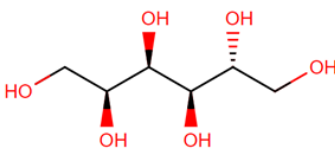
Tez kapsamında HDAC inhibisyon aktivitesi araştırılan 7 bileşik ve bilinen HDAC inhibitörlerinin kimyasal yapıları karşılaştırıldı. Karşılaştırmalarda küçük moleküllere ait farklı kütüphanelerin hızlı bir şekilde ligand tabanlı sanal taramasına olanak sağlayan bir web aracı olan *SwissSimilarity* programından yararlanıldı. *SwissSimilarity* ile bileşiklerin yapısal karşılaştırmaları için;

- HDAC6 inhibitör aktivitesi bilinen bileşiklerin *smiles* kodları arama sekmesine aktarıldı.
- Kütüphane olarak; FDA onaylı ilaç kütüphanesi, prelinik/klinik çalışmalarda olan ilaç kütüphanesi, kullanımdan kaldırılmış ilaç kütüphanesi ve nutrasötik bileşik kütüphanesi ayrı ayrı seçildi.
- Ligand tabanlı sanal taramalar için hem molekülün üç boyutlu geometrisini, hem de kimyasal iskelet yapısını dikkate alan 'combined 'opsiyonu seçildi.
- Bilinen HDAC6 inhibitörleri ile yüksek derecede yapısal benzerlik gösteren bileşiklerin içinde, seçilen 7 bileşik olup olmadığına bakılarak ligand temelli tarama yapıldı.

Bileşikler, ayrıca, bilinen HDAC inhibitörlerinin yapısında bulunan ve enzim aktivitesinde kilit rol oynayan çinko-bağlama bölgesini, HDAC6 spesifikliğini sağladığı bilinen kimyasal grupları içerip içermemesine göre de analiz edildi. Bileşiklerin iki boyutlu kimyasal yapıları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Bileşiklerin iki boyutlu kimyasal yapıları

Bileşik Adı	Kimyasal Yapıları
5-O-phosphono-alpha-D-ribofuranosyl diphosphate	
Riboflavin	
Rutin	
Hesperidin	

Cilastatin	 <p>The chemical structure of Cilastatin consists of a central chain starting with a 2-amino-3-hydroxypropyl group attached to a sulfur atom. This sulfur atom is part of a 6-membered ring containing a double bond and a nitrogen atom. The nitrogen atom is further substituted with a cyclopropylmethyl group and a carboxylic acid group. The chain ends with another carboxylic acid group.</p>
Dopexamine	 <p>The chemical structure of Dopexamine features a central 1,4-bis(2-phenylethyl)butane-1,4-diamine chain. One of the terminal secondary amine groups is substituted with a 2,4-dihydroxyphenylethyl group, while the other remains a secondary amine.</p>
Sorbitol	 <p>The chemical structure of Sorbitol is a six-carbon polyol chain. The hydroxyl groups are positioned at the 1, 2, 3, and 5 positions. The stereochemistry is shown with wedged bonds for the hydroxyl groups at C2 and C3, and a dashed bond for the hydroxyl group at C4.</p>

Bilinen HDAC İnhibitörleri	
TSA (pan-HDAC inhibitörü)	<p>The chemical structure of TSA (Tosylamide) consists of a central chain starting with a hydroxyl group (HO) attached to a nitrogen atom (NH), which is part of a carbonyl group (C=O). This is followed by a double bond (C=C), a single bond to a carbon atom with a methyl group (CH3), another double bond (C=C), and a single bond to a carbon atom with a methyl group (CH3). This chain is attached to a para-substituted benzene ring, which also has a dimethylamino group (N(CH3)2) at the opposite para position.</p>
Tubastatin A (HDAC6 inhibitörü)	<p>The chemical structure of Tubastatin A features a complex polycyclic core. It includes a piperidine ring fused to a benzene ring, which is further fused to a five-membered ring containing a nitrogen atom. This nitrogen atom is connected to a methylene group (-CH2-), which is in turn connected to a para-substituted benzene ring. This benzene ring has a hydroxylamide group (-NH-OH) and a carbonyl group (C=O) at the para position.</p>
Tubacin (HDAC6 inhibitörü)	<p>The chemical structure of Tubacin is a complex molecule. It features a central benzene ring with a hydroxyl group (-OH) at the para position. This benzene ring is connected via an oxygen atom to a five-membered ring containing a sulfur atom (S) and a nitrogen atom (N). The sulfur atom is also connected to a phenyl ring. The nitrogen atom is connected to a methylene group (-CH2-), which is in turn connected to a para-substituted benzene ring. This benzene ring has a hydroxylamide group (-NH-OH) and a carbonyl group (C=O) at the para position.</p>
Ricolinostat (HDAC6 inhibitörü)	<p>The chemical structure of Ricolinostat consists of a central pyrimidine ring. The pyrimidine ring is substituted with a phenyl group at the 2-position and a dimethylamino group (-N(CH3)2) at the 4-position. The pyrimidine ring is also connected via a carbonyl group (C=O) to a long alkyl chain (heptyl group), which is terminated by a hydroxylamide group (-NH-OH).</p>
Citarinostat (HDAC6 inhibitörü)	<p>The chemical structure of Citarinostat features a central pyrimidine ring. The pyrimidine ring is substituted with a phenyl group at the 2-position and a 3-chlorophenyl group at the 4-position. The pyrimidine ring is also connected via a carbonyl group (C=O) to a long alkyl chain (heptyl group), which is terminated by a hydroxylamide group (-NH-OH).</p>

3.2.2. *In vitro* HDAC6 İnhibisyon Aktivitesi Analizi

Rutin, riboflavin ve cilastatin adlı bileşiklerin HDAC6 inhibisyon aktiviteleri *in vitro* olarak analiz edilmiştir. HDAC6 aktivite analizlerinde “HDAC6 florometric drug screening kit” kullanılmış olup inhibisyon aktivitesi analiz edilecek bileşikler ve kit bileşenleri aşağıda belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra analizler gerçekleştirilmiştir.

- HDAC6 inhibisyon aktivitesi araştırılacak bileşikler olan rutin, riboflavin, cilastatin ve tubastatin, “tampon II” içerisinde seyreltildi. Cilastatin ve tubastatin için 200 mM; rutin için 163,794 mM ve riboflavin için 81.533 mM konsantrasyonda olacak şekilde ara stoklar hazırlandı.
- Florometrik substrat (5 mM), 12 µM/kuyucuk olacak şekilde “tampon II” ile seyreltildi.
- Rekombinant insan HDAC6 enzimi (50 µg), 0.5 ug/kuyucuk olacak şekilde “tampon II” ile seyreltildi.
- Pozitif kontrol olarak kullanılan TSA inhibitörü (0.2 mM) , “tampon II “ ile 5 uM/kuyucuk olacak şekilde seyreltildi.
- Developer II (5X), “tampon 143” ile 5 kat seyreltildi. 1X developer içerisine, 1 µM/kuyucuk olacak şekilde TSA eklendi

Analiz basamakları:

- Aday inhibitörler “tampon II” içinde 10 µM, 100 µM ve 1 mM konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı.
- Tampon II, “blank” kuyucuklarına 25 ul/kuyucuk, kontrol kuyucuklarına ise 10 µl/kuyucuk olacak şekilde eklendi.
- “Blank” hariç tüm kuyucuklara rekombinant HDAC6 enzimi 15 µl/kuyucuk olacak şekilde ilave edildi.
- Seyreltilmiş substrat çözeltisi 25 µl/kuyucuk olacak şekilde eklendi.
- Mikroplaka 550 rpm’de, 50 sn vorteksenerek kit bileşenleri karıştırıldı.

- Mikroplaka 37°C kuru etüvde 1 saat tutularak reaksiyon başlatıldı.
- Reaksiyonun durdurulması amacıyla HDAC inhibitörü olan TSA eklenmiş developer 50 µl/kuyucuk olacak şekilde her kuyucuğa eklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında, ışık almayan bir ortamda bekletilerek reaksiyon durduruldu.
- Mikroplaka, 360 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon aralığında spektrofotometrede okutuldu ve floresan sinyaldeki azalma takip edildi.
- Çalışmalar 96 kuyucuklu beyaz mikroplakalarda (Greiner) triplike olarak gerçekleştirildi.

3.2.3. Hücre Kültürü ve Bileşik Uygulama Çalışmaları

Tez kapsamında Anabilim Dalı'mız Prof. Dr. Altan Günalp Araştırma Laboratuvarı stoğunda bulunan fare motor nöron benzeri NSC34 hücre hattı kullanılmış olup hücrelerin kültürü aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

NSC34 hücrelerinin açılması ve pasajlanması

- Sıvı azotta dondurulmuş olan NSC34 hücreleri 37°C'de hızlıca çözülerek çoğaltma ortamı içeren 75 cm²lik kültür kaplarına aktarıldı.
- Hücre açılmasını takip eden gün hücrelerin çoğaltma ortamı taze ortam ile değiştirilerek, dondurma ortamı içerisinde bulunan DMSO uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin yaklaşık olarak %85 yoğunluğa ulaşması sonrasında 75 cm²lik hücre kültür kabında çoğaltılan hücrelerin çoğaltma ortamı uzaklaştırılarak, 1X PBS ile 1 kez yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 5 ml Tripsin/EDTA eklendi ve 8 dakika 37°C, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.
- Tripsinin inaktivasyonu için 7 ml taze çoğaltma ortamı koyularak hücreler 15 ml tüp içerisine alındı.
- Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildikten sonra süpernatant atılarak pellet 3 ml çoğaltma ortamı ile resüspand edildi.
- Hücreler 1:2 oranında yeni 75 cm²lik kültür kaplarına aktarıldı.

- Hücreler deneysel çalışmalar için Cedex XS cihazı ile sayıldı. Cedex XS cihazında hücre sayımı yaparken hücreleri içeren çoğaltma ortamı, tripan mavisi çözeltisi (% 0.4) ile 1:1 oranında karıştırıldı ve Cedex slaytına 10 µl olacak şekilde yüklendi. Deneysel çalışmalar için hücreler aşağıda belirtilen şekilde kültür kaplarına aktarıldı.
 - Hücre canlılık analizleri için 96 kuyucuklu kültür kaplarına
6.000 hücre/kuyucuk
 - Western blot çalışmaları için 6 kuyucuklu kültür kaplarına,
200.0 cre/kuyucuk

NSC34 hücrelerinin farklılaştırması:

- Analizler için gerekli olan eşit sayıda hücre, kuyucuklara dağıtıldıktan sonra kültür kabına yapışmaları için, 24 saat 37°C, %5 CO₂ içeren etüvde çoğaltma ortamı içerisinde inkübe edildi.
- Ertesi gün çoğaltma ortamı farklılaşma ortamı ile değiştirilerek hücreler 72 saat 37°C, %5 CO₂ içeren etüve kaldırılarak farklılaştırıldı.

NSC34 hücrelerinin dondurulması:

- 75 cm²'lik hücre kültür kabında çoğaltılan hücreler tripsinizasyon sonrasında 1000 rpm'de 5 santrifüje edildi.
- Süpernatant atılarak pellet 1 ml dondurma ortamı ile resüspandede edildi.
- Hücreler dondurma tüpüne (*cryo tube*) alındı ve izopropanol içeren özel dondurma kabına koyularak -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Rutin ve riboflavinin NSC34 hücrelerine uygulanmış ve *in vitro* analizlerde HDAC6 inhibisyonu sağladıkları tespit edilen konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTS yöntemi ile araştırılmıştır. MTS yöntemi tetrazolyum tuzlarının formazan tuzlarına indirgenmesine bağlı olarak meydana gelen renk değişiminin kalorimetrik olarak ölçülmesi prensibine dayalı olarak çalışmakta olup deneysel aşamalar aşağıda belirtilmiştir.

- Bileşik uygulaması öncesinde, 96 kuyucuklu mikropalakaya 6000 hücre/kuyucuk şeklinde aktarılan ve 72 saat süreyle farklılaştırılan hücrelerin içinde bulunduğu farklılaşma ortamı uzaklaştırıldı ve hücrelere 180 µl taze farklılaşma ortamı eklendi.
- Farklılaşan hücrelere 10 µM, 100 µM ve 1000 µM konsantrasyonlarda rutin ve riboflavin 24 saat süreyle uygulandı. Eş zamanlı olarak, rutin'in çözücüsü olan DMSO ve riboflavinin çözücüsü olan dH₂O eşit hacimde uygulandı.
- Bileşikler ile inkübasyon sonrası, toplam hacmin %10 olacak şekilde (18 µl) MTS reaktifi karanlık ortamda ilave edildi ve pipetaj ile karıştırıldı.
- Hücreler 2 saat 37°C, %5 CO₂ etüvde inkübe edildi.
- Oluşan formazan 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Molecular Devices, Spectramax M2) olarak ölçüldü.
- Çalışmalar, 96 kuyucuklu şeffaf mikropalakalarda triplike olacak şekilde gerçekleştirildi.

Bileşiklerin α -tübülün Asetilasyonu Düzeyi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

MTS analizi ile hücre canlılığının belirlenmesinin ardından bileşiklerin α -tübülün asetilasyon düzeyi üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla NSC34 hücrelerine spesifik HDAC6 inhibitörü olan tubastatin A ve aday bileşiklerden rutin ve riboflavin uygulamaları gerçekleştirilmiş olup deneysel aşamalar aşağıda belirtilmiştir.

