

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**SCARA5 RESEPTÖRÜNÜN SRCR BÖLGESİNİN HESAPLAMALI YAPISAL
MODELLENMESİ VE BİLGİSAYAR TEMELLİ İLAÇ TASARIM YÖNTEMİ
KULLANILARAK GELİŞTİRİLECEK RESEPTÖR BLOKER'İNİN MCF-7
İNSAN MEME KANSER HÜCRE HATTINDAKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Orhan KOÇAK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ŞUBAT 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**SCARA5 RESEPTÖRÜNÜN SRCR BÖLGESİNİN HESAPLAMALI YAPISAL
MODELLENMESİ VE BİLGİSAYAR TEMELLİ İLAÇ TASARIM YÖNTEMİ
KULLANILARAK GELİŞTİRİLECEK RESEPTÖR BLOKER'İNİN MCF-7
İNSAN MEME KANSER HÜCRE HATTINDAKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Orhan KOÇAK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ŞUBAT 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SCARA5 RESEPTÖRÜNÜN SRCR BÖLGESİNİN HESAPLAMALI YAPISAL
MODELLENMESİ VE BİLGİSAYAR TEMELLİ İLAÇ TASARIM YÖNTEMİ
KULLANILARAK GELİŞTİRİLECEK RESEPTÖR BLOKER'İNİN MCF-7
İNSAN MEME KANSER HÜCRE HATTINDAKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Orhan KOÇAK
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FDK-2021-5512 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ŞUBAT 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SCARA5 RESEPTÖRÜNÜN SRCR BÖLGESİNİN HESAPLAMALI YAPISAL
MODELLENMESİ VE BİLGİSAYAR TEMELLİ İLAÇ TASARIM YÖNTEMİ
KULLANILARAK GELİŞTİRİLECEK RESEPTÖR BLOKER'ININ MCF-7
İNSAN MEME KANSER HÜCRE HATTINDAKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Orhan KOÇAK
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 08/02/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK
Doç. Dr. Uğur BİLGE
Doç. Dr. Mustafa YAVUZ
Prof. Dr. Deniz ŞİRİN
Dr. Öğr. Üyesi Deniz İRTEM KARTAL

ÖZET

SCARA5 RESEPTÖRÜNÜN SRCR BÖLGESİNİN HESAPLAMALI YAPISAL MODELLENMESİ VE BİLGİSAYAR TEMELLİ İLAÇ TASARIM YÖNTEMİ KULLANILARAK GELİŞTİRİLECEK RESEPTÖR BLOKER'İNİN MCF-7 İNSAN MEME KANSER HÜCRE HATTINDAKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Orhan KOÇAK

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK

Şubat 2024; 205 sayfa

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı yöntemi, hastalık sürecinde yer alan potansiyel ilaç hedeflerinin üç boyutlu yapılarını ve yeni moleküller tasarlamak için kullanır. Kanser hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkeler için önemli bir sağlık sorunudur. Son on yılda araştırmacılar, kanser tedavisi için potansiyel bir alternatif yaklaşım olarak antikanser özelliklere sahip küçük peptitleri araştırmışlardır.

Bu tez çalışmasındaki amaç kanserde aday terapötik hedef olan Scavenger Reseptör Sınıfı A üye 5 (SCARA5)'in ligandı L-ferritin ile olan etkileşimini inhibe edecek bir peptit tasarlanması ve bu peptitin insan meme kanser hücre hattı MCF7 üzerindeki etkisinin in vitro araştırılmasıdır. Tez çalışması in silico ve in vitro olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır

Bu amaç doğrultusunda in silico aşamada SCARA5'in ligand bağlama bölgesi olan sisteince zengin scavenger reseptör (SRCR)'nin üç boyutlu yapısı hesaplamalı yapısal modeli ortaya çıkarıldı. X-ışını kristalografik yöntem ile sonradan ortaya çıkarılan üç boyutlu yapısı ile modellenen yapı karşılaştırıldı. Robetta_cm en uygun model olarak seçilerek ligandı olan L-Ferritin ile aralarındaki etkileşim protein-protein docking yöntemi ile ortaya çıkarıldı. Bu etkileşim bölgesindeki 16-22. aminoasit rezidüleri ile 79. aminoasit rezidüleri peptit tasarımı için hedef bölge olarak belirlendi.

Tez çalışmasının in vitro aşamasında Peptitin MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkileri WST-1 ve Sülförodamin B testi ile belirlenmiştir. ELISA ve Western blot teknikleri ile in vitro aşama tamamlanmıştır. Peptitin MCF7 hücreleri üzerindeki yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değeri 188 $\mu g/ml$ olarak hesaplanmıştır. Peptitin sitotoksik etkilerinin apoptoz kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi için önemli belirteçlerden olan başlatıcı kaspaz-9 ve cellat kaspaz-7'nin protein seviyeleri ELISA testi ile saptanmıştır. Peptit dozları 2X IC_{50} , IC_{50} ve 1/2X IC_{50} olarak belirlenmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelere uygulanan IC_{50} ve 1/2X IC_{50} dozlarında miktarı istatistiksel anlamda artış göstermiştir. 48 saat sonra ise 1/2X IC_{50} dozunda kaspaz-9 artışı görülmüştür. Kaspaz-7 miktarı açısından artış görülen doz ve saat IC_{50} ve 48. saatlik inkübasyon süresidir. 72 saatlik inkübasyon sonunda ise 2X IC_{50} uygulanan hücrelerin kaspaz-7 miktarında artış görülmüştür. Western blot sonuçlarına göre peptit 24 saatlik inkübasyondan sonra MCF7 hücrelerinde kaspaz-7 miktarını arttırırken, 48 saatlik

inkübasyon sonrası kesilmiş kaspaz-7 miktarı artmıştır. Tasarlanan peptit MCF7 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetiklemiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Antikanser Peptit, İlaç Tasarımı, Kaspaz, MCF7, Moleküler Dinamik Simülasyon, Moleküler Docking

JÜRİ: Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK

Doç. Dr. Uğur BİLGE

Doç. Dr. Mustafa YAVUZ

Prof. Dr. Deniz ŞİRİN

Dr. Öğr. Üyesi Deniz İRTEM KARTAL



ABSTRACT

COMPUTATIONAL STRUCTURAL MODELLING OF THE SRCR REGION OF THE SCARA5 RECEPTOR AND IN VITRO INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF A RECEPTOR BLOCKER DEVELOPED BY USING COMPUTER-BASED DRUG DESIGN METHOD IN MCF-7 HUMAN BREAST CANCER CELL LINE

Orhan KOÇAK

PhD Thesis in Biology

Supervisor: Assoc. Dr. Ece ŞİMŞEK

February 2024; 205 pages

The computer-aided drug design method uses three-dimensional structures of potential drug targets involved in the disease process to design new molecules. Cancer is a major health problem for both developed and developing countries. In the last decade, researchers have investigated small peptides with anticancer properties as a potential alternative approach for cancer therapy.

Therefore, the aim of this thesis is to design a peptide to inhibit the interaction of Scavenger Receptor Class A member 5 (SCARA5), a candidate therapeutic target in cancer, with its ligand L-ferritin and to investigate the effect of this peptide on human breast cancer cell line MCF7 in vitro. The thesis study consists of two stages, in silico and in vitro.

For this purpose, a computational structural model of the three-dimensional structure of the cysteine-rich scavenger receptor (SRCR), the ligand binding site of SCARA5, was developed in silico. The modelled structure was compared with the three-dimensional structure revealed by X-ray crystallographic method. Robetta_cm was selected as the most appropriate model and its interaction with its ligand L-Ferritin was revealed by protein-protein docking method. Amino acid residues 16-22 and 79 in this interaction region were identified as target sites for peptide design.

In the in vitro stage of the thesis study, the effects of the peptide on the viability of MCF7 cells were determined by WST-1 and Sulforhodamine B assay. The in vitro stage was completed with ELISA and Western blot techniques. The peptide exhibited cytotoxic effects in MCF7 cells at different doses and incubation times. The half maximum inhibitory concentration (IC_{50}) value of the peptide on MCF7 cells was calculated as 188 $\mu\text{g/ml}$. Protein levels of initiator caspase-9 and executioner caspase-7, which are important markers for determining whether the cytotoxic effects of the peptide are apoptosis-induced, were determined by ELISA test. Peptide doses were determined as 2X IC_{50} , IC_{50} and 1/2X IC_{50} . At the end of 24 hours incubation period, the amount of IC_{50} and 1/2X IC_{50} doses applied to the cells increased statistically. After 48 hours, an increase in caspase-9 was observed at 1/2X IC_{50} dose. The dose and time of increase in the amount of caspase-7 were IC_{50} and 48th hour incubation period. At the end of 72 hours of incubation, an increase in the amount of caspase-7 was observed in cells treated

with 2X IC50. According to Western blot results, the peptide increased the amount of caspase-7 in MCF7 cells after 24 hours of incubation, while the amount of cleaved caspase-7 increased after 48 hours of incubation. The designed peptide triggered apoptotic cell death in MCF7 cells.

KEYWORDS: Anticancer Peptide, Caspase, Drug Design, MCF7, Molecular Docking, Molecular Dynamic Simulation.

COMMITTEE: Assoc. Dr. Ece ŞİMŞEK

Assoc. Dr. Uğur BİLGE

Assoc. Dr. Mustafa YAVUZ

Prof. Dr. Deniz ŞİRİN

Asst. Prof. Dr. Deniz İRTEM KARTAL

ÖNSÖZ

Bilgisayar teknolojilerinin hızla gelişmesi, yazılım alanında yaşanan kayda değer ilerlemeler hayatın her alanında olduğu gibi yaşam bilimlerinde de önemli bir ilerlemeyi sağladı ve sağlamaya devam ediyor. Özellikle proteinler gibi karmaşık moleküllerin üç boyutlu yapısının çözülmesinde kullanılan deneysel yaklaşımlar (X-ışını, NMR, Kriyo-elektron mikroskop) çok fazla sayıda yapının ortaya çıkarılmasında önemli işler başarmaya devam etmektedir. Ancak hesaplamalı yapısal biyoloji alanındaki gelişmeler benzeri görülmemiş sayıda protein ve protein kompleksinin yapısal ve işlevsel karakterizasyonunun yanı sıra bu moleküllerin etkileşimlerinin ve işlevlerinin modüle edilmesini ve tasarlanmasını sağlamaktadır. Buna paralel olarak, hesaplama yaklaşımları da son birkaç yılda büyük bir hızla gelişmiştir. Hesaplama gücü artmakta ve daha karmaşık algoritmaların daha büyük ölçeklerde yürütülmesine olanak sağlamaktadır. Temel olarak makine öğrenimi veya derin öğrenmeye dayanan yeni teorik modeller ve algoritmalar, hesaplamalı yapısal biyolojinin birçok alanında yeni fiili standart haline gelmekte ve yüz milyonlarca protein yapısının tahmin edilmesini sağlamaktadır. 2020 yılının sonlarında itibaren AlphaFold'un ortaya çıkması ile proteinlerin üç boyutlu yapı tahmininde bir devrim yaşanmaktadır. Bir sonraki aşama proteinlerin konformasyonel topluluklarını ve mutasyonların genel protein yapısı üzerindeki etkilerini doğru bir şekilde tahmin etmektir.

Hastalıkla ilişkili proteinlerin yapılarının tahmin edilmesi tedavi anlayışımızı değiştirmiştir. Oluşumu, gelişimi ve ilerleyişi bakımından kendine özgü birçok kompleks basamağa sahip bir hastalık olan kanser günümüzde ölüm en yüksek olmaya devam ediyor. Bu nedenle bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemleri terapötik aday olabilecek proteinlerin etkileşimlerini docking ve moleküler dinamik simülasyon araçlarıyla ortaya çıkarılabilir. Bu etkileşimi hedef alarak tasarlanan antagonist veya agonistler yeni tedaviler için umut vadetmektedir. Geleneksel kemoterapötiklere kıyasla seçici ve normal hücreler için daha az toksiktirler.

Tümör hücrelerinde transferrinden bağımsız olarak demir alınımlarında rol oynayan SCARA5 transmembran bir proteindir. Hücre dışında bağlama bölgesi ve hücre içinde fokal adezyon kinaz proteini ile etkileşmektedir. Doğal ligandı olan L-Ferritin ile hücre dışında etkileşime girdikten sonra hücre içinde fokal adezyon kinaz serbest kalarak sinyal yolağı aracılığı ile tümörün hayatta kalması, göçü gibi durumlara neden olur.

Bu nedenle öncelikle SCARA5'in üç boyutlu yapısı hesaplamalı yapısal yöntemlerle ortaya çıkarıldı. SCARA5/L-Ferritin etkileşimi moleküler docking yöntemi ile belirlendi. Bu bölgenin etkileşimini inhibe edecek bir peptit tasarlanarak MCF7 hücreleri üzerinde denendi. Hücre canlılığı testi ile peptitin sitotoksik dozu belirlendi. Sitotoksik dozlarda hücre ölümü ile ilişkili kaspaz-7 ve kaspaz-9 protein miktarları ELISA ile kaspaz-7 ve kesilmiş kaspaz-7 protein seviyesi western blot yöntemi ile belirlendi.

Son yıllarda literatürde SCARA5'in kanserde biyobelirteç olarak kullanımına ilişkin çalışmalar artmaktadır. SCARA5'in hücre içi bölgede hangi sinyal yollarını tetiklediği özellikle fokal adezyon kinaz ile olan etkileşiminin aydınlatılması SCARA5'in biyolojik işlevi konusundaki bakışımızı derinden etkileyecektir.

Böyle güzel ve heyecanlı bir alanda bana çalışma fırsatı veren sadece akademik hayatımda değil sosyal hayatımda da bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e (Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü), tezimin *in silico* aşamalarını yapmamı sağlayan, enerjisi, bilgisi ve sabrıyla bana tüm desteğini sağlayan Doç. Dr. Outi Salo-Ahen'e (Abo Akademi Üniversitesi, Farmasötik Bilimler Laboratuvarı), tezimin *in vitro* çalışmalarını tamamladığım Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nın kurulmasını sağlayan, tecrübesini her daim aktaran Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a (Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü)'a ve laboratuvar ekibine, birlikte aynı laboratuvar da çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, tüm çalışmalarım da bana maddi manevi desteğini esirgemeyen, ablam Öğr. Gör. Esra TANYEL AKÇİT 'e (Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Diyaliz Bölümü), birlikte olduğumuz sürede çalışmaktan büyük keyif aldığım bu yolda ve her anlamda bana çok şey katan kardeşim Öğr. Gör. Serhat BOZKURT'a (Antalya Belek Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri), aynı laboratuvar da çalışmaktan mutluluk duyduğum, bilime ve hayata dair fikirlerini önemsedğim Majda LİCİNA'ya (Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı), aynı çatı altında çalışmaktan keyif aldığım Cemilenur ATAŞ'a (Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoteknoloji Doktora Programı), tezin tamamlanmasında çok büyük katkısı olan, gece gündüz demeden yardıma koşan, birlikte başladığımız bu yolda her daim her ne olursa olsun yanımda olduğunu bildiğim, zor zamanlarımda beni hiç yalnız bırakmayan can kardeşim Aykut KURUOĞLU'na (Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp Ve Genom Enstitüsü, Genom Bilimleri Ve Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Doktora Programı) western blot deneyleri için laboratuvarını açan Dr. Öğr. Üyesi Yavuz OKTAY'a (Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) ve OKTAY Lab. ekibine, tanıştığımız ilk günden bugüne her konuda yanımda olduğunu bildiğim, neşeli, enerjik kardeşim Bircan ÖNEL'e, sadece yazılımla ilgili sorunlarda değil her konuda bana deneyimlerini aktaran, bakış açımı hep geliştiren kardeşim Yiğit EFE'ye, yazılımla ilgili ve hayat görüşü ile ilgili fikirlerine hep kulak verdiğim kardeşim Mahmut Sami GÜRPINAR'a, bana desteğini her daim hissettiren kardeşim Edip ALÇELİK'e en derin teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2021-5512 nolu proje ile desteklenmiştir. Doktora dönemim boyunca desteklerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)-Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı'na teşekkür ediyorum.

Ayrıca sadece tez aşamasında değil hayatımın tüm evrelerinde beni koşulsuz destekleyen canım aileme, annem Gülmay KOÇAK'a babam Ehliman KOÇAK'a, abim Cihan KOÇAK'a, eşi Fadime KOÇAK'a, yeğenlerim Elif Yaren KOÇAK'a ve Alperen KOÇAK'a en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum. Doktora tezimi biricik aileme ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxxii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	5
2.1. Aminoasitler ve Proteinlerin Üç Boyutlu Yapıları.....	5
2.1.1. Tek harfli kod	5
2.2. Proteinlerin Birincil Yapısı	7
2.3. Proteinlerin İkincil Yapısı ve Omurga Konformasyonu	8
2.3.1. Ana zincir torsiyon açıları	8
2.3.2. Ramachandran plot	9
2.3.3. Alfa heliksler	10
2.3.4. 3 ₁₀ -heliksler.....	12
2.3.5. Beta kırmalı tabakalar.....	12
2.3.6. İlmekler (coil) ve dönüşler.....	15
2.4. Süper İkincil Yapılar	16
2.4.1. Beta hairpinler	16
2.4.2. Beta köşeleri	17
2.4.3. Heliks hairpinler	18
2.4.4. Alfa alfa köşesi	19
2.4.5. Heliks turn heliks.....	20
2.4.6. Beta alfa beta motifleri	21
2.5. Yan Zincir Konformasyonu.....	22
2.6. Üçüncül Yapılar	23
2.7. Kuaterner Yapı	24
2.7.1. Kovalent olarak bağlı üçüncül domainler.....	25
2.7.2. Hetero multimerler.....	25

2.7.3. Homo multimerler	26
2.7.4. Daha büyük yapılar	26
2.8. Protein Katlanması Enerjisi ve Kinetiği	27
2.8.1. Protein katlanması	28
2.8.2. Proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları	30
2.9. Proteinlerin Yapı ve Stabilitésinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	31
2.9.1. X-ışını kristalografisi	32
2.9.2. X-ışını serbest elektron lazerleri (XFEL)	33
2.9.3. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi	33
2.9.4. Kriyo-elektron mikroskopisi.....	34
2.9.5. Bütünleştirici modelleme.....	35
2.10. <i>in silico</i> Yöntemler Kullanarak Protein Yapı Tahmini	35
2.10.1. Protein yapısı tahmini için geleneksel yaklaşımlar	36
2.10.1.1. Homoloji modelleme	37
2.10.1.2. İş parçası (threading).....	39
2.10.1.3. Şablonsuz modelleme/serbest modelleme (ŞM/SM).....	40
2.10.2. Protein yapısı tahmini için yapay zeka teknikleri	44
2.11. Protein Yapısı Tahmin Yöntemlerinin Değerlendirilmesi	44
2.12. Yapısal Kararlılıkta Moleküler Etkileşimlerin Rolü	45
2.12.1. Protein yapısındaki tuz köprüleri.....	46
2.12.2. Proteinlerdeki iyon çiftleri.....	46
2.12.3. Dipol-dipol etkileşimleri.....	47
2.12.4. Pi-Pi (II-II kümeleme) etkileşimleri.....	47
2.13. Geleceğin İlaçlarının Keşfi.....	47
2.14. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı	48
2.15. Yapı Temelli İlaç Tasarımı.....	51
2.15.1. Hedef tanımlama.....	52
2.15.2. Makromolekül yapının modellenmesi ve görüntülenmesi	52
2.15.3. Bağlanma bölgesi tahmini ve analizi	53
2.15.4. Moleküler yerleştirme (kenetlenme).....	53
2.15.4.1. Ligand konformasyon stratejileri.....	56
2.15.4.2. Moleküler yerleştirme yaklaşımları	57

2.15.4.3. Rijit ligand ve rijit reseptörün yerleştirmesi	58
2.15.4.4. Esnek ligand ve rijit reseptörün yerleştirmesi.....	59
2.15.4.5. Esnek ligand ve esnek reseptörün yerleştirmesi	59
2.15.4.6. Moleküler yerleştirmenin doğrulaması	61
2.15.4.7. Yerleştirme sonuçlarının analizi	62
2.15.4.8. Yerleştirme algoritmalarının sınırlamaları ve geleceği.....	62
2.15.4.9. Yerleştirme alanındaki önemli gelişmeler	62
2.16. Ligand Temelli Dizayn.....	63
2.16.1. Farmakor modelleme	63
2.16.2. Kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR).....	63
2.16.2.1. CoMFA	64
2.16.2.2. CoMSIA.....	64
2.17. ADMET Tahmini ve Analizi.....	64
2.18. Moleküler Dinamik Simülasyon	65
2.18.1. MD simülasyonun prensibi.....	66
2.18.2. MD simülasyon analizi için yapısal parametreler	68
2.18.2.1. RMSD	68
2.18.2.2. RMSF	68
2.18.2.3. Dönme yarıçapı	68
2.18.2.4. Protein-ligand bağlantıları	68
2.18.2.5. SASA	69
2.18.2.6. Temel bileşen analizi veya temel dinamikler.....	69
2.18.2.7. İkincil yapı analizi.....	69
2.19. Kanser.....	69
2.19.1. Meme kanseri.....	75
2.19.2. Meme kanserinde güncel tedavi yaklaşımları.....	75
2.19.2.1. Meme kanseri radyasyon terapisi.....	76
2.19.2.2. Meme brakiterapisi	77
2.19.2.3. Meme kanseri kemoterapileri	77
2.19.2.4. Meme kanseri endokrin terapisi.....	79
2.19.2.5. Meme karsinomu terapisinde hedefe yönelik tedaviler	80
2.19.2.6. Meme kanserinin cerrahi tedavisi	81

2.20. Meme Kanserinde Tümör Mikroçevresi	82
2.21. Epitelyal Mezankimal Geçiş (EMT)	82
2.22. Hedefe Yönelik Tedaviye Dirençte Src.....	82
2.23. Scavenger Reseptörler	83
2.23.1. Sınıf A.....	84
2.23.1.1. Sınıf A scavenger reseptör üyesi 5 (SCARA5).....	85
2.24. Anti Kanser Peptitler	86
3. MATERYAL VE METOD	91
3.1. <i>İn silico</i> Yöntemler	91
3.1.1. Aminoasit dizisi	91
3.1.2. İki boyutlu sekonder yapının tahmini	91
3.1.3. SRCR bölgesinin hesaplamalı yapısal modellenmesi.....	91
3.1.4. Global model iyileştirme ve enerji minimizasyonu.....	92
3.1.5. Model validasyonu.....	92
3.1.6. Post-translasyonel bölgelerin <i>in silico</i> tahmini.....	94
3.1.7. Farklı SRCR Domainlerinin moleküler dinamik simülasyon çalışmaları.....	94
3.1.8. Modellenmiş SRCR domain'inin deneysel yapı ile karşılaştırılması	94
3.1.9. Protein-protein docking yöntemi ile SRCR domaini ve L-Ferritin arasındaki etkileşimin belirlenmesi	95
3.1.9.1. L-Ferritin'in aminoasit dizisi ve üç boyutlu yapısına erişim sağlama....	95
3.1.9.2. SRCR domain'in ve L-Ferritin'in potansiyel bağlanma bölgelerinin karakterizasyonu	95
3.1.9.3. SRCR/L-Ferritin protein-protein docking çalışması.....	96
3.1.9.4. SRCR domain için tespit edilen bağlanma bölgelerine özgü peptidlerin tasarlanması ve moleküler docking çalışmaları	97
3.1.9.5. Docking sonuçlarının moleküler dinamik simülasyonla değerlendirilmesi.....	99
3.1.9.6. Peptitin farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerinin <i>in silico</i> tahmini	99
3.2. <i>İn vitro</i> Yöntemler	99

3.2.1. Hücreler ve kültür koşulları	99
3.2.2. Besiyerlerinin hazırlanması	99
3.2.2.1. % 10 FBS İçeren besiyeri hazırlanması	99
3.2.2.2. % 1 FBS içeren besiyeri hazırlanması.....	100
3.2.2.3. Dondurma besiyerinin hazırlanması.....	100
3.2.3. Peptitin hazırlanması	100
3.2.4. Hücrelerin deneyler için bölünmesi	100
3.2.4.1. Hücrelerin tripsinizasyonu	100
3.2.4.2. Hücrelerin proliferasyon deneyleri için 96-kuyucuklu plakalara bölünmesi	100
3.2.4.3. Hücrelerin ELIZA ve western blotlama deneyleri için 6 ve 12 kuyucuklu plakalara bölünmesi	101
3.2.5. Peptitin MCF7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	101
3.2.5.1. Peptit uygulamaları	101
3.2.5.2. WST-1 testi	101
3.2.5.3. Sülföradamin B (SRB) testi ile sitotoksosite gösterilmesi.....	102
3.2.6. Peptitin MCF7 hücrelerindeki Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 protein miktarlarındaki değişimin ELISA testi ile gösterilmesi	103
3.2.6.1. Peptit uygulamaları	103
3.2.6.2. Hücrelerin lizis edilmesi	103
3.2.6.3. Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 ELISA testi çalışmaları	103
3.2.7. Western blotlama çalışmaları	104
3.2.7.1. Hücre lizatı hazırlama	104
3.2.7.2. Örneklerdeki protein miktar tayini.....	104
3.2.7.3. Dikey elektroforez jeli için solüsyonların hazırlanması	105
3.2.7.4. SDS PAGE jel elektroforezi	106
3.2.7.5. Protein transferi.....	107
3.2.7.6. İmmünblotlama işlemi	107
3.2.7.7. Tespit işlemi (kemilüminesans).....	108
3.2.7.8. Membran stripleme ve beta aktin antikör işaretlenmesi.....	108
3.2.8. İstatistiksel analizler	108

4. BULGULAR.....	110
4.1. SCARA5 Proteinin SRCR Bölgesinin Sekonder Yapısı ve Topolojik Özellikleri.....	110
4.2. SRCR Bölgesinin Hesaplamalı Yapısal Modeli.....	112
4.3. SRCR Bölgesinin Altı Farklı Modelinin Enerji Minimizasyonu, Validasyonu ve Post-translasyonel Modifikasyonların Belirlenmesi.....	114
4.3.1. SRCR bölgesinin altı farklı modelinin enerji minimizasyonu ve validasyonu	114
4.3.2. SCARA5 proteininin post-translasyonel modifikasyonlarının tahmini.....	119
4.3.3. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyonu	120
4.4. SRCR Modelinin Deneysel Yapı ile Karşılaştırılması	122
4.5. SRCR/L-Ferritin Moleküler Docking Sonuçları	123
4.5.1. SRCR bölgesinin ve L-Ferritin'in potansiyel bağlanma yüzeyleri.....	123
4.5.2. SRCR/L-Ferritin'in docking sonuçları	124
4.6. SRCR Bölgesine Özgü Peptitlerin Tasarımı	129
4.6.1. SRCR domaini için tespit edilen bağlanma bölgelerine özgü tasarlanan peptidler	129
4.6.2. Peptit ve SRCR domain moleküler docking çalışması.....	129
4.6.3. SRCR ve peptit docking sonuçlarının moleküler dinamik simülasyonla değerlendirilmesi	134
4.6.4. Peptitin farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerinin tahmini	135
4.7. Peptitin MCF7 Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik ve Proliferatif Etkileri	136
4.8. Peptitin MCF7 Hücre Hattının Canlılığı Üzerine Gösterdiği Etkinin Sülforadamin B Testi Sonuçları	145
4.9. Peptitin MCF7 hücrelerindeki Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 Protein Miktarı Üzerine Etkileri	147
4.9.1. Peptitin MCF7 hücrelerindeki Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 protein miktarının ELISA test sonuçları.....	148
4.10. Western Blot Sonuçları	153
5. TARTIŞMA	156
6. SONUÇLAR	166

7. KAYNAKLAR	169
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “SCARA5 Reseptörünün SRCR Bölgesinin Hesaplamalı Yapısal Modellenmesi Ve Bilgisayar Temelli İlaç Tasarım Yöntemi Kullanılarak Geliştirilecek Reseptör Bloker'ının MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattındaki Sitotoksik Etkilerinin İn Vitro Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

08/02/2024

Orhan KOÇAK

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

-	: Tire
%	: Yüzde
()	: Parantez
/	: Bölü
[]	: Köşeli Parantez
~	: Yaklaşık
+	: Artı
<	: Küçüktür
=	: Eşittir
>	: Büyüktür
±	: Artı Eksi
≈	: Yaklaşık Eşittir
≤	: Küçük eşit
°	: Derece
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
Å	: Angstrom
BrCN	: Siyanojen Bromür
C	: Karbon
C°	: Santigrat Derece
C°	: Santigrat Derece

Ca	: Kalsiyum
Ca ²⁺	: Kalsiyum İyonu
CH ₃	: Metil
Cl	: Klor
CO	: Karbonil
Da	: Dalton
Fe	: Demir
fs	: Femtosaniye
gr	: Gram
H	: Entalpi
H	: Hidrojen
K	: Potasyum
kDa	: Kilodalton
kj	: Kilojul
kT	: Boltzmann Sabiti
kV	: Kilovolt
L	: Litre
log	: Logaritma
MDa	: Megadalton
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mol	:mol
N	: Azot
N	: Parçacık Sayısı

Na	: Sodyum
NH	: Amino
nm	: Nanometre
nm ³	: Nanometre K�p
O	: Oksijen
OH	: Hidroksil
P	: Basınç
pH	: Hidrojen Potansiyeli
pK _a	: Asidik İyonlaşma Sabiti
pK _r	: Yan Zincir Aminoasit pK _a 'sı
ps	: Pikosaniye
R	: Rezidü
R _g	: Dönme Yarıçapı
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RT	: Gaz sabiti
S	: Entropi
s	: saniye
S _f	: Katlanmış Protein Entropisi
SH	: Tiyol
SO ₄	: Sülfat
S _u	: Katlanmamış Protein Entropisi
T	: Sıcaklık
V	: Hacim
x	: Çarpı
Zn	: Çinko
�	: Alfa

β : Beta

γ : Gama

δ : Delta

Δ : Delta

$\Delta G, dG$: Gibbs Serbest Enerjisi

ε : Epsilon

ε : Epsilon

θ : Teta

θ : Teta

κ : Kappa

λ : Lamda

Π : Pi

Σ, σ : Sigma

Φ, φ : Phi

ψ : Psi

ω : Omega

Bu tezde ondalık yazım ayırıcı olarak nokta (.) kullanılmıştır.

Kısaltmalar

2D : İki Boyutlu

3D : Üç Boyutlu

A549 : İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı

AAV2 : Adeno ilişkili Virüs Tip 2

ABC : ATP Bağlayan Kaset Geni

ADMET : Emilim, Dağılım, Metabolizma, Atılım, Toksikite

ADP	: Adenozin Difostaf
AGE	: Glukasyon Son Ürünleri
AKP	: Anti Kanser Peptit
Akt	: Protein Kinaz B
AMP	: Adenozin Monofostaf
APBS	: Adaptif Poisson-Boltzmann Çözücü
APS	: Amonyum Persülfat
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin Trifostat
ATP	: Adenozin Trifostat
ATP	: Adenozin Trifostat
Bax	: Apoptoz Düzenleyici Protein
BCA	: Bikinkoninik Asit
Bcl-2	: Apoptoz Düzenleyici Protein
BH4	: Bcl-2 Protein Bölgesi
BIRD2	: Bcl-2 IP3 Reseptör Engelleyici-2
BOILED-Egg	: Beyin veya Bağırsak Tahmini Geçirgenlik Yöntemi
BRCA	: Meme Kanseri Duyarlılık Proteini Kodlayan Gen
BRCT2	: Nibrin Protein Bölgesi
BSA	: Sığır Serum Albumin
CADD	: Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
CASP	: Protein Yapı Tahmini Tekniklerinin Kritik Değerlendirmesi
CATH	: Protein Bölgelerinin Evrimsel İlişkileri ile İlgili Veritabanı
CCD	: Yüklü Birleştirilmiş Cihaz Dedektörleri
CD133	: Promin-1 Proteini
CD36	: Trombosit Glikoprotein 4'ü Kodlayan Gen

cDNA	: Komplementer DNA
CFTR	: Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Regülatörü
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
c-MET	: Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü
CoMFA	: Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizi
CoMSIA	: Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndeksleri Analizi
COO	: Karboksilat
CpG	: DNA Dizisindeki Bölgeler
CPORT	: Geçici Komplekslerdeki Arayüz Rezidülerinin Konsensüs Tahmini
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Besiyeri
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DÖ	: Derin Öğrenme
DTT	: Ditiyotritol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ECL	: Geliştirilmiş Kemilüminesans
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<i>EGFR</i>	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Geni
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi
EM	: Elektron Mikroskop
EMDB	: Elektron Mikroskobu Veri Bankası
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
ER	: Endoplazmik Retikulum
ER	: Östrojen Reseptör
ErbB1	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<i>ERBB2</i>	: Reseptör Tirozin-Protein Kinaz erbB-2'Yİ Kodlayan Gen

ERK1/2	: Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz 1/2
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
Fas	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü Süper Aile Üyesi 6
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FFT	: Hızlı Fourier Dönüşümü
<i>FLT3</i>	: Fms Benzeri Tirozin Kinaz 3 Geni
FSSP	: Protein Yapılarını 3D Olarak Karşılaştırmak İçin Ağ Hizmeti
FTH	: Ferritin Ağır Zincir
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
FTL	: Ferritin Hafif Zincir
GA	: Genetik Algoritma
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GDT_HA	: Evrensel Mesafe Testi Yüksek Doğruluk Puanı
GDT_TS	: Evrensel Uzaklık Testi Toplam Puanı
G-QSAR	: Grup ya da Fragment Temelli Kantitatif Yapı Aktivite İlişkisi
GroEl	: Yardımcı şaperonin
GroES	: Şaperonin 10
GSH	: Glutasyon
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Glutasyon disülfid
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HB	: Hidrojen Bağı
HCl	: Hidroklorik Asit

HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HIF	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktörler
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HQSAR	: Hologram Kantitatif Yapı Aktivite İlişkisi
HRP	: At Turpu Peroksidaz
Hsc70	: Isı Şok Protein 70 kDa
HSK	: Hepatoselüler Karsinoma
Hsp90	: Isı Şok Protein 90
Hsp90	: Isı Şok Protein 90 kDa
IC ₅₀	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
IDDT	: Yerel Mesafe Farkı Testi
IgM	: İmmünglobulin M
IKK	: NF-κB kinaz İnhibitörü
IP3R	: İnositol 1,4,5-Trisfosfat Reseptörü
IPS	: İzotropik Periyodik Toplam
İκB	: NF-κB İnhibitörü
İLOP	: Dahili log P Yöntemi
JAK	: Trozin Protein Kinaz
KDEL motif	: Lizin-Aspartik asit-Glutamik asit-Lösün motifi
<i>KIT</i>	: Proto-onkogen c-KIT Geni
KKH	: Kanser Kök Hücresi
LBDD	: Ligand Tabanlı İlaç Tasarımı
M	: Mesafe
MC	: Monte Carlo
MCF7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MD	: Moleküler Dinamik

<i>MDM2</i>	: E3 Ubikitin Protein Ligaz Mdm2
<i>MDM4</i>	: Mdm4 Proteini
MD-MB-231	: İnsan Meme Kanser Hücre Hattı
MERTK M2	: M2 Makrofaj Üzerinde Mer Proto-Onkogen Tirozin Kinaz
MIA-QSAR	: Çok Değişkenli Görüntü Analizi Kantitatif Yapı Aktivite İlişkisi
MM/GBSA	: Moleküler Mekanik Genelleştirilmiş Born Yüzey Alan Solvasyonu
MM/PBSA	: Moleküler Mekanik Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı
MMP-2	: Matriks Metalloproteinaz-2
MMP-3	: Matriks Metalloproteinaz-3
MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz-9
MÖ	: Makine Öğrenimi
mRNA	: Mesajcı RNA
mRNA	: Mesajcı RNA
mTOR	: Serin/Treonin Protein Kinaz
NAD ⁺	: Nikotin Adenin Dinükleotid, Oksitlenmiş
NADH + H ⁺	: Nikotin Adenin Dinükleotid, İndirgenmiş
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NAK	: Neo-adjuvan Kemoterapi
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NH ₂	: Amino
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NO	: Nitrik Oksit

OD	: Optik Dansite
ÖE	: Özel Etkileşim
ÖSHK	: Özofageal Skuamöz Hücreli Karsinom
p130CAS	: Meme Kanseri Anti-Östrojen Direnç Proteini 1
p27kip1	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
PBC	: Periyodik Sınır Koşulu
PBS	: Fosfat Tamponu
PC	: Temel Bileşen
PDB	: Protein Veri Bankası
<i>PDGFR</i>	: Trombosit Türevli Büyüme Faktörü Reseptörü Geni
PDI	: Protein Disülfid Polimeraz
PI3K	: Fosfoinozidit 3-Kinaz
PME	: Parçacık Ağı Ewald
PR	: Progesteron Reseptör
PS	: Pi Kümeleme
pSrc	: Fosforile Src
PVDF	: Poliviniliden Difluorür
QMEAN	: Kalitatif Model Enerji Analizi
QMEANDisCo	: Kalitatif Model Enerji Analizi Mesafe Kısıtlamaları
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR
QSAR	: Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi
<i>RB</i>	: Retinoblastoma Geni
RMSD	: Kök Ortalama Kare Sapma
RMSF	: Kök Ortalama Kare Dalgalanma
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri

RT-PCR	: Ters-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAM	: S-Adenosil Metiyonin
SASA	: Çözücü İle Erişilebilen Yüzey Alanı
SBDD	: Yapı Tabanlı İlaç Tasarımı
SBK	: Siklin Bağımlı Kinaz
SBKİ	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
SCARA5	: Scavenger Reseptör Sınıf A Üye 5
SCOP	: Proteinlerin Yapısal Sınıflandırması
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
Siklin B1	: G2/Mitotik Spesifik Protein
Siklin D1	: G1/S Spesifik Protein
Siklin E1	: G1/S Spesifik Protein Asit
SMILES	: Sadeleştirilmiş Moleküler Girdi Satırı Girişi
SR	: Scavenger Reseptör
SRB	: Sülfuradamin B
Src	: Proto-onkogen Tirozin Protein Kinaz
SRCR	: Scavenger Reseptörü Sistein Açısından Zengin Bölge
SSE	: İkincil Yapı Elemanları
STAT	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
T0	: Başlangıç Zamanı
TBS	: Tris Tuz Tamponu
TBST	: Tween-20 Eklenmiş Tris Tuz Tamponu
TCA	: Trikloroasetik Asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
THSD7A	: Trombospondin Tip 1 Domain İçeren 7A
TIM barrel	: Trioz-Fosfat İzomeraz

TK	: Tuz Köprüsü
TM	: Şablon Modelleme
TME	: Tümör Mikro Çevresi
TP53	: p53 Geni
UDP	: Üridin Difosfat
UniProtKB	: Evrensel Protein Kaynağı Bilgi Bankası
UV	: Ultraviyole
VdW	: Van der Waals
VEGF-A	: Damar Endotel Büyüme Faktörü A
VEGF-C	: Damar Endotel Büyüme Faktörü A
VEGFR2	: Damar Endotel Büyüme Faktör Reseptörü 2 Geni
WST-1	: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum
WT	: Willms Tümör Protein Geni
XFEL	: X-ışını Serbest Elektron Lazerleri
Y	: Yakınlık
YK	: Yüzey Komplementeri
YZ	: Yapay Zeka

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aminoasitin yapısal formülü	5
Şekil 2.2. Amino asitlerin peptit ve proteinlere polikondenzasyonu	7
Şekil 2.3. Peptit bağı etrafında cis-trans-izomeri	8
Şekil 2.4. Peptit torsiyon açıları	9
Şekil 2.5. Ramachandran grafiği	10
Şekil 2.6. Bir alfa heliksin yapısı	11
Şekil 2.7. 3 ₁₀ heliksin küçük bir uzantısı	12
Şekil 2.8. Tek bir beta ipliğinin görünümü	13
Şekil 2.9. Farklı beta kırmalı tabaka türleri	14
Şekil 2.10. Bir beta kırmalı tabakasının görünümü	15
Şekil 2.11. Beta (ters) dönüş yapıları	16
Şekil 2.12. Bir beta hairpinin şematik görünümü	17
Şekil 2.13. Beta köşesi ve beta hairpin içeren yapı elemanı	18
Şekil 2.14. İki amino asitten oluşan bir heliks hairpin örneği	19
Şekil 2.15. Parvalbumin alpha'da EF eli	20
Şekil 2.16. Beta-alfa-beta motifi	21
Şekil 2.17. Amino asit yan zincirlerindeki atom isimlendirmesi ve yan zincir dihedralleri	23
Şekil 2.18. Hemoglobin animasyon görünümü	25
Şekil 2.19. Homo-multimer oluşturan proteinlerin dört örneği	26
Şekil 2.20. L1 protein papillomavirus 16'nın (homo-60-mer) animasyon görünümü	27
Şekil 2.21. Protein katlanması serbest enerjiyi (G) azaltır	27
Şekil 2.22. HIV-proteazın (PDB kodu 1DAZ) dimerizasyonu	30
Şekil 2.23. Beta-galaktosidazın kriyo-EM haritası	35
Şekil 2.24. Homoloji modelleme akış şeması	38

Şekil 2.25. Öncül optimizasyon döngüsü	48
Şekil 2.26. İlaç keşfi ve tasarımı da moleküler modelleme yaklaşımlarının uygulanması	51
Şekil 2.27. Moleküler yerleştirmede kullanılan arama algoritmaları ve skora fonksiyonları	55
Şekil 2.28. Baēlanmıř ve baēlanmamıř etkileşimleri temsil eden bir kuvvet alanının bileşenleri	67
Şekil 2.29. Kanserin ayırt edici özellikleri	71
Şekil 2.30. Meme karsinomu tanısında kullanılan farklı kemoterapötikler.....	78
Şekil 2.31. AKP'lerin yapısal sınıflandırmasının şematik diyagramı	87
Şekil 3.1. HADDCOK sunucu görünümü	97
Şekil 3.2. Protein konsantrasyonlarının standart grafiēi.....	105
Şekil 4.1. SRCR bölgesinin sekonder yapısı	110
Şekil 4.2. SCARA5'in topoloji grafiēi	111
Şekil 4.3. SCARA5'in farklı topoloji grafiēi.....	112
Şekil 4.4. SRCR bölgesinin altı farklı yaklaşımdan elde edilen üçüncül katlanma yapıları.....	113
Şekil 4.5. Altı farklı SRCR modelinin Z skorlarının karşılaştırılması.....	115
Şekil 4.6. Modellerin QMEAN deēerlendirmesi	116
Şekil 4.7. SRCR bölgesinin hesaplamalı yapısal modeli.....	117
Şekil 4.8. SRCR bölgesinin Ramachandran grafiēi.....	118
Şekil 4.9. PhosphoSitePlus'a göre SCARA5'teki post-translasyonel modifikasyonlar ..	119
Şekil 4.10. NetNGlyc 1.0'a göre SCARA5'teki N-glikosilasyon bölgeleri	119
Şekil 4.11. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyon sonrası RMSD grafiēi ..	120
Şekil 4.12. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyon sonrası RMSF grafiēi...	121
Şekil 4.13. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyon sonrası SSE grafiēi	121
Şekil 4.14. SCARA5'in SRCR bölgesinin Robetta cm modeli (mor) ve AlphaFold modelinin (turuncu) kristal yapı (camēöbeēi) (PDB ID: 7C00) ile karşılaştırılması....	122

Şekil 4.15. SRCR bölgesinin elektrostatik potansiyel görseli	123
Şekil 4.16. L-Ferritin'in elektrostatik potansiyel görseli	124
Şekil 4.17. SRCR/L-Ferritin HADDOCK skoru	125
Şekil 4.18. SRCR/L-Ferritin etkileşim bölgesi	125
Şekil 4.19. SRCR/L-Ferritin etkileşiminin olduğu rezidüleri	129
Şekil 4.20. Peptitin SRCR bölgesi üzerinde gerçekleştirdiği bağlanma pozları.....	130
Şekil 4.21. SRCR-peptit etkileşiminin görseli.....	134
Şekil 4.22. SRCR bölgesinin tasarların peptit bağlanmadan (solda) ve peptidin bağlandıktan sonraki (sağda) RMSD grafiği	134
Şekil 4.23. SRCR bölgesinin peptit bağlanmadan (solda) ve peptidin bağlandıktan sonraki (sağda) RMSF grafiği.....	135
Şekil 4.24. SRCR bölgesinin peptit bağlanmadan (solda) ve peptidin bağlandıktan sonraki (sağda) ikincil yapı elemanları durum grafiği	135
Şekil 4.25. Peptitin 1. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (**, $p \leq 0.01$; kontrole kıyasla).....	137
Şekil 4.26. Peptitin 1. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla).....	137
Şekil 4.27. Peptitin 1. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; kontrole kıyasla)...	138
Şekil 4.28. Peptitin 2. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).	139
Şekil 4.29. Peptitin 2. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; **, $p \leq 0.01$; kontrole kıyasla).....	139
Şekil 4.30. Peptitin 2. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$ kontrole kıyasla).	140
Şekil 4.31. Peptitin 3. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).....	141
Şekil 4.32. Peptitin 3. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla).....	141

Şekil 4.33. Peptitin 3. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).	142
Şekil 4.34. Peptitin 3. Set 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla).	142
Şekil 4.35. Peptitin 3. Set 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla).	143
Şekil 4.36. Peptitin 4. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla).	144
Şekil 4.37. Peptitin 4. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla).	144
Şekil 4.38. Peptitin 4. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).	145
Şekil 4.39. Peptitin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisinin SRB testi grafiği (*, $p \leq 0,05$; kontrole kıyasla).	146
Şekil 4.40. Peptitin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisinin SRB testi grafiği	146
Şekil 4.41. Peptitin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisinin SRB testi grafiği (****, $p \leq 0,00001$; (***, $p \leq 0,001$; *, $p \leq 0,05$; kontrole kıyasla).	147
Şekil 4.42. Peptitin MCF7 hücrelerindeki IC50 konsantrasyonu	148
Şekil 4.43. 24 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-7 miktarı üzerine etkisi.	149
Şekil 4.44. 48 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-7 miktarı üzerine etkisi.	150
Şekil 4.45. 72 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-7 miktarı üzerine etkisi.	150
Şekil 4.46. 24 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-9 miktarı üzerine etkisi.	151
Şekil 4.47. 48 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-9 miktarı üzerine etkisi.	152
Şekil 4.48. 72 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-9 miktarı üzerine etkisi.	153

Şekil 4.49. Peptit dozlarının MCF7 hücrelerinde iki farklı inkübasyon süreleri sonunda kaspaz-7 ve kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarlarındaki değişimin bant görüntüsü.....	153
Şekil 4.50. MCF7 hücrelerinde peptit dozlarının kaspaz-7 enzim miktarları üzerindeki değişimi.	154
Şekil 4.51. MCF7 hücrelerinde peptit dozlarının kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarları üzerindeki değişimi.	154
Şekil 5.1. Antikanser peptit etki mekanizmaları: mitokondriyal ilişkili yollar ve ölüm reseptörüyle indüklenen yollar.....	157



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Aminoasitlerin üçlü ve tekli kod gösterimleri	6
Çizelge 2.2. Protein modelleme için yöntemler	43
Çizelge 2.3. İlaç keşfinde kullanılan veri tabanları.....	52
Çizelge 2.4. İlaç keşfinde kullanılan ve çok atıf alan moleküler yerleştirme programlarının bir özeti.....	54
Çizelge 2.5. Amino asit rezidülerinin kanser hücrelerindeki AKP etkileri üzerindeki rolü.	89
Çizelge 4.1. Altı farklı modelin beş farklı validasyon programı ile karşılaştırılması...	114
Çizelge 4.2. Altı farklı SRCR modelinin QMEANDisCo değerleri.....	117
Çizelge 4.3. İnsan SCARA5 SRCR domain modellerinin kristal yapı ile yapısal hizalanması.....	123
Çizelge 4.4. SRCR/L- Ferritin docking sonrası etkileşim gösteren rezidüler	126
Çizelge 4.5. Peptit SRCR etkileşim rezidüleri.....	131
Çizelge 4.6. Peptitin farmakokinetik ve farmakolojik özellikleri.....	136

1. GİRİŞ

Bir hastalığın biyolojik kökeni, aslında o hastalığın modern tedavisinin temelini oluşturur. İlk zamanlarda, doğal ürünler tedavi olarak veya semptomları hafifletmek için kullanılmıştır. Bilim ve teknolojiye ilerlemeler, belirli bir hastalıkta doğrudan veya dolaylı rol oynayan makromoleküllerin keşfedilmesine yol açmıştır. Bu keşifler de bilim insanlarını, var olanlardan daha aktif yeni biyoaktif bileşikler tasarlamaya ve sentezlemeye yönlendirdi. Ancak, ilaç olarak kullanılabilecek bir bileşiğin piyasaya sürülmesi belirli adımlardan oluşan zorlu bir süreçtir. Aynı zamanda muazzam miktarda iş gücü, zaman ve bütçe gereksinimi vardır. 2009 ve 2018 yılları arasında bir ilacın tasarımı ve keşfinin ortalama maliyetinin 2,8 milyar dolara kadar çıktığı bildirilmiştir (Wouters vd. 2020).

Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (Computer-aided drug design, CADD) stratejileri, modern ilaç keşfi ve geliştirilmesinde vazgeçilmez araçlar haline gelmiştir. Akademiklerin yanı sıra, büyük ve küçük ölçekli ilaç ve biyoteknoloji şirketleri, biyoaktif bileşiklerin keşfine veya optimizasyonuna yardımcı olmak için akıllı yazılımlar kullanmaktadır. CADD teknolojileri kullanılarak farklı aşamalarda birçok ilaç keşfedilmiş ve/veya optimize edilmiştir. Bunlara Aliskiren, Boceprevir, Captopril, Dorzolamide, Nilotrexed, Oseltamivir, Rupintrivir, Saquinavir ve Zanamivir gibi ilaçlar da dahildir, ancak bunlarla sınırlı değildir (Talele vd. 2010).

CADD kabaca iki kategoriye ayrılabilir: yapı tabanlı ilaç tasarımı (Structure-based drug design, SBDD) ve ligand tabanlı ilaç tasarımı (Ligand-based drug design, LBDD). Hedef makromolekülün 3D yapısı bilinmiyorsa veya homoloji modellemesi kullanılarak oluşturulamıyorsa, o zaman molekülün ligandı baz alınarak LBDD araçları kullanılabilir. Örnek olarak, kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (Quantitative structure-activity relation, QSAR) onlarca yıldır kullanılmaktadır. Bu yöntemde, biyolojik aktiviteyi ligandların tahmin edilen parametrelerinin/tanımlayıcılarının bir fonksiyonu olarak ilişkilendiren bir denklem oluşturulur (Ece ve Sevin 2010). Böylece bu yöntem, laboratuvar deneylerinden önce bir bileşiğin aktivitesini tahmin edebilmemizi sağlar.

Sık kullanılan bir diğer LBDD yöntemi de farmakofor çalışmalarıdır. Ligandların bir makromolekül tarafından moleküler olarak tanınmasında kritik olan moleküler özellikleri vardır (hidrojen bağı alıcı/verici, aromatik, hidrofobik, iyonize edilebilirlik gibi). SBDD kullanılarak iyi bir farmakofor da oluşturulabilir. Ligandların kritik amino asit rezidüleri ile bağlanmasında gerekli olan özellikler ile hedef biyolojik makromolekülün bağlanma bölgesi özellikleri yardımıyla bir farmakofor oluşturulur. Bir farmakofor, milyonlarca (hatta milyarlarca) molekülden oluşan bir veri tabanından daha fazla optimizasyon ve test için ilaç adayları olarak (sanal tarama) kullanılabilirken, genellikle sadece binlerce bileşik moleküler docking kullanılarak taranır. SBDD'nin bir parçası olan moleküler dinamik simülasyon çalışmaları ise bir makromoleküler sistemin konformasyonlarını, dalgalanmalarını ve dinamiklerini tahmin edebilmek için yani biyomoleküllerin simülasyonunu yapmak için sıklıkla kullanılır. Geçmiş 1950 yılına kadar uzanmasına rağmen, CADD yönteminde yapay zeka (YZ) kullanımına son yıllarda başlanmıştır. Yüksek performanslı hesaplamanın ilerlemesine paralel olarak, birçok karmaşık problem CADD araçlarının bir kombinasyonu kullanılarak yapay zeka yardımıyla kolayca çözülebilir (Turing 1950; Godwin vd. 2016; Yang vd. 2019).

Söz konusu küçük moleküllerin veya makromoleküllerin yapısal özelliklerini ve konformasyonlarını hesaplamak için farklı algoritmalar kullanılır (Patrick 2023). Moleküler mekanikte kullanılan denklemler klasik fizik yasalarına dayanmaktadır. Moleküler mekanik, bileşikler atomları küre ve bağları yay olarak basitleştirir. Bu yaklaşımla, büyük sistemlerin (örneğin proteinler) birçok etkileşimi ve enerjisi, elektronlar dikkate alınmadığı için daha az hesaplama süresi ve kaynakla kolayca hesaplanabilir. Buna karşılık, kuantum mekaniği hesaplamalarının uygulanmasını gerektiren küçük sistemlerde, elektronların bileşik çekirdekleri ile etkileşimleri de dikkate alınmalıdır. CADD hızlı bir gelişim alanı olmaya devam etmektedir. Ancak, herhangi bir özelliği veya karmaşık bir sistemi tahmin etmeden önce her adım mutlaka doğrulanmalıdır. İç doğrulama (moleküler yerleştirmede, Kök Ortalama Kare Sapması, RMSD (Root Mean Square Deviation)), çapraz doğrulama, 2akros doğrulaması ve öğrenci t-testi (2D veya 3D QSAR’da), sağlam ilk geliştirme, alıcı işletim karakteristiği, alıcı işletim karakteristiği eğrisinin Boltzman ile geliştirilmiş ayrımı ve zenginleştirme faktörü vb. (sanal taramada) ilk olarak değerlendirilmesi gereken doğrulama/istatistiksel parametrelerden sadece birkaçıdır (Ece 2023).

CADD teknolojileri özellikle kanser gibi kompleks hastalıkların tedavisinde büyük ilgi görmektedir. Kanser, birçok farklı nedenden kaynaklanabilen karmaşık bir hastalıktır ve ilerlemesi ve yayılması birden fazla faktörden etkilenir. Kalıtsal ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimler, normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesine yol açabilir ve bu hücreler daha sonra büyüyerek çevre dokuları istila edebilir ve diğer organlara yayılabilir (Fares vd. 2020).

Mevcut kanser tedavilerine karşı direnç gelişimi ise giderek artan bir endişe kaynağıdır. Bu direnç, kanser hücrelerinin evrimi ve kemoterapiye karşı direnç geliştirme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, ilaç direncinin üstesinden gelmek için farklı yolları hedef alan ve farklı etki mekanizmaları kullanan yeni tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Son birkaç yılda, tümör oluşumunu önlemek ve tümör yükünü azaltmak için yenilikçi yaklaşımlar sunan çok sayıda terapötik hedef tanımlanmıştır. Kanser hastalarına etkili tedaviler sağlamak için, geleneksel ilaç keşfi, sağlıklı hücrelere en az zarar vererek kanser hücrelerini yok edebilecek ilaçları tasarlamak ve geliştirmek için kullanılmıştır. Bu süreç, hedeflerin belirlenmesini, bileşiklerin kimyasal sentezini, *in vitro* ve hayvan modellerinde prelinik testleri ve toksisite değerlendirmesini içerir. Başarılı bileşikler daha sonra, hedef hasta popülasyonundaki güvenlik ve etkinliklerini değerlendirmek için insanlarda klinik deneylere tabi tutulur ve bunların tamamlanması birkaç yıl sürebilir (Cha vd. 2018; Shao vd. 2022; Iwaloye vd. 2023).

CADD içeren hesaplama yöntemleri, yeni anti-kanser ilaçlarının tasarımında ve keşfinde giderek daha önemli hale gelmiştir. Bu yöntem Potansiyel ilaç bileşikleri ile biyolojik hedefler arasındaki etkileşimleri modellemek ve tahmin etmek için iyi bir araçtır (Iwaloye vd. 2023).

Çöpçü reseptör, sınıf A üye 5 (scavenger receptor class A member 5, SCARA5)’in yakın zamanda kanserlerde son derece önemli olduğu ve tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Liu vd. 2022; Lu vd. 2023a). Bunun aksine tümörü teşvik ettiğine dair sunulan çalışma da literatürde mevcuttur (Jumai vd. 2022). Bir membran proteini olan SCARA5 doğal ligandı olan L-Ferritin ile etkileşime girdiğinde hücre içi moleküler sinyal yolağını tetiklemektedir. Bu yolak FAK/Src/p130CAS kompleksinin

fosforilasyonu ile başlar ve kanser hücrelerinin canlılığı, proliferasyonu, hareketliliği, hücre döngüsünün devamının sağlanması, anjiyogenez, metastaz ve epitel-mezanşimal transformasyon gibi tümörün agresifliğinden sorumlu pek çok farklı mekanizmayla ilişkili olduğu bilinmektedir (Huang vd. 2010b).

Bu tez çalışmasının temel amacı “SCARA5 reseptörünün L-ferritin ile etkileşimini engellemek üzere *in silico* yöntemler kullanılarak tasarlanacak peptitin *in vitro* sitotoksik etkilere sahip olabileceğini göstermektir”. Tasarlanan peptitin aminoasit kompozisyonu açısından değerlendirdiğimizde etkileşiminin engellenmesine bağlı olarak hücre ölüm yollarını tetikleyerek etki gösterebileceğini ön gördük. Bunun için öncelikle peptitin SCARA5 proteinini ifade ettiği bilinen MCF7 hücrelerinde doz taraması yapıldı. Apoptozun en önemli proteinlerinden olan kaspazların protein miktarları ELISA ve Western Blot yöntemleri ile çalışıldı.

Kaspazlar, programlı hücre ölümü ve inflamasyonda hayati rol oynayan korunmuş sistein proteaz enzim ailesi üyeleridir. Bu enzimler, sistein-aspartik proteazlar, sistein aspartazlar veya sisteine bağımlı aspartata yönelik proteazlar olarak da bilinir. Bir kaspaz, aktif bölgesinde bir aspartik asit rezidüsünden sonra bir hedef proteine saldıran nükleofilik bir sistein içerir. Bu saldırı, substrattaki belirli aspartik asit rezidülerinden sonra hedef proteinin kesilmesiyle sonuçlanır (Cookson ve Brennan 2001; McIlwain vd. 2013; Galluzzi vd. 2016; Sahoo vd. 2023).

Başlatıcı kaspazlar-8 ve -9 normalde inaktif prokaspaz monomerleri olarak bulunur ve bölünme yoluyla değil dimerizasyon yoluyla aktive edilir. Bu süreç, yukarı yönlü sinyal olaylarının kaspaz dimerizasyonunu ve aktivasyonunu indüklediği “indüklenmiş yakınlık modeli” olarak geliştirilir.

Cellat kaspazlar-3, -6 ve -7’nin uygunsuz aktivasyonu, başlatıcı kaspazlar tarafından kesilmesi gereken inaktif prokaspaz dimerleri olarak üretilmeleriyle önlenir. Büyük ve küçük alt birimler arasındaki bu kesilme, cellat kaspaz dimerinin iki aktif bölgesini bir araya getiren ve işlevsel bir olgun proteaz oluşturan konformasyonel bir değişikliğe izin verir. Aktive edildikten sonra, tek bir cellat kaspaz diğer yürütücü kaspazları parçalayıp aktive ederek kaspaz aktivasyonunun hızlandırılmış bir geri besleme döngüsüne yol açabilir (McIlwain vd. 2013). Bu bağlamda tez kapsamında hesaplamalı yöntemlerle tasarlanan peptitin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve bu etki ile ilişkili kaspaz enzim aktiviteleri *in vitro* değerlendirilmiştir.

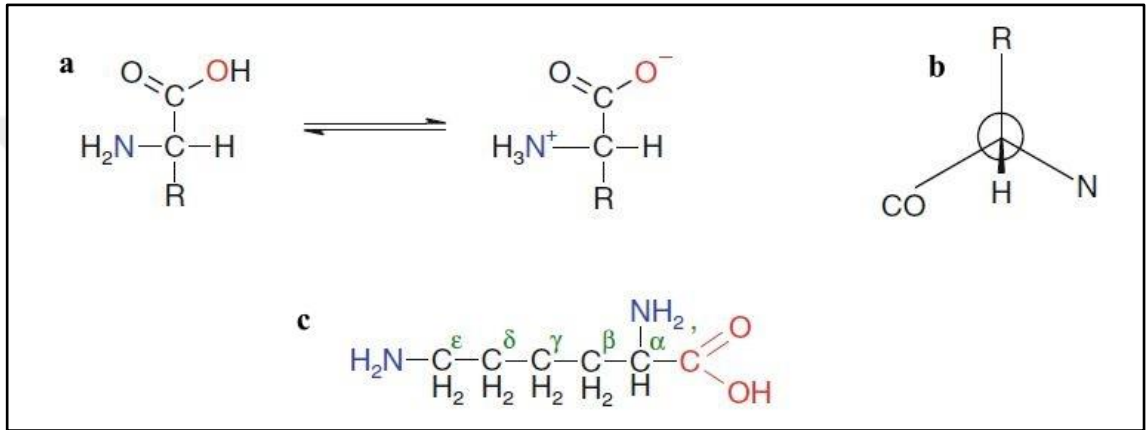
Bu tez çalışmasının temel amacı “SCARA5 reseptörünün L-ferritin ile etkileşimini engellemek üzere *in silico* yöntemler kullanılarak tasarlanacak peptitin *in vitro* sitotoksik etkilere sahip olabileceğini göstermektir”. Tasarlanan peptitin aminoasit kompozisyonu açısından değerlendirdiğimizde etkileşiminin engellenmesine bağlı olarak hücre ölüm yollarını tetikleyerek etki gösterebileceğini ön gördük. Bunun için öncelikle peptitin SCARA5 proteinini ifade ettiği bilinen MCF7 hücrelerinde doz taraması yapıldı. Apoptozun en önemli proteinlerinden olan kaspazların protein miktarları ELISA ve Western Blot yöntemleri ile çalışıldı.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Aminoasitler ve Proteinlerin Üç Boyutlu Yapıları

Amino asitler bir karboksi grubu, bir amino grubu, bir hidrojen atomu ve değişken bir yan zincir R (“rezidü”) içerir. En basit amino asit, R’nin bir hidrojen atomu olduğu glisindir. Gly’nin α -karbonu yalnızca üç farklı ligand taşıdığından, enantiyomerik değildir. Dolayısıyla glisin, diğer tüm amino asitlerin aksine kiral değildir (Şekil 2.1). Proteinlerde sadece L-amino asitler bulunur. Bununla birlikte, D-amino asitler bakteri hücre duvarında ve çeşitli antibiyotiklerde bulunur.



Şekil 2.1. Aminoasitin yapısal formülü; **a)** Bir amino asidin temel yapısı. Amino asitler bir pozitif ve bir negatif yük ile zwitteriyonlar oluşturabilir; **b)** α -karbon dört farklı grup taşıdığı için kiraldir (istisna: R D H olan glisin). L-amino asitlerde α -karbon kağıt düzleminde, hidrojen karşı tarafa bakacak şekilde yerleştirilirse, kalan gruplar “CORN” olarak okunur; **c)** örnek olarak lizin kullanılarak karbon atomlarının isimlendirilmesi (Buxbaum 2015)

2.1.1. Tek Harfli Kod

Çoğu durumda amino asit isimleri, isimlerinin ilk üç harfi ile kısaltılır. Bu kısaltmaların hatırlanması kolaydır, ancak bilgisayar veri tabanlarında gereksiz bellek işgal ederler. 22 proteinojenik amino asit, Roma alfabesinin 26 harfiyle kodlanabilir (bazı nadir amino asitler için boşluk bırakarak) ve daha sonra bir protein dizisindeki her amino asit, 3 bayt yerine yalnızca 1 bayt depolama alanı kullanır hale getirilmiş olur. Ne yazık ki, birkaç amino asit aynı harfle başlar (Ala, Arg, Asp ve Asn gibi), bu nedenle onları kodlamak için ilk harf kullanılmamaktadır.

Çizelge 2.1. Aminoasitlerin üçlü ve tekli kod gösterimleri (Buxbaum 2015)

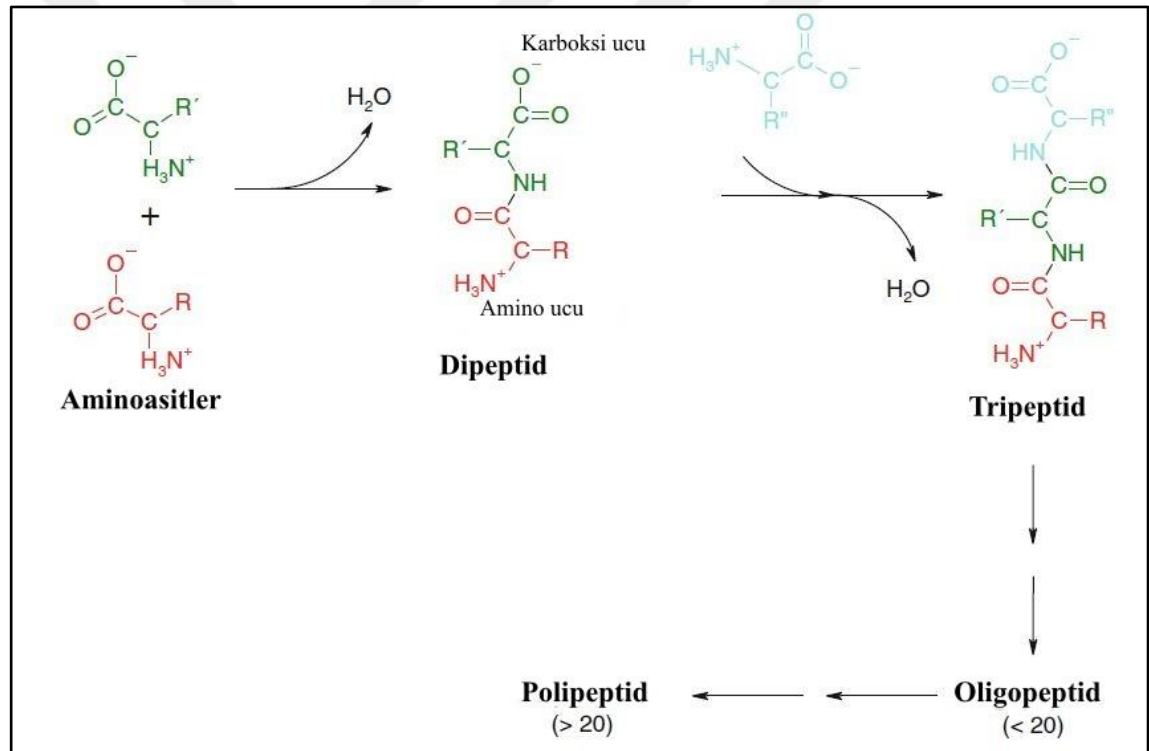
Aminoasit	Üçlü Kod	Tekli Kod
Alanin	Ala	A
Arjinin	Arg	R
Asparajin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Sistein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glisin	Gly	G
Histidin	His	H
Lizin	Lys	K
Lösın	Leu	L
İzolösın	Ile	I
Metiyonin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Pirolizin	Pyl	O
Selenosistein	Sec	U
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V

2.2. Proteinlerin Birincil Yapısı

Suyun eliminasyonu altında iki amino asidin yoğunlaşmasıyla bir peptid bağı oluşur (Şekil 2.2) (Buxbaum 2015). Zincire başka amino asitlerin eklenmesi, 7akroskobik7e, tetrapeptidlere vb. yol açar. 20'ye kadar amino asit içeren zincirlere oligopeptidler (az sayıda oligo D) ve daha uzun olanlara polipeptidler (çok sayıda poli D) adı verilir. Proteinler, biyolojik bir işlevi olan polipeptitlerdir.

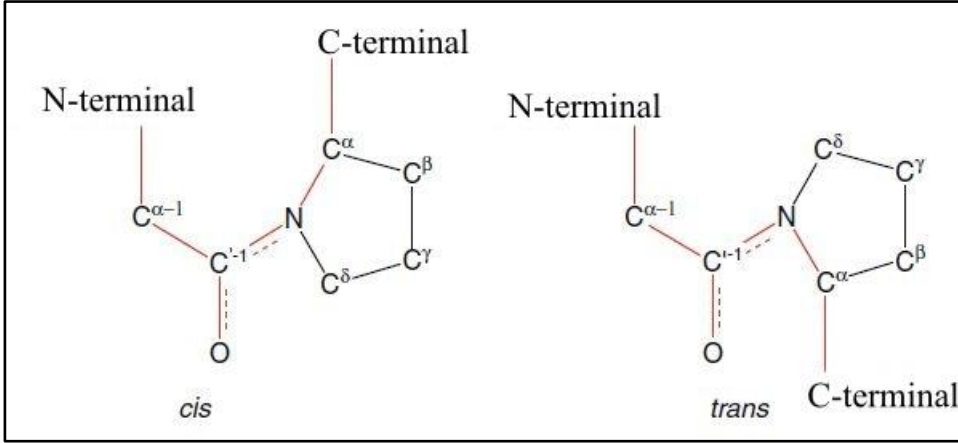
Polipeptitlerin boyutları birkaç amino asitten binlere kadar değişir. Gıda endüstrisinde yapay tatlandırıcı olarak kullanılan aspartam bir dipeptittir. Proteinler ya tek bir polipeptit zincirinden oluşur ya da alt birimler adı verilen ayrı polipeptit zincirlerinden oluşur. Bazı proteinler, diğer kovalent olarak bağlı bileşenleri, prostetik grupları ve post-translasyonel modifikasyonları içerebilir.

Bir proteindeki amino asitlerin dizisine birincil yapı denir. Biyokimyada, bu her zaman N-terminalinden başlayıp C-terminal amino asitte sonlanır, çünkü hücrede protein sentezi sırasında amino asitlerin eklenme sırası budur (Alberts 2015; Lodish vd. 2016).



Şekil 2.2. Amino asitlerin peptit ve proteinlere polikondenzasyonu (Buxbaum 2015)

Ca , C' , peptit bağının nitrogen ve oksijen atomları tek bir düzlem oluşturur. $C=O$ çift bağı ile mezomeri nedeniyle C' ve N arasındaki bağ, normal bir C-N tekli bağından biraz daha kısadır. N'nin yalnız elektron çifti kısmi çift bağa girdiğinden, artık bir protonu kabul edemez; Bir peptit bağındaki N bazik değildir. Dolayısıyla peptit bağı "kısmi (%40) çift bağ karakterine" sahiptir. $C=C$ bağı gibi düzlemseldir ve dönemez. Peptit bağının H ve O'su trans-konfigürasyondadır. Biçimsel olarak, aynı durum peptit bağının alfa dihedral açısının 180° 'ye sabitlenmesiyle ifade edilebilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Peptit bağı etrafında cis-trans-izomeri (Buxbaum 2015)

Büyük R-grupları nedeniyle, trans-konfigürasyon çoğu amino asitte daha karardır (%99.7 olasılıkla). Bunun istisnası, diğr amino asitlere göre çok daha sık olarak konfigürasyonda meydana gelen Pro'dur (%5.8 olasılıkla).

Öte yandan, N-Cα ve Cα-C' bağları normal tekli bağlardır; grupları etrafında döndürmek mümkündür. Dönme açıları sırasıyla Φ (Phi) ve Ψ (Psi) olarak adlandırılır. Peptit zincirindeki dönüş iki faktörle sınırlıdır. İlk olarak, bir amino asidin etrafındaki belirli φ ve ψ açıları, o amino asidin bir atomu bir sonraki amino asidin bir atomu ile çarpışacaktır. Φ, ψ açıları; C'n=O ve N_{n+1}-H arasında çarpışmaya neden olan 0°, 0° olarak tanımlanır. Ek olarak, R gruplarının boyutu ve yükü, belirli konumları diğrlerinden daha kararlı hale getirebilir.

