

Histonların Asetilasyonu ve Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Acetylation of Histones and Histone Deacetylase Inhibitors: Review

Kaan KÜÇÜKOĞLU^a

^aFarmasötik Kimya AD,
Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Erzurum

Geliş Tarihi/Received: 04.11.2013

Kabul Tarihi/Accepted: 06.01.2014

Yazışma Adresi/Correspondence:

Kaan KÜÇÜKOĞLU
Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Kimya AD, Erzurum,
TÜRKİYE/TURKEY
kucukogluk35@hotmail.com

ÖZET Kromatin ve DNA modifikasyonları ile transkripsiyonel düzeydeki gen ifadesinin kontrolü sağlanmaktadır. Histon yapılarındaki amino kuyruklarında oluşan çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar vasıtasıyla birçok biyolojik olay kontrol edilmektedir. Kimyasal kromatin modifikasyonlarının en önemlilerinden biri histon asetilasyonudur. Asetilasyon ile histonların amino ucunda bulunan lizin aminoasitlerine asetil grubu takılmakta ve elektrostatik yükü değişen histonun DNA'ya ilgisi azalmaktadır. Bu asetilasyon, diğer proteinler için bağlanma bölgeleri oluşturarak protein-protein bağlantılarına olanak sağlamaktadır. Histon asetilasyonunun, lizin aminoasidinin pozitif yükünü nötralize ederek DNA'ya ilgisini azalttığı, böylece transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını kolaylaştırdığı ve transkripsiyonu aktive ettiği bilinmektedir. Histonların asetilasyon durumu, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri arasındaki dinamik/geri dönüşebilir bir denge ile belirlenmektedir. HDAC enzimleri önemli hücrel olayları etkilemeleri nedeni ile potansiyel ilaçların hedefi olmuş ve bu enzimleri inhibe edebilen bileşikler tanımlanmıştır. HDAC inhibitörleri olarak adlandırılan bu bileşikler, söz konusu enzimlerin aktif bölgelerine bağlanırlar, böylece histonlar asetile formda kalır ve gen ifadeleri değişir. HDAC inhibitörleri hücre bölünmesi, apoptoz ve farklılaşma gibi temel hücrel süreçler üzerinde etkiye sahip olup, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere araştırılmaktadır. HDAC inhibitörleri başta kanser olmak üzere, spinal kaslar atrofi, Alzheimer hastalığı, diyabet, psikiyatrik hastalıklar ve paraziter enfeksiyonlar gibi değişik hastalık gruplarının tedavilerine yönelik çalışmalarda ön plana çıkmıştır. Bu bileşiklerin pan-HDAC inhibisyon aktivitelerinin araştırılmasının yanı sıra son yıllarda, tek bir HDAC enzimine etkili inhibitörlerin geliştirilmesi hedeflenmiş; böylece hem etkinliğin artırılması hem de diğer HDAC enzimlerinin inhibisyonu ile ortaya çıkan toksik etkilerin azaltılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, özellikle son yıllarda yayımlanmış makaleler incelenmiş ve HDAC enzimleri, inhibitörleri, inhibitörlerin mekanizmaları, kullanım alanları ve kimyasal yapıları ile ilgili bilgiler derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: HDAC enzimleri; HDAC inhibitörleri; histon; asetilasyon

ABSTRACT The control of gene expression at the transcriptional level is provided via the modifications of chromatin and DNA. Many biological processes are controlled by a variety of posttranslational modifications formed in amino tails of histone structures. One of the most important chemical modifications of chromatin is histone acetylation. During acetylation process, an acetyl group is attached to the lysine amino acids in the amino terminal of the histones, through which the affinity of histone to DNA decreases as a result of the change in its electrostatic charge. This acetylation allows protein-protein links by creating binding sites for other proteins. Histone acetylation, by neutralizing the positive charge of the lysine amino acid and decreased the interest for DNA, thus it is known that binding of transcription factors to DNA facilitate and transcription activates. Acetylation state of histones, is determined with a dynamic/recyclable balance in histone acetyl transferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) enzyme families. Since HDAC enzymes affect significant cellular processes, they have become targets for potential drugs and compounds that inhibit these enzymes have been defined. These compounds called HDAC inhibitors bind to the active sites of these enzymes so histones remain acetylated forms and change gene expression. HDAC inhibitors have control over basic cellular processes, such as proliferation, apoptosis and differentiation and they have been investigated for using in treating various diseases. HDAC inhibitors came to the fore for the studies in treatment of various disease groups particularly in cancer such as spinal muscular atrophy, Alzheimer's disease, diabetes, psychiatric disorders and parasitic infections. Recently, besides the investigation of pan-HDAC inhibition activities of these compounds; developing inhibitors that target a single HDAC isoform, intend to develop for both increasing the efficiency and also decreasing the toxic effect resulting from inhibition of many isoforms. In this study, scientific journals which have been published in recent years especially has been examined and informations about HDAC enzymes, inhibitors, their mechanisms, using areas, and chemical structures have been reviewed.

Key Words: HDAC enzymes; HDAC inhibitors; histone; acetylation

HİSTONLARIN POSTTRANSLASYONEL MODİFİKASYONLARI

Histonlar, ökaryotik hücrelerde, DNA ile iyonik bağ yapmak suretiyle birleşerek nükleozom yapısını oluşturan basit bazik karakterde proteinlerdir.^{1,2} Her histon yapısal etki alanı ve yapısal olmayan terminal amino kuyruğundan oluşmaktadır.² Nükleozomları çevreleyen boşluğa doğru uzanan bu amino kuyrukları asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar için uygun bir yöredir.³ Modifikasyonlar sonucu histonların elektrostatik yükünün etkilendiği, bu sayede kromatin yapısının değiştiği ve protein kompleksleri için tanıma bölgesi oluştuğu düşünülmektedir. Sonuçta histon-DNA ve histon-histon ilişkisi etkilenebilir, DNA paketlenmesi, replikasyonu, onarımı ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olay kontrol edilebilmektedir. Modifikasyonlar tek başlarına veya farklı kombinasyonlarda bulunarak kromatine bazı anlamlar yükleyebilir veya bu anlamları değiştirebilir.⁴⁻⁷

İnsan genomundaki protein kodlayan genlerin hepsi aynı zamanda fonksiyonel değildir. Genlerin bazıları gelişim sürecinin belli dönemlerinde aktif olarak çalışırken, diğer dönemlerinde aktif değildir. Bir genin ifade edilebilmesi için kromatin yapısının gevşemesi ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanması gerekmektedir. Gen ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi, kromatinin yeniden modellenmesi ve histon modifikasyonları ile sağlanmaktadır.⁸

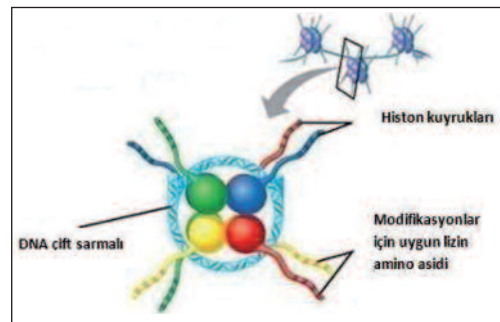
DNA nükleotid dizisindeki bir değişimden kaynaklanmayan, ancak fenotipte meydana gelen kalıtılabilir değişiklikler epigenetik değişimler olarak adlandırılmaktadır. Posttranslasyonel histon modifikasyonları kromatinin epigenetik düzenleyicileridir. Bu modifikasyonlar histon-histon ve histon-DNA arasındaki etkileşimlerde rol alarak kromatin yapısını değiştirmektedir. Özgül histon modifikasyonları, genomun transkripsiyonel olarak aktif ökromatin ve transkripsiyonel olarak sessiz heterokromatin bölgelerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır.^{9,10} Histon proteinlerinin amino ucu kuyrukları nükleozom dışına doğru uzanmakta ve protein-protein etkileşimine, dolayısıyla histon modifikasyonlarına olanak sağlamaktadır (Şekil 1).¹¹

Histon modifikasyonları, nükleozom yapısının dışında kalan histon kuyruklarına (amino terminal uçları) asetil, metil ve fosfor gruplarının eklenmesiyle gerçekleşmektedir. Bugüne kadar histon asetilasyonu ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış; histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin asetilasyon olaylarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir.^{12,13}

HAT enzimleri, histon kuyruklarında bulunan lizin aminoasitlerine negatif yüklü asetil grubu ekleyerek histon ve DNA etkileşimini azaltmaktadır. Transkripsiyonel koaktivatör olarak fonksiyon gören HAT enzimleri, transkripsiyon aşamasında RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını ve gen aktivasyonunu sağlamaktadır. HDAC enzimleri ise asetil gruplarını çıkartarak kromatin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Korepresör olarak fonksiyon gören HDAC enzimleri transkripsiyonu baskılamaktadır. Gen ekspresyonunun açılmasında ve baskılanmasında en önemli rolü bu iki enzim oynamaktadır. Asetilasyonun bu iki enzim tarafından düzenlenmesi ile belli bir hücre tipine özgü gen ekspresyonu ve hücrenin kaderine karar verilmesi epigenetik kontrolün merkezini oluşturmaktadır.¹⁴

HİSTONLARIN ASETİLASYONU

Negatif yüklü asetil grubunun amino kuyruk bölgesine bağlanmasıyla pozitif yüklü lizin aminoasidi yükünü kısmen kaybetmekte, kromatinde gevşeme meydana gelmekte, transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotör bölgelerine ulaşmaları kolaylaşmakta ve bu sayede transkripsiyon gerçekleşmektedir. Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleş-



ŞEKİL 1: Histon proteinleri amino ucu kuyrukları ve kor nükleozom yapısı.¹¹ (Renkli hali için Bkz.

<http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/eczacilik-bilimleri-dergisi/2146-944X/>)

şen bir olaydır. Lizin aminoasidinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondanse olmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır.⁵

Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olduğunu gösterirken, deasetile olması transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir. Histon asetilasyonu transkripsiyonel düzenlenmenin yanında epigenetik kalıtım ve DNA replikasyonu gibi biyolojik olaylarda da görev almaktadır.^{4,15} Histon kuyruklarında asetile edilecek olan lizinin yakınındaki aminoasit dizisinin, asetilasyon enzimlerinin özgül bağlanmasında rolü vardır. Asetilasyon her zaman aynı aminoasitlerden gerçekleştirilmektedir. Örneğin; H3 özellikle 9, 14, 18 ve 23., H4 ise 5, 8, 12 ve 16. pozisyonlardaki lizine aminoasitlerinden asetillenmektedir.^{4,16}

HAT ve HDAC enzimleri, histon olmayan proteinleri asetilleyerek veya asetil gruplarını uzaklaştırarak hücrede önemli etkilerde bulunmaktadır. Protein kararlılığı, protein-protein etkileşimi, protein yerleşimleri, DNA'ya bağlanma yetenekleri bu etkiler arasındadır.¹⁷

HİSTON DEASETİLİZ ENZİM AİLESİ

HDAC enzimleri, histonların amino kuyruklarındaki lizine aminoasitlerinden ve histon olmayan proteinlerden asetil gruplarını çıkartan enzimlerdir. Histonların deasetilasyonu kromatinin kondanse olmasını, böylece gen ifadesinin baskılanmasını sağlarken, histon olmayan proteinlerin deasetilasyonu DNA replikasyonu, hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesinde görevlidir (Şekil 2).¹⁸⁻²⁰

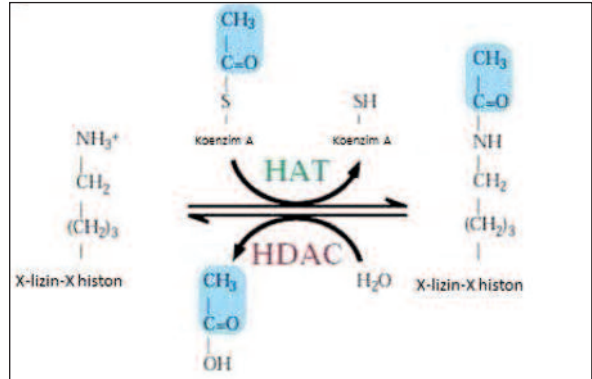
HAT ve HDAC arasındaki denge; hücrelerin gen regülasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. HAT aktivitesinde azalma veya HDAC aktivitesinde artış olması hücrelerin malign dönüşümünde rol oynamaktadır. Örneğin; retinoik reseptör- α (RAR α) ile promyelotik lösemi zincir (PLZF) veya promyelotik lösemi protein (PML) arasındaki kromozomal translokasyon akut promyelotik lösemi (APL)'ye neden olur. Bu kanserlerde HDAC enzimlerinin düzelmesiyle hastalıkta iyileşme gözlemlenmektedir.²¹

Bugüne kadar tanımlanmış 18 adet insan HDAC enzimi vardır. Bunlar, dizi benzerlikleri ve kofaktör

bağımlılıklarına göre I, IIa, IIb, III, IV olmak üzere beş sınıf altında incelenmektedir (Şekil 3).^{22,23}

