



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

**DOKTORA
TEZİ**

**ARILOKSİARİL ASETAMİT YAPISINDA SİRTUİN
İNHİBİTÖRÜ OLABİLECEK BİLEŞİKLERİN TASARIMI,
SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

SELEN GÖZDE KAYA

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

ARALIK 2023



**ARİLOKSİARİL ASETAMİT YAPISINDA SİRTUİN İNHİBİTÖRÜ OLABİLECEK
BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Selen Gözde KAYA

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Selen Gözde KAYA

08/12/2023

ARİLOKSİARİL ASETAMİT YAPISINDA SİRTUİN İNHİBİTÖRÜ OLABİLECEK BİLEŞİKLERİN
TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI
(Doktora Tezi)

Selen Gözde KAYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Aralık 2023

ÖZET

Sirtuin (SIRT) enzim ailesi, histon ve histon olmayan protein substratlarındaki lizin kalıntılarının ϵ -amino gruplarında deasetilasyon reaksiyonunu katalizleyen nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) bağımlı histon deasetilazlardır. İlk olarak mayalarda keşfedilen sirtuinlerin, günümüze kadar yedi memeli homoloğu (SIRT1-7) tanımlanmıştır. İzofomlar arasında sitozolik izofom olarak bilinen SIRT2'nin inhibisyonu, kanser, kardiyovasküler, metabolik ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere farklı patolojilerin tedavisinde potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Bu doğrultuda yürüttüğümüz doktora tez çalışmamızda, ilk olarak farmakofor-temelli sanal tarama çalışmasının çıktısı olan iki bileşik üzerinde öncü bileşik optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek *N*-ariloksaril-2-(aril)asetamit yapısında yirmi üç adet yeni türeve ulaşılmıştır. Çalışmanın ilk serisini oluşturan bu bileşikler arasından **S1.12** (SIRT2 IC_{50} =9,97 μM) iyi bir selektif SIRT2 inhibitör profili sergileyerek ön plana çıkmıştır. Devamında, birinci seri bileşiklere ait yapı-etki ilişkileri değerlendirilerek SIRT2 inhibitör etkiyi destekleyen sübstituentler ve ara zincirler belirlenmiş ve bu grupların bir arada yer aldığı yedi adet yeni bileşik tasarlanmıştır. Çalışmanın ikinci serisini oluşturan bu bileşiklerden **S2.2** (SIRT2 IC_{50} =5,74 μM) ile daha güçlü bir selektif SIRT2 inhibitör etkiye ulaşılmıştır. Çalışmanın üçüncü bölümünde ise, toplamda otuz adet sonuç bileşiğin yapı-etki ilişkileri değerlendirilmiş, SIRT2 aktif bölgesine daha iyi bağlanma için gerekliliği vurgulanan yeni etkileşimlerin kurulmasına olanak sağlayacak değişiklikleri içeren 1,1'-(9-okso-9H-floren-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) genel yapısında dört adet yeni bileşik elde edilmiştir. Üçüncü seri bileşiklerinden **S3.3** (SIRT2 IC_{50} =2,04 μM) çalışma kapsamında yer alan tüm bileşikler arasında SIRT2 aktivitesine karşı en güçlü selektif inhibitör etkiyi gösteren bileşik olmuştur. Ayrıca, etkin selektif SIRT2 inhibisyon gösteren bileşiklerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı *in vitro* antiproliferatif etkileri belirlenmiş, elde edilen sonuçlara göre seçilen bileşiklerin ise SIRT2 inhibitör profili ile antiproliferatif etkileri arasındaki ilişki Western blot analizi ile değerlendirilmiştir.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar Kelimeler : Bilgisayar destekli ilaç tasarımı, SIRT2, inhibitör, MCF-7, α -tubulin
Sayfa Adedi : 190
Danışman : Prof. Dr. Gökçen EREN

DESIGN, SYNTHESIS, AND BIOLOGICAL ACTIVITY STUDIES ON ARYLOXYARYL ACETAMIDE
DERIVATIVES WITH POTENTIAL INHIBITORY EFFECT AGAINST SIRTUIN

(Ph. D. Thesis)

Selen Gözde KAYA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2023

ABSTRACT

The sirtuin (SIRT) enzymes are a class of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent histone deacetylases that catalyze the deacetylation reaction at the ε-amino groups of lysine residues in histone and non-histone protein substrates. The discovery of sirtuins began in yeast, and seven mammalian homologs (SIRT1-7) have been identified so far. SIRT2, the cytosolic isoform among these isoforms, has been reported to play an essential role in cellular biological processes such as inflammation, metabolism, oxidative stress, and apoptosis mediated by an increasing number of substrates. Therefore, its inhibition is considered a potential therapeutic strategy for treating pathologies, including cancer, cardiovascular, metabolic, and neurodegenerative diseases. With this aim, a lead optimization study was performed on two hit compounds, which were the output of the pharmacophore-based virtual screening campaign, yielding twenty new derivatives with *N*-aryloxyaryl-2-(arylthio)acetamide scaffold. Among these compounds, the so-called first series, the potency of selective SIRT2 inhibition was enhanced by **S1.12** (SIRT2 IC₅₀=9,97 μM) compared to the hit compounds. Following the evaluation of the SAR of the first series, the substituents and the linkers that contributed to the SIRT2 inhibition were identified, and four new compounds were designed as the second series, resulting in **S2.2** (SIRT2 IC₅₀=5,74 μM), which displayed more potent and selective SIRT2 inhibitor profile. Finally, based on the SAR data and the crucial interactions in the SIRT2 active site, four derivatives were designed with 1,1'-(9-oxo-9*H*-fluoren-2,7-diyl)bis(3-(aryl)urea) scaffold. Among these compounds comprising the third series, **S3.3** (SIRT2 IC₅₀=2,04 μM) was identified as the most potent and selective SIRT2 inhibitor of the entire compounds designed in the study. Moreover, the compounds displaying potent and selective SIRT2 inhibition were evaluated for their antiproliferative effects on the human MCF-7 breast cancer cell line. According to the results, the selected compounds were subjected to Western blot analysis to determine the relationship between their SIRT2 inhibition potentials and antiproliferative effects.

Science Code : 1019

Key Words : Computer-aided drug design, SIRT2, inhibitor, MCF-7, α-tubulin

Page Number : 190

Supervisor : Prof. Dr. Gökçen EREN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında değerli zamanını esirgemeyerek bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Gökçen EREN'e, doktora eğitimim boyunca gerekli çalışma ortamını sağlayan Anabilim Dalımızın çok değerli öğretim üye ve yardımcılarına, biyolojik aktivite çalışmalarını gerçekleştiren Gazi Üniversitesi Biyokimya ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN'a, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD Öğretim Üyesi Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ'e ve Ankara Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Erva ÖZKAN'a, SIRTeam çalışma grubumuzun değerli üyeleri; çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Mahmut GÖZELLE'ye, Ahmet Buğra AKSEL'e, Fikriye ÖZGENCİL'e ve Habibe Beyza GÜNİNDİ'ye şükranlarımı sunar, teşekkür ederim. Her zaman yanımda olup bana destek olan sevgili arkadaşlarım Özge KUYRUKÇU ÖZTÜRK'e ve Sultan PEKACAR'a, tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili aileme ve yakın zamanda kaybettiğim dedeme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde verdiği desteklerden ötürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK Proje No: 118S673), Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (TÜSEB Proje No: 16743), doktora sürecimin başından 2020 yılı Ocak ayına kadar 100/2000 Doktora Programı kapsamında bursiyeri olduğum Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Epigenetik ve Histon Deasetilazlar.....	7
2.2. Sirtuinler.....	8
2.2.1. Sirtuin 2 (SIRT2)	12
2.3. Selektif SIRT2 İnhibitörleri.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Kimyasal Çalışmalar	43
3.1.1. Materyal.....	43
3.1.2. Genel sentez yöntemleri.....	43
3.2. Analitik Çalışmalar	46
3.2.1. Erime derecesi tayini	46
3.2.2. İnce tabaka kromatografisi.....	46
3.2.3. Kolon kromatografisi.....	46
3.2.4. ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları	46
3.2.5. HRMS spektrumları.....	47
3.3. Moleküler Docking Çalışmaları.....	47

	Sayfa
3.4. <i>İn vitro</i> SIRT1, SIRT2, SIRT3 İnhibisyon Testleri	48
3.5. <i>İn vitro</i> Antiproliferatif Etki Çalışmaları	49
3.6. Western blot analizi.....	50
4. BULGULAR	51
4.1. Kimyasal Bulgular	51
4.2. Biyolojik Bulgular.....	130
4.2.1. <i>İn vitro</i> SIRT1-3 inhibitör etki	130
4.2.2. <i>İn vitro</i> antiproliferatif etki	134
4.2.3. Western blot.....	135
4.3. Moleküler Docking.....	136
5. TARTIŞMA	147
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	167
KAYNAKLAR	169
ÖZGEÇMİŞ	189

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Günümüze kadar aydınlatılmış insan SIRT2 x-ray kristal yapıları	20
Çizelge 4.1. S1.1-S1.23 ve S2.1-S2.7 kodlu bileşiklerin SIRT1-3 enzimlerine karşı %inhibisyon değerleri.....	131
Çizelge 4.2. S3.1-S3.4 kodlu bileşiklerin SIRT1-3 enzimlerine karşı %inhibisyon değerleri.....	132
Çizelge 4.3. Öncü ve referans bileşiklerinin SIRT1-3 enzimlerine karşı %inhibisyon değerleri.....	132
Çizelge 4.4. S1.12, S2.2, S.2.5, S3.1, S3.3 ve S3.4 kodlu bileşiklerin SIRT2 IC ₅₀ değerleri.....	133
Çizelge 4.5. MCF-7 hücre hattında seçilen bileşiklere ait %hücre canlılığı değerleri.....	134
Çizelge 4.6. MCF-7 hücre hattında seçilen bileşiklere ait IC ₅₀ değerleri.....	134
Çizelge 5.1. Seçilen bileşiklerin SIRT2 aktif bölgesinde meydana getirdikleri etkileşimler.....	157

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Öncü bileşik optimizasyonu için seçilen bileşikler ve tez kapsamını oluşturan bileşiklerin tasarımı.....	3
Şekil 1.2. İnsan SIRT2 enzim aktif bölgesini oluşturan amino asitler	5
Şekil 2.1. Sirtuinlerin katalizlediği deaçilasyon reaksiyonu mekanizması.....	12
Şekil 2.2. İnsan SIRT2 aktif bölgesi	18
Şekil 2.3. SirReal2-insan SIRT2 kompleksi (PBD: 4RMG).....	19
Şekil 2.4. Bileşik 1, 2 ve 3'ün kimyasal yapıları	22
Şekil 2.5. Bileşik 4, 5 ve 6'nın kimyasal yapıları	22
Şekil 2.6. Bileşik 7, 8 ve 9'un kimyasal yapıları	23
Şekil 2.7. Bileşik 10, 11, 12, 13 ve 14'ün kimyasal yapıları	24
Şekil 2.8. Bileşik 15, 16 ve 17'nin kimyasal yapıları	25
Şekil 2.9. Bileşik 18, 19, 20, 21, 22, 23 ve 24'ün kimyasal yapıları	25
Şekil 2.10. Bileşik 25'in kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.11. Bileşik 26, 27 ve 28'in kimyasal yapıları	26
Şekil 2.12. Bileşik 29, 30 ve 31'in kimyasal yapıları	27
Şekil 2.13. Bileşik 32, 33, 34 ve 35'in kimyasal yapıları.....	28
Şekil 2.14. Bileşik 36, 37, 38 ve 39'un kimyasal yapıları	28
Şekil 2.15. Bileşik 40, 41, 42 ve 43'ün kimyasal yapıları	29
Şekil 2.16. Bileşik 44 ve 45'in kimyasal yapıları	29
Şekil 2.17. Bileşik 46, 47, 48 ve 49'un kimyasal yapıları	30
Şekil 2.18. Bileşik 50 ve 51'in kimyasal yapıları	31
Şekil 2.19. Bileşik 52 ve 53'ün kimyasal yapıları	31
Şekil 2.20. Bileşik 54, 55, 56 ve 57'nin kimyasal yapıları	32
Şekil 2.21. Bileşik 58, 59 ve 60'ın kimyasal yapıları	33

Şekil	Sayfa
Şekil 2.22. Bileşik 61, 62, 63 ve 64'ün kimyasal yapıları	34
Şekil 2.23. Bileşik 65, 66 ve 67'nin kimyasal yapıları	35
Şekil 2.24. Bileşik 68, 69, 70 ve 71'in kimyasal yapıları	36
Şekil 2.25. Bileşik 72 ve 73'ün kimyasal yapıları	37
Şekil 2.26. Bileşik 74 ve 75'in kimyasal yapıları	37
Şekil 2.27. Bileşik 76 ve 77'nin kimyasal yapıları	38
Şekil 2.28. Bileşik 78, 79 ve 80'nin kimyasal yapıları	39
Şekil 2.29. Bileşik 81 ve 82'nin kimyasal yapıları	39
Şekil 2.30. Bileşik 83, 84 ve 85'in kimyasal yapıları	40
Şekil 2.31. Bileşik 86, 87, 88, 89, 90 ve 91'in kimyasal yapıları.....	41
Şekil 2.32. Bileşik 92 ve 93'ün kimyasal yapıları	41
Şekil 2.33. Bileşik 94'ün kimyasal yapısı.....	42
Şekil 4.1. Bileşik S1.1 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	63
Şekil 4.2. Bileşik S1.2 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	65
Şekil 4.3. Bileşik S1.3 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	67
Şekil 4.4. Bileşik S1.4 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	69
Şekil 4.5. Bileşik S1.5 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	71
Şekil 4.6. Bileşik S1.6 'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	73
Şekil 4.7. Bileşik S1.7 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	75
Şekil 4.8. Bileşik S1.8 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	77
Şekil 4.9. Bileşik S1.9 'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	79
Şekil 4.10. Bileşik S1.10 'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	81
Şekil 4.11. Bileşik S1.11 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	83
Şekil 4.12. Bileşik S1.12 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	85
Şekil 4.13. Bileşik S1.13 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	87

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. Bileşik S1.14 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	89
Şekil 4.15. Bileşik S1.15 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	91
Şekil 4.16. Bileşik S1.16 'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	93
Şekil 4.17. Bileşik S1.17 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	95
Şekil 4.18. Bileşik S1.18 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	97
Şekil 4.19. Bileşik S1.19 'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	99
Şekil 4.20. Bileşik S1.20 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	101
Şekil 4.21. Bileşik S1.21 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	103
Şekil 4.22. Bileşik S1.22 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	105
Şekil 4.23. Bileşik S1.23 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	107
Şekil 4.24. Bileşik S2.1 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	109
Şekil 4.25. Bileşik S2.2 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	111
Şekil 4.26. Bileşik S2.3 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	113
Şekil 4.27. Bileşik S2.4 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	115
Şekil 4.28. Bileşik S2.5 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	117
Şekil 4.29. Bileşik S2.6 'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	119
Şekil 4.30. Bileşik S2.7 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	121
Şekil 4.31. Bileşik S3.1 'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	123
Şekil 4.32. Bileşik S3.2 'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	125
Şekil 4.33. Bileşik S3.3 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	127
Şekil 4.34. Bileşik S3.4 'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları	129
Şekil 4.35. Test edilen bileşiklere ait Western blot analizi sonuçları. Önemli farklılıklar * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ şeklinde gösterilmiştir.....	136
Şekil 4.36. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (A) 5GN kodlu SirReal türevinin (PDB: 5DY4) ve (B) L5C kodlu inhibitörün (PDB: 5YQO) meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.	137

Şekil	Sayfa
Şekil 4.37. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5DY4) öncü bileşiklerin meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.....	138
Şekil 4.38. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5DY4) seçilen birinci seri bileşiklerin meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.	140
Şekil 4.39. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5DY4) seçilen ikinci seri bileşiklerin meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.	141
Şekil 4.40. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5YQO) üçüncü seri bileşiklerin meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.	142
Şekil 4.41. İnsan SIRT1 aktif bölgesinde (PDB: 4I5I) (A) EX-527 analogunun ve (B) S1.14' ün meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir..	143
Şekil 4.42. İnsan SIRT3 aktif bölgesinde (PDB: 4JSR)(A) 1NQ kodlu inhibitörün,(B) S3.1 'in ve (C) S3.4' ün meydana getirdiği etkileşimler.Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir..	145
Şekil 5.1. Selektif SIRT2 inhibitörleri için geliştirilen farmakofor model (ARRR)	147
Şekil 5.2. Öncü bileşiklerden hareketle ulaşılan <i>N</i> -ariloksaril-2-(ariltiyo)asetamit türevi bileşiklerin tasarımı.....	148
Şekil 5.3. <i>N</i> -ariloksaril-2-(metil(fenil)amino)asetamit, <i>N</i> -benzoilaril-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve <i>N</i> -benzoilaril-2-(ariltiyo)asetamit genel yapılarını taşıyan bileşiklerin tasarımı	150
Şekil 5.4. 1,1'-(9-okso-9 <i>H</i> -florein-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) türevi bileşiklerin tasarımı	152
Şekil 5.5. Test edilen bileşiklerin <i>in vitro</i> SIRT2 inhibitör etkileri.....	153
Şekil 5.6. Seçilen bileşiklerin <i>in vitro</i> SIRT1-3 inhibitör etkileri	153
Şekil 5.7. Test edilen bileşiklerin 72 saat süre sonunda MCF-7 hücrelerindeki etkileri. Önemli farklılıklar # $p < 0,000001$; ## $p = 0.002206$; * $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,01$ şeklinde gösterilmiştir.....	155
Şekil 5.8. Test edilen bileşiklere ait Western blot analizi sonuçları. Önemli farklılıklar * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ şeklinde gösterilmiştir.	156

Şekil**Sayfa**

Şekil 5.9. <i>N</i> -(3-/4-ariloksifenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevlerinin (S1.1-S1.23) ve <i>N</i> -(4-benzoilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevinin (S2.1) sentezi için izlenen sentez yöntemi.....	159
Şekil 5.10. <i>N</i> -(3-/4-ariloksifenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve <i>N</i> -(4-benzoilfenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit genel yapısına sahip bileşikler (S2.2-S2.7) için izlenen sentez yöntemi.....	160
Şekil 5.11. 1,1'-(9-Okso-9 <i>H</i> -florein-2,7-diil)bis(3-arilüre) genel yapısına sahip bileşikler (S3.1-S3.4) için izlenen sentez yöntemleri.....	160
Şekil 5.12. Seçilen bileşiklerin HRMS spektrumları	166



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
Å	Angstrom
β	Beta
δ	Delta, Kimyasal kayma
ϵ	Epsilon
Hz	Hertz
J	Etkileşim sabiti
κ	Kappa
π	Pi
MHz	Megahertz
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
mg	Miligram
mmol	Milimol
mM	Milimolar
ml	Mililitre
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir
rpm	Bir dakikada gerçekleştirilen dönüş veya devir sayısı
kcal	Kilo kalori
xg	Yerçekimi ivmesinin katları

Kısaltmalar	Açıklamalar
ADP	Adenozin difosfat
ALP	Alkalın fosfataz
ATP	Adenozin trifosfat

BubR1	Bub1 ilişkili protein kinaz
CDH	Kadherin
CDK4	Siklin bağımlı kinaz 4
CDK9	Siklin bağımlı kinaz 9
c-Myc	Hücrel miyelositomatoz onkogen
c-RAF	Proto-onkogen serin/treonin-protein kinaz
DIPEA	<i>N,N</i> -Diizopropiletilamin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
eIF5A	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 5A
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FOXO	Forkhead box transkripsiyon faktörü
G6PD	Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz
GATA4-5	GATA bağlama proteini 4 ve 5
HAT	Histon asetil transferaz
HDAC	Histon deasetilaz
HIF-1α	Hipoksi indüklenebilir faktör 1 α
HMVC	İnsan sitomegalovirüsü
IC₅₀	Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
JNK	Jun N-terminal kinaz
KRas4a	Kirsten rat sarkomu viral onkogen homologu 4a
LDH-A	Laktat dehidrojenaz A
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MLH1	MutL homolog 1
MMP-9	Matris metalloproteinaz 9
NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit
NFκB	Nükleer faktör kappa B
N-myc	Nöroblastoma ile ilişkilendirilmiş bir onkogen
NRF2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
p53	Tümör protein 53
p73	Tümör protein 73

p300	Tümör protein 300
PAR-3	Proteazla aktive olan reseptör 3
PARP1	Poli (ADP-Riboz) polimeraz 1
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDB	Protein veri bankası
PEPCK	Fosfoenolpiruvat karboksikinaz
PGAM	Fosfogliserik asit mutaz
Prdx-1	Peroksiredoksin-1
PRLR	Prolaktin reseptörü
RAS	Rat sarkomu
RB	Retinoblastoma proteini
RMSD	Kare ortalamalarının karekökündeki sapma
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
Sir2	Sessiz enformasyon düzenleyici 2
SirReals	Sirtuini yeniden düzenleyici ligantlar
SIRT	Sirtuin
Sirtuin	Sessiz enformasyon düzenleyici 2 homologu
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
TEA	Trietilamin
TIAM 1	T-hücreli lenfoma invazyonu ve metastaz indükleyici faktör 1

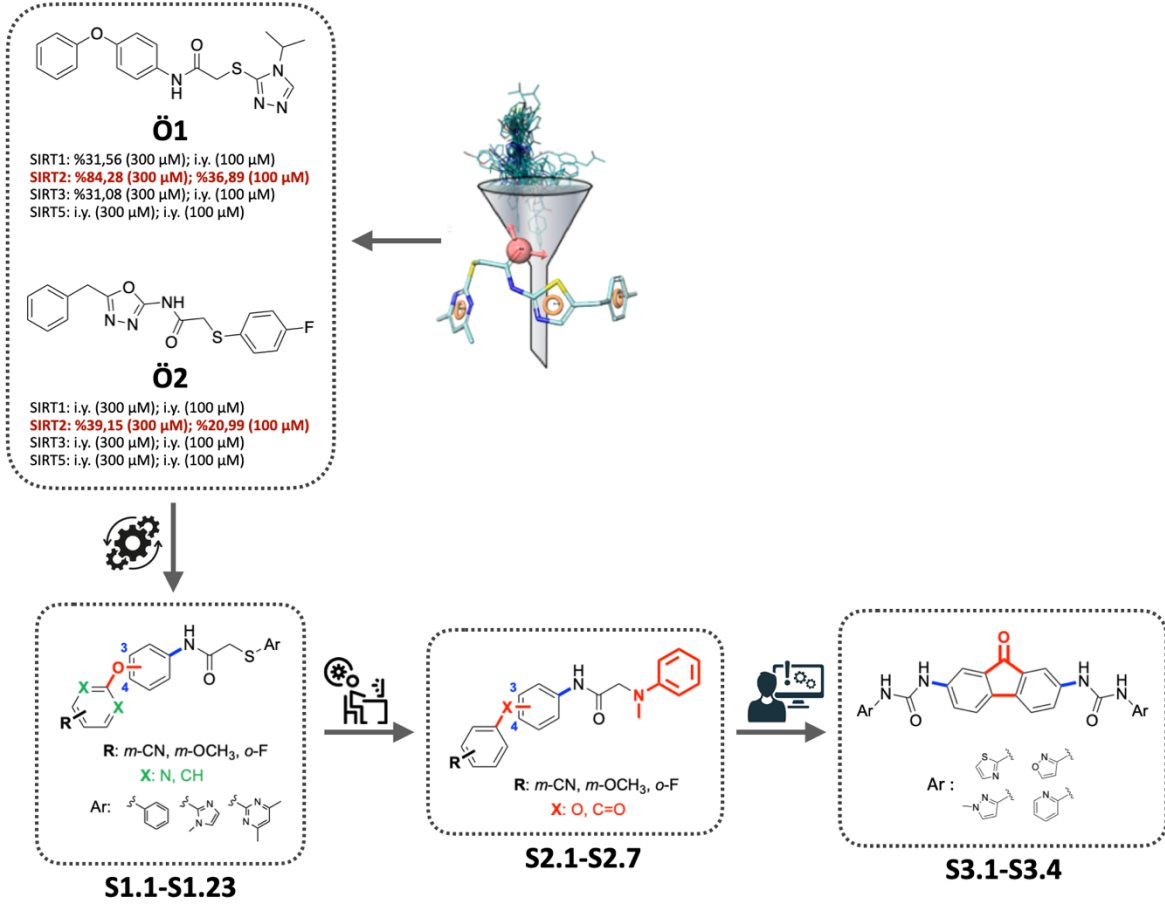
1. GİRİŞ

Epigenetik, organizmada DNA (deoksiribonükleik asit) baz diziliminden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen ve mitoz ve/veya mayoz bölünmeyle kalıtsal olarak aktarılabilen değişiklikleri tanımlamaktadır. Epigenetik mekanizmalar aracılığıyla DNA'da var olan genetik bilginin ifade edilmesi veya ifade edilmemesi sağlanmaktadır. Gen ifadesinin kontrolünü sağlayan pek çok epigenetik mekanizma bulunmakta [1, 2], histon asetilasyonu en önemli epigenetik mekanizmalardan birisini oluşturmaktadır. Histon asetilasyonu, DNA'nın histon proteini ile olan etkileşimini dolayısıyla genetik materyalin paketlenmesini azaltarak gen ekspresyonunu indüklemektedir. Histon deasetilasyonu ise DNA'nın histon proteini ile olan etkileşimini artırıp genetik materyalin paketlenmesini sağlayarak gen ekspresyonun baskılanmasına yol açmaktadır. Organizmada her iki reaksiyonu katalizleyen ve bir denge halinde görev yapan histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri bulunmaktadır. Özellikle HDAC'ların son yıllarda kanser, bakteriyel enfeksiyonlar, nörodejeneratif ve enflamatuvar hastalıklar başta olmak üzere pek çok hastalık için önemli bir terapötik hedef haline geldiği bildirilmektedir [3, 4].

Sınıf III HDAC ailesine mensup olan, sessiz enformasyon düzenleyici 2 homologu (sirtuin, SIRT) olarak anılan, tüm canlı gruplarında varlığını sürdürmüş sirtuinlerin, memelilerde farklı oranlarda dizilim benzerliği gösteren yedi izoformu (SIRT1-7) olduğu bildirilmektedir. SIRT1-7, hücresel lokalizasyonları, sahip oldukları substratları dolayısıyla katalitik aktiviteleri bakımından farklılık göstermektedirler. Sirtuinler, diğer HDAC'lardan farklı olarak katalitik aktiviteleri için nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) kofaktörüne ihtiyaç duymaktadırlar. Organizmada histon veya histon olmayan protein yapılarındaki lizin kalıntılarından farklı açıl gruplarının uzaklaştırılmasını sağlayarak apoptoz, metabolizma, hücre siklusu, genom stabilitesi gibi hücre için önemli biyolojik süreçlerde görev almaktadırlar [5-7]. Pek çok hastalığın ortaya çıkışını ve ilerleyişini etkileyen bu süreçlerde yer almaları, bu hastalıkların tedavileri adına yapılan çalışmalarda sirtuin enzimlerine olan ilgiyi artırmakta, sirtuin aktivitesini düzenleyebilen küçük molekül ağırlıklı bileşiklerin, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için potansiyel birer hedef olabilecekleri kabul görmektedir [8].

Sirtuin ailesinin araştırmacılar tarafından en çok ilgi gören ve üzerinde en çok çalışılan spesifik izoformlarından biri olan SIRT2, daha çok sitoplazmada görev yapmakla beraber mitoz bölünmenin G₂/M fazında hücre çekirdeğine taşınabilmektedir. Organizmada pek çok farklı işlevde kullanılan protein yapılarındaki lizin kalıntılarından asetil, 4-oksononanoil, miristoil, krotonoil ve benzoil gibi farklı açıl gruplarının uzaklaştırılmasını sağlayarak metabolizma, yaşlanma, enflamasyon ve apoptoz gibi fonksiyonlarda görev almaktadır [9-12]. SIRT2 aktivitesinin anormal işleyişinin, başta kanser olmak üzere kardiyovasküler, metabolik, psikolojik ve nörolojik pek çok hastalığın ortaya çıkışı ve ilerleyişinde rol aldığı bildirilmektedir [13]. SIRT2 ve hastalıkların gelişimi arasındaki ilişkiler incelendiğinde özellikle SIRT2 inhibisyonu sağlayan küçük molekül ağırlıklı bileşiklerin, tedavi açısından fayda sağladığı yürütülen çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Günümüze kadar SIRT2 enzim inhibisyonu sağlayan kimyasal yapı çeşitliliği fazla olan çok sayıda SIRT2 inhibitörü bileşik keşfedilmiştir [7, 14, 15]. Bu bileşikler, düşük çözünürlük, zayıf etkinlik ve izoform selektivitesi veya standartlara uygun olmayan ilaç-benzeri fizikokimyasal özellikleri sebebiyle klinik çalışmalara aday olamamıştır [16, 17]. Bu nedenle, ilaç olabilirlik özellikleri iyileştirilmiş, yüksek etkinlik ve selektiviteye sahip yeni SIRT2 inhibitör bileşiklerin keşfedilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır. Böyle bileşiklerin keşfedilmesi hastalıkların tedavisi açısından fayda sağlayacağı gibi, SIRT2'nin kanser gibi bazı hastalık gruplarındaki karmaşık rolünün daha iyi anlaşılmasına da katkı sağlayacağı düşünülmektedir [4, 18, 19].

Potent ve selektif SIRT2 inhibitörü keşfine katkı sağlamak amacıyla yürüttüğümüz çalışmalarımızda, ilk olarak selektif SIRT2 inhibitörü olarak bildirilen aminotiyazol türevi SirReal2 (sirtuini yeniden düzenleyici ligant 2) (SIRT2 IC₅₀=140 nM) ve analogları kullanılarak elde edilen farmakofor model ile sanal tarama çalışması gerçekleştirilmiş, tarama çıktısı bileşiklerin *in vitro* SIRT1, SIRT2, SIRT3 ve SIRT5 aktiviteleri belirlenmiştir [20]. Test edilen bileşiklerden asetamit yapısı taşıyan **Ö1** (*N*-(4-fenoksifenil)-2-([4-(propan-2-il)-4*H*-1,2,4-triazol-3-il]sülfanil)asetamit) ve **Ö2** (*N*-(5-benzil-1,3,4-oksadiazol-2-il)-2-([4-florofenil]sülfanil)asetamit) kodlu iki bileşik (Şekil 1.1), “öncü bileşik optimizasyonu” çalışmaları için seçilerek yapı üzerinde hedeflenen bölgelerde değişikliklere gidilmiş, tez çalışmamızın ilk bölümünü kapsayan *N*-ariloksiaril-2-(ariltiyo)asetamit yapısında yeni türevlerin (**S1.1-S1.23**) tasarımı için kullanılmıştır.



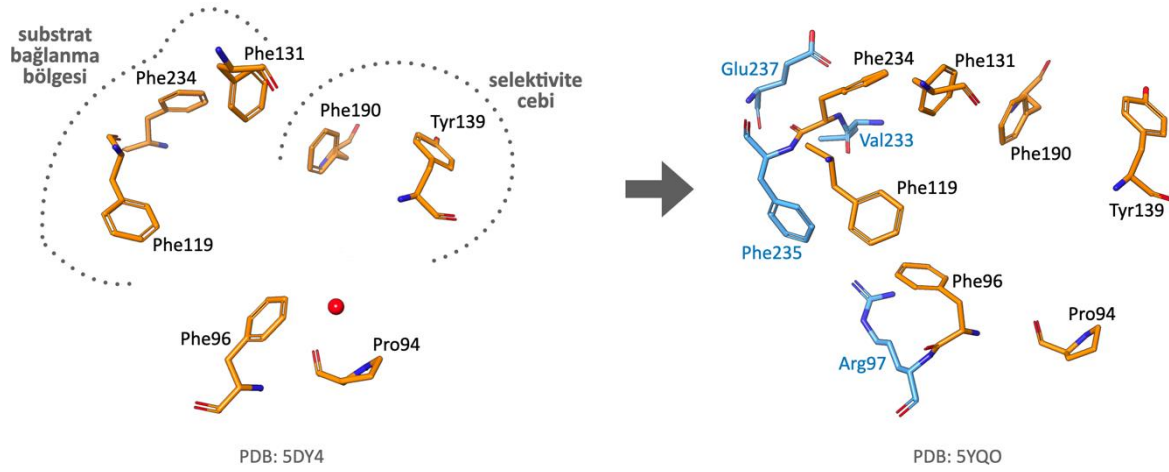
Şekil 1.1. Öncü bileşik optimizasyonu için seçilen bileşikler ve tez kapsamını oluşturan bileşiklerin tasarımı

Optimizasyon çalışması için seçilen öncü bileşikler, ortak bir yapı iskeleti taşıdıkları için yeni türevlerin tasarımında bu yapı korunmuş, değişikliğe gidilecek bölgelerin ve bu bölgelere gelecek yeni grupların seçiminde, bileşiklerin güçlü bir inhibisyon için SIRT2 aktif bölgesi ile gerekli kritik etkileşimleri sağlaması ve böylece enzim-inhibitör kompleksinin stabilitesinin artması esas alınmıştır. Sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanan bileşiklerin SIRT2 enzim aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* olarak test edilmiştir. Bu noktada elde edilen sonuçlar daha sonra tasarlanacak olan ikinci seri bileşikler için ön veri oluşturmuştur.

Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının ilk basamağında öncü bileşiklere göre daha güçlü ve selektif SIRT2 inhibitörlerine ulaşılmış, üzerinde değişikliğe gidilen bölgelerden özellikle aktif bölgenin giriş kısmına yerleşmesi beklenen fenil halkasındaki sübstituentlerin SIRT2 inhibisyonuna katkı verdiği belirlenmiştir. İkinci basamakta, araştırma grubumuz tarafından elde edilen diğer bileşiklere ait veriler ele alınarak, yapıdaki farklı aromatik

halkaların bağı olduğu kükürt atomunda ve diaril yapısını birbirine bağlayan oksijen köprüsünde değişikliklere gidilmiş, *N*-ariloksaril-2-(metil(fenil)amino)asetamit, *N*-benzoilaril-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve *N*-benzoilaril-2-(ariltiyo)asetamit genel yapılarını taşıyan yeni türevler (**S2.1-S2.7**) tasarlanmıştır.

Yang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmaya göre (PDB: 5YQO) SIRT2 inhibitör aktivite için daha önce bildirilen gerekli etkileşimlere ek olarak aktif bölge girişinde yer alan Phe235 ile kurulan π - π etkileşiminin, Arg97 ve Val233 ile kurulan hidrojen bağı etkileşiminin önemi vurgulanmıştır [21] (Şekil 1.2). Yeni tasarlanan bileşiklerde bu etkileşimlerin kurulabilmesi için, daha önce tasarlanan inhibitör bileşiklerin birbirine köprü atomlarıyla bağlı diaril yapısına Arg97 ve Val233 ile hidrojen bağı yapabilecek bir fonksiyonel grup köprüsü ile, Phe235 ile π - π etkileşimine girebilecek halkalı bir yapının süstitüe edilmesi gerektiğine karar verilmiştir. Elde etmiş olduğumuz SIRT2 inhibitör bileşikler ve SIRT2 aktif bölgesine dair bilgiler ışığında, daha aktif olduğu bulunan birbirine karbonil köprüsüyle bağlı diaril yapısı, 9*H*-flore-9-on halka sistemine çevrilmiş, aktif bölgenin giriş kısmında ve selektivite cebinde ön görülen etkileşimleri kurabilmesi için iki konumdan süstitüe edilmiştir. Ulaşılan yeni halka sistemi ile daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilen *m*-disüstitüe motifinin hizalanması sonucu 9*H*-flore-9-on halka sisteminin 2. ve 7. konumlarının, enzim aktif bölgesiyle etkileşimleri sağlaması beklenen aromatik yan zincir süstitüsyonu için uygun konumlar olduğu tespit edilmiş halka sistemi bu konumlardan süstitüe edilmiştir. Yan zincirlerinde üre köprüsü taşıyarak köprü yapısında yer alan karbonil grubu ile önemi vurgulanan Arg97 ve Val233 ile kurulan hidrojen bağı etkileşiminin kurulması hedeflenmiştir. Üre köprüsü farklı aromatik halka sistemleriyle bağlanmış böylelikle hem selektivite cebindeki Phe190 ve Tyr139 ile olan π - π etkileşiminin hem de aktif bölge girişinde yer alan Phe235 ile olan π - π etkileşiminin kurulması sağlanmaya çalışılmıştır. Bu hedefler ışığında merkezde yer alan 9*H*-flore-9-on halka sistemi ve bu halkanın 2. ve 7. konumlarına çeşitli aromatik heterosiklik yapıların üre köprüsü ile bağlanmasıyla oluşturulmuş dört adet 1,1'-(9-okso-9*H*-flore-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) türevi bileşik (**S3.1-S3.4**) tasarlanmış, sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanan bileşiklerin SIRT2 enzim aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* olarak test edilmiştir.



Şekil 1.2. İnsan SIRT2 enzim aktif bölgesini oluşturan amino asitler

In vitro SIRT2 enzim aktiviteleri belirlenen bileşiklerden SIRT2 enzim inhibisyonu %45 ve üzerinde olanların selektivite profillerinin belirlenmesi için SIRT1 ve SIRT3 enzim aktiviteleri üzerine etkileri *in vitro* olarak test edilmiştir. SIRT2 enzimine karşı inhibitör etkili bileşiklerin MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik etkileri belirlenmiş, yarattıkları antiproliferatif etkinin SIRT2'ye karşı gösterdikleri inhibitör etki ile ilişkisi incelenmiştir. Bu analize göre en aktif bulunan bileşiklerin, önemli bir SIRT2 substratı olan α -tubulinin asetilasyonu üzerine etkileri Western blot analizi ile belirlenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik ve Histon Deasetilazlar

Epigenetik, organizmanın genotipini oluşturan DNA'nın nükleotit dizilimini değiştirmeksizin gen ekspresyonunda meydana gelen, kalıtsal olarak aktarılabilen, kimyasal ve fiziksel değişiklikleri tanımlayan bir terimdir [3, 22]. Epigenetik mekanizmalar, DNA yapısında bulunan bazların metilasyonu, kodlanamayan RNA (ribonükleik asit) aktivitesi ve histon proteinlerinin asetilasyonu, metilasyonu, ubiquitinasyonu ve fosforilasyonu gibi post-translasyonel modifikasyonlar aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenlemektedirler [1, 23]. Epigenetik mekanizmaların anormal işleyişi, organizmada fizyolojik değişikliklere yol açmakla birlikte çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına da neden olmaktadır [24].

Gen ekspresyonun kontrolünü sağlayan en önemli epigenetik yapısal değişiklik, histon asetilasyonudur [25]. Ökaryotik organizmalarda DNA, hücre çekirdeğinde histon adı verilen özel proteinler ile paketlenmesi sonucu oluşan kromatin yapısı halinde bulunmakta [26], kromatin yapısında meydana gelen değişikliklerle genlerin ekspresyonu sağlanmaktadır. Gen ekspresyonu için kromatin yapısının gevşeyerek açılması gerekmekte, böylece ilgili transkripsiyon faktörlerinin DNA üzerinde hedefledikleri promotör bölgelere erişimlerine izin verilmektedir [27, 28]. Buna göre histon kuyruklarında yer alan pozitif yüklü lizin kalıntılarının ϵ -amino gruplarına negatif yüklü asetil grubunun bağlanmasıyla pozitif yük ortadan kalkmış olup, yerini kısmen nötral amit grubuna bırakmış olmaktadır. Böylece histon proteinin, negatif yüklü olan DNA molekülüyle etkileşimi azalmakta, kromatin yapısı gevşemekte ve DNA transkripsiyona açık hale gelmektedir. Bu durumun tam tersi olarak asetil gruplarının bağlı oldukları amino gruplarından ayrılmalarıyla birlikte DNA-histon etkileşimi artmakta, kromatin yapısı sıkılaşmakta, transkripsiyon faktörlerinin promotör bölgelere erişimleri engellenmekte ve gen transkripsiyonu baskılanmaktadır. Baskılanan gen transkripsiyonu sonucu gen ekspresyonu durdurularak gen sessizleşmesi sağlanmaktadır [29-31]. Organizmada histonların asetilasyonu, histon asetil transferaz (HAT), deasetilasyonu ise histon deasetilaz (HDAC) enzimleri tarafından katalizlenmektedir. Organizmada bu iki enzim aktivitesi arasındaki homeostaz, pek çok farklı fizyolojik veya patofizyolojik sürecin yönetilmesine aracılık etmektedir [32].

Epigenetik açıdan tüm organizmalarda gen ekspresyonunun önemli kontrol parametrelerinden biri olarak görülen HDAC'ların transkripsiyon, metastaz, hücre farklılaşması, apoptoz, otofaji, hücre siklusu, DNA hasar tamiri, anjiyogenez, stres yönetimi ve yaşlanma gibi hücresel süreçlerde görev almaları, birçok hastalığın tedavisi için önemli bir hedef haline gelmesine yol açmıştır [3, 33, 34].

HDAC'lar, yapısal özelliklerinin yanı sıra katalitik aktiviteleri ve hücresel lokalizasyonları bakımından da farklılık göstermektedirler. Hücre çekirdeğindeki aktivitelerin yanı sıra sitoplazmada da histon olmayan protein yapıları üzerinde etkinlik göstermektedirler [35]. Günümüze kadar tanımlanmış on sekiz memeli homologu olan HDAC'lar, yapılarında bulunan, kendilerine özgü kofaktörlere bağlı olarak çinko bağımlı HDAC'lar ve nikotinamid adenindinükleotit (NAD⁺) bağımlı HDAC'lar olmak üzere iki grup, yapısal benzerliklerine bağlı olarak da beş (HDAC I, IIa, IIb, III ve IV) grup altında incelenmektedirler [36].

2.2. Sirtuinler

Sirtuinler (sessiz enformasyon düzenleyici 2 ilişkili protein, SIRT), evrimsel açıdan bakteriden hayvanlara kadar olan tüm canlı gruplarında varlıklarını sürdürmüş, NAD⁺-bağımlı sınıf III HDAC ailesine mensup bir enzim grubudur. Histon (H1-K26Ac, H3-K9Ac, H4-K16Ac, H4-K20me, H3-K9me3, H3-K18Ac ve H3-K56Ac) veya transkripsiyon faktörleri, metabolik enzimler gibi histon olmayan (FOXO ailesi, KU70, p53, GATA4-5, Myc, HIF-1 α , MLH1, RB, p73, STAT3, α -tubulin, KRAS, CDH, PEPCK, PARP1 vb.) substratlarındaki lizin kalıntılarından açıl gruplarının geri dönüşümlü olarak uzaklaştırılmasını sağlayarak glukoz ve lipid metabolizması, yaşlanma, mitokondriyal biyogenez, DNA tamiri, apoptoz, enflamasyon, oksidatif stres, hücre sinyalizasyonu, transkripsiyon ve metabolizasyon gibi önemli biyolojik süreçlerde görev almaktadırlar [5, 37, 38]. Bu süreçlerin, çeşitli nedenlere bağlı olarak gerektiği gibi yönetilememesi durumunda kanser, diyabet, nörodejenaratif, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklar gibi patolojik tabloların ortaya çıkması söz konusu olmaktadır [39].

Sessiz enformasyon düzenleyici 2 (*Sir2*) olarak adlandırılan ilk sirtuin, *Saccharomyces cerevisiae* mayasında keşfedilmiştir [40]. *Sir2*'nin mayalarda eşleşme tipi lokusların,

telomerlerin ve ribozomal DNA'nın transkripsiyonunun engellenmesini sağladığı böylece mayaların replikatif yaşam süresini düzenlediği bildirilmiştir. *Sir2* geninin inaktive edilmesinin mayalarda replikatif yaşam süresinin kısalmasına, *Sir2* geninin aşırı ekspresyonunun ise replikatif yaşam süresinin uzamasına neden olduğu ortaya koyulmuştur [41, 42]. Daha sonrasında yapılan çalışmalarda, *Sir2*'nin NAD⁺-bağımlı histon deasetilaz enzim aktivitesine sahip olduğu, bu fonksiyonuna dayanarak mayalarda gen sessizleştirilmesi ve yaşam süresi üzerine etkili olduğu ifade edilmiş, ökaryot organizmalarda benzer aktiviteleri sağlamak üzere bulunabileceği belirtilmiştir [13, 43]. İlerleyen yıllardaki çalışmalarda ise, *Sir2* homolog genleri arka arkaya bakteri, solucan, sinek, bitki ve memelilerde izole edilmiş ve tüm organizmalarda var olduğu kanıtlanan *Sir2* homologu bu proteinlere sirtuin adı verilmiştir [44].

Memelilerde yedi *Sir2* homologu (SIRT1-7) bulunan sirtuinler, evrimsel açıdan varlığını sürdürmüş, yaklaşık 275 amino asit kalıntısından oluşan ortak bir katalitik NAD⁺ bağlama bölgesini içerirken, katalitik bölgeye komşu farklı uzunluk ve dizilim kompozisyonunda C- ve N-terminal bölgeleriyle birbirilerinden ayrılmaktadırlar. Bu durum, sahip oldukları substratlarının, enzimatik aktivitelerin, hedefledikleri bileşiklerin, etkileşimde oldukları epigenetik veya epigenetik olmayan proteinlerin ve hücresel lokalizasyonlarının farklılaşmasına yol açmaktadır [18, 45].

Memeli homologlarının lokalizasyonları ile aracılık ettikleri biyolojik aktiviteler paralellik göstermektedir. SIRT1 esas olarak hücre çekirdeğinde görev yaparken, zaman zaman sitozole taşınıp buradaki hedef proteinleri ile de etkileşmektedir. Kromatin yapısının düzenlenmesi, dolayısıyla gen ekspresyonunun kontrol altında tutulması, hücre siklusunun düzgün işleyişi ve hücre homeostazının sağlanması gibi fonksiyonlarda görev almaktadır. SIRT2 daha çok sitozolik izoform olarak bilinmekle birlikte, hücre siklusunun G₂ fazından metafaza geçişinde hücre çekirdeğine taşınmaktadır. Hücre çekirdeğinde bölünmenin metafaz evresinde histon H4 proteinin deasetilasyonunu katalizleyerek kromatin kondezasyonunu sağlamak ve mitoz kontrol noktası olarak çalışmaktadır. Diğer sitozolik sirtuinlere benzer şekilde DNA tamiri ve apoptoz gibi önemli süreçleri yönetmektedir. Sitozolda birincil fonksiyonu olan α -tubulin deasetilasyonu sayesinde özellikle oligodendrositlerde nöronal farklılaşmaya aracılık etmektedir. Mitokondride görev yapan

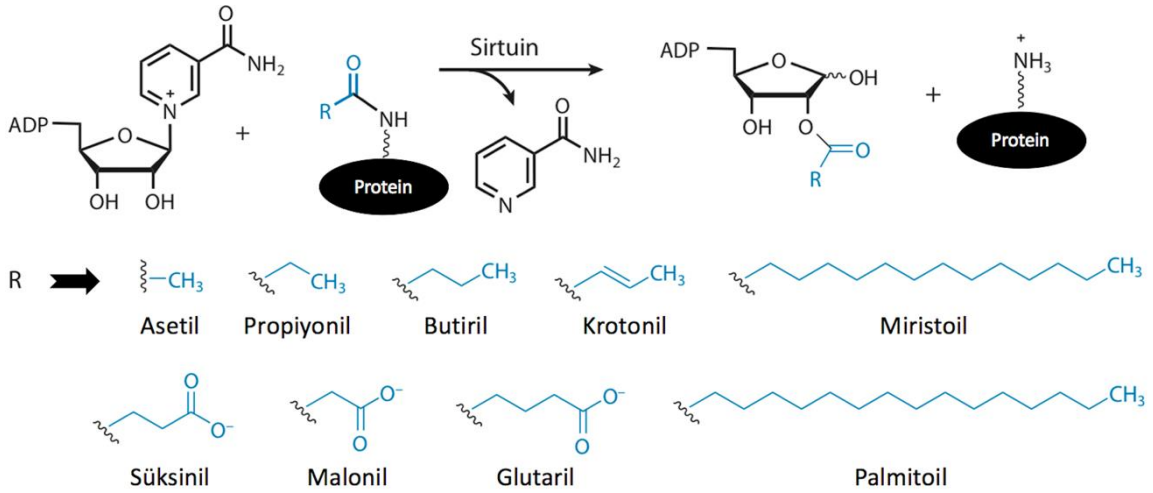
SIRT3-5, enerji metabolizması ve yaşlanma gibi süreçlerde yer almaktadırlar. Oksidatif stresin düzenlenmesi ve reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılması gibi fonksiyonları yerine getirerek ilgili olumsuz etkilerini azaltmaktadırlar. SIRT6 kromatin yapısında, SIRT7 ise çekirdekçikte bulunmaktadır; bu yüzden nükleer sirtuin türleri olarak da anılmaktadırlar. SIRT6, telomer sessizleştirilmesi, genom stabilizasyonu ve DNA hasar tamiri gibi aktivitelerde görev almaktayken; SIRT7 hücre proliferasyonu, apoptoz, rRNA ekspresyonu, ribozomal biyosentez ve stres yanıtının oluşturulması gibi fonksiyonların gerçekleştirilmesinde rol oynamaktadır [6, 7, 46].

Bilinen memeli sirtuinleri, farklı açıl gruplarının değişen düzeylerde deasetilasyonunu katalizlemektedirler. SIRT1-3 güçlü birer deasetilaz olarak, bunun yanı sıra SIRT3 deketonilaz, SIRT2 ise deketonilaz, demiristoilaz ve 4-oksononanoilaz olarak da görev yapmaktadır. SIRT4 ve SIRT6 deasetilaz aktivitelerin yanı sıra ADP (adenozin difosfat)-ribozil transferaz olarak çalışırken, SIRT6 ayrıca demiristoilaz ve depalmitoilaz aktivitesi göstermektedir [4, 47, 48]. SIRT5 malonil, süksinil, glutaril gruplarının lizin kalıntılarından uzaklaştırılmasını sağlayacak deasetilaz aktivitesi gösterirken, SIRT7 ise deasetilaz aktivitesinin yanı sıra histon desüksinilaz aktivitesi de göstermektedir [48-50].

Sirtuin homologlarının, farklı canlı gruplarına ait çok sayıda apo formunda veya substrat/inhibitör/aktivatör bağlı formlarda, yüksek çözünürlüklü üç boyutlu x-ray kristal yapıları aydınlatılmıştır [51]. Bu verilerden yola çıkarak homologların üç boyutlu yapıları ve katalitik mekanizmaları belirlenmiştir. Buna göre; katalitik bölge oval bir kıvrım yapısında olup, dört döngü ile birbirine bağlanan iki küresel alt bölgeden oluşmaktadır. Büyük alt bölge, NAD⁺/NADH bağlayıcı proteinler için spesifik olan Rossmann kıvrımından; küçük alt bölge ise oval şekilde olup Rossmann kıvrımına eklenen iki modülün birleşmesi sonucunda meydana gelerek çinko bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. Bu iki modülden biri, dört sistein kalıntısı ile koordine kovalent bağ kuran yapısal çinko iyonu taşımaktadır. Diğer modül ise, α -helikal yapıda olup sirtuin homologları arasında yüksek oranda farklılık gösteren özelliktedir [52, 53]. Rossmann kıvrımı bölgesi, farklı *Sir2* homologları arasında evrimsel açıdan korunmuş bir bölgeyken, çinko bağlanma bölgesi memeli homologlarının kendi içinde ve diğer türler arasında dizilim ve üç boyutlu yapı açısından daha fazla farklılık gösterdiği bölgeyi oluşturmaktadır. Bu farklılığın özellikle sirtuinlerin substrat spesifitesine

katkı sağladığı düşünülmektedir [54, 55]. Rossmann kıvrımı ve çinko bağlanma bölgesinin arasında, enzimin aktif bölgesi olarak bilinen, hem NAD^+ hem de asetile-lizin substratlarının bağlandığı derin ve esnek yapıda bir cep bulunmaktadır. Asetile-lizin kalıntısı içeren protein yapısı enzim aktif bölgesine bağlandığında biri Rossmann kıvrımında yer alan, diğeri Rossmann kıvrımı ile çinko bağlanma bölgesi arasında yer alan zincirlerle β -sheet benzeri etkileşimler kurduğu öne sürülmektedir [51, 56]. Kurulan etkileşimler sonucu çinko bağlanma bölgesinin Rossmann kıvrımı yönünde bükülerek substratın etrafındaki cebi kapattığı konformasyonel bir değişiklik meydana gelmekte, Rossmann kıvrımı ve çinko bağlanma bölgesinin birbirine bağlandığı bölgede substratın asetillenmiş lizin kalıntısının yerleştiği hidrofobik bir tünel oluşmaktadır. Tünel oluşumuyla enzim açık konformasyondan kapalı konformasyona geçmektedir [4, 52, 57]. Kapalı konformasyona dönüşüm, asetile-lizin substratı bağlanma bölgesinin hemen yanında yer alan kofaktör bağlanma bölgesine NAD^+ 'ın doğru konformasyonda yerleşmesine katkıda bulunmaktadır. Substratın bağlanıp enzimin kapalı konformasyona geçişinin ardından NAD^+ 'ın kofaktör bölgesine bağlanmasıyla deaçilasyon reaksiyonu başlamaktadır [58].

Lizin deaçilasyonu tüm memeli sirtuin izorfomlarında benzer mekanizma üzerinden yürümektedir. Reaksiyon açıl grubundaki karbonil oksijeninin NAD^+ yapısındaki riboza C1' pozisyonundan atağı ile başlamakta, sonuçta nikotinamit ve ADP-ribozil alkilamidat açığa çıkmaktadır. İkinci basamakta sirtuin aktif bölgesinde korunmuş histidin amino asiti NAD^+ 'ın 3'-OH grubunu deprotonize edip ardından 2'-OH grubunun deprotonize edilmesine aracılık etmektedir. Oluşan deprotonize grup ADP-ribozil alkilamidata atak ederek 1',2'-siklik yapıda bir ara ürünün oluşmasını sağlamaktadır. Son basamakta açıl grubunun 2'-OH grubuna transferi gerçekleşerek deaçile lizin ve 2'-O-açill ADP-riboz ürünleri oluşmaktadır (Şekil 2.1) [37, 59-61].



Şekil 2.1. Sirtuinlerin katalizlediği deaçilasyon reaksiyonu mekanizması

Sirtuinlerin, organizmada çok yönlü olarak birçok fizyolojik fonksiyonda görev almaları, bu fonksiyonların anormal işleyişinde ortaya çıkan hastalıklarla ilişkilendirilmelerine yol açmaktadır. Sirtuinlerin enzimatik aktivitelerinin düzenlenmesini hedefleyen tedavi yaklaşımlarının, bu hastalıkların ortaya çıkışı veya ilerlemesini önlemek adına umut vadeci bir strateji olduğu düşünülmektedir [46].

2.2.1. Sirtuin 2 (SIRT2)

Sirtuin ailesinin üzerinde en çok çalışılan spesifik izoformlarından biri olan SIRT2, daha çok sitoplazmada görev yapmakla beraber mitoz sırasında hücre çekirdeğine taşınabilmektedir [62]. SIRT2, en fazla oranda beyinde, bunun dışında yumurtalık, yemek borusu, kalp, karaciğer, akciğer, testisler, tiroid ve dalak dahil olmak üzere çeşitli organlarda eksprese edilmektedir [63].

Hücre döngüsü ile ilişkili enzimler ve metabolik enzimler (G6PD, PEPCK1, PGAM, LDH-A, CDK9, BubR1), transkripsiyon faktörleri (p300, FOXO1, FOXO3, NFκB, HIF-1α), hücre sinyalizasyonunda görevli bileşenler (PRLR, TIAM 1, K-Ras4a, PAR-3) ve yapısal proteinlerin (α-tubulin, keratin 8) yer aldığı histon (H4K16, H3K18, H3K56) veya histon olmayan substratlarının deaçilasyon reaksiyonlarını katalizleyerek hücre döngüsü, farklılaşma, enerji metabolizması, yaşlanma ve hücre göçü gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer almaktadır [63-66]. Asetil grubunun uzaklaştırmasına ek olarak 4-oksononanoil, miristoil, krotonoil ve

benzoil gibi farklı açıl gruplarının lizin kalıntılarından uzaklaştırılmasını da sağlamaktadır [9-12].

Mitoz bölünmenin G₂/M fazında hücre çekirdeğinde SIRT2 seviyelerinin arttığı ve aşırı SIRT2 ekspresyonunun mitotik fazın uzamasını sağlayıp herhangi bir stres sinyaliyle karşı karşıya kalan veya hasarlı DNA içeren hücrenin bir sonraki faza geçişini engelleyerek işlenmesini önleyen mitotik bir kontrol noktası olarak görev yapmaktadır [67, 68]. Bunun yanı sıra SIRT2, replikasyonun durdurulmasını önlemek için gerekli bir protein olan siklin bağımlı kinaz 9'un (CDK9) deasetilasyonunu sağlayıp onu aktive ederek replikasyona bağlı stres yanıtlarının yönetilmesini düzenlemekte, böylece genom stabilitesine katkı sağlamaktadır [69]. SIRT2, yapısal bir protein olan α -tubulinin deasetilasyonunu sağlayarak, mikrotübül stabilitesini etkilemekte, böylece hücre canlılığı, hücre göçü ve hücre bölünmesi gibi süreçlerin yönetilmesinde rol oynamaktadır [70]. Hücrel redoks reaksiyonlarının devamlılığının sağlanmasında ve oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasında önemli rolü olan glikoz-6-fosfat dehidrogenazı (G6PD) aktive ederek oksidatif hasara karşı hücrelerin korunmasına aracılık etmektedir [71]. SIRT2 ayrıca glukoz homeostazında ve insülin duyarlılığında da rol oynamaktadır; deasetilasyon aracılığıyla fosfoenolpüüvat karboksikinazı (PEPCK) aktive ederek glukoz yoksunluğunda glukoneogenezi arttırmaktadır [72]. SIRT2, O sınıfı forkhead box transkripsiyon faktörü 1'in (FOXO1) deasetilasyonunu düzenleyerek onun hücre çekirdeğinde artan miktarına bağlı olarak adipogenezin inhibisyonuna yol açmaktadır [73]. SIRT2, bakteri aracılı konakçı hücre gen ekspresyonunun, H3K18'nin deasetilasyonu aracılığıyla yeniden programlanmasında yer alarak bakteriyel enfeksiyonlarda rol oynamaktadır [74]. SIRT2 ayrıca farelerde mitotik kontrol noktası kinaz BubR1'i deasetilleyerek hücre döngüsünün durmasını dolayısıyla yaşlanma etkilerinin tersine çevrilmesini ve ortalama yaşam süresinin uzamasına aracılık etmektedir [75].

SIRT2'nin sahip olduğu fazla sayıdaki substratlar ve aracılık ettikleri hücrel fonksiyonlar göz önüne alındığında anormal işleyişinin nörolojik ve metabolik hastalıkların yanı sıra kanser başta olmak üzere pek çok hastalığın ortaya çıkışı veya ilerleyişinde rol oynayabileceğini işaret etmektedir [76]. SIRT2 hemen hemen tüm beyin hücrelerinde, özellikle merkezi sinir sistemindeki oligodendrositlerde eksprese edilmektedir ve dolaylı

olarak nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisiyle ilgili hücresel süreçlerde yer almaktadır [77]. Protein agregasyonu ve metabolik bozuklukların eşlik ettiği kompleks bir patogenezi olan Huntington hastalığında SIRT2 inhibisyonunun, sterol biyosentezini düzenleyip mutant huntingtin proteini toksisitesini azalttığı ve Huntington hastalığına ait hücresel ve omurgasız hayvan modellerinde nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir [78, 79]. SIRT2 aktivitesinin Alzheimer hastalığında amiloid β ($A\beta$) agregasyonunu ve tau proteini fosforilasyonuna aracılık ederek hastalığın ortaya çıkışına katkı sağladığı gösterilmiştir. SIRT2 inhibisyonunun, mikrotübül stabilizasyonunu sağlayıp otofajiyi artırıp toksik $A\beta$ oligomerlerini ortadan kaldırarak nöronların sağ kalımını desteklediği, ayrıca tau fosforilasyonunu azaltarak kognitif fonksiyonların geri kazanılmasına aracılık ettiği gösterilmiştir [80, 81]. α -Sinüklein gibi patolojik proteinlerin biriktiği ve dopaminerjik nöronlarda aşırı kayıp ile karakterize ilerleyici bir hastalık olan Parkinson hastalığında ise SIRT2 inhibisyonunun, asetile α -sinüklein miktarını artırıp, α -sinüklein agregasyonunu ve toksisitesini azalttığı ve α -sinüklein agregatlarının ortadan kaldırılmasını sağlayan alkaline fosfat (ALP) aktivitesini indüklediği ifade edilmiştir [82, 83].

SIRT2'nin iskemik inme ile de ilişkili olduğu bulunmuştur. SIRT2'nin, inmeden sonra bazı beyin bölgelerinde yüksek oranda eksprese edildiği, SIRT2 nakavt farelerde inme sonrası daha az nörolojik hasarın gözlemlendiği bildirilmiştir [84]. Beyin dokusunda kronik stresin SIRT2 ekspresyonunu artırdığı gözlenirken monoaminerjik antidepresanların SIRT2 ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiş ve yapılan çalışmalar SIRT2 inhibisyonunun glutamat ve serotonin sistemlerini modüle ederek antidepresan benzeri etkileri indüklediğini göstermiştir [85]. Otizm spektrum bozukluğuna ait fare modelinde SIRT2 geninin silinmesiyle FOXO1'in asetilasyonunun arttığı, otofaji yoluyla bozukluğa bağlı gelişen hipokampüsteki fazla nöron sayısının ve artmış nöroenflamasyonun önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir [86].

SIRT2 glukoz homeostazında ve insülin duyarlılığında görev alması sebebiyle metabolik hastalıkların başında gelen diyabet hastalığı ile de ilişkilendirilmiştir. SIRT2'nin glukoneogeneze görevli bir enzim olan PEPCK'yı aktive ettiği ve hastalık patogeneziye katkı sağladığı gösterilmiştir. Karaciğerde SIRT2 inhibisyonunun, PEPCK1'in asetilasyonunu artırıp inaktif olmasıyla glukoneogenezi inhibe edebileceği bildirilmiştir [87, 88]. Bunun

yanı sıra kardiyak hipertrofiye sahip farelerde SIRT2 ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiş ve yapılan çalışmalar sonucunda kardiyak dokularda SIRT2'nin aşırı ekspresyonunun anjiyotensin II kaynaklı kardiyak hipertrofiye ve fibroze karşı kalbi koruduğu gösterilmiştir [89]. SIRT2'nin deneysel alerjik astımatik enflamasyon gelişimini tetiklediği, SIRT2 yıkımının azalmasının ve genetik olarak SIRT2 ekspresyonunun artmasının astım patofizyolojisini kötüleştirdiği ifade edilmiştir [90].

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, pek çok farklı kanser türünde SIRT2 aktivitesinin anormal işlediğini ve kanser başlangıcını ve ilerleyişini etkilediğini ve SIRT2'nin tümör mikroçevresini düzenleyen süreçlerde yer aldığını ortaya koymuştur [19]. Bununla birlikte, SIRT2'nin tümör baskılayıcı olarak mı yoksa tümör oluşumunu teşvik edici olarak mı işlev gördüğü henüz net olarak belirlenememiştir. Bu durumun SIRT2'nin tümördeki moleküler mekanizmalarının çok karmaşık olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir [91]. İlgili dokularda SIRT2 ekspresyon seviyelerine ve işlevlerine bağlı olarak hücre tipine, tümör evresine ve dokuya özgü etkilerin ortaya çıktığı görülmüştür [64].

Tümör oluşumunu teşvik edici olarak işlev gördüğü kanser türlerinde, kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından fark edilmesini önlemek için enerji metabolizmasını indüklediği, bağışıklık sisteminden kaçışı indüklediği ve tümör mikroçevresinde değişiklikler yaptığı ortaya koyulmuştur [92]. Bulunduğu dokudaki metabolik süreçleri yöneterek DNA tamir mekanizmalarını ve hücre siklusu kontrolünü devre dışı bıraktığı, invazyonu, kanser hücre göçünü, proliferasyonunu ve büyümesini artırdığı bildirilmiştir [93-95]. SIRT2 ekspresyonundaki artışa bağlı olarak bağışıklık sisteminin tümör baskılanmasını sağlayan T lenfositleri ve doğal öldürücü hücrelerin tümör mikroçevresinde fonksiyonlarının ve proliferasyonun baskılanmasını sağladığı ortaya koyulmuştur. Melanomada SIRT2'nin farmakolojik olarak inhibisyonun bu hücrelerin tümör bölgesine göçünü artırıp tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir [96]. Gastrik kanserde, SIRT2'nin PEPCK1 proteinin seviyelerini ve mitokondriyal aktivitesini artırdığı ayrıca RAS/ERK/JNK/MMP-9 yolağını aktive ederek tümör hücre göçünü ve invazyonunu indüklediği gözlemlenmiştir [97]. Hücre siklusu kontrolünün ve DNA tamir mekanizmalarının bozulduğu üçüncü seviye agresif özellikte meme kanseri hücrelerinde SIRT2 seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuş, bu durumun nüksü ve ölümü hızlandırabileceği bildirilmiştir [93]. Ayrıca SIRT2'nin N-Myc ve c-

Myc onkogenlerinin stabilitesini sağlayarak nöroblastoma ve pankreas kanseri hücrelerinde proliferasyonu artırdığı ortaya koyulmuştur [98].

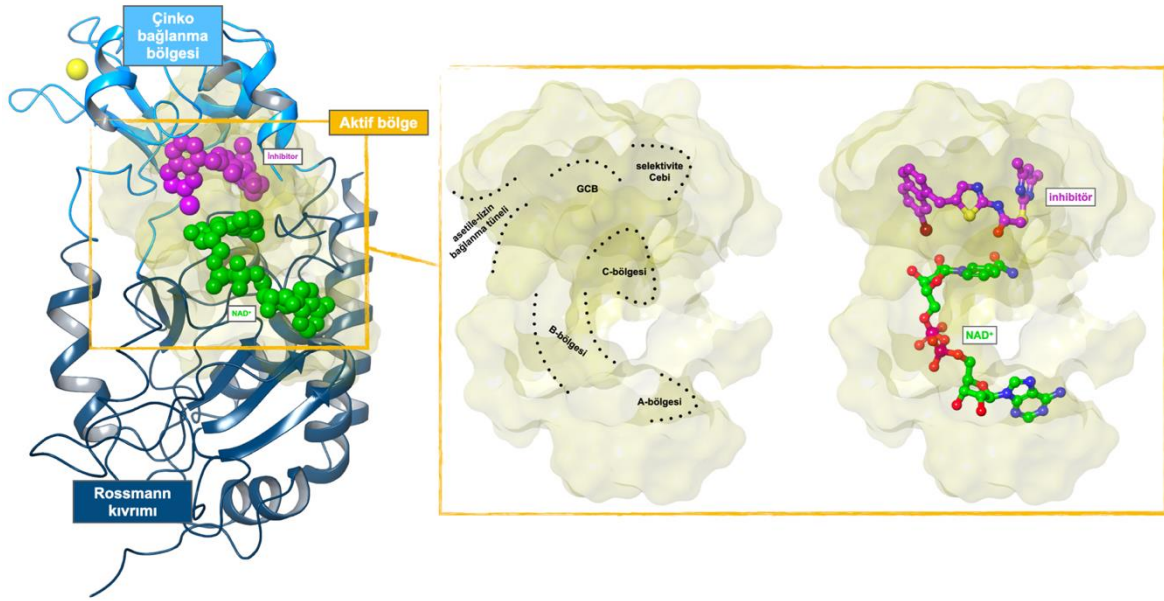
Tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü kanser türlerinde ise, fibroblast aktivitesini ve anjiyogenezi inhibe ettiği, apoptozu indüklediği ayrıca hücre bütünlüğünün sağlanmasını, hücre proliferasyonunun kontrolünü ve DNA hasarında görevli substratların aktive olmasını sağladığı ortaya koyulmuştur [99]. Bunun yanı sıra, SIRT2'nin mitotik kontrol noktası olarak görev yaptığı ve mitoz sürecini düzenleyerek kromatin kondenzasyonunu ve hiperploidi oluşumunu önlediği de gösterilmiştir. SIRT2 ekspresyonun aşırı artışının kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonu ve hücre göçünü önemli ölçüde baskıladığı ortaya koyulmuştur [100]. Meme kanserinde SIRT2'nin sadece tümör başlatıcı etkisi olmadığı aynı zamanda tümör baskılayıcı etkisi de olduğu ifade edilmiştir. Meme kanserinde SIRT2'nin peroksiredoksin-1'in (Prdx-1) antioksidan aktivitesini inhibe ettiği kanser hücrelerini reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan DNA hasarına ve sitotoksositeye duyarlı hale getirip kanser hücrelerinde apoptoza yol açtığı bildirilmiştir [101]. Buna ek olarak SIRT2'nin ATP (adenozin trifosfat)-sitrat liyazın yıkımına katkı sağlayarak lipid biyosentezini önleyip tümör büyümesini azalttığı ileri sürülmüştür [102]. Seröz yumurtalık kanserinde SIRT2'nin aşırı ekspresyonun karsinogen özellikle CDK4 (siklin bağımlı kinaz 4)'ün yıkımına katkı sağlayarak hücre kolonizasyonunu, hücre göçünü ve invazyonunu azalttığı bildirilmiştir [103].

Yapılan tüm araştırmalar sonucunda SIRT2'nin kanser gelişimi veya tedavisi konusunda oldukça önemli etkileri olduğu keşfedilmiş, ancak etkilerinin ne yönde olduğu konusundaki çelişkiler henüz giderilememiş ve enzim inhibisyonu ile antikanser etki arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, güçlü ve seçici SIRT2 inhibitörlerinin geliştirilmesi; ilgili moleküler mekanizmaları araştırmak ve kanser veya diğer ilgili hastalıklarla savaşan potansiyel ajanlar geliştirmek için önemli bir amaç haline gelmiştir.

İnsan SIRT2 enzimi, toplamda 389 amino asitten oluşmakta; 304 amino asitten oluşan bir katalitik çekirdek, 52 aminoasitten oluşan N-terminal bölgesi ve 33 amino asitten oluşan C-terminal bölgesini içermektedir. N-terminal bölgesi, sitoplazmik lokalizasyondan sorumlu, çoğunlukla düzensiz ve esnek yapıdaki nükleer çıkış sekansına sahipken, serin amino

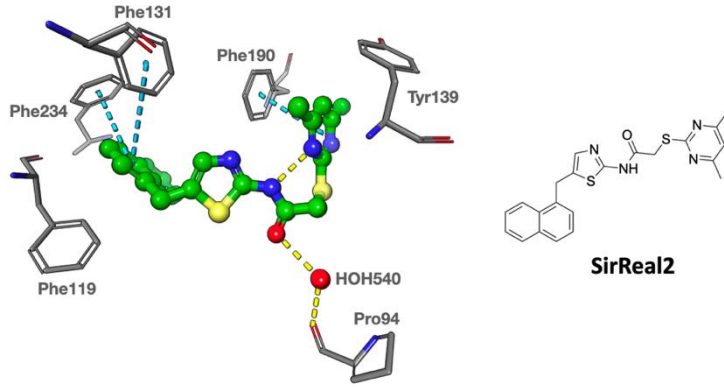
asitlerince zengin olan C-terminal bölgesi, tirozin ve serin kalıntılarının fosforilasyonu ve lizin kalıntılarının asetilasyonu yoluyla enzim aktivitesini modüle etmektedir [104-106].

İnsan SIRT2 yapısı, sirtuinler için tipik olan, Rossmann kıvrımı bölgesi ve çinko bağlanma bölgesi olarak anılan iki ana bölgeden meydana gelmektedir. Bu bölgeler, substrat ve kofaktörün bağlandığı enzim aktif bölgesi olarak bilinen büyük hidrofobik bir yarık ile birbirinden ayrılmaktadır. SIRT2'nin aktif bölgesi NAD⁺-bağlanma bölgesi, selektivite cebi, genişletilmiş C-bölgesi ve asetile-lizin bağlanma tüneli şeklinde dört ana kısımda incelenmektedir. NAD⁺-bağlanma bölgesi; NAD⁺'ın adenin riboz kısmının bağlandığı A-bölgesi, nikotinamide bağlı ribozun bağlandığı B-bölgesi ve nikotinamit kısmının bağlandığı katalitik merkezi de içeren C-bölgesinden oluşmaktadır. Sirtuin enzimlerinin fizyolojik inhibitörü olan nikotinamidin bağlandığı genişletilmiş C-bölgesi ise C-bölgesinin bitişiğinde yer almaktadır. Hidrofobik karaktere sahip asetile-lizin bağlanma tüneli, NAD⁺-bağlanma bölgesi ve asetile-lizin bağlanma bölgesini birbirine bağlamaktadır (Şekil 2.2) [106, 107]. Günümüze kadar keşfedilen SIRT2'nin çeşitli ligantlarıyla olan x-ışını kristal yapıları yeni keşfedilecek bileşiklerin tasarımına yol gösterirken, SIRT2 enzim yapısının, substrat veya ligantların bağlanma mekanizmalarının ve SIRT2'nin çeşitli hücrel biyolojik süreçlerdeki rollerinin aydınlatılmasına ışık tutmuştur [4, 7]. SIRT2'ye ait kristalografik analizler, uzun zincirli yağ açıl gruplarının bağlanmasını sağlayabilen, ayrıca inhibitör bileşik geliştirmek için spesifik yapısal özellikleri temsil eden, uzun ve hidrofobik bir bağlanma cebine sahip olduğunu ortaya koymuştur [14].