Bugün bilenen çok çeşitli proteinler, evrim sırasında az sayıda atadan köken almaktadır. Bu durum, proteinlerin birincil yapısı karşılaştırılarak gösterilebilir; birincil yapılar ne kadar benzerlerse, proteinler o kadar yakın akrabadırlar (Dayhoff 1969). Birincil yapıdaki her pozisyon, 20 ortak amino asitten herhangi biri (ve bazen Sec ve Pyl tarafından) tarafından işgal edilebildiğinden, olası kombinasyon sayısı çok fazladır. Örneğin, 100 amino asitli bir proteinin $20^{100} = 1.3 \times 10^{130}$ olası dizisi vardır.

2.3. Proteinlerin İkincil Yapısı ve Omurga Konformasyonu

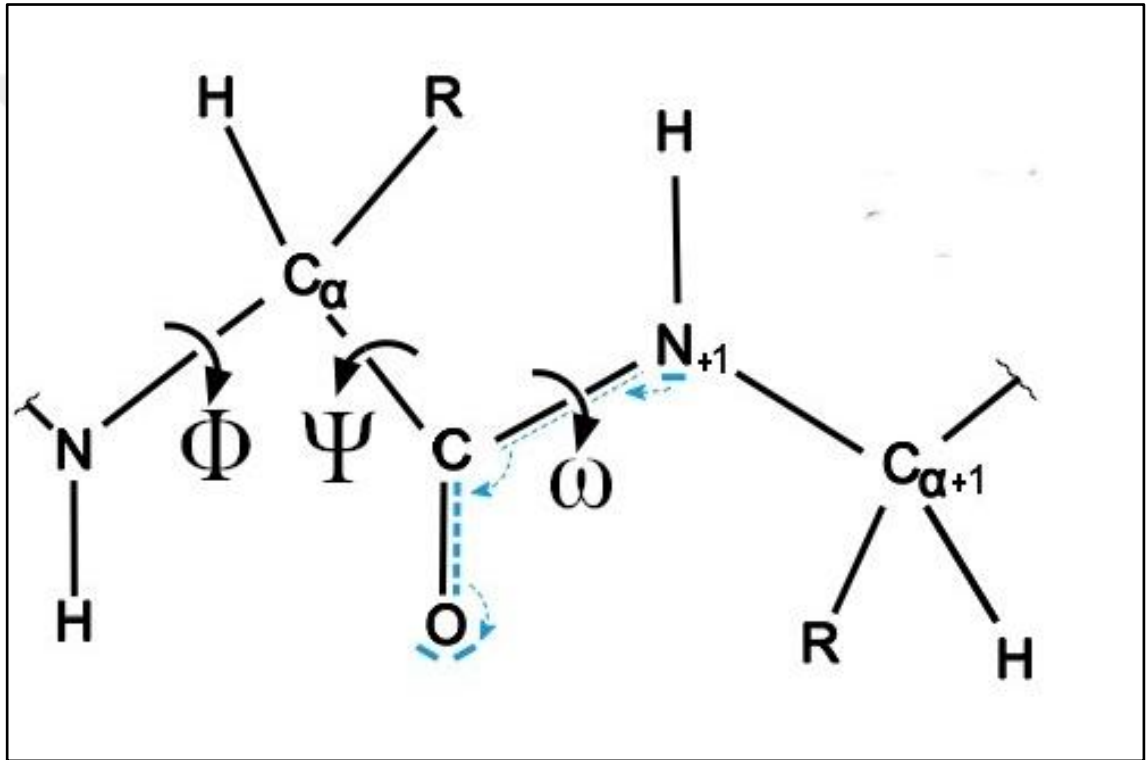
2.3.1. Ana zincir torsiyon açıları

Bir polipeptidin üç ana zincir burulma açısı bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Anonymous 1) Phi (Φ; C, N, Cα, C) ve psi (Ψ; N, Cα, C, N) Cα atomunun her iki tarafındadır ve omega (ω; Cα, C, N, Cα) peptit bağının açısını tanımlar. Φ ve Ψ önemli ölçüde dönme serbestliğine sahipken, ω düzlemseldir. Bu, rezonans etkilerinden kaynaklanan peptit bağının kısmi çift bağ karakterinin, yani delokalize elektronların (N-C=O <-> N+=C-O-) bir sonucudur. Sterik nedenlerden dolayı trans konfigürasyonu (≈180°) tercih edilir. Cis konfigürasyonu (≈0°) prolinler dışında nadirdir (Anonymous 1).

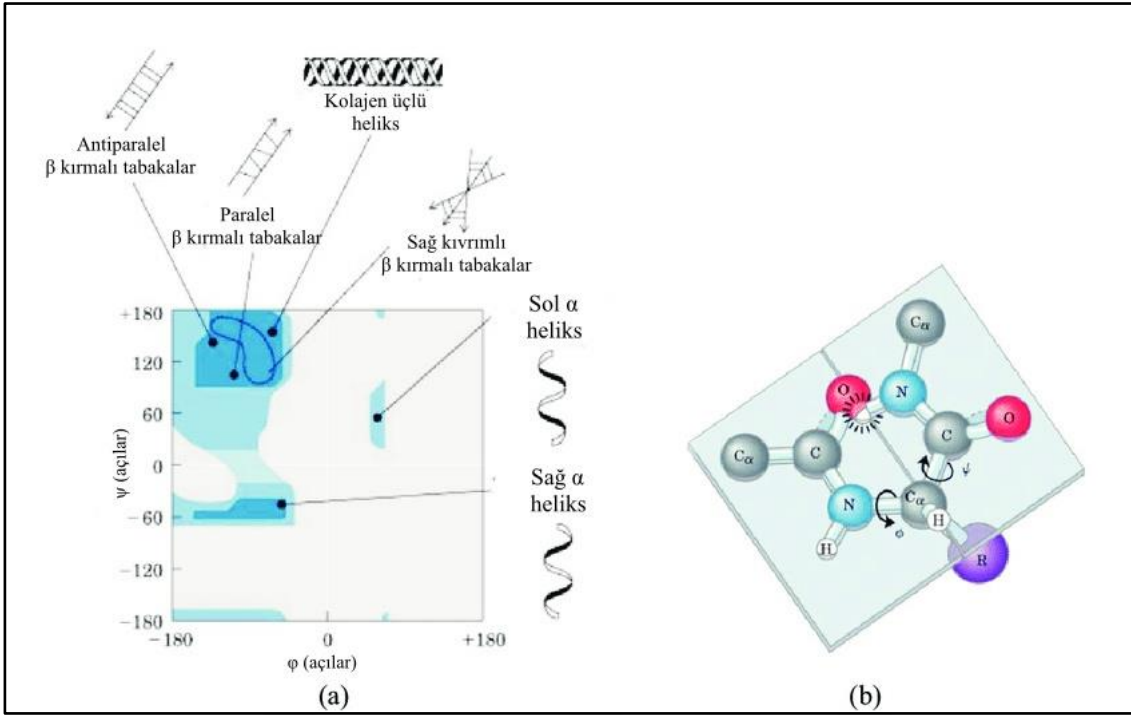
2.3.2. Ramachandran plot

ω açıları kısıtlı olsa da polipeptit ana zinciri N-C α (Φ) ve C α -C (Ψ) bağları etrafında dönmek için önemli ölçüde özgürlük sergiler. Bu durum Ramachandran grafiğinde görselleştirilmiştir. GN Ramachandran, kararlı konformasyonlar bulmak amacıyla Φ/Ψ uzayını sistematik olarak örneklemek için küçük polipeptitlerin bilgisayar modellerini kullanmıştır (Ramachandran vd. 1963).

Ramachandran grafiğinde anahtar ikincil yapılar çizimdeki belirli bölgelere atanmıştır. Tercih edilen (ya da adlandırdığı şekliyle tamamen izin verilen) bölgede beta kırmalı tabakaları, poliprolin heliksi ve (sağ elli) alfa heliksi ortaya çıkmaktadır. Daha küçük VdW yarıçapları ile hesaplanan dış sınır, sol elli alfa heliksine karşılık gelen ek bir bölge ortaya çıkarmıştır (Şekil 2.5) (Burri 2008).



Şekil 2.4. Peptit torsiyon açıları; üç bükülme açısı phi, psi ve omega ile iki amino asitlik bir zincir gösterilmiştir. Hem phi hem de psi açısı yüksek bir dönme özgürlüğüne sahipken, omega açısı ya trans durumunda (180 derece) veya daha nadiren cis durumunda (10 derece) kilitlenir. Amin bağının rezonansı açık mavi ile belirtilmiştir (Anonymous 1)

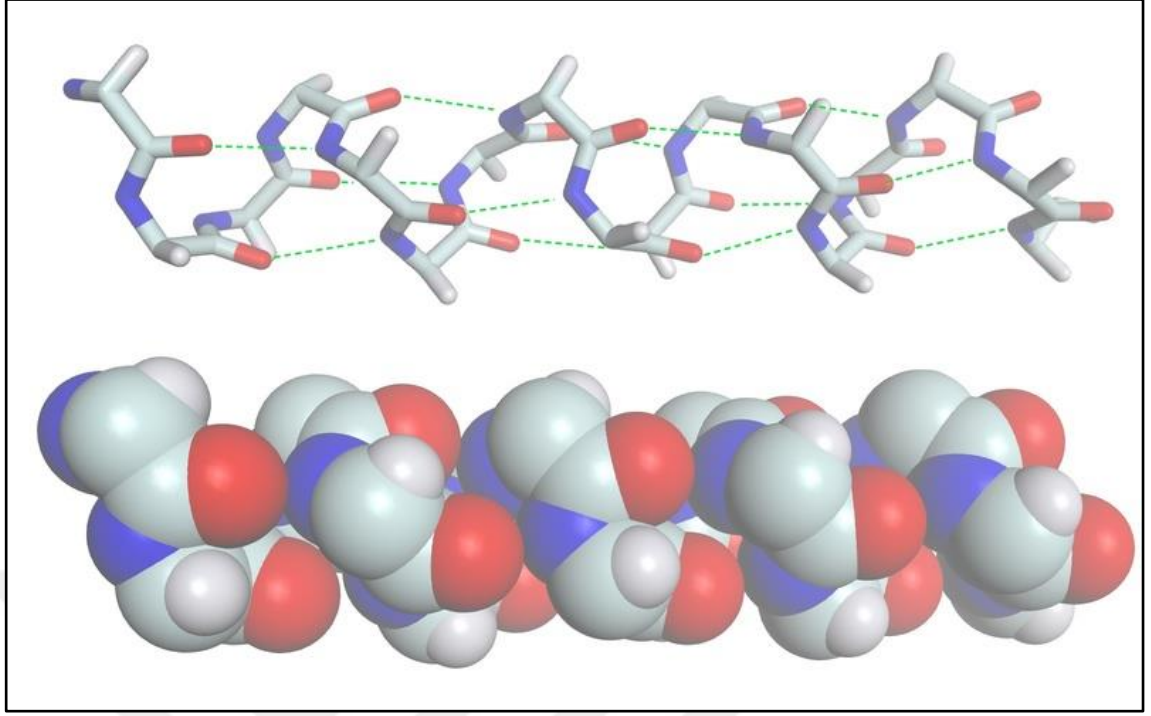


Şekil 2.5. Ramachandran grafiği; **a)** Ramachandran grafiğinde izin verilen yapılar; **b)** Poliipeptit zincirinin peptit düzlemleri (Nelson vd. 2000)

L-amino asitler, sol-el heliksin genişletilmiş bölgelerini oluşturamaz, ancak bazen ayrı ayrı rezidüler bu konformasyonu benimser. Bu rezidüler genellikle glisindir, ancak yan zincirin ana zincir ile bir hidrojen bağı oluşturduğu ve bu nedenle bu başka şekilde elverişsiz olan konformasyonu stabilize ettiği asparajin veya aspartat da olabilir. İzin verilmeyen bölgeler genellikle yan zincir atomları ile ana zincir atomları arasında sterik engelleme içerir. Glisinin yan zinciri yoktur ve bu nedenle Ramachandran grafiğinin dört çeyreğinin hepsinde phi ve psi açılarını benimseyebilir. Bu nedenle, diğer rezidülerin sterik olarak engelleneceği protein bölgelerinde sık sık görülür.

2.3.3. Alfa heliksler

Pauling ve Corey (1951), protein omurgasını alfa-keratin fiber X-ışını kırınım verileriyle uyumlu olacak düzenli konformasyonlara sokmanın yollarını bulmak için poliipeptit modellerini büktiler. En basit ve zarif düzenleme ‘alfa-heliks’ olarak bilinen sağ-el spiral konformasyondur (Pauling ve Corey 1951) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Bir alfa heliksin yapısı (Anonymous 1)

Alfa helikslerin özellikleri

Yapı, heliks eksenine boyunca her 5.4 Å’da bir kendini tekrar eder, yani alfa heliks 5.4 Å’luk bir eğime sahiptir. Alfa heliksler tur başına 3.6 amino asit rezidüsüne sahiptir, yani 36 amino asit uzunluğunda bir heliks 10 dönüş oluşturacaktır. Helikon eksenine boyunca rezidülerin ayrılması 5.4 / 3.6 veya 1.5 Å’dur, yani alfa heliksin rezidü başına 1.5 Å’luk bir artış vardır.

- Her ana zincir C = O ve N-H grubu, 4 rezidü uzakta (yani O_i ’den N_{i+4} ’e) bir peptid bağına hidrojen ile bağlıdır. Bu, çok düzenli ve istikrarlı bir diziliş sağlar.

- Peptid düzlemleri, heliks eksenine kabaca paraleldir ve heliks içindeki çift kutuplar hizalanır, yani tüm C = O grupları aynı yönü gösterir ve tüm N-H grupları diğer yönü gösterir. Yan zincirler, heliks ekseninden dışa doğru işaret eder ve genellikle amino terminal ucuna doğru yönlendirilir.

- Phi ve Psi’nin ikisi de negatiftir.

Alfa helikslerin bükülmesi (distorsiyonu)

Globüler proteinlerdeki alfa-helikslerin çoğu, Pauling ve Corey tarafından önerilen idealleştirilmiş alfa-heliks modeline kıyasla biraz eğimli veya bozuktur. Bu çarpıklıklar, Ramachandran’a göre ihlal edilen dihedral açılarla bağlantılı değildir ve aşağıdakiler dahil çeşitli faktörlerden kaynaklanır:

- Gömülü helikslerin proteinin çekirdeğindeki diğer ikincil yapı elementlerine karşı paketlenmesi,

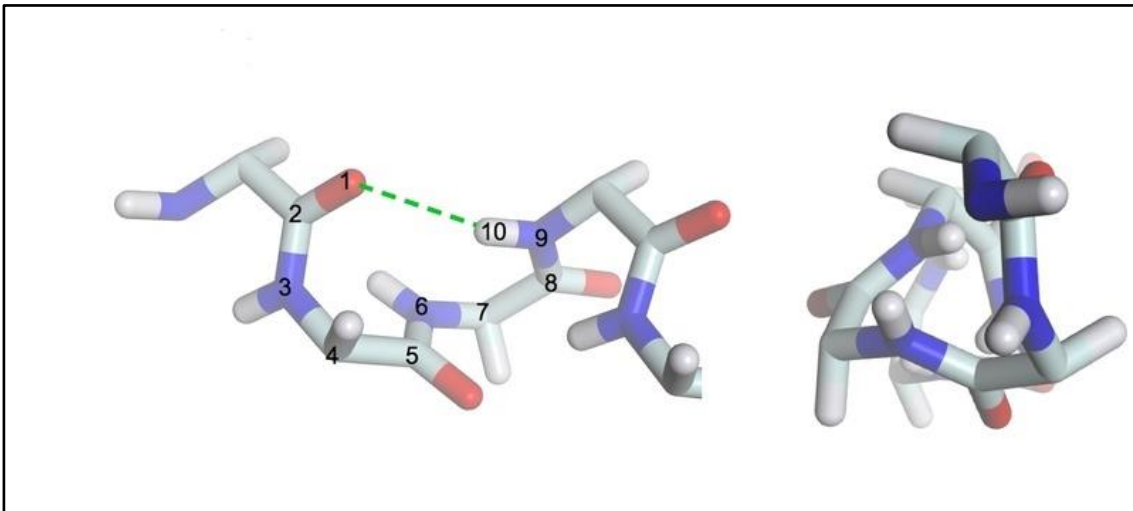
- Prolin rezidüleri, heliks ekseninde yaklaşık 20 °'lik bozulmalara neden olur. Bunun nedeni, Prolin'in, aynı zamanda ana zincir N atomunu bloke eden ve bir hidrojen bağı oluşturmamasını kimyasal olarak engelleyen döngüsel yan zincirinden kaynaklanan sterik engelleme nedeniyle normal bir α -heliks oluşturmamasıdır. Prolin, aşağıdaki rezidünün NH grubunun da iyi bir hidrojen bağı oluşturmaması engellendiğinden, helikste iki H-bağının kırılmasına neden olur.

- Prolin içeren heliksler genellikle uzundur çünkü daha kısa heliksler, bir Prolin rezidüsünün çok fazla varlığıyla dengesizleşecektir. Prolin, polipeptidin genişletilmiş bölgelerinde daha yaygın olarak bulunur.

- Çözücüye maruz kalan heliksler genellikle çözücü bölgesinden uzağa doğru bükülür. Bunun nedeni, maruz kalan C = O gruplarının, H-bağlama kapasitelerini en üst düzeye çıkarmak için çözücüye yönelme, yani çözücüyle ve N-H gruplarıyla H-bağları oluşturma eğiliminde olmalarıdır. Bu, heliks ekseninde bir bükülmeye neden olur.

2.3.4. 3₁₀-heliksler

3₁₀-Heliksler, farklı bir heliks sınıfı oluştururlar, ancak genellikle kısırlı ve sıklıkla normal alfa-helikslerin uçlarında meydana gelirler (Şekil 2.7). 3₁₀ adı, her dönüşte üç rezidü olduğu ve her hidrojen bağının oluşturduğu bir halka içinde on atom bulunduğu için verilmiştir (hidrojen atomu bu sayıya dahil edilir). Zincir boyunca üç rezidü şeklinde ayrılan rezidüler arasında ana zincir hidrojen bağları vardır (yani O_i ile N_{i+3}). Bu isimlendirmede Pauling-Corey alfa-heliks 3.6₁₃ helikstir. 3₁₀-heliksin dipolleri, alfa-helikste kadar iyi hizalanmamıştır, bu nedenle daha az kararlı bir yapıdır ve yan zincir paketlenmesi daha az elverişlidir.



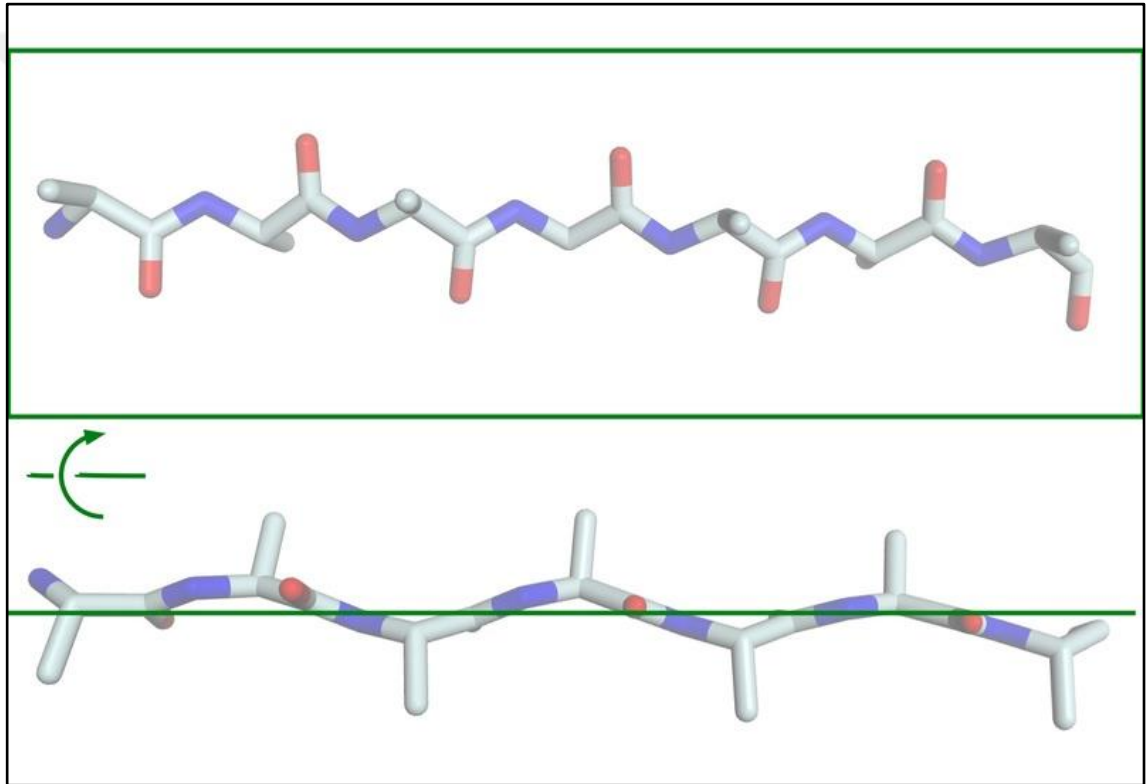
Şekil 2.7. 3₁₀ heliksin küçük bir uzantısı; üç amino asidin 10 atomu numaralandırılır ve hidrojen bağı yeşil noktalı bir çizgi olarak gösterilir (Anonymous 1)

2.3.5. Beta kırmalı tabakalar

Pauling ve Corey, beta-keratin olarak bilinen lifli proteinlerin konformasyonu için bir model geliştirmişlerdir. Bu konformasyonda polipeptit, bir coil (halka) oluşturmaz.

Bunun yerine, alfa heliksten daha geniş bir konformasyonda zikzaklar çizer. Beta-yapısındaki amino asit rezidüleri negatif phi açılara sahiptir ve psi açıları pozitifdir. Tipik değerler $\phi = -140$ derece ve $\psi = 130$ derecedir. Aksine, alfa-heliks rezidüleri hem negatif phi hem de psi açılara sahiptir. Beta-yapısında rezidüleri sahip bir polipeptit bölümü, bir beta-heliks olarak adlandırılır ve bu heliksler, bir tabaka oluşturmak için ana zincir hidrojen bağı etkileşimleriyle birleşebilir.

Bir beta- kırmalı tabakada, iki veya daha fazla polipeptit zinciri yan yana gelir ve ana zincir C = O ve N-H grupları arasındaki hidrojen bağlarıyla düzenli bir şekilde bağlanır. Bu nedenle, bir beta kırmalı tabakasındaki tüm hidrojen bağları, polipeptidin farklı segmentleri arasındadır. Bu, tüm hidrojen bağlarının aynı ikincil yapı elementini içerdiği alfa-heliks ile çelişir. Bir beta iplikteki komşu rezidülerin R grupları (yan zincirler) zıt yönleri işaret eder. Beta kırmalı tabakaları genellikle oklarla tasvir edilir. Geleneksel olarak ok, peptidin C-terminal kısmına doğru işaret eder (Şekil 2.8).



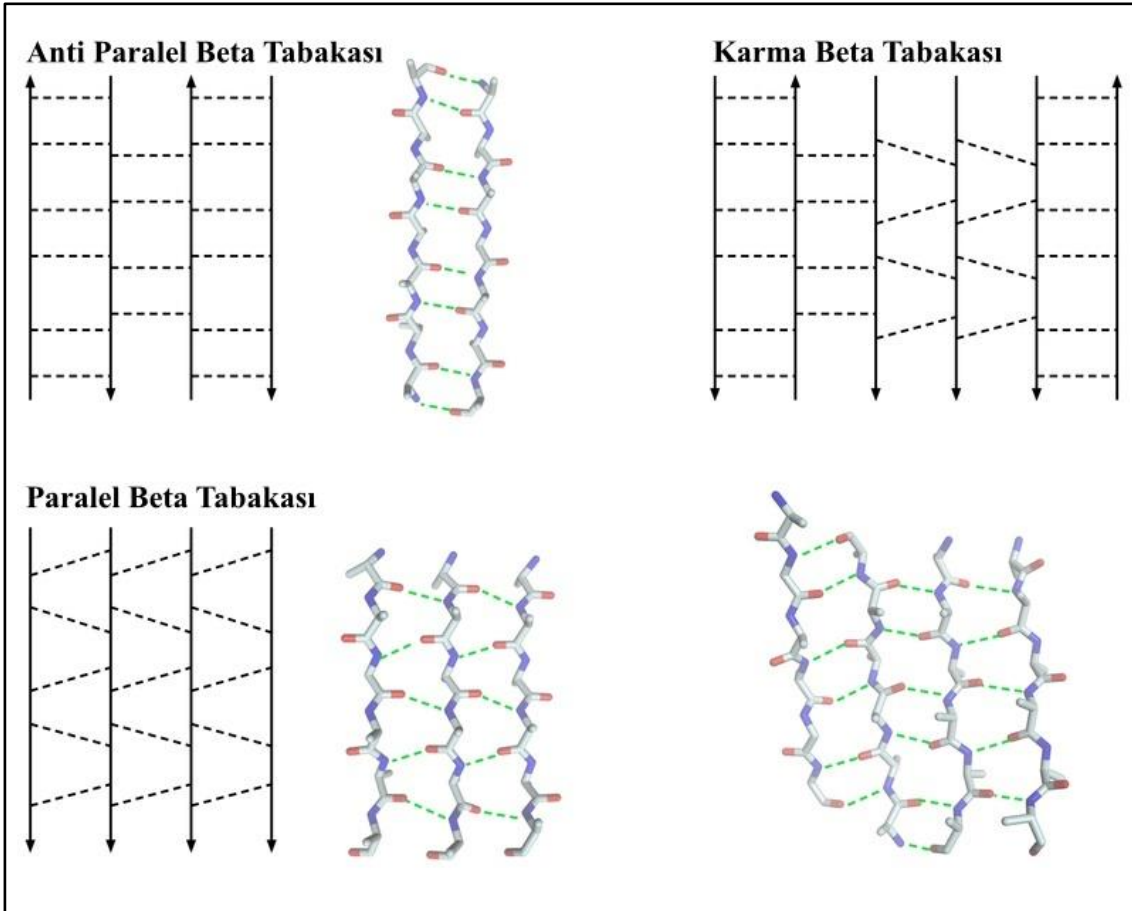
Şekil 2.8. Tek bir beta ipliğinin görünümü; koyu yeşil kutu, beta kırmalı tabakasının düzlüğünü gösterir. Üstte, düzlük monitörle aynı hizada. Alt şerit 90° döndürülür ve düzlük monitörden dışarı çıkar (Anonymous 1)

Yukarıda gösterilen iplikte paralel iki ipi, ya tel ile düzlemde (üst iplik) ya da ekran düzleminin üstünde ve arkada (alt iplik) iki ipi hayal ederek, betanın pileli görünümünün nasıl ortaya çıktığını kavramak mümkündür.

Bitişik rezidüler arasındaki eksenel(axial) mesafe 3.5 Å'dur. Her bir tekrar birimi için beta-kırmalı tabakasına 7 Å aralık veren iki rezidü vardır. Bu, bitişik rezidüler arasındaki eksenel mesafenin yalnızca 1.5 Å olduğu alfa-heliks ile karşılaştırılır. Açıkça, beta-yapısındaki polipeptitler, alfa-heliks yapıdakilerden çok daha uzundur.

Paralel, antiparalel ve karma beta kırmalı tabakaları

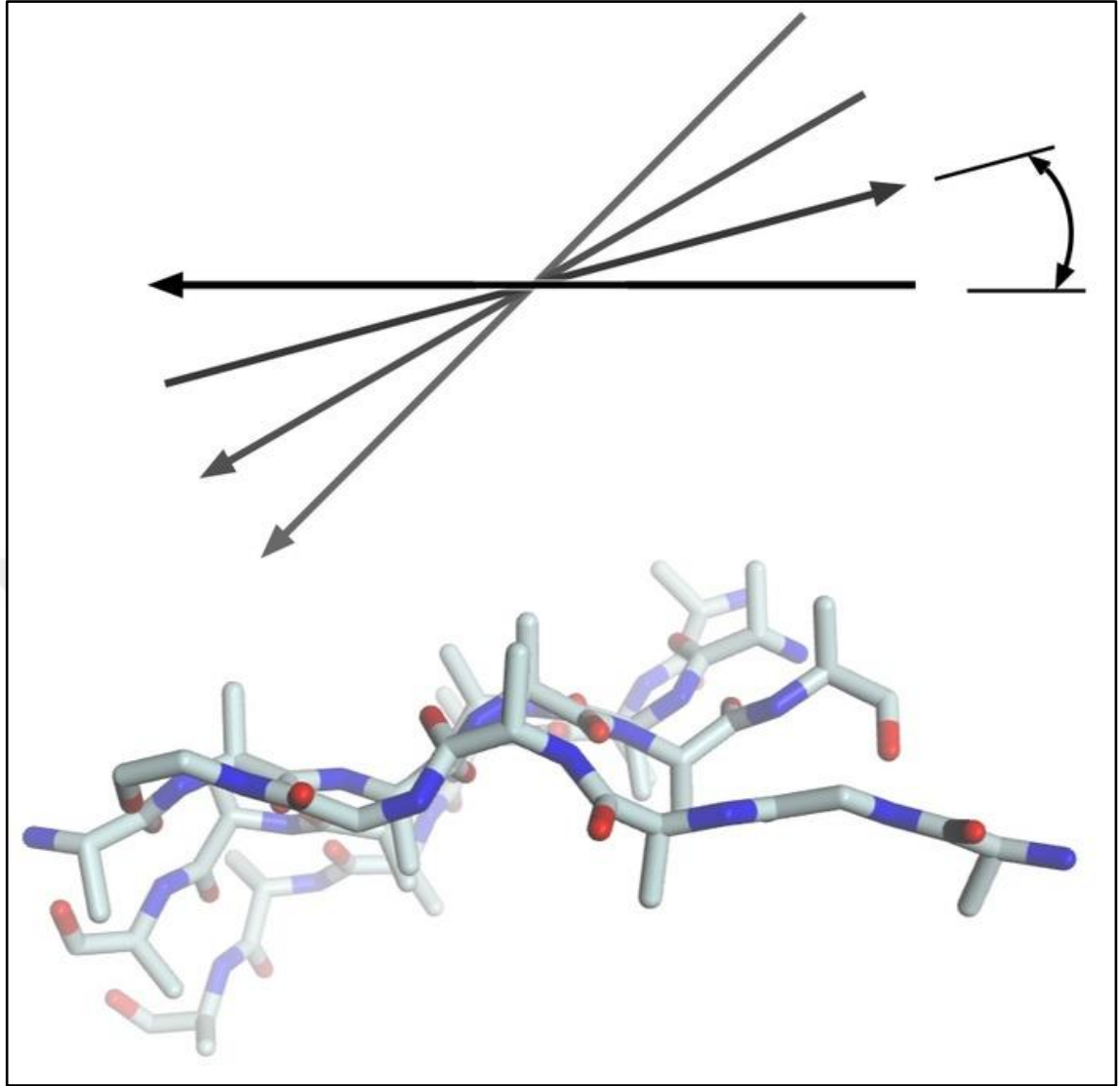
Paralel beta kırmalı tabakalarda ipliklerin tümü tek bir yönde ilerlerken, anti paralel bitişik tabakalarda ters yönde ilerler. Karışık tabakalarda bazı iplikler paralel, diğerleri ise anti paraleldir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Farklı beta kırmalı tabaka türleri; hidrojen bağları noktalı çizgilerle gösterilir. Protein yapılarından hem şematik bir sunum hem de parçalar gösterilmektedir. Anlaşılır olması için, sadece omurga ağır atomları ve uygulanabildiği yerlerde C-beta atomları gösterilmiştir. (Paralel olmayan tabaka, PDB kod: 1DAB'den paralel 4TVW'den karışık tabaka 5K00'dan alınmıştır) (Anonymous 1)

Klasik Pauling-Corey modellerinde, paralel beta- kırmalı tabaka biraz daha bozulmuştur ve dolayısıyla iplikler arasında daha zayıf hidrojen bağlarına sahiptir.

Beta kırmalı tabakasının Pauling-Corey modeli düzlemseldir. Bununla birlikte, küresel protein X-ışını yapılarında bulunan çoğu beta- kırmalı tabaka bükülmüştür. Bu bükülme, aşağıda gösterildiği gibi solaktır. Tabakanın genel bükülmesi, ipliklerdeki her rezidünün, sağ eli kullanılarak amino asit başına 30 derece nispi dönüşünden kaynaklanır (Şekil 2.10).



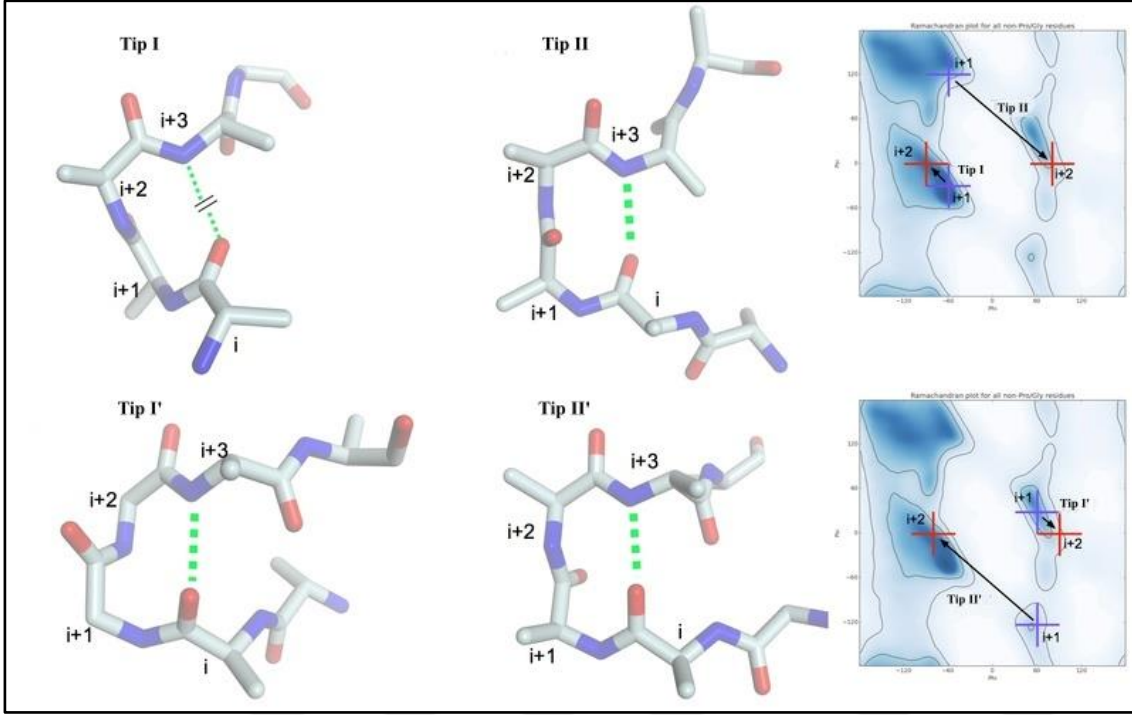
Şekil 2.10. Bir beta kırmalı tabakasının görünümü; bir beta kırmalı tabakanın şematik görünümü (üstte) ve bir bölümü (PDB kod: 4TVW). Netlik sağlamak için sadece omurga ağır atomu ve C-beta gösterilmektedir (Anonymous 1)

Paralel tabakalar anti paralele göre daha az bükülür ve daima gömülüdür. Buna karşılık, anti paralel tabakalar daha büyük bozulmalara (bükülme ve beta çıkıntılar) ve solvante daha fazla maruz kalmaya dayanabilir. Bu, anti paralel tabakaların hem hidrojen bağı geometrisi hem de küçük paralel tabakaların nadiren meydana geldiği gerçeğiyle tutarlı olan paralel tabakalardan daha kararlı olduğunu ifade eder.

2.3.6. İlmekler (coil) ve dönüşler

Bir beta dönüşü, i 'inci ana zincir rezidüsünün karbonil oksijeni ile zincir boyunca $i + 3$. Rezidüsünün NH grubu (O_i 'den NH_{i+3} 'e) arasında (genellikle) bir hidrojen bağına sahip dört ardışık rezidüden oluşan bir bölgedir. Alt tip, ortadaki iki rezidünün ($i + 1$ ve $i + 2$) phi ve psi açılarıyla tanımlanır. Genellikle hidrojen bağı zorunlu olarak kabul edilir ve sadece 7 Å'nın altında i ve $i + 4$ rezidü arasında bir $C\alpha$ mesafesi olan motifler dikkate

alınır. Her tur dokuz sınıftan birine atanır. Heliks bölgeler bu tanımın dışında tutulur ve beta iplikler arasındaki dönüşler, beta-fırkete (hairpin) olarak bilinen özel bir dönüş sınıfı oluşturur (Şekil 2.11) (Venkatachalam 1968; Lewis vd. 1973; Richardson 1981; Kabsch ve Sander 1983; Hutchinson ve Thornton 1994).



Şekil 2.11. Beta (ters) dönüş yapıları; sol el benzerleriyle (Tip I' ve Tip II') Tip I ve II dönüşler gösterilmektedir. Beta dönüşünün tipi, $i + 1$ ve $i + 2$ rezidüsünün phi ve psi açılarıyla belirlenir. Birinci rezidüsün oksijeni ile $i+3$ 'üncü rezidüsün NH grubu arasındaki hidrojen bağları noktalı yeşil çizgi ile gösterilmiştir. Tip I dönüşün bu örnekte bir hidrojen bağı oluşturmamaktadır (// ile gösterilir). Ramachandran grafiklerinde $i + 1$ 'inci (mor) ve $i + 2$ 'inci (kırmızı) rezidüsün ideal dihedral açıları gösterilmektedir. Çarpı $\pm 30^\circ$ aralığını işaretler (Anonymous 1)

2.4. Süper İkincil Yapılar

2.4.1. Beta hairpinler

Beta-hairpinler, en basit süper ikincil yapılardan biridir ve küresel proteinlerde yaygındır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Bir beta hairpinin şematik görünümü; noktalı çizgiler, beta zincirleri arasındaki hidrojen bağlarını gösterir (Anonymous 1)

Anti paralel hidrojen bağlı beta iplikler arasında kısa döngü bölgeleri olarak oluşurlar. Genel olarak bir ters dönüş (veya bazen adlandırıldıkları gibi beta dönüşü), rezidü i 'nin karbonilini ve $i + 3$ rezidüsünün NH grubunu içeren bir hidrojen bağının bulunduğu bir proteinin herhangi bir bölgesidir. Alternatif bir tanım, i ve $i + 3$ rezidülerinin alfa karbonlarının 7.0 Å dahilinde olması gerektiğini belirtir.

Sibanda ve Thornton (1985) tarafından önerilen orijinal sınıflandırmaya göre; Bir ilmeğin uzunluğu, anti paralel beta merdivenine katılmayan rezidülerin sayısı ile verilir. Beta hairpin iki amino asitten oluşuyorsa, buna “İki rezidülü beta-hairpin” denir (Sibanda ve Thornton 1985).

Bir yıl sonra Milner-White & Poet (1986), tüm beta hairpinlerinin dört grupta sınıflandırılabilmesine işaret etmiştir (Sınıf 1 ila Sınıf 4 olarak adlandırılır). Bu sınıflandırma, amino asitleri oluşturan hairpin sayısını tanımlamak için beta iplikler arasında hidrojen bağlarının oluşumuna ve bir “Beş rezidü beta hairpinin” aslında sınıf 1 veya sınıf 3’e karşılık geldiğinin gözlemlenmesine dayanır (Milner-White ve Poet 1986).

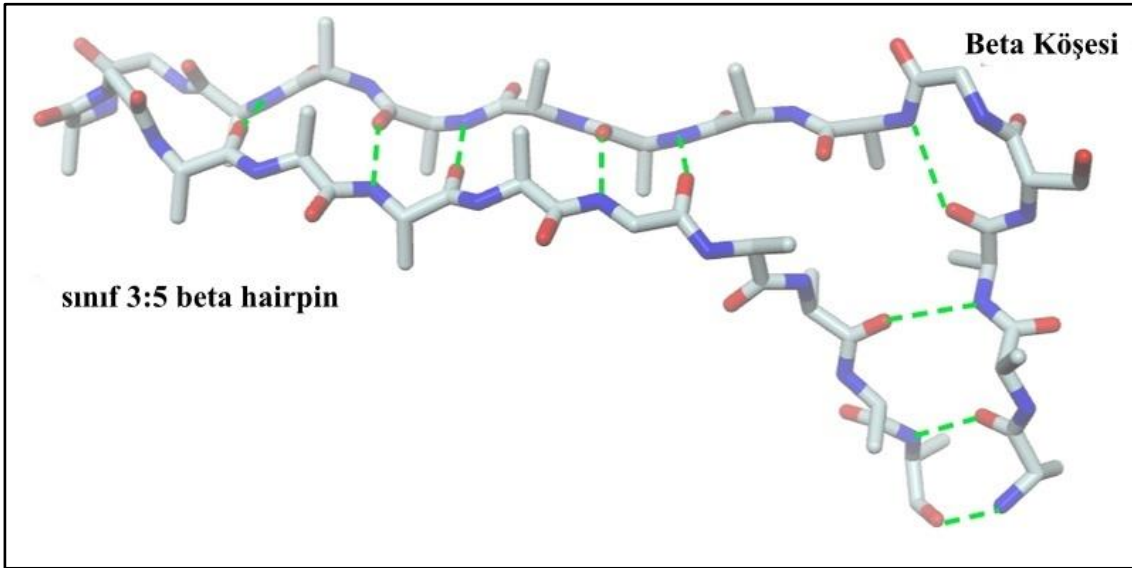
Sibanda ve Thornton (1989), orijinal tanımdaki belirsizliği ortadan kaldıran genişletilmiş bir sınıflandırma yayınladılar. Bu sınıflandırmada, alfa heliksler ve beta kırmalı tabakalar için iki tanımdan yararlanılmıştır. Buna göre;

- NH- veya CO grubu uygun hidrojen bağını oluşturuyorsa ve
- ϕ ve ψ açıları ilgili boşluğa düşerse bir rezidü, önceki iki ikincil yapı elemanının bir parçası olarak kabul edilir (Sibanda vd. 1989).

2.4.2. Beta köşeleri

Beta iplikçikleri, bir beta kırmalı tabaka oluşturmak için yan yana dizildiklerinde, tabakanın genel olarak sol elli bir eğriliğe sahip olacağı şekilde hafif bir sağ el bükülmesine sahiptir. Bir beta-hairpin oluşturan antiparalel beta-iplikleri, beta-köşe olarak bilinen yöndeki 90 derecelik bir değişikliği barındırabilir. Kıvrımın iç tarafındaki şerit genellikle bu pozisyonda bir glisin içerirken, diğer şerit bir beta çıkıntıya sahip olabilir. İkincisi, beta- kırmalı tabakanın hidrojen bağlama modelini kıran sağ-el alfa-

heliks yapıda tek bir rezidü içerir. Bu rezidü, Ramachandran grafiğinin sol elli heliks veya köprüleme bölgelerinde de olabilir (Şekil 2.13).

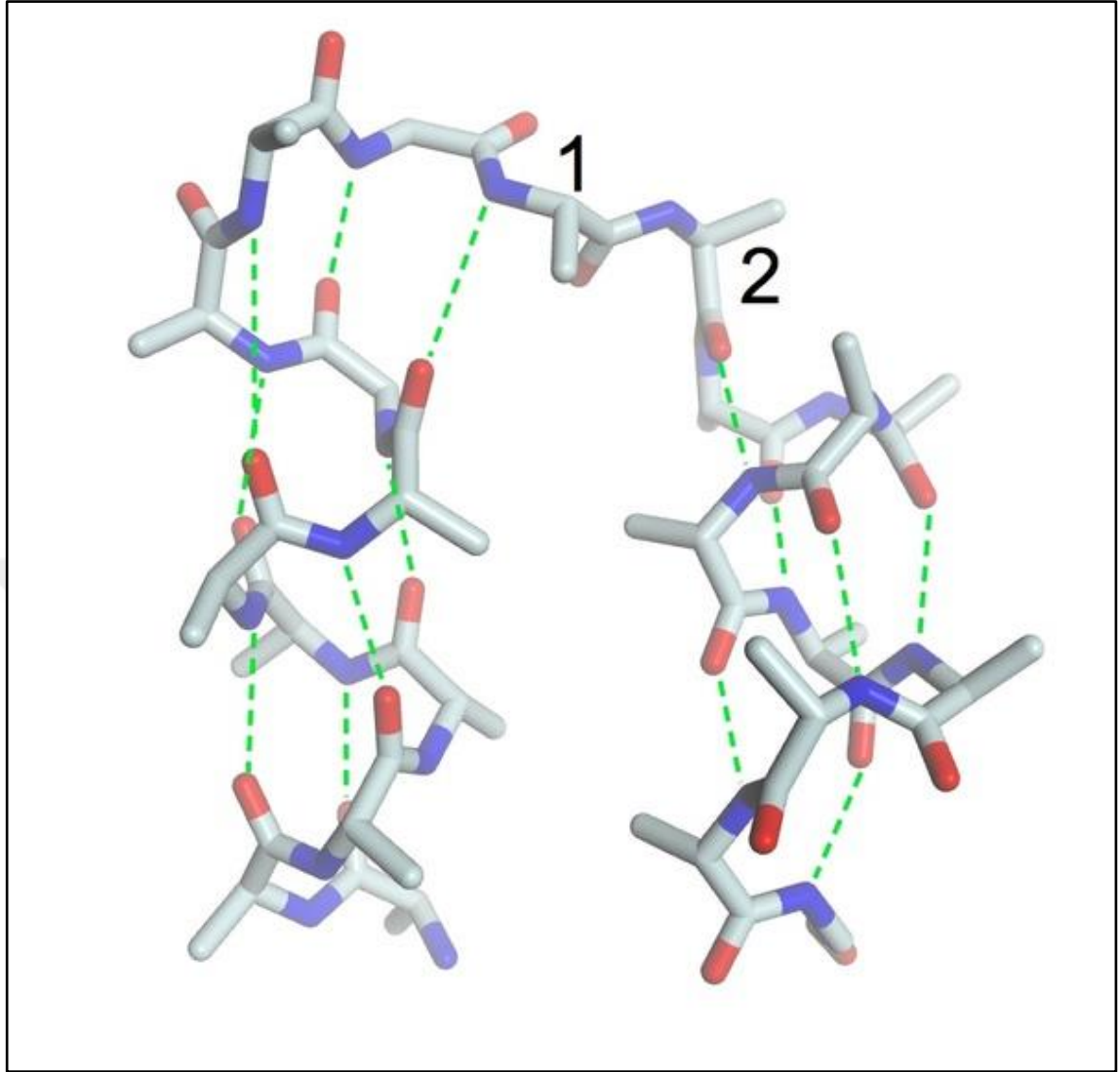


Şekil 2.13. Beta köşesi ve beta hairpin içeren yapı elemanı; yeşil noktalı çizgiler hidrojen bağlarını gösterir. Netlik sağlamak için yalnızca omurga ağır atomları ve C-beta gösterilmektedir (Anonymous 1)

2.4.3. Heliks hairpinler

Bir heliks hairpin veya alfa-alfa-hairpin, iki anti paralel alfa-heliks segmenti birleştiren ilmeğe karşılık gelir. Açık ki, döngünün uzunluğu ne kadar uzun olursa, olası uyumların sayısı o kadar fazla olur. Bununla birlikte, kısa bağlantılar için sınırlı sayıda biçim vardır ve iki veya üç rezidü için en kısa döngüler için, yalnızca bir olası biçim vardır. Anti paralel alfa-heliksler, genellikle arayüzdeki yan zincirler arasındaki hidrofobik etkileşimlerle etkileşime girecektir. Bu nedenle hidrofobik amino asitlerin, bir hidrofobik çekirdek oluşturmak için amino asit sekansına (her heliksin dönüşü başına bir tane) uygun şekilde konumlandırılması gerekir.

En kısa alfa-heliks bağlantılar, helikslerin eksenlerine yaklaşık olarak dik yönlendirilmiş iki rezidü içerir. Bilinen yapıların analizi, bu iki rezidünün ilkinin, Ramachandran grafiğinin köprü oluşturan veya alfa-heliks bölgelerinde phi ve psi açılarını benimsediğini ortaya koymaktadır. İkinci rezidü her zaman glisindir ve diğer amino asitler için mevcut olmayan pozitif phi ile Ramachandran grafiğinin bir bölgesindedir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. İki amino asitten oluşan bir heliks hairpin örneği; hidrojen bağları yeşil noktalı çizgilerle belirtilmiştir. Anlaşılır olması için yalnızca omurga ağır atomları ve C beta gösterilmektedir (Anonymous 1)

2.4.4. Alfa alfa Köşesi

Birbirlerine kabaca dikey olan heliksleri bağlayan kısa döngü bölgeleri, alfa-alfa köşeleri olarak adlandırılır. Efimov, en kısa alfa-alfa köşesinin ilk rezidüsünün sol elli alfa-heliks yapıda ve sonraki iki rezidünün beta-iplik biçimlerinde olduğunu göstermiştir. Bu konformasyon yalnızca iki heliks bir sağ el köşesi oluşturduğunda benimsenebilir. Aslında, sol elli bir köşe oluşturacak şekilde bağlanırsa, sterik engel olacaktır. Bu durum, protein X-ışını yapılarında sol el alfa-alfa köşelerinin kıtlığını açıklayabilir.

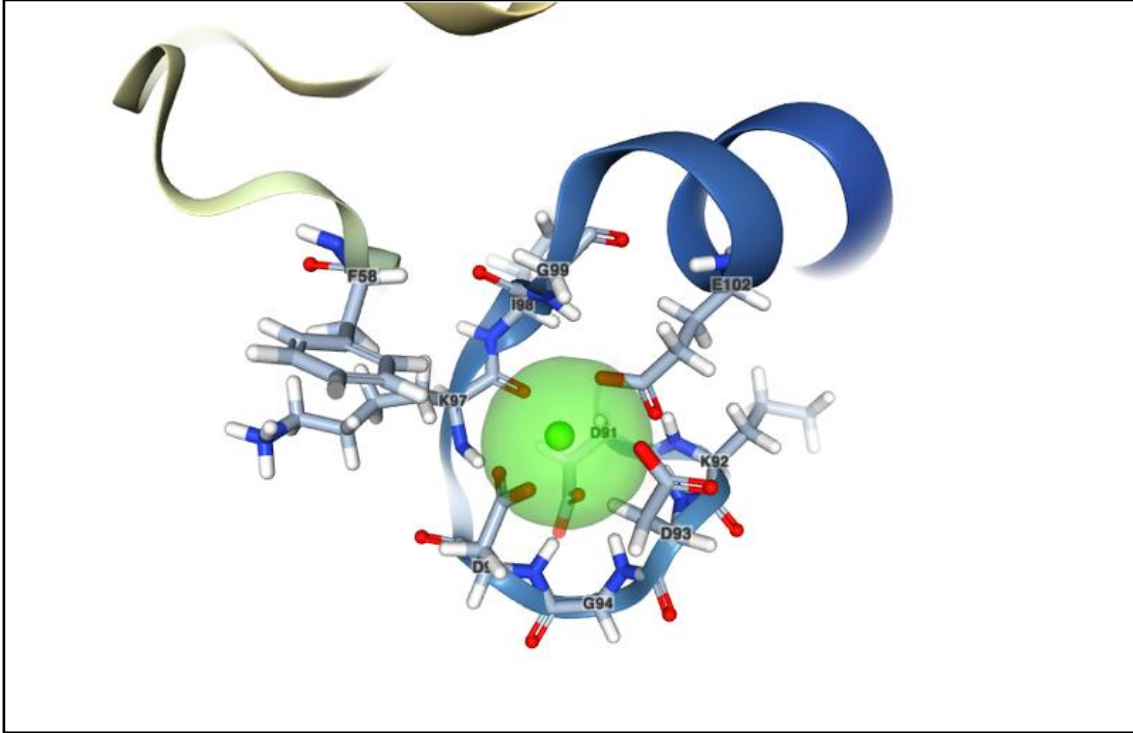
İlk heliksin sol-elli alfa-heliks yapıda bulunan C-terminal rezidüsü, sterik engelden kaçınmak için kısa bir yan zincire sahip olmalıdır ve bu yan zincirin yaygın olarak glisin olduğu gözlenir. İkinci heliksin beta yapısında olan birinci rezidüsü sıklıkla ikinci heliksin amino terminal ucunda serbest NH grupları ile hidrojen bağları oluşturabilen serin veya aspartat gibi küçük bir polar yan zincire sahiptir. Alfa-alfa

köşesinin merkezi rezidüsü, gömülü olduğundan ve iki heliksin uçlarının birbirine temas ettiği yerde gömülü olan diğer polar olmayan yan zincirlerle etkileşime girdiğinden hemen hemen her zaman hidrofobiktir.

2.4.5. Heliks turn heliks

Alfa-heliks segmentleri bağlayan döngü bölgeleri önemli işlevlere sahip olabilir. Örneğin EF eli. Parvalbumin yapıda üç heliks-turn-heliks motifi vardır. Bu motiflerden ikisi, karboksil yan zincirleri ve ana zincir karbonil grupları sayesinde kalsiyumun bağlanmasında rol oynar. Bu motif, biri parvalbuminin E ve F heliksleri arasında yer aldığından EF eli olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.15).

EF elleri, korunmuş pozisyonlarda polar ve hidrofobik amino asitlere sahip yaklaşık 12 rezidüden oluşan bir döngüden oluşur. Bunlar, metal iyonunu bağlamak ve kararlı bir hidrofobik çekirdek oluşturmak için çok önemlidir. Glisin, yapısal nedenlerden dolayı döngüde altıncı pozisyonda değişmez. Kalsiyum iyonu, karboksil yan zincirleri, ana zincir grupları ve bağlı çözücü tarafından oktahedral olarak koordine edilir.



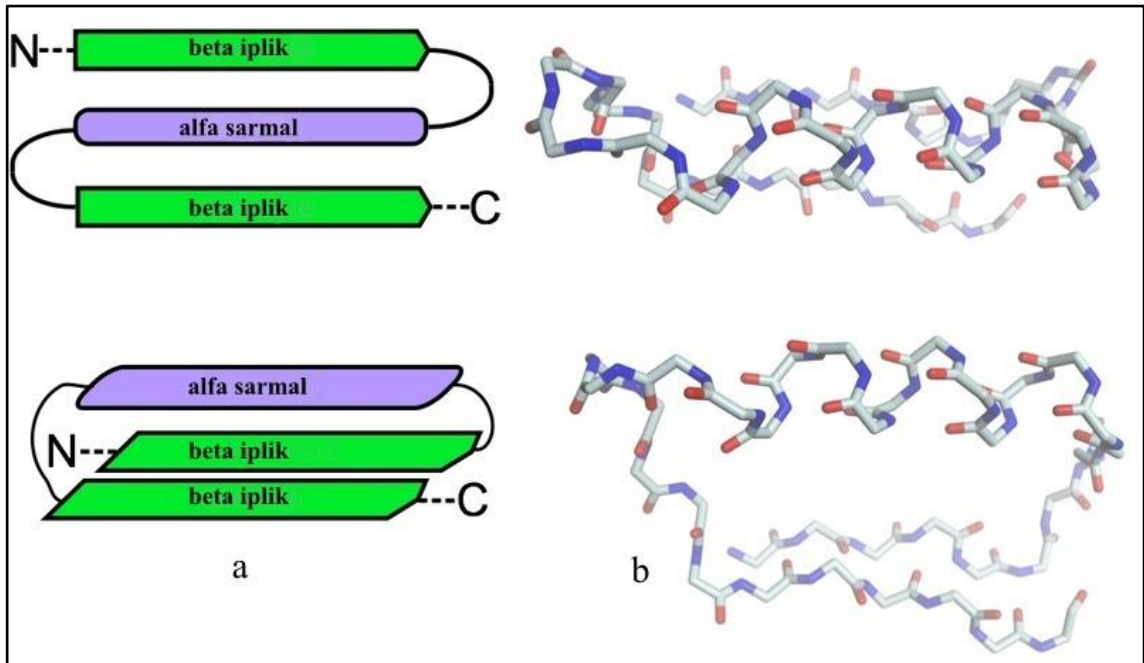
Şekil 2.15. Parvalbumin alpha'da EF eli; kalsiyum iyonu yeşil renkte gösterilmiştir. Protein, resim taslağı görünümünde açıkça kalsiyumla etkileşime giren amino asitler temsil edilir. PDB kodu: 1JRV. NGL görüntüleyicisi ile hazırlanmıştır (Anonymous 1)

Farklı bir heliks-loop-heliks motifi de belirli DNA bağlama proteinleri için ortaktır. Bu motif ilk olarak faj lambdadan gelen cro baskılayıcı gibi prokaryotik DNA bağlayıcı proteinlerde gözlemlendi. Bu protein, her alt birimi 66 amino asit uzunluğunda olan bir homodimerdir. Her alt birim, birinci ve ikinci beta iplikleri arasına sırayla yerleştirilmiş üç heliks bölüme sahip tamamen anti paralel üç iplikli bir beta kırmalı tabakadan oluşur. Molekölün merkezinde altı iplikli bir beta- kırmalı tabakası oluşumu

ile etkileşime giren üçüncü beta-iplikleri sayesinde cro ilişkili iki alt birimi vardır. Mutagenез ve biyokimyasal çalışmalar, her bir cro monomerin ikinci heliksindeki rezidülerin DNA ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Buna göre model oluşturma çalışmaları, dimerik proteindeki bu her iki heliksin de B-DNA'nın ana oluğuna sığacağını gösterdi. Bu proteinler, palindromik olan, yani iki katlı bir iç simetri eksenine sahip olan baz dizilerini tanıır. Cro proteininin iki tanıma heliksi, dimerin merkezi beta- kırmalı tabaka bölgesinden geçen iki katlı bir eksenle de ilişkilidir. Bu nedenle, cro dimerin tanıma heliksleri DNA'nın ana oluğuna sığar ve palindromun her bir özdeş yarısı ile etkileşime girer. Bu nedenle, turn-helix-turn motifinin ikinci heliksi, DNA'nın tanınmasında önemli bir role sahipken, yapının geri kalanı, iki heliksin, DNA'nın ana oluğuna uyması için doğru ilgili konumda tutulmasına hizmet eder. Farklı kıvrımlara sahip diğer birçok turn-helix-turn proteini, esasen DNA'ya bağlanmanın aynı biçimini sergiler.

2.4.6. Beta alfa beta motifleri

Antiparalel beta iplikleri, beta hairpin yapıları oluşturan kısa polipeptid uzunluklarıyla bağlanabilir. Buna karşılık, paralel beta-iplikleri, beta-kırmalı tabakasını geçen ve sıklıkla alfa-heliks segmentler içeren daha uzun zincir bölgeleri ile bağlanır. Bu motif, beta-alfa-beta motifi olarak adlandırılır ve paralel beta kırmalı tabakasına sahip çoğu proteinde bulunur. İplikleri loop bölgelerine bağlayan heliks bölgelerinin uzunluğu büyük ölçüde değişebilir. Heliks eksen, beta iplikleriyle kabaca paraleldir ve ikincil yapının üç elementi de hidrofobik bir çekirdek oluşturarak etkileşime girer. Bazı proteinlerde, birinci beta-ipliğinin karboksi terminal ucunu heliksin amino terminal ucuna bağlayan loop(ilmek), ligandların veya substratların bağlanmasında rol oynar (Şekil 2.16).



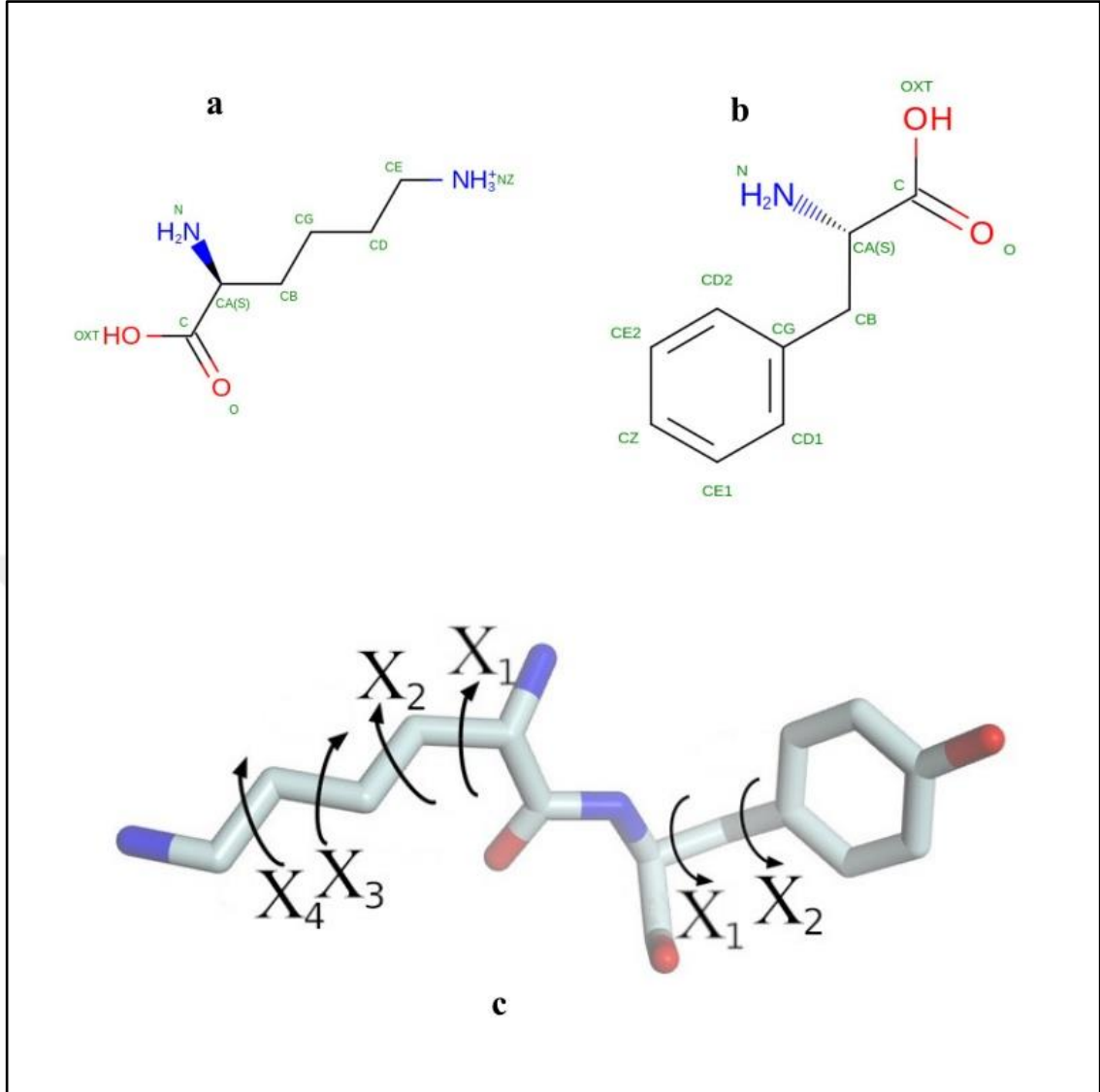
Şekil 2.16. Beta-alfa-beta motifi; bu yapı bir alfa heliksine bağlı iki paralel beta dizisinden oluşur; **a)** Beta ipliklerini yeşil ve alfa heliksini mor olarak gösteren peptidin soyut bir temsili ve protein segmenti içeren bir beta-alfa-beta motifi (PDB kod: 2BNH). Netlik

sağlamak için sadece omurga gösterilmektedir; **b)** alfa heliksten beta kırmalı tabakalara doğru görünüm ve ikincil yapı elemanlarının uzaysal yönelimini gösteren kabaca 80 derece eğimli bir görüntü (Anonymous 1)

2.5. Yan Zincir Konformasyonu

Amino asitlerin yan zincir atomları Yunan alfabesine göre sırayla adlandırılır. Bu adlandırma şeması genellikle latin karakterlerine çevrilir. Örneğin, bir lizin yan zinciri bir β karbon (CB), bir γ karbon (CG), bir δ karbon (CD), bir ϵ karbon (CE) ve bir Z nitrojeninden (NZ) oluşur.

Neredeyse sabit bağ uzunlukları ve bağ açıları nedeniyle, amino asit yan zincirleri yaklaşık olarak 4 dihedral açı (sırayla numaralandırılmış chi açıları, yani X1-4) ile tanımlanabilir. Rotamer olarak adlandırılan yan zincir konformasyonları, enerjik olarak tercih edilen konformasyonlar etrafında kümelenir. X1 açısı, γ yan zincir atom(lar)ı ile ana zincir arasındaki sterik engel nedeniyle kısıtlamalara tabidir. Yan zincir torsiyon açılarının tercih edilen konformasyonları gauche(+), trans ve gauche(-) olarak adlandırılır. Bunlar, amino asidin C β -C α bağı (X1) boyunca görüldüğü aşağıdaki diyagramlarda belirtilmiştir. (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Amino asit yan zincirlerindeki atom isimlendirmesi ve yan zincir dihedralleri; **a)** Lizin; **b)** Fenilalanin; **c)** Bir lizin-tirozin di-peptidinde yan zincir konformasyonlarını tanımlayan Chi (X) açılıarı (Anonymous 1)

2.6. Üçüncül Yapılar

Üçüncül yapı, bir proteinin genel konformasyonunu, başka bir deyişle, ikincil yapısının elemanlarının uzayda düzenlenme şeklini tanımlar. Üçüncül şu etkileşimlerle belirlenir:

Amino asit yan zincirlerinin hidrofobik etkileşimleri, tipik küresel proteinler, hidrofobik yan zincirlerden oluşan bir çekirdeğe sahipken, hidrofilik yan zincirler, suyla veya diğer proteinlerle etkileşime girdikleri yüzeydedir. Hidrofobik rezidüler suya maruz kalırsa, su, sistemin entropisini azaltacak şekilde etraflarında düzenli bir kafes (sözde klatrat) oluşturmak zorunda kalır.

Van der Waals etkileşimleri, 4-17 Kj/mol'lük bir bağ enerjisi ile dalgalanan dipol etkileşimleridir. Bağ uzunluğu $\leq 4\text{\AA}$ 'dur.

Hidrojen bağları, kalıcı kısmi yükler arasındaki etkileşimlerdir. Bağ uzunluğu yaklaşık $3\text{\AA}$ 'dur; bağ enerjisi, her iki tarafta kısmen yüklüyse 2-6 Kj/mol'dür ve bir taraf tamamen yüklüyse 21 Kj/mol'e kadar çıkar. Ortaklar arasındaki mesafe çok büyükse, suyun köprü görevi gördüğü yerde dolaylı bir hidrojen bağı oluşabilir ($\delta^- \dots \text{H}_2\text{O} \dots \delta^+$)

Tuz köprüleri, tam yüklü gruplar arasındaki etkileşimlerdir. Bağ uzunluğu $2.8\text{\AA}$ 'dır. Bağ enerjisi sulu bir ortamda 10-30 Kj/mol'dür, ancak her iki grup da hidrofobik bir çekirdeğe gömülürse önemli ölçüde daha yüksek olabilir.

Disülfid bağları, proteinin daha yüksek sıralı yapısına ($\text{R-SH} + \text{HS-R}' \rightarrow \text{R-S-S-R}' + 2[\text{H}]$) katlanmasından sonra iki Cys rezidüsü arasında oluşturulur. Bu, normalde sitozolün indirgeyici ortamında oluşmayacak olan bir oksidasyondur (hidrojenin uzaklaştırılması). Ancak, ER içindeki ortam oksitleyicidir. Bu nedenle, disülfid köprüleri hücre yüzeyinde ve salgılanan proteinlerde sitozolik olanlardan daha sık bulunur. Aynı polipeptitte (zincir içi) iki Cys rezidüsü arasında veya farklı polipeptitler arasında (zincirler arası) meydana gelebilirler. Bağ uzunluğu $2.2\text{\AA}$ ve bağ enerjisi 167 Kj/mol'dür.

Kofaktörler etrafında koordinasyon. Bir proteindeki birkaç amino asit, metal iyonlarının (Ca, Zn, Fe, Mg, Na, K) veya h eme veya FAD gibi protez gruplarının koordinasyonunda yer alabilir.

Transmembran segmentlerde, hidrofilik amino asitler su ile temas halindedir ( snorkel etkisi) ve hidrofobik amino asitler, lipidlerin ya  asidi kuyrukları ile temas halinde bulunur ( snorkel karşıtı etki). Lipit/su arayüzü, spesifik özelliklere sahip üç amino asit tarafından oluşturulur: Trp, Tyr ve Lys aromatik kuşak olarak adlandırılır ( ekil 2.18). Ortak olarak, hidrofobik olan ancak hidrofilik (polarize veya iyonize) bir uca sahip olan ve aynı zamanda lipidler ve su ile temas kurabilen nispeten uzun moleküllere sahiptirler. Böylece bir zar-ötesi segment, zar içinde iyi tanımlanmış bir konuma sahiptir ve yukarı ve a a ı hareket edemez (Granseth vd. 2005).

Bazı proteinlerin birkaç domaini vardır, yani kısa bölümlerle birbirine ba lanan ayrı ayrı katlanan bölgeler. Bu bireysel alanlar, hassas bir proteoliz ile izole edilebilir; bu durumda bu domainler sadece yapılarını değil, katalitik işlevlerini bile koruyabilirler. Örneğin,  aperon Hsc70    domaine sahiptir: bir ATPaz-, bir peptit ba lama- ve bir düzenleyici alan. Kimotripsin uygulaması ile, bu alanlar arasındaki bağlantılar parçalanmış olsa da İzole edilmiş ATPaz domaini hala ATP'yi hidrolize edebilir.