I. SINIF HİSTON DEASETİLİZ ENZİMLERİ

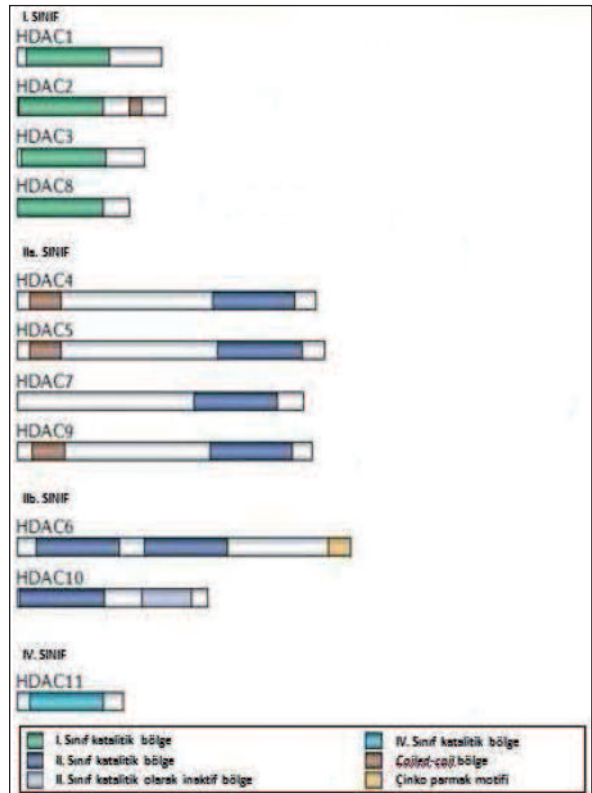
Maya Rpd3-a proteini ile homolog olan HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8 enzimleri bu sınıf içerisinde yer almaktadır. Bu enzimlerin moleküler



ŞEKİL 2: Histon proteini amino ucunda bulunan lizine aminoasidinin asetilasyonu ve deasetilasyonu.¹⁸

(Renkli hal için Bkz.

<http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/eczacilik-bilimleri-dergisi/2146-944X/>)



ŞEKİL 3: HDAC sınıflandırılmasının şematik gösterimi.²³

(Renkli hal için Bkz.

<http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/eczacilik-bilimleri-dergisi/2146-944X/>)

ağırlıkları 22-55 kDa'dur ve katalitik bölgeleri homoloji göstermektedir. Enzimatik aktiviteleri çok yüksek olan bu grubun hücre sağkalımı ve çoğalmasında rol oynadığı gösterilmiştir.^{24,25} Örneğin; HDAC1'in p53 regülasyonunda görev aldığı, ayrıca MyoD ile kompleks oluşturarak miyoblastların bölünmesini baskıladığı, HDAC3'ün ise başka bir transkripsiyon faktörü olan TFII-1'in fonksiyonunu düzenlediği bilinmektedir.²⁶

Çekirdekte bulunan HDAC1 ve HDAC2 enzimleri çekirdek yerleşme sinyali (nuclear localization signal) içerirken, HDAC3 çekirdek-sitoplazma arasında geçiş yapabilmekte ve yapısında çekirdek dışına gönderim sinyali (nuclear export signal)'ni de bulundurmaktadır. Bu sınıftaki enzimlerin DNA'ya bağlanan proteinlerle kompleks yaparak promotörleri etkilemeleri nedeni ile gene özgül etki gösterebildikleri bildirilmiştir.^{8,9} HDAC8 ise kasa özgül olarak ifade edilmekte ve bugüne kadar herhangi bir proteinle kompleks oluşturduğu bilinmemektedir.^{22,27}

II. SINIF HİSTON DEASETİLİZ ENZİMLERİ

Maya Hda1 proteinine homoloji gösteren ve HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 ve HDAC10 enzimlerini kapsayan sınıftır. Bu grup enzimler, I. sınıf HDAC enzimlerine göre yapısal olarak daha büyük olup, moleküler ağırlıkları 120-130 kDa'dur. Dağılımlarının dokuya özgül olması ve çeşitli hücrel sinyallere göre çekirdek ve sitoplazma arasında gidip gelmeleri, hücrel gelişim ve farklılaşmada değişik görevleri olduğunu göstermektedir.²⁸⁻³⁰

I. sınıf HDAC enzimlerine yapısal olarak benzerlik gösteren bu sınıf iki alt sınıfa ayrılmaktadır. HDAC4, HDAC5, HDAC7 ve HDAC9 enzimleri IIa sınıfı içinde yer almakta ve bu enzimler dokuya özgül olarak ifade edilmektedir. Diğer HDAC sınıflarından farklı olarak ifade düzeyleri düşüktür. HDAC5 ve HDAC9'un yüksek miktarda kas, kalp ve beyinde, HDAC4'ün beyin ve iskeletin büyüme plağında, HDAC7'nin ise endotel hücreler ile lenfositlerde bulunduğu ifade edilmektedir.^{22,27} Ayrıca, HDAC4'ün sadece embriyonik dönemde eksprese olması ve HDAC ekspresyonlarının embriyonik gelişim süresince değişiklik göstermesi, bu enzimlerin embriyogenezin değişik evrelerinde görev aldığını

düşündürmektedir.²⁸ IIb sınıfı içinde ise HDAC6 ve HDAC10 enzimleri yer almaktadır. Bu iki enzim, iki adet katalitik bölge içerdiği için ayrı bir alt sınıf olarak değerlendirilmektedir. HDAC6, alışılmışın dışında bağımsız fonksiyon gösteren iki katalitik bölge ve bir karboksil ucu Zn⁺² bağlama bölgesi içermektedir.²² Öncelikli olarak sitoplazmada bulunmakla birlikte çekirdekte de gözlemlenmiştir. Sitoplazmik HDAC6, α -tübülünü deasetile etmekte ve mikrotübül stabilitesini değiştirmektedir. HDAC10'un da HDAC6 gibi iki katalitik bölgesi olmasına rağmen C terminal katalitik bölgesi işlevsel değildir.^{22,31,32}

I ve II. sınıf HDAC enzimleri DNA ve histonlara direkt olarak bağlanamazlar. Çoğunlukla büyük transkripsiyon faktör komplekslerinin bileşeni olarak bulunurlar. Farklı proteinlerle kompleks oluşturmaları, fonksiyonlarının da farklı olduğunu göstermektedir. Örneğin; HDAC4, HDAC5 ve HDAC7 MEF2'yi inhibe ederek kas hücre farklılaşmasını baskılamakta, HDAC6 yanlış katlanmış proteinlere karşı stres cevabının oluşturulmasında rol oynamakta, HDAC7 ise timusta T- hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde görev almaktadır.^{18,19,26,28}

III. SINIF HİSTON DEASETİLİZ ENZİMLERİ

NAD bağımlı-Sirtuin enzim ailesini kapsamakta ve maya Sir2 proteini ile homoloji göstermektedir. Sirtuinler I ve II. sınıf HDAC enzimleriyle homoloji göstermeyen 275 aminoasitlik korunmuş bir katalitik bölge içermektedir. I ve II. sınıf HDAC enzimlerinin yaklaşık 390 aminoasitlik korunmuş bir katalitik bölgeleri bulunmaktadır. Sir 2 ailesiyle yapılan araştırmalar, bu sınıfın üyelerinin primer substratlarının histonlar olmadığını göstermiştir.³³

IV. SINIF HİSTON DEASETİLİZ ENZİMLERİ

Bu grup içerisinde yer alan tek enzim HDAC11'dir. Yapısal olarak I. ve II. sınıf HDAC enzimlerinden farklıdır. Beyin, kalp, böbrek, kas ve testislerde varlığı bilinmekle birlikte fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır.^{22,27}

HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRLERİ

HDAC inhibitörleri, histon asetilasyonunu sağlayarak bazı genlerin ifadesini değiştirebilmekte, ay-

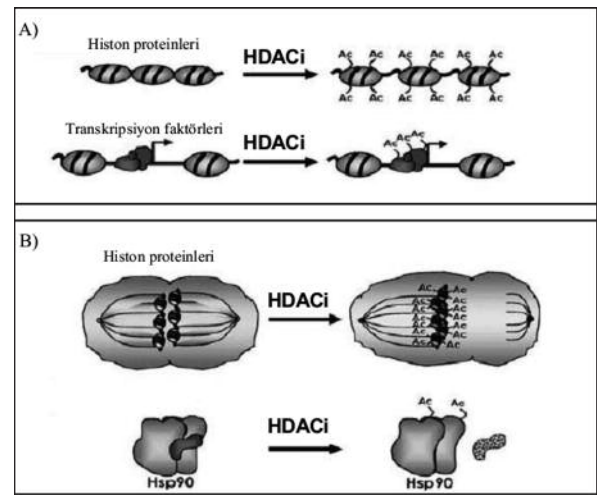
rıca transkripsiyon faktörleri ve tümör baskılayıcı proteinler gibi histon olmayan bazı proteinlerin asetilasyonunu arttırarak biyolojik aktiviteleri etkilemektedir. HDAC inhibitörleri uygulanarak histonların deasetilasyonu engellenmekte, histonlar asetilli halde kalmakta ve transkripsiyonun sürekliliği sağlanmaktadır.^{34,35}

Potansiyel ilaç hedefi olmaları nedeni ile, tıbbi açıdan önemli olan HDAC enzimlerini inhibe edebilen moleküller geliştirilmiştir. Bu moleküllere hidroksamatlar, siklik tetrapeptidler ve kısa zincirli yağ asitlerini örnek olarak verebiliriz.^{34,36,37}

HDAC inhibitörleri, birçok transforme ya da kanser hücre tipinde apoptozu ve diferensiyasyonu tetikleyerek hücre siklusunun G1 veya G2 fazında durmasına neden olur ve proliferasyonu inhibe ederler.³⁸ HDAC inhibitörlerinin antitümör aktivitesinde ilginç bir durum da, histon asetilasyonunun sadece belli genlerin transkripsiyonunu (ekspres edilmiş genlerin ~%2'si) aktive etmesi ve ekspresyonun tümör büyümesini inhibe etmesidir. En çok uyarılmış genlerden biri hücre siklusu kinaz inhibitörü olan p21^{WAF1} genidir.³⁹ HDAC inhibitörlerinin kullanılması sonucu p21 promotör bölgesindeki H3 ve H4 histonların asetilasyonu gerçekleşir ve p21 geninin ekspresyonu artar.^{40,41} Normal hücreler, DNA hasarı veya DNA tamir hataları gibi apoptotik sinyallere karşı duyarlıdır. HDAC inhibitörleri, kanserde bloke edilmiş veya suprese edilmiş apoptotik yolların tekrar kazanılmasını sağlayabilirler.⁴² HDAC inhibitörü uygulanan hücrelerde genlerin %2-5'inin ekspresyon düzeyi değişmektedir.³⁴ Bu değişikliğin nedenleri kesin olarak açıklanamamakla birlikte, histon veya transkripsiyon faktörü gibi histon olmayan proteinlerdeki asetilasyon artışından ve/veya asetilasyonun dolaylı etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. HDAC inhibitörleri, transkripsiyonel etkilerinin yanı sıra, kanser hücrelerinde hücre döngüsünün inaktif olan G2 kontrol noktasını aktif hale getirerek hücre bölünmesini durdurmakta ve apoptozu uyarmaktadır.^{43,44} Kanser hücrelerinin HDAC inhibitörleri tarafından indüklenen apoptozu karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (Şekil 4).^{35,45}

HDAC inhibitörleri ile yapılan *in vivo* çalışmalar, bu bileşiklerin tümör büyümesini ve metastazı önemli ölçüde azalttıklarını göstermiştir. Örneğin; kısa zincirli yağ asitlerinden bütirik asitler ve türevleri kolon ve prostat kanserleri ile endometriyal ve servikal karsinomlarda çalışılmış, bu maddelerin kanserli hastalarda hücre siklusunu etkileyerek bölünmeyi durdurduğu, farklılaşma ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir.³⁶

HDAC inhibitörlerinin çekici taraflarından biri, diğer terapötik yaklaşımları optimize etme yetenekleridir. HDAC inhibitörleri, kanser modellerindeki retinoik asitler, D vitamini analogları ve peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör gamma (PPAR- γ) ligandları gibi ilaçların etkisini artırabilirler.⁴⁶ HDAC inhibitörlerinin hücre ayrışması, hücre devir ilerlemesi, apoptozis, sitoskeletal modifikasyonlar ve anjiyogenezi içeren geniş çapta hücre fonksiyonları ayarlama yeteneği bulunmaktadır. Tümör proliferasyonunun bu anahtar bileşenlerini hedefleyerek, HDAC inhibitörlerinin sitostatik pazarda güçlü bir pozisyon elde etme potansiyelleri bulunmaktadır. Bu ilaç grubunun böyle anahtar bir rol oynamasının iki büyük nedeni, var-olan sitostatiklerin (retinoidler gibi) etkisini iyileştirme ve ayrıca kanser terapisine benzersiz terapötik pencereler açarak, hastalığa neden olan belirli genlerin transkripsiyonunu hedefleme yetenekleridir.^{47,48}