- Bileşik uygulaması öncesinde, 6 kuyucuklu mikropalakaya 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde aktarılan ve 72 saat süreyle farklılaştırılan hücrelerin içinde bulunduğu farklılaşma ortamı uzaklaştırıldı ve 2 ml taze farklılaşma ortamı eklendi.
- Farklılaşan hücrelere 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonlarda rutin ve riboflavin 12 ve 24 saat süre ile uygulandı. Tubastatin A uygulaması ise 2,5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda 4 saat olacak şekilde gerçekleştirildi. Eş zamanlı olarak, bileşiklerin çözücülerini (DMSO veya dH_2O) eşit hacimde olacak şekilde uygulandı.
- Tubastatin A ve riboflavin uygulamaları duplike, rutin uygulamaları ise triplike olacak şekilde gerçekleştirildi.
- Bileşik inkübasyon sürelerinin bitiminde, hücreler proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren RIPA lizis tamponu içerisine toplandı.

3.2.4. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

- Hücreler soğuk RIPA tamponu içerisinde alındıktan sonra buz içerisinde 15 dk sonikasyon yapıldı.
- Sonikasyon sonrasında örnekler soğutmalı santrifüjde 4°C'de 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant temiz tüpe aktarıldıktan sonra proteinler -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı.
- *BCA Protein Assay* kiti kullanılarak, izole elde edilen protein konsantrasyonları belirlendi.

- %1 SDS içerisinde farklı BSA konsantrasyonlarına sahip standartlar kullanılarak standart eğri çizildi (Tablo 3.3).
- Protein örnekleri %1 SDS ile 10 kat seyreltildi.
- 50A:1B oranında hazırlanmış olan çalışma çözeltisi 1 ml olacak şekilde eklendikten sonra örneklerle karıştırıldı.
- Örnekler 37°C'deki inkübatör içerisinde 30 dakika bekletildi.
- Proteinlerin 562 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri, triplicate olacak şekilde spektrofotometrik (SpectraMax M2, Molecular Devices) olarak ölçüldü. Standart eğri yardımıyla proteinlerin konsantrasyonları hesaplandı.

Tablo 3.3. Protein miktar tayininde standart eğri çizilmesi için gerekli BSA konsantrasyonları

Standart	%1 SDS (μ l)	BSA (μ l)	Konsantrasyon (μ g/ μ l)
0	50	0	0
1	47,5	2,5	0,1
2	40	10	0,4
3	30	20	0,8
4	20	30	1,2

3.2.5. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Western Blot

NSC34 hücrelerine farklı konsantrasyon ve sürelerde bileşik uygulaması sonrasında, α -tübülin asetilasyon düzeyindeki değişiklikler Western blot yöntemi ile araştırıldı.

SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

- Proteinlerin ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için %12,5'lük ayırıcı ve %5'lik toplayıcı SDS poliakrilamid jel kullanıldı. Ayırıcı jel (%12,5) taraktan yaklaşık 1 cm aşağısına kadar döküldü ve polimerizasyonu takiben toplayıcı jel (%5) camlar arasına dökülerek taraklar yerleştirildi.
- Polimerleşen jelden taraklar çıkartılıp jel, *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad) cihazına ait tanka yerleştirildi.
- Örnekler 30 μ g olacak şekilde 1:5 oranında 2-merkaptotanol içeren 5X laemli tamponu ile karıştırıldı ve proteinlerin denatüre olması amacıyla 95 °C de 7 dakika kaynatılarak buz içerisine alındı.
- Jele 10 μ l moleküler ağırlık belirleyicisi ve örnekler yüklendi.
- Örnekler elektrofrezde 120 V'da 2 saat yürütülerek proteinlerin molekül büyüklüklerine göre ayrımı gerçekleştirildi.

Western Blot

Islak Transfer:

- 9/6 cm boy/en oranında olacak şekilde kesilen 1 adet nitroselüloz membran, 4 adet Whatmann kağıdı ve süngerler transfer tamponunun içinde 5 dakika bekletildi.
- Elektrofrez sonrasında toplayıcı jel kesilip atılarak ayırıcı jel tamponun içine alındı.

- Islak transfer için kasetin siyah kapağından başlayarak sırasıyla sünger, 2 adet Whatmann kağıdı, jel, membran, 2 adet Whatmann kağıdı, sünger konularak sandviç hazırlandı.
- Transfer tamponu içeren tanka kasetler ve buz kalıbı yerleştirilerek 150 V'da 1,5 saat proteinlerin jelden nitroselüloz membrana transferi sağlandı.
- Transfer sonrasında membran Ponceau S ile boyanarak transfer kontrol edildi.

Bloklama ve Antikor İnkübasyonları:

- Transfer işlemi sonrasında özgül olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla membran %5 süt tozu içeren bloklama solüsyonu içerisinde çalkalayıcıda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Primer antikorlar, bloklama solüsyonu içerisinde, gereçler kısmında belirtilen oranlarda seyreltilerek +4 °C'de 16 saat süre çalkalayıcıda inkübe edildi.
- Ertesi gün bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması amacıyla yıkama tamponu ile 3 defa 10 dakika aralıklarla yıkamalar gerçekleştirildi.
- Membran, 1:4000 ya da 1:8000 oranında seyreltilmiş olan horseradish peroksidaz (HRP) işaretli uygun sekonder antikorlar ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
- Sekonder antikor inkübasyonu sonrasında membran yıkama tamponu ile 4 defa 10 dakika aralıklarla yıkandı.
- Protein bantlarının görüntülenmesi amacıyla, West Femto Supersignal kemilüminesans kit solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı ve görüntüleme karışımı hazırlandı. Membran görüntüleme karışımı ile 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. GeneGnome görüntüleme cihazına yerleştirildi ve CCD kamera ile görüntülendi.
- Asetile α -tübülin düzeyleri, total α -tübüline göre normalize edilerek değerlendirildi. Bileşik uygulamalarının α -tübülin düzeyine etkisi ise GAPDH normalizasyonu ile değerlendirildi. Bu proteinleri görüntülemek için önceden membran üzerine uygulanan antikorlar *stripping* işlemi ile uzaklaştırıldı. Bu

işlemede membran hibridizasyon fırınının içinde 65 °C’de 30 dakika bekletildi. Ardından üç kez hızlı, ardından üç kez 10’ar dakika %0,1 TBS-T ile yıkandı, bloklama ve antikor uygulamaları sonrasında protein bantları görüntülendi.

- Protein bantları dansitometrik olarak ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Farklı konsantrasyon ve sürelerde bileşik uygulaması sonucunda asetil α -tübülin protein düzeylerindeki değişimler çözücü uygulanan örneklerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi.

3.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Western Blot çalışmalarından elde edilen sonuçlar Image J programı ile analiz edildi. Verilerin istatistiksel değerlendirmeleri Graphpad Prism 8 programı ile gerçekleştirildi. Kullanılan istatistiksel testler şekil alt yazılarında belirtildi. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

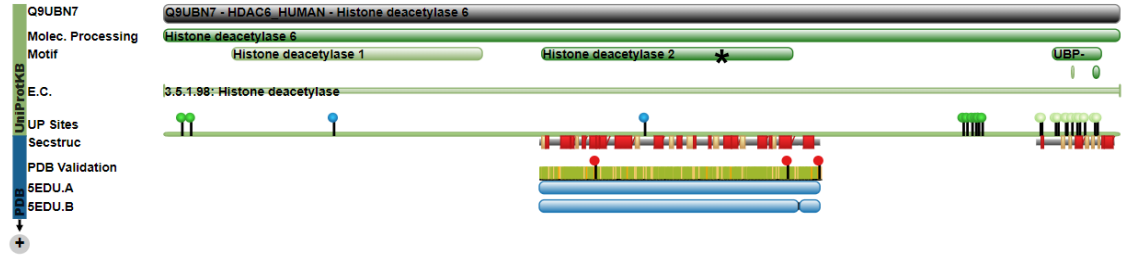
4.1. *In silico* Analizler

4.1.1. Moleküler Kenetleme Çalışmaları

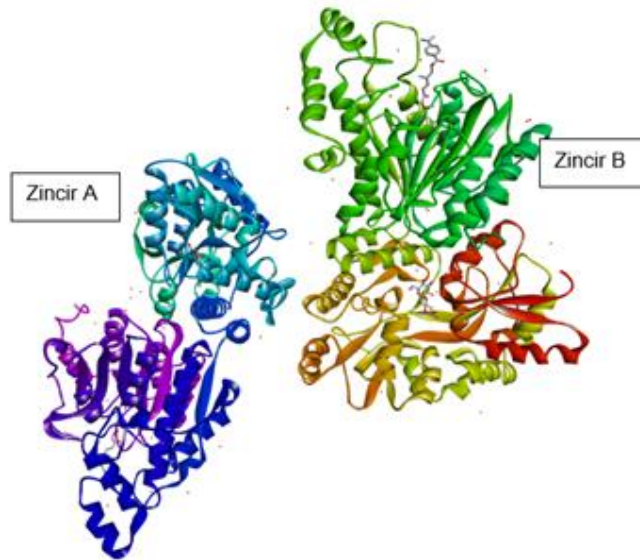
Tez çalışması öncesinde gerçekleştirilen ön çalışmalarda, FDA tarafından onaylanmış bileşiklere ait kütüphane “Drug Bank” veri tabanından elde edilmiştir. Yaklaşık 1500 bileşik içeren bu kütüphane, HDAC6 enziminin α -tübülün deasetilaz aktivitesinden sorumlu olan 2. katalitik domainine (DD2) karşı Glide-Schrodinger moleküler kenetleme programı kullanılarak taranmış ve bağlanma enerjilerine göre sıralama yapılarak bir liste oluşturulmuştur. Listede bağlanma enerjileri -11 kcal/mol'den düşük olan 7 adet bileşik belirlenmiş olup bu bileşikler; 5-O-phosphono-alpha-D-ribofuranosyl diphosphate, flavin mononucleotide (riboflavin), rutin, hesperidin, cilastatin, dopexamine ve sorbitol'dür.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, bu 7 bileşik, HDAC6'nın aynı domainine (DD2) karşı, farklı algoritmalara sahip iki program olan AutoDock Vina ve SwissDock programları kullanılarak kenetlenmiştir. HDAC6 proteininin Protein Data Bankası'nda bulunan kristal yapısı, aralarında bir amino asitlik fark olan iki polipeptit zincirinden (A ve B) oluşmaktadır (Şekil 4.1). Kenetleme çalışmaları için tüm amino asitleri içeren A zinciri (5EDU.A) seçilmiş, bu zincir, yöntem kısmında detaylı bir şekilde bahsedildiği şekilde kenetleme çalışmalarına uygun hale getirilmiştir. Ayrıca, kenetleme çalışmaları öncesinde, HDAC6 proteinine kenetlenecek bileşikler de yöntem kısmında belirtildiği şekilde enerji minimizasyonları yapılarak hazırlanmıştır. Aktivitesi araştırılan 7 bileşiğin yanı sıra, bilinen HDAC6 inhibitörlerinden tubacin, tubastatin A, ricolinostat, citarinosat ve pan-HDAC inhibitörü olan TSA'da kenetleme çalışmalarına dahil edilmiştir.

A



B



Şekil 4.1. HDAC6 proteininde, **(A)** moleküler kenetleme yapılan DD2 katalitik domaininin gösterimi (*), A (5EDU.A) ve B (5EDU.B) zincirlerinin yerleşimi (PDB), **(B)** DD2 domaininin kristal yapısı. [Erişim Tarihi 14 Kasım 2020]. Erişim adresi: <https://www.rcsb.org/>

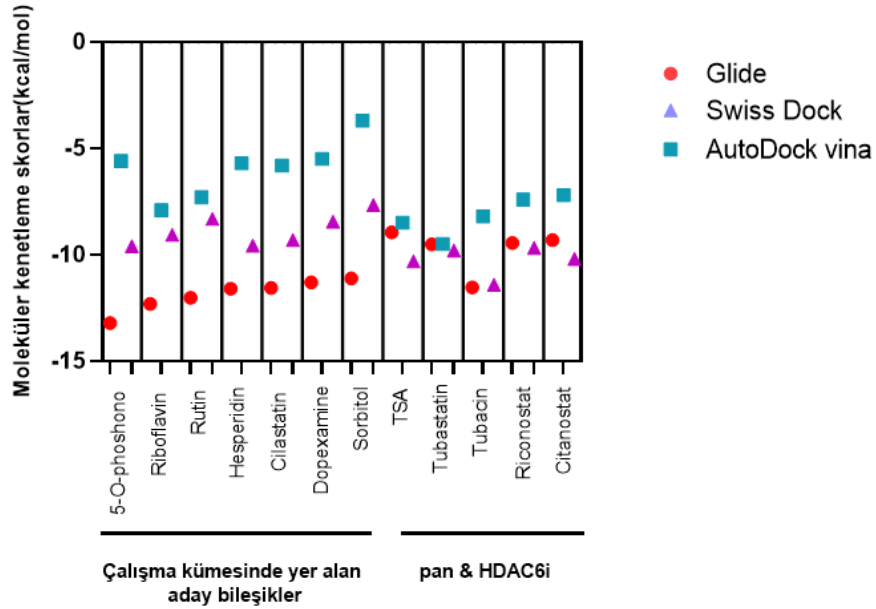
Kenetleme çalışmaları, HDAC6'nın merkez koordinatları (x: 17.206, y:-44.564, z:101.809) kullanılarak seçilen bir grid alanında 50 koşturma olacak şekilde

gerçekleştirilmiştir. AutoDock Vina ve SwissDock programları kullanılarak gerçekleştirilen moleküler kenetleme çalışmaları sonucunda elde edilen kenetleme skorları Tablo 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen kenetleme skorları, tez öncesi dönemde Glide-Schrodinger programı ile gerçekleştirilmiş olan ön taramalardan elde edilen skorlarla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.1., Şekil 4.2.).