2.7. Kuaterner Yapı

Kuaterner yapı, birkaç polipeptit zincirinin tek bir fonksiyonel protein oluşturmak için nasıl bir araya geldiğini açıklar.       l yapıda olduğu gibi, kuaterner yapı da amino asit R-grupları arasındaki iyonik ve hidrofobik etkileşimlerle belirlenir. Birçok protein birkaç alt birimden oluşur. Alt birimlerin sayısına bağlı olarak proteinler monomerler, dimerler, trimerler vb. adlandırılırlar. Bu alt birimlerin aynı olup olmamasına göre; aynı ise homo- farklı ise hetero-  n ekleri kullanılır. Dolayısıyla bir heterodimer, iki farklı polipeptit zincirinden oluşan iki alt  niteli bir proteini ifade etmek için kullanılır. Bu

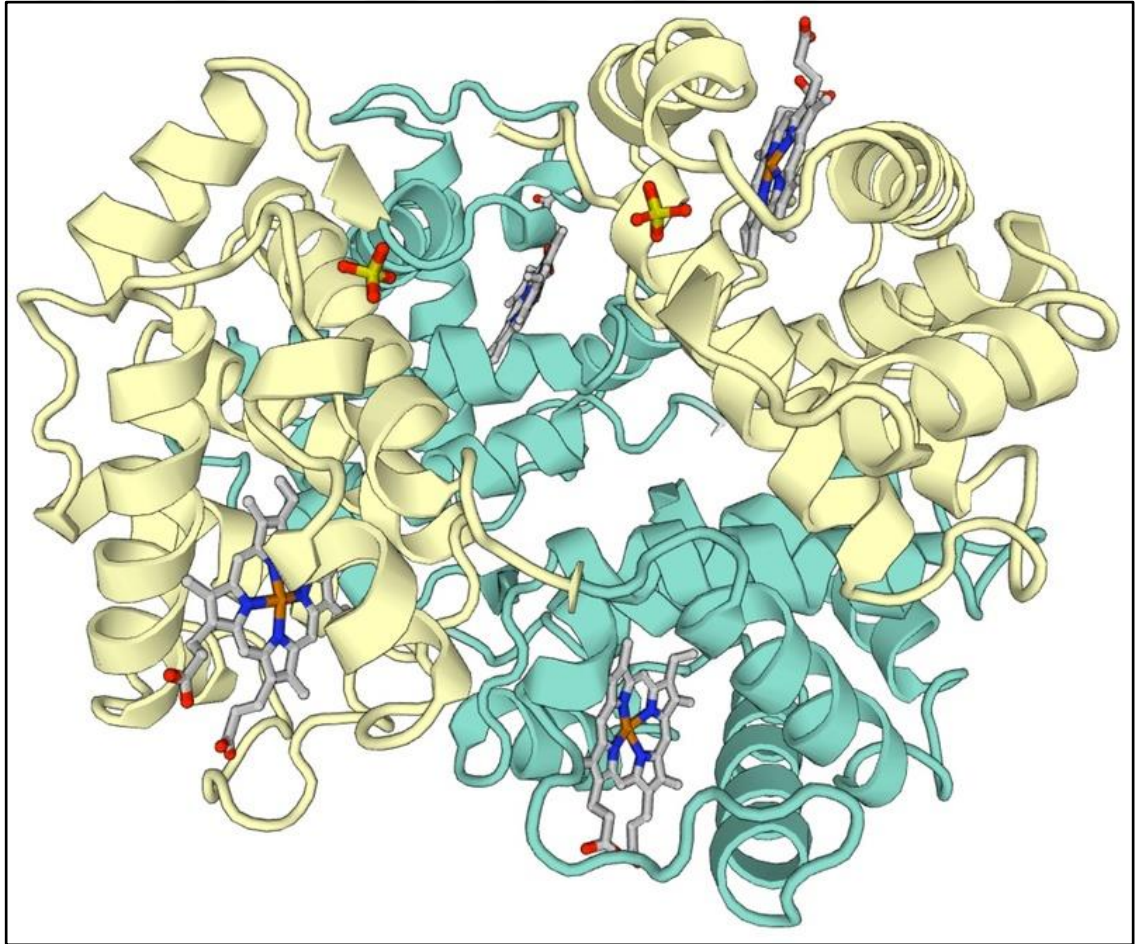
nedenle, birkaç alt birimin bir araya gelmesiyle oluşan kuaterner yapı, proteinin fonksiyonu belirler ve bu fonksiyon, genellikle alt birimlerin birbirinden ayrılmasıyla kaybolur (Buxbaum 2015).

2.7.1. Kovalent olarak bağlı üçüncül domainler

Bu protein sınıfında, domainler genellikle tek bir polipeptit zinciri üzerinde kovalent olarak “birbirine dizilmiş” modüller olarak oluşturulur. Özgün antikor zincirleri bunun en güzel örneklerindendir. Bununla birlikte, hafif ve ağır zincirler daha sonra, Immünoglobulin M (IgM) ‘de olduğu gibi daha yüksek kompleks yapıları oluşturmak için hetero-multimerler üretmek üzere birleşebilir.

2.7.2. Hetero multimerler

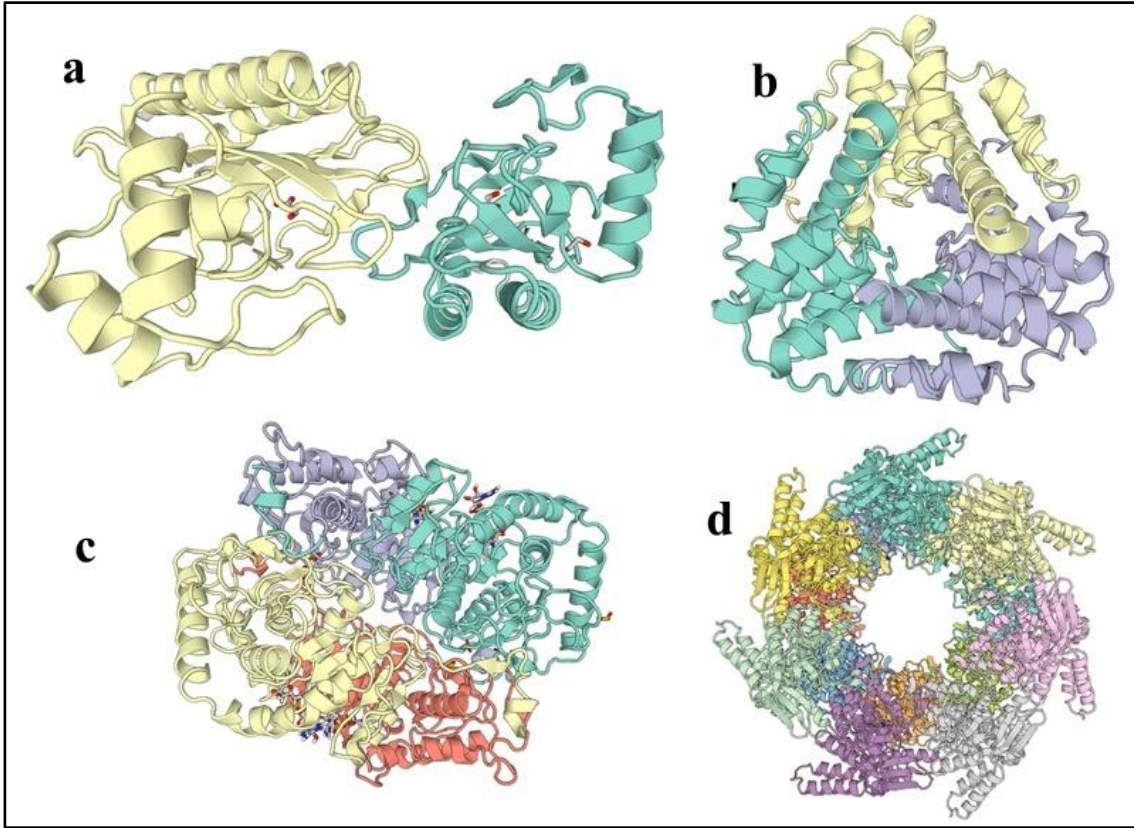
Hemoglobin iki alfa ve iki beta alt birimden oluşan hetero multimer yapı için iyi bir örnektir (Şekil 2.19). Bazen, tek bir enzim kompleksinde, tek bir polipeptit zincirinde bazen de ayrı zincirlerin bir birleşimi olarak birkaç domain bulunabilir.



Şekil 2.18. Hemoglobin animasyon görünümü; iki alfa alt birimi mavi, iki beta alt birimi sarı renkle gösterilir (Anonymous 1)

2.7.3. Homo multimerler

Kovalent olmayan bağlarla bir araya gelen aynı üçüncül domainlerin oluşturduğu yapıdır. Bu tür kompleksler genellikle simetriktir. Proteinler doğada asimetrik olarak bulunduklarından, multimerler neredeyse her zaman bir veya daha fazla eksen etrafında dönme simetrisi sergiler (Şekil 2.20).



Şekil 2.19. Homo-multimer oluşturan proteinlerin dört örneği; **a)** Homo-dimer (PDB: 2O99); **b)** homo-trimer (PDB: 1GU9); **c)** homo-tetramer (PDB: 5KKC); **d)** homo-14-mer (protein iki homo- birbirinin üzerine oturan heptamerik halkalar, heptamerin bir dimerini oluşturur.) PDB:1GRL (Anonymous 1)

2.7.4. Daha büyük yapılar

Hücrenin ve aslında hücre gruplarının moleküler mekanizmaları, proteinlerin, nükleik asitlerin ve şekerlerin multimerik gruplarındaki yan grupların etkileşimlerine dayanır (Şekil 2.21). Bu büyük yapıların bazı örnekler şunlardır:

- Virüsler
- Mikrotübüller
- Kamçı
- Çeşitli türlerde lifler (fibril)
- Ribozomlar

Şekil 2.21. Protein katlanması serbest enerjiyi (G) azaltır; doğal yapı, en düşük serbest enerjiye sahip olan yapıdır. Bununla birlikte, proteinler enerji ortamının yerel minimumlarında kinetik olarak sıkışıp kalabilir. Katlanma sırasında, katlanmamış proteinin entropisi (S_u), huninin genişliği ile sembolize edilen katlanmış proteinin entropisine (S_f) düşürülür. Bu entropi azalması (daha düzenli, daha az olası durum) katlanma sürecinin serbest enerjisindeki genel değişimi azaltır. Bu burada iki boyutlu bir reaksiyon için gösterilmiştir, ancak protein katlanmasında her amino asit en az ϕ ve ψ 'yi ayarlayabilir, bu nedenle boyutların sayısı etkileyicidir ve belirli bir protein dizisinin 3D yapısını ilk prensiplerden hesaplamanın hiçbir yolunun bilinmemesi şaşırtıcı değildir (Buxbaum 2015).

Katlanma entalpiyi (H) azaltsa da (doğal yapıyı stabilize eder), aynı zamanda entropiyi (S) de azaltır, bu da doğal yapının stabilitesini bozma eğilimindedir. Dolayısıyla protein katlanması kuvvetler arasında bir uzlaşmadır ve gerçek stabilizasyon enerjisi sadece yaklaşık 20-40 KJ/mol'dür bu da, oda sıcaklığındaki termal enerjinin yaklaşık 10'u kadardır (tek tek moleküller için K_t veya $RT \sim 2.5$ KJ/mol) (Zwanzig vd. 1992). Ancak proteinlerin bu marjinal kararlılığının iyi bir tarafı vardır: Bu durum, proteinlerin ligand bağlaması ve enzimatik aktiviteleri için gerekli olan protein esnekliğini kazandırır (Buxbaum 2015).

2.8.1. Protein katlanması

Ribonükleaz gibi bazı proteinler ısı veya denatürant ilavesiyle tamamen denatüre edilebilir. Çözelti soğutulursa veya denatürant diyaliz yoluyla uzaklaştırılırsa, protein kendiliğinden doğal konformasyonuna geri döner ve enzimatik aktivite yeniden sağlanır. İlk olarak 1950'lerde gerçekleştirilen bu deneyler, bir proteinin ikincil ve üçüncül yapısının yalnızca amino asit dizilimi tarafından belirlendiğini kanıtlamaktadır (Anfinsen 1973).

Bunun önemli bir sonucu vardır: Sadece tek bir amino asidin mutasyonu protein katlanmasına müdahale ederek işlev kaybına yol açabilir. Örneğin, kistik 28akros bir transmembran klorid kanalının (kistik 28akros transmembran iletkenlik regülatörü, CFTR) eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır. Bir başka örnek de tek amino asit mutasyonlarının osteogenezis imperfekta veya EHLERS-DANLOS sendromuna yol açtığı kolajen olabilir (Tissenbaum ve Guarente 2001).

Protein katlanmasını tanımlamak için temelde üç model vardır:

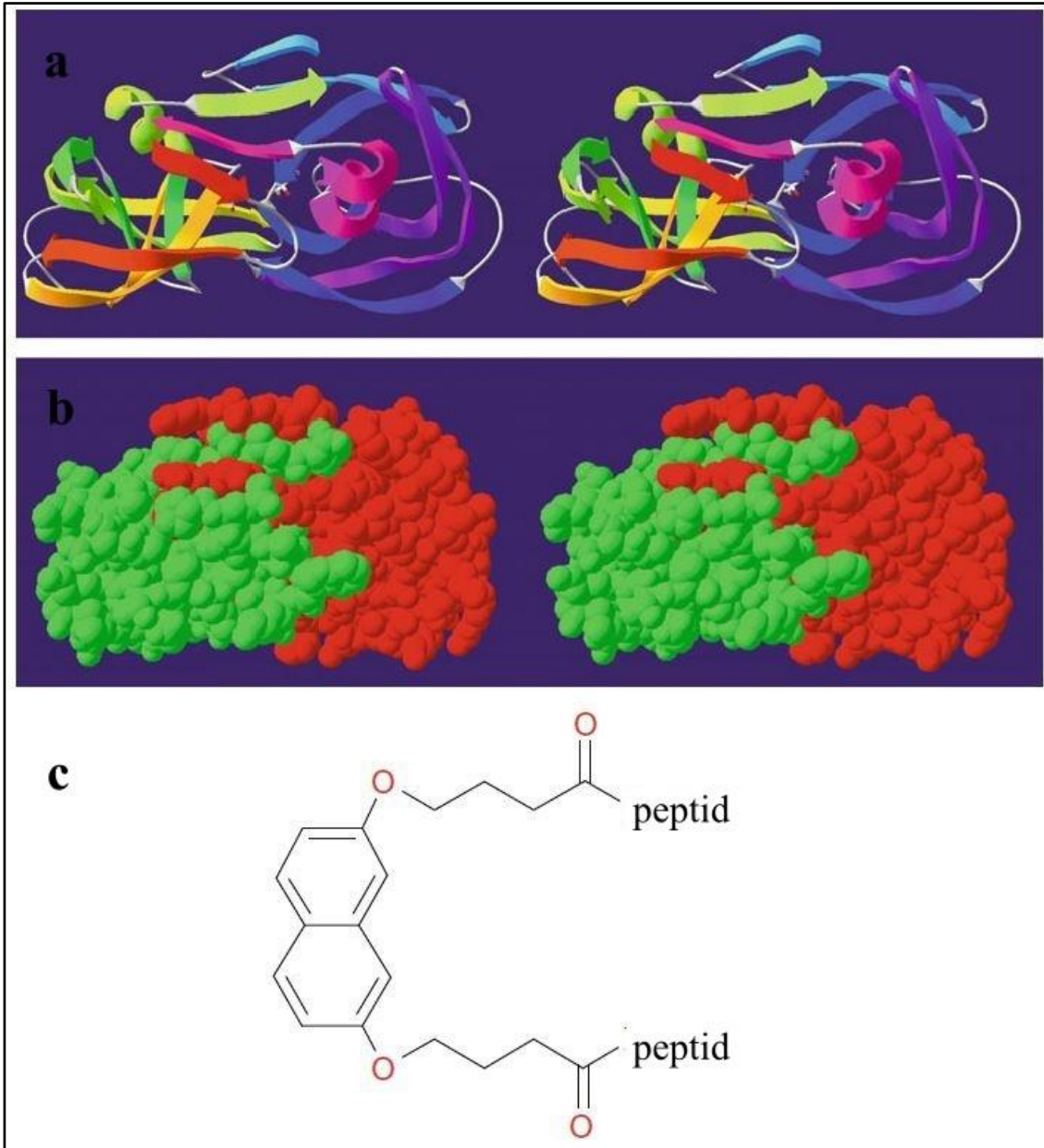
1-Çerçeve modeli, proteinler, sekanslarında bulunan bilgileri kullanarak önce ikincil yapılarını oluştururlar. İkincil yapı oluşturulduktan sonra, amino asitler arasındaki uzun menzilli etkileşimler üçüncül yapıyı stabilize eder.

2-Hidrofobik çöküş, sentezden sonra proteinler, hidrofobik amino asitlerin içine gömüldüğü ve hidrofilik amino asitlerin proteinin yüzeyinde olduğu bir konformasyona uyum sağlar. Bu yapı "erimiş globül" olarak adlandırılır. Erimiş küreciğin içinde amino asitler arasında uzun menzilli etkileşimler kurulur ve üçüncül yapının oluşmasına izin verilir. İkincil yapı en son kurulur.

3-Çekirdeklenme/Yoğunlaşma modeli ise diğer iki modelin bir kombinasyonudur: proteinler anahtar rezidüleri arasındaki bağların oluşumu altında çökerler. Amino asitlerin mesafesindeki bu azalma, uzun menzilli (üçüncül yapı) ve kısa menzilli (ikincil yapı) etkileşimlerin aynı anda oluşmasına yol açar. Sonuç olarak, katlanma ara katlanmalar olmaksızın tek bir büyük adımda gerçekleşir. Birçok protein için, özellikle de <100 amino asitli olanlar için, bu deneysel kanıtlarla iyi bir şekilde uyumaktadır. Büyük proteinler genellikle katlanma hızları önemli ölçüde değişebilen bağımsız katlanma modüllerinden (domain) oluşur. Bu modüller daha sonra proteinin nihai yapısında bir araya gelmek zorundadır.

Katlanma oldukça hızlı bir süreçtir, bir *E. Coli* hücresinde 100 amino asitlik bir proteinin sentezi ve katlanması 5 saniyeden daha kısa bir sürede tamamlanır (37 °C’de). Katlanma, bir protein ribozom üzerinde sentezlenirken bile başlar, yani protein molekülünün sadece bir kısmı katlanma reaksiyonu için kullanılabilir.

Enzimlerin ve reseptörlerin yapısının bilinmesi, farmasötiklerin tasarımı için gereklidir. Örneğin, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) proteazı, virüs zarfındaki inaktif bir öncü proteini iki aktif proteine bölmek için gereklidir ve bu proteinler olmadan bir virüs partikülü hedef hücrelerine bağlanamaz ve bulaşıcı olmaz. HIV-proteaz, bir homodimerdir ve her bir alt birimi 99 amino asit uzunluğundadır. Her iki alt birimin 1-4 ve 96-99 amino asitleri tarafından oluşturulan antiparalel bir “ β kırmalı tabaka” tarafından bir arada tutulurlar (Şekil 2.22). Bu yapısal düzenlenme, katalitik aspartat rezidülerini (her alt ünite de D²⁵) bir araya getirerek enzimin katalitik bölgesini oluşturur. Bu nedenle, protein yapıda ilaçların geliştirilmesi için, o proteinin yapısının ve işlevinin yakından anlaşılması gerekmektedir (Boggetto ve Reboud-Ravaux 2002).



Şekil 2.22. a) HIV-proteazın (PDB kodu 1DAZ) dimerizasyonu, her iki alt birimin uçlarından antiparalel bir “beta-kırmalı tabaka” oluşmasıyla gerçekleşir. Bu, iki katalitik aspartat rezidüsünü (D^{25} ve $D^{25'}$) birbirine yaklaştırır; **b)** HIV-Proteaz’ın boşluk doldurma modeli. Her iki alt birimin N- ve C-terminal uçları tarafından oluşturulan “beta-kırmalı tabaka” açıkça görülebilir; **c)** Sert bir omurga ile bağlanmış iki peptid içeren maddeler, bir mo’merin dimerizasyon bölgesine interdigitasyon yapabilir ve dimerizasyonu önleyebilir (Buxbaum 2015)

2.8.2. Proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları

İnsan genomu yaklaşık 23 000 gen içerir. Mrna işleme (alternatif splicing, Mrna düzenleme vb.) gen başına yaklaşık 3 Mrna ile sonuçlanır. Bunlardan üretilen proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonu, her Mrna’dan yaklaşık 10 farklı protein oluşturma

potansiyelindedir. Bu nedenle aslında insan proteomu farklı işlevlere, düzenlemelere, yıkımlara sahip yaklaşık 10^6 farklı proteinden oluşur.

Proteinlerin özellikleri posttranslasyonel modifikasyonla değiştirilebilir; bu değişim, örneğin hormonlara maruz kalma gibi çevresel uyarılara yanıt olarak hızlı bir şekilde yapılabilir (veya geri alınabilir). Bu tür modifikasyonlar enzimleri aktif ve inaktif durumları arasında dönüştürebilir ve bir proteinin hücre altı yapılara uygun şekilde hedeflenmesi için gereklidir (Lander vd. 2001; Venter vd. 2001; International Human Genome Sequencing 2004). Post transkripsiyonel modifikasyonlara;

Glikolizasyon, Glukasyon, Disülfid Bağı Oluşumu, Proteolizis, Hidroksilasyon, Fosforilasyon/Defosforilasyon, Asetilasyon/Deasetilasyon, Metilasyon/Demetilasyon, Hidrofobik Kuyrukların Eklenmesi / Çıkarılması, S-Nitrozilasyon, ADP-Ribosilasyon, Deamidasyon ve AMPilasyon (Adenilasyon) örnek verilebilir.

2.9. Proteinlerin Yapı ve Stabilitésinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Proteinler, tüm canlı organizmalarda her yerde bulunan ve esasen hayatta kalmak için gerekli tüm işlevleri yerine getiren harika moleküllerdir. Herhangi bir canlı organizmada gerçekleştirilen taşıma, depolama, mekanik destek, hareket ve büyüme gibi işlevler, protein olarak adlandırılan bu olağanüstü molekül grubu tarafından gerçekleştirilir. Yapı-fonksiyon ilişkilerini tam olarak anlayabilmek için, işlevleri hakkında fikir verecek olan bu biyomoleküllerin yapısını ortaya çıkarmak zorundayız. Proteinler, kendisini kodlayan gen tarafından belirlenen 22 farklı amino asitten (monomer) oluşan, peptid bağı ile bağlanan ve sonunda atomlar arası etkileşimlerle üç boyutlu yapılar katlanan biyopolimerlerdir. Proteinlerin yapısı dört farklı seviyede tanımlanabilir (Desai vd. 2010; Bencharit ve Border 2012).

Birincil yapı, proteinin spesifik amino asit düzenlemesinin doğrusal dizisidir. İkincil yapı, omurga C-Cα arasındaki yerel etkileşimli hidrojen bağları nedeniyle oluşan kısa bir dizi aralığına uzanır, çoğunlukla α-helisleri veya β-yapraklarını oluşturur. Üçüncül yapı, amino asitlerin yan zincirleri arasında oluşan üç boyutlu düzenlemedir ve α-heliksler ve β-kırmalı tabakalar gibi ikincil yapılara sahip farklı konformasyonlarla sonuçlanır ve dönüşler veya döngüler olarak adlandırılan düzensiz bölgelerle bağlanır. Kuaterner yapılar, bir protein molekülü içindeki iki veya daha fazla alt birimin tam uzamsal düzenlemeleridir. Protein yapısının farklı organizasyon seviyeleri, birincil yapı gibi çeşitli yöntemler kullanılarak belirlenebilir, yani herhangi bir proteinin aminoasit dizisi Edman bozunma yöntemi ve kütle spektrometresi ile bulunabilir. İkincil yapı dairesel dikroizm ve FTIR yöntemleri ile belirlenebilir. Bir proteinin üç boyutlu yapısı (tersiyer/kvaterner) X-ışını kristalografisi, Nükleer Magnetik Rezonans (NMR), Kriyo – Elektron Mikroskobu (Kriyo -EM) ve nötron kırınımı gibi deneysel yöntemlerle belirlenebilir veya homoloji modelleme, ab-initio ve protein ipliği (Threading) yöntemleri gibi hesaplamalı bilgisayar yöntemleriyle tahmin edilebilir (Walsh vd. 2015). Protein yapısının deneysel olarak belirlenmesinde en popüler ve en yaygın kullanılan yöntem X-ışını kristalografisi yöntemidir ve Protein Veri Bankası'na kaydedilen yapıların %89'undan fazlası bu yöntemle çözülmüştür; X-ışını kristalografisi yöntemini %8'in üzerinde bir oranla NMR, yaklaşık %2.5 oranıyla Kriyo -EM takip etmektedir. Geriye kalan %0.5'lik protein yapıları ise diğer yöntemler kullanılarak çözülmüştür (Burley vd. 2019).

2.9.1. X-ışını kristalografisi

Basit bir ifadeyle X-ışını kristalografisi, kristallerin X-ışını ile incelenmesi anlamına gelmektedir. X-ışını kristalografisi kullanılarak protein yapısının belirlenmesi için ön koşul bir kristal elde etmektir. Proteinlerin kristalizasyonu, arkasındaki gerçek fiziksel temel iyi anlaşılmadığı için zordur; Ph, sıcaklık, titreşim, protein ve çöktürücü konsantrasyonu, protein saflığı ve esneklik gibi birçok faktör kristalizasyon süreçlerini etkiler (Parker 2003). Protein kristalleri, protein çözeltisinin ya artan çöktürücü konsantrasyonu kullanılarak ya da protein tarafından aşırı doyurulmasıyla elde edilir. X-ışınları, hızlandırılmış elektron (senkrotron) veya elektron bir anot metaline çarptığında üretilir, kristal bir gonyometreye monte edilir, bu cihaz 360 derece döner, böylece X-ışınları kristaller boyunca açığa çıkabilir. X-ışını kristallere maruz kaldığında, bir atomda bulunan elektron tarafından saçılır ve molekülün yapısal bilgilerini içeren kırınım desenleri oluşturur (Smyth ve Martin 2000). Bununla birlikte, tek bir molekül tarafından kırınımın tespiti çok zayıf olacaktır, ancak düzenli olarak şekillendirilmiş tekrarlar olan kristaller yapının tespit edilebilirliğini mümkün kılar. Bu deneyin temeli Laue ve W. L. Bragg tarafından atılmıştır ve Bragg yasası olarak adlandırılır, buna göre X-ışını kırınımı atomların kristal düzlemindeki yansımalarına benzer olarak kabul edilir. Kırınım deseninin elde edilebilmesi için yapıcı uyumlu girişimin gerçekleşmesi gerekir; bu da ancak verilen denklem sağlandığında ortaya çıkar; burada λ (lamda) X-ışınının dalga boyu, d düzlemler arası mesafe ve θ (teta) gelen ışın ile düzlemler arasındaki açıdır.

$$\lambda = 2d \sin \theta \quad (2.1)$$

Saçılan X-ışınları CCD (yükü birleştirilmiş cihaz; charged coupled device) dedektörleri tarafından kaydedilmiş ve kristal kalitesi, kristal simetrisi, X-ışını yoğunluğu ve dedektör verimliliği gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilen kırınım yoğunluğu verileri toplanmıştır. Toplanan bu veriler, elektron yoğunluğu haritaları elde etmek için kristal sistem tanımlama, indeksleme, yoğunlukların ölçümü ve ölçekleme faktörü için modern yazılım kullanılarak işlenir. Kristalografi yöntemindeki ana zorluk, elde edilemeyen faz bilgisidir. Bu nedenle, deneysel olarak çözülmüş homolog protein yapısının faz bilgisinin kullanıldığı moleküler değiştirme gibi çeşitli yöntemler kullanılarak bu zorluklar ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Elde edilen genlik ve faz bilgileri ile hızlı Fourier dönüşümü yöntemi kullanılarak elektron yoğunluğu haritaları oluşturulur. Elektron yoğunluk haritaları, yapının oluşturulacağı üç boyutlu konturlar kullanılarak elde edilir. Ayrıca yapının kalitesi R faktörü ile hesaplanır. Yapının modeli tahmin edildikten sonra, daha kaliteli yapılar elde etmek için Refmac gibi bilgisayar programları tarafından daha fazla iyileştirme yapılabilmektedir (Su vd. 2015).

X-ışını kristalografisi protein yapılarının en yüksek atomik çözünürlüğünü elde etse de proteinin çözünür ve kristalize edilebilir olması, çok miktarda proteinin gerekli olması gibi bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Ancak daha büyük proteinlerin saflaştırılması ve kristalize edilmesi zordur ve bu nedenle bu yöntemle 250 kDa'dan nispeten daha büyük olan hedef proteinlerin yapılarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaz (Singh ve Tripathi 2020).

2.9.2. X-ışını serbest elektron lazerleri (XFEL) kullanılarak biyolojik yapı ve işlevin keşfedilmesi

Seri femtosaniye kristalografi olarak adlandırılan bu yöntem, X-ışını kristalografi yöntemlerinde devrim yaratan yeni bir teknolojidir. Serbest elektron X-ışını lazeri (XFEL), son derece kısa (sadece femtosaniye süren) ve son derece parlak radyasyon darbeleri oluşturmak için kullanılır. Küçük kristallerden (nanometreden mikrometreye kadar) oluşan bir akım, ışının içinden geçirilir ve her X-ışını darbesi bir kristalden bir kırınım deseni üretir ve genellikle bu süreçte onu yok eder. Bu bireysel kırınım desenlerinin on binlerce kadarından tam bir veri seti derlenir. Bu yöntem çok güçlüdür çünkü araştırmacıların ışığın biyolojik kromoforlar tarafından emilmesi gibi çok kısa zaman ölçeklerinde meydana gelen moleküler süreçleri incelemesine olanak tanımaktadır (Zardecki vd. 2022).

2.9.3. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, yüksek manyetik alanlar altında H^1 , C^{13} , N^{15} gibi belirli çekirdeklerin radyo frekansı radyasyonunu absorbe etmesini ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, bazı moleküllerin manyetik olduğu ve çekirdeklerinin manyetik alan varlığında döndüğü prensibiyle çalışır. Harici manyetik alanlar uygulandığında, protonlar belirli dönme durumları (α veya β formları) sergiler ve bu durumlar arasındaki fark uygulanan manyetik alanın gücü ile ilişkilidir. Spin durumu, rezonans olarak adlandırılan atomlara özgü elektromanyetik radyasyonun uygun darbe frekansı uygulanarak α formundan uyarılmış β formuna kaydırılabilir. Bu rezonans spektrumu, elektromanyetik radyasyon veya manyetik alanın herhangi biri sabit tutularak değiştirilmesiyle elde edilebilir. NMR kullanarak bir proteinin yapısını belirlemek için, öncelikle yapıyı incelemeyi sağlayacak C^{13} ve N^{15} atomları ile etiketlenmelidir. Bu etiketlenmiş proteinler, tek karbon kaynağı ve azot kaynağı olarak sırasıyla C^{13} etiketli glikoz ve N^{15} etiketli amonyum klorür içinde rekombinant protein ekspresyonu ile elde edilebilir (Sugiki vd. 2017).

NMR ile yapı belirleme iki veri seti ile gerçekleştirilir, birincisi elektromanyetik radyasyona maruz kaldığında spesifik rezonansa sahip C^{13} , N^{15} ve proton gibi izotopik etiketli moleküller tarafından nükleer manyetik rezonans ölçümüdür. Rezonans, çeşitli deneyler kullanılarak bulunacak belirli bir amino aside atanacak olan proteinin üç boyutlu yapısındaki çekirdeklere, frekansa ve elektromanyetik ortamlara göre farklılık gösterir. İkinci veri seti ise, çekirdekler arası mesafeler ve NOE (Nükleer Overhauser Etkisi) ile bulunabilen atomun konumu hakkında bilgi içerir, yani mıknatıslanma etkisi, aralarında 5 Å'dan daha az mesafe olan bir çekirdekten diğerine kaydırılır. Bu yöntem, proteinin yapısını yeniden yapılandırmak için kullanılacak üç boyutlu uzayda bir atomun diğerine göre konumunu elde etmemizi sağlar. Yetersiz veri seti, yaklaşık mesafe bilgisi ve çözelti halindeki proteinlerin gerekliliği gibi çeşitli faktörler NMR ile protein yapısının belirlenmesini sınırlar (Wider 2005).

Kristalize edilemeyen ancak çözünebilen ve nispeten küçük boyutlu (2-40 kDa) proteinler NMR kullanılarak çözülebilir ve protein yapısının grupları çözelti içinde belirlenir ve böylece proteinin dinamik davranışı incelenebilir. NMR'da çözülen protein yapısının çözünürlüğü, aktif bölge etkileşimleri gibi temel bilgilerin elde edilmesinin zor olduğu X-ışını kristalografisine kıyasla nispeten düşüktür (Singh ve Tripathi 2020).

2.9.4. Kriyo-elektron mikroskopisi

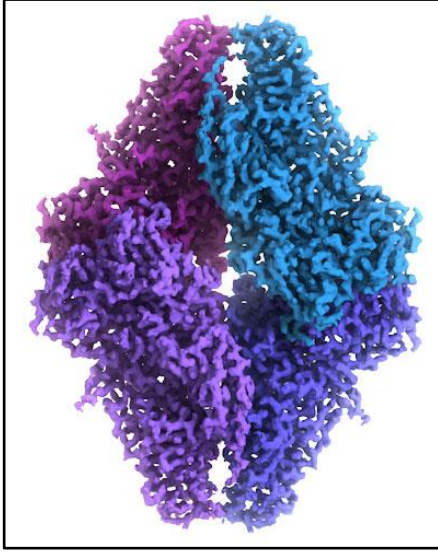
Kriyo-elektron mikroskobu prensip olarak ışık mikroskobuna benzer ancak aradaki fark, radyasyon kaynağı olarak 4000-7000 Å gibi daha yüksek dalga boyuna sahip ışık yerine, ışığa kıyasla moleküllerle daha büyük ölçüde etkileşime girmeyi sağlayan 0.02 Å (300 Kv) dalga boyuna sahip elektronların kullanılmasıdır. Hücre mimarisini ve protein birleşimleri gibi karmaşık yapıları başka hiçbir yöntemle elde edilemeyecek moleküler çözünürlükte görselleştirmede yaygın olarak kullanılan bir tekniktir ve birkaç mega Dalton yapısına kadar büyük proteinler bu yöntemle modellenenir. Örneğin, hesaplama ve görüntüleme tekniklerindeki son gelişmelerle, AAV2 kapsid varyantının (3.9 Mda) daha yüksek çözünürlüğü (1.8 Å çözünürlük) yakın zamanda belirlenmiştir (Tan vd. 2018).

İlk olarak, çözelti halindeki makromoleküler örnek, iyon bombardımanı yoluyla EM ızgarası üzerine yayılmış karbon bazlı bir film üzerine uygulanır ve böylece proteini tutmak için hidrofilik bir yüzey oluşturur. Örneklerin radyasyon hasarından korunması için amorf buz oluşturmak üzere sıvı nitrojen veya sıvı helyum kullanılır. Dondurulmuş ızgaralar, radyasyon hasarını azaltmak için düşük elektron dozuyla görüntülemenin yapıldığı kriyo-transfer tutuculara aktarılır. Daha sonra, gelişmiş bir dedektör kullanılarak moleküller farklı yönlerdeyken, örnek eğilerek binlerce görüntü kaydedilir.

Elde edilen kriyo-EM mikrografları, projeksiyonun Fourier dönüşümü gerçekleştirildikten sonra üç boyutlu bir model elde etmek için hesaplamalı olarak yeniden yapılandırılır. Veri rekonstrüksiyonu 4 Å çözünürlüğün ötesinde yapılmışsa, de novo model gibi çeşitli arıtma programları ile daha yüksek çözünürlüklü sonuçlar elde edilebilir (Lyumkis 2019).

Moleküler ve atomik ayrıntılar açısından, hem tek parçacık üç boyutlu elektron mikroskobu hem de elektron kırınımı yöntemleri artık makromoleküler kristalografi ile karşılaştırılabilir boyutta çözünürlüğe sahip sonuçlar vermektedir (yani, amino asit yan zincirlerinin, yüzey su moleküllerinin ve kovalent olarak bağlı olmayan ligandların görselleştirilmesini sağlar). 2016 yılında, üç boyutlu elektron mikroskobu yapılarının PDB kayıtları sayıca ilk kez NMR spektroskopisi ile aydınlatılmış proteinleri geçmiştir.

Üç boyutlu elektron mikroskobunun gücü aslında, vitröz buzda numune hazırlama/koruma, gelişmiş elektron optikleri, elektron görüntü kontrastını artırmak için faz plakaları, doğrudan elektron dedektörleri, gelişmiş veri işleme yazılımı ve daha hızlı bilgisayarlar gibi son önemli teknolojik gelişmeler sayesinde artmıştır. (Şekil 2.31).



Şekil 2.23. Beta-galaktosidazın kriyo-EM haritası; bu harita molekülün buz içinde donmuş 90.000’den fazla görüntüsünden oluşturulmuş ve atomik bir model sağlayacak kadar ayrıntılı hale getirilmiştir Kriyo EM haritası EMDatabank girişi EMD-2984’te ve atomik koordinatlar PDB girişi 5A1A’da bulunmaktadır (Zardecki vd. 2022)

2.9.5. Bütünleştirici modelleme

Yapısal biyoloji alanı, son yıllarda “bütünleştirici modelleme” olarak adlandırılan bir yaklaşım kullanarak özel bir başarı elde etmiştir. Bu yaklaşımdaki ana fikir, her biri sistemin belirli bir yönünü incelemek için iyi olan çeşitli yöntemlerden elde edilen bilgileri birleştirerek düzeneğin genel bir resmini oluşturmaktır.

Örneğin, bir düzenepteki bileşenler arasındaki mesafeleri belirleyen spektroskopik veya kimyasal çapraz bağlanma verilerini, bir kompleksin genel şekli hakkında bilgi veren düşük çözünürlüklü elektron mikroskobu verileriyle birleştirmek, bütünleştirici modellemede etkili bir strateji haline gelmiştir. X-ışını kristalografisi, NMR spektroskopisi ve elektron mikroskopisi gibi geleneksel yapısal biyoloji yöntemlerine ek olarak, küçük açılı çözelti saçılması, Forster rezonans enerji transferi, kimyasal çapraz bağlama, kütle spektrometrisi, elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi ve diğer biyofiziksel teknikler gibi deneysel yöntemler bütünleştirici modelleme çalışmalarında kullanılmıştır. Bütünleştirici modellemenin önemli bir yönü, ortaya çıkan yapısal modellerin her zaman atomik koordinatlardan oluşmaması ve birden fazla atomu temsil eden kaba taneli bölgeler içerebilmesidir. Bunun nedeni, farklı deney türlerinin farklı çözünürlük seviyelerinde bilgi sağlamasıdır (Zardecki vd. 2022).

2.10. *in silico* Yöntemler Kullanarak Protein Yapı Tahmini

Hesaplamalı protein yapısı tahmini, onlarca yıldır biyoinformatikçiler için önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Genom dizileme teknolojilerindeki ilerlemeler nedeniyle yeni protein dizileri olağanüstü bir hızla yayınlanmaktadır ve şu anda veri tabanlarında 200 milyondan fazla dizi bulunmaktadır. Bununla birlikte, Protein Veri Bankası’na (PDB) depolanan deneysel protein yapılarının sayısı ise yaklaşık 154.000 civarındadır.

Bu nedenle, bu dizi-yapı boşluğunu kapatmak için etkili protein yapı tahmin sistemlerine ihtiyaç vardır (Berman vd. 2000; UniProt 2023).

Protein yapısı tahmin yöntemlerindeki ilerlemeleri takip edebilmek için, ilki 1994 yılında gerçekleştirilen CASP (Protein Yapı Tahmini Tekniklerinin Kritik Değerlendirmesi), isimli etkinlik her iki yılda bir düzenli olarak yapılmaktadır. Her CASP yarışması için katılımcılar, verilen hedef diziler için öngörülen süre içinde modeller oluşturmak zorundadır (hedef, 3D yapının belirlenmesi gereken protein dizisini temsil eder). Bu hedef dizilerin gerçek yapıları önceden bilinmemektedir. CASP ekibi, etkinliğin sonuna kadar bu hedef dizinin gerçek yapısını belirleyecek ve sonuçlar deneysel olarak belirlenen modellere göre değerlendirilecektir. Tahmin edilen yapılar, CASP bilim insanları tarafından deneysel olarak belirlenen muadilleriyle karşılaştırılacaktır. CASP7'den itibaren hedefler iki kategoriye ayrılmıştır: serbest modelleme (SM) ve şablon tabanlı modelleme (ŞTM). ŞTM, homolog yapıları zaten PDB'de depolanmış olan hedefler içindir. Önemli benzerlikleri paylaşan protein dizileri homolog olarak adlandırılır. SM kategorisi yarışmadaki en zor gruptur. Rosetta ve I-TASSER ve QUARK gibi diğer parça tabanlı yaklaşımlar uzun yıllar boyunca CASP yarışmalarına hakim olsa da, derin öğrenme teknikleri bu senaryoyu değiştirmiştir. CASP13'ten bu yana, protein yapı tahmini önemli ölçüde ilerlemiştir.

Derin öğrenme tekniklerinin eşlik ettiği rezidü-kalıntı mesafesi tahmini bu olağanüstü başarıya katkıda bulunmaktadır. SM hedefleri için Global Mesafe Testi (GMT) skorları CASP13'te önceki CASP yarışmalarına kıyasla önemli bir artış göstermiştir. CASP13'te ilk kez turlara katılan AlphaFold ekibi bu kayda değer gelişmeyi elde etmiştir. CASP14 sonuçları açıklandığında, AlphaFold 2 GDT puanlarını 90'a yaklaştırarak 'birçok CASP değerinde' iyileştirme elde etmiştir.

CASP14'ün genel tahmin doğruluğu, özellikle en zor CASP hedefleri olan SM hedefleri için önemli ölçüde artmıştır. Sonuçların doğruluğundaki artışın başlıca nedeni, derin öğrenme ağlarının istatistiksel yöntemlerin yapamadığı bir şey olan kalıntılar arası mesafeleri tahmin etme becerisidir. CASP14'e katılan ekiplerin yaklaşık yarısı tahmin görevlerinin bir parçası olarak derin öğrenmeyi kullanmıştır. Bu durum, yapay zeka tekniklerinin bu alandaki ilerlemeyi hızlandırma potansiyelini göstermektedir (Kryshtafovych vd. 2019; Senior vd. 2019; 2020; Jisna ve Jayaraj 2021).

2.10.1. Protein yapısı tahmini için geleneksel yaklaşımlar

Protein yapısı tahmini, Emin Fischer (1894)'in benzersiz bir katı 3D yapının bir proteinin işlevini tanımladığını öne sürdüğü yıla dayanmaktadır. Christian Anfinsen (1961) doğal konformasyonun tüm olası konformasyonlar arasında en düşük enerjiye sahip olduğunu öne sürmüştür. Daha sonra 1972'de, bir proteinin belirli bir ortamdaki doğal konformasyonunun yalnızca amino asit dizisi tarafından belirlendiğini belirten hipotez (Anfinsen'in dogması olarak bilinir), daha fazla biyoinformatikçiye yapı tahmin problemleri üzerinde çalışmaya motive etmiştir. Aslında protein yapısı tahmin teknikleri, sezgisel algoritmalar uygulayarak en uygun protein konformasyonunu ortaya çıkarmayı amaçlar (Anfinsen 1973).

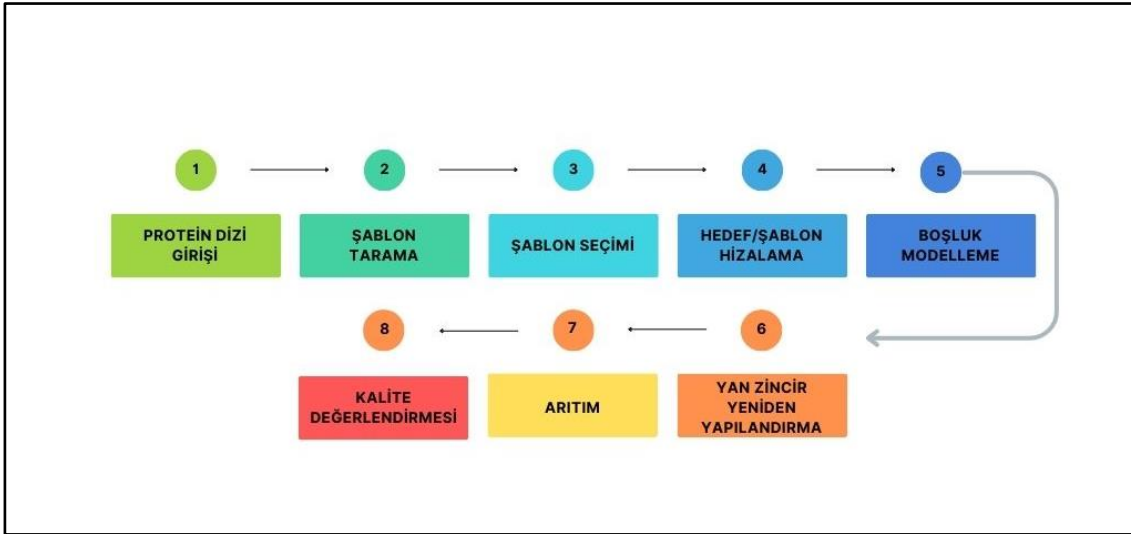
Protein yapı tahmini için iki ana yaklaşım vardır: Bunlar şablon tabanlı ve şablonsuz yapı tahminidir. Seçilecek yöntem, protein veri bankalarındaki şablon yapıların

mevcudiyetine bağlıdır. Şablon tabanlı yöntemler modeli oluşturmak için bir şablon yapı kullanırken, şablonsuz modelleme sıfırdan başlamak zorundadır. Şablon tabanlı yöntemler, bilinen diğer proteinlerle yapısal benzerlik bilgisini kullanır. Bu yaklaşımlar homolog proteinleri veya benzer katlanmalara sahip proteinleri arar ve bunları hedef modeli oluşturmak için şablon/şablonlar olarak kullanır. Homolog diziler, ortak bir evrimsel atayı paylaşan dizilerdir. Ancak, bazı durumlarda önemli bir dizi benzerliğini paylaşmayan bazı diziler de ortak bir ataya sahip olabilir (Fiser 2010; Lam vd. 2017; Wei 2019).

Şablon tabanlı yöntemler; homoloji modelleme, karşılaştırmalı modelleme ve protein dizileme (kat tanıma) tekniklerini kullanır. Homoloji modelleme ve karşılaştırmalı modelleme terimleri, her ikisi de yapı tahminine benzer bir yaklaşım izlediğinden birbirinin yerine kullanılır. Tek fark, sorgu dizisi ve seçilen şablonlar atasal bir geçmişi paylaştığında, bunun homoloji modellemesi olarak tanımlanmasıdır. Herhangi bir evrimsel ilişki olmaksızın sadece paylaşılan bir dizi benzerliği olduğunda, buna karşılaştırmalı modelleme denir. Potansiyel şablonlar bulunduktan sonra, üç boyutlu yapıyı oluşturmak için model oluşturma teknikleri uygulanır. Güvenilir bir evrimsel ilişki veya önemli bir dizi benzerliği tespit edilmediğinde, herhangi bir evrimsel ilişkisi olmayan (ancak benzer katlanmalara sahip) proteinler de yapısal benzerlik gösterdiğinden, protein dizileme teknikleri kullanılır. Ab initio yöntemler genellikle şablon tabanlı yöntemler için uygun bir yapısal şablon tespit edemediğinde kullanılır. Şablon tabanlı yaklaşımlar, bilinen yapılara yüksek düzeyde dizi benzerliği gösteren bu hedef diziler için yüksek kaliteli modeller üretebilir. Doğru modeller genellikle Şablon tabanlı yöntemler kullanılarak üretilbilse de protein katlanmasının arkasındaki fizikokimyasal prensibi anlamamıza yardımcı olmaz (Jisna ve Jayaraj 2021).

2.10.1.1. Homoloji modelleme

Homoloji modelleme, PDB’de uygun bir şablon mevcut olduğunda güvenilir protein yapıları oluşturmak için en doğru ve başarılı yaklaşımdır. Homoloji modelleme yöntemleri, bilinen 3D yapılara sahip homolog protein dizilerini arar ve şablon / şablonlar olarak hedefe önemli dizi benzerliği olan bir dizi / dizileri seçer (Fiser 2010). Daha sonra hedef diziyi şablonla hizalar ve yapısal modeli oluşturmaya başlar. Çoklu dizi hizalama teknikleri (örneğin CLUSTALW (Higgins vd. 1992), Clustal Omega (Sievers ve Higgins 2014) ve MUSCLE (Edgar 2004)) dizideki yapısal olarak korunmuş bölgeler hakkında daha fazla bilgi ekler ve bu nedenle daha uzak ilişkili şablonları tespit edebilir. Tek bir şablona güvenmek yerine, birden fazla şablondan gelen bilgiler homoloji modelleme tekniğinin doğruluğunu ve verimliliğini artırır. Homoloji modellemesi, dizi özdeşliğinin %25’in üzerinde olduğu hedefler için geçerlidir. Dizi özdeşliği daha az olduğunda, bir kalıntının yanlış hizalanması bile ortaya çıkan modelin kalitesini önemli ölçüde azaltacaktır. Farklı protein modelleme teknikleri arasında homoloji modelleme yüksek kaliteli yapılar oluşturur. Neredeyse tüm homoloji modelleme yöntemleri, benzer belirli bir süreci takip eder (Şekil 2.32).



Şekil 2.24. Homoloji modelleme akış şeması (Jisna ve Jayaraj 2021)

Homoloji modellemesindeki ilk adım olan şablon arama, sorgu dizisini BLAST veya FASTA gibi araçlar kullanarak bilinen protein yapılarının dizileriyle karşılaştırır. Şablon seçimi, arama yöntemleri tarafından bulunan sonuçlar arasından en uygun şablonu / şablonları seçer. Diğer adımlar, şablon-hedef hizalama bilgilerini kullanarak hedef yapıları oluşturur. Şablon-hedef hizalamasından iki bölge ayırt edilebilir: şablonla iyi hizalanmış bölgeler ve hizalanmamış bölgeler. Bir sonraki adım, şablonun yapısal bilgilerini kullanarak bu hizalanmış bölgeler için üç boyutlu model oluşturur. Burada şablona bağlı modelleme yöntemi kullanılabilir. Hizalanmamış bölgeler dizideki boşluklara karşılık gelir: bu boşlukların modellenmesi boşluk modelleme veya döngü modelleme olarak adlandırılır (Jones ve Swindells 2002; Xu vd. 2003; Wu ve Zhang 2007; Finn vd. 2011; Pearson 2016).

Şablona bağlı modelleme yönteminde, model aşağıda belirtilen yöntemlerden biriyle oluşturur:

İlk yöntem hizalanmış bölgeleri katı cisimler olarak kabul eder ve bunları birleştirerek modeli oluşturur. Şablonun omurga koordinatlarını hizalanmış bölgelerden kopyalar. Protein yapısı, korunmuş çekirdek bölgeler, değişken döngüler ve yan zincirlerin bir kombinasyonu olarak inşa edilir.

İkinci yaklaşımda, $C\alpha$ atomlarının koordinatları gibi atomik koordinatların bir alt kümesi kılavuz konum olarak kabul edilir. Model oluşturma, bilinen protein yapılarından en uygun parçanın aranması ve ardından yerleştirilmesi ile yapılmaktadır.

Üçüncü yöntem, şablonun hizalanmış bölgelerine dayalı olarak hedef sekans için bir dizi kısıtlama oluşturur. Bu kısıtlamalar, stereo-kimyasal kısıtlamalarla birlikte modelleri oluşturmak için kullanılır. En iyi model, kısıtlamaların en az ihlal edildiği modeldir.

Bir segment için yapısal bilgi mevcut olmadığında, bu bölgeler için şablondan bağımsız modelleme uygulanır; bu durumda, yaygın olarak kullanılan iki yaklaşım vardır:

Parça veri tabanı arama yaklaşımlarında, döngü parçalarından oluşan bir kütüphane kullanılır. Sistem aday parçaları uzunluk, ikincil yapı ve diğer geometrik kısıtlamalara göre seçer ve seçilen parçaların uyumunu RMSD ve katı cisim çarpışma sayısı gibi çeşitli kriterlerle değerlendirir.

İkinci yöntem, segmentlerin tüm olası konformasyonları arasında konformasyonel aramaya dayanmaktadır. Bu yöntemler Moleküler Dinamik (MD) (Lee vd. 2001), Monte Carlo (MC) simülasyonları (Carnevali vd. 2003), Genetik Algoritmalar (Herrmann ve Suhai 1994), benzetimli tavlama (Nilges vd. 1988) gibi yöntemlerden birkaçını kullanır.

Yan zincirler, bir proteinin yapısını tamamlamak için omurgasına eklenen dallardır. Yan zincirleri omurga yapısına yerleştirmenin fizibilitesi, yan zincir konformasyonlarının sınırlı sayıda olduğu gerçeğine dayanır. Yan zincir konformasyonlarını elde etmek için rotamer kütüphaneleri kullanılır. Çoğu zaman, homoloji modelleme yöntemi ile oluşturulan başlangıç modelinin iyileştirilmesi gerekir. Protein yapısı iyileştirme, protein modelleme yöntemleri tarafından tahmin edilen yapıların kalitesini artırmayı amaçlar.

Uygun bir şablon veya iyi bir hizalama bulmak zor olduğunda, karşılaştırmalı modelleme adımları (şablon arama hariç), elde edilen modelde daha fazla iyileşme sağlanana kadar yinelenir (Xu ve Zhang 2011; Bhattacharya vd. 2016; Huang vd. 2020).

Homoloji modellemesi için yaygın olarak kullanılan bağımsız bir uygulama olan MODELLER, yapının kısıtlamalarını temsil eden bir moleküler olasılık yoğunluk fonksiyonunu optimize ederek hedefin üç boyutlu modelini oluşturur. MODELLER, şablon-hedef hizalamalarına dayalı olarak atomik mesafeleri ve dihedral açıları tanımlayan birçok kısıtlama tanımlar. MODELLER, tek bir 3D model oluşturmak için birden fazla şablonu birleştirmek veya şablonların fikir birliğini temsil eden modeller oluşturmak için yaygın olarak kullanılır (Eswar vd. 2006).

RosettaCM (Song vd. 2013), dizi benzerliği %15 gibi düşük bir oranda olsa da, protein modeli için doğru omurga ve yan zincir konformasyonlarını oluşturur. Hedef dizinin şablonlara hizalanması, HHSearch (Soding vd. 2005), SPARKS-X (Chen vd. 2016) ve RaptorX (Kallberg vd. 2012) gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. RosettaCM, hizalanmış bölgeler için Kartezyen uzay tabanlı şablon parçaları ile hizalanmamış segmentler için burulma açısı tabanlı parçaların bir kombinasyonunu kullanır. Yerel yapı optimizasyonu ve döngü kapatma, iteratif parça yerleştirme ve gradyan tabanlı minimizasyon teknikleri ile gerçekleştirilir. MODELLER gibi, RosettaCM de şablonun gözlemlenen özelliklerinden yola çıkarak, hedef için belirli kısıtlamalar getirir. Ayrıca, omurga ve yan zincir konformasyonlarını iyileştirmek için FastRelax protokolünü (Conway vd. 2014) kullanır. Ortaya çıkan modellere yüksek çözünürlüklü iyileştirme uygulandıktan sonra, en kararlı yapı doğal yapı olarak seçilir.

2.10.1.2. İş parçası (threading)

Düşük dizi özdeşliğine sahip protein dizilerinin benzer katlanmalar sergileyebildiği nadiren gözlenir (Lemer vd. 1995). Bir kat tanıma yöntemi olan Threading, verilen hedef sekans için çeşitli alternatifler arasından en benzer katlamayı seçer. Şimdiye kadar belirlenen yapıların ayrıntılı analizleri, protein yapıları tarafından

benimsenen farklı katlanmaların sayısının doğada sınırlı olduğunu göstermektedir. Dizi özdeşliği %25'in altına düştüğünde, homolog şablonlar elde etmek kolay değildir ve bu nedenle daha hassas yapısal ilişkiler bulmak için kat tanıma teknikleri kullanılır.

Kat tanıma yöntemleri (Rost vd. 1997; Soding ve Remmert 2011) hedefle benzer bir kata sahip bir proteini aramak için dizi-yapı karşılaştırmaları gerçekleştirir. Bu şekilde elde edilen protein yapısı, hedef için bir 3D model oluşturmak için şablon olarak kullanılır. Bu yöntemler, sorgu dizisini bir kütüphaneye eşleştirir. Kütüphane, kıvrımları temsil etmek için fizikokimyasal özellikleri, ikincil yapıyı ve çözücü erişilebilirliğini kullanır. Bu özelliklerin şablonlar, hedefler ve homolog diziler için hesaplanması daha kolaydır. EigenTHREADER, pGenTHREADER, HHSearch, ORION yöntemleri protein yapı tahmini için iş parçacığı tabanlı yaklaşımlar kullanır. TMFoldRec ve RosettaMP yöntemleri ise genellikle membran proteinlerine uygulanmaktadır (Lobley vd. 2009; Ghouzam vd. 2015; Kozma ve Tusnady 2015; Buchan ve Jones 2017; Koehler Leman vd. 2017).

Evrimsel ilişkileri ortaya çıkarmak için güçlü tekniklerin geliştirilmesi, çoklu şablonların birleştirilmesi için yaklaşımlar, başarılı arıtma yöntemleri, daha iyi model seçim stratejileri ve büyük veri tabanlarını hızlı bir şekilde işlemek için yüksek performanslı hesaplama olanaklarının geliştirilmesi, şablon tabanlı yöntemlerin başarısına katkıda bulunmuştur. Bunlar en doğru protein yapısı tahmin yöntemleri olsa da veri tabanlarında homolog diziler bulunmadığında başarısız olurlar. Derin öğrenme tabanlı yaklaşımların entegre edilmesiyle, şablon tabanlı yöntemin performansı son zamanlarda artmıştır (Jisna ve Jayaraj 2021).

2.10.1.3. Şablonsuz modelleme/serbest modelleme (ŞM/SM)

Karşılaştırmalı modelleme ve iş parçacığı yöntemleri şablon bilgilerine ihtiyaç duyarken, şablonsuz yöntemler herhangi bir potansiyel şablon yapısı kullanmadan protein yapıları geliştirir. Gerçekte, sekans veri tabanındaki önemli sayıda protein, bilinen protein yapılarıyla herhangi bir sekans benzerliğini paylaşmaz. Bu dizilerin modellenmesi, yapı tahmini alanında çalışan araştırmacılar için en zor hedeflerden birisidir. Bu nedenle, önceden bilinen yapılara dayanmadan sadece amino asit dizisini kullanan şablonsuz tahmin yöntemlerinin geliştirilmesi de oldukça önemlidir. Bu alanda kabul edilebilir doğruluğa sahip ilk model CASP4'te sunulmuştur. Ab initio modelleme terimi şablonsuz modelleme yaklaşımlarının yerine kullanılmaktadır.

Ab initio yöntemi proteinin doğal yapısını bulmak için konformasyonel uzayda yoğun bir arama yapar. Ab initio yöntem, fizik tabanlı (saf ab initio olarak da adlandırılır) veya bilgi tabanlı (parça tabanlı olarak da adlandırılır) olabilir (Weiner vd. 1984; Skolnick 2006; Dhingra vd. 2020). Fizik tabanlı yaklaşım atomlar arasındaki etkileşimi modellemek için kuvvet alanlarını kullanırken, bilgi tabanlı teknikler PDB'de depolanan verilere dayanır. Fizik tabanlı yaklaşımlar, gerçek katlanma mekanizmaları hakkında fikir vermenin yanı sıra termodinamik ilkelerini kullanarak doğal yapılar üreten yaklaşımlar oldukları için araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. Bu yaklaşımlar MD, MC simülasyonları, genetik algoritmalar ve benzetimli tavlama tekniklerini uygular. Saf bir ab initio yöntemi yalnızca 'yeni' bir katlanma ile doğal yapıyı türetebilir. ASTRO-FOLD, AMBER, CHARMM, OPLS, UNRES ve GROMOS96 protein yapılarını tahmin etmek için saf ab initio yöntemini kullanır. CHARMM36 ve AMBER Lipid14 gibi yöntemlerde

ise kuvvet alanları özellikle membran proteinlerine uygulanmaktadır. Bilgi tabanlı teknikler, parçaları ve diğer istatistiksel bilgileri elde edebilmek için PDB kayıtlı, bilinen 3B yapıları kullanır. Bununla birlikte, en başarılı ab initio yaklaşımları, önceden belirlenmiş protein yapılarını kullanan parça tabanlı yöntemlerdir (Jorgensen ve Tirado-Rives 1988; Schuler vd. 2001; Case vd. 2008; Brooks vd. 2009; Subramani vd. 2012; Dickson vd. 2014; Czaplewski vd. 2018).

Parça bazlı yaklaşımlar, uygun şablon yapıların bulunamadığı durumlarda tek pratik yaklaşımdır. Tipik olarak, saf bir ab initio modelleme, oluşturulan birçok konformasyon arasından en düşük enerjili durumu aramak için enerji fonksiyonlarını kullanır. Parça tabanlı yöntemlerde uygulanan puanlama fonksiyonlarının, enerji fonksiyonları ile ilişkisi zayıftır. Ayrıca, saf ab initio yaklaşımları, son teknoloji ürünü süper bilgisayarlar kullanılsa bile yalnızca küçük hedeflere uygulanmaktadır. Parça tabanlı yaklaşımlar, saf ab initio yöntemlerine kıyasla konformasyon sayısını azaltma avantajına sahiptir (Abbass ve Nebel 2020). Parça tabanlı yöntemler, yapıların yerel düzeyde karşılık gelen amino asit dizisiyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu ilkesine dayanır. Böylece, hedef diziden küçük segmentleri, bilinen yapılardan (yani fragman kütüphanesinden) benzer dizilerin konformasyonlarını seçerek ilerler. Dahası, çalışmalar bir parçanın benimseyebileceği konformasyonların neredeyse eksiksiz olduğunu göstermektedir. (Baeten vd. 2008; Trevizani vd. 2017).

MC ve MD, makromoleküllerin konformasyon uzayını örneklemek için yaygın olarak kullanılan iki simülasyon yöntemidir. MD simülasyonları bir moleküler sistemin zamana dayalı davranışını hesaplar, MC simülasyonları problemin rastgele örneklerini seçer ve sonuçları toplar. Ayrıca, MD simülasyonları gerçek katlanma mekanizmalarının araştırılmasında kullanılırken, MC simülasyonları katlanmış yapı araştırmalarında kullanılır. Yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardan MC, katlanma sürecini simüle ederken, MD yapısal iyileştirmeye katkıda bulunur. MC simülasyonlarını kullanan parça tabanlı yaklaşımlar, genellikle doğru topolojiye sahip küçük ya da orta büyüklükte proteinler için umut verici sonuçlar vermektedir.

Parça bazlı yaklaşımlar, aşağıdaki nedenlerden dolayı saf ab initio modellemeye göre hesaplama açısından daha az maliyetlidir:

- Tek bir rezidü yerine, bir seferde bir dizi rezidü dikkate alınır, bu da konformasyonel arama uzayının daralmasına neden olur.
- Bu yöntemler, bilinen protein yapılarından parçaların yeniden kullanılmasına izin verir. Bilinen protein yapılarından seçilen fragmanlar zaten kararlı konformasyonlardır ve bu nedenle bu fragmanlar içindeki etkileşimlerin yeniden hesaplanmasına gerek yoktur.
- Bu yaklaşımlar genellikle MC simülasyonlarını kullanır. MC algoritmaları kuvvetlerin hesaplanmasını veya sonlu zaman adımlı integratörlerin kullanılmasını gerektirmez. Bu yöntemler, sabit bağ uzunluğuna sahip olduğu varsayılan modeller için oldukça iyi çalışır. MC simülasyonları aynı anda birden fazla çözüm hesaplayarak daha hızlı çalışır (Jorgensen ve Tiradorives 1996; Shah ve Maginn 2011).

Parça tabanlı yaklaşımlar, ilgilenilen hedef segmentle eşleşen bilinen parça yapılarını arar. Çoğu yöntem, fragman kütüphanesi olarak bilinen bir fragman

koleksiyonundan fragmanları seçer. Tahmin edilen yapının kalitesi, parça seçim stratejilerine bağlıdır. İdeal bir parça kütüphanesi kullanılarak, yüksek kaliteli protein yapılar oluşturulabilir.

Parça seçim stratejileri, parça tabanlı yöntemlerin başarısını belirler. FRAGFOLD, I-TASSER, ROSETTA (Das ve Baker 2008) ve QUARK bu teknikleri kendi tahmin sistemlerine dahil etmişlerdir. I-TASSER, bağımsız bir paket ve çevrimiçi bir sunucudur ve ücretsiz olarak kullanılabilen bir yinelemeli iş parçacığı (ASSEMBLY) arıtma algoritmasıdır. Hedef diziler, benzer bir kıvrıma ait proteinleri tanımlamak için bir protein yapısı kütüphanesinde taranır. Şablonun hizalanmış bölgesinin parçaları tam uzunlukta bir model oluşturmak için yeniden birleştirilirken, hizalanmamış bölgeler saf ab initio teknikleriyle oluşturulur. Konformasyonel uzay örnekleme için MC simülasyonları kullanılır. Konformasyonlar daha sonra SPICKER (Zhang ve Skolnick 2004) kullanılarak kümelenir. Simülasyonun ikinci turundan sonra, en düşük enerjili yapılar seçilir. Son olarak, tam atomlu yapıyı tamamlamak için omurga ve yan zincir atomları seçilen yapılara eklenir. I-TASSER (Zhang sunucusu olarak), CASP14 yarışmalarında Evrensel Uzaklık Testi Toplam Puanı (Global Distance Test Total Score, GDT-TS) için z-skorumlarının analizine dayalı olarak en iyi protein tahmin sunucusu seçilmiştir. Chunk-TASSER (Zhou ve Skolnick 2007) ve I-TASSER bilgi tabanlı teknikler kullanırken, ROSETTA ve QUARK fizik ve bilgi tabanlı yaklaşımları birleştiren hibrit bir teknik uygulamaktadır. ROSETTA, PDB'den bilinen yapıların parçalarını bir araya getirerek protein modelleri oluşturur. QUARK, CASP9, 10, 13 ve 14 serbest modellemede en iyi sunucu ('tüm gruplar' + 'yalnızca sunucu' hedeflerindeki sunucu grupları) olarak belirlenmiştir ve bilgi tabanlı kuvvet alanları tarafından yönlendirilen Replica-Exchange Monte Carlo (Thachuk vd. 2007) simülasyonlarını birleştiren bir parça birleştirme yaklaşımı kullanmaktadır. I-TASSER (Zhang sunucusu olarak) CASP11'de SM kategorisi için en iyi sunucu ('tüm gruplar' + 'sadece sunucu' hedefleri üzerindeki sunucu grupları) olarak belirlenmiştir. Son CASP yarışmalarında SM kategorisinde en üst sıralarda yer alan sunucular ('tüm gruplar' + 'yalnızca sunucu' hedeflerindeki sunucu grupları) tahmin işlem süreçlerine parça tabanlı teknikleri de dahil etmişlerdir.

Parça tabanlı yöntemler, saf ab initio yöntemlerinden daha doğru yapılar üretir ve bu nedenle ab initio yöntemler, yapı tahmini için parça tabanlı yöntemleri yaygın olarak uygular. Birkaç karşılaştırmalı modelleme yöntemi de boşlukları modellemek için bu tekniği benimser. Bu yöntemler için oluşturulan fragman kütüphanelerinin, ilmekler ve helikslerden ziyade helikal yapılar için yerel fragmanlar içermesi beklenmektedir. Helikal alt yapı geometrisi, modelin diğer ikincil yapı türlerine kıyasla daha az esnek olmasını sağlar (Baeten vd. 2008; Wang vd. 2019a; Abbass ve Nebel 2020). Bu sınırlı yapısal çeşitlilik nedeniyle, tüm alfa sınıflarına ait proteinler, parça tabanlı ab initio yöntemleri için en uygun olanlardır. Ayrıca, ab initio yöntemlerinde kullanılan enerji fonksiyonları, uzun menzilli atomik etkileşimleri içermediği için küçük alfa-helikal proteinler için daha uygundur (Bowie ve Eisenberg 1994). Beta kırmalı tabakalar ve heliksler daha zayıf ve gevşek dizi-yapı ilişkileri sergilediğinden, baskın beta ve heliks içerikli yapıların modellenmesinde genellikle bu yöntemler kullanılmaz (Baeten vd. 2008; Wang vd. 2019a).

Enerji fonksiyonunun doğruluğu, düşük enerjili durumu bulmak için kullanılan arama algoritması ve çeşitli konformasyonlar arasından en iyi modeli seçmek için

benimsenen stratejiler ab initio yönteminin başarısını belirler. Bu yöntemler genellikle çok fazla hesaplama kaynağı gerektirdiğinden, ab initio modelleme yerine diğer yöntemlerle tespit edilen bazı düşük şablonlarla başlamak genellikle daha iyi sonuç verir. Ab initio yöntemi için konformasyonel arama alanı, hedef dizinin uzunluğu ile artar. Bu nedenle bu yöntemler daha çok küçük uzunluktaki diziler için uygundur. Bilgi tabanlı yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, saf ab initio modelleme hız ve doğruluk açısından hala çok geridedir. Son zamanlarda, birçok homoloji modelleme programı, hizalanmamış bölgelerdeki boşlukları modellemek için parça tabanlı yöntemler kullanmaktadır. Ab initio tarafından üretilen düşük çözünürlüklü yapıların PDB'deki bilinen yapılarla eşleştirilmesinin, hedef diziye düşük dizi benzerliği olan ancak yerel yapıya yüksek yapısal benzerliğe sahip yapıların tanımlanmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir.

Farklı sunucuların sonuçlarını birleştiren bir meta sunucu yaklaşımı (Zhang vd. 2016) protein yapısı tahmini için de kullanılabilir. Zhang sunucusu, iki parça tabanlı yaklaşımı, I-TASSER ve QUARK'ı birleştirmiştir ve CASP14'te 'sunucu grubu' kategorisinde en iyi performans gösterenlerden biri olmuştur. Ab initio protein yapısı tahminine yönelik son teknolojik sistemlerden bazıları, tahmin amacıyla kalıntı-rezidü temas bilgilerinden yararlanmaktadır.

Çizelge 2.2. Protein modelleme için yöntemler (Jisna ve Jayaraj 2021)

Yöntemler	Özellikler
Karşılaştırmalı/homoloji modelleme	Yüksek kaliteli yapılar üretir, Seçilen protein şablonuna yönelik güçlü önyargı, Dizi-dizi karşılaştırmaları, Yüksek dizi özdeşliği gerektirir
İş parçacığı	Dizi-yapı karşılaştırmaları, Evrimsel ilişkinin olmadığı durumlarda kullanılır, Düşük dizi özdeşliğine sahip proteinlere uygulanır
Ab initio	Hesaplama açısından pahalı, Konformasyon alanı dizi uzunluğu ile artar, Küçük proteinler için uygundur, Genellikle yerel yapıları tanımda başarısız olur

2.10.2. Protein yapı tahmini için yapay zeka teknikleri

Son birkaç yıldır oldukça popüler olan yapay zeka, akıllı programlar ve makineler oluşturmakla ilgilidir. YZ terimi 1956 yılında John McCarthy tarafından ortaya atılmıştır. Bir YZ yaklaşımı olan Makine Öğrenimi (ML), programların programcılar tarafından açıkça programlanmak yerine kendi deneyimlerinden öğrenmelerini sağlar. Makine öğrenimi, tahminler yapmak için öncelikle sinir ağlarını ve genetik algoritmaları kullanır. Eğitimin ardından ML, girdiyi çıktıya eşleyen işlevi öğrenme yeteneği kazanır. ML algoritmaları arasında karar ağacı öğrenimi, Rastgele Orman (Ali vd. 2012), kümeleme, Destek Vektör Makineleri, Bayesian ağları ve Takviyeli Öğrenme yer almaktadır (Mahesh 2020). Yapay Sinir Ağları (YSA), insan beyin sisteminden esinlenen bir “makine öğrenme modelleri” sınıfıdır. Katmanlar halinde organize edilmiş birbirine bağlı birkaç yapay nörondan oluşan YSA, evrensel fonksiyon yaklaşımıcıları olarak bilinir. Bu çok katmanlı ağ, eğitim için bir geri yayılım algoritması kullanır (Jisna ve Jayaraj 2021).

Derin öğrenme, son yıllarda en iyi performans gösteren yapay zeka sistemleri tarafından kullanılmaktadır. Derin Öğrenme (DÖ) teknolojileri (LeCun vd. 2015), bilgisayarla görme, Doğal Dil İşleme gibi hayatının tüm alanlarında devrim yaratmıştır. GPU’ların ve TPU’ların piyasaya sürülmesi, hızlı öğrenme algoritmaları ve büyük veri kullanılabilirliği DÖ sisteminin büyümesini hızlandırmıştır. DÖ, birçok yapay nöron katmanı içeren Derin Sinir Ağlarını kullanır ve modelin karmaşık girdi modellerini tanımasını sağlar. Derin öğrenme algoritmaları, büyük bir veri kümesi üzerinde eğitildiğinde girdi-çıkı eşlemesini otomatik olarak öğrenir, böylece eğitim için özelliklerin açıkça çıkarılması gibi sıkıcı bir görevden kaçınılmış olur. Bu sistemler ayrıca, modeli eğitmek için kullanılan verilerden gelen çıkarımları kullanarak daha önce görülmemiş yeni verilere de uyum sağlayabilir. Özelliklerin girdi verilerinden hiyerarşik olarak öğrenilebilmesi, bu modellerin proteinlerde uygulanabilirliğini artırmaktadır.