ŞEKİL 4: HDAC inhibitörlerinin etki mekanizması.²⁶

- A) Transkripsiyonel etki
- B) Transkripsiyonel olmayan etki

Mutasyon ve/veya çeşitli HDAC enzimlerinin anormal ekspresyonunun önemli bir terapötik hedef olduğu özellikle kanser ve diğer hastalıklarda gözlemlenmiştir. HDAC aktivitesi tümör fenotipinin kurulmasında kritik bir rol oynamaktadır.⁴⁹ Tablo 1 ekspresyon seviyesinde ve birkaç kanser tipinde HDAC enzimlerinin rolünü özetlemektedir.⁵⁰ Kanser hücreleri, lizin 16'da H4 asetilasyon kaybına uğramaktadır (Şekil 5).^{49,51}

Şimdiye kadar iki HDAC inhibitörü Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi [Food and Drug Administration (FDA)] tarafından kanser tedavisi (kutanöz T-hücreli lenfoma (CTCL) hastalarında) için onay almıştır. Bunlar; vorinostat (Suberoilanolithidrokamik asit; SAHA) ve romidepsindir (FK228).⁴⁹ Diğer HDAC inhibitörlerinin pek çoğu Faz I ve II klinik deneylerde test edilmektedir.^{52,53} HDAC inhibitörlerinin birçoğu enzim özgünlüğüne sahip olmadığı için bazı yan etkiler gösterebilmektedir. HDAC enzimleri bazı lösemilerde olduğu gibi fuzion proteinleriyle etkileşim yoluyla hedef genlerde anormal bir biçimde toplanabilmektedir.⁴⁹

HDAC inhibitörleri, farklı biyolojik fonksiyonları etkilemeleri nedeni ile epigenetik hastalıklar sınıfına girmeyen, spinal kaslar atrofi, Huntington hastalığı, diyabet ve paraziter enfeksiyonların araştırılmasında, epigenomda değişiklik

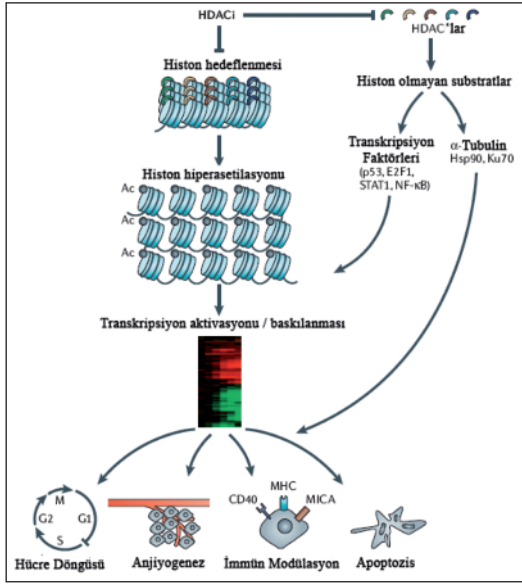
yaratmak amacıyla kullanılmaktadır.⁵⁴⁻⁵⁶ Örneğin; çocukluk çağının en sık görülen kalıtsal hastalıklarından spinal kaslar atrofi sorumlu olan "survival motor neuron (SMN)" geni üzerinde yapılan çalışmalarda, kısa zincirli yağ asidi grubuna giren HDAC inhibitörlerinin "splicing" hatasını düzelttiği ve fonksiyonel protein düzeyini arttırdığı bilinmektedir.⁵⁷⁻⁵⁹ Kalıtsal bir poliglutamin tekrar hastalığı olan Huntington'da ise transkripsiyon regülasyon bozukluğu olabileceği düşünülerek yapılan fare çalışmalarında, SAHA'nın kan beyin bariyerini geçerek beyinde histon asetilasyonunu arttırdığı ve fare beyinde görülen motor bozukluklarını düzelttiği gösterilmiştir.⁶⁰

HDAC inhibitörlerinin antiinflamatuar etkileri de *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda çalışılmakta, diyabet, astım ve romatizma gibi hastalıkların tedavisindeki etkinlikleri araştırılmaktadır.⁶¹ Diyabette görülen inflammatuar süreçte rol alan genlerin ifade düzeylerinin değişmesinde HAT aracılı asetilasyon mekanizmalarının etkisi olduğu gösterilmiştir. Diyabetli hastalar üzerinde genomik düzeyde gerçekleştirilen araştırmalarda diyabet ile HDAC genleri arasında bağlantı bulunmuştur. Bu bulgu, epigenetik faktörlerin bu hastalıkta rol aldığı görüşünü desteklemiş ve HDAC inhibitörleri diyabet tedavisinde ön plana çıkmıştır.⁶²

TABLO 1: HDAC enzimlerinin bazı kanserler üzerindeki rolleri.

Grup ekspresyonu	Tümörün rolü	Tümör
Sınıf I		
HDAC1	Akciğer ve meme kanserlerinde prognostik indikatör olabilir. Ayrıca prostat kanseri, gastrik ve kolorektal kanserlerde daha belirgindir	++
HDAC2	Kolorektal ve gastrik kanserlerde daha belirgindir. Ekspresyon süresince kolorektal kanserlerde HDAC2 verilmesi durumunda hücrelerde antijen kaybı olmaktadır	++
HDAC3	Akciğer kanseri ve birkaç solid tümörde daha belirgindir	++
HDAC8	Birkaç insan tümör hücresinde hücre gelişimi engeller	++
Sınıf IV		
HDAC11	Bilinmiyor	
Sınıf II		
HDAC4	Bilinmiyor	++
HDAC5	Kolon kanseri ve miyeloid lösemide düzenleyici	--
HDAC6	Meme kanserinde	
HDAC7	Bilinmiyor	
HDAC9	Bilinmiyor	
HDAC10	Bilinmiyor	

++ Tümör üzerinde daha belirgin olduğunu gösterir, -- Azaltılmış ekspresyonu gösterir.



ŞEKİL 5: HDAC inhibitörlerinin histon ve histon olmayan proteinler üzerindeki etkisi.⁵¹

(Renkli hali için Bkz.

http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/eczacilik-bilimleri-dergisi/2146-944X/)

HDAC enzimleri *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* ve *Leishmania* spp. gibi parazitlerin yaşam döngüsünde rol alan önemli düzenleyicilerdir. Bu nedenle HDAC inhibitörleri uyku hastalığı, sıtma ve layşmanya gibi parazitler hastalıklarının tedavisinde hedef moleküller olarak düşünülmektedir.^{63,64}

HDAC inhibitörleri nörolojik hastalıkların tedavisinde de yararlı olmaktadır. HDAC inhibitörü olan valproik asit (VAP), şizofreni ve bipolar düzensizlik için halen tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır.^{22,63} Nörodejeneratif hastalıklarda HDAC inhibitörleri iki farklı şekilde etki göstermektedir. Bunlardan birincisi spinal kaslar atrofisi ve andrenolökodistrofide olduğu gibi hastalık modifiye edici genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlamaktır. İkincisi ise iskemik felç, Huntington, Parkinson, Kennedy hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS)'da görülen histon asetilasyon dengesindeki düzensizliğin ortadan kaldırılmasıdır.³²

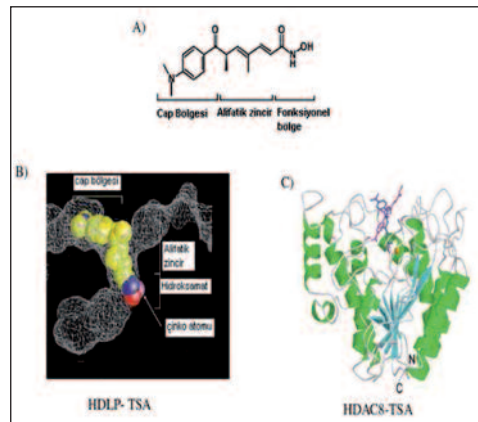
HDAC inhibitörlerinin histon asetilasyonunu artırarak öğrenme ve bellek fonksiyonlarında ilerleme sağladığı gösterilmiştir. Bu durum sinaptik esneklik kaybı ve bilinç bozukluğu ile seyreden Alzheimer hastalığında HDAC inhibitörleri ile tedaviyi gündeme getirmiştir.⁶⁵

HİSTON DEASETİLİZ VE İNHİBİTÖR ETKİLEŞİMİ

HDAC inhibitörleri yapısal olarak üç bölge içermektedir (Şekil 6A). Fonksiyonel bölge metal bağlayıcı kısım olup enzimin aktif bölgesine yani tüpün uç kısmına bağlanmakta, alifatik zincir enzim yapısındaki tüp boyunca uzanmakta, cap bölgesi ise yüzey tanımadan sorumlu olup tüpün giriş kısmı ile etkileşmektedir.^{23,66,67}

Bir memeli HDAC homologu olan ve *Aquifex aeolicus* bakterisinden elde edilen HDAC benzeri proteinin (Histone deacetylase-like protein; HDLP) kristal yapısının, trikostatın A (TSA) ve SAHA ile direkt olarak etkileştiği gösterilmiştir (Şekil 6.B).^{66,68,69} HDLP ile yapılan çalışmanın ardından insan HDAC8 enzimi hidroksamat grubu inhibitörler ile çalışılmış, böylece söz konusu enzimin kristal yapısı ortaya çıkartılarak katalitik bölgenin üç boyutlu yapısı gösterilmiştir (Şekil 6.C).⁶⁶ Her iki çalışmada da, katalitik bölgede bulunan çinko atomu ile inhibitörün doğrudan etkileştiği ve inhibisyonun gerçekleşmesi için çinko atomunun gerekliliği gösterilmiştir.^{66,68,69} HDLP ile TSA etkileşimi incelenerek, TSA'nın alifatik zincirinin tüp yapısı içerisine doğru uzandığı, hidroksamat grubunun ise aktif bölgedeki çinko ile etkileştiği gösterilmiştir (Şekil 7).^{23,66,67,70}

Kristal yapı düzeyinde açıklanabilen HDAC ve inhibitör etkileşimlerinden yararlanılarak diğer



ŞEKİL 6: HDAC ve inhibitör etkileşimi

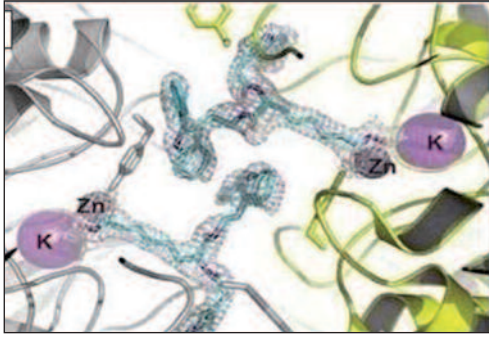
A) HDAC inhibitörlerinin temel yapısı²³

B) HDLP-TSA etkileşiminin üç boyutlu görüntüsü⁶⁸

C) HDAC8-TSA etkileşiminin üç boyutlu görüntüsü⁶⁶

(Renkli hali için Bkz.

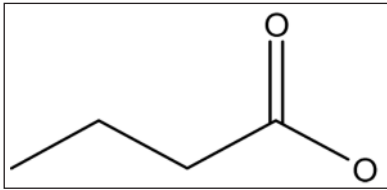
http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/eczacilik-bilimleri-dergisi/2146-944X/)



ŞEKİL 7: HDAC inhibitör bağlanma bölgesi.⁷⁰

(Renkli hali için Bkz.

<http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/eczacilik-bilimleri-dergisi/2146-944X/>)



ŞEKİL 8: Bütiratın kimyasal formülü.