Tablo 4.1. Moleküler kenetleme çalışmaları sonucu elde edilen skorlar

Aday Bileşikler	Moleküler Kenetleme Skorları (ΔG , kcal/mol)		
	Autodock Vina	SwissDock	Glide*
5-O-phosphono-alpha-D-ribofuranosyl diphosphate	-5,6	-9,02	-13,21
Riboflavin	-7,9	-9,06	-12,31
Rutin	-7,3	-9,45	-12,02
Hesperidin	-5,7	-9,30	-11,59
Cilastatin	-5,8	-8,73	-11,55
Dopexamine	-5,5	-8,13	-11,29
Sorbitol	-3,7	-7,66	-11,11
HDAC İnhibitörleri			
TSA (pan-HDACi)	-8,5	-9,86	-8,95
Tubastatin A (HDAC6i)	-9,5	-8,91	-9,51
Tubacin (HDAC6i)	-8,2	-10,73	-11,53
Ricolinostat (HDAC6i)	-7,4	-9,86	-9,45
Citarinostat (HDAC6i)	-7,2	-10,66	-9,30

* Tez çalışması öncesinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. AutoDock Vina, SwissDock ve Glide-Schrodinger programları ile elde edilen moleküler kenetleme skorlarına ait karşılaştırmalı grafik.

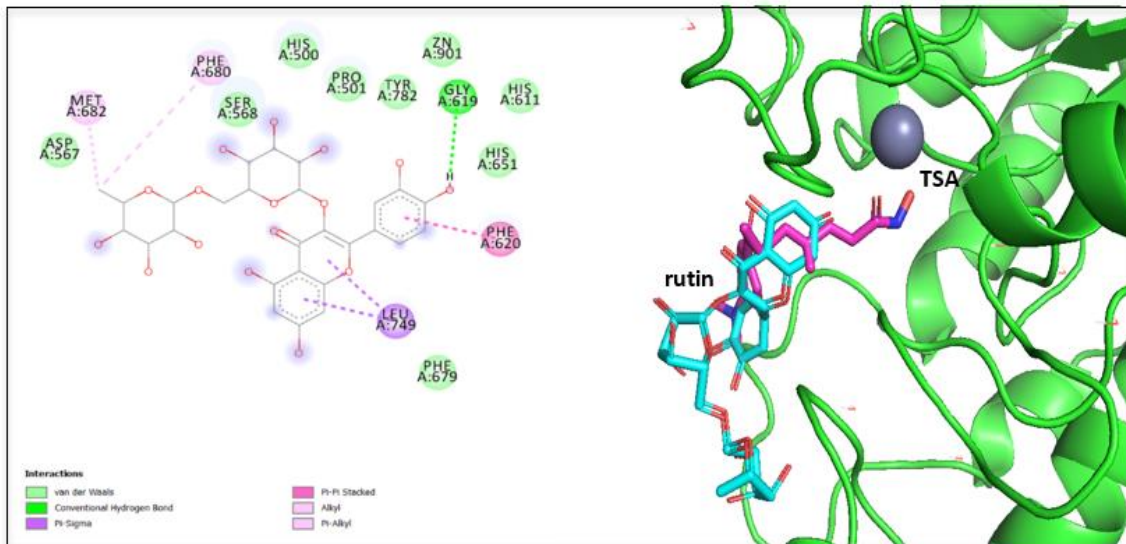
Moleküler kenetleme çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bilinen pan-HDAC ve HDAC6 inhibitörleri için üç programın da yakın kenetleme skorları verdiği görülmüştür. Bu nedenle, çalışma kümesinde yer alan 7 aday bileşik arasından kenetleme skorları birbirine yakın olan rutin, riboflavin, cilastatin ve hesperidin seçilmiş ve kenetleme sonrası analizler gerçekleştirilmiştir.

Kenetleme sonrası analizler *Discovery Studio* programı kullanılarak gerçekleştirilmiş, bileşiklerin HDAC6 proteininin aktif merkezinde etkileştiği amino asitler belirlenmiştir (Şekil 4.3.). Ayrıca, HDAC6'nın, Protein Data Bankası'ndaki orijinal kristal yapısında bulunan TSA yapıda tutulmuş, *Pymol* programı ile aday bileşiklerin aktif merkeze yerleşim durumları TSA ile karşılaştırılarak incelenmiştir (Şekil 4.3.).

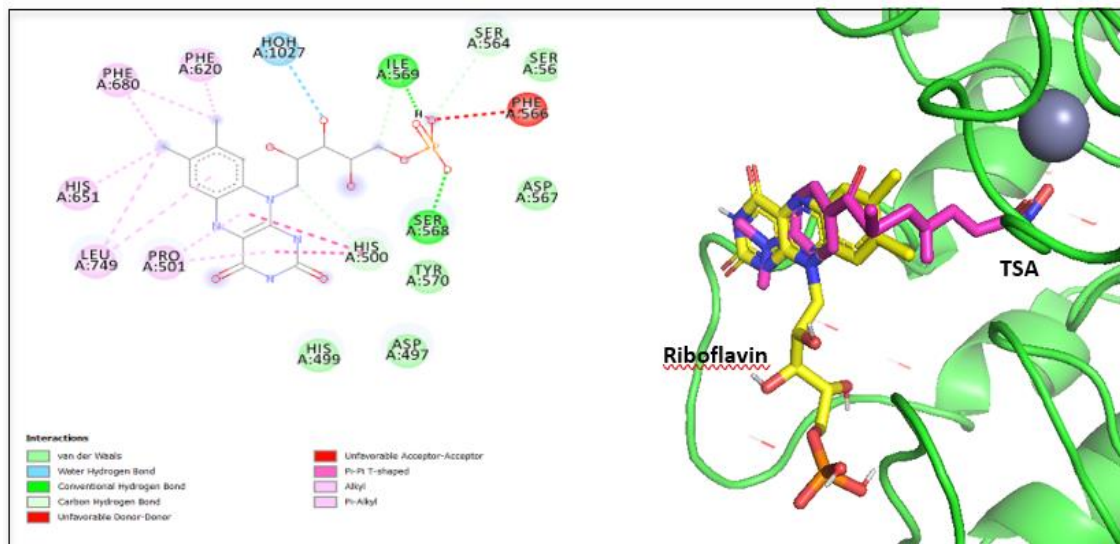
HDAC6 proteinine kenetleme sonucunda;

- **Rutin'in**, 749. lösin amino asit ile π -sigma; 620. fenilalanin amino asiti ile rutinin aromatik halkaları arasındaki elektron bulutları arasındaki π - π etkileşimi; 682. metiyonin ve 680. fenilalanin ile diğer zayıf etkileşimler ve birçok vander waals etkisi; 619. glisin amino asitindeki N elektronegatif heteroatomu ile hidrojen bağ etkileşimi saptanmıştır (Şekil 4.3.A).
- **Riboflavin'in**; aromatik halkası ile 500. histidin amino asitinin aromatik halkaları arasındaki π elektron bulutları arasındaki etkileşim (T-shape; iki aromatik halkadaki elektron bulutları 90° olarak konumlanmış); 749. lösin, 651. histidin, 680/620. fenilalanin, 501. prolin ile π -alkil zayıf etkileşimleri; 566. fenilalanin, 564. serin, 569. izolösin ile klasik hidrojen bağı etkileşimi saptanmıştır (Şekil 4.3.B).
- **Cilastatin'deki** karbonil grubu ile 500. histidin amino asiti arasında hidrojen bağ etkileşimi; cilastatindeki quaterner azot atomu ile 680. fenilalanin arasında katyon- π etkileşimi; 651. histidin ile London etkileşimi; cilastatindeki alkil grubu ile 679. amino asitinin aromatik halkası arasında π -sigma etkileşimi; ayrıca cilastatin ile, 570/782. tirozin, 619. glisin, 749. lösin, 620. fenilalanin ve 569. izolösin arasında van der waals etkileşimleri saptanmıştır (Şekil 4.3.C).
- **Hesperidin'deki** kısmi negatif O_2 atomu ile, 651. histidin / 749. lösin / 568. serin ile hidrojen bağ etkileşimi; 680. fenilalanin / 682. metiyonin ile zayıf etkileşimler; hesperidindeki karbonil grubu ile 500. prolin amino asitinin H^+ kısmi pozitif atomu arasında London etkileşimleri; 570. tirozin, 569. izolösin, 500/499. histidin, 620/679. fenilalanin arasında van der Waals etkileşimleri saptanmıştır (Şekil 4.3.D).

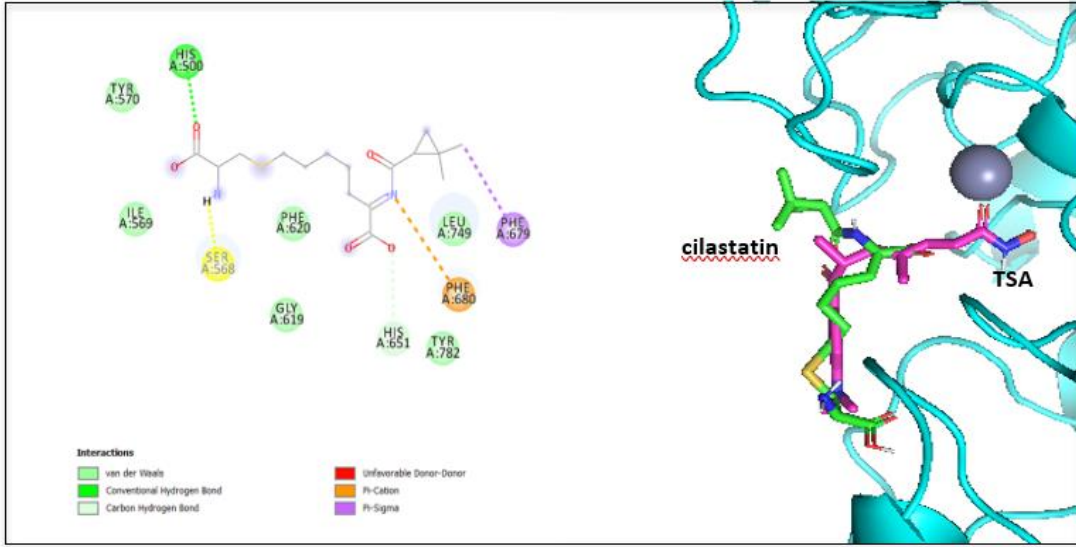
A



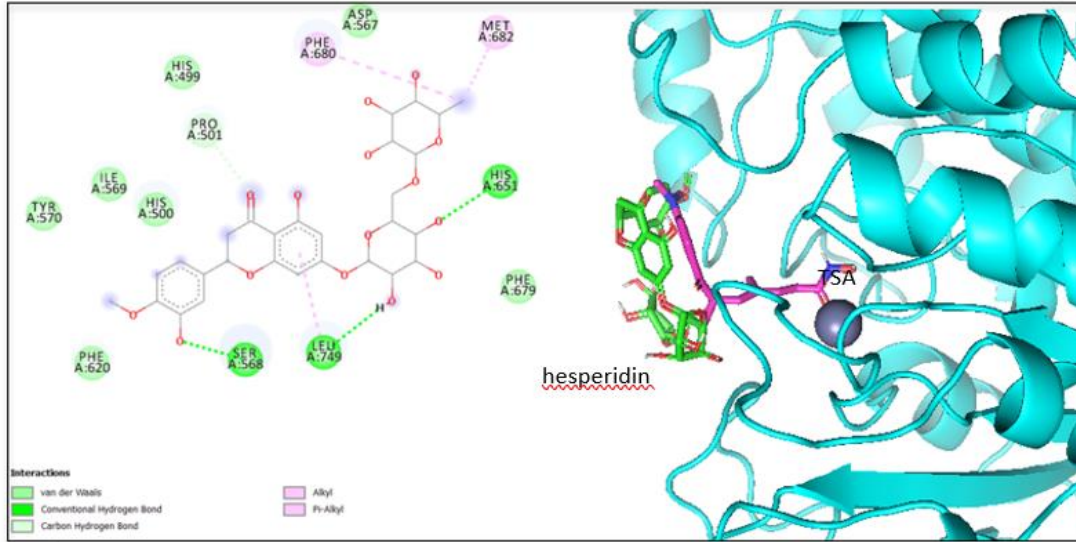
B



C



D



Şekil 4.3. Moleküler kenetleme sonrası analizler. **(A)** Rutin, **(B)** riboflavin, **(C)** cilastatin ve **(D)** hesperidin bileşiklerinin HDAC6'nın aktif merkezindeki amino asitlerle etkileşiminin *Discovery Studio* (sol) programı ile gösterimi. *Pymol* programı (sağ) ile bileşiklerin HDAC6'nın aktif merkezindeki amino asitlerle etkileşimi ve TSA'ya göre konumlarını belirten, çakıştırılmış üç boyutlu gösterimleri.