CASP13’te AlphaFold (Senior vd. 2019; 2020), yüksek ŞTM ve GDT_TS puanları ile “iki CASP” değerinde başarı sağlamıştır. AlphaFold, dizideki alt bölgeler için rezidüler arası mesafelerin ayrık olasılık dağılımlarını tahmin etmektedir ve tüm protein dizisi için bir LxL (L dizinin uzunluğudur) mesafe haritası (distogramlar veya mesafe histogramları olarak da adlandırılır) oluşturmaktadır. Bu mesafe tahminleri, örnekleme ve gradyan iniş tabanlı yöntemler kullanılarak minimize edilmiş bir mesafe potansiyeli kullanılarak 3D modellere dönüştürülmektedir. Burada kullanılan mesafe tahmin modeli, tüm mesafe matrisinin 64×64 bölgelerine uygulanan derin bir konvolüsyonel residü ağıdır. Bu yaklaşım, daha az homolog diziye sahip hedefler için bile yüksek doğrulukla model elde edilmesini sağlar. AlphaFold hem temas mesafesi tahmininde hem de 3D model oluşturmada diğer yöntemlerden daha iyi performans göstermektedir. AlphaFold tarafından tahmin edilen rezidüler arası mesafe olasılıkları analiz edildiğinde, derin öğrenme modelinin ikincil yapılar arası paketleme ayrıntılarının yanı sıra alfa heliks ve beta kırmalı tabakalarının topolojisini de yakaladığı görülmektedir.

2.11. Protein Yapısı Tahmin Yöntemlerinin Değerlendirilmesi

Kök Ortalama Kare Sapması (RMSD), tahmin edilen yapının kalitesini tahmin etmek için geleneksel ve yaygın olarak kullanılan bir ölçüdür. RMSD, en iyi şekilde üst üste bindirilmiş iki protein yapısındaki eşdeğer atom çiftleri arasındaki ortalama mesafeyi hesaplar. Genellikle, RMSD hesaplamalarına sadece omurga atomları dahil edilir. RMSD

hesaplamasına sadece $C\alpha$ atomları dahil edilirse, buna c-RMSD veya $c-\alpha$ RMSD denir. N uzunluğunda iki parça arasındaki RMSD formülü: Burada d_i , söz konusu parçalardaki i^{th} koordinatları arasındaki mesafedir.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i^2} \quad (2.2)$$

RMSD ölçümleri de yerleştirme ve birçok farklı yöntem için yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük bir RMSD, dikkate alınan parçaların yeterince yakın olduğunu veya tek bir küme halinde gruplandığını gösterir. RMSD, küresel topolojiden ziyade yerel yapı sapmasına daha duyarlıdır. RMSD'deki kuadratik faktör, birkaç yerel yapısal farklılığa sahip olanlar için bile yüksek değerlerle sonuçlanır. Bu nedenle, tek başına RMSD değeri kullanıldığında, tamamen farklı topolojilere sahip yapılar ile döngülerde veya kuyruklarda hafif yönelim farkı olan yapılar birbirinden ayırt edilemez (Xu ve Zhang 2010). RMSD değeri protein uzunluğu ile artar, bu da onu daha büyük proteinler için kullanışsız hale getirir (Maiorov ve Crippen 1994).

2.12. Yapısal Kararlılıkta Moleküler Etkileşimlerin Rolü

Atomların ve moleküllerin en dıştaki elektron kabuğu, tanımlanan yapıyı oluşturmak için birbirlerine sıkıca paketlenmiştir. Bir molekülün her bir atomu, elektrostatik etkileşimler olarak tanımlanan atomları çekmek veya itmek için belirli bir yük (pozitif veya negatif) ile ilişkilidir. Bu moleküler etkileşimler, yaşam biliminin çeşitli alanlarında önemli bir parametredir. Örneğin, protein katlanması, ilaç tasarımı ve malzeme bilimini vb. anlamaya yardımcı olur. Moleküller arası etkileşimler veya iki veya daha fazla molekül/atom arasında etkileşim oluşturan kovalent olmayan etkileşimlere molekül içi etkileşimler denir. Kovalent olmayan etkileşimler kovalent etkileşimlerden farklıdır ve elektronları paylaşmazlar, daha ziyade atomlar arasında kuvvet oluştururlar. Genellikle, atomlar arasındaki bağlar molekülü kendi ortamlarında belirli bir konformasyonda tutar ve bu da kararlı yapıyı sınırlamak için önemlidir. Azot, oksijen, iyot ve hidrojen gibi atomlar oda sıcaklığında iki atomlu halde bulunur. Yüksek basınç ve sıcaklık altında, azot atomları etkileşimlerini kaybeder ve böylece kimyasal reaksiyon sonucu doğal yapıyı deforme eder.

Atomlar arasındaki bağları kırmak için harcanan enerji miktarı bağ entalpisi olarak tanımlanır. Örneğin, su molekülünün bağlarını kırmak için 493 KJ/mol enerji gereklidir. Biyolojik moleküldeki bağlar DNA, RNA ve protein gruplarında aynıdır ve yapıyı deforme etmek için bağların kırılması gerekli değildir. Molekülün entalpi enerjileri çevresel koşullara göre değişebilir. Çoğunlukla, yapıdaki moleküler etkileşimler, komplekslere biyolojik işlevlerine ulaşmaları için kararlılık sağlar. Protein belirli bir katlanma benzeri yapı oluşturur ve globüler kıvrım oluşturduğunda stabilize olur. DNA molekülleri biyolojik işlev için her zaman çift standart sarmala sahiptir. Böylece DNA, heliksler arasındaki moleküler etkileşim sayesinde yapısını korur. Protein-DNA kompleksinin biyolojik birleşiminde, proteinler DNA'yı tanır ve ona bağlanır. Buna karşılık, kompleksler açıldığında veya yapı ayrıldığında, proteinin yüzeyi su molekülü

tarafından çevrelenir; bu nedenle, moleküler etkileşimler çevrelenmiş su yüzeyi ile gerçekleşir. Dolayısıyla protein veya DNA'nın yapısı komplekslerin doğal katlanmasından farklı olabilir (Singh ve Tripathi 2020).

Moleküler etkileşim terimi ilk olarak Johannes Diderik van der Waals tarafından ortaya atılmıştır. Van der Waals etkileşimi, atomun çekici veya itici kuvvetini tanımlar (Roth vd. 1996). Moleküler etkileşimler molekülün yüklü yüzeyinin doğası gereği elektrostatiktir. Protein, DNA veya RNA'nın yapısal kararlılığı moleküler etkileşime dayanır. İlaç keşif sürecinde, ligand molekülünün fizikokimyasal özellikleri ve geometrisi, inhibitör aktivite için spesifik bağlanma bölgesine bağlanma açısından önemlidir. Bileşiğin kovalent tek bağı 80-100 Kcal/mol enerji ve birkaç kovalent olmayan etkileşim içerir (Andrews vd. 1984). Genellikle, tuz köprüsü, H-bağı, hidrofobik ve aromatik etkileşimlerin enerjileri sırasıyla ~ 2 , ~ 1 , ~ 0.7 ve $\sim 1-3$ kcal/mol'dür. Ayrıca, $Dg \frac{1}{4} 2.303 RT \log K$ olduğunda tek iyonik etkileşimler için 25 kat artmış afinite ölçebiliriz; benzer şekilde, bir hidrojen bağı altı kat artmış enerji ve metil grubu (-CH₃) için 3.5 kat artmış enerji üretir. Atomlar arasındaki sterik bir çarpışma bile bağlanma afinitesi üzerinde kayda değer bir etkiye neden olur ve bu da basitçe Lennard-Jones potansiyeli ile açıklanır. Moleküler etkileşim; (1) elektrostatik etkileşimler, (2) tuz köprüleri, (3) hidrojen bağları, (4) kısa menzilli itme, (5) proteinlerdeki iyon çiftleri, (6) dipolar, (7) dipol-dipol etkileşimleri, (8) dipol kaynaklı dipol etkileşimleri, (9) yük-dipol etkileşimleri, (10) dalgalanan dipolar etkileşimler, (11) katyon- π etkileşimleri ve (12) Lennard-Jones potansiyeli ve van der Waals yarıçapları etkileşimler olmak üzere çeşitli türlerden oluşur.

2.12.1. Protein yapısındaki tuz köprüleri

Tuz köprüsü, kovalent olmayan etkileşimlerin bir türüdür ve tipik olarak proteindeki amino asitlerin iki iyonize bölgesi arasında etkileşim oluşturur. Genel olarak, amino asitlerin zıt yüklü yan zincirleri (Glu- veya Asp- ile Arg+ veya Lys+) tuz köprüleri oluşturur. Ayrıca, proteindeki amino asit yan zincirleri, K⁺ ve SO₄²⁺ gibi iyonize ligand ile tuz köprüleri oluşturabilir. Bu da doğal proteinin yapısal stabilitesine katkıda bulunur. Çoğunlukla, tuz köprülerinin yüklü atomların merkezinde 4 Å'luk bir mesafe ile var olduğuna inanılmaktadır. Termofillerin proteinleri, *mezofil* organizmanın proteininden daha fazla tuz köprüsüne sahiptir. Proteine yapısal kararlılık ve termal ortamlarda yaşama direnci kazandırır. Tuz köprüleri hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Hidrojen bağları ligand bağlanması, protein-protein etkileşimi ve enzimatik aktivite için çok önemlidir. İyon eşleştirme etkileşimleri en önemli etkileşimlerden biridir ve proteinlerin yapısal stabilitesinde rol oynar. Ayrıca, proton verici ve alıcı atomlar ortalama 3 Å mesafe ile hidrojen bağı etkileşimi oluşturmaktadır ki bu da hidrojen bağındaki mesafenin iyon çifti etkileşimlerinden farklı olabileceğini göstermektedir. Çoğunlukla, kovalent olmayan etkileşimler zayıf etkileşimlerdir, ancak protein konformasyonunda yapısal stabiliteye daha az katkıda bulunur (Gromiha 2010).

2.12.2. Proteinlerdeki iyon çiftleri

İyon çiftleri genellikle pozitif ve negatif yüklü parçacıklardan oluşur. Nötr atomlara verilen yeterli enerji, iyon çiftlerinin yüklü parçacıklarını üretir ve bu da zıt yüklü molekülde ayrışmanın meydana gelmesine neden olur. İyon çiftleri, protein yapısının stabilizasyonu için zıt yüklü amino asitler arasındaki hayati etkileşimdir.

Basitçe, kristal yapıda tek konformer hidrojen bağlı iyon çiftini oluşturan tuz köprüleri sınıfı olarak adlandırılırlar. Çözeltide, iyon çifti, etkileşim oluşturmak için sarmalın dönüşündeki yüklü rezidülerden (Arg, Glu ve Lys) oluşan alandaki α -heliksi stabilize etmek için önemlidir (Batchelor vd. 2019).

2.12.3. Dipol-dipol etkileşimleri

Dipol, atomlar veya moleküller arasındaki eşit olmayan elektron çifti ile etkileşimler oluşturur. Dipol-dipol etkileşimleri, iki dipolar molekül birbiriyle etkileşime girdiğinde oluşur. Polar molekülün kısmen yüklü negatif bölgesi, başka bir polar molekülün kısmen yüklü pozitif kısmını çeker. Protein yapısında, dipol-dipol etkileşimleri helikal yapının stabilize edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu etkileşim genellikle diğer proteinler veya peptitlerle bağlanmak için protein yapısında belirgin bir konformasyonel değişikliğe uyum sağlamaya zorlar. Ayrıca, dipol-dipol etkileşimleri protein-protein kompleksi oluşumu için önemlidir.

2.12.4. Pi-Pi (II-II kümeleme) etkileşimleri

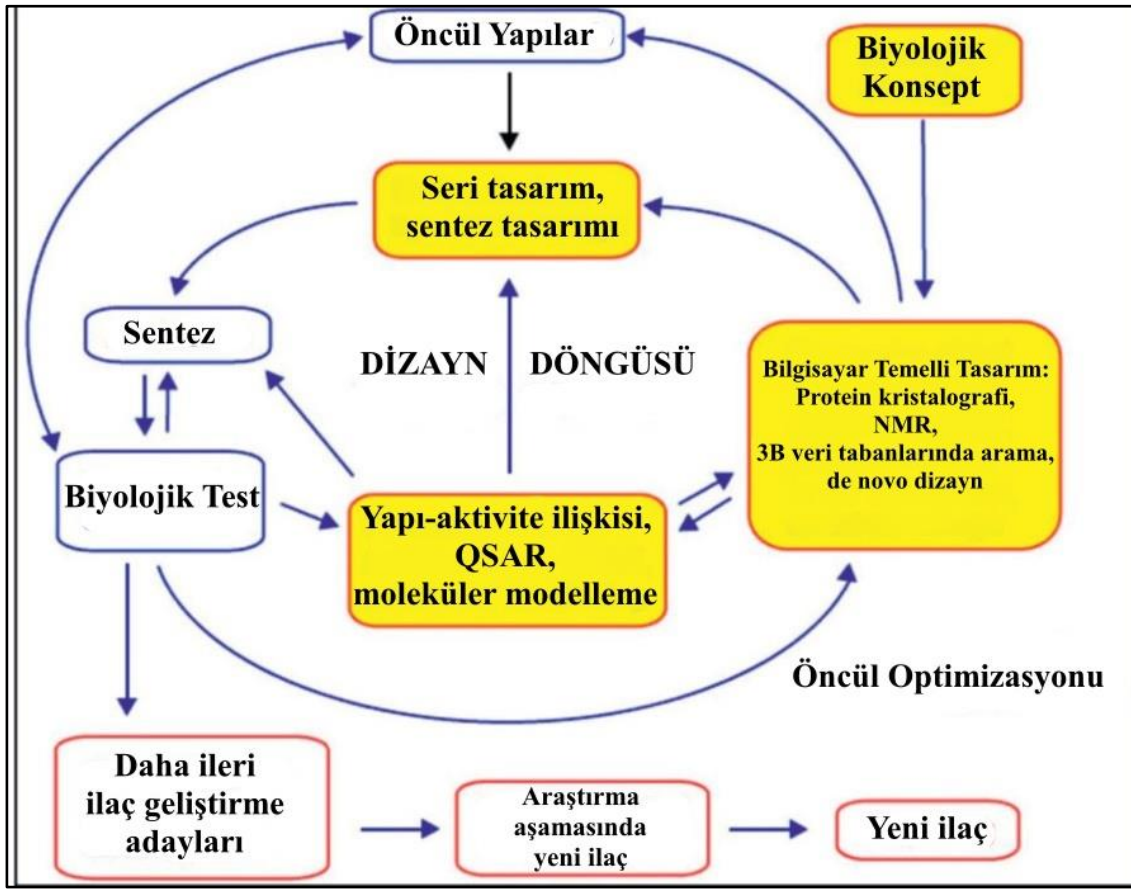
Pi-pi kümeleme etkileşimleri, moleküllerin veya amino asitlerin aromatik halkası arasında oluşan kovalent olmayan etkileşim türüdür. Triptofan, tirozin ve fenilalanin rezidüleri, diğer aromatik içeren moleküller veya bileşiklerle pi-pi kümeleme etkileşimi oluşturabilen aromatik bir halkadan oluşur. Pi-pi kümeleme etkileşimleri, biyolojik mekanizma için protein-protein ve protein-ligandın yapısal stabilitesi ve moleküler tanınmasında önemlidir. Ligand molekülünden oluşan aromatik halka, pi-pi kümeleme etkileşimi yoluyla proteinin aktif bölge rezidülerine yaklaşacak ve daha sonra cep ile yüksek afinite ile bağlanacaktır.

2.13. Geleceğin İlaçlarının Keşfi

Geleneksel olarak, yeni ilaçlar çok sayıda sentetik kimyasal bileşiğin veya doğal maddenin istenen etkiler açısından taranmasıyla keşfedilmektedir. Yeni farmakolojik ajanlar geliştirmeye yönelik bu yöntemin geçmişte başarılı olduğu kanıtlanmış olsa da, çeşitli nedenlerden dolayı optimal değildir. Tarama yaklaşımının en önemli dezavantajı, uygun bir tarama prosedürü gerektirmesidir. Tarama süreciyle ilgili bir diğer sorun da, rastgele doğası nedeniyle, sadece istenen aktiviteye sahip bir kimyasal bulmak için tekrarlayıcı ve zaman alıcı olmasıdır (Venger vd. 1979; Klebe ve Abraham 1999). Hastalık süreci moleküler düzeyde anlaşıldıktan ve hedef molekül(ler) tanımlandıktan sonra ilaçlar özellikle hedef moleküle etkileşime girerek hastalığı bozacak şekilde oluşturulabilir. Bu yöntemi kullanarak ilaç üretmek için toplanması gereken büyük miktarda veri nedeniyle, bilgisayar destekli ilaç tasarımının en fazla etkiye sahip olacağı yer burasıdır.

Şekil 2.33'te açıklanan çeşitli yeni ilaç bulma tekniklerini tartışırken, ilaç keşfinin hem kümülatif hem de tekrarlayan bir süreç olduğunu hatırlamak önemlidir. Mekanistik olarak geliştirilen ilaçlar muhtemelen taranacak ve daha sonra en iyi aday tasarımını üretmek için modifiye edilecektir (Loew vd. 1993). Yapı ve hedefler için katı yapıların kullanımı, ilaç oluşturmak için moleküler modelleme kullanmanın ilk aşamalarında yaygındır. İlaç tasarımında, hem tek moleküllerde hem de birbirleriyle etkileşime giren

moleküllerde moleküler bilginin esnekliği çok önemli ve zor bir konudur (Kishor vd. 2022).



Şekil 2.25. Öncül optimizasyon döngüsü (Kishor vd. 2022)

2.14. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

Genel olarak, yeni ilaçlar tesadüfi gözlemler ve analizler yoluyla bitkilerden ve diğer doğal kaynaklardan keşfedilmiştir. İlaç keşfi alanı son derece zorludur ve yüksek maliyetli altyapı ve laboratuvar olanakları gerektirir. Her ulustan insanlar, hastalıkları tedavi etmek ve önlemek için bitki veya hayvan kökenli ilaçlar kullanmışlardır. Hastalıklarla mücadele etmek, ruh halini ve bilinci değiştirmek için madde arayışı neredeyse yiyecek ve barınak arayışı kadar temeldir. Bitkilerden veya hayvanlardan elde edilen çeşitli ilaç molekülleri oldukça değerlidir, ancak modern tıp sistemindeki ilaçların çoğu sentetik kimya ve biyoteknoloji ürünleridir. Dolayısıyla bir ilacın, hastalıkların önlenmesi, tedavisi ve teşhisinde ya da biyolojik sistemlerin hedef veya işlevlerinin modülasyonunda kullanılan doğal veya sentetik kaynaklı bir madde olduğu söylenir. Dolayısıyla, genel olarak, bir ilacın biyolojik sistemleri ve süreçlerini moleküler düzeyden hücresel düzeye kadar etkileyen bir kimyasal olduğunu söyleyebiliriz (Huang vd. 2010a). Ancak, yeni ilaç moleküllerinin keşfi için kullanılan geleneksel yaklaşım zaman alıcı ve yüksek maliyetlidir. Bu nedenle, yeni yaklaşımlar ilaç keşfi alanındaki geleneksel araştırmaların sınırlamalarını aşmaktadır. Bu yaklaşım, vücutta bulunan moleküler hedef ile potansiyel biyoaktif bileşiğin birbiriyle doğrudan ilişkili olduğu düşüncesine dayalı olarak gelişmiştir.

Bir ilacın tasarlanması için hastalığın ve bulaşıcı süreçlerin moleküler mekanizmasının anlaşılması şarttır. Yapı temelli ilaç tasarımı için, moleküler bir hedefin araştırılması, bir hastalık süreci ve bulaşıcı bir patojen için gerekli olan ilk adımdır. Bir sonraki önemli adım, hedefin moleküler yapısını deneysel veya hesaplamalı yaklaşımlarla belirlemektir. Yapı tabanlı ilaç keşfinin başarısı, bağlanma bölgelerinde bulunan amino asit rezidülerinin ayrıntılı bilgileriyle birlikte doğru hedef yapısına bağlıdır ve bu da küçük moleküllerin veri tabanının taranması için moleküler yerleştirme programı tarafından daha fazla kullanılır (Kesharwani vd. 2018).

İlaçlar tarihsel olarak tek bir biyolojik nesneyi, genellikle hedef olarak bilinen bir proteini, diğer biyolojik hedeflerin yanlış hedeflenmesinden kaynaklanan istenmeyen etkileri önlemek için yüksek seçicilikle hedeflemek üzere geliştirilmiştir. Buna dayanarak, çok hedefli ilaç kavramı, doğal olarak zararlı etkilerle bağlantılı olduğu için uzun zamandır “istenmeyen” olarak tanımlanmaktadır (Bolognesi ve Cavalli 2016; Ramsay vd. 2018). Buna paralel olarak, birden fazla hedefi vuran moleküllerin tek hedefe kıyasla daha güvenli bir profile sahip olduğu çeşitli kanıtlarla doğrulanmıştır. Bu nedenle, çok hedefli ilaçlar fikri, 2000 yılının başlarında ilk kez ortaya atıldığında evrim geçiren bir paradigmadan, 2017 yılı’nın en sıcak ilaç araştırma konularından birine hızlı ve çarpıcı bir ilerleme kaydetmiştir (Roth vd. 2004; Ramsay vd. 2018).

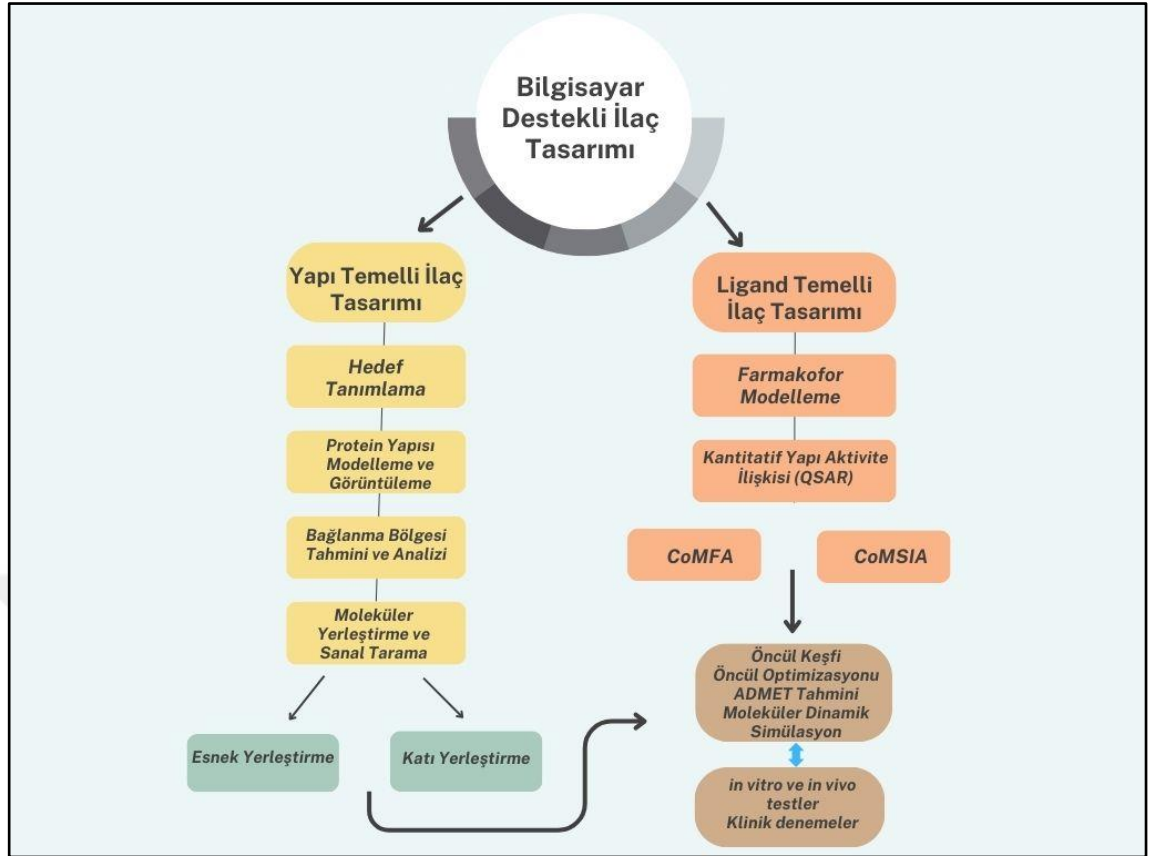
Kanser ve Alzheimer hastalığı gibi multifaktöriyel hastalıklarda, çok hedefli terapötiklerin bulunmasına acil ihtiyaç vardır. Alzheimer gelişimi için gerekli olan β -amiloid bölünme enzimi (BACE-1) ve asetilkolinesteraz (AChE) ilaç için umut verici hedefler olarak kabul edilmektedir (Goyal vd. 2014). Aslında, ilaçlar da tedavileriyle birlikte ciddi yan etkilere yol açmaktadır. Bu nedenle, aynı anda birden fazla hedefi inhibe edebilen ve yan etkileri en aza indirebilen çoklu endikasyon tedavilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Lim vd. 2019). Hastalıkların tedavisi için piyasada bazı çok hedefli ilaçlar mevcuttur. Nisan 2017’de onaylanan çok hedefli ilaç midostaurindir; belirli bir FLT3 gen varyantına sahip olan akut miyeloid lösemili yeni tanı konmuş yetişkin hastaların tedavisi için iyi bilinen bir çoklu kinaz inhibitörüdür. Bir çalışmada bu ilacın, protein kinaz C alfa, KIT, VEGFR2, WT ve PDGFR ve/veya FLT3 tirozin kinaz mutantlarının aktivitesini inhibe edebildiğini göstermiştir (Levis 2017; Ramsay vd. 2018).

İlaç keşfi, küçük molekül veri tabanlarının bir reseptör üzerinde taranmasına dayanırken, tasarım, öncü bileşiğin terapötik olarak istenmeyen bazı yan etkilere sahip olması durumunda öncü bileşiğin yapısında değişiklik yapılması esasına dayanır. Yukarıdakilere ek olarak, kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR), ilaç tasarım sürecinde tıbbi kimyacılar yardımcı olan moleküler modellemedeki bir diğer potansiyel alandır. Önceki yıllarda, yeni bir ilaç molekülünün tanımlanması çok karmaşık ve zaman alan bir süreçti. Genellikle, 5000-10.000’den fazla bileşik üzerinde çalışıldıktan sonra sadece tek bir ilaç molekülü piyasaya çıkmaktadır. Keşif aşamasında her bir ilacın maliyeti yaklaşık 156 milyon dolardır. Faz I, II ve III klinik araştırma ve Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) süreçlerinin maliyeti ise 75 milyon dolardır. Böylece, toplum yararına piyasaya çıkan her bir ilaç için toplam tutar yaklaşık 231 milyon dolar olmaktadır. Ardından, FDA onayı almak için de kapsamlı ve pahalı bir prosedürün izlenmesi gerekmektedir (Huang vd. 2010a; de Ruyck vd. 2016).

Yüksek başarısızlık seviyeleri, önemli maliyetler ve yeni ilaç tanımlama araştırmalarının yavaş hızı göz önüne alındığında, yaygın ve nadir hastalıkları tedavi

etmek için “mevcut” ilaçların yeniden tasarlanması, daha kısa sürede ve uygun maliyetli bir şekilde ilaç geliştirmek için düşük riskli bileşiklerin kullanılmasını gerektirdiğinden giderek daha fazla arzu edilir hale gelmektedir. Genel olarak, ilacın yeniden konumlandırılmasında yaygın olarak kullanılan üç tür yaklaşım hesaplamalı, deneysel ve karma yaklaşımları içerir (Xue ve ark. 2018; Talevi ve Bellera 2020). 1920’lerde ilk ilaç yeniden konumlandırma vakası tesadüfi bir keşifti. Bir asırlık ilerlemenin ardından, ilacın yeniden konumlandırılması döngüsünü hızlandırmak için daha fazla strateji önerilmiştir. Bu senaryoda, ilaç yeniden konumlandırma verimliliğini artırmak için makine öğrenimi algoritmaları uygulanmıştır. Hesaplama yöntemlerinin ötesinde, hedef tarama, hücre deneyleri, hayvan modeli ve klinik yaklaşımlar gibi ilaçlar ve hastalıklar arasındaki bağlantılara dair net kanıtlar sağlayan deneysel yöntemler oluşturulmuştur. Bunlar etkili ve güvenilir yöntemlerdir. Son yıllarda, giderek artan sayıda araştırmacı, yeni ilaç endikasyonlarını belirlemek için karma yaklaşımlar olarak adlandırılan hesaplamalı ve deneysel yöntemleri birleştirmiştir. Biyolojik deneyler ve klinik çalışmalar, hesaplama yöntemlerinin bulgularını doğrulamıştır. Karma yaklaşımlar, yeniden konumlandırılmış ilaçların başarılı ve hızlı bir şekilde keşfedilmesi için teşvikler sağlamaktadır. Bazı başarılı yeniden konumlandırılmış ilaçlar Zidovudine, Minoxidil, Sildenafil, Thalidomide, Celecoxib, Atomoxetine, Duloxetine, Rituximab, Raloxifene, Fingolimod, Dapoxetine, Topiramate, Ketoconazole ve Aspirin’dir. Bununla birlikte, ele alınması gereken önemli teknik ve düzenleyici konular da vardır. Bu, teknoloji, iş modelleri, patentler, yatırım ve tüketici talepleri gibi çeşitli faktörleri içeren karmaşık bir süreçtir. Çeşitli tıbbi veri tabanları geliştirilmiş olsa da, büyük miktarda tıbbi veriden tam olarak faydalanmak için en iyi yaklaşımı seçmek hala bir zorluktur (Xue vd. 2018; Pushpakom vd. 2019; Talevi ve Bellera 2020).

Moleküler modelleme, algoritmaların ve veri tabanlarının birçoğunun yeni veri formlarına yanıt olarak oluşturulduğu veya uyarlandığı, veri odaklı bir bilim dalıdır. Günümüzde bilgisayar deneyleri araştırmalarda giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek performanslı hesaplamanın ortaya çıkışı, laboratuvar deneylerini ve teoriyi yorumlamak için bir araç olarak *in silico* deneylere izin vermektedir. Hesaplama algoritmalarındaki ilerlemeler ve verimli yazılımların geliştirilmesi sayesinde, öncü bileşiklerin tanımlanması için gereken süre önemli ölçüde azalmıştır. İlaç keşfi ve tasarımında moleküler modellemenin farklı yaklaşımlarını vurgulayan ayrıntılı bir akış şeması Şekil 2.34’te gösterilmektedir.



Şekil 2.26. İlaç keşfi ve tasarımında moleküler modelleme yaklaşımlarının uygulanması (Singh 2020)

2.15. Yapı Temelli İlaç Tasarımı

Yapı temelli tasarım, araştırma kurumlarında ve ilaç endüstrisinde köklü bir geçmişe sahip olan multidisipliner ve yinelemeli bir süreçtir. Zanamivir, nelfinavir ve alevlitazar gibi birçok ruhsatlı ilaç ve klinik adayın keşfi ve geliştirilmesinde büyük rol oynamıştır. Buna karşılık, yapıya dayalı tasarım tarımsal kimya endüstrisinde nispeten yenidir ve şu anda piyasada bu yaklaşımın kullanımıyla doğrudan araştırılan bir ürün bulunmamaktadır. Bununla birlikte, yapı temelli tasarımın güçlü bir etkiye sahip olduğu birkaç veri tabanı ve yazılım programı bulunmaktadır (Huang vd. 2010a). Bir ilaç keşif programında kullanılan başlıca veri tabanı kaynakları çizelge 2.3’de listelenmiştir.

Çizelge 2.3. İlaç keşfinde kullanılan veri tabanları

Veri tabanı	Tanım	Referans
ZINC	Moleküler yerleştirme ve sanal tarama için ticari olarak mevcut bileşiklerin ücretsiz olarak kullanılabilen bir veritabanıdır	(Irwin ve Shoichet 2005)
PubChem	Küçük kimyasal moleküller ve bunların biyolojik aktivitelerini içeren bir veri tabanıdır.	(Kim vd. 2016)
ChemSpider	İlaç keşfi için kullanılan bir kimyasal yapı veritabanıdır	(Pence ve Williams 2010)
ChEMBL	Çok sayıda biyoaktif bileşik için ADMET ve bağlanma hakkında bilgi içeren küçük moleküllü bir veritabanıdır	(Gaulton vd. 2011)
DrugBank	İlaçlar, hedefleri ve diğer faydalı bilgiler hakkında bilgi içeren kapsamlı bir veritabanı kaynağıdır	(Wishart vd. 2006)

2.15.1. Hedef tanımlama

İlaç hedefinin belirlenmesi ve doğrulanması, ilaç keşif sürecinin ilk adımıdır. Bir hastalığın patofizyolojisinde yerleşik bir işlevi olan bir makromoleküldür. Organizmalarda dört ana ilaç hedefi bulunur: reseptörler ve enzimler dahil olmak üzere proteinler, nükleik asitler (DNA ve RNA), karbonhidratlar ve lipid. Piyasada bulunan ilaçların çoğunluğu hedef olarak proteinlere yöneliktir. Ancak, birçok patojen genomunun kodunun çözülmesi nedeniyle, nükleik asitler gelecekte ilaç hedefi olarak büyük önem kazanabilir. Binlerce aday makromolekül arasından potansiyel ilaç hedeflerinin seçilmesi zorlu bir görevdir. Post-genomik çağda, genomik ve proteomik yaklaşımlar hedef belirleme için en önemli araçlardır. Ayrıca, yüksek verimli omik teknolojilerindeki gelişmeler, konakçı-patojen etkileşimi için büyük miktarda veri üretmiştir. Bu mevcut veriler, ilaç keşif programında hedef belirleme sürecini hızlandırmak için bilim camiası tarafından ağ ve sistem biyolojisi yaklaşımları aracılığıyla entegre ve analiz edilmektedir (Gashaw vd. 2012; Singh vd. 2016; Singh 2020).

2.15.2. Makromolekül yapının modellenmesi ve görüntülenmesi

Daha önceki başlıklarda da belirtildiği gibi üç boyutlu yapının deneysel yaklaşımlarla belirlenmesi maliyetli ve zaman alan bir süreçtir. Bu nedenle, dizi

bilgilerini kullanarak karşılaştırmalı modelleme veya homoloji modelleme, üç boyutlu yapıların tahmini için doğru bir yöntemdir ve ilaç keşfi alanında çok çeşitli uygulamalar için uygun modeller sağlar. Hedef ve şablon yapının dizisi arasında daha yüksek bir dizi özdeşliği, daha güvenilir bir modelin oluşturulmasını vaat eder. Bir proteinin 3D yapısını bir diziden modellemek, X-ışını veya NMR doğrulanmış bir yapının yokluğunda ilaç tasarımı için gereklidir (Bodade vd. 2010; Hekkelman vd. 2010; Bagaria vd. 2012; Pathak vd. 2016).

RasMol, PyMol, Chimera ve diğer görselleştirme araçları, makromoleküllerin atomik düzeyde tahmin edilen ve deneysel olarak belirlenen 3B yapılarının görüntülenmesinde ve analiz edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda yapısal biyologlar için bilgisayar grafiklerine dayalı kullanıcı dostu simülasyon ortamları geliştirmek için birçok çaba sarf edilmiştir (Seeliger ve de Groot 2010; Mamgain vd. 2018).

2.15.3. Bağlanma bölgesi tahmini ve analizi

Bağlanma bölgelerinin belirlenmesi basit bir iş değildir; araştırmacılar bir bağlanma bölgesinin seçilmesi için bazı kriterler önermişlerdir. Herhangi bir proteinin fonksiyonel aktivitesinin, bağlanma bölgesi cebinde bulunan yüksek oranda korunmuş amino asit rezidüleri kümesi tarafından yönetildiği önerilmiştir. Mevcut algoritmaların çoğu, protein yapılarının tamamen gözden geçirilmiş ve deneysel olarak doğrulanmış bilgilerini içeren PDB gibi işlevsel alan veritabanları için moleküler yüzeyin benzerlik aramalarına dayanmaktadır. Ayrıca, rezidülerin filogenetik profiline ve Hidden Markov model, destek vektör makineleri ve CASP9 gibi diğer çeşitli modellere dayanan bazı yöntemler de geliştirilmiştir (Lopez vd. 2009; Liu vd. 2014).

Genel olarak, bağlanma bölgesi kalıntıları yakın akraba proteinler arasında yüksek oranda korunur. Bu tür bağlanma bölgesi rezidülerinin tanımlanması, tahmin edilen modelin homoloji için bütünlük sağlayan ve korunmuş aktif bölge rezidülerinin konumlandırılmasına yardımcı olan şablonlarıyla üst üste bindirilmesi yoluyla da yapılır. Bununla birlikte, birçok protein-ligand kompleks yapısı, ligandın bir proteinin bağlanma bölgesi boşluğuna bağlandığı bağlanma bölgesi için bir imza olarak halka açık veri tabanlarında da mevcuttur. Genellikle, araştırmacılar bağlı ligandı proteinden ayırır ve bu alan, deneysel olarak belirlenmiş bir kompleks yapı olduğu ve önemli sonuçlar verdiği için ligand yapıları kullanılarak yapılan moleküler yerleştirme çalışmaları için bağlanma bölgesi alanı olarak kabul edilir. Biyoinformatik alanındaki gelişmeler, tahmin edilen protein modelinin oyuğunda bulunan ve ilaç keşfi araştırmalarında daha fazla kullanılan yeni bağlanma bölgesi rezidülerini tahmin edebilen çeşitli hesaplama araçları sağlamaktadır (Bajorath 2015).

2.15.4. Moleküler yerleştirme (kenetlenme)

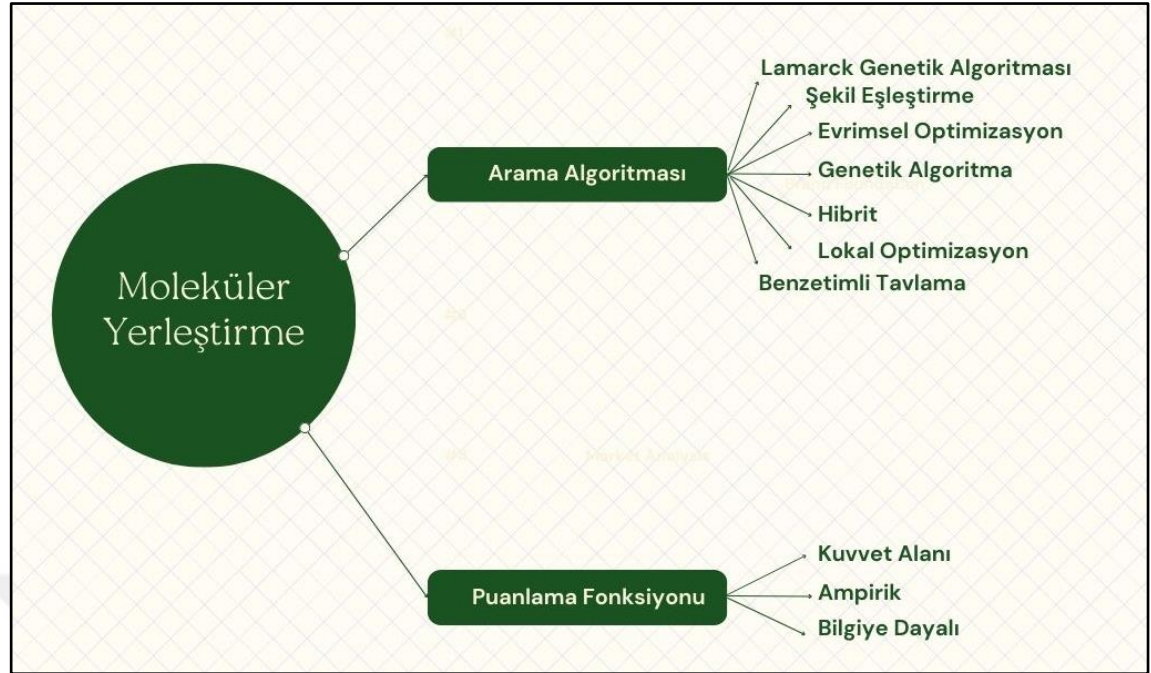
Yerleştirme, bir ligandın yapısını bir reseptör bağlanma bölgesinin gerekliliklerine tam olarak uydurmayı ve bağlanma gücünü doğru bir şekilde değerlendirmeyi amaçlar. Hedef protein yapısında bağlanma bölgesi bilinmediğinde, bu durumda, tüm protein yapısının bağlanma bölgesi alanı olarak kabul edildiği kör yerleştirme yararlı olurken, bağlanma bölgesi biliniyorsa, bölgeye özgü yerleştirme, ligand molekülünün etkileşimli doğasını tahmin etmek için yararlıdır. Genel olarak, kör

yerleştirme sonuçları daha az doğrudur ve sadece bağlanma bölgesi boşluğunda bulunan seçilmiş amino asit rezidülerini hedef aldığı için bölgeye özgü yerleştirmeye göre daha fazla zaman ve bellek gerektirir. Bununla birlikte, mevcut literatürün çoğunluğu, ligand tasarımı veya hedef tanıma ile ilgili belirli sorunların üstesinden gelmek için moleküler kenetlenmenin kullanıldığı vaka çalışmalarını da içermektedir (Adrian-Scotto ve Vasilescu 2008; Huang vd. 2010a; Yuriev ve Ramsland 2013; Pathak vd. 2016; Rana vd. 2020). İlaç keşfinde kullanılan ve çokça atıfta bulunulan moleküler yerleştirme programlarının bir özeti Çizelge 2.4’de listelenmiştir.

Çizelge 2.4. İlaç keşfinde kullanılan ve çok atıf alan moleküler yerleştirme programlarının bir özeti (Singh 2020)

Programlar	Açıklama	Referanslar
AutoDock	Moleküler yerleştirme için kullanılır. Küçük bir molekülün 3D yapıdaki bir hedef proteine bağlanma afinitesini ve pozlarını tahmin eder.	(Goodsell vd. 1996)
AutoDock Vina	Sanal tarama ve moleküler yerleştirme için kullanılır.	(Trott ve Olson 2010)
Glide Schrodinger	Moleküler modelleme ve bilgisayar destekli ilaç keşfi (CADD) için eksiksiz bir pakettir.	(Friesner vd. 2004)
Hex	Yerleştirme çalışmaları için kullanılmaktadır.	(Ritchie 2003)
Moleküler çalışma ortamı (MOE)	Moleküler modelleme ve bilgisayar destekli ilaç keşfi (CADD) için eksiksiz bir pakettir.	(Vilar vd. 2008)

Yerleştirme süreci üç ana bölüme ayrılabilir: (1) ligand ve makromolekül hazırlığı. Bu, potansiyel ligand bölgeleri olarak yüzey temsiline ve boşluklara izin veren kuvvet alanlarına dayanarak yapılır; (2) yerleştirme türünün tanımlanması: katı veya esnek; ve (3) ligand konformasyonları için arama stratejisinin belirlenmesi: sistematik veya stokastiktir (Guedes vd. 2014). Moleküler yerleştirme de uygulanan farklı skorlama fonksiyonları ve arama algoritmaları Şekil 2.35’de vurgulanmıştır.



Şekil 2.27. Moleküler yerleştirmede kullanılan arama algoritmaları ve skorlama fonksiyonları (Singh 2020)

Protein ve ligand seçimi ve hazırlanması her türlü hesaplama için önemli bir süreçtir. İlk adım, proteinin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu bir yapısını elde etmektir. Bazı proteinler için, önceki docking veya yapısal çalışma raporlarına sahip yapılar kullanılabilir. Docking için birkaç parametre ataması şunları içerir: parametrelendirme yönteminin seçimi yazılıma bağlıdır; örneğin, AutoDock ve SwissDock grup içi bir kuvvet alanı kullanırken, MOE (25) ve LeDock (Zhang ve Zhao 2016) sırasıyla AMBER ve CHARMM yüklerini ve atom türlerini kullanır. Sonuç olarak, tüm docking hesaplamaları için aynı hazırlık protokolü kullanılmalıdır. Ligand hazırlamada ilk adım genellikle protein yapısından veya PDB'den (örneğin, PubChem, organik sentez veya sanal bileşikler gibi açık kaynaklar) çıkarılmasını veya basitleştirilmiş moleküler girdi satırı girişi (SMILES) formatından böyle bir molekülün oluşturulmasını veya çeşitli optimizasyonlar gerçekleştirilerek molekülün çizilmesini içerir: ab initio veya yarı ampirik yöntemler kullanılarak geometri ve/veya yük atama, enerji minimizasyonu veya konformasyonel / totomer arama bunları içermektedir. (Wang vd. 2009; Elokely ve Doerksen 2013; Zhang ve Zhao 2016).

Protein yapıları da benzer şekilde hazırlanabilir, kompleks optimizasyonu ve ayrıntılı parametrelerin kullanımı, sonuçları ve etkileşimlerin modellenmesini önemli ölçüde iyileştirir. Ligand ve protein hazırlığının ardından, bağlanma bölgesi seçilmeli ve sınırlandırılmalıdır. Bu adım, koordinatlar belirtilerek manuel olarak veya herhangi bir bağlı ligandın koordinatları kullanılarak otomatik olarak yapılabilir. Ek olarak, bazı programlar boşlukların veya muhtemel bağlanma bölgelerinin hesaplanmasına izin verir. Bu özellikle bağlanma bölgesinin bilinmediği durumlarda kullanışlıdır. Ayrıca, bazı programlar kör yerleştirme yeteneğine sahiptir ve arama alanı makromolekülün tamamını içerir. Bağlanma bölgesi haritalaması GRID metodolojisi aracılığıyla gerçekleştirilir. Bir çalışmada, kutu boyutunun isabetlerin belirlenmesi ve sanal tarama süresi üzerindeki

etkisi tanımlanmıştır. Moleküler yerleştirme için GRID'nin önceden hesaplanmasına ihtiyaç duyan AutoDock ve AutoDock Vina örnek olarak verilebilir (Trott ve Olson 2010; Feinstein ve Brylinski 2015).

Grid (ızgara) kutusu boyutu, enerji aralığı ve tüketilebilirlik gibi farklı parametrelerin tanımlanması, moleküler yerleştirme yapmadan önce temel ve gerekli bir görevdir. Burada, ligandın bağlanma yapısını puanlamak ve doğru bir şekilde tahmin etmek için bağlanma bölgesi boşluğunda bulunan amino asit rezidülerine dayalı bir grid kutusu boyutu oluşturabiliriz. Ayrıca, özellikle AutoDock Vina'da enerji aralığını ve tüketilebilirliği tanımlamak, iyi olasılıkla doğru konformasyonun araştırılmasında yardımcı olur (Trott ve Olson 2010; Mamgain vd. 2015).

Katı molekül yerleştirme probleminde, molekülleri yerleştirme sırasında 3B uzamsal şeklini değiştiremeyen katı bir cisim olarak ilişkilendireceğiz, oysa esnek yerleştirmede moleküller reseptöre yanıt olarak tanımlanmış bir bölge içinde yeniden düzenleme esnekliğine sahiptir. Ligand bağlandıktan sonra, reseptördeki esneklik küçük yan zincir yeniden düzenlenmesinden büyük ölçekli omurga yeniden düzenlemelerine kadar değişebilir. Katı yerleştirme, esnek yerleştirme ve tasarımda önemli rol oynayan çeşitli hesaplama kavramlarının geliştirilmesine katkıda bulunur: şekil tanımlayıcıları, yerel minimizasyon, yumuşak potansiyeller, ızgara tabanlı enerji değerlendirmesi ve çoklu kopya teknikleri.

Moleküler yerleştirme, parça tabanlı, genetik algoritma, Monte Carlo ve dinamik algoritmalar gibi çeşitli arama algoritmalarını içerir. FlexX, DOCK, GOLD ve iç koordinat mekaniği (ICM) gibi özellikle yüksek verimli kenetlenme simülasyonları için kullanılan bazı önemli temel araçlar vardır. Kenetlenme simülasyonlarının amaçlarına bağlı olarak, farklı moleküler kenetlenme prosedürleri ya katı ya da esnek kenetlenme yaklaşımını içerir. Etkileşim potansiyelinin yumuşatılması, Lennard-Jones potansiyelini içeren etkileşim parametrelerinin değiştirilmesini içerir (Honeycutt ve Andersen 1987).

2.15.4.1. Ligand konformasyon stratejileri

Yerleştirme algoritmaları, sistematik veya rastgele konformasyonel arama ve puanlama fonksiyonuna göre en uygun çözümün seçilmesini içeren ligand konformasyonu ve yerleştirilmesinde önemli bir rol oynar. Sistematik arama, konformerleri ayrı ayrı değerlendirir ve ayrıca konformasyonların kapsamlı bir örneklemesini ve yapısal parametrelerin bir kombinasyonunu içerir. Stokastik arama iki algoritma kullanarak rastgele kullanılır: Monte Carlo veya genetik algoritmalar. Her biri, serbestlik derecesi olarak bağ rotasyonlarına dayalı farklı konformasyonlar geliştirir. Bundan sonra, yapılar poz seçimi ve filtreleme için puanlama fonksiyonuna gönderilir (Jones vd. 1997; Liu ve Wang 1999).

Skorlama fonksiyonları, moleküller arası etkileşimler, desolvasyon, elektrostatik ve entropik etkiler dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere geniş bir özellik yelpazesini değerlendirerek farklı çözümler arasında ayırım yapmak için kullanılır. Kuvvet alanına dayalı, ampirik ve bilgiye dayalı olarak sınıflandırılabilir (Wang vd. 2002). Operasyonel performans için, skorlama fonksiyonunun iki teorik yönü tanımlanmaktadır. Birincisi, bir puanlama fonksiyonunun ligand pozı manzarası içinde uygun konumda küresel bir ekstremuma sahip olma derecesidir. İkincisi ise ekstremumdaki fonksiyonun

büyükliğünün ne derece doğru olduğudur. Bu fonksiyon, protein ve ligand arasındaki mutlak bağlanma afinitesini tahmin eder. İdeal bir puanlama fonksiyonu, deneysel olarak belirlenen bağlanma modunu en yüksek seviyede sıralayacaktır. Ligandın bağlanma modu belirlendikten sonra, bu etkileşim haritası daha iyi bağlanma afinitesi elde etmek için liganda gereken değişiklikleri anlamak için kullanılabilir. Bu aynı zamanda ekleme veya uzatma, silme ve değiştirme gibi tüm modifikasyonların yerinin gösterilmesine de yardımcı olabilir.

Skorlama fonksiyonu terimleri hidrofobik tamamlayıcılık, polar tamamlayıcılık ve entropidir. Puanlama fonksiyonunu tanımlamak için sterik puan, polar puan, polar itme puanı ve entropi puanı ile ilgili dört denklem kullanılır. Sterik skor ve polar skoru tanımlamak için kullanılan değişkenler, atomların durumu (H bağı alıcısı veya vericisi), yükü ve element türü ile ilgili veriler de dahil olmak üzere, çift atomlar arasındaki çift Van der Waals yüzey mesafesi r 'ye dayanmaktadır. Hem polar hem de hidrofobik etkileşimler mesafeye bağlıdır ve sigmoid Gauss teriminden oluşur. Polar itme terimi, benzer polariteye sahip atomların birbirine yakın düzenlenmesinin kaybını hesaplar ve yöne göre ölçeklendirilir. Entropik terim, bağlanma sırasında ligandın kaybettiği rotasyonel ve translasyonel serbestlik derecelerini kodlar (Jain 1996). Skorlama fonksiyonunun üç farklı yaklaşımı vardır.

Kuvvet alanı skorlama fonksiyonu, bağ esnetme, elektrostatik ve bağ dışı etkileşimler için parametre katkısını kullanır (Vanommeslaeghe ve Guvench 2014). Bu yaklaşımlar genellikle daha uzun hesaplama süreleri içerir ve mesafe kesme ihtiyacı uzun menzilli etkilerin doğruluğunu azaltır. Fizik ilkelerine göre kuantum mekaniği hesaplaması ve deneysel verilerin her ikisi de kuvvet alanı fonksiyonları ve parametreleri oluşturmak için gereklidir. Ligand bağlanmasında çözücü muamelesi önemli bir noktadır (Vanommeslaeghe vd. 2014).

Ampirik puanlama fonksiyonları deneysel değerlerin yeniden üretilmesini içerir ve tahmin, çözücü tarafından erişilebilir yüzey alanı (SASA) değerindeki değişimi gözlemleyerek etkileşen moleküller arasındaki etkileşim sayısına dayanır. Ağırlıklı enerji terimleri kümesine dayalı olarak yapısal bir kompleksin bağlanma afinitesini hesaplar. Ampirik puanlama fonksiyonları, basit enerji terimleri nedeniyle kuvvet alanı puanlama fonksiyonlarına kıyasla çok daha hızlıdır. Çeşitli protein-ligand kompleksleri için 3D yapılar ve bağlanma afiniteleri verileri mevcuttur; bunlar, bilinen protein-ligand komplekslerinden bilgi madenciliği ile eğitilerek daha kesin ve genel ampirik puanlama fonksiyonu oluşturmak için kullanılabilir (Durham vd. 2009).

Bilgiye dayalı puanlama fonksiyonları enerjilerden ziyade yapılar içindir; 3D veri tabanlarında moleküller arası temasların istatistiksel gözlemlerine dayanır. Yapı, bilinen reseptör-ligand komplekslerinden çift yönlü potansiyeller kullanılarak oluşturulur. Bilgi tabanlı puanlama fonksiyonlarında, çift yönlü potansiyeller ters Boltzmann ilişkisi kullanılarak yapılandırılmış bir veri tabanındaki atom çiftlerinin oluşma sıklığından alınır.

2.15.4.2. Moleküler yerleştirme yaklaşımları

Birlikte kenetlenme, ilaç keşfinin erken aşama alanında kullanılır. Bu yerleştirme, moleküler dinamik simülasyonu gibi önemli faktörleri içeren ve dört boyutlu yerleştirme

olarak da kabul edilen hesaplamalı yapı tabanlı ilaç keşfinde ilaç hedefi konformasyonlarının oluşturulmasına karşılık gelir. Bu tür yerleştirmenin temeli, farklı protein konformasyonları üzerinde çoklu yerleştirme simülasyonlarına dayanır ve protein esnekliği ile ilgilidir (Amaro vd. 2018).

Konsensüs yerleştirme, dinamik bir kıyaslamadan veri seçimini ve yerleştirme başarı oranını artırmak için en iyi program kombinasyonlarını belirlemek üzere çoklu yerleştirme programlarını kullanır. Konsensüs puanlaması poz seçimini, poz zenginleştirmeyi, sıralama tabanlı ve kesişimi iyileştirir, ancak doğrudan birleştirilen puanlara bağlıdır, örneğin, aralarında güçlü bir korelasyon hata oranını artırabilir. Ayrıca, puanlama fonksiyonları bağlanma bölgelerinin belirli özelliklerine duyarlıdır.

2.15.4.3. Rijit ligand ve rijit reseptörün yerleştirmesi

Ligand ve reseptörün her ikisi de sadece üç öteleme ve üç dönme serbestlik derecesine sahip katı varlıklar olarak düşünüldüğünde, arama alanı oldukça kısıtlıdır. Bu senaryoda, ligand esnekliği, protein ve ligand arasında bir dereceye kadar atom-atom örtüşmesine izin vererek veya önceden hesaplanmış bir ligand konformasyonları kümesi kullanarak ele alınabilir. DOCK, FLOG ve FTDOCK gibi bazı protein-protein yerleştirme sistemlerinin ilk versiyonları, yerleştirme işlemi sırasında ligand ve reseptörü sert tutan bir mekanizma kullanmıştır (Still vd. 1990; Muegge ve Martin 1999).

DOCK, bir molekülü bir reseptör bölgesine yerleştirmek için kullanılan ilk otomatik işlemdir ve hala da geliştirilmektedir. Ligand ve reseptör, bir klik tespit yaklaşımı kullanılarak üst üste bindirilebilen küre kümeleri olarak temsil edilir. Ligand-reseptör kompleksleri geometrik ve kimyasal MA'lar kullanılarak puanlanır ve sterik uyum, kimyasal tamamlama ve farmakofor benzerliği dikkate alınır. Ligand esnekliğini hesaba katmak için, geliştirilmiş versiyonlara artımlı yapı yaklaşımı ve kapsamlı arama dahil edilmiştir.

Kapsamlı arama, ligandın döndürülebilir bağlarının bir katı olan kullanıcı tanımlı sayıda konformerini rastgele üretir. Puanlama açısından, DOCK 6.4 artık örtük çözücü ile AMBER türetilmiş kuvvet alanı puanlamasını içermektedir. Ayrıca, Poisson-Boltzmann veya genelleştirilmiş Born ve yüzey alanı sürekli solvasyon (MM/PBSA ve MM/GBSA) yöntemleri gibi moleküler mekanik metodolojileri, küçük ligandların biyolojik makromoleküllere bağlanmasının serbest enerjisini tahmin eden kemisorpsiyonu belirlemek için kullanılır (Guimarães ve Mathiowetz 2010).

FLOG, mesafe geometrisine dayalı ligand konformasyonları oluşturur ve bir arama tekniği kullanarak mesafe kümelerini hesaplar. Bazı esneklikler için, ligandın 25'e kadar belirlenmiş konformasyonu yerleştirmek için kullanılabilir. Kullanıcılar FLOG kullanarak ligand atomları ile ilişkilendirilmesi gereken kritik bölgeleri belirleyebilirler. Kritik bir etkileşim yerleştirmeden önce zaten biliniyorsa, bu yöntem kullanışlıdır. Van der Waals, elektrostatik, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimlerin tümü, konformasyonlar puanlanırken dikkate alınır (Singh ve Warshel 2010).

2.15.4.4. Esnek ligand ve rijit reseptörün yerleştirilmesi

Hem ligand hem de reseptör, indüklenmiş uyum paradigmasını takip eden sistemlerde minimum enerjili mükemmel uyum kompleksi oluşturmak için konformasyonları değiştirdiğinden hem ligandın hem de reseptörün esnekliğini dikkate almak çok önemlidir. Bununla birlikte, reseptör de esnek olduğunda, maliyet çok yüksektir. Sonuç olarak, en tipik teknik, yerleştirme sırasında reseptörü sert tutarken ligandı esnek olarak değerlendirmektir; bu da aynı şekilde doğruluk ve hesaplama süresi arasında bir değiş tokuştur. AutoDock ve FlexX gibi neredeyse tüm docking uygulamaları bu konsepti benimsemiştir (Bron ve Kerbosch 1973; Meng vd. 1992; Gabb vd. 1997). Reseptörü sert tutarken ligand esnekliğini taklit etmek için AutoDock 3.0 Monte Carlo simüle tavlama, evrimsel, genetik ve Lamarckian genetik algoritma (LGA) yaklaşımlarını kullanır. Puanlama fonksiyonunu hesaplamak için van der Waals, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, konformasyonel entropi ve desolvasyon bileşenlerini içeren AMBER kuvvet alanı kullanılır. Her bir terimi ağırlıklandırmak için deneysel verilerden elde edilen ampirik bir ölçeklendirme faktörü kullanılır. AutoDock 4.0, yan zincirlerin kaymasını sağlayarak reseptör esnekliğini modelleyebilir. AutoDock'un bu sürümünde, protein-protein kenetlenmesinin etkileşimi de test edilebilir (Boehm vd. 2000; Doman vd. 2002; Kirton vd. 2005; Meng vd. 2009). Moleküler yerleştirme ve sanal tarama için AutoDock Vina'nın en son sürümü kısa süre önce yayınlanmıştır. AutoDock 4 için bir eğitim seti olarak kullanılan 190 reseptör-ligand kompleksini yeniden yerleştirerek, AutoDock Vina docking hızında iki dereceli üstel bir artış ve bağlanma modu tahmin doğruluğunda önemli bir gelişme göstermiştir (Shoichet vd. 1999). FlexX, artımlı bir inşa yaklaşımı kullanarak ligand konformasyonlarını örnekler. Ligand ve protein arasındaki hidrojen bağı eşleşmeleri ile metal ve aromatik halka etkileşimleri eşleştirilerek baz parçası aktif bölgeye yerleştirilir. Kalan bileşenler daha sonra yapıyı tamamlamak için önceden ayarlanmış bir dizi döndürülebilir burulma açısı doğrultusunda aşamalı olarak inşa edilir. Elektrostatik etkileşimler, yönlü hidrojen bağları, rotasyonel entropi ve aromatik ve lipofilik etkileşimlerin tümü mevcut baskıya dahil edilmiştir. Grup tipleri ve geometrisi atanırken fonksiyonel gruplar arasındaki ilişkiler de dikkate alınmaktadır (Lorber ve Shoichet 1998).

2.15.4.5. Esnek ligand ve esnek reseptörün yerleştirilmesi

Esnek kenetlenmede, ligand ve reseptörün kenetlenmesi, proteinin içsel hareketliliği ve ligand bağlanma afinitesi nedeniyle zor bir görevdir. MD simülasyonları teorik olarak ligand-reseptör kombinasyonundaki tüm serbestlik derecelerini modelleyebilir. Ancak MD, yetersiz örnekleme sorununa sahiptir. Diğer bir engel de yöntemin yüksek hesaplama maliyetidir ve bu da büyük ölçekli kimyasal veri tabanı taramasında bu yaklaşımın kullanılmasını engeller (Freymann vd. 2000). Konformer seçimi ve konformasyonel indüksiyon dahil olmak üzere çeşitli teorik modeller, tarihsel olarak indüklenen uyumun yanı sıra esnek ligand-protein bağlanma sürecini göstermek için sunulmuştur. Konformer seçimi, bir ligandın çeşitli protein konformasyonları arasından uygun bir konformasyonu seçtiği bir süreci ifade ederken, konformasyonel indüksiyon, ligandın proteini bağlanmamış durumda kendiliğinden benimsemeyeceği bir konformasyonu benimsemeye teşvik ettiği bir süreci tanımlar. Bu konformasyonel değişiklik bazen proteinin kısmi olarak yeniden katlanmasıyla karşılaştırılır (Su vd. 2001). En temel olanı, reseptör ve ligand arasında bir miktar atomdan atoma örtüşmeye izin vermek için puanlama fonksiyonundaki van der Waals itme enerjisi terimini düşüren

“yumuşak yerleştirme”dir. Bu strateji çok yönlülükten yoksun olabilir. Bununla birlikte, reseptör koordinatları sabit olduğu ve van der Waals parametreleri kolayca ayarlanabildiği için hesaplama verimliliği avantajına sahiptir. Yan zincir esnekliği ile başa çıkmak için AutoDock 4 eşzamanlı örnekleme tekniğini kullanır. Kullanıcılar reseptörün birden fazla yan zincirini seçebilir ve aynı yöntemleri kullanarak bunları bir ligand ile eşzamanlı olarak örneklebilir. Örnekleme sırasında, reseptörün diğer kısımları kesinlikle bir ızgara enerji haritası kullanılarak ele alınır. Izgara enerji haritaları, reseptör enerji bilgilerini tutmak ve ligand-reseptör etkileşim enerji hesaplamalarını kolaylaştırmak için oluşturulmuştur (Gschwend ve Kuntz 1996). Protein esnekliği ile başa çıkmak için bir başka yaklaşım, konformer seçim teorisine karşılık gelen bir protein konformasyonları topluluğu kullanmaktır. Tek bir katı protein konformasyonuna yerleştirmek yerine, bir ligand bir dizi sert protein konformasyonuna yerleştirilir ve sonuçlar tercih edilen yöntem kullanılarak birleştirilir. Bu yöntem ilk olarak bir grubun ortalama potansiyel enerji ızgarasını oluşturan DOCK'ta kullanılmış ve o zamandan beri çeşitli programlarda genişletilmiştir. Ayrık protein konformasyonları, bir ligandın kademeli olarak oluşturulması sırasında kombinatorial bir yaklaşımla örneklenir. Ligand ve her bir alternatifin karşılaştırılmasına dayanarak, en yüksek puan alan protein yapısı seçilir.

Çok fazla serbestlik derecesi olduğundan ve çözücünün bağlanma ilişkisi üzerindeki etkisi hakkında çok az bilgi olduğundan, bir ligand-protein kompleksindeki moleküller arası etkileşimleri modellemek zordur. Bir ligandın bir bağlanma bölgesine yerleştirilmesi, mümkün olan en kısa yolu izleyerek ligand ve reseptörü arasındaki etkileşimin doğal seyrini taklit etmeye çalışır. Katı ligandları katı reseptörlerle ve esnek ligandları katı reseptörlerle yerleştirmek için basit yollar olmasına rağmen, konformal olarak esnek ligandları ve reseptörleri yerleştirmek daha zordur. Makromoleküler reseptörler ve küçük ilaç moleküllerinin etkileşimi, düzenleyici sistemler, ilaç farmakolojisi, tehlikeli yan etkiler ve diğer süreçlerde çok önemli bir aşamadır.

SBDD'de protein-ligand veya protein-protein bağlanma bölgelerinin yapısından yararlanılır, ancak bölge her zaman başlangıçta bilinmez. Bölge tanımlanmış olsa bile, araştırmacılar farklı biyolojik etkilere veya yeni bir ilaç sınıfına yol açabilecek diğer potansiyel bağlanma bölgelerini aramak isteyebilirler. Lead optimizasyonunda, bilinen bağlayıcıların veya yerleştirme isabetlerinin reseptörün tamamlayıcılığını ne kadar yerine getirdiğini veya ihlal ettiğini bilmek de kritik öneme sahiptir. Moleküler modellemenin bir bileşeni, modellerin fiziksel temelini tanımlamak için klasik/Newton mekaniğinin kullanılmasını ifade eden moleküler mekaniktir. Çoğu moleküler modelde atomlar (çekirdek ve elektronların birleşimi) kütleli noktasal yükler olarak tanımlanır. Yay benzeri etkileşimler (kimyasal bağları temsil eder) ve Van der Waals kuvvetleri yakındaki atomlar arasındaki etkileşimleri tanımlar. Lennard-Jones potansiyeli genellikle Van der Waals kuvvetlerini karakterize etmek için kullanılır. Elektrostatik etkileşimleri hesaplamak için Coulomb yasası kullanılır. Atomlara Kartezyen uzayda veya iç koordinatlarda koordinatlar verilir ve dinamik simülasyonlarda bunlara hızlar da verilebilir. Atomik hızlar sistemin sıcaklığı (60akroskobik bir miktar) ile orantılıdır. Potansiyel fonksiyon, potansiyel ve kinetik enerjilerin (termodinamik bir büyüklük) toplamına eşit olan sistemin iç enerjisiyle ilgili matematiksel bir ifadedir. Enerji azaltma teknikleri (örneğin, en dik iniş ve eşlenik gradyan) potansiyel enerjiyi azaltmak için kullanılırken, moleküler dinamik yöntemleri zaman yayımlı bir sistemin davranışını

tahmin etmek için kullanılır (Bytheway ve Cochran 2004; Friesner vd. 2004; Halgren vd. 2004; Kellenberger vd. 2004; Klon vd. 2004a; Klon vd. 2004b; Perola vd. 2004; Ruddat vd. 2004; Kontoyianni vd. 2005; Krovat vd. 2005).

Daha önce de belirtildiği gibi, moleküler yerleştirmenin ilaç tasarımındaki rolü iki paradigmaya ayrılmıştır: biri reseptör hakkında ayrıntılı 3D yapısal bilginin yokluğunda rasyonelleştirmeye çalışan yapı-aktivite probleminde odaklanırken, diğeri yeni ilaçlar tasarlamak için terapötik hedefin bilinen 3D yapısını kullanan reseptör-ligand kompleksinde görülen etkileşimi anlamaya odaklanmıştır. Küçük molekülü bir ligand ile bir enzim proteini arasındaki bağlanma ilişkisi, enzimin aktive olmasına veya inhibe olmasına neden olabilir. Ligand bağlanması, protein bir reseptör ise agonizme veya antagonizme neden olabilir. Yerleştirmenin en yaygın uygulaması ilaç tasarımı alanındadır. İlaçların çoğu küçük organik bileşiklerdir ve yerleştirme aşağıdaki gibi uygulanabilir,

İsabet tanımlama: Bir puanlama algoritması ile eşleştirilmiş yerleştirme, isabet tanımlama kullanılarak olası ilaçların geniş veri tabanlarını hızlı bir şekilde taramak için kullanılabilir. *in silico* ilgilenilen bir protein hedefine bağlanma olasılığı olan bileşikler bulmak için (sanal tarama). De kullanılabilir.

Lead optimizasyonu: Yerleştirme, bir ligandın göreceli yönelim (bağlanma modu veya pozu olarak da adlandırılır) açısından bir proteine bağlanıp bağlanmayacağını ve nerede bağlanacağını tahmin etmek için kullanılabilir. Bu bilgi, daha güçlü ve seçici analoglar oluşturmak için kullanılabilir.

Biyoremediasyon: Protein ligand yerleştirme, enzimlerin hangi kirleticileri sindirebileceğini tahmin etmek için kullanılabilir.

Moleküler yerleştirme sadece güçlü bileşiklerin tasarımına katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda laboratuvardan kliniğe yeni ilaçların geliştirilmesinde çeşitli adımlara yardımcı olur. Antikanser ajanları olarak timidilat sentetaz inhibitörlerinin, antiviral ajanlar olarak HIV proteaz inhibitörlerinin, amfizem ajanları olarak nötrofil elastaz inhibitörlerinin, antiglucoma ajanları olarak karbonik anhidraz inhibitörlerinin tasarımı ve yeni tatlandırıcı-tat reseptör modellerinin keşfinde moleküler modellemenin katkısına birkaç örnek olarak verilebilir (Schulz-Gasch ve Stahl 2003; Wu vd. 2003; Kontoyianni vd. 2004).

2.15.4.6. Moleküler yerleştirmenin doğrulaması

Moleküler kenetlenmeyi doğrulamak için çeşitli yöntemler yayınlanmıştır. Yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım, genellikle bir eş-kristal yapıdan, hedefin aktif bölgesine bilinen bir konformasyon ve oryantasyona sahip bir bileşiği yeniden yerleştirmek için yerleştirme programlarının kullanıldığı poz seçimidir. Bilinen konformasyondan (ligandın boyutuna bağlı olarak genellikle 1.5 veya 2 Å) önceden seçilmiş bir RMSD değerinin altında pozlar döndürebilen programlar iyi olarak kabul edilir. Poz seçimine daha sonra, mevcut puanlama fonksiyonlarından hangisinin pozları RMSD değerlerine göre en doğru şekilde sıraladığını analiz etmek için puanlama ve sıralama eşlik eder.

Bir başka doğrulama stratejisi de etkinliği bilinen bileşiklerle hedefe karşı “tohumlanmış” inaktif veya inaktif olduğundan şüphelenilen bileşiklerden oluşan bir yem setini kenetlemektir. Zenginleştirme, yerleştirilen yem setinin puanlara göre sıralanmasından sonra ölçülebilir ve zenginleştirme grafikleri veya alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrileri çizilebilir. ROC eğrileri, belirli bir yerleştirme/skorlama kombinasyonunun özgüllüğe karşı hassasiyetini haritalandırır ve karşılaştırma için eğrinin altındaki alan belirlenebilir. Bu yaklaşımlar bize yerleştirme sonuçlarının doğrulanması için inanılmaz bir fırsat sunmaktadır (Jain 2008; Hevener vd. 2009).