Şekil 2.2. İnsan SIRT2 aktif bölgesi

Araştırmacılar, selektif SIRT2 inhibitörü olan SirReal2 ile kompleks halinde olan ilk SIRT2 x-ray kristal yapısından (PDB: 4RMG) yola çıkarak çinko bağlanma bölgesinin hemen yanında, inhibitör bileşiğin bağlanmasıyla birlikte indüklenme sonucu konformasyonel değişikliklerle meydana gelebilen ve selektivite cebi olarak anılan hidrofobik özellikte bir bağlanma cebinin varlığını öne sürmüştür. Bu cebin SIRT2 izoformu için seçiciliği sağlamak üzere yeni veriler sunacağı ileri sürülmüştür. İndüklenme sonucu selektivite cebinin meydana gelmesiyle birlikte asetile-lizin bağlanma bölgesinde deasetilasyon reaksiyonun ve kapalı konformasyona geçişin engellendiği bildirilmiştir [106]. SirReal2'nin aminotiyazol grubunun genişletilmiş C-bölgesini işgal ettiği, naftil grubunun asetile-lizin bağlanma bölgesine yerleştiği ve buradaki bazı amino asitlerle (Phe131, Ile232, Val233, Phe234, Leu134 ve Ile169) ve NAD⁺'ın nikotinamit kısmıyla van der Waals etkileşimleri kurduğu, dimetilmerkaptopyrimidin kısmının ise genişletilmiş C-bölgesinin ötesinde selektivite cebinin oluşumunu indüklediği, oluşan cepte Phe190 ile π - π etkileşimi kurduğu ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra, karbonil oksijeni ve Pro94 arasında yapısal su molekülü (HOH540) aracılı hidrojen bağı etkileşiminden bahsedilmiştir. SirReal2'nin sahip olduğu amit azotu ile pirimidin halkasına ait azotlardan biriyle molekül içi hidrojen bağı kurduğu böylece daha rijit bir konformasyonda enzim aktif bölgesine yerleştiği bildirilmiştir (Şekil 2.3) [106, 108].



Şekil 2.3. SirReal2-insan SIRT2 kompleksi (PDB: 4RMG)

İlerleyen yıllarda farklı ligant ve substratları içeren x-ray kristal yapıların (Çizelge 2.1) aydınlatılmasıyla beraber, örneğin; SIRT2'nin 2-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)tiyo)-N-(3-(fenoksimetil)fenil)asetamit çekirdeği taşıyan inhibitör ile kompleksinde (PDB: 5YQO) olduğu gibi, selektivite cebine bağlanmanın yanı sıra enzim aktif bölgesinin girişinde asetile-lizin bağlanma bölgesinde yer alan hidrofilik özellik taşıyan Val233 ve Arg97 gibi amino asitleriyle hidrojen bağ etkileşimlerinin, His187 ve Phe235 ile de π - π etkileşimlerinin kurulmasının, enzim aktivitesinin daha potent bir şekilde inhibisyonun sağlanmasına yol açtığı gösterilmiştir [109].

Diğer sirtuin izoformlarına ve çinko-bağımlı deasetilazlara karşı inaktif bulunan selektif SIRT2 inhibitörü NPD11033'ün SIRT2 enzimiyle olan kristalografik analizleri sonucunda çinko bağlanma bölgesinde meydana gelen konformasyonel değişikliğin ardından asetile-lizin bağlanma bölgesinin derinliklerinde hidrofobik bir cep oluşturduğu öne sürülmüştür. Oluşturulan bu cebin hidrofobik özellikte olan fenilalanin (Phe96, Phe119, Phe131, Phe190 ve Phe235) ve izolösin (Ile93, Ile169 ve Ile232) amino asitleriyle çevrelendiği ifade edilmiştir. Bu cebin girişinde yer alan His187 ile NPD11033'ün oksopiridil grubu oksijeni arasında bir hidrojen bağ etkileşimi kurulduğu vurgulanmıştır [66].

SIRT2-ADP-riboz ile 1,2,4-oksadiazol türevi bileşiğe ait kristalografik analizler sonucunda bileşiğin büyük ve hidrofobik asetile-lizin bağlanma bölgesinde daha önce örneği görülmemiş bir şekilde Leu134 ve Leu138 ile etkileşim kurarak SIRT2'ye özgü farklı bir alt cebi işgal ettiği öne sürülmüştür. Ortaya atılan bu alt cebin yeni selektif SIRT2 inhibitörü bileşiklerin tasarımına fayda sağlayabileceği ifade edilmiştir [110].

Çizelge 2.1. Günümüze kadar aydınlatılmış insan SIRT2 x-ray kristal yapıları

PDB	Ko-kristalize ligant	Yıl	Kaynak
1J8F	-	2001	[104]
3ZGV	ADPR	2013	[105]
3ZGO	-		
4L3O	Makrosiklik peptit S2iL5	2013	[111]
4RMJ	ADPR ve nikotinamit	2015	[106]
4RMI	SirReal1 ve Ac-Lys-OTC peptit		
4RMH	SirReal2 ve Ac-Lys-H3 peptit		
4RMG	SirReal2 ve NAD ⁺		
4R8M	BHJH-TM1 peptit	2015	[112]
5D7Q	ADPR ve CHIC35	2015	[113]
5D7P	ADPR ve EX243		
5D7O	ADPR		
4Y6Q	2-O-miristoil-ADPR	2015	[60]
4Y6O	Miristoile peptit (TNF-alphaK20myr)		
4Y6L	Miristoile peptit (H3K9myr)		
5DY4	SirReal analogu ve NAD ⁺	2016	[108]
5DY5	SirReal prob fragmanı	2016	[114]
5FYQ	13-mer trifloroasetile Ran peptit	2016	[115]
5G4C	4-ONil peptit	2016	[116]
4X3P	Miristoil peptit	2017	[117]
4X3O	Miristoil peptit		
5MAT	Tiyenopirimidinon türevi inhibitör	2017	[118]
5MAR	1,2,4-Oksadiazol türevi inhibitör ve ADPR	2017	[110]
5Y5N	Selektif inhibitör 8NO	2017	[119]
5Y0Z	NPD11033	2018	[66]
5YQL	Selektif inhibitör A2I	2018	[120]
5YQM	Selektif inhibitör A29		
5YQN	Selektif inhibitör L55		
5YQO	Selektif inhibitör L5C		
6QCN	Kersetin ve ADPR	2019	[121]
6NR0	Glukoz-TM-1beta ve 1'-SH ADPR	2019	[122]
6L65	Miristoile peptit (H3K18)	2020	Yayınlanacak
6L66	Miristoile peptit (H3K18) ve NAD ⁺		
6L71	Peptit	2021	Yayınlanacak
6L72	Peptit		
7BOS	Miristoil tiyoüre inhibitörü, No. 13	2021	[123]
7BOT	Miristoil tiyoüre 20nhibitörü, No. 23		
7T1D	Allosterik inhibitör 359	2023	[124]

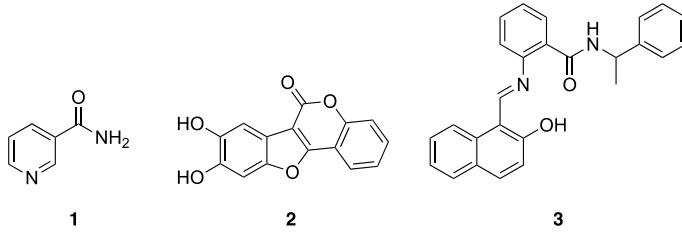
Ligant bağlanma bölgelerinin sahip olduğu dinamiklerin belirlenmesini sağlayan bilgisayar destekli simülasyonlar, akılcı ilaç tasarımı için önemli yöntemlerden biri halini almıştır. SIRT2'ye ait bağlanma bölgeleri dinamiklerinin belirlendiği ve bunun yapı temelli sanal tarama protokolü ile bütünleştirildiği bir çalışmada araştırmacılar, selektivite cebinin uzantısında yer alan Ile213 ve Phe190 arasında oluşan ve daha önce keşfedilmemiş bir alt cebi tanımlamışlardır [125].

2.3. Selektif SIRT2 İnhibitörleri

Son yıllarda SIRT2 izoformuna olan ilgi önemli ölçüde artmış ve SIRT2 enzim yolağına ait çok sayıda farklı mekanizma ve substrat tanımlanmıştır. Bu durum SIRT2'nin fizyolojik ve patofizyolojik koşullardaki rolüne ilişkin bilgilerin aydınlatılmasını sağlamıştır [76]. SIRT2 aktivitesinin disregülasyonu kanser, enflamasyon ve nörodejenerasyon patogenezi ile ilişkilendirildiği için, bu patogenezeğin yol açtığı hastalıklarda SIRT2, potansiyel terapötik ilaç hedefi haline almıştır [14]. SIRT2 enzim aktivitesinin düzenlenmesini sağlayacak bileşiklerin geliştirilmesi süreci göz önüne alındığında, enzimatik aktivitesinin inhibisyonunu sağlayacak bileşiklerin tedavi açısından önemli olduğu yapılan pek çok çalışmayla ortaya koyulmuştur [126]. Güçlü ve selektif SIRT2 inhibitörlerinin geliştirilmesi; hastalıkların tedavi edilmesini sağlamanın yanı sıra, SIRT2 ile ilgili moleküler mekanizmaları araştırmaya da olanak sağlayacaktır. Günümüze kadar farklı araştırma grupları tarafından otuzun üzerinde insan SIRT2 x-ray kristal yapısı aydınlatılmış, bunun yanı sıra farklı kimyasal yapıda pek çok inhibitör etkili bileşik keşfedilmiştir.

Küçük bileşik yapısında ilk keşfedilen SIRT2 inhibitörü nikotinamit (**1**) (SIRT2 IC_{50} =100 μ M; SIRT1 IC_{50} =120 μ M; SIRT3 IC_{50} =50 μ M; SIRT5 IC_{50} =150 μ M; SIRT6 IC_{50} =184 μ M), sirtuin-katalize deasetilasyon reaksiyonunun ürünü olup sirtuinlerin zayıf ve selektif olmayan doğal inhibitörüdür [8, 127, 128]. İnsan prostat kanseri hücrelerinin gelişimini azalttığı ve apoptozu indüklediği ayrıca lösemili hücrelerde proliferasyonu azalttığı bildirilmiştir [129, 130] (Şekil 2.4).

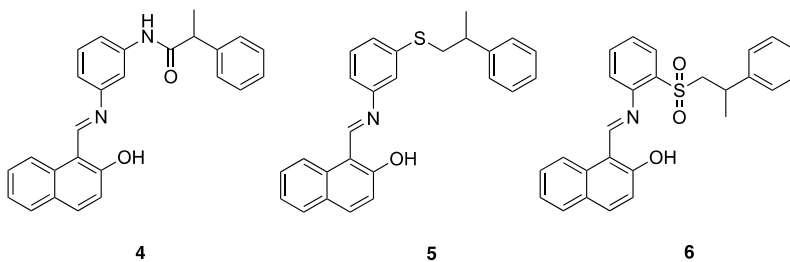
Grozinger ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen hücre-temelli yüksek çıktılı tarama çalışmalarında 1600 bileşik arasında **2** numaralı bileşik (sir2p IC_{50} =66 μ M ve SIRT2 IC_{50} =38 μ M) ve sirtinolün (**3**) (sir2p IC_{50} =68 μ M ve SIRT2 IC_{50} =45 μ M) *in vitro* olarak hem maya *Sir2* enzimini ve hem insan SIRT2 enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir [131]. Sirtinolün H1299 insan akciğer kanseri hücrelerinde ve MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde RAS/MAPK yolağının aktivite olmasını azaltarak yaşlanma benzeri büyüme durmasını, ayrıca yine MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde apoptozu ve otofajik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir [132, 133] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Bileşik 1, 2 ve 3'ün kimyasal yapıları

Sirtinolün yapısal optimizasyon çalışmaları sırasında ortaya çıkan ters amit türevi salermitin (**4**) (100 μ M konsantrasyonda SIRT2 %80 inh., 25 μ M konsantrasyonda SIRT1 %80 inh.) SIRT2 karşısında sirtinole benzer inhibitör aktivite gösterdiği bildirilirken, MOLT4 insan lösemi hücre hattında, MDA-MB-231 insan meme kanseri ve RKO insan kolon kanseri hücre hattında daha yüksek antiproliferatif aktivite gösterdiği öne sürülmüştür [134] (Şekil 2.5).

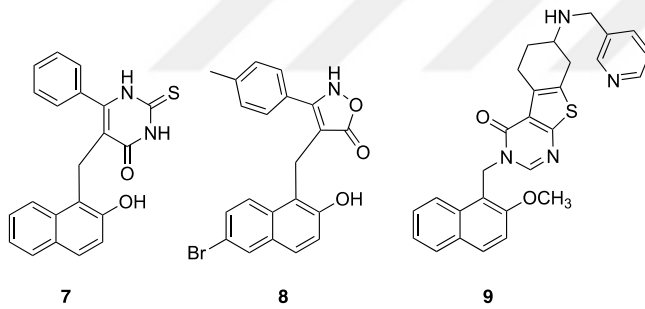
Salermite yapısı üzerinde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında keşfedilen fenilpropiltiyo türevi **5** numaralı bileşiğin (SIRT2 IC_{50} =19,2 μ M) ve 2-(2-fenilpropil)sülfonil türevi **6** numaralı bileşiğin (SIRT2 IC_{50} =24,2 μ M) potent SIRT2 inhibitör aktivite gösterdiği, Bileşik **5**'in MOLT4 insan T lenfoblastı, MDA-MB-231 insan meme kanseri ve RKO insan kolon kanseri hücre hatlarında hücre büyümesini bloke ettiği, her iki bileşiğin de glioblastoma çoklu form kanser kök hücrelerini inhibe ettikleri keşfedilmiştir [134] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bileşik 4, 5 ve 6'nın kimyasal yapıları

Sirtinol üzerinde farklı bir araştırma grubu tarafından gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sırasında süstitüe-anilin grubunun 6-fenil-2-tiyourasil ile yer değiştirilmesi sonucu ortaya çıkan kambinolün (**7**) (SIRT2 IC_{50} =56 μ M ve SIRT1 IC_{50} =59 μ M) *in vivo* ortamda fare ksenograft modelinde ilk antikanser aktivite gösteren β -naftol türevi bileşik olduğu, fare ksenograft modelinin BCL-6-eksprese eden Burkitt lenfoma hücrelerinde

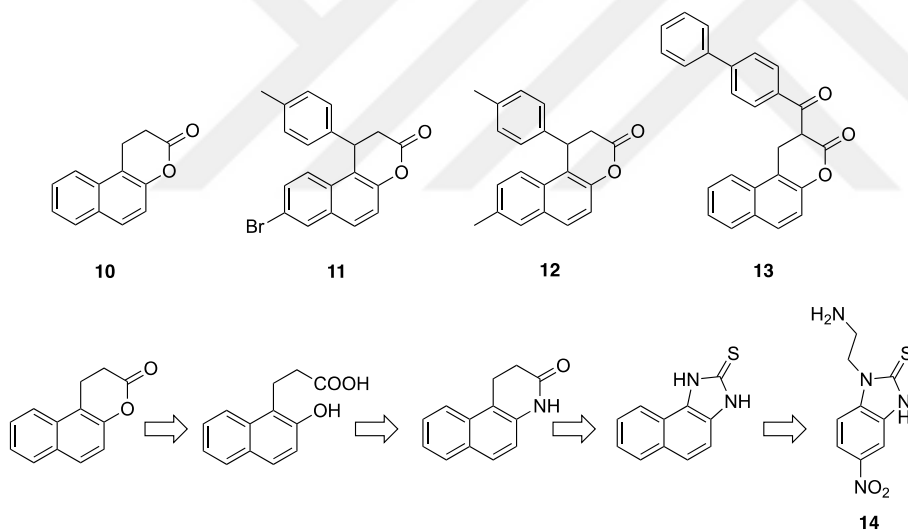
apoptozu indüklediği ve tümör büyümesini azalttığı bildirilmiştir [135]. Kambinolün yapısında bulunan 5,6-disübstitüe 2-tiyourasil halkasının farklı heterosiklik halkalarla yer değiştirilmesi sonucu elde edilen **8** numaralı bileşiğin SIRT1 ve SIRT3 izoformlarına nazaran potent ve selektif SIRT2 inhibitör etki gösterdiği (SIRT2 $IC_{50}=13 \mu M$; SIRT1 ve SIRT3 $IC_{50}>200 \mu M$), Burkitt lenfoma hücre hatlarının yanı sıra HCT116 insan kolon kanseri, MCF-7 insan meme kanseri ve NCI-H460 insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi solid tümör hücre hatlarında tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [136]. Kambinolün de içinde yer aldığı bileşiklerden hareketle oluşturulan farmakofor model kullanılarak keşfedilen ICL-SIRT078'in (**9**) substrat kompetitif SIRT2 inhibitörü olduğu (SIRT2 $IC_{50}=1,5 \mu M$; SIRT1 ve SIRT3 $IC_{50}>100 \mu M$), SIRT2 için SIRT1 ve SIRT3 göre elli kat daha selektif olduğu gözlemlenmiştir. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında α -tubulin hiperasetilasyonuna yol açtığı ve N27 rat dopaminerjik nöronal hücre hattında laktasistin kaynaklı Parkinson nöronal hücre ölümü modelinde güçlü nöroprotektif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [137] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Bileşik 7, 8 ve 9'un kimyasal yapıları

Inhibitör etkili bileşiklerin keşfi için gerçekleştirilen hücre temelli tarama çalışmaları sırasında keşfedilen splitomisin (**10**) sadece maya sirtuinleri üzerine inhibitör etki gösterirken insan homologlarına karşı etki göstermediği belirlenmiştir [138]. Splitomisinden hareketle yapı-etki ilişkilerini belirlemek üzere bir seri β -aril yapısında bileşikler sentezlenmiş, bu bileşikler arasında β -(4-metil)fenil-8-bromo-splitomisin (**11**) (SIRT2 $IC_{50}=1,5 \mu M$) ve β -(4-metil)fenil-8-metil-splitomisinin *R*-enantiomerinin (**12**) SIRT2'yi yüksek oranda inhibe ettiği (SIRT2 $IC_{50}=1 \mu M$), ancak yüksek lipofilitesinden dolayı MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde proliferasyonu düşük oranda bloke ettiği bildirilmiştir [139]. Rotilli ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise splitomisin yapısıyla ilişkili

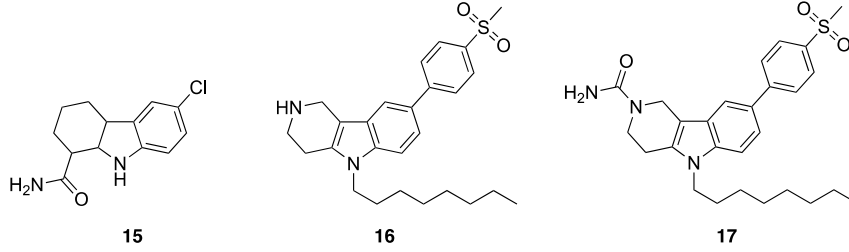
bir seri 2-arilalkanoil-1,2-dihidrobenzo[f]kromen-3-on türevi bileşik tasarlanmış, bunlar arasında **13** numaralı bileşiğin selektif SIRT2 inhibisyonu sağladığı (SIRT2 IC_{50} =10 μ M ve 50 μ M konsantrasyonda SIRT1 %8,9 inh.) aynı zamanda U937 insan lösemi hücre hattında yüksek pro-apoptotik ve/veya sitodiferansiyasyon özellikler gösterdiği belirlenmiştir [140]. Freitag ve arkadaşları sulu ortamda kolay bir şekilde hidroliz olan splitomisin bileşiğinin stabilitesini ve aktivitesini iyileştirmek için gerçekleştirdikleri çalışmalarda bileşik yapısındaki lakton halkasının hidroliz olmuş olan formunda ve laktama dönüştürülmüş formunda aktivite kaybı gözlediklerini belirtmişlerdir. Bu yüzden lakton yapısını daha stabil olduklarını düşündükleri doymuş veya doymamış heterosiklik halkalarla yer değiştirmişlerdir. Sonuçta SIRT2 inhibitörü (SIRT2 IC_{50} =5 μ M; SIRT1 IC_{50} =7,7 μ M; 50 μ M konsantrasyonda SIRT3 <%10 inh.) benzimidazoliyon ana yapısında yeni tasarlanacak bileşiklere ışık tutacak **14** numaralı öncü bileşiğe ulaşmışlardır [141] (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Bileşik 10, 11, 12, 13 ve 14'ün kimyasal yapıları

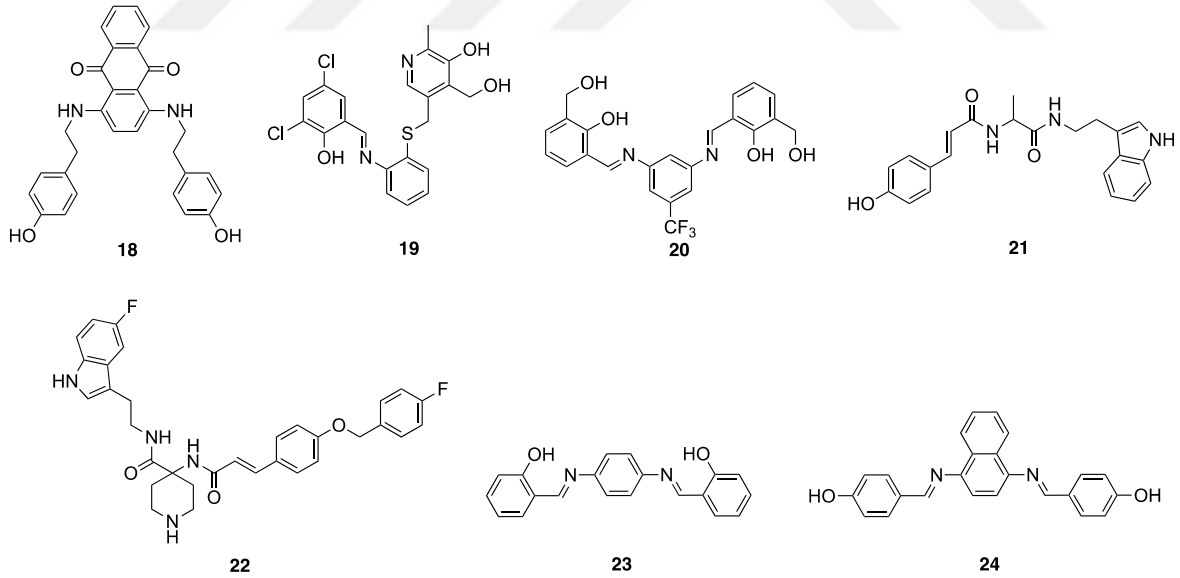
SIRT inhibitörü bileşiklerin keşfi amacıyla gerçekleştirilen yüksek çıktılı tarama çalışmaları sonucunda keşfedilen indol türevi bileşik EX-527'nin (**15**) SIRT1'e karşı daha selektif olduğu belirlenmiş, ilerleyen yıllarda EX-527'nin sahip olduğu 2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol çekirdeği 2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol yapısı ile yer değiştirilerek yeni indol türevi bileşikler tasarlanmış, bunlar arasında **16** (SIRT2 IC_{50} =3,8 μ M ve SIRT1 IC_{50} =16,7 μ M) ve **17** numaralı bileşiğin (SIRT2 IC_{50} =4 μ M ve SIRT1 IC_{50} =28 μ M) EX-527'e göre SIRT2'ye karşı inhibitör aktivitelerinin ve selektivitelerinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Bu bileşiklerin, HepG2 insan karaciğer ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında

p53 ve α -tubulin substratlarının hiperasetilasyonuna aracılık ettiği bildirilmiştir [142] (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Bileşik 15, 16 ve 17'nin kimyasal yapıları

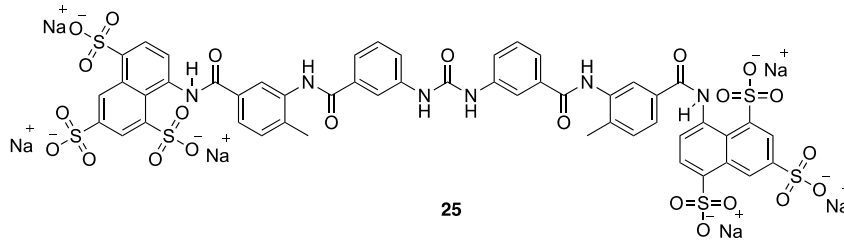
Tervo ve arkadaşları insan SIRT2 x-ray kristal yapısını ve moleküler modelleme tekniklerini kullanarak farklı kimyasal yapılarda selektif SIRT2 inhibitör bileşikler keşfetmişlerdir (**18**) (SIRT2 IC_{50} =56,7 μ M), (**19**) (SIRT2 IC_{50} =74,3 μ M), (**20**) (SIRT2 IC_{50} =91 μ M), (**21**) (SIRT2 IC_{50} =47 μ M), (**22**) (SIRT2 IC_{50} =51 μ M), (**23**) (SIRT2 IC_{50} =58,4 μ M), (**24**) (SIRT2 IC_{50} =137,4 μ M) [128, 143-146] (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Bileşik 18, 19, 20, 21, 22, 23 ve 24'ün kimyasal yapıları

Başlangıçta tripanozomiyazis ve onkoserkiyazis tedavisinde kullanılan simetrik polianiyonik naftilüre türevi bir bileşik olan suramin sodyumun (**25**), pürin bağlanma bölgesini hedef alan ilaçlar sınıfında yer aldığı, bu yüzden sirtuinler üzerine olan etkisinin tarandığı ve dual

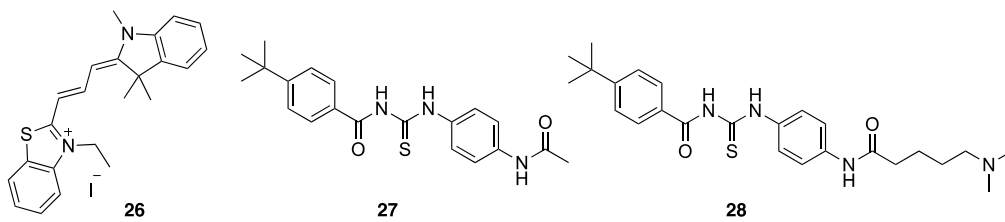
SIRT1/SIRT2 inhibitörü (SIRT2 $IC_{50}=1,15 \mu M$ ve SIRT1 $IC_{50}=0,297 \mu M$) olduğu bildirilmiştir [147] (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Bileşik 25'in kimyasal yapısı

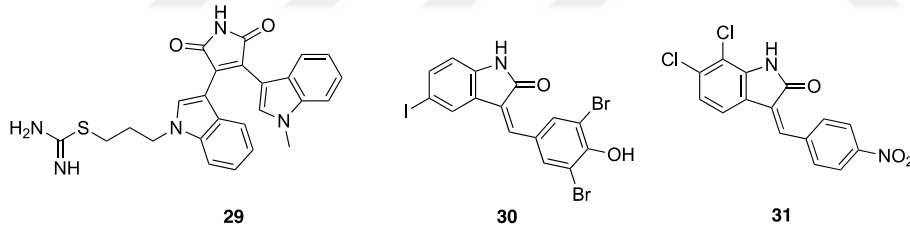
Selektif SIRT2 inhibitörü olarak keşfedilen AC-93253 (**26**) kodlu bileşiğin (SIRT2 $IC_{50}=6 \mu M$; SIRT1 $IC_{50}=45,3 \mu M$; SIRT3 $IC_{50}=24,6 \mu M$) α -tubulin, p53 ve histon H4'ün asetilasyonunu indüklediği ve DU145 insan prostat, MiaPaCa2 insan pankreas, A549 ve NCI-H460 insan akciğer kanseri hücre hatlarında apoptozu artırarak sitotoksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir [148] (Şekil 2.11).

Lain ve arkadaşları gerçekleştirdiği hücre-temelli p53 indüksiyon testinde sirtuin inhibitörü Tenovin-1'i (**27**) keşfetmişler, bu bileşiğin p53 hiperasetilasyonu aracılığıyla BL2 Burkitt lenfoma ve ARN8 melanoma hücrelerinde sitotoksiteye neden olduğu ve tümör büyümesini azalttığını bildirmişler, fakat bu bileşiğin yeteri kadar suda çözünmediğini fark etmişlerdir. Tenovin-1'in sudaki çözünürlüğünü artırmak amacıyla gerçekleştirdikleri optimizasyon çalışmalarında, ARN8 insan melanoma hücrelerinde Tenovin-1' e göre daha toksik olduğunu ortaya koyulan Tenovin-6 (**28**) (SIRT2 $IC_{50}=10,4 \mu M$ ve SIRT1 $IC_{50}=37,5 \mu M$) kodlu bileşiğe ulaşmışlardır [149] (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Bileşik 26, 27 ve 28'in kimyasal yapıları

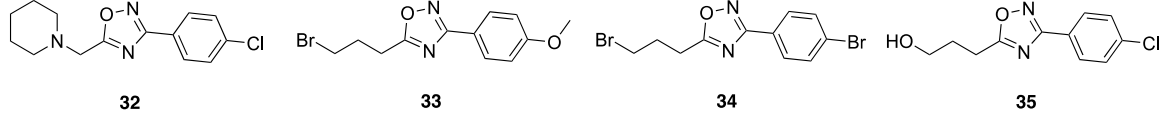
Sirtuinler tarafından kullanılan NAD^{+} 'ın ve kinazlar tarafından kullanılan ATP'nin her ikisinin de adenosin yapısı taşıması, var olan kinaz inhibitörlerinin aynı zamanda sirtuinleri de inhibe edebileceği fikrini doğurmuştur. Bu bağlamda kinaz inhibitörleri üzerinde yapılan çalışmalar bazı kinaz inhibitörü bileşiklerin sirtuinleri de inhibe ettiğini göstermiştir. Öyle ki, güçlü bir protein kinaz C inhibitörü olan Ro31-8220'nin (**29**) güçlü bir sirtuin inhibitörü olduğu (SIRT2 IC_{50} =0,8 μM ; SIRT1 IC_{50} =3,5 μM ; SIRT3 IC_{50} =3,7 μM) ve A549 insan akciğer adenokarsinoma hücrelerinde α -tubulin hiperasetilasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada öne çıkan güçlü bir c-RAF1 kinaz inhibitörü olan GW5074'ün (**30**) (SIRT2 IC_{50} =15,6 μM ; SIRT1 IC_{50} =41,6 μM ; SIRT3 IC_{50} =25,1 μM), Ro31-8220'ye göre daha düşük sirtuin inhibitör aktivite gösterdiği ifade edilmiştir [150]. Her iki bileşiğin de kinaz inhibitör aktivitelerinin sirtuin inhibitör aktivitelerinden çok daha iyi olduğu belirtilmiştir. Bu iki bileşiğin ve bauerin C alkaloidi gibi bazı biyoaktif doğal bileşiklerin sahip olduğu önemli yapısal elementleri birleştirerek 6,7-dikloro-2-oksoindol çekirdeği taşıyan selektif SIRT2 inhibitör **31** numaralı bileşiğe (SIRT2 IC_{50} =10,4 μM ve 50 μM konsantrasyonda SIRT1 %30 inh.) ulaşılmıştır [151] (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Bileşik 29, 30 ve 31'in kimyasal yapıları

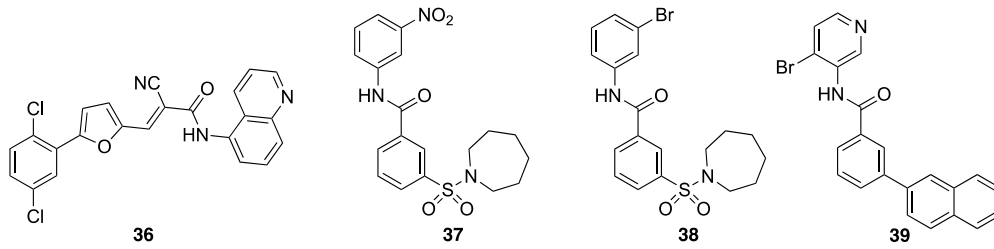
Schlicker ve arkadaşları, SIRT2-SIRT6 izoformlarına karşı selektif olabilecek ve substrat bağlanma bölgesine bağlanabilecek bileşikler keşfetmek için gerçekleştirdikleri sanal tarama çalışmasında CSC37 (**32**) kodlu bileşiğin de yer aldığı 3,5-disübstitüe-1,2,4-oksadiazol yapısı taşıyan inhibitörler keşfetmişlerdir. Sonrasında CSC37'nin öncü bileşik olarak kullanıldığı yapı-etki çalışmaları sonucunda geliştirilmiş selektivite ve potense sahip SIRT2 inhibitörü bileşiklere ulaşılmış; bunlar arasında yer alan **33** (SIRT2 IC_{50} =10,4 μM) ve **34** numaralı bileşiklerin (SIRT2 IC_{50} =1,5 μM) lösemi hücrelerinde apoptozu indüklediği ve antiproliferatif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Aynı seride yer alan **35** numaralı bileşiğin

(SIRT2 IC_{50} =41,2 μ M) SIRT2 ve ADP-riboz ile kompleks halinde olan x-ray kristal yapısı daha önce keşfedilmemiş hidrofobik özellikte bir cebin varlığını göstermiştir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Bileşik 32, 33, 34 ve 35'in kimyasal yapıları

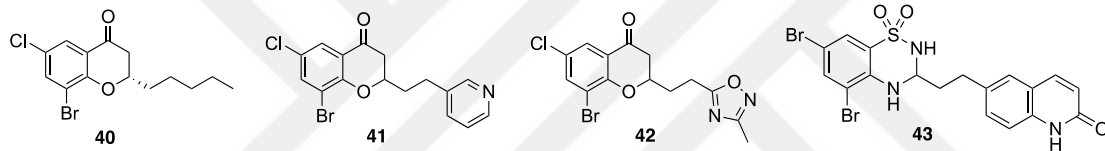
2007 yılında Outeiro ve arkadaşları tarafından tasarlanan güçlü ve selektif SIRT2 inhibitörü olan AGK2 (**36**) (SIRT2 IC_{50} =3,5 μ M; SIRT1 IC_{50} =30 μ M; SIRT3 IC_{50} =91 μ M) ve AK-1 (**37**) (SIRT2 IC_{50} =12,5 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >50 μ M) kodlu bileşiklerin Parkinson hastalığına ait hücresel bir modelde α -sinüklein toksisitesini ortadan kaldırdıkları ve hücreleri dopaminerjik hücre ölümüne karşı korudukları bildirilmiştir [152]. Geniş bir kütüphane taraması sırasında keşfedilen AK-7'nin (**38**) düşük SIRT2 inhibitör aktivitesine rağmen (SIRT2 IC_{50} =15,5 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >50 μ M) Hungtington hastalığının fare modelinde güçlü nöroprotektif etkiler yarattığı gözlemlenmiştir [79]. Sülfobenzoik asit yapısı taşıyan ve nöroprotektif etkilere sahip AK-7'nin SIRT2 inhibitör potansiyelini iyileştirmek amacıyla gerçekleştirilen bazı modifikasyonların ardından benzamit türevi potent ve selektif SIRT2 inhibitörü **39** numaralı bileşik (SIRT2 IC_{50} =0,6 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μ M) keşfedilmiş ve bu bileşiğin nörodejeneratif hastalıklar ve kanser tedavisi için umut vadeden bir ilaç adayı olabileceği ileri sürülmüştür [153] (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Bileşik 36, 37, 38 ve 39'un kimyasal yapıları

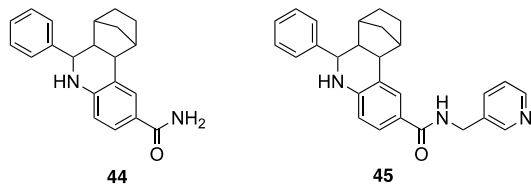
Kromon ve kroman-4-on çekirdeklerini taşıyan bir seri bileşiğin sirtuin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, **40** numaralı bileşiğin (-) enantiomerinin düşük mikromolar seviyede selektif olarak SIRT2 inhibitör aktiviteye sahip olduğu (SIRT2 IC_{50} =1,5 μ M; 200 μ M konsantrasyonda SIRT1 %3,5 inh.; SIRT3 %3,9 inh.) ortaya koyulmuştur [154].

Devamında gerçekleştirilen yapı-etki çalışmalarıyla tasarlanan **41** (SIRT2 IC_{50} =3,7 μ M; 200 μ M konsantrasyonda SIRT1 %9,8 inh.; SIRT3 %28 inh.) ve **42** (SIRT2 IC_{50} =12,2 μ M; 200 μ M konsantrasyonda SIRT1 %6,7 inh.; SIRT3 %13 inh.) numaralı bileşiklerin SIRT2 enzimine karşı selektif ve potent inhibitör aktivite gösterdikleri, ayrıca MCF-7 insan meme kanseri ve A549 insan akciğer kanseri hücre hatlarında SIRT2 inhibitör etkileriyle paralellik gösterecek şekilde antiproliferatif etkiye sahip oldukları ve α -tubulin asetilasyonunu doza bağımlı şekilde artırdıkları ifade edilmiştir [155]. 2020 yılında aynı araştırma grubu, bileşik yapılarında yer alan kroman-4-on halka sistemini farklı biyoizosterik halka sistemleriyle yer değiştirerek yeni SIRT2 inhibitörlerine ulaşmışlardır. Benzotiyadiazin-1,1-dioksit halka sistemine sahip **43** numaralı bileşik (200 μ M konsantrasyonda SIRT2 %74 inh.; SIRT1 %25 inh.; SIRT3 %28 inh.) en potent SIRT2 inhibitörü olarak bildirilmiştir [156] (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Bileşik 40, 41, 42 ve 43'ün kimyasal yapıları

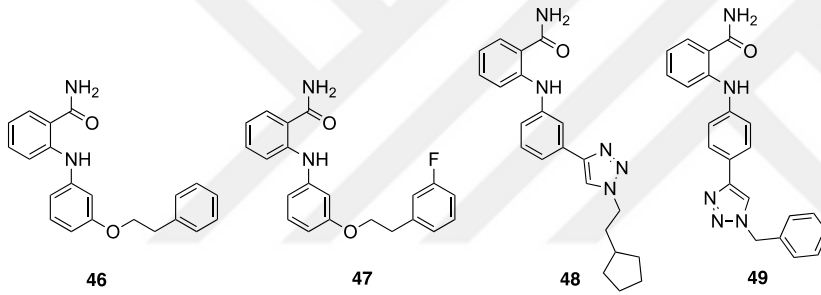
Hoffmann ve arkadaşları tarafından tasarlanan selektif SIRT2 inhibitörlerinden, fenantridin halka sistemini taşıyan AEM1 (**44**) (SIRT2 IC_{50} =18,5 μ M ve SIRT1 IC_{50} >100 μ M) ve AEM2 (**45**) (SIRT2 IC_{50} =3,8 μ M ve SIRT1 IC_{50} >100 μ M) kodlu bileşiklerin SIRT2-bağımlı p53 deasetilasyonunu azalttıkları ayrıca A549 ve H1299 insan akciğer kanseri hücre hatlarında apoptozu indükledikleri belirlenmiştir [157] (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Bileşik 44 ve 45'in kimyasal yapıları

Nikotinamit-benzeri benzamit yapısı içeren 2-anilinobenzamit türevi bir seri bileşik tasarlanmış ve bileşiklere ait yapı-etki ilişkileri belirlenerek NCO-90 (**46**) (SIRT2 IC_{50} =1 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >300 μ M) ve NCO-141 (**47**) (SIRT2 IC_{50} =0,57 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >300

μM) kodlu bileşiklerin potent ve selektif birer SIRT2 inhibitörü oldukları bildirilmiştir [158]. Her iki bileşiğin de lösemi hücre hatlarında kaspaz aktivasyonu ve mitokondriyal süperoksit oluşumuyla apoptozu indüklediği, ayrıca NCO-90'nın HCT116 insan kolon kanseri hücre hattında α -tubulin asetilasyonunu doz-bağımlı olarak artırdığı ifade edilmiştir [159]. Sonrasında, para ve meta sübstitüe 2-anilinobenzamit türevleri elde edilmiştir. Bu türevler arasında A1B11 (**48**) (SIRT2 IC_{50} =5,3 μM ; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μM) ve A2B57 (**49**) (SIRT2 IC_{50} =6,3 μM ; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μM) kodlu bileşikler göstermiş oldukları selektif SIRT2 inhibitör aktiviteleriyle ön plana çıkmışlardır [160]. Sonraki yıllarda SIRT2:NCO-90 kompleksinin x-ray kristal yapısı (PDB: 5Y5N) aydınlatılmış; gözlemlenen enzim-inhibitör etkileşimlerinin ve hidrofobik bağlanma bölgesinin selektif SIRT2 inhibisyonu için önemi vurgulanmıştır [119] (Şekil 2.17).

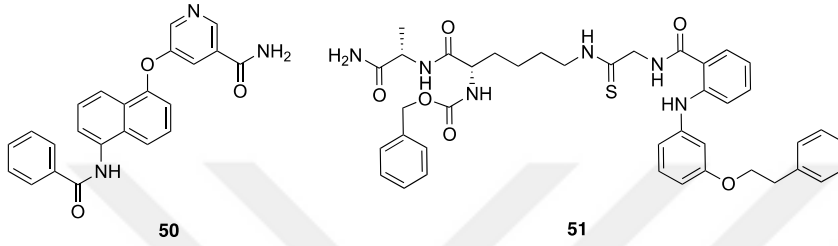


Şekil 2.17. Bileşik 46, 47, 48 ve 49'un kimyasal yapıları

Cui ve arkadaşları, fragman-temelli tasarım yaklaşımını kullanarak nikotinamit türevi bileşikler tasarlamışlardır. Tasarımlarında suramin bileşiğine ait naftilamit sülfonik asit çekirdeği ile nikotinamit çekirdeğini birleştirerek aromatik amit yapısı taşıyan naftalen-nikotinamit türevi bileşikler elde etmişlerdir. Bu bileşikler içerisinde **50** numaralı bileşiğin (SIRT2 IC_{50} =0,0483 μM ; SIRT1 IC_{50} =10,2 μM ; SIRT3 IC_{50} =44,2 μM) nanomolar seviyede selektif SIRT2 inhibitör aktivite gösterdiği, *in vitro* ortamda α -tubulin asetilasyonunu doz ve zaman-bağımlı olarak artırdığı bildirilmiştir [161] (Şekil 2.18).

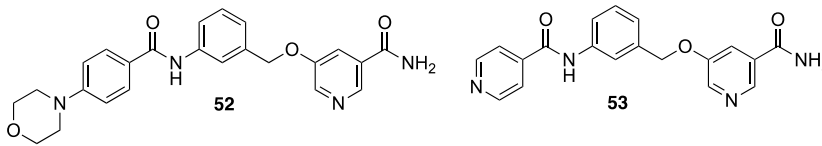
Suzuki ve arkadaşları aydınlattıkları SIRT2:NCO-90 kompleksinin x-ray kristal yapısına dayanarak SIRT2 enzim inhibisyonu için hem selektivite cebine hem de NAD^+ bağlanma bölgesine bağlanabilecek yeni bir bileşiğe ulaşmak amacıyla 2-anilinobenzamit yapısındaki bileşiklerin amit gruplarında değişikliğe giderek KPM-2 kodlu (**51**) (SIRT2 IC_{50} =0,055 μM ;

SIRT1 $IC_{50}=1,6 \mu M$; SIRT3 $IC_{50}=9,5 \mu M$) mekanizma-temelli, potent ve selektif SIRT2 inhibitörü bileşiği keşfetmişlerdir. MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarında güçlü antiproliferatif aktivite göstermesinin yanı sıra Nöro-2a (N2a) fare nöroblastoma hücrelerinde nörit büyümesine yol açmıştır. Böylece SIRT2 selektif inhibitörlerinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceği vurgulanmıştır [119] (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Bileşik 50 ve 51'in kimyasal yapıları

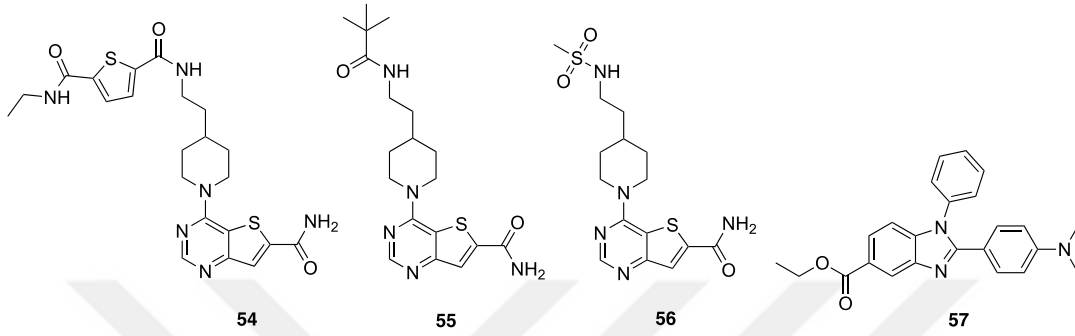
Daha sonrasında yayımlanan bir çalışmada ise 5-((3-amidobenzil)oksi)-nikotinamid türevi SIRT2 inhibitörü bileşikler elde edilmiş; **52** (SIRT2 $IC_{50}=0,0167 \mu M$; SIRT1 $IC_{50}=6,56 \mu M$; SIRT3 $IC_{50}=1,87 \mu M$) ve **53** (SIRT2 $IC_{50}=0,0341 \mu M$; SIRT1 $IC_{50}=2,46 \mu M$; SIRT3 $IC_{50}=2,40 \mu M$) numaralı bileşikler seride ön plana çıkmış, her ikisinin de SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde α -sinüklein agregasyonu sonucu indüklenen sitotoksiteyi önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu keşif Parkinson hastalığının tedavisi için SIRT2 inhibitörleri üzerinde durulmasının potansiyel bir yaklaşım olacağı fikrini doğurmuştur [162] (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Bileşik 52 ve 53'ün kimyasal yapıları

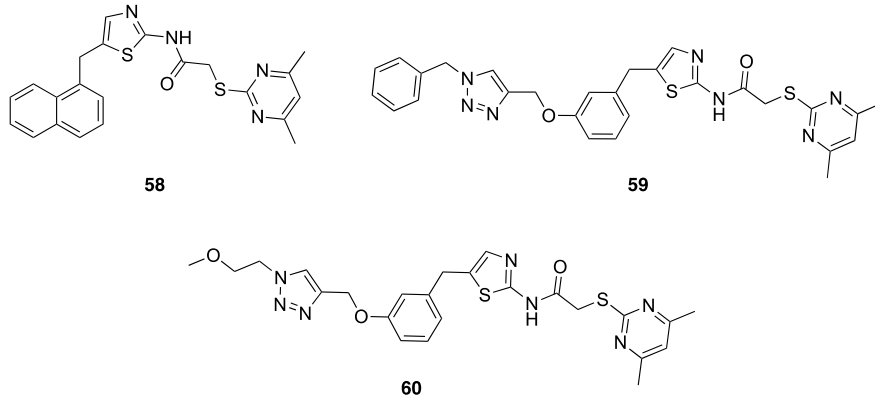
Disch ve arkadaşları, DNA'yı hedefleyen heterosiklik halkalarca zengin bileşiklerin yer aldığı sanal kütüphane taraması gerçekleştirerek tiyeno[3,2-*d*]pirimidin-6-karboksamit türevi **54** (SIRT2 $IC_{50}=0,003 \mu M$; SIRT1 $IC_{50}=0,004 \mu M$; SIRT3 $IC_{50}=0,004 \mu M$), **55** (SIRT2 $IC_{50}=0,010 \mu M$; SIRT1 $IC_{50}=0,015 \mu M$; SIRT3 $IC_{50}=0,033 \mu M$) ve **56** (SIRT2 $IC_{50}=0,001 \mu M$; SIRT1 $IC_{50}=0,004 \mu M$; SIRT3 $IC_{50}=0,007 \mu M$) numaralı bileşiklere ulaşmışlardır [163] (Şekil 2.20).

Benzimidazol türevi **57** numaralı bileşiğin, SIRT2/SIRT1 dual inhibitör (SIRT2 IC_{50} =28,65 μ M; SIRT1 IC_{50} =54,21 μ M) özellikte olduğu ve HCT116 insan kolon kanseri, MDA-MB-468 insan meme kanseri ve CCRF-CEM insan lösemi hücre hatlarında güçlü antikanser etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [164] (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Bileşik 54, 55, 56 ve 57'nin kimyasal yapıları

Rumpf ve arkadaşları daha önce geliştirmiş oldukları bileşiklerin yer aldığı kütüphanelerindeki bileşikleri *in vitro* ortamda SIRT1-3 aktivitelerini taradıkları sırada aminotiyazol türevi, daha sonraları sirtuini yeniden düzenleyici ligantlar (SirReals) olarak anılacak olan, potent ve selektif SIRT2 inhibitörlerini keşfetmişlerdir. SirReal2 (**58**) (SIRT2 IC_{50} =0,435 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μ M) göstermiş olduğu güçlü SIRT2 inhibitör profiliyle ön plana çıkan bileşik olmuştur. SirReal2'nin HeLa insan servikal kanseri hücrelerinde α -tubulin hiperasetilasyonuna yol açtığı, hücre siklusunun kontrol noktası proteini BubR1 destabilizasyonunu indüklediği, ayrıca HCT116, SW948 ve HT29 insan kolon kanseri, A549 ve H520 insan akciğer kanseri, K562 insan lösemi, HeLa insan servikal kanseri ve ASPC1 ve CFPAC1 insan pankreatik kanseri hücre hatlarında orta derecede sitotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Aynı araştırma grubu tarafından aydınlatılan SIRT2:SirReal2 kompleksine ait x-ray kristal yapısı (PDB: 4RMG), inhibitörün bağlanmasıyla aktif bölgede indüklenen konformasyonel değişikliklerle hidrofobik etkileşimlere olanak verecek ve selektivite cebi olarak anılan bağlanma bölgesinin SIRT2 selektif inhibitörler yaratmak için eşsiz bir olanak sunacağı ileri sürülmüştür [106, 126]. SIRT2:SirReal2 kompleksinin x-ray kristal yapısı kullanılarak, **59** (SIRT2 IC_{50} =0,163 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μ M) **60** (SIRT2 IC_{50} =0,118 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μ M) numaralı bileşikler gibi selektif SIRT2 inhibitör aktivitesi, suda çözünürlüğü ve efikasitesi iyileştirilmiş yeni bileşikler tasarlanmıştır [114] (Şekil 2.21).

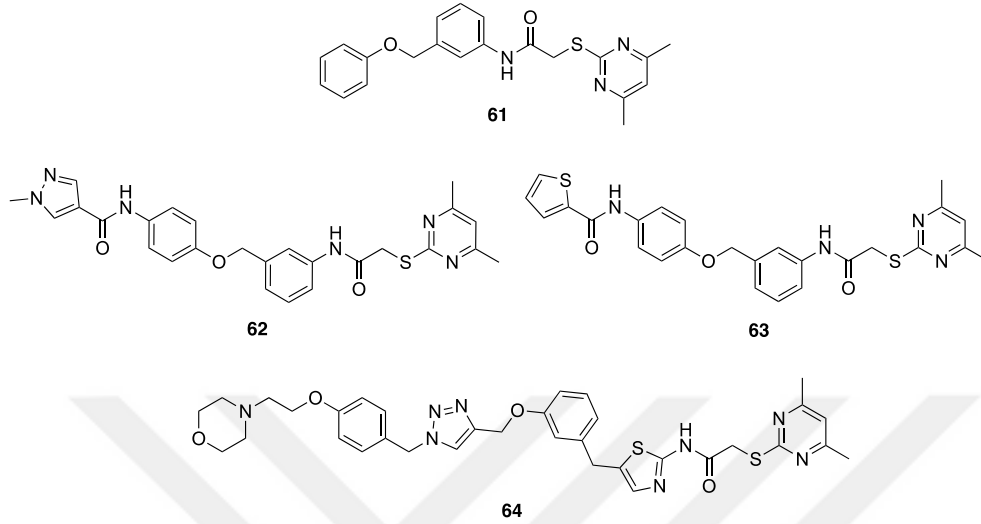


Şekil 2.21. Bileşik 58, 59 ve 60'ın kimyasal yapıları

Yang ve arkadaşları, SirReal2 üzerinde gerçekleştirdikleri öncü bileşik optimizasyon çalışmalarında biyoizosterik değişimler yaparak *N*-(3-(fenoksimetil)fenil)asetamit türevi selektif SIRT2 inhibitörü **61** numaralı bileşiğe (SIRT2 $IC_{50}=25,9 \mu M$) ulaşmışlar, bu bileşiğin SIRT2 enzimiyle olan kompleksinin x-ray kristal yapısını aydınlatmışlardır [21, 109]. İncelemeler sonucu Bileşik **61**'in selektivite cebinin oluşumunu indükleyip burayla etkileştiği fakat substrat bağlanma cebine bağlanmadığı görülmüştür. Bu yüzden yapı-temelli optimizasyon çalışmalarına gidilmiş, substrat bağlanma bölgesiyle etkileşim kurup bu bölgeye bağlanmayı sağlayabilmek için bileşiklere amit köprüsüyle çeşitli heterosiklik halkalar eklenmiş ve sonuçta potent SIRT2 selektif inhibitörler **62** (SIRT2 $IC_{50}=0,815 \mu M$; SIRT1 ve SIRT3 $IC_{50}>100 \mu M$) ve **63** (SIRT2 $IC_{50}=0,042 \mu M$; SIRT1 ve SIRT3 $IC_{50}>100 \mu M$) numaralı bileşiklere ulaşılmıştır. Bileşik **62**'nin NCI-H441 insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde doz-bağımlı olarak α -tubulin hiperasetilasyonuna neden olduğu, hücresel proliferasyonu ve hücre büyümesini engellediği, hücre göçü ve invazyonunu baskıladığı ortaya koyulmuştur. Bileşik **63**'ün ise MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve doz-bağımlı α -tubulin hiperasetilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.22).

SirReal2'ye göre daha selektif ve daha potent etki gösterebilecek bileşikler tasarlamak üzere yürütülen bir çalışmada ise, SirReal tipi inhibitörlerin genel yapısı temel alınarak bir seri yeni bileşik tasarlanmıştır; bu bileşikler arasında **64** numaralı bileşiğin (SIRT2 $IC_{50}=0,12 \mu M$, deasetilasyon; SIRT2 $IC_{50}=2,4 \mu M$, demiristoilasyon) güçlü etkinlik gösterdiği, metastatik androjen-bağımsız prostat kanseri hücrelerinde SIRT2 aracılı deasetilasyonun yanı sıra demiristoilasyonu da bloke ettiği, böylece güçlü bir şekilde c-Myc miktarını azaltıp

hücre göçünü inhibe ettiği, α -tubulin hiperasetilasyonuna neden olduğu ve Kras4a'nın açılmasını indüklediği ortaya koyulmuştur [64] (Şekil 2.22).

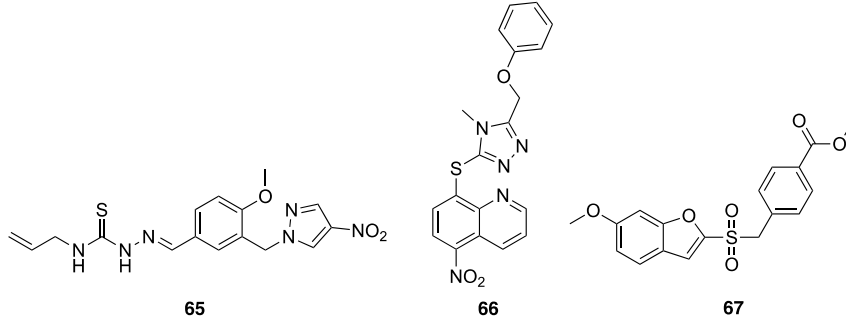


Şekil 2.22. Bileşik 61, 62, 63 ve 64'ün kimyasal yapıları

Yüksek çıktılı tarama çalışmalarında elde edilen RK-9123016 (**65**) (SIRT2 IC_{50} =0,18 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μ M) kodlu bileşiğin güçlü ve selektif SIRT2 inhibitörü olduğu ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında c-Myc miktarını azaltıp hücre büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir [165] (Şekil 2.23).

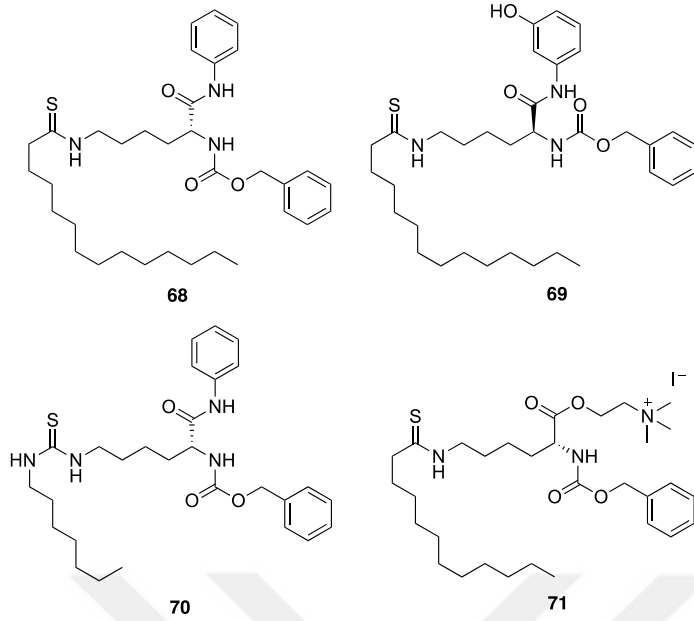
2016 yılında keşfedilen triazoltiyokinolin yapısında doz-bağımlı selektif SIRT2 inhibitörü MIND4 kodlu bileşiğin (**66**) (SIRT2 IC_{50} =3,5 μ M) Huntington hastalığı modelinde sitoprotektif faktör NRF2'yi indükleyerek nöroprotektif etki gösterdiği ortaya koyulmuştur [166] (Şekil 2.23).

Zhou ve arkadaşları, bilinen selektif SIRT2 inhibitör yapılarında yer alan benzimidazol ve indol çekirdeklerinin biyoizosteri olan benzofuran yapısını kullanarak selektif SIRT2 inhibitörü **67** numaralı bileşiğe (SIRT2 IC_{50} =3,81 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μ M) ulaşmışlardır [167] (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Bileşik 65, 66 ve 67'nin kimyasal yapıları

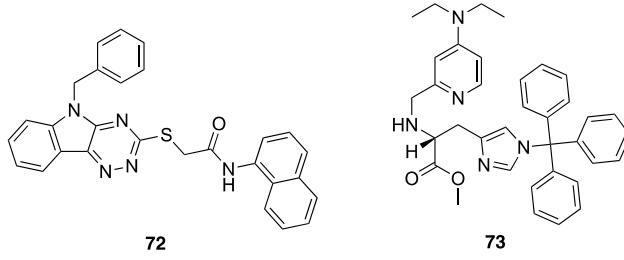
2016 yılında, özellikle c-Myc ilişkili kanser türlerinin tedavisi için sirtuinleri hedefleyen ve substratlarına benzer alifatik açıl grupları içeren tiyoaçıl lizin türevi bileşikler tasarlanmıştır. Bu bileşiklerden mekanizma-temelli selektif SIRT2 inhibitörü olarak bildirilen TM (tiyomiristoil) kodlu bileşiğin (**68**) (SIRT2 IC_{50} =0,028 μ M; SIRT1 IC_{50} =98 μ M; SIRT3 IC_{50} >200 μ M) farklı kanser hücre hatlarında c-Myc seviyelerini azaltarak antikanser etkinlik gösterdiği bulunmuştur [126, 168]. TM bileşiğinin çözünürlük problemi nedeniyle farklı türevlerinin tasarımına ihtiyaç duyulmuş; güçlü bir SIRT2 inhibitörü olduğu bildirilen TM analogu JH-T4 (**69**) kodlu bileşiğin (SIRT2 IC_{50} =0,030-0,050 μ M), asetil grubunun yanı sıra farklı açıl gruplarının uzaklaştırılmasında da görev aldığı, TM'den farklı olarak K-RAS4a onkoprotein seviyelerini azaltarak antikanser etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [169]. Ancak, farklı kanser hücre hatlarında sitotoksik etki göstermesinin yanı sıra JH-T4'ün normal hücrelerde de bu etkiyi yarattığı gözlemlenmesi üzerine ileri çalışmalara geçilememiştir. TM bileşiğinin çözünürlük problemini çözmek ve daha kolay sentezlenebilir bir formunu yaratmak amacıyla Farooqi ve arkadaşları tarafından lizin-temelli tiyoüre türevleri tasarlanmış [170], AF-8'in (**70**) güçlü SIRT2 selektif inhibitör (SIRT2 IC_{50} =0,061 μ M) olarak HCT116 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Hong ve arkadaşları, var olan glukoz-konjuge SIRT2:TM kompleksine ait x-ray kristal yapısından (PDB: 6NR0) faydalanan çözünürlük problemini aşmış, daha güçlü antikanser etkinlik gösteren TM analoglarına ulaşmışlardır. Bu analoglardan biri olan NH4-13'ün (**71**) güçlü SIRT2 selektif inhibitör (SIRT2 IC_{50} =0,087 μ M; SIRT1,3-6 IC_{50} >50 μ M) özellikte olduğu fakat TM ile karşılaştırıldığında farklı kanser hücre hatlarında daha zayıf etkinlik gösterdiği ve normal hücrelerde de 100 μ M konsantrasyonda sitotoksik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [38, 122] (Şekil 2.24).



Şekil 2.24. Bileşik 68, 69, 70 ve 71'in kimyasal yapıları

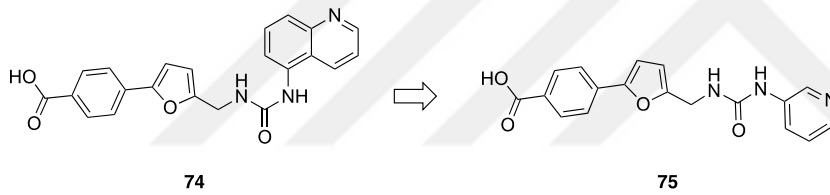
Huang ve arkadaşları, yeni SIRT2 inhibitörleri keşfetmek üzere sanal bir kütüphanedeki bileşikleri tutarlı docking/skorlama protokolüne tabii tutmuş ardından yapı-temelli optimizasyon ve yapı-etki çalışmalarını gerçekleştirip 2-((5-benzil-5*H*-[1,2,4]triazino[5,6-*b*]indol-3-il)tiyo)-*N*-(naftalen-1-il)asetamit yapısında güçlü ve selektif SIRT2 inhibitörü SR86 (**72**) (SIRT2 $IC_{50}=1,3 \mu M$; SIRT1 ve SIRT3 $IC_{50}>100 \mu M$) kodlu bileşiğe ulaşmışlardır. SR86'nın α -tubulin deasetilasyonunu inhibe ederek MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azaltıcı etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [171] (Şekil 2.25).

Ali ve arkadaşlarının SIRT2'nin aktif bölgesinde yer alan her bir alt cebe bağlanabilecek fragmanları bir araya getirerek küçük molekül ağırlıklı SIRT2 selektif inhibitör bileşik geliştirmeye çalıştıkları bir çalışmada, dimetilaminopiridin, histidin ve tritil fragmanlarını içeren TH-3 kodlu bileşiğin (**73**) (SIRT2 $IC_{50}=1,3 \mu M$) yüksek SIRT2 inhibitör aktivite gösterdiği bildirilmiştir. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında ortaya çıkardığı yüksek inhibitör aktivitenin sadece SIRT2 inhibisyonundan kaynaklanmadığı, DNA'da kırıklara yol açabilecek başka bir mekanizmanın da bu noktada iş gördüğü ifade edilmiştir [172] (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Bileşik 72 ve 73'ün kimyasal yapıları

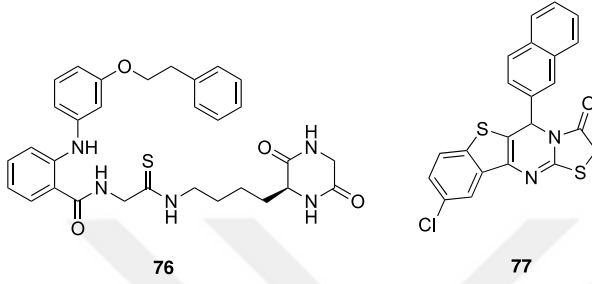
Wang ve arkadaşları, geliştirmiş oldukları floresan-temelli aktivite tayin yöntemiyle kendi bileşik kütüphanelerinde gerçekleştirdikleri tarama çalışması sonucunda orta düzeyde SIRT2 inhibitör aktivitesi olan **74** numaralı bileşiğe (100 μ M konsantrasyonda SIRT2 %63 inh.) ulaşmışlar, devamında yapı üzerinde uygulanan yapı-etki ilişkileri çalışmalarıyla (5-fenilfuran-2-il)metanammin yapısında potent SIRT2 inhibitör **75** numaralı bileşiği (SIRT2 IC_{50} =2,47 μ M) keşfetmişlerdir [173] (Şekil 2.26).



Şekil 2.26. Bileşik 74 ve 75'in kimyasal yapıları

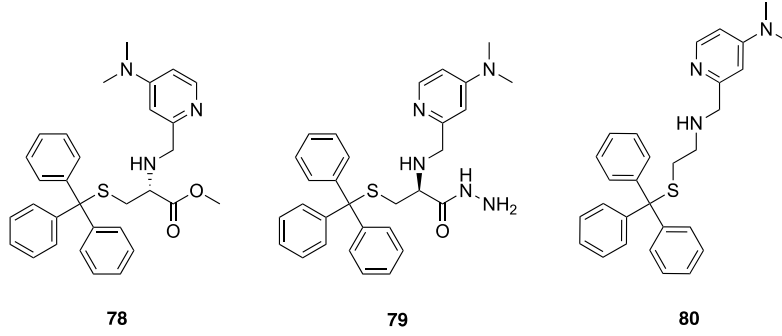
Bilinen selektif SIRT2 inhibitörlerinin varsayımsal bağlanma modlarının ve bunların SIRT2 inhibitör aktivitelerinin değerlendirilmesi sonucunda ilaç benzeri özellikleri iyileştirilmiş yeni inhibitörlere ulaşılmıştır. Bu bileşikler arasında **76** numaralı bileşiğin sahip olduğu diketopiperazin grubu ile substrat bağlanma bölgesine ait amino asitler arasında meydana gelmesi beklenen hidrojen bağı etkileşimlerinin kurulduğu, tiyoamit köprüsüyle diketopiperazine bağlı olan 2-anilinobenzamit yapısının ise selektivite cebine bağlanmayı sağladığı bildirilmiştir. Mekanizma-temelli olarak güçlü selektif SIRT2 inhibisyon sağlayan Bileşik **76**'nın (SIRT2 IC_{50} =0,31 μ M; SIRT1 IC_{50} =77,4 μ M; SIRT3 IC_{50} =69,2 μ M) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde güçlü antiproliferatif aktivite göstermesinin yanı sıra N2a fare nöroblastoma hücrelerinde nörit büyümesine de yol açtığı ifade edilmiştir [174] (Şekil 2.27).

2020 yılında Khalil ve arkadaşları, tasarladıkları benzotiyeno[3,2-*d*]pirimidin türevi bir seri bileşiğin altmış farklı insan kanser hücre hattında etkilerini araştırmıştır. Seri içerisinde **77** numaralı bileşiğin (SIRT2 IC_{50} =2,10 μ g/ml) selektif SIRT2 inhibitör aktivite gösterdiği bildirilmiş, ayrıca MCF-7 insan meme kanseri ve UO-31 insan renal kanseri hücre hatlarında güçlü sitotoksik etkinliğe sahip olduğu görülmüştür [175] (Şekil 2.27).



Şekil 2.27. Bileşik 76 ve 77'nin kimyasal yapıları

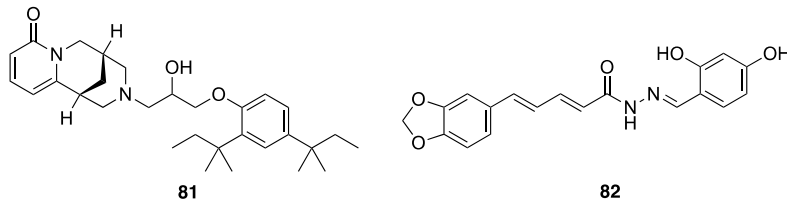
Radwan ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, *S*-tritol-1-sistein (STLC) yapı iskeletini içeren bileşiklerin SIRT2 inhibitörü olabileceği ileri sürülmüş, bu iskeleti taşıyan bir seri bileşik arasında güçlü SIRT2 inhibitör aktivite gösteren STC4 (**78**) (SIRT2 IC_{50} =9,5 μ M) ve STC11 (**79**) (SIRT2 IC_{50} =10,8 μ M) ön plana çıkmıştır. Yürütülen *in silico* çalışmalarda STC4'ün taşıdığı metil ester grubunun Asn168 ile etkileşim kurmasının, bileşiğin selektivite cebine yerleşmesini engellediği belirlenmesiyle metil ester motifi taşımayan ve *S*-tritol sisteinamin yapısı içeren analoglar tasarlanmış; bunlar arasında STCY1 (**80**) (SIRT2 IC_{50} =7,5 μ M) en iyi *in vitro* SIRT2 inhibitör aktiviteyi göstermiştir. MCF-7 insan meme kanseri, HeLa insan servikal kanseri ve HL60 insan lösemi hücre hatlarında güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Gerçekleştirilen bilgisayar destekli çalışmalar bu bileşiğin selektivite cebine bağlanmayı engellemediğini ortaya koymuştur [176, 177] (Şekil 2.28).



Şekil 2.28. Bileşik 78, 79 ve 80'nin kimyasal yapıları

Yeni selektif SIRT2 inhibitörlerinin keşfi amacıyla yürütülen kütüphane taraması sonucunda ulaşılan NPD11033 kodlu SIRT2 selektif inhibitörünün (**81**) (SIRT2 $IC_{50}=0,46 \mu M$), SIRT2 substratı olan eIF5A'nın hiperasetilasyonuna aracılık ederek PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiği ortaya koyulmuştur [66] (Şekil 2.29).

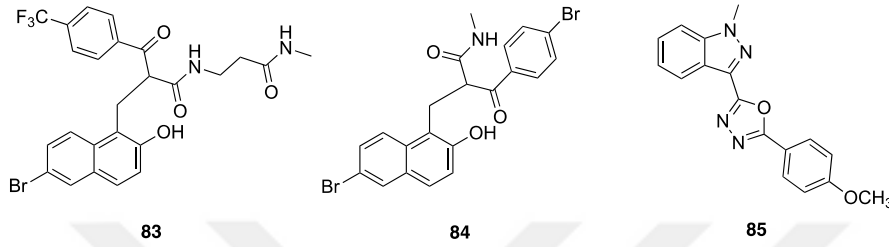
Fragman-temelli ilaç tasarımı yöntemi kullanılarak resveratrol ve piperonilik asit fragmanlarını birleştirip SIRT2 hedefli hibrit bileşiklere ulaşmayı hedefleyen Tantawy ve arkadaşları, tasarladıkları hibrit bileşiklerden en aktif bileşik olarak belirledikleri **82** numaralı bileşiğin (SIRT2 $IC_{50}=21 \mu M$ ve $50 \mu M$ konsantrasyonda SIRT1 %45 inh.) çok sayıda kanser hücre hattına karşı antiproliferatif etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir [178] (Şekil 2.29).



Şekil 2.29. Bileşik 81 ve 82'nin kimyasal yapıları

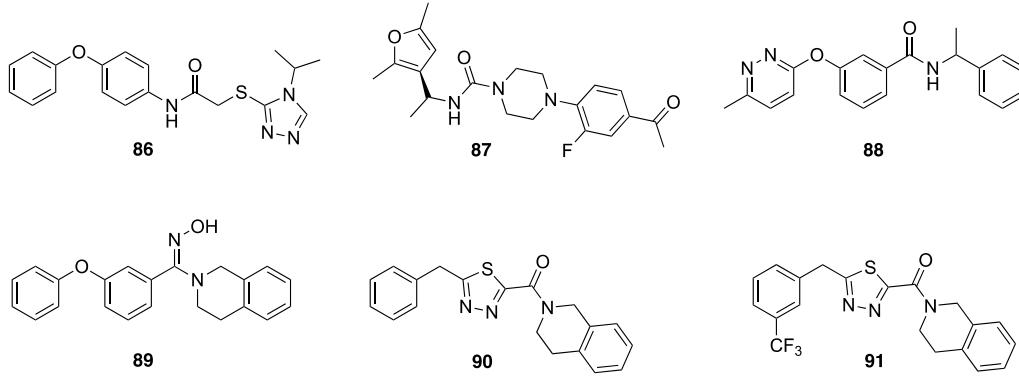
Chowdhury ve arkadaşları, kambinolün açık zincir analogları olan **83** (SIRT2 $IC_{50}=0,25 \mu M$; $50 \mu M$ konsantrasyonda SIRT1 <%25 inh.; SIRT3 <%25 inh.) ve **84** (SIRT2 $IC_{50}=0,78 \mu M$; $50 \mu M$ konsantrasyonda SIRT1 <%25 inh.; SIRT3 <%25 inh.) numaralı bileşiklerin B-hücre lenfoma hücre hatlarında apoptozu indükleyip antiproliferatif etkinlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır [179] (Şekil 2.30).

Dukanya ve arkadaşları, tasarladıkları indazol bağlı oksadiazol türevi SIRT2 inhibitörü olabilecek bileşikler arasında **85** numaralı selektif SIRT2 inhibitörü bileşiğin (SIRT2 IC_{50} =19,5 μ M; SIRT1 ve SIRT3 IC_{50} >100 μ M) HepG2 insan karaciğer kanser hücrelerinde SubG1 pikindeki hücre yüzdesini artırmasıyla paralel olarak apoptozu indüklediğini göstermişlerdir [180] (Şekil 2.30).