4.1.2. Kemoinformatik Analizler

Moleküler kenetleme çalışmaları ile, rutin, riboflavin, cilastatin ve hesperidin'in HDAC6 proteinine bağlanma potansiyelinin yüksek bulunması sonrasında bu bileşiklerle kemoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlerde web tabanlı farklı veri tabanlarından faydalanılmış ve bileşiklerin HDAC6, histon asetilasyonu/deasetilasyonu, tübülün asetilasyonu/deasetilasyonu veya mikrotübül ile ilişkili olası protein hedefleri araştırılarak çalışma kümesinin daraltılması amaçlanmıştır.

Rutin, riboflavin, cilastatin ve hesperidin'in *SwissTarget* programı ile analizi sonucunda rutin hedefi olabilecek proteinler arasında mikrotübül asosiyel proteinlerden TAU'nun bulunduğu saptanmıştır. Diğer bileşiklerin olası hedefleri arasında asetilasyon/deasetilasyon ile ya da mikrotübüllerle ilişkili proteinlere rastlanmamıştır. Bileşiklerin *ChEMBL* veri tabanında analizi sonucunda; rutin olası hedef proteinleri arasında TAU; riboflavinin olası hedefleri arasında histon asetil transferaz olan CREB-binding protein; cilastatin'in olası hedefleri arasında ise mikrotübül asosiyel proteinlerden olan MAP2 saptanmıştır. *ChEMBL* veri tabanında ayrıca, bileşiklerin membran geçirgenliğini belirten partiyon katsayıları da incelenmiştir. İlaç olma özelliği taşıyan küçük moleküllerin partiyon katsayısının (log P) 'nın 0 ile 3 arasında olması gerekmektedir ve bu değerin rutin'de 0.15, riboflavin'de -1, cilastatin'de -1.3, hesperidin'de ise -0.31 olduğu görülmüştür. Bu bulgu, rutin hariç diğer bileşiklerin yardımcı maddeler olmaksızın hücre membranı geçirgenliklerinin düşük olacağını düşündürmüştür.

Rutin, riboflavin, cilastatin ve hesperidin'in *cMAP* veri tabanında bulunan *cMap* haritaları incelendiğinde rutin'in mikrotübül ile ilişkili bir serin/threonin kinaz olan MAST4 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Diğer bileşikler için transkripsiyonel değişiklikleri ifade eden bir *cMAP* skoru bulunmamıştır. Bileşikler *LINCS* veri tabanında incelendiğinde ise rutin'in olası hedef proteinleri arasında mikrotübül uç proteinlerinin, riboflavin'in olası hedef proteinleri arasında, tübülüne bağlanabilen proteinlerden aldehit dehidrojenaz 1'in, cilastatin'in hedef proteinleri

arasında ise, histon deasetilaza bağlanabilen geminin proteininin olduğu saptanmıştır.

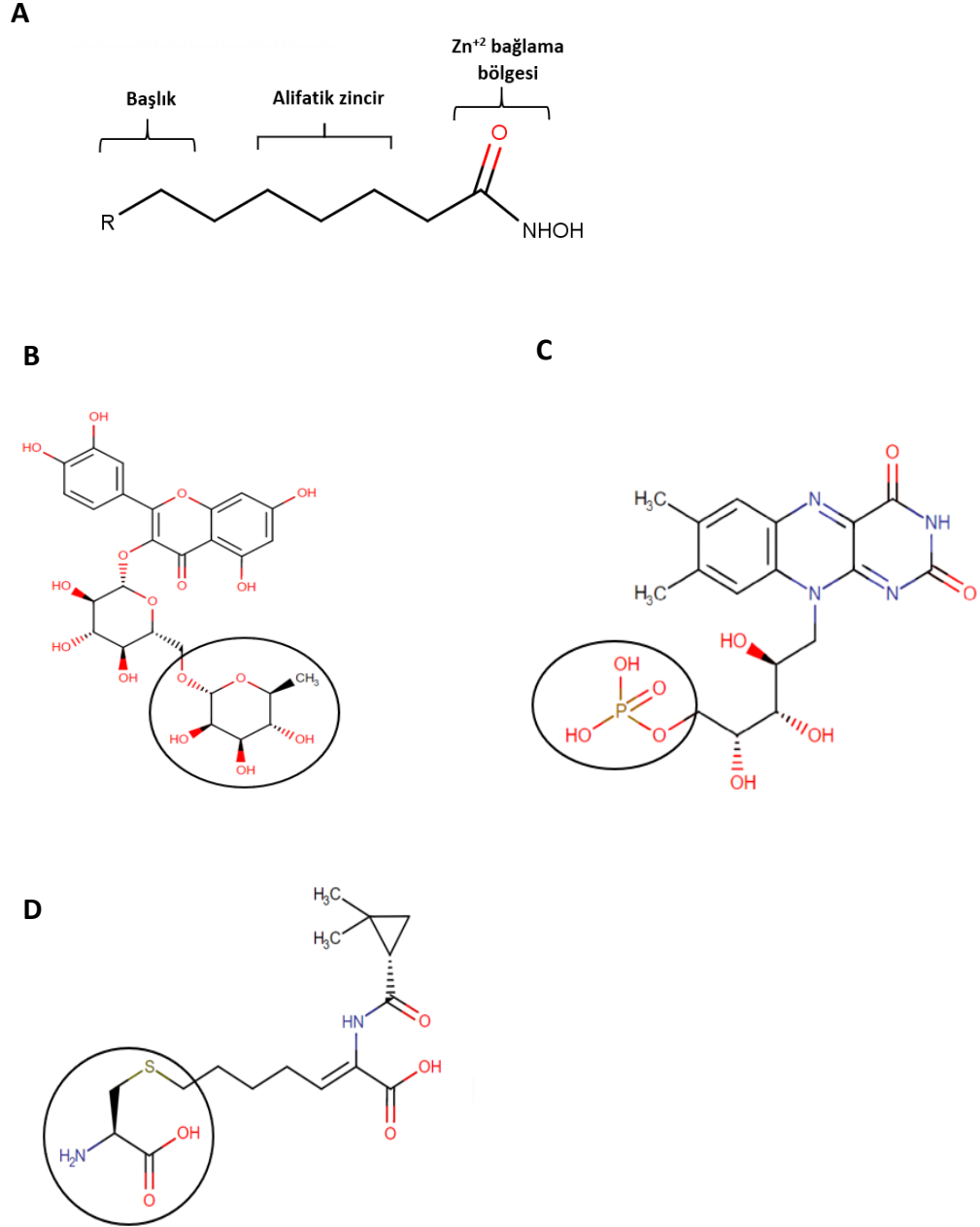
Kemoinformatik analizler sonucunda HDAC6 proteininin, rutin, riboflavin, cilastatin ve hesperidin'in olası hedefleri arasında yer almadığı görülmüştür. Ancak rutin, riboflavin ve cilastatin'in histon asetilasyonu/deasetilasyonu ya da mikrotübül ile ilişkili bazı protein hedeflerinin olabileceği saptanmış, hesperidin'in bu fonksiyonlara sahip olabilecek bir protein hedefi bulunamamıştır. Rutin, riboflavin ve cilastatin'in α -tübülün asetilasyonu üzerindeki olası etkilerinin yanında başka hedef genleri/proteinleri etkileyerek de aksonal transport hatalarını düzeltici etki gösterebilecekleri düşünülmüş, bu nedenle hesperidin çalışma kümesinden çıkartılarak küme 3 bileşiğe indirgenmiştir.

4.1.3. Bilinen HDAC İnhibitörleri ile Karşılaştırmalı Yapısal Analizler

HDAC6 inhibitörlerinin yapıları pan-HDAC inhibitörleri ile benzerlik göstermekte olup farmakofor model üç yapısal alandan oluşmaktadır. İnhibitörlerin yapısında katalitik cepte Zn^{+2} iyonu ile etkileşime giren bir Zn^{+2} bağlama bölgesi (ZBG), hidrofobik kanalı kaplayan bir alifatik zincir ve yüzeyle etkileşime giren bir başlık grubu bulunmaktadır (Şekil 4.4.A). Rutin, riboflavin ve cilastatin'in yapısal analizlerinde öncelikle *SwissSimilarity* programı kullanılmış ve bileşiklerin yapıları bilinen HDAC6 inhibitörleri ile karşılaştırılmıştır. Bilinen HDAC6 inhibitörlerinin ligand temelli modellemeleri yapıldığında, bilinen inhibitörlere yapısal benzerlik gösteren bileşikler arasında rutin, riboflavin ve cilastatin bulunmamıştır.

Bileşiklerin iki boyutlu kimyasal yapıları veri tabanından bağımsız olarak bilinen HDAC inhibitörlerinin yapıları ile karşılaştırılmıştır. Rutinin yapısında yer alan hidroksi oksa-siklik grupların, riboflavinin yapısında yer alan fosfat grubunun ve cilastatinin yapısında yer alan gruplarının elektronegatifliklerinin yüksek olması nedeniyle Zn^{+2} bağlama bölgesi için uygun kimyasal gruplar arasında yer aldığı saptanmıştır. Ayrıca HDAC6 enziminin spesifik inhibisyonunda rolü olan amino-2-karboksietil sülfanil grubu, cilastatinin yapısında bulunmaktadır (Şekil 4.4). Yapısal

incelemelerden elde edilen bilgiler ışığında rutin, riboflavin ve cilastatin'in HDAC6 aktivitesini inhibe edebileceği düşünülmüş ve bu üç bileşikle *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir.



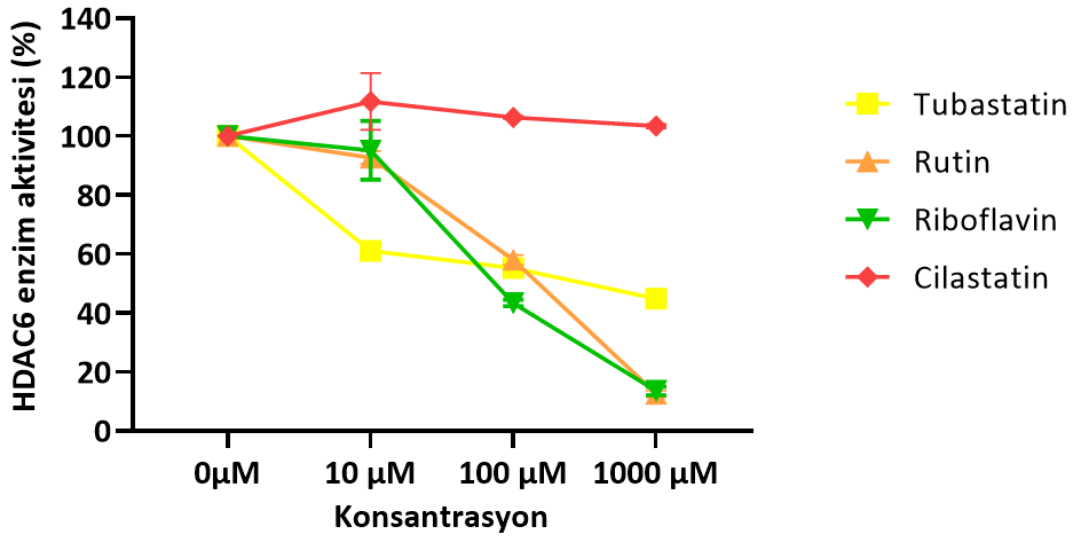
Şekil 4.4. Bileşiklerin iki boyutlu kimyasal yapı analizleri. **(A)** HDAC inhibitörlerinin genel kimyasal yapısı. **(B)** Rutin'in kimyasal yapısı. Elektronegatifliği yüksek olan hidroksi oksasiklik grubu (daire içerisinde). **(C)** Riboflavin'in kimyasal yapısı. Elektronegatifliği yüksek olan fosfat grubu (daire içerisinde). **(D)** Cilastatin'in kimyasal yapısı. Elektronegatifliği yüksek ve HDAC6 inhibisyon aktivitesinin

spesifikliğine katkıda bulunan amino-2-karboksietil sülfanil grupları (daire içerisinde).

4.2. *In vitro* HDAC6 İnhibisyon Aktivitesinin Florometrik Yöntemle Analizi

In silico analizlerle HDAC6 enzimini inhibe edebilecek aday bileşikler rutin, riboflavin ve cilastatin olarak belirlenmiş olup bu bileşiklerin aktiviteleri *in vitro* olarak analiz edilmiştir. Analizler, HDAC6 enzim inhibisyonunun florometrik olarak takibini sağlayan bir kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz kiti, insan rekombinant HDAC6 enziminin, asetilli lizin yan zinciri içeren florometrik bir substrat üzerine etki göstermesi ve deasetilasyon nedeniyle substratın, developer'a duyarlı hale gelmesiyle florofor ışımaya başlaması prensibine dayanmaktadır. Rutin, riboflavin ve cilastatin'in HDAC6 inhibisyon aktiviteleri 10 µM, 100 µM ve 1000 µM konsantrasyonlarda araştırılmış ve spesifik HDAC6 inhibitörü olan tubastatin A ile karşılaştırılmıştır. Analizler sonucunda HDAC6 enzim aktivitesini;

- 10 µM konsantrasyonda uygulanan tubastatin A'nın %39, riboflavin'in %5 ve rutin'in %7,
- 100 µM konsantrasyonda uygulanan tubastatin A'nın %45, riboflavin'in %57, rutin'in %42,
- 1000 µM konsantrasyonda uygulanan tubastatin A'nın %55, riboflavin'in %86, rutin'in %87 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.
- Cilastatin araştırılan hiç bir konsantrasyonda inhibisyon aktivitesi göstermemiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. *In vitro* HDAC6 inhibisyon aktivitesi analiz sonuçları. Rutin ve riboflavin'in HDAC6 inhibisyon aktivitesi olduğu saptanmıştır.