2.15.4.7. Yerleştirme sonuçlarının analizi

Moleküler yerleştirme çalışmasından elde edilen kenetlenmiş kompleks yapısının analizi, 2D veya 3D moleküler modelleme araçları kullanılarak protein-ligand etkileşiminin atomik düzeyde görselleştirilmesi için temel görevlerden biridir. Bu analizde, ligandın farklı bir fonksiyonel grubu ile proteinin bağlanma bölgesinde bulunan amino asit rezidüleri arasında oluşan hidrojen bağlarının sayısı ve bağ uzunlukları belirlenmektedir, çünkü hidrojen bağı protein-ligand etkileşiminde önemli bir rol oynar (Singh ve Dwivedi 2016). Ayrıca, hidrofobik ve katyon-pi etkileşimi de analiz edilebilmektedir. Bu analiz, araştırmacının en iyi etkileşime giren ligandı seçmesini kolaylaştırır çünkü bazı durumlarda iki veya daha fazla ligandın bağlanma enerjisi aynıdır ancak etkileşime giren amino asit rezidülerinin sayısı daha az veya daha fazladır. Bu nedenle, böyle bir durumda, genellikle etkileşen amino asit rezidü sayıları açısından hedefle daha fazla etkileşime sahip ligand seçilir. PyMOL ve Chimera, moleküler kenetlenme sırasında oluşturulan ligandın farklı pozlarını seçerek ve etkileşimli rezidüleri 3D olarak görselleştirerek yerleştirme sonuçlarının analizinde yaygın olarak kabul gören araçlardır (Mamgain vd. 2015; Singh ve Dwivedi 2016; Pathak vd. 2018; Rana vd. 2020).

2.15.4.8. Yerleştirme algoritmalarının sınırlamaları ve geleceği

X-ışınları ile belirlenen çeşitli protein-ligand kompleksleri veri tabanlarında mevcuttur ve bu da yerleştirmenin puanlama işlevini büyük ölçüde geliştirmiştir. Yine de, yerleştirme ile doğru bir poz oluşturmak zordur. Protein-ligand kompleksi arasındaki farklı etkileşim türlerini ölçmek ve anlamak için çok sayıda yerleştirme aracı geliştirilmiştir. Farklı yerleştirme araçlarının doğruluğu karşılaştırılmıştır ve yerleştirmenin puanlama fonksiyonunu iyileştirme şansı hala mevcuttur. Farklı yerleştirme araçları, protein-ligand kompleksinin bağlanma enerjisinin farklı değerlerini tahmin eder. Enerji minimizasyon algoritmaları da bu puanlama fonksiyonlarına dayanır. Bu nedenle, bir ligandın doğru bağlanma modunu ve sıralamasını elde etmek için doğru ve hassas bir puanlama fonksiyonu gereklidir. Ayrıca, hibrit bir algoritma, algoritmaların kombinasyonunu kullandığı için protein-ligand yerleştirme probleminin üstesinden gelmek için daha etkili kabul edilir (Singh 2014; Guan vd. 2018).

2.15.4.9. Yerleştirme alanındaki önemli gelişmeler

Bir hastalıktan sorumlu proteine bağlanabilen küçük bir molekül, yeni kavram keşfi sürecinin tamamının ana adımıdır. Böyle bir tasarımın etkinliğini artırmak için atomistik bilgisayar modellemesi önemli ölçüde işe yarayabilir. Hedef proteine bağlanma serbest enerjisinin hesaplanmasındaki doğruluk, bu tür modellemenin en önemli sorunudur. Birkaç önemli ve iyi bilinen geleneksel yerleştirme programı göz önünde

bulundurulmaktadır. Arama yöntemleri, küresel optimizasyonla ilgili problemlere dayanmaktadır. Bu problemi çözmek için farklı algoritmalar kullanılmaktadır ve sezgisel genetik algoritma, ayrıntılı tasarımı ve diğer algoritmalar arasındaki popülerliği ile ayırt edilmekte ve kabul görmektedir. Son zamanlarda, yeni nesil yerleştirme programları geliştirilmiştir. Bir ligand-protein kompleksinin düşük enerji minima spektrumu tespit edilebilmektedir. Bunlar daha doğru programlar olmalıdır çünkü ligand-protein etkileşim potansiyellerinin önceden hesaplanmış bir ızgarasını kullanmazlar. Tasarlanan yeni yerleştirme algoritmaları ve çok yönlü aktif bir ligandı, çevreleyen enerji minimum aramasının altındaki birçok düzine hareketli atomla çok yönlü aktif bir proteine yerleştirerek çalışırlar. Bu tür yerleştirme algoritmaları yerleştirmede ligand konumlandırmasının doğruluğunu artırır. Kuantum kimyası yöntemlerindeki ilerleme, yerleştirmenin doğruluğunu artırmıştır. Örtük çözücü modelleri ve kuantum-kimyasal yöntemler de dahil olmak üzere moleküler enerji hesaplamalarında ve ayrıca ligandların esnekliği ve protein atomlarının hareketliliğinde çok fazla ilerleme kaydedilmiştir (Sulimov vd. 2019).

2.16. Ligand Temelli Dizayn

Ligand bazlı ilaç tasarımı alternatif bir protokoldür ve hedef proteinin yapısı bilinmediğinde veya mevcut modelleme yöntemleriyle tahmin edilemediğinde muazzam bir rol oynar. Ligandın aktivitesini yapısal bilgilerle ilişkilendirmek için istatistiksel yöntemler kullanır (Huang vd. 2010a).

2.16.1. Farmakor modelleme

Farmakofor haritalama, hedef reseptörün temel bilgileri olmadan ilaç tasarlama programındaki gerçek bileşenlerden biridir. İlk başta öncü bileşiklerin tanımlanmasında kullanılan bu araç artık öncü optimizasyonuna kadar uzanmaktadır. Lead optimizasyonu, bir ilaç adayının ilk lead bileşiği arandıktan sonra tasarlandığı mekanizmadır. Yöntem, ilacın kimyasal yapı ve davranışının hedefler ve metabolizması ile etkileşim açısından nasıl ilişkili olduğuna dair bir resim oluşturmaktır. Ayrıca ilacın varsayılan yinelemeli sentez ve karakterizasyon turlarını içerir (Bauer ve Stockwell 2008).

Farmakoforik özellikler, kimyasal bileşik veri tabanlarından (öncü moleküllerin keşfi) potansiyel öncüleri aramak ve almak aynı zamanda, kesin özelliklere sahip moleküller tasarlamak için (öncü optimizasyonu) bir sorgu parametresi olarak kullanılabilir. Ayrıca farmakofor parmak izlerini kullanarak bileşiklerin karşılaştırılabilirliğini ve çeşitliliğini değerlendirir. Aynı şekilde, bileşikler 3D düzenlemeye bağlı olarak hizalamak veya öngörülü 3D QSAR modelleri oluşturmak için de kullanılabilir (Bauer ve Stockwell 2008; Huang vd. 2010a).

2.16.2. Kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR)

Kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR), ilaç tasarımında kimyasal bileşiklerin biyolojik aktivitesini tahmin etmek için kullanılan bir yaklaşımdır. Bileşik yapıları ile bunlara karşılık gelen biyolojik davranışlar arasındaki ilişkiyi bulmak için istatistiksel ve matematiksel araçlar kullanır. Bu nedenle QSAR modeli, bir ilacın biyolojik özelliklerini tahmin etmek için yapısal parametreler kullanılarak oluşturulur. İki boyutlu QSAR (2D-QSAR), çoklu regresyon analizi kullanarak moleküler biyolojik aktiviteyi yorumlamak

için sterik, elektrostatik, hidrofobiklik ve geometrik davranış gibi tanımlayıcıların 2 boyutlu yapısal özelliklerini kullanır. 2D-QSAR teknikleri, fizikokimyasal özellikler ile 3D uzamsal düzenleme ve biyolojik aktiviteler arasındaki korelasyonu doğru bir şekilde açıklayamamaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda, 2D QSAR'ın sınırlamasının üstesinden gelmek için 3D-QSAR yaklaşımları tanıtılmıştır. Son yıllarda çok boyutlu QSAR kavramı ortaya atılmıştır. Kimyasal moleküllerin biyolojik özelliklerinin tahmin edilmesinde daha kullanışlıdır. HQSAR, G-QSAR, MIA-QSAR ve çoklu hedef QSAR'ı içerir. Bu yaklaşımlar ilaç keşif programında dikkate değer bir başarı elde etmiştir. Karşılaştırmalı moleküler alan analizi (CoMFA) ve karşılaştırmalı moleküler benzerlik indeksleri analizi (CoMSIA) ilaç moleküllerinin tasarlanmasında kullanılan en önemli iki yöntemdir (Clayton ve Purcell 1969; Huang vd. 2010a; Singh vd. 2013; Wang vd. 2017).

2.16.2.1. CoMFA

CoMFA tekniği, küçük bir molekülün biyolojik aktivitesinin moleküler alanlara bağlı olduğu kavramına dayanmaktadır. Sterik ve elektrostatik alanları hesaplamak için sırasıyla Lennard-Jones ve Coulombic potansiyelini kullanır. Her iki potansiyel fonksiyon da molekülün van der Waals yüzeyinin yakınında önemli ölçüde değişir ve bu da genellikle kesme değerleri gerektirir. Ek olarak, ligandlar enerji hesaplanmadan önce hizalanmalıdır, ancak üst üste bindirilmiş bileşiklerin yönelimi ızgarayla ilişkilidir. CoMFA sonuçlarında önemli değişikliklere neden olabilir. Ayrıca, aynı PLS analizinde her iki alanı da belirlemek için sterik alana bir ölçeklendirme faktörü eklenmelidir (Cramer vd. 1989; Huang vd. 2010a).

2.16.2.2. CoMSIA

CoMSIA tekniği yakın zamanda CoMFA'ya ek olarak geliştirilmiştir. Bu teknik sterik, hidrofobik, elektrostatik, hidrojen bağı donörleri ve hidrojen bağı alıcılarını içeren ekstra alan özelliklerini içerir. Bu teknik, bileşiklerin hizalanmasına, 3D yönelimlerine duyarlı değildir. Ayrıca, geliştirilmiş fonksiyonel algoritma van der Waals yüzeyine olan göreceli mesafeden daha az etkilenir. Bu nedenle, bu model CoMFA'ya kıyasla daha kesin ve doğrudur (Klebe vd. 1994; Huang vd. 2010a).

2.17. ADMET Tahmini ve Analizi

ADMET, herhangi bir ilaç keşif programındaki temel adımlardan biridir çünkü deneysel çalışmalara geçmeden önce öncü moleküllerin farmakokinetiğini (ADME, yani Emilim, Dağılım, Metabolizma ve Atılım) ve farmakodinamiğini, yani toksisitesini (T) öngörmeyi sağlar. Bu nedenle deneysel maliyet, zaman ve ilaç başarısızlığı riskini azaltır. Literatür çalışmaları, zayıf farmakokinetik ve farmakodinamiğin maliyetli ve geç aşama ilaç geliştirme başarısızlıklarının ana nedenleri olduğunu göstermiştir ve bilgisayar tabanlı ADMET tahmininin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara gitmeden önce ilaç keşif programında dikkate alınması gerektiği yaygın olarak kabul edilmektedir. Şu anda Lipinski kuralı ve polar yüzey alanı (2D), polarize edilebilirlik, van der Waals yüzey alanı, kırıcılık vb. gibi diğer bazı temel tanımlayıcılarla sınırlıdır. Kombinatoryal kimya ve yüksek verimli taramadaki gelişmeler, ADMET ile ilgili erken verilerin referans olarak mevcut olduğu küçük moleküllerin sayısını büyük ölçüde artırmıştır. Ayrıca, ADMET araçlarının doğruluğu, yeni ilke tanımlayıcıları dahil edilerek ve gelişmiş algoritmaların uygulanmasıyla geliştirilen hesaplama araçlarının kullanılmasıyla geliştirilebilir,

herhangi bir molekülün en ilgili farmakokinetik ve farmakodinamik bilgileri, yeni ilaç benzeri bileşiklerin maliyet etkin bir şekilde tanımlanması için ilaç keşif sürecini hızlandırmak üzere modellenenebilir (Pathak vd. 2018).

2.18. Moleküler Dinamik Simülasyon

Bugüne kadar, detaylı biyomoleküler konformasyonel dinamikleri *in vitro* olarak doğru bir şekilde tahmin etmek mümkün değildir. X-ışını kristalografisi, NMR ve kriyo-EM yöntemleri gibi teknikler yapısal biyolojide çığır açmıştır. Yine de mevcut protein dizilerinin sayısı ile protein yapıları arasında büyük bir uçurum vardır. UniProtKB'nin 13/09/2023 tarihli son sürümünde 206.173.379 protein dizisi bulunurken, protein veri bankasında (PDB) 24/10/2023 tarihinde yalnızca 210.836 protein yapısı bulunmaktadır; bu da toplam dizilerin yalnızca küçük bir kısmının bilinen yapılara sahip olduğunu göstermektedir (Burley vd. 2022; Consortium 2022).

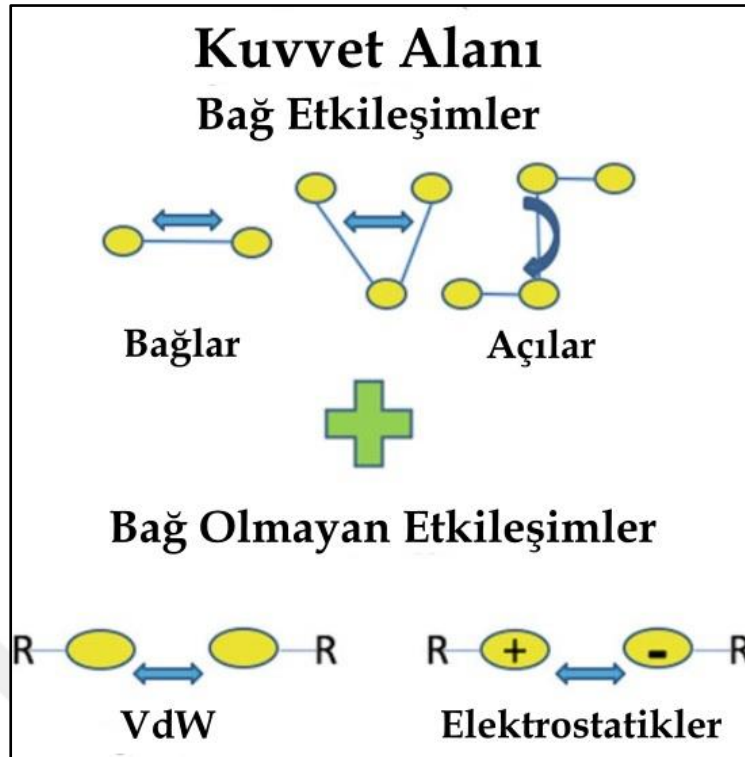
Çoğu deneysel yöntem, proteinlerin yapısal bilgilerini statik biçimde sağlarken, pratikte proteinler oldukça dinamiktir. Moleküler yerleştirme yalnızca statik bir poz sağlar ve protein-ligand kompleksinin dinamiklerini gösteremez. Biyolojik sistemlerin dinamik davranışlarının tahmin edilmesine ek olarak, MD simülasyonları moleküllerin kinetik davranışlarını ve atomik seviyedeki birleşimlerini keşfetmeye de yardımcı olabilir. Proteinlerdeki konformasyonel dinamikler hem büyüklük hem de zaman ölçeğinde geniş aralıkları kapsar ve konformasyonel değişiklikler nedeniyle proteinler taşıyıcılar, sinyal molekülleri, sensörler ve mekanik efektörler gibi çeşitli şekillerde işlev görebilir ve ayrıca konformasyonel değişiklikler yoluyla substrat, ilaçlar ve hormonlarla etkileşime girebilir. Protein konformasyonlarındaki yapısal dinamikler hızlıdır, 10^{-12} s ile 10^5 s arasındaki zaman ölçeğinde 10^{-11} ila 10^{-6} m arasında bir büyüklüğü kapsar. Yerel hareketler: ilmek ve yan zincir hareketlerinin tamamlanması 10^{-15} sn ila 10^{-1} sn sürerken, sarmal, alan (menteşe bükme) ve alt birim hareketleri 10^{-9} sn ila 1 sn sürer. Sarmal-bobin geçişleri, birleşme/ayırışma ve katlanma/çözülme gibi süreçler büyük ölçekli hareketler kapsamına girer ve tamamlanması 10^{-7} sn ila 10^4 sn sürebilir. Pratikte, çok kısa bir sürede gerçekleştikleri için bu tür değişiklikleri incelemek zordur, ancak *in vivo* koşullara hesaplamalı olarak benzetilerek bu süreçler incelenebilir, görselleştirilebilir ve analiz edilebilir (Boehr vd. 2006; Dror vd. 2012; Krishnamoorthy 2012; Vögeli vd. 2012; Wolf ve Kirschner 2013; Mamgain vd. 2015; Pandey vd. 2017; Sonkar vd. 2017; Rajendran vd. 2018; Shukla vd. 2018a; Shukla vd. 2018b; Kalita vd. 2019).

MD simülasyonunda, bir molekül yaylarla (bağlar) birbirine bağlanmış bir dizi yüklü nokta (atom) olarak düşünülür. MD Simülasyon, bağ uzunluklarının, bağ açılarının, burulmaların ve ayrıca atomlar arasındaki bağ olmayan etkileşimlerin zaman içindeki gelişimini tanımlamak için kuvvet alanı kullanır. MD simülasyonunda, protein ve su molekülleri kullanılarak *in vivo* benzeri bir ortam oluşturulur. Protein ve su atomları kısa bir zaman adımıyla (fs zaman süresinde) hareket eder, burada her atomun kuvvetleri hesaplanır ve bir kuvvet alanı kullanılarak bir dosyaya yazılır. Bu kuvvet alanı, denklemlerin ve ilgili sabitlerin bir koleksiyonudur ve bağlı ve bağlı olmayan potansiyel terimleri ile potansiyel enerji fonksiyonlarını içerir. Moleküler geometriyi ve test yapılarının seçilmiş özelliklerini yeniden üretir. Cammon ve arkadaşları biyolojik makromoleküllerin ilk MD simülasyonunu 1977 yılında sığır pankreatik tripsin inhibitörleri için 9.2 ps'de gerçekleştirmiştir. MD simülasyonlarındaki ilerlemelerden önce, hidrojen bağı değişimi gibi deneysel gözlemler zaten çalışılmıştı. Termal faktörün

(B) proteinlerin iç hareketlerindeki rolü o zamana kadar araştırılmıştır (Jeremy Smith ve ark. 1986; Brunger ve ark. 1985; Brooks ve Karplus 1983). MD simülasyon verilerinden, temel bileşenleri (PC'ler) çıkarıp hesaplayabilir ve analizini gerçekleştirebiliriz. Hesaplanan PC'ler, konformasyon topluluğu ile toplam dalgalanmaya katkılarına göre düzenlenmiştir. Küresel ve ilişkili hareketler hesaplanan veriler kullanılarak tahmin edilebilir. MD simülasyonu ayrıca makromoleküllerin konformasyonel esnekliğinin yanı sıra floresan depolarizasyonunun analizi, NMR parametrelerinin dinamiği ve çözücü ve sıcaklığın protein stabilitesi üzerindeki etkisi gibi deneysel sonuçların anlaşılmasında da bilgi sağlar (Berger ve Linderstrom-Lang 1957; Brooks ve Karplus 1983; Harvey vd. 1984; Brünger vd. 1985; Nilsson vd. 1986; Brünger vd. 1987; Frauenfelder vd. 1987; Smith vd. 1990; Wolf ve Kirschner 2013; David ve Jacobs 2014).

2.18.1. MD simülasyonun prensibi

MD simülasyonunun altında yatan prensip Newton'un moleküler mekanik yasasına dayanmaktadır. Biyomoleküler dinamiklerin hesaplamalı çalışması için, MD simülasyonu en önemli yerleşik tekniktir. MD simülasyonunda, atomlar ve moleküller arasındaki etkileşim, bilinen fiziksel özelliklerin yaklaşımları ile bir zaman periyodu için incelenir. Günümüzde biyomoleküllerin simülasyonunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Artık atomların hareketini, residülerin yan zincir konformasyonunu inceleyebiliyor, bir proteindeki ikincil yapıyı ve etki alanlarını, ayrıca nükleik asitlerin ve lipid membranların bağlanma modelini tahmin edebiliyoruz. Sistemlerin bağlanma serbest enerjisi ve konformasyonel değişimleri, istatistiksel mekaniğe dayandıkları için MD simülasyonu ile de tahmin edilebilmektedir. Bu nedenle MD simülasyonu ilaç tasarımı alanında da kullanılmaktadır. Kuvvet alanı kullanılarak, atomun yeni konumunu tanımlamak için parçacıkların yer değiştirmesi ve her zaman adımındaki enerji değerleri hesaplanır. Bağlanmış (açılar ve atom bağları) ve bağlanmamış katkılar, klasik MD simülasyonunda bir enerji fonksiyonu olarak kuvvet alanına dahil edilir (Şekil 2.37) (Levitt ve Warshel 1975; Karplus ve Kuriyan 2005; Adcock ve McCammon 2006; Paquet ve Viktor 2015; Perilla vd. 2015).



Şekil 2.28. Bağlanmış ve bağlanmamış etkileşimleri temsil eden bir kuvvet alanının bileşenleri (Singh 2020)

Daha sonraki katkılar esas olarak Lennard-Jones 6-potansiyeli (Jones 1924) tarafından inşa edilen van der Waals etkileşimi tarafından yapılır. Elektrostatik etkileşimin hesaplanması için Coulomb yasası kullanılır (Cornell vd. 1995). Monte Carlo (MC) simülasyonları, Langevin dinamikleri ve MD'yi içeren çeşitli algoritmalar, ilgili özellikleri ve avantajları ile birlikte rapor edilmiştir (Adcock ve McCammon 2006). Tasarlanan kuvvet alanı parametreleri ve tanımlanan denklemler iyi uyum sağlar ve daha üst düzey hesaplamalardan ve/veya deneylerden elde edilen verileri yeniden üretebilir. Proteinler, nükleik asitler, lipitler ve şekerler dahil olmak üzere çoğu biyomolekül, genel kullanım için kuvvet alanında iyi parametrelendirilmiştir (Paquet ve Viktor 2015). Yeni ligandlar için kuvvet alanı parametreleri, kuantum kimyası işleminin yanı sıra PRODRG (van Aalten et al. 1996; Schüttelkopf and van Aalten 2004), ATP topology builder (Malde et al. 2011) ve SwissParam (Zoete et al. 2010) gibi ligandın topolojisini oluşturabilen birçok web sunucusu kullanılarak hesaplanabilir. Bağ uzunlukları, bağ dihedral açıları, bağ valans açıları ve van der Waals ve elektrostatik etkileşimler gibi bağ dışı etkileşimler sistemlerin toplam enerjisine katkıda bulunur (Hernandez-Rodriguez et al. 2016). AMBER, GROMOS ve CHARMM gibi çeşitli kuvvet alanları da geliştirilmiştir (MacKerell et al. 1998). Her kuvvet alanının kendine özgü bir özelliği vardır ve kullanıcı, çalışmanın amacına göre kuvvet alanını kendi seçimine göre tanımlar (Ponder ve Case 2003; Salsbury 2010). Bir MD simülasyonunda kuvvet alanı ve proteinlerin çözünmesi sabitlendikten sonra, kullanıcılar tarafından aşağıda kısaca tanımlanan çeşitli parametreler de ayarlanır (Cornell vd. 1995; van Aalten vd. 1996; MacKerell vd. 1998; Ponder ve Case 2003; Schüttelkopf ve van Aalten 2004; Adcock ve McCammon 2006; Salsbury 2010; Malde vd. 2011; Zoete vd. 2011; Hernández-Rodríguez vd. 2016).

2.18.2. MD simülasyon analizi için yapısal parametreler

MD simülasyonu sonucu bir yörünge şeklinde üretir. Yörünge, atomların her bir adım hareketi sırasında üretilen tüm parametreleri içerir. Sonuçları analiz etmek için kullanılabilecek çeşitli yapısal parametreler aşağıda sıralanmıştır.

2.18.2.1. RMSD

RMSD, herhangi bir MD yörüngesini analiz etmek için en önemli ve ilk parametredir. RMSD, bir proteinin omurgaları arasındaki ilk yapısal konformasyonundan son konumuna kadar olan farkı ölçmek için kullanılır. Proteinin konformasyonuna göre kararlılığı, MD simülasyon işlemi sırasında üretilen sapmalarla belirlenebilir.

Tüm kalıntılar, omurga, yan zincir ve C α atomları için RMSD hesaplanabilir. RMSD simülasyon süresine göre hesaplanır. Daha küçük sapmalar daha kararlı bir protein yapısını gösterir ve bunun tersi de geçerlidir. Genel olarak, anlamlı bir veri elde etmek için bir makromolekül için RMSD değeri 2 Å'dan az olmalıdır (Kuzmanic ve Zagrovic 2010).

2.18.2.2. RMSF

Kök ortalama kare dalgalanması (RMSF), MD yörüngesinden proteinin rezidü bazlı dalgalanmasını incelemenin en iyi yoludur. Bir proteindeki her bir rezidünün veya alanın dalgalanmasını tanımlar.

RMSF, rezidü sayısına karşı RMSF (nm) olarak çizilebilir. Heliks ve kırmalı tabaka gibi iyi organize olmuş ve katı yapılar düşük RMSF gösterirken, kıvrımlar ve ilmekler gibi gevşek yapılar daha yüksek RMSF değeri gösterir. Çünkü atom, heliks ve kırmalı tabakaya kıyasla kıvrımlarda ve ilmeklerde daha fazla dalgalanmaya sahip olabilir (Kuzmanic ve Zagrovic 2010).

2.18.2.3. Dönme yarıçapı

Bir proteinin dönme yarıçapı (R_g) katlanmış proteinin kompaktlığını tanımlar. Aynı boyuttaki proteinler için, ideal R_g değeri globüler katlanmış durum için daha az olmalıdır, genişletilmiş formda veya daha fazla sayıda döngü ve dönüş içeren protein formunda, R_g değeri nispeten yüksek olmalıdır (Singh 2020).

2.18.2.4. Protein-ligand bağlantıları

Kovalent olmayan bağlar, protein ve ligandın stabilitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu bağlar, protein yapısının katlanmasında ve protein-ligand stabilitesinde çok önemli bir rol oynar. Katlanma sırasında, hidrojen bağları bir proteinin uygun şekilde katlanması için bir yol sağlar. Hidrofobik bağlar gibi diğer etkileşimler, bir biyomakromolekülün iç yamalarını ve katalitik üçlüsünü oluşturur. Rezidüler arasındaki hidrojen bağları simülasyon sırasında zamana göre hesaplanabilir. Apo-protein ve protein-ligandın MD simülasyon analizinde, hidrojen bağlarının yanı sıra diğer etkileşimler, ligand stabilizasyonu için gerekli potansiyel rezidüleri bulmak için

simülasyon süresi boyunca hesaplanabilir. Protein-ligand temas haritası, simülasyon süresinin çoğunda ligand ile temas (etkileşim) halinde olan rezidüleri bulmak için oluşturulur (Singh 2020).

2.18.2.5. SASA

Çözücünün erişebildiği yüzey alanı (SASA), bir simülasyon kutusundaki çözücülerle etkileşime giren protein alanını tanımlar (Mazola ve ark. 2015). Aynı boyuttaki proteinler için, katlanmış globüler durum daha az SASA değeri gösterirken, proteinin genişlemiş formu daha yüksek SASA değeri gösterir. Sistemin sıcaklığındaki bir artışın proteinin açılmasına yol açacağı ve proteinin hidrofobik çekirdeğinin çözücüye doğru açığa çıkacağı iyi bilinmektedir. Sonuç olarak, SASA değeri katlanmanın ardından artar (Mazola vd. 2015).

2.18.2.6. Temel bileşen analizi veya temel dinamikler

Temel dinamikler (ED), simülasyonların zaman ölçeği boyunca bir proteindeki hareketlerin genel artışını yansıtır (Maisuradze ve ark. 2009). Temel bileşen analizi (PCA) proteinin kolektif hareketlerini tahmin eder ve yapıdaki atomik dalgalanmaları ortaya çıkarır. MD simülasyonunda her atom birbiriyle ilişkilidir. Korelasyon hareket analizi moleküllerin davranışını tahmin etmek için çok önemlidir. Atomik dalgalanmaların kovaryans matrisi, öz değerleri tahmin etmek için köşegenleştirilir. İlk öz vektörler proteinin genel hareketlerinde önemli bir rol oynar. PCA analizi, bir proteinin çeşitli koşullar altındaki korelasyonlu hareketlerini karşılaştırmak için kullanılır (Maisuradze vd. 2009; David ve Jacobs 2014).

2.18.2.7. İkincil yapı analizi

İkincil yapı, MD sonuçlarının analizinde çok önemli bir parametredir ve zamana göre ikincil yapının içeriğini tanımlar. Her bir alanın kararlılığını anlamak için yapısal içerikleri açıkça tanımlar. Bir simülasyon sırasında bir alanın açılmasını ve kararlılığını açıklayabildiği için mutasyonel ve protein katlanma çalışmalarında etkilidir (Singh 2020).

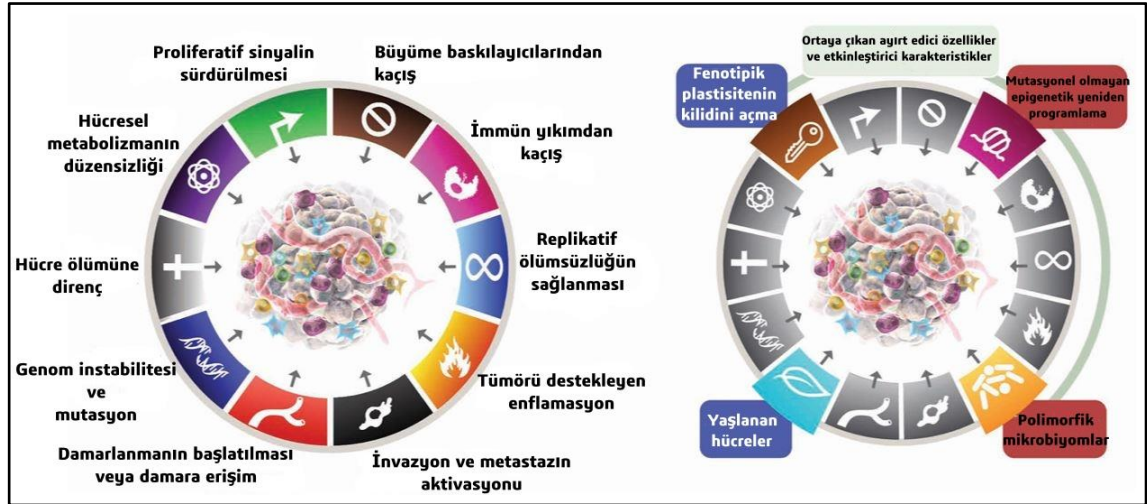
2.19. Kanser

Kanser, dünya çapında düşük hayatta kalma oranları nedeniyle en ölümcül hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2019 yılı tahminlerine göre kanser, 23 ülkede 70 yaşından önce ölümlerin en önemli dördüncü nedeni ve 183 ülkenin 112'sinde birinci veya ikinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle kanser, mevcut tıbbi bilgi ve tedavilere karşı büyük bir meydan okuma oluşturan, yaşamı tehdit eden önemli bir hastalıktır. Ne yazık ki, hastalığın doku düzeyinde karmaşıklığı, doğru teşhis konulmasını ve tedavinin etkili olmasını zorlaştırmaktadır. Prostat, akciğer ve bronşlar, kolon, rektum ve idrar kesesi, kanserden en çok etkilenen ana organlardır. Kadınlarda ise meme, akciğer, bronş, kolon, rektum, uterinekorus ve tiroid kanseri prevalansının en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler, prostat ve meme kanserinin sırasıyla erkeklerde ve kadınlarda en yaygın kanser türü olduğuna dair tahminleri yükseltmektedir. Kan, beyin ve lenf ile ilgili kanserler çocuklarda en sık görülen kanserler olup, çocuklarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %28'ini oluşturmaktadır (Fisher vd.

2013; Meacham ve Morrison 2013; Siegel vd. 2016; Bray vd. 2021; Sung vd. 2021; Mehraj vd. 2022; Mir ve Gul 2022; Mir ve Mir 2022).

Tümör, işlevsel bir amacı olmayan ve bitişik hücrelere, organlara veya vücudun diğer bölümlerine yayılma potansiyeli olan anormal hücre büyümesidir. İyi huylu tümörün nedenleri çok net değildir ve genetik bozukluklar, sağlıklı beslenme alışkanlıkları, mesleki stres, radyasyonlara maruz kalma ve/veya toksin alımı, enfeksiyonlar veya iltihaplar vb. nedenlerden kaynaklanabilir. Genellikle iyi huylu tümörler tedavi veya çıkarılma gerektirmez. Bazı durumlarda, tümör cerrahi işlemlerle çıkarılır. Kanseri, bazı vücut hücrelerinin kontrolden çıkarak yeni tümörler oluşturmak üzere vücudun başka bölgelerine yayılmasına (metastaz olarak adlandırılan süreç) neden olur. Karsinogenez olarak adlandırılan kanserin ilerlemesi, süreci başlatan ve dolayısıyla kanser hücrelerinin farklı karakteristiklerini oluşturan kanser hücrelerinin tüm özelliklerini listeleterek en iyi şekilde tanımlanabilir. Kanseri progresyonu, kendi kendini destekleyen proliferasyon, anti-proliferatif sinyallere duyarsızlık, kanser hücrelerinin apoptoza girememesi, büyüme faktörlerine daha düşük gereksinim, anjiyogenez ve formalignite, doku invazyonu ve metastaz gibi çeşitli normal olmayan özelliklerin kazanılmasına bağlıdır. Dönüşüm olarak adlandırılan normal hücreden kanser hücresine geçiş çok yönlü bir süreçtir (Hanahan ve Weinberg 2000; Wang vd. 2018; Mir ve Haq 2022).

Kanser; genetiği, hücre ve doku biyolojisini, patolojiyi ve tedaviye yanıtı kapsayan çeşitliliğinin genişliği ve kapsamı bakımından ürkütücüdür. Her zamankinden daha güçlü deneysel ve hesaplamalı araçlar ve teknolojiler, kanserin kapsadığı hastalıkların sayısız tezahürü hakkında çığ gibi büyüyen bir "büyük veri" sağlamaktadır. Kanseri ayırt edici özelliklerinde somutlaşan bütünleştirici kavram, bu karmaşıklığın giderek daha mantıklı bir bilime dönüştürülmesine yardımcı olmaktadır ve bu perspektifte sunulan geçici yeni boyutlar, kanser gelişimi ve kötü huylu ilerleme mekanizmalarını daha iyi anlamak ve bu bilgiyi kanser tıbbına uygulamak için bu çabaya değer katabilir. 2000 yılında kanseri altı temel özelliği ile kanseri kazandığı yetenekler vurgulanmıştır. 2011 yılında tanımlanan iki geçici "ortaya çıkan işaret" -hücrel enerji (şimdi daha geniş bir şekilde "hücrel metabolizmanın yeniden programlanması" olarak tanımlanmaktadır) ve "bağışıklık yıkımından kaçınma"- ana setin bir parçası olarak kabul edilmek için yeterince doğrulanmıştır. Tümörlerin ya anjiyogenez şalterini açarak ya da normal doku damarlarını birlikte kullanarak yeterince vaskülarize olabileceğine dair artan kanıtlar göz önüne alındığında (128), bu ayırt edici özellik daha geniş bir şekilde, esas olarak invazyon ve metastaz yoluyla, tümör büyümesini destekleyen vaskülatörü indüklemeye veya başka bir şekilde erişime yeteneği olarak da tanımlanmaktadır. 2011 yılında yayınlanan devam niteliğindeki çalışmada, tümör büyümesi ve ilerlemesi için gerekli olan sekiz ayırt edici (işlevsel) özelliğin harekete geçirilmesinde temel olarak rol oynayan "genom istikrarsızlığı ve mutasyonu" tamamlayan ikinci bir etkinleştirme özelliği olarak "tümörü teşvik eden iltihaplanma" da eklenmiştir. Son olarak, "fenotipik plastisitenin kilidini açma", "mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama", "polimorfik mikrobiyomlar" ve "yaşlanan hücreler" ile ilgili önerilen yeni ayırt edici özellikleri ve etkinleştirici özellikleri de içermektedir (Kuczynski vd. 2019; Hanahan 2022) (Şekil 2.39).



Şekil 2.29. Kanser ayırt edici özellikleri (Hanahan 2022)

Bu özelliklere kısaca değinmek gerekirse,

Proliferatif sinyalin sürdürülmesi muhtemelen kanser hücrelerinin en temel özelliği, kronik çoğalmayı sürdürebilme yetenekleridir. Normal dokular, hücre büyümesi ve bölünmesi döngüsüne girişi ve bu döngünün ilerlemesini sağlayan büyüme teşvik edici sinyallerin üretimini ve salınımını dikkatli bir şekilde kontrol eder, böylece hücre sayısının homeostazını ve dolayısıyla normal doku mimarisinin ve işlevinin korunmasını sağlar. Kanser hücreleri, bu sinyalleri düzenleyerek kendi bölgelerinin efendisi haline gelirler. Bu sinyaller, büyük ölçüde, tipik olarak hücre içi tirozinekinaz alanları içeren hücre yüzey reseptörlerini bağlayan büyüme faktörleri tarafından iletilir. Bu sinyaller, hücre döngüsündeki ilerlemeyi ve hücre büyümesini (yani hücre boyutundaki artışları) düzenleyen hücre içi sinyal yollarına dağılır; çoğu zaman bu sinyaller hücrenin hayatta kalması ve enerji metabolizması gibi diğer hücre-biyolojik özelliklerini de etkiler (Lemmon ve Schlessinger 2010).

Büyüme baskılayıcılardan kaçınma, kanser hücreleri, pozitif etkili büyüme uyarıcı sinyalleri indüklemeye ve sürdürme kabiliyetine ek olarak, hücre çoğalmasını negatif olarak düzenleyen güçlü programları da atlatmalıdır; bu programların çoğu tümör baskılayıcı genlerin eylemlerine bağlıdır. Hücre büyümesini ve çoğalmasını sınırlamak için çeşitli şekillerde çalışan düzinelerce tümör baskılayıcı, hayvan veya insan kanserinin bir veya başka bir türünde karakteristik inaktivasyonları yoluyla keşfedilmiştir; bu genlerin çoğu, farelerde işlev kazanımı veya kaybı deneyleri yoluyla iyi niyetli tümör baskılayıcılar olarak doğrulanmıştır. İki prototipik tümör baskılayıcı RB (retinoblastoma-associated) ve TP53 proteinlerini kodlar; hücrelerin çoğalma veya alternatif olarak yaşlanma ve apoptotik programları aktive etme kararlarını yöneten iki önemli tamamlayıcı hücrel düzenleyici devre içinde merkezi kontrol düğümleri olarak çalışırlar (Burkhart ve Sage 2008).

Hücre ölümüne direnç, apoptoz yoluyla programlanmış hücre ölümünün kanser gelişimine karşı doğal bir bariyer görevi gördüğü kavramı, son yirmi yılda yürütülen ilgi çekici işlevsel çalışmalarla ortaya konmuştur. Apoptotik programı yöneten sinyal devresinin aydınlatılması, kanser hücrelerinin tümörigenez sırasında veya antikanser

tedavisinin bir sonucu olarak yaşadığı çeşitli fizyolojik streslere yanıt olarak apoptozun nasıl tetiklendiğini ortaya çıkarmıştır. Apoptozu tetikleyen stresler arasında, daha önce de belirtildiği gibi, yüksek seviyelerde onkogen sinyalleşmesinden kaynaklanan sinyal dengesizlikleri ve hiper proliferasyonla ilişkili DNA hasarı dikkat çekicidir. Yine de başka araştırmalar, yüksek dereceli malignite ve tedaviye direnç durumlarına ilerlemeyi başaran tümörlerde apoptozun nasıl zayıfladığını ortaya koymuştur. Apoptotik mekanizma hem yukarı akış düzenleyicilerinden hem de aşağı akış efektör bileşenlerinden oluşur. Düzenleyiciler ise, biri hücre dışı ölüme neden olan sinyalleri alıp işleyen (örneğin Fas ligand/Fas reseptörünü içeren ekstrinsik apoptotik program), diğeri ise hücre içi kaynaklı çeşitli sinyalleri algılayıp entegre eden (intrinsik program) iki ana devreye ayrılır. Her biri normalde latent olan bir proteazın (sırasıyla kaspaz 8 ve 9) aktivasyonu ile sonuçlanır ve bu da apoptozun yürütme aşamasından sorumlu efektör kaspazları içeren bir proteoliz kaskadını başlatmaya devam eder; bu aşamada hücre aşamalı olarak parçalanır ve ardından hem komşuları hem de profesyonel fagositik hücreler tarafından tüketilir. Günümüzde, intrinsik apoptotik program kanser patogenezinde bir bariyer olarak daha yaygın bir şekilde yer almaktadır (Lowe vd. 2004; Adams ve Cory 2007).

Çoğaltılabilir ölümsüzlüğün etkinleştirilmesi, 2000 yılına gelindiğinde, kanser hücrelerinin makroskopik tümörler oluşturabilmek için sınırsız çoğalma potansiyeline ihtiyaç duyduğu yaygın olarak kabul edilmekteydi. Bu kapasite, vücuttaki normal hücre soylarının çoğunda bulunan ve yalnızca sınırlı sayıda ardışık hücre büyüme ve bölünme döngüsünden geçebilen hücrelerin davranışıyla belirgin bir tezat oluşturmaktadır. Bu sınırlama, çoğalmanın önündeki iki farklı engelle ilişkilendirilmiştir: tipik olarak geri dönüşü olmayan, çoğalmayan ancak yaşayabilir bir duruma giriş olan senesens ve hücre ölümünü içeren kriz. Buna göre, hücreler kültürde çoğaltıldığında, tekrarlanan hücre bölünmesi döngüleri önce yaşlanmanın indüklenmesine ve ardından bu engeli aşmayı başaran hücreler için popülasyondaki hücrelerin büyük çoğunluğunun öldüğü bir kriz aşamasına yol açar. Nadiren de olsa, hücreler krizdeki bir popülasyondan çıkar ve sınırsız çoğalma potansiyeli sergiler. Bu geçiş immortalizasyon olarak adlandırılır ve çoğu yerleşik hücre hattının, senesens veya kriz kanıtı olmaksızın kültürde çoğalma yetenekleri sayesinde sahip olduğu bir özelliktir (Hanahan ve Weinberg 2011).

Anjiyogenezin indüklenmesi, normal dokular gibi tümörler de besin ve oksijen şeklinde beslenmenin yanı sıra metabolik atıkları ve karbondioksiti tahliye etme yeteneğine ihtiyaç duyar. Anjiyogenez süreci tarafından oluşturulan tümörle ilişkili neovaskülatür bu ihtiyaçları karşılar. Embriyogenez sırasında vaskülatürün gelişimi, yeni endotel hücrelerinin doğuşunu ve bunların tüpler halinde birleşmesini (vaskülogenez) ve mevcut damarlardan yeni damarların filizlenmesini (anjiyogenez) içerir. Bu morfogenez takiben, normal vaskülatür büyük ölçüde durağan hale gelir. Yetişkinlerde, yara iyileşmesi ve kadın üreme döngüsü gibi fizyolojik süreçlerin bir parçası olarak, anjiyogenez açılır, ancak sadece geçici olarak. Bunun aksine, tümör ilerlemesi sırasında "anjiyojenik anahtar" neredeyse her zaman aktive olur ve açık kalır, bu da normalde durgun olan damar sisteminin sürekli olarak yeni damarlar filizlendirmesine neden olarak genişleyen neoplastik büyümelerin sürdürülmesine yardımcı olur (Hanahan ve Folkman 1996).

İnvazyonun ve metastazın etkinleştirilmesi, 2000 yılında, invazyon ve metastazın altında yatan mekanizmalar büyük ölçüde bir muammaydı. Epitelyal dokulardan

kaynaklanan karsinomlar, lokal invazyon ve uzak metastaz olarak yansıyan daha yüksek patolojik malignite derecelerine ilerledikçe, ilişkili kanser hücrelerinin tipik olarak şekillerinin yanı sıra diğer hücrelere ve hücre dışı matrise bağlanmalarında değişiklikler geliştirdiği açıktı. En iyi karakterize edilen değişiklik, hücreden hücreye önemli bir yapışma molekülü olan E-cadherin'in karsinoma hücreleri tarafından kaybedilmesidir. E-cadherin, bitişik epitel hücreleriyle adherens bağlantıları oluşturarak epitel hücre tabakalarının bir araya getirilmesine ve bu tabakalar içindeki hücrelerin sakinliğinin korunmasına yardımcı olur. E-cadherin'in artan ekspresyonu, invazyon ve metastazın bir antagonisti olarak iyi bir şekilde belirlenmiştir, oysa ekspresyonunun azaltılmasının bu fenotipleri güçlendirdiği bilinmektedir. İnsan karsinomlarında E-cadherin'in sıklıkla gözlenen aşağı regülasyonu ve zaman zaman mutasyonel inaktivasyonu, bu ayırt edici özelliğin kilit bir baskılayıcısı olarak rolü için güçlü bir destek sağlamıştır (Cavallaro ve Christofori 2004; Berx ve van Roy 2009).

Genom kararsızlığı ve mutasyon, yukarıda sıralanan çoklu özelliklerin kazanılması, büyük ölçüde neoplastik hücrelerin genomlarındaki değişikliklerin art arda gelmesine bağlıdır. Basitçe tasvir etmek gerekirse, belirli mutant genotipler hücre alt klonlarına seçici avantaj sağlayarak bunların büyümesine ve yerel doku ortamında nihai hakimiyet kurmasına olanak tanır. Buna göre, çok aşamalı tümör ilerlemesi, her biri etkin bir mutant genotipin tesadüfen edinilmesiyle tetiklenen bir dizi klonal genişleme olarak tasvir edilebilir. Kalıtsal fenotipler, örneğin tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar yoluyla da edinilebildiğinden, bazı klonal genişlemeler gen ifadesinin düzenlenmesini etkileyen mutasyonel olmayan değişikliklerle de tetiklenebilir (Berdasco ve Esteller 2010).

Tümörü teşvik eden enflamasyon, patologlar bazı tümörlerin bağışıklık sisteminin hem doğal hem de adaptif kollarına ait hücreler tarafından yoğun bir şekilde infiltre edildiğini ve böylece neoplastik olmayan dokularda ortaya çıkan inflamatuvar durumları yansıttığını uzun zamandır kabul etmektedir (Dvorak, 1986). İmmün sistemin farklı hücre tiplerini doğru bir şekilde tanımlamak için daha iyi belirteçlerin ortaya çıkmasıyla birlikte, artık neredeyse her neoplastik lezyonun, yalnızca hücre tipine özgü antikörlerle tespit edilebilen ince infiltrasyonlardan standart histokimyasal boyama teknikleriyle bile görülebilen büyük iltihaplara kadar değişen yoğunluklarda mevcut immün hücreler içerdiği açıktır (Pagès vd. 2010).

Enerji metabolizmasının yeniden programlanması, Neoplastik hastalığın özünü temsil eden kronik ve genellikle kontrolsüz hücre çoğalması, sadece hücre çoğalmasının düzensiz kontrolünü değil, aynı zamanda hücre büyümesini ve bölünmesini beslemek için enerji metabolizmasının ilgili ayarlamalarını da içerir. Aerobik koşullar altında normal hücreler glikozu önce sitozolde glikoliz yoluyla pirüvata ve ardından mitokondride karbondioksit'e dönüştürür; anaerobik koşullar altında glikoliz tercih edilir ve oksijen tüketen mitokondriye nispeten az pirüvat gönderilir. Otto Warburg ilk olarak kanser hücresi enerji metabolizmasının anormal bir özelliğini gözlemlemiştir; oksijen varlığında bile kanser hücreleri enerji metabolizmalarını büyük ölçüde glikolizle sınırlandırarak glikoz metabolizmalarını ve dolayısıyla enerji üretimlerini yeniden programlayabilir ve bu da "aerobik glikoliz" olarak adlandırılan bir duruma yol açar (Warburg 1930; Warburg 1956).

Bağıışıklık yıkımından kaçınma, tümör oluşumunu çevreleyen ve halen çözülmemiş olan ikinci bir konu, bağışıklık sisteminin yeni başlayan neoplazilerin, geç evre tümörlerin ve mikrometastazların oluşumuna ve ilerlemesine direnme veya bunları ortadan kaldırmada oynadığı rolü içermektedir. Uzun süredir devam eden bağışıklık gözetimi teorisi, hücrelerin ve dokuların sürekli tetikte olan bir bağışıklık sistemi tarafından sürekli olarak izlendiğini ve bu bağışıklık gözetiminin yeni başlayan kanser hücrelerinin ve dolayısıyla yeni oluşan tümörlerin büyük çoğunluğunun tanınması ve ortadan kaldırılmasından sorumlu olduğunu öne sürmektedir. Bu mantığa göre, ortaya çıkan katı tümörler bir şekilde bağışıklık sisteminin çeşitli kolları tarafından tespit edilmekten kaçınmayı başarmış veya immünolojik öldürmenin kapsamını sınırlayabilmiş ve böylece eradikasyondan kaçabilmiştir (Vajdic ve van Leeuwen 2009).

Tüm bu özelliklerin yanısıra 2022 yılında kanserin ayırt edici özelliklerine dört yeni durum eklenmiştir.

Fenotipik plastisitenin kilidini açmak, organogenez sırasında, homeostatik işlevleri üstlenmek üzere hücrelerin gelişimi, belirlenmesi ve dokular halinde organize edilmesine, bu süreçlerin doruğa ulaşmasıyla progenitör hücrelerin -bazen geri dönülmez bir şekilde- büyümesinin durduğu terminal farklılaşma eşlik eder. Bu nedenle, hücresel farklılaşmanın nihai sonucu çoğu durumda antiproliferatiftir ve neoplazi için gerekli olan sürekli çoğalmanın önünde açık bir engel teşkil eder. Terminal farklılaşma durumundan kaçınmak veya kaçmak için normalde kısıtlı olan fenotipik plastisite yeteneğinin kilidini açmanın kanser patogenezinin kritik bir bileşeni olduğuna dair kanıtlar giderek artmaktadır (Yuan vd. 2019).

Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, genom (DNA) istikrarsızlığı ve mutasyonunun etkinleştirici özelliği, kanser oluşumu ve patogenezinin temel bir bileşenidir. Şu anda, çok sayıda uluslararası konsorsiyum, insan kanser hücrelerinin genomu boyunca mutasyonları kataloglamakta ve bunu hemen hemen her tür insan kanserinde, metastatik lezyonlar da dahil olmak üzere malign progresyonun farklı aşamalarında ve tedaviye adaptif direnç gelişimi sırasında yapmaktadır. Sonuçlardan biri, kromatin mimarisini düzenleyen, modüle eden ve koruyan ve böylece gen ifadesini küresel olarak düzenleyen genlerdeki mutasyonların giderek daha fazla tespit edildiği ve işlevsel olarak kanser özellikleriyle ilişkilendirildiğinin artık yaygın bir şekilde kabul görmesidir (Baylin ve Jones 2016; Jones vd. 2016; Flavahan vd. 2017).

Polimorfik mikrobiyomlar, vücudun dış çevreye maruz kalan bariyer dokularıyla (epidermis ve iç mukoza, özellikle gastrointestinal sistem, akciğer, meme ve ürogenital sistem) simbiyotik olarak ilişki kuran ve toplu olarak mikrobiyota olarak adlandırılan çok sayıda mikroorganizmanın çeşitliliği ve değişkenliğinin aydınlatılmasıyla biyotıpta geniş bir sınır ortaya çıkmaktadır. Yerleşik bakteriler ve mantarlar tarafından oluşturulan ekosistemlerin (mikrobiyomlar) sağlık ve hastalık üzerinde derin bir etkiye sahip olduğu giderek daha fazla kabul görmektedir (87); bu durum, yeni nesil dizileme ve biyoinformatik teknolojileri kullanarak mikrobiyal türlerin popülasyonlarını denetleme kabiliyetiyle desteklenmektedir. Kanser için, bir popülasyondaki bireyler arasında mikrobiyomlardaki polimorfik değişkenliğin kanser fenotipleri üzerinde derin bir etkiye sahip olabileceğine dair kanıtlar giderek daha ikna edici hale gelmektedir. İnsanlarda yapılan ilişkilendirme çalışmaları ve fare kanser modellerinde yapılan deneysel manipülasyonlar, kanser gelişimi, kötü huylu ilerleme ve tedaviye yanıt üzerinde

koruyucu veya zararlı etkileri olabilen, başta bakteriler olmak üzere belirli mikroorganizmaları ortaya çıkarmaktadır (Dzutsev vd. 2017; Thomas vd. 2017; Helmink vd. 2019).

Yaşlanan hücreler, hücresel yaşlanma tipik olarak geri dönüşü olmayan bir proliferatif duraklama şeklidir, muhtemelen doku homeostazını korumak için koruyucu bir mekanizma olarak evrimleşmiştir, görünüşte hastalıklı, işlevsiz veya başka türlü gereksiz hücreleri etkisiz hale getirmeye ve zamanında ortadan kaldırmaya hizmet eden programlanmış hücre ölümünü tamamlayıcı bir mekanizmadır. Hücre bölünme döngüsünü durdurmanın yanı sıra, yaşlanma programı hücre morfolojisi ve metabolizmasında değişikliklere ve en önemlisi, kimliği yaşlanan hücrenin ortaya çıktığı hücre ve doku tipine bağlı olan kemokinler, sitokinler ve proteazlar da dahil olmak üzere çok sayıda biyoaktif proteinin salınmasını içeren yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipinin (SASP) aktivasyonuna neden olur (Faget vd. 2019; Gorgoulis vd. 2019; Birch ve Gil 2020).

2.19.1. Meme kanseri

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında ölümün önde gelen nedenidir. Farklı patolojik özellikler ve klinik önem açısından farklılık gösteren birçok alt grubu içeren heterojen bir hastalıktır. Farklı histopatolojik ve biyolojik özelliklere sahip bu farklı alt gruplar, tedavilere farklı tepkiler verilmesine ve dolayısıyla farklı terapötik stratejiler uygulanmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, kanserin alt türlerine göre spesifik olarak gruplandırılması, terapötik karar verme ve kişiselleştirilmiş tedavi için önemlidir. Mikroarray gibi gen ekspresyon analizinin yüksek çıktı taraması, tümör hücrelerinin tedaviye yanıtının, anatomik prognostik faktörlerden ziyade içsel moleküler karakteristikler tarafından belirlendiğini ortaya koymuştur. Bu sınıflandırılmış ve kişiselleştirilmiş yaklaşım, hastalık teşhisinin doğruluğunu ve yeniden üretilebilirliğini artırmak için faydalı olacaktır., 456 cDNA klonları kullanılarak yürütülen bir çalışmaya göre meme kanseri Luminal A, Luminal B, HER2 aşırı ekspresyonu, bazal ve normal benzeri tümörler gibi beş intrinsik alt tipte sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmanın ardında yatan temel mantık, moleküler düzeyde çeşitli kanser türleri arasındaki farklı ifade biçimlerinin altında yatmaktadır (Perou vd. 2000; Sorlie vd. 2003; Pusztai vd. 2008; Spitale vd. 2009; Blows vd. 2010; Iwamoto ve Pusztai 2010).

Dünya Sağlık Örgütü, meme kanserini histomorfoloji ve büyüme şekillerine dayalı olarak 21 türde tanımlamıştır. Meme kanseri, insitükarsinom ve invaziv karsinom gibi birçok geniş kategoride tanımlanmaktadır. In situ karsinoma şunları içerir: Duktal karsinoma in situ ve lobüler karsinoma in situ; bunların her ikisi de sitolojik özellikler ve büyüme paternleri ile ayırt edilir ve Duktal karsinoma in situ ayrıca tümör mimarisine göre sınıflandırılır. İnvaziv karsinom alt tipleri ise yapısal şekilleri (tübüler, medüller ve papiller), salgıları (müsinöz/kolloid) ve mimarileri temelinde karakterize edilir (Malhotra vd. 2010; Dieci vd. 2014).

2.19.2. Meme kanserinde güncel tedavi yaklaşımları

Meme kanserinin tedavisi kapsamlıdır. Meme kanserinin erken teşhisi, ilerleme riskini azaltır, yeniden ortaya çıkma oranını düşürür ve hayatta kalma olasılığını artırır. Zamanında tespit edilen meme kanseri yerel ve sistemik yaklaşımlarla tedavi edilebilir.

Malignite tedavisi, hastanın ekonomik ve lojistik kısıtlamalarını azaltırken önemli tedavileri yürütmek için yetkin onko-cerrahların ve profesyonel çalışanların işlevsel bir altyapı içinde koordine olduğu planlı, bütünsel bir yaklaşım gerektirir. Günümüzde meme tümörlerinin tedavisi için radyoterapi, kimyasal tedavi, cerrahi yöntemler, hormonal tedavi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi ve yeni genetik tedavi dahil olmak üzere çeşitli seçenekler mevcuttur. Meme kanserine bağlı ölüm grafiği, tarama, tanı ve tedavideki ilerleme nedeniyle düzleşmektedir. Çoğu kadın hasta, sağkalım oranlarını iyileştirdiği ve daha iyi sonuçlar sağladığı gösterildiği için adjuvan sistemik tedavi almaktadır ve tedaviyi tehlide göre kişiselleştirmek için moleküler profillemeye artık HR-pozitif karsinomlu hastalar için tıbbi bir gerçekliktir. Radyasyon tedavisi veya mastektomi ile meme koruyucu ameliyatlar, düşük dereceli meme tümörü olan çoğu kadın için seçeneklerdir. Fraksiyonel mastektomi, lumpektomi, kuadrantektomi ve lokal eksizyon meme koruyucu cerrahi seçeneklerinden bazılarıdır. Meme koruma tedavisi yirmi yılı aşkın bir süredir uygulanmakta olup, bu tekniklerin ardından beş ila yedi haftalık fototerapi uygulanmaktadır. Meme kanseri moleküler düzeyde farklı bir hastalıktır, moleküler özellik ERBB2 tarafından kodlanan HER2'nin aktivasyonunu, hormon reseptörlerinin ,östrojen ve progesteron reseptörleri, aktivasyonunu ve BRCA genlerindeki mutasyonları içerir. Bu nedenle, meme kanseri tanı ve tedavisi çeşitli alt uzmanlık alanlarını içeren multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Tanısal görüntüleme çalışmaları ve biyopsi, tanıyı başlatmada ve primer tümör yönetimi, aksiller evreleme ve tedavi sırası ile ilgili cerrahi seçimleri etkilemede kritik öneme sahiptir. Meme tümörü tanısı konulduktan sonra, hastalığın derecesine erişilir ve bu da sistemik neoadjuvan tedavinin gerekli olup olmadığını yönlendirir. İleri evre IV'teki meme kanseri, primer tümörün palyatif rezeksiyonu için bir neden olmadıkça tedavi edilemez olarak kabul edilir, dördüncü evre sadece sistemik tedavi ile tedavi edilir. Meme tümörlerinin ölüm oranı, meme kanseri ile mücadelede kemoterapideki ilerleme nedeniyle son birkaç yılda düşmüştür. Buna ek olarak, anti-HER2 monoklonal antikorlar gibi biyolojik tedavilerin etkinliği, meme kanseri tedavisinde moleküler olarak hedeflenmiş yöntemin etkinliğini ve önemini ortaya koymuştur. Vücudun diğer bölgelerini de istila edebilen üçlü negatif meme kanseri hala çok az tedavi seçeneği olan ciddi bir hastalıktır. Meme kanserindeki farklı tedavi yanıtının altında yatan biyolojik süreçler son yıllarda daha iyi anlaşılmıştır. Tamoksifen ve diğer endokrin ilaçlar meme kanseri yönetimini değiştirmiş ve kansere bağlı ölümlerde önemli azalmalar sağlamıştır (García Rodríguez vd. 2010; Gianni vd. 2011; Anampa vd. 2015; McPhail vd. 2015; Mehraj vd. 2021a; Qayoom vd. 2022; Sofi vd. 2022).

2.19.2.1. Meme kanseri radyasyon terapisi

Radyasyon tedavisi, yüksek enerjili radyasyon kullanan kanser öldürücü ve tümör küçültücü bir tedavidir. Yüksek enerjili radyasyon, hücrel genetik havuzları yok ederek daha fazla büyümelerini ve genişlemelerini önler. Radyasyon hem kanserli hem de kanserli olmayan hücrelere zarar verse de radyoterapinin temel amacı, tümör hücrelerine verilen radyasyon miktarını önemli ölçüde artırırken, karsinom hücrelerine yakın veya radyasyon yolunda bulunan sağlıklı hücrelere yönelik riskleri azaltmaktır. Kanser hücreleri genellikle radyasyon hasarını onarmada normal hücreler kadar etkili değildir, bu da farklı kanser hücrelerinin ölümüne yol açar. Radyoterapi, hem "non-invaziv hem de invaziv MK" tedavisinde önemli bir işlev görmektedir. Hem terapötik hem de palyatif bakım ortamlarında, radyasyon tedavisi meme malignitesinin yönetiminde faydalıdır.

"Meme koruyucu cerrahi" sonrasında memenin radyasyonu, erken hastalıkta mastektomi ile karşılaştırılabilir onkolojik sonuçlar verir. İleri evre kanserli bireylerde, meme duvarına ve yakındaki lenfatik düğümlere uygulanan adjuvan radyasyon, lokal ve uzak nüks riskini azaltır ve hastalığa özgü genel sağkalıma fayda sağlar. Bu avantaj, nod pozitifliği, ergenlik, üçlü negatif moleküler belirteçler, yüksek dereceli kanser ve lenf damarı invazyonu gibi risk faktörleri ile artar. Radyasyona maruz kalma seviyeleri bölgesel hastalığı içerecek şekilde yükseltildiğinde, özellikle "akciğerler ve kalp" için toksisite tehlikesi artar. Metastazik meme kanserli hastalara radyasyon uygulamak birkaç durumda faydalıdır. Cerrahi rezeksiyon bir seçenek olmadığında, palyatif radyasyon dermal rekürrens veya lokalize hastalık durumlarında lokal kontrole yardımcı olabilir. BT görüntü analizi, simülasyon, hasta izleme ve uygulama yöntemlerindeki gelişmelerle daha kesin ve homojen radyasyon tedavisi sağlanabilmektedir. Terapiden sonra radyoterapi seçenekleri arasında "hipo-fraksiyone, tüm meme radyasyonu, eksternal ışın tedavisi ışın tedavisi ile hızlandırılmış kısıtlı meme radyasyonu yer alır. Radyasyon tümör noktasına temel olarak iki şekilde verilebilir. Vücut dışından gelen harici ışın radyasyonu, yüksek enerjili ışınlar (protonlar veya parçacık radyasyonu ve fotonlar) hedeflenerek tümör bölgesine iletilir. Bu, klinik ortamlarda en yaygın kullanılan yaklaşımdır (Fisher vd. 2002; Bese vd. 2008; Jackson ve Bartek 2009; Begg vd. 2011; McGale vd. 2014; Braunstein vd. 2017; Vrieling vd. 2017; Mir vd. 2020; Mehraj vd. 2021b).

2.19.2.2. Meme brakiterapisi

"Meme brakiterapisi" bir zamanlar lumpektomi boşluğunu tedavi etmek için dışarıdan tüm meme radyasyon terapisinden sonra "boost" olarak kullanılıyordu. "Hızlandırılmış parsiyel meme ışınlaması", Contura çok lümenli balon, MammoSite balon gibi çeşitli uygulamalarla veya interstisyel iğne implantlarıyla ya da radyasyon tedavisi için tek mod olarak 3D konformal harici "meme koruyucu cerrahi sonrası radyo terapi" ile çeşitli klinikler tarafından benimsenmiştir. Daha küçük hacmin ışınlanmasıyla tümör yatağında fraksiyon başına daha yüksek radyasyon dozları biriktirilir. Özellikle günlük tüm meme eksternal ışın radyoterapisi ile karşılaştırıldığında, bu tedavi sürelerini önemli ölçüde azaltır. Meme koruyucu cerrahiden sonra bile "interstisyel meme brakiterapisi" on yıl boyunca etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Nelson vd. 2009).

2.19.2.3. Meme kanseri kemoterapileri

Kemoterapi, tümör hücrelerini tedavi etmek için anti-kanser ilaçlarının kullanılmasıdır (Şekil 2.40).



Şekil 2.30. Meme karsinomu tanısında kullanılan farklı kemoterapötikler (Mir 2023)

Meme kanseri tedavisi, genel sağlık durumu, tıbbi geçmiş, yaş (adet görüp görmeme durumu dahil), kanserin türü, evresi ve reçete edilen ilaçlara ve protokollere duyarlılık dahil olmak üzere bir dizi değişkene bağlı olacaktır. Kemoterapi seçenekleri tipik olarak döngüler halinde verilir: önceden belirlenmiş bir süre için bir tedavi ve ardından iyileşme aşaması ve ardından başka bir tedavi. Ameliyattan önce, kemoterapi tümörün boyutunu küçültmek ve bazı durumlarda mastektomi yerine meme koruyucu cerrahiye izin vermek için kullanılabilir. Ameliyattan sonra rutin olarak verilir ve bazen "doz yoğun" bir şekilde verilir.

Adjuvan kemoterapi de yüksek riskli hastalar için sistematik kemoterapiler önerilmektedir. Antrasiklin ve taksan gibi sayısız kemoterapi mevcuttur. Amerika Birleşik Devletleri'nde 4 kürlük paklitaksel eşliğinde 4 kürlük "Dox ve siklofosfamid" etkili bir tedavi rejimidir. Kemoterapi döngüsünden sonra büyüme faktörü desteği ile iki haftada bir sabit doz (cd) şeklinde verilen AC-T, önceki üç haftada bir programından daha iyi performans göstermektedir. Taksan sonrası diğer optimum dox ve siklofosfamid programı 12 haftalık paklitaksel veya üç haftada bir 4 kür dosetaksel içerir. Adjuvan kemoterapi ile dosetaksel de başka bir yaygın seçenektir, ancak yukarıdaki tedavilerden daha ileri değildir ve dosetaksel paklitakselden daha toksiktir ve özellikle febril nötropeni oranları artmıştır (Citron vd. 2003; Sparano vd. 2008; Swain vd. 2013; Mehraj vd. 2021a; Mehraj vd. 2021b).

Adjuvan kemoterapinin avantajı, HR negatif meme kanseriden muzdarip olanlarda nüks ve meme kanseri ölüm oranlarını daha yüksek düzeyde fayda ile azalttığı meta-analizlerle gösterilmiştir. "Onko tipi yeniden nüks skorları ≥ 31 " kemoterapi ile nüks riskinde anlamlı bir azalmaya yol açarken (rölatif risk-0.26), diğer yandan skorları düşük olanlar kemoterapiden çok az fayda görmektedir. Antrasiklinle ilişkili kardiyotoksisite veya lösemojenik olasılıklarla ilgili endişeler mevcut olsa da, antrasiklin taşıyan adjuvan tedavi tedavileri meme kanserinin erken evre tanısında kullanılmıştır (Paik vd. 2006; Peto vd. 2012).

Neo-adjuvan kemoterapi (NAK) de, başlangıçta, bu kemoterapi bölgesel olarak ilerlemiş, tedavi edilemeyen rezektabl meme kanseri için kullanılmıştır. NAK son zamanlarda "tedavi edilebilir tümörlerde meme ve aksilladaki hastalığın evresini düşürmek" için meme korumasına izin vermek ve bazı durumlarda aksiller lenf nodu diseksiyonunu en aza indirmek için kullanılmaktadır. Çeşitli randomize çalışmalarda NAK'nin onkolojik koruma ve sağkalım oranları incelenmiştir. Kemo-terapiden sonra "NAK vs cerrahi" tanısı konan bireylerin sistemik bir incelemesinde, "NAK" ile belirgin bir canlılık veya loko-bölgesel nüks farkı bulunmamış, ancak NAK alanlarda mastektomi oranı %17 azalmıştır (van der Hage vd. 2001; Mieog vd. 2007).

2.19.2.4. Meme kanseri endokrin terapisi

Meme dokusu gelişimi ve farklılaşmasının başlıca düzenleyicileri östrojen ve progesterondur. Yumurtalıklar her iki steroid hormonun da birincil kaynağıdır. "Östrojen reseptörleri (ER'ler)" ve "progesteron reseptörleri (PR'ler)" adı verilen "aktif edici nükleer reseptörlere" bağlanarak hücreler üzerinde etki gösterirler. Bu "reseptörler" aktive edildikten sonra membran lokalizasyonunun yanı sıra transkripsiyonel sinyal aktivitesi de gösterirler. En yaygın ER'lerden ikisi ER α ve ER β 'dir. ER α meme tümörlerinin %70'inde eksprese edilir; ancak ER β yeterince tanımlanmamıştır. Östrojen veya progesteron reseptörleri pozitif olarak taranan kanserlerin çoğu endokrin tedavisine iyi yanıt verir. Endokrin tedavisi 5-10 yıl boyunca ve bazı durumlarda muhtemelen çok daha uzun süre kullanılabilir. Başlıca endokrin tedavi türleri arasında-tamoksifen ve aromataz inhibitörleri bulunmaktadır (Mir 2023).

Tamoksifen'in erken evrelerde adjuvan endokrin tedavi olarak kullanımını destekleyen güçlü kanıtlar vardır. Nonsteroidal bir antiöstrojen olan Tamoksifen, 1970'lerde FDA tarafından metastatik meme kanseri olan menopoz sonrası kadınlar için hormonal bir tedavi olarak ruhsatlandırılmıştır. "Ulusal Sağlık Enstitüleri Meme Kanseri Kemoterapisi Konsensüs Konferansı 1985" kılavuzuna göre tamoksifenin kullanımı "nod+ ve ER+ tümörü olan postmenopozal kadınların tedavisiyle birlikte adjuvan ortama" genişletilmiştir. 1958 yılından bu yana, "Ulusal Cerrahi Adjuvan Meme ve Bağırsak Projesi (NSABP)" tarafından adjuvan ve cerrahi tedavinin çeşitli yönlerini incelemek için randomize kontrollü çalışmalar yürütülmektedir (Band 2010; Jankowitz ve Davidson 2013).

Aromataz inhibitörleri, yumurtalık dokusu artık östrojen üretmediğinden, menopoz sonrası kadınlar bunun yerine aromataz enzimini kullanarak ağırlıklı olarak glandüler olmayan kaynaklardan östrojen üretirler. Meme tümörü hücrelerinden ayrılmasının yanı sıra, aromataz kas, deri altı yağ ve karaciğer gibi bir dizi başka organda da bulunmuştur. Östrojen baskılaması geçmişte çok başarılı olduğu için, "aromataz

inhibisyonu" bir meme kanseri tedavi seçeneği olarak çok dikkat çekmiştir. Aromataz inhibitörleri (AI'ler) ilk iki jenerasyon için meme kanseri tedavisinde etkiliydi, ancak "kortizol ve aldosteron" gibi diğer androjenik hormonları bloke ettikleri için önemli yan etkileri vardı. Üçüncü nesil AI'ler daha fazla aromataz seçiciliğine sahiptir, bu nedenle "steroidal (tip I) veya nonsteroidal (tip II)" olarak sınıflandırılır. Non-steroidal inhibitörler geri dönüşümlü kompetitif inhibitörlerdir, steroidal inhibitörler ise enzim aktivitesini geri dönüşümsüz olarak azaltır. Metastatik meme kanserli kadınlar, üçüncü nesil AI'ler kullanılarak incelenen ilk kadınlar olmuştur. AI tedavisinin metastatik meme kanserindeki etkinliği keşfedildiğinde, odak noktası adjuvan ortamlarda uygulanmasına geçmiştir. Tamoksifen ile tedavi edilen birçok hastada ilaç direnci nedeniyle nüksler görülmüş veya endometriyal malignite ve "venöz tromboembolik bozukluk" gibi zararlı etkiler görülmüştür (Howell vd. 2005).