Şekil 2.30. Bileşik 83, 84 ve 85'in kimyasal yapıları

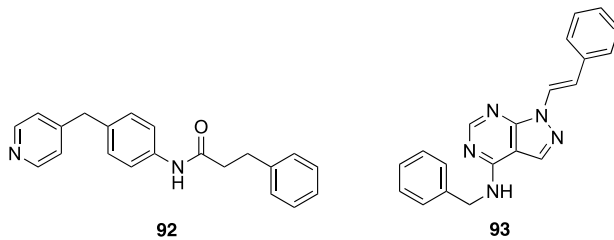
Eren ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, SirReal2 ve analoglarından hareketle elde edilen farmakofor model ile gerçekleştirilen sanal tarama çalışması sonucu ulaşılan **86** (300 μ M konsantrasyonda SIRT2 %84,28 inh.; SIRT1 %31,56 inh.; SIRT3 %31,08 inh.) ve **87** (300 μ M konsantrasyonda SIRT2 %63,17 inh.; SIRT1 %44,74 inh.; SIRT3 %38,30 inh.) numaralı bileşiklerin MCF-7, HeLa ve A-549 kanser hücre hatlarında hücre büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir [20]. Aynı çalışmada sanal tarama çıktısı olarak belirlenen diğer bir bileşik olan STH1 (**88**) (300 μ M konsantrasyonda SIRT2 %42,47 inh.; SIRT1 %31,45 inh.; SIRT3 %18,23 inh.) üzerinde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarıyla iyileştirilmiş SIRT2 inhibitör etki gösteren i) ariloksibenzamit yapısında SIRT1/SIRT2 dual inhibitörü olarak belirlenen ST14 kodlu bileşiğe (**89**) (100 μ M konsantrasyonda SIRT2 %51,61 inh.; SIRT1 %47,16 inh.; SIRT3 <%5 inh.) [16]; ii) 5-feniloksi/benzil-heteroaril-2-karboksamit yapısında selektif SIRT2 inhibitörü olarak belirlenen ST29 (**90**) (SIRT2 IC_{50} =38,69 μ M) ve ST30 (**91**) (SIRT2 IC_{50} =43,29 μ M) kodlu bileşiklere ulaşılmış, bu bileşiklerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında ortaya koydukları sitotoksik etkinliğin SIRT2 inhibisyonu üzerinden olabileceği ifade edilmiştir [17] (Şekil 2.31).



Şekil 2.31. Bileşik 86, 87, 88, 89, 90 ve 91'in kimyasal yapıları

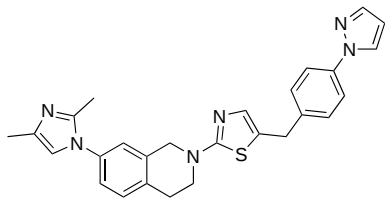
Djokovic ve arkadaşları, yapı-temelli sanal tarama yöntemiyle harmanlanmış SIRT2 bağlanma bölgesi dinamiklerini belirleyen bilgisayar simülasyon protokolünü kullanarak potent ve selektif SIRT2 inhibitörü NDJ18 kodlu bileşiğe (**92**) (SIRT2 $IC_{50}=58,7 \mu M$) ulaşmışlardır. NDJ18'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptozu ve nekrozu indüklediği, G_2/M fazının uzamasını sağladığı, artmış invazyon ve hücre metastazı indükleme özelliğiyle karakterize epitelyal mezenşimal geçiş yolağının önemli bir belirteci olan E-kadherinin ekspresyonunu artırarak invazyon ve metastaz riskini azalttığı bildirilmiştir [125] (Şekil 2.32).

Farklı kimyasal iskeletler taşıyan yeni SIRT2 inhibitörlerin tasarımı amacıyla gerçekleştirilen yapı-temelli sanal tarama çalışması sonucunda seçilen sanal tarama çıktısı bileşikler üzerinde biyoizosterik iskelet değişikliği yapılarak elde edilen pirazolo-pirimidin türevlerinden **93** numaralı bileşiğin (150 μM konsantrasyonda SIRT2 %81 inh.; SIRT1 %76 inh.; SIRT3 %33 inh.) en iyi SIRT2 inhibitör profili sergilediği bildirilmiştir [181] (Şekil 2.32).



Şekil 2.32. Bileşik 92 ve 93'ün kimyasal yapıları

Roche ve arkadaşları önemli bir epigenetik yolak olan lizin asetilasyonun, virüslerin konakçı hücredeki replikasyonunda görev alan faktörler üzerinde etkisi olduğu bilgisinden yola çıkarak; insan sitomegalovirüsü (HMVC) başta olmak üzere pek çok virüse karşı etkili ve SIRT2'yi hedef alan bir seri antiviral bileşik tasarlamışlardır. Bu bileşikler arasında FLS-359'un (**94**) (SIRT2 $IC_{50}=3,0 \mu M$; SIRT1 ve SIRT3 $IC_{50}>100 \mu M$) SIRT2 enzimine bağlanarak aktif bölgenin allosterik olarak yeniden düzenlenmesini sağladığı ve konakçı hücrede deasetilasyon oranını azalttığı bildirilmiştir. SIRT2'ye bağlanmasının ardından deasetilaz aktivitesini azaltması fakat hücrede kısmen de olsa hala SIRT2 aktivitesinin sürdürülüyor olması bu bileşiğin allosterik olarak etkinlik gösterdiğini işaret etmiştir. Substrat selektif allosterik modulator olarak tanımlanan bu bileşiğin özellikle immün sistemi baskılanmış insanları hedef alan pek çok DNA ve RNA virüsüne karşı etkili olduğu, bu virüslerin insan fibroblast hücrelerinde yayılımını ve enfekte etme olasılıklarını azalttığı ifade edilmiştir. Bu çalışmayla, SIRT2'nin iyi bir konakçı hedefi olabileceği ve SIRT2 inhibitör aktivite gösteren geniş spektruma sahip antiviral ilaçların daha da geliştirilebileceği fikri ortaya çıkarılmıştır. Bu bileşiğin ayrıca HepG2 insan hepatoselüler karsinoma hücrelerinde asetile- α -tubulin miktarını artırdığı, MDA-MB-231 insan meme adenokarsinomu hücrelerinde c-Myc onkoprotein miktarını ciddi ölçüde azalttığı da bildirilmiştir [124] (Şekil 2.33).



94

Şekil 2.33. Bileşik 94'ün kimyasal yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Materyal

Çalışmalarımızda kullanılan çözücü ve re ajanlar analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasallar, Abcr (Almanya), Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Carlo Erba (Almanya) ve Isolab (Almanya) firmalarının ürünleridir.

3.1.2. Genel sentez yöntemleri

3-/4-Ariloksianilin türevleri (1a-1j)

Yöntem 1 [182]: Sentezlenecek bileşiğe uygun fenol türevi (1,5 ekivalan) ve 1-iyodo-3-nitrobenzen veya 1-iyodo-4-nitrobenzen (1 ekivalan), *N,N*-dimetilglisin (1 ekivalan), CuI (0,3 ekivalan) ve Cs₂CO₃ (1,5 ekivalan) varlığında 1,4-dioksan:*N,N*-dimetilformamit (60:6) karışımı içerisinde argon atmosferi altında 100 °C'de 24 saat süreyle ısıtılır. Süre sonunda soğutulan reaksiyon ortamı %10'luk NaOH çözeltisi içerisine boşaltılarak etil asetat (3x10 ml) ile ekstre edilir. Birleştirilen organik fazlar susuz Na₂SO₄ ile kurutularak alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Elde edilen ariloksi nitrobenzen türevi ham ürün (1 ekivalan) daha ileri saflaştırmaya tabi tutulmadan bir sonraki basamakta SnCl₂.2H₂O (5 ekivalan) ile etanol içerisinde 3-6 saat arasında değişen sürelerde geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Elde edilen kalıntı 20 ml suda çözülüp, doymuş NaHCO₃ çözeltisi ile pH=8-9 olacak şekilde bazikleştirilir ve etil asetat (3x10 ml) ile ekstre edilir. Organik faz, susuz Na₂SO₄ ile kurutularak alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Kalıntı, uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılır.

Yöntem 2 [183]: Bis(dibenzilidenaseton)paladyum(0) (Pd(dba)₂) (0,01 ekivalan), 2-di-*t*-bütilfosfino-2',4',6'-triizopropilbifenil (*t*-BuXPhos) (0,015 ekivalan) ve K₃PO₄ (2 ekivalan) karışımı toluen içerisinde çözülerek 15 dakika süreyle oda sıcaklığında karıştırılır. Devamında, 2-bromopirimidin (1 ekivalan) ve 3-/4-nitrofenolün (1,2 ekivalan) toluen

içerisindeki çözeltisi karışıma eklenerek argon atmosferinde 8 saat süreyle geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır ve elde edilen kalıntı etil asetat ile çözülerek sırasıyla %5'lik NaOH çözeltisi (3x10 ml) ve %3'lük NaCl çözeltisi (3x10 ml) ile ekstre edilir. Organik faz, susuz Na₂SO₄ ile kurutularak alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Elde edilen 2-(3-/4-nitrofenoksi)pirimidin türevi ham ürün (1 ekivalan), daha ileri bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan bir sonraki basamakta SnCl₂.2H₂O (5 ekivalan) ile etanol içerisinde 4 saat süreyle geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Kalıntı, 20 ml suda çözülüp doymuş NaHCO₃ çözeltisi ile pH=8-9 olacak şekilde bazikleştirilerek etil asetat (3x10 ml) ile ekstre edilir. Birleştirilen organik fazlar, susuz Na₂SO₄ ile kurutularak alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Kalıntı, uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılır.

2-Bromo-N-(3-/4-ariloksifenil)asetamit veya 2-bromo-N-(4-benzoilfenil)asetamit türevleri (2a-2k)

Sentezlenecek bileşiğe uygun amin türevi (1 ekivalan) ve trietilaminin (TEA) (1,1 ekivalan) diklorometan içerisindeki çözeltisine 2-bromoasetil bromür (1,8 ekivalan) 0 °C'de damla damla ilave edilerek 2-4 saat arasında değişen sürelerde oda sıcaklığında karıştırılır. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır ve elde edilen kalıntı diklorometan ile çözülerek sırasıyla 0,1 M HCl (3x10 ml), %1'lik NaHCO₃ (3x10 ml) çözeltileri ve %3'lük NaCl çözeltisi (3x10 ml) ile ekstre edilir. Organik faz, susuz Na₂SO₄ ile kurutularak alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Kalıntı, uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılır veya daha ileri bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan bir sonraki basamakta kullanılır.

N-(3-/4-Ariloksifenil)-2-(ariltiyo)asetamit veya N-(4-benzoilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevleri (S1.1-S1.23 ve S2.1)

Uygun ariltiyol türevi (1,1 ekivalan) ve NaOH (1,1 ekivalan), etanol:su (10:1) karışımı içerisinde 15 dakika süreyle oda sıcaklığında karıştırılır. Sonrasında sentezlenecek bileşiğe uygun 2-bromo-N-(3- veya 4-ariloksifenil)asetamit veya 2-bromo-N-(4-

benzoilfenil)asetamit türevi (1 ekivalan) ilave edilerek 6-8 saat arasında değişen sürelerde oda sıcaklığında karıştırılmaya devam edilir. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Kalıntı, diklorometan ile çözülerek sırasıyla %5'lik NaOH (3x10 ml), 0,1 M HCl (3x10 ml) çözeltileri ve %3'lük NaCl çözeltisi (3x10 ml) ile ekstre edilir. Organik faz, susuz Na₂SO₄ ile kurutularak alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Elde edilen kalıntı, uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi veya kristalizasyon ile saflaştırılır.

N-(3-/4-Ariloksifenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit veya *N*-(4-benzoilfenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit türevleri (S2.2-S2.7)

N-Metilanilin (1,2 ekivalan) ve *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA) (1,5 ekivalan) asetonitril içerisinde oda sıcaklığında 15 dakika süreyle karıştırılır. Sonrasında 2-bromo-*N*-(3 veya 4-ariloksifenil)asetamit veya 2-bromo-*N*-(4-benzoilfenil)asetamit türevi (1 ekivalan) ilave edilir ve 50 °C'de 24 saat süreyle karıştırılmaya devam edilir. Süre sonunda, reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Kalıntı, diklorometan ile çözülerek sırasıyla %1'lik NaHCO₃ çözeltisi (3x10 ml) ve %3'lük NaCl çözeltisi (3x10 ml) ile ekstre edilir. Organik faz, susuz Na₂SO₄ ile kurutularak alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Kalıntı, uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi veya kristalizasyon ile saflaştırılır.

1,1'-(9-Okso-9H-floren-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) türevleri (S3.1-S3.3) [184]

Sentezlenecek bileşiğe uygun amin türevi (1 ekivalan) ve 1,1'-karbonildiimidazol (1,2 ekivalan) diklorometan içerisinde oda sıcaklığında 1 saat karıştırılır. Süre sonunda, reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Elde edilen kalıntı, *N,N*-dimetilformamit içerisinde çözülerek üzerine 2,7-diamino-9H-floren-9-on (0,5 ekivalan) ilave edilir ve 24 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırılır. Süre sonunda reaksiyon ortamı 0,1 M HCl çözeltisi içerisinde boşaltılır ve çöken katı süzülür. Elde edilen katı, uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi veya kristalizasyon ile saflaştırılır.

3.2. Analitik Çalışmalar

3.2.1. Erime derecesi tayini

Sentezlenen bileşiklerin erime dereceleri, Schmelzpunktbestimmer SMP-II dijital erime derecesi tayin cihazı ile belirlenmiş olup değerler düzeltilmeden verilmiştir.

3.2.2. İnce tabaka kromatografisi

Sentez çalışmalarında ve bileşiklerin saflık kontrollerinde, Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ markalı hazır alüminyum plaklar ile çözücü sistemi olarak *n*-hekzan:etil asetat (35:15; 30:20), petrol eteri:etil asetat (35:15), diklorometan:etil asetat (30:20), diklorometan:metanol (48:2; 45:5) ve toluen:metanol (40:10) karışımları kullanılmıştır. Lekelerin belirlenmesinde uv ışığından (254 ve 366 nm), Dragendorf ve Ninhidrin belirteçlerinden yararlanılmıştır.

3.2.3. Kolon kromatografisi

Sentezlenen bileşiklerin saflaştırma işlemlerinde, sabit faz olarak silika (Merck Silica gel 60 (0,063-0,200)) ile hareketli faz olarak bileşiklerin monograflarında belirtilen oranlarda *n*-hekzan:etil asetat, diklorometan:etil asetat ve diklorometan:metanol çözücü sistemleri kullanılmıştır.

3.2.4. ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda Varian Mercury 400 High Performance Digital FT-NMR ve Bruker Avance Neo 500 MHz FT-NMR Spektrometre cihazları ile DMSO-*d*₆ içinde alınıp kayma değerleri δ (ppm) skalasında değerlendirilmiş, *J* değerleri Hz cinsinden verilmiştir.

3.2.5. HRMS spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin HRMS spektrumları, Waters LCT Premier XE UPLC/MS-TOF sistemi kullanılarak pozitif iyon (ESI+) elektrosprey iyonizasyon yöntemi ile metanol içinde alınmıştır.

3.3. Moleküler Docking Çalışmaları

Moleküler docking çalışmaları, bileşiklerin inhibitör etki gösterdiği SIRT1-3 izoformlarının aktif bölge amino asitleriyle etkileşimlerini moleküler düzeyde tespit etmek amacıyla Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2023-2 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnsan SIRT2 enzimine ait farklı x-ray kristal yapıları (PDB: 5DY4 ve 5YQO) [21, 108], insan SIRT1 enzimine ait x-ray kristal yapısı (PDB: 4I5I) [185] ve insan SIRT3 enzimine ait x-ray kristal yapısı (PDB: 4JSR) [163], RCSB Protein Data Bank veri tabanından indirilerek Schrödinger programının “protein preparation wizard” modülü ile hazırlanmıştır. Hazırlık aşamasında aktif bölgedeki kristal su moleküllerinden HOH549 (PDB: 5DY4); HOH702 ve HOH717 (PDB: 4I5I); HOH531 ve HOH632 (PDB: 4JSR) dışındakiler silinmiş, hidrojen atomları eklenmiş, eksik veya yanlış atom tipleri düzeltilmiştir. OPLS4 kuvvet alanı uygulanarak RMSD değeri en fazla 0,3 Å olacak şekilde enerji minimizasyonu uygulanmıştır. Enzim x-ray kristal yapılarına bağlı inhibitör bileşikler seçilerek, inhibitörlerin çevresinde aktif bölgeyi tanımlayan 20 Å'luk bir kutu (grid), “receptor grid generation” paneli ile oluşturulmuştur. Bu aşamada kuvvet alanı olarak yine OPLS4 kullanılarak van der Waals ölçeklendirme faktörü 0,80 ve yük parçalı kesme noktası 0,15 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen grid dosyaları moleküler docking çalışmalarında kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Schrödinger programının Maestro arayüzünde çizilen bileşikler, LigPrep (Schrödinger Release 2023-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023) modülü kullanılarak varsayılan değerlerle üç boyutlu yapılarına geçirilmiştir.

Uygulanacak moleküler docking protokolünü doğrulamak amacıyla SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 enzimlerinin x-ray kristal yapılarında yer alan koligantlar ilgili enzim aktif bölgelerine yeniden yerleştirilmiş ve bu işlem sonucu elde edilen konformasyonlar ilgili koligantlara ait

biyoaktif konformasyonlar ile karşılaştırılarak protokolün doğruluğunu gösterir düzeyde RMSD değerlerine (0,1351 Å (PDB: 5DY4); 0,3759 Å (PDB: 5YQO); 0,4508 Å (PDB: 4I5I); 0,5234 Å (PDB: 4JSR)) ulaşılmıştır.

Bileşiklerin SIRT2 aktif bölgesine yerleştirilmesi, önceden kaydedilen grid dosyaları üzerinden Schrödinger programının Glide modülü ile Extra Precision (XP) algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir [186]. Elde edilen sonuçlar, XP GScore değerleri ile ifade edilen bağlantı enerjileri ve etkileşim türleri temel alınarak değerlendirilip, uygun bağlantı modları belirlenmiştir [16].

Bileşiklerin SIRT1 ve SIRT3 aktif bölgelerine yerleştirilmesi ise, Induced Fit Docking (IFD) protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan docking işleminde van der Waals ölçeklendirme faktörü hem reseptör hem de ligantlar için 0,50 olarak belirlenmiş, Prime MM-GBSA metodu kullanılarak düşük enerjili yapılara dönüştürülen bileşiklerin yeniden yerleştirilmesinde XP algoritması kullanılmış ve her bir bileşik için en iyi yirmi poz seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar, XP GScore değerleri ile ifade edilen bağlantı enerjileri ve etkileşim türleri temel alınarak değerlendirilip, uygun bağlantı modları belirlenmiştir [187, 188].

3.4. *In vitro* SIRT1, SIRT2, SIRT3 İnhibisyon Testleri

Sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanan bileşiklerin *in vitro* SIRT1-3 inhibitör etkilerinin belirlenmesinde; i) Fluor De Lys® Fluorometric Drug Discovery Kit (BML-AK555-0001 SIRT1; BML-AK556-0001 SIRT2; BMLAK557-0001 SIRT3, Enzo Life Sciences), ii) SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 Direct Fluorescent Screening Assay Kit (Katalog No 10010401 SIRT1; 700280 SIRT2; 10011566 SIRT3, Cayman Chemical) iii) SIRT2 Screening Assay Kit (Katalog No ab133082, Abcam) kullanılmıştır [16, 189, 190]. Test bileşiklerinin ve referans olarak kullanılan SIRT inhibitörü suramin, EX-527 ve nikotinamidin DMSO (son konsantrasyondaki miktarı ≤%1) içerisindeki çözeltileri 100 µM konsantrasyonda taranmıştır. Kullanılan enzim kitlerinin çalışma protokolü iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta SIRT enziminin substratla olan aktivasyonu toplamda 50 µl içerisinde sağlanmış, ikinci basamakta ise reaksiyon developer ile durdurularak floresan sinyalin oluşması sağlanmıştır. Enzo üretici firmasına ait kitlerin çalışma protokolüne göre; ilk basamakta test bileşikleri (10 µl/kuyucuk)

ve SIRT enzimi (15 µl/kuyucuk) 37 °C'de 1 saat, süre sonunda substrat (NAD⁺ ve Fluor de Lys-SIRT substratı) (25 µl/kuyucuk) ilavesiyle 37 °C'de yine 1 saat inkübe edilmiştir. Süre bitiminde Fluor de Lys developer ve 2 mM nikotinamit karışımı (50 µl/kuyucuk) eklenerek yine 37 °C'de 45 dakika inkübe edilmiş ve floresans ışımada, eksitasyon 360 nm, emisyon 460 nm dalga boylarında Molecular Device Spectramax i3x marka cihazda okunmuştur. Cayman ve Abcam üretici firmalarına ait kitlerin çalışma protokülüne göre; ilk basamakta test bileşikler (5 µl/kuyucuk), SIRT enzimi (5 µl/kuyucuk), NAD⁺ ve substrat çözeltisi (15 µl/kuyucuk) tampon çözelti içerisinde (25 µl/kuyucuk) 37 °C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. Süre bitiminde developer çözeltisi (50 µl/kuyucuk) eklenerek yine 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve süre sonunda floresans ışımada, eksitasyon 360 nm, emisyon 460 nm dalga boylarında Molecular Device Spectramax i3x marka cihazda okunmuştur. Elde edilen değerler enzim içermeyen kuyucuklara (kör kuyucukları) ait zemin floresans şiddeti değerlerine göre normalize edilmiş, test bileşiklerinin SIRT enzim aktivitesine karşı %inhibisyon değerleri aşağıda verilen eşitliğe (Eş. 3.1) göre hesaplanmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır. Bileşiklerin SIRT2 IC₅₀ değerleri, 0,1-300 µM arasında değişen konsantrasyonlar için elde edilen doz yanıt eğrileri yardımıyla GraphPad Prism 9.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{Inhibisyon} = 1 - \left(\frac{\text{Enzim aktivitesi}_{\text{bileşik-Kör}}}{\text{Enzim aktivitesi}_{\text{kontrol-Kör}}} \times 100 \right) \quad (3.1)$$

3.5. *In vitro* Antiproliferatif Etki Çalışmaları

Test bileşiklerinin *in vitro* antiproliferatif etkileri MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [191, 192]. Kültür edilen MCF-7 hücrelerinin 180 µl hücre süspansiyonu (5x10⁴ hücre/ml), 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 37 °C'de %5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda 1, 10, 25, 50, 100, 200 µM olarak belirlenen tarama konsantrasyonlarındaki test bileşikler plakalara ekilmiş, 37 °C'de %5 CO₂'li etüvde 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 5 mg/ml MTT reajanı (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difelintetrazolyum bromür) ilave edilmiş, 4 saat süresince kuyucuk içeriğinin MTT reajanı ile muamele edilmesi sağlanmıştır. Süre sonunda oluşan formazan kristalleri çözülerek 540 nm dalga boyundaki absorban değerleri spektrofotometre cihazı (Thermo, Almanya) ile

okunmuş, kontrol kuyucuklarına karşı %hücre canlılığı (Eş. 3.2) ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Her deney dört kez tekrarlanarak, istatistiksel analiz için GraphPad Prism 9.0 ve one-way ANOVA testi kullanılmıştır.

$$\%Hücre\ canlılığı = 1 - \left(\frac{Absorbans_{bileşik}}{Absorbans_{kontrol}} \times 100 \right) \quad (3.2)$$

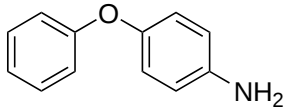
3.6. Western blot analizi

Kültür edilen MCF-7 hücreleri, 2,5x10⁶ hücre/ml konsantrasyonda 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra test bileşiklerinin MTT testinde MCF-7 hücre hattına karşı belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarında hücrelere uygulanmıştır. 72 saat sonra hücreler tripsin yardımıyla plaka yüzeyinden kaldırılarak 3000 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Hücre pelletleri bir defa 1xPBS tamponu ile yıkandıktan sonra tekrar aynı hızda santrifüj edilmiştir. Pelletler hücre lizis çözeltisi (Cell Signaling, ABD) içerisinde 0 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda 14000 xg hızda 4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve supernatantlar ayrı eppendorflara aktarılmıştır. Elde edilen lizatlar 25 µg protein içerecek şekilde SDS-PAGE jel üzerine uygulanmış, 1 saat boyunca elektroforez işlemi ile yürütülmüştür. Semi-dry transfer cihazı (BioRad, ABD) ile proteinler bir nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra 1xPBS tamponu ile 3 defa yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi takiben %5 yağsız süt tozu içeren PBS çözeltisinde 1,5 saat boyunca bloklama yapılmış, sonrasında primer antikorlar membranlar üzerine aktarılmıştır. Membranlar, gece boyu 4 °C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra 3 defa PBS-Tween çözeltisi ile yıkanmış ve üzerine sekonder antikorlar koyularak 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tekrar 3 defa PBS-Tween çözeltisi ile yıkanan tüm membranlar, Li-cor Odyssey FC cihazı ile görüntülenmiştir [193].

4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Bulgular

4-Fenoksianilin (1a)



Fenol (282 mg; 3 mmol) ve 1-iyodo-4-nitrobenzenden (500 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntem 1'e göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

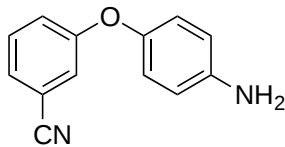
Verim: 130 mg, %35

CAS: 139-59-3

Erime derecesi: 84,1-84,4 °C (82,9-84,1 °C [194])

C₁₄H₁₅N₂O için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 227,1184; Bulunan: 227,1182

3-(4-Aminofenoksi)benzonitril (1b)



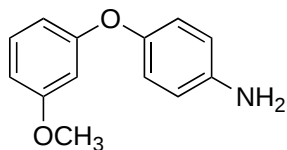
3-Siyanofenol (357 mg; 3 mmol) ve 1-iyodo-4-nitrobenzenden (500 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Soluk sarı renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 61 mg, %15

CAS: 305801-18-7

Erime derecesi: 40,3-40,7 °C

C₁₅H₁₄N₃O için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 252,1137; Bulunan: 252,1130

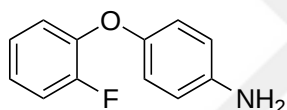
4-(3-Metoksifenoksi)anilin (1c)

3-Metoksifenol (325 µl; 3 mmol) ve 1-iyodo-4-nitrobenzenden (500 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (90:10) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Kahverengi renkte yağimsı bir bileşiktir.

Verim: 155 mg, %36

CAS: 56705-86-3

C₁₅H₁₇N₂O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 257,1290; Bulunan: 257,1283

4-(2-Florofenoksi)anilin (1d)

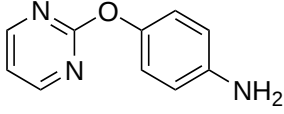
2-Florofenol (273 µl; 3 mmol) ve 1-iyodo-4-nitrobenzenden (500 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (90:10) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Soluk pembe renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 200 mg, %49

CAS: 305801-12-1

Erime derecesi: 61,2-61,5 °C (63-64 °C [195])

C₁₂H₁₂FNO için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 204,0825; Bulunan: 204,0826

4-(Pirimidin-2-iloksi)anilin (1e)

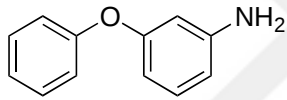
2-Bromopirimidin (492 mg; 3 mmol) ve 4-nitrofenolden (510 mg; 3,6 mmol) hareketle genel sentez yöntemi 2'ye göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Soluk sarı renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 177 mg, %32

CAS: 105130-26-5

Erime derecesi: 122,8-123,1 °C (125-126 °C [196])

C₁₀H₁₀N₃O için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 188,0824; Bulunan: 188,0824

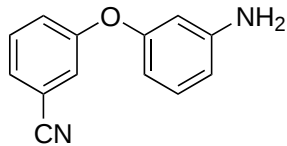
3-Fenoksianilin (1f)

Fenol (282 mg; 3 mmol) ve 1-iyodo-3-nitrobenzenden (500 mg; 2 mmol) genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Turuncu renkte yağimsı bir bileşiktir.

Verim: 188 mg, %51

CAS: 3586-12-7

C₁₂H₁₂NO için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 186,0919; Bulunan: 186,0917

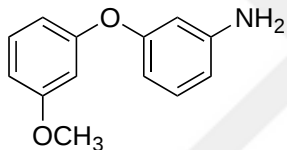
3-(3-Aminofenoksi)benzonitril (1g)

3-Siyanofenol (357 mg; 3 mmol) ve 1-iyodo-3-nitrobenzenden (500 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sarı renkte yağımsı bir bileşiktir.

Verim: 177 mg, %42

CAS: 1198117-24-6

C₁₅H₁₄N₃O için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 252,1137; Bulunan: 252,1133

3-(3-Metoksifenoksi)anilin (1h)

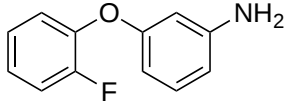
3-Metoksifenol (325 µl; 3 mmol) ve 1-iyodo-3-nitrobenzenden (500 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Soluk sarı renkte yağımsı bir bileşiktir.

Verim: 200 mg, %47

CAS: 116289-64-6

C₁₃H₁₄NO₂ için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 257,1290; Bulunan: 257,1288

3-(2-Florofenoksi)anilin (1i)

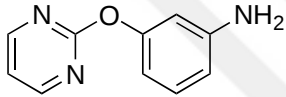


2-Florofenol (273 µl; 3 mmol) ve 1-iyodo-3-nitrobenzenden (500 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemi 1'e göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Kahverengi renkte yağimsı bir bileşiktir.

Verim: 165 mg, %41

C₁₄H₁₄FN₂O için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 245,1090; Bulunan: 245,1079

3-(Pirimidin-2-iloksi)anilin (1j)



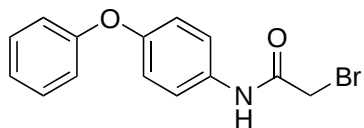
2-Bromopirimidin (492 mg; 3 mmol) ve 3-nitrofenolden (510 mg; 3,6 mmol) hareketle genel sentez yöntemi 2'e göre sentezlenmiş, diklorometan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 149 mg, %40

CAS: 176032-34-1

Erime derecesi: 101,5-101,8 °C

C₁₀H₁₀N₃O için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 188,0824; Bulunan: 188,0816

2-Bromo-N-(4-fenoksifenil)asetamit (2a)

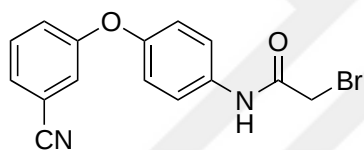
Bileşik **1a'**dan (365 mg; 1,97 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 312 mg, %52

CAS: 36160-85-7

Erime derecesi: 86,2-86,6°C (86 °C [197])

C₁₄H₁₃BrNO₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 306,0130; Bulunan: 306,0121

2-Bromo-N-(4-(3-siyanofenoksi)fenil)asetamit (2b)

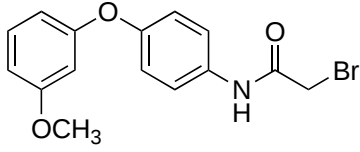
Bileşik **1b'**den (268 mg; 1,27 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 182 mg, %43

Erime derecesi: 136,1-136,6 °C

C₁₅H₁₂BrN₂O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 331,0082; Bulunan: 331,0086

2-Bromo-N-(4-(3-metoksifenoksi)fenil)asetamit (2c)



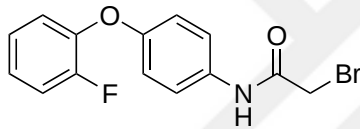
Bileşik **1c'**den (261 mg; 1,21 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Pembemsi renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 171 mg, %42

Erime derecesi: 104,3-105,0 °C

C₁₅H₁₅BrNO₃ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 336,0235; Bulunan: 336,0231

2-Bromo-N-(4-(2-florofenoksi)fenil)asetamit (2d)

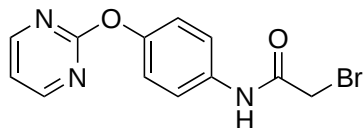


Bileşik **1d'**den (367 mg; 1,21 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (90:10) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 332 mg, %57

Erime derecesi: 101,7-102,2 °C

C₁₄H₁₂BrFNO₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 324,0035; Bulunan: 324,0035

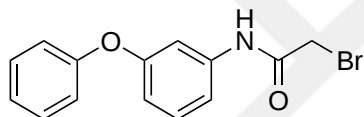
2-Bromo-N-(4-(pirimidin-2-iloksi)fenil)asetamit (2e)

Bileşik **1e'**den (426 mg, 2,31 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:etil asetat (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Soluk sarı renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 211 mg, %30

Erime derecesi: 145,2-146,0 °C

C₁₂H₁₁BrN₃O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 308,0035; Bulunan: 308,0040

2-Bromo-N-(3-fenoksifenil)asetamit (2f)

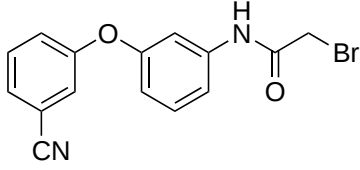
Bileşik **1f'**den (93 mg; 0,5 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamağa geçilmiştir. Soluk sarı renkte yağimsı bir bileşiktir.

Verim: 107 mg, %70

CAS: 149609-27-8

C₁₄H₁₃BrNO₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 306,0130; Bulunan: 306,0139

2-Bromo-N-(3-(3-siyanofenoksi)fenil)asetamit (2g)

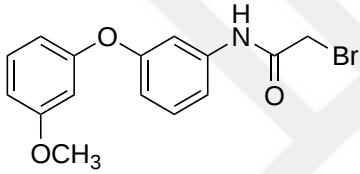


Bileşik **1g'**den (140 mg; 0,66 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamağa geçilmiştir. Sarı renkte sıvı bir bileşiktir.

Verim: 120 mg, %55

C₁₇H₁₆BrN₃O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 372,0348; Bulunan: 372,0360

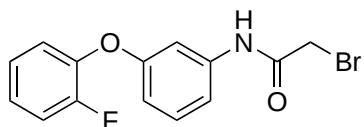
2-Bromo-N-(3-(3-metoksifenoksi)fenil)asetamit (2h)



Bileşik **1h'**den (366 mg; 1,7 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamağa geçilmiştir. Soluk pembe renkte sıvı bir bileşiktir.

Verim: 245 mg, %43

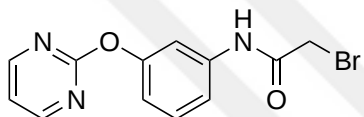
C₁₅H₁₅BrNO₃ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 336,0235; Bulunan: 336,0238

2-Bromo-N-(3-(2-florofenoksi)fenil)asetamit (2i)

Bileşik **1i**'den (260 mg; 1,28 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamağa geçilmiştir. Sarı renkte sıvı bir bileşiktir.

Verim: 266 mg, %64

C₁₄H₁₂BrFNO₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 324,0035; Bulunan: 324,0038

2-Bromo-N-(3-(pirimidin-2-iloksi)fenil)asetamit (2j)

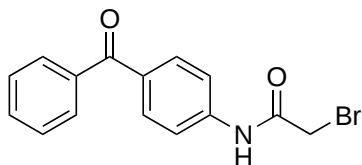
Bileşik **1j**'den (149 mg; 0,80 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamağa geçilmiştir. Sarı renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 114 mg, %46

Erime derecesi: 128,5-128,9 °C

C₁₂H₁₁BrN₃O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 308,0035; Bulunan: 308,0024

N-(4-benzoilfenil)-2-bromoasetamit (2k)



(4-aminofenil)(fenil)metanondan (592 mg; 3 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamağa geçilmiştir. Sarı renkte katı bir bileşiktir.

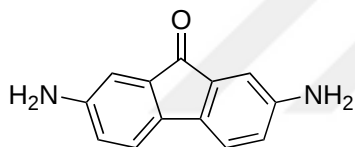
Verim: 303 mg, %32

CAS: 947240-23-5

Erime derecesi: 142,0-142,4 °C

C₁₅H₁₃BrNO₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 318,0030; Bulunan: 318,0040

2,7-Diamino-9H-floren-9-on (3a) [198]



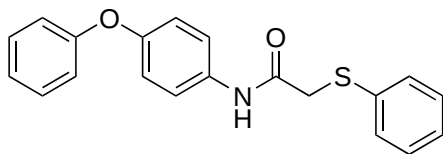
2,7-Dinitro-9H-floren-9-on (1 ekivalan) ve SnCl₂.2H₂O (8 ekivalan) etanol içerisinde 24 saat süreyle geri çeviren soğutucu altında ısıtılmıştır. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Kalıntı, 20 ml suda çözülüp doymuş NaHCO₃ çözeltisi ile pH=8-9 olacak şekilde bazikleştirilmiş ve etil asetat (3x10 ml) ile ekstre edilmiştir. Organik faz, susuz Na₂SO₄ ile kurutulmuş ve alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen ham ürün daha ileri bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Siyah renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 446 mg, %87

CAS: 2915-84-6

Erime Derecesi: 283,3-283,8 °C (283–285 °C [199])

C₁₃H₁₁N₂O için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 211,0871; Bulunan: 211,0871

N-(4-Fenoksifenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.1)

Bileşik **2a** (203 mg; 0,66 mmol) ve tiyofenolden (75 µl; 0,73 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 69 mg, %31

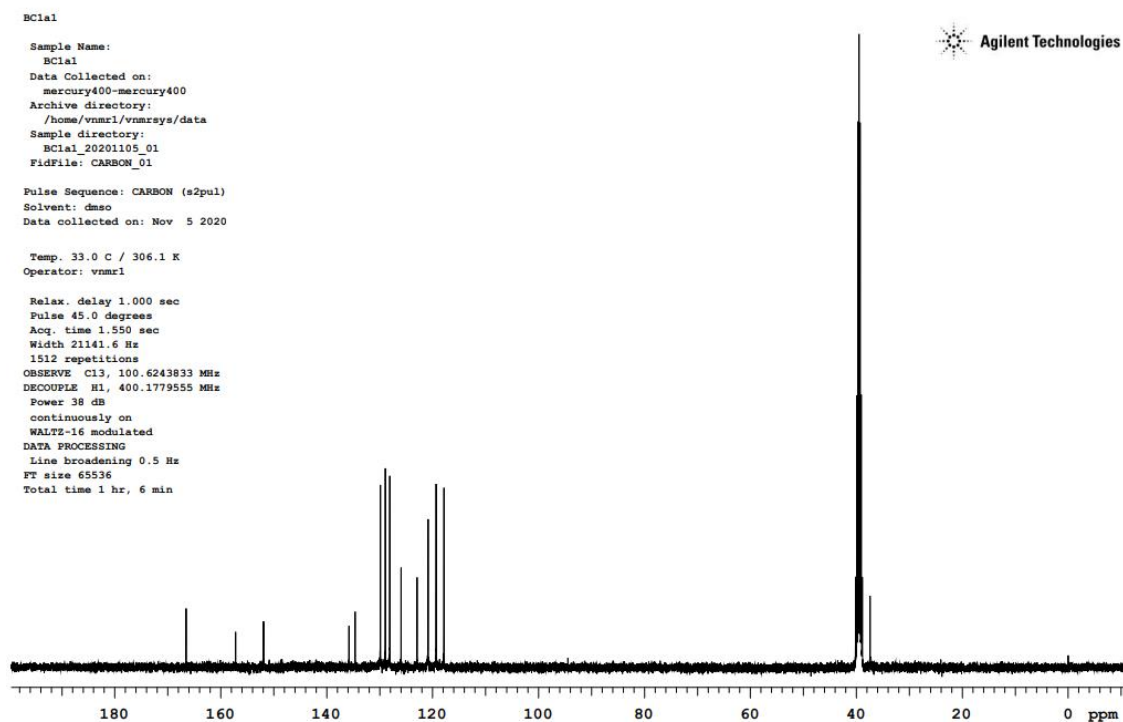
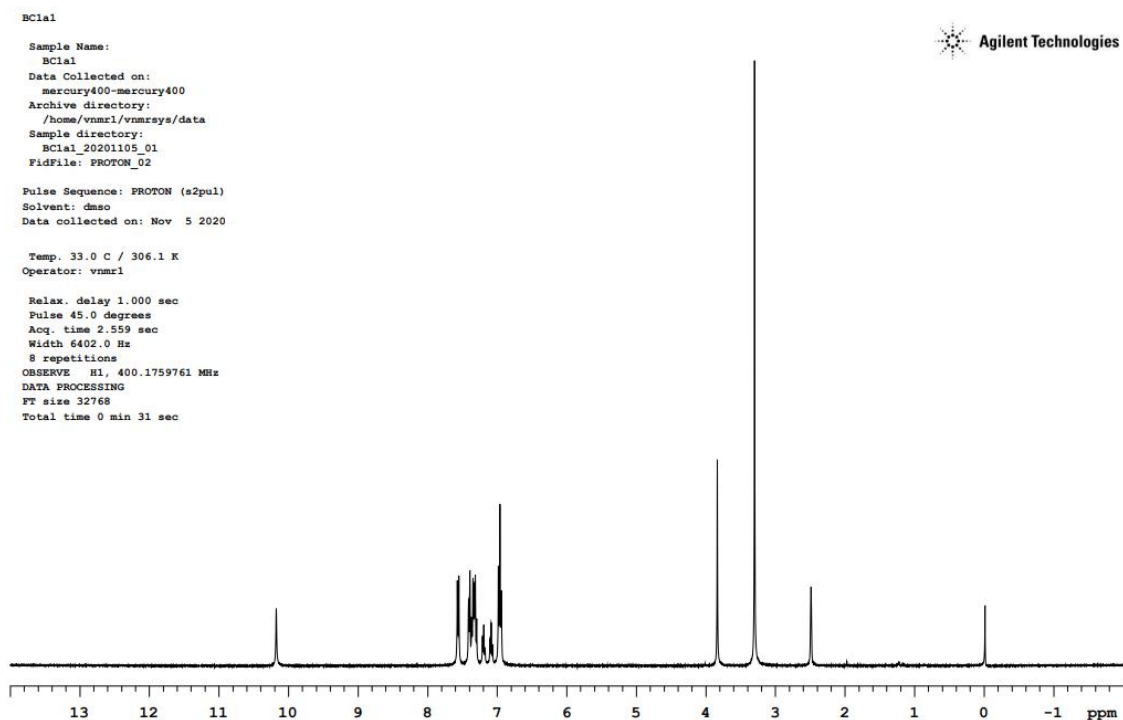
CAS: 363576-67-4

Erime derecesi: 123,6-124,2 °C

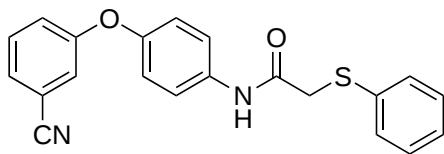
C₂₀H₁₈NO₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 336,1058; Bulunan: 336,1058

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,84 (2H, s, -COCH₂S-); 6,96 (4H, t, *J*=8,8 Hz, Ar-H); 7,09 (1H, t, *J*=7,2 Hz, Ar-H); 7,19 (1H, t, *J*=7,4 Hz, Ar-H); 7,30-7,41 (6H, m, Ar-H); 7,56 (2H, d, *J*=8,4 Hz, Ar-H); 10,18 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 37,42; 117,86; 119,35; 120,85; 122,94; 125,96; 128,10; 128,94; 129,87; 134,64; 135,80; 151,93; 157,20; 166,55.



Şekil 4.1. Bileşik **S1.1**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(3-Siyanofenoksi)fenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.2)

Bileşik **2b** (155,1 mg; 0,47 mmol) ve tiyofenolden (53 µl; 0,52 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

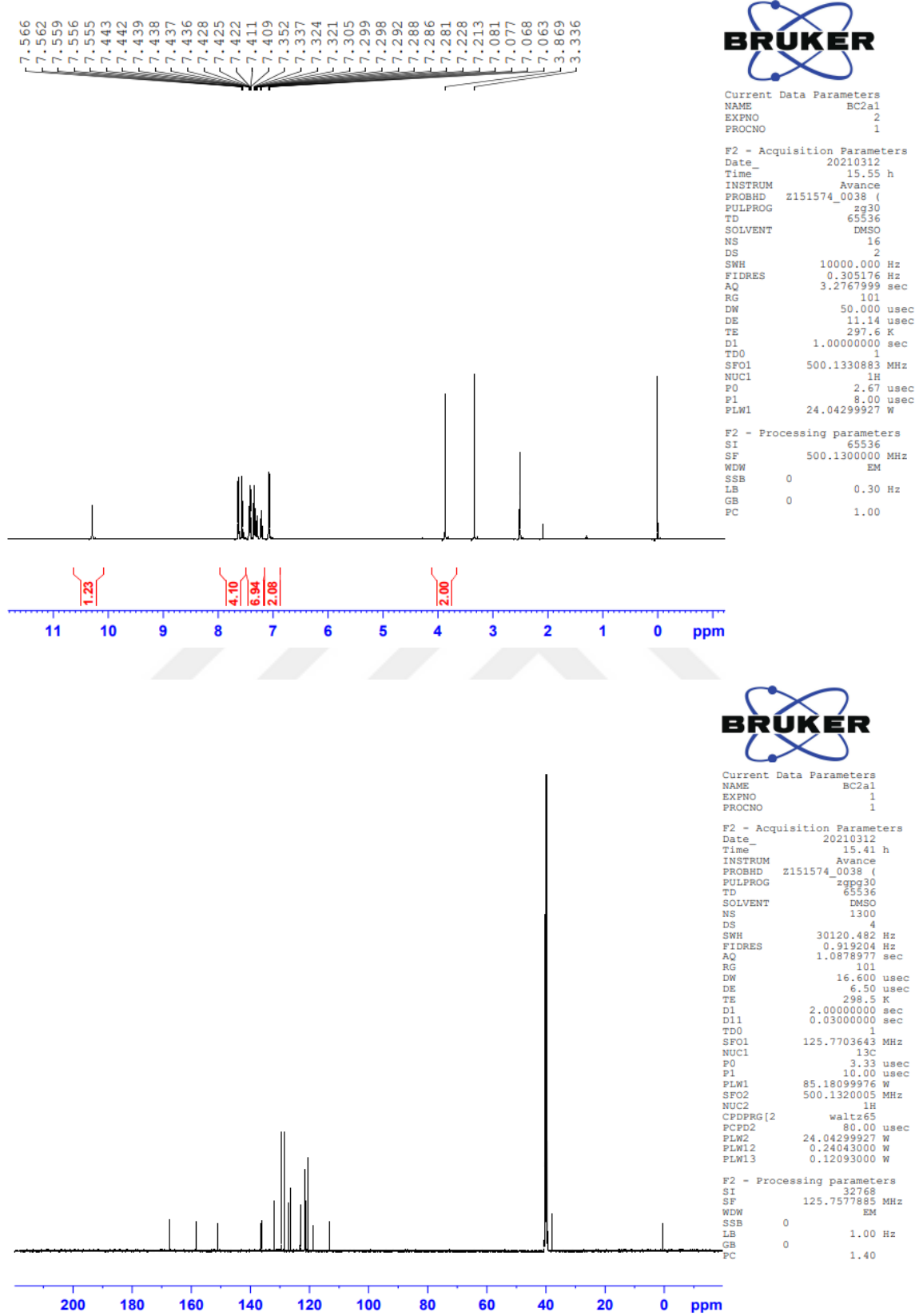
Verim: 52 mg, %31

Erime derecesi: 114,7-115,2 °C

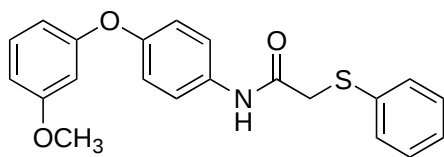
C₂₁H₁₇N₂O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 361,1011; Bulunan: 361,1001

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,87 (2H, s, -COCH₂S-); 7,07 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 7,21 (1H, tt, *J*=7,4 ve 1,2 Hz, Ar-H); 7,28-7,31 (1H, m, Ar-H); 7,34 (2H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 7,41-7,44 (3H, m, Ar-H); 7,56-7,57 (2H, m, Ar-H); 7,63 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 10,29 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 37,90; 113,12; 118,66; 120,59; 121,28; 121,44; 123,10; 126,51; 127,21; 128,57; 129,51; 131,89; 136,08; 136,32; 151,16; 158,29; 167,23.



Şekil 4.2. Bileşik **S1.2**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(3-Metosifenoksi)fenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.3)

Bileşik **2c** (101 mg; 0,30 mmol) ve tiyofenolden (34 µl; 0,33 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, etanol:su karışımından kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

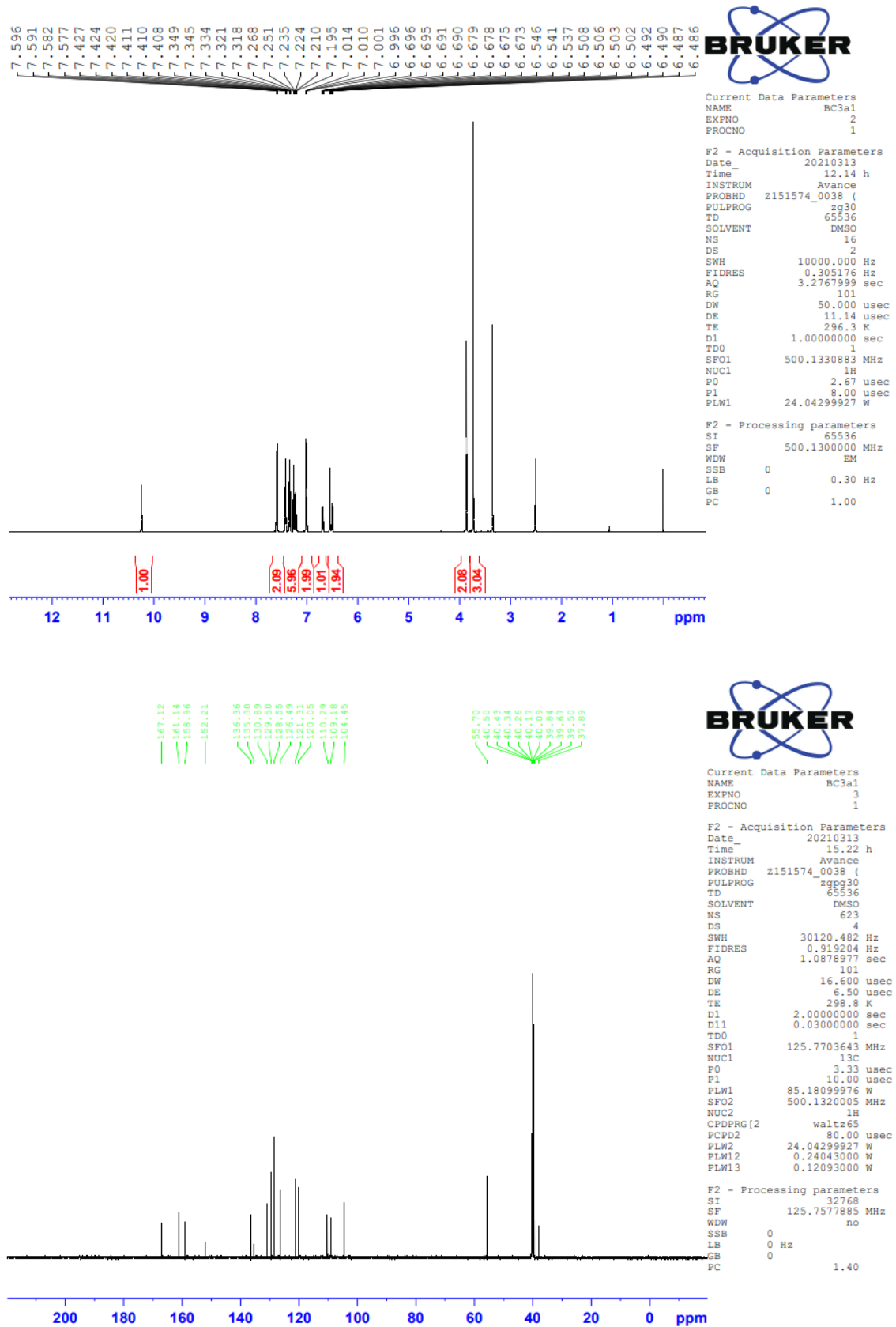
Verim: 60 mg, %32

Erime derecesi: 112,0-112,3 °C

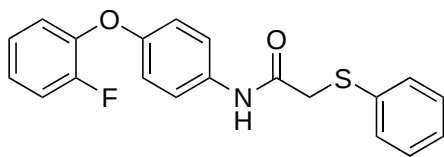
C₂₁H₂₀NO₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 366,1164; Bulunan: 366,1162

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,73 (3H, s, -OCH₃); 3,86 (2H, s, -COCH₂S-); 6,50 (1H, dd, *J*=7,8 ve 2,4 Hz, Ar-H); 6,54 (1H, t, *J*=2,4 Hz, Ar-H); 6,68 (1H, dd, *J*=7,8 ve 2,4 Hz, Ar-H); 7,01 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 7,21 (1H, tt, *J*=7,4 ve 1,2 Hz, Ar-H); 7,25 (1H, t, *J*=8,2 Hz, Ar-H); 7,33 (2H, t, *J*=8,2 Hz, Ar-H); 7,40-7,43 (2H, m, Ar-H); 7,59 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 10,24 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 37,89; 55,70; 104,46; 109,18; 110,29; 120,05; 121,31; 126,49; 128,55; 129,50; 130,89; 135,30; 136,36; 152,21; 158,96; 161,14; 167,12.



Şekil 4.3. Bileşik **S1.3**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(2-Florofenoksi)fenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.4)

Bileşik **2d** (114 mg; 0,35 mmol) ve tiyofenolden (40 µl; 0,39 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

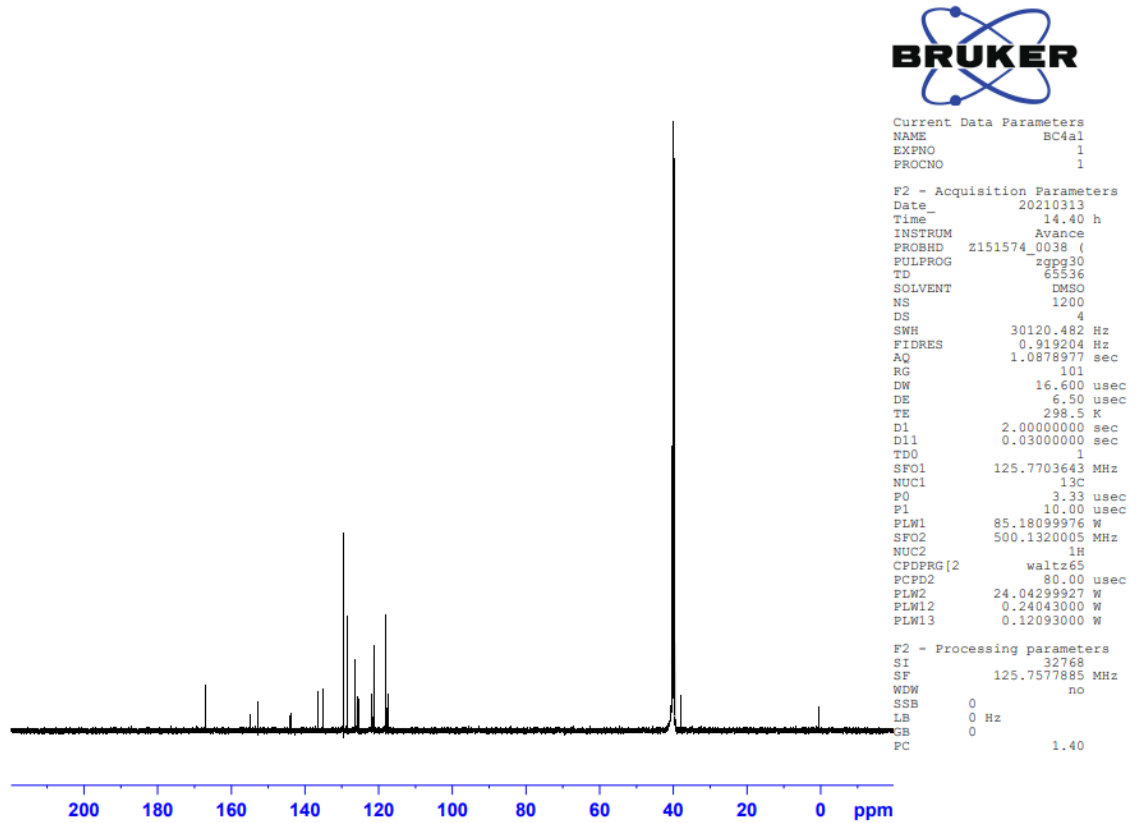
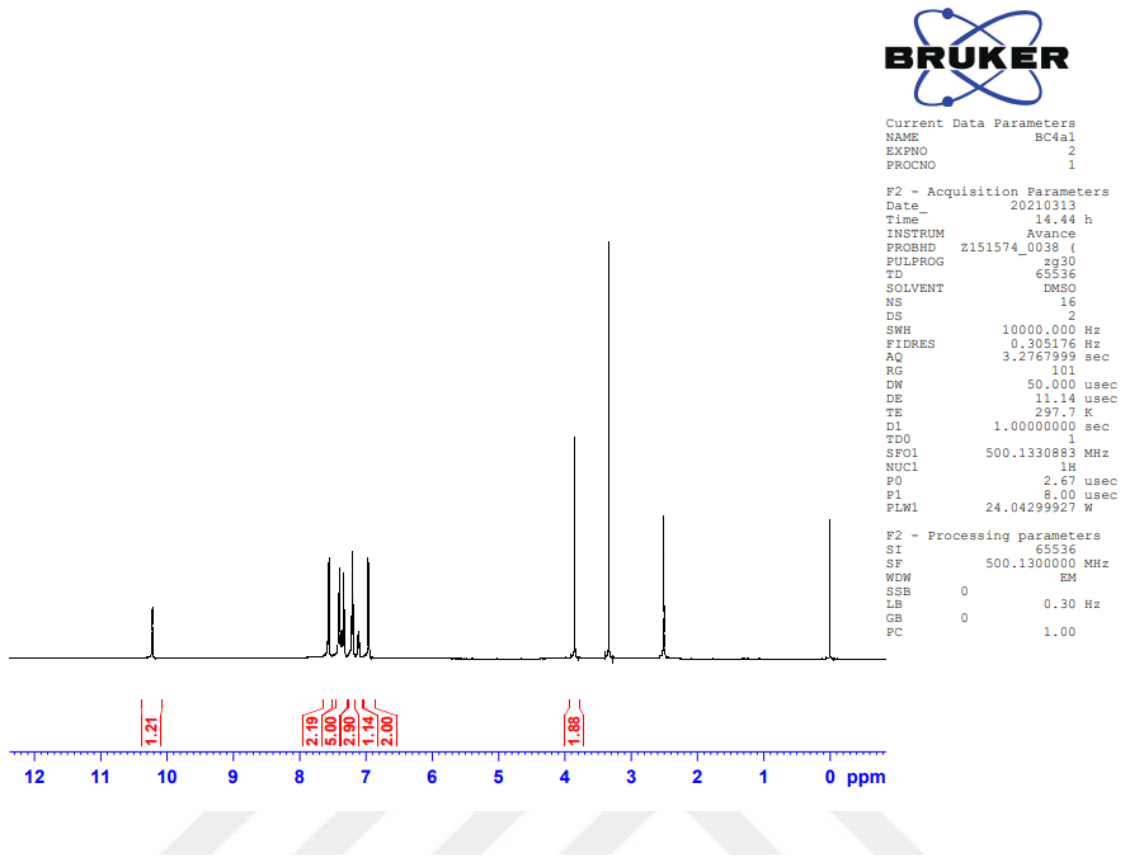
Verim: 50 mg, %40

Erime derecesi: 113,4-113,7 °C

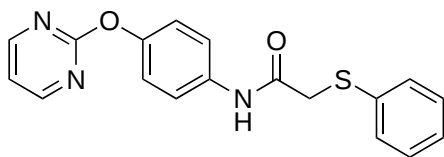
C₂₀H₁₇FNO₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 354,0964; Bulunan: 354,0963

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,85 (2H, s, -COCH₂S-); 6,96 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 7,09-7,13 (1H, m, Ar-H); 7,18-7,23 (3H, m, Ar-H); 7,33 (2H, t, *J*=7,5 Hz, Ar-H); 7,35-7,42 (3H, m, Ar-H); 7,56 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 10,22 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 37,86; 117,60 (d, *J*=18,0 Hz); 118,13; 121,36; 121,86; 125,55 (d, *J*=7,3 Hz); 125,85 (d, *J*=3,7 Hz); 126,49; 128,56; 129,50; 135,03; 136,35; 143,89 (d, *J*=10,0 Hz); 152,85; 153,85 (d, *J*=244,9 Hz); 167,10.



Şekil 4.4. Bileşik **S1.4**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(Pirimidin-2-iloksi)fenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.5)

Bileşik **2e** (71 mg; 0,23 mmol) ve tiyofenolden (26 µl; 0,25 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, metanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Soluk sarı renkte katı bir bileşiktir.

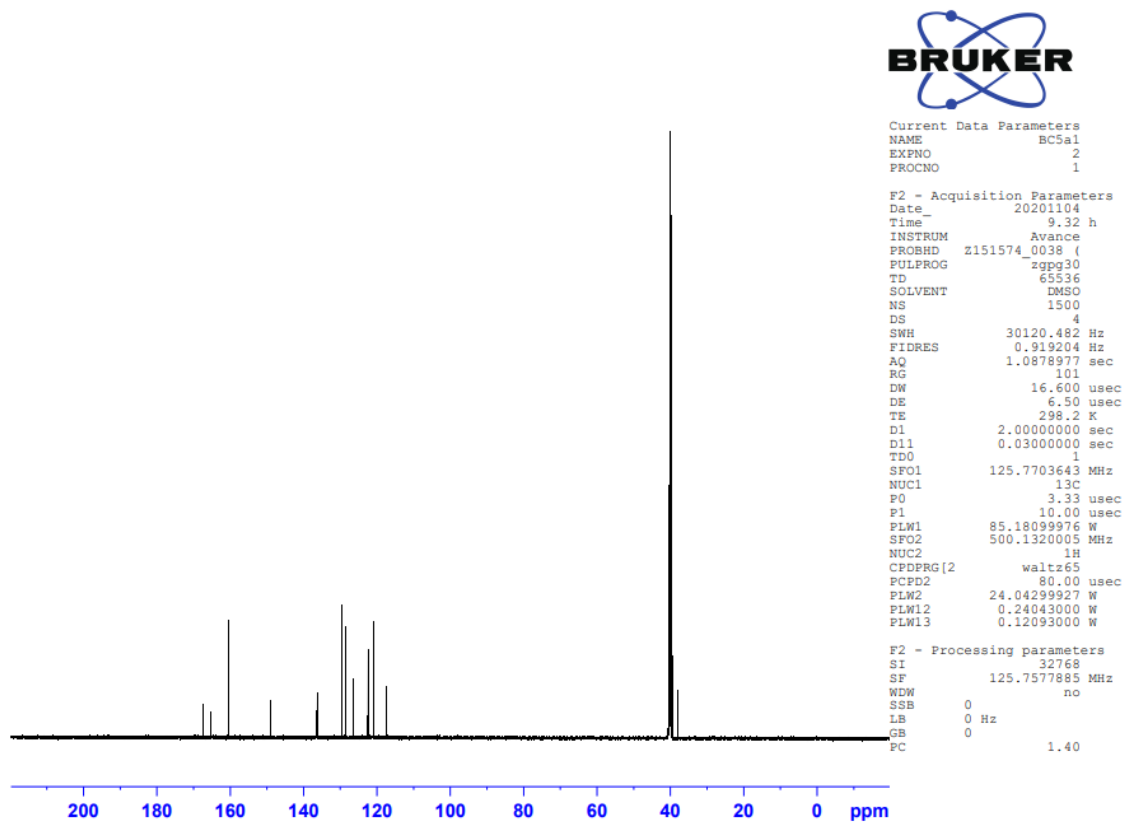
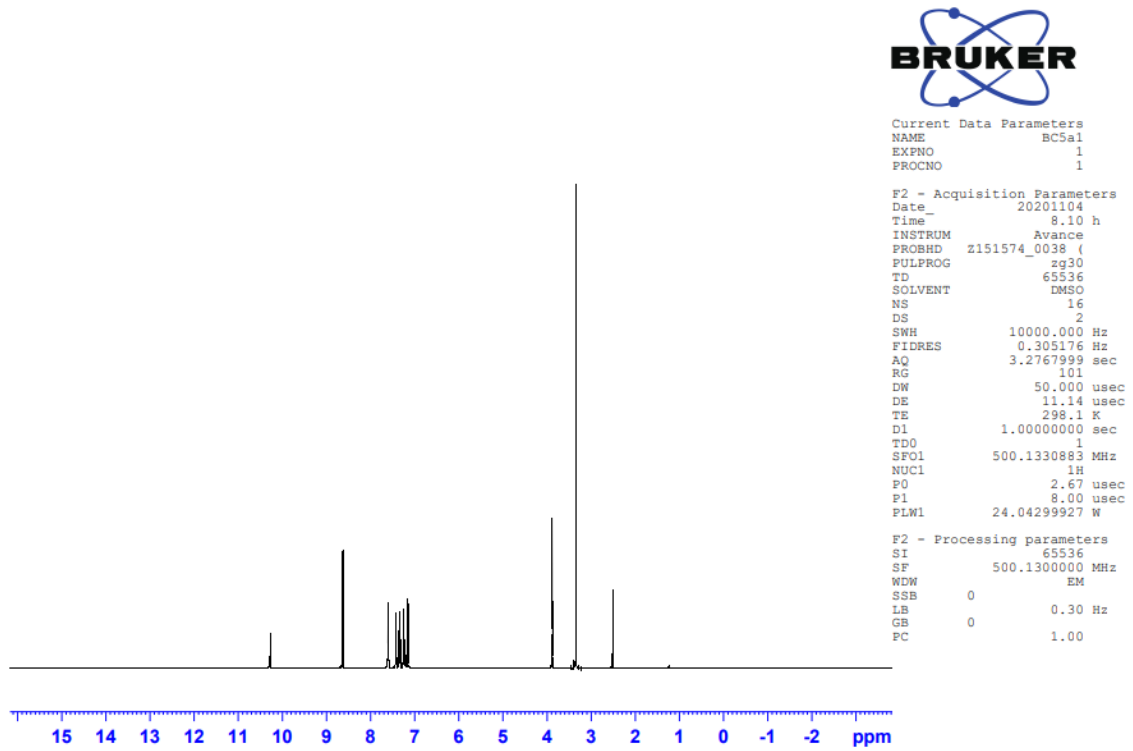
Verim: 38 mg, %49

Erime derecesi: 173,0-173,5 °C

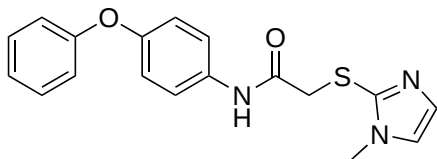
C₁₈H₁₆N₃O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 338,0963; Bulunan: 338,0960

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,88 (2H, s, -COCH₂S-); 7,14 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 7,22 (1H, tt, *J*=7,8 ve 1,2 Hz, Ar-H); 7,25 (1H, t, *J*= 4,8 Hz, Ar-H); 7,34 (2H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 7,42 (2H, dd, *J*=7,8 ve 1,2 Hz, Ar-H); 7,60 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 8,63 (2H, d, *J*=4,8 Hz, Ar-H); 10,28 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 37,93; 117,31; 120,89; 122,45; 126,53; 128,62; 129,51; 136,30; 136,42; 148,86; 160,47; 165,36; 167,23.



Şekil 4.5. Bileşik **S1.5**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-Fenoksifenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (S1.6)

Bileşik **2a** (101 mg; 0,33 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (41 mg; 0,36 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 68 mg, %61

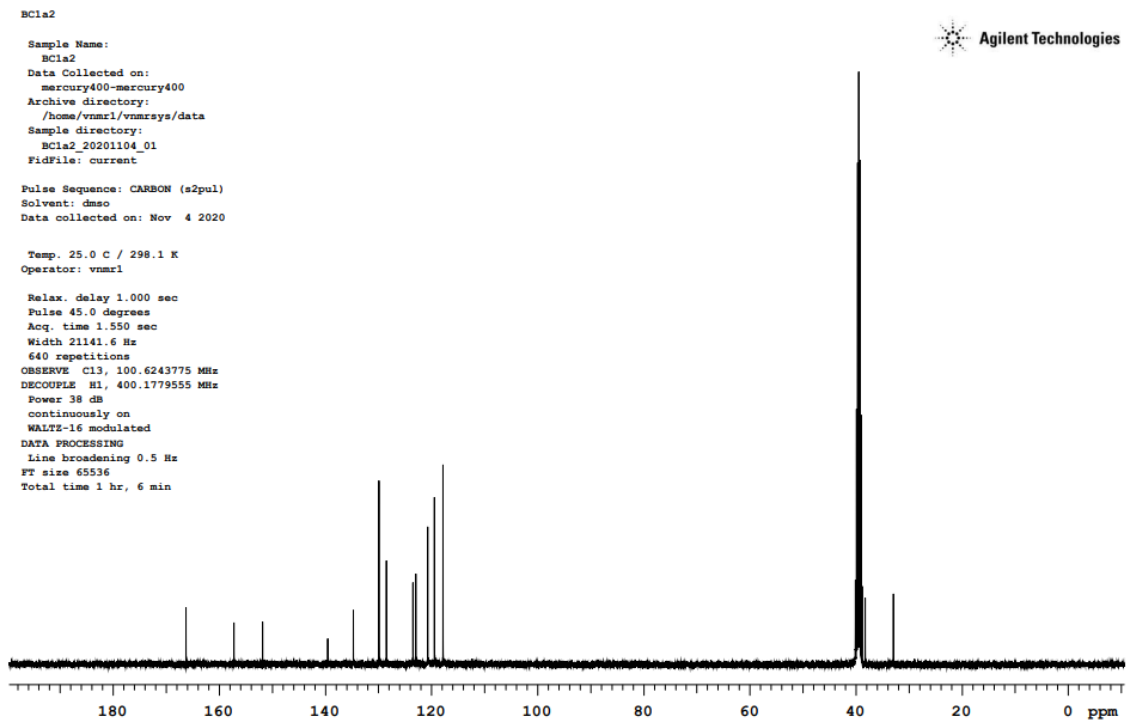
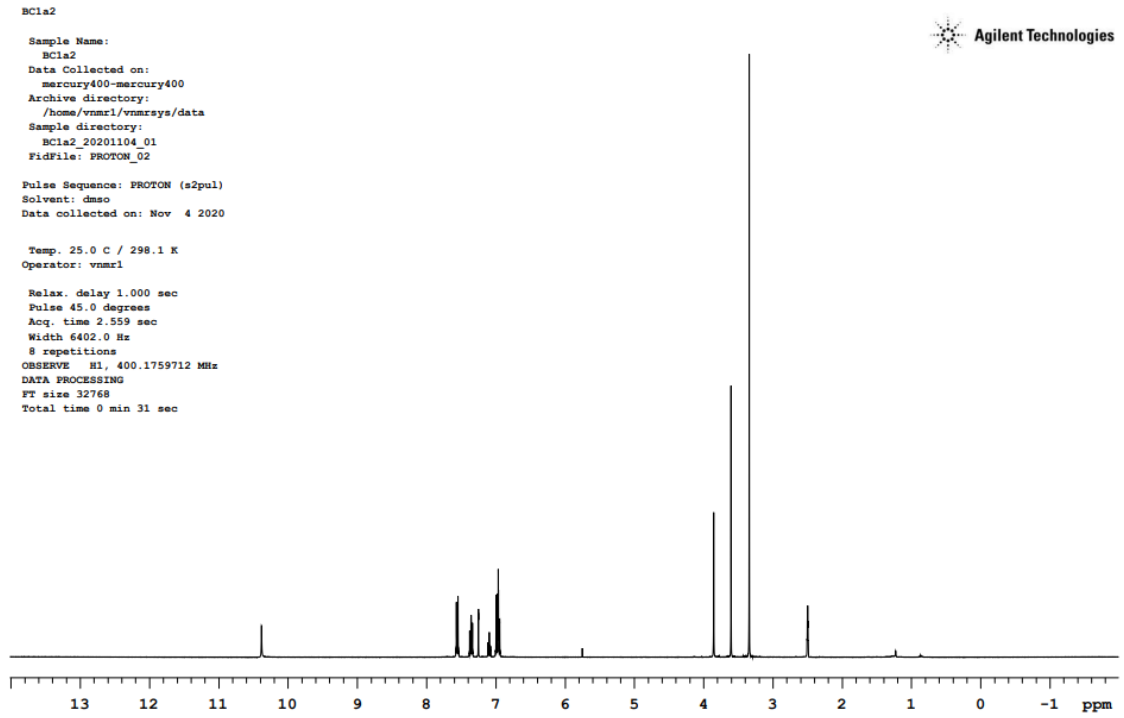
CAS: 438604-43-4 [200]

Erime derecesi: 141,5-141,9 °C

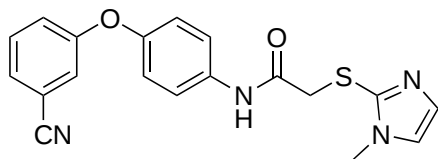
C₁₈H₁₈N₃O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 340,1120; Bulunan: 340,1131

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,61 (3H, s, -NCH₃); 3,86 (2H, s, -COCH₂S-); 6,94- 6,97 (3H, m, Ar-H); 6,99 (2H, d, *J*=9,2 Hz, Ar-H); 7,10 (1H, t, *J*=7,2 Hz, Ar-H); 7,25 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,33-7,38 (2H, m, Ar-H); 7,56 (2H, d, *J*=9,2 Hz, Ar-H); 10,39 (1H, br s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 32,96; 38,29; 117,86; 119,48; 120,74; 122,98; 123,52; 128,52; 129,93; 134,76; 139,58; 151,86; 157,27; 166,30.