HDAC enzimlerinin yapılarını aydınlatmaya yönelik araştırmalar devam etmektedir.⁵⁴

HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRLERİ

1. KISA ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİ

Bütirat

Bütirat diyetsel bir HDAC inhibitörüdür (Şekil 8). Kısa zincirli bir yağ asidi olup, diyetsel lifin barsakta mikrobiyal fermantasyonu ile türetilmiştir.^{40,71,72} Bütirat, özellikle hücre proliferasyonunun durdurulması ve gen ekspresyonunun seçici olarak değiştirilmesi yoluyla hücre farklılaşmasının uyarılması veya apoptozisin indüklenmesi sayesinde birçok sitoprotektif, kemoproventif ve kemoterapötik aktiviteyi ortaya çıkarmıştır.⁷³

Bütiratın farklı türevleri geliştirilmiştir. Bunlar, insan çalışmalarında ve hayvan modellerinde farklı kanserler, hemoglobinopati, kistik fibrozis ve Huntington hastalığını tedavi etmek için kullanılmaktadır.⁷⁴ Diğer taraftan, kardiyovasküler hastalıklarda bütiratın koruyucu rolünü göstermek amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Bütiratın vasküler düz kas hücreleri (VSMC)'nin proliferasyonunu durdurmasında çeşitli genlerin ekspresyo-

nunun değişmesinin rol oynadığı cDNA dizisi tarama çalışmalarında saptanmıştır.⁷³

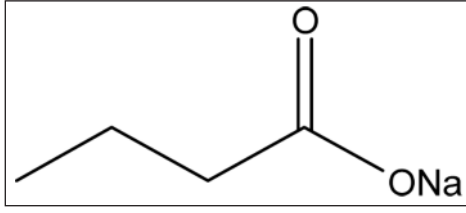
Farklı çalışmalarda lenfosit veya nötrofil apoptozisi üzerinde bütiratın etkileri gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 0,4 mM bütiratın nötrofil apoptozisini geciktirdiği görülmüştür.⁷⁵ Başka bir çalışmada ise 1 mM bütiratın nötrofil apoptozisini geciktirdiği belirlenirken, 5 mM bütiratın ise nötrofil apoptozisini indüklediği saptanmıştır.⁷⁶ Bu çalışmalar, konsantrasyona bağlı olarak bütiratın nötrofil apoptozisini geciktirebileceğini veya indükleyebileceğini akla getirmektedir. Ayrıca, bütiratın kaspaz-3 ekspresyonuyla nötrofil apoptozisini ve Bcl-2 ailesi proteinlerini indüklediği bildirilmiştir.⁷⁶ Ancak kaspazları aktive etmek için hassas sinyalizasyon yolu aydınlatılmamıştır.⁷³ Bütirat, periferel kan mono nükleer hücrelerinde nükleer faktör-κB aktivitesinin baskılanması ve çekal delme sonrası sıçanlarda yüksek değişken grup olan box-1'in inhibisyonu gibi birçok antiinflamatuvar etkiye rol oynamaktadır.⁷⁷ Buna ek olarak, bütiratın nükleer faktör-κB aktivitesini baskılaması; astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve akut solunum distres sendromu gibi solunum sistemi inflamasyonlarının düzelmesi üzerinde etkilidir.⁷⁸ Kan dolaşımında bütiratın normal konsantrasyonu çeşitli mikromolar seviyelerde olmasına rağmen bütiratın ön droğu olan tribütirinin oral olarak verilmesinden sonra insanlarda plazma bütirat konsantrasyonunun 0,45 mM arttığı gözlemlenmiştir. Bütiratın yüksek konsantrasyonu sadece barsakları değil, aynı zamanda çeşitli organları da etkilemektedir.⁷⁹

Kolon kanseri tedavisinde bütiratın mitokondriyal iç zar boşluğundan sitokrom c'nin salımına neden olduğu, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonunu sağlayarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir.⁸⁰

Ayrıca bütirat, sistemik inflamasyon boyunca nötrofil apoptozisinin inhibisyonu yoluyla organ hasarını düzeltmektedir. Kısa zincirli yağ asitlerinin mekanizmasını anlamada ve nötrofil apoptozisinde bu yağ asitlerinin etkilerini açıklamada bütiratın önemi büyüktür.⁴⁹

Sodyum Bütirat

Bütirik asidin sodyum tuzudur (Şekil 9). Kolonda diyetsel lifin bakteriyel metabolizmasından türe-



ŞEKİL 9: Sodyum bütiratın kimyasal yapısı.

tilmiştir. Dört karbonlu bir yağ asidi olup, mide-barsak yoluna yerleşmiş bakteriler de dâhil olmak üzere birçok organizmada bulunan doğal bir metabolittir. Hücre farklılaşması, proliferasyonu, motilitesi, hücre döngüsü indüksiyonunu durdurma, apoptozis ve hatta bellek oluşumu gibi epigenetik kontrollü bir dizi faaliyette rol oynamaktadır.⁸¹

Küresel gen ekspresyon profillerinin mikroarray deneylerinde, sığır böbrek epitelyum hücrelerinde 450'den fazla gen ekspresyonunun sodyum bütiratla düzenlendiği gösterilmiştir.⁸² Başka bir deneyde ise 10 000'in üzerinde genin, insan epitelyum hücrelerinde sodyum bütirat regülasyonuna duyarlı olduğu saptanmıştır.⁸³ Bütirat, histon deasetilasyon ve fosforilasyon inhibisyonu ile sitozin kalıntılarının hipermetilasyonu sayesinde DNA ve nükleer proteinler üzerinde denetleyici etki göstermektedir.⁸⁴ Son raporlar, histon asetilasyonu ve kromatin fonksiyonu ilişkisinin, deasetilasyon vasıtasıyla inaktive ve asetilasyon vasıtasıyla aktive olması şeklindeki basit düzenden daha kompleks olabileceğini göstermektedir. Bu durum, bütirat tedavisinde mikroarray deneylerin sonuçlarını açıklayabilmektedir. Kalıcı histon asetilasyonu, birçok test edilmiş genin baskılanmasına sebep olmaktadır.⁸¹

Sodyum bütiratın birçok normal hücrede, insan kolon karsinoma hücrelerinde ve neoplastik hücrelerde antiproliferatif ve farklılaşma ile indüklenen aktivitesi gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, sodyum bütiratın ekstraselüler sinyal ile ilgili kinaz bağımlı bir mekanizma aracılığıyla insan multipotent mezenkimal kök hücrelerinde RANKL/OPG (NF- κ B ligandının reseptör aktivatörü/osteoprotegerin) oranı ile adipojenik ve osteojenik farklılaşmayı düzenlediği bildirilmiştir. Böylece, sodyum bütiratın multipotent mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında önemli bir rol

oynamasının yanı sıra osteoklast farklılaşmasında multipotent mezenkimal kök hücrelerinin yeteneğini kontrol etmekte olduğu da anlaşılmıştır.⁸⁵

Sodyum bütirat; lösemi, kolon kanseri ve solid tümörlü hastalarda hücre siklusunu etkileyerek bölünmeyi durdurmakta, farklılaşma ve apoptozisi uyarmaktadır.^{86,87} Sodyum bütiratın β -talasemi ve orak hücre anemisi tedavilerinde kullanıldığı, fetal globin gen ekspresyonunu arttırdığı da bilinmektedir.^{88,89}

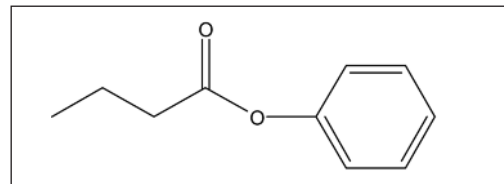
Fenil Bütirat

Fenil bütirat, azotun üreye parçalanmadığı ve üre halinde biriktiği üre siklus bozukluklarında azotun vücuttan atılmasını sağlamaktadır (Şekil 10).⁹⁰ Kistik fibroziste mutant sistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) proteinin yıkılmasını önleyerek şaperon olarak görev yapan fenil bütirat, X'e bağlı adrenolökodistrofide de beyindeki uzun zincirli yağ asitlerini oksitleyerek miktarlarının azalmasına neden olur.^{86,87,91} Spinal kaslar atrofide fenil bütiratın SMN2 geni "splicing" hatasını düzelttiği ve 7. ekzonu da içeren mRNA oluşturarak fonksiyonel protein düzeyini arttırdığı bildirilmiştir.⁵⁷

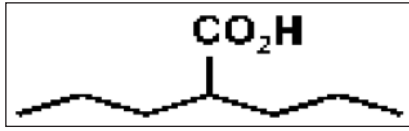
Fenil bütirat; lösemi, kolon kanseri ve solid tümörlü hastalarda hücre siklusunu etkileyerek bölünmeyi durdurmakta, farklılaşma ve apoptozisi uyarmaktadır.⁸⁶

Valproik Asit

VAP (Valproik asit; 2-propilpentanoik asit), anti-konvülsan olarak keşfedilişinin ardından ilk olarak 1964 yılında Fransa'da klinikte kullanılmaya başlanmış ve tüm epilepsi nöbet tiplerine karşı geniş spektrumlu etkisiyle dünyada en çok kullanılan antiepileptik ilaçlar arasına girmeyi başarmıştır (Şekil 11). 2001 yılında HDAC enzimlerini inhibe edebildiği anlaşılan VAP, bu özelliği ile oldukça ilgi çekmiş ve farklı alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır.⁹²



ŞEKİL 10: Fenil bütiratın kimyasal formülü.



ŞEKİL 11: VAP'ın kimyasal formülü.

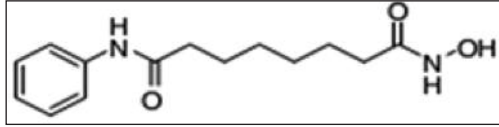
VAP, gen ekspresyonu, kromatin yapısının değişimi ve histon asetilasyonunun düzenlenmesinin temelini oluşturan HDAC enzimlerinin hepsini güçlü bir şekilde inhibe etmez.^{93,94} IIb sınıfı ve diğer sınıflar üzerinde çok az etkiye sahipken, Zn⁺² bağımlı I. sınıf (HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8) ve IIa sınıfı (HDAC4, HDAC5, HDAC7 ve HDAC9) HDAC enzimlerini güçlü bir şekilde inhibe etmektedir. VAP, HDAC enzimlerini inhibe etme yeteneği nedeni ile proliferasyonu baskılar ve tümör hücrelerinin apoptozisini ve farklılaşmasını indükler. Bunun sonucu olarak, VAP'ın bir anti-kanser ajan olarak klinik çalışmaları devam etmektedir. Ayrıca, VAP'nin HDAC inhibisyonu yoluyla, nörodejeneratif hastalıkların hayvan modellerinde birçok nöroprotektif rol oynadığı saptanmıştır.⁹⁵ Örneğin; serebral granül kültür hücrelerinin VAP veya benzer maddelerle ve farklı HDAC inhibitörleriyle ön tedavisi, glutamat kaynaklı N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aracılı eksitotoksikite vasıtasıyla indüklenmiş apoptozisten nöronları korumaktadır.⁹⁶⁻⁹⁸ Buna ek olarak nöroprotektif etkisi, sinüklein, ısı şok protein 70 (HSP70), beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) ve glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör (GDNF) gibi nörotrofinlerin ve nöroprotektif proteinlerin indüksiyonuna aracılık etmektedir. Yapılan bir çalışmada, VAP veya ilgili HDAC inhibitörleri ile tedavinin inme, amiotrofik lateral skleroz, spinal kaslar atrofi ile Huntington, Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının dâhil olduğu nörodejeneratif hastalıklar üzerinde yararlı etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma, nörodejeneratif hastalığı olan kemirgen modelleri üzerinde yapılmıştır.⁹⁵

HDAC inhibitörleri Hsp70 ve Bcl-2 gibi nöroprotektif genlerin ekspresyonunu ve transkripsiyonunu aktive etmektedir. Bir çalışmada, kalıcı fokal serebral iskemisi hastası fareler üzerindeki VAP tedavisi, fokal sonucun geliştirilmesi ve beyin hasarının azalmasının yanı sıra asetillenmiş histon

H3 ve Hsp70 düzeylerinin artması ile sonuçlanmıştır. Geçici fokal serebral iskemisi hastası farelerde VAP'ın, asetillenmiş H3 ve Hsp70 düzeyinde zamana bağlı bir artışa, HDAC inhibisyonuna ve Hsp70 indüksiyonuna sebep olduğu gözlemlenmiştir. VAP'ın aynı zamanda antiapoptotik faktör Bcl-2 ve Bcl-x(L) ve spinal kaslar atrofide spinal motor nöronların dejenerasyonunda düzelmeye neden olduğu saptanmıştır. Hayvan modellerinde, Hsp70 veya Bcl-2'nin ekspresyonunun spinal bağ hasarlarına karşı koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir.⁹²

Çocukluk çağında en sık görülen kalıtsal hastalıklardan biri olan spinal kaslar atrofiden sorumlu SMN geni üzerinde yapılan çalışmalarda, VAP'ın "splicing" hatasını düzelttiği ve fonksiyonel protein düzeyini arttırdığı bildirilmiştir.^{58,59}

VAP, genellikle güvenli ve iyi tolere edilen bir ilaç olmasına rağmen, özellikle karaciğer ve teratojenite ile ilgili nadir ancak ciddi bazı yan etkileri mevcuttur. Bu etkilerin altında yatan mekanizmalar tam olarak tanımlanmış değildir. Şu ana kadar toplanan veriler, bu yan etkilerin HDAC inhibisyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir.⁹⁹ Yapılan bir çalışmada, VAP'ın ekstraselüler sinyal ile ilişkili kinaz mekanizmasının aktivasyonu ile ve GpIIIa gen bölgesinde histon asetilasyonu sayesinde UT-7 hücresi hattında megakaryositik farklılaşmayı indüklediği tespit edilmiştir. Megakaryositik lösemiden türetilen UT-7 hücreleri değişik konsantrasyonlarda VAP uygulanması ile tedavi edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada VAP'ın doza bağımlı bir şekilde ilk megakaryositik işaretleyiciler olan GpIIb/IIIa ve GpIIIa (CD61) ekspresyonunu indüklediği saptanmıştır. VAP ile tedavi edilen hücrelerde H3 ve H4 histonlarının hiperasetilasyonu görülmüştür. Histon asetilasyonunun özellikle CD61 ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Kromatin immünopresipitasyon deneyi ile GpIIIa promotöründe H4 hiperasetilasyonu gözlemlenmiştir.¹⁰⁰ Yapılan başka bir çalışmada ise VAP'nin insan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde melatonin MT₁ reseptör ekspresyonunu indüklediği ve melatoninle kombine halde uygulandığında sinerjistik antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir.¹⁰¹



ŞEKİL 12: SAHA'nın açık formülü.