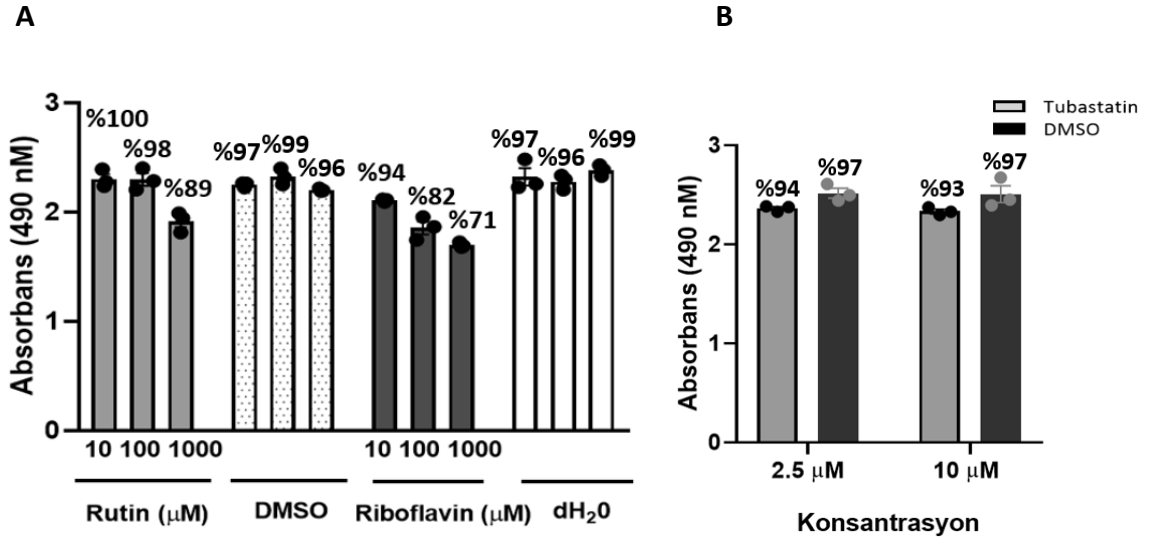
Analizler sonucunda, rutin ve riboflavinin benzer inhibisyon aktivitesine sahip oldukları ve konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibisyon aktivitesinin arttığı saptanmış, ancak cilastatin'in araştırılan konsantrasyonlarda HDAC6 enzimini inhibe etmediği gösterilmiştir (Şekil 4.5.). Bu nedenle cilastatin çalışma kümesinden çıkartılarak sonraki çalışmalara rutin ve riboflavin bileşikleriyle devam edilmiştir.

4.3. Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin MTS Yöntemi ile Analizi

In vitro aktivite analizleri ile rutin ve riboflavin'in HDAC6 inhibisyon aktivitesi olduğunun gösterilmesi üzerine bu bileşiklerle hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında yer alan ilaç yeniden konumlandırma yaklaşımının nörodejeneratif hastalıklara yönelik olması nedeniyle, hücre kültürü çalışmalarında motor nöron benzeri bir hücre hattı olan fare NSC34 hücreleri kullanılmıştır. Bileşik uygulama çalışmalarına canlılık analizleriyle başlanmış, bileşiklerin hücre canlılığı üzerine etkisi MTS yöntemi ile araştırılmıştır. Kolorimetrik bir analiz yöntemi olan MTS, metabolik olarak aktif hücrelerde NAD(P)H'ye bağımlı dehidrojenaz enzimleri tarafından indirgenme reaksiyonu sonucu oluşan formazan bileşiğinin 490 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

MTS analizi için NSC34 hücreleri, serumu azaltılmış kültür ortamında 3 gün süreyle farklılaştırılarak motor nöron benzeri karakter kazandırılmış, ardından hücrelere 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonlarda rutin ve riboflavin 24 saat süreyle uygulanmıştır. Eş zamanlı olarak hücrelere bileşiklerin çözücülerini olan DMSO ve dH₂O eşit hacimde olacak şekilde uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M rutin uygulanan hücrelerdeki canlılık oranları sırasıyla; %100, %98 ve %89 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6.A). Aynı konsantrasyonlarda uygulanan riboflavin'in ise canlılık oranları sırasıyla %94, %82 ve %71 olarak saptanmıştır. MTS analizleri ile rutin uygulanan hücrelerdeki canlılık oranlarının riboflavin uygulanan hücrelere göre yüksek olduğu saptanmış olmakla birlikte, her iki bileşik uygulaması sonrasında hücrelerin canlılıklarını büyük oranda koruduğu gösterilmiştir.

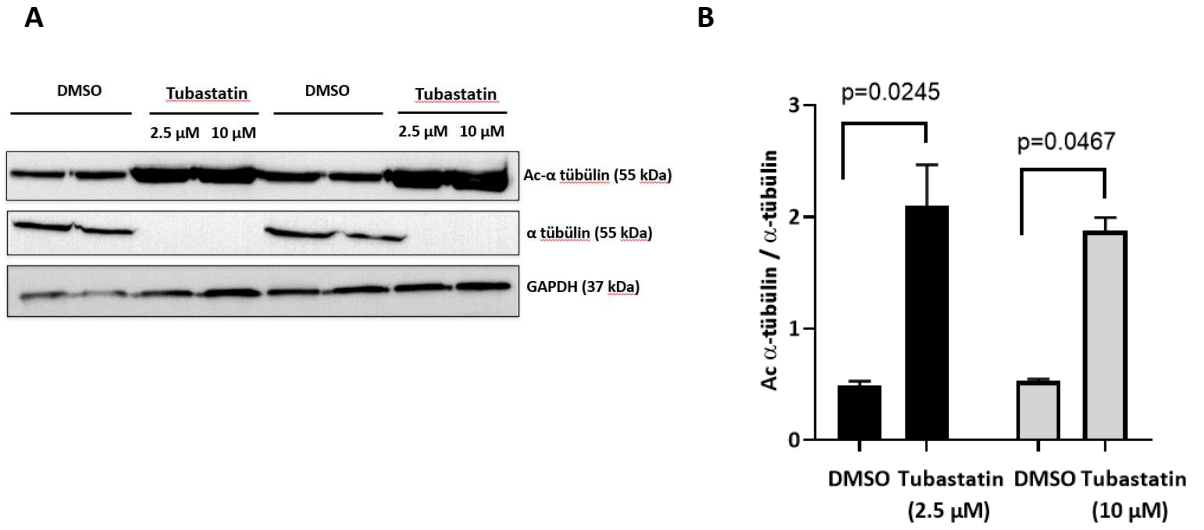
Eş zamanlı olarak NSC34 hücrelerine, asetilasyon araştırmalarında kontrol olarak kullanılacak olması nedeniyle spesifik HDAC6 inhibitörü olan tubastatin A'da uygulanmıştır. Tubastatin A, HDAC6 inhibisyonu sağladığı bilinen konsantrasyonlar olan 2.5 μ M ve 10 μ M'da uygulanmış ve bu konsantrasyonlarda NSC34 hücrelerinin canlılığını etkilemediği saptanmıştır (Şekil 4.6.B).



Şekil 4.6. Hücre canlılık analizi sonuçları. Farklı konsantrasyonlarda **(A)** rutin, riboflavin ve **(B)** tubastatin A uygulanan NSC34 hücrelerinde canlılık oranlarını gösteren sonuçlar. Bileşik uygulamaları sonrasında hücre canlılıklarının korunduğu saptanmıştır. \pm SEM. Tubastatin grafiğindeki DMSO'ların üzerine de yüzde yazalım.

4.4. Tubastatin A'nın NSC34 hücrelerinde α -Tübülün Proteinlerinin Asetilasyon Düzeyine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi

NSC34 hücrelerinde α -tübülün asetilasyonunun bileşik uygulaması yoluyla arttırılabildiğinin gösterilmesi amacıyla, kontrol olarak, spesifik HDAC6 inhibitörü olan tubastatin A hücrelere uygulanmıştır. Bu amaçla, 72 saat farklılaştırılan NSC34 hücrelerine 2.5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda tubastatin A, çözücüsü olan DMSO ile birlikte 4 saat süreyle uygulanmış, inkübasyon süresinin sonunda hücrelerden protein izole edilmiş ve α -tübülün asetilasyonu düzeyi Western blot ile araştırılmıştır. 2.5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda uygulanan Tubastatin A'nın NSC34 hücrelerinde α -tübülün asetilasyonunu kontrole göre sırası ile 4.29 ve 3.53 kat arttırdığı saptanmış olup artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.7).



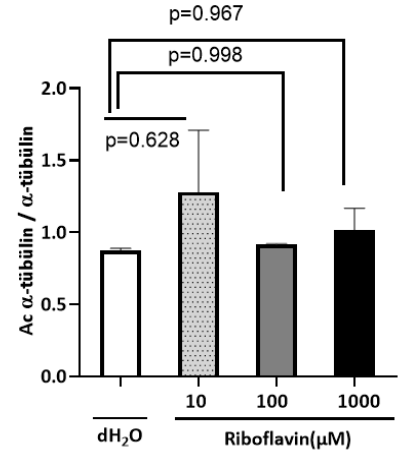
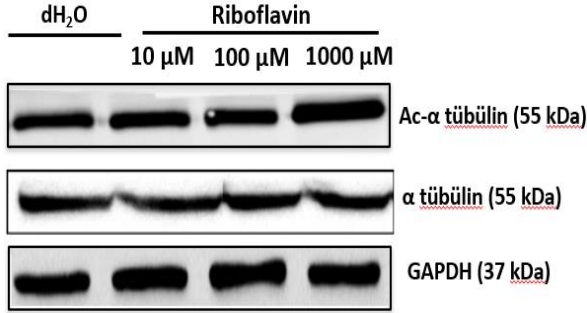
Şekil 4.7. Tubastatin A'nın NSC34 hücrelerinde α -tübülin asetilasyonu düzeyine etkisi **(A)** Örnek Western blot görüntüleri, **(B)** analiz sonuçlarını gösteren grafik. Tubastatin A'nın 2.5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda α -tübülin asetilasyonunu sırasıyla 4.29 ve 3.53 kat arttırdığı saptanmıştır. n=2 tekrar. Two-way ANOVA, *p<0.05, Ac: asetil. Veri \pm SEM.

4.5. Riboflavin'in NSC34 hücrelerinde α -Tübülin Proteinlerinin Asetilasyon Düzeyine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi

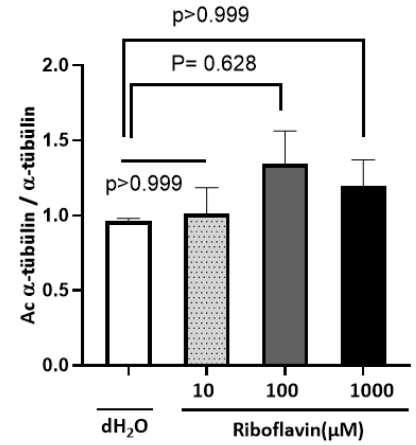
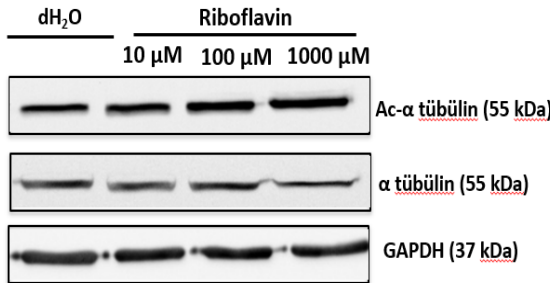
Tubastatin A uygulaması ile NSC34 hücrelerinde α -tübülin asetilasyonunun arttırılabildiğinin gösterilmesinden sonra, hücrelere riboflavin uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Farklılaştırılmış NSC34 hücrelerine 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonlarda riboflavin, çözücüsü olan dH₂O ile birlikte, 12 ve 24 saat süreyle uygulanmış, inkübasyon sürelerinin bitiminde hücreler toplanarak protein izolasyonları ve Western blot çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Western blot sonuçları, riboflavin uygulanan hücrelerdeki α -tübülin miktarının GAPDH'e göre değişmediğini göstermiş, bu nedenle riboflavine bağlı olarak asetilenmiş α -tübülin düzeyindeki değişiklikler, hücrelerdeki toplam α -tübülin düzeyine göre normalize edilerek değerlendirilmiştir.

Western blot çalışmaları sonucunda, farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulanan riboflavinin NSC34 hücrelerinde α -tübülin asetilasyonunu arttırmadığı saptanmıştır (Şekil 4.8).

A



B



Şekil 4.8. Riboflavin'in NSC34 hücrelerinde α -tübülin asetilasyonu düzeyine etkisi.