Şekil 4.6. Bileşik **S1.6**'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(3-Siyanofenoksi)fenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (S1.7)

Bileşik **2b** (100 mg; 0,30 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (38 mg; 0,33 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:etil asetat (70:30) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 49 mg, %45

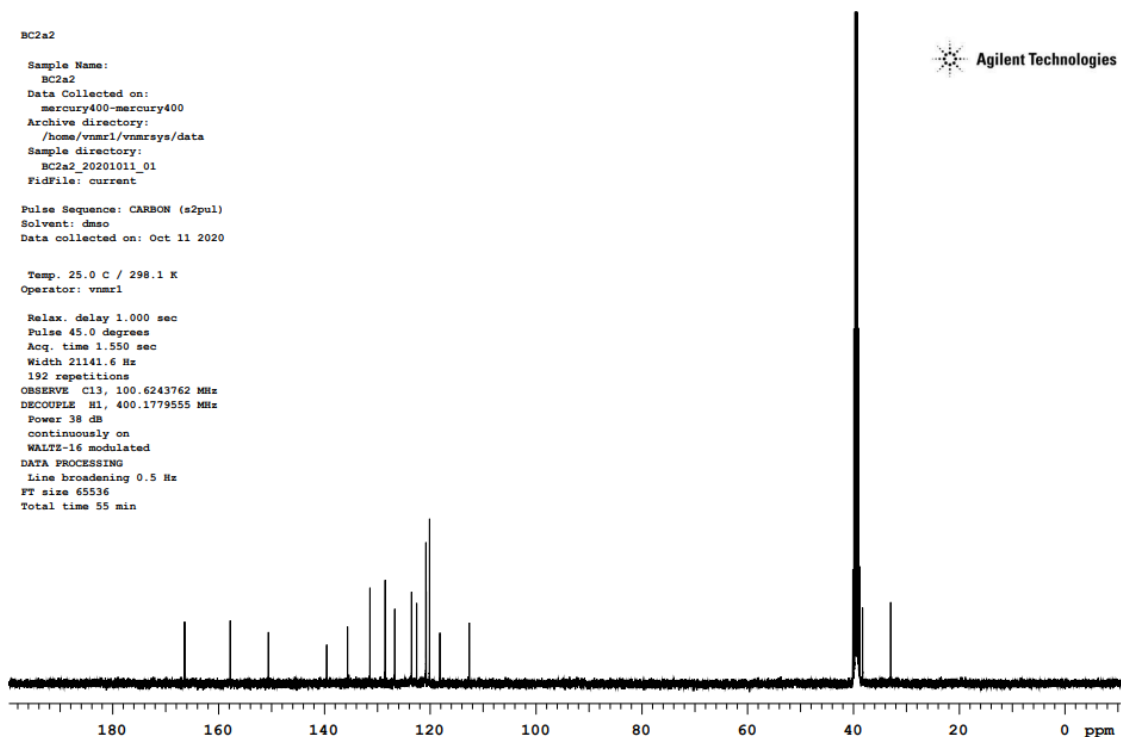
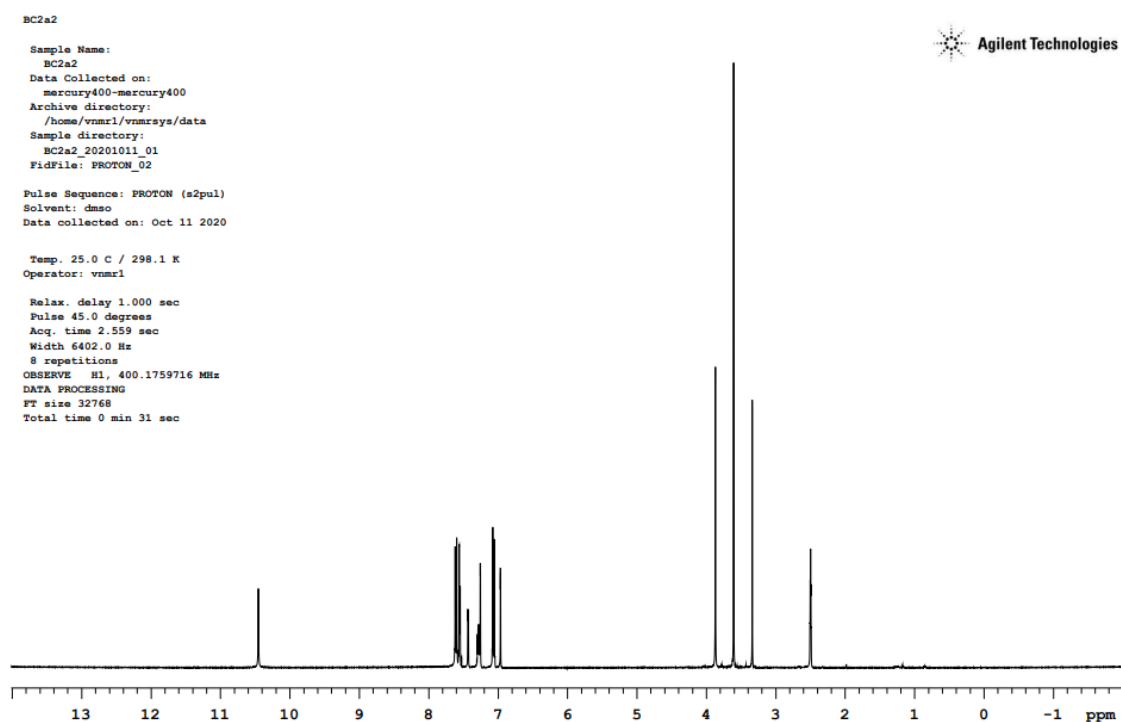
CAS: 2775680-32-3

Erime derecesi: 97,7-98,3 °C

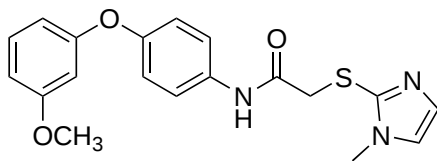
C₁₉H₁₇N₄O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 365,1072; Bulunan: 365,1074

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,61 (3H, s, -NCH₃); 3,87 (2H, s, -COCH₂S-); 6,97 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,07 (2H, d, *J*=9,2 Hz, Ar-H); 7,26 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,27- 7,30 (1H, m, Ar-H); 7,43 (1H, d, *J*=2,0 Hz, Ar-H); 7,53-7,57 (2H, m, Ar-H); 7,61 (2H, d, *J*=9,2 Hz, Ar-H); 10,46 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 32,97; 38,30; 112,63; 118,19; 120,14; 120,78; 120,83; 122,58; 123,54; 126,71; 128,53; 131,41; 135,65; 139,58; 150,60; 157,82; 166,44.



Şekil 4.7. Bileşik **S1.7**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(3-Metoksifenoksi)fenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (S1.8)

Bileşik **2c** (128 mg; 0,38 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (48 mg; 0,42 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Soluk pembe renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 100 mg, %71

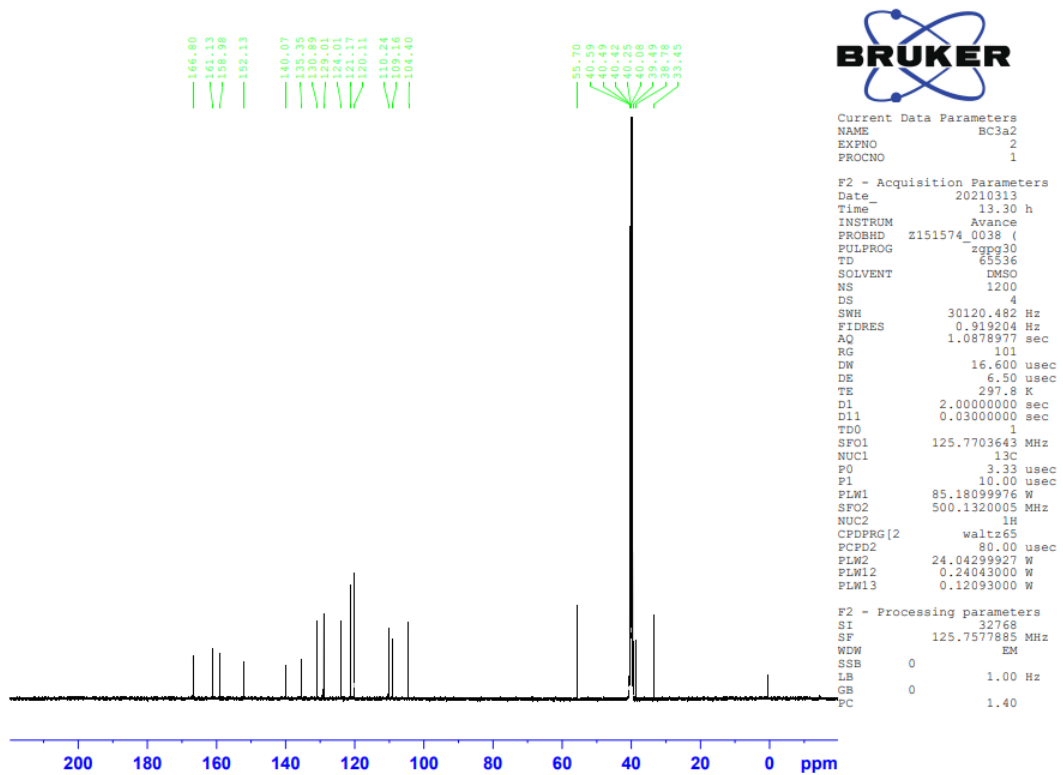
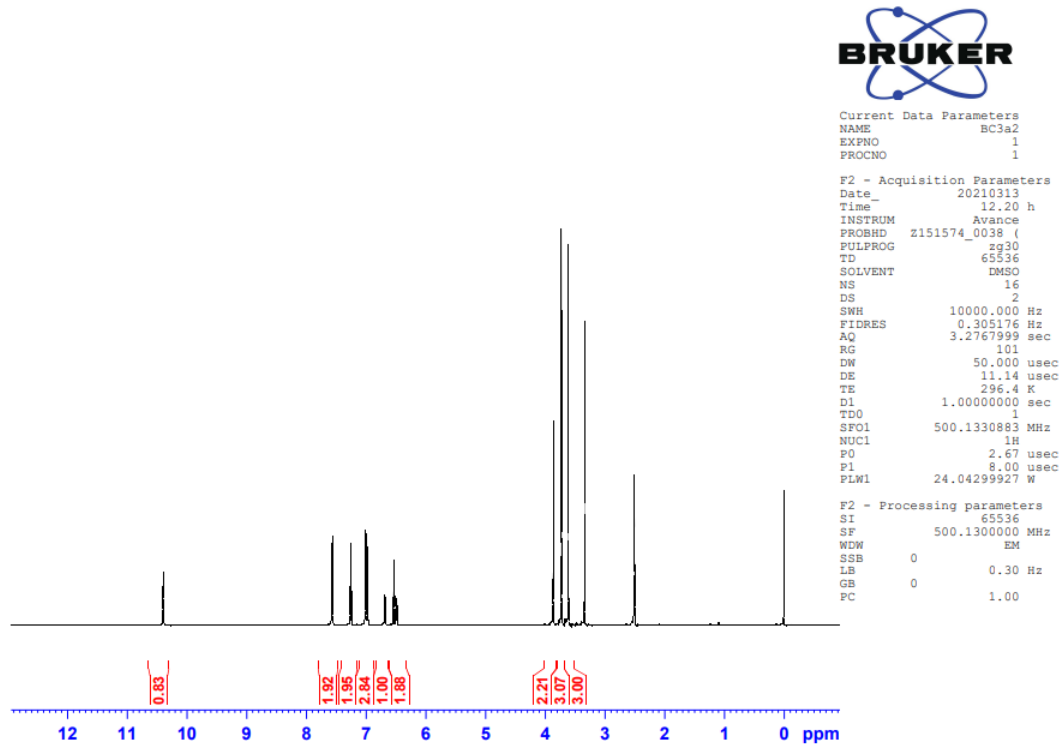
CAS: 2772458-63-4

Erime derecesi: 110,2-110,3 °C

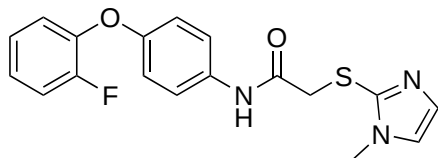
C₁₉H₂₀N₃O₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 370,1225; Bulunan: 370,1226

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,61 (3H, s, -NCH₃); 3,73 (3H, s, -OCH₃); 3,87 (2H, s, -COCH₂S-); 6,50 (1H, dd, *J*=7,8 ve 2,3 Hz, Ar-H); 6,54 (1H, t, *J*=2,3 Hz, Ar-H); 6,68 (1H, dd, *J*=7,8 ve 2,3 Hz, Ar-H); 6,97 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,01 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 7,24-7,27 (2H, m, Ar-H); 7,57 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 10,40 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 33,45; 38,78; 55,70; 104,40; 109,16; 110,24; 120,11; 121,17; 124,02; 129,01; 130,89; 135,35; 140,07; 152,13; 158,98; 161,13; 166,80.



Şekil 4.8. Bileşik **S1.8**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(2-Florofenoksi)fenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (**S1.9**)

Bileşik **2d** (101 mg; 0,31 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (39 mg; 0,34 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:etil asetat (70:30) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 60 mg, %54

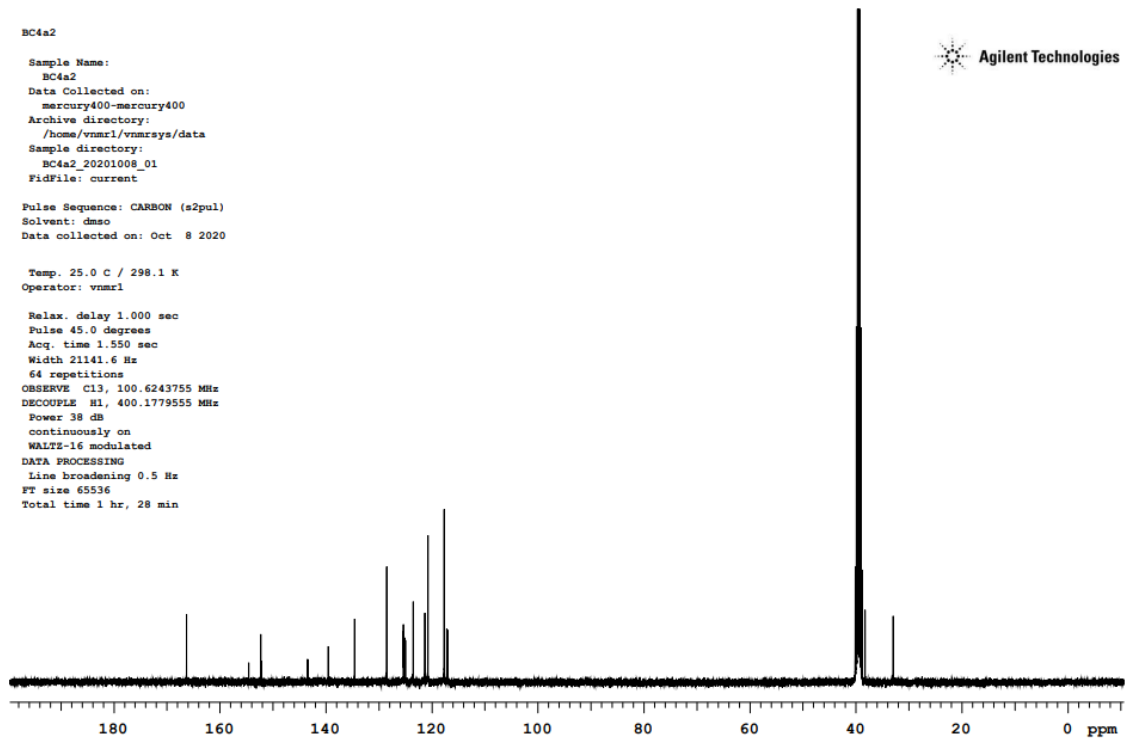
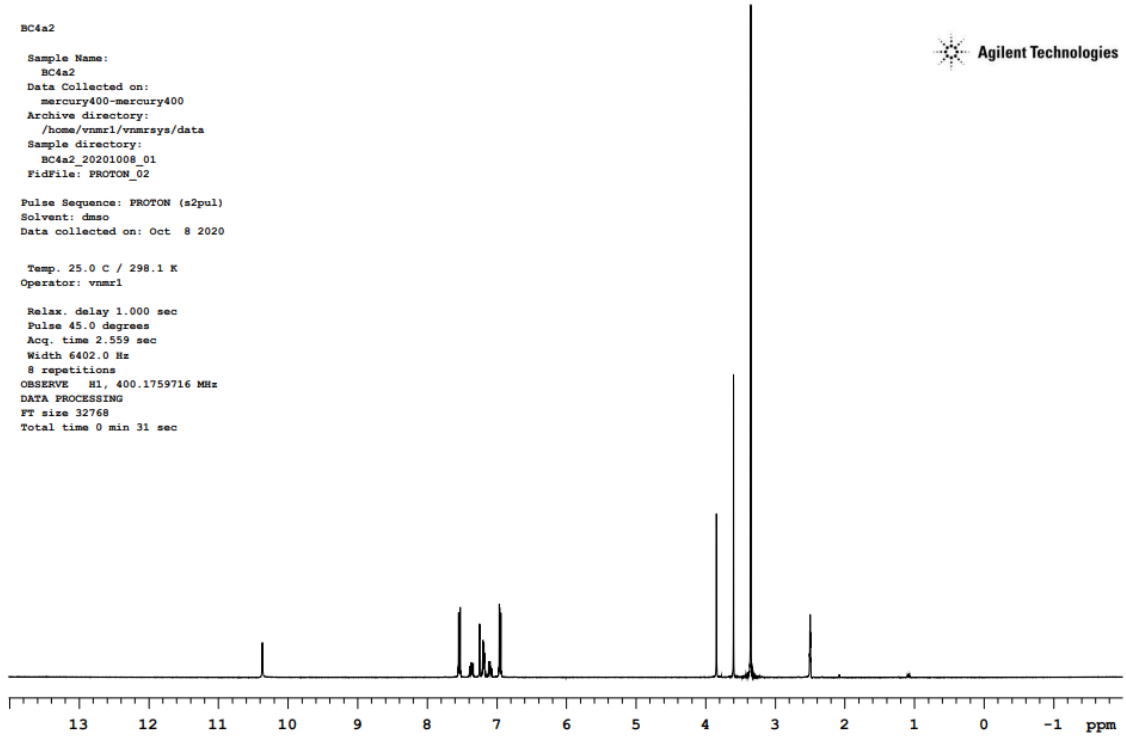
CAS: 2774717-49-4

Erime derecesi: 101,9-102,4 °C

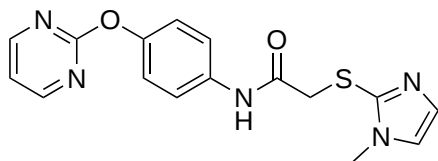
C₁₈H₁₇FN₃O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 358,1026; Bulunan: 358,1023

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,60 (3H, s, -NCH₃); 3,85 (2H, s, -COCH₂S-); 6,94- 6,97 (3H, m, Ar-H); 7,08-7,13 (1H, m, Ar-H); 7,16- 7,23 (2H, m, Ar-H); 7,25 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,33-7,39 (1H, m, Ar-H); 7,54 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H); 10,37 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 32,98; 38,30; 117,12 (d, *J*=17,9 Hz); 117,70; 120,76; 121,35; 123,55; 125,06 (d, *J*=7,0 Hz); 125,37 (d, *J*=3,9 Hz); 128,54; 134,60; 139,56; 143,43 (d, *J*=10,9 Hz); 152,31; 153,36 (d, *J*=244,3 Hz); 166,31.



Şekil 4.9. Bileşik **S1.9**'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(Pirimidin-2-iloksi)fenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (**S1.10**)

Bileşik **2e** (154 mg; 0,5 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (63 mg; 0,55 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Soluk sarı renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 84 mg, %49

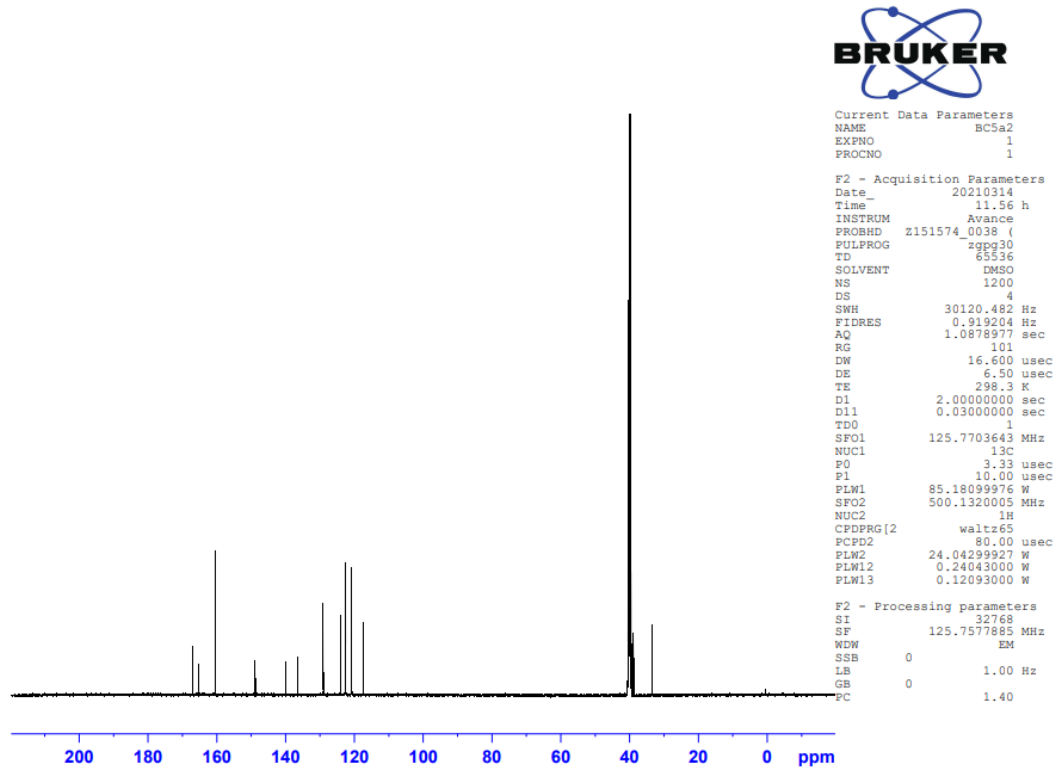
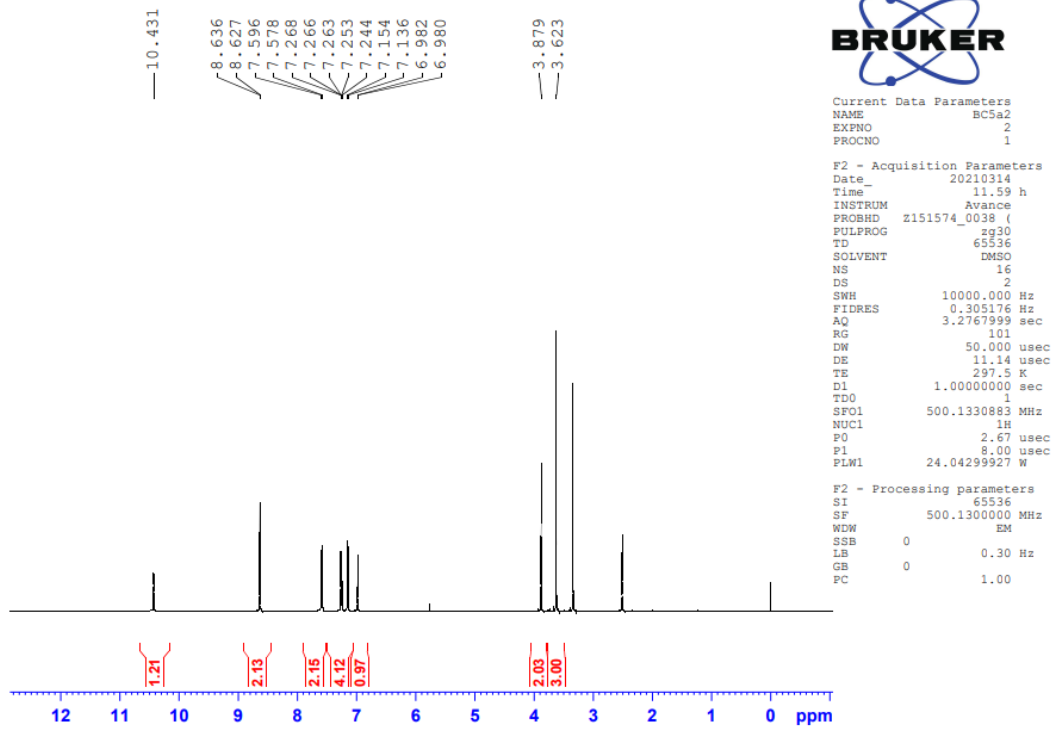
CAS: 2776704-87-9

Erime derecesi: 155,2-155,4 °C

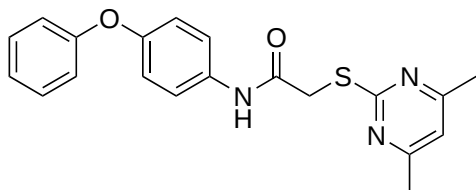
C₁₆H₁₆N₅O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 342,1025; Bulunan: 342,1024

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,62 (3H, s, -NCH₃); 3,88 (2H, s, -COCH₂S-); 6,98 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,15 (2H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H); 7,24-7,27 (2H, m, Ar-H); 7,59 (2H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H); 8,63 (2H, d, *J*=4,8 Hz, Ar-H); 10,43 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 33,47; 38,82; 117,30; 120,75; 122,46; 124,04; 129,04; 136,47; 140,03; 148,81; 160,47; 165,36; 166,94.



Şekil 4.10. Bileşik **S1.10**'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-Fenoksifenil)-2-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)tiyo)asetamit (S1.11)

Bileşik **2a** (92 mg; 0,30 mmol) ve 4,6-dimetilpirimidin-2-tiyolden (46 mg; 0,33 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, metanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 88 mg, %73

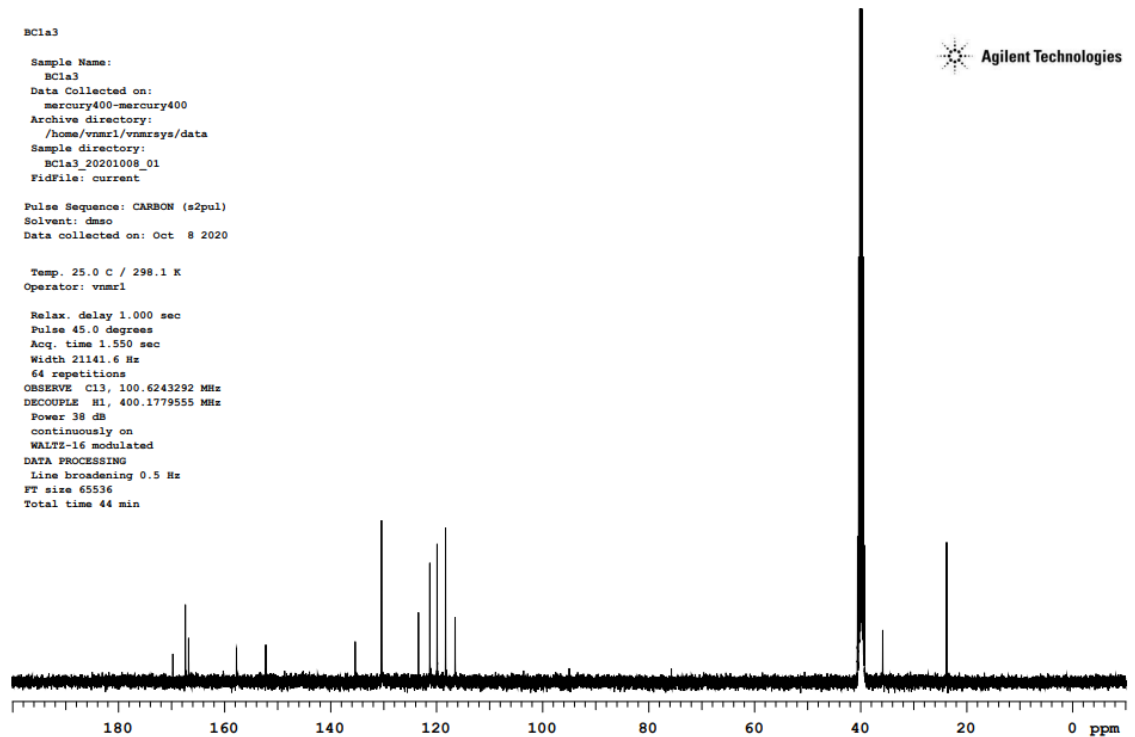
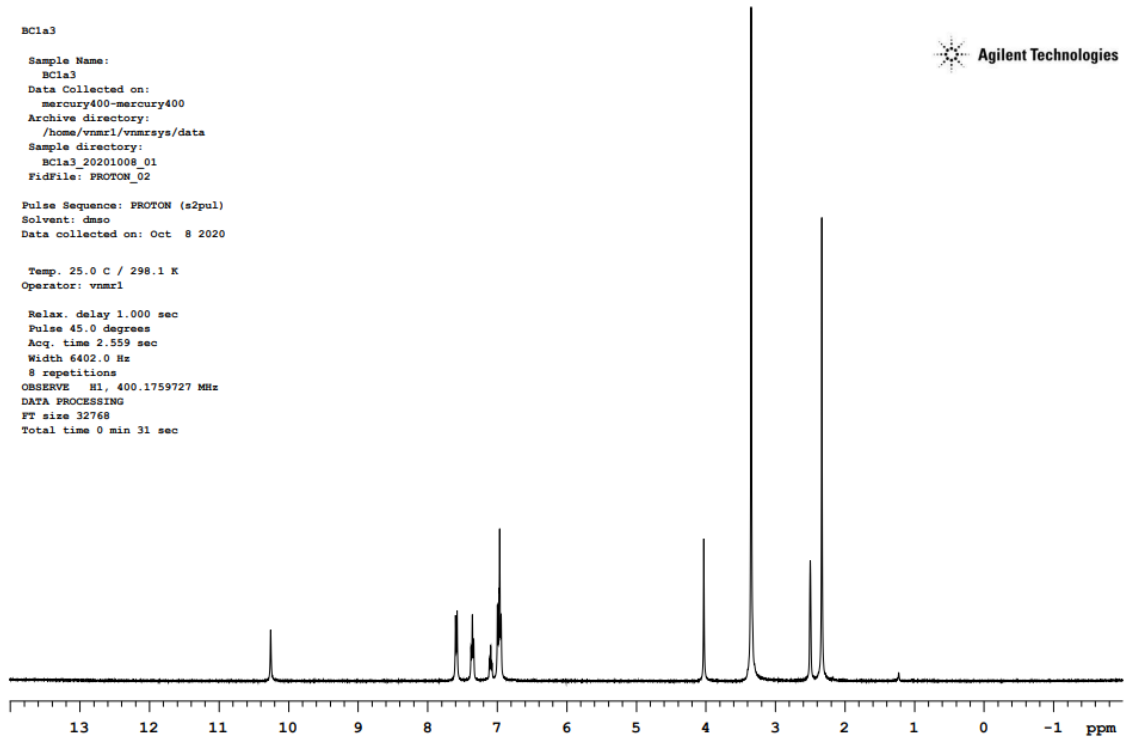
CAS: 332162-28-4 [109]

Erime derecesi: 143-144 °C (>300 °C [109])

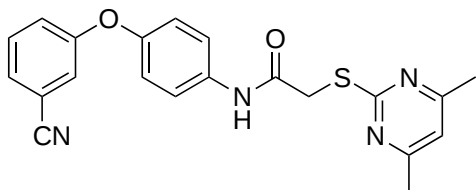
C₂₀H₂₀N₃O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 366,1276; Bulunan: 366,1275

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 2,33 (6H, s, Ar-CH₃); 4,03 (2H, s, -COCH₂S-); 6,95-7,00 (5H, m, Ar-H); 7,09 (1H, t, *J*=7,6 Hz, Ar-H); 7,36 (2H, t, *J*=7,6 Hz, Ar-H); 7,59 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H); 10,26 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 23,80; 35,86; 116,53; 118,33; 119,92; 121,30; 123,45; 130,42; 135,39; 152,25; 157,78; 166,80; 167,43; 169,78.



Şekil 4.11. Bileşik **S1.11**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(3-Siyanofenoksi)fenil)-2-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)tiyo)asetamit (S1.12)

Bileşik **2b** (119 mg; 0,36 mmol) ve 4,6-dimetilpirimidin-2-tiyolden (56 mg; 0,40 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, etanol:su karışımından kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

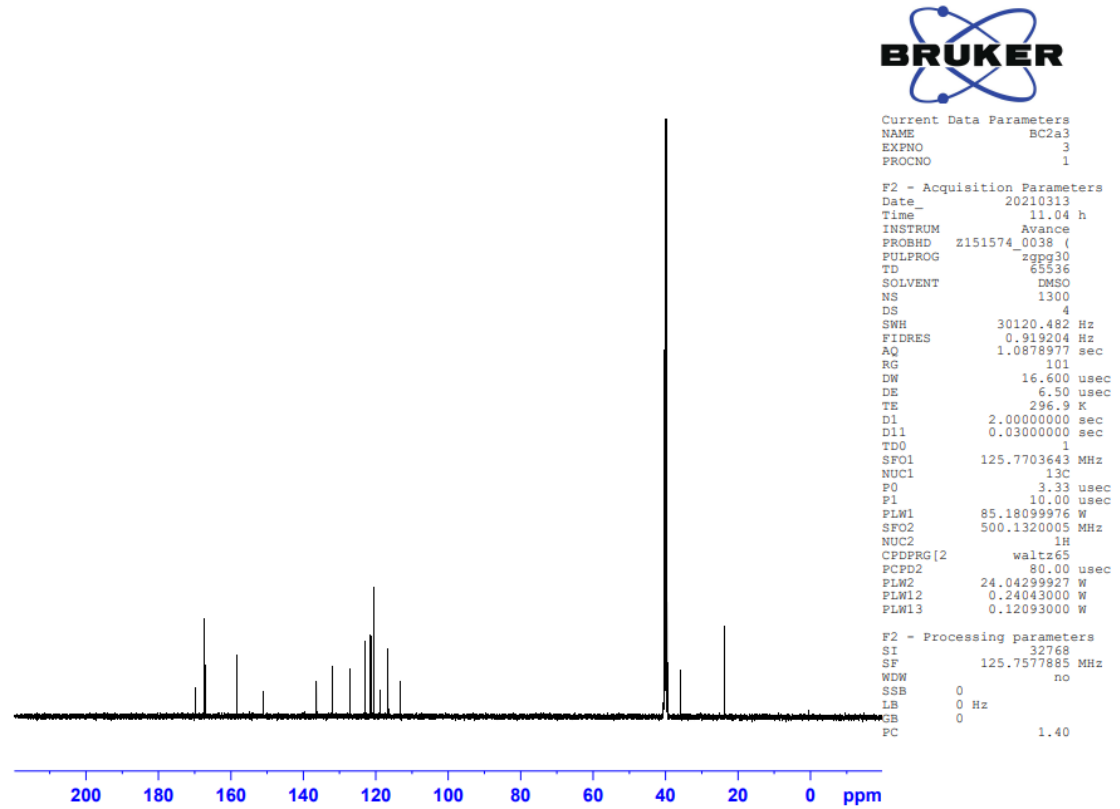
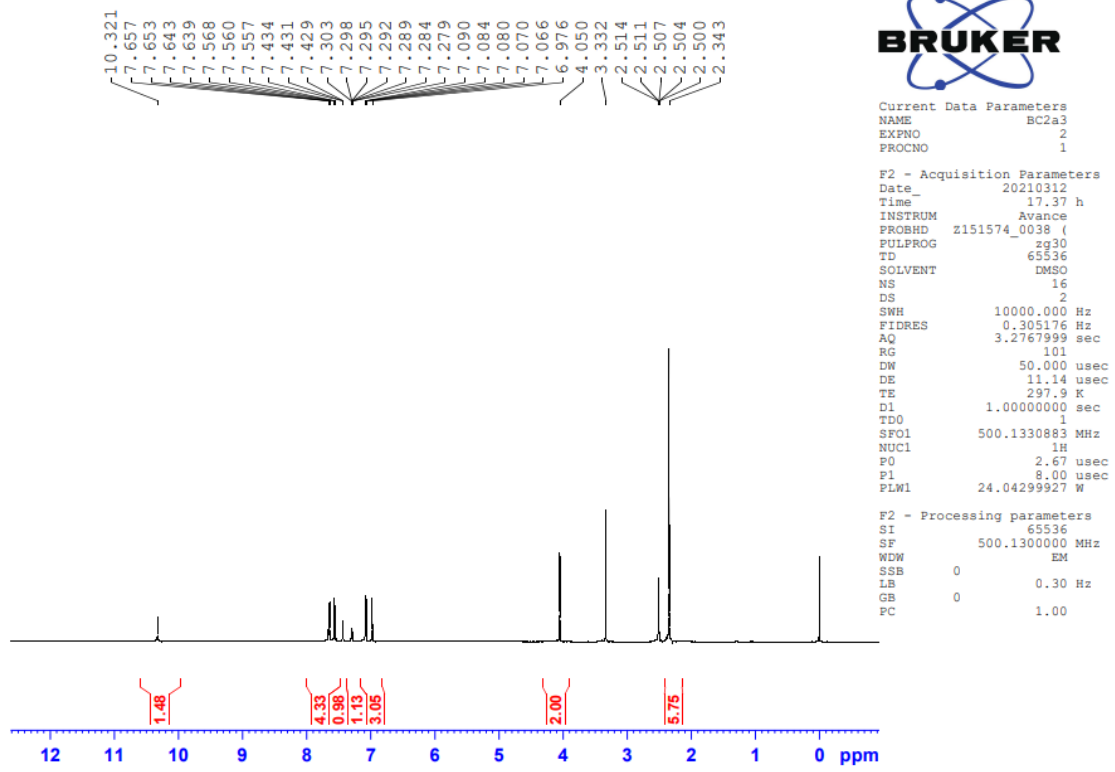
Verim: 60 mg, %43

Erime derecesi: 161,1-161,4 °C

C₂₁H₁₉N₄O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 391,1229; Bulunan: 391,1221

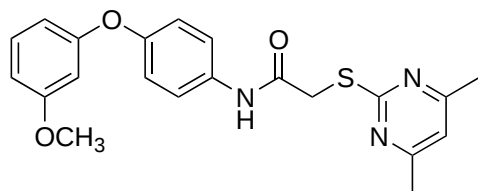
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 2,34 (6H, s, Ar-CH₃); 4,05 (2H, s, -COCH₂S-); 6,98 (1H, s, Ar-H); 7,08 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 7,28-7,30 (1H, m, Ar-H); 7,42-7,43 (1H, m, Ar-H); 7,56-7,57 (2H, m, Ar-H); 7,65 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 10,32 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 23,81; 35,89; 113,11; 116,55; 118,67; 120,58; 121,25; 121,37; 123,06; 127,18; 131,89; 136,27; 150,99; 158,33; 166,93; 167,45; 169,76.



Şekil 4.12. Bileşik **S1.12**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(3-Metoksifenoksi)fenil)-2-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)tiyo)asetamit (**S1.13**)



Bileşik **2c** (165 mg; 0,49 mmol) ve 4,6-dimetilpirimidin-2-tiyolden (76 mg; 0,54 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, metanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

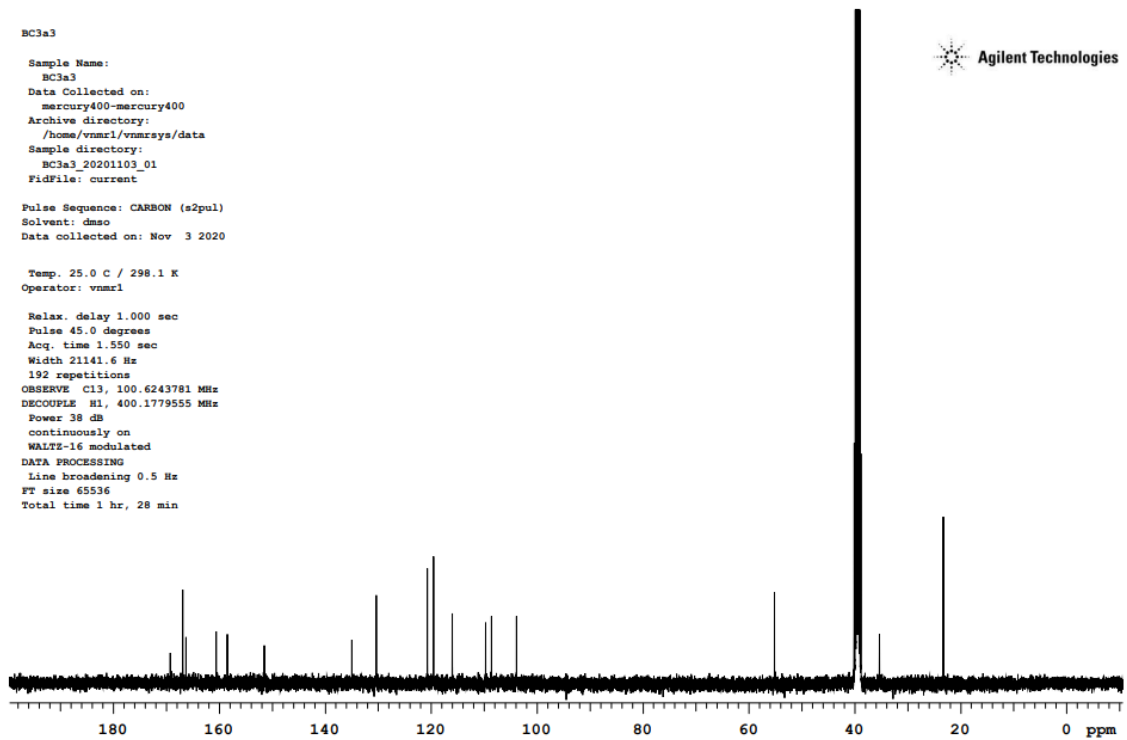
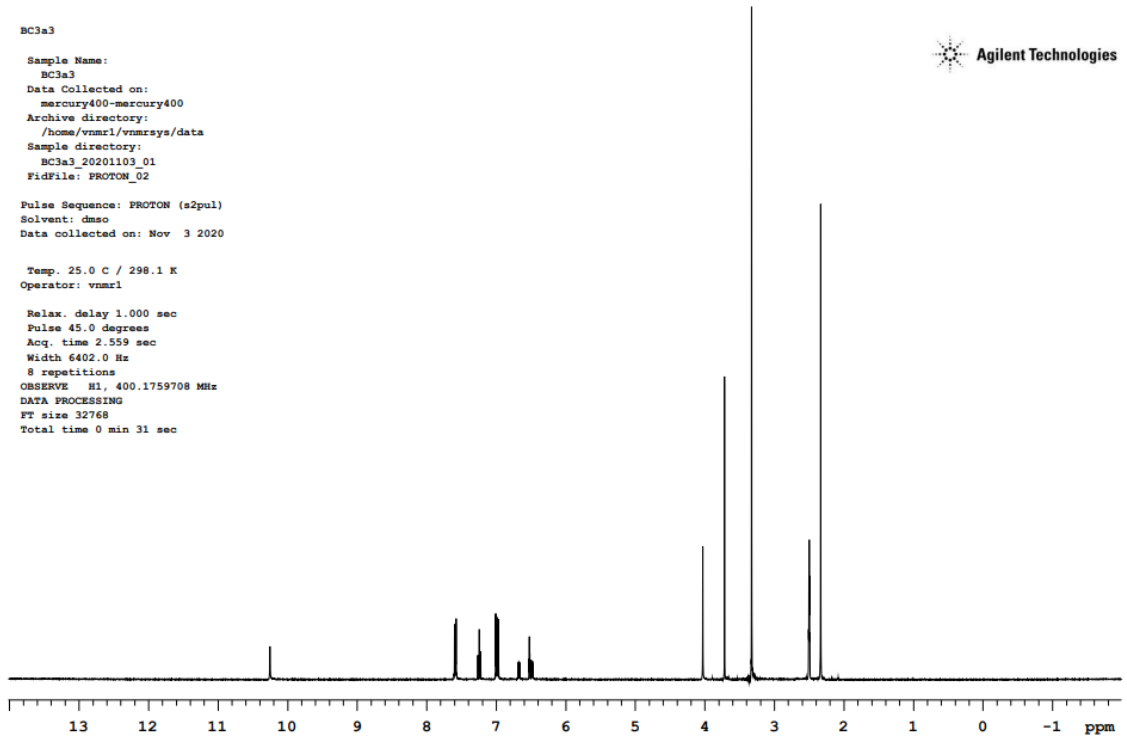
Verim: 92 mg, %48

Erime derecesi: 123-124 °C

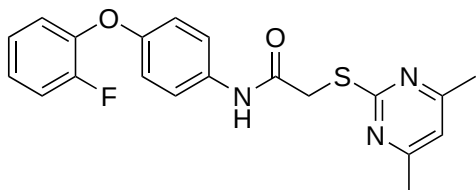
C₂₁H₂₂N₃O₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 396,1382; Bulunan: 396,1381

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 2,34 (6H, s, Ar-CH₃); 3,72 (3H, s, -OCH₃); 4,03 (2H, s, -COCH₂S-); 6,49 (1H, dd, *J*=8,0 ve 2,4 Hz, Ar-H); 6,53 (1H, t, *J*=2,4 Hz, Ar-H); 6,68 (1H, dd, *J*=8,0 ve 2,4 Hz, Ar-H); 6,97 (1H, s, Ar-H); 7,00 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H); 7,25 (1H, t, *J*=8,2 Hz, Ar-H); 7,59 (2H, d, *J*=9,2 Hz, Ar-H); 10,26 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 23,31; 35,37; 55,20; 103,90; 108,63; 109,74; 116,04; 119,58; 120,75; 130,39; 135,00; 151,54; 158,52; 160,63; 166,31; 166,94; 169,28.



Şekil 4.13. Bileşik **S1.13**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(2-Florofenoksi)fenil)-2-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)tiyo)asetamit (**S1.14**)

Bileşik **2d** (101 mg; 0,31 mmol) ve 4,6-dimetilpirimidin-2-tiyolden (48 mg; 0,34 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, metanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

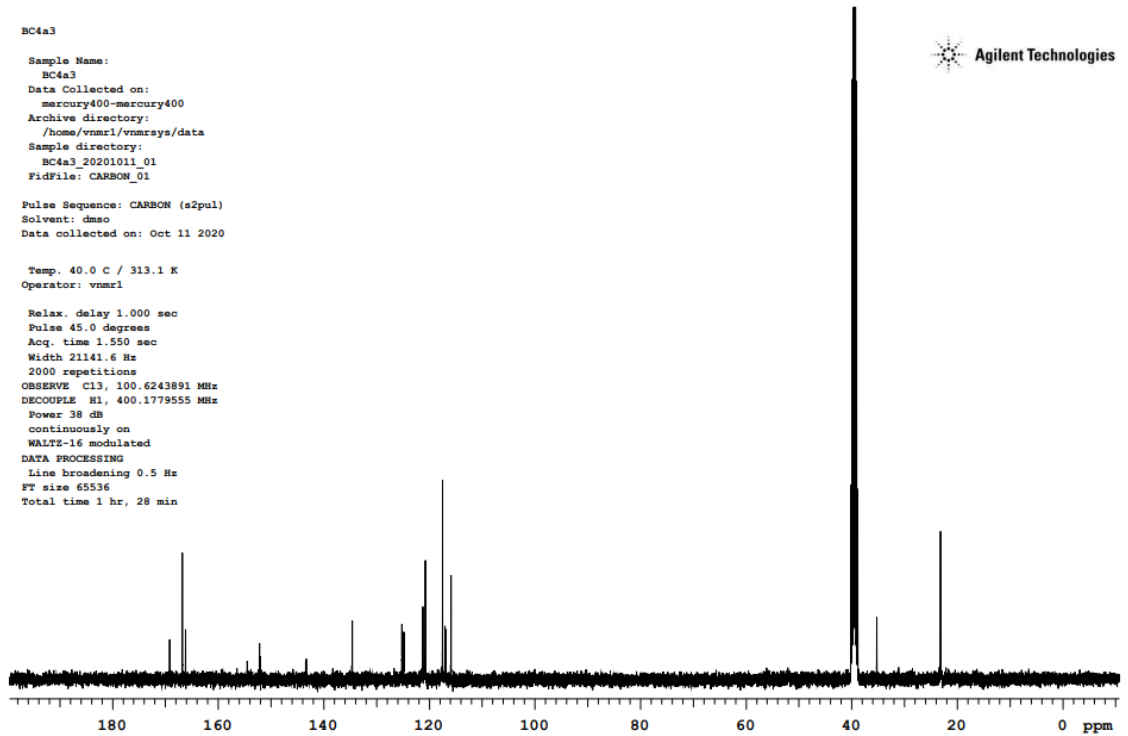
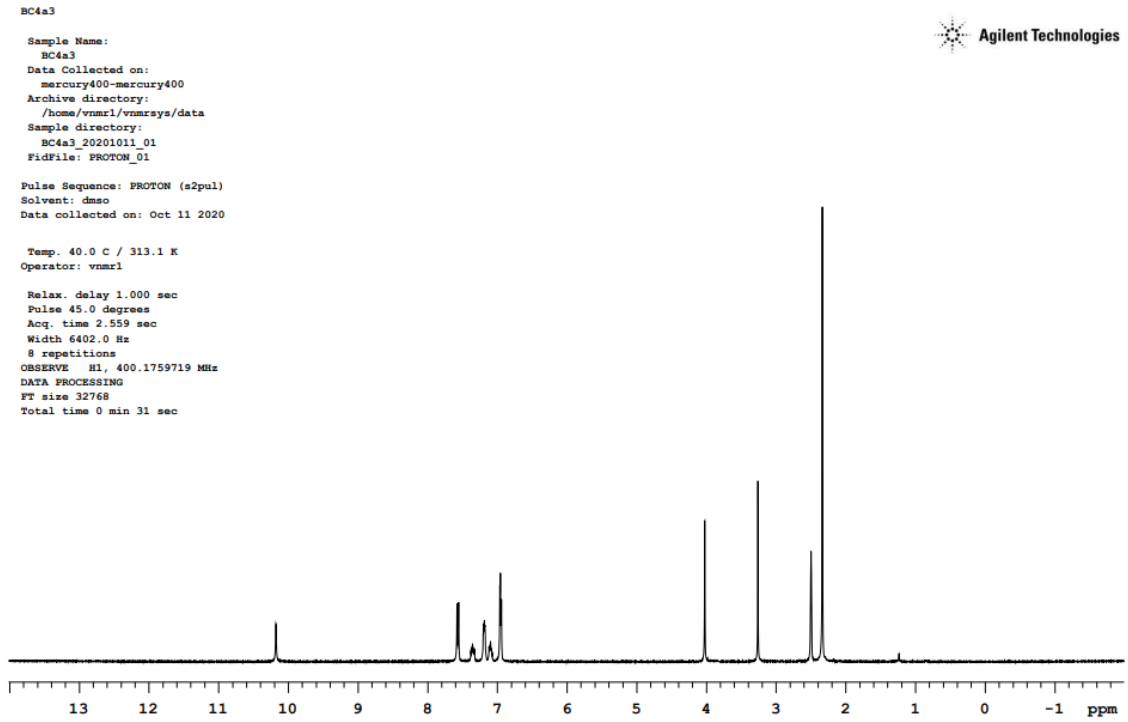
Verim: 68 mg, %57

Erime derecesi: 137,2-138,0 °C

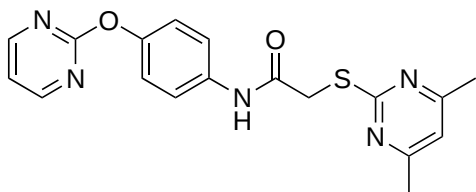
C₂₀H₁₉FN₃O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 384,1182; Bulunan: 384,1177

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 2,34 (6H, s, Ar-CH₃); 4,03 (2H, s, -COCH₂S-); 6,94- 6,97 (3H, m, Ar-H); 7,08-7,12 (1H, m, Ar-H); 7,18-7,20 (2H, m, Ar-H); 7,33-7,38 (1H, m, Ar-H); 7,57 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H); 10,18 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 23,18; 35,26; 115,90; 116,96 (d, *J*=18,0 Hz); 117,51; 120,77; 121,24; 124,87 (d, *J*=7,1 Hz); 125,19 (d, *J*=3,2 Hz); 134,61; 143,38 (d, *J*=10,9 Hz); 152,06; 153,28 (d, *J*=244,3 Hz); 166,19; 166,81; 169,20.



Şekil 4.14. Bileşik **S1.14**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(Pirimidin-2-iloksi)fenil)-2-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)tiyo)asetamit (S1.15)

Bileşik **2e** (120 mg; 0,39 mmol) ve 4,6-dimetilpirimidin-2-tiyolden (60 mg; 0,43 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (98:2) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Soluk sarı renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 36 mg, %25

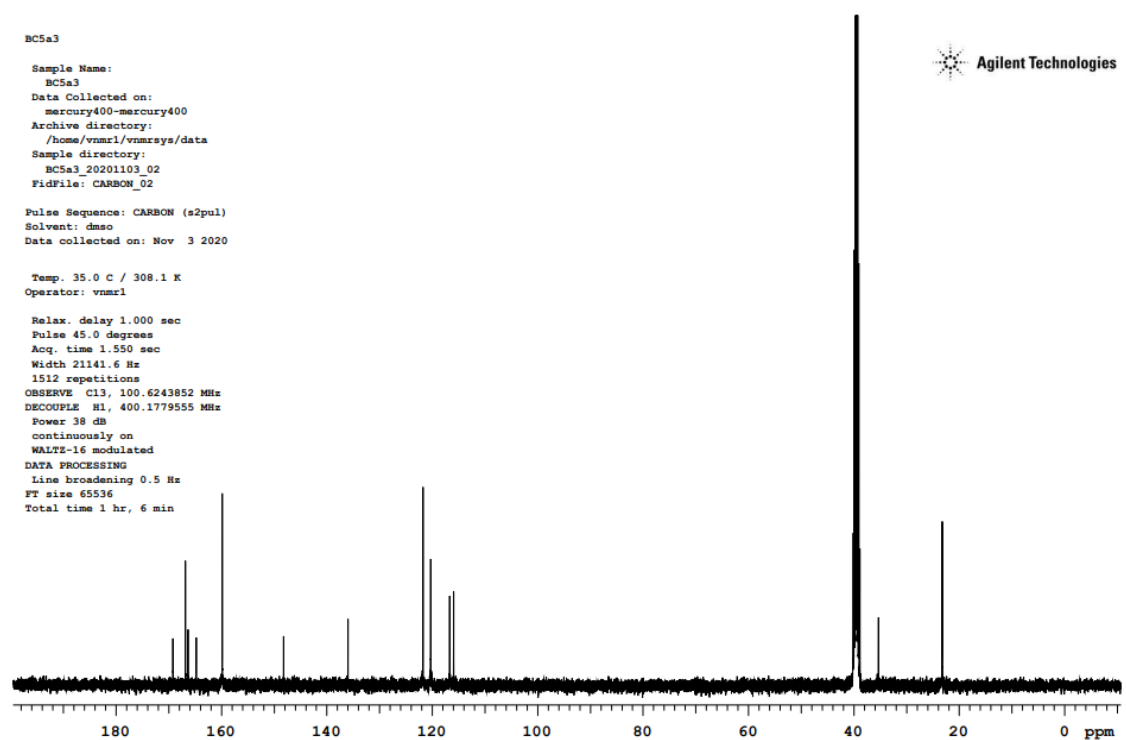
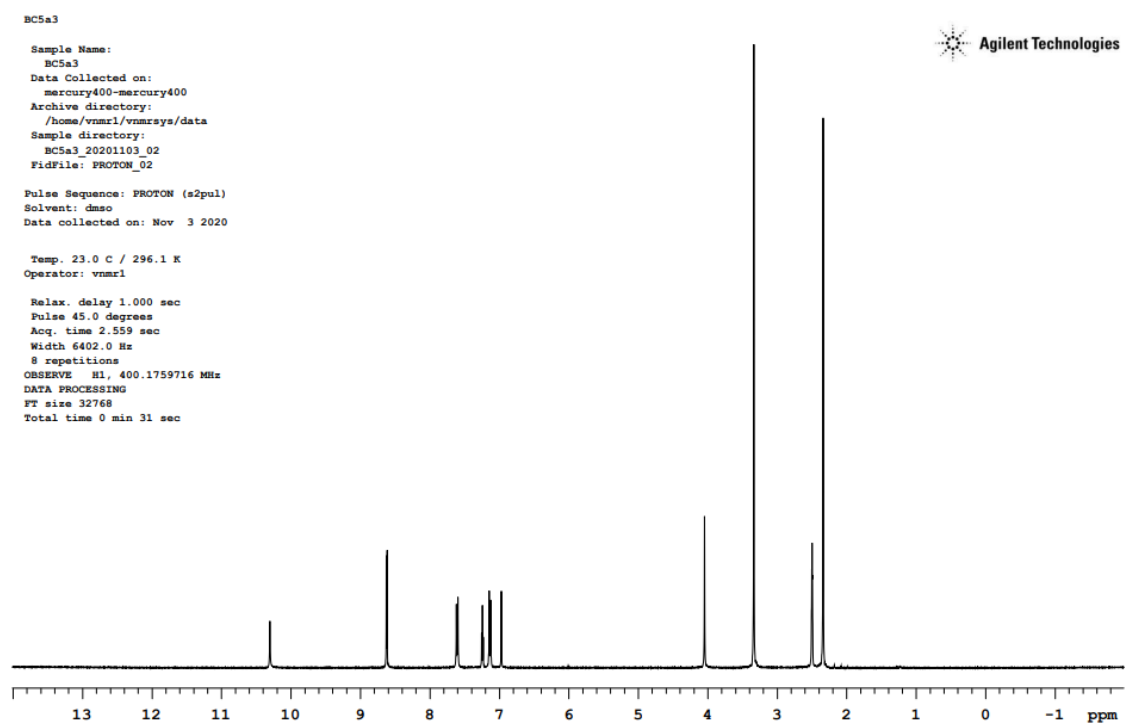
CAS: 2782431-25-6

Erime derecesi: 178,8-179,1 °C

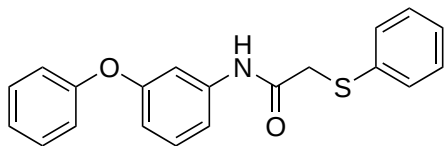
C₁₈H₁₈N₅O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 368,1181; Bulunan: 368,1181

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 2,34 (6H, s, Ar-CH₃); 4,05 (2H, s, -COCH₂S-); 6,97 (1H, s, Ar-H); 7,14 (2H, d, *J*=9,2 Hz, Ar-H); 7,25 (1H, t, *J*=4,8 Hz, Ar-H); 7,61 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H); 8,62 (2H, d, *J*=4,8 Hz, Ar-H); 10,31 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 23,25; 35,35; 115,96; 116,71; 120,31; 121,77; 136,01; 148,23; 159,87; 164,80; 166,36; 166,87; 169,23.



Şekil 4.15. Bileşik **S1.15**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-Fenoksifenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.16)

Bileşik **2f** (110 mg; 0,36 mmol) ve tiyofenolden (41 µl; 0,40 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:aseton karışımından kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 73 mg, %61

Erime derecesi: 109,8-110,3 °C

C₂₀H₁₈NO₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 336,1058; Bulunan: 336,1057

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,83 (2H, s, -COCH₂S-); 6,70-6,73 (1H, m, Ar-H); 7,02 (2H, d, *J*=8,4 Hz, Ar-H); 7,14-7,21 (2H, m, Ar-H); 7,28-7,33 (5H, m, Ar-H); 7,37-7,42 (4H, m, Ar-H); 10,27 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 37,44; 108,85; 113,44; 113,88; 118,96; 123,67; 126,02; 128,03; 129,02; 130,07; 130,18; 135,77; 140,35; 156,28; 157,13; 166,98.

BC1b1

Sample Name:
BC1b1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
BC1b1_20201010_01
FidFile: PROTON_02

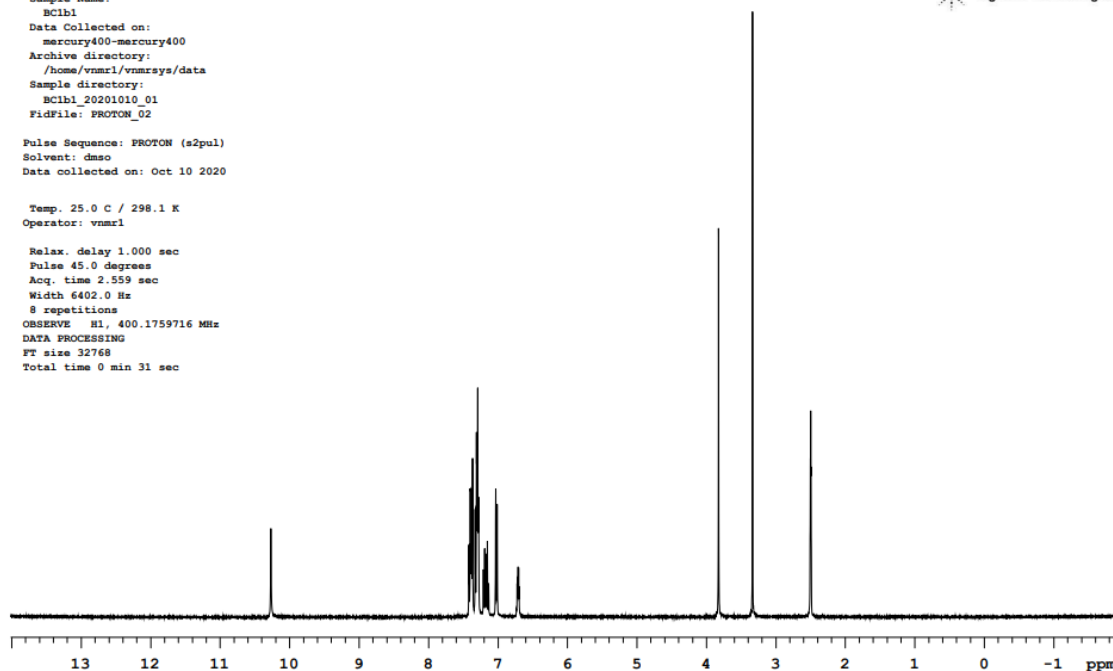
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 10 2020

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759716 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Agilent Technologies



BC1b1

Sample Name:
BC1b1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
BC1b1_20201010_01
FidFile: current

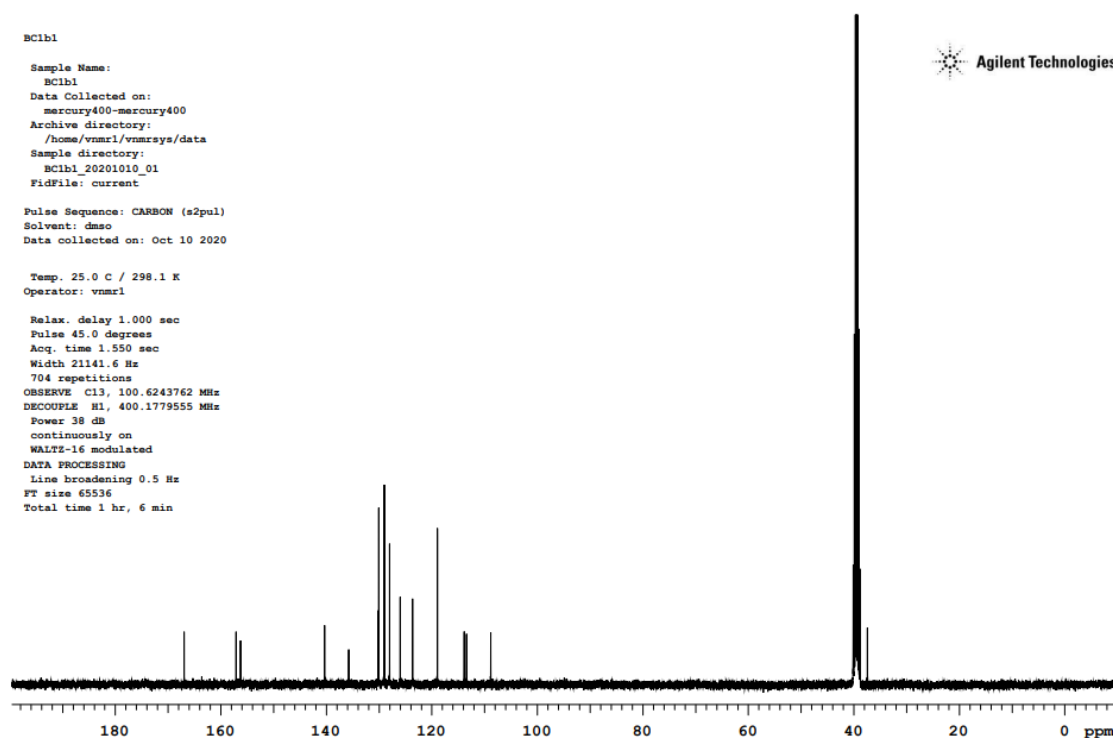
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Oct 10 2020

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

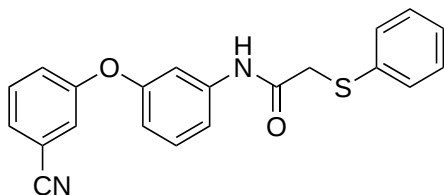
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
704 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243762 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 6 min



Agilent Technologies



Şekil 4.16. Bileşik **S1.16**'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

***N*-(3-(3-Siyanofenoksi)fenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.17)**

Bileşik **2g** (149 mg; 0,45 mmol) ve tiyofenolden (51 µl; 0,50 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, etanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

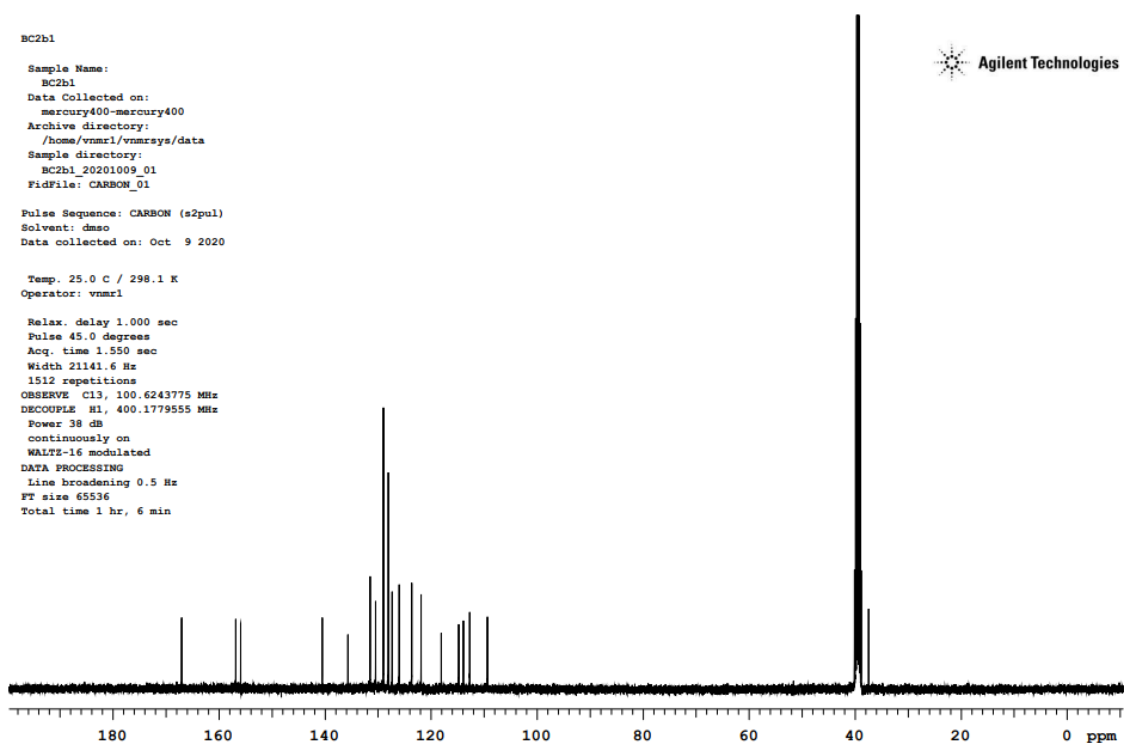
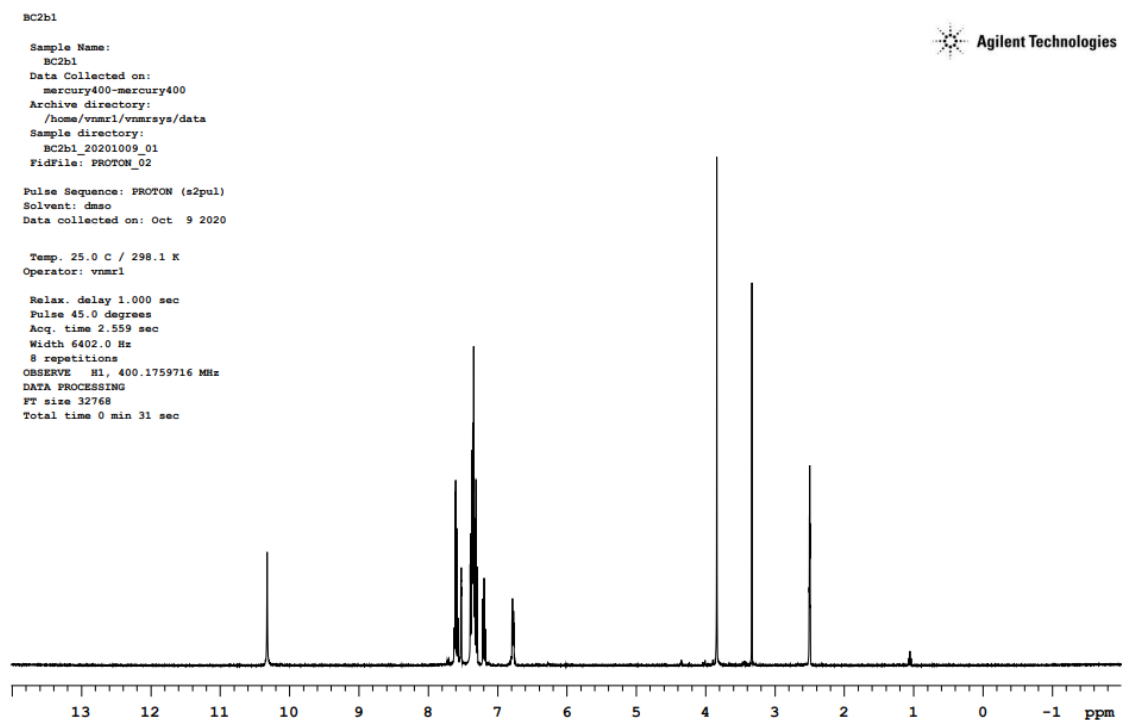
Verim: 49 mg, %30

Erime derecesi: 143,2-143,7 °C

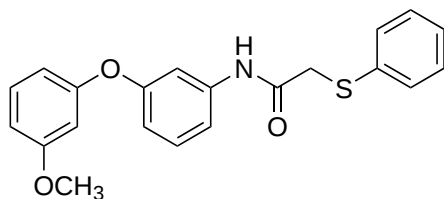
C₂₁H₁₇N₂O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 361,1011; Bulunan: 361,1013

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,84 (2H, s, -COCH₂S-); 6,77-6,80 (1H, m, Ar-H); 7,20 (1H, t, *J*=7,2 Hz, Ar-H); 7,31-7,40 (8H, m, Ar-H); 7,52-7,53 (1H, m, Ar-H); 7,57-7,63 (2H, m, Ar-H); 10,32 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 37,47; 109,39; 112,74; 113,92; 114,80; 118,10; 121,90; 123,66; 126,04; 127,37; 128,09; 129,01; 130,49; 131,51; 135,70; 140,54; 155,94; 156,87; 167,07.