2. HİDROKSAMİK ASİT TÜREVLERİ

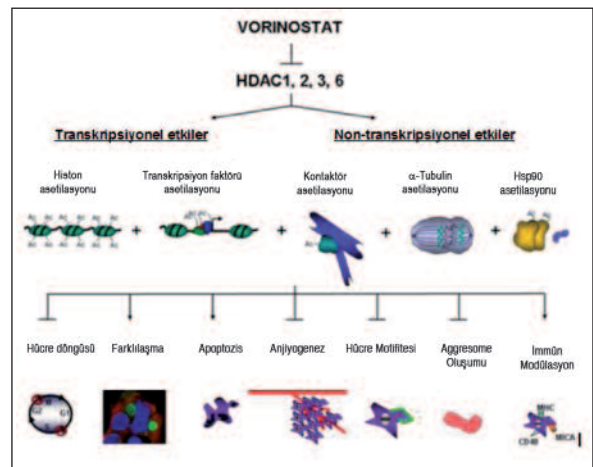
Suberoilanilithidroksamik Asit

SAHA güçlü bir HDAC inhibitörü olup, bu enzimlerin katalitik bölgesini bloke etmektedir (Şekil 12). Hücresel proteinlerin büyük bir kısmı, asetilasyon ve değiştirilmiş fonksiyon ve/veya yapısıyla posttranslasyonel olarak modifiye edilmiştir. Bu proteinlerin çoğu, çekirdek nükleozomal histonlar ve transkripsiyon faktörleri gibi anahtar hücresel süreçlerde, hücresel büyüme ile migrasyon ve farklılaşmayı düzenleyen sinyal iletim yollarında görev yapmaktadır. SAHA, normal ve transforme hücreler ile hayvan tümör modellerinde hücresel asetilasyon modellerini önemli ölçüde değiştirir ve büyümenin durmasına, sonuçta ölüme neden olur. Yapılan çalışmalarda, SAHA'nın hastalara iyi tolere edilebilir dozlarda verildiğinde hematolojik ve solid tümörlere karşı ümit verici klinik etkinlik gösterdiği saptanmıştır.¹⁰²

SAHA, I (HDAC1, HDAC2 ve HDAC3) ve II. sınıf (HDAC6) HDAC enzimleri üzerindeki inhibe edici etkisi sayesinde, doku düzeyinde immün yanıt modülasyonu, anjiyogenez inhibisyonu, hücresel seviyede farklılaşma, agresome oluşumu, hücre motilitesi, apoptozis ve hücre siklusunun progresyonu gibi biyolojik süreçler üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (Şekil 13). Güçlü bir HDAC inhibitörü olarak SAHA'nın, radyasyon terapisinde ve diğer antineoplastik ajanlarla kombine şekilde kullanımını uygun görülmektedir. Her iki tedavi şeklinde de normal hücreler üzerinde toksisitenin az olduğu saptanmıştır ve hücresel süreçlerde spesifik biyolojik etkileri mevcuttur. Diğer kanser terapileri (radyasyon, kinaz inhibitörleri, sitotoksik maddeler ve ayırt edici maddeler dâhil olmak üzere) ile SAHA'nın kombinasyon hâlinde aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda, çeşitli insan transforme kültür hücrelerinde sinerjistik ve katkı aktivitesi gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar Tablo 2'de görülmektedir.¹⁰²

SAHA'nın antikanser potansiyeli ilk olarak CWR22 insan prostat tümörlerinin farelere nakledilmesiyle gösterilmiştir. SAHA'nın kontrollü ve intraperitoneal olarak 50 mg/kg/gün dozunda uygulanması sonucu tümör hacminde ortalama %97 oranında bir azalma gözlemlenirken, herhangi bir toksisite saptanmamıştır.¹⁰³ Daha sonra SAHA bir dizi tümör gelişimini inhibe etmek için araştırılmıştır. Yapılan Faz I çalışmasında, ileri evre kanser hastalarında SAHA'nın oral olarak uygulanması sonucu maksimum tolere edilebilir doz günde bir kez 400 mg, sürekli günlük doz günde iki kez 200 mg ve haftalık doz üç ardışık gün için günde iki kez 300 mg olarak belirlenmiştir. Farmakokinetiklerin doğrusal, oral biyoyararlanımın %43 oranında olduğu ve antikanser aktivitenin gözlemlendiği saptanmıştır.¹⁰⁴ Bir sonraki Faz II çalışmasında bir dizi doz ve program araştırılmıştır. Bu çalışmada, en uygun güvenlik profilinin günde bir kez 400 mg SAHA uygulanması ile sağlandığı ve yoğun tedavi görmüş CTCL hastalarında ilacın aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.¹⁰⁵ SAHA'nın onaylanması, genel yanıt oranı %29,7 olan CTCL hastaları üzerinde çok önemli bir Faz IIb çalışmasına dayanmaktadır.¹⁰⁶

SAHA, düşük nanomolar konsantrasyonlarda ($IC_{50} < 86$ nM) I (HDAC1, HDAC2 ve HDAC3) ve II. sınıf (HDAC6) HDAC enzimlerinin katalitik bölgelerine doğrudan etki ederek bu enzimleri bloke etmektedir. Nonspesifik veya bütün HDAC inhibitörleri, belirli bir HDAC enzimini etkileyen çok spesifik bir inhibitör ve SAHA gibi güçlü bir HDAC in-



ŞEKİL 13: SAHA'nın değişik hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkisi.

(Renkli hali için Bkz. <http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/eczacilik-bilimleri-dergisi/2146-944X/>)

TABLO 2: SAHA kombinasyon tedavilerinin prelinik aktiviteleri.

Kombinasyon	Dönüştürülmüş hücre çizgileri	Kombinasyonun aktivitesi
SAHA+5-Aza-20-deoksitidin	CTCL (HH)	Sinerjistik
SAHA+17-AAG	Lösemi (U937, K562, LAMA84)	Sinerjistik
SAHA+ATRA	APL (NB4)	Katkı
SAHA+bortezomib	Bcr-Abl + lösemi (K562, LAMA84); miyelom; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri; mantle hücreli lenfoma, hepatoma, pankreatik kanser	Sinerjistik
SAHA+sisplatin	Meme (MCF7); skuamöz hücre (HSC3)	Geliştirilmiş hücre ölümü
SAHA+dosetaksel	Meme (BT474, SKBR3)	Sinerjistik
SAHA+trastuzumab	Meme (BT474, SKBR3)	Sinerjistik
SAHA+epirubisin	Meme (MCF7)	Sinerjistik
SAHA+etoposid	Meme (MCF7)	Geliştirilmiş hücre ölümü
SAHA+flavopiridol	Lösemi (U937), meme (MDA-MB231, MCF7)	Sinerjistik
SAHA+5-FU+irinotekan	Hepatoselüler karsinom (HepG2, Hep1B)	Geliştirilmiş hücre ölümü
SAHA+radyasyon	Prostat (LNCaP), skuamöz karsinoma; melanom, NSCLC	Sinerjistik; gelişmiş hassasiyet
SAHA+TRAIL	Lösemi, akciğer, prostat, meme karsinomu, melanom	Sinerjistik
SAHA+LY294002	Lösemi (U937, HL60, K562, Jurkat)	Sinerjistik
SAHA+PD184352	Lösemi (K562, LAMA84)	Sinerjistik
SAHA+perifosin	Lösemi (U937, HL60, Jurkat)	Sinerjistik
SAHA+bay 11-7082	Lösemi (U937, HL60, Raji, Jurkat)	Sinerjistik
SAHA+gemsitabin	NSCLC (A549, H460), pankreatik (PANC1)	Sinerjistik
SAHA+bikalutamid	Prostat (LNCaP)	Sinerjistik
SAHA+zoledronik asit	Prostat (LNCaP, PC3)	Sinerjistik
SAHA+cis-retinoik asit	Medullablastoma (D283)	Sinerjistik
SAHA+MK-0457 (VX-680)	CML (K562, birincil), AML (HL60, OCI-AML3, birincil)	Sinerjistik
SAHA+imatınib	CML (K562, LAMA84)	Sinerjik katkı
SAHA+desatinib	CML (K562, LAMA84, birincil), BaF3	Sinerjistik
SAHA+sorafenib	CML (K562, LAMA84), pankreatik (MiaPaCa2, PANC1), hepatik (HEPG2, HuH7, HEP3B) renal (A498, CAKI-1, UOK121LN)	Sinerjistik
SAHA+sulindak	NSCLC (H460, A549)	Gelişmiş hassasiyet

- CTCL (HH): Bir tür kutanöz T-hücreli lenfoma hücre hattı

- 17-AAG: 17-Allilamino-17-demetoksigeldanamisin

- U937, K562, LAMA84: Lösemi hücre hattı türleri

- ATRA: Bütün trans retinoik asit

- APL (NB4): NB4 türü akut promiyelositik lösemi hücre hattı

- Bcr-Abl: Birçok kronik miyeloid lösemi hastasında bulunan anormal bir gen

- MCF7: İnsan meme adenokarsinomu hücre hattı

- HSC3: Oral skuamöz karsinom hücre hattı

- BT474: İnvaziv duktal meme karsinomu hücre hattı

- SKBR3: Bir meme kanseri hücre hattı türü

- MDA-MB231: Bir meme kanseri hücre hattı türü

- 5-FU: 5-Fluorourasil

- HepG2: Bir tür hepatoselüler karsinom hücre hattı

- Hep1B: Bir tür hepatoselüler karsinom hücre hattı

- LNCaP: Androjene duyarlı insan prostat adenokarsinomu hücreleri

- NSCLC: Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu

- TRAIL: Tümör nekrozis faktör-İlgili apoptozisi indükleyici ligand

- LY294002: Kuersetinin morfolin türevi bir bileşik

- HL60: İnsan promiyelositik lösemi hücreleri

- Jurkat: İnsan T-hücreli lenfoblast benzeri hücre hattı

- PD184352: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz/ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz inhibitörü

- Bay 11-7082: Selektif ve irreversibl NF- κ B inhibitörü

- Raji: İnsan Burkitt lenfoma hücre hattı

- A549: Bir tür insan akciğer adenokarsinomu epitelyal hücre hattı

- H460: Bir tür insan akciğer kanseri hücre hattı

- PANC1: İnsan pankreatik karsinomu epitelyal benzeri hücre hattı

- PC3: İnsan prostat kanseri hücre hattı

- D283: İnsan medullablastoma hücre hattı

- MK-0457 (VX-680): Tozasertib

- CML: Kronik miyeloid lösemi

- AML: Akut miyeloid lösemi

- OCI-AML3: Bir tür akut miyeloid lösemi hücre hattı

- BaF3: Sıçan interlökin-3 bağılı pro-B hücre hattı

- MiaPaCa2: İnsan pankreatik adenokarsinoma hücre hattı

- HuH7: Bir tür insan hepatoma hücre hattı

- HEP3B: Bir tür insan hepatoma hücre hattı

- A498: Bir tür insan renal kanser hücre hattı

- CAKI-1: Bir tür insan renal kanser hücre hattı

- UOK121LN: Bir tür renal karsinom hücre hattı

hibitörünün belirli bir HDAC inhibisyon profili ile birlikte antikanser ajan olarak çok yararlı olabileceği düşünülmektedir. Bunun üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Büyük olasılıkla, farklı tümör tiplerinde spesifik HDAC enzimlerinin inhibe edilmesiyle birlikte farklı biyolojik süreçlerin bozulması, gözlemlenen antikanser etkilere katkıda bulunacaktır. Bu görüş, antikanser terapötikler olarak küçük moleküllu protein kinaz inhibitörlerinin gelişimine paraleldir. Özel küçük moleküllu ilaçların spesifik protein kinaz inhibitör profili, insan kanser hücrelerinin spesifik tiplerine karşı doğrudan kendi programlarını inhibe etmesi şeklindedir.¹⁰⁷