2.19.2.5. Meme karsinomu tedavisinde hedefe yönelik tedaviler

Meme kanseri için "hedefe yönelik tedaviler", hücre yüzeylerinde belirli ayırt edici proteinlerin aşırı ekspresyonu nedeniyle "meme kanseri hücrelerinin" anormal bir büyüme modeline sahip olduğu bireyleri teşhis etmek için kullanılır. İnsan bağışıklık sistemiyle aynı şekilde hareket eden antikörler, meme kanseri hedefli tedavi olarak öncelikle kullanılmaktadır. Meme kanserli hücrelerin periferindeki "HER2 proteininin" yukarı regülasyonunun hedeflenmesi, günümüzde mevcut olan en verimli "meme kanseri hedefli tedavi" yöntemidir. Şu anda, kanser hücrelerinin büyümelerini uyaran sinyalleri almasını engelleyen Herceptin olarak da bilinen Trastuzumab gibi birçok moleküler yolu engellemede başarılı olan ve yaygın olarak kullanılan bazı meme kanseri hedefli tedaviler vardır. Perjeta olarak da bilinen Pertuzumab, kanser hücrelerinin çoğalmak için kullandığı sinyalleri bloke ederek çalışır. Avastin olarak da bilinen Bevacizumab, kanser hücrelerinin kendilerine oksijen ve besin sağlayan yeni kan kılcal damarlarının büyümesini durdurur (Baselga vd. 2012b; Gianni vd. 2013; Giordano vd. 2014).

HER2+ memenin malign tümörü, insan epidermal büyüme reseptörü pozitif, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve apoptotik baskılanmayı teşvik eden hücre sinyal yollarında yer alan bir ErbB ailesi " tirozin kinaz reseptörüdür". Meme kanserinde en sık diferansiyel olarak ifade edilen "reseptör" olan HER2, meme kanserlerinin yaklaşık %15'inde yüksek oranda ifade edilir ve bu da düzensiz hücre proliferasyonuna neden olur. HER2, tümör büyümesiyle ilgili aşağı akış yollarını güçlü bir şekilde tetiklediğinden, ifade düzeyleri meme kanseri metastazı ve prognozuyla yakından ilişkilidir. "HER2" bu nedenlerle son 20 yıldır yeni terapötiklerin keşfi için biyolojik bir hedef olarak kullanılmaktadır. Anti-HER2 tedavisi, hızlı gelişmelerine ve diğer formlardan daha agresif olmalarına rağmen HER2 + meme kanserlerinde sağkalımı artırmıştır (García-Aranda ve Redondo 2017; Masoud ve Pagès 2017; Nami ve Wang 2017; Mir vd. 2020).

Trastuzumab veya Herceptin HER2+ BC tedavisinin temel taşıdır. FDA onaylı ilk hümanize immünoglobulin G1kappa monoklonal antikörüdür (mAb) ve çok sayıda klinik çalışmada hastalısız sağkalım ve uzun dönem genel sağkalımı önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur (Masoud ve Pagès 2017).

Pertuzumab, rekombinant insan monoklonal antikoru (mAb) HER2'ye bağlanır ve diğer HER-reseptörleri ile dimerleşmesini engeller. "Pertuzumab" HER2 ile "trastuzumab" dan farklı bir epitopta etkileşime girdiğinden ve tamamlayıcı yollar aracılığıyla

"antikora bağılı hücre aracılı sitotoksisteyi" uyardığından, birlikte kullanıldığında, pertuzumab ve trastuzumab tek başına her iki tedaviden daha güçlü antitümör etkinlik sergiler. HER2+ metastatik meme kanserli bireyleri tedavi etmek için pertuzumab, trastuzumab ve docetaxel ile kullanılır. Ayrıca, erken HER2 +, "ileri veya inflamatuvar MK" için neo-adjuvan tedavi olarak kullanılır, buna ek olarak trastuzumab artı ve kemoterapi ile birlikte aşırı yeniden oluşma şansı olan HER2 + erken meme kanseri adjuvan tedavisi için kullanılır (Franklin vd. 2004; Baselga vd. 2012b).

Antikor ve ilaç konjugatları, "Antikor-ilaç konjugatları (AİK'ler)" rekombinant mAb ile sitotoksik bir ilaç arasındaki sentetik bağlantıdan oluşur. Antikorum içeri alınması, kanserli hücrenin yüzeyindeki spesifik bir antijene bağlandıktan sonra gerçekleşir. İlaç daha sonra hücre içine iletilir ve burada sitotoksisteye neden olur. T-DM1, halihazırda "trastuzumab" artı taksan (tek başına veya birlikte) ile tedavi edilmiş "HER2 (+) metastatik MK" hastalarını iyileştirmek için kullanılan bir "AİK" dir (Verma vd. 2012; Beck vd. 2017).

mTOR yolağının, hedefe yönelik tümör tedavisinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Meme tümörlerinin %70'inde (Fosfatidilinositol 3-kinaz) PI3K/AKT/mTOR yolağı yüksek oranda aktive olmaktadır ve bu yolaklar boyunca keşfedilen kinaz proteinleri meme kanseri tedavisi için ileriye dönük terapötik hedefler olabilir. "HER-2 veya ER inhibitörleri" ile birlikte "everolimus" ilacı ile mTOR yolağının kullanılması ve geleneksel tedavilere karşı " meme kanseri hücrelerinin duyarlılığının" geri kazanılmasının yanı sıra "mTOR yolağı" aşırı aktif olduğunda ortaya çıkan direnç süreçlerinin üstesinden gelinmesi için umut verici bir perspektif yaklaşımı olabilir. Glaysher ve arkadaşları, knocked-in mutasyonlarına sahip meme epitel hücre hatlarını hedeflemek için EGFR ve mTOR inhibitörlerinin kullanılmasının, terapötik ilaçlara daha iyi yanıt verilmesiyle sonuçlandığını keşfetti (Grunt ve Mariani 2013; Glaysher vd. 2014).

Reseptör tirozin kinaz inhibitörleri, temel olarak "HER2 gibi bir tirozin-kinaz-reseptörünün ATP-bağlayıcı bölgesi" ile etkileşime giren ve aktivitesini inhibe eden küçük moleküler bileşiklerdir. Tykerb olarak da bilinen Lapatinib, EGFR ErbB1 ve HER2 yolakları tarafından indüklenen büyümeyi baskılayan bir kinaz inhibitörüdür (García-Aranda ve Redondo 2017).

İkinci bir kinaz inhibitörü olan neratinib veya Nerlynx, adjuvan trastuzumab tedavisinden sonra HER2+ erken aşama meme kanseri adjuvan tedavisi için tek bir ilaç olarak onaylanmıştır. Ayrıca, daha önce iki veya daha fazla anti-HER2 tedavisi almış kişilerde "HER2+ mBC'yi tedavi etmek için kapesitabin" ile birlikte kullanılır (Segovia-Mendoza vd. 2015).

Son zamanlarda Tukysa olarak da bilinen tucatinib 2020 yılında "FDA" tarafından trastuzumab ve kapesitabin ile birlikte "HER2+ metastatik meme kanseri " tanısı için önerilen bir başka kinaz inhibitörüdür (Murthy vd. 2020).

2.19.2.6. Meme kanserinin cerrahi tedavisi

Ameliyat sırasında tümör ve yakın bölgedeki bazı normal dokular çıkarılır. Malignitenin evresine ve türüne göre lumpektomi (sadece yumrunun çıkarılması) veya mastektomi (tüm memenin cerrahi olarak çıkarılması) yapılır. Cerrah, standart prosedüre

göre ameliyatta çıkarılan dokuların sınırlarının malignite içermediğini ve kanserin tamamen çıkarıldığını gösterdiğini doğrulamalıdır. Önceleri, tedavi önemli bir ameliyat ve uzun süre hastanede kalmayı gerektirirken, artık tipik olarak hızlı bir iyileşme ile ayakta hasta ameliyatı şeklinde gerçekleştirilmektedir (Lowery vd. 2012).

2.20. Meme Kanseri Tumor Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi (TME), çevredeki kan damarları, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, sinyal molekülleri ve hücre dışı matriksten oluşur. Bu bileşenler kanserin ayırt edici özelliklerine ve içsel ve edinilmiş dirençte katkıda bulunur. Hipoksi, kanser progresyonunda hayati bir rol oynayan TME'nin önemli bir özelliğidir. Hipoksinin KKH fenotipi, anjiyogenez, ABCC1 ve ABCG2'nin artan ekspresyonu yoluyla ilaç akışı, senesans ve apoptozun modülasyonu, metastaz ve genomik instabilite ile ilişkili çeşitli mekanizmaları indüklediği bilinmektedir. Hipoksi, hipoksinin etkilerine aracılık eden düşük oksijen seviyelerine yanıt veren bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi ile indüklenen faktörün (HIF) üretimine yol açar. HIF-1 epitelyal-mezankimal geçişi (EMT) teşvik eder ve üçlü negatif meme kanseri'nin ayırt edici bir özelliğidir. HIF-1α'nın ER+ BC hücre hatlarında ilaç direncine katkıda bulunduğu da söylenmektedir (Felipe Lima vd. 2016; Nedeljković ve Damjanović 2019; Wander vd. 2022).

2.21. Meme Kanseri Epiteyal Mezankimal Geçiş (EMT)

Normal hücrelerde EMT, embriyonik gelişim ve yara iyileşmesinde rol oynayan bir süreçtir; ancak bu süreç çeşitli mekanizmalarla ele geçirilerek tümörigenezlere yol açabilir. EMT, kanserde terapötik direnç, tümör invazyonu ve metastazda önemli bir rol oynar. EMT sırasında E-cadherin işlevi kaybolur, bu da hücre-hücre adezyonunun azalmasına ve apoptoz direncine yol açar. EMT'nin ilaç direncini indüklediği mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır; ancak bazı hipotezler ortaya atılmıştır. Bir teori, EMT ve KKH benzer fenotipleri paylaştığından, EMT'nin Wnt gibi terapötik direnci sağlayan sinyal yollarına da sahip olabileceğidir (Felipe Lima vd. 2016; Wang vd. 2019b).

2.22. Meme Kanseri Hedefe Yönelik Tedaviye Dirençte Src

HER2+ meme kanseri hastaları, bu hastaların önemli bir kısmı, özellikle trastuzumab durumunda, tedaviye karşı içsel veya edinilmiş direnç nedeniyle hala nüksetmektedir. Trastuzumab bazlı tedaviye başlangıçta yanıt veren hastaların çoğunluğu bir yıl içinde direnç geliştirmektedir. Aslında, HER2+ meme kanserli hastaların %70'i trastuzumaba karşı intrinsik veya edinsel direnç göstermektedir (Slamon vd. 2001; Nielsen vd. 2009; Dawood vd. 2010; Baselga vd. 2012a; Wong ve Lee 2012; Perez vd. 2014).

Anti-HER2 tedavilerine karşı dirençte rol oynayan birçok mekanizma bulunmaktadır. Bunlar PI3K/Akt/mTOR yolağının düzensizliği, c-MET, p27^{kip1}, Protein Fosfataz 2A (PP2A) Ailesi, CD36, mikroRNA'lar ve Src'dir.

Src bu tez çalışmasında araştırılan proteinin başlattığı sinyal yolağı içinde yer alan bir hücresel proto onkogendir. Src, Hücresel replikasyon, farklılaşma ve hayatta kalma gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen reseptör olmayan bir tirozin kinazdır. Aberrant

Src aktivasyonunun belirgin bir onkojenik olay olduğu düşünülmektedir. Src normalde fosfotirozininin (Tyr530) Src homoloji 2 alanı ile intramoleküler bağlanmasıyla inaktive edilmiş olarak bulunur. Reseptör tirozin kinazların (RTK'lar) EGF ve PDGF gibi büyüme faktörleriyle etkileşimi Y530 defosforilasyonuna ve bunun sonucunda Src aktivasyonuna neden olur. Aktive olan Src daha sonra kinaz alanındaki tirozin 416 rezidüsünü (Tyr416) otofosforile ederek çeşitli hedeflerle etkileşime girmesini sağlar (Ralston ve Bishop 1985; Weernink ve Rijksen 1995; Thomas ve Brugge 1997; Yeatman 2004; Kim vd. 2009).

Src aktivasyonu ve hedefe yönelik tedaviye yanıt arasındaki ilişki açısından, 57 BC hastasını içeren bir çalışma, yüksek düzeyde fosforile Src (pSrc) içeren tümörlerin trastuzumab tedavisinden sonra kötü bir klinik yanıt ve daha agresif hastalığa sahip olduğunu göstermiştir. Tahmin edilebileceği gibi, genel sağkalım pSrc düşük tümörlü hastalara kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğu görülmüştür (Zhang vd. 2011).

Lapatinib direnci, yüksek düzeyde aktive Src gösteren hücre hatlarında da bildirilmiştir. Saracatinib (Src inhibitörü) ile kombine edilen Lapatinib, ksenogreftlenmiş farelerin sağkalımını önemli ölçüde uzatmıştır (Formisano vd. 2014).

Bu sonuçlar Src aktivasyonunun hedefe yönelik tedaviye direnç gelişimi sırasında yaygın bir olay olduğunu ve Src inhibisyonunun yeni bir terapötik strateji olabileceğini düşündürmektedir.

Buraya kadar anlatılan direnç mekanizmaları meme kanserinin tedavisindeki başarıları önemli ölçüde azaltmakta ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesini elzem kılmaktadır. Meme kanserinin ilaç direncine genellikle birden fazla mekanizma aracılık ettiğinden dolayı yeni hedeflere yönelik ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle yeni tanımlanan proteinler ve bunların hücresel düzeyde özellikle de kanser hücresi özelinde araştırılması yeni tedavi ajanlarının keşfi ve buna bağlı olarak da kanser tedavisine dair umudunu arttırabilir.

2.23. Scavenger Reseptörler

Scavenger reseptörlerinin (SR'ler) makrofajlarda endositoz ve modifiye edilmiş (asetillenmiş) düşük yoğunluklu lipoproteinlerin parçalanmasında işlev gördüğü ilk kez gösterilmiştir. SR'ler yapısal olarak heterojen bir protein üst ailesidir ve yapısal benzerlikleri çok az olan ya da hiç olmayan farklı sınıflara aittirler. Çeşitli sınıfları belirleyen tek özellik, karşılıklı ligandları bağlama yeterlilikleridir. SR'ler, modifiye edilmiş kendi molekülleri, hasarla ilişkili moleküler kalıplar, mikrobiyal patojenler (lipopolisakkarit ve lipoteikoik asit) üzerindeki korunmuş patojenle ilişkili moleküler kalıplar gibi kendinden olmayan moleküllerle etkileşim gösterir. Ayrıca modifiye edilmemiş endojen proteinleri, lipoproteinleri, apoptotik hücreleri ve karbonhidratlar, proteoglikanlar, kolesterol ester ve fosfolipidler gibi poliyonik ligandları da tanırlar. Konak hücreler, Örüntü Tanıma Reseptörleri (PRR'ler) de dahil olmak üzere karmaşık gözetim sistemlerinin ifadesi yoluyla bağışıklık yanıtının etkili koruyucularıdır. Çöpçü reseptörler, patojenik mikropların ve/veya ürünlerinin doğrudan non-opsonik alımına aracılık eden fagositik reseptörler olarak görev yapan membranla ilişkili örüntü tanıma reseptörleridir. SR'ler, TLR'ler (Toll benzeri reseptörler) gibi diğer PRR'lerle veya çeşitli hücre tiplerindeki multimoleküler komplekslerle ortak olabilir ve süpürme dışında sinyal verme gibi çeşitli işlevlere katılabilir. Patojenlerin antijen sunan hücreler üzerindeki

SR'ler tarafından tanınması, fagositoz, antijenlerin işlenmesi ve daha sonra MHC sınıf I ve II molekülleri üzerinde sunulmasını takiben enflamatuvar tepkiye yol açar, böylece doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkilerini birbirine bağlar. SR'ler makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller, mikrogliya, B hücreleri, endotelyal ve epitelyal hücreler gibi patojen girişinin potansiyel portalları olan çeşitli hücre tiplerinde ekspresyon gösterir. SR'ler, patojen istilasının portallarında sayısız mikrobiyal antijeni tanıyarak ve patojenlerle savaşmak ve ortadan kaldırmak için aşağı akış bağışıklık tepkilerini aktive ederek konak savunmasında önemli bir rol oynar (Brown ve Goldstein 1983; Gordon 2002; Mukhopadhyay ve Gordon 2004; Murphy vd. 2005; Kishore 2009; Talele vd. 2010; Plüddemann vd. 2011; Haase 2013).

Scavenger reseptörleri, nükleotid dizisi hizalamasına ve protein yapısına göre sınıflandırılır. Her sınıf, yapısal özellikleri paylaşan üyeleri içeren alt sınıflara ayrılır. Scavenger reseptörlerinin mevcut anlayışına ve önerilen isimlendirmeye dayanarak, sınıf A-L olmak üzere 12 sınıf ve bir potansiyel scavenger reseptörü, anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE-2'ye) ayrılmıştır (PrabhuDas vd. 2017; Taban vd. 2022).

2.23.1. Sınıf A

A sınıfı çöpçü reseptörlerinin bir N-terminus sitoplazmik alanı, tek transmembran bölümü ve ligand tanımlamasında yer alan büyük bir ekstraselüler C-terminus kısmı vardır. A sınıfı SR'ler bir kolajen alanı ve bir A tipi sisteince zengin alan (SRCR) veya bir C tipi lektin alanı (CLEC) içerir. Üyeler arasında SR-A1 (SCAR-A1 VEYA MSR1), SR-A3 (SCAR-A3 veya CSR1), SR-A4 (SRCL), SR-A5 (SCAR-A5) ve SR-A6 (MACRO) bulunur. SR-A1'in bağlantılı SRCR alanı diğer membrana bağlı reseptörlerle iletişimi kolaylaştırırken, kolajen alanı ligand tanımadan sorumludur. SR-A1 lipopolisakkarit, lipoteikoik asit ve bakteriyel CpG DNA'ya bağlanır. Lipopolisakkarit varlığında SR-A1, Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ile etkileşime girer ve Lipopolisakkarit varlığında makrofajlarda NF- κ B ve enflamatuvar sitokin üretimini uyarır. Ayrıca, endotoksinlerin temizlenmesi ve detoksifikasyonunda rol aldığı *E. coli*'den LPS'nin saflaştırılmış lipid A kısmına bağlanır. Benzer şekilde SR-A1, LTA ve/veya gram-pozitif bakterilerin dokulardan ve dolaşımdan (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* ve *Listeria monocytogenes*) bağlanması ve temizlenmesi yoluyla konak savunmasına da katılır. SR-A1, HSP70 üyeleriyle ittifak halinde antijen bağlanmasını, içselleştirilmesini ve antijen sunumunu uyararak adaptif bir bağışıklık yanıtı oluşturabilir. SR-A1 ayrıca *Escherichia coli*'yi fagosite etmek için TLR4 ile işbirliği yaparken, SR-A1 ve TLR2 *Staphylococcus aureus*'un fagositozunda işbirliği yapar (Hampton vd. 1991; Dunne vd. 1994; Amiel vd. 2009; Fischer vd. 2010; Yu vd. 2012).

SR-A1, klattrin bağımlı endositoz veya klattrinden bağımsız endositoz yöntemleriyle içselleştirmeye katılır ve ikincisi apoptozu uyarır. Antijen sunan hücrelerde SR-A1, lipid salına bağımlı bir yöntemle içselleştirmeyi ve fagositozu kolaylaştırır. SR-A1'in eş reseptörü MERTK M2 ile birlikte kümülatif yüzey ekspresyonunun apoptotik cisimlerin makrofajlar tarafından yutulmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir. SCAR-A3 veya CSR1'e (hücresel stres yanıt proteini) gelince, ifadesi oksidatif stres ile geliştirilebilir ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizlemek için bir hücresel stres yanıt geni olarak işlev görür (Zizzo vd. 2012).

2.23.1.1. Sınıf A scavenger reseptör üyesi 5 (SCARA5)

Scavenger reseptör sınıfı A üyesi 5 (SCARA5) 2006 yılında SR'lerin yeni bir üyesi olarak bulunmuştur. SCARA5, adını aileye üye SR-AI/II ve MARCO proteinine benzer şekilde; kısa bir N-terminal domain, bir transmembran domain, bir spacer bölgesi, bir kollajen bölgesi ve C ucunda bir A tipi (en az iki ekzon ve 6 sistein aa'ı içeren tip) SRCR bölgesi içermektedir. SRCR bölgeleri farklı homolojilere sahip olsa da sistein aa'lerinin pozisyonları yapı içerisinde iyi korunmuştur. Bu sistein aa'leri arasında oluşan disülfid bağları da yapının bütünlüğü açısından önem arz etmektedir (Jiang vd. 2006; Martínez vd. 2011).

Artan SCAR-A5 ekspresyonu, pro-enflamatuvar gen ekspresyonunda baş transkripsiyonel bekçi olan sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3'ün (STAT3) inaktivasyonuna neden olur (Yan vd. 2012).

SCARA5 transferrine bağlı olmayan demir iletimine aracılık eden ferritin reseptörü olarak işlev görmektedir. Ferritinler dokuların çoğunda demir depolamak için sitozolik proteinler olarak bulunurlar. Ferritin, yaklaşık 12 nm boyutunda ve 250 nm³ hacminde bir boşluk oluşturacak şekilde 24 alt ünitenin bir araya gelerek oluşturduğu küresel formda bir demir depo proteinidir. İnsan ferritinleri, ferritin ağır zincir (FTH, ~21 kDa) ve ferritin hafif zincir (FTL, ~19 kDa) olmak üzere iki alt birimden oluşur ve oranları farklı dokularda 2:22 ila 20:4 arasında değişir. Ferritinin H ve L altüniteleri arasındaki homoloji %55'ler seviyesinde olsa da her iki alt ünite farklı fonksiyonlara sahiptir. FTH Fe(II)'nin oksidasyonunu katalize ederken, FTL Fe(III)'ün çekirdeklenmesini ve depolanmasını teşvik eder. Ferritin ayrıca nispeten demirden fakir ve esas olarak FTL'den oluşan serum ferritini olarak hücrelerin dışında dolaşır (Worwood vd. 1976; Harrison ve Arosio 1996; Ghosh vd. 2004; Arosio vd. 2009).

H alt ünitesi enzimatik aktiviteye sahiptir ve ferröz demiri ferrik demire okside eder. H- Ferritindeki ferroksidaz bölgesi çoğunluğu glutamik asit olmak üzere birkaç aa'ten oluşmaktadır. Bu merkez H-Ferritin helikal demeti ile örtülüdür ve metal ligandların bağlanma bölgesi olarak işlev görür. H-ferritinin ferroksidaz aktivitesi Ferritin kompleksinin oluşumuna bağlı değildir ve monomerik halde bile tespit edilebilir (Boyd vd. 1985; Cozzi vd. 2000; Cozzi vd. 2004).

L-Ferritin ise enzimatik aktivitesi yoktur bu nedenle demirin oksidasyonuna katkıda bulunamaz. L-Ferritin, Ferritin boşluğu içerisinde çok miktarda karboksil grubu sağlayarak çekirdeklenme bölgesini oluşturur. Bununla birlikte, L-Ferritin monomeri, helikal yapıyla tuz köprüsü oluşturarak Ferritin kompleksinin stabilizasyonunu sağlamaktadır (Levi vd. 1992).

Serum Ferritin'in, Hodgkins' lenfoma, hepatoselüler karsinoma, pankreas kanseri ve meme kanseri gibi pek çok farklı malignant durumda over eksprese olduğu gösterilmiştir. Yapısal, immünolojik ve izoelektrik analizler, tümörden salınan Ferritinlerin H ve L alt ünite kompozisyonu açısından normal Ferritinden farklı olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle meme tümörlerinde, benign meme dokusu ile karşılaştırıldığında, artışın yaklaşık 6 kat olduğu ve L-Ferritine spesifik olduğu da ortaya çıkarılmıştır. Bu artış, yüksek miktarda epitel hücre proliferasyonu, histopatolojik farklılaşma ve kısalan yaşam süresi ile koreledir (Jézéquel vd. 2012; Alkhateeb vd. 2013).

Hücre dışı Ferritin, tümör oluşumunu pek çok farklı seviyede stimüle edebilir. Hücre dışı Ferritin kanser hücrelerinin:

- Proliferasyonunu artırabilir
- Anjiyogenezi artırabilir
- Lenfosit yanıtını baskılayabilir.

Tüm bu sonuçlar aslında, Ferritinin tümörigeneze katkı sağladığını, dahası doğrudan önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Serum Ferritin seviyesindeki artış genellikle daha agresif bir fenotip ve daha kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedir. Özellikle Meme kanserindeki artış L-Ferritinde görülmektedir. Serum Ferritin L alt ünitesindeki artış biyolojik olarak önemli olabilir çünkü H ve L alt ünitelerinin reseptörleri farklıdır (Fisher vd. 2007; Li vd. 2009).

Serum ferritinin birçok yönü belirsizliğini korusa da kanıtlar demir iletiminde, anjiyogeneze, inflamasyonda, bağışıklıkta ve kanserde rol oynayabileceğini göstermiştir. Serum ferritini hasarlı hücrelerden sızan bir ürün olarak düşünülebilir ve serum ve dokudaki demir yüklü ferritin hücreler için toksik olabileceğinden uygun şekilde uzaklaştırılması gerekir. Bununla birlikte, ferritin'in uzaklaştırılmasındaki doğal mekanizma belirsizliğini korumaktadır (Coffman vd. 2008; Bresgen vd. 2010; Wang vd. 2010; Kurz vd. 2011; Kell ve Pretorius 2014).

L-Ferritin için şimdilik tanımlanmış tek reseptör SCARA5'tir. Tümör dokularındaki ekspresyonu tam olarak çalışılmamış olsa da özellikle meme ve hepatoselüler karsinoma hücrelerinde SCARA5 ekspresyonunun prognozla korale şekilde arttığı bilinmektedir (Huang vd. 2010b; Miller vd. 2011). Ayrıca, SCARA5'in ERK1/2, STAT3 ve AKT sinyal yollarını inaktive ederek meme kanseri hücrelerinin progresyon ve metastazında rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır (You vd. 2017).

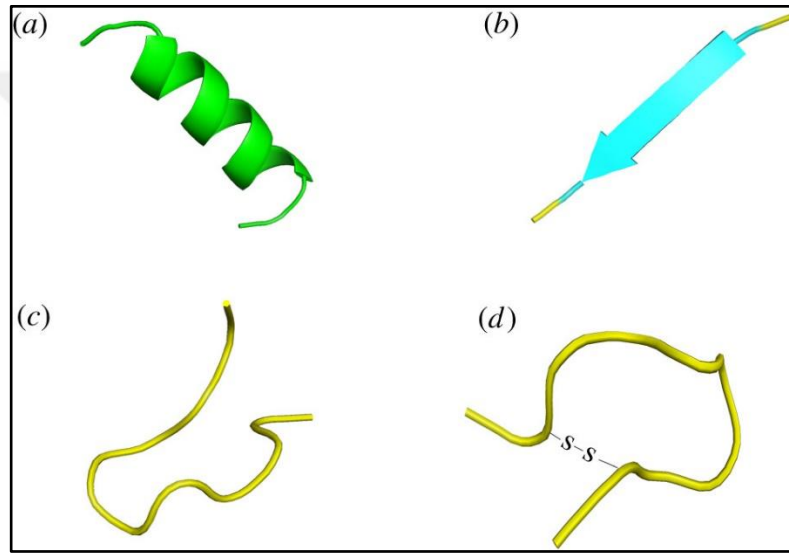
Tüm bu literatür taramaları neticesinde terapötik ilaçlar kullanılarak tedavi uygulanan kanserde direnç gelişebilmektedir. Kanser hücrelerine karşı en yeni tedavi stratejilerinden birisi anti kanser peptidlerdir. Kanser hücreleri için seçici ve toksik olan bu peptidler SCARA5 gibi yeni tanımlanan protein aileleri ve onların ferritin gibi ligandları ile olan etkileşimini inhibe ederek kanser tedavisinde yeni keşifler sağlama potansiyeli sunmaktadır.

2.24. Anti Kanser Peptitler

Moleküler biyolojinin gelişmesiyle birlikte, çok çeşitli organizmalarda çok sayıda kısa peptidin var olduğu bulunmuştur (Li vd. 2014). Bu peptitler bakterileri, mantarları ve tümör hücrelerini öldürebilir ve hatta bağışıklık sistemini düzenleyebilir. Yapısal ve işlevsel verilerin birikimi, anti-kanser peptitleri (AKP'ler) olarak sınıflandırılan anti-tümör aktivitesine sahip katyonik düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Qiao vd. 2019). Aslında, çeşitli organizmalardan izole edilen katyonik peptitler tarihsel olarak antimikrobiyal aktiviteler açısından değerlendirilmiş ve 1985 yılında ilk kez güçlü anti-kanser ajanları olarak tanımlanmadan önce bu şekilde çalışılmıştır (Sheu vd. 1985). Benzersiz etki mekanizmaları nedeniyle AKP'ler, tümör

hücresi proliferasyonunu, migrasyonunu ve tümör anjiyogenezini daha iyi inhibe edebilen geleneksel kemoterapiye göre birçok avantaja sahiptir (Hilchie vd. 2019). Olgun katı faz sentez teknolojisine sahip olan AKP'lerin üretim maliyeti düşüktür ve modifiye edilmeleri kolaydır. Nispeten yüksek doku penetrasyonu ve düşük ilaç direnci oluşumu özellikleriyle birleştiğinde, AKP'lerin klinik uygulama beklentisi umut vericidir. ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri Klinik Araştırmalar veri tabanında 'anti-kanser peptidleri' ifadesi kullanılarak yapılan bir araştırmada, farklı kanser türlerini hedef alan 1002 peptid bazlı klinik çalışma bulunmuştur (Pan vd. 2020).

AKP'lerin aktivitesi büyük ölçüde amino asitlerinin türüne, sayısına ve yapısına bağlı olduğundan, yapısal sınıflandırma günümüzde en yaygın sınıflandırma yöntemidir (Li vd. 2012). Bu sınıflandırmaya göre, AKP'ler dört kategoriye ayrılabilir: α -helikal, β -kırmalı tabaka, rastgele ilmek ve siklik (Meng ve Wang 2011) (Şekil 2.41).



Şekil 2.31. AKP'lerin yapısal sınıflandırmasının şematik diyagramı; **a)** α -helikal; **b)** β -kırmalı tabaka; **c)** rastgele ilmek; **d)** siklik (Xie vd. 2020)

α -helikal AKP'lerde peptit zinciri genellikle kısa uzunlukta ve basit yapıdadır. ACP'lerin en tipik yapı türüdür. β -kırmalı tabaka AKP'lerin çoğu iyi stabilizeye sahip iki veya daha fazla disülfid bağına sahiptir. Bu yapılar α -helikal AKP'lerden daha karmaşıktır. Rastgele sarmal ACP'ler genellikle prolin ve glisin bakımından zengindir ve tipik bir ikincil yapıdan yoksundur. Siklik AKP'ler baştan kuyruğa siklizasyon omurgasından veya sistin düğümleri oluşturan disülfid bağlarından oluşan kapalı peptitlerdir; doğrusal yapılardan daha kararlıdır (Marsh vd. 2007; Veldhuizen vd. 2014; Duan 2019).

Anti-kanser peptitler günümüzde küçük moleküller ve antikörlerle karşılaştırıldığında birçok özelliklerinden dolayı üstün terapötik yaklaşımlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu özellikler;

Boyutlarının küçük olması, kolay sentezlenebilir olmaları ve hücre membranlarından penetre olma yeteneklerinin fazla olmasıdır.

Yüksek aktiviteleri, afiniteleri vardır ve oldukça spesifiktirler. İlaç-ilaç etkileşimleri minimumdur.

Böbrek ve karaciğer gibi spesifik organlarda birikmezler bu da toksik etkilerini minimuma indirmektedir (Ali vd. 2013).

Hızlı sentezlenirler ve kolay modifiye edilirler (Boohaker vd. 2012).

Rekombinant antikor proteinlerle karşılaştırıldıklarında immümojeniteleri çok daha azdır (McGregor 2008).

Anti-kanser terapide önemli olan nokta, terapötiklerin farklı tipte kanser hücreleri üzerine etki gösterirken sağlıklı hücelere zarar vermemelidir. Anti-kanser peptitler ile hücre membran bileşenlerinin spesifik etkileşimi çoğunlukla elektrostatik bağlarla sağlanır (Jobin ve Alves 2014). Antikanser peptitler moleküler hedefli peptitler gibi de davranabilirler yani doğrudan kanser hücre membranına ya da organel membranlarına bağlanabilirler ya da antikanser ilaçlara bağlı peptitlere bağlanabilirler (Li vd. 2011; Peyressatre vd. 2015; Raucher ve Ryu 2015). Kanser hücresinde antikanser peptitler moleküler hedefli peptitler gibi özellikle alfa-heliks yapıdadırlar ve plazma membranına, nükleer membrana ve/veya mitokondri membranına penetre olarak farklı mekanizmalarla farmakolojik aktivite gösterirler (DNA sentezi inhibisyonu ya da hücre bölünmesinin durdurulması gibi) ve kanser hücresinde apoptozu tetiklerler (Horwitz 1994; Fuertes vd. 2003; Huang vd. 2017; Zhang vd. 2017). Ancak, bağlayıcı peptitler, antikanser peptidler ya da hücre-penetre edici peptitleri yönlendirebilirler. Bunların anti-kanser etkileri yoktur. Sadece kanser hücre membranını tanıyıp buraya penetre olabilirler. Bu nedenle bağlayıcı peptitler ilaç taşıyıcı sistemlerle birlikte de kullanılabilirler (Ramsey ve Flynn 2015).

Anti-kanser peptitler; peptitin yapısı, biyolojik aktivitesi, seçiciliği göz önüne alınarak oluşturulmalıdır (Gabernet vd. 2019; Singh vd. 2020). Bu peptitler fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılmaktadır;

1-Sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik aktiviteler yoluyla doğrudan kanser hücrelerine etki eden moleküler olarak hedeflenmiş peptitler

2-İlaçları kanser hücresi hedeflerine taşımak için kullanılan ilaç bağlama peptidleri olan "kılavuz füze" peptitleri veya bağlayıcı peptitler

3- İmmünomodülatör aktiviteler ve hormon reseptörleri gibi diğer uyarıcı hücreleri kanser hücrelerini öldürmek için dolaylı olarak etkileyen hücre uyarıcı peptidler (Levely vd. 1990; Böhmová vd. 2018; Ray vd. 2018)

Kanser hücresi hedeflerine özgü moleküler olarak hedeflenen peptitler, karsinogenez veya proliferasyonun önemli bir aşamasında kanser hücrelerine nüfuz edebilir, bağlanabilir ve ardından bunları inhibe edebilir veya öldürebilir (Asao vd. 2019). Tez çalışmamızda tasarlamış olduğumuz ve hücreler üzerindeki etkinliğini araştırdığımız ScaLFe (1-7) sentetik peptitler fonksiyonları bakımından yukarıda belirtilen gruplardan moleküler hedefli peptidler grubuna girmektedir.

Moleküler hedefli peptitler, spesifik olarak kanser hücrelerini hedef alırlar hücreye penetre olurlar, bağlanırlar ve karsinogenez ya da proliferasyonun önemli bir basamağında bulunan kanser hücrelerini ya inhibe ederler yada öldürürler (Asao vd. 2019). Peptitler, amino asit kompozisyonları, sekans uzunlukları, izoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları, net yükleri, hidrofobiklik, amfifilik, sekonder yapı ve yapısal yönelimleri gibi özelliklerine bağlı olarak, hücre proliferasyonunu inhibe etmek veya kanser hücrelerini tamamen ortadan kaldırmak için moleküler hedefli ilaçlar olarak da kullanılabilir (Roudi vd. 2017). AKP'lerin içerdiği aminoasitlerin kanser hücreleri üzerindeki rolleri şu şekilde sıralanabilir: (Çizelge 2.5). (Chiangjong vd. 2020).

Çizelge 2.5. Amino asit rezidülerinin kanser hücrelerindeki AKP etkileri üzerindeki rolü

Aminoasitler	Aminoasidin özelliği	Kanser hücresi üzerindeki etkisi
Lizin	Pozitif yüklü	Hücre membran bütünlüğünü bozar. Hücre membranına penetre olur. Kanser hücresinde sitotoksiteye neden olur (Dai vd. 2017).
Arjinin	Bazik	Hücre membran bütünlüğünü bozar. Hücre membranına penetre olur. Kanser hücresinde sitotoksiteye neden olur (Dai vd. 2017).
Histidin	Polar, hidrofilik	Asidik koşullarda membran permabilitesini değiştirerek sitotoksiteyi artırır (Midoux vd. 1998; Navarro vd. 2008).
Glutamik asit	Negatif yüklü	Tümör hücresinde anti-proliferatif etki gösterirler (Yamaguchi vd. 2016).
Aspartik asit	Polar, hidrofobik	Tümör hücresinde anti-proliferatif etki gösterirler (Yamaguchi vd. 2016).
Sistein	Polar, yüksüz	Hücre yüzey reseptörlerinin çoğunda bulunur ekstraselüler motif ya da domain'in stabilizasyonunda rol oynar (Oancea vd. 1998).
Prolin	Non-polar, alifatik	Membran etkileşimi ve konformasyonel esneklikte rolü var sitotoksik aktiviteyi artırabilir (Shamova vd. 2009; Ahmaditaba vd. 2018).
Glisin	Asidik	Membran etkileşimi ve konformasyonel esneklik (Shamova vd. 2009).

(Devamı Arkada)

Çizelge 2.5'in devamı

Fenilalanin	Aromatik	Hedef kanser hücre membranına afiniteyi artırır. Sitotoksik aktiviteyi artırabilir (Chiangjong vd. 2020)
Metiyonin	Polar, yüksüz	Redüklenmiş metiyonin kanser hücre proliferasyonunu durdurabilir (Ahmaditaba vd. 2018).
Tirozin	Aromatik	Sitotoksisiteyi artırabilir (Marchand vd. 2006)
Triptofan	Aromatik	DNA majör groove'a bağlanma (Harris vd. 2013).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. *In silico* Yöntemler

SCARA5'in SRCR bölgesinin üç boyutlu yapısının hesaplamalı yapısal modellenmesi, SRCR-L-ferritin etkileşiminin belirlenmesi ve bu etkileşimi bloke edecek peptit tasarlanması adımlarını içermektedir.

3.1.1. Aminoasit dizisi

İnsan SCARA5 proteini 495 aminoasitten oluşan transmembran bir proteindir. İnsan SCARA5'in aminoasit dizisi UniProt veritabanından elde edilmiştir (SCARA5 Uniprot ID: Q6ZMJ2). Ligand bağlama bölgesi olan SRCR bölgesi ise 393-493 aminoasitlik kısmı kapsamaktadır (UniProt 2023).

3.1.2. İki boyutlu sekonder yapının tahmini

SRCR alanının ikincil yapısı PsiPred ile tahmin edilmiştir. SRCR alanının topolojisi TMHMM ver. 2.0 ve/veya PROTTER ile tahmin edilmiştir (Krogh vd. 2001; Omasits vd. 2014; Buchan ve Jones 2019).

3.1.3. SRCR bölgesinin hesaplamalı yapısal modellenmesi

SRCR domain bölgesinin üç boyutlu yapısının tahmini için altı farklı modelleme aracı serveri kullanılmıştır. Bunlar I-Tasser, MODELLER, RaptorX, Phyre2, Robetta comperative modelling ve Robetta ab initio'dur.

I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement), protein yapısı tahmini ve yapı bazlı fonksiyon doğrulamasını temel alan hiyerarşik bir yaklaşımdır. İlk olarak, yinelemeli şablon tabanlı fragment birleştirme simülasyonları ile oluşturulan tam uzunlukta atomik modellerle, çoklu yaklaşım modeline esasen LOMETS ile PDB'den yapısal şablonları tanımlar. *I-TASSER* ('Zhang-Sunucusu' olarak) yakın zamanda CASP (Protein Yapısı Tahmininin Kritik Değerlendirmesi Programı) CASP7, CASP8, CASP9, CASP10, CASP11, CASP12, CASP13 ve CASP14 deneylerinde protein yapısı tahmini için 1 numaralı sunucu olarak seçilmiştir. Ayrıca, CASP9'da işlev tahmini için en iyi server seçilmiştir (Yang vd. 2015).

RaptorX, birincil diziden veya çoklu dizi hizalamasından ultra derin konvolüsyon (evrişimli) sinir ağını kullanarak bir proteinin üçüncül yapı özelliklerini, temas ve mesafe matrisini, rezidüler arası yönelimini tahmin etmektedir (Källberg vd. 2012).

*Phyre*², yapısı belirlenmek istenen protein için öncelikle homoloji gösteren yapıları tarar. PsiPred kullanarak ikincil yapıyı tahmin eder. Hem dizinin hizalanması hem de şablon dizinin bir araya getirilmesi için Markov modelini kullanır ve omurga modeli oluşturur. Diğer aşamada loop döngü yeniden düzenlenir ve yan zincirler eklenerek son model ortaya çıkarılır (Kelley vd. 2015).

Robetta comperative modelling, özellikleri arasında nispeten hızlı ve doğru bir derin öğrenme tabanlı yöntem, TrRosetta ve homoloji modellenmesi, kısıtlamalar, yerel fragmentler ve özel sıra hizalamalarına olanak tanıyan etkileşimli bir gönderim arayüzü

yer almaktadır. Karşılaştırmalı modellemeyi kullanarak çok zincirli kompleksleri modelleyebilir ve büyük ölçekli örnekleme seçeneği sunar. Haftalık olarak güncellenen PDB100 şablon veritabanı ile birlikte evrim tabanlı bir model veritabanını (MDB) da kullanmaktadır (Song vd. 2013).

Robetta ab initio, yine Robetta server'ı içinde bulunan özel bir seçenektir. BLAST, PSI-BLAST, FFAS03 veya 3D-Jury kullanarak yapısı bilinen bir protein ile güvenilir bir eşleşme bulunursa, karşılaştırmalı modelleme için bu yapısı bilinen proteini bir şablon olarak kullanır. Eşleşme bulunmazsa, de novo Rosetta fragment ekleme yöntemi kullanılarak yapı tahminleri yapılır. NMR kısıtlama verileri için de ayrıca RosettaNMR kullanılarak proteinin de novo yapısının belirlenmesi için kullanılmaktadır (Song vd. 2013).

MODELLER, üç boyutlu protein yapılarının homolojisi veya karşılaştırmalı modellemesi için kullanılır ve tüm hidrojen olmayan atomları içeren bir modeli otomatik olarak hesaplar. *MODELLER*, uzaysal kısıtlamaların giderilmesi nedeni ile karşılaştırmalı protein yapısı modellemesini uygular ve protein yapılarında döngülerin de novo modellemesi de dahil olmak üzere, çeşitli protein yapısı modellerinin optimizasyonu gibi birçok ek görevi gerçekleştirmektedir (Webb ve Sali 2016).

3.1.4. Global model iyileştirme ve enerji minimizasyonu

Elde edilen altı farklı protein modellerinin karşılaştırılması ve en doğru katlanma konformasyonunun belirlenmesi için ModRefiner server'ı kullanılmıştır. ModRefiner, C-alfa, ana zincir modelinden veya tam atom modelinden başlayabilen, atom düzeyinde, yüksek çözünürlüklü protein yapısı iyileştirmesi için kullanılan bir algoritmadır. ModRefiner, iyileştirme simülasyonlarının yönlendirildiği bir referans olarak kullanılacak ikinci bir yapının atanmasına izin verme seçeneğine sahiptir. ModRefiner'in bir diğer amacı da, hidrojen bağları, omurga topolojisi ve yan zincir konumlandırma açısından ilk başlangıç modellerini doğal durumlarına yaklaştırmaktır. Aynı zamanda lokal yapıların fiziksel kalitesinde önemli gelişme sağlamaktadır (Xu ve Zhang 2011).

3.1.5. Model validasyonu

Her bir model ModRefiner kullanılarak rafine edilmiştir ve rafine edilen bu modeller validasyon testine tabi tutulmuştur. Bu validasyon testleri VERIFY, ERRAT, PROVE, PROCHECK WHATCHECK'tir.

VERIFY, Bir protein yapısının üç boyutlu profili, 3 boyutlu yapı modelinin herhangi bir amino asit dizisiyle uyumluluğunu puanlamak için kullanılabilen, yapının atomik koordinatlarından hesaplanan bir tablodur. Doğru protein yapılarından hesaplanan üç boyutlu profiller, yüksek puanlarla kendi dizileriyle eşleşmektedir (Bowie vd. 1991; Lüthy vd. 1992).

ERRAT, karakteristik atomik etkileşime dayalı olarak protein yapılarının doğru ve yanlış belirlenmiş bölgelerini ayırt etmek için kullanılan bir yöntemdir. Proteinler içinde farklı atom türleri birbirine göre rastgele dağılmıştır. Model oluşturmadaki hatalar, farklı atom türlerinin daha rastgele dağılımlarına yol açar ve bu durum istatistiksel yöntemlerle doğru dağılımlardan ayırt edilebilir. Atomlar üç kategoridedir: karbon (C), nitrojen (N)

ve oksijen (O). Bu durum, ikili kovalent olmayan bağlı etkileşimlerin altı farklı kombinasyonuna (CC, CN, CO, NN, NO ve OO) yol açmaktadır (Colovos ve Yeates 1993).

PROVE, standart atom ve rezidü hacim aralıkları, klasik Voronoi prosedürü kullanılarak 64 yüksek düzeyde çözülmüş ve iyi rafine edilmiş protein kristal yapısı kullanılarak hesaplanır. Atomik hacimlerin standart değerlerden sapmaları, hacim Z skorları olarak değerlendirilir ve protein kristal yapılarının kalitesini değerlendirmek için kullanılır. Tek tek atomların mutlak Z-skorları, bir protein modeli içindeki belirli bölgelerdeki problemleri tanımlamak için kullanılır. Bu Z-puanları, atomik B-faktörleri ile oldukça ilişkilidir. Böylece, kristalografik iyileştirme ile doğrudan sınırlandırılmayan atom hacimleri, protein yapısının kalitesinden bağımsız, oldukça hassas bir şekilde ölçülebilmektedir (Pontius vd. 1996).

PROCHECK'in amacı, belirli bir protein yapısındaki rezidülerin geometrisinin, iyi rafine edilmiş, yüksek çözünürlüklü yapılardan türetilen stereokimyasal parametrelerle karşılaştırıldığında ne kadar normal veya bunun tersine ne kadar olağandışı olduğunu değerlendirmektir. *PROCHECK* tarafından vurgulanan olağandışı bölgeler, mutlaka hatalı anlamına gelmemektedir. Bu bölgelerde makul bir açıklaması olan alışılmadık özellikler olabilir (örneğin, proteinin aktif bölgesindeki ligand bağlanmasına bağlı bozulmalar) (Laskowski vd. 1993).

WHATCHECK, protein yapısının simetrisini, Ramachandran grafiğini, bağ açıları ve uzunlukları gibi geometrik özelliklerini değerlendiren bir algoritmadır (Hooft vd. 1996).

Bu yaklaşımların yanı sıra elde edilen 6 protein modelinin kalitelerini değerlendirmek için ayrıca *SWISS-MODEL*'in yapı değerlendirme modülü kullanılmış ve modeller bu program kullanılarak da ayrıca değerlendirilmiştir. *QMEAN* sunucusu, protein yapı modellerinin kalite tahmini için bir dizi modeli sıralamaya ve bunlar içindeki potansiyel olarak güvenilir bölgeleri belirlemeye olanak tanıyan üç puanlama işlevine erişim sağlar.

QMEANDisCo, tek bir model temelinde hem global (yani tüm yapı için) hem de yerel (yani rezidü başına) mutlak kalite tahminleri türetebilen bileşik bir puanlama fonksiyonudur. Temel olarak *QMEAN*'ın tek terimlerini kullanır. Ana geliştirme, değerlendirilen modele homolog yapılardan çıkarılan mesafe kısıtlamaları toplulukları (*DisCo*) ile çift rezidü-rezidü mesafelerinin uyumunu değerlendirerek yerel rezidü başına kalite tahminlerini öngören yeni bir terimdir. *QMEANDisCo* global skoru, ortalama rezidü başına skordur ve sağlanan hata tahmini, geniş bir model seti için tahmin edilen global *QMEANDisCo* skorlarına dayanır ve *QMEANDisCo* global skoru ile *IDDT* (temel gerçek) arasındaki kök ortalama kare farkını (yani standart sapma) temsil eder. Tahminin güvenilirliği büyük ölçüde model boyutuna bağlı olduğundan, sağlanan hata tahmini, girdiye benzer boyuttaki modellere dayalı olarak hesaplanır (Studer vd. 2019).

QMEAN, tek bir model temelinde hem global (yani tüm yapı için) hem de yerel (yani rezidü başına) mutlak kalite tahminleri türetebilen bileşik bir puanlama fonksiyonudur. *QMEAN4* ve *QMEAN6* olmak üzere iki global skor değeri vardır. *QMEAN4*, dört istatistiksel potansiyel teriminin doğrusal bir kombinasyonudur.

QMEAN6 ek olarak yapısal özelliklerin sekans bazlı tahminlerle tutarlılığını değerlendiren iki uyum terimi kullanır. Her iki global skor da başlangıçta [0,1] aralığındadır. Varsayılan olarak, yüksek çözünürlüklü X-ışını yapılarından beklediğimiz şeyle ilişkilendirmek için Z puanlarına dönüştürülürler. Sonuç sayfalarında da bu şekilde görüntülenir. Yerel skorlar, 4 istatistiksel potansiyel teriminin yanı sıra kalıntı bazında değerlendirilen anlaşma terimlerinin doğrusal bir kombinasyonudur. Bunlar da [0,1] aralığındadır (Benkert vd. 2010).

3.1.6. Post-translasyonel bölgelerin *in silico* tahmini

Fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi post-translasyonel bölgelerin tahmini için PhosphoSitePlus ve N-glikozilasyon bölgelerinin tahmini için NetNGlyc 1.0 sunucusu kullanılmıştır (Gupta ve Brunak 2002; Hornbeck vd. 2015).

3.1.7. Farklı SRCR domainlerinin moleküler dinamik simülasyon çalışmaları

Farklı sunuculardan elde edilen protein yapılarının dinamik bir ortamda stabil olup olmadığını test etmek için 300 K'de 100 ns'lik bir sürede grup NPT (Madde miktar: N, Basınç: P, Sıcaklık: T) sistemi içinde moleküler dinamik simülasyonlar test edilmiştir. Protein modelleri Protein Hazırlama Modülü kullanılarak hazırlanmıştır. Protein modeli hazırlığı, nötr pH 7.0 ile protein modeline eklenen hidrojen atom bağları atanarak yapılır. TIP3P olarak isimlendirilen su çözücü atomları, periyodik sınır koşullarında oktahedron geometrisinde simülasyon kutusuna ilave edildi ve şekil-boyut, 10.0 tamponlu mesafeye ayarlandı. Simülasyon sistemini elektriksel olarak nötralize etmek, kutu yükünü stabilize etmek için Na⁺ / Cl⁻ iyonları eklendi ve solventli sisteme rastgele yerleştirildi.

Simülasyon sistemi, aşağıdaki kademeli relaksasyon protokolü kullanılarak çözünen ağır atomlar üzerinde kısıtlamalarla ve kısıtlamalar olmadan güvenli bir şekilde başlamıştır: 10 K'de NVT grubunda 12 ps Brownian dinamiği, Berendsen termostadı kullanımı ve kısıtlamalarla 1 fs zaman adımı; NPT grubunda 12 ps Langevin dinamiği, üç yüz ok ve 1 atm'de Berendsen termostadı ve barostat kullanımını kısıtlamalarla ve 24 ps kısıtlamalar olmadan zorlar. Gerçek üretim simülasyonları, 2 fs zaman adımıyla 100 ns için bir NPT grubunda yürütülmüştür. Sıcaklık, Nosé-Hoover zincir termostadı ile 300 K'de ve Martyna-Tobias-Klein barostadı ile 1.01325 bar'da gerinim, sırasıyla bir ps ve 2 ps'lik izotropik bağlantı ve dinlenme süresinin kullanımı ile değiştirildi. Hızlı çeşitlilikteki Coulombik etkileşimlerle başa çıkmak için 9.0 Å'luk bir yarıçap azalması kullanılırken, Coulomb kapasitesinin u serisi ayrışması uzun menzilli elektrostatik etkileşimler için kullanıldı. Simülasyon yörüngeleri, Maestro'nun dahili Simülasyon Etkileşimleri Diyagramı aracı kullanılarak analiz edilmiş ve ardından oluşturulan etkileşim analizi istatistikleri, analize yardımcı olacak açıklayıcı grafikleri bir araya getirmek için Microsoft Excel360 ile işlenmiştir (Nosé 1984; Martyna vd. 1994; Nosé 2002; Bowers vd. 2006; Madhavi Sastry vd. 2013; Predescu vd. 2020).

3.1.8. Modellenmiş SRCR domain'inin deneysel yapı ile karşılaştırılması

Modelleme çalışmaları sırasında, insan SCARA5 SRCR domaininin kristal yapısı yayınlandı ve böylece modellerimizi ve ayrıca yeni AlphaFold modeli (AF-Q15392-F1-model_v3) karşılaştırıldı. UCSF ChimeraX MatchMaker aracı ile protein yapıları yapısal olarak hizalandı ve SRCR yapılarının Cα atomları arasındaki kök ortalama kare sapmasını

(RMSD) hesaplandı. Ayrıca deneysel olarak doğrulanmış üç disülfid bağının doğruluğuna ve Ca^{2+} koordine edici rezidülerine uygun rotamerlerine de dikkat edilmiştir (Jumper vd. 2021; Pettersen vd. 2021; Varadi vd. 2022).

3.1.9. Protein-protein docking yöntemi ile SRCR domaini ve L-Ferritin arasındaki etkileşimin belirlenmesi

3.1.9.1. L-Ferritin'in aminoasit dizisi ve üç boyutlu yapısına erişim sağlama

SCARA5'in bilinen doğal ligandı olan L-Ferritin'in aminoasit dizisi UniProt veri tabanından elde edilmiştir (L-Ferritin Uniprot ID: P02792). UniProt veri tabanında, L-Ferritin 175 aminoasitten oluştuğu bildirilmiştir. 2. aminoasit rezidüsü N-asetilserin şeklinde modifiye edilmiştir. Moleküler docking çalışmalarında kullanılmak üzere PDB kodu 2FFX olan üç boyutlu yapı seçilmiştir. Protein Data Bank'ta depolanan yapı insan L-Ferritin'in yapısıdır. X-ışını yöntemi ile 1.90 Å çözünürlükte üç boyutlu yapısı ortaya çıkarılmıştır (Wang vd. 2006; Wang vd. 2011; UniProt 2023).

3.1.9.2. SRCR domain'in ve L-Ferritin'in potansiyel bağlanma bölgelerinin karakterizasyonu

Kalite değerlendirmesinden en iyi sonuçları alan en kararlı model daha sonra SRCR-L-ferritin kompleksini modellemek için kullanıldı. Potansiyel bağlanma arayüzlerini karakterize etmek için, etkileşime giren proteinler için moleküler elektrostatik potansiyel haritalarını hesaplamak amacıyla PyMOL'deki (Schrödinger) APBS modülü kullanıldı.

APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver; Uyarlanabilir Poisson-Boltzmann Çözücü), büyük biyomoleküler bileşenler için sürekli elektrostatik denklemlerini çözen bir yazılımdır. Böylece protein yüzeyindeki yük (+, - veya nötr) belirlenebilir.

SRCR bölgesinin potansiyel bağlanma arayüzlerinin tespiti üç basamakta gerçekleştirilmiştir:

a. Molekölün hazırlanması: pdb2pqr yöntemi ile, hidrojenler ve eksik yan zincir atomları eklendi kısmi yükler ve yarıçaplar atandı. Ligandları ve modifiye rezidüleri kaldırıldı.

b. Elektrostatik haritanın APBS ile hesaplanması: Bu bölümde iki seçenek mevcuttur.

b1. Focus Selection: Burada isteğe bağlı olarak proteinin bağlayıcı bölgesi hakkında bilgi sahibi iseniz "focus selection" değeri girilebilir.

b2. Grid aralığı (Angstrom): Hesaplamayı hızlandırmak ve bellek kullanımını azaltmak için artırılabilir. Daha yüksek bir harita çözünürlüğü elde etmek için azaltılması gerekir. Tez çalışmasında PyMOL yazılımında bu değer 0.50 olarak belirlenmiştir.

c. Moleküler yüzey görselleştirme: Hesaplanan elektrostatik potansiyel haritası görselleştirildi. (Jurrus vd. 2018).

3.1.9.3. SRCR/L-Ferritin protein-protein docking çalışması

SRCR modeli ve L-ferritin docking çalışmasından önce proteinler, Maestro'nun Protein Hazırlama Sihirbazı ile optimize edilmiştir: eksik hidrojen atomları eklenmiş ve hidrojen bağı ağı pH 7.0'da PROPKA ile optimize edilmiştir. Proteinler, OPLS3e kuvvet alanı kullanılarak, tüm ağır atomlar için RMSD 0.3 Å yakınsama standartları ile elektrik yük minimize edilmiştir (Olsson vd. 2011; Søndergaard vd. 2011; Madhavi Sastry vd. 2013).

SRCR domaini ile L-Ferritin arasındaki olası bağlanma bölgesini tahmin etmek için HADDOCK kullanılmıştır. HADDOCK (High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing; Yüksek Belirsizlik Güdümlü protein-protein DOCKing), biyomoleküler komplekslerin modellenmesi için bilgi odaklı esnek bir yerleştirme yaklaşımıdır. HADDOCK, kenetlenme sürecini yürütmek için belirsiz etkileşim kısıtlamalarında (ambiguous interaction restraints: AIR'ler) tanımlanan veya tahmin edilen protein arabirimlerinden gelen bilgileri kodlamasıyla ab-initio yerleştirme yöntemlerinden ayrılır. Belirsiz etkileşim kısıtlamaları, moleküller arası etkileşimde yer alan rezidülerle ilgili mevcut her türlü deneysel bilgiden türetilir. HADDOCK, protein-protein, protein-nükleik asitler ve protein-ligand kompleksleri dahil olmak üzere geniş bir modelleme problemleri sınıfıyla başa çıkabilir. Örnekleme, puanlamayı veya her ikisini de geliştirmek için biyokimyasal, biyofiziksel veya biyoinformatik yöntemlerden elde edilen bilgileri entegre eden HADDOCK gibi veri odaklı yaklaşımlar, dikkate değer ölçüde daha iyi performans gösterir.

HADDOCK ile protein protein etkileşim ara yüzünü tahmin etmek için;

Birinci ve ikinci proteinlerin PDB kodlarını ya da indirilen üç boyutlu yapıları sisteme girilir. Protein protein etkileşiminin HADDOCK aracılığı ile çalışması için her bir proteinin aktif rezidülerinin tespit edilmesi gerekir. Bunun için yine HADDOCK içerisinde geliştirilen CPORT(Consensus Prediction Of interface Residues in Transient complexes; Geçici Komplekslerdeki Arayüz Rezidülerinin Konsensüs Tahmini) algoritması proteinlerin aktif rezidülerinin tespit edilmesi için kullanılmıştır. Deneysel bilginin sınırlı olduğu durumlar için, bu tahmine dayalı yerleştirme protokolü, herhangi bir bilgi kullanılmadan komplekslerin yerleştirilmesi olan ab initio yerleştirmeye bir alternatif sunmaktadır.

SRCR modeli reseptör, L-ferritin ligand olarak belirlendi. Proteinlerin aktif rezidüleri sisteme girildi (Şekil 3.1). Docking parametreleri olarak ise:

Mesafe kısıtlamaları otomatik olarak seçildi. Rijit cisim kenetlemesi için yapı sayısı 1000 ve rijit cisim minimizasyonu için deneme sayısı 5 olarak seçilmiştir. Son düzeltme için yapı sayısı ve analiz edilecek yapı sayısı 200 olarak seçilmiştir. Kümeleme yöntemi olarak Fraction of Common Contacts (FCC) seçildi ve kümeleme için FCC Cutoff 0.60 değeri girildi. Minimum küme büyüklüğü 4 olarak kabul edilmiştir. Enerji, başlangıç elemanlarının rastgele seçimi ve çeşitli işlem aşamalarının sıcaklık-zaman adımları otomatik olarak seçilmiştir (de Vries vd. 2010; de Vries ve Bonvin 2011).

Şekil 3.1. HADDOCK sunucu görünümü (de Vries vd. 2010)

Veriler sisteme yüklendikten sonra docking çalışması için gönderildi ve sonuçlar görselleştirilerek analiz edildi. Sonuçlar Maestro programı ile analiz edilip görselleştirilmiştir.

3.1.9.4. SRCR domain için tespit edilen bağlanma bölgelerine özgü peptidlerin tasarlanması ve moleküler docking çalışmaları

SRCR/L-ferritin arasındaki etkileşimin protein-protein docking sonuçlarına göre; SRCR domaini/L- ferritin etkileşim bölgesinde yer alan aminoasit rezidüleri ilaç dizaynı için hedef bölgeler olarak belirlenmiştir. SRCR/L-ferritin etkileşimini inhibe etmeye yönelik tasarlanan 10 peptid diziliminden en iyi bağlanma enerjisine sahip olanı seçilerek tez çalışmasına devam edilmiştir.

Tasarlanan peptidler ve SRCR domaini arasındaki etkileşimi belirlemek için Schrödinger yazılımındaki Glide modülü kullanılmıştır.

Glide, milyonlarca bileşik kitaplığını verimli bir şekilde zenginleştirmek için HTVS (yüksek verimli sanal tarama) modundan, on ila yüz binlerce ligandın güvenilir bir şekilde kenetlenmesi için SP (standart hassasiyet) moduna kadar, hıza karşı doğruluk seçeneklerinin tamamını kullanıma sunan bir modüldür. Yanlış pozitiflerin daha fazla ortadan kaldırıldığı XP (ekstra hassasiyet) modunda ise sonuçların doğruluğu, daha kapsamlı örnekleme ve gelişmiş puanlama ile elde edilir.

Her bir ligand için proteinin aktif bölgesi üzerinde olası konumları ve yönleri içeren kapsamlı bir araştırma yapılır. Arama, aktif alan bölgesini kapsayan eşit aralıklı 2 Å ızgara üzerinde "alan noktalarının" seçilmesiyle başlamaktadır.

Glide ile docking çalışması basamakları:

- Peptidin bağlanacağı bölgeye özgü aminoasit rezidülerinin bulunduğu alan docking için seçildi.
- Ligand olarak tasarlanan peptid, seçilerek protein-peptid docking hesaplamasına dahil edildi.
- Sonuçlar değerlendirildi.

Protein-ligand bağlanma afinitelerini doğru bir şekilde tahmin etme görevi, yerleştirme puanlama işlevlerinin yeteneklerinin ötesinde kalır. Bu nedenle, bağlı veya mutlak bağlanma afinitelerini tahmin etmek için GlideScore ile korelasyon dışındaki yaklaşımlar uygulanmalıdır (Friesner vd. 2006).

Bunun için Schrödinger yazılımında bulunan Prime modülü kullanılmıştır (Jacobson vd. 2004). Bu modül MM-GBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area; Moleküler Mekanik/Genelleştirilmiş Doğan Yüzey Alanı) yöntemini kullanır.

MM-GBSA yönteminin genel amacı, çoğunlukla iki çözünmüş molekülün bağlı ve bağlı olmayan durumunu temsil eden iki durum arasındaki serbest enerji farkını hesaplamak veya alternatif olarak aynı molekülün çözünmüş iki farklı konformasyonlarının serbest enerjisini karşılaştırmaktır.

Prime MM-GBSA, birçok enerji özelliği üretir. Bu özellikler, ligand, reseptör ve karmaşık yapılar için enerjilerin yanı sıra gerilim ve bağlanma ile ilgili enerji farklılıklarını bildirir.

Prime MM-GBSA'da yapılan beş temel enerji hesaplaması vardır: Optimize edilmiş serbest reseptör ("Reseptör")

Optimize edilmiş serbest ligand ("Ligand") Optimize edilmiş kompleks ("Kompleks") Küçültülmüş/optimize edilmiş kompleksten alıcı

Minimize edilmiş/optimize edilmiş kompleksten ligand

Bu enerjilerden aşağıdaki gerilme ve bağlanma enerjileri hesaplanır:

Rec Strain = Reseptör (optimize edilmiş kompleksten) - Reseptör Lig Gerilme = Ligand (optimize edilmiş kompleksten) – Ligand MMGBSA dG Bağlama = Kompleks – Reseptör – Ligand

MMGBSA dG Bağ(NS) = Kompleks – Reseptör (optimize edilmiş kompleksten) – Ligand (optimize edilmiş kompleksten) = MMGBSA dG Bağ – Rec Gerilme – Lig Gerilme

(NS", "gerilme yok" anlamına gelir; kompleksi oluşturmak için gerekli olan reseptör ve ligand konformasyonel değişiklikleri hesaba katmadan bağlanma/etkileşim enerjisidir).

3.1.9.5. Docking sonuçlarının moleküler dinamik simülasyonla değerlendirilmesi

3.1.7. aşamasında belirtildiği gibi moleküler dinamik simülasyon çalışmaları dizayn edilip çalışılmıştır. RMSD, RMSF, İkincil Yapı Eleman bilgileri grafiklendirilerek analiz edilmiştir (Bowers vd. 2006).

3.1.9.6. Peptidin farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerinin *in silico* tahmini

Bir ilaç olarak etkili olabilmesi için güçlü bir molekülün vücuttaki hedefine yeterli konsantrasyonda ulaşması ve beklenen biyolojik olayların gerçekleşmesi için yeterince uzun süre biyoaktif bir formda kalması gerekir. İlaç geliştirme, keşif sürecinin giderek daha erken aşamalarında, düşünülen bileşiklerin çok sayıda olduğu ancak fiziksel örneklerle erişimin sınırlı olduğu bir aşamada emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisitenin (ADMET) değerlendirilmesini içerir. Bu bağlamda, bilgisayar modelleri deneylere geçerli alternatifler oluşturmaktadır. BOILED-Egg, iLOGP ve Biyoyararlanım Radarı gibi yetkin yöntemlerin de bulunduğu fizikokimyasal özellikler, farmakokinetik, ilaca benzerlikte sağlam tahmin modellerinden olan SwissADME aracı peptidin farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerini tahmin etmek için kullanılmıştır.

Peptidin aminoasit rezidüleri ilgili alana girilip çalışma başlatılmıştır.

Çalışmanın sonucu elde edilen verilen farmakokinetik ve farmakolojik özellikler açısından değerlendirilmiştir (Daina vd. 2017).

3.2. *In vitro* Yöntemler

3.2.1. Hücreler ve kültür koşulları

In vitro deneylerde kullanılan hücre hattı insan meme kanseri hücre hattı MCF7 (ATCC HTB-22)'dir. Hücre adenokarsinom türünde epitel hücre morfolojisine sahiptir. Hücrelerin kültür ortamında büyüebilmesi için %10 Fetal Bovin Serum (FBS) ve % 2 L-glutamin takviyeli DMEM (ATCC Kat No: 30-2002) besiyerinde çoğaltılmıştır. Hücreler deney süresince %5 CO₂'li inkübatörde 37 °C'de inkübe edilmiştir.

Hücrelerin tripsinizasyonu için ATCC'nin önerdiği şekilde %0.25 tripsin, 0.53 mM EDTA karışımı kullanılmıştır. Hücrelerin pasajlanma oranı 1:3 veya 1:6 olarak belirlenmiştir. Hücreler %5 DMSO ile desteklenmiş tam besiyerinde (dondurma besiyeri) dondurularak geçici süre için -80°C dondurucuda uzun süreli dondurma için azot tankında saklanmıştır.

3.2.2. Besiyerlerinin hazırlanması

3.2.2.1. % 10 FBS içeren besiyeri hazırlanması

%10 FBS'li DMEM besiyeri için 500 ml'lik DMEM besiyeri içerisine 50 ml FBS, 5 ml esansiyel olmayan aminoasit karışımı, 2.5 ml sodyum privat ve 1 ml antibiyotik eklenerek iyice karıştırıldı. O günün tarihi atılarak +4°C'de saklandı.

3.2.2.2. % 1 FBS içeren besiyeri hazırlanması

%1 FBS'li DMEM besiyeri için 500 ml'lik DMEM besiyeri içerisine 5 ml FBS, 5 ml esansiyel olmayan aminoasit karışımı, 2.5 ml sodyum privat ve 1 ml antibiyotik eklenerek iyice karıştırıldı. O günün tarihi atılarak +4°C'de saklandı.

3.2.2.3. Dondurma besiyerinin hazırlanması

Dondurma besiyeri için 97.5 ml FBS ve 2.5 mL DMSO karıştırıldı ve o günün tarihi yazılarak +4°C'de saklandı.

3.2.3. Peptitin hazırlanması

Tasarlanan peptit %98.8 saflıkta, liyofilize ve suda çözünebilir olarak ürettirilmiştir. 10 mg'lık toz halinde üretilen peptit -20 °C'de muhafaza edilmiştir. 10 mg peptit içeren tüpe 2 ml ultra saf su eklenerek peptit çözündürüldü böyle ana stok konsantrasyonu 5mg/ml olarak belirlendi. Peptit saf su ile çözündükten sonra ise -80 °C'de saklanmıştır.

Peptid özgün bir tasarım olduğu için herhangi bir literatür çalışmasına konu olmamıştır. Ancak özgün peptid tasarımlarının MCF7 insan meme kanseri hücrelerini proliferasyonu üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar dikkate alınarak peptidin konsantrasyonları belirlenerek doz taraması yapılmıştır. Peptidin, besiyerindeki proteinlerle etkileşimini en aza indirebilmek için %1 serum içeren besi yerinde, en yüksek dozu 400 µg/ml olacak şekilde, her seferinde ½ kez seyreltme yapılarak seri dilüsyon halinde hazırlandı ve hemen hücrelere uygulandı. Buna göre konsantrasyonlar 400,-200,-100,-50, -25,-12.5,-6.25,-3.12,-1.56 ve -0.78 µg/ml olacak şekilde belirlendi.

3.2.4. Hücrelerin deneyler için bölünmesi

3.2.4.1. Hücrelerin tripsinizasyonu

Hücreler en az %70 doluluk oranına ulaştığında pasajlama işlemi için hazırlanır. Biyogüvenlik kabini içinde petri kaplarında bulunan besiyeri çekilerek atılır. %0,25 tripsin, 0,53 mM EDTA karışımından 2 ml eklenir ve inkübatörde 5-10 dk bekletilir. Mikroskopla hücrelerin kalktıkları kontrol edildikten sonra petri kaplarına %10 FBS'li besiyerinden eklendi. Hücreler bir falkon tüpe toplandıktan sonra 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım olan süpernatant kısmı atılarak altta kalan hücre peleti deneysel işlemler için kullanıldı.