Şekil 4.17. Bileşik **S1.17**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-(3-Metoksifenoksi)fenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.18)

Bileşik **2h** (168 mg; 0,5 mmol) ve tiyofenolden (57 µl; 0,55 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, 2-propanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

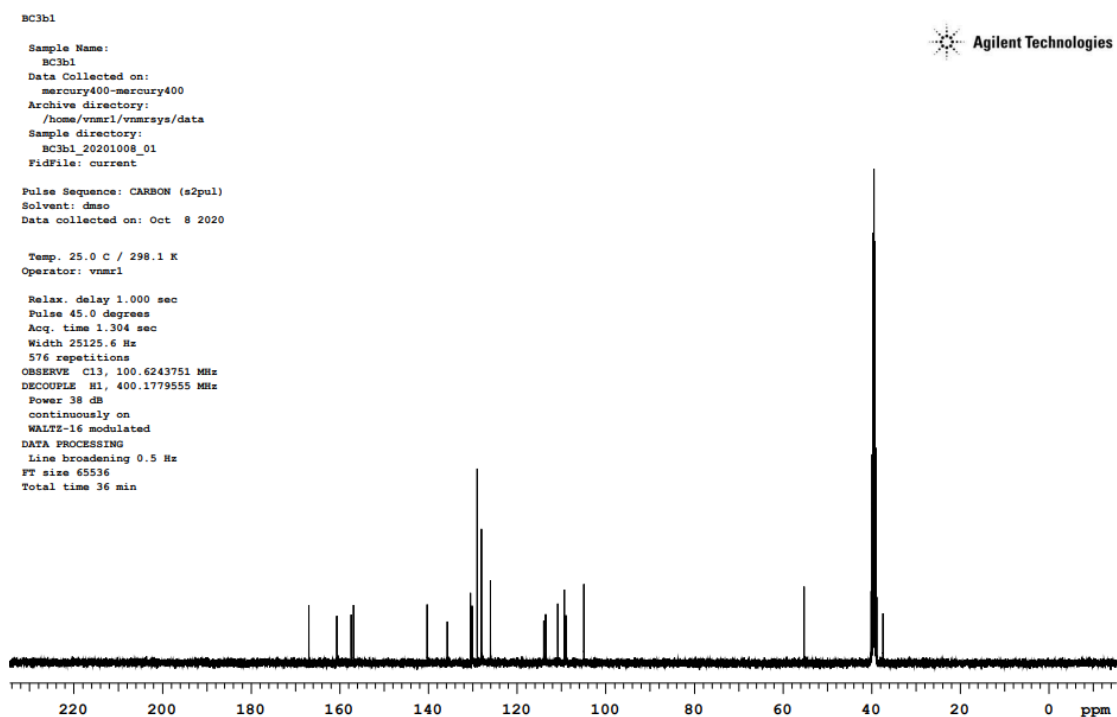
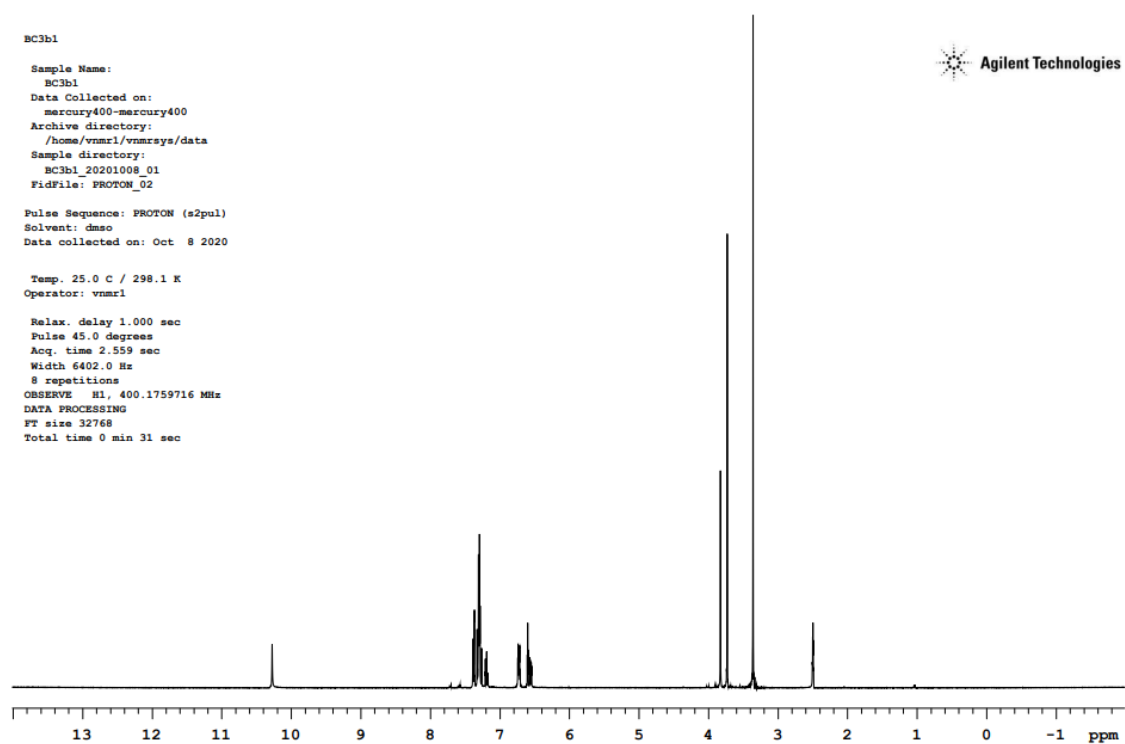
Verim: 51 mg, %28

Erime derecesi: 108,3-108,6 °C

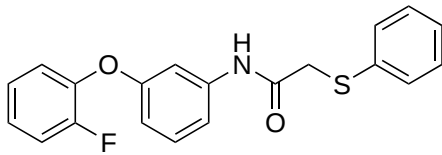
C₂₁H₂₀NO₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 366,1164; Bulunan: 366,1162

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,73 (3H, s, -OCH₃); 3,83 (2H, s, -COCH₂S-); 6,56 (1H, dd, *J*=7,8 ve 2,4 Hz, Ar-H); 6,60 (1H, t, *J*=2,4 Hz, Ar-H); 6,71-6,74 (2H, m, Ar-H); 7,19 (1H, tt, *J*=7,2 ve 1,2 Hz, Ar-H); 7,27-7,33 (6H, m, Ar-H); 7,36-7,39 (2H, m Ar-H); 10,28 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 37,47; 55,27; 104,95; 108,98; 109,35; 110,85; 113,57; 114,00; 126,03; 128,06; 129,03; 130,16; 130,54; 135,76; 140,32; 156,92; 157,46; 160,69; 167,00.



Şekil 4.18. Bileşik **S1.18**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-(2-Florofenoksi)fenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.19)

Bileşik **2i** (139 mg; 0,43 mmol) ve tiyofenolden (49 µl; 0,47 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, 2-propanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

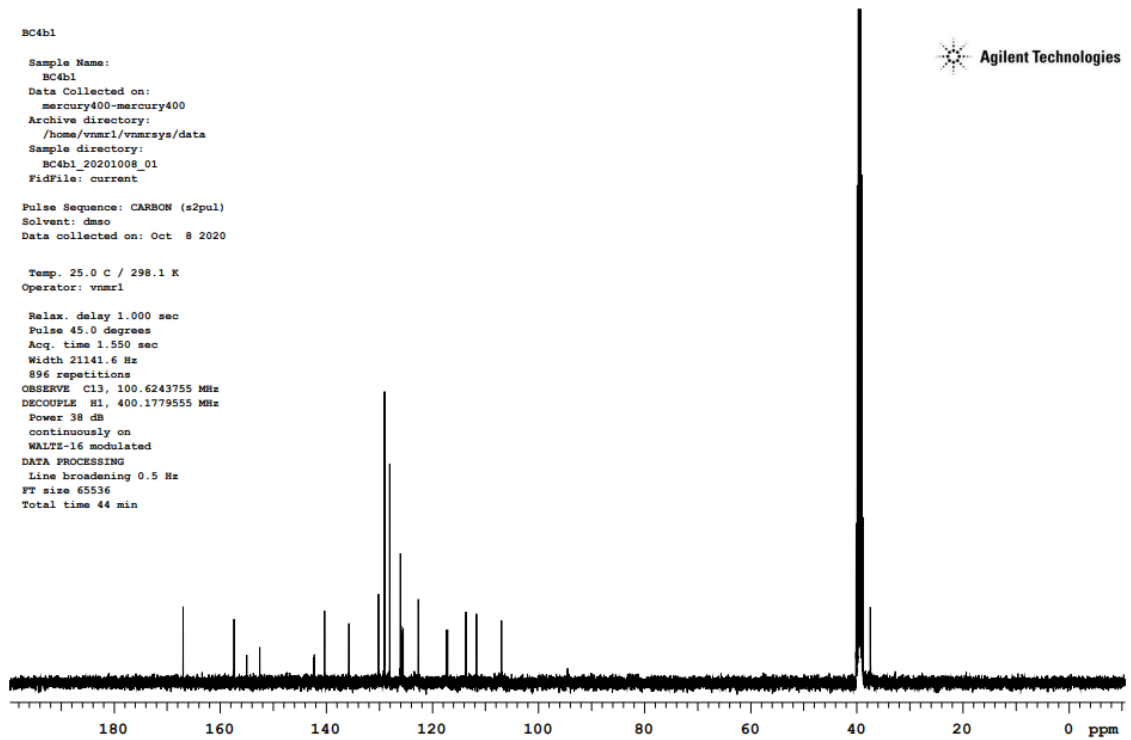
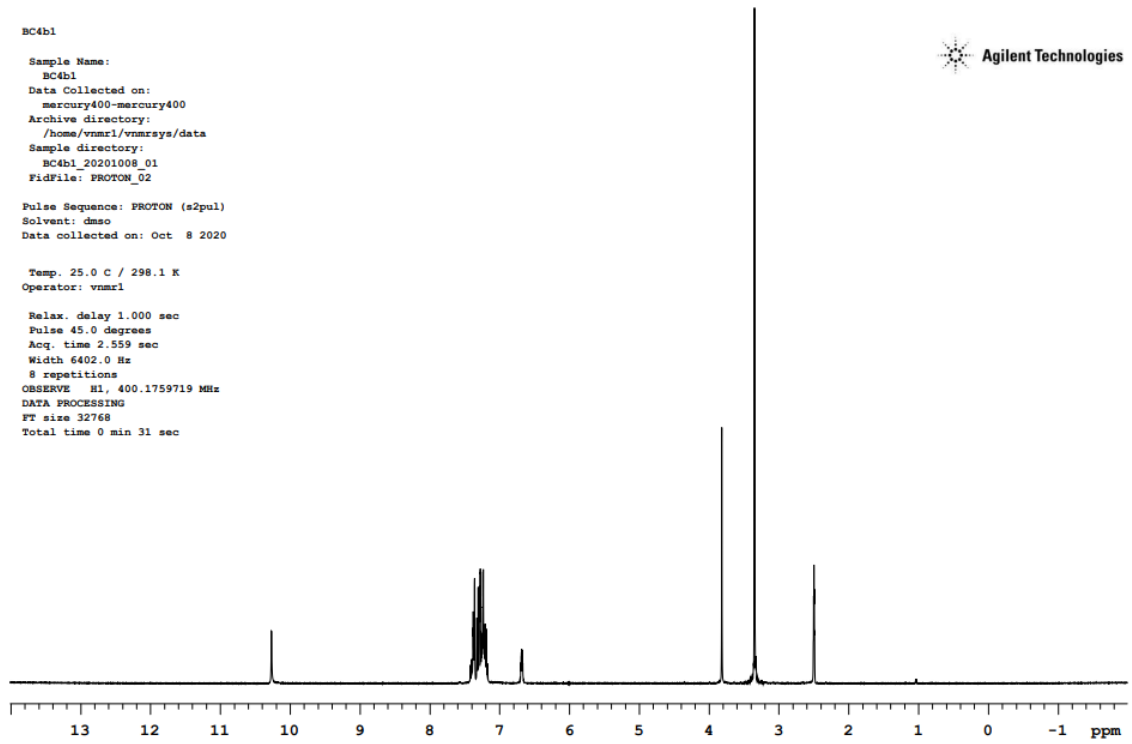
Verim: 33 mg, %22

Erime derecesi: 93,8- 94,1 °C

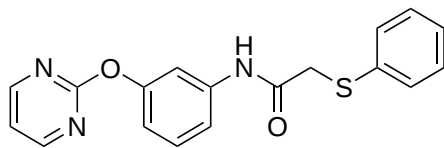
C₂₀H₁₇FNO₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 354,0964; Bulunan: 354,0965

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,82 (2H, s, -COCH₂S-); 6,66-6,71 (1H, m, Ar-H); 7,17-7,33 (9H, m, Ar-H); 7,36-7,42 (3H, m, Ar-H); 10,27 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 37,46; 106,99; 111,70; 113,69; 117,24 (d, *J*=18,0 Hz); 122,66; 125,55 (d, *J*=3,9 Hz); 125,88 (d, *J*=7,0 Hz); 126,04; 128,05; 129,03; 130,18; 135,75; 140,34; 142,33 (d, *J*=11,5 Hz); 153,79 (d, *J*=244,9 Hz); 157,41; 167,01.



Şekil 4.19. Bileşik **S1.19**'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-(Pirimidin-2-iloksi)fenil)-2-(feniltiyo)asetamit (S1.20)

Bileşik **2j** (114 mg; 0,37 mmol) ve tiyofenolden (42 µl; 0,41 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 51 mg, %41

Erime derecesi: 144,8-145,4 °C

C₁₈H₁₆N₃O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 338,0963; Bulunan: 338,0966

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ ppm: 3,86 (2H, s, -COCH₂S-); 6,86-6,92 (1H, m, Ar-H); 7,20 (1H, tt, *J*=7,2 ve 1,5 Hz, Ar-H); 7,27 (1H, t, *J*=5,2 Hz, Ar-H); 7,32 (2H, t, *J*=7,2 Hz, Ar-H); 7,34-7,41 (4H, m, Ar-H); 7,50 (1H, s, Ar-H); 8,64 (2H, d, *J*=5,2 Hz, Ar-H); 10,34 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 37,44; 112,29; 115,77; 116,58; 116,98; 126,02; 128,05; 129,01; 129,81; 135,74; 140,06; 152,99; 160,06; 164,63; 167,03.

BC5b1

Sample Name:
BC5b1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
BC5b1_20201103_01
FidFile: PROTON_01

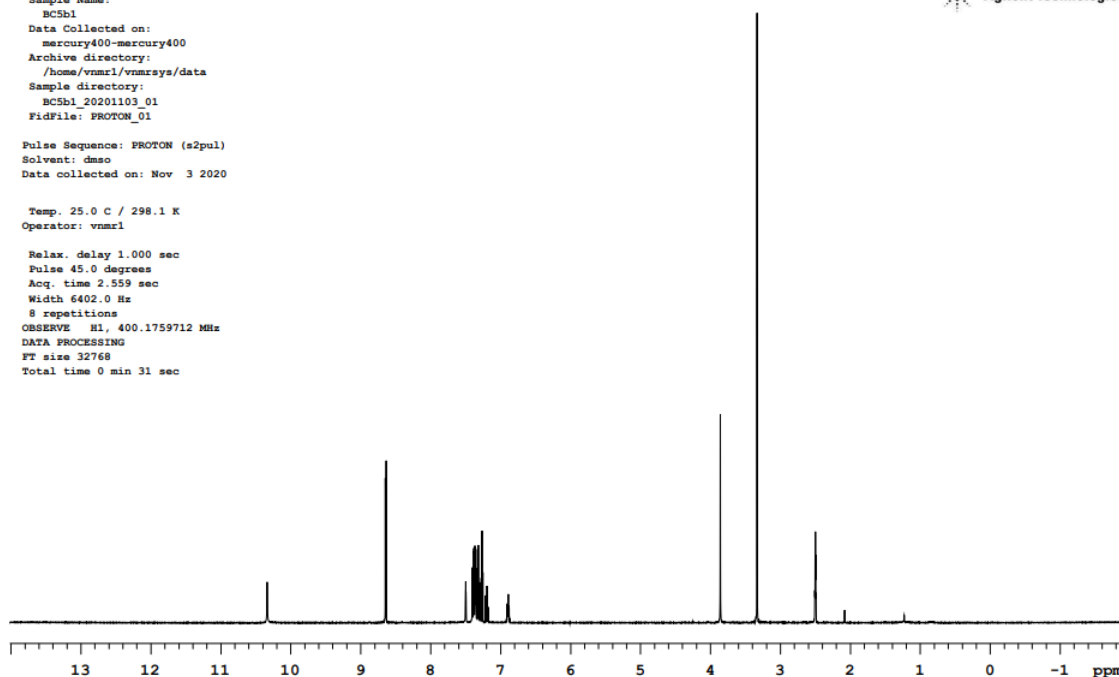
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Nov 3 2020

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.559 sec
Width 6402.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759712 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 31 sec



Agilent Technologies



BC5b1

Sample Name:
BC5b1
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
BC5b1_20201103_01
FidFile: current

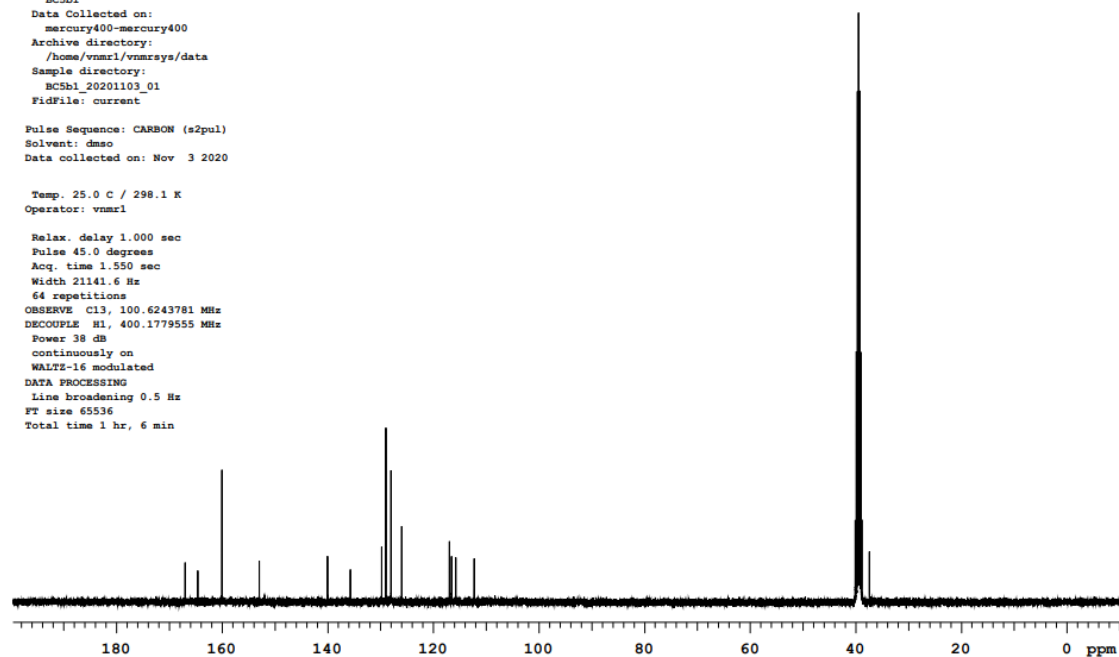
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Nov 3 2020

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

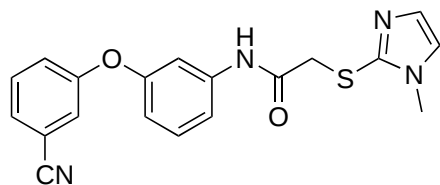
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
64 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243781 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 6 min



Agilent Technologies



Şekil 4.20. Bileşik **S1.20**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-(3-Siyanofenoksi)fenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (**S1.21**)

Bileşik **2g** (166 mg; 0,5 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (63 mg; 0,55 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (98:2) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

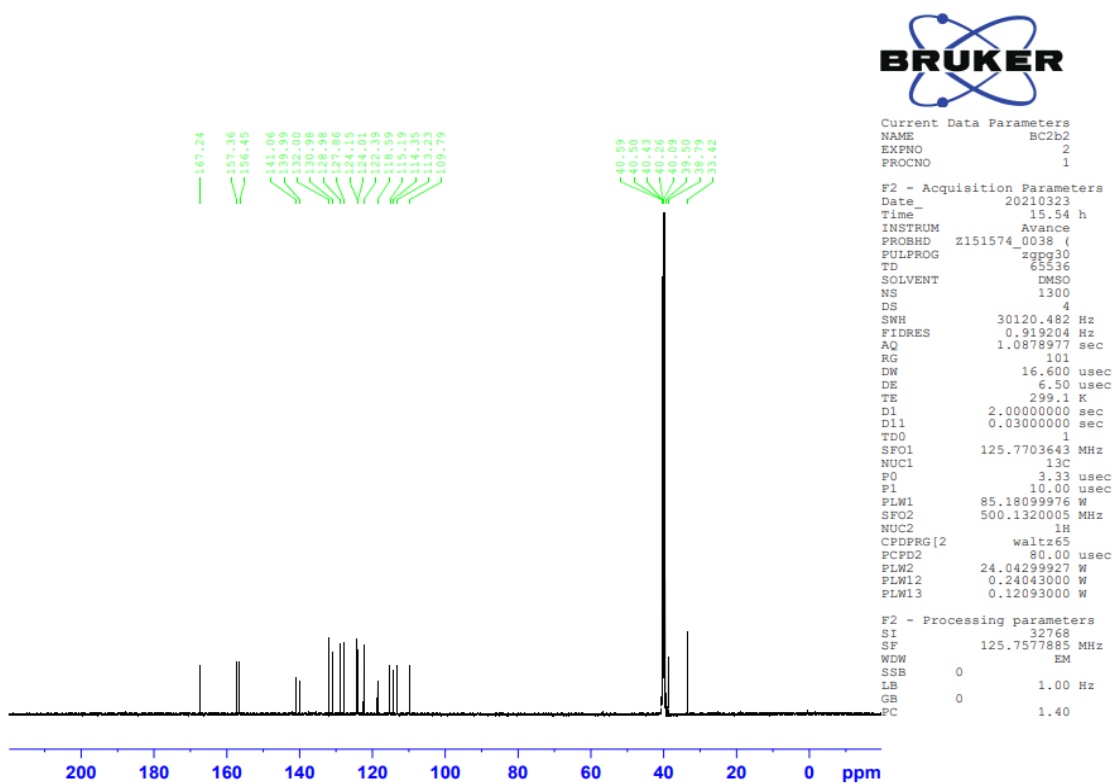
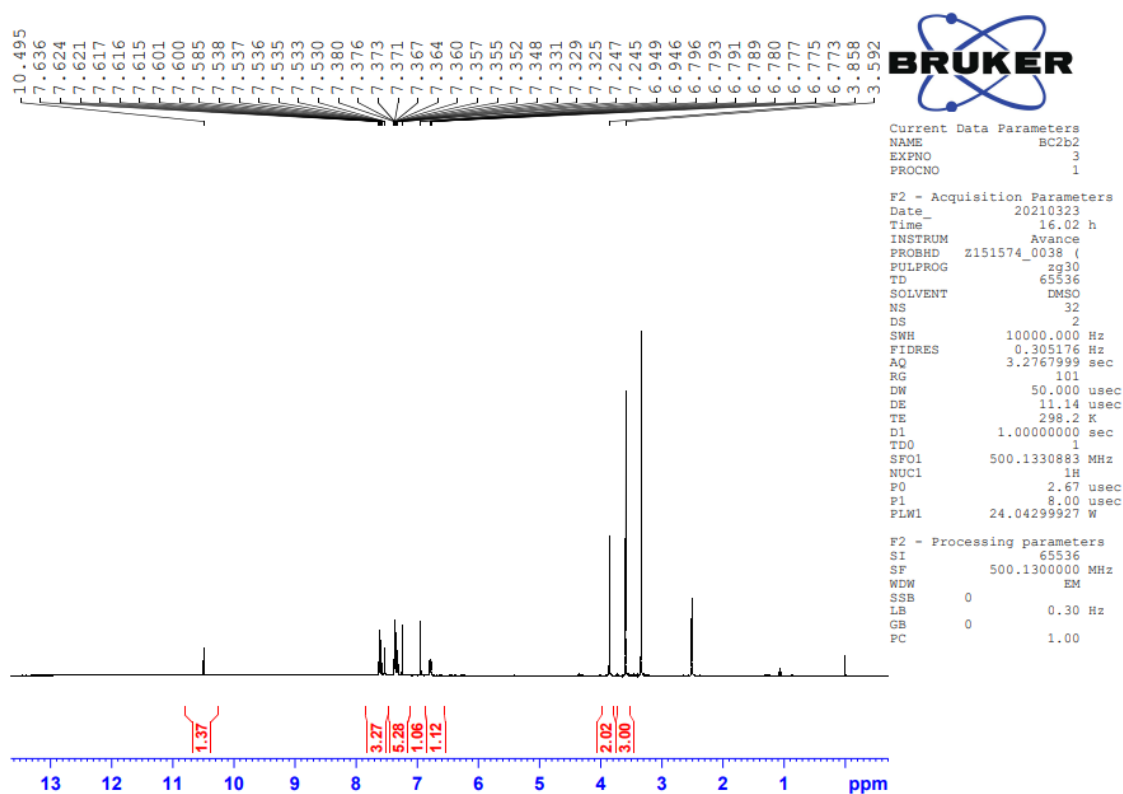
Verim: 98 mg, %54

Erime derecesi: 150,8-151,2 °C

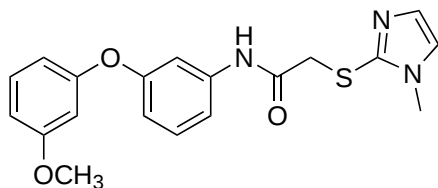
C₁₉H₁₇N₄O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 365,1072; Bulunan: 365,1071

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,59 (3H, s, -NCH₃); 3,86 (2H, s, -COCH₂S-); 6,77-6,80 (1H, m, Ar-H); 6,95 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,25 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,30-7,33 (1H, m, Ar-H); 7,35-7,38 (3H, m, Ar-H); 7,53-7,54 (1H, m, Ar-H); 7,59-7,61 (1H, m, Ar-H); 7,62-7,64 (1H, m, Ar-H); 10,50 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 33,42; 38,79; 109,80; 113,23; 114,35; 115,19; 118,59; 122,39; 124,01; 124,15; 127,86; 128,98; 130,98; 132,00; 139,99; 141,07; 156,45; 157,36; 167,24.



Şekil 4.21. Bileşik **S1.21**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-(3-Metoksifenoksi)fenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (**S1.22**)

Bileşik **2h** (229 mg; 0,68 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (86 mg; 0,75 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (98:2) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

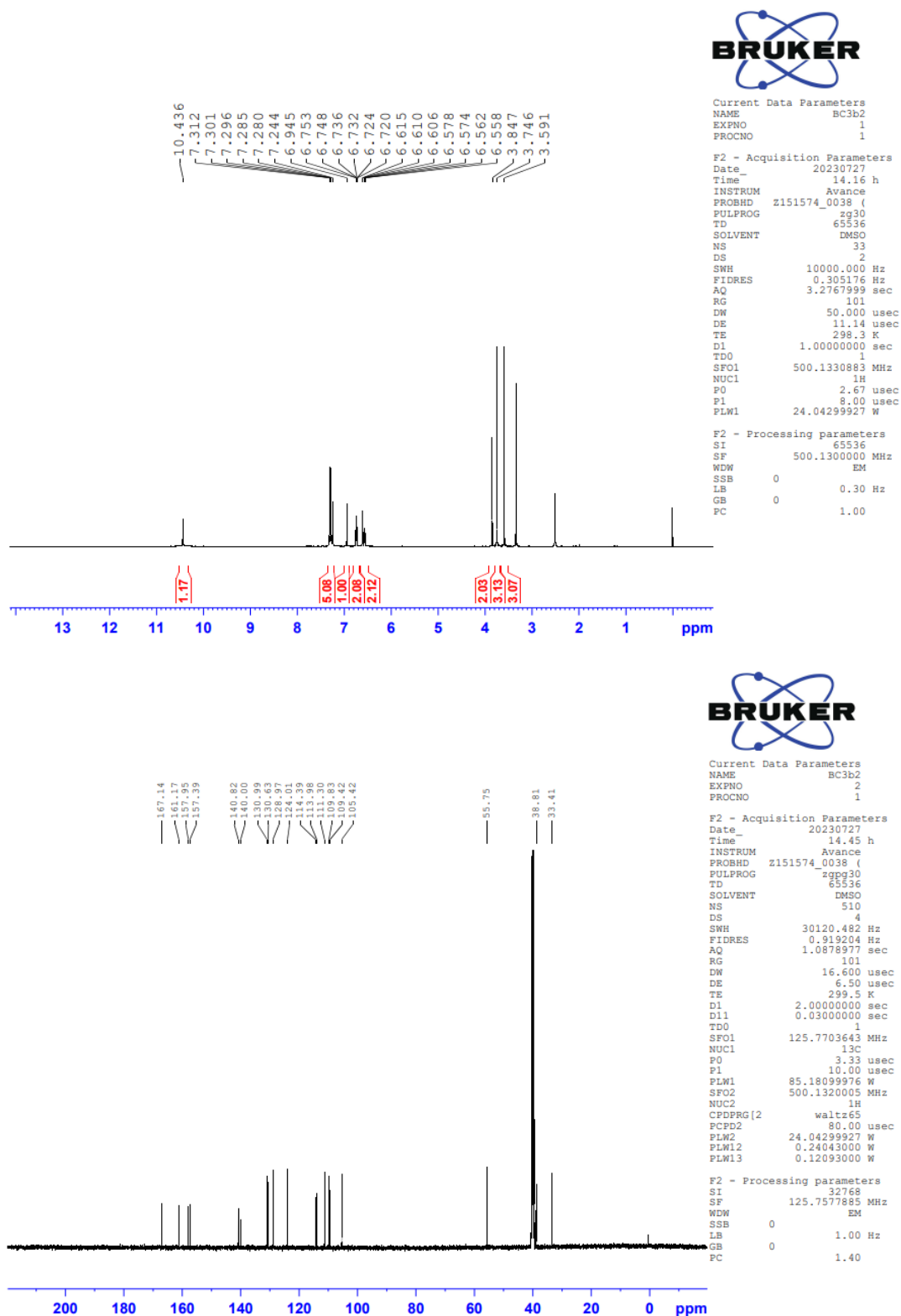
Verim: 60 mg, %24

Erime derecesi: 114,3-114,8 °C

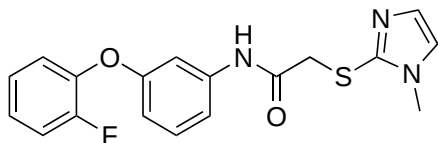
C₁₉H₂₀N₃O₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 370,1225; Bulunan: 370,1221

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,59 (3H, s, -NCH₃); 3,75 (3H, s, -OCH₃); 3,85 (2H, s, -COCH₂S-); 6,57 (1H, dd, *J*= 8,1 ve 2,2 Hz, Ar-H); 6,61 (1H, t, *J*=2,3 Hz, Ar-H); 6,73 (2H, td; *J*=8,2 ve 2,2 Hz, Ar-H); 6,95 (1H, s, Ar-H); 7,24 (1H, s, Ar-H); 7,28-7,33 (4H, m, Ar-H); 10,44 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 33,41; 38,81; 55,75; 105,42; 109,42; 109,83; 111,30; 113,98; 114,39; 124,01; 128,97; 130,63; 130,99; 140,00; 140,82; 157,39; 157,95; 161,17; 167,14.



Şekil 4.22. Bileşik **S1.22**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-(2-Florofenoksi)fenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (S1.23)

Bileşik **2i** (101 mg; 0,31 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (39 mg; 0,34 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (98:2) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

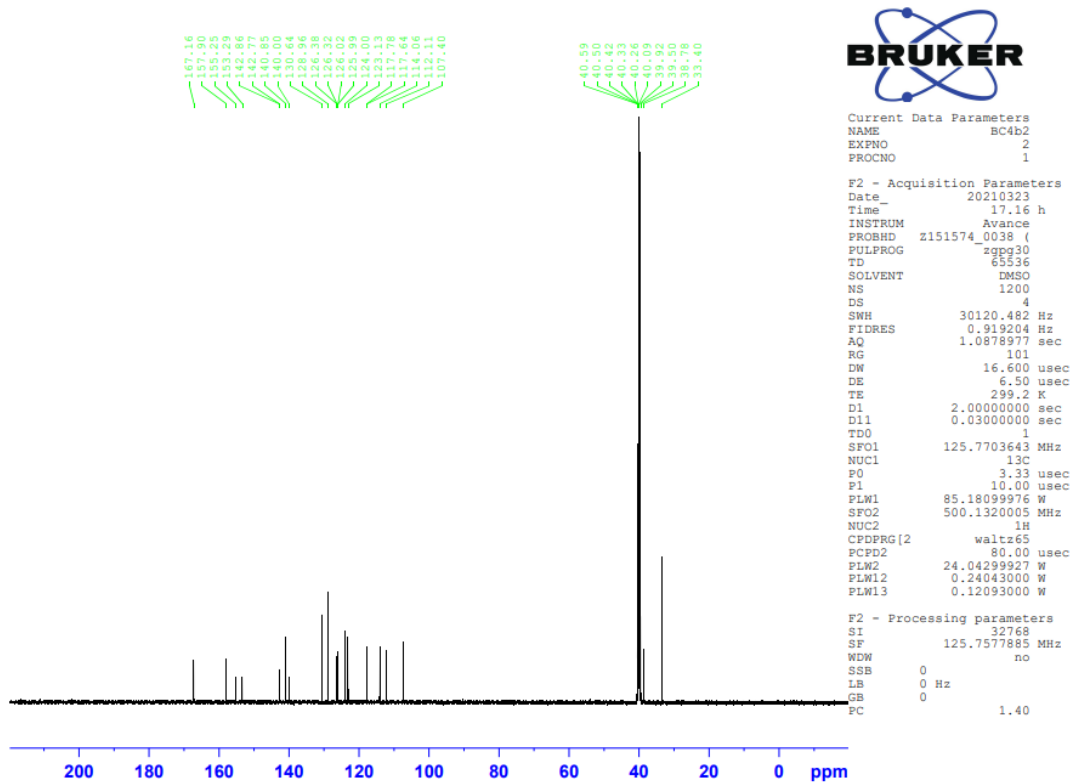
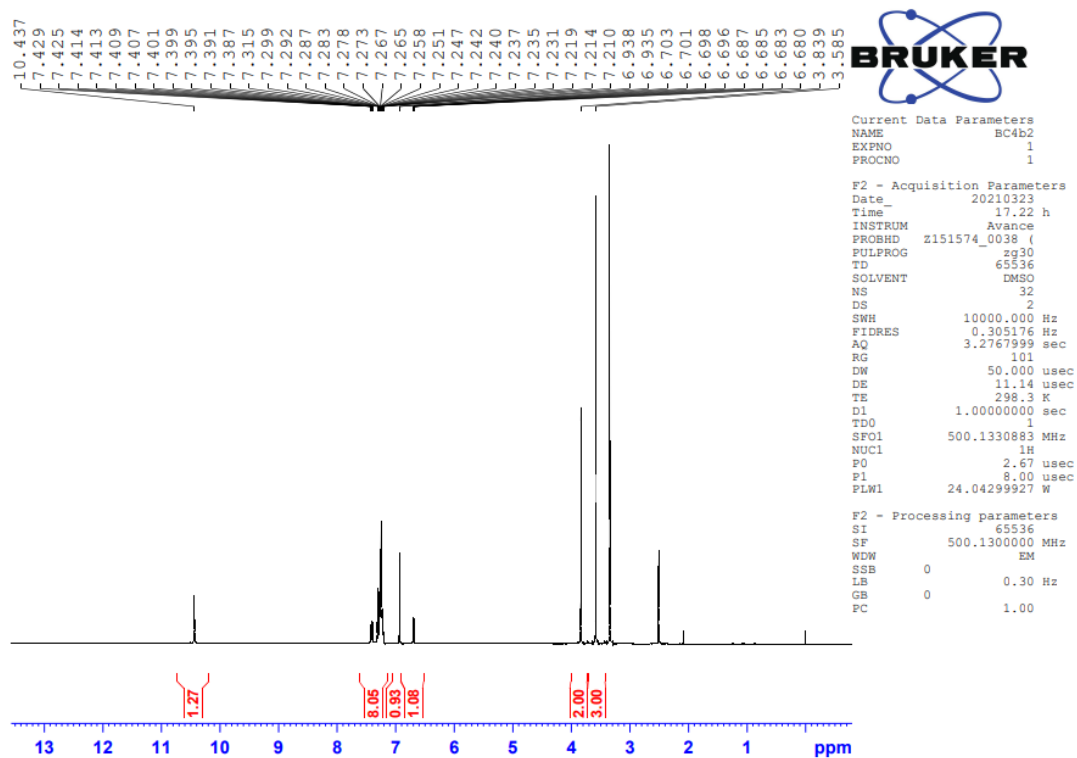
Verim: 66 mg, %60

Erime derecesi: 110,4-110,9 °C

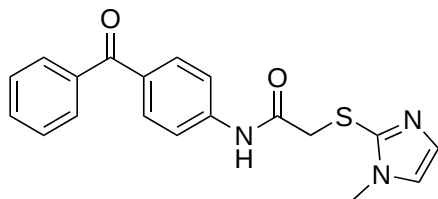
C₁₈H₁₇FN₃O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 358,1026; Bulunan: 358,1024

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,59 (3H, s, -NCH₃); 3,84 (2H, s, -COCH₂S-); 6,68-6,70 (1H, m, Ar-H); 6,94 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,20-7,32 (7H, m, Ar-H); 7,39-7,43 (1H, m, Ar-H); 10,44 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 33,40; 38,78; 107,40; 112,11; 114,06; 117,71 (d, *J*=17,7 Hz); 123,13; 124,00; 126,00 (d, *J*=3,7 Hz); 126,35 (d, *J*=7,3 Hz); 128,96; 130,64; 140,00; 140,85; 142,8 (d, *J*=11,2 Hz); 154,27 (d, *J*=244,8 Hz); 157,90; 167,16.



Şekil 4.23. Bileşik **S1.23**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-Benzoilfenil)-2-((1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo)asetamit (**S2.1**)

Bileşik **2k** (190 mg; 0,6 mmol) ve 1-metil-1*H*-imidazol-2-tiyolden (75 mg; 0,66 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, etanol:su karışımından kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Soluk sarı renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 110 mg, %52

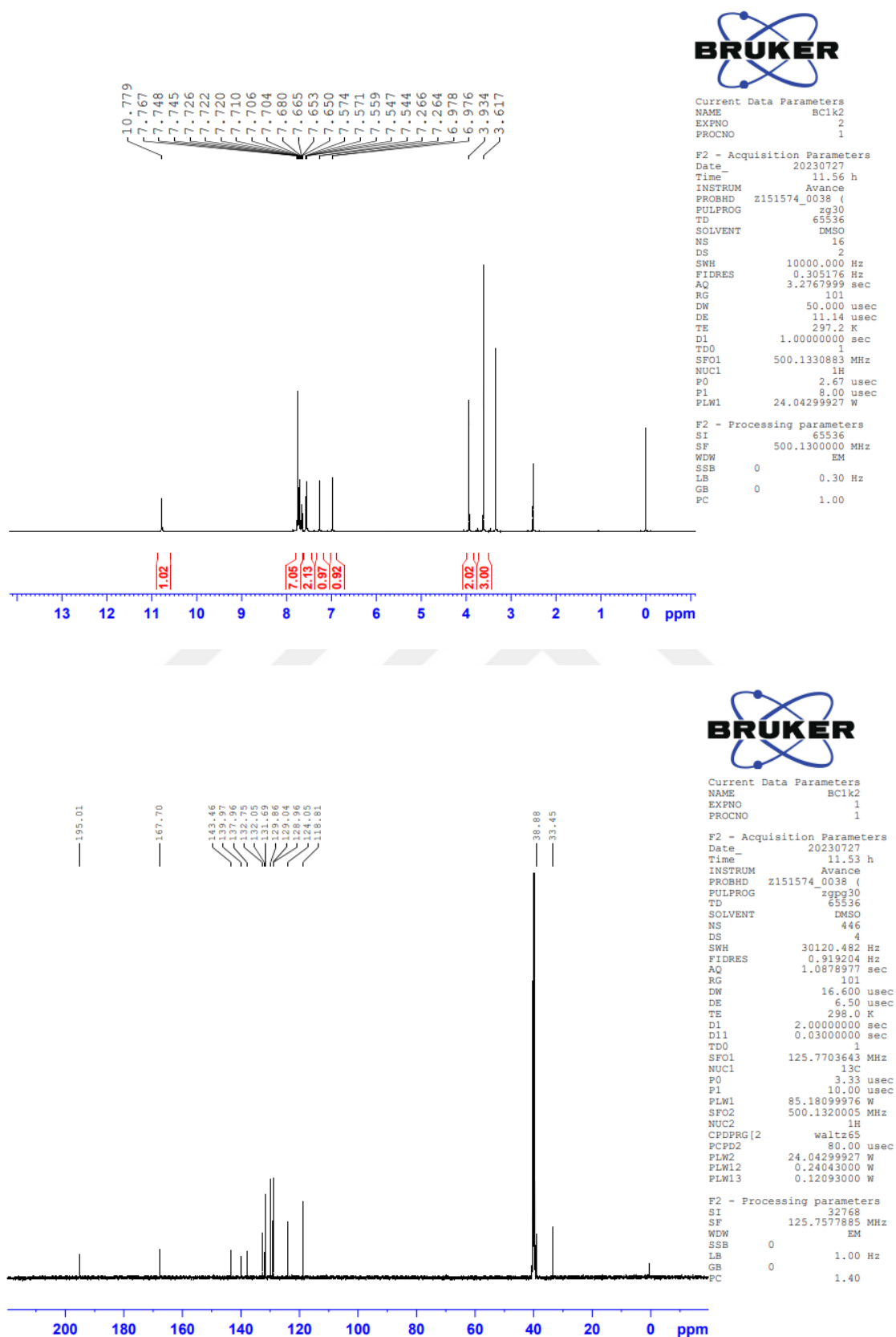
CAS: 212073-13-7 [201]

Erime derecesi: 121,1-121,5 °C

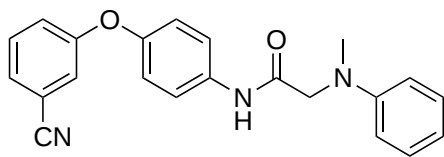
C₁₉H₁₈N₃O₂S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 352,1120; Bulunan: 352,1115

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,62 (3H, s, -NCH₃); 3,93 (2H, s, -COCH₂S-); 6,98 (1H, d, *J*=1,3 Hz, Ar-H); 7,27 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar-H); 7,56 (2H, t, *J*=7,5 Hz, Ar-H); 7,67 (1H, tt, *J*=7,5 ve 1,3 Hz, Ar-H); 7,70-7,77 (6H, m, Ar-H); 10,78 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 33,45; 38,88; 118,81; 124,05; 128,96; 129,04; 129,86; 131,69; 132,05; 132,75; 137,96; 139,97; 143,46; 167,70; 195,01.



Şekil 4.24. Bileşik **S2.1**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(3-Siyanofenoksi)fenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit (S2.2)

Bileşik **2g** (149 mg; 0,45 mmol) ve *N*-metilanilinden (59 µl; 0,54 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, etanolden kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

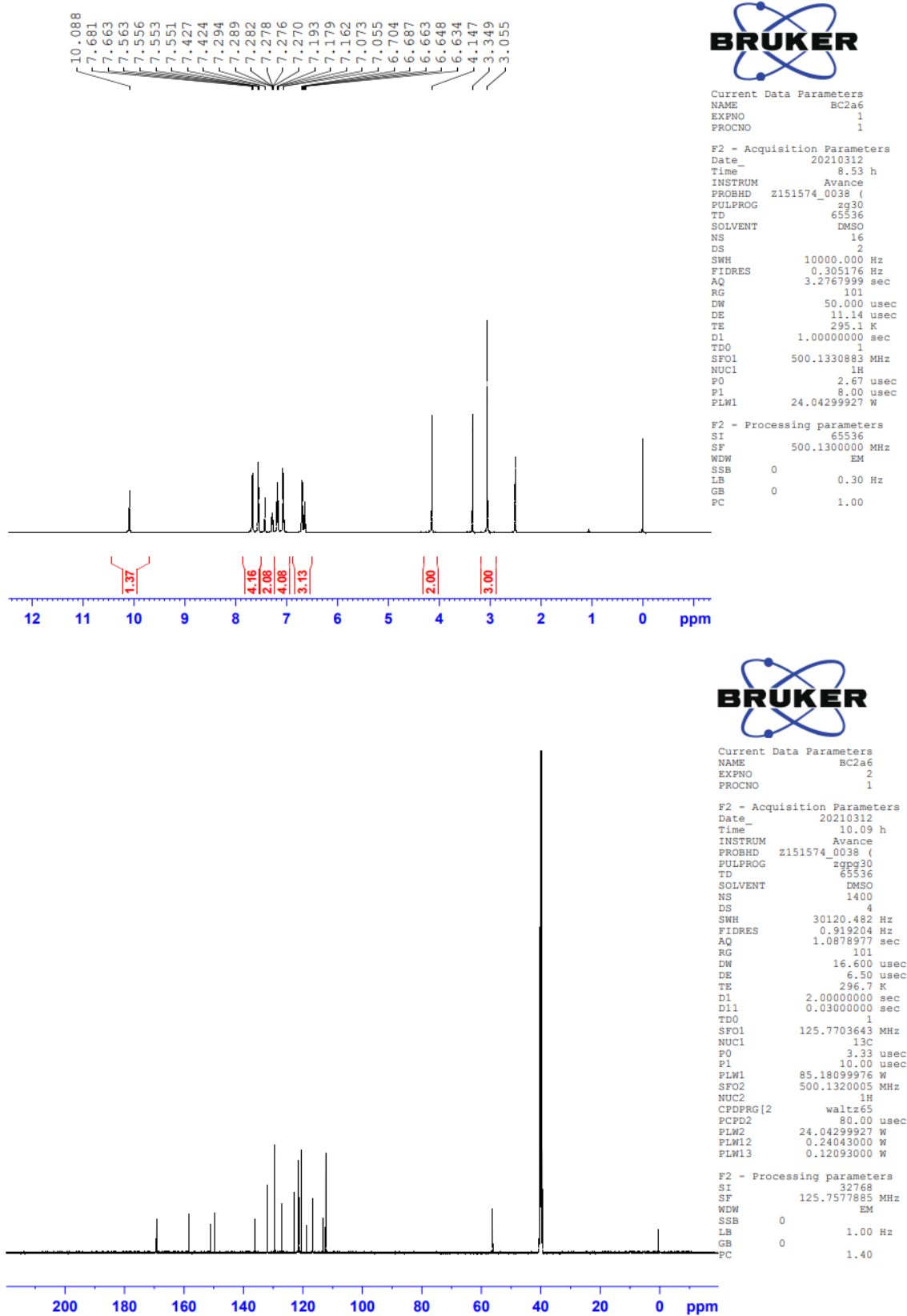
Verim: 87 mg, %54

Erime derecesi: 156,2-156,6 °C

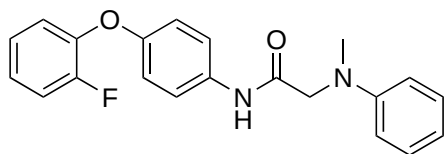
C₂₂H₂₀N₃O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 358,1556; Bulunan: 358,1564

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,06 (3H, s, -NCH₃); 4,15 (2H, s, -COCH₂S-); 6,65 (1H, t, *J*=7,2 Hz, Ar-H); 6,70 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H); 7,06 (2H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H); 7,18 (2H, t, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 7,27-7,29 (1H, m, Ar-H); 7,42-7,43 (1H, m, Ar-H); 7,55-7,56 (2H, m, Ar-H); 7,67 (2H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H); 10,09 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 40,00 (DMSO ile); 56,19; 112,37; 113,10; 116,68; 118,67; 120,56; 121,19; 121,48; 123,01; 127,14; 129,38; 131,88; 136,15; 149,74; 150,92; 158,34; 169,25.



Şekil 4.25. Bileşik **S2.2**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-(2-Florofenoksi)fenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit (S2.3)

Bileşik **2i** (139 mg; 0,43 mmol) ve *N*-metilanilinden (56 µl; 0,52 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

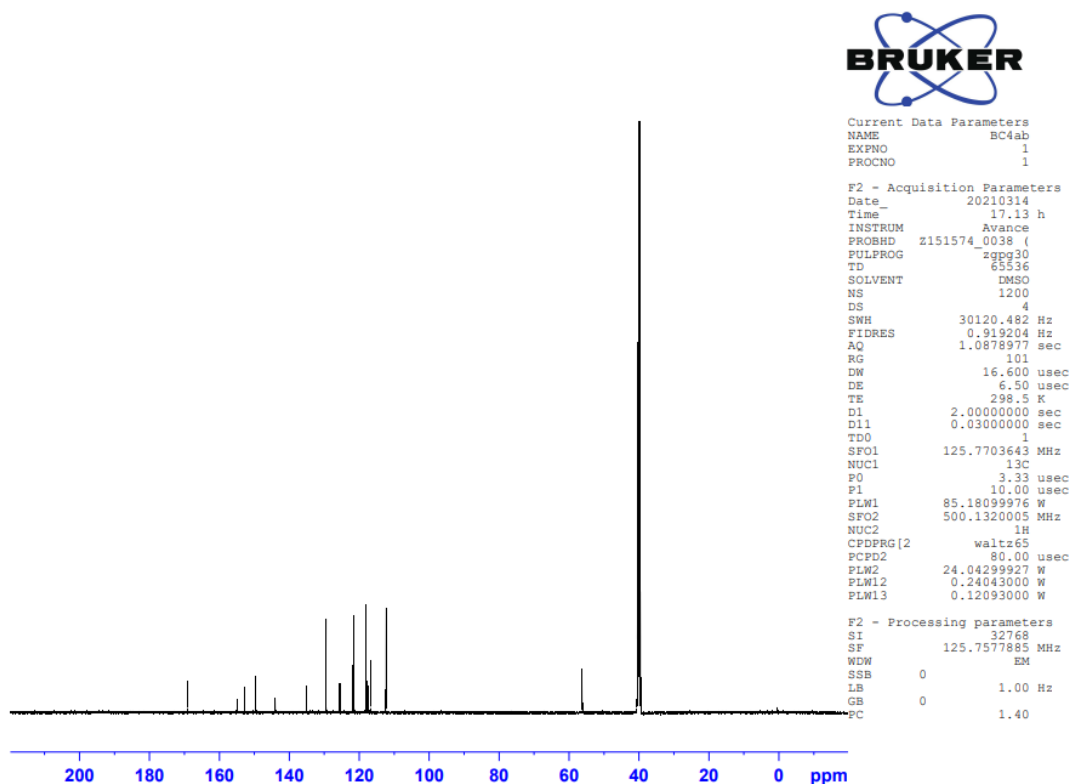
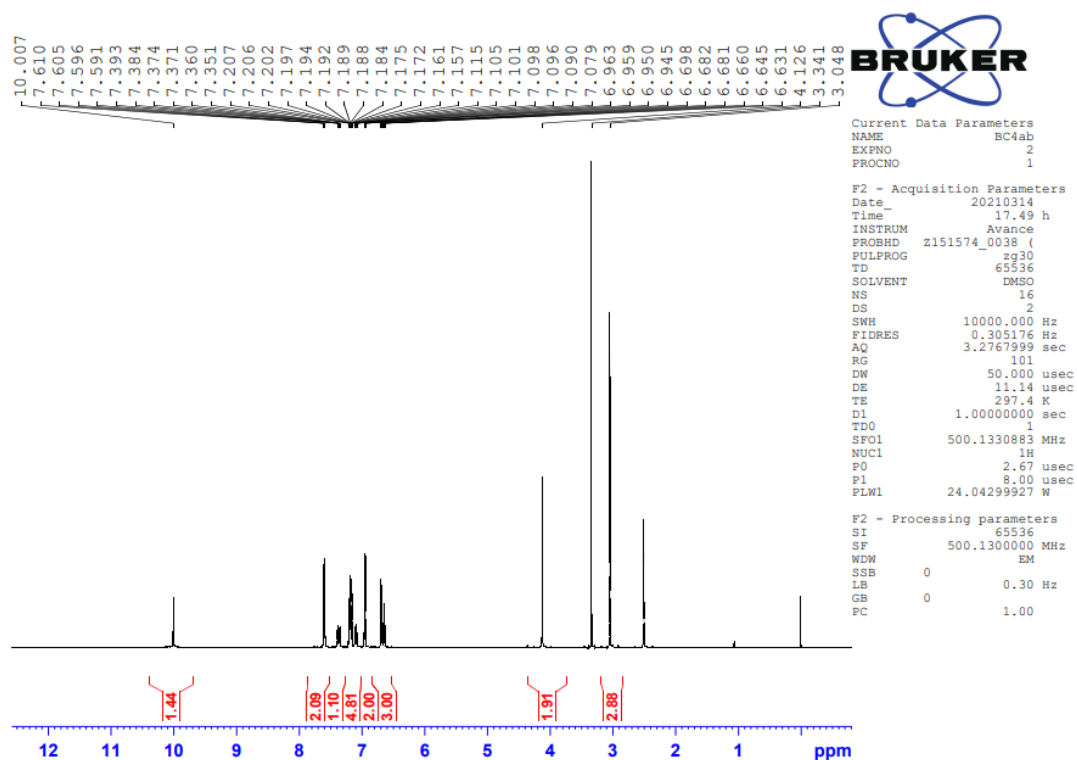
Verim: 39 mg, %26

Erime derecesi: 144,9-145,1 °C

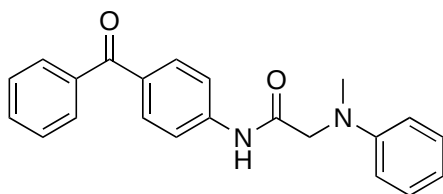
C₂₁H₂₀FN₂O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 351,1509; Bulunan: 351,1512

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,05 (3H, s, -NCH₃); 4,13 (2H, s, -COCH₂S-); 6,65 (1H, t, *J*=7,3 Hz, Ar-H); 6,69 (2H, d, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 6,95 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 7,08- 7,12 (1H, m, Ar-H); 7,16-7,21 (4H, m, Ar-H); 7,35-7,39 (1H, m, Ar-H); 7,60 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H); 10,01 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 40,00 (DMSO ile); 56,19; 112,37; 116,67; 117,59 (d, *J*=17,7 Hz); 118,10; 121,41; 121,77; 125,47 (d, *J*=7,1 Hz); 125,83 (d, *J*=3,6 Hz); 129,37; 135,09; 143,99 (d, *J*=11,1 Hz); 149,75; 152,65; 153,83 (d, *J*=244,8 Hz); 169,12.



Şekil 4.26. Bileşik **S2.3**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(4-Benzoilfenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit (S2.4)

Bileşik **2k** (200 mg; 0,63 mmol) ve *N*-metilanilinden (82 µl; 0,76 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

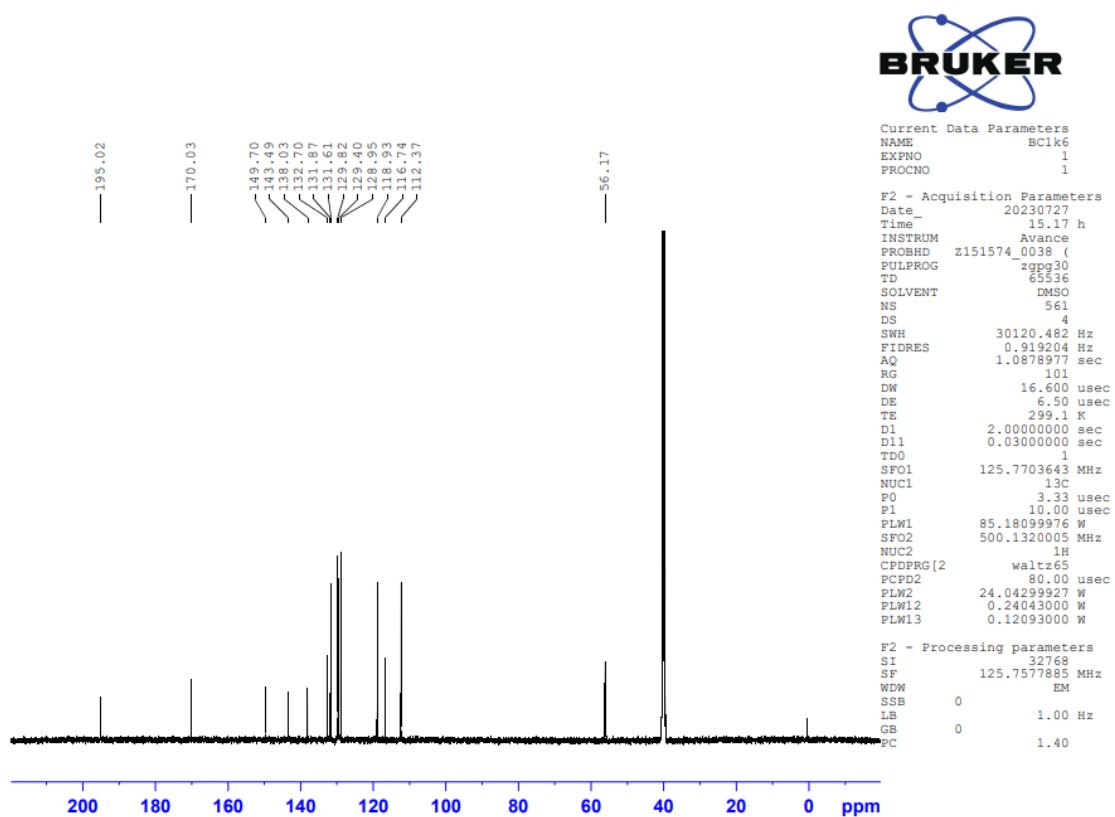
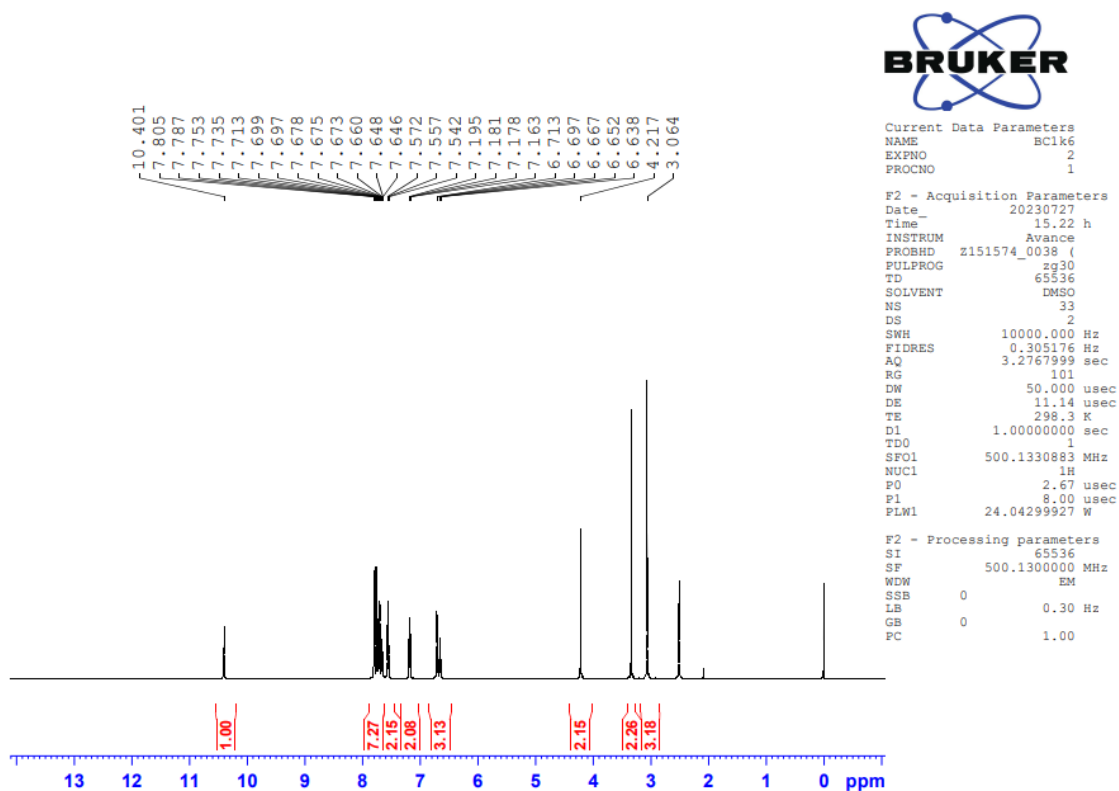
Verim: 63 mg, %29

Erime derecesi: 144,6-144,9 °C

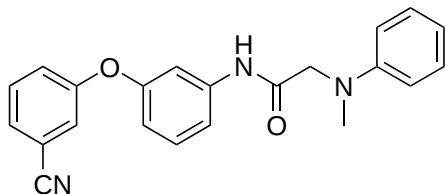
C₂₂H₂₁N₂O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 345,1603; Bulunan: 345,1607

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,06 (3H, s, -NCH₃); 4,22 (2H, s, -COCH₂S-); 6,65 (1H, t, *J*=7,3 Hz, Ar-H); 6,71 (2H, d, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 7,18 (2H, t, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 7,56 (2H, t, *J*=7,5 Hz, Ar-H); 7,66 (1H, tt, *J*=7,5 ve 1,3 Hz, Ar-H); 7,70 (2H, d, *J*=7,7 Hz, Ar-H); 7,74 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H); 7,80 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H); 10,40 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 40,00 (DMSO ile); 56,17; 112,37; 116,74; 118,93; 128,95; 129,40; 129,82; 131,61; 131,87; 132,70; 138,03; 143,49; 149,70; 170,03; 195,02.



Şekil 4.27. Bileşik **S2.4**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-(3-Siyanofenoksi)fenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit (S2.5)

Bileşik **2g** (149 mg; 0,45 mmol) ve *N*-metilanilinden (59 µl; 0,54 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

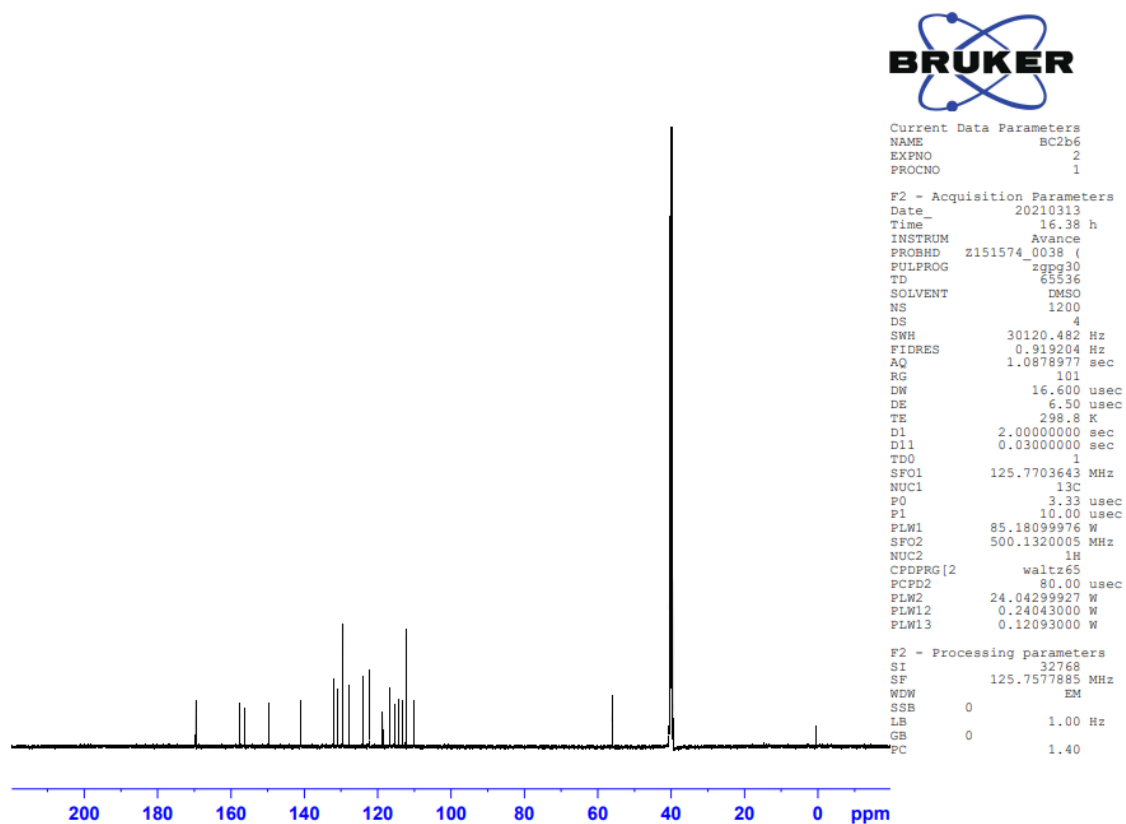
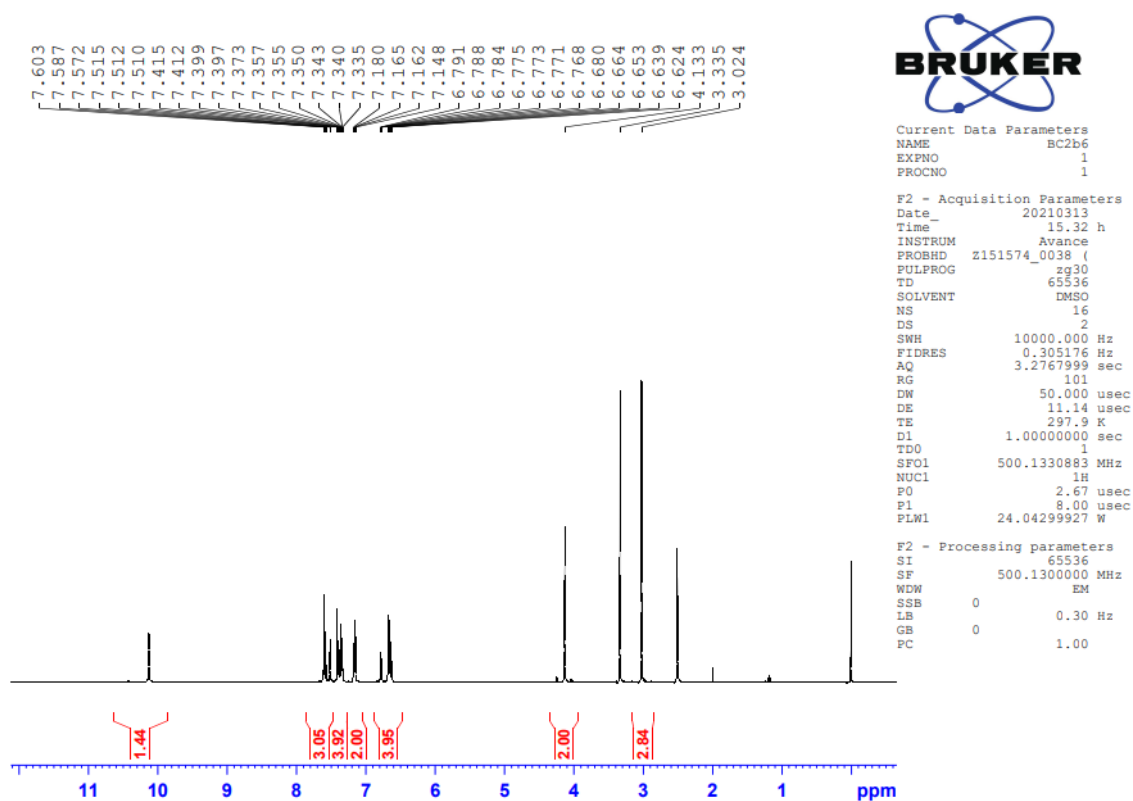
Verim: 93 mg, %58

Erime derecesi: 121,7-122,4 °C

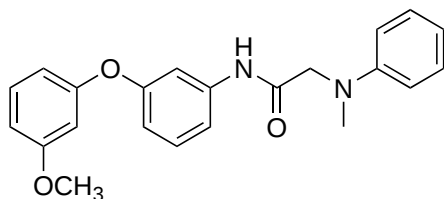
C₂₂H₂₀N₃O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 358,1556; Bulunan: 358,1551

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,02 (3H, s, -NCH₃); 4,13 (2H, s, -COCH₂S-); 6,64 (1H, t, *J*=7,3 Hz, Ar-H); 6,67 (2H, d, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 6,77-6,79 (1H, m, Ar-H); 7,16 (2H, t, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 7,34-7,42 (4H, m, Ar-H); 7,51-7,52 (1H, m, Ar-H); 7,57-7,62 (2H, m, Ar-H); 10,13 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 40,00 (DMSO ile); 56,11; 110,02; 112,33; 113,21; 114,30; 115,38; 116,68; 118,60; 122,27; 124,04; 127,78; 129,37; 130,88; 131,99; 141,10; 149,68; 156,36; 157,49; 169,61.



Şekil 4.28. Bileşik **S2.5**'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

***N*-(3-(3-Metoksifenoksi)fenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit (S2.6)**

Bileşik **2h** (225 mg; 0,67 mmol) ve *N*-metilanilinden (87 µl; 0,80 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

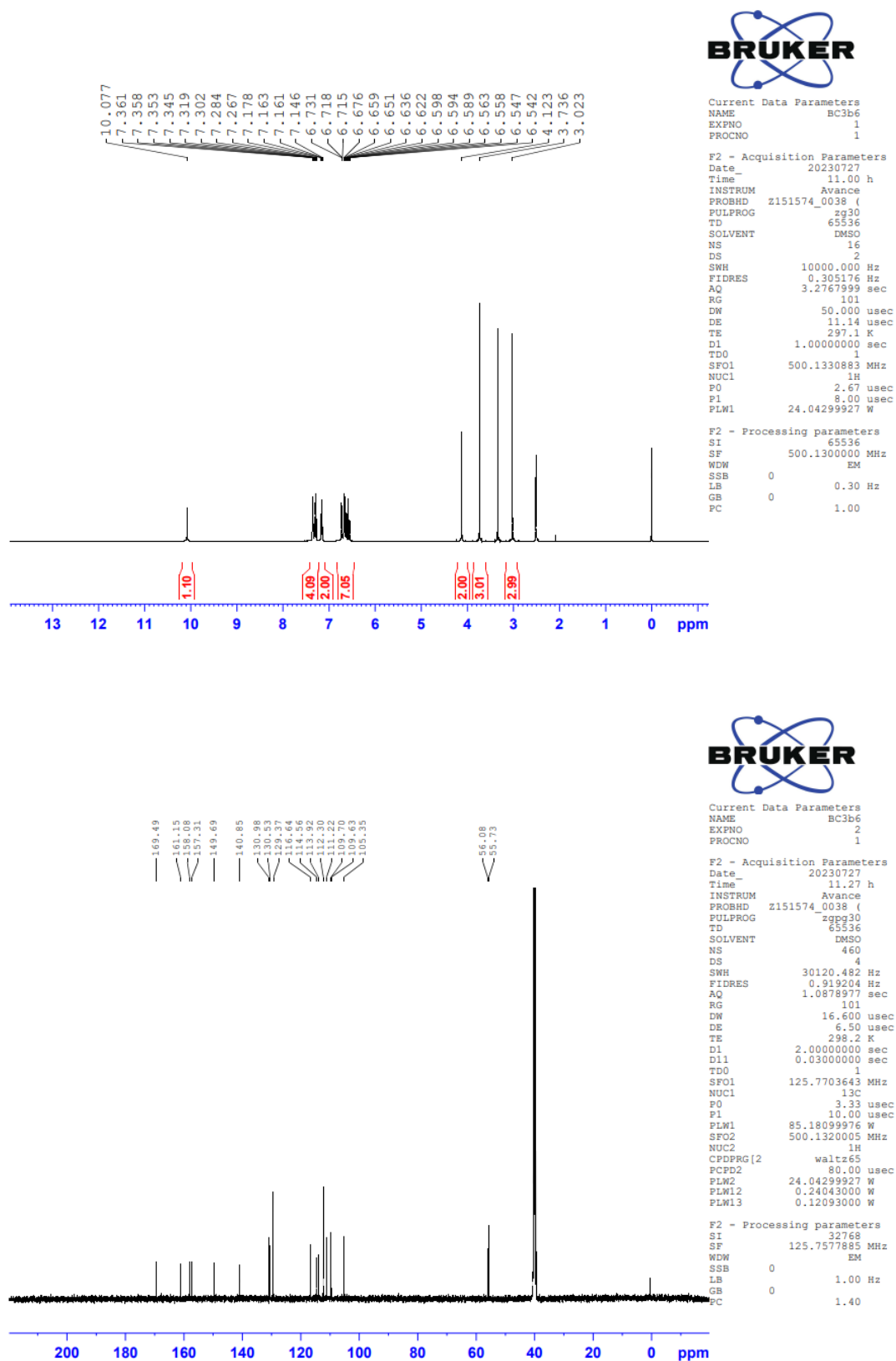
Verim: 60 mg, %25

Erime derecesi: 141,5-141,8 °C

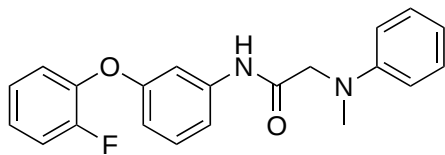
C₂₂H₂₃N₂O₃ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 363,1709; Bulunan: 363,1703

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm; 3,02 (3H, s, -NCH₃); 3,74 (3H, s, -OCH₃); 4,12 (2H, s, -COCH₂S-); 6,55 (1H, dd, *J*=8,0 Hz ve 2.2 Hz, Ar-H); 6,59 (1H, t, *J*=2,3 Hz, Ar-H); 6,64 (1H, t, *J*=7,3 Hz, Ar-H); 6,67 (2H, d, *J*=8,3 Hz, Ar-H); 6,72 (2H, d, *J*=7,3 Hz, Ar-H); 7,16 (2H, t, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 7,27-7,32 (2H, m, Ar-H); 7,34-7,36 (2H, m, Ar-H); 10,08 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm; 40,00 (DMSO ile); 55,73; 56,08; 105,35; 109,63; 109,70; 111,22; 112,30; 113,92; 114,56; 116,64; 129,37; 130,53, 130,98; 140,85; 149,69; 157,31; 158,08; 161,15; 169,49.