SAHA'nın antitümör aktivitesi, HDAC enzimlerinin aktivitesini ve histonların birikimini inhibe etmesine ve farklılaşma veya apoptozisin indüksiyonuna neden olan genleri aktive etmesine bağlıdır. Böylece tümörün büyümesini inhibe eder. Bu model, tümör hücrelerinin SAHA'ya maruz kalmasından sonra düzenlenmiş genlerin nispeten az bir miktarının (ifade edilen genlerin %2-10'u) ekspresyonu bulgusuna dayanmaktadır. Uyarılmış genlerden en yaygın olanı sikline bağımlı kinaz inhibitörü olan p21^{WAF1}'dir. Ancak tümör hücrelerinde apoptozisin ilerlemesinden ziyade, sitoprotektif bir hücre döngüsünü indükleyen p21^{WAF1}'in SAHA ile indüklenmiş ekspresyonu meydana çıkmaktadır. Lösemik hücrelerde, p21^{WAF1}'in SAHA kullanılarak indüklenmiş ekspresyonu, p21^{WAF1} fonksiyonunu bloke ederek apoptozisi azaltmaktadır.¹⁰²

Kromatinize DNA'da asetillenmiş histon birikimi DNA hasarı olarak kabul edilir ve bağımsız bir p53 türünde hücre siklusunun durmasına sebep olur. Transkripsiyon faktörlerinin sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT) ailesi, SAHA ile indüklenmiş apoptoziste rol oynamaktadır. STAT transkripsiyonel faktörler, antiapoptotik genlerin düzenlenmesi ve HDAC enzimleri ile ilişkilidir.^{108,109} Yapılan bir çalışmada, lösemi ve lenfoma hücre dizilerinde (CTCL içeren) SAHA ile tedavinin kötü sonuç vermesinde hücre hatlarına daha duyarlı ve aktive edilmiş STAT1, STAT3 ve STAT5'in yüksek bazal seviyelerinin etkili olduğu tespit edilmiştir. Tedavi öncesinde Sézary sendromu veya mikozis fungoidesli cevap vermeyen CTCL hastalarından alınan deri biyopsilerinde STAT1 ve STAT3'ün daha yük-

sek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. CTCL hastalarında STAT3'ün yapısal aktivitesi gözlenirken, son sonuçlar, aktive edilmiş STAT3 protein düzeylerinde hastadan hastaya değişen önemli farklılıkların mevcut olduğunu ve bu durumun HDAC inhibitör tedavisinde hasta duyarlılığı ile ilişkili olduğunu belirtmektedir. Bir Janus kinaz 2 (JAK2) inhibitörün CTCL hücre hatlarını tedavi etmesiyle STAT fonksiyonunun inhibisyonu hücre büyümesi inhibisyonunda SAHA ile sinerjistikdir.¹¹⁰ Aktive edilmiş STAT3'ün hücre lokalizasyonu, HDAC inhibisyonundan etkilenir ve tedavi için hücre tepkiye katkıda bulunabilir. Tedavi edilemeyen CTCL hastalarında aktive edilmiş STAT3, ağırlıklı olarak mikozis fungoides hücrelerinin (lenfosit ve keratinositlerin ikisi de dâhil) çekirdeklerinde lokalize olmuştur.¹⁰⁵ SAHA kullanılarak dört hafta boyunca 16 hastanın tedavisinden sonra, aktive edilmiş STAT3, klinik düzelme görülen 11 hastadan dokuzunda öncelikle sitoplazmada tespit edilmiştir. Fakat 16 hastanın üçünde hiçbir klinik düzelme görülmemiştir. CTCL hücre hatları ve CTCL hastalarının dolaşan malign T-hücreleri, STAT6 proteinlerinde ve STAT6 fosforilasyonunda azalma olması ve apoptozisin indüksiyonu için *in vitro* ortamda SAHA'ya maruz bırakılmıştır.¹¹¹ SAHA'nın transkripsiyonel etkilerine ek olarak, gelişmiş histon asetilasyonu sayesinde p53 gibi transkripsiyon faktörlerinin asetilasyonunu artırma etkisi de mevcuttur.¹¹²

HIF-1 α , E2F, α -tubulin, kortaktin ve HSP90 gibi sitoplazmik proteinlerin asetilasyonlarının artması da hücre büyümesinin inhibisyonu, hücre ölümünün indüksiyonu ve SAHA ile indüklenmiş hücre siklusunun durdurulmasına katkıda bulunmaktadır.^{113,114} Bu histon olmayan asetillenmiş proteinler, birkaç hücresel sürece katılmaktadır. Bunlar, *in vivo* ortamda tümörlerin ve *in vitro* ortamda transforme hücre hatlarının büyümesi için gereklidir (Şekil 13). SAHA ile bu hücresel süreçlerin bozulması, özellikle partiküler tümör tiplerinde etkili olmaktadır. SAHA, düşük mikromolar konsantrasyonlarda, çeşitli transforme hücre kültürlerinde hücre büyümesinin durdurulması veya apoptozis ve farklılaşmanın uyarılmasında etkilidir. Transforme hücrelerin büyümesini durdurmayı ve apoptozisini veya farklılaşmasını indüklemek için gereken SAHA konsantrasyonu, asetillenmiş histonların birikimine neden olan kon-

santrasyonla ilişkilidir. SAHA'nın antikanser aktivitesi insan karsinomlarında çeşitli ksenograft modellerde kanıtlanmıştır. SAHA'nın intraperitoneal uygulanması insan prostat, meme ve kolon kanserinde tümör büyümesini büyük ölçüde önlemektedir. Prostat tümör modelinde regresyon gözlenmiştir. SAHA'nın oral uygulanmasıyla farelerde meme tümörlerinin büyümesi inhibe edilmiştir. Ayrıca, sıçanlarda kanser tedavisi için oral SAHA uygulanmasının tümör latansını artırdığı ve meme tümörünün insidansını, çokluğunu ve hacmini azalttığı yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Sıçanlarda oral SAHA uygulaması, akciğer tümörü çokluğunu azaltmıştır.¹⁰²

Kalıtıl bir poliglutamin tekrar hastalığı olan Huntington hastalığının moleküler patogenezi nedeniyle transkripsiyon regülasyon bozukluğu olabileceği düşünülerek yapılan fare çalışmalarında, SAHA'nın kan-beyin bariyerini geçerek beyinde histon asetilasyonunu artırdığı ve fare beyinde görülen motor bozukluklarını düzelttiği gösterilmiştir.⁶⁰

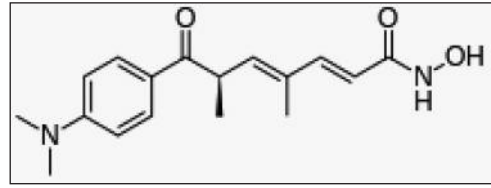
Trikostatin

TSA'nın, lösemi vakaları için transkripsiyonel bir regresyona neden olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 14). Fakat toksisitesi nedeni ile, TSA'nın lösemi tedavisinde kullanımı kesin olarak sınırlandırılmıştır. TSA'nın aynı zamanda skuamöz hücre proliferasyonu ve keratinosit gelişimini *ex vivo* ortamda etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. TSA aracılı arrestin değiştirilemez olduğu bulunmuştur.¹¹⁵ Bu nedenle, toksik yan etkilerinden bazıları sınırlandırılarak, cilt kanserinde TSA'nın lokal uygulaması düşünülebilir.¹¹⁶

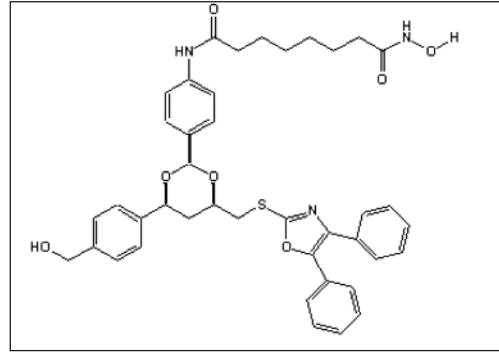
TSA'nın siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p21 geninin promotörünü aktive ederek tümörlü hücrenin büyümesini durdurduğu, hücre döngüsünü etkilediği, hücrel ve mitokondriyel yolaklar üzerinden apoptozu indüklediği bilinmektedir.^{117,118}

Tübasin

Tübasin ilk keşfedilen seçici HDAC inhibitörüdür (Şekil 15). Bileşik, histon asetilasyonunu etkilemeden memeli hücrelerinde α -tübülin asetilasyonuna yol açarak HDAC6'yı inhibe eder.⁴³ Hücrelerin tübasin tedavisi, NIH-3T3 fibroblastlardaki değiştirilmiş hücre tutunması nedeni ile yayılmanın inhibisyonuyla sonuçlanır.¹¹⁹ Meme kanseri hücrelerinde,



ŞEKİL 14: Trikoastatin A'nın kimyasal formülü.



ŞEKİL 15: Tübasinin açık formülü.

estradiol uyarılı hücre migrasyonunu engeller.¹²⁰ Ayrıca tübasin, tümör hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişini, hücre hareketliliği ve invazyonunu (yayılmasını) kolaylaştıran bir süreci inhibe eder. Bu etkinin moleküler temeli, TGF β -SMAD3 sinyalini verme yolu ile engellemeyi içermektedir.¹²¹ Tübasin ayrıca, proteasomal yola benzeyen, ortaya çıkan ya da yanlış bir şekilde bastırılan ubiquitin eklenmiş proteinleri ayrıştırmak için HDAC6 aktifliğine bağlı olan "aggresome" fonksiyonunu bloke eder.¹²² Çoklu/birçok miyelom (ilik uru) hücrelerinde, tübasin ubiquitin proteinlerinin belirgin kümülasyonlarına neden olur ve sinerjik olarak c-Jun NH2-sonlu kinaz/kaspaz aktivasyonu tarafından bortezomib nedenli sitotoksitesi artırır.¹²³

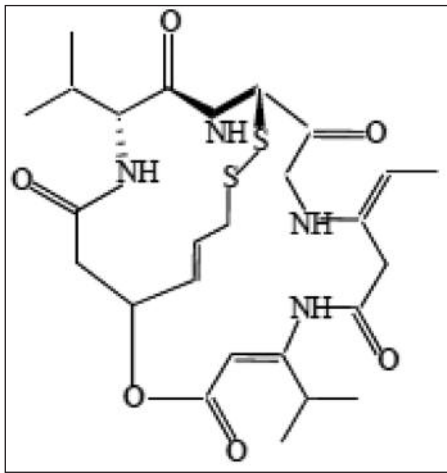
HDAC8 seçici inhibitörlere benzer olarak, HDAC6 seçici inhibitörleri histon asetilasyonunu değiştirmekten bağımsız olarak davranırlar. Seçici olmayan HDAC inhibitörlerinin aksine, HDAC6 seçici inhibisyonu, mikrodizi analizinde gen ifade işaretlerini önemli ölçüde değiştirmemekte, hücre progresyon dönemini değiştirmekte ve anormal mitotik iğ formasyonuna neden olmamaktadır.¹²⁴ Bu durum, HDAC6 inhibitörlerinin hücre biyolojisi üzerindeki nispeten seçici etkisini açıkça göstermektedir. İlginçtir ki, klinik ortamlardaki HDAC6 inhibisyonu diğer HDAC enzimlerinin inhibisyo-

nunun aksine büyük yan etkilere sebep olmamakta ve normal gelişim ya da esas organ fonksiyonlarını bozmamaktadır. Böylelikle, tübasin ve diğer HDAC6 seçici inhibitörler, tümör hücrelerinin migrasyon ve metastaz inhibisyonuyla ve kanser hücrelerindeki baskı cevap yollarına neden olan ilaçların birleşmesiyle kanser tedavisinde faydalı olabilir. Bu bileşikler, α -tübülün ve ısı şoklu proteinler gibi sitoplazmik proteinlerin asetilasyonu ile histon asetilasyonuna bağlı epigenetik süreçleri değiştirmeden hücreler üzerinde etkilerini ortaya koyarlar.¹²⁵

3. SIKLIK TETRAPEPTİDLER

Depsipeptit (Romidepsin)

Bir HDAC inhibitörü olarak romidepsin (FR901228, FK228, depsipeptid), hücre döngüsünü durduran, farklılaşmayı inhibe eden ve çeşitli kanser hücrelerinde apoptozise neden olan bir madde dir (Şekil 16). 2004 yılında FDA tarafından T-hücre lenfoma hastalarının monoterapisinde kullanılan romidepsin için en hızlı ve dolaysız bir şekilde hedefe yönelen bir ilaç tanımı yapılmıştır. Romidepsin 2009 yılında onaylanıp 2010 yılında piyasaya sürülmüştür. Romidepsin başlangıçta *Chromobacterium violaceum* 968'in fermantasyonu ile keşfedilip izole edilmiştir. Ras sinyalizasyon yolu kanser gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Romidepsin, rasonkojen-transforme hücrelerinin morfolojik fenotipini seçici olarak geri çeviren yeni ajanların araştırılması sonucu tanımlanmıştır.¹²⁶



ŞEKİL 16: Depsipeptidin (Romidepsin) kimyasal formülü.