3.2.4.2. Hücrelerin Proliferasyon Deneyleri için 96-Kuyucuklu Plakalara Bölünmesi

3.2.4.1'deki işlemlerde elde edilen hücre peletine 10 ml %10 FBS'li DMEM besiyeri eklenerek iyice karıştırıldı. Ependorf tüp içerisine 900 µl %10 FBS'li DMEM besiyeri ve 100 µl hücre örneğinden alınarak karıştırıldı ve böyle 10 kat sulandırılmış oldu. Bu hücre-besiyeri karışımı Thoma lamında sayıldı. Thoma lamında bulunan 4 adet 16 kareye düşen hücreler sayıldı ve ortalaması alındı. Ortalaması alınan bu sayı sulandırma katsayısı olan 10 ve 10⁴ ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı. Hücreler kuyucuk başına 5x10³ olacak şekilde bölündü.

3.2.4.3. Hücrelerin ELIZA ve western blotlama deneyleri için 6 ve 12 kuyucuklu plakalara bölünmesi

3.2.4.1'deki işlemlerde elde edilen hücre peletine 10 ml %10 FBS'li DMEM besiyeri eklenerek iyice karıştırıldı. Ependorf tüp içerisine 900 µl %10 FBS'li DMEM besiyeri ve 100 µl hücre örneğinden alınarak karıştırıldı ve böyle 10 kat sulandırılmış oldu. Bu hücre-besiyeri karışımı Thoma lamında sayıldı. Thoma lamında bulunan 4 adet 16 kareye düşen hücreler sayıldı ve ortalaması alındı. Ortalaması alınan bu sayı sulandırma katsayısı olan 10 ve 10^4 ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı. Hücreler ELISA testi için 12 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 10^5 western blotlama deneyi için 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 10^6 olacak şekilde bölündü.

3.2.5. Peptitin MCF7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi

3.2.5.1. Peptit uygulamaları

Peptit özgün bir tasarım olduğu için herhangi bir literatür çalışmasına konu olmamıştır. Ancak özgün peptid tasarımlarının MCF7 insan meme kanseri hücrelerini proliferasyonu üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar dikkate alınarak peptidin konsantrasyonları belirlenerek doz taraması yapılmıştır. Peptidin, besiyerindeki proteinlerle etkileşimini en aza indirebilmek için %1 FBS'li DMEM içeren besi yerinde, en yüksek dozu 400 µg/ml olacak şekilde, her seferinde ½ kez seyreltme yapılarak seri dilüsyon halinde hazırlandı ve hemen hücrelere uygulandı. Konsantrasyon hesaplamaları için $M1 \times V1 = M2 \times V2$ formülü uygulandı. M1: Peptitin ana stok konsantrasyonu, V1: Peptitin ana stoğundan alınacak hacim miktarı, M2: Peptitin istenilen konsantrasyonu, V2: Uygulanacak toplam peptit hacmi. Buna göre konsantrasyonlar 400 -200 -100 -50 -25 -12,5 -6,25 -3,12 -1,56 ve -0,78 µg/ml olacak şekilde belirlendi. Peptit kuyucuk başına 100µl olacak şekilde uygulandı.

3.2.5.2. WST-1 testi

Peptidin kanser hücrelerinin büyümesini üzerine etkisi olup olmadığı WST-1 kullanılarak belirlendi. WST-1'in yüksek oranda suda çözünen tetrazolyum tuzu, WST-1 5-(2,4-disülfenil)-2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu canlı hücrelerdeki dehidrogenaz aktiviteleriyle redüklenerek sarı renkli formazana dönüşür. Test sonucu ortaya çıkan renk yaşayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Tukler Henriksson vd. 2015).

İlaç uygulamasının hemen arkasından, başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek için başlangıç zamanı (Time Zero (T0)) okuması yapıldı. Bunun için T0 olarak belirlenen kuyucuklardaki besi yeri çekilerek yerine 90 µl serum içermeyen besi yeri koyuldu ve içerisine kit içerisindeki WST-1 solüsyonun'dan 10 µl eklendi. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda plakanın absorbands değerleri Eliza kit okuyucuda 450 nm'de okundu. Bu okumanın ardından hücreler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda inkübe edildi. Her bir inkübasyon süresi sonunda deneyler T0 okumasındaki gibi sonlandırıldı.

3.2.5.3. Sülforadamin B (SRB) testi ile sitotoksisite gösterilmesi

Tez çalışması kapsamında peptidin MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için WST-1 testine ek olarak SRB testi yapılması planlanmıştır. SRB testi, büyük ölçekli ilaç tarama uygulamaları için ilaca bağlı sitotoksisiteyi ve hücre proliferasyonunu ölçmek üzere geliştirilmiştir. Protein boyası SRB'nin çalışma prensibi, trikloroasetik asitle (TCA) sabitlenmiş hücrelerin proteinlerindeki bazik amino asit rezidülerine SRB'nin elektrostatik etkileşimlere ve pH'a bağlı olarak bağlanma kapasitesine dayanır. SRB testinin etkinliği, sıklıkla tetrazolyum boya 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) kullanan başka bir yöntemle karşılaştırılır. MTT, renksiz tetrazolyumu mor renkli formazan boya'ya dönüştürmek için hücresel metabolik aktivite gerektirir; bu nedenle, yalnızca canlı hücreleri saptar, oysa SRB yöntemi canlı ve ölü hücreler arasında ayrım yapmaz. Ancak bu fark, SRB testinin bir ilacın sitotoksik etkilerini tespit etme kabiliyetini tehlikeye atmaz.

SRB toz halinde 5 gr'lık şişe de temin edilmiştir. 96 kuyucuklu plakalara MCF7 hücreleri bölündükten sonraki gün peptit uygulamaları yapılarak 24,48 ve 72. saat aralıklarla inkübasyona bırakılmıştır.

Buna göre;

1. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölündü.
2. Bir gece inkübasyonun ardından hazırlanan peptid dozlara hücrelere uygulandı ve 24,48,72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda SRB testi protokolü uygulandı.
3. Kuyucuklardaki besiyerleri atılmadan kontrol ve deney gruplarındaki tüm kuyucuklara 100 µl soğuk %10'luk TCA eklendi. Plaka +4°C'de 1 saat süreyle fiksasyona bırakıldı.
4. Fiksasyonun ardından kuyucukla dört defa yavaş bir şekilde çeşme suyu ile yıkandı ve gece boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
5. Kurumanın ardından kuyucuklara 1 mg/ml SRB solüsyonu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. Boyanmanın ardından kuyucuklar dört defa %1'lik asetik asit ile yıkandı ve gece boyu oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
7. Kuruma sonrası her bir kuyucuğa 200 µl 10mM Tris solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında SRB boyasının solubilize olması sağlandı.
8. Daha sonra plaka 510 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okunarak sonuçlar analiz edildi (Vichai ve Kirtikara 2006).

3.2.6. Peptitin MCF7 hücrelerindeki Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 protein miktarlarındaki değişimin ELISA testi ile gösterilmesi

3.2.6.1. Peptit uygulamaları

Peptitin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin apoptoz kaynaklı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla apoptozun en önemli enzimlerinden olan kaspaz-7 ve kaspaz-9 protein miktarları eliza testi ile gösterilmiştir. Öncelikle, peptitin kaspaz-7 ve kaspaz-9 protein miktarları üzerindeki değişimini belirlemek amacıyla MCF7 hücrelerini öldürdüğü en etkin doz IC_{50} değeri belirlenmiştir. IC_{50} yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu olarak da ifade edilebilir. Bir hücre popülasyonunun %50'sinin inhibisyonu için gerekli olan ilaç konsantrasyonudur. IC_{50} , bir ilacın etkinliğinin en yaygın kullanılan ve bilgilendirici ölçüsüdür. Tez çalışmamızda peptitin IC_{50} değerini belirlemek için tüm saatlerdeki (24,48 ve 72.saat) ve setlerdeki veriler GraphPad Prism 8.0.2 programı ile değerlendirilmiştir. Lineer olmayan regresyon analiz sonuçlarına göre peptidin yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. Kaspaz-7 ve -9 protein miktarlarının eliza testi ile gösterilmesi için peptid dozları IC_{50} değeri $IC_{50} \times 2$ ve $IC_{50}/2$ olarak belirlenmiştir.

Öncelikle MCF7 hücreleri 12 kuyucuklu plakalara 100.000 hücre olacak şekilde bölünmüş ve gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda belirlenen üç peptid dozu 24 ve 48. saatler için MCF7 hücrelerine uygulanarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Kaspaz enzimleri hücre dışına salınan proteinler olmadığı için hücreler parçalanarak eliza deneylerine devam edilmiştir.

3.2.6.2. Hücrelerin lizis edilmesi

Kaspaz-7 ve -9 eliza kit protokollerinin önerdiği üzere her bir inkübasyon süresi sonunda kontrol ve ilaç gruplarındaki hücrelerin besi yerleri uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırılarak ayrı ayrı ependorf tüplere toplandı. Ependorf tüpler 20 dk boyunca 3000 RPM'de santrifüj edildi. Santrifügasyonun sonunda süpernatantlar atıldı ve hücre peletlerinin 1mL PBS ile çözünmeleri sağlandı. Bu aşama da hücreler tekrarlayan soğuk-sıcak döngüleri ile parçalandı. PBS ile çözünen hücreler 5 dk buz içerisinde bırakıldı. Bu sürenin sonunda 5dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu döngü 5 kere uygulandı. Hücreler tekrar 20 dk 3000 rpm'de santrifüje edildi. Süpernatantlar ya hemen çalışıldı ya da çalışılincaya kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklandı.

3.2.6.3. Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 ELISA testi çalışmaları

Bu kit bir Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testidir (ELISA). Her iki kitin içinde bulunan 96 kuyucuklu plakalar kaspaz-7 ve kaspaz-9 antikoru ile önceden kaplanmıştır. Gerekli tüm solüsyonlar bu kitlerle birlikte gelmektedir. Aşağıda projede kullanılan kitlerin deney prosedürleri verilmektedir. Tüm çalışmalar bu protokole uygun yapılmıştır.

Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun şekilde hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirildi. Test oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 testinin her biri için standart kuyucuklara 50 µl standart solüsyonundan eklendi. Not: Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuğa antikor eklenmedi.

Örnek kuyucuklarına 40 µl kontrol ve peptid örneklerinden eklendi ve ardından bu kuyucuklara 10 µl İnsan Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 antikorları eklendi. Ardından örnek kuyucuklara ve standart kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi. (Boş kontrol kuyucuğa eklenmedi). İyice karıştırıldı. Plaka bir kapatıcı ile kapatılarak, 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

Süre sonunda kapatıcıyı çıkarılarak plaka yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı. Her yıkama için kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu ekledni ve 30 saniye ila 1 dakika bekletildi. Plaka kağıt havlu üzerinde kurulandı.

Her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A ve ardından her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi B eklendi. Plaka kapatıcı ile kapatılarak karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.

Süre sonunda her bir kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi, mavi rengin sarıya dönüşmesi gözlemlendi.

Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroparka okuyucu kullanarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlenerek analiz edildi.

3.2.7. Western blotlama çalışmaları

3.2.7.1. Hücre lizati hazırlama

Eliza testi sonuçlarını doğrulamak için kaspaz-7 enzim protein miktarı western blot yöntemi ile belirlenmiştir. MCF7 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her bir well başına 10^6 hücre olacak şekilde pasajlandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. IC₅₀ değeri belirlenen üç peptid dozu 24 ve 48. saatler için hücrelere uygulanarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

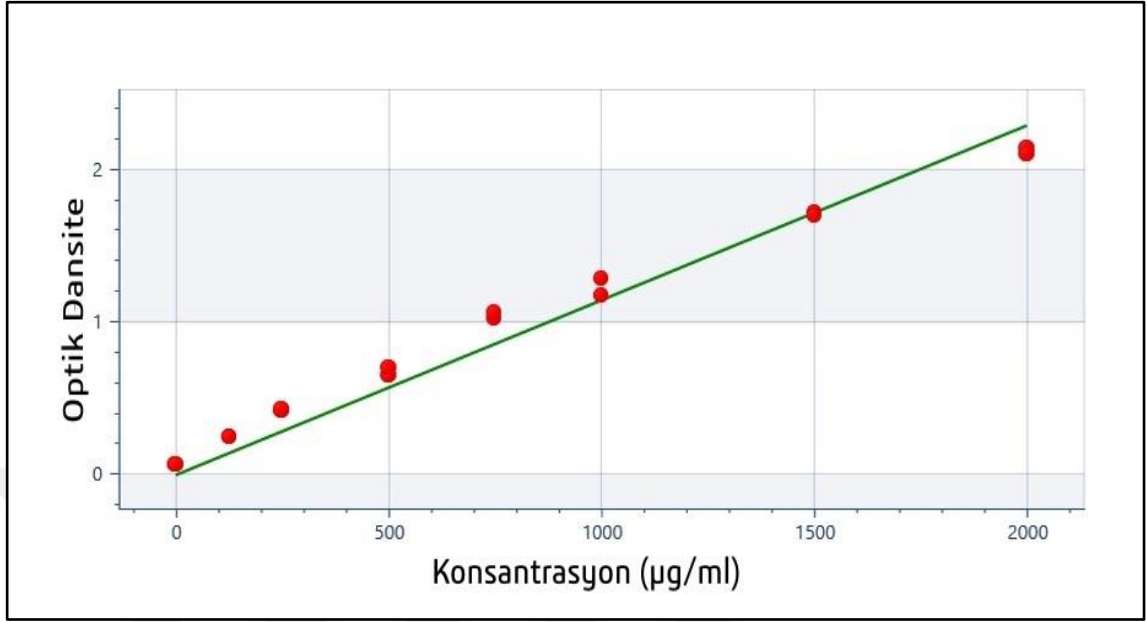
Kaspaz-7 enzim proteini sitoplazmik bir protein olduğu için liziz tamponu olarak Tris-HCl (20mM, pH: 7.5) kullanılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda hücrelere 500 µl Tris-HCl (pH: 7.5) eklendi ve hücre kazıyıcı ile kazınarak tüplere toplandı.

Tüpteki örnekler ultrasonik homojenizatör yardımı ile 9000 rpm'de 10 saniye sonike edildi. Daha sonra +4°C'de 12500 rpm hızda 25 dakika santrifüj edildi. Tüpteki süpernatant örneği western blot analizi için kullanıldı.

3.2.7.2. Örneklerdeki protein miktar tayini

Örneklerdeki protein miktarını tespit etmek için bikinkoninik asit (BCA) test kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde konsantrasyonu bilinen BSA standart solüsyonu ve çalışma solüsyonu bulunmaktadır. BSA standart solüsyonları 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 µg/ml olacak şekilde hazırlandı. Standartlar ve örnekler (24 ve 48 saatlik dozlar kontrol, 2X IC₅₀, IC₅₀, 1/2X IC₅₀ olmak üzere sekiz tane) 96 kuyucuklu plakalara iki tekrarlı olmak üzere 25 µl eklendi. Daha sonra bu kuyucuklara 200 µl çalışma solüsyonu

eklendi. Plaka 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi ve ardından oda sıcaklığına alındı. 562 nm dalga boyunca eliza okuyucu ile okundu ve veriler grafiklendirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Protein konsantrasyonlarının standart grafiği

3.2.7.3. Dikey elektroforez jeli için solüsyonların hazırlanması

a. Ayırma jeli solüsyonu (1.5 M Tris pH: 8.8)

18.17 g Tris tartılarak 40 ml distile suda çözüldü. pH'sı HCl ile 8.8'e ayarlanarak 100 ml hacim olacak şekilde distile su ile tamamlandı ve kaldırıldı.

b. Yükleme jeli solüsyonu (0.5 M Tris pH: 6.8)

6.05 g Tris tartılarak 60 ml distile suda çözüldü. pH'sı HCl ile 6.8 ayarlanarak son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

c. Akrilamid-Bisakrilamid solüsyonu

Kullanıma hazır %30 akrilamid bisakrilamid solüsyonu kullanıldı.

d. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS %10)

10 g SDS tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.

e. Amonyum Persülfat (APS %10)

0.1 g APS tartılarak 1 ml distile suda çözüldü ve 200 µl küçük tüplere alikotlanarak -20 °C'ye kaldırıldı.

f. TEMED (N,N,N,N-Tetrametil Etilendiamin)

Akrilamid-bisakrilamid polimerizasyonu için kullanıma hazır solüsyon kullanıldı.

Ayrışma (resolving) ve yükleme (stacking) jelinin hazırlanması

%10 Ayrışma jeli için 4 ml distile su, 3.3 ml % 30 akrilamid-bisakrilamid solüsyonu, 2.5 ml 1.5 M Tris (pH: 8.8), 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 APS, 4 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı.

%5 Yükleme jeli için 3.4 ml distile su, 830 µl % 30 akrilamid-bisakrilamid solüsyonu, 630 µl 0.5 M Tris (pH: 6.8), 50 µl %10 SDS, 500 µl %10 APS, 5 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı.

Ayrışma ve yükleme jelini hazırlamadan önce camlar %70'lik alkol ile temizlendi. Aparatları yardımı ile sabitlenerek jel dökme tankına yerleştirildi. % 10 ayrışma jeli hemen hazırlanarak kısa süre vortekslendi. İki cam arasına yaklaşık 5 ml ayrışma jeli eklenir ve üzerine izopropanol eklenerek donması beklendi. Ayrışma jeli donduktan sonra izopropanol uzaklaştırıldı. Yükleme jeli hazırlanarak yaklaşık 2 ml ayrışma jelinin üzerine döküldü ve 10 taraklı plastik aparat yerleştirilerek donmaya bırakıldı.

3.2.7.4. SDS PAGE jel elektroforezi**a. Örneklerin hazırlanması**

BCA testi ile protein konsantrasyonu belirlenen örneklerden kuyucuk başına 6.5 µg protein olacak şekilde alınarak hazırlandı. Üzerine 3X DTT (ditiyotritol)'li leamli solüsyondan 10 µl (3:1 oranında sulandırılacak şekilde) eklenerek her kuyucuk için toplam 25 µl hacime tamamlandı. Hazırlanan bu örnekler 95 °C'de 5 dakika denatüre edildi.

b. Elektroforez işlemi

Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilir. Hem camların olduğu bölüm hem de tank Running solüsyon (1X) ile dolduruldu. 10X Running solüsyonu hazırlamak için 30 g Tris base, 144 g glisin ve 10 g SDS tartılarak 900 ml distile suda çözüldü. pH'sı HCl ile 8.3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı. Solüsyon elektroforez işlemi için 1:10 oranında seyreltilerek 1X şeklinde hazırlandı.

Yükleme jelindeki taraklar çıkarıldı ve hazırlanan örnekler ince uçlu mikropipet ile kuyucuklara yüklendi. Daha sonra boş bırakılan ilk kuyucuğa moleküler ağırlıkları bilinen ladder yüklendi.

Elektroforez kapağı anot ve katot işaretleri dikkate alınarak kapatıldı ve güç kaynağına bağlandı. Örnekler yükleme jelini geçerek tek sıra haline gelene kadar 15 mA güçte yürütüldü. Daha sonra elektroforez 18 mA güçte yürütülmeye devam edildi. Bu süre 2 saat kadar devam etti. Leamli solüsyonu ile işaretli örnekler en alt bölgeye gelince elektroforez işlemi durduruldu.

3.2.7.5. Protein transferi

Transfer işlemi için önceden 10X transfer solüsyonu hazırlandı. 1:10 oranında seyreltilerek transfer işleminde kullanıldı. Transfer solüsyonu hazırlamak için 24.2 gr Tris, 112.5 gr Glisin tartılarak 1L distile su içinde çözüldü. Transfer solüsyonu 1X'e seyreltilirken %20 metanol eklendi.

Jel transfer için hazırlanmadan önce büyük bir kap 1X transfer solüsyon ile dolduruldu. Transfer kasedi, süngerler ve filtre kağıtları transfer solüsyonu içine alındı. PVDF membran 2 dakika boyunca metanol ile ıslatıldı ve ardından transfer solüsyonu içine cımbız ile alındı. Transfer kasetinin negatif tarafı aşağı gelecek şekilde transfer solüsyonuna yatırıldı. Sandviç sünger-iki adet filtre kağıdı-PVDF membran-jel-iki adet filtre kağıdı-sünger olacak şekilde yerleştirildi. Hava kabarcıklarının giderilmesi için silindir veya serolojik pipet kullanıldı. Transfer kaseti uygun şekilde sıkıştırılarak transferin gerçekleşeceği tankın içine pozitif ve negatif kutuplar dikkate alınarak yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağına bağlandı ve soğuk bir ortamda (4°C'de veya buz içerisinde) 250 mA güçte 2 saat transfere bırakıldı.

3.2.7.6. İmmünblotlama işlemi

Bu prosedür için gerekli solüsyonlar TBS, TBST ve bloklama solüsyonlarıdır. 10X TBS solüsyonu için 24.23 gr Tris-HCl ve 80.06 gr NaCl tartılarak 900 ml distile suda çözüldü. pH'sı HCl ile 7.6'ya ayarlanarak son hacim 1L'ye tamamlandı.

TBST hazırlamak için 10X TBS solüsyonundan 100 ml alınarak üzerine 899 ml distile su eklendi. Son olarak 1ml Tween-20 eklenerek son hacim 1L'ye tamamlandı.

Bloklama solüsyonu yağsız süt tozu veya BSA (Bovin Serum Albumin) ile hazırlanmaktadır. Antikoru satın alındığı marka ve modele göre bu değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan antikor için bloklama ve primer antikor seyreltme aşamalarında BSA önerilmiştir. Bu yüzde işlemler BSA ile gerçekleştirildi.

Transfer sonrası membrandaki moleküler ağırlıkları belli olan ladder kontrol edildi. Protein transferinin başarılı olduğunu doğrulamak amacıyla protein bantlarını görselleştirmek için membran 30 saniye boyunca Ponceau S (geri dönüşümlü bir protein boyası) ile boyandı ve protein bantları gözlemlendi. Membran berraklaşana kadar 1x TBST içinde birkaç yıkama ile Ponceau S boyası yıkandı.

%5 Bloklama solüsyonu hazırlamak için 1 gr BSA tartılarak 20 ml TBST içinde çözüldü. Membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında %5 bloklama solüsyonu ile rotator cihazında inkübe edildi. Bloklama antikoru membrana spesifik olmayan bir şekilde bağlanmasını önler. Bloklama sonrası membran TBST solüsyonu ile rotator cihazında 10 dakika-10 dakika-5 dakika aralıklarla üç kez yıkandı.

Bloklamadan sonra membran, primer antikorlu içeren bir çözeltide inkübe edildi. Antikor satın alınan markanın önerisi doğrultusunda %5 BSA'lı TBST solüsyonu içinde 1:1000 seyreltme olacak şekilde hazırlandı (5 ml içinde 5 µl antikor). Birincil antikor, ilgili proteinin epitopunu veya spesifik amino-asit dizisini tanıır ve bağlar. Membran primer antikor ile +4°C'de gece boyunca rotator cihazında inkübe edildi. Primer antikorla

inkübasyon sonrası membran TBST solüsyonu ile bir önceki adımda olduğu gibi üç kez yıkandı.

Bu adımdan sonra membran TBST ile hazırlanmış HRP (Horse-Radish Peroxidase) konjuge rabbit sekonder antikor (1:200000 seyreltme) da 2 saat oda sıcaklığında rotator cihazında inkübe edildi. Sekonder antikor primer antikoru tanır.

3.2.7.7. Tespit işlemi (kemilüminesans)

TBST solüsyonu içinden alınan membran görüntüleme sisteminin kapağına yerleştirildi. ECL solüsyonu membrana damlatılarak 1 dk dakika boyunca inkübe edildi. Fazla ışımaya oluşumunu engellemek için membran üzerindeki fazla ECL substratı bir peçete ile emdirildi.

Membran, ChemiDoc kemilüminesans görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğraflar kaydedildi.

Bantlar ImageJ programı kullanılarak analiz edildi.

3.2.7.8. Membran stripleme ve beta aktin antikor işaretlenmesi

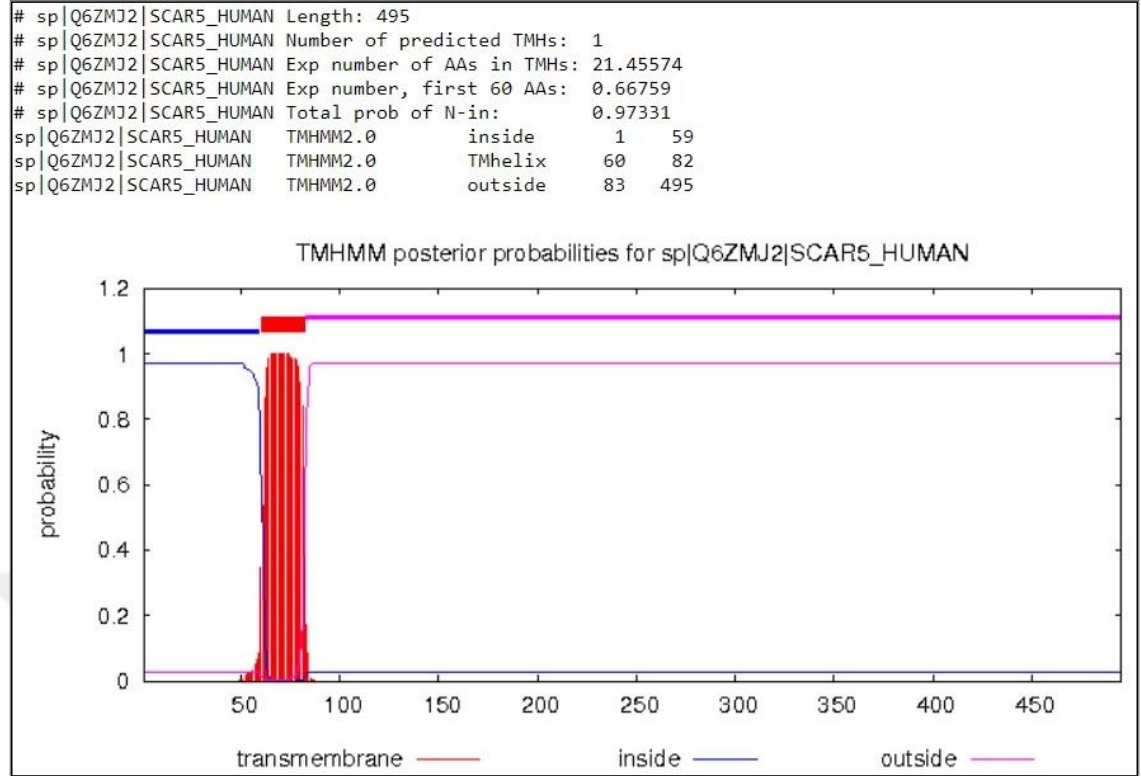
Stripleme bir western blot membranından primer ve sekonder antikoru çıkarma yöntemini ifade etmektedir. Bu şekilde membran birden fazla antikor ile işaretlenebilir. Bu yöntem genellikle beta aktin gibi yükleme kontrol proteinlerinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Bunun için öncelikle stripping solüsyonu hazırlandı. Stripping solüsyon için 6.25 ml 1 M Tris HCl (pH:6.8), 10 ml %20 SDS ve 700 µl beta merkaptotanol toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda hazırlandı.

Membran oda sıcaklığında rotator cihazında 1 saat inkübe edildi. Böylece primer ve sekonder antikorlar membrandan çıkarılmış oldu. Bloklama işleminden kemilüminesans görüntüleme işlemine kadar aynı adımlar tekrar edilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel analizler

Deneylerden elde edilen verilerin analizi ve grafiklendirilmesi için GraphPad Prism 8.0 programı kullanılmıştır. Grup içi değerlendirmeler için Dunnett's Multiple Comparison post-test ve tek yönlü ANOVA, IC₅₀ değerleri için lineer olmayan regresyon analizi kullanıldı ($p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

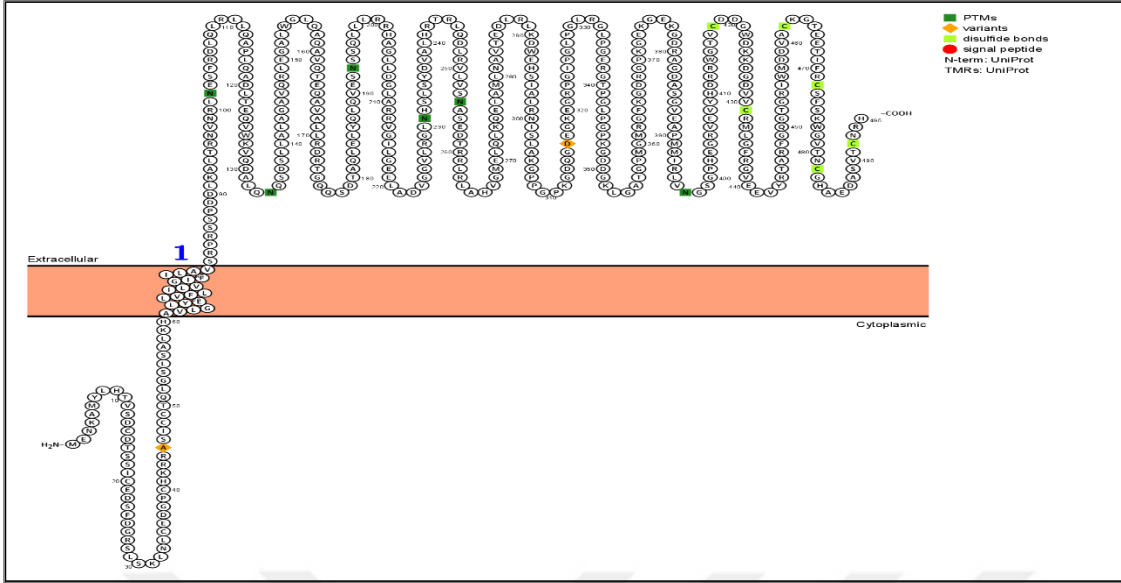




Şekil 4.2. SCARA5'in topoloji grafiği

TMHMM ver 2.0 sonuçlarına göre SCARA5 reseptörünün 1-59 aminosit bölgesi sitoplazmik bölgede bulunurken, 60-82 aminoasit arası transmembran heliks yapısındadır. SCARA5'in bağlanma bölgesi olan SRCR'nin de bulunduğu 83-495 aminositlik dizi ise ekstraselüler bölgede bulunmaktadır. Kırmızı çizgi transmembran bölgeyi, mavi çizgi sitoplazmik bölgeyi ve mor çizgi de hücre dışı bölgeyi göstermektedir.

SCARA5'in topolojisi bir başka server olan PROTTER ile tahmin edilmiştir.

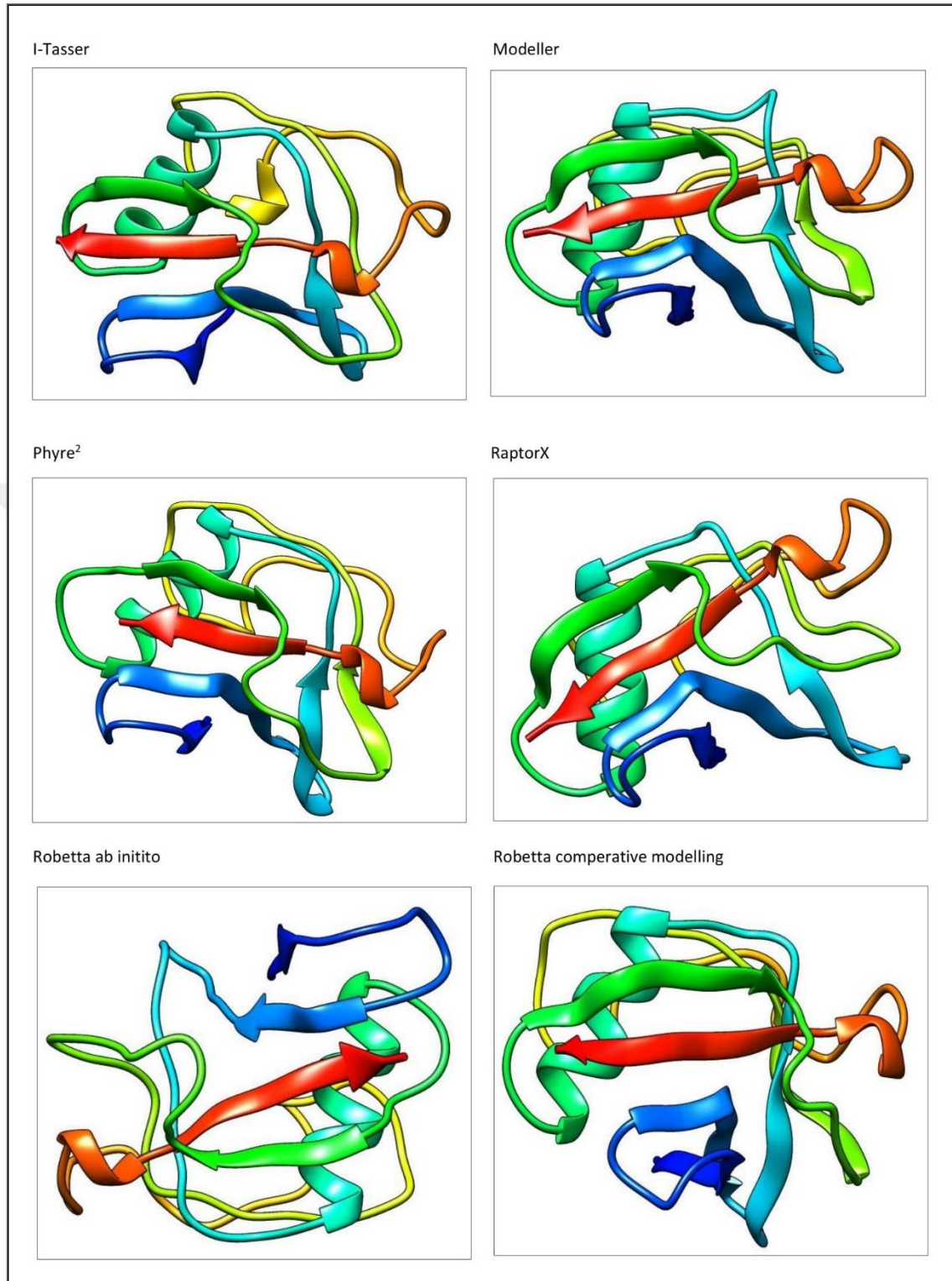


Şekil 4.3. SCARA5'in farklı topoloji grafiği

PROTTER'den gelen sonuçlarda TMHMM ver 2.0 analizine benzer şekilde SCARA5'in bağlanma bölgesine karşılık gelen 393-493 aminoasitlik dizi ekstraselüler bölgede yer almaktadır.

4.2. SRCR Bölgesinin Hesaplamalı Yapısal Modeli

Altı farklı hesaplama yaklaşımı kullanılarak SRCR bölgesinin altı farklı tersiyer yapısı ortaya çıkarılmış ve bu üç boyutlu yapı görselleştirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. SRCR bölgesinin altı farklı yaklaşımdan elde edilen üçüncül katlanma yapıları

4.3. SRCR Bölgesinin Altı Farklı Modelinin Enerji Minimizasyonu, Validasyonu ve Post-translasyonel Modifikasyonların Belirlenmesi

4.3.1. SRCR bölgesinin altı farklı modelinin enerji minimizasyonu ve validasyonu

Elde edilen altı farklı protein modellerinin karşılaştırılarak en doğru katlanma konformasyonunun belirlenmesi için ModRefiner server'ı kullanılmıştır. Bu serverdan gelen yapılar validasyon testlerine tabi tutulmuştur.

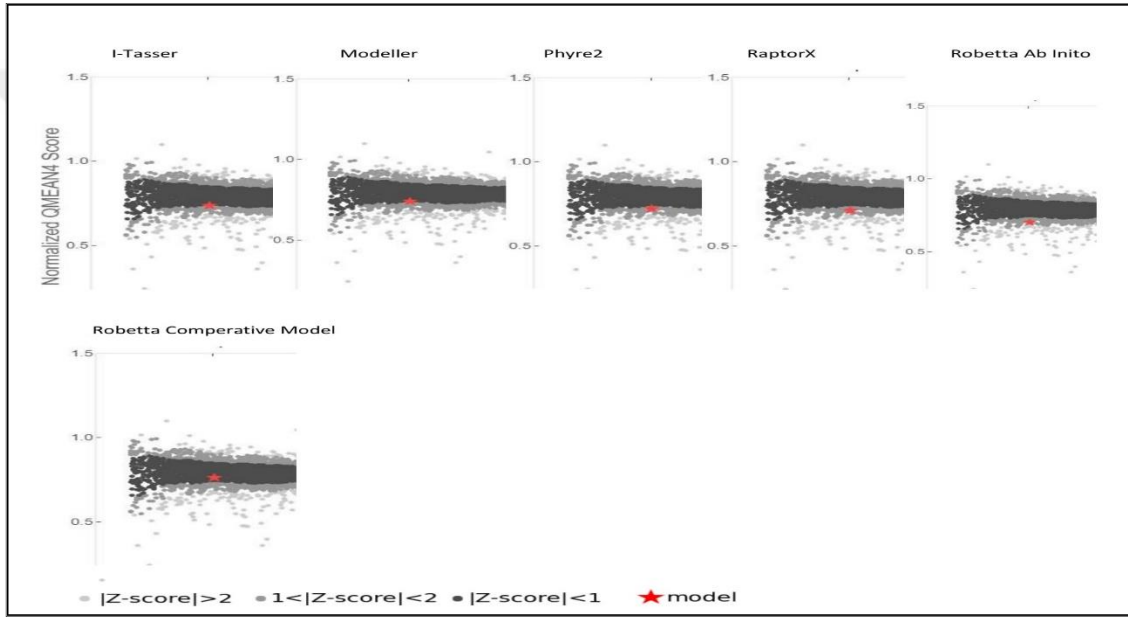
Elde edilen SRCR modelleri beş farklı yaklaşımın dördünde benzer sonuçlar vermiş ancak ERRAT programında Robetta_cm'nin skoru diğer modellere göre daha yüksek çıkmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Altı farklı modelin beş farklı validasyon programı ile karşılaştırılması

	VERIFY	ERRAT	PROVE	PROCHECK	WHATCHECK
I-Tasser	Geçti	84.946	Geçti	Hatalar: 4 Uyarılar: 1 Geçti: 3	Hatalar: 6 Uyarılar: 14 Geçti: 27
Modeller	Geçti	84.946	Geçti	Hatalar: 5 Geçti: 3	Hatalar: 6 Uyarılar: 14 Geçti: 27
Phyre2	Geçti	80.434	Geçti	Hatalar: 4 Uyarılar: 1 Geçti: 3	Hatalar: 5 Uyarılar: 16 Geçti: 26
RaptorX	Geçti	77.173	Geçti	Hatalar: 3 Uyarılar: 3 Geçti: 2	Hatalar: 6 Uyarılar: 16 Geçti: 25
Robetta_ab	Geçti	73.333	Geçti	Hatalar: 5 Uyarılar: 0 Geçti: 3	Hatalar: 5 Uyarılar: 14 Geçti: 28
Robetta_cm	Geçti	88.172	Geçti	Hatalar: 4 Uyarılar: 1 Geçti: 3	Hatalar: 6 Uyarılar: 14 Geçti: 27

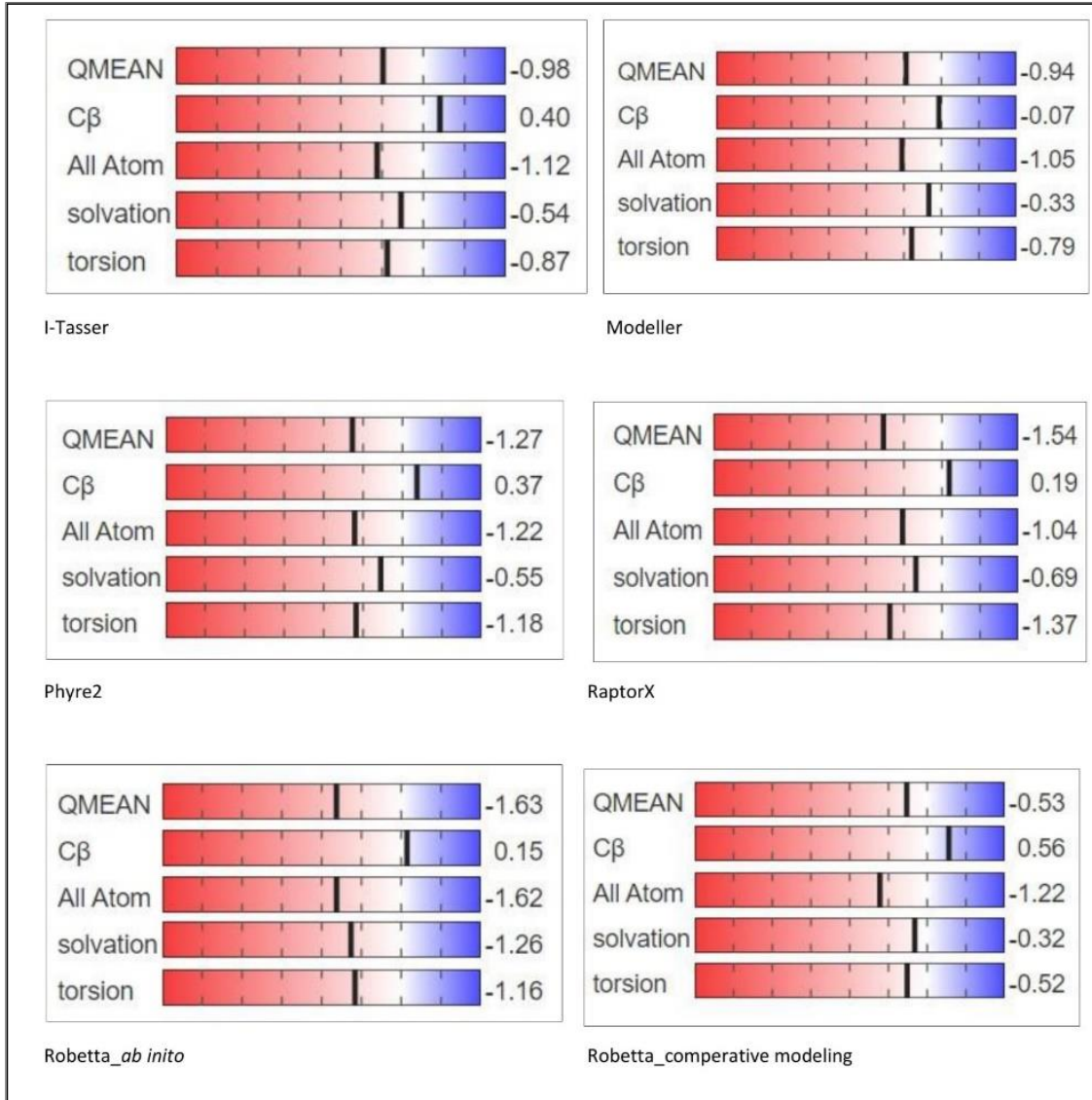
Bu yaklaşımların yanı sıra elde ettiğimiz altı protein modelinin kalitelerini değerlendirmek için ayrıca SWISS-MODEL'in yapı değerlendirme modülü kullanılmış ve modeller bu program kullanılarak da ayrıca değerlendirilmiştir.

Kırmızı ile temsil edilen yıldızlar farklı yaklaşımlardan elde edilen SRCR domain yapılarını temsil etmektedir. Her nokta deneysel bir protein yapısını temsil etmektedir. Siyah noktalar, QMEAN skoru ortalamasının 1 standart sapması içinde olan deneysel yapılardır ($|Z\text{-skor}| = 0-1$); $|Z\text{-skor}| = 1-2$ olan yapılar gri renktedir. Ortalamadan daha da uzak olan deneysel yapılar açık gridir. Z-skoru 1'in altında olan yıldız modelin kaliteli olduğunu gösterir ve koyu renkli alana karşılık gelecek şekilde temsil edilir. Şekil 4.5'te Robetta comparative modeli temsil eden kırmızı yıldız diğer modellere kıyasla koyu renkli alana en çok temas eden yapıdır. Bu yaklaşım açısından diğer modellere kıyasla daha kaliteli bir yapı göstermektedir.



Şekil 4.5. Altı farklı SRCR modelinin Z skorlarının karşılaştırılması

Kalite değerlendirme modülünde ise QMEAN, C-beta, tüm atomlar, çözünürlük ve torsiyonuna göre protein yapıları değerlendirilmiştir. Maviye en yakın olan değerler, protein yapısının kalitesini göstermektedir (Şekil 4.6).



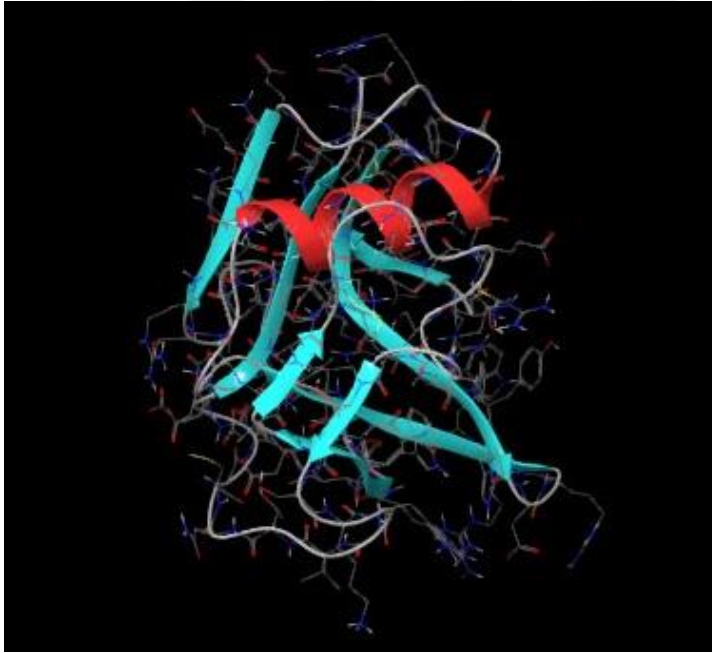
Şekil 4.6. Modellerin QMEAN değerlendirmesi

QMEANDisCo protein yapılarını değerlendiren bir başka puanlama skorudur ve altı farklı model bu yaklaşım açısından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Altı farklı SRCR modelinin QMEANDisCo değerleri

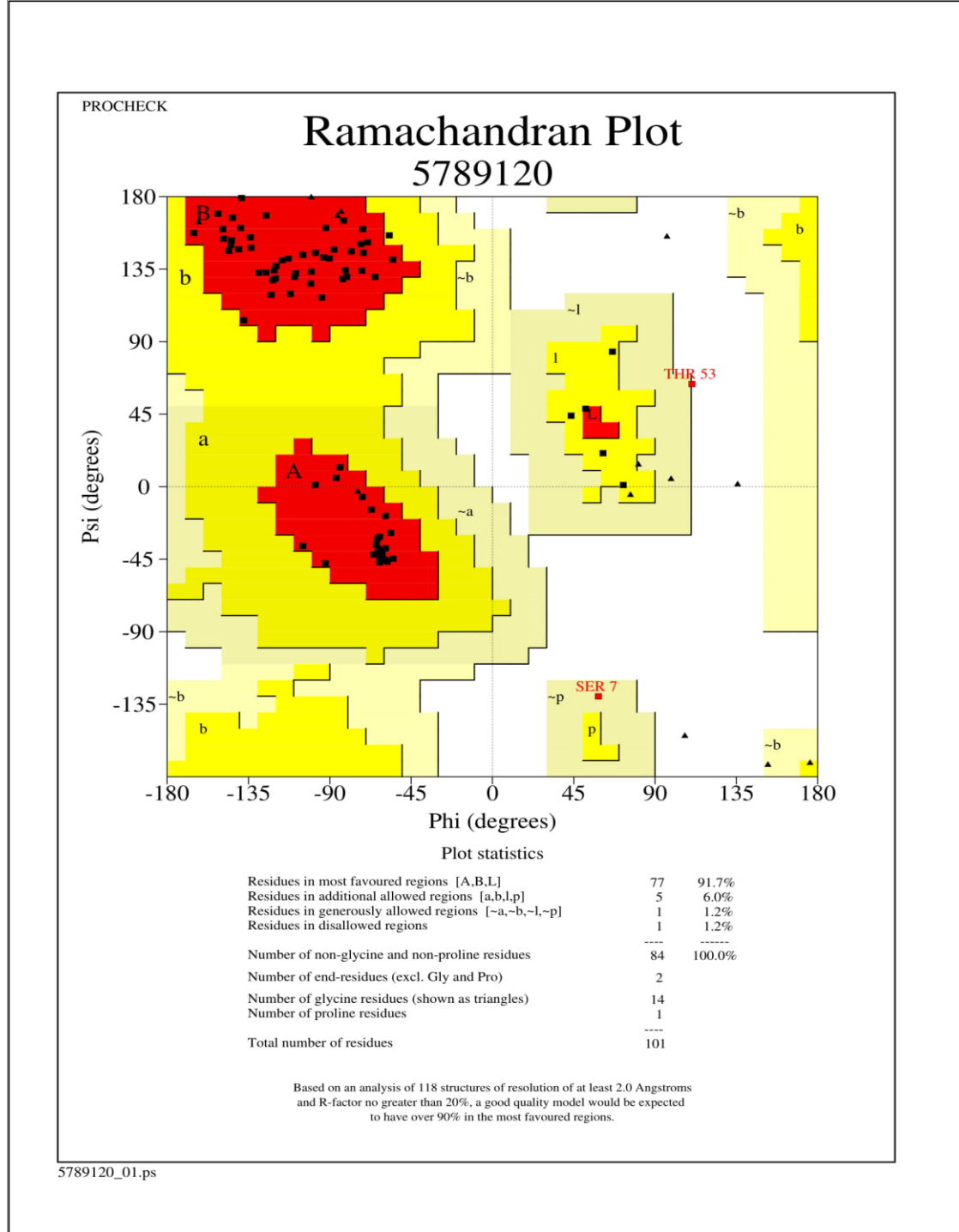
Altı SRCR Modeli	QMEANDisCo
I-Tasser	0.86 ± 0.08
MODELLER	0.87 ± 0.08
Phyre²	0.85 ± 0.08
RaptorX	0.86 ± 0.08
Robetta_ab	0.67 ± 0.08
Robetta_cm	0.89 ± 0.08

Robetta_cm QMEAN değerlendirmesinde mavi en yakın QMEANDisCo değerlendirmesinde 1'e an yakın modeldir. Bu sonuçlara göre robetta comperative model diğer protein modellerine göre en uygun model olarak belirlenmiştir. Tezin devamında yapılacak çalışmalar bu model üzerinden devam edecektir (Şekil 4.7).

**Şekil 4.7.** SRCR bölgesinin hesaplamalı yapısal modeli

SRCR bölgesinin modeli belirlendikten sonra tüm rezidülerini phi-psi torsiyon açılarını göstermek için Ramachandran grafiği oluşturulmuştur. Ramachandran grafiği yapıdaki tüm rezidüler için phi-psi torsiyon açılarını gösterir (zincir uçlarındakiler hariç). Çizim üzerindeki renklendirme/gölgelendirme, en koyu alanlar (burada kırmızı ile gösterilmiştir) phi-psi değerlerinin en uygun kombinasyonlarını temsil eden "çekirdek" bölgelere karşılık gelir. İdeal olarak, bu "çekirdek" bölgelerdeki rezidülerin %90'ından

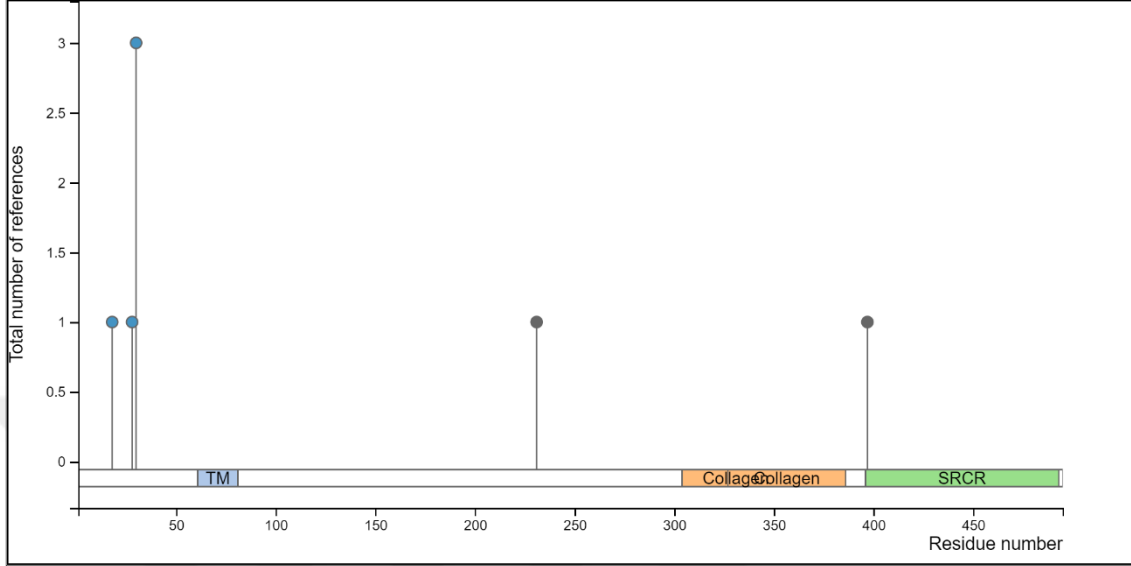
fazlasına sahip olunması beklenir. "çekirdek" bölgelerdeki rezidülerin yüzdesi, stereokimyasal kaliteye yönelik en iyi kılavuzlardan biridir. Robetta_cm ile oluşturulan SRCR proteini için çekirdek bölgelerdeki rezidülerin yüzdesi %91.7 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. SRCR bölgesinin Ramachandran grafiği

4.3.2. SCARA5 proteininin post-translasyonel modifikasyonlarının tahmini

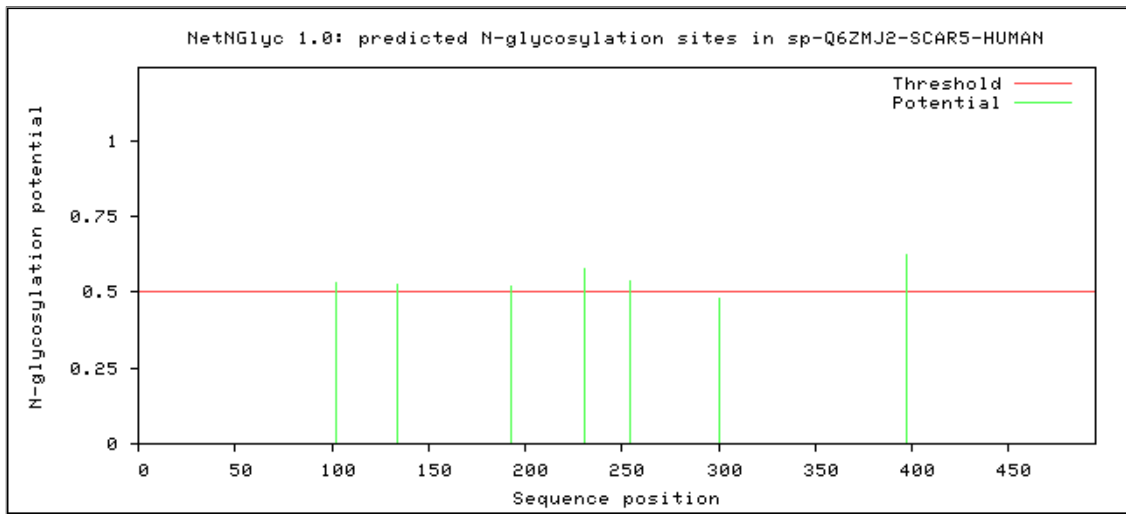
Proteinde meydana gelmesi olası post-translasyonel modifikasyonların tahmini için PhosphoSitePlus ve NetNGlyc 1.0 sunucuları kullanılmıştır.



Şekil 4.9. PhosphoSitePlus'a göre SCARA5'teki post-translasyonel modifikasyonlar

PhosphoSitePlus sonuçlarına göre SCARA5'in SRCR bölgesinde yer alan 397. aminoasitte bir N-glikosilasyon tespit edilmiştir. Hücre dışı alanda bir N-glikosilasyon bölgesi ve sitoplazmik alanda üç fosforilasyon bölgesi tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

NetNGlyc 1.0 sunucusunda da SCARA5 proteininde tahmin edilen N-glikosilasyon bölgeleri şekilde gösterilmiştir. Kırmızı çizgi N-glikosilasyon potansiyelinin sınırı olan 0.5'tir. İlgilendiğimiz bölge olan SRCR bölgesi içinde 397. aminoasitte bir N-glikosilasyon bölgesi bulunmaktadır (Şekil 4.10).

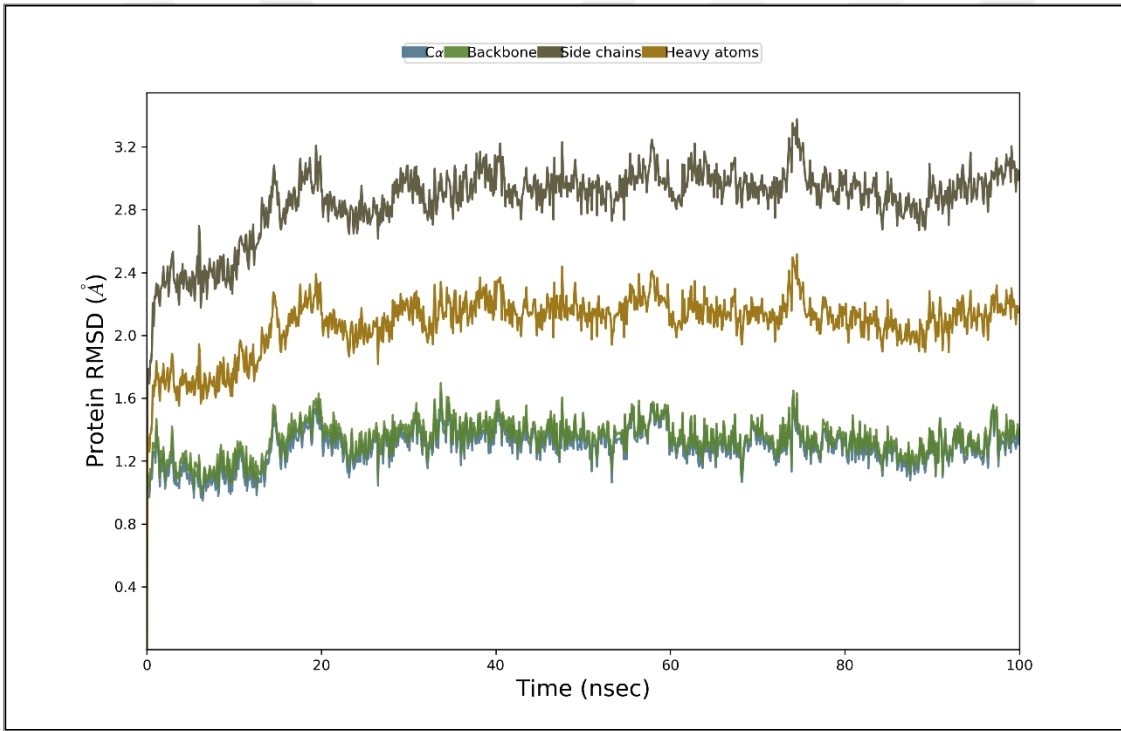


Şekil 4.10. NetNGlyc 1.0'a göre SCARA5'teki N-glikosilasyon bölgeleri

4.3.3. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyonu

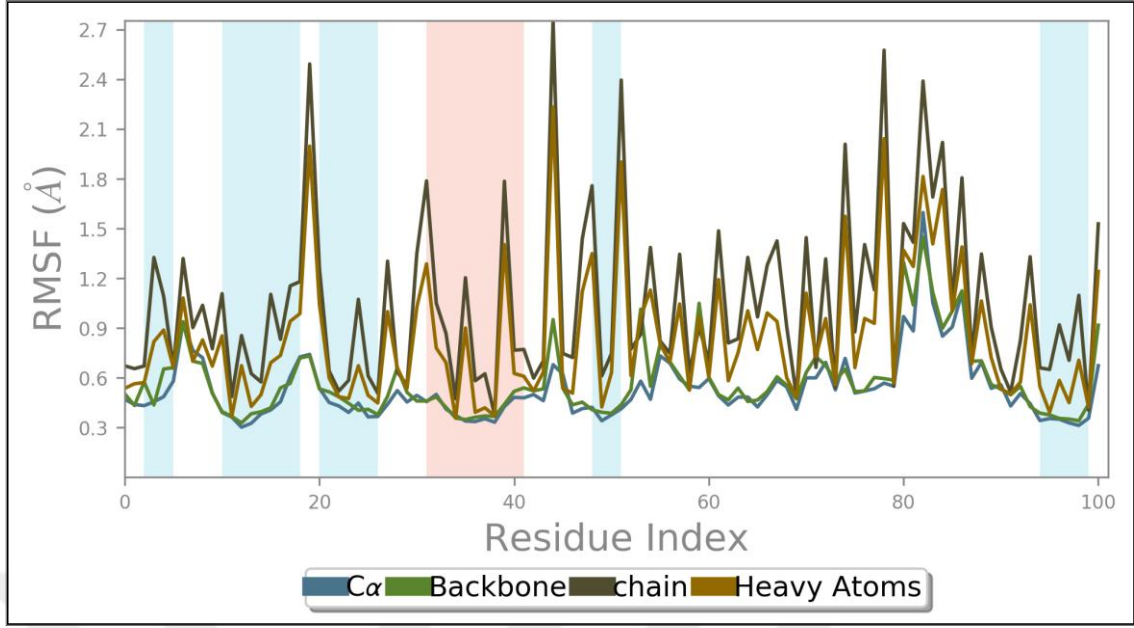
Modelin stabilite analizi için, simülasyon sırasında protein rezidülerindeki dalgalanma / termal hareketin belirlenmesi için seçilen RMSD değeri ve RMSF yapı değişikliğini ölçmek için kullanılır. 1-3 Å sırasındaki değişiklikler, küçük, küresel proteinler için mükemmel şekilde kabul edilebilir. Bununla birlikte, bundan çok daha büyük değişiklikler, proteinin simülasyon sırasında büyük bir konformasyonel değişikliğe uğradığını gösterir. Simülasyonda RMSD değerleri sabit bir değer etrafında stabilize olur.

Model kalitesi değerlendirildikten sonra seçilen Robetta_cm ile oluşturulan SRCR domaini, için RMSD değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 4.11). 1.2 Å seviyesinde başlayan mavi rengi temsil eden C-alfa omurgasının çok fazla dalgalanma göstermediği görülmüştür. Simülasyonun yaklaşık 20. saniyesindeki 1.6 Å'lık artış dışında proteinin omurga yapısı sabit bir ortalama etrafında toplanmıştır.



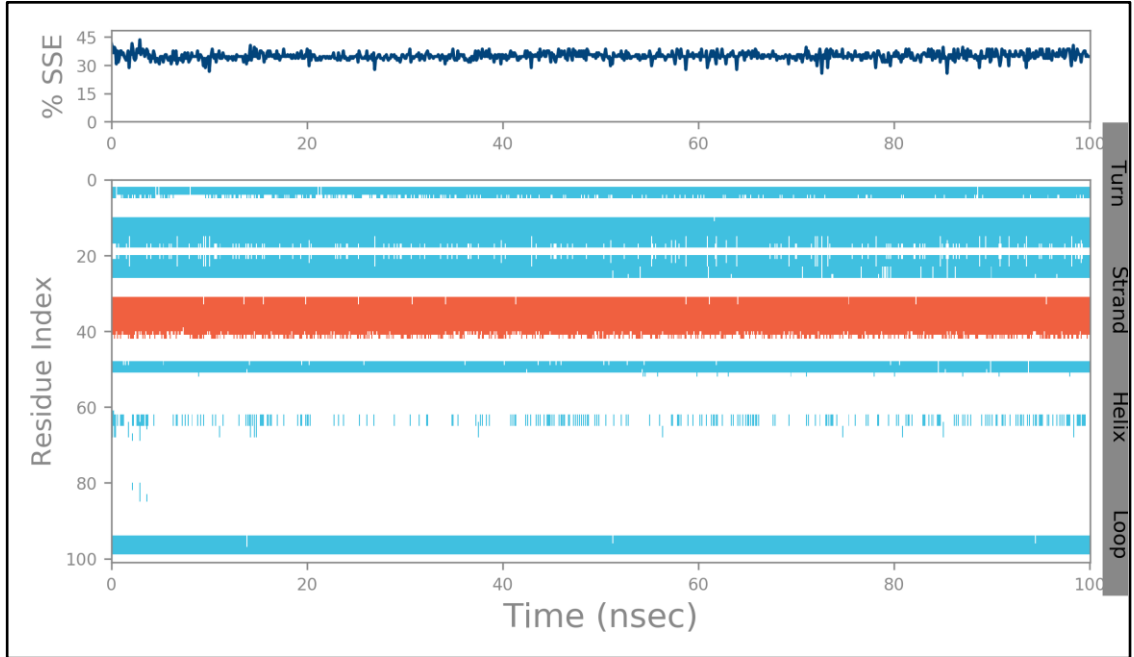
Şekil 4.11. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyon sonrası RMSD grafiği

SRCR domaini, için RMSF değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 4.12). Grafikte pik yapan çizgiler, simülasyon sırasında en çok dalgalanan protein alanlarını gösterir. Tipik olarak kuyrukların (N- ve C-terminalleri) proteinin diğer herhangi bir bölümünden daha fazla dalgalanması normaldir. Alfa heliksleri ve beta kırmalı tabakaları gibi ikincil yapı öğeleri genellikle proteinin yapılandırılmamış kısmından daha serttir ve bu nedenle döngü bölgelerinden daha az dalgalanır. C-alfa omurga yapısını temsil eden mavi çizgi de 80. ve 90. nanosaniye de ki dalgalanma 0.6-1.5 Å arasındadır. Bu bölgeler proteinin daha esnek bölgelerini temsil eder.



Şekil 4.12. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyon sonrası RMSF grafiği

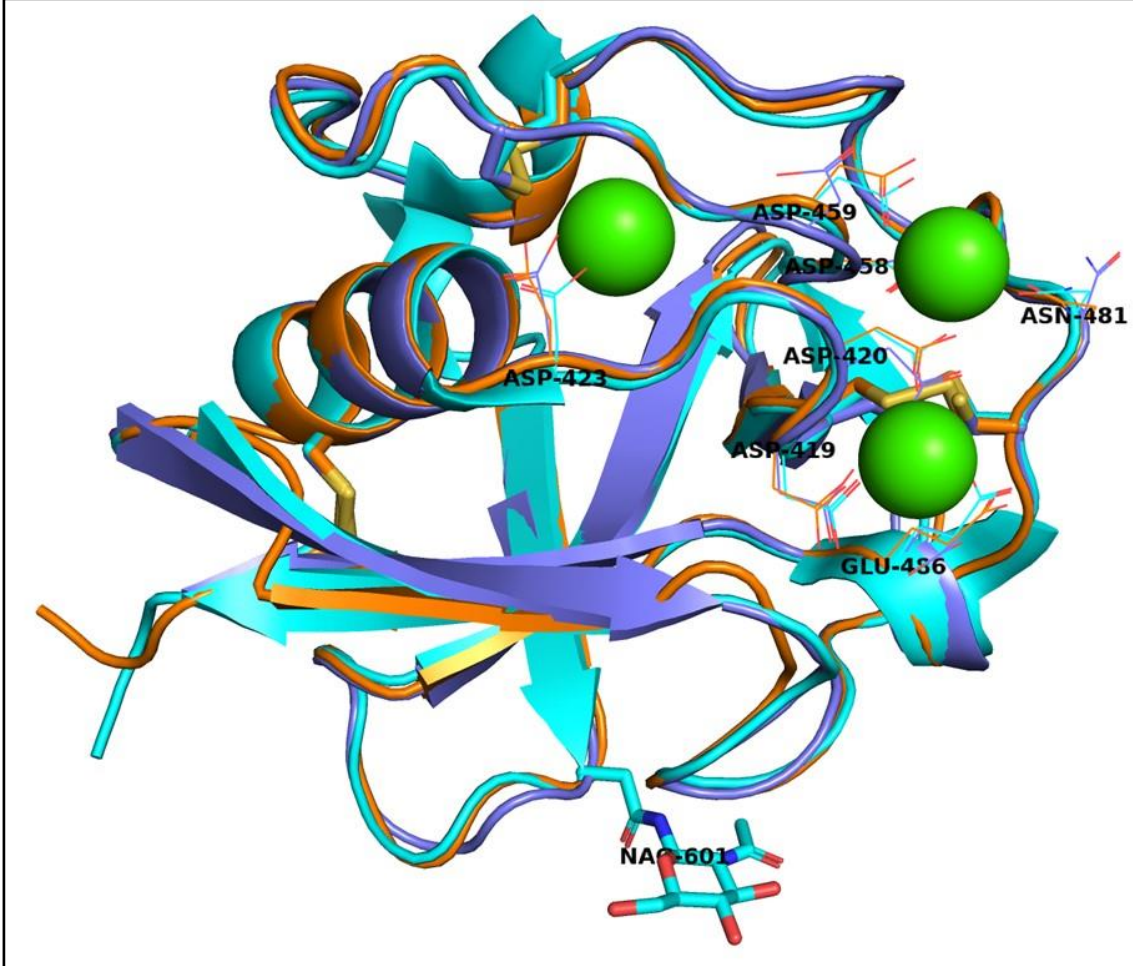
Alfa heliksler ve beta kırmalı tabakalar gibi protein ikincil yapı öğeleri (SSE) simülasyon boyunca izlenir. Alfa heliks ve beta kırmalı tabaka bölgeleri sırasıyla kırmızı ve mavi arka planlarla vurgulanır. Bu bölgeler, protein yapısının stabilizasyonunda proteine katkı sağlar (Şekil 4.13). SSE grafiğinde simülasyon boyunca her bir yörünge adımı için SSE bileşimi özetlenir ve aynı zamanda, her bir rezidünün zaman içindeki SSE atamasını izlenir. Robetta_cm ile elde edilen yapı % SSE ile karşılaştırıldığında en stabil yapı olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 4.13. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyon sonrası SSE grafiği

4.4. SRCR Modelinin Deneyisel Yapı ile Karşılaştırılması

Bu tez çalışması yapılırken SCARA5'in kristal yapısı ve AlphaFold modeli henüz ortaya çıkmamıştı. Ancak kristal yapısı ortaya çıktıktan sonra her üç model birbirleriyle örtüştürülerek görselleştirilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.14. SCARA5'in SRCR bölgesinin Robetta cm modeli (mor) ve AlphaFold modelinin (turuncu) kristal yapı (camgöbeği) (PDB ID: 7C00) ile karşılaştırılması

6 farklı protein modelinin deneyisel SRCR yapısı ile benzerliğini karşılaştırmak için RMSD değeri kullanılmıştır. RMSD büyük ölçüde iki yapının tam olarak örtüşmesine bağlıdır ve iki protein konformasyonunu atomik koordinatlarıyla örtüştürmek için kullanılır. En küçük RMSD değerine sahip protein yapısı deneyisel SRCR yapısına en yakın olanıdır (Kufareva ve Abagyan 2012). RMSD değerlerine göre Robetta_cm modeli bu çalışma için en iyi model olarak seçilmiştir (Çizelge 4.3). Elbetteki deneyisel model tüm modellerden üstündür ancak tez çalışmasının mali süreçleri tamamlandığı için geriye dönüp yeniden bir peptit tasarımı mümkün olmamaktadır. *in silico* verilerden elde edilen sonuçlar ve peptit tasarımı Robetta_cm modeli ile ilerlemiştir.