Şekil 4.29. Bileşik **S2.6**'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

N-(3-(2-Florofenoksi)fenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit (S2.7)

Bileşik **2i** (165 mg; 0,51 mmol) ve *N*-metilanilinden (66 µl; 0,61 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (85:15) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

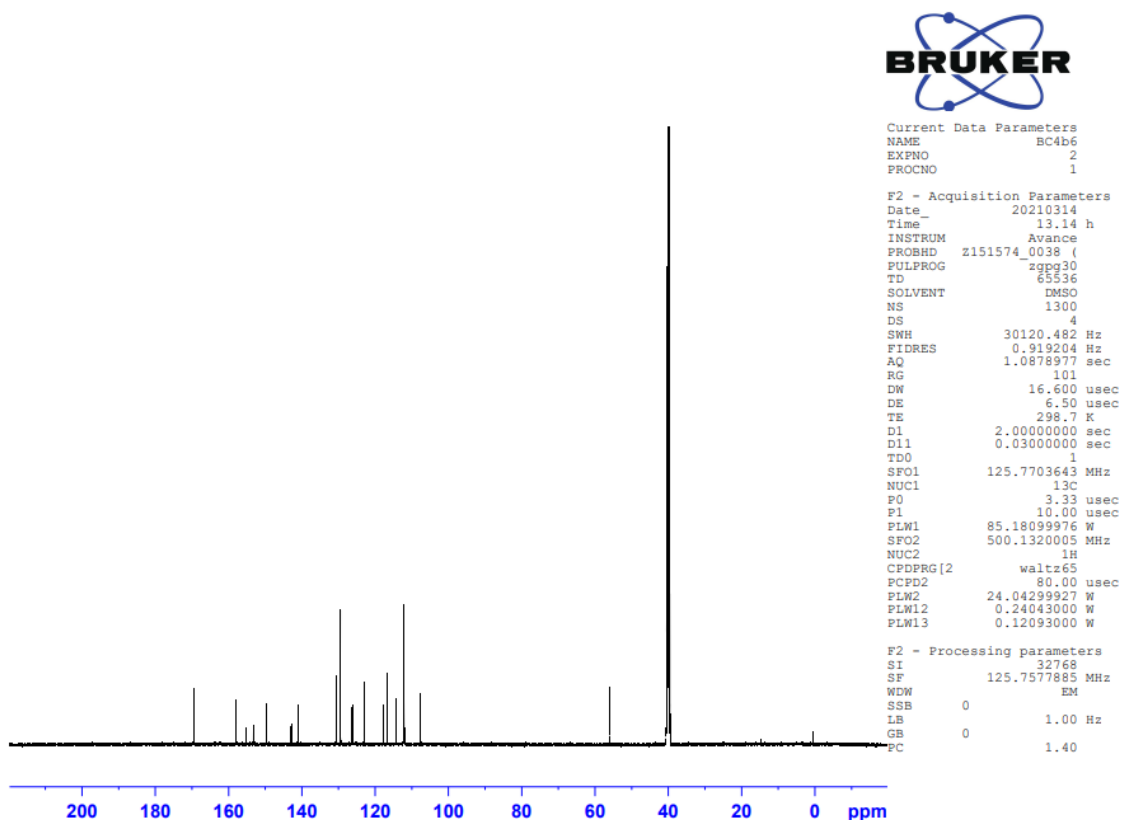
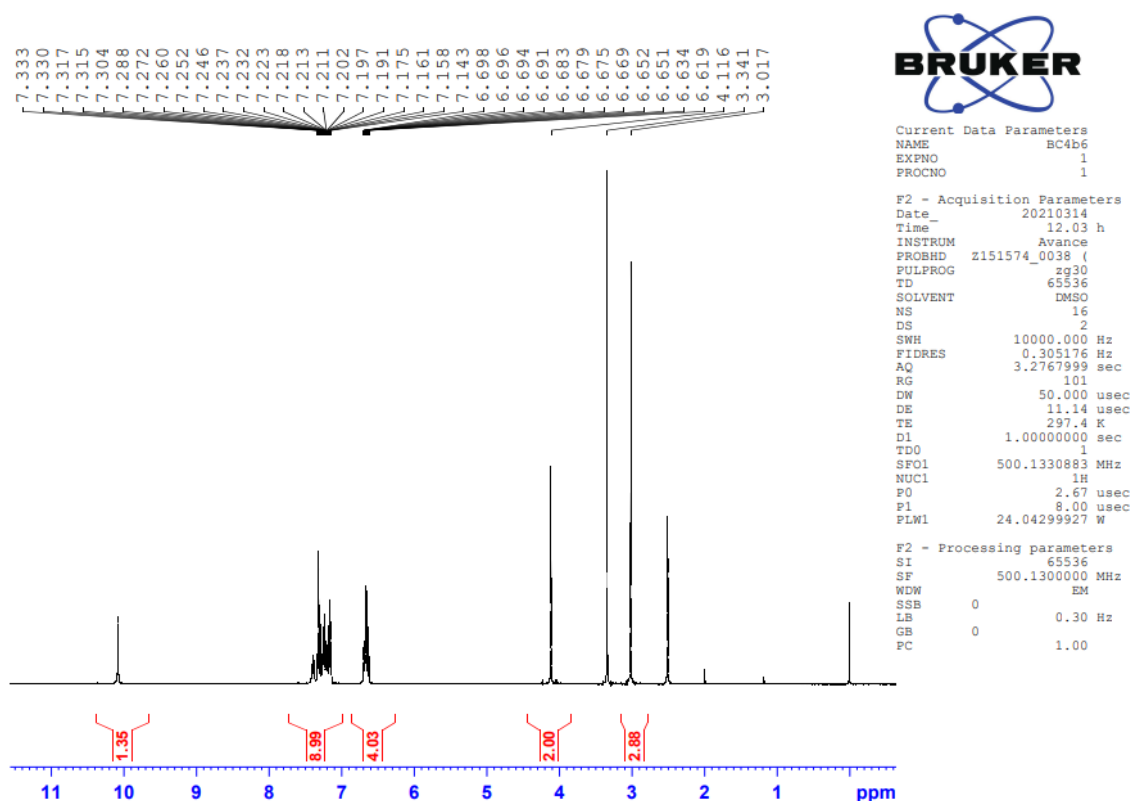
Verim: 40 mg, %22

Erime derecesi: 133,5-133,8 °C

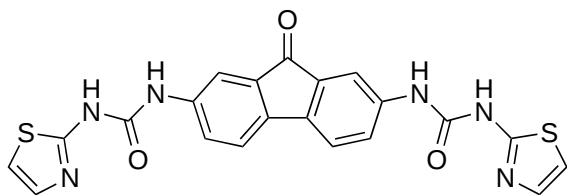
C₂₁H₂₀FN₂O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 351,1509; Bulunan: 351,1506

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,02 (3H, s, -NCH₃); 4,12 (2H, s, -COCH₂S-); 6,62-6,70 (4H, m, Ar-H); 7,16 (2H, t, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 7,18-7,33 (6H, m, Ar-H); 7,37-7,42 (1H, m, Ar-H); 10,08 (1H, s, -CONH-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 40,00 (DMSO ile); 56,04; 107,55; 112,04; 112,28; 114,20; 116,63; 117,71 (d, *J*=17,9 Hz); 123,05; 125,99 (d, *J*=3,6 Hz); 126,26 (d, *J*=7,0 Hz); 129,37; 130,54; 140,89; 142,93 (d, *J*=11,3 Hz); 149,67; 154,24 (d, *J*=245,0 Hz); 157,85; 169,51.



Şekil 4.30. Bileşik **S2.7**'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

1,1'-(9-Okso-9H-floren-2,7-diil)bis(3-(tiyazol-2-il)üre) (S3.1)

Tiyazol-2-amin (50 mg; 0,5 mmol), 1,1'-karbonildiimidazol (105 mg; 0,6 mmol) ve Bileşik **3a'**dan (53 mg; 0,25 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *N,N*-dimetilformamitten kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Bordo renkte katı bir bileşiktir.

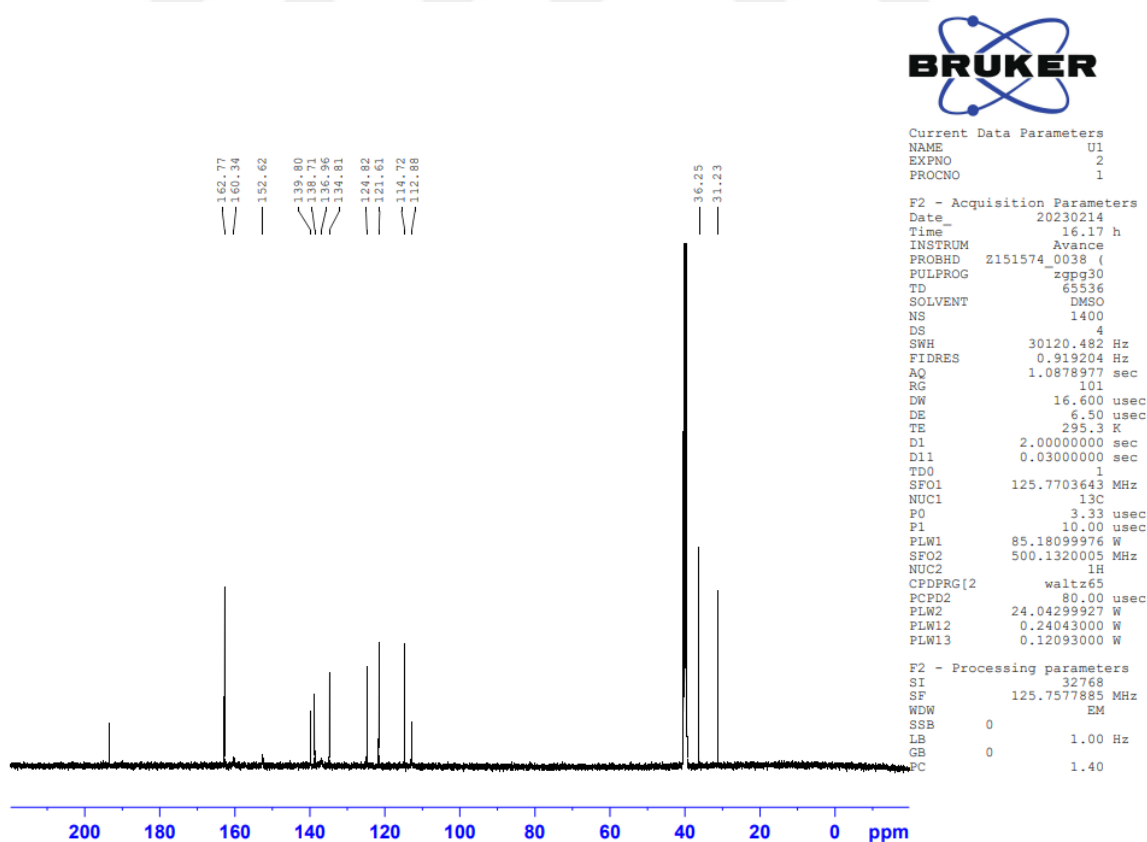
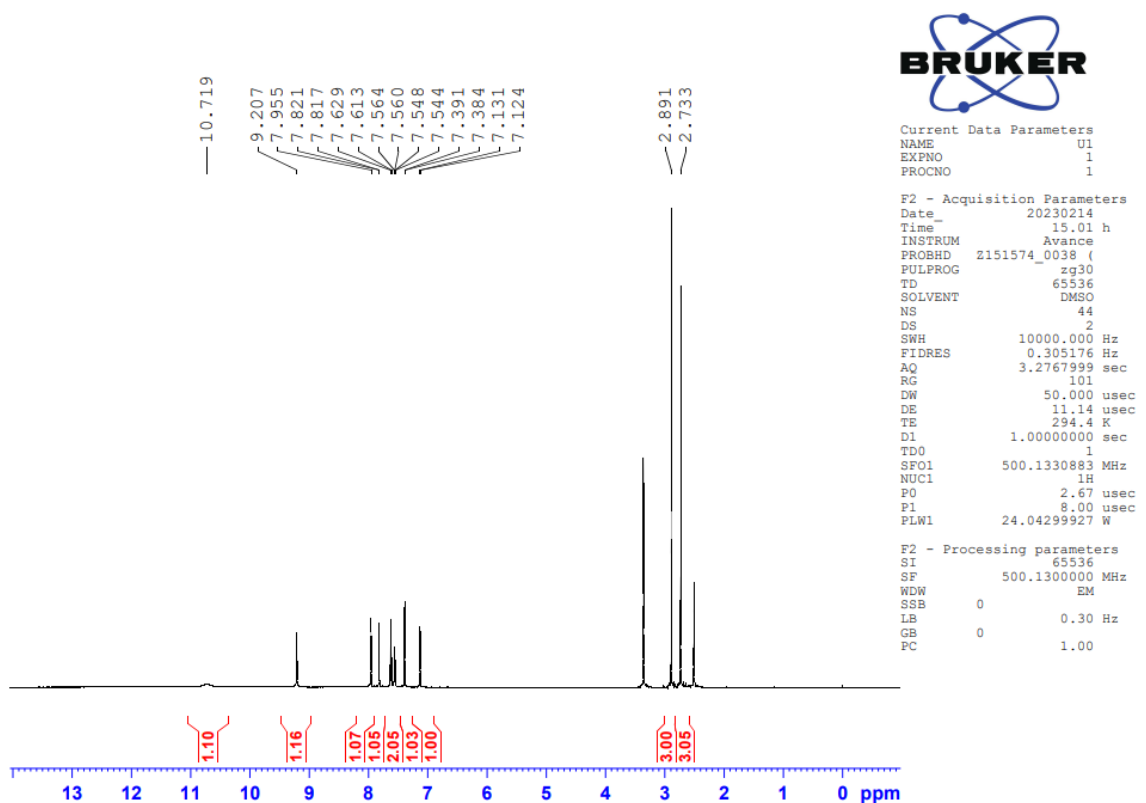
Verim: 51 mg, %44

Erime derecesi: >300 °C

C₂₁H₁₅N₆O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 463,0647; Bulunan: 463,0648

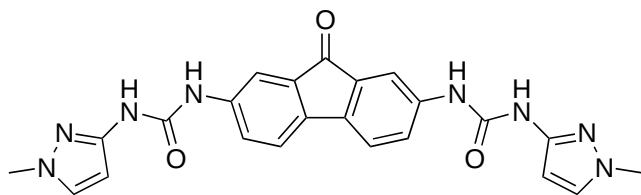
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 7,13 (2H, d, *J*=3,7 Hz, Ar-H); 7,39 (2H, d, *J*=3,7 Hz, Ar-H); 7,55 (2H, dd, *J*=8,1 ve 2,0 Hz, Ar-H); 7,62 (2H, d, *J*=8,1 Hz, Ar-H); 7,82 (2H, d, *J*=2,0 Hz, Ar-H); 9,21 (2H, s, tiyazol halkasına komşu -NH), 10,72 (2H, br s, -NH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 112,88; 114,72; 121,61; 124,82; 134,81; 136,96; 138,71; 139,80; 152,63; 160,35; 193,37.



Şekil 4.31. Bileşik **S3.1**'in ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

1,1'-(9-Okso-9H-floren-2,7-diil)bis(3-(1-metil-1H-pirazol-3-il)üre) (S3.2)



1-Metil-1H-pirazol-3-amin (49 mg; 0,5 mmol), 1,1'-karbonildiimidazol (105 mg; 0,6 mmol) ve Bileşik **3a**'dan (53 mg; 0,25 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol:asetik asit (95:5:0,5) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Pembe renkte katı bir bileşiktir.

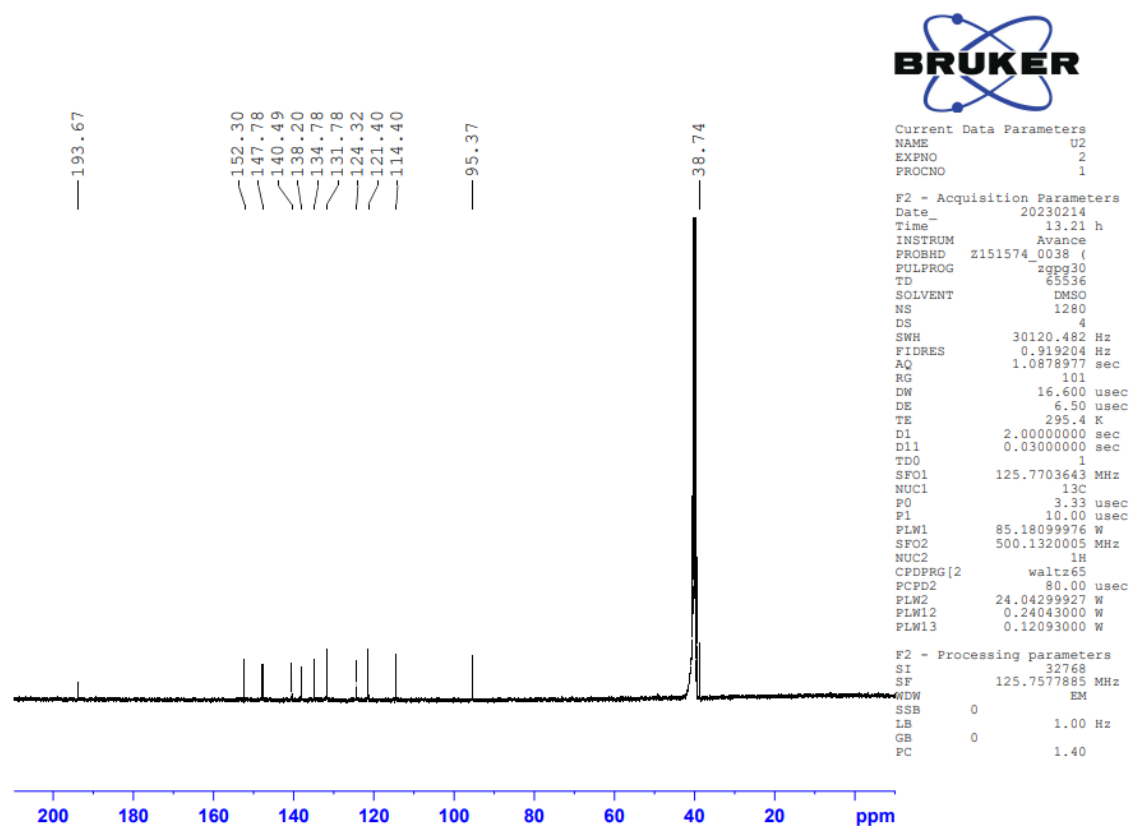
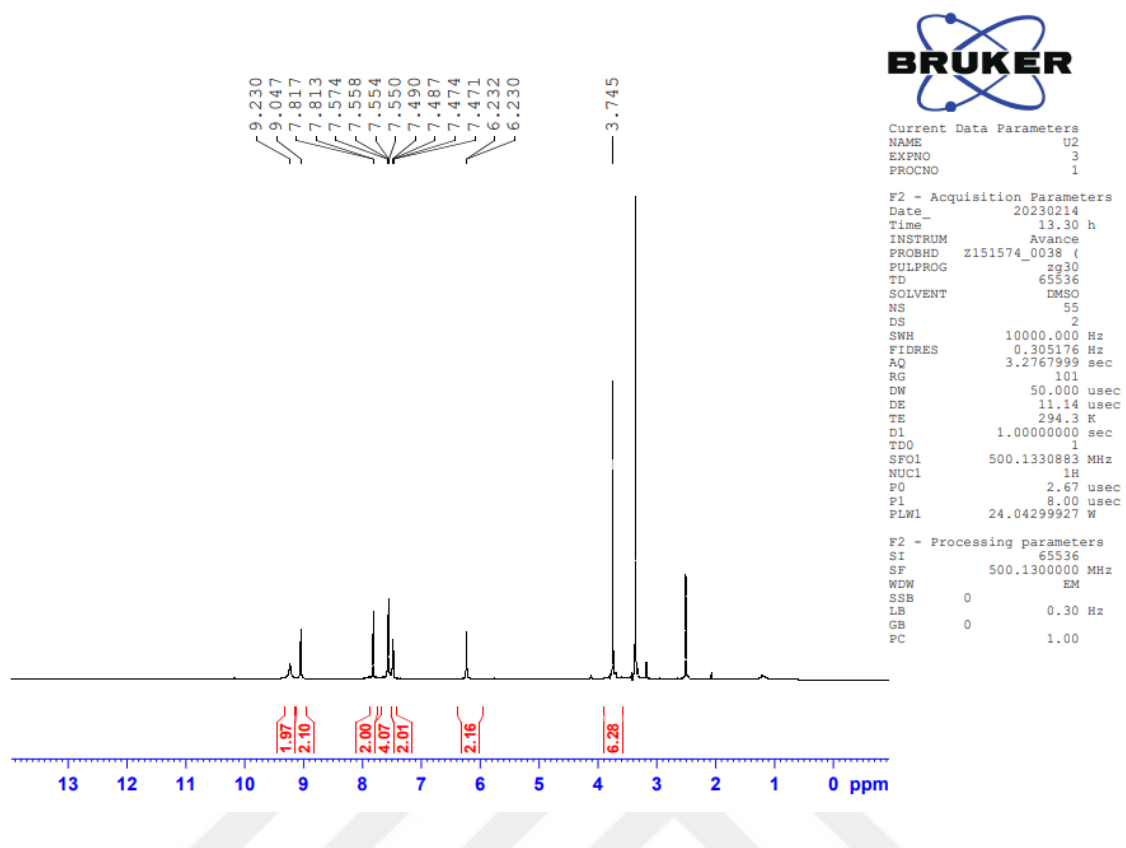
Verim: 39 mg, %34

Erime derecesi: >300 °C

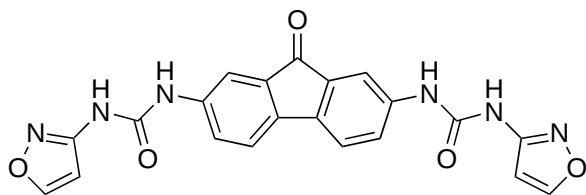
C₂₃H₂₁N₈O₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 457,1737; Bulunan: 457,1739

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3,75 (6H, s, -NCH₃); 6,23 (2H, d, *J*=1,1 Hz, Ar-H); 7,48 (2H, dd, *J*=8,1 ve 1,8 Hz, Ar-H); 7,55 (2H, d, *J*=2,2 Hz, Ar-H); 7,57 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H); 7,82 (2H, d, *J*=1,8 Hz, Ar-H); 9,05 (2H, s, 1-metil-1H-pirazol halkasına komşu -NH); 9,23 (2H, br s, -NH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 38,74; 95,37; 114,40; 121,40; 124,32; 131,78; 134,78; 138,20; 140,49; 147,78; 152,30; 193,67.



Şekil 4.32. Bileşik **53.2'** nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

1,1'-(9-Okso-9H-floren-2,7-diil)bis(3-(izoksazol-3-il)üre) (S3.3)

İzoksazol-3-amin (39 μ l; 0,5 mmol), 1,1'-karbonildiimidazol (105 mg; 0,6 mmol) ve Bileşik **3a**'dan (53 mg; 0,25 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *N,N*-dimetilformamitten kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Bordo renkte katı bir bileşiktir.

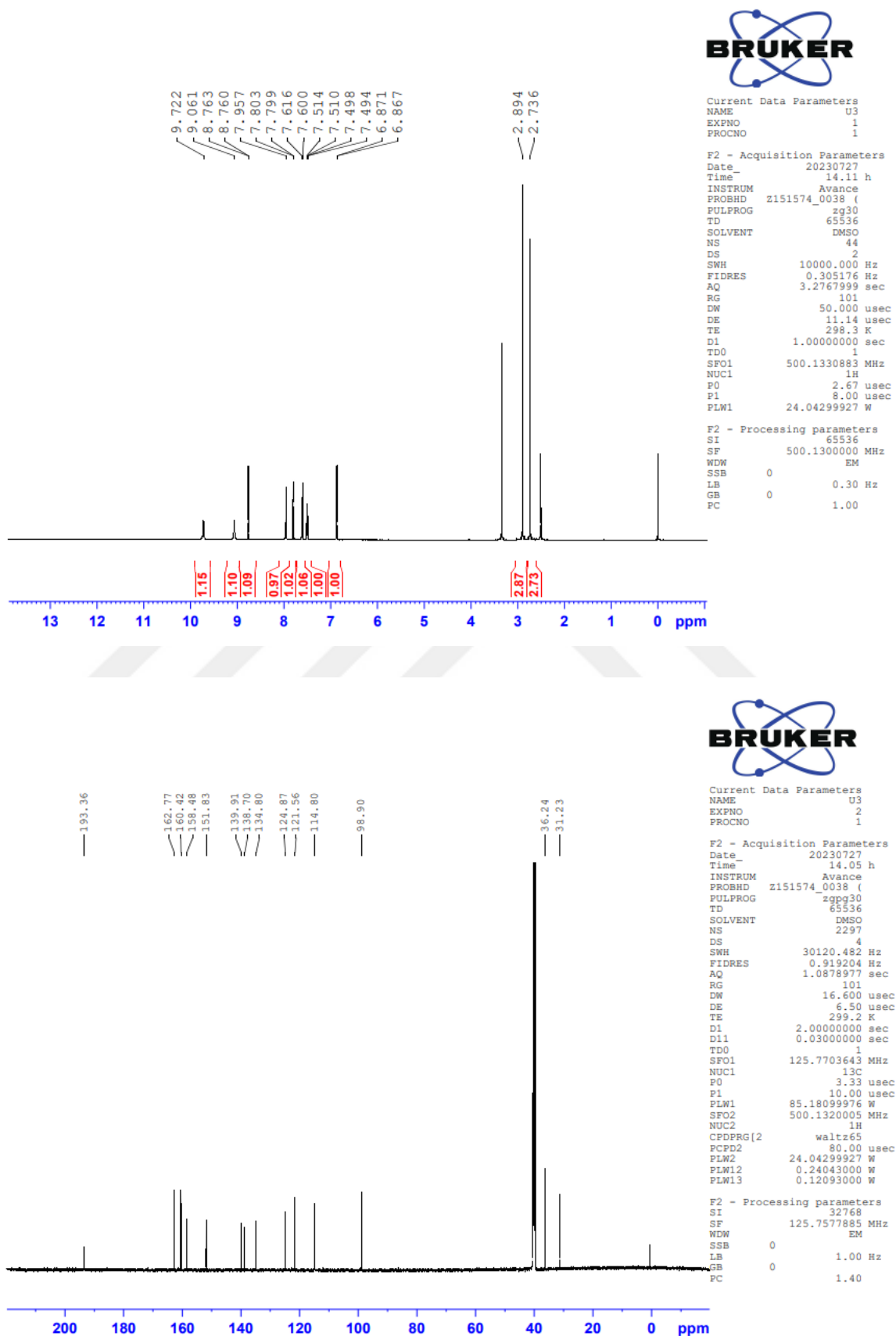
Verim: 36 mg, %33

Erime derecesi: >300 °C

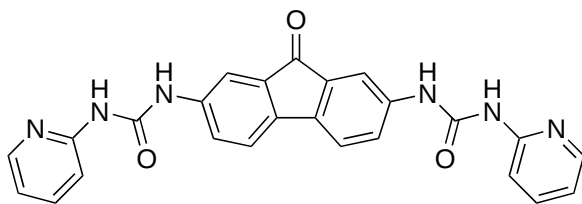
C₂₁H₁₅N₆O₅ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 431,1104; Bulunan: 431,1101

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 6,87 (2H, d, *J*=1,8 Hz, Ar-H); 7,50 (2H, dd, *J*=8,0 ve 2,0 Hz, Ar-H); 7,61 (2H, d, *J*=8,0 Hz, Ar-H); 7,81 (2H, d, *J*=2,0 Hz, Ar-H); 8,76 (2H, d, *J*=1,8 Hz, Ar-H); 9,06 (2H, br s, izoksazol halkasına komşu -NH); 9,72 (2H, br s, -NH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 98,90; 114,80; 121,56; 124,87; 134,80; 138,70; 139,91; 151,83; 158,48; 160,42; 193,36.



Şekil 4.33. Bileşik **S3.3**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

1,1'-(9-Okso-9H-floren-2,7-diil)bis(3-(piridin-2-il)üre) (S3.4)

2-Aminopiridin (94 mg; 1 mmol) ve piridin (81 µl; 1 mmol) diklorometan içerisindeki çözeltisine 4-nitrofenil kloroformat (210 mg; 1 mmol) 0 °C'de damla damla ilave edilmiş ve ardından 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Süre sonunda reaksiyon ortamında çöken katı süzülerek ayrılmış ve diklorometan ile yıkanmıştır. Elde edilen ham ürün (205 mg; 0,75 mmol) ve Bileşik **3a**'nın (53 mg; 0,25 mmol) *N,N*-dimetilformamit içerisindeki çözeltisi 80 °C'de 24 saat süreyle karıştırılmış, süre sonunda reaksiyon ortamı pH=4 olan HCl çözeltisi içerisine boşaltılmıştır. Çöken katı süzülerek ayrılmış ve dimetil sülfoksit:etanol karışımından kristallendirilerek saflaştırılmıştır. Kırmızı renkte katı bir bileşiktir.

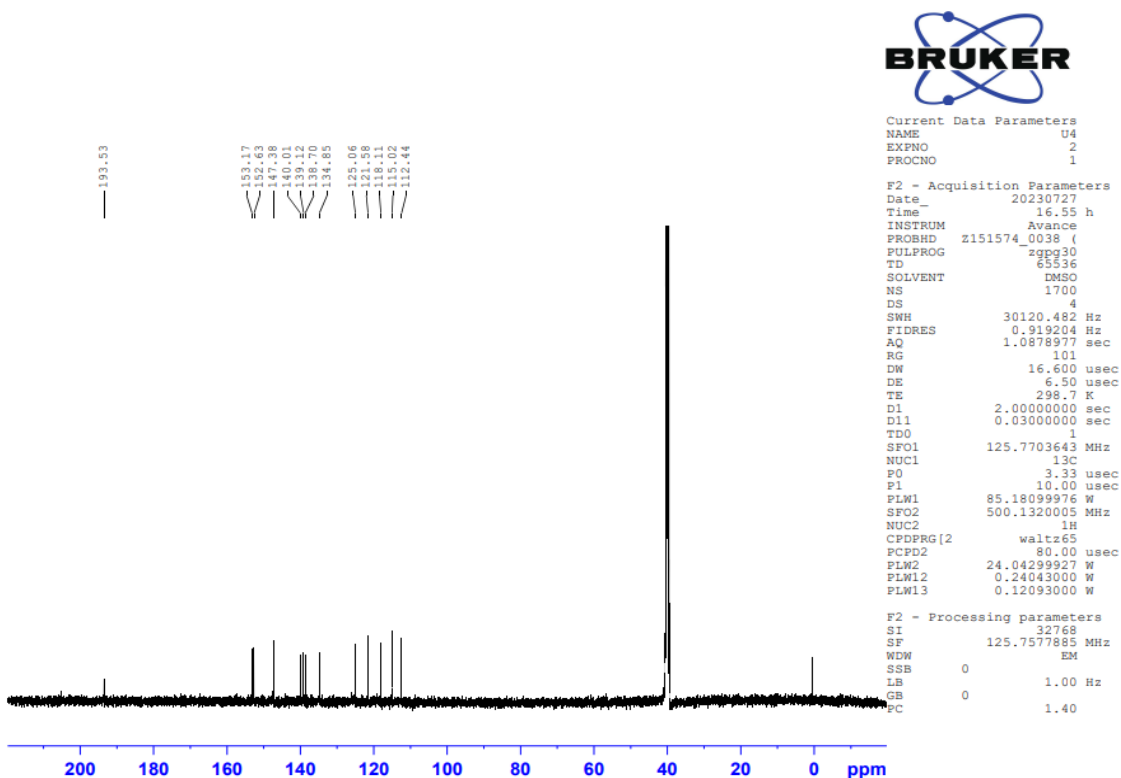
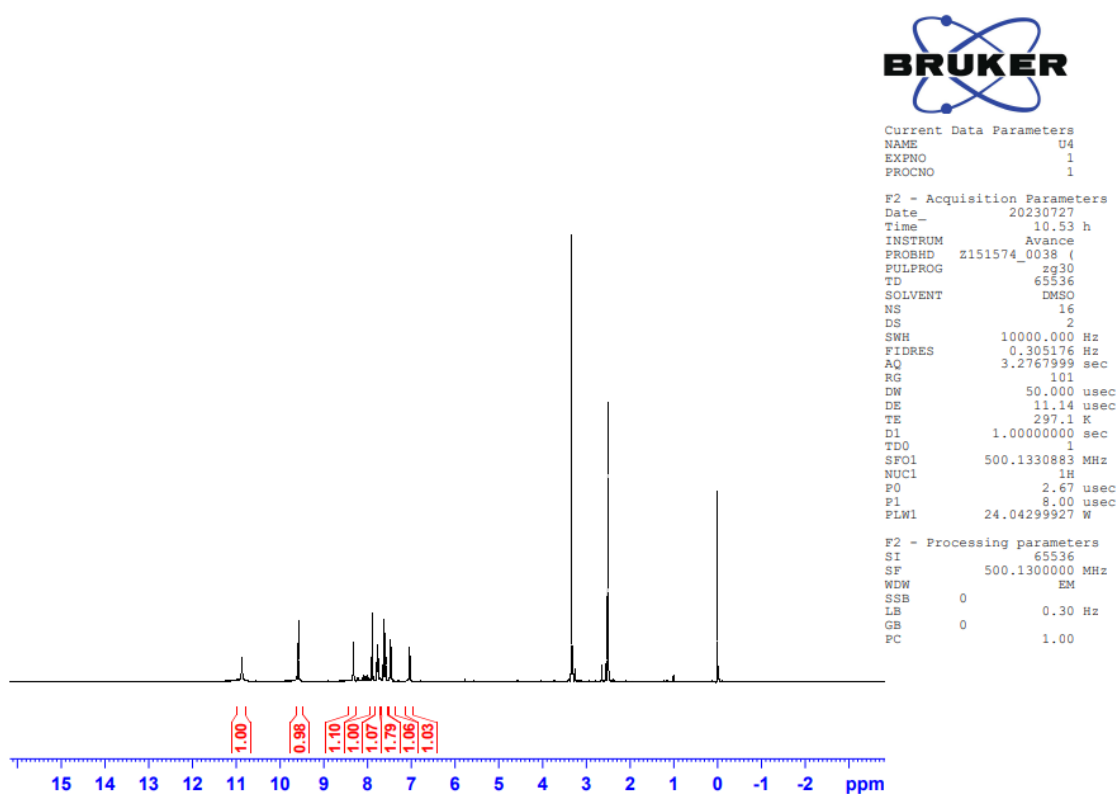
Verim: 41 mg, %36

Erime derecesi: >300 °C

C₂₅H₁₉N₆O₃ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 451,1519; Bulunan: 451,1518

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 7,02-7,05 (2H, m, Ar-H); 7,47 (2H, d, *J*=8,3 Hz, Ar-H); 7,58-7,60 (2H, m, Ar-H); 7,62-7,64 (2H, m, Ar-H); 7,77 (2H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 7,90 (2H, s, Ar-H); 8,32 (2H, d, *J*=4,6 Hz, Ar-H); 9,58 (2H, s, piridin halkasına komşu -NH); 10,87 (2H, br s, -NH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 112,44; 115,02; 118,11; 121,58; 125,06; 134,85; 138,70; 139,12; 140,01; 147,38; 152,63; 153,17; 193,53.



Şekil 4.34. Bileşik **S3.4**'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

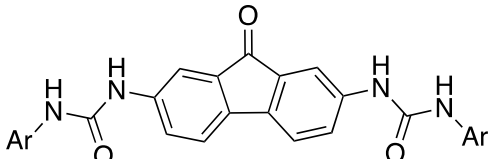
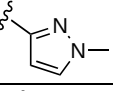
4.2. Biyolojik Bulgular

4.2.1. *İn vitro* SIRT1-3 inhibitör etki

Sentez ve yapı-aydınlatma çalışmaları tamamlanan bileşiklerin, SIRT2 enzim aktivitesi üzerine etkileri fluorimetrik esasa göre çalışan enzim kiti kullanılarak 100 μ M tarama konsantrasyonunda *in vitro* olarak belirlenmiştir. Deneylerde referans bileşik olarak SIRT inhibitörü suramin (SIRT1 IC_{50} =297 nM; SIRT2 IC_{50} =1,15 μ M), selektif SIRT1 inhibitörü EX-527 (SIRT1 IC_{50} =38 nM; SIRT2 IC_{50} =19,6 μ M; SIRT3 IC_{50} =48,7 μ M) ve nikotinamit (SIRT1 IC_{50} =120 μ M; SIRT2 IC_{50} =100 μ M; SIRT3 IC_{50} =50 μ M) kullanılmıştır. Test edilen bileşikler için belirlenen SIRT1-3 inhibitör etkileri Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

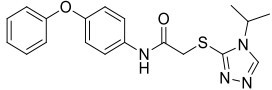
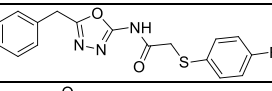
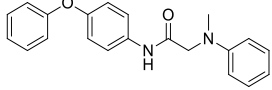
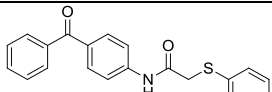
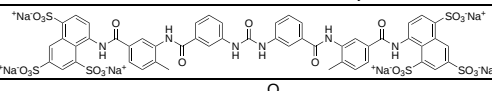
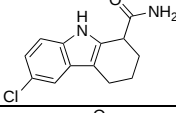
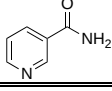
SIRT2 enzim aktivitesini 100 μ M tarama konsantrasyonunda yüksek oranda inhibe eden **S1.12, S2.2, S2.5, S3.1, S3.3** ve **S3.4** kodlu bileşiklerin 0,01-100 μ M arasında değişen tarama konsantrasyonlarındaki SIRT2 %inhibisyon değerleri normalize edilerek elde edilen doz yanıt eğrileri ile SIRT2 IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.2. **S3.1-S3.4** kodlu bileşiklerin SIRT1-3 enzimlerine karşı %inhibisyon değerleri

				
Kod	Ar	%İnhibisyon ^a (100 µM)		
		SIRT2	SIRT1	SIRT3
S3.1		106,21±4,22	22,47±3,74	44,73±2,08
S3.2		48,50±0,30	11,31±1,83	17,50±0,57
S3.3		84,39±4,07	7,98±1,47	18,61±1,54
S3.4		100,75±7,54	24,71±5,02	42,55±4,88

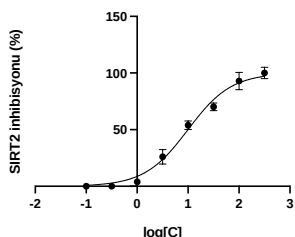
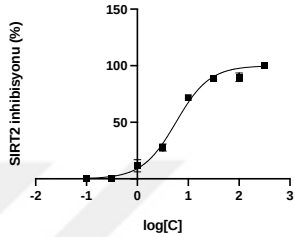
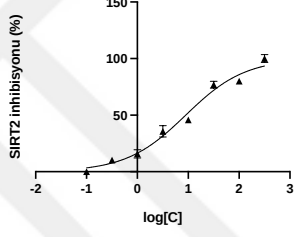
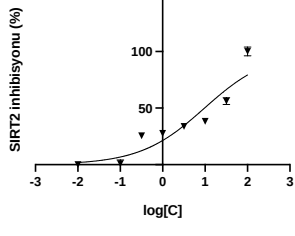
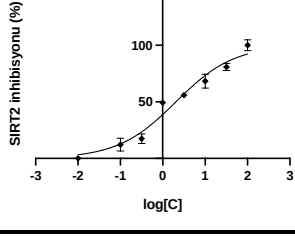
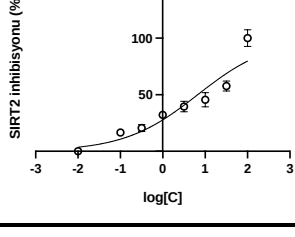
^a%İnhibisyon değerleri "ortalama değer±standart sapma" olarak verilmiştir (n=3); i.y.: inhibisyon yok; t.e.: test edilmedi.

Çizelge 4.3. Öncü ve referans bileşiklerinin SIRT1-3 enzimlerine karşı %inhibisyon değerleri

Kod	Kimyasal yapı	%İnhibisyon ^a (100 µM)		
		SIRT2	SIRT1	SIRT3
Ö1		36,89±0,45	i.y.	i.y.
Ö2		20,99±4,76	i.y.	i.y.
Ö3		50,07±2,07	8,54±3,50	22,87±4,09
Ö4		54,03±1,52	i.y.	19,17±0,14
Suramin		98,37±0,25	94,52±0,92	96,82±3,26
EX-527		76,39±2,49	99,28±1,07	44,61±3,81
Nikotinamit		81,13±4,15	t.e.	t.e.

^a%İnhibisyon değerleri "ortalama değer±standart sapma" olarak verilmiştir (n=3); i.y.: inhibisyon yok; t.e.: test edilmedi.

Çizelge 4.4. S1.12, S2.2, S.2.5, S3.1, S3.3 ve S3.4 kodlu bileşiklerin SIRT2 IC₅₀ değerleri

Kod	[C]	%İnhibisyon ^a	IC ₅₀ (μM)	Doz yanıt eğrileri
S1.12	300 μM	73,55±3,69	9,97	
	100 μM	68,33±5,63		
	30 μM	51,63±2,48		
	10 μM	39,68±2,81		
	3 μM	19,16±4,70		
	1 μM	2,87±1,45		
	0,3 μM	i.y.		
	0,1 μM	i.y.		
S2.2	300 μM	99,72±2,97	5,74	
	100 μM	89,51±3,73		
	30 μM	88,25±1,98		
	10 μM	71,61±1,45		
	3 μM	27,67±3,20		
	1 μM	11,55±5,34		
	0,3 μM	i.y.		
	0,1 μM	i.y.		
S2.5	300 μM	94,13±3,35	8,92	
	100 μM	75,41±0,78		
	30 μM	72,39±2,88		
	10 μM	43,09±1,95		
	3 μM	33,55±4,70		
	1 μM	14,88±3,44		
	0,3 μM	9,75±2,22		
	0,1 μM	i.y.		
S3.1	100 μM	106,21±4,22	9,67	
	30 μM	59,65±3,15		
	10 μM	40,65±2,87		
	3 μM	35,86±2,64		
	1 μM	29,46±1,44		
	0,3 μM	27,09±1,95		
	0,1 μM	1,03±3,43		
	0,01 μM	i.y.		
S3.3	100 μM	84,39±4,07	2,04	
	30 μM	69,04±2,75		
	10 μM	58,33±5,28		
	3 μM	47,73±0,47		
	1 μM	42,09±0,91		
	0,3 μM	14,90±3,60		
	0,1 μM	10,37±4,85		
	0,01 μM	i.y.		
S3.4	100 μM	100,75±7,54	6,65	
	30 μM	58,15±4,41		
	10 μM	45,96±6,39		
	3 μM	39,81±4,66		
	1 μM	32,45±1,96		
	0,3 μM	20,66±3,13		
	0,1 μM	16,73±2,77		
	0,01 μM	i.y.		

^a %İnhibisyon değerleri "ortalama değer±standart sapma" olarak verilmiştir (n=3).

4.2.2. *In vitro* antiproliferatif etki

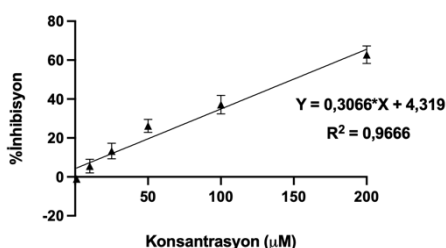
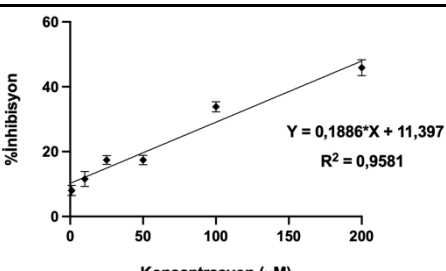
SIRT2 enzimini yüksek oranda inhibe eden bileşiklerin (**S1.12**, **S2.2**, **S2.5**, **S3.1**, **S3.3** ve **S3.4**), MCF-7 hücre hattına karşı 1-200 μM arasında değişen tarama konsantrasyonlarındaki antiproliferatif etkileri belirlenmiş, bu sayede SIRT2 inhibisyonunun meme kanseri hücrelerinin çoğalmasına olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bileşiklerden 72 saat süre sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te sunulmuştur. Test edilen bileşikler arasında en etkili türevlerin (**S2.5** ve **S3.3**) IC_{50} değerleri, lineer regresyon yöntemi ile elde edilen regresyon denkleminde hesaplanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. MCF-7 hücre hattında seçilen bileşiklere ait %hücre canlılığı değerleri

Kod	MCF-7 %Hücre canlılığı ^a (72. saat)						
	Kontrol	1 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
S1.12	100,00 $\pm$ 4,57	103,52 $\pm$ 6,99	76,95 $\pm$ 5,18	64,10 $\pm$ 2,97	59,23 $\pm$ 1,79	58,38 $\pm$ 1,64	56,75 $\pm$ 2,00
S2.2	100,01 $\pm$ 1,87	104,16 $\pm$ 0,52	98,43 $\pm$ 4,50	92,52 $\pm$ 1,35	84,40 $\pm$ 1,88	71,94 $\pm$ 2,00	71,88 $\pm$ 2,28
S2.5	100,00 $\pm$ 4,03	101,02 $\pm$ 1,58	94,49 $\pm$ 3,54	86,73 $\pm$ 4,01	73,83 $\pm$ 3,41	62,91 $\pm$ 4,76	37,24 $\pm$ 4,49
S3.1	99,90 $\pm$ 4,73	98,79 $\pm$ 1,32	99,02 $\pm$ 0,68	99,63 $\pm$ 5,46	95,94 $\pm$ 1,80	79,96 $\pm$ 3,22	60,07 $\pm$ 4,24
S3.3	100,05 $\pm$ 3,25	91,98 $\pm$ 1,58	88,43 $\pm$ 2,33	82,56 $\pm$ 1,38	82,60 $\pm$ 1,46	66,18 $\pm$ 1,57	54,15 $\pm$ 2,48
S3.4	100,05 $\pm$ 3,25	91,56 $\pm$ 3,24	84,56 $\pm$ 1,57	83,16 $\pm$ 5,64	83,53 $\pm$ 1,91	66,98 $\pm$ 7,14	63,01 $\pm$ 2,12

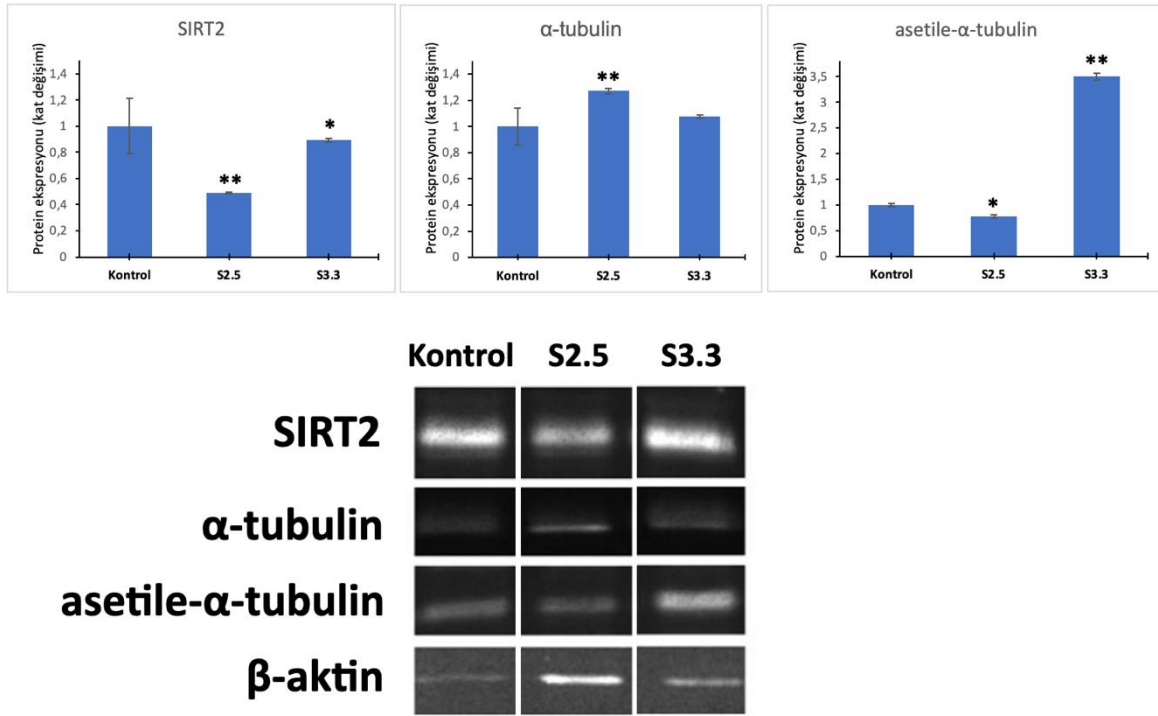
^a%Hücre canlılığı değerleri "ortalama değer $\pm$ standart sapma" olarak verilmiştir (n=4).

Çizelge 4.6. MCF-7 hücre hattında seçilen bileşiklere ait IC_{50} değerleri

Kod	IC_{50} (μM)	Doz yanıt eğrileri
S2.5	148,99	
S3.3	204,68	

4.2.3. Western blot

MCF-7 hücre hattına karşı *in vitro* antiproliferatif etkileri belirlenen SIRT2 inhibitör etkili bileşiklerin arasında en düşük IC₅₀ değerine sahip **S2.5** ve **S3.3** kodlu bileşikler Western blot analizi için seçilmiş, bileşiklerin gösterdikleri SIRT2 inhibisyon gücünün α -tubulin asetilasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Western blot analizinde, **S2.5** ve **S3.3** kodlu bileşiklerin MCF-7 hücre hattına karşı antiproliferatif etki çalışmalarında belirlenen IC₅₀ değerleri (**S2.5**: 148,99 μ M; **S3.3**: 204,68 μ M) ile 72 saat süre boyunca muamele edilen hücrelerde SIRT2 ekspresyonu, toplam α -tubulin ve asetile- α -tubulin düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, **S2.5** (*in vitro* SIRT2 IC₅₀=8,92 μ M) ve **S3.3** (*in vitro* SIRT2 IC₅₀=2,04 μ M) kodlu bileşiklerin, SIRT2 düzeyini kontrole göre anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. İzole SIRT2 enzimine karşı belirlenen etki profillerinde daha etkin bir inhibisyon gösteren **S3.3** kodlu bileşiğin MCF-7 hücrelerinde aynı oranda SIRT2 inhibisyona sahip olmaması; *in vitro* çalışmaların *in vivo* çalışmalarla her zaman paralel sonuçlar göstermediğini vurgulamaktadır [202]. SIRT2 inhibisyonu sonucu deasetilasyona uğrayamayan asetile- α -tubulin düzeyleri incelendiğinde, **S3.3** kodlu bileşiğin, sergilediği SIRT2 inhibisyonu ile paralel olmasa da asetile- α -tubulin düzeylerinde önemli ölçüde artışa sebep olduğu görülmüştür. Diğer yandan, **S2.5** kodlu bileşik MCF-7 hücrelerinde SIRT2 ekspresyonunu anlamlı bir şekilde baskılamasına rağmen, α -tubulin asetilasyonu üzerine etki göstermemiştir (Şekil 4.35).



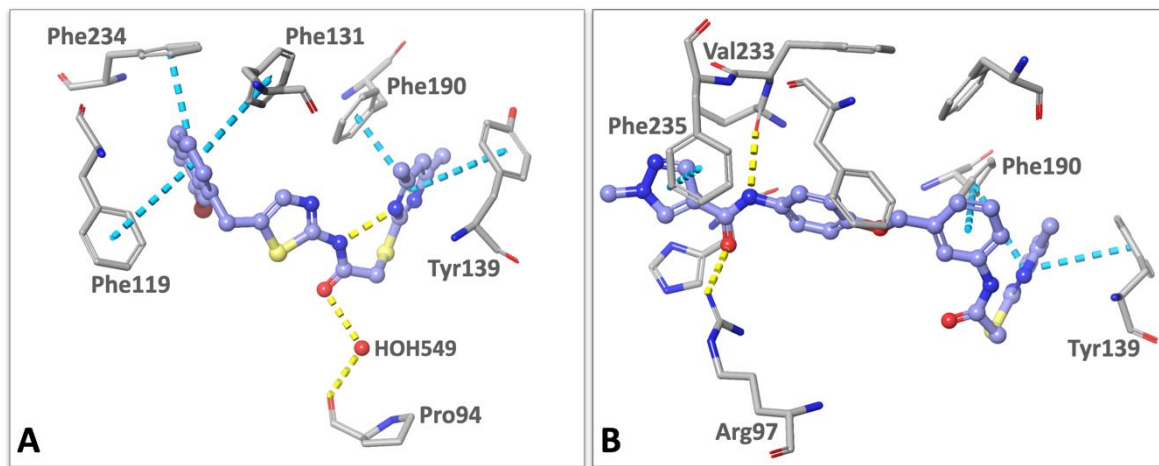
Şekil 4.35. Test edilen bileşiklere ait Western blot analizi sonuçları. Önemli farklılıklar * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ şeklinde gösterilmiştir.

4.3. Moleküler Docking

Tez kapsamında SIRT2 enzimine karşı etkisi belirlenen bileşiklerin; enzim aktif bölgesindeki bağlantı modlarının, etki için gerekli olduğu bildirilen etkileşimlerin incelenmesi amacıyla yapılan moleküler docking çalışmalarında, insan SIRT2 enzimi-selektif SIRT2 inhibitörü SirReal analogu 5GN-NAD⁺ kompleksi (PDB: 5DY4) ve insan SIRT2 enzimi-selektif SIRT2 inhibitörü L5C kompleksi (PDB: 5YQO) kullanılmıştır.

SIRT2-5GN-NAD⁺ kompleksinde (PDB: 5DY4), selektif SIRT2 inhibitörü ve SirReal analogu 5GN (*N*-[5-[(7-bromonaftalen-1-il)metil]-1,3-tiyazol-2-il]-2-[(4,6-dimetilpirimidin-2-il)sulfanil]asetamit), fenil halkası ile aktif bölge girişinde bulunan substrat kanalındaki Phe119, Phe131 ve Phe234 amino asitleri arasında π - π etkileşimleri, selektivite cebinde 4,6-dimetilpirimidin halkası ile Tyr139 ve Phe190 amino asitleri arasında π - π etkileşimleri, karbonil oksijeni ile Pro94 amino asidi arasında yapısal su HOH549 köprülülük hidrojen bağı meydana getirmektedir. Tüm bu etkileşimlerin yanı sıra, 5GN yapısında bulunan 4,6-dimetilpirimidin halkasındaki azot atomlarından biri ile amit grubu arasında kurulan

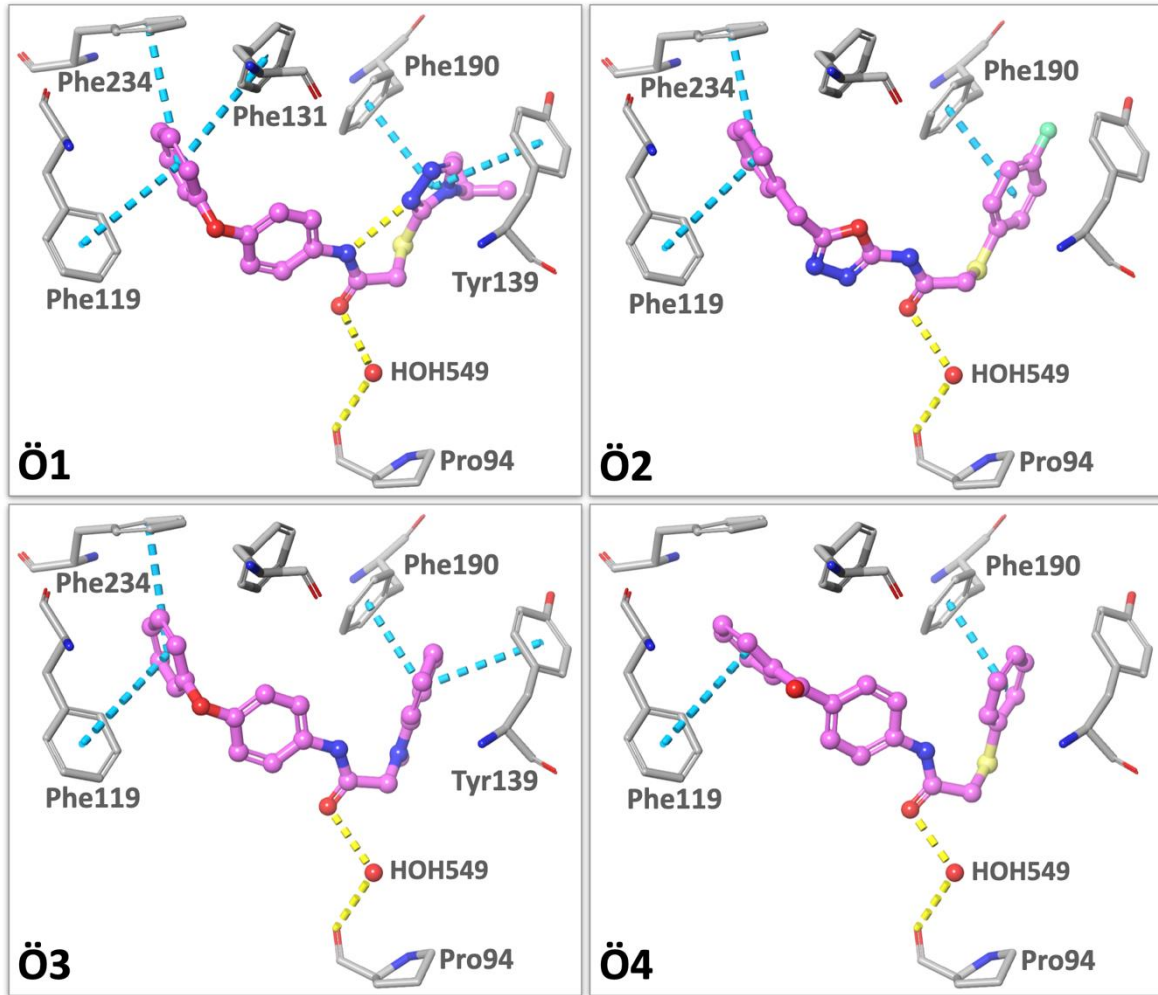
molekül içi hidrojen bağının, bileşiğin selektivite cebine daha uygun pozisyonda yerleşmesine katkı sağladığı ve bu etkileşimin güçlü SIRT2 inhibitör aktivite için kaçınılmaz olduğu vurgulanmaktadır [106]. SIRT2-L5C kompleksine göre ise selektif SIRT2 inhibitörü L5C (*N*-[4-[[3-[2-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)sulfaniletanoilamino]fenil]metoksi]fenil]-1-metil-pirazol-4-karboksamit), daha önce bahsi geçen etkileşimlere ek olarak aktif bölge girişinde yer alan Arg97 ve Val233 amino asitleriyle hidrojen bağı ve Phe235 ile π - π etkileşimleri meydana getirmektedir [120] (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (A) 5GN kodlu SirReal türevinin (PDB: 5DY4) ve (B) L5C kodlu inhibitörün (PDB: 5YQO) meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

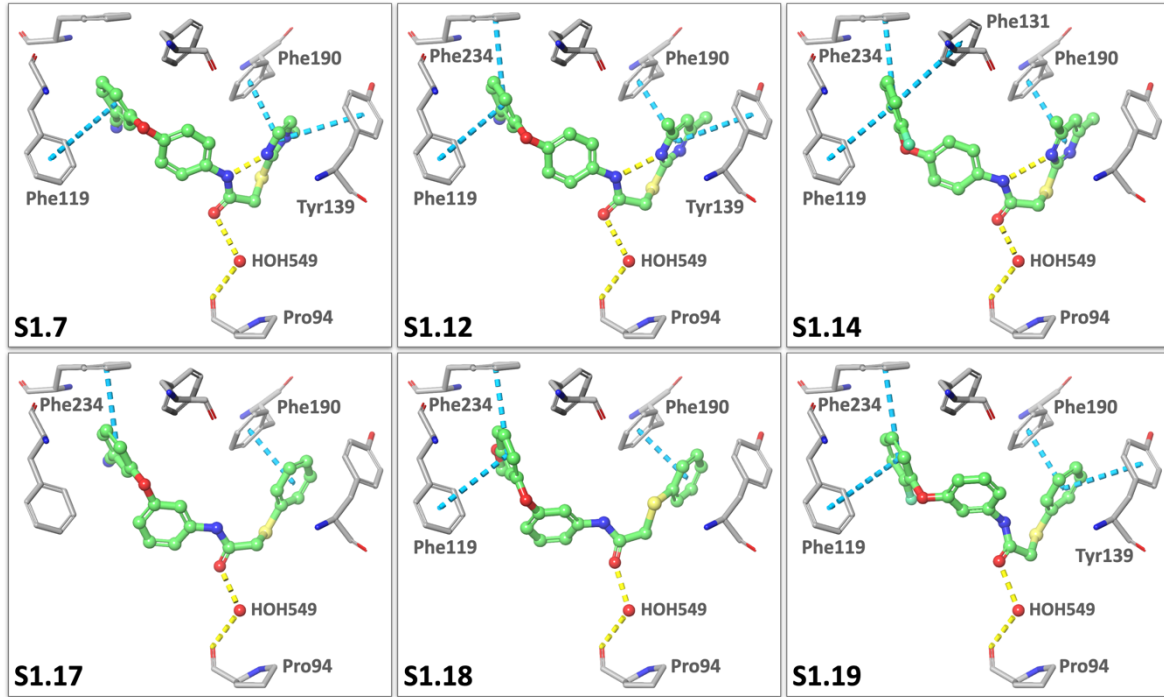
Öncü bileşikler ile gerçekleştirilen moleküler docking çalışmalarına göre, aktif bölge girişinde substrat bağlanma kanalına doğru yönelerek **Ö1**'in merkez halkaya oksijen köprüsü ile bağlanan fenil halkasının Phe131, Phe119 ve Phe234 amino asitleriyle, 4-izopropil-1,2,4-triazol halkası ile selektivite cebinde Phe190 ve Tyr139 amino asitleriyle π - π etkileşimleri kurduğu, amit yapısının karbonil oksijeni ile de Pro94 ile inhibitör etki için önemi vurgulanan yapısal su molekülü (HOH549) aracılı hidrojen bağı oluşturduğu görülmüştür. **Ö2**'nin ise aktif bölgede **Ö1**'e benzer bir pozisyon alarak yerleşerek merkez halkaya komşu fenil halkası üzerinden substrat bağlanma bölgesinde Phe119 ve Phe234 amino asitleriyle, selektivite cebinde ise *p*-florofenil halkasıyla sadece Phe190 ile π - π etkileşimleri meydana getirdiği, Pro94 ile de HOH549 köprüsü hidrojen bağı üzerinden etkileştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.37).

İkinci seri bileşiklerin tasarımı için çıkış noktası oluşturan **Ö3** ve **Ö4** kodlu bileşiklerin SIRT2 aktif bölgesinde meydana getirdikleri etkileşimler incelendiğinde, aktif bölgenin substrat bağlanma kanalında yer alan önemli üç aromatik amino asitten Phe119 ve Phe234 ile **Ö3** yapısındaki uç fenil halkası π - π etkileşimleri üzerinden bağlantı kurarken; **Ö4** bileşiği sadece Phe119 ile etkileşime girmiştir. Selektivite cebinde ise, etkileşim kurulması beklenen amino asitlerden Tyr139 ve Phe190 ile **Ö3** yapısındaki *N*-metil grubuna komşu fenil halkası π - π etkileşimleri oluştururken, **Ö4** yapısında kükürt atomuna komşu fenil halkası beklenen bağlantılardan sadece Phe190 ile π - π etkileşimi meydana getirmiştir. Her iki bileşik, Pro94 ile su köprülü hidrojen bağı üzerinden etkileşmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5DY4) öncü bileşiklerin meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

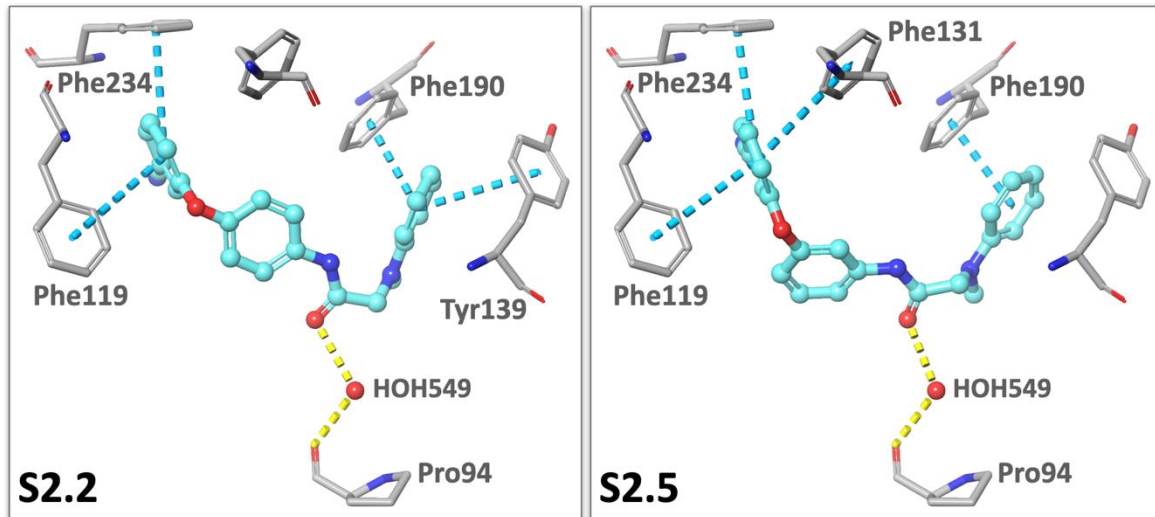
Tez çalışması kapsamında SIRT2 enzimine karşı %40 inhibisyon oranının üzerinde etki gösteren bileşiklerin SIRT2 aktif bölgesinde beklenen etkileşimleri hangi düzeyde gerçekleştirdiği incelenmiştir. Birinci seri bileşiklerinden **S1.7**, **S1.12**, **S1.14**, **S1.17**, **S1.18** ve **S1.19** kodlu bileşikler ile moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlara göre seçilen bileşiklerin öncü bileşiklerle benzer şekilde aktif bölgeye yerleştikleri, taşımış oldukları sübstitüe uç fenil halkasıyla beklenildiği şekilde substrat bağlanma bölgesine yönlendikleri ve bu bölgede yer alan amino asitlerden Phe131, Phe119 ve Phe234 ile π - π etkileşimleri kurdukları belirlenmiştir. Bileşiklerden sadece **S1.14**'ün bu bölgedeki tüm amino asitlerle gerekli etkileşimleri sağladığı; **S1.12**, **S1.18** ve **S1.19**'un Phe119 ve Phe234 ile, **S1.7**'nin sadece Phe119 ile, **S1.17**'nin ise sadece Phe234 ile π - π etkileşimleri kurduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin sahip oldukları kükürt atomuna bağlı farklı aromatik halkalarla hidrofobik özellikteki amino asitlerden oluşan selektive cebine öncü bileşiklere benzer şekilde yerleştikleri, burada **S1.7**, **S1.12** ve **S1.19**'un hem Phe190 hem de Tyr139 ile; **S1.14**, **S1.17** ve **S1.18**'in ise sadece Phe190 ile π - π etkileşimleri üzerinden bağlantı kurdukları belirlenmiştir. Bileşikler **S1.7**, **S1.12** ve **S1.14**'ün taşımış oldukları kükürt atomuna bağlı heterosiklik halkalardaki azot atomları ile amit grubu arasında SIRT2 x-ray yapısındaki koliganta benzer şekilde molekül içi hidrojen bağının meydana geldiği tespit edilmiş böylece bu bileşiklerin daha stabil bir konformasyonda aktif bölgeye yerleştiği ve bu durumun sergiledikleri güçlü SIRT2 inhibitör etkiye katkı sağladığı düşünülmüştür. Ayrıca, seriye ait tüm bileşiklerin amit karbonilleri ile önemi vurgulanan Pro94 arasında yapısal su molekülü (HOH549) aracılı hidrojen bağı olduğu görülmüştür (Şekil 4.38). Bileşiklerin SIRT2 ile meydana getirdikleri komplekslerin enerji bakımından stabil olduğu, ilgili bileşikler için hesaplanan ve -11,93 ile -9,98 kkal/mol arasında değişiklik gösteren bağlanma enerjileri ile görülmüştür.



Şekil 4.38. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5DY4) seçilen birinci seri bileşiklerin meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

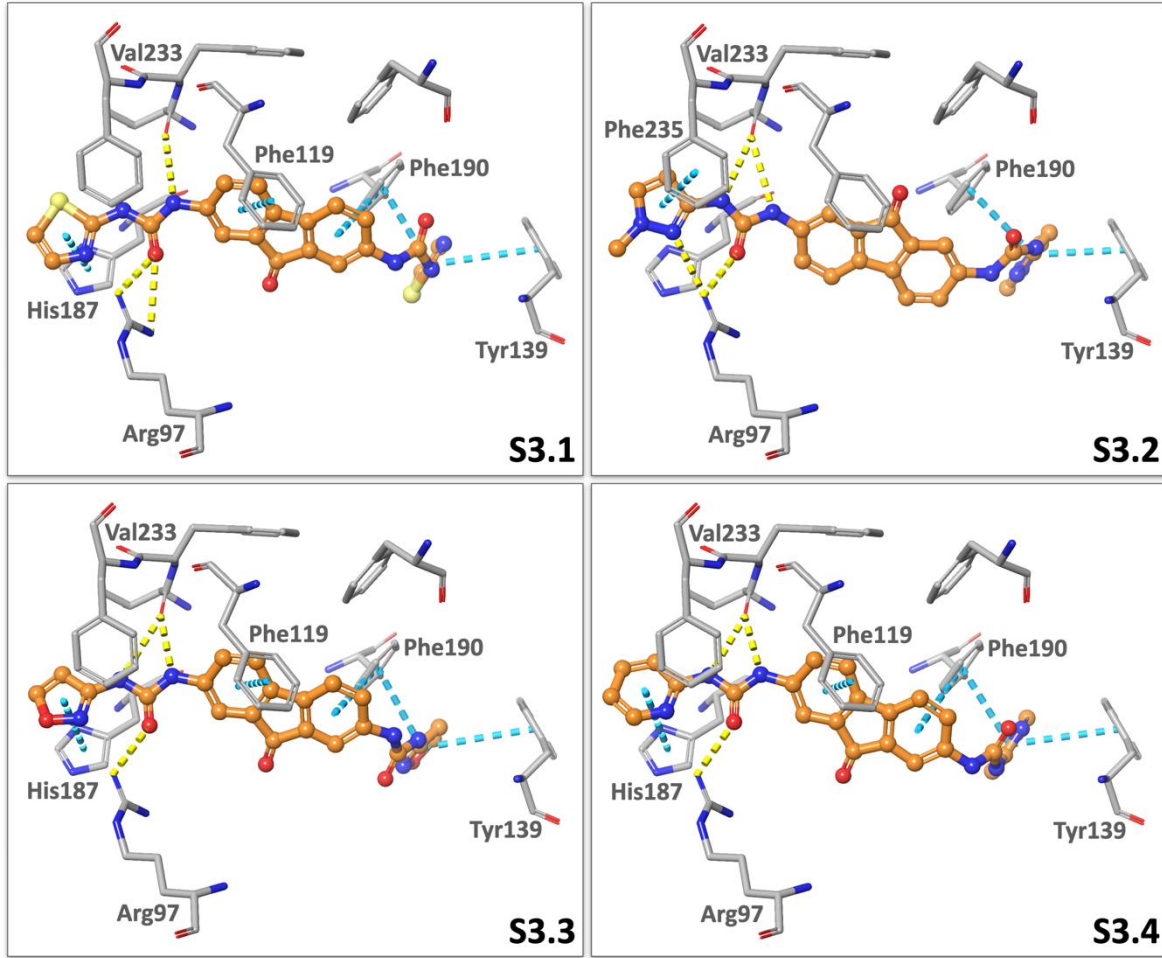
Tasarlandıkları **Ö3** ve **Ö4** kodlu öncü bileşiklerle karşılaştırıldığında, ikinci seri bileşiklerin daha etkin SIRT2 inhibisyonu yaptığı sonucuna ulaşılmış, bu seride moleküler docking için seçilen bileşiklerin (**S2.2** ve **S2.5**) SIRT2 aktif bölgesinde meydana getirdiği etkileşimler bileşiklerin inhibitör etkileri ile ilişkili bulunmuştur. Bileşik **S2.2**'nin 3-siyanofenil halkası ile substrat bağlanma bölgesinde Phe119 ve Phe234 arasında π - π etkileşimleri gözlenirken, **S2.5** kodlu bileşiğin 3-siyanofenil halkasıyla aynı bölgede **S2.2**'nin göstermiş olduğu etkileşimlere ek olarak Phe131 ile de π - π etkileşimi kurduğu belirlenmiştir. Selektivite cebinde ise **S2.2**'nin metilamine bağlı fenil halkasıyla hem Tyr139 ve hem de Phe190 π - π etkileşimleri üzerinden bağlantı kurduğu belirlenirken, **S2.5**'nin metilamine bağlı fenil halkasıyla bu bölgede yalnızca Phe190 amino asidiyle π - π etkileşimi meydana getirdiği gözlenmiştir. Her iki bileşiğin amit grubunda yer alan karbonil oksijenleri ile Pro94 ile su (HOH549) köprülülük hidrojen bağı oluşmuştur (Şekil 4.39). Bağlanma enerjileri **S2.5** için -11,61 kkal/mol ve **S2.2** için -11,59 kkal/mol olarak hesaplanmış, moleküler docking sonrası oluşan enzim-ligant komplekslerinin enerji bakımından oldukça stabil olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bağlantı modlarından yola çıkarak bileşiklerin önemi vurgulanan etkileşimlerin büyük çoğunluğunu gerçekleştirmiş olmaları, çıkış noktalarını oluşturan hem birinci seri

bileşiklere hem de öncü bileşiklere göre iyileştirilmiş SIRT2 inhibitör aktivite sonuçlarını destekler nitelikte olmuştur.