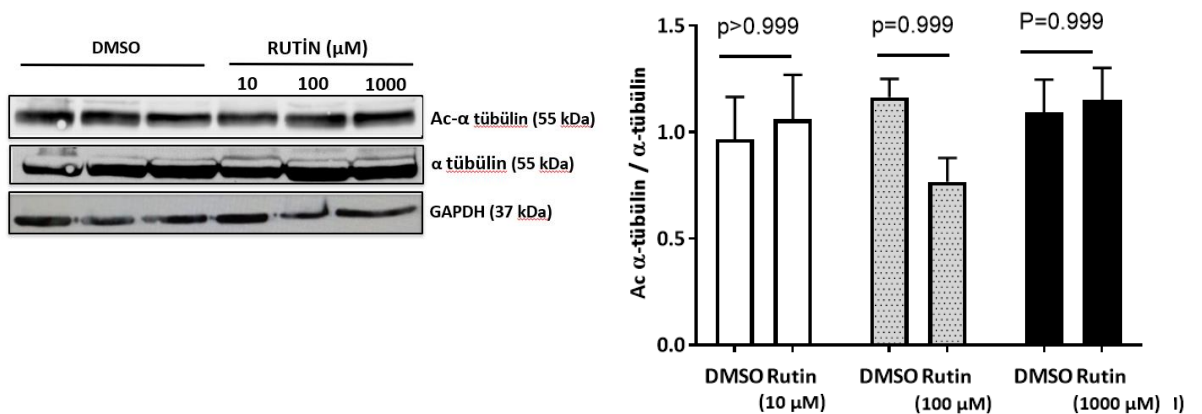
(A) 12 saat riboflavin uygulamasına ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçları. (B) 24 saat riboflavin uygulamasına ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçları. Riboflavin uygulamaları ile α -tübülin asetilasyonunda artış saptanmamıştır. n=2 tekrar. Two-way ANOVA, Ac: asetil. Veri \pm SEM.

4.6. Rutin'in NSC34 hücrelerinde α -Tübülin Proteinlerinin Asetilasyon Düzeyine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi

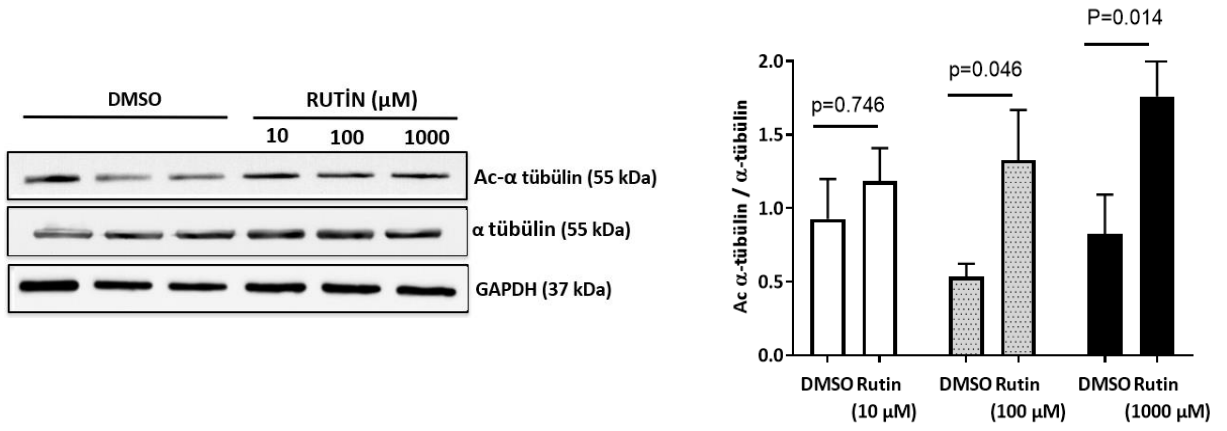
Bileşik uygulama çalışmalarına rutin ile devam edilmiş ve 72 saat farklılaşmış NSC34 hücrelerine 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonlarda rutin, çözücüsü olan DMSO ile birlikte 12 ve 24 saat süreyle uygulanmıştır. İnkübasyon sürelerinin bitiminde hücrelerden protein izole edilmiş ve Western blot çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Rutin uygulamasının α -tübülin miktarını etkilemediği gösterilmiş, rutin uygulanan hücrelerdeki asetilenmiş α -tübülin düzeyindeki değişiklikler toplam α -tübüline göre normalize edilerek değerlendirilmiştir.

Western blot çalışmaları sonucunda, 12 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda uygulanan rutin'in hücrelerde α -tübülin asetilasyonunu arttırmadığı saptanmıştır (Şekil 4.9.A). Ancak 24 saat süreyle 100 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonlarda uygulanan rutin'in NSC34 hücrelerinde α -tübülin asetilasyonunu kontrole göre sırası ile 2.5 ve 2.13 kat arttırdığı saptanmış olup artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.9.B).

A



B



Şekil 4.9. Rutin'in NSC34 hücrelerinde α -tübülün asetilasyonu düzeyine etkisi. **(A)** 12 saat rutin uygulamasına ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçları. **(B)** 24 saat rutin uygulamasına ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçları. 100 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonlarda 24 saat uygulanan rutin'in α -tübülün asetilasyonunu sırasıyla 2.5 ve 2.13 kat arttırdığı saptanmıştır. n=3 tekrar. Two-way ANOVA, Ac: asetil. Veri \pm SEM.

5.TARTIŞMA

De nova ilaç keşfi yaklaşımında öncü molekülün tanımlanmasından ilacın piyasaya çıkmasına kadar 10-15 yıllık bir süre gerekmekte olup yeni ilaç geliştirme başarısı % 6'dan az olmaktadır. Bu nedenle, hastalıklar için gerekli tedavi ihtiyacının sağlanması amacıyla, başarı oranı daha yüksek olan ve hızlı ilaç geliştirilebilmesine olanak sağlayan yeniden konumlandırma yaklaşımının kullanımı hız kazanmıştır. Bu yaklaşım, henüz tedavileri bulunmayan ve görülme sıklığı giderek artan nörodejeneratif hastalıklar için uygulanmakta; nörodejeneratif hastalık tiplerine spesifik hataların (ör; Alzheimer hastalığında amiloid beta plakları) ya da bu hastalık grubunda ortak olarak saptanan değişikliklerin (ör; inflammasyon, oksidatif stres) düzeltilmesine yönelik olarak farklı bileşiklerin etkileri araştırılmaktadır.

Aksonal transport hataları, nörodejeneratif hastalıklarda ortak olarak saptanan moleküler değişikliklerden biridir. Aksonal transport ile, aksonların uçlarındaki büyüme bölgelerine ya da hücre gövdesine doğru iki yönlü olacak şekilde çeşitli proteinler (ör; hücre iskeleti proteinleri, membran proteinleri, nörotransmitterler), RNA'lar (ör; beta aktin mRNA), lipitler ve organeller (ör; mitokondri, lizozom) taşınmakta; bu sayede nöronların birbirleriyle/kas hücreleri ile etkileşimi ve sinaptik iletim sağlanmaktadır (64). Aksonal transportun hatalı gerçekleşmesi, protein birikimlerine, enerji ve kalsiyum metabolizmasında hatalara, aksonal morfolojinin ve sinaptik iletiminin bozulmasına yol açmaktadır. Aksonal transport hataları farklı nedenlerle ortaya çıkabilmektedir. Örneğin; kinezin/dinein motor proteinlerinin mutasyonlar nedeniyle kargo veya mikrotübül ile bağlantılarının bozulması, mitokondri/lizozom trafiğini etkileyecek genlerdeki mutasyonlar, hücre iskeleti proteinlerinde hiperfosforilasyon ve birikimler (ör; nörofilament, TAU), tübülün genlerindeki mutasyonlar, mikrotübül stabilitesinin kontrolünde görevli proteinlerde ifade/post-translasyonel modifikasyon değişiklikleri transport hatalarına neden olabilmektedir.

Mikrotübül aracılı olarak gerçekleşen aksonal transportta, mikrotübüller kinesin ve dinein motor proteinlerinin kargoları taşıyacağı yollar oluşturmaktadır. Mikrotübüllerin yapısını oluşturan tübülün proteinleri post-translasyonel olarak modifiye edilmekte olup bu modifikasyonlar, mikrotübül ile ilişkili proteinlerin bağlanmasını düzenlemekte, böylece mikrotübül stabilitesinin korunmasını sağlamaktadır. α -tübülün proteinlerinde 40. lizin amino asitinden gerçekleşen asetilasyon, aksonal mikrotübüller gibi stabil ve uzun ömürlü mikrotübüllerde fazla oranda görülmektedir. Farklı nörodejeneratif hastalıklara ait model sistemlerin kullanıldığı çalışmalarda, α -tübülün asetilasyonunun azaldığı gösterilmiş olup, asetilasyon artırılarak aksonal transport hatalarının düzeltilebildiği rapor edilmiştir. α -tübülün asetilasyonu, deasetilasyonu katalizleyen HDAC6 enziminin ifade düzeyinin ya da aktivitesinin azaltılması yoluyla artırılabilen, bu nedenle HDAC6 ilaç hedefi olarak düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, ilaç yeniden konumlandırma yaklaşımı kullanılarak FDA tarafından onaylı bileşikler arasından HDAC6 aktivitesini azaltarak α -tübülün asetilasyonunu arttıracak bir bileşiğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez öncesi dönemde yürütülen moleküler kenetleme çalışmalarında, FDA onaylı ilaç kütüphanesinde bulunan 7 bileşiğin, HDAC6 enzime yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği bulunmuştur. Bu bileşikler; 5-O-phosphono-alpha-D-ribofuranosyl diphosphate, riboflavin, rutin, hesperidin, cilastatin, dopexamine ve sorbitol olup tez kapsamında ilk olarak bu bileşiklerde detaylı *in silico* analizler gerçekleştirilmiştir. Bileşikler, farklı algoritmalara sahip iki moleküler kenetleme programı olan AutoDock ve SwissDock kullanılarak HDAC6 enzimi ile kenetlenmiş; 7 bileşik arasından rutin, riboflavin, cilastatin ve hesperidin'in kenetleme skorlarının birbirine yakınlığı göz önünde tutularak kenetleme sonrası analizler gerçekleştirilmiş, HDAC6'nın aktif merkezi ile kurulan bağlantılar *Discovery Studio* ve *Pymol* programları kullanılarak incelenmiştir. HDAC6'ya yüksek bağlanma afinitesi gösteren bu 4 bileşik ile kemoinformatik analizler gerçekleştirilmiş, bileşiklerin membran geçirgenliklerini gösteren partiyon katsayıları ve potansiyel biyolojik hedefleri incelenmiştir. Partiyon katsayılarına göre bileşikler incelendiğinde, rutin

hariç diğer bileşiklerin yardımcı maddeler olmaksızın membran geçirgenliklerinin düşük olduğu görülmüştür. Bileşiklerin olası protein hedefleri ve *in vitro*'da neden oldukları transkriptomik değişiklikler incelendiğinde, HDAC6 ile ilişkili bir veri bulunamamış, ancak hesperidin hariç diğer bileşiklerin histon asetilasyonu/deasetilasyonu, tübülün asetilasyonu/deasetilasyonu veya mikrotübül ile ilişkili olası protein hedeflerinin olduğu görülmüştür. Rutin, riboflavin ve cilastatin'in α -tübülün asetilasyonu üzerindeki olası etkilerinin yanında başka hedef genleri/proteinleri etkileyerek de mikrotübül stabilitesini arttırabileceği ve aksonal transport hatalarını düzeltebileceği düşünülmüş; bu doğrultuda hesperidin çalışma kümesinden çıkartılarak, rutin, riboflavin ve cilastatin ile çalışmalara devam edilmiştir. Bileşiklerin yapıları, bilinen HDAC inhibitörleri ile karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, HDAC6 inhibisyonu sağlayabilecek gruplara sahip oldukları saptanmış, bu nedenle bu bileşiklerin inhibisyon aktiviteleri *in vitro* olarak analiz edilmiştir. Rekombinant HDAC6 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen florometrik analizlerde, cilastatin'in inhibisyon aktivitesinin bulunmadığı saptanmıştır. Riboflavin'in 1000 μ M konsantrasyonda HDAC6 aktivitesini %86, rutin'in ise %87 oranında inhibe edebildiği saptanmıştır. *In vitro* inhibisyon aktivitesi çalışmaları ile çalışma kümesinin iki bileşiğe indirgenmesinin ardından, çalışmalara rutin ve riboflavin ile devam edilmiş, bileşikler nöron benzeri NSC34 hücre hattına uygulanarak hücre canlılığına etkileri MTS yöntemi ile araştırılmıştır. Rutin uygulanan hücrelerdeki canlılık oranları riboflavin uygulanan hücrelere göre yüksek bulunmakla birlikte bileşik uygulamaları sonucu hücrelerin canlılıklarını büyük oranda koruduğu gösterilmiş, çalışmalara bileşiklerin α -tübülün asetilasyonuna etkilerinin araştırılması ile devam edilmiştir. Bileşikler hücrelere üç farklı konsantrasyonda (10, 100 ve 1000 μ M) ve iki farklı sürede (12 ve 24 saat) uygulandıktan sonra α -tübülün asetilasyonu düzeyleri Western blot ile araştırılmış; riboflavin uygulanan hücrelerde α -tübülün asetilasyonunda anlamlı bir artış saptanmazken, rutin'in 100 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda 24 saat uygulanması sonucu α -tübülün asetilasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır.