Romidepsin, özellikle HDAC1'e ve daha az olmak üzere HDAC2'ye karşı aktiftir.¹²⁷ Daha yüksek konsantrasyonlarda HDAC4'ü de inhibe ettiği saptanmıştır. Depsipeptid pek çok kanser hücre modelinde aktiftir.¹²⁸

Depsipeptid, gelecek vaat eden bir antikanser ve antiproliferatif ajandır. Farklı hücre hatlarında çeşitli kanser risklerini azalttığı rapor edilmiştir. Klinik çalışmalarda kullanılmasına rağmen etki mekanizması büyük ölçüde bilinmemektedir. Gen transkripsiyonunu düzenlediği düşünülmektedir. Depsipeptid, habis lenfomalı hastaların Faz I deneylerinde terapötik etkinlik göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, kanser hücrelerindeki metastaz-spesifik matris metalloproteinazların (MMP-2 ve MMP-9) inhibisyonunun, depsipeptidin antikanser fonksiyonu için hedeflerden biri olabileceği saptanmıştır. Bu durum, metastatik akciğer kanseri için yeni bir kimyasal koruyucu ajan olan depsipeptidin gelişiminin moleküler temelini oluşturmaktadır.¹²⁹

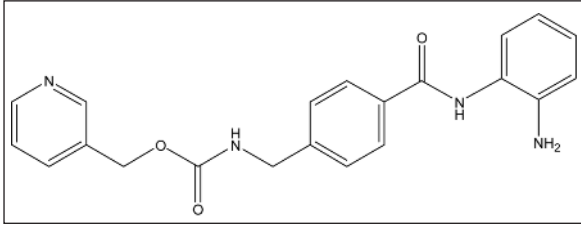
Depsipeptidin, düzensiz histon asetilasyonu, kromatin yapısı, apoptozis, farklılaşma ve hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan genlerin transkripsiyonunu değiştirerek solid tümörlerin yanı sıra hematolojik patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Romidepsin, histonların hiperasetilasyonuna ve daha sonra genlerin transkripsiyonuna neden olmaktadır. Böylece tümör büyümesini inhibe ederek antitümör aktivite göstermektedir. Romidepsinin antiproliferatif etkisi, insan tümör hücrelerinde apoptozisin induksiyonuna ve hücre bölünme oranının baskılanmasına dayandırılmaktadır. Son veriler, romidepsinin pleiotropik etkisinin, histon asetilasyon modifikasyonu sayesinde gen ekspresyon modülasyonunu içerebileceğini göstermektedir.¹³⁰

4. BENZAMİDLER

MS-275

MS-275, kanser tedavisi için klinik ajan olarak geliştirilmeye çalışılan bir bileşiktir (Şekil 17). Birçok tümör hücresine karşı *in vivo* ve *in vitro* ortamda etkinlik göstermektedir. Bileşiğin şu anda Faz I/II klinik çalışmaları sürdürülmektedir.¹³¹

MS-275'in inhibitör profili *in vitro* ortamda farklı bir dizi HDAC enzimi kullanılarak test edil-



ŞEKİL 17: MS-275'in açık formülü.

miştir. Nikotinamid, sodyum bütirat ve TSA'nın inhibitör profilleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda MS-275'in I. sınıf HDAC enzim inhibitörü olduğu saptanmış, aynı zamanda HDAC1 ve HDAC3'e yüksek afinite gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat HDAC8 üzerinde zayıf inhibisyon göstermiştir (Tablo 3).^{69,132} Yeni yapılan bir çalışmada ise MS-275'in HDAC2 aktivitesini de inhibe ettiği saptanmıştır. TSA ve sodyum bütirat I ve II. sınıf HDAC enzimlerinin inhibitörü iken nikotinamidin sadece SIR1'i inhibe ettiği saptanmıştır (Tablo 3).¹³³

MS-275 meme, kolon, akciğer, miyelom, yumurtalık, pankreas, prostat ve lösemi gibi çeşitli insan kanser hücrelerinde *in vitro* ortamda antiproliferatif aktivite göstermiştir.¹³⁴⁻¹³⁶ Ayrıca, oral kullanımı takiben insan erişkin ve pediatrik tümör modellerinin birçoğunda *in vivo* ortamda antitümör aktivite göstermiştir. Kolon ve akciğer ksenograft modellerinde, MS-275'in günlük oral kullanımının tümör büyümesini sırasıyla %70 ve %75 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Geliş-

tirilmiş çalışmalar, cilt nakli ve prostat modellerinde MS-275'in çeşitli tümör hatlarının oranını azaltmadığını, fakat tümör regresyonu veya büyüme inhibisyonunu indüklediğini ortaya koymuştur.¹³⁴ MS-275 aynı zamanda bir dizi pediatrik solid tümör modelinde de analiz edilmiştir. MS-275'in, bütün hücre hatlarında doza bağımlı [³H] timidin yükselmesinin inhibisyonuyla belirlenen DNA sentezini kesintiye uğrattığı gösterilmiştir. Mikroskopik incelemeler, bütün hücre hatlarında hücre sayısında bir azalmanın ve hücre morfolojisinde değişikliklerin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ksenograft modeller, farklılaşmış sarkom, Ewing sarkomu ve nöroblastomun *in vivo* ortamda büyümesinde MS-275'in etkilerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Farklılaşmış sarkom ve Ewing sarkomunun her ikisi de MS-275 ile tedaviye yanıt vermiştir. Dört haftalık tedaviden sonra Ewing sarkomunun tümör hacminde artış görülmemiş iken, yüksek dozda ise %60 oranında büyüme inhibisyonu görülmüştür. Nöroblastom modelinde, bir ay boyunca plasebo veya MS-275 ile tedaviyi takiben, plasebo grubundaki tüm hayvanlarda tümör saptanmış, MS-275 ile tedavi edilen hayvanların %50'sinde tümör saptanmış ve bunların hacminin kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir.¹³⁵ Yeni bir yayında, bu sınıfın yeni sentezlenmiş bileşikleriyle MS-275'in antitümör etkileri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonunda, bazı durumlarda MS-275'e göre yeni sentezlenen bileşiklerin daha üstün oldukları saptanmıştır. Bu çalışmanın yanı sıra MS-275'e maruz kalan hücrelerin içinde meydana gelen moleküler olayların ortaya çıkarıldığı çalışmalar da yapılmıştır. Ayrıca çalışmalar, MS-275 ve diğer HDAC inhibitörlerinin pleiotropik etkilerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda apoptozise neden olmakla birlikte MS-275, insan lösemi ve lenfoma hücre dizilerinde doza bağımlı olarak etki göstermiştir.¹³⁷ Çoğalan hücrelerde MS-275'in apoptotik etkisinin reaktif oksijen türlerinin oluşumundan kaynaklandığına inanılmaktadır.^{138,139} Kronik lenfositik lösemi hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, reaktif oksijen türlerinin üretiminin apoptozis bağlantısından önce meydana gelmediği saptanmıştır. Aksine, MS-275'in kaspaz-bağımlı apoptozisi indüklediği görülmüştür.¹⁴⁰

TABLO 3: Nikotinamid (NAM), sodyum bütirat (NaBu), trikostatin A (TSA) ve MS-275'in HDAC selektivitelerinin karşılaştırılması.^{69,132}

İzoenzim	MS-275 (µM)	IC50 değerleri (in vitro)			NAM (mM)
		TSA (nM)	NaBu (mM)		
I					
HDAC1	0,368	3,87	0,216	>10	
HDAC3	0,501	2,17	0,475	Test edilmemiş	
HDAC8	63,4	420	0,231	Test edilmemiş	
II					
HDAC4	10,7	9,68	1,29	Test edilmemiş	
HDAC6	>100	13,9	79,4	Test edilmemiş	
HDAC10	50,1	11,5	1,69	Test edilmemiş	
III					
SIRT1	>100	>1000	>100	0,169	

SIRT1: Hücre sel regulasyonu katılan proteinleri deasetile eden bir enzim.

SONUÇ

HDAC enzim ailesinin hücre döngüsü düzenlenmesi, hücre çoğalması, sağkalım, farklılaşma, metabolizma, DNA tamiri gibi birçok biyolojik olayla ilişkili olması nedeni ile ilaç hedefi olma kapasitesi yüksektir. HDAC inhibitörleri; HDAC enzimlerinin aktif bölgelerine bağlanmak suretiyle bu enzimlerin substratla ilişki kurmasını engelleyerek histonların asetilli formda kalmasını sağlayan, gen ifadelerini değiştirebilen ve birçok biyolojik faaliyete etki edebilen moleküllerdir. Bu nedenle HDAC enzimlerini inhibe edebilen çok sayıda bileşiğin klinik araştırmaları yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, HDAC enzimlerini inhibe edebilen bileşiklerin hücre bölünmesinin durdurulması, apoptoz ve farklılaşmanın indüklenmesi gibi biyolojik olaylarda etkili olduğunu göstermiştir. Bu antikarsinojenik etkiler transkripsiyonel baskılanma ve/veya çeşitli proapoptotik ya da antiapoptotik genlerin aktivasyonu ile bağlantılıdır.

HDAC inhibitörleri, farklı biyolojik fonksiyonları etkilemeleri nedeni ile başta kanser olmak üzere, spinal kaslar atrofisi, Alzheimer hastalığı, diyabet, psikiyatrik hastalıklar, inflamasyon, astım, romatizma ve paraziter enfeksiyonlar gibi değişik hastalık gruplarının tedavilerine yönelik çalışmalarda ön plana çıkmıştır.

Bugün HDAC inhibitörü olarak ruhsat almış ve klinikte kullanılan sadece iki ilaç (SAHA ve romidepsin) bulunmakla birlikte, pek çok HDAC inhibitörü bileşik klinik deneylerde test edilmektedir. Bu nedenle, önümüzdeki yıllarda değişik kimyasal yapılara sahip HDAC enzim inhibitörlerinin geliştirilmesi ve bu geliştirilen inhibitörlerin kanserin yanı sıra farklı hastalıkların tedavisinde klinikte kullanılmaya başlanması sürpriz olmayacaktır.

Teşekkür

Bu derlemenin hazırlanması, yazımı ve kaynakların düzenlenmesinde bana önemli katkılarda bulunan değerli öğrencim Fatma Kızılay'a çok teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Cooper GM, Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach. 3rd ed. Washington DC, USA: ASM Press; 2004. p.150-4.
- Turner BM. Cellular memory and the histone code. Cell 2002;111(3):285-91.
- Wu J, Grunstein M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. Trends Biochem Sci 2000;25(12):619-23.
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. Nature 2000;403(6765): 41-5.
- Grant PA. A tale of histone modifications. Genome Biol 2001;2(4):REVIEWS0003.
- Peterson CL, Lanier MA. Histones and histone modifications. Curr Biol 2004;14(14):R546-51.
- Lizuka M, Smith MM. Functional consequences of histone modifications. Curr Opin Genet Dev 2003;13(2):154-60.
- Klung SW, Cummings RM. [Regulation of gene expression in eukaryotes]. In: Klung SW, Cummings RM, eds. Concepts of Genetics. 6th ed. Newnan, GA, USA: Prentice Hall College Div; 2002. p.434-42.
- Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. J Histochem Cytochem 2008;56(8):711-21.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell 2007;128(4):693-705.
- Campbell NA, Reece JB. Biology. 6th ed. San Francisco: Benjamin Cummings; 2002. p.240-56.
- Latchman D. Gene Regulation: A Eukaryotic Perspective. 4th ed. United Kingdom: Nelson Thornes Ltd; 2002. p.49-158.
- Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. Curr Opin Genet Dev 2002;12(2):142-8.
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. Cell 2002;108(4):475-87.
- Ogryzko VV. Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. Cell Mol Life Sci 2001;58(5-6):683-92.
- Kimura A, Horikoshi M. How do histone acetyltransferases select lysine residues in core histones? FEBS Lett 1998;431(2):131-3.
- Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, Ohya K, Soma K. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stroma cell line ST2. J Bone Miner Metab 2005;23(3):219-25.
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Biosays 1998;20(8):615-26.
- Dokmanovic M, Marks PA. Prospects: histone deacetylase inhibitors. J Cell Biochem 2005;96(2):293-304.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. Gene 2005;363:15-23.
- Fenrick R, Hiebert SW. Role of histone deacetylases in acute leukemia. J Cell Biochem Suppl 1998;30-31:194-202.
- Kazantsev AG, Thompson LM. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. Nat Rev Drug Discov 2008;7(10):854-68.
- Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. Chem Biol 2002;9(1):3-16.
- Marsoni S, Damia G, Camboni G. A work in progress: the clinical development of histone deacetylase inhibitors. Epigenetics 2008;3(3):164-71.
- Sleiman SF, Basso M, Mahishi L, Kozikowski AP, Donohoe ME, Langley B, et al. Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and challenges of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions. Expert Opin Investig Drugs 2009;18(5):573-84.
- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors. Adv Cancer Res 2004;91:137-68.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nat Rev Genet 2009;10(1):32-42.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem J 2003;370(Pt 3):737-49.
- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. Trends Genet 2003;19(5):286-93.
- Yang XJ, Grégoire S. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. Mol Cell Biol 2005;25(8):2873-84.
- Morrison BE, Majdzadeh N, D'Mello SR. Histone deacetylases: focus on the nervous system. Cell Mol Life Sci 2007;64(17):2258-69.
- Hahnen E, Hauke J, Tränkle C, Eyüpoglu IY, Wirth B, Blümcke I. Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. Expert Opin Investig Drugs 2008;17(2):169-84.
- Gray SG, Ekström TJ. The human histone deacetylase family. Exp Cell Res 2001;262(2):75-83.
- Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. Curr Opin Pharmacol 2003;3(4):344-51.

35. Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality. *Expert Opin Ther Targets* 2005;9(4):809-24.
36. Lindemann KR, Johnstone WR. Histone deacetylase inhibitors: promising candidates for chemotherapeutic drugs. *Gene Ther Mol Biol* 2004;8:61-74.
37. Krämer OH, Göttlicher M, Heinzl T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(7):294-300.
38. Hrzanjak A, Moirfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatlouk K, et al. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5(9):2203-10.
39. Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(18):11700-5.
40. Mehnert JM, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of action. *Cancer J* 2007;13(1):23-9.
41. Lagger G, Doetzelhofer A, Schuettengruber B, Haidweger E, Simboeck E, Tischler J, et al. The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol* 2003;23(8):2669-79.
42. Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2003;6(4):183-95.
43. Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almourzi G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO Rep* 2005;6(6):520-4.
44. Bernhard D, Ausserlechner MJ, Tonko M, Löffler M, Hartmann BL, Csordas A, et al. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *FASEB J* 1999;13(14):1991-2001.
45. Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P, et al. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 2005;11(1):77-84.
46. Theocharisa S, Margeli A, Kouraklis G. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands as potent antineoplastic agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003;3(3):239-51.
47. Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 2004;112(2):171-8.
48. Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11(12):1695-713.
49. Bameda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* 2012;6(6):579-89.
50. Bertrand P. Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010;45(6):2095-116.
51. Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, Harata S, Motomura S. Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. *Bone* 2003;33(4):475-84.
52. Vigushin DM, Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs* 2002;13(1):1-13.
53. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(4):287-99.
54. Takigawa-Imamura H, Sekine T, Murata M, Takayama K, Nakazawa K, Nakagawa J. Stimulation of glucose uptake in muscle cells by prolonged treatment with scriptide, a histone deacetylase inhibitor. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67(7):1499-506.
55. Mosley AL, Ozcan S. Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4. *J Biol Chem* 2003;278(22):19660-6.
56. Colletti SL, Myers RW, Darkin-Rattray SJ, Gurnett AM, Dulski PM, Galuska S, et al. Broad spectrum antiprotozoal agents that inhibit histone deacetylase: structure-activity relationships of apicidine. Part 2. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11(2):113-7.
57. Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, et al. Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 2004;12(1):59-65.
58. Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coovert DD, et al. Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol* 2003;54(5):647-54.
59. Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehrubel FA, Raschke H, Blumcke I, et al. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2003;12(19):2481-9.
60. Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(4):2041-6.
61. Halli MA, Andrews MR, Sweet MJ, Fairlie DP. Histone deacetylase inhibitors in inflammatory disease. *Curr Top Med Chem* 2009;9(3):309-19.
62. Selvi RB, Kundu TK. Reversible acetylation of chromatin: implication in regulation of gene expression, disease and therapeutics. *Biotechnol J* 2009;4(3):375-90.
63. Riestler D, Hildmann C, Schwienhorst A. Histone deacetylase inhibitors—turning epigenetic mechanisms of gene regulation into tools of therapeutic intervention in malignant and other diseases. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;75(3):499-514.
64. Ouaisi M, Ouaisi A. Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. *J Biomed Biotechnol* 2006;2006(2):13474.
65. Abel T, Zukin RS. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8(1):57-64.
66. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999;401(6749):188-93.
67. Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003;46(24):5097-116.
68. Somoza JR, Skene RJ, Katz BA, Mol C, Ho JD, Jennings AJ, et al. Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* 2004;12(7):1325-34.
69. Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(42):15064-9.
70. Vannini A, Volpari C, Gallinari P, Jones P, Mattu M, Carfi A, et al. Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8-substrate complex. *EMBO Reports* 2007;8(9):879-84.
71. Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 2003;133(7 Suppl):2485S-2493S.
72. Ranganna K, Yatsu FM, Hayes BE. Butyrate, a small pleiotropic molecule with multiple cellular and molecular actions: Its role as an anti-atherogenic agent. *Recent Res Devel Mol Cell Biochem* 2005;2:123-51.
73. Mathew OP, Ranganna K, Yatsu FM. Butyrate, an HDAC inhibitor, stimulates interplay between different posttranslational modifications of histone H3 and differently alters G1-specific cell cycle proteins in vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother* 2010;64(10):733-40.
74. Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* 2007;17(3):195-211.
75. Moulding D, Quayle JA, Stringer RE, Hart CA, Edwards SW. Regulation of neutrophil apoptosis by sodium butyrate. *Biologicals* 1996;24(4):301-6.
76. Stehle HW, Leblebicioglu B, Walters JD. Short-chain carboxylic acids produced by gram-negative anaerobic bacteria can accelerate or delay polymorphonuclear leukocyte apoptosis in vitro. *J Periodontol* 2001;72(8):1059-63.
77. Zhang LT, Yao YM, Lu JQ, Yan XJ, Yu Y, Sheng ZY. Sodium butyrate prevents lethality of severe sepsis in rats. *Shock* 2007;27(6):672-7.
78. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2005;25(3):552-63.
79. Conley BA, Egorin MJ, Tait N, Rosen DM, Sausville EA, Dover G, et al. Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 1998;4(3):629-64.
80. Mariadason JM. HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics* 2008;3(1):28-37.
81. Kopinarova M, Botev P, Russev G. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances cellular radiosensitivity by inhibiting both DNA nonhomologous end joining and homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 2011;10(9):970-7.
82. Li RW, Li C. Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple single pathways in bovine kidney epithelial cells. *BMC Genomics* 2006;7:234.
83. Daly K, Shirazi-Beechey SP. Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol* 2006;25(1):49-62.
84. Dokmanovic M, Clarke C, Marke PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007;5(10):981-9.
85. Chen TH, Chen WM, Hsu KH, Kuo CD, Hung SC. Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355(4):913-8.
86. Rubenstein RC, Zeitlin PL. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(2):484-90.
87. Kemp S, Wei HM, Lu JF, Braiterman LT, McGuinness MC, Moser AB, et al. Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med* 1998;4(11):1261-8.
88. Cao H. Pharmacological induction of fetal hemoglobin synthesis using histone deacetylase inhibitors. *Hematology* 2004;9(3):223-33.
89. McCaffrey PG, Newsome DA, Fibach E, Yoshida M, Su MS. Induction of gamma-globin by histone deacetylase inhibitors. *Blood* 1997;90(5):2075-83.
90. Brusilow SW, Maestri NE. Urea cycle disorders: diagnosis, pathophysiology, and therapy. *Adv Pediatr* 1996;43:127-70.
91. Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest* 1997;100(10):2457-65.

92. Lv L, Sun Y, Han X, Xu CC, Tang YP, Dong Q. Valproic acid improves outcome after rodent spinal cord injury: potential roles of histone deacetylase inhibition. *Brain Res* 2011;1396:60-8.
93. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001;20(24):6969-78.
94. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2011;276(39):36734-41.
95. Chuang DM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, Chiu CT. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* 2009;32(11):591-601.
96. Leng Y, Chuang DM. Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurosci* 2006;26(28):7502-12.
97. Leng Y, Liang MH, Ren M, Marinova Z, Leeds P, Chuang DM. Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3 inhibition. *J Neurosci* 2008;28(10):2576-88.
98. Marinova Z, Ren M, Wendland JR, Leng Y, Liang MH, Yasuda S, et al. Valproic acid induces functional heat-shock protein 70 via Class I histone deacetylase inhibition in cortical neurons: a potential role of Sp1 acetylation. *J Neurochem* 2009;111(4):976-87.
99. Leng Y, Marinova Z, Reis-Fernandes MA, Nau H, Chuang DM. Potent neuroprotective effects of novel structural derivatives of valproic acid: potential roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. *Neurosci Lett* 2010;476(3):127-32.
100. Vulcano F, Ciccarelli C, Mattia G, Marampon F, Giampiero M, Milazzo L, et al. HDAC inhibition is associated to valproic acid induction of early megakaryocytic markers. *Exp Cell Res* 2006;312(9):1590-7.
101. Kim B, Rincón Castro LM, Jawed S, Niles LP. Clinically relevant concentrations of valproic acid modulate melatonin MT(1) receptor, HDAC and MeCP2 mRNA expression in C6 glioma cells. *Eur J Pharmacol* 2008;589(1-3):45-8.
102. Richon VM, Garcia-Vargas J, Hardwick JS. Development of vorinostat: current applications and future perspectives for cancer therapy. *Cancer Lett* 2009;280(2):201-10.
103. Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000;60(18):5165-70.
104. Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, Chiao JH, Heaney M, Curley T, et al. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(17):3923-31.
105. Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2007;109(1):31-9.
106. Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM, Parker S, et al. Phase II multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25(21):3109-15.
107. Carter TA, Wodicka LM, Shah NP, Velasco AM, Fabian MA, Treiber DK, et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(31):11011-6.
108. Rascole A, Johnston JA, Amati B. Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5. *Mol Cell Biol* 2003;23(12):4162-73.
109. Xu M, Nie L, Kim SH, Sun XH. STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J* 2003;22(4):893-904.
110. Fantin VR, Loboda A, Paweletz CP, Hendrickson RC, Pierce JW, Roth JA, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription predicts vorinostat resistance in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res* 2008;68(10):3785-94.
111. Zhang C, Richon V, Ni X, Talpur R, Duvic M. Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol* 2005;125(5):1045-52.
112. Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 1997;90(4):595-606.
113. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007;26(37):5541-52.
114. Secrist JP, Zhou X, Richon VM. HDAC inhibitors for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4(12):1422-7.
115. Kouraklis G, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy (review). *Oncol Rep* 2006;15(2):489-94.
116. Saunders N, Dicker A, Popa C, Jones S, Dahler A. Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. *Cancer Res* 1999;59(2):399-404.
117. Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 2009;280(2):125-33.
118. Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 2009;107(4):600-8.
119. Tran AD, Marmo TP, Salam AA, Che S, Finkelstein E, Kabariti R, et al. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 8):1469-79.
120. Saji S, Kawakami M, Hayashi S, Yoshida N, Hirose M, Horiguchi S, et al. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* 2005;24(28):4531-9.
121. Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 2009;277(1):8-21.
122. Hideshima T, Bradner JE, Wong J, Chauhan D, Richardson P, Schreiber SL, et al. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(24):8567-72.
123. Strachan T, Read AP. DNA structure and gene expression. *Human Molecular Genetics*. 3rd ed. London-New York: Garland Science; 2004. p.19-22.
124. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(8):4389-94.
125. Zhang Y, Kwon S, Yamaguchi T, Cubizolles F, Rousseaux S, Kneissel M, et al. Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* 2008;28(5):1688-701.
126. Liu KK, Sakya SM, O'Donnell CJ, Flick AC, Ding HX. Synthetic approaches to the 2010 new drugs. *Bioorg Med Chem* 2012;20(3):1155-74.
127. Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 2002;62(17):4916-21.
128. Kijima M, Yoshida M, Sugita K, Horinouchi S, Beppu T. Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J Biol Chem* 1993;268(30):22429-35.
129. Vinodkumar R, Song YS, Ravikumar V, Ramakrishnan G, Devaki T. Depsipeptide a histone deacetylase inhibitor down regulates levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 mRNA and protein expressions in lung cancer cells (A549). *Chem Biol Interact* 2007;165(3):220-9.
130. Vinodkumar R, Song YS, Devaki T. Romidepsin (depsipeptide) induced cell cycle arrest, apoptosis and histone hyperacetylation in lung carcinoma cells (A549) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression. *Biomed Pharmacother* 2008;62(2):85-93.
131. Hess-Stump H, Bracker TU, Henderson D, Politz O. MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases—the development of an anticancer agent. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(7-8):1388-405.
132. Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(2):720-8.
133. Inoue S, Mai A, Dyer MJ, Cohen GM. Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 2006;66(13):6785-92.
134. Hess-Stump H, Hoffmann J, Schott A. MS-275, a potent orally active inhibitor of histone deacetylases is highly active in experimental tumor models of melanoma and prostate cancer. *EJC Supplements* 2004;2(8):28.
135. Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim CJ, Robey R, et al. MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Res* 2002;62(21):6108-15.
136. Wei Y, Qian DZ, Ren MQ, Zhang L, Wang X, Kato Y, et al. In vivo real-time imaging of transcriptional activation of the RARβ gene promoter by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in a prostate cancer model. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2004;45:960.
137. Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003;2(1):30-7.
138. Rosato RR, Almenara JA, Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res* 2003;63(13):3637-45.
139. Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13(1):21-38.
140. Lucas DM, Davis ME, Parthun MR, Mone AP, Kitada S, Cunningham KD, et al. The histone deacetylase inhibitor MS-275 induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2004;18(7):1207-14.