Şekil 4.39. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5DY4) seçilen ikinci seri bileşiklerin meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

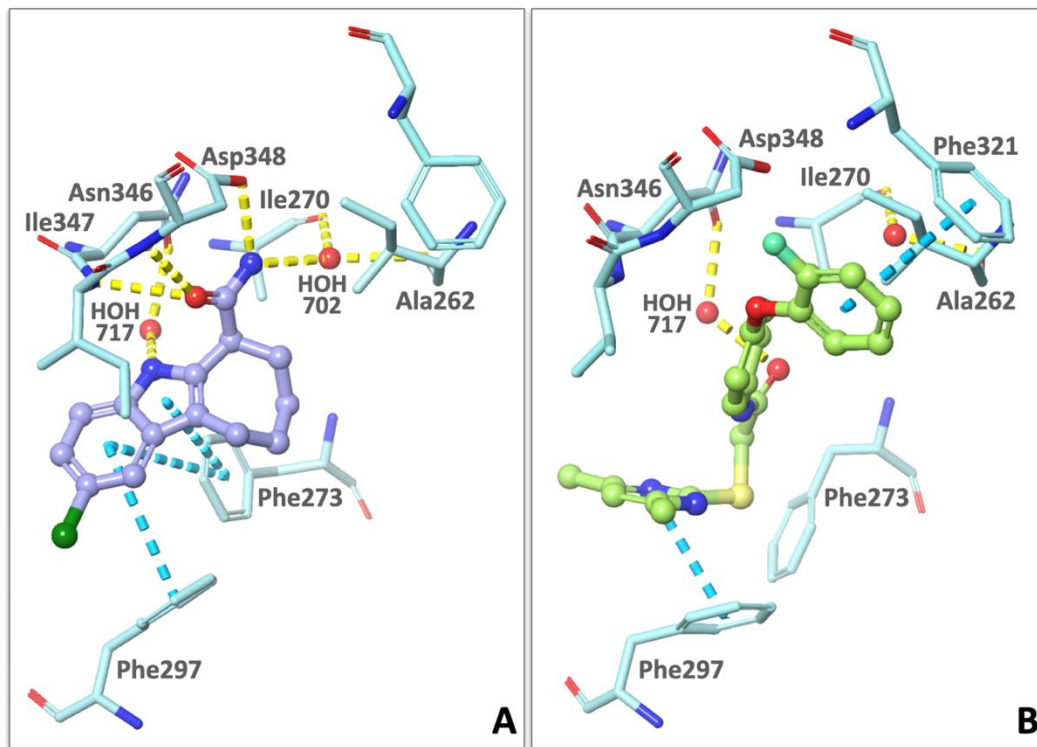
Yapısal olarak birinci ve ikinci seri bileşiklerinden farklılık gösteren ve tasarım stratejisinin doğrulunu destekler nitelikte SIRT2 inhibitör etki sergileyen üçüncü seri bileşiklerinin (**S3.1-S3.4**) SIRT2 aktif bölgesi ile olan etkileşimleri incelendiğinde, dört bileşiğin de sahip olduğu ortak 9H-fluoren-9-on merkezi halkasıyla ilgili SIRT2 x-ray yapısındaki L5C kodlu inhibitöre (Şekil 4.36) benzer şekilde substrat bağlanma bölgesine yerleştikleri; **S3.1**, **S3.3** ve **S3.4**'ün bu bölgede Phe119 ile π - π etkileşimleri kurdukları, ayrıca bu halka sistemleriyle selektivite cebinde yer alan Phe190 ile π - π etkileşimi kurarak aktif bölgedeki bağlantılarını stabilize ettikleri tespit edilmiştir. Tüm bileşiklerin yan zincirlerinde yer alan heterosiklik halkalarla selektivite cebindeki Tyr139 ve Phe190 amino asitleriyle π - π etkileşimleri gerçekleştirdikleri; üre köprüsü ile de Arg97 ve Val233 arasında beklenen hidrojen bağı etkileşimlerini kurdukları görülmüştür. Tüm bu etkileşimlerin yanında **S2.2**'nin aktif bölge girişinde yer alan Phe235 ile; **S3.1**, **S3.3** ve **S3.4**'ün de His187 ile π - π etkileşimleri meydana getirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.40). Bileşiklerin SIRT2 aktif bölgesine yerleştirildiklerinde oluşan enzim-ligant komplekslerinin enerji bakımından oldukça stabil olduğu, hesaplanan bağlanma enerjilerinin -14,33 ile -12,90 kkal/mol arasında değişiklik gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.40. İnsan SIRT2 aktif bölgesinde (PDB: 5YQO) üçüncü seri bileşiklerin meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Selektivite çalışması kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* SIRT1 etki belirleme çalışmaları sonucu, SIRT2 inhibitör etkinin yanında SIRT1 enzimini %42 oranında inhibe eden birinci seri bileşiklerden **S1.14**'ün SIRT1 enziminin aktif bölgesindeki bağlantı modunu belirlemek üzere insan SIRT1 enzimi-EX-527 analogu kompleksi (PDB: 4I5I) kullanılmıştır. İlgili kompleks yapısı incelendiğinde koligandın, hidrofobik amino asitlerden meydana gelen cebi Phe273 ve Phe297 ile π - π etkileşimleri kurarak işgal ettiği, ayrıca Ala262, Ile270 ve Asn346 amino asitleri ile yapısal su molekülleri (HOH702 ve HOH717) aracılı hidrojen bağı ağı meydana getirdiği bildirilmektedir [185]. Bileşik **S1.14** ve SIRT1 ile gerçekleştirilen moleküler docking çalışmasına göre; bileşiğin sadece 4,6-dimetilpirimidin halkasıyla Phe297 ile π - π etkileşimi, Asn346 ile yapısal su molekülü (HOH717) aracılı hidrojen bağı kurduğu tespit edilmiştir. Bunların dışında x-ray kristal yapısında görülmeyen bir etkileşim olarak bileşiğin florofenil halkası ile Phe321 arasında π - π etkileşimi gözlenmiştir (Şekil 4.41). Bağlanma enerjisi -10,01

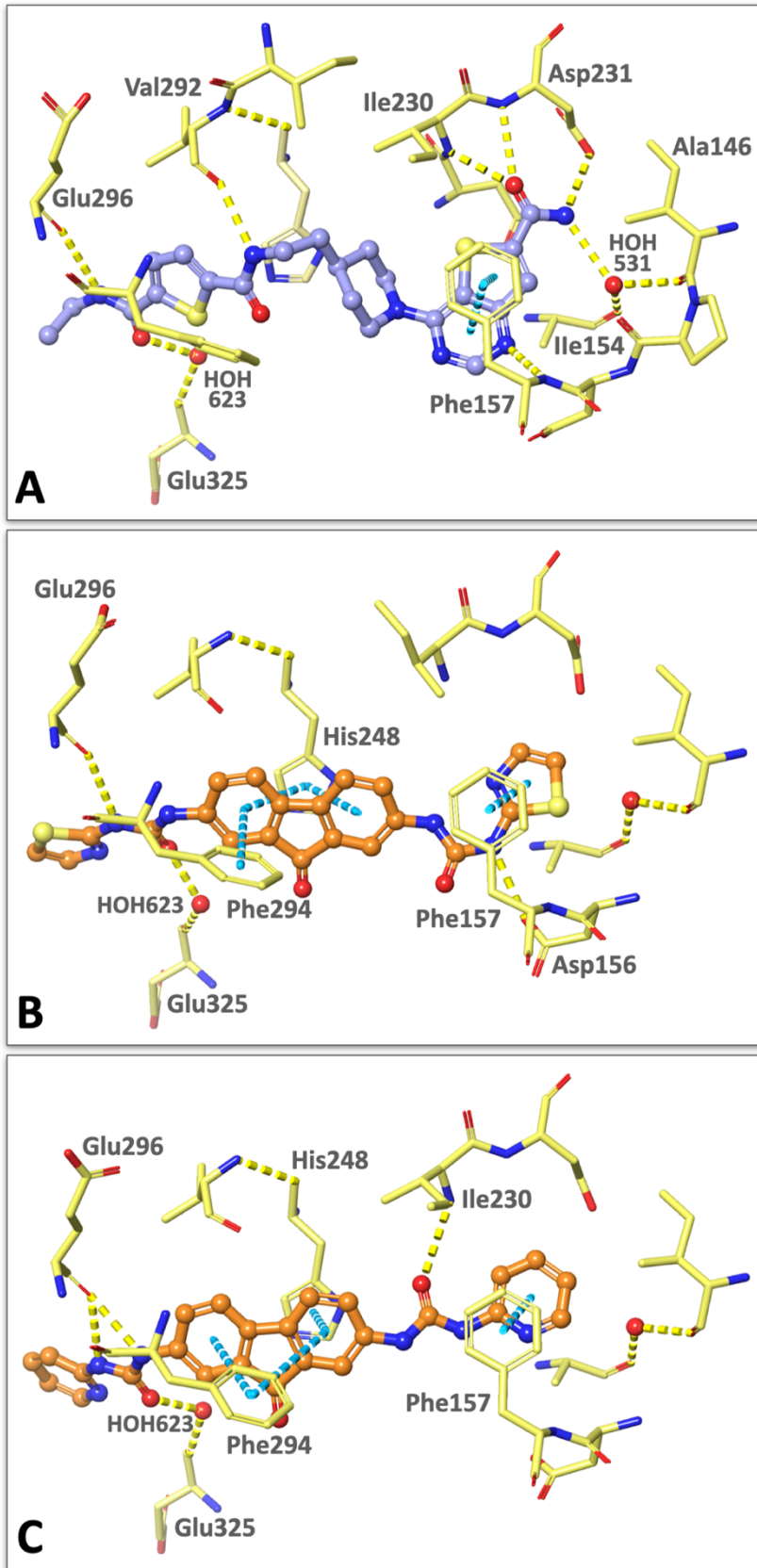
kkal/mol olarak hesaplanmıştır. Moleküler docking çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre koligantla karşılaştırıldığında **S1.14**'ün aktif bölgede inhibitör etki için önem arz eden etkileşimleri daha az göstermesi bileşiğe ait orta düzeydeki SIRT1 inhibitör profilini açıklar nitelikte bulunmuştur.



Şekil 4.41. İnsan SIRT1 aktif bölgesinde (PDB: 4I5I) (A) EX-527 analogunun ve (B) **S1.14**'ün meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Selektivite çalışması kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* SIRT3 etki belirleme çalışmaları sonucu, SIRT2 inhibitör etkinin yanında SIRT3 enzimini sırasıyla %45 ve %43 oranında inhibe eden üçüncü seri bileşiklerden **S3.1** ve **S3.4**'ün SIRT3 enziminin aktif bölgesindeki bağlantı modlarını belirlemek üzere insan SIRT3 enzimi-ELT inhibitörü 1NQ kompleksi (PDB: 4JSR) kullanılmıştır. İlgili kompleks yapısına göre inhibitör bileşik 1NQ, tiyeno[3,2-*d*]pirimidin halkasıyla Phe157 ile π - π etkileşimleri, aynı halkanın birinci konumdaki azot atomuyla Phe157 yan zinciri arasında hidrojen bağı, altıncı konumunda yer alan karboksamit karboniliyle Ile230 ve Asp231 yan zincirleri arasında hidrojen bağları, yine karboksamit kalıntısına ait NH grubu ile Asp231 (doğrudan), Ala146 (HOH531-köprülülü) ve Ile154 (HOH531-köprülülü) yan zinciri arasında hidrojen bağları bulunmaktadır. Bunun yanında,

1NQ yapısındaki tiyofen halkasına bağlı etil amit kalıntısının NH grubu Glu296 (doğrudan) ile, karbonil grubu ise Glu325 (HOH632-köprülü) ile hidrojen bağları üzerinden etkileştiği görülmektedir [163]. Üçüncü seri bileşiklerinden **S3.1** ve **S3.4** ile gerçekleştirilen moleküler docking çalışmasına göre; her iki bileşiğin de koliganda benzer şekilde SIRT3 aktif bölgesinde konumlandığı, üre köprüsünün Glu296 (doğrudan) ve Glu325 (HOH632-köprülü) amino asitleriyle hidrojen bağları, üre köprüsüne bağlı heterosiklik halkaların Phe157 ile π - π etkileşimleri meydana getirdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.42). Bağlanma enerjileri, **S3.1** için -9,34 kkal/mol ve **S3.4** için -10,78 kkal/mol olarak hesaplanmıştır. Moleküler docking çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre her iki bileşiğin de aktif bölgede gerekli bazı etkileşimleri göstermeleri SIRT3 inhibisyon aktivitelerini açıklarken, koligantla karşılaştırıldığında daha az etkileşim göstermeleri bileşiklerin göstermiş olduğu orta düzeydeki SIRT3 inhibisyon değerlerini açıklar nitelikte bulunmuştur.

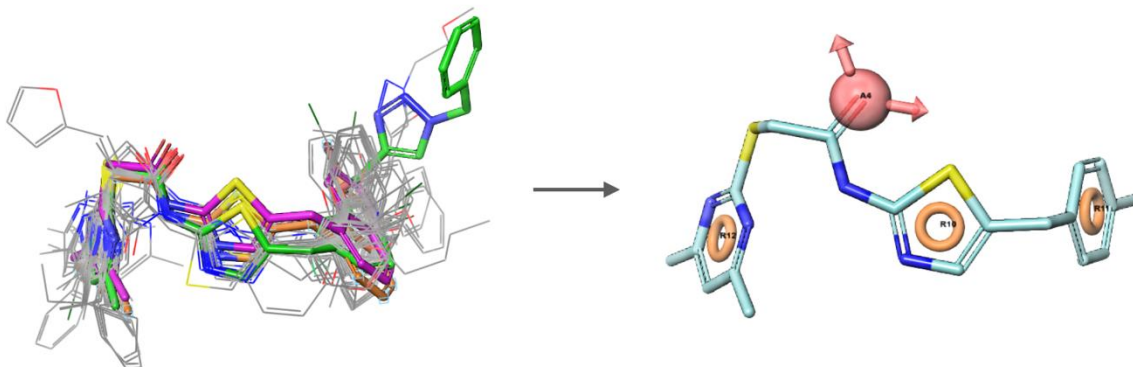


Şekil 4.42. İnsan SIRT3 aktif bölgesinde (PDB: 4JSR) (A) 1NQ kodlu inhibitörün, (B) **S3.1**'in ve (C) **S3.4**'ün meydana getirdiği etkileşimler. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.



5. TARTIŞMA

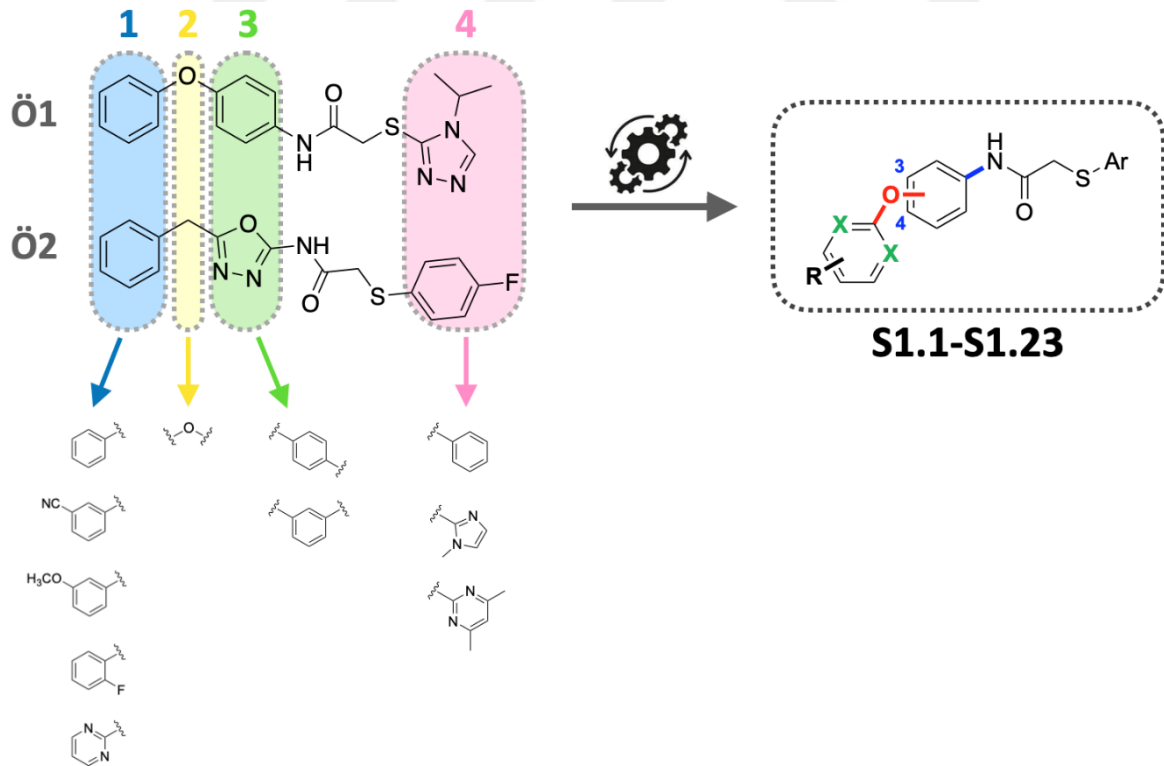
Yeni, potent ve selektif SIRT2 inhibitörü geliştirmek amacıyla başlattığımız çalışmalarımızda, ilk olarak selektif SIRT2 inhibitörü SirReal2 ve analoglarından oluşan aminotiyazol yapısındaki bir seri bileşikten ve SIRT2 enziminin aktif bölge özelliklerinden yola çıkarak hidrojen bağı akseptörü (A) ve aromatik halka (R) özelliği taşıyan dört üyeden (A4, R10, R11, R12) oluşan bir farmakofor model geliştirilmiştir (Şekil 5.1). Bu farmakofor model kullanılarak ZINC veri tabanında sanal tarama protokolü uygulanmış, tarama çıktısı olarak belirlenen bileşiklerin *in vitro* SIRT1, SIRT2, SIRT3 ve SIRT5 aktiviteleri incelenmiştir [20]. Test edilen SIRT izoformlarına karşı inhibitör etkileri belirlenen bileşikler arasında asetamit yapısı taşıyan **Ö1** ve **Ö2** kodlu iki bileşik tez kapsamında tasarlanan bileşikler için öncü bileşik olarak seçilmiştir.



Şekil 5.1. Selektif SIRT2 inhibitörleri için geliştirilen farmakofor model (ARRR)

Tez çalışmamızın çıkış noktasını oluşturan **Ö1** ve **Ö2** öncü bileşiklerin selektif SIRT2 inhibitör potansiyelini geliştirmek amacıyla, bileşiklerin taşıdıkları ortak yapı iskeleti bozulmadan özellikle substrat bağlanma kanalı ve selektivite cebiyle daha güçlü etkileşimlere olanak verecek yeni fragmanların bulunmasına odaklanılarak bir “öncü bileşik optimizasyonu” çalışması gerçekleştirilmiştir. Öncü bileşiklerin i) aktif bölge girişinde konumlanan fenil halkaları farklı olarak elektron çekici veya elektron salıcı gruplarla farklı pozisyonlarda süstitüe edilmiş veya fizikokimyasal parametreler açısından pirimidin halkası ile yer değiştirilmiş; ii) diaril yapısında yer alan oksijen ve karbon köprüsü oksijen olarak tek tip köprüye çevrilmiş; iii) merkez halka olarak adlandırılan fenil ve oksadiazol halkalarından

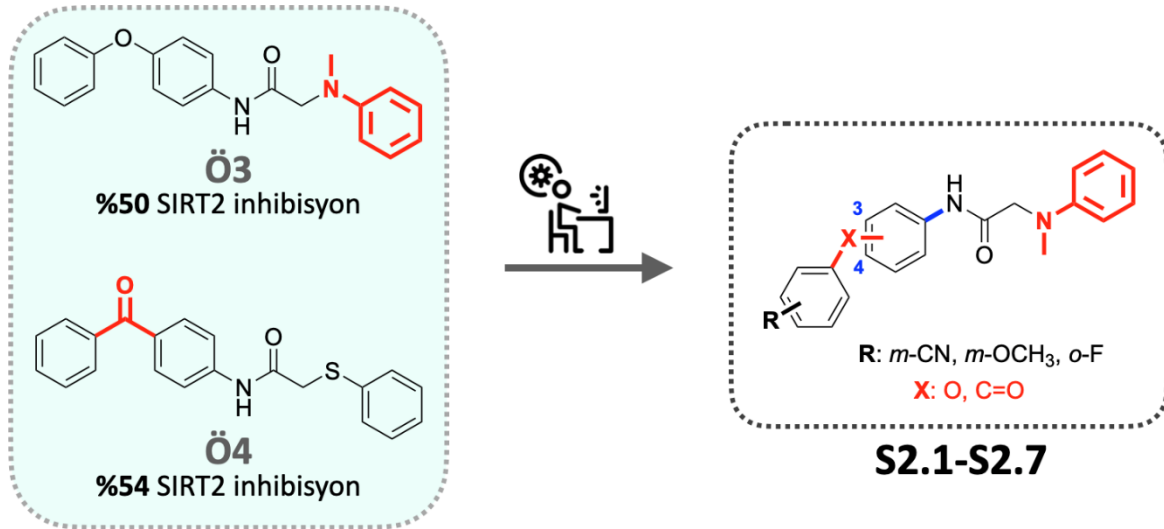
fenil halkasıyla devam edilerek **Ö1** yapısındaki *p*-disübstitüe düzenine *m*-disübstitüe düzeni de eklenmiş; iv) selektivite cebinde etkileşimleri sağlayan uç halkalar yerine ise fenil, 1-metil-1*H*-imidazol ve SirReal analoglarının yapısında bulunup selektivite cebi için uygunluğu vurgulanan 4,6-dimetilpirimidin halkaları getirilmiştir (Şekil 5.2). Öncü bileşik yapılarında belirlenen bölgelerde moleküler docking çalışmaları yardımıyla yapılan bu değişiklikler sonucu tez çalışmamızın ilk serisi olarak *N*-ariloksiaril-2-(ariltiyo)asetamit genel yapısında on beşi yeni toplamda yirmi üç adet bileşik (**S1.1-S1.23**) tasarlanmış, sentez ve yapı aydınlatma çalışmalarını takiben *in vitro* SIRT2 inhibitör etkileri belirlenmiştir. Tasarlanan bileşikler içerisinde yer alan **S1.11**, Yang ve arkadaşları tarafından 2-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)tiyo)-*N*-fenilasetamit türevi bileşiklerin SIRT2 enzimine karşı olan yapı-etki ilişkilerini araştırmak üzere tasarlanmış bir bileşik olup SIRT2 enzimini 50 μ M konsantrasyonda %78 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir [109]. Bu bileşiğin bizim tasarlamış olduğumuz bileşikler içerisinde yer almasının sebebi tasarım stratejisinin seri içerisindeki devamlılığını sağlayıp daha sağlam bir yapı-etki ilişkisi ortaya koymak olmuştur.



Şekil 5.2. Öncü bileşiklerden hareketle ulaşılan *N*-ariloksiaril-2-(ariltiyo)asetamit türevi bileşiklerin tasarımı

Birinci basamak optimizasyon çalışmaları sonucu ulaşılan bileşiklerle SIRT2 inhibisyon potansiyelinde öncü bileşiklere göre iyileşmeler görülmüştür. Öncü bileşiklerin SIRT2 aktif bölgesi girişine yönelen fenil halkalarının sübstitüe edilmesinin bu iyileşmeye büyük oranda katkı sağladığı düşünülmektedir. Özellikle *m*-siyano sübstitüenti taşıyan türevlerde belirgin bir SIRT2 inhibitör etki gözlenmiştir. Selektivite cebine yönelen aromatik halkaların çeşitlendirilmesiyle elde edilen sonuçlar; 4,6-dimetilpirimidin kalıntısının ilgili bölgeye en uygun fragman olduğunu tekrar vurgulamıştır. Bu konumda fenil ve 1-metil-1*H*-imidazol halkalarına sahip türevlerin (*m*-siyano sübstitüenti taşıyan **S1.7** kodlu bileşik hariç) öncü bileşiklerle karşılaştırıldığında inhibisyon oranlarında değişim gözlenmemişken; 4,6-dimetilpirimidin halkasına sahip türevlerde genel bir artış görülmüş, özellikle *m*-siyano sübstitüenti taşıyan (**S1.12**) türevin SIRT2 aktivitesini %68,33 oranında inhibe ettiği tespit edilmiş, seri içerisinde en etkili inhibitör bileşik olarak belirlenmiştir. Öncü bileşiklerde merkez halkanın sahip olduğu *p*-disübstitüe düzeni (**S1.1-S1.5**) *m*-disübstitüe düzene çevrildiğinde (**S1.16-S1.20**) ise yine inhibisyon oranlarının %50'lere çıktığı gözlenmiştir.

Öncü bileşiklere göre *N*-ariloksiril-2-(ariltiyo)asetamit türevi bileşiklerde SIRT2 inhibitör aktivitenin iyileştiği görülmüş olsa da daha etkili SIRT2 inhibitörlere ulaşmak adına yeni türevler tasarlanmıştır. Yeni türevlerde, Şekil 5.2'de (1) ile gösterilen bölgede, SIRT2 inhibitör aktiviteye katkısı göz önüne alınarak sübstitüe fenil halkası korunmuş, merkez halkada ağırlıklı olarak *m*-disübstitüe düzeni uygulanmıştır. Bunun yanında, araştırma grubumuz tarafından elde edilen ve yapısal farklılık olarak asetamit yapısına bağlı kükürt atomu yerine *N*-metilamin taşıyan **Ö3** (SIRT2 %50,07 inhibisyon) ve **Ö4** (SIRT2 %54,03 inhibisyon) kodlu bileşiklerden yola çıkarak, selektivite cebine yerleşen halkalar arasından fenil halkası ile devam edilerek, bağlantısında *N*-metilamin grubu ve merkez halka ile sübstitüe fenil halkasını birbirine bağlayan oksijen atomu yerine karbonil grubu kullanılmıştır. Uygulanan bu yaklaşımlarla *N*-ariloksiril-2-(metil(fenil)amino)asetamit, *N*-benzoilaril-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve *N*-benzoilaril-2-(ariltiyo)asetamit genel yapılarını taşıyan beşi yeni toplamda yedi bileşiğe (**S2.1-S2.7**) ulaşılmış (Şekil 5.3), sentez ve yapı aydınlatma çalışmalarını takiben *in vitro* SIRT2 inhibitör etkileri belirlenmiştir.



Şekil 5.3. *N*-ariloksiaril-2-(metil(fenil)amino)asetamit, *N*-benzoilaril-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve *N*-benzoilaril-2-(ariltiyo)asetamit genel yapılarını taşıyan bileşiklerin tasarımı

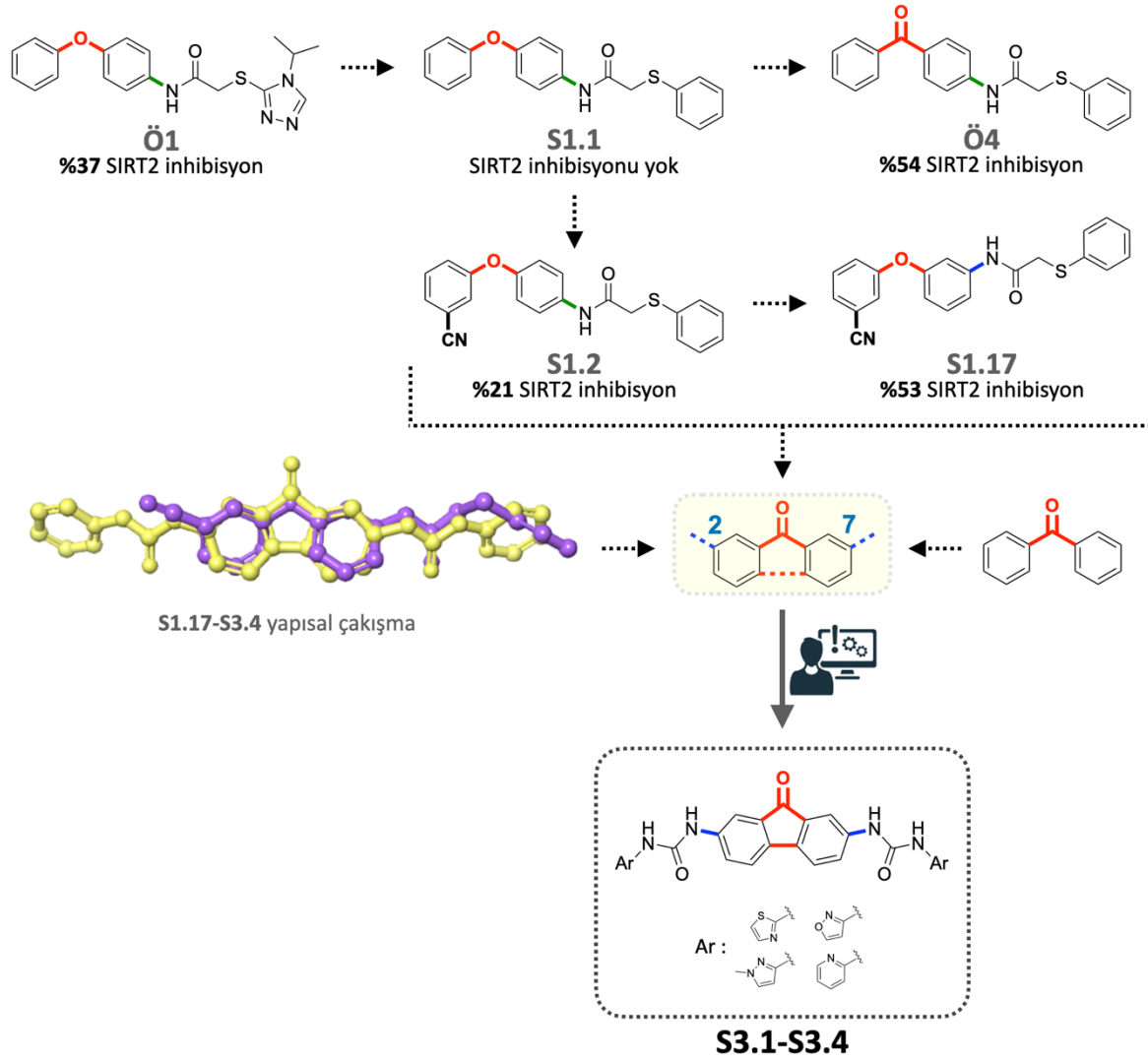
Bu türevler içerisinde yine *m*-siyano sübstitüenti taşıyanların (**S2.2** ve **S2.5**) en iyi SIRT2 inhibisyon oranına sahip olduğu gözlenmiştir. **S1.2** (%21,34) – **S2.2** (%89,51) ve **S1.17** (%52,61) – **S2.5** (%75,41) analogları karşılaştırıldığında kükürt atomu ile *N*-metilamin değişiminin aktivite üzerine olumlu etkileri görülmüştür. *N*-metilamin taşıyan türevler arasında merkez halka düzeninin *p*-disübstitüeden *m*-disübstitüe düzene çevrilmesi SIRT2 inhibitör aktivitede beklenildiği kadar etki yaratmamıştır. Seri içerisinde oksijen köprüsü yerine karbonil grubu taşıyan türevlerin (**S2.1** ve **S2.4**) sonuçları incelendiğinde, hem **S2.1** kodlu bileşiğin hem de **S1.6** kodlu oksijen eşleniğinin SIRT2 enzime karşı etkisiz olduğu görülmüştür. **S2.4** kodlu bileşik için ise gösterdiği %36,14 oranındaki SIRT2 inhibisyonunun karbonil grubu sebebiyle mi *N*-metilamin kaynaklı mı olduğu ortaya koyulamamıştır. Sonuç olarak seri içerisinde, *N*-ariloksiaril-2-(ariltiyo)asetamit türevi bileşiklerden daha etkili iki bileşiğe (**S2.2**: %89,51 ve **S2.5**: %75,41) ulaşılmıştır.

Selektif SIRT2 inhibitörlerinin geliştirilmesi üzerine devam eden çalışmalar sonucu, Yang ve arkadaşları yeni aydınlattıkları insan SIRT2-inhibitör kompleksine (PDB: 5YQO) göre, SIRT2 inhibisyonu için daha önce bildirilen gerekli etkileşimlere ek olarak aktif bölge girişinde yer alan Phe235 amino asidi ile kurulan π - π etkileşiminin, Arg97 ve Val233 ile kurulan hidrojen bağı etkileşiminin önemini vurgulamışlardır [21]. Yang ve arkadaşlarının belirttiği yeni etkileşimler dikkate alınarak, mevcut inhibitör yapılarının boyut açısından olarak

veremeyeceği düşüncesiyle, SIRT2 aktif bölgesinin girişine ve hatta enzim yüzeyine ulaşabilen daha uzun bileşiklerin tasarlanması düşünülmüştür. Bu amaçla, elde edilen bileşikler içerisinde en iyi etki gösterenler moleküler docking çalışması ile SIRT2 aktif bölgesine yerleştirilmiş, etkileşim kurulması adına hedeflenen selektivite cebi ve substrat bağlanma bölgesine en uygun fragmanlar ve bu fragmanların doğru şekilde yönlendirilmesini sağlayan yapı iskeleti araştırılmıştır. Sonuç olarak, bileşiğin diğer grupları için doğru konformasyonu sağlayan merkez halka için birbirine karbonil köprüsüyle bağlı diaril yapısından esinlenerek, daha rijit bir yapıya sahip 9*H*-florene-9-on halka sistemi seçilmiştir. Bu halka sistemi üzerinde yapılacak süstitüsyon konumları, birinci ve ikinci seri bileşiklerde daha iyi SIRT2 inhibisyonu yaptığı tespit edilen *m*-disüstitüe düzeninin moleküler docking çalışması ile hizalanması sonucu 2. ve 7. konumlar olarak belirlenmiştir. Bileşiklerin bu konumlardaki yan zincirlere moleküler docking sonuçlarına göre Arg97 ve Val233 ile hidrojen bağı etkileşimlerine olanak veren üre grubunun köprü olarak eklenmesine karar verilmiştir. Üre köprüsü aynı zamanda SIRT2 inhibisyonu için önemli olduğu bildirilen kristal su molekülü (HOH549) üzerinden Pro94 ile hidrojen bağı etkileşimini de sağlamıştır [106]. Üre köprüsüne farklı aromatik halkalar bağlanarak, bu halkalar üzerinden hem selektivite cebinde Phe190 ve Tyr139 ile olan π - π etkileşimleri hem de aktif bölge girişinde Phe235 ile olan π - π etkileşimleri hedeflenmiştir. Merkez halka sistemi 2. ve 7. konumlardan aynı yan zincirlerle süstitüe edilerek bileşiğe simetrik bir özellik kazandırılmıştır. Bu yaklaşım, hem sentezlenebilirlik açısından kolaylık sağlamış, hem de yan zincirlerdeki uç aromatik halkaların aktif bölgede yönelimleri sırasında selektivite cebi ve substrat bağlanma bölgesi arasındaki tercihi ortadan kaldırmıştır. Üre köprüsüyle merkez halka sistemine bağlı aromatik halkaların seçiminde moleküler docking sonuçları kullanılmış, hedeflenen bölgelerde istenilen π - π etkileşimleri sağlayan tiyazol, 1-metil-1*H*-pirazol, izoksazol ve piridin halkaları seçilmiştir. Sonuç olarak 1,1'-(9-okso-9*H*-florene-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) yapısında dört yeni sonuç bileşik (**S3.1-S3.4**) tasarlanmış (Şekil 5.4), sentez ve yapı aydınlatma çalışmalarını takiben *in vitro* SIRT2 inhibitör etkileri belirlenmiştir.

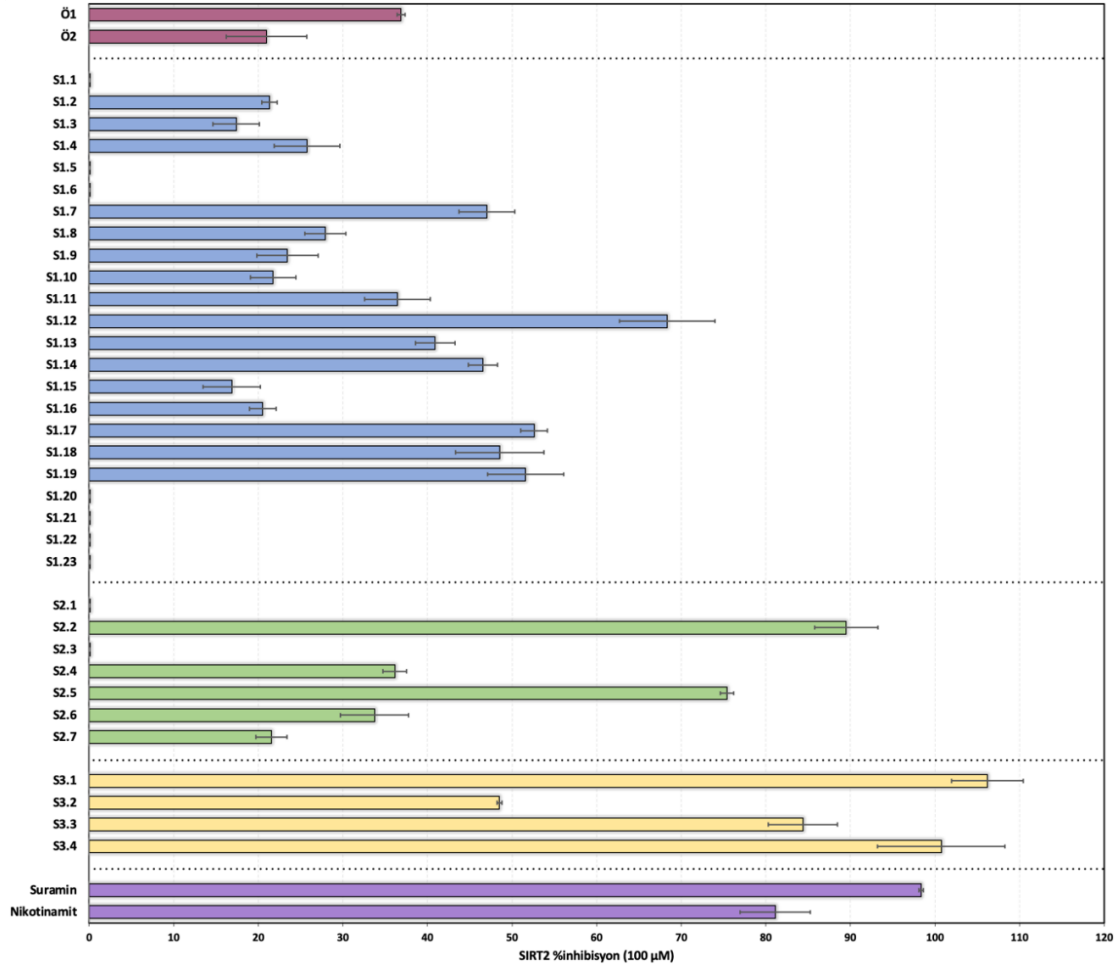
1,1'-(9-okso-9*H*-florene-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) yapısı taşıyan bileşiklerin, daha önce tasarlanan bileşiklere göre SIRT2 enzimatik aktivitesini daha güçlü şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Dört bileşik arasında en zayıf inhibitör etki **S3.2** (%48,50) kodlu bileşik için hesaplanırken serinin diğer bileşiklerinde SIRT2 inhibisyon oranı %84,39 ve üstü şeklinde

bulunmuştur. Yang ve arkadaşları tarafından vurgulanan etkileşimlere olanak verecek şekilde bileşik yapısının uzatılarak diğer bileşiklere göre daha stabil bir enzim:inhibitör kompleksi elde etmenin, SIRT2 inhibitör etki gücündeki bu önemli artışın ana sebebi olduğu düşünülmüştür.

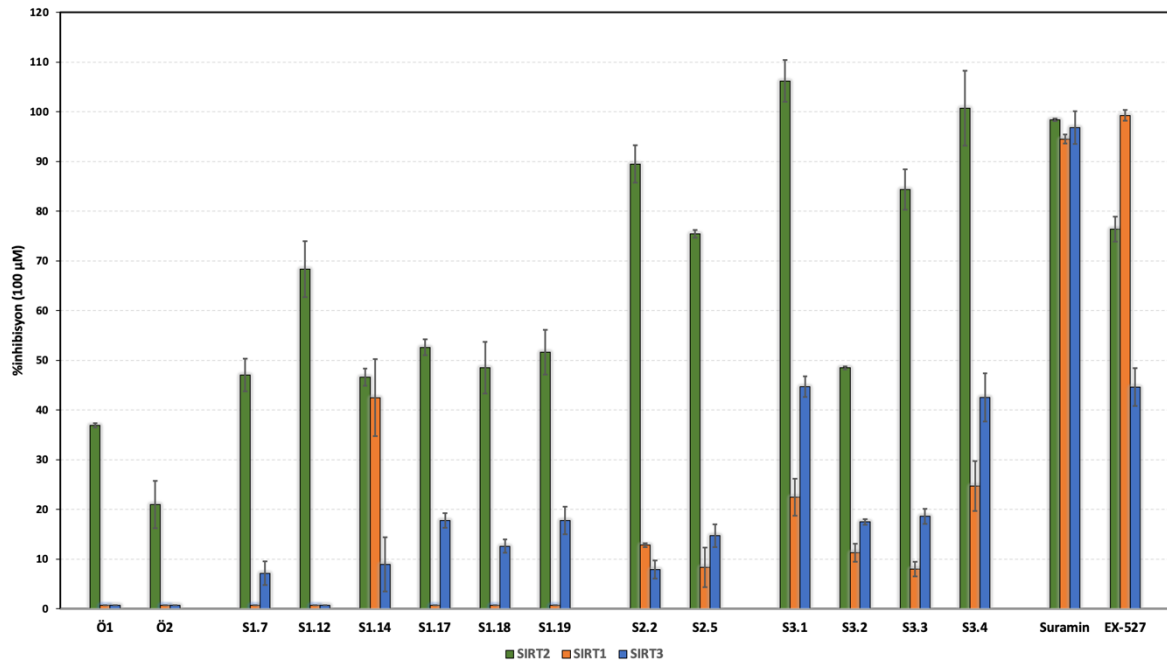


Şekil 5.4. 1,1'-(9-okso-9H-floren-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) türevi bileşiklerin tasarımı

Tez çalışmamız kapsamında öncü bileşik optimizasyonu çalışmaları sonucu selektif SIRT2 inhibitörü olarak tasarlanan tüm bileşiklerin *in vitro* SIRT2 inhibitör etkileri grafik halinde Şekil 5.5'te sunulmuştur. Bu bileşiklerden SIRT2 enzimatik aktivitesini iyi oranda inhibe edenlerin, izoform selektivitesinin değerlendirilmesi için *in vitro* SIRT1 ve SIRT3 inhibitör etkileri de belirlenmiştir (Şekil 5.6).



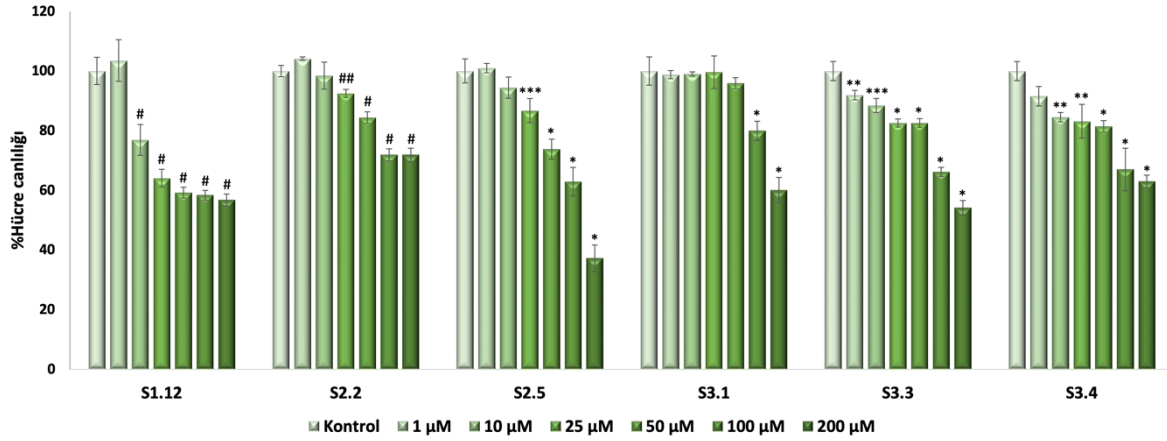
Şekil 5.5. Test edilen bileşiklerin *in vitro* SIRT2 inhibitör etkileri



Şekil 5.6. Seçilen bileşiklerin *in vitro* SIRT1-3 inhibitör etkileri

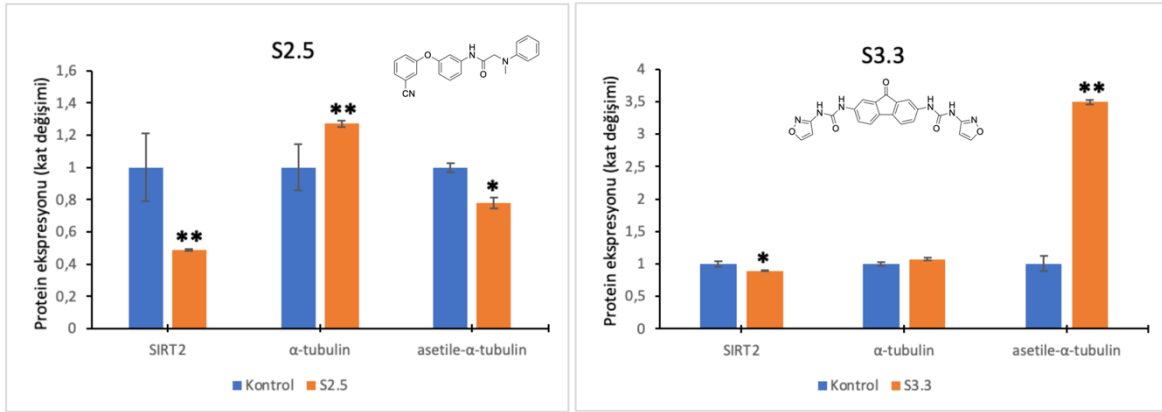
Elde edilen sonuçlara göre, *N*-ariloksiaril-2-(ariltiyo)asetamit türevi bileşiklerden **S1.14** kodlu bileşiği SIRT1 ve SIRT3 enzim aktivitelerini sırasıyla %42,48 ve %8,93 oranlarında inhibe ettiği için bu bileşik non-selektif SIRT1-SIRT2 inhibitörü olarak değerlendirilmiştir. *N*-Ariloksiaril-2-(ariltiyo)asetamit türevi diğer bileşiklerde SIRT1 izoformuna karşı etki gözlenmezken, SIRT3'e karşı en fazla %17 oranında inhibisyon görülmüştür. **S1.12** kodlu bileşik, izoform selektivitesi incelenen tüm bileşikler içerisinde SIRT2'ye karşı selektivite indeksi en yüksek bileşik olarak bulunmuştur. Test edilen *N*-ariloksiaril-2-(metil(fenil)amino)asetamit türevi bileşiklerden **S2.2** ve **S2.5** kodlu bileşikler de SIRT1 ve SIRT3 izoformlarına karşı düşük inhibisyon gösterdiklerinden selektif SIRT2 inhibitörü olarak değerlendirilmişlerdir. 1,1'-(9-okso-9H-floren-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) yapısında **S3.1**, **S3.2** ve **S3.4** kodlu bileşikler özellikle SIRT3 izoformuna karşı etkili bulunmuş, SIRT2 inhibisyon oranlarının yarısı kadar bir oranda SIRT3 aktivitesini inhibe ettikleri görülmüştür. Bu nedenle, ilgili bileşikler non-selektif SIRT1-SIRT3 inhibitörü olarak değerlendirilmiştir. Bu türevlerden **S3.3** kodlu bileşik için belirlenen SIRT1 ve SIRT3 inhibisyon oranları incelendiğinde, **S1.12** kadar SIRT2 selektivite indeksi yüksek olmasa da selektif SIRT2 inhibitörü olarak tanımlanmıştır.

SIRT2 enzimatik aktivitesini selektif olarak inhibe edip etmediğine bakılmaksızın 100 µM tarama konsantrasyonunda %68-100 oranlarında SIRT2 inhibisyon gösteren bileşiklerin insan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 72 saat süre sonundaki antiproliferatif etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre test edilen bileşikler arasında en etkili türevlerin **S1.12**, **S2.5** ve **S3.3** kodlu bileşikler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.7). Bileşiklerin test edilen hücre hattına karşı beklenilenden düşük oranda etki göstermesi ile sahip oldukları SIRT2 inhibitör profil arasında ilişki maalesef kurulamamıştır. SIRT2 inhibisyonunun antikanser etkiye sebep olduğunu destekleyen çalışmaların genelinde MCF-7 hücre hattı kullanılmış olsa da farklı kanser hücrelerinde de çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle, tez çalışmamız kapsamında ulaşılan SIRT2 inhibitörlerinin daha sonraki çalışmalarda farklı hücre hatlarına karşı da değerlendirilmesi planlanmıştır.



Şekil 5.7. Test edilen bileşiklerin 72 saat süre sonunda MCF-7 hücrelerindeki etkileri. Önemli farklılıklar # $p < 0,000001$; ## $p = 0,002206$; * $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,01$ şeklinde gösterilmiştir.

İnsan MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı en etkin antiproliferatif etkiyi gösteren **S2.5** ve **S3.3** kodlu bileşiklerin, SIRT2 enziminin en önemli substratı olan α -tubulinin asetilasyonu üzerine etkileri Western blot analizi ile belirlenmiştir (Şekil 5.8). Elde edilen sonuçlara göre her iki bileşik hücre içinde SIRT2 ekspresyonunu anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Bileşiklerin *in vitro* SIRT2 inhibitör etki çalışmaları sonucu **S3.3** kodlu bileşik **S2.5**'e göre daha etkili bulunmuşken, hücre içinde belirlenen etki düzeyleri farklı olmuştur. Bu duruma benzer sonuçlara literatürde rastlanmış, bileşikler arasındaki diğer fizikokimyasal ve stabilite farklılıklarının, gözlemlenen hücresel inhibisyon gücünde farklara neden olabileceği şeklinde açıklanmıştır [118]. SIRT2 inhibisyonu ile asetile- α -tubulin substratının deasetilasyonu gerçekleşmeyeceğinden, Western blot analizi ile asetile- α -tubulin düzeyleri incelenmiştir. Bileşiklerden **S3.3**, anlamlı bir şekilde α -tubulin hiperasetilasyonuna sebep olurken, beklenmedik bir şekilde **S2.5** kodlu bileşik için bu etki gözlenmemiştir. Asetile- α -tubulin seviyelerinin beklenilenin aksine düşmesi, **S2.5** ile muamele olan hücrelerin 72 saat sonunda ölmesi nedeniyle meydana gelen protein degradasyonunun sonucu olabileceği düşünülmüştür [202]. Sonuç olarak test edilen bileşiklerden **S3.3**'ün, MCF-7 hücrelerinde sergilediği antiproliferatif etkinin SIRT2 inhibisyonundan kaynaklandığı ortaya koyulurken, **S2.5**'in α -tubulin asetilasyonu üzerine etkilerinin nedeni tez çalışmamız kapsamında aydınlatılamamıştır.



Şekil 5.8. Test edilen bileşiklere ait Western blot analizi sonuçları. Önemli farklılıklar * $p<0,05$; ** $p<0,01$ şeklinde gösterilmiştir.

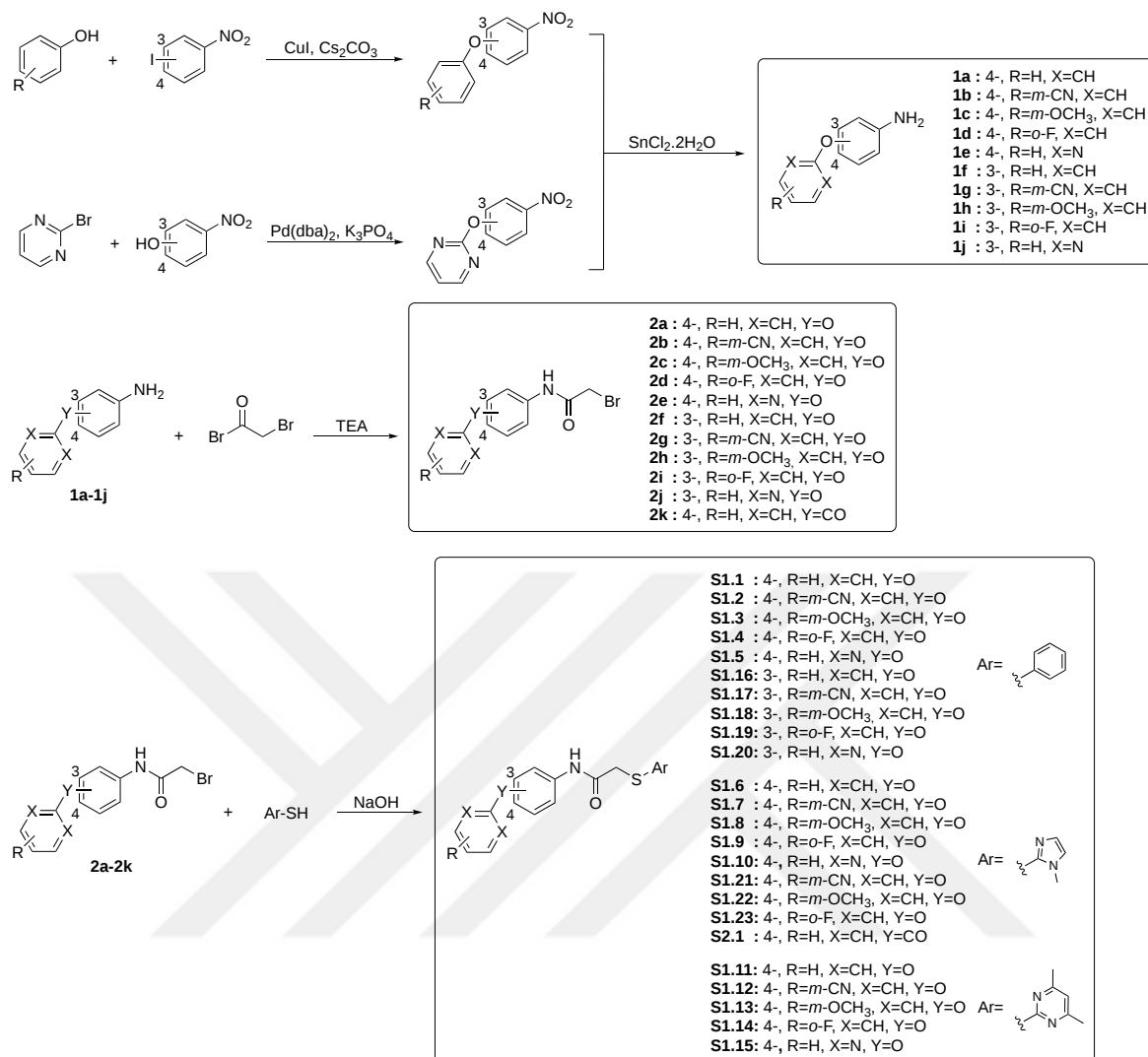
SIRT2 enzimatik aktivitesini yüksek oranda inhibe eden bileşiklerin etki düzeyleri ile SIRT2 aktif bölge etkileşimleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla moleküler docking çalışmaları yürütülmüştür. Bileşiklerin aktif bölgeyle etkileşimleri, kullanılan SIRT2-inhibitör komplekslerinde etkili SIRT2 inhibisyonu için gerekli olduğu vurgulanan etkileşimler temel alınarak değerlendirilmiş; moleküler docking çalışması için seçilen türevlerin (**S1.7**, **S1.12**, **S1.14**, **S1.17**, **S1.18**, **S1.19**, **S2.2**, **S2.5**, **S3.1-S3.4**) beklenen etkileşimleri büyük oranda meydana getirdiği gözlenmiştir (Çizelge 5.1). Bu nedenle, moleküler docking ile belirlenen bağlantı modları, ilgili bileşikler için tespit edilen inhibitör etkileri destekler nitelikte bulunmuştur. Ancak, aynı durum SIRT2 inhibisyonu göstermeyen türevler için belirlenememiş, benzer türevlerin arasındaki inhibitör etki farkı moleküler docking sonuçlarıyla açıklanabilir bulunamamıştır.

Çizelge 5.1. Seçilen bileşiklerin SIRT2 aktif bölgesinde meydana getirdikleri etkileşimler

Kod	Substrat Bağlanma Bölgesi			Selektivite Cebi		Diğer Etkileşimler					XP GScore (kcal/mol)	SIRT2 PDB
	Phe119 (π - π)	Phe131 (π - π)	Phe234 (π - π)	Tyr139 (π - π)	Phe190 (π - π)	Pro94 (HOH541 aracılı H bağı)	Arg97 (H bağı)	Val233 (H bağı)	Phe235 (π - π)	His187 (π - π)		
Ö1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-9,87	5DY4
Ö2	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-10,63	
Ö3	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-11,36	
Ö4	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-11,59	
S1.7	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-9,98	
S1.12	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-11,93	
S1.14	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-11,33	
S1.17	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-11,20	
S1.18	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-11,15	
S1.19	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-11,48	
S2.2	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-11,59	5YQO
S2.5	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-11,61	
5GN	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-12,80*	
S3.1	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-12,99	
S3.2	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-14,33	
S3.3	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-13,90	
S3.4	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-13,49	
L5C	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-12,93*	

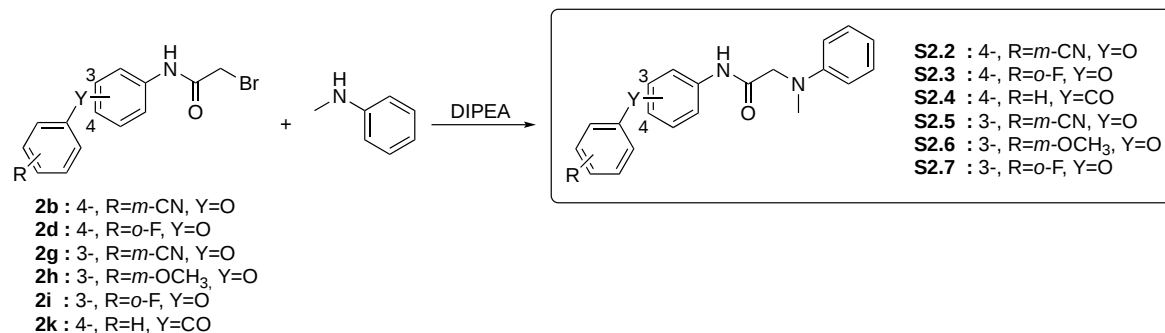
* Uygulanacak moleküler docking protokolünü doğrulamak amacıyla koligantların ilgili SIRT2 x-ray yapısında aktif bölgeye yeniden yerleştirilmesi sonucu elde edilen bağlanma enerjileri

Tez çalışmamızda yer alan *N*-(3-/4-ariloksifenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevlerinin (**S1.1-S1.23**) ve *N*-(4-benzoilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevinin (**S2.1**) sentezi için ilk olarak pirimidin yapısı taşımayan ariloksi nitrobenzen türevleri, uygun fenol türevlerinin 1-iyodo-3-/4-nitrobenzen ile CuI ve *N,N*-dimetilglisin varlığında verdiği Ullmann kenetlenme reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Ullmann reaksiyonu sonucu sentezlenemeyen 2-(3-/4-nitrofenoksi)pirimidin türevleri ise, 2-bromopirimidin 3-/4-nitrofenol ile Pd(dba)₂ ve *t*-BuXPhos varlığındaki kenetleme reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen tüm ariloksi nitrobenzen türevleri SnCl₂ varlığında nitro redüksiyonu ile amin türevlerine (**1a-1j**) dönüştürülmüştür. Elde edilen amin türevleri (**1a-1j**) ve satın alınan (4-aminofenil)(fenil)metanon, TEA varlığında 2-bromoasetil bromür ile amitleştirme reaksiyonuna tabi tutularak 2-bromoasetamit türevlerine (**2a-2k**) ulaşılmıştır. Son basamakta, bu bileşiklerin (**2a-2k**) uygun ariltiyol türevleri ile bazik ortamda verdikleri yer değiştirme reaksiyonu sonucu **S1.1-S1.23** ve **S2.1** kodlu sonuç bileşikler elde edilmiştir (Şekil 5.9).



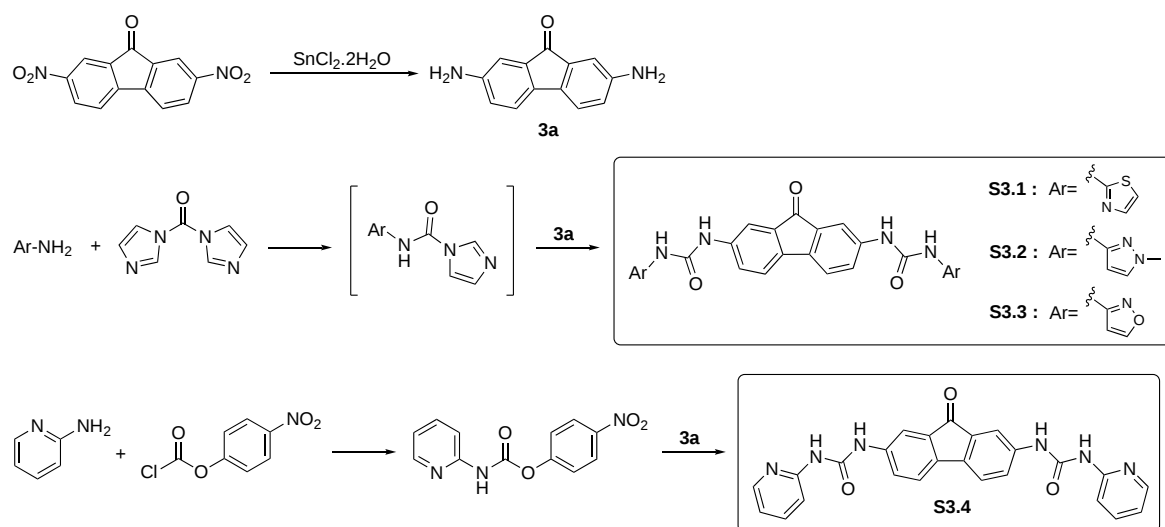
Şekil 5.9. *N*-(3-/4-ariloksifenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevlerinin (**S1.1-S1.23**) ve *N*-(4-benzoilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevinin (**S2.1**) sentezi için izlenen sentez yöntemi

N-(3-/4-ariloksifenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve *N*-(4-benzoilfenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit genel yapısına sahip bileşikler (**S2.2-S2.7**) ise, uygun 2-bromo-*N*-(3-/4-fenoksifenil)asetamit (**2b**, **2d**, **2g**, **2h**, **2i**) ve *N*-(4-benzoilfenil)-2-bromoasetamit (**2k**) türevlerinin DIPEA varlığında *N*-metilanilin ile vermiş olduğu yer değiştirme reaksiyonu sonucu elde edilmiştir (Şekil 5.10).



Şekil 5.10. *N*-(3-/4-ariloksifenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve *N*-(4-benzoilfenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit genel yapısına sahip bileşikler (**S2.2-S2.7**) için izlenen sentez yöntemi

1,1'-(9-Okso-9*H*-florene-2,7-diil)bis(3-arilüre) genel yapısına sahip bileşiklerin (**S3.1-S3.4**) sentezi için ilk basamakta 2,7-dinitro-9*H*-florene-9-on bileşiği nitro redüksiyonu ile 2,7-diamino-9*H*-florene-9-on (**3a**) yapısına dönüştürülmüştür. Devamında, uygun arilamin türevleri ile 1,1'-karbonildiimidazolün verdiği yer değiştirme reaksiyonu sonucu elde edilen *N*-aril-1-karbonil-1*H*-imidazol ara ürünü ile **3a** kodlu bileşik reaksiyona tabi tutulmuş ve **S3.1-S3.3** kodlu üre türevi sonuç bileşiklere ulaşılmıştır. Aynı seri içerisinde **S3.4** kodlu bileşiğin bahsi geçen yöntemle sentezlenememesinden dolayı alternatif bir sentez yöntemi izlenerek; 2-aminopiridin ve 4-nitrofenilkloroformatın bazik ortamda reaksiyonu ile elde edilen 4-nitrofenil piridin-2-ilkarbamat ara ürününün, **3a** kodlu bileşik ile reaksiyonu sonucu **S3.4** kodlu sonuç bileşiğe ulaşılmıştır (Şekil 5.11).



Şekil 5.11. 1,1'-(9-Okso-9*H*-florene-2,7-diil)bis(3-arilüre) genel yapısına sahip bileşikler (**S3.1-S3.4**) için izlenen sentez yöntemleri

N-(3-/4-ariloksifenil)-2-(ariltiyo)asetamit yapısı taşıyan bileşiklere ait ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde, SIRT2 aktif bölgesinin girişinde konumlanan fenil halkasında metoksi sübstitüenti taşıyan türevlerde (**S1.3**, **S1.8**, **S1.13**, **S1.18**) metoksi grubuna ait hidrojen sinyalleri 3,72-3,73 ppm aralığında 3H değerinde singlet olarak gözlenmiştir. Sübstitüe veya non-sübstitüe fenil türevlerinde fenil halkasının hidrojenlerine ait sinyaller 6,50-8,00 ppm aralığındaki aromatik sahada multipler olarak gözlenmiştir. Aynı konumda pirimidin taşıyan türevlerde (**S1.5**, **S1.10**, **S1.15**, **S1.20**) ise, pirimidin halkasının dördüncü ve altıncı konumda yer alan eşdeğer hidrojenlere ait sinyaller 8,62-8,63 ppm aralığında 2H değerinde dublet ($J=4,8-5,2$ Hz) olarak, beşinci konumdaki hidrojene ait sinyaller ise üç türevde (**S1.5**, **S1.15**, **S1.20**) 7,25-7,27 ppm aralığında 1H değerinde triplet ($J=4,8-5,2$ Hz) olarak, diğer türevde (**S1.10**) ise, aromatik sahada yer alan diğer hidrojenlerle birlikte multipler olarak görülmüştür.

Merkez halkada *p*-disübstitüe düzenine sahip türevlerde (**S1.1-S1.15**) orta halkadaki hidrojenlerden ikinci ve altıncı konumlardaki eşdeğer hidrojenlerin sinyalleri 7,54-7,65 ppm aralığında 2H değerinde dublet ($J=8,4-9,2$ Hz) olarak gözlenmiştir. Üç türevde (**S1.12**, **S1.13**, **S1.15**) üçüncü ve beşinci konumlardaki eşdeğer hidrojenlere ait sinyaller 7,00-7,14 ppm aralığında 2H değerinde dublet ($J=8,8-9,2$ Hz) şeklinde ayırt edilebilmiş, diğer türevlerde (**S1.1-S1.11**, **S1.14**) ilgili hidrojen sinyalleri, aromatik sahada diğer hidrojenlerle birlikte multipler olarak görülmüştür. Merkez halkada *m*-disübstitüe düzenine sahip türevlerde (**S1.16-S1.23**) orta halkadaki hidrojenler, aromatik sahada diğer aromatik hidrojenlerle birlikte yaklaşık 6,50-8,00 ppm arasında multipler olarak sinyal vermiştir.

N-(3-/4-ariloksifenil)-2-(ariltiyo)asetamit yapısı taşıyan tüm bileşiklerde amit grubunun NH hidrojeni 10,18-10,50 ppm aralığında 1H değerinde singlet olarak belirlenmiştir. Asetamit yapısındaki metilen hidrojenleri, asetamit yapısına komşu kükürt köprüsüne bağlı aromatik halkalardan fenil ve 1-metil-1*H*-imidazol taşıyan türevlerde (**S1.1-S1.10**, **S1.16-S1.23**) 3,82-3,88 ppm aralığında 2H değerinde singlet olarak; 4,6-dimetilpirimidin içeren türevlerde (**S1.11-S1.15**) ise 4,03-4,05 ppm aralığında 2H singlet olarak gözlenmiştir.

Kükürt köprüsüne komşu aromatik halka olarak 1-metil-1*H*-imidazol taşıyan türevlerde (**S1.6-S1.10**, **S1.21-S1.23**) imidazol halkasına bağlı metil hidrojenleri 3,59-3,62 ppm

aralığında 3H değerinde singlet şeklinde, halkaya ait dördüncü konumdaki hidrojenin sinyalleri beş türevde (**S1.7**, **S1.8**, **S1.10**, **S1.21** ve **S1.23**) 6,94-6,97 ppm aralığında 1H değerinde dublet ($J=1,2$ Hz) olarak, diğer üç türevde (**S1.6**, **S1.9**, **S1.22**) aromatik sahada yer alan diğer hidrojenlerle birlikte multipler olarak; beşinci konumdaki hidrojene ait sinyaller ise bazı türevlerde (**S1.6**, **S1.7**, **S1.9** ve **S1.21**) 7,25-7,26 ppm aralığında 1H değerinde dublet ($J=1,2$ Hz) olarak, diğer türevlerde (**S1.8**, **S1.10**, **S1.22**, **S1.23**) ise aromatik sahada yer alan diğer hidrojenlerle birlikte multipler olarak görülmüştür.

Kükürt köprüsüne komşu aromatik halka olarak 4,6-dimetilpirimidin yapısı taşıyan türevlerde (**S1.11-S1.15**) halkaya bağlı metil gruplarının eşdeğer hidrojenlerine ait sinyaller 2,33-2,34 ppm aralığında 6H değerinde singlet olarak gözlenmiş, beşinci konumdaki hidrojene ait sinyaller ise bazı türevlerde (**S1.12**, **S1.13**, **S1.15**) 6,95-6,97 pm aralığında 1H değerinde singlet şeklinde, bazı türevlerde (**S1.11**, **S1.14**) ise aromatik sahada yer alan diğer hidrojenlerle birlikte multipler olarak gözlenmiştir.

N-(3-/4-ariloksifenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit, *N*-(4-benzoilfenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve *N*-(4-benzoilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevi bileşiklerin ¹H-NMR spektrumları incelendiğinde, SIRT2 aktif bölgesinin girişinde konumlanan fenil halkasında metoksi sübstitüenti taşıyan **S2.6** kodlu bileşikte metoksi grubuna ait hidrojenlerin sinyalleri 3,74 ppm'de 3H değerinde singlet olarak, diğer türevlerde fenil halkasına ait hidrojenler 6,50-8,00 ppm arasında aromatik sahada multipler olarak gözlenmiştir. Seride merkez halkanın *p*-disübstitüe düzeninde olduğu türevlerde (**S2.2-S2.4**), merkez fenil halkasının ikinci ve altıncı konumlardaki eşdeğer hidrojenleri 7,67-7,80 ppm aralığında 2H değerinde dublet ($J=8,8-9,0$ Hz) şeklinde, üçüncü ve beşinci konumlardaki eşdeğer hidrojenleri ise 6,95-7,74 ppm aralığında 2H değerinde dublet ($J=8,8-9,0$ Hz) şeklinde belirlenmiş, **S2.1** kodlu bileşikte ise fenil halkasına ait tüm hidrojenler aromatik sahada yer alan diğer hidrojenlerle birlikte multipler olarak görülmüştür. Merkez halkanın *m*-disübstitüe düzeninde olduğu türevlerde (**S2.5**, **S2.6** ve **S2.7**) merkez fenil halkasına bağlı hidrojenler diğer aromatik sahada yer alan hidrojenlerle birlikte 6,50-8,00 ppm arasında multipler şeklinde gözlenmiştir.

N-(3-/4-arylksifenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit, *N*-(4-benzoilfenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve *N*-(4-benzoilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevi bileşiklerin tamamında amit grubuna ait NH hidrojeni 10,01-10,78 ppm aralığında 1H değerinde singlet olarak belirlenmiştir. Asetamit yapısındaki metilen hidrojenleri, kükürt köprüsüne komşu aromatik halka olarak 1-metil-1*H*-imidazol taşıyan **S2.1** kodlu türevde 3,93 ppm'de 2H değerinde singlet olarak gözlenirken, diğer türevlerde (**S2.2-S2.7**) 4,12-4,22 ppm aralığında 2H değerinde singlet olarak tespit edilmiştir. Kükürt köprüsüne komşu aromatik halka olarak 1-metil-1*H*-imidazol taşıyan türevde (**S2.1**) imidazol halkasına bağlı metil hidrojenleri, birinci serideki eşleniklerine benzer şekilde 3,62 ppm'de 3H değerinde singlet olarak, dördüncü konumdaki hidrojen ise 6,98 ppm'de 1H değerinde dublet olarak ($J=1,3$ Hz), beşinci konumdaki hidrojen ise 7,27 ppm'de 1H değerinde dublet ($J=1,2$ Hz) olarak belirlenmiştir. Bu seride yapısında *N*-metilamin taşıyan bileşiklerin (**S2.2-S2.7**) *N*-metil hidrojenleri 3,02-3,06 ppm aralığında 3H değerinde singlet şeklinde sinyal vermiştir.

1,1'-(9-Okso-9*H*-florein-2,7-diil)bis(3-arylüre) türevi **S3.1-S3.3** yapılarındaki merkez floren halka sisteminin üçüncü ve altıncı konumdaki eşdeğer hidrojenler 7,48-7,55 ppm aralığında 2H değerinde dubletin dubleti ($J=8,0-8,1$ ve $J=1,8-2,0$ Hz) şeklinde, dördüncü ve beşinci konumda bulunan eşdeğer hidrojenler 7,57-7,62 ppm aralığında 2H değerinde dublet ($J=8,0-8,2$ Hz) şeklinde, birinci ve sekizinci konumda bulunan eşdeğer hidrojenleri ise 7,76-7,82 ppm aralığında 2H değerinde dublet ($J=1,8-2,0$ Hz) şeklinde gözlenirken; **S3.4** kodlu bileşikte floren halkasının dördüncü ve beşinci konumdaki eşdeğer hidrojenler 7,47 ppm'de 2H değerinde dublet ($J=8,3$ Hz) şeklinde, halka üzerindeki diğer aromatik hidrojenler ise 6,50-8,00 ppm arasındaki multipler şeklinde gözlenmiştir. Tüm türevlerde üre grubunun taşıdığı hidrojenler 9,72-10,87 ppm aralığında 2H değerinde yayvan singlet ve 9,05-9,72 ppm aralığında 2H değerinde genellikle yayvan singlet olarak belirlenmiştir.