Rutin ve riboflavin ile gerçekleştirilen *in silico* çalışmalarda yakın kenetleme skorları elde edilmiş, *in vitro* inhibisyon aktivitesi analizinde her iki bileşiğin rekombinant HDAC6 aktivitesini benzer düzeylerde inhibe ettiği gösterilmiştir. Moleküler kenetleme çalışmaları HDAC6'nın tübülün deasetilaz aktivitesine sahip olan ikinci katalitik domaine (DD2) ait kristal yapı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup aktif bölgenin merkezinde çinko (Zn^{+2}) katyonu bulunmaktadır. Bu katyon, çevresinde bulunan histidin ve aspartik asit amino asitleri ile üç koordinasyon bağı kurmakta olup dördüncü bağ substrat ile kurulmakta ve katalitik işlev gerçekleşmektedir. Dolayısıyla substratın bağlanma yerine giren bileşiğin, Zn^{+2} ile dördüncü koordinasyonu oluşturması enzimin inhibisyonunda kilit rolü oynamaktadır (65). *In silico* analizlerde rutin'in substratın yerine geçtiği, 651. histidin amino asitinin Zn^{+2} ile etkileşimi sonucu metal kompleksin oluştuğu saptanmış, ancak riboflavinde bu etkileşim gözlenmemiştir. Ayrıca, Zn^{+2} ile koordinasyon kuran diğer amino asitlerle etkileşimin de enzim inhibisyonu açısından önemli olduğu bilinmektedir (66). Katalitik domainde temel rol oynan Zn^{+2} koordinasyonunda görev alan diğer amino asitler olan 782. tirozin, 619. glisin ve 611. histidin, aktif merkezde rutin'in etkileşimde olduğu bölgelerde yer alırken, riboflavinin etkileştiği bölgelerde bu amino asitler yer almamaktadır. Riboflavin, HDAC6'nın aktif merkezindeki Zn^{+2} ile etkileşmemesine ve etkileştiği bölgede inhibisyon açısından önemli amino asitlerin bulunmamasına rağmen *in silico* analizlerde yüksek kenetleme skoru vermiş, *in vitro* çalışmalarda da HDAC6 enzimi aktivitesini inhibe etmiştir. Bu durumun, riboflavin'in aktif merkezin girişindeki amino asitlerle etkileşerek substratın aktif merkeze bağlanmasına engel olacak bir sterik engel oluşturmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

In silico ve *in vitro* çalışmalarda HDAC6 inhibisyon aktivitesi olduğu gösterilen rutin ve riboflavin NSC34 hücrelerine uygulandığında sadece rutin'in α -tübülün asetilasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Bu bulgu, rutin'in hücre içinde doğal konformasyonunda bulunan HDAC6'nın aktivitesini inhibe edebildiğini göstermiş, ancak riboflavin etkisiz bulunmuştur. Rutin ve riboflavin'in partiyon katsayıları incelendiğinde, riboflavin'in partiyon katsayısının rutin'e göre düşük olduğu

saptanmıştır. Bu nedenle, riboflavin'in düşük hücre membranı geçirgenliği nedeniyle inhibisyon aktivitesi gösterememiş olabileceği düşünülmüştür.

HDAC6 hücrelerdeki temel tübülün deasetilaz enzimi olmakla birlikte, sınıf III HDAC'lardan olan SIRT2 perinükleer mikrotübüllerin deasetilasyonunu katalizleyebilmektedir. Ayrıca, HDAC6 ile SIRT2'nin kompleks oluşturarak deasetilasyonu katalizlediği bildirilmiştir (67). Tez öncesi dönemde gerçekleştirilen moleküler kenetleme çalışmalarında rutin'in SIRT2'ye bağlanma afinitesi yüksek bulunmuş, ancak riboflavin'in bağlanma potansiyeli olmadığı saptanmıştır (yayınlanmamış veri). Bu nedenle, rutin uygulaması ile α -tübülün asetilasyonunda saptanan artışta, HDAC6 inhibisyonunun yanı sıra SIRT2 inhibisyonunun da rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, rutin'in etki mekanizmasının aydınlatılması açısından ilerleyen çalışmalarda SIRT2 inhibisyonunun *in vitro* olarak araştırılması önemli görülmektedir.

Nörodejeneratif hastalıklar, kompleks patofizyolojiye sahip olmaları nedeniyle tek bir hücresel mekanizmasının düzeltilmesi yoluyla hastalıkların tedavisi mümkün görünmemektedir. HDAC6, nörodejenerasyon ile ilişkili birden fazla mekanizmada görev alması nedeniyle potansiyel bir tedavi hedefidir. HDAC6'nın, α -tübülün dışında, aktine bağlanan proteinlerden cortactin'in, şaperon proteinlerinden Hsp90'ın ve hidrojen peroksit indigenmesinde görevli peroksiredoksin 1 ve 2'nin deasetilasyonunu katalizlediği, bu nedenle, aktin dinamiğinin düzenlenmesi, protein katlanması ve redoks metabolizmasında görev aldığı bildirilmiştir (68,69). Alzheimer modeli olarak fare hipokampal hücre hattının kullanıldığı bir çalışmada, amiloid beta ile indüklenen mitokondri transport hatası HDAC6 inhibisyonu ile düzeltilebilmiş, saptanan etki peroksiredoksin 1 asetilasyonundaki artışa bağlı olarak azalan reaktif oksijen bileşikleri ve kalsiyum seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (70). Ayrıca, HDAC6'nin, ubikuitin zincirlerine bağlanarak protein agregatlarının yıkımında görev aldığı ve mikrotübül stabilitesinin kontrolünde görevli TAU proteini ile interaksiyona girerek asetilasyonunu, fosforilasyonunu ve mikrotübül ile ilişkisini düzenlediği bilinmektedir (71). Dolayısıyla HDAC6 inhibisyonuyla aksonal transport hataları düzeltilebildiği gibi, nörodejeneratif hastalıklarda görülen oksidatif stres ve

TAU fosforilasyonu da azaltılabilmekte, TAU birikimi engellenebilmektedir. Bu nedenle, HDAC6 aktivitesini spesifik olarak inhibe eden bileşikler geliştirilmekte/tanımlanmakta olup prelinik çalışmalarda sıklıkla, bilinen en iyi HDAC6 inhibitörü olan tubacin kullanılmakla birlikte bu bileşik, üretiminin zor olması ve lipofilik özelliği nedeniyle klinik kullanım için uygun değildir. Klinik faz çalışmaları aşamasında olan 5 adet HDAC6 inhibitörü bulunmakta olup sadece bir tanesi nörodejeneratif hastalıklardan Huntington hastalığının tedavisine yöneliktir (72). Bu nedenle HDAC6 aktivitesini inhibe edebilecek ve klinik olarak kullanıma uygun bileşiklerin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez kapsamında HDAC6 inhibisyon aktivitesi araştırılan bileşiklerden rutin, rutosid olarak da bilinmekte olup, flavonoid sınıfında yer alan bir küçük moleküldür (73). Rutin'in, merkezi sinir sisteminde antikonvulsan, antidepresan ve nöroprotektif etkileri bildirilmiştir. Amiloid beta enjekte edilen Alzheimer sıçan modelinde, rutin'in MAP kinaz yolağını aktive ettiği, hipokampüste ERK1, CREB ve BDNF gen ifadelerini arttırdığı ve hafızanın geri kazanımı üzerine olumlu etkileri rapor edilmiştir (74). Alzheimer tipi sporadik demans ile ilgili olarak gerçekleştirilen bir çalışmada ise, sıçan modelinde rutin'in, glial fibriler asidik protein, interlökin-8, siklooksijenaz-2, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve nükleer faktör-kB'nin ifadesini azaltarak hipokampüsteki morfolojik değişiklikleri önlediği bildirilmiştir (75). Bu tez çalışması ile rutin'in HDAC6 inhibisyon aktivitesinin bulunduğu ve α -tübülün asetilasyonunu arttırabildiği ilk kez gösterilmiştir. Rutin'in diğer HDAC enzimleri üzerindeki etkileri bilinmemekte olup ileriki çalışmalarda araştırılması, rutin'in HDAC6 spesifikliğinin belirlenmesi, ayrıca rutine bağlı gen ifade değişikliklerine ait mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca tez kapsamında gerçekleştirilen kemoinformatik analizler, rutin'in olası biyolojik hedefleri arasında TAU'nun ve mikrotübül pozitif uç proteinlerinin bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla rutin'in HDAC6 inhibisyonunun yanı sıra TAU proteini/mikrotübül uç proteinlerini etkileyerek de aksonal transport hatalarını düzeltici etki gösterebileceği düşünülmüştür. Sonraki çalışmalarda, rutin'in etkisinin, aksonal transport hatası

bulunan nörodejeneratif hastalıklara ait hücre kültürü modellerinde araştırılması, tedavi potansiyelinin değerlendirilebilmesi açısından kıymetli olacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Moleküler kenetleme çalışmaları Autodock Vina ve SwissDock programları ile gerçekleştirilmiş olup tez çalışması öncesinde belirlenen 7 aday bileşik hedef protein olan HDAC6'ya kenetlenmiştir. Elde edilen kenetleme skorları, tez çalışması öncesinde Glide-Schrodinger programı kullanılarak gerçekleştirilen ön tarama sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş, rutin, riboflavin, cilastatin ve hesperidin bileşikleri için birbirleri ile uyumlu ve yüksek bağlanma enerjisi skorları elde edilmiştir. Bu nedenle, bu 4 bileşik ile *in silico* analizlere devam edilmiştir. Kenetleme çalışmaları sonrasında *Discovery studio* ile gerçekleştirilen analizler sonucunda sadece rutin' in, HDAC6'nın aktif merkezinde bulunan Zn^{+2} ve Zn^{+2} koordinasyonu için gerekli olan amino asitler ile direkt olarak etkileştiği saptanmıştır.
- *In silico* çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen kemoinformatik analizlerde, rutin, riboflavin ve cilastatin'in histon asetilasyonu/deasetilasyonu, tübülün asetilasyonu/deasetilasyonu veya mikrotübül ile ilişkili olası protein hedefleri bulunduğu belirlenmiş ancak hesperidin'in bu fonksiyonlara sahip bir hedefi saptanmamıştır. Bileşiklerin α -tübülün asetilasyonuna etkilerinin yanında başka hedef genleri/proteinleri etkileyerek de aksonal transport hatalarını düzeltebileceği düşünülmüş, bu doğrultuda hesperidin çalışma kümesinden çıkartılmıştır.
- Bileşiklerin iki boyutlu kimyasal yapıları bilinen HDAC inhibitörleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Yapılan incelemelerde rutin'in yapısında yer alan hidroksi siklik grupların, riboflavin'in yapısında yer alan fosfat grubunun ve cilastatin'in yapısında yer alan tiyozol gruplarının elektronegatifliklerinin yüksek olması nedeniyle Zn^{+2} bağlama bölgesi için uygun kimyasal gruplar arasında yer

aldığı saptanmıştır. Ayrıca HDAC6 enziminin spesifik inhibisyonunda rolü olan tiyazol grubunun, cilastatinin yapısında bulunduğu belirlenmiştir.

- *In silico* çalışmalar ile rutin, riboflavin ve cilastatin *in vitro* çalışmalara değer görülmüş ve HDAC6 inhibisyon aktiviteleri analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda 10, 100 ve 1000 μM konsantrasyonlarda uygulanan cilastatin'in HDAC6 enzimini inhibe etmediği saptanmıştır. Ancak aynı konsantrasyonlarda uygulanan rutin ve riboflavin'in benzer inhibisyon aktivitesine sahip olduğu ve konsantrasyon artışına paralel bir şekilde HDAC6 aktivitesini inhibe ettikleri gösterilmiştir. Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarına rutin ve riboflavin bileşikleri ile devam edilmiştir.
- Hücre kültürü çalışmalarında motor nöron benzeri NSC34 hücre hattı kullanılmış ve *in vitro* analizlerde HDAC6 inhibisyonu saptanan 10, 100 ve 1000 μM konsantrasyonlarda rutin ve riboflavinin hücre canlılığına etkisi MTS yöntemi ile araştırılmıştır. Farklılaştırılmış NSC34 hücrelerine belirtilen konsantrasyonlarda 24 saat süreyle rutin/riboflavin uygulandığında, rutin uygulanan hücrelerdeki canlılık oranlarının riboflavin uygulanan hücrelere göre yüksek olduğu görülmekle birlikte, her iki bileşik uygulaması sonrasında hücrelerin canlılıklarını büyük oranda koruduğu saptanmıştır.
- Western blot çalışmaları sonucunda 10, 100 ve 1000 μM konsantrasyonlarda 12 ve 24 saat süreyle uygulanan riboflavin'in NSC34 hücrelerinde α -tübülin asetilasyonunu arttırmadığı saptanmıştır. Aynı konsantrasyon ve sürelerde hücrelere rutin uygulanmış, 24 saat süreyle 100 ve 1000 μM konsantrasyonlarda uygulanan rutin'in NSC34 hücrelerinde α -tübülin asetilasyonunu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı saptanmıştır.

6.2. Öneriler

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda aşağıdaki çalışmaların yapılması önerilmektedir.

- Nörodejeneratif hastalıkların patomekanizmasında ortak bir bulgu olarak α -tübülün asetilasyonunun azaldığı bilinmektedir. Bu nedenle rutin'in, farklı nörodejeneratif hastalıklara ait *in vitro* modellerde α -tübülün asetilasyon düzeyini arttırıcı etkisinin araştırılması önerimizdir.
- Nörodejeneratif hastalıklarda, azalan α -tübülün asetilasyonu ile bağlantılı olarak aksonal transport hataları görülmektedir. Hastalıklara ait *in vitro* modellerde rutin uygulaması ile α -tübülün asetilasyonunun arttırılabilmesi durumunda, artışın aksonal transportu düzeltici etkisinin araştırılması önerimizdir. Rutin'in α -tübülün asetilasyonu ve aksonal transport üzerine etkisinin hastalara ait indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden farklılaştırılan nöronlarda gösterilmesinin, tedavi potansiyellerinin değerlendirilmesi açısından değerli olacağı düşünülmektedir.
- HDAC ailesi, sınıf I, II ve III enzimlerini içermekte olup bu tez çalışmasında rutin'in, sınıf II enzimlerden biri olan HDAC6'yı inhibe edebildiği gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarla, rutin'in diğer HDAC sınıfı enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkisinin araştırılması, saptanan etkinin HDAC6'ya özgüllüğünün değerlendirilebilmesi açısından önerimizdir.
- Sınıf III HDAC'lardan biri olan SIRT2'nin, α -tübülün deasetilaz aktivitesi olduğu bilinmektedir. Rutin uygulaması ile α -tübülün'de saptanan asetilasyon artışının SIRT2 inhibisyonu nedeniyle de gerçekleşmesi muhtemeldir. Sonraki çalışmalarla rutin'in SIRT2 inhibisyon aktivitesinin *in vitro* olarak gösterilmesi önerimizdir.