Üre köprüsüne bağlı tiyazol halkası taşıyan **S3.1** kodlu bileşikte tiyazol halkasının beşinci konumunda yer alan hidrojen 7,13 ppm'de 2H değerinde dublet ($J=3,7$ Hz) olarak, dördüncü konumunda yer alan hidrojen ise 7,39 ppm'de 2H değerinde dublet ($J=3,7$ Hz) olarak gözlenmiştir. Aynı konumda 1-metil-1*H*-pirazol taşıyan **S3.2** kodlu bileşikte halkaya bağlı metil grubu 3,75 ppm'de 6H değerinde singlet, halkanın dördüncü konumunda yer alan hidrojen 6,23 ppm'de 2H değerinde dublet ($J=1,1$ Hz), beşinci konumunda yer alan hidrojen

ise 7,82 ppm'de 2H değerinde dublet ($J=1,8$ Hz) olarak görülmüştür. İzoksazol taşıyan **S3.3** kodlu bileşikte ise, halkanın dördüncü konumunda yer alan hidrojen 6,87 ppm'de 2H değerinde dublet ($J=1,8$ Hz) ve beşinci konumunda yer alan hidrojen 8,76 ppm'de 2H değerinde dublet ($J=1,8$ Hz) olarak belirlenmiştir. Piridin taşıyan **S3.4** kodlu türevde, piridin halkasının altıncı konumunda yer alan hidrojen 8,32 ppm'de 2H değerinde dublet ($J=4,6$ Hz) şeklinde, dördüncü konumunda yer alan hidrojen ise 7,77 ppm'de 2H değerinde triplet ($J=7,8$ Hz) şeklinde sinyal vermiştir. Tüm bunların dışında piridin halkasında yer alan aromatik hidrojenlere ait sinyaller yaklaşık 6,50-8,00 ppm aralığında gözlenmiştir.

N-(3-/4-ariloksifenil)-2-(ariltiyo)asetamit yapısı taşıyan tüm bileşiklere ait ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde, SIRT2 aktif bölgesinin girişinde konumlanan fenil halkasında metoksi sübstitüenti taşıyan türevlerde (**S1.3**, **S1.8**, **S1.13**, **S1.18**), metoksi karbonuna ait sinyal 55,20-55,70 ppm aralığında gözlenmiştir. Flor sübstitüenti taşıyan türevlerde (**S1.4**, **S1.9**, **S1.14**, **S1.19**) flor atomunun bağlı olduğu karbon sinyalinin 153,28-154,27 ppm aralığında dublete ($J=244,3$ -244,8 Hz) yarıldığı, flor atomunun bağlı olduğu karbona komşu karbonlardan birinin sinyalinin 142,80-143,89 ppm aralığında dublete ($J=10,0$ -11,5 Hz) yarıldığı, diğerinin ise 116,96-117,71 ppm aralığında dublete ($J=17,7$ -18,0 Hz) yarıldığı gözlenmiştir. Flor sübstitüentine    bağ uzaklıkta yer alan karbon sinyalinin 124,87-126,87 ppm aralığında dublete ($J=7,0$ -7,3 Hz) yarıldığı, dört bağ uzaklıkta yer alan karbon sinyalinin ise 125,19-126,00 ppm aralığında dublete ($J=3,2$ -3,9 Hz) yarıldığı görülmüştür. Asetamit yapısındaki metilen grubuna ait karbon sinyali 35,26-38,89 ppm aralığında, karbonil grubuna ait sinyal ise yaklaşık 165,00-170,00 ppm aralığında gözlenmiştir. Yan zincirinde 1-metil-1*H*-imidazol halkası taşıyan türevlerde (**S1.6-S.10**, **S1.21-S1.23**) imidazolün taşıdığı metile ait karbonun 32,96-33,42 ppm aralığında; yan zincirinde 4,6-dimetilpirimidin halkası taşıyan türevlerde (**S1.11-S1.15**) halkaya bağlı metil karbonlarının 23,18-23,81 ppm aralığında sinyal verdikleri belirlenmiştir. Tüm bu sinyallerin dışında kalan aromatik halkalara ait karbon atomu sinyallerinin 100,00-158,00 ppm aralığında olduğu görülmüştür.

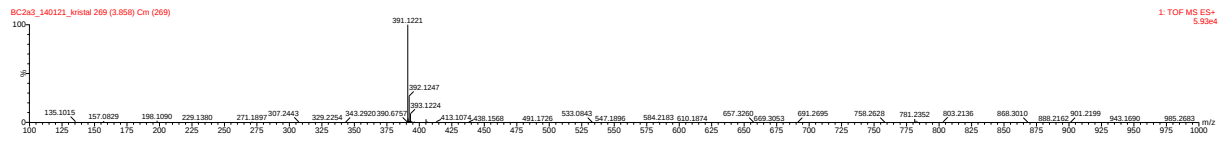
N-(3-/4-ariloksifenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit, *N*-(4-benzoilfenil)-2-(metil(fenil)amino)asetamit ve *N*-(4-benzoilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevi bileşiklerde, metoksi fenil halkası taşıyan **S2.6** kodlu bileşik için metoksi karbonuna ait sinyal 55,73 ppm'de gözlenmiştir. Floro fenil halkası taşıyan türevlerde (**S2.3**, **S2.7**) flor atomunun

doğrudan bağlı olduğu karbona ait sinyalin 153,83-154,24 ppm aralığında dublete ($J=244,8-245,0$ Hz) yarıldığı, flor atomunun doğrudan bağlı olduğu karbona komşu karbonlardan birinin sinyalinin 142,93-143,99 ppm aralığında dublete ($J=11,1-11,3$ Hz) yarıldığı, diğerinin 117,59- 117,71 ppm aralığında dublete ($J=17,7-17,9$ Hz) yarıldığı, flor sübstitüentine üç bağ uzaklıkta yer alan karbon sinyalinin 125,47-126,26 ppm aralığında dublete ($J=7,0-7,1$ Hz) yarıldığı, dört bağ uzaklıkta yer alan karbon sinyalinin ise 125,83-125,99 ppm aralığında dublete ($J=3,6$ Hz) yarıldığı görülmüştür. **S2.1** ve **S2.7** kodlu bileşiklerde iki fenil halkasını birbirine bağlayan karbonil grubunun yaklaşık 195,00 ppm'de sinyal verdiği gözlenmiştir. Asetamit yapısında yer alan karbonil grubuna ait sinyal ise yaklaşık 165,00-170,00 pm aralığında gözlenmiştir. Asetamit yapısındaki metilen grubuna ait karbonun sinyali bu serideki bileşiklerde 38,8-40,0 ppm aralığında görülmüştür. Kükürt köprüsüne komşu aromatik halka olarak 1-metil-1*H*-imidazol taşıyan **S2.1** kodlu türevde, imidazol halkasına bağlı metil karbonuna ait sinyal 33,45 ppm'de gözlenmiştir. Yapısında kükürt köprüsü yerine *N*-metilamin taşıyan türevlerde (**S2.2-S2.7**) metil grubuna ait sinyalin 56,04-56,19 ppm aralığında olduğu belirlenmiştir. Tüm bu sinyallerin dışında kalan aromatik halkalara ait karbon sinyallerinin 100,00-158,00 ppm aralığında olduğu görülmüştür.

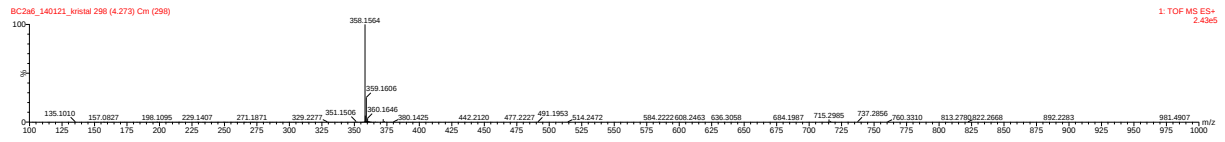
1,1'-(9-Okso-9*H*-florein-2,7-diil)bis(3-arilüre) türevi bileşiklerin tamamında (**S3.1-S3.4**) merkez floren halkasında yer alan karbonil grubuna ait sinyal 193,36-193,67 ppm aralığında, üre yapısına ait karbonil grubu sinyali 151,83-152,63 ppm aralığında görülmüştür. Yan zincirinde 1-metil-1*H*-pirazol taşıyan **S3.2** kodlu türevde) pirazol halkasına bağlı metil grubuna ait karbon sinyali 38,74 ppm'de gözlenmiştir. Tüm bu sinyallerin dışında kalan aromatik halkalara ait karbon atomu sinyalleri 95,37-160,35 ppm aralığında görülmüştür.

Tüm sonuç bileşiklere ait HRMS spektrumları incelendiğinde kütle hatalarının kabul edilir aralık olan ± 5 ppm aralığında olduğu görülmüştür. En aktif bileşikler olarak **S1.12**, **S2.2** ve **S3.3'**ün kütle hataları sırasıyla 2,0, -2,2 ve 0,7 ppm olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.12). Yapısında kükürt atomu taşıyan sonuç bileşiklerinde (**S1.1-S1.23**, **S2.1**) moleküler iyon (M^+) pikinin %5'i oranında M^{+2} piki gözlenmiştir.

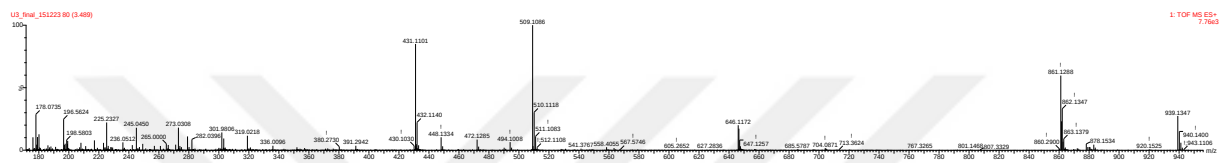
S1.12



S2.2



S3.3



Şekil 5.12. Seçilen bileşiklerin HRMS spektrumları

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamız kapsamında, seçilen öncü bileşiklere göre daha selektif ve daha etkili SIRT2 inhibitörlere ulaşmak amacıyla, üç aşamalı “öncü bileşik optimizasyonu” çalışması yürütülmüştür. İlk aşamada **Ö1** ve **Ö2** kodlu bileşiklerde SIRT2 aktif bölge etkileşimlerini güçlendirebilecek bölgeler seçilerek yapısal değişikliklere gidilmiş ve *N*-ariloksiairil-2-(ariltiyo)asetamit yapısında birinci seri türevlere ulaşılmıştır. Bu türevlere ait yapı-etki ilişkileri ve çalışma grubumuz tarafından gerçekleştirilen diğer çalışmaların çıktısı olan **Ö3** ve **Ö4** kodlu bileşiklerin yapıları değerlendirilerek ikinci seri türevler elde edilmiştir. Üçüncü seriyi oluşturan optimizasyon çalışmalarında ise mevcut etkileşimlere ek olarak aktif bölgenin farklı amino asitleriyle de etkileşime olanak verecek şekilde bileşiklerin boyutu büyütülmüş ve 1,1’-(9-okso-9*H*-florein-2,7-diil)bis(3-(aril)üre) genel yapısına ulaşılmıştır. Çalışma sonunda öncü bileşiklere göre çok daha güçlü ve selektif yeni SIRT2 inhibitörler (**S1.12** IC₅₀=9,97 µM; **S2.2** IC₅₀=5,74 µM; **S3.3** IC₅₀=2,04 µM) elde edilmiş, bu sebeple, yürütülen tüm “öncü bileşik optimizasyonu” çalışmalarının başarılı olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda bileşiklerin SIRT2 inhibitör etkileri ile MCF-7 hücrelerine karşı sergiledikleri antiproliferatif etki arasında istenilen düzeyde bir ilişki kurulamamıştır, bu nedenle bileşiklerin farklı kanser hücrelerinde de test edilmesi planlanmaktadır.

Western blot analizi ile elde edilen sonuçlara göre tez çalışmamız kapsamında ulaşılan en etkili selektif SIRT2 inhibitör **S3.3** bileşiğinin, MCF-7 hücrelerinde α-tubulin hiperasetilasyonuna yol açtığı da gösterilmiştir. Böylece SIRT2 inhibisyonu ile antikanser etki arasında ilişki ortaya koyulmuştur. Selektif SIRT2 inhibitörü olarak belirlenen **S2.5** kodlu molekülün asetile-α-tubulin seviyeleri üzerine etkilerinin değişik konsantrasyonlarda ve zaman dilimlerinde tekrar incelenerek aydınlatılması gerekmektedir.

Bileşiklerin tasarımında büyük oranda faydalanılan moleküler docking çalışmaları, benzer türevler arasındaki aktivite farkını açıklar nitelikte bulunamamıştır. Bu durumun, MD simülasyonları ve serbest bağlanma enerjisi hesapları ile tekrar değerlendirilmesi düşünülmektedir.

Sonuç olarak, kanseri tedavisine yönelik yeni ilaç ve tedavi stratejileri geliştirilmesinde ümit vaat eden bir hedef olarak görülen SIRT2 enzimine karşı selektif ve güçlü inhibitör yapılara ulaşmak amacıyla gerçekleştirilen tez çalışmamızın bu alanda yapılan çalışmalara büyük katkı sağlayacağı, selektif SIRT2 inhibitörlerinin tasarımı için önemli ipuçları sunacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Skvortsova, K., Iovino, N., Bogdanović, O. (2018). Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(12), 774-790.
2. Deans, C., Maggert, K. A. (2015). What Do You Mean, "Epigenetic"? *Genetics*, 199(4), 887-896.
3. Gujral, P., Mahajan, V., Lissaman, A. C., Ponnampalam, A. P. (2020). Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 84-95.
4. Penteado, A. B., Hassanie, H., Gomes, R. A., Emery, F. d. S., Trossini, G. H. G. (2023). Human sirtuin 2 inhibitors, their mechanisms and binding modes. *Future Medicinal Chemistry*, 15(3), 291-311.
5. Carafa, V., Altucci, L., Nebbioso, A. (2019). Dual Tumor Suppressor and Tumor Promoter Action of Sirtuins in Determining Malignant Phenotype. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 38.
6. Ziğtara, P., Dziewiğcka, M., Augustyniak, M. (2023). Why Is Longevity Still a Scientific Mystery? Sirtuins-Past, Present and Future. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 728.
7. Roshdy, E., Mustafa, M., Shaltout, A. E.-R., Radwan, M. O., Ibrahim, M. A. A., Soliman, M. E., Fujita, M., Otsuka, M., Ali, T. F. S. (2021). Selective SIRT2 inhibitors as promising anticancer therapeutics: An update from 2016 to 2020. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113709.
8. Hu, J., Jing, H., Lin, H. (2014). Sirtuin inhibitors as anticancer agents. *Future Medicinal Chemistry*, 6(8), 945-966.
9. Bao, X., Wang, Y., Li, X., Li, X.-M., Liu, Z., Yang, T., Wong, C. F., Zhang, J., Hao, Q., Li, X. D. (2014). Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *eLife*, 3, e02999.
10. Teng, Y.-B., Jing, H., Aramsangtienchai, P., He, B., Khan, S., Hu, J., Lin, H., Hao, Q. (2015). Efficient Demyristoylase Activity of SIRT2 Revealed by Kinetic and Structural Studies. *Scientific Reports*, 5(1), 8529.
11. Feldman, J. L., Baeza, J., Denu, J. M. (2013). Activation of the Protein Deacetylase SIRT6 by Long-chain Fatty Acids and Widespread Deacylation by Mammalian Sirtuins. *Journal of Biological Chemistry*, 288(43), 31350-31356.

12. Jin, J., He, B., Zhang, X., Lin, H., Wang, Y. (2016). SIRT2 Reverses 4-Oxononanoyl Lysine Modification on Histones. *Journal of the American Chemical Society*, 138(38), 12304-12307.
13. Wu, Q.-J., Zhang, T.-N., Chen, H.-H., Yu, X.-F., Lv, J.-L., Liu, Y.-Y., Liu, Y.-S., Zheng, G., Zhao, J.-Q., Wei, Y.-F., Guo, J.-Y., Liu, F.-H., Chang, Q., Zhang, Y.-X., Liu, C.-G., Zhao, Y.-H. (2022). The sirtuin family in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 402.
14. Yang, W. Y., Chen, W., Su, H. L., Li, R., Song, C., Wang, Z. Y., Yang, L. L. (2020). Recent advances in the development of histone deacetylase SIRT2 inhibitors. *Rsc Advances*, 10(61), 37382-37390.
15. Nandave, M., Acharjee, R., Bhaduri, K., Upadhyay, J., Rupanagunta, G. P., Ansari, M. N. (2023). A pharmacological review on SIRT 1 and SIRT 2 proteins, activators, and inhibitors: Call for further research. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124581.
16. Yagci, S., Gozelle, M., Kaya, S. G., Ozkan, Y., Aksel, A. B., Bakar-Ates, F., Dundar, Y., Eren, G. (2021). Hit-to-lead optimization on aryloxybenzamide derivative virtual screening hit against SIRT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 30, 115961.
17. Gozelle, M., Kaya, S. G., Aksel, A. B., Ozkan, E., Bakar-Ates, F., Ozkan, Y., Eren, G. (2022). Hit evaluation results in 5-benzyl-1,3,4-thiadiazole-2-carboxamide based SIRT2-selective inhibitor with improved affinity and selectivity. *Bioorganic Chemistry*, 123, 105746.
18. Mautone, N., Zwergel, C., Mai, A., Rotili, D. (2020). Sirtuin modulators: where are we now? A review of patents from 2015 to 2019. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(6), 389-407.
19. Chen, G., Huang, P., Hu, C. (2020). The role of SIRT2 in cancer: A novel therapeutic target. *International Journal of Cancer*, 147(12), 3297-3304.
20. Eren, G., Bruno, A., Guntekin-Ergun, S., Cetin-Atalay, R., Ozgencil, F., Ozkan, Y., Gozelle, M., Kaya, S. G., Costantino, G. (2019). Pharmacophore modeling and virtual screening studies to identify novel selective SIRT2 inhibitors. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 89, 60-73.
21. Yang, L.-L., Wang, H.-L., Zhong, L., Yuan, C., Liu, S.-Y., Yu, Z.-J., Liu, S., Yan, Y.-H., Wu, C., Wang, Y., Wang, Z., Yu, Y., Chen, Q., Li, G.-B. (2018). X-ray crystal structure guided discovery of new selective, substrate-mimicking sirtuin 2 inhibitors that exhibit activities against non-small cell lung cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155, 806-823.
22. Handy, D. E., Castro, R., Loscalzo, J. (2011). Epigenetic Modifications. *Circulation*, 123(19), 2145-2156.

23. Fiorino, E., Giudici, M., Ferrari, A., Mitro, N., Caruso, D., De Fabiani, E., Crestani, M. (2014). The sirtuin class of histone deacetylases: Regulation and roles in lipid metabolism. *IUBMB Life*, 66(2), 89-99.
24. Wu, S., Liu, H. (2022). Sirtuins—Novel Regulators of Epigenetic Alterations in Airway Inflammation. *Frontiers in Genetics*, 13, 862577.
25. Peleg, S., Feller, C., Ladurner, A. G., Imhof, A. (2016). The Metabolic Impact on Histone Acetylation and Transcription in Ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(8), 700-711.
26. Hogg, S. J., Beavis, P. A., Dawson, M. A., Johnstone, R. W. (2020). Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(11), 776-800.
27. Gibney, E. R., Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4-13.
28. Geiman, T. M., Robertson, K. D. (2002). Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation—how does it all fit together? *Journal of Cellular Biochemistry*, 87(2), 117-125.
29. Strahl, B. D., Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41-45.
30. Grant, P. A. (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biology*, 2(4), reviews0003.1.
31. López-Rodas, G., Brosch, G., Georgieva, E. I., Sendra, R., Franco, L., Loidl, P. (1993). Histone deacetylase. *FEBS Letters*, 317(3), 175-180.
32. Peserico, A., Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *Journal of Biomedicine Biotechnology*, 2011, 371832.
33. Li, G., Tian, Y., Zhu, W.-G. (2020). The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
34. Hadley, M., Noonepalle, S., Banik, D., Villagra, A. (2019). Functional Analysis of HDACs in Tumorigenesis. *Methods in molecular biology*, 1983, 279-307.
35. Barneda-Zahonero, B., Parra, M. (2012). Histone deacetylases and cancer. *Molecular Oncology*, 6(6), 579-589.
36. Park, S.-Y., Kim, J.-S. (2020). A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 204-212.

37. Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L., Boeke, J. D. (2006). The Biochemistry of Sirtuins. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 435-465.
38. Hong, J. Y., Fernandez, I., Anmangandla, A., Lu, X., Bai, J. J., Lin, H. (2021). Pharmacological Advantage of SIRT2-Selective versus pan-SIRT1–3 Inhibitors. *ACS Chemical Biology*, 16(7), 1266-1275.
39. Mei, Z., Zhang, X., Yi, J., Huang, J., He, J., & Tao, Y. (2016). Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 182.
40. Klar, A. J., Fogel, S., Macleod, K. (1979). MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics*, 93(1), 37-50.
41. Naiman, S., Cohen, H. Y. (2012). The contentious history of sirtuin debates. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 3(4), e0022.
42. Yao, Y., Yang, Y., Zhu, W.-G. (2014). Sirtuins: Nodes Connecting Aging, Metabolism and Tumorigenesis. *Current Pharmaceutical Design*, 20(11), 1614-1624.
43. Wang, Z. A., Hsu, W., Liu, W. R. (2019). Role of SIRT1 in Epigenetics. In V. B. Patel & V. R. Preedy (Editörler). *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics*. Cham: Springer International Publishing, 311-329.
44. Michan, S., Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *The Biochemical Journal*, 404(1), 1-13.
45. Machado de Oliveira, R., F. Pais, T., Fleming Outeiro, T. (2010). Sirtuins: Common Targets in Aging and in Neurodegeneration. *Current Drug Targets*, 11(10), 1270-1280.
46. Abbotto, E., Scarano, N., Piacente, F., Millo, E., Cichero, E., Bruzzone, S. (2022). Virtual Screening in the Identification of Sirtuins' Activity Modulators. *Molecules*, 27(17), 5641.
47. Jing, H., Lin, H. (2015). Sirtuins in Epigenetic Regulation. *Chemical Reviews*, 115(6), 2350-2375.
48. Dang, W. (2014). The controversial world of sirtuins. *Drug Discovery Today Technology*, 12, e9-e17.
49. Rardin, M. J., He, W. J., Nishida, Y., Newman, J. C., Carrico, C., Danielson, S. R., Guo, A., Gut, P., Sahu, A. K., Li, B., Uppala, R., Fitch, M., Riiff, T., Zhu, L., Zhou, J., Mulhern, D., Stevens, R. D., Ilkayeva, O. R., Newgard, C. B., Jacobson, M. P., Hellerstein, M., Goetzman, E. S., Gibson, B. W., Verdin, E. (2013). SIRT5 Regulates the Mitochondrial Lysine Succinylome and Metabolic Networks. *Cell Metabolism*, 18(6), 920-933.
50. Zhao, E., Hou, J., Ke, X., Abbas, M. N., Kausar, S., Zhang, L., Cui, H. (2019). The Roles of Sirtuin Family Proteins in Cancer Progression. *Cancers*, 11(12), 1-22.

51. Sanders, B. D., Jackson, B., Marmorstein, R. (2010). Structural basis for sirtuin function: What we know and what we don't. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(8), 1604-1616.
52. Bheda, P., Jing, H., Wolberger, C., Lin, H. (2016). The Substrate Specificity of Sirtuins. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 405-429.
53. Moniot, S., Weyand, M., Steegborn, C. (2012). Structures, Substrates, and Regulators of Mammalian Sirtuins – Opportunities and Challenges for Drug Development. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 16.
54. Zhao, K., Chai, X., Marmorstein, R. (2004). Structure and Substrate Binding Properties of cobB, a Sir2 Homolog Protein Deacetylase from Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*, 337(3), 731-741.
55. Rauh, D., Fischer, F., Gertz, M., Lakshminarasimhan, M., Bergbrede, T., Aladini, F., Kambach, C., Becker, C. F. W., Zerweck, J., Schutkowski, M., Steegborn, C. (2013). An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms. *Nature Communications*, 4(1), 2327.
56. Avalos, J. L., Celic, I., Muhammad, S., Cosgrove, M. S., Boeke, J. D., Wolberger, C. (2002). Structure of a Sir2 Enzyme Bound to an Acetylated p53 Peptide. *Molecular Cell*, 10(3), 523-535.
57. Avalos, J. L., Boeke, J. D., Wolberger, C. (2004). Structural Basis for the Mechanism and Regulation of Sir2 Enzymes. *Molecular Cell*, 13(5), 639-648.
58. Teixeira, C. S. S., Cerqueira, N. M. F. S. A., Gomes, P., Sousa, S. F. (2020). A Molecular Perspective on Sirtuin Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8609.
59. Avalos, J. L., Bever, K. M., Wolberger, C. (2005). Mechanism of Sirtuin Inhibition by Nicotinamide: Altering the NAD⁺ Cosubstrate Specificity of a Sir2 Enzyme. *Molecular Cell*, 17(6), 855-868.
60. Feldman, J. L., Dittenhafer-Reed, K. E., Kudo, N., Thelen, J. N., Ito, A., Yoshida, M., Denu, J. M. (2015). Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD⁺Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacylation. *Biochemistry*, 54(19), 3037-3050.
61. Wang, M., Lin, H. (2021). Understanding the Function of Mammalian Sirtuins and Protein Lysine Acylation. *Annual Review of Biochemistry*, 90, 245-285.
62. North, B. J., Verdin, E. (2007). Interphase Nucleo-Cytoplasmic Shuttling and Localization of SIRT2 during Mitosis. *PloS One*, 2(8), e784.

63. Ibrahim, M. A. A., Abdeljawaad, K. A. A., Roshdy, E., Mohamed, D. E. M., Ali, T. F. S., Gabr, G. A., Jaragh-Alhadad, L. A., Mekhemer, G. A. H., Shawky, A. M., Sidhom, P. A., Abdelrahman, A. H. M. (2023). In silico drug discovery of SIRT2 inhibitors from natural source as anticancer agents. *Scientific Reports*, 13(1), 2146-2158.
64. Vogelmann, A., Schiedel, M., Wössner, N., Merz, A., Herp, D., Hammelmann, S., Colcerasa, A., Komaniecki, G., Hong, J. Y., Sum, M., Metzger, E., Neuwirt, E., Zhang, L., Einsle, O., Groß, O., Schüle, R., Lin, H., Sippl, W., Jung, M. (2022). Development of a NanoBRET assay to validate inhibitors of Sirt2-mediated lysine deacetylation and defatty-acylation that block prostate cancer cell migration. *RSC Chemical Biology*, 3(4), 468-485.
65. Wang, H.-L., Ma, X., Guan, X.-Y., Song, C., Li, G.-B., Yu, Y.-M., Yang, L.-L. (2022). Potential synthetic lethality for breast cancer: A selective sirtuin 2 inhibitor combined with a multiple kinase inhibitor sorafenib. *Pharmacological Research*, 177, 106050.
66. Kudo, N., Ito, A., Arata, M., Nakata, A., Yoshida, M. (2018). Identification of a novel small molecule that inhibits deacetylase but not defatty-acylase reaction catalysed by SIRT2. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1748), 20170070.
67. Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., Oshimura, M. (2007). The Molecular Biology of Mammalian SIRT Proteins: SIRT2 Functions on Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle*, 6(9), 1011-1018.
68. Dryden, S. C., Nahhas, F. A., Nowak, J. E., Goustin, A.-S., Tainsky, M. A. (2003). Role for Human SIRT2 NAD-Dependent Deacetylase Activity in Control of Mitotic Exit in the Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(9), 3173-3185.
69. Zhang, H., Park, S.-H., Pantazides, B. G., Karpiuk, O., Warren, M. D., Hardy, C. W., Duong, D. M., Park, S.-J., Kim, H.-S., Vassilopoulos, A., Seyfried, N. T., Johnsen, S. A., Gius, D., Yu, D. S. (2013). SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201301463.
70. North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., Verdin, E. (2003). The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase. *Molecular Cell*, 11(2), 437-444.
71. Wang, Y.-P., Zhou, L.-S., Zhao, Y.-Z., Wang, S.-W., Chen, L.-L., Liu, L.-X., Ling, Z.-Q., Hu, F.-J., Sun, Y.-P., Zhang, J.-Y., Yang, C., Yang, Y., Xiong, Y., Guan, K.-L., Ye, D. (2014). Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *The EMBO Journal*, 33(12), 1304-1320.
72. Jiang, W. Q., Wang, S. W., Xiao, M. T., Lin, Y., Zhou, L. S., Lei, Q. Y., Xiong, Y., Guan, K. L., Zhao, S. M. (2011). Acetylation Regulates Gluconeogenesis by Promoting PEPC1 Degradation via Recruiting the UBR5 Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*, 43(1), 33-44.

73. Jing, E. X., Gesta, S., Kahn, C. R. (2007). SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metabolism*, 6(2), 105-114.
74. Eskandarian, H. A., Impens, F., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Cossart, P., Hamon, M. A. (2013). A Role for SIRT2-Dependent Histone H3K18 Deacetylation in Bacterial Infection. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6145), 1238858.
75. North, B. J., Rosenberg, M. A., Jeganathan, K. B., Hafner, A. V., Michan, S., Dai, J., Baker, D. J., Cen, Y., Wu, L. E., Sauve, A. A., van Deursen, J. M., Rosenzweig, A., Sinclair, D. A. (2014). SIRT2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan. *The EMBO Journal*, 33(13), 1438-1453.
76. Wang, Y., Yang, J., Hong, T., Chen, X., Cui, L. (2019). SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. *Ageing Research Reviews*, 55, 100961.
77. Chen, X., Lu, W., Wu, D. (2021). Sirtuin 2 (SIRT2): Confusing Roles in the Pathophysiology of Neurological Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 614107.
78. Luthi-Carter, R., Taylor, D. M., Pallos, J., Lambert, E., Amore, A., Parker, A., Moffitt, H., Smith, D. L., Runne, H., Gokce, O., Kuhn, A., Xiang, Z., Maxwell, M. M., Reeves, S. A., Bates, G. P., Neri, C., Thompson, L. M., Marsh, J. L., Kazantsev, A. G. (2010). SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 7927-7932.
79. Taylor, D. M., Balabadra, U., Xiang, Z., Woodman, B., Meade, S., Amore, A., Maxwell, M. M., Reeves, S., Bates, G. P., Luthi-Carter, R., Lowden, P. A. S., Kazantsev, A. G. (2011). A Brain-Permeable Small Molecule Reduces Neuronal Cholesterol by Inhibiting Activity of Sirtuin 2 Deacetylase. *ACS Chemical Biology*, 6(6), 540-546.
80. Silva, D. F., Esteves, A. R., Oliveira, C. R., Cardoso, S. M. (2017). Mitochondrial Metabolism Power SIRT2-Dependent Deficient Traffic Causing Alzheimer's-Disease Related Pathology. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4021-4040.
81. Esteves, A. R., Palma, A. M., Gomes, R., Santos, D., Silva, D. F., Cardoso, S. M. (2019). Acetylation as a major determinant to microtubule-dependent autophagy: Relevance to Alzheimer's and Parkinson disease pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(8), 2008-2023.
82. Ghosh, D., Mehra, S., Sahay, S., Singh, P. K., Maji, S. K. (2017). α -synuclein aggregation and its modulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 100, 37-54.
83. de Oliveira, R. M., Vicente Miranda, H., Francelle, L., Pinho, R., Szegő, É. M., Martinho, R., Munari, F., Lázaro, D. F., Moniot, S., Guerreiro, P., Fonseca, L., Marijanovic, Z., Antas, P., Gerhardt, E., Enguita, F. J., Fauvet, B., Penque, D., Pais, T. F., Tong, Q., Becker, S., Kügler, S., Lashuel, H. A., Steegborn, C., Zweckstetter, M., Outeiro, T. F. (2017). The mechanism of sirtuin 2-mediated exacerbation of alpha-synuclein toxicity in models of Parkinson disease. *PLoS Biology*, 15(3), e2000374.

84. Krey, L., Lühder, F., Kusch, K., Czech-Zechmeister, B., Könnecke, B., Fleming Outeiro, T., Trendelenburg, G. (2015). Knockout of silent information regulator 2 (SIRT2) preserves neurological function after experimental stroke in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(12), 2080-2088.
85. Erburu, M., Muñoz-Cobo, I., Diaz-Perdigon, T., Mellini, P., Suzuki, T., Puerta, E., Tordera, R. M. (2017). SIRT2 inhibition modulate glutamate and serotonin systems in the prefrontal cortex and induces antidepressant-like action. *Neuropharmacology*, 117, 195-208.
86. Guo, L., Jiang, Z.-M., Zhan, Y.-J., Pan, W., Wu, Q.-W., Song, F.-X., Zhou, X., Zhou, X.-Y., Liu, L.-J., Wang, J.-T. (2023). Neuro death through autophagy via the acetylation of FoxO1 by SIRT2 in the hippocampus of mice in a autism spectrum disorder mice model. *Journal of Cellular Physiology*, 238(6), 1275-1287.
87. Zhang, M., Pan, Y., Dorfman, R. G., Yin, Y., Zhou, Q., Huang, S., Liu, J., Zhao, S. (2017). Sirtinol promotes PEPCK1 degradation and inhibits gluconeogenesis by inhibiting deacetylase SIRT2. *Scientific Reports*, 7(1), 7.
88. Ren, Y.-r., Ye, Y.-l., Feng, Y., Xu, T.-f., Shen, Y., Liu, J., Huang, S.-l., Shen, J.-h., Leng, Y. (2021). SL010110, a lead compound, inhibits gluconeogenesis via SIRT2-p300-mediated PEPCK1 degradation and improves glucose homeostasis in diabetic mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(11), 1834-1846.
89. Tang, X., Chen, X. F., Wang, N. Y., Wang, X. M., Liang, S. T., Zheng, W., Lu, Y. B., Zhao, X., Hao, D. L., Zhang, Z. Q., Zou, M. H., Liu, D. P., Chen, H. Z. (2017). SIRT2 Acts as a Cardioprotective Deacetylase in Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circulation*, 136(21), 2051-2067.
90. Lee, Y. G., Reader, B. F., Herman, D., Streicher, A., Englert, J. A., Ziegler, M., Chung, S., Karpurapu, M., Park, G. Y., Christman, J. W., Ballinger, M. N. (2019). Sirtuin 2 enhances allergic asthmatic inflammation. *JCI Insight*, 4(4), e124710.
91. Zhang, L., Kim, S., Ren, X. (2020). The Clinical Significance of SIRT2 in Malignancies: A Tumor Suppressor or an Oncogene? *Frontiers in Oncology*, 10, 1721.
92. Zhu, C., Dong, X., Wang, X., Zheng, Y., Qiu, J., Peng, Y., Xu, J., Chai, Z., Liu, C. (2022). Multiple Roles of SIRT2 in Regulating Physiological and Pathological Signal Transduction. *Genetics Research*, 2022, 9282484.
93. McGlynn, L. M., Zino, S., MacDonald, A. I., Curle, J., Reilly, J. E., Mohammed, Z. M. A., McMillan, D. C., Mallon, E., Payne, A. P., Edwards, J., Shiels, P. G. (2014). SIRT2: Tumour suppressor or tumour promoter in operable breast cancer? *European Journal of Cancer*, 50(2), 290-301.

94. Li, Y., Zhang, M., Dorfman, R. G., Pan, Y., Tang, D., Xu, L., Zhao, Z., Zhou, Q., Zhou, L., Wang, Y., Yin, Y., Shen, S., Kong, B., Friess, H., Zhao, S., Wang, L., Zou, X. (2018). SIRT2 Promotes the Migration and Invasion of Gastric Cancer through RAS/ERK/JNK/MMP-9 Pathway by Increasing PEPCK1-Related Metabolism. *Neoplasia*, 20(7), 745-756.
95. Zhao, D., Zou, S.-W., Liu, Y., Zhou, X., Mo, Y., Wang, P., Xu, Y.-H., Dong, B., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., Guan, K.-L. (2013). Lysine-5 Acetylation Negatively Regulates Lactate Dehydrogenase A and Is Decreased in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*, 23(4), 464-476.
96. Zhang, M., Acklin, S., Gillenwater, J., Du, W., Patra, M., Yu, H., Xu, B., Yu, J., Xia, F. (2021). SIRT2 promotes murine melanoma progression through natural killer cell inhibition. *Scientific Reports*, 11(1), 12988.
97. Wang, J., Wu, J., Wang, L., Min, X., Chen, Z. (2021). The LINC00152/miR-138 Axis Facilitates Gastric Cancer Progression by Mediating SIRT2. *Journal of Oncology*, 2021, 1173869.
98. Liu, P. Y., Xu, N., Malyukova, A., Scarlett, C. J., Sun, Y., Zhang, X. D., Ling, D., Su, J. S. P., Nelson, C., Chang, D. K., Koach, J., Tee, A. E., Haber, M., Norris, M. D., Toon, C., Rومان, I., Xue, C., Cheung, B. B., Kumar, S., Marshall, G. M., Biankin, A. V., Liu, T. (2013). The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins. *Cell Death Differentiation*, 20(3), 503-514.
99. Ponnusamy, M., Zhou, X., Yan, Y., Tang, J., Tolbert, E., Zhao, T. C., Gong, R., Zhuang, S. (2014). Blocking Sirtuin 1 and 2 Inhibits Renal Interstitial Fibroblast Activation and Attenuates Renal Interstitial Fibrosis in Obstructive Nephropathy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350(2), 243-256.
100. Du, F., Li, Z., Zhang, G., Shaoyan, S., Geng, D., Tao, Z., Qiu, K., Liu, S., Zhou, Y., Zhang, Y., Gu, J., Wang, G., Li, L., Wu, W. (2020). SIRT2, a direct target of miR-212-5p, suppresses the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(17), 9985-9998.
101. Fiskus, W., Coothankandaswamy, V., Chen, J., Ma, H., Ha, K., Saenz, D. T., Krieger, S. S., Mill, C. P., Sun, B., Huang, P., Mumm, J. S., Melnick, A. M., Bhalla, K. N. (2016). SIRT2 Deacetylates and Inhibits the Peroxidase Activity of Peroxiredoxin-1 to Sensitize Breast Cancer Cells to Oxidant Stress-Inducing Agents. *Cancer Research*, 76(18), 5467-5478.
102. Lin, R. T., Tao, R., Gao, X., Li, T. T., Zhou, X., Guan, K. L., Xiong, Y., Lei, Q. Y. (2013). Acetylation Stabilizes ATP-Citrate Lyase to Promote Lipid Biosynthesis and Tumor Growth. *Molecular Cell*, 51(4), 506-518.
103. Du, Y., Wu, J., Zhang, H., Li, S., Sun, H. (2017). Reduced expression of SIRT2 in serous ovarian carcinoma promotes cell proliferation through disinhibition of CDK4 expression. *Molecular Medicine Reports*, 15(4), 1638-1646.

104. Finnin, M. S., Donigian, J. R., Pavletich, N. P. (2001). Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nature Structural Biology*, 8(7), 621-625.
105. Moniot, S., Schutkowski, M., Steegborn, C. (2013). Crystal structure analysis of human Sirt2 and its ADP-ribose complex. *Journal of Structural Biology*, 182(2), 136-143.
106. Rumpf, T., Schiedel, M., Karaman, B., Roessler, C., North, B. J., Lehotzky, A., Oláh, J., Ladwein, K. I., Schmidtkunz, K., Gajer, M., Pannek, M., Steegborn, C., Sinclair, D. A., Gerhardt, S., Ovádi, J., Schutkowski, M., Sippl, W., Einsle, O., Jung, M. (2015). Selective Sirt2 inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site. *Nature Communications*, 6(1), 6263.
107. Sakkiyah, S., Arooj, M., Kumar, M. R., Eom, S. H., Lee, K. W. (2013). Identification of Inhibitor Binding Site in Human Sirtuin 2 Using Molecular Docking and Dynamics Simulations. *PLOS ONE*, 8(1), e51429.
108. Schiedel, M., Rumpf, T., Karaman, B., Lehotzky, A., Oláh, J., Gerhardt, S., Ovádi, J., Sippl, W., Einsle, O., Jung, M. (2016). Aminothiazoles as Potent and Selective Sirt2 Inhibitors: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(4), 1599-1612.
109. Yang, L., Ma, X., Yuan, C., He, Y., Li, L., Fang, S., Xia, W., He, T., Qian, S., Xu, Z., Li, G., Wang, Z. (2017). Discovery of 2-((4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)thio)- N -phenylacetamide derivatives as new potent and selective human sirtuin 2 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 134, 230-241.
110. Moniot, S., Forgione, M., Lucidi, A., Hailu, G. S., Nebbioso, A., Carafa, V., Baratta, F., Altucci, L., Giacché, N., Passeri, D., Pellicciari, R., Mai, A., Steegborn, C., Rotili, D. (2017). Development of 1,2,4-Oxadiazoles as Potent and Selective Inhibitors of the Human Deacetylase Sirtuin 2: Structure–Activity Relationship, X-ray Crystal Structure, and Anticancer Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(6), 2344-2360.
111. Yamagata, K., Goto, Y., Nishimasu, H., Morimoto, J., Ishitani, R., Dohmae, N., Takeda, N., Nagai, R., Komuro, I., Suga, H., Nureki, O. (2014). Structural Basis for Potent Inhibition of SIRT2 Deacetylase by a Macrocyclic Peptide Inducing Dynamic Structural Change. *Structure*, 22(2), 345-352.
112. Teng, Y.-B., Jing, H., Aramsangtienchai, P., He, B., Khan, S., Hu, J., Lin, H., Hao, Q. (2015). Efficient Demyristoylase Activity of SIRT2 Revealed by Kinetic and Structural Studies. *Scientific Reports*, 5(1), 8529.
113. Rumpf, T., Gerhardt, S., Einsle, O., Jung, M. (2015). Seeding for sirtuins: microseed matrix seeding to obtain crystals of human Sirt3 and Sirt2 suitable for soaking. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications*, 71, 1498-1510.

114. Schiedel, M., Rumpf, T., Karaman, B., Lehotzky, A., Gerhardt, S., Ovádi, J., Sippl, W., Einsle, O., Jung, M. (2016). Structure-Based Development of an Affinity Probe for Sirtuin 2. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(6), 2252-2256.
115. Knyphausen, P., de Boor, S., Kuhlmann, N., Scislowski, L., Extra, A., Baldus, L., Schacherl, M., Baumann, U., Neundorf, I., Lammers, M. (2016). Insights into Lysine Deacetylation of Natively Folded Substrate Proteins by Sirtuins. *Journal of Biological Chemistry*, 291(28), 14677-14694.
116. Jin, J., He, B., Zhang, X. Y., Lin, H. N., Wang, Y. (2016). SIRT2 Reverses 4-Oxononanoyl Lysine Modification on Histones. *Journal of the American Chemical Society*, 138(38), 12304-12307.
117. Wang, Y., Fung, Y. M. E., Zhang, W. Z., He, B., Chung, M. W. H., Jin, J., Hu, J., Lin, H. N., Hao, Q. (2017). Deacylation Mechanism by SIRT2 Revealed in the 1'-SH-2'-O-Myristoyl Intermediate Structure. *Cell Chemical Biology*, 24(3), 339-345.
118. Sundriyal, S., Moniot, S., Mahmud, Z., Yao, S., Di Fruscia, P., Reynolds, C. R., Dexter, D. T., Sternberg, M. J. E., Lam, E. W. F., Steegborn, C., Fuchter, M. J. (2017). Thienopyrimidinone Based Sirtuin-2 (SIRT2)-Selective Inhibitors Bind in the Ligand Induced Selectivity Pocket. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(5), 1928-1945.
119. Mellini, P., Itoh, Y., Tsumoto, H., Li, Y., Suzuki, M., Tokuda, N., Kakizawa, T., Miura, Y., Takeuchi, J., Lahtela-Kakkonen, M., Suzuki, T. (2017). Potent mechanism-based sirtuin-2-selective inhibition by an in situ-generated occupant of the substrate-binding site, "selectivity pocket" and NAD⁺-binding site. *Chemical Science*, 8(9), 6400-6408.
120. Yang, L. L., Wang, H. L., Zhong, L., Yuan, C., Liu, S. Y., Yu, Z. J., Liu, S., Yan, Y. H., Wu, C., Wang, Y., Wang, Z., Yu, Y., Chen, Q., Li, G. B. (2018). X-ray crystal structure guided discovery of new selective, substrate-mimicking sirtuin 2 inhibitors that exhibit activities against non-small cell lung cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155, 806-823.
121. You, W. J., Zheng, W., Weiss, S., Chua, K. F., Steegborn, C. (2019). Structural basis for the activation and inhibition of Sirtuin 6 by quercetin and its derivatives. *Scientific Reports*, 9, 19176.
122. Hong, J. Y., Price, I. R., Bai, J. J., Lin, H. (2019). A Glycoconjugated SIRT2 Inhibitor with Aqueous Solubility Allows Structure-Based Design of SIRT2 Inhibitors. *ACS Chemical Biology*, 14(8), 1802-1810.
123. Nielsen, A. L., Rajabi, N., Kudo, N., Lundø, K., Moreno-Yruela, C., Bæk, M., Fontenas, M., Lucidi, A., Madsen, A. S., Yoshida, M., Olsen, C. A. (2021). Mechanism-based inhibitors of SIRT2: structure–activity relationship, X-ray structures, target engagement, regulation of α -tubulin acetylation and inhibition of breast cancer cell migration. *RSC Chemical Biology*, 2(2), 612-626.

124. Roche, K. L., Remiszewski, S., Todd, M. J., Kulp, J. L., III, Tang, L., Welsh, A. V., Barry, A. P., De, C., Reiley, W. W., Wahl, A., Garcia, J. V., Luftig, M. A., Shenk, T., Tonra, J. R., Murphy, E. A., Chiang, L. W. (2023). An allosteric inhibitor of sirtuin 2 deacetylase activity exhibits broad-spectrum antiviral activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 133(12), e158978.
125. Djokovic, N., Ruzic, D., Rahnasto-Rilla, M., Srdic-Rajic, T., Lahtela-Kakkonen, M., Nikolic, K. (2022). Expanding the Accessible Chemical Space of SIRT2 Inhibitors through Exploration of Binding Pocket Dynamics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(10), 2571-2585.
126. Spiegelman, N. A., Price, I. R., Jing, H., Wang, M., Yang, M., Cao, J., Hong, J. Y., Zhang, X., Aramsangtienchai, P., Sadhukhan, S., Lin, H. (2018). Direct Comparison of SIRT2 Inhibitors: Potency, Specificity, Activity-Dependent Inhibition, and On-Target Anticancer Activities. *ChemMedChem*, 13(18), 1890-1894.
127. He, B., Du, J., Lin, H. (2012). Thiosuccinyl Peptides as Sirt5-Specific Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 134(4), 1922-1925.
128. Tervo, A. J., Kyrilenko, S., Niskanen, P., Salminen, A., Leppänen, J., Nyrönen, T. H., Järvinen, T., Poso, A. (2004). An In Silico Approach to Discovering Novel Inhibitors of Human Sirtuin Type 2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(25), 6292-6298.
129. Jung-Hynes, B., Nihal, M., Zhong, W., Ahmad, N. (2009). Role of Sirtuin Histone Deacetylase SIRT1 in Prostate Cancer: A Target For Prostate Cancer Management Via Its Inhibition?. *Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3823-3832.
130. Audrito, V., Vaisitti, T., Rossi, D., Gottardi, D., D'Arena, G., Laurenti, L., Gaidano, G., Malavasi, F., Deaglio, S. (2011). Nicotinamide Blocks Proliferation and Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells through Activation of the p53/miR-34a/SIRT1 Tumor Suppressor Network. *Cancer Research*, 71(13), 4473-4483.
131. Grozinger, C. M., Chao, E. D., Blackwell, H. E., Moazed, D., Schreiber, S. L. (2001). Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38837-38843.
132. Ota, H., Tokunaga, E., Chang, K., Hikasa, M., Iijima, K., Eto, M., Kozaki, K., Akishita, M., Ouchi, Y., Kaneki, M. (2006). Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras–MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene*, 25(2), 176-185.
133. Wang, J., Kim, T. H., Ahn, M. Y., Lee, J., Jung, J. H., Choi, W. S., Lee, B. M., Yoon, K. S., Yoon, S., Kim, H. S. (2012). Sirtinol, a class III HDAC inhibitor, induces apoptotic and autophagic cell death in MCF-7 human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 41(3), 1101-1109.

134. Rotili, D., Tarantino, D., Nebbioso, A., Paolini, C., Huidobro, C., Lara, E., Mellini, P., Lenoci, A., Pezzi, R., Botta, G., Lahtela-Kakkonen, M., Poso, A., Steinkühler, C., Gallinari, P., De Maria, R., Fraga, M., Esteller, M., Altucci, L., Mai, A. (2012). Discovery of Salermide-Related Sirtuin Inhibitors: Binding Mode Studies and Antiproliferative Effects in Cancer Cells Including Cancer Stem Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(24), 10937-10947.
135. Heltweg, B., Gatbonton, T., Schuler, A. D., Posakony, J., Li, H., Goehle, S., Kollipara, R., DePinho, R. A., Gu, Y., Simon, J. A., Bedalov, A. (2006). Antitumor Activity of a Small-Molecule Inhibitor of Human Silent Information Regulator 2 Enzymes. *Cancer Research*, 66(8), 4368-4377.
136. Mahajan, S. S., Scian, M., Sripathy, S., Posakony, J., Lao, U., Loe, T. K., Leko, V., Thalhofer, A., Schuler, A. D., Bedalov, A., Simon, J. A. (2014). Development of Pyrazolone and Isoxazol-5-one Cambinol Analogues as Sirtuin Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(8), 3283-3294.
137. Di Fruscia, P., Zacharioudakis, E., Liu, C., Moniot, S., Laohasinnarong, S., Khongkow, M., Harrison, I. F., Koltsida, K., Reynolds, C. R., Schmidtkunz, K., Jung, M., Chapman, K. L., Steegborn, C., Dexter, D. T., Sternberg, M. J., Lam, E. W., Fuchter, M. J. (2015). The discovery of a highly selective 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one SIRT2 inhibitor that is neuroprotective in an in vitro Parkinson's disease model. *ChemMedChem*, 10(1), 69-82.
138. Bedalov, A., Gatbonton, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E., Simon, J. A. (2001). Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15113-15118.
139. Neugebauer, R. C., Uchiechowska, U., Meier, R., Hruby, H., Valkov, V., Verdin, E., Sippl, W., Jung, M. (2008). Structure–Activity Studies on Splitomicin Derivatives as Sirtuin Inhibitors and Computational Prediction of Binding Mode. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(5), 1203-1213.
140. Rotili, D., Carafa, V., Tarantino, D., Botta, G., Nebbioso, A., Altucci, L., Mai, A. (2011). Simplification of the tetracyclic SIRT1-selective inhibitor MC2141: Coumarin- and pyrimidine-based SIRT1/2 inhibitors with different selectivity profile. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(12), 3659-3668.
141. Freitag, M., Schemies, J., Larsen, T., El Gaghlab, K., Schulz, F., Rumpf, T., Jung, M., Link, A. (2011). Synthesis and biological activity of splitomicin analogs targeted at human NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(12), 3669-3677.
142. Yang, T., Chen, X., Jin, H.-x., Sethi, G., Go, M.-L. (2015). Functionalized tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indoles: A novel chemotype with Sirtuin 2 inhibitory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92, 145-155.

143. Kiviranta, P. H., Leppänen, J., Kyrylenko, S., Salo, H. S., Lahtela-Kakkonen, M., Tervo, A. J., Wittekindt, C., Suuronen, T., Kuusisto, E., Järvinen, T., Salminen, A., Poso, A., Wallén, E. A. A. (2006). N,N'-Bisbenzylidenebenzene-1,4-diamines and N,N'-Bisbenzylidenenaphthalene-1,4-diamines as Sirtuin Type 2 (SIRT2) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(26), 7907-7911.
144. Kiviranta, P. H., Leppänen, J., Rinne, V. M., Suuronen, T., Kyrylenko, O., Kyrylenko, S., Kuusisto, E., Tervo, A. J., Järvinen, T., Salminen, A., Poso, A., Wallén, E. A. A. (2007). N-(3-(4-Hydroxyphenyl)-propenoyl)-amino acid tryptamides as SIRT2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(9), 2448-2451.
145. Tervo, A. J., Suuronen, T., Kyrylenko, S., Kuusisto, E., Kiviranta, P. H., Salminen, A., Leppänen, J., Poso, A. (2006). Discovering Inhibitors of Human Sirtuin Type 2: Novel Structural Scaffolds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(24), 7239-7241.
146. Kiviranta, P. H. (2008). *Design and Synthesis of Silent Information Regulator Human Type 2 (SIRT2) Inhibitors*. (Ph. D. Thesis), University of Kuopio, Finland. (1235-0478)
147. Trapp, J., Meier, R., Hongwiset, D., Kassack, M. U., Sippl, W., Jung, M. (2007). Structure-Activity Studies on Suramin Analogues as Inhibitors of NAD⁺-Dependent Histone Deacetylases (Sirtuins). *ChemMedChem*, 2(10), 1419-1431.
148. Zhang, Y., Au, Q., Zhang, M., Barber, J. R., Ng, S. C., Zhang, B. (2009). Identification of a small molecule SIRT2 inhibitor with selective tumor cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(4), 729-733.
149. Lain, S., Hollick, J. J., Campbell, J., Staples, O. D., Higgins, M., Aoubala, M., McCarthy, A., Appleyard, V., Murray, K. E., Baker, L., Thompson, A., Mathers, J., Holland, S. J., Stark, M. J. R., Pass, G., Woods, J., Lane, D. P., Westwood, N. J. (2008). Discovery, In Vivo Activity, and Mechanism of Action of a Small-Molecule p53 Activator. *Cancer Cell*, 13(5), 454-463.
150. Trapp, J., Jochum, A., Meier, R., Saunders, L., Marshall, B., Kunick, C., Verdin, E., Goekjian, P., Sippl, W., Jung, M. (2006). Adenosine Mimetics as Inhibitors of NAD-Dependent Histone Deacetylases, from Kinase to Sirtuin Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(25), 7307-7316.
151. Huber, K., Schemies, J., Uciechowska, U., Wagner, J. M., Rumpf, T., Lewrick, F., Süss, R., Sippl, W., Jung, M., Bracher, F. (2010). Novel 3-Arylideneindolin-2-ones as Inhibitors of NAD⁺-Dependent Histone Deacetylases (Sirtuins). *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(3), 1383-1386.
152. Outeiro, T. F., Kontopoulos, E., Altmann, S. M., Kufareva, I., Strathearn, K. E., Amore, A. M., Volk, C. B., Maxwell, M. M., Rochet, J. C., McLean, P. J., Young, A. B., Abagyan, R., Feany, M. B., Hyman, B. T., Kazantsev, A. G. (2007). Sirtuin 2 Inhibitors Rescue -Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. *Science*, 317(5837), 516-519.

153. Sakai, T., Matsumoto, Y., Ishikawa, M., Sugita, K., Hashimoto, Y., Wakai, N., Kitao, A., Morishita, E., Toyoshima, C., Hayashi, T., Akiyama, T. (2015). Design, synthesis and structure–activity relationship studies of novel sirtuin 2 (SIRT2) inhibitors with a benzamide skeleton. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(2), 328-339.
154. Fridén-Saxin, M., Seifert, T., Landergren, M. R., Suuronen, T., Lahtela-Kakkonen, M., Jarho, E. M., Luthman, K. (2012). Synthesis and Evaluation of Substituted Chroman-4-one and Chromone Derivatives as Sirtuin 2-Selective Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(16), 7104-7113.
155. Seifert, T., Malo, M., Kokkola, T., Engen, K., Fridén-Saxin, M., Wallén, E. A. A., Lahtela-Kakkonen, M., Jarho, E. M., Luthman, K. (2014). Chroman-4-one- and Chromone-Based Sirtuin 2 Inhibitors with Antiproliferative Properties in Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(23), 9870-9888.
156. Seifert, T., Malo, M., Kokkola, T., Stéen, E. J. L., Meinander, K., Wallén, E. A. A., Jarho, E. M., Luthman, K. (2020). A scaffold replacement approach towards new sirtuin 2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(2), 115231.
157. Hoffmann, G., Breitenbücher, F., Schuler, M., Ehrenhofer-Murray, A. E. (2014). A Novel Sirtuin 2 (SIRT2) Inhibitor with p53-dependent Pro-apoptotic Activity in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 5208-5216.
158. Suzuki, T., Khan, M. N. A., Sawada, H., Imai, E., Itoh, Y., Yamatsuta, K., Tokuda, N., Takeuchi, J., Seko, T., Nakagawa, H., Miyata, N. (2012). Design, Synthesis, and Biological Activity of a Novel Series of Human Sirtuin-2-Selective Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(12), 5760-5773.
159. Kozako, T., Mellini, P., Ohsugi, T., Aikawa, A., Uchida, Y.-I., Honda, S.-I., Suzuki, T. (2018). Novel small molecule SIRT2 inhibitors induce cell death in leukemic cell lines. *BMC Cancer*, 18, 791.
160. Tatum, P. R., Sawada, H., Ota, Y., Itoh, Y., Zhan, P., Ieda, N., Nakagawa, H., Miyata, N., Suzuki, T. (2014). Identification of novel SIRT2-selective inhibitors using a click chemistry approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(8), 1871-1874.
161. Cui, H., Kamal, Z., Ai, T., Xu, Y., More, S. S., Wilson, D. J., Chen, L. (2014). Discovery of Potent and Selective Sirtuin 2 (SIRT2) Inhibitors Using a Fragment-Based Approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(20), 8340-8357.
162. Ai, T., Wilson, D. J., More, S. S., Xie, J., Chen, L. (2016). 5-((3-Amidobenzyl)oxy)nicotinamides as Sirtuin 2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(7), 2928-2941.

163. Disch, J. S., Evindar, G., Chiu, C. H., Blum, C. A., Dai, H., Jin, L., Schuman, E., Lind, K. E., Belyanskaya, S. L., Deng, J., Coppo, F., Aquilani, L., Graybill, T. L., Cuozzo, J. W., Lavu, S., Mao, C., Vlasuk, G. P., Perni, R. B. (2013). Discovery of Thieno[3,2-d]pyrimidine-6-carboxamides as Potent Inhibitors of SIRT1, SIRT2, and SIRT3. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(9), 3666-3679.
164. Yoon, Y. K., Ali, M. A., Wei, A. C., Shirazi, A. N., Parang, K., Choon, T. S. (2014). Benzimidazoles as new scaffold of sirtuin inhibitors: Green synthesis, *in vitro* studies, molecular docking analysis and evaluation of their anti-cancer properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 448-454.
165. Shah, A. A., Ito, A., Nakata, A., Yoshida, M. (2016). Identification of a Selective SIRT2 Inhibitor and Its Anti-breast Cancer Activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 39(10), 1739-1742.
166. Quinti, L., Casale, M., Moniot, S., Pais, Teresa F., Van Kanegan, Michael J., Kaltenbach, Linda S., Pallos, J., Lim, Ryan G., Naidu, Sharadha D., Runne, H., Meisel, L., Rauf, Nazifa A., Leyfer, D., Maxwell, Michele M., Saiah, E., Landers, John E., Luthi-Carter, R., Abagyan, R., Dinkova-Kostova, Albena T., Steegborn, C., Marsh, J. L., Lo, Donald C., Thompson, Leslie M., Kazantsev, Aleksey G. (2016). SIRT2- and NRF2-Targeting Thiazole-Containing Compound with Therapeutic Activity in Huntington's Disease Models. *Cell Chemical Biology*, 23(7), 849-861.
167. Zhou, Y., Cui, H., Yu, X., Peng, T., Wang, G., Wen, X., Sun, Y., Liu, S., Zhang, S., Hu, L., Wang, L. (2017). Synthesis and Evaluation of Novel Benzofuran Derivatives as Selective SIRT2 Inhibitors. *Molecules*, 22(8), 1348.
168. Jing, H., Hu, J., He, B., Negrón Abril, Y. L., Stupinski, J., Weiser, K., Carbonaro, M., Chiang, Y.-L., Southard, T., Giannakakou, P., Weiss, R. S., Lin, H. (2016). A SIRT2-Selective Inhibitor Promotes c-Myc Oncoprotein Degradation and Exhibits Broad Anticancer Activity. *Cancer Cell*, 29(3), 297-310.
169. Spiegelman, N. A., Hong, J. Y., Hu, J., Jing, H., Wang, M., Price, I. R., Cao, J., Yang, M., Zhang, X. Y., Lin, H. N. (2019). A Small-Molecule SIRT2 Inhibitor That Promotes K-Ras4a Lysine Fatty-Acylation. *ChemMedChem*, 14(7), 744-748.
170. Farooqi, A. S., Hong, J. Y., Cao, J., Lu, X., Price, I. R., Zhao, Q., Kosciuk, T., Yang, M., Bai, J. J., Lin, H. (2019). Novel Lysine-Based Thioureas as Mechanism-Based Inhibitors of Sirtuin 2 (SIRT2) with Anticancer Activity in a Colorectal Cancer Murine Model. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(8), 4131-4141.
171. Huang, S., Song, C., Wang, X., Zhang, G., Wang, Y., Jiang, X., Sun, Q., Huang, L., Xiang, R., Hu, Y., Li, L., Yang, S. (2017). Discovery of New SIRT2 Inhibitors by Utilizing a Consensus Docking/Scoring Strategy and Structure–Activity Relationship Analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(4), 669-679.

172. Ali, T. F. S., Ciftci, H. I., Radwan, M. O., Koga, R., Ohsugi, T., Okiyama, Y., Honma, T., Nakata, A., Ito, A., Yoshida, M., Fujita, M., Otsuka, M. (2019). New SIRT2 inhibitors: Histidine-based bleomycin spin-off. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(9), 1767-1775.
173. Wang, L., Li, C., Chen, W., Song, C., Zhang, X., Yang, F., Wang, C., Zhang, Y., Qian, S., Wang, Z., Yang, L. (2019). Discovery of (5-Phenylfuran-2-yl)methanamine Derivatives as New Human Sirtuin 2 Inhibitors. *Molecules*, 24(15), 2724.
174. Mellini, P., Itoh, Y., Elboray, E. E., Tsumoto, H., Li, Y., Suzuki, M., Takahashi, Y., Tojo, T., Kurohara, T., Miyake, Y., Miura, Y., Kitao, Y., Kotoku, M., Iida, T., Suzuki, T. (2019). Identification of Diketopiperazine-Containing 2-Anilinobenzamides as Potent Sirtuin 2 (SIRT2)-Selective Inhibitors Targeting the "Selectivity Pocket", Substrate-Binding Site, and NAD⁺-Binding Site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(12), 5844-5862.
175. Khalil, N. A., Ahmed, E. M., Zaher, A. F., El-Zoghbi, M. S., Sobh, E. A. (2020). Synthesis of certain benzothieno[3,2-d]pyrimidine derivatives as a selective SIRT2 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 187, 111926.
176. Radwan, M. O., Ciftci, H. I., Ali, T. F. S., Ellakwa, D. E., Koga, R., Tateishi, H., Nakata, A., Ito, A., Yoshida, M., Okamoto, Y., Fujita, M., Otsuka, M. (2019). Antiproliferative S-Trityl-L-Cysteine -Derived Compounds as SIRT2 Inhibitors: Repurposing and Solubility Enhancement. *Molecules*, 24(18), 3295.
177. Radwan, M. O., Ciftci, H. I., Ali, T. F. S., Koga, R., Tateishi, H., Nakata, A., Ito, A., Yoshida, M., Fujita, M., Otsuka, M. (2020). Structure activity study of S-trityl-cysteamine dimethylaminopyridine derivatives as SIRT2 inhibitors: Improvement of SIRT2 binding and inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(19), 127458.
178. Tantawy, A. H., Meng, X.-G., Marzouk, A. A., Fouad, A., Abdelazeem, A. H., Youssif, B. G. M., Jiang, H., Wang, M.-Q. (2021). Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of novel piperine–resveratrol hybrids as antiproliferative agents targeting SIRT-2. *RSC Advances*, 11(41), 25738-25751.
179. Chowdhury, S., Sripathy, S., Webster, A. A., Park, A., Lao, U., Hsu, J. H., Loe, T., Bedalov, A., Simon, J. A. (2020). Discovery of Selective SIRT2 Inhibitors as Therapeutic Agents in B-Cell Lymphoma and Other Malignancies. *Molecules*, 25(3), 455.
180. Dukanya, Shanmugam, M. K., Rangappa, S., Metri, P. K., Mohan, S., Basappa, Rangappa, K. S. (2020). Exploring the newer oxadiazoles as real inhibitors of human SIRT2 in hepatocellular cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(16), 127330.
181. Scarano, N., Abboto, E., Musumeci, F., Salis, A., Brullo, C., Fossa, P., Schenone, S., Bruzzone, S., Cichero, E. (2023). Virtual Screening Combined with Enzymatic Assays to Guide the Discovery of Novel SIRT2 Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9363.

182. Ma, D., Cai, Q. (2003). N,N -Dimethyl Glycine-Promoted Ullmann Coupling Reaction of Phenols and Aryl Halides. *Organic Letters*, 5(21), 3799-3802.
183. Zhang, Y., Ni, G., Li, C., Xu, S., Zhang, Z., Xie, X. (2015). The coupling reactions of aryl halides and phenols catalyzed by palladium and MOP-type ligands. *Tetrahedron*, 71(30), 4927-4932.
184. Padiya, K. J., Gavade, S., Kardile, B., Tiwari, M., Bajare, S., Mane, M., Gaware, V., Varghese, S., Harel, D., Kurhade, S. (2012). Unprecedented "In Water" Imidazole Carbonylation: Paradigm Shift for Preparation of Urea and Carbamate. *Organic Letters*, 14(11), 2814-2817.
185. Zhao, X., Allison, D., Condon, B., Zhang, F., Gheyi, T., Zhang, A., Ashok, S., Russell, M., MacEwan, I., Qian, Y., Jamison, J. A., Luz, J. G. (2013). The 2.5 Å Crystal Structure of the SIRT1 Catalytic Domain Bound to Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) and an Indole (EX527 Analogue) Reveals a Novel Mechanism of Histone Deacetylase Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 963-969.
186. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., Mainz, D. T. (2006). Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177-6196.
187. Pecio, Ł., Alilou, M., Kozachok, S., Orhan, I. E., Eren, G., Şenol Deniz, F. S., Stuppner, H., Oleszek, W. (2023). Absolute configuration of spiro-flavostilbenoids from *Yucca schidigera* Roez. ex Ortgies: First indication of (2R)-naringenin as the key building block. *Phytochemistry*, 207, 113584.
188. Allegra, M., Tutone, M., Tesoriere, L., Attanzio, A., Culletta, G., Almerico, A. M. (2021). Evaluation of the IKK β Binding of Indicaxanthin by Induced-Fit Docking, Binding Pose Metadynamics, and Molecular Dynamics. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 701568.
189. Yoon, S. P., Kim, J. (2016). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 contributes to oxidative stress through downregulation of sirtuin 3 during cisplatin nephrotoxicity. *Anatomy & Cell Biology*, 49(3), 165-176.
190. Aragonès, G., Suárez, M., Ardid-Ruiz, A., Vinaixa, M., Rodríguez, M. A., Correig, X., Arola, L., Bladé, C. (2016). Dietary proanthocyanidins boost hepatic NAD⁺ metabolism and SIRT1 expression and activity in a dose-dependent manner in healthy rats. *Scientific Reports*, 6(1), 24977.
191. Kuźma, Ł., Wysokińska, H., Różalski, M., Krajewska, U., Kisiel, W. (2012). An unusual taxodione derivative from hairy roots of *Salvia austriaca*. *Fitoterapia*, 83(4), 770-773.
192. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

193. Bakar-Ates, F., Ozkan, E., Sengel-Turk, C. T. (2020). Encapsulation of cucurbitacin B into lipid polymer hybrid nanocarriers induced apoptosis of MDAMB231 cells through PARP cleavage. *International Journal of Pharmaceutics*, 586, 119565.
194. Tan, X., Xiong, W., Zhu, B., Liu, H., Wu, W., Jiang, H. (2023). Photoinduced Arene C–H Amination with Ammonia: A Practical and Regioselective Strategy for Primary Amines. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 365(13), 2165-2170.
195. Cheng, H., Shen, Y.-Q., Pan, X.-Y., Hou, Y.-P., Wu, Q.-Y., Yang, G.-F. (2015). Discovery of 1,2,4-triazole-1,3-disulfonamides as dual inhibitors of mitochondrial complex II and complex III. *New Journal of Chemistry*, 39(9), 7281-7292.
196. Bhuyan, A. J., Bharali, S. J., Sharma, A., Dutta, D., Gogoi, P., Saikia, L. (2022). Copper-Catalyzed Direct Syntheses of Phenoxypyrimidines from Chloropyrimidines and Arylboronic Acids: A Cascade Avenue and Unconventional Substrate Pairs. *The Journal of Organic Chemistry*, 87(17), 11846-11851.
197. Matsuoka, E., Hamada, Y. (1972). Synthesis and antimicrobial properties of halogen-substituted diphenylethers. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 92, 111-115.
198. Alvi, S., Ali, R. (2021). An expeditious and highly efficient synthesis of substituted pyrroles using a low melting deep eutectic mixture. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 19(44), 9732-9745.
199. Dufresne, S., Callaghan, L., Skene, W. G. (2009). Conjugated Fluorenes Prepared From Azomethines Connections-II: The Effect of Alternating Fluorenones and Fluorenes on the Spectroscopic and Electrochemical Properties. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(47), 15541-15549.
200. Goldfarb, D. S. (2009). *Method For Altering The Lifespan Of Eukaryotic Organisms* (US Patent No. US 2009/163545 A1) European Patent Office: U. P. Application.
201. Connell, R. D., , Ladouceur, G. H., Osterhout, M. H. (1999). *NPY5 receptor antagonists and methods for using same* (US Patent No. 5,939,462). European Patent Office: U. S. Patent.
202. Peck, B., Chen, C.-Y., Ho, K.-K., Di Fruscia, P., Myatt, S. S., Coombes, R. C., Fuchter, M. J., Hsiao, C.-D., Lam, E. W.-F. (2010). SIRT Inhibitors Induce Cell Death and p53 Acetylation through Targeting Both SIRT1 and SIRT2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(4), 844-855.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Selen Gözde KAYA
Uyruğu: T.C.

Eğitim derecesi	Okul/ Program	Yıl
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya Anabilim Dalı	
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	
Lise	Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi	

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2020-devam ediyor	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü Farmasötik Kimya Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

Bilimsel Projeler

1. Yeni Selektif SIRT2 İnhibitörlerinin Tasarımı, Sentezi, Biyolojik Aktivitelerinin Tayini ve Yapı-Etki İlişkilerinin İncelenmesi, TÜBİTAK 1001 118S673, Yürütücü: Gökçen EREN, Araştırmacılar: Yeşim ÖZKAN, Mahmut GÖZELLE, Danışman: Filiz BAKAR ATEŞ, Bursiyerler: **Selen Gözde KAYA**, Ahmet Buğra AKSEL, Habibe Beyza GÜNİNDİ, Selin KORKMAZ (15.11.2018- 15.05.2022).
2. Öncü Bileşik Optimizasyonu ile Yeni Selektif SIRT2 İnhibitörlerin Geliştirilmesi, Gazi Üniversitesi Öncelikli Alan Bilimsel Araştırma Projesi TOA-2021-7165, Yürütücü: Gökçen EREN, Araştırmacılar: Yeşim ÖZKAN, Mahmut GÖZELLE, Filiz BAKAR ATEŞ, **Selen Gözde KAYA**, Ahmet Buğra AKSEL, Fikriye ÖZGENCİL, Erva ÖZKAN (26.08.2021-Devam ediyor).
3. Yeni 2,7-Disübitü 9H-Fluoren-9-on Türevleri: Tasarımı, Sentezi ve SIRT2 İnhibitör Etkilerinin Araştırılması, TÜSEB A Grubu Ar-Ge Projesi 16743, Yürütücü: Gökçen EREN, Araştırmacılar: Yeşim ÖZKAN, **Selen Gözde KAYA** (11.11.2022- Devam ediyor).

Eserler

SCIE kapsamında taranan uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. EREN G.; BRUNO A.; GUNTEKIN-ERGUN S.; CETIN-ATALAY R.; OZGENCIL F.; OZKAN Y.; GOZELLE M.; **KAYA S.G.**; COSTANTINO G.: "Pharmacophore Modeling and Virtual Screening Studies to Identify Novel Selective SIRT2 Inhibitors", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 89, 60-73 (2019).
2. YAGCI S.; GOZELLE M.; **KAYA S.G.**; OZKAN Y.; AKSEL A.B.; BAKAR-ATES F.; DUNDAR Y.; EREN G.: "Hit-to-lead Optimization on Aryloxybenzamide Derivative Virtual Screening Hit against SIRT", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 30, 115961 (2021).
3. GOZELLE M.; **KAYA S.G.**; AKSEL A. B.; OZKAN E.; BAKAR-ATES F.; OZKAN Y.; EREN G.: "Hit Evaluation Results in 5-Benzyl-1,3,4-thiadiazole-2-carboxamide Based SIRT2-Selective Inhibitor with Improved Affinity and Selectivity", *Bioorganic Chemistry*, 123, 105746 (2022).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. YAGCI S.; GOZELLE M.; **KAYA S.G.**; EREN G.: "Design and Synthesis of Aryloxy Benzamide Derivatives with Potential Inhibitory Effect against SIRT2", 6th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium (EFMC-YMCS 2019), September 5-6, Athens, Greece (2019) (Poster).
2. **KAYA S.G.**; OZKAN Y.; EREN G.: "SIRT2 Inhibitory Activities of *N*-Aryloxyphenyl-2-(arylothio)acetamide Derivatives", 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), September 8-10, Ankara, Türkiye (2021) (Poster).
3. **KAYA S.G.**; OZKAN Y.; EREN G.: "*In Silico* Hit Optimization toward SIRT2 Inhibition: *N*-aryloxyaryl-2-(arylothio)acetamides", 9th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium (EFMC-YMCS 2022), September 8-9, Nice, France (2022) (Poster).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