7. KAYNAKLAR

1. Fetro C, Scherman D. Drug repurposing in rare diseases: Myths and reality, 2020; 75(2):157–60.
2. Talevi A. Drug repositioning: Current approaches and their implications in the precision medicine era. *Expert Rev Precis Med Drug Dev*, 2018;3(1):49–61.
3. Walker N. Accelerating drug development through repurposing, repositioning and rescue. *Pharm Outsourcing*. 2017;18(7):1–5.
4. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. Vol. 18, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2018. p. 41–58.
5. Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, Gupta V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discovery Today*. 2019.
6. Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature*. 2016;534(7607):314–6.
7. Köhler O, E. Benros M, Nordentoft M, Farkouh ME, Iyengar RL, Mors O, et al. Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Psychiatry*. 2014;71(12):1381–91.
8. Ebada ME. Drug repurposing may generate novel approaches to treating depression. *J Pharm Pharmacol*. 2017;69(11):1428–36.
9. Pillaiyar T, Meenakshisundaram S, Manickam M, Sankaranarayanan M. A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: Recent advances and challenges in drug discovery. *Eur J Med Chem*, 2020;195:112275.
10. Guedes IA, de Magalhães CS, Dardenne LE. Receptor-ligand molecular docking. *Biophys Rev*. 2014;6(1):75–87.
11. Gilson MK, Zhou HX. Calculation of protein-ligand binding affinities. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2007;36:21–42.
12. Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape

of bioactive molecules. *Bioinformatics*. 2013;29(23):3073–9.

13. Halperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins Struct Funct Genet*. 2002;47(4):409–43.

14. Lo YC, Rensi SE, Torng W, Altman RB. Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. *Drug Discov Today*. 2018;23(8):1538-1546.

15. Mendez D, Gaulton A, Bento AP, Chambers J, De Veij M, Félix E, Magariños MP, Mosquera JF, Mutowo P, Nowotka M, Gordillo-Marañón M, Hunter F, Junco L, Mugumbate G, Rodriguez-Lopez M, Atkinson F, Bosc N, Radoux CJ, Segura-Cabrera A, Hersey A, Leach AR. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D930-D940.

16. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W357-W364.

17. Stathias V, Turner J, Koleti A, Vidovic D, Cooper D, Fazel-Najafabadi M, Pilarczyk M, Terryn R, Chung C, Umeano A, Clarke DJB, Lachmann A, Evangelista JE, Ma'ayan A, Medvedovic M, Schürer SC. LINCS Data Portal 2.0: next generation access point for perturbation-response signatures. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jan 8;48(D1):D431-D439.

18. Ken Youens-Clark, Ben Faga, Immanuel V. Yap, Lincoln Stein, Doreen Ware, CMap 1.01: a comparative mapping application for the Internet, *Bioinformatics*. 2009, 3040–3042.

19. Durães F, Pinto M, Sousa E. Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. Vol. 11, Pharmaceuticals. MDPI AG; 2018.

20. Durães F, Pinto M, Sousa E. Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. Vol. 11, Pharmaceuticals. MDPI AG; 2018.

21. Hassan M, Raza H, Abbasi MA, Moustafa AA, Seo SY. The exploration of novel Alzheimer's therapeutic agents from the pool of FDA approved medicines using drug repositioning, enzyme inhibition and kinetic

mechanism approaches. *Biomed Pharmacother.* 2019;109(November 2018):2513–26

22. Hayes CD, Dey D, Palavicini JP, Wang H, Patkar KA, Minond D, et al. Striking reduction of amyloid plaque burden in an Alzheimer's mouse model after chronic administration of carmustine. *BMC Med.* 2013;11(1):1–22.

23. Orsucci, D., Calsolaro, V., Mancuso, M., & Siciliano, G. (2009). Neuroprotective effects of tetracyclines: molecular targets, animal models and human disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(3), 222–231.

24. González-Lizárraga F, Socías SB, Ávila CL, Torres-Bugeau CM, Barbosa LRS, Binolfi A, et al. Repurposing doxycycline for synucleinopathies: Remodelling of α -synuclein oligomers towards non-toxic parallel beta-sheet structured species. *Sci Rep.* 2017;7(September 2016):1–13.

25. Imamura K, Izumi Y, Banno H, Uozumi R, Morita S, Egawa N, et al. Induced pluripotent stem cell-based Drug Repurposing for Amyotrophic lateral sclerosis Medicine (iDReAM) study: Protocol for a phase i dose escalation study of bosutinib for amyotrophic lateral sclerosis patients. *BMJ Open.* 2019;9(12).

26. Martinez A, Palomo Ruiz M del V, Perez DI, Gil C. Drugs in clinical development for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2017;26(4):403–14.

27. Sleight JN, Rossor AM, Fellows AD, Tosolini AP, Schiavo G. Axonal transport and neurological disease. *Nat Rev Neurol* ,2019;15(12):691–703.

28. Chevalier-Larsen E, Holzbaur EL. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov-Dec;1762(11-12):1094-108. Epub 2006 Apr 19. PMID: 16730956.

29. Bora G, Koyunoğlu D, Sunguroğlu M, Yurter HE. Microtubule structure, organization and defects: Spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Turkiye Klin J Med Sci.* 2019;39(2):221–30.

30. Dráber P, Sulimenko V, Dráberová E. Cytoskeleton in mast cell

signaling. *Front Immunol*, 2012.00130. PMID: 22654883; PMCID: PMC3360219.

31. Matov A, Applegate K, Kumar P, Thoma C, Krek W, Danuser G, et al. Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker. *Nat Methods*. 2010;7(9):761–8.

32. Akhmanova A, Hoogenraad CC. Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr Biol*, 2015;25(4):R162–71.

33. Janke C, Magiera MM. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* , 2020;21(6):307–26.

34. Westermann S, Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(12):938–47.

35. Janke C, Montagnac G. Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Curr Biol* , 2017;27(23):R1287–92.

36. Szyk A, Deaconescu AM, Spector J, Goodman B, Valenstein ML, Ziolkowska NE, et al. Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell*, 2014;157(6):1405–15.

37. Park SY, Kim JS. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med* , 2020;52(2):204–12.

38. Boyault C, Sadoul K, Pabion M, Khochbin S. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*. 2007;26(37):5468–76.

39. Skoge RH, Ziegler M. SIRT2 inactivation reveals a subset of hyperacetylated perinuclear microtubules inaccessible to HDAC6. *J Cell Sci*. 2016;129(15):2972–82.

40. Lin S, Sterling N, Junker I, Smith GM. Effects of HDAC5 and aTAT1 expression on axon regeneration in adult neurons. *Mol Biol Cell*, 2016;27(25):5371.

41. Boyault C, Sadoul K, Pabion M, Khochbin S. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and

ubiquitination. Vol. 26, *Oncogene*. 2007. p. 5468–76.

42. Li Y, Shin D, Kwon SH. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS J*. 2013;280(3):775–93.

43. Park SY, Kim JS. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med*, 2020;52(2):204–12.

44. Boyault C, Sadoul K, Pabion M, Khochbin S. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*. 2007;26(37):5468–76.

45. Asthana J, Kapoor S, Mohan R, Panda D. Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells. *J Biol Chem*. 2013;288(31):22516–26.

46. Li G, Jiang H, Chang M, Xie H, Hu L. HDAC6 α -tubulin deacetylase: A potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*, 2011;304(1–2):1–8.

47. Perlson E, Maday S, Fu Meng, Moughamian AJ, Holzbaur ELF. Retrograde axonal transport: Pathways to cell death? *Trends in Neurosciences*. 2010.

48. Sleight JN, Rossor AM, Fellows AD, Tosolini AP, Schiavo G. Axonal transport and neurological disease. *Nat Rev Neurol*, 2019;15(12):691–703.

49. Publication F, The OF. Intelligent Transport Systems in South East Europe. 2014;39–71.

50. Sleight JN, Rossor AM, Fellows AD, Tosolini AP, Schiavo G. Axonal transport and neurological disease. *Nat Rev Neurol*, 2019;15(12):691–703.

51. Franker MAM, Hoogenraad CC. Microtubule-based transport - basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *J Cell Sci*. 2013;126(11):2319–29.

52. Balabanian L, Berger CL, Hendricks AG. Acetylated Microtubules Are Preferentially Bundled Leading to Enhanced Kinesin-1 Motility. *Biophys J*, 2017;113(7):1551–60.

53. Monroy BY, Sawyer DL, Ackermann BE, Borden MM, Tan TC, Ori-Mckenney KM. Competition between microtubule-associated proteins directs motor transport. *Nat Commun* , 2018;9(1):1–12.

54. Govindarajan N, Rao P, Burkhardt S, Sananbenesi F, Schlüter OM, Bradke F, et al. Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer’s disease. *EMBO Mol Med*. 2013;5(1):52–63.

55. Ding H, Dolan PJ, Johnson GVW. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem*. 2008;106(5):2119–30.

56. Kim C, Choi H, Jung ES, Lee W, Oh S, Jeon NL, et al. HDAC6 inhibitor blocks amyloid beta-induced impairment of mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One*. 2012 Aug 22;7(8).

57. Godena VK, Brookes-Hocking N, Moller A, Shaw G, Oswald M, Sancho RM, et al. Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. *Nat Commun*. 2014;5.

58. Benoy V, Vanden Berghe P, Jarpe M, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Development of Improved HDAC6 Inhibitors as Pharmacological Therapy for Axonal Charcot–Marie–Tooth Disease. *Neurotherapeutics*. 2017 Apr 1;14(2):417–28.

59. D’Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, Van Damme P, Irobi J, Kozikowski AP, et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med*. 2011;17(8):968–74.

60. Guo W, Naujock M, Fumagalli L, Vandoorne T, Baatsen P, Boon R, et al. HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nat Commun* , 2017;8(1):1–14.

61. Guo W, Naujock M, Fumagalli L, Vandoorne T, Baatsen P, Boon R, et al. HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nat Commun* , 2017;8(1):1–14.

62. Taes I, Timmers M, Hersmus N, Bento-Abreu A, Van Den Bosch L, Van Damme P, et al. Hdac6 deletion delays disease progression in the sod1g93a mouse model of ALS. *Hum Mol Genet*, 2013;22(9):1783–90.

63. Dios AM, Babu S, Granucci EJ, Mueller KA, Mills AN, Alshikho MJ, et al. Class I and II histone deacetylase expression is not altered in human amyotrophic lateral sclerosis: Neuropathological and positron emission tomography molecular neuroimaging evidence. *Muscle and Nerve*, 2019;60(4):443–52.

64. Millecamps S, Julien JP. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(3):161–76.

65. Simões-Pires C, Zwick V, Nurisso A, Schenker E, Carrupt PA, Cuendet M. HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: What makes it different from the other HDACs? *Mol Neurodegener*. 2013;8(1).

66. Uba AI, Yelekçi K. Carboxylic acid derivatives display potential selectivity for human histone deacetylase 6: Structure-based virtual screening, molecular docking and dynamics simulation studies. *Comput Biol Chem [Internet]*. 2018;75:131–42.

67. Zou H, Wu Y, Navre M, Sang BC. Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(1):45–50

68. Vaughan EE, Geiger CR, Miller AM, Loh-Marley PL, Suzuki T, Miyata N, et al. Microtubule acetylation through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency. *Mol Ther*. 2008;16(11):1841–7.

69. Noack M, Leyk J, Richter-Landsberg C. HDAC6 inhibition results in tau acetylation and modulates tau phosphorylation and degradation in oligodendrocytes. *Glia*. 2014;62(4):535–47

70. Choi H, Kim HJ, Kim J, Kim S, Yang J, Lee W, et al. Increased acetylation of Peroxiredoxin1 by HDAC6 inhibition leads to recovery of A β -induced impaired axonal transport. *Mol Neurodegener*. 2017;12(1):23.

71. Yan J, Seibenhener ML, Calderilla-Barbosa L, Diaz-Meco MT,

Moscat J, Jiang J, Wooten MW, Wooten MC. SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PLoS One*. 2013 Sep 27;8(9):e76016.

72. Shen S, Kozikowski AP. A patent review of histone deacetylase 6 inhibitors in neurodegenerative diseases (2014-2019). *Expert Opin Ther Pat*. 2019 Dec 25;1–16.

73. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J*. 2017;25(2):149–64.

74. Song HL, Zhang X, Wang WZ, Liu RH, Zhao K, Liu MY, et al. Neuroprotective mechanisms of rutin for spinal cord injury through anti-oxidation and anti-inflammation and inhibition of p38 mitogen activated protein kinase pathway. *Neural Regen Res*. 2018;13(1):128–34.

75. Javed H, Khan MM, Ahmad A, Vaibhav K, Ahmad ME, Khan A, et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience*. 2012;210:340–52.