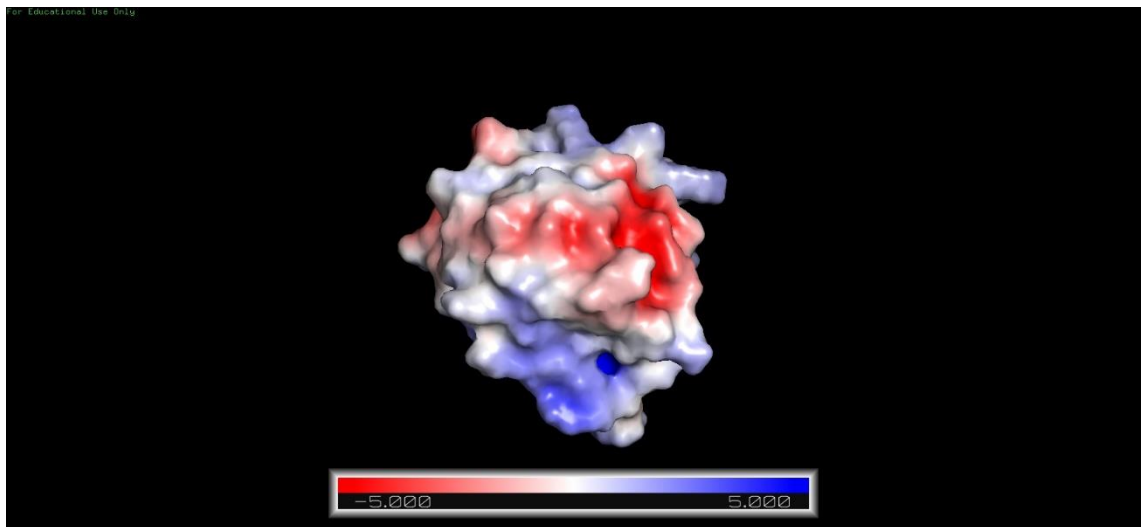
Çizelge 4.3. İnsan SCARA5 SRCR domain modellerinin kristal yapı ile yapısal hizalanması

Protein Modelleme Yazılımı	RMSD Dizi hizalama puanı	Kesilmiş atom çiftleri	RMSD ile kesilmiş atom çiftleri (Å)	101 atom çiftinin tamamında (Å)
I-Tasser	483.4	97	0.634	0.877
MODELLER	500.2	95	0.615	0.990
Phyre2	483.4	99	0.591	0.647
RaptorX	515.2	97	0.565	0.902
Robetta_ab_initio	483.2	67	1.217	2.999
Robetta_cm	501.4	99	0.559	0.638
AlphaFold	515.8	101	0.525	0.525

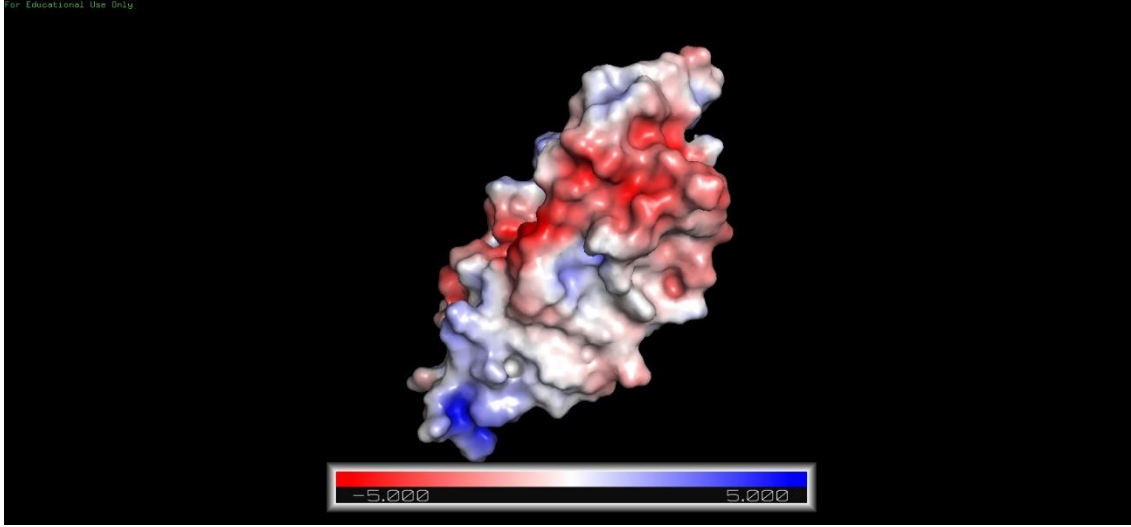
4.5. SRCR/L-Ferritin Moleküler Docking Sonuçları

4.5.1. SRCR bölgesinin ve L-Ferritin'in potansiyel bağlanma yüzeyleri

SRCR bölgesinin ve L-Ferritin'in potansiyel bağlanma arayüzleri APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver; Uyarlanabilir Poisson-Boltzmann Çözücü) ile hesaplanarak görselleştirilmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15). Kırmızı bölgeler negatif elektrostatik potansiyeli gösterirken, mavi bölgeler pozitif elektrostatik potansiyeli göstermektedir.



Şekil 4.15. SRCR bölgesinin elektrostatik potansiyel görseli



Şekil 4.16. L-Ferritin'in elektrostatik potansiyel görseli

4.5.2. SRCR/L-Ferritin'in docking sonuçları

SRCR ve L-Ferritin'in docking çalışmasına gönderilmeden önce aktif rezidülerinin belirlendi. Bu aktif rezidüler

L-Ferritin için tahmin edilen aktif rezidüler

5, 7, 8, 28, 32, 35, 36, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 53, 54, 56, 63, 66, 67, 70, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 92, 95, 97, 153, 154, 156, 157, 158, 160, 161, 162, 164, 165, 167, 168, 169, 172, 173, 174, 176, 177. aminoasitler olarak tahmin edilmiştir.

SRCR domain için tahmin edilen aktif rezidüler

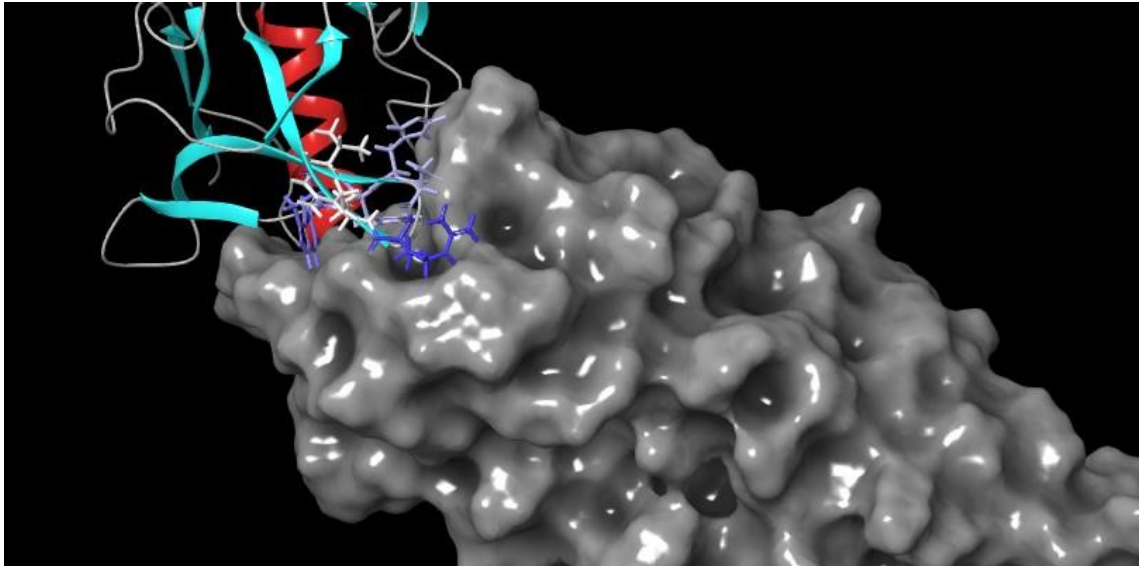
1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 54, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 67, 69, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 92. aminoasitler olarak tahmin edilmiştir.

Bu aktif rezidüleri sisteme yükledikten sonra docking çalışması sistem üzerinden başlatılmıştır. Docking sonrası HADDOCK tarafında belirlenen ve en iyi etkileşim gösteren dört yapıdan Z skoru en düşük olan yapı, en iyi bağlanma gösteren yapıdır (Şekil 4.16).

Cluster 1	
HADDOCK score	-42.6 +/- 5.4
Cluster size	16
RMSD from the overall lowest-energy structure	5.1 +/- 0.2
Van der Waals energy	-67.2 +/- 8.3
Electrostatic energy	-203.6 +/- 18.2
Desolvation energy	-14.6 +/- 3.4
Restraints violation energy	798.8 +/- 103.3
Buried Surface Area	1787.5 +/- 16.1
Z-Score	-1.5
Nr 1 best structure	 Download file 
Nr 2 best structure	 Download file
Nr 3 best structure	 Download file
Nr 4 best structure	 Download file

Şekil 4.17. SRCR/L-Ferritin HADDOCK skoru

En iyi etkileşim gösteren yapı etkileşim bölgesi görselleştirilip analiz edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.18. SRCR/L-Ferritin etkileşim bölgesi; gri renkli üç boyutlu yüzey L-Ferritin'i temsil etmektedir. İkincil yapıları içeren model ise SRCR bölgesini temsil etmektedir

SRCR domain'deki 20:Arg rezidüsü; L-Ferritin'in 49:Glu, 168:Tyr, 172:Arg rezidüleri ile hidrojen bağı ve tuz köprüleri oluşturmuştur. Yine SRCR domain'deki 17:Tyr rezidüsü, L-Ferritin'in 167:Glu, 46:Val, 48:Leu, 168:Tyr, 164:Gly rezidüleri ile hidrojen bağı kurmuştur. Diğer rezidüler de çizelgede gösterildiği şekilde çeşitli bağ etkileşimlerine sahiptir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. SRCR/L- Ferritin docking sonrası etkileşim gösteren rezidüler (R: Rezidü, Y: Yakınlık, M: Mesafe, ÖE: Özel Etkileşimler, HB: Hidrojen Bağı, TK: Tuz Köprüleri, PS: Pi Stack, vDW: van der Waals Etkileşimleri, YK: Yüzey Komplementeri, GS: Gömülü SASA)

R	Y	M	ÖE	HB	TK	PS	vDW	YK	GS
A:20:Arg	B:49:Glu B:168:Tyr B:172:Arg	2.7 Å 2.9 Å 3.5 Å	1x HB, 1x TK B:49:Glu 1x HB B:168:Tyr	2	1	0	0	62	5,24
A:3:Leu	B:162:Glu	2.9 Å	1x HB B:162:Glu	1	0	0	0	83	5,78
A:17:Tyr	B:167:Glu B:46:Val B:48:Leu B:168:Tyr B:164:Gly	2.8 Å 3.1 Å 3.6 Å 3.6 Å 3.9 Å	1x HB B:167:Glu	1	0	0		72	9,76
A:18:His	B:44:Asp	2.9 Å	1x HB B:44:Asp	1	0	0	0	37	6,9
A:41:Met	B:95:Lys	2.9 Å	1x HB B:95:Lys	1	0	0	0	83	9,29
A:79:Arg	B:92:Glu	2.9 Å	1x HB, 1x TK, 2x B:92:Glu'ya yakın	1	1	0	2	54	5,27
B:44:Asp	A:18:His A:85:Trp	2.9 Å 3.0 Å	1x HB A:18:His	1	0	0	0	47	5,24

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.4'ün devamı

R	Y	M	ÖE	HB	TK	PS	vDW	YK	GS
B:49:Glu	A:20:Arg	2.7 Å	1x HB, 1x TK A:20:Arg	1	1	0	0	34	4,92
B:92:Glu	A:79:Arg	2.9 Å	1x HB, 1x TK, 2x A:79:Arg'ye yakın	1	1	0	2	57	3,6
B:95:Lys	A:41:Met A:40:Arg	2.9 Å 3.9 Å	1x HB A:41:Met	1	0	0	0	82	6,23
B:162:Glu	A:3:Leu A:2:Arg A:9:Pro A:42:Leu	2.9 Å 3.4 Å 3.5 Å 3.7 Å	1x HB A:3:Leu	1	0	0	0	80	7,25
B:167:Glu	A:17:Tyr	2.8 Å	1x HB A:17:Tyr	1	0	0	0	54	8,57
B:168:Tyr	A:20:Arg A:22:Trp A:17:Tyr A:21:Arg	2.9 Å 3.2 Å 3.6 Å 4.0 Å	1x HB A:20:Arg 2x pi stack A:22:Trp	1	0	2	0	75	7,97
A:1:Ile	B:165:Leu B:164:Gly	3.1 Å 3.2 Å	1x B:164:Gly'ye yakın	0	0	0	1	84	10
A:2:Arg	B:165:Leu B:162:Glu	3.4 Å 3.4 Å		0	0	0	0	81	4,9
A:9:Pro	B:162:Glu B:161:Pro	3.5 Å 3.8 Å		0	0	0	0	75	4,6
A:16:Val				0	0	0	0	29	0

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.4'ün devamı

R	Y	M	ÖE	HB	TK	PS	vDW	YK	GS
A:19:Asp	B:47:Ala	3.2 Å	1x B:47:Ala'ya yakın	0	0	0	1	81	2,49
A:21:Arg	B:168:Tyr	4.0 Å		0	0	0	0	57	0,28
A:22:Trp	B:168:Tyr B:165:Leu B:164:Gly	3.2 Å 3.7 Å 3.9 Å	2x pi stack B:168:Tyr	0	0	2	0	84	6,35
A:40:Arg	B:95:Lys	3.9 Å		0	0	0	0	0	0,52
A:42:Leu	B:161:Pro B:163:Ala B:160:Gly B:162:Glu B:164:Gly	3.3 Å 3.5 Å 3.6 Å 3.7 Å 3.9 Å		0	0	0	0	82	9,18
A:43:Gly	B:160:Gly B:161:Pro	3.5 Å 3.9 Å		0	0	0	0	78	3,72
A:44:Phe	B:161:Pro	3.3 Å		0	0	0	0	88	2,87



Şekil 4.19. SRCR/L-Ferritin etkileşiminin olduğu rezidüler

Docking sonuçlarına göre etkileşim bölgesi belirlenen açık ve koyu mavi renklerle temsil edilen rezidüler SRCR domaini ve L-Ferritin arasındaki etkileşimin en iyi olduğu rezidülerdir. 16-22. Aminoasitler ve 79. Aminoasitler peptid dizaynları için seçilen hedef bölgelerdir.

4.6. SRCR Bölgesine Özgü Peptitlerin Tasarımı

4.6.1. SRCR domaini için tespit edilen bağlanma bölgelerine özgü tasarlanan peptidler

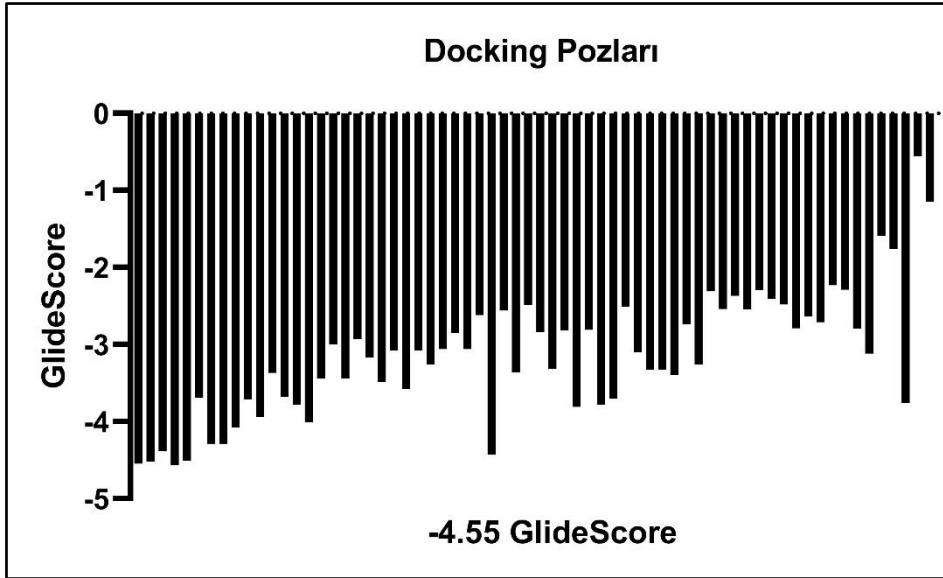
SRCR/L-Ferritin docking sonuçlarına göre SRCR domain / L-ferritin etkileşim bölgesi aminoasit rezidüleri ilaç dizaynı için hedef bölgeler olarak belirlenmiştir. 16-22. aminoasitler ve 79. aminoasitler etkileşimin en iyi olabileceği potansiyel rezidüler olduğundan peptidin özellikle bu bölgelere bağlanması önem arz etmektedir. SRCR / L-ferritin etkileşimini inhibe etmeye yönelik dizayn edilen 100 peptid diziliminden en iyi bağlanma enerjisine sahip olanı seçilerek tez çalışmasına devam edilmiştir.

Tasarlanan peptidler ile SRCR domaini ile olan etkileşimi belirlemek için Schrödinger yazılımındaki Glide modülü kullanılmıştır.

4.6.2. Peptit ve SRCR domain moleküler docking çalışması

Glide modülü ile çalıştırılan peptit SRCR domain docking çalışmasının sonucunda peptidin bağlanma gösterdiği pozlar ve bağlanma enerjileri bir dosya çıktısı olarak alınmıştır (Şekil 4.20, 4.21). SRCR-peptit docking çalışmaları algoritma dahili gerinim enerjisini birleştiren bir model yani enerji skoru (Emodel) kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve en iyi bağlanma verdiği skor kaydedilmiştir. Buna göre;

$$\text{En iyi Emodel} = -71.50 \text{ E} = -51.03 \text{ Eint} = 4.20 \text{ GlideScore} = -4.55$$



Şekil 4.20. Peptitin SRCR bölgesi üzerinde gerçekleştirdiği bağlanma pozları

Ancak biyolojik sistemlerde iki çözünmüş molekülün bağlı ve bağlı olmayan durumunu temsil eden iki durum arasındaki serbest enerji farkını hesaplamak tasarlanan peptitlerden SRCR bölgesine en iyi bağlanan tasarımı belirlemek açısından önemlidir.

Tez çalışmaları için denenecek olan peptitin MMGBSA dG Bağlama enerjisi -76.138 kcal/mol'dür. Peptidler için MMGBSA bağlanma enerjisinin en az -60 kcal/mol olması beklenmektedir.

Peptid-protein docking sonuçlarına göre, peptitin SRCR bölgesi ile etkileşim halinde olan aminoasit rezidüleri belirtilmiştir (Çizelge 4.5). SRCR L-ferritin etkileşim bölgesindeki 16-22. Aminoasit rezidülerini de içine alarak tasarlanan peptit bu etkileşim bölgesine bağlanmıştır.

Çizelge 4.5. Peptit SRCR etkileşim rezidüleri (R: Rezidü, Y: Yakınlık, M: Mesafe, OE: Özel Etkileşimler, HB: Hidrojen Bağı, TK: Tuz Köprüleri, PS: Pi Stack, vDW: van der Waals Etkileşimleri, YK: Yüzey Komplementeri, GS: Gömülü SASA)

R	Y	M	OE	HB	TK	PS	vDW	YK	GS
A:1:Tyr	B:2:Arg B:22:Trp	3.0 Å 3.3 Å	1x hb to B:2:Arg	1	0	0	0	85	1,55
A:2:Tyr	B:22:Trp B:17:Tyr B:20:Arg	3.2 Å 3.3 Å 3.6 Å	1x pi stack to B:17:Tyr	0	0	1	0	93	6,11
A:3:Asp	B:20:Arg B:22:Trp B:21:Arg	2.9 Å 3.2 Å 3.5 Å	1x hb to B:20:Arg 1x hb to B:22:Trp	2	0	0	0	91	3,01
A:4:Asp	B:2:Arg B:22:Trp	2.8 Å 3.9 Å	2x hb, 1x salt bridge to B:2:Arg	2	1	0	0	85	2,45
A:5:Trp	B:21:Arg B:15:Glu B:2:Arg B:60:Thr B:61:Gly B:22:Trp B:13:Arg B:62:Arg	2.8 Å 2.8 Å 3.1 Å 3.2 Å 3.2 Å 3.4 Å 3.5 Å 3.9 Å	1x hb to B:15:Glu 2x hb to B:21:Arg	3	0	0	0	84	6,55

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.5'in devamı

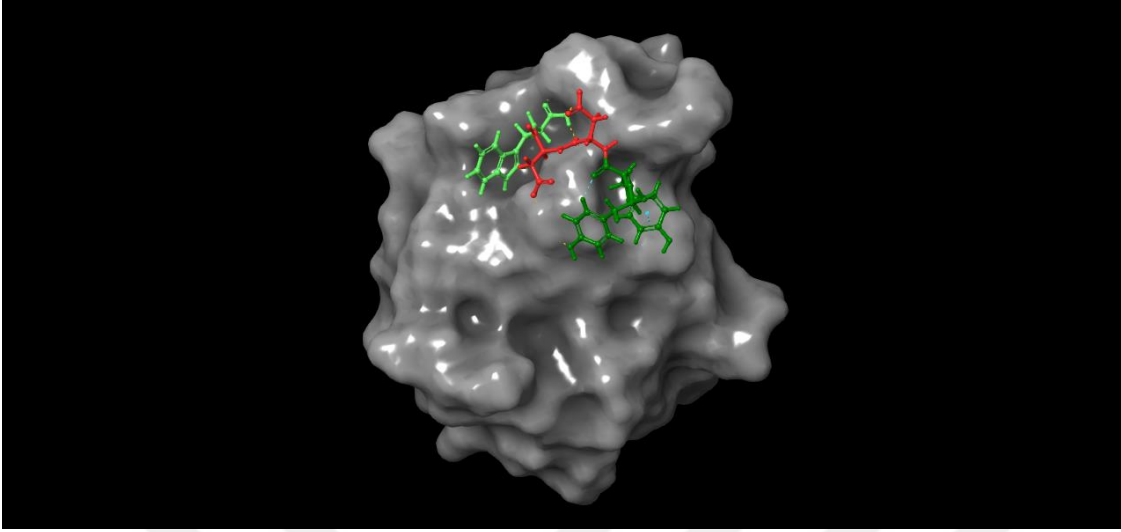
R	Y	M	ÖE	HB	TK	PS	vDW	YK	GS
B:2:Arg	A:4:Asp A:1:Tyr A:5:Trp	2.8 A 3.0 A 3.1 A	1x hb to A:1:Tyr 2x hb, 1x salt bridge to A:4:Asp	3	1	0	0	81	6,23
B:4:Val				0	0	0	0	0	0,86
B:13:Arg	A:5:Trp	3.5 A		0	0	0	0	82	5,38
B:15:Glu	A:5:Trp	2.8 A	1x hb to A:5:Trp	1	0	0	0	53	10
B:17:Tyr	A:2:Tyr	3.3 A	1x pi stack to A:2:Tyr	0	0	1	0	93	4,22
B:20:Arg	A:3:Asp A:2:Tyr	2.9 A 3.6 A	1x hb to A:3:Asp	1	0	0	0	91	1,8
B:21:Arg	A:5:Trp A:3:Asp	2.8 A 3.5 A	2x hb to A:5:Trp	2	0	0	0	85	3,07
B:22:Trp	A:2:Tyr A:3:Asp A:1:Tyr A:5:Trp A:4:Asp	3.2 A 3.2 A 3.3 A 3.4 A 3.9 A	1x hb to A:3:Asp	1	0	0	0	90	9,75

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.5'in devamı

R	Y	M	ÖE	HB	TK	PS	vDW	YK	GS
B:23:Gly				0	0	0	0	13	6,7
B:24:Thr				0	0	0	0	11	10
B:60:Thr	A:5:Trp	3.2 A		0	0	0	0	49	2,58
B:61:Gly	A:5:Trp	3.2 A		0	0	0	0	90	1,9
B:62:Arg	A:5:Trp	3.9 A		0	0	0	0	0	0

SRCR-peptit etkileşimi üç boyutlu olarak görselleştirilmiştir (Şekil 4.21).

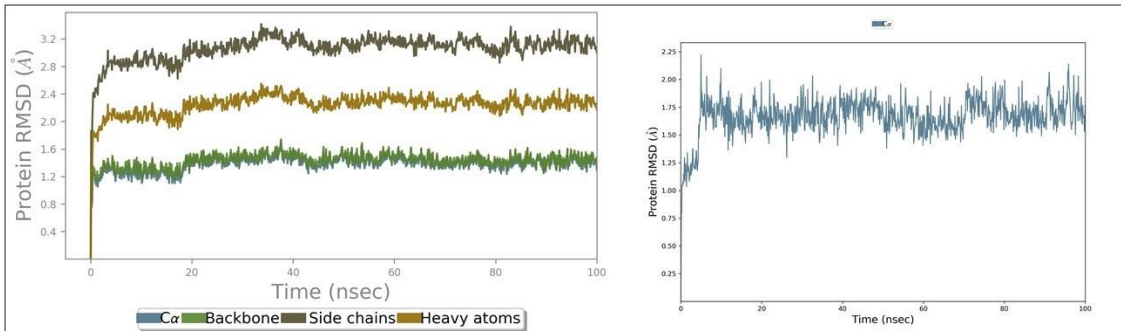


Şekil 4.21. SRCR-peptit etkileşiminin görseli (Gri yapı: SRCR bölgesi, yeşil ve kırmızı renkli yapı ise peptiti temsil etmektedir)

4.6.3. SRCR ve peptit docking sonuçlarının moleküler dinamik simülasyonla değerlendirilmesi

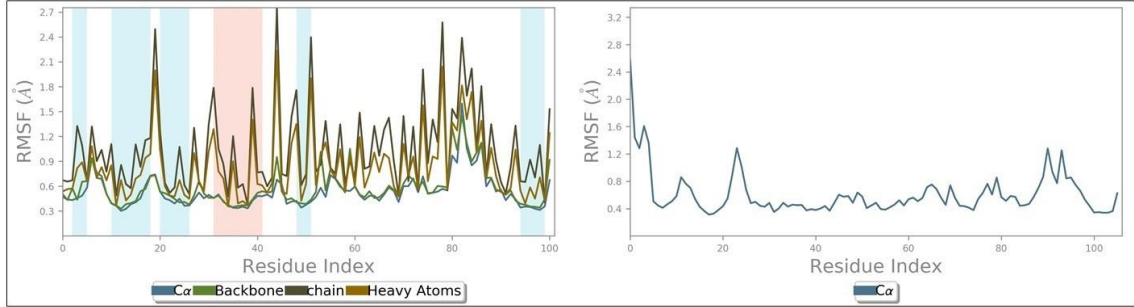
Peptit/SRCR docking sonucunu moleküler dinamik simülasyonda değerlendirmek için Schrödinger yazılımının Desmond modülü kullanılmıştır. SRCR proteininin peptit bağlanmadan önce ve peptit bağlandıktan sonraki RMSD (Şekil 4.22) ve RMSF (Şekil 4.23) değerleri karşılaştırıldı. Peptit SRCR bölgesine bağlanmadan önce ve bağlandıktan sonra ikincil yapı elemanlarındaki değişim grafiklendirilmiştir (Şekil 4.24).

RMSD, bir atom seçiminin yer değiştirmesindeki ortalama değişikliği ölçmek için kullanılır. RMSF, protein zinciri boyunca yerel değişiklikleri karakterize etmek için kullanışlıdır.



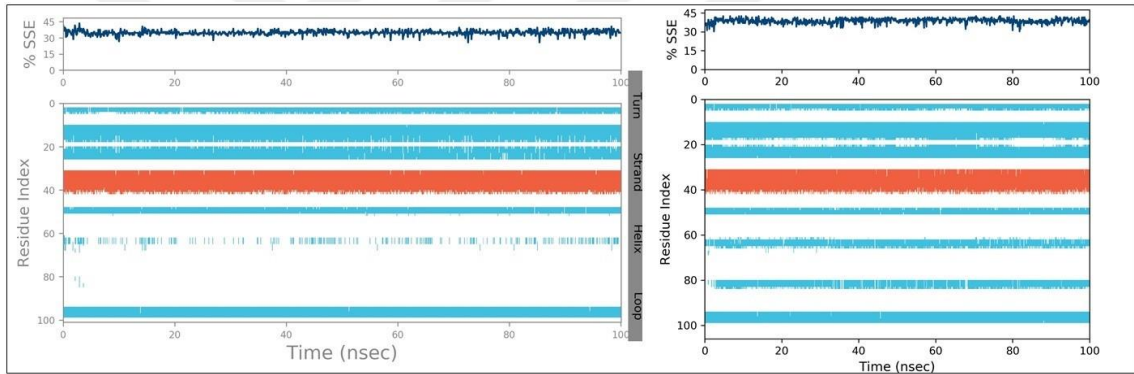
Şekil 4.22. SRCR bölgesinin tasarlan peptit bağlanmadan (solda) ve peptidin bağlandıktan sonraki (sağda) RMSD grafiği

Şekil 4.22'nin sağındaki grafikte simülasyonun ilk başlarındaki dalgalanma soldaki grafiğe göre daha belirgindir. Peptit ile simülasyon süresince SRCR proteini daha stabil davranmıştır.



Şekil 4.23. SRCR bölgesinin peptit bağlanmadan (solda) ve peptidin bağlandıktan sonraki (sağda) RMSF grafiği

Şekil 4.23'in sağındaki grafikte 0-20. ve yaklaşık 30. aminoasit rezidülerindeki dalgalanma SRCR ve peptitin birlikte gösterdikleri dinamik hareketin sonucudur.



Şekil 4.24. SRCR bölgesinin peptit bağlanmadan (solda) ve peptidin bağlandıktan sonraki (sağda) ikincil yapı elemanları durum grafiği

Alfa heliksler(kırmızı) ve beta sarmalları(mavi) gibi protein ikincil yapı elemanları (SSE) simülasyon boyunca izlenir. Simülasyon boyunca her bir yörünge çerçevesi için SSE bileşimini özetlemektedir. Böylece her rezidü ve zaman içindeki SSE ataması izlenebilmektedir.

Şekil 4.23'ün solundaki grafik ile karşılaştırıldığında sağ taraftaki grafikte, 60-80. aminoasit rezidülerinin belirgin bir şekilde simülasyon süresince atandığı görülmektedir. Peptit SRCR domain'ine bağlanarak, SRCR proteininin özellikle ikincil yapılarına simülasyon süresi boyunca daha stabil kalmasına katkı sağladığı söylenebilir.

4.6.4. Peptitin farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerinin tahmini

Peptitin sergilediği farmakokinetik ve farmakolojik özellikler raporlanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6. Peptitin farmakokinetik ve farmakolojik özellikleri

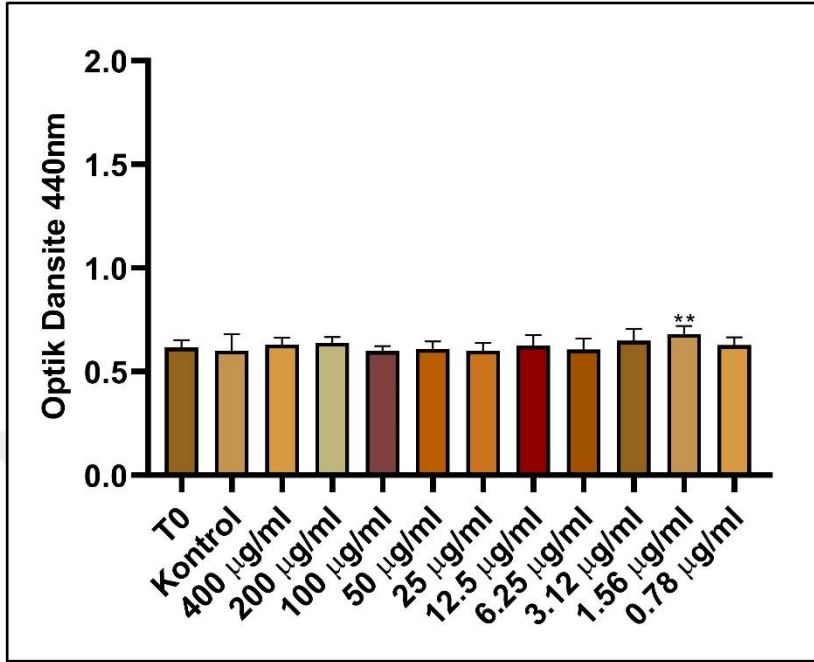
Farmakokinetik ve Farmakolojik Özellikler	Peptit
Moleküler Ağırlık	760.75 g/mol
Suda Çözünürlük	
Çözünürlük	1.53e-02 mol/l
Çözünme Derecesi	Yüksek
Farmakokinetik Özellikleri	
Gastrointestinal Emilim	Düşük
Kan Beyin Bariyerini Geçme	Hayır
CYP1A2 inhibitörü	Hayır
CYP2C19 inhibitörü	Hayır
CYP2C9 inhibitörü	Hayır
CYP2D6 inhibitörü	Hayır
CYP3A4 inhibitörü	Hayır
Sentetik Erişebilirlik (1 en kolay,10 en zor)	5.70
Toksisitesi	Yok

Çizelge 4.7’da ki verilere göre peptitin suda çözünme derecesinin yüksek olması *in vitro* çalışmalar için bir kolay sağlamaktadır. Karaciğerde bulunan önemli özellik de detoksifikasyon enzimlerini inhibe etmemesi peptitin toksik özellikler sergilemediğini göstermektedir. Bu da peptitin güvenle *in vitro* denemelerde ve daha sonra *in vivo* denemelerde kullanılabileceğini gösteren parametrelerdendir.

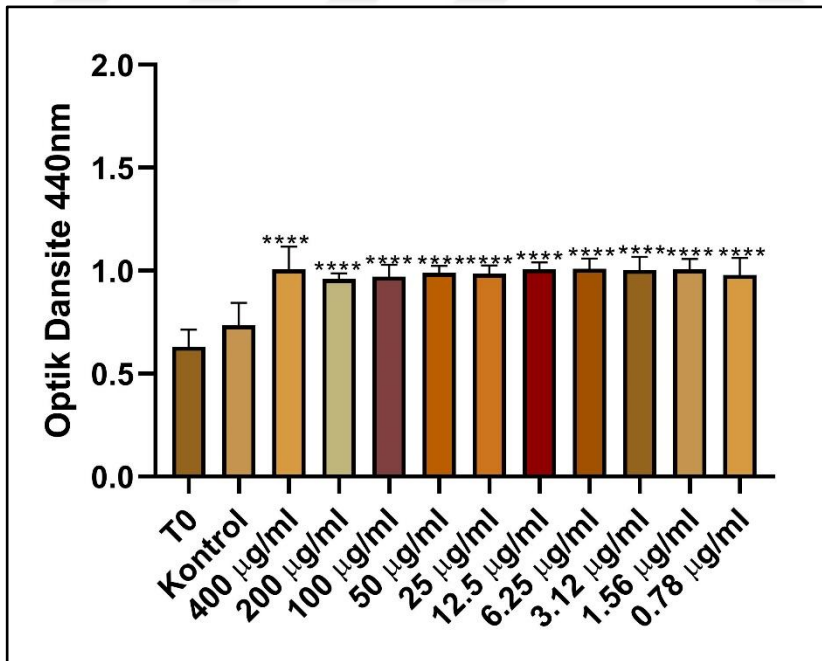
4.7. Peptitin MCF7 Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik ve Proliferatif Etkiler

Peptitin MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri kendi içinde sekiz tekrarlı her biri birbirinden bağımsız dört deney seti şeklinde gerçekleştirilmiştir. Peptit MCF7 hücreleri üzerinde farklı doz ve farklı zaman aralıklarında sitotoksik ve proliferatif etkiler sergilemiştir. Peptitin farklı dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik üç inkübasyon süresi sonunda

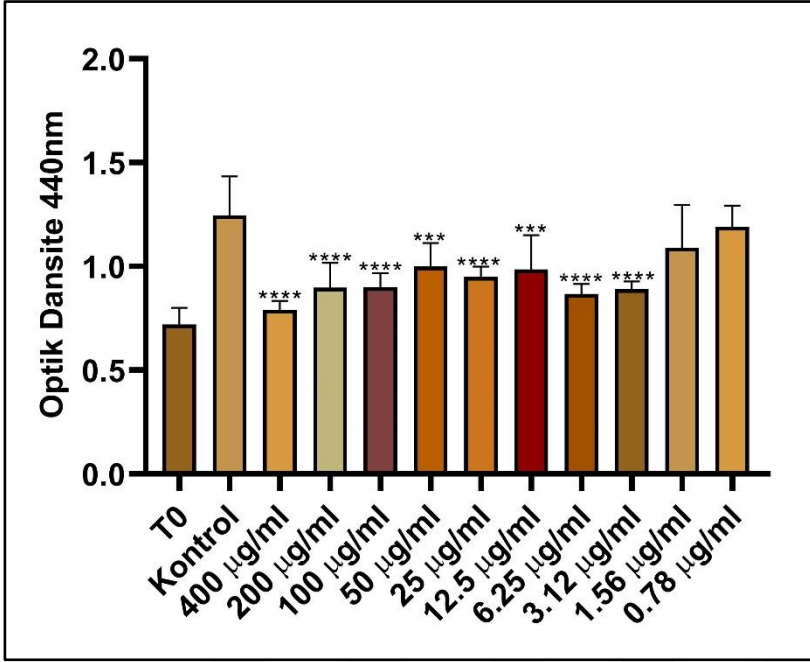
MCF7 hücrelerine gösterdiği etkiler aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38).



Şekil 4.25. Peptitin 1. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (**, $p \leq 0.01$; kontrole kıyasla)

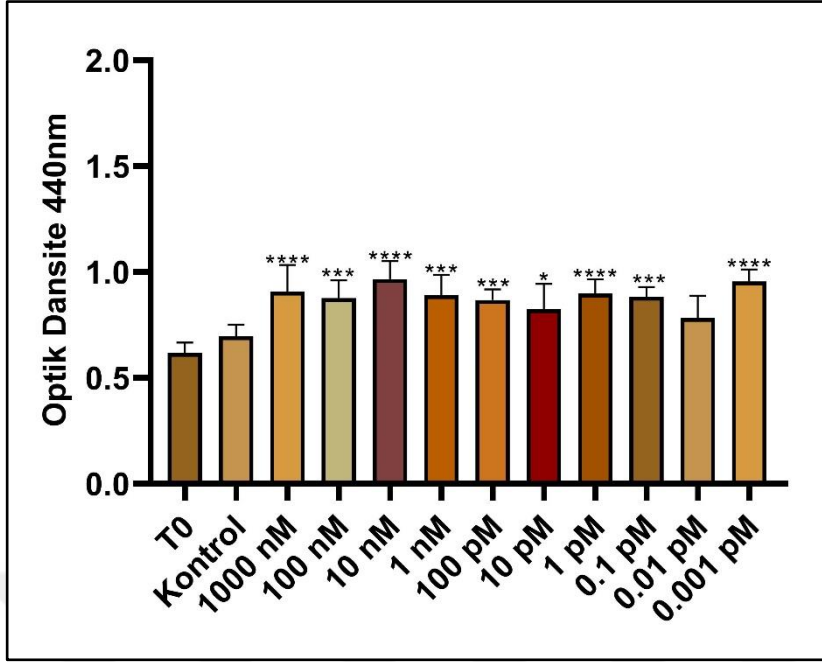


Şekil 4.26. Peptitin 1. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla)

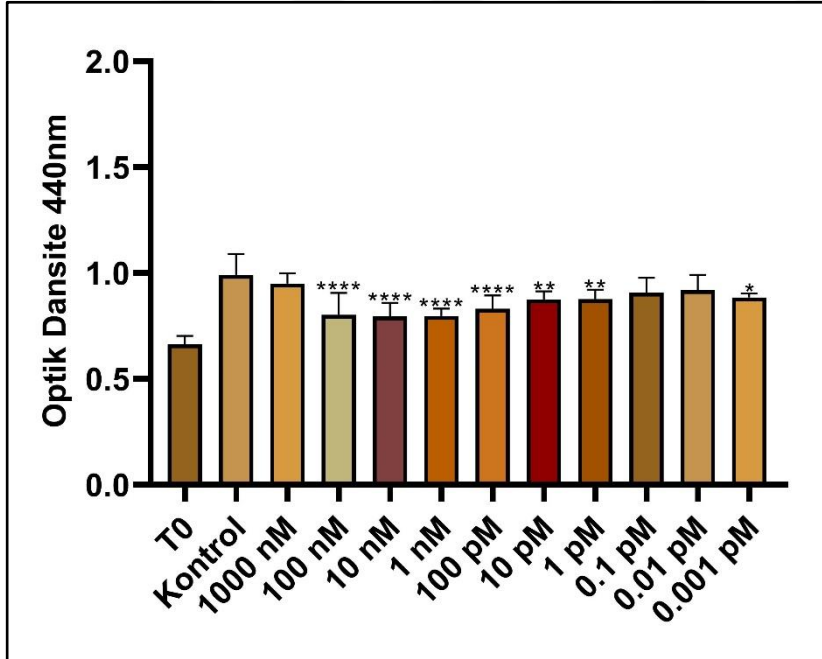


Şekil 4.27. Peptitin 1. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; kontrole kıyasla)

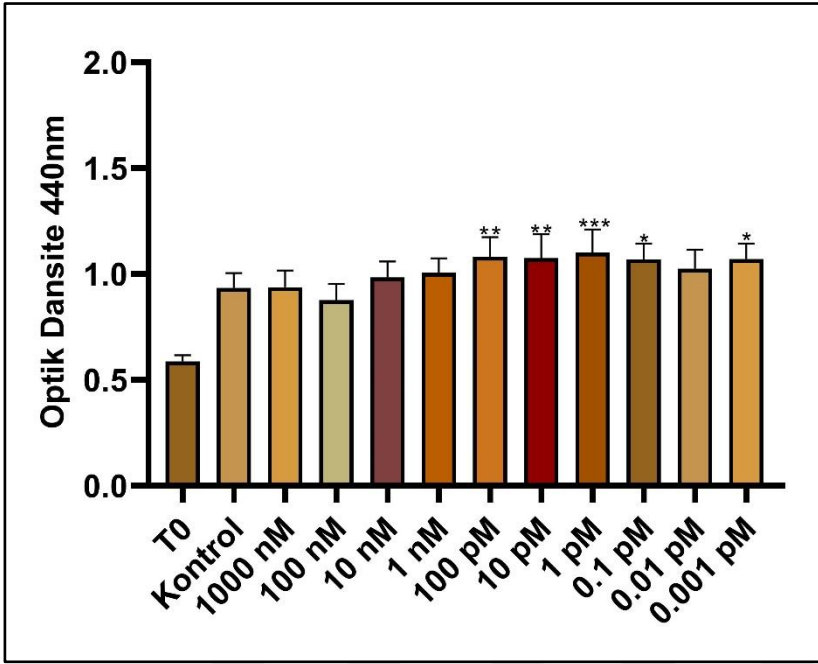
Şekil 4.25, 4.26 ve 4.27’te ki set 1 sonuçlarına peptit 24 saatlik inkübasyon süresinde MCF7 hücrelerinde sadece 3.12 µg/ml’lik dozda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. 48 saatlik inkübasyon süresinde ise tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonuna gelindiğinde peptit MCF7 hücrelerinde bu anlamlı artış yerini istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa bırakmıştır. 400 -200 -100 -50 -25 -12.5 -6.25 ve -3.12 µg/ml’lik peptit dozları kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır.



Şekil 4.28. Peptitin 2. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla)

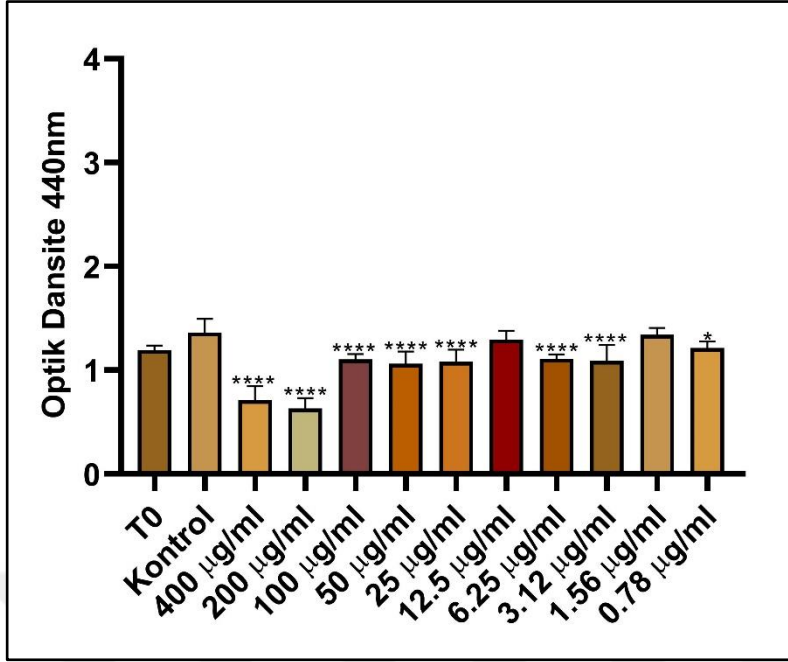


Şekil 4.29. Peptitin 2. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla)

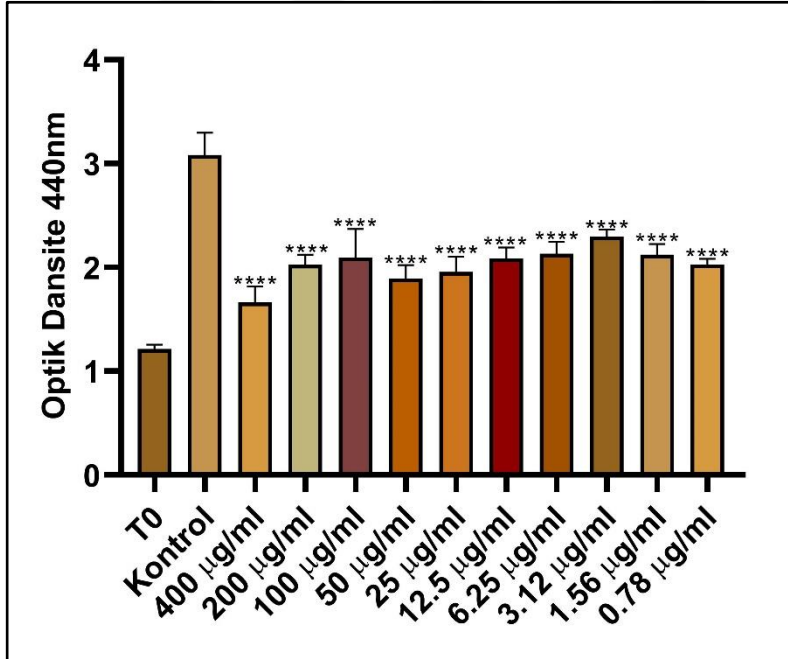


Şekil 4.30. Peptitin 2. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$ kontrole kıyasla)

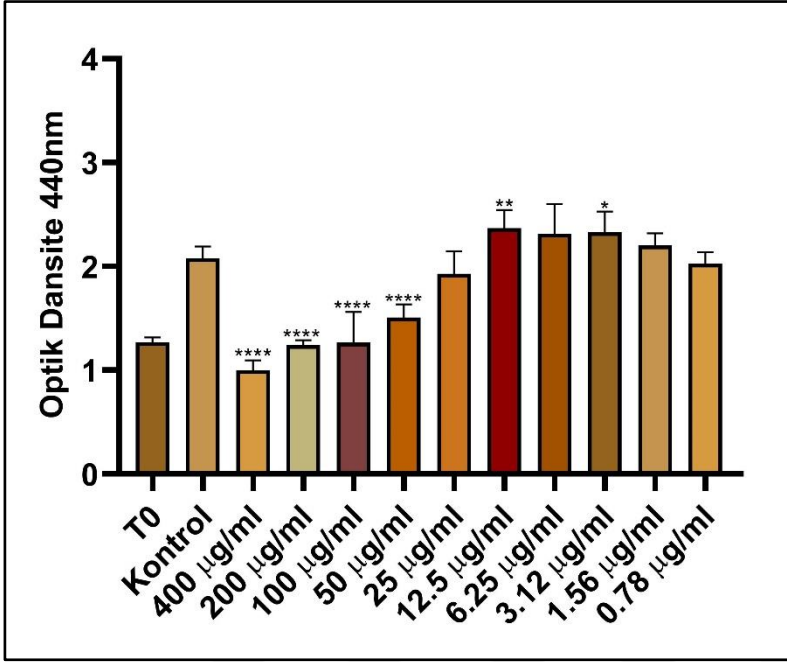
Peptit özgün bir tasarım olduğu için farklı konsantrasyonlarda (1000nM, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM, 0.1pM, 0.01pM, 0.001pM) MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerine gösterdiği etkiler Şekil 4.27, 4.28 ve 4.29’de gösterilmiştir. Buna göre peptit ilk 24 saatte 0.01 pM’lık konsantrasyon hariç diğer tüm dozlar kontrole kıyasla proliferatif etki göstermektedir. 48. saatte, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM ve 0.001pM’lik konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı bir sitotoksik etki göstermiştir. 72. saatte bu sitotoksik etki ortadan kalkarak 100pM, 10pM, 1pM, 0.1pM ve 0.001pM’lik dozlarda proliferatif bir etki göstermiştir. Sonraki doz çalışmalarına set 1’de kullanılan dozlarla devam edilmiştir.



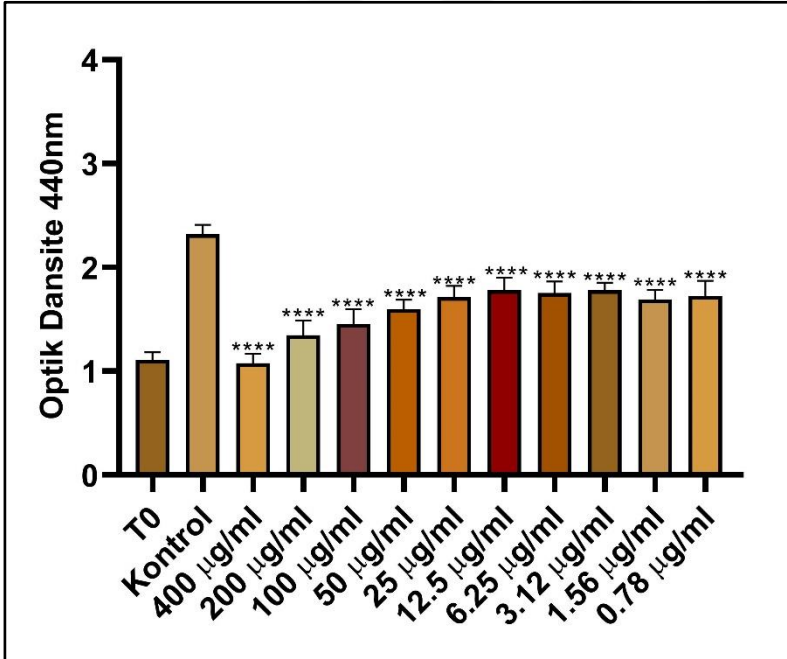
Şekil 4.31. Peptitin 3. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değışikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla)



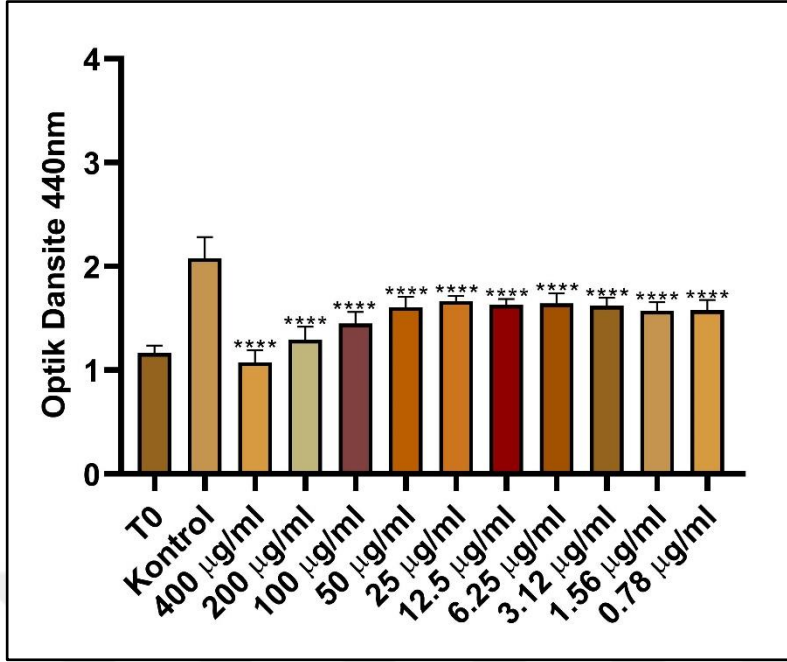
Şekil 4.32. Peptitin 3. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değışikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla)



Şekil 4.33. Peptitin 3. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla)

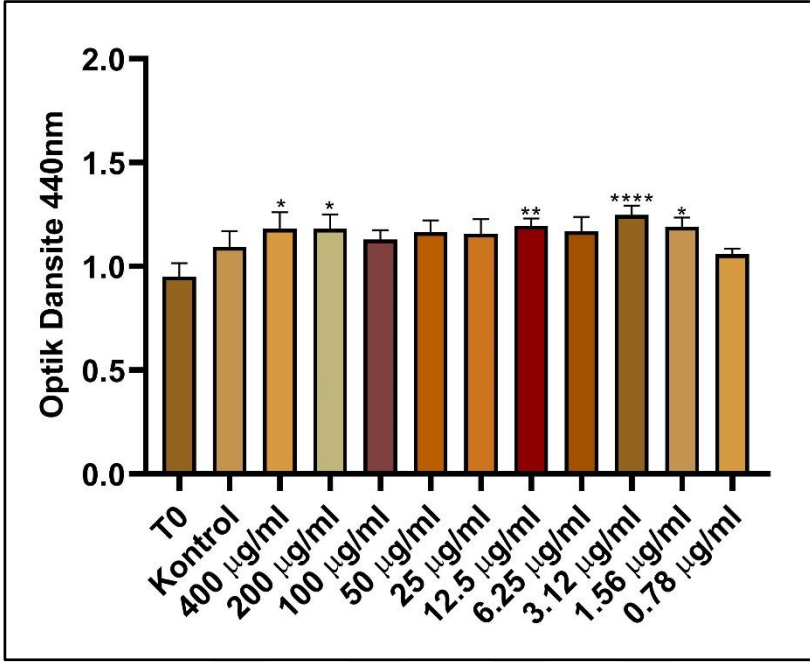


Şekil 4.34. Peptitin 3. Set 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla)

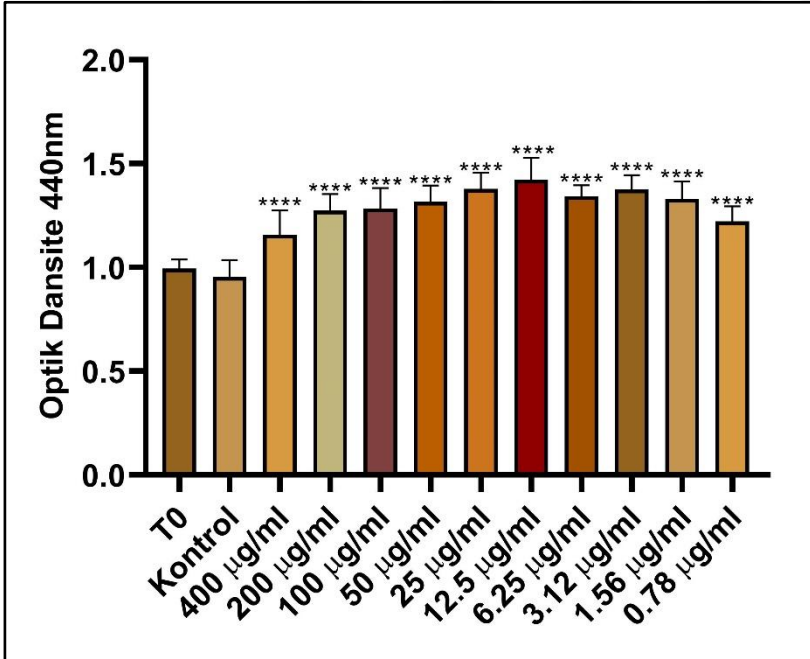


Şekil 4.35. Peptitin 3. Set 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla)

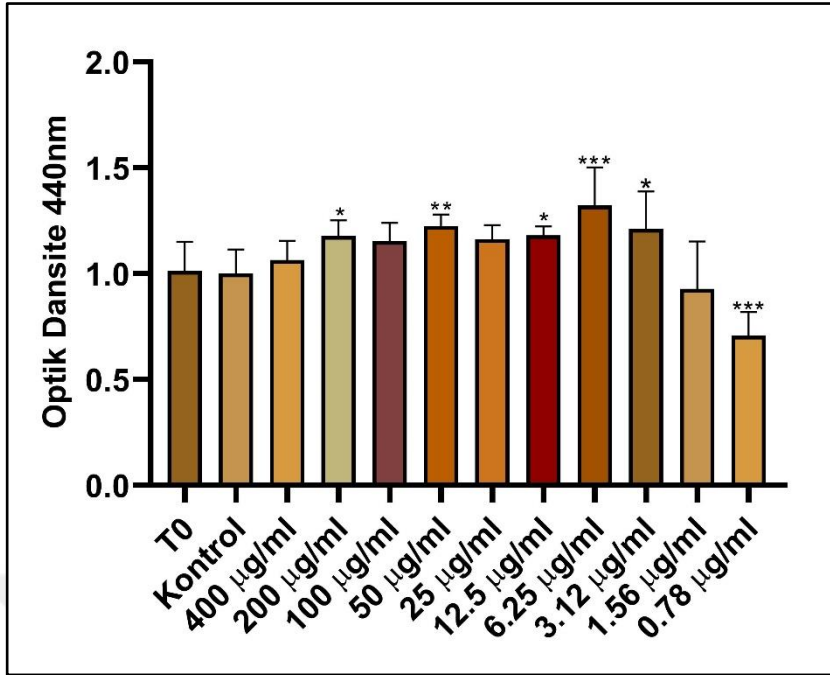
Şekil 4.31, 4.32, 4.33, 4.34 ve 4.35'te gösterildiği gibi set 3'te üç inkübasyon süresine ek olarak 96 ve 120 saatlik inkübasyon süreleri de eklenerek peptitin etkisi araştırıldı. Buna göre 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 12.5 ve 1.56 µg/ml'lik dozlar hariç diğer tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görünmektedir. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir sitotoksik etki görülmüştür. 72 saat sonunda ilk dört doz sitotoksik bir etki gösterirken diğer dozlarda bir artış görülmüştür. 12.5 ve 3.12 µg/ml'lik dozlarda anlamlı bir artış vardır. Ancak 96 ve 120 saatlik inkübasyon sürelerinin hepsinde de tüm konsantrasyonlarda peptit MCF7 hücrelerinde kontrole kıyasla anlamlı bir sitotoksiste göstermiştir.



Şekil 4.36. Peptitin 4. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla)



Şekil 4.37. Peptitin 4. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (****, $p \leq 0.00001$; kontrole kıyasla)

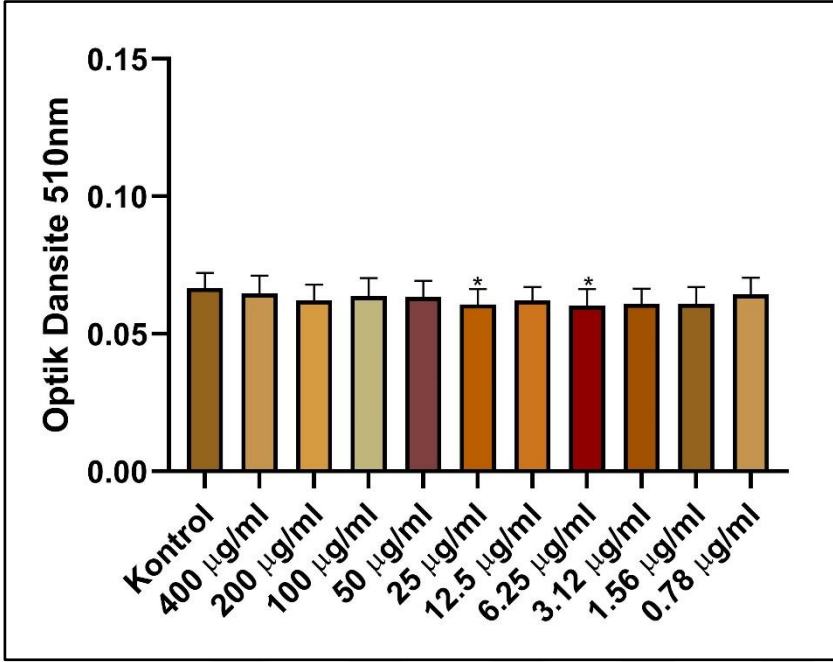


Şekil 4.38. Peptitin 4. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisi (***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla)

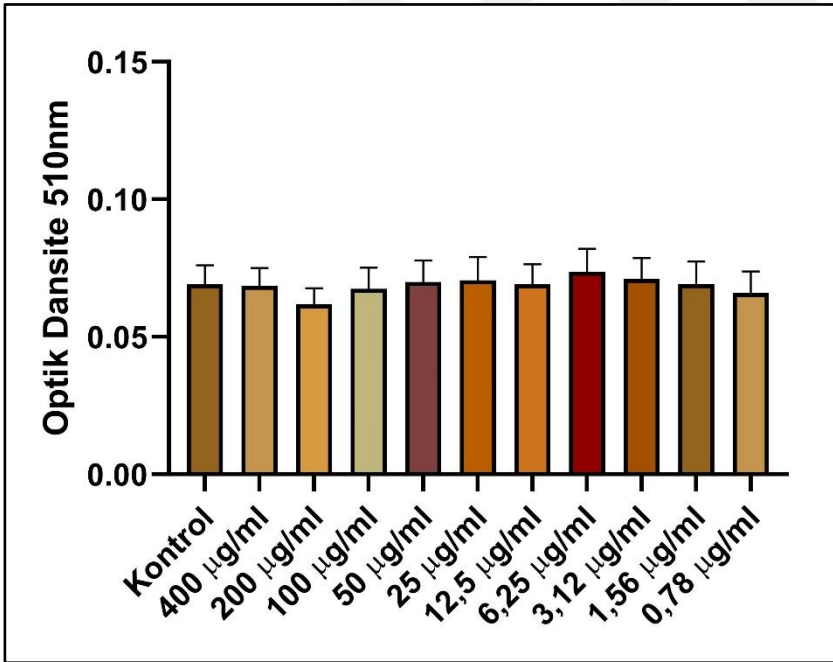
Set 4'ün 24 saatlik inkübasyonu sonunda 400 -200 -12.5 -3.12 -1.56 µg/ml'lik konsantrasyonlarında anlamlı bir artış görülürken 48 saatin sonunda bu artış tüm dozlara yansımıştır. 72 saatin sonunda bu artış yavaşlamış ancak bazı dozlarda (200 -50 -12.5 -3.12 µg/ml) anlamlı olmaya devam etmiştir. 0.78 µg/ml'lik doz ise kontrole kıyasla anlamlı bir azalış sergilemiştir.

4.8. Peptitin MCF7 Hücre Hattının Canlılığı Üzerine Gösterdiği Etkinin Sülforadamin B Testi Sonuçları

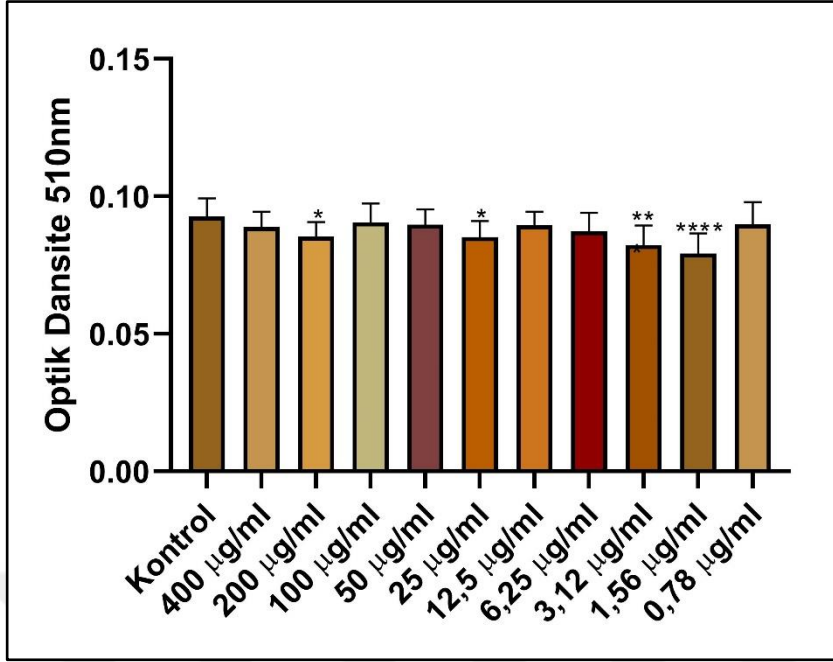
Peptitin MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri kendi içinde sekiz tekrarlı her biri birbirinden bağımsız dört deney seti şeklinde SRB testi ile de gösterilmiştir. Peptit MCF7 hücreleri üzerinde farklı doz ve farklı zaman aralıklarında sitotoksik etkiler sergilemiştir (Şekil 4.39, 4.40, 4.41).



Şekil 4.39. Peptitin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değışikliğe etkisinin SRB testi grafiğı (*, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla)



Şekil 4.40. Peptitin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değışikliğe etkisinin SRB testi grafiğı

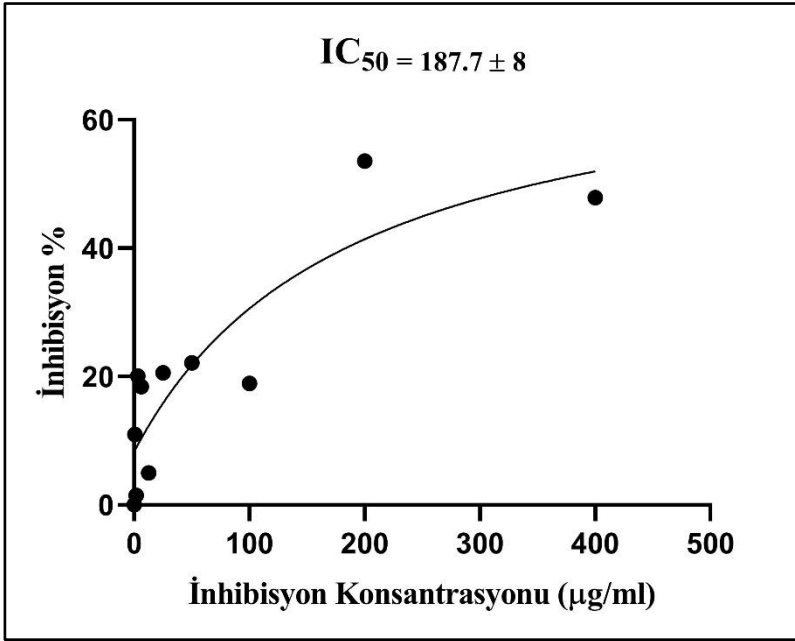


Şekil 4.41. Peptitin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, MCF7 hücre canlılığındaki değişikliğe etkisinin SRB testi grafiği (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla)

Peptitin MCF7 hücrelerine uygulanmasından sonraki 24 saat sonunda 25 ve 6.25µg/ml'lik dozlarında kontrole kıyasla anlamlı bir azalış görülmektedir. Şekil 4.38'deki sonuç bir önceki bölümde açıklanan (Şekil 4.31) set 3'ün 24 saat inkübasyon grafiği ile uyumludur, burada da artışlar ve istatistiksel olarak anlamlı azalışlar söz konusudur. Şekil 4.40'ta gösterilen 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda peptitin anlamlı bir etki sergilemediği görülmüştür ancak dozlarda kontrole yakın ve kontrolün üstünde artışlar bulunmaktadır. Şekil 4.41'de ki grafikte 72 saat sonunda peptit set 1 (Şekil 4.27) ve set 4 (Şekil 4.38)'te ki 72 saat grafikleri ile benzer sonuçlar sergilemektedir.

4.9. Peptitin MCF7 hücrelerindeki Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 Protein Miktarı Üzerine Etkileri

ELISA çalışmalarına geçmeden önce peptitin MCF7 hücreleri üzerine gösterdiği etkinin yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu IC_{50} grafiği Şekil 4.40'ta gösterilmiştir. Buna göre ELISA ve Western blotlama çalışmalarında 2X IC_{50} , IC_{50} ve 1/2X IC_{50} konsantrasyonları kullanılmıştır.

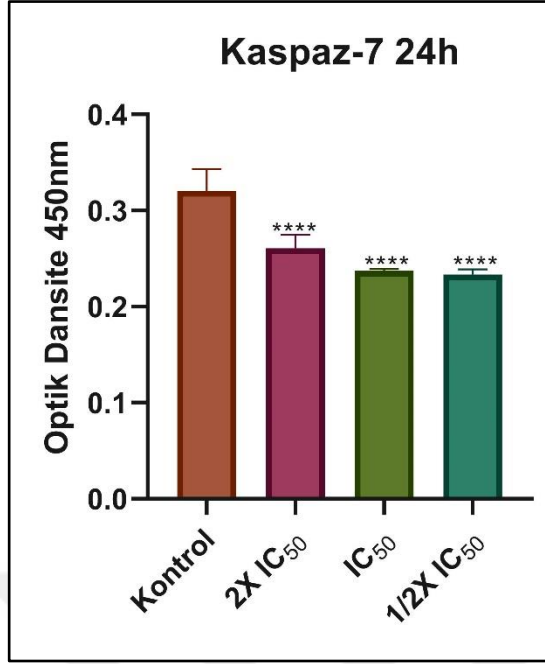


Şekil 4.42. Peptitin MCF7 hücrelerindeki IC₅₀ konsantrasyonu

4.9.1. Peptitin MCF7 hücrelerindeki Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 protein miktarının ELISA test sonuçları

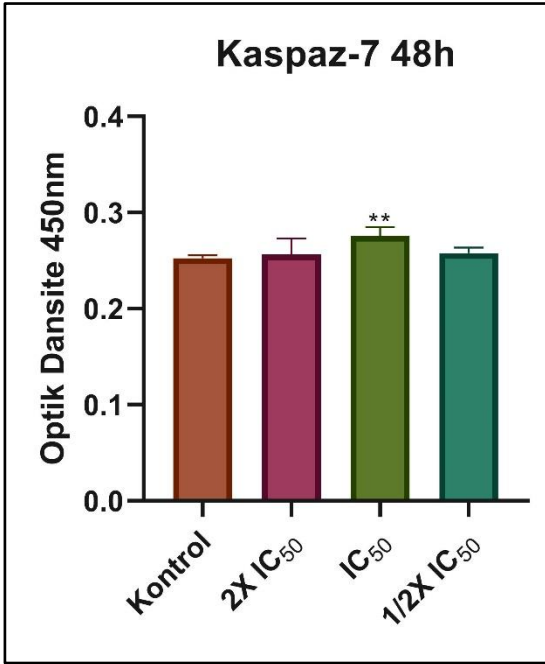
Peptitin MCF7 hücrelerindeki farklı inkübasyon sürelerinde Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 enzim miktarları üzerinde farklı etkiler göstermiştir (Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.45, Şekil 4.46, Şekil 4.47, Şekil 4.48).

Şekil 4.43'te 24. saat inkübasyon sonuçlarına göre kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı kaspaz-7 protein miktarında azalış görülmüştür ($p \leq 0.0001$, ****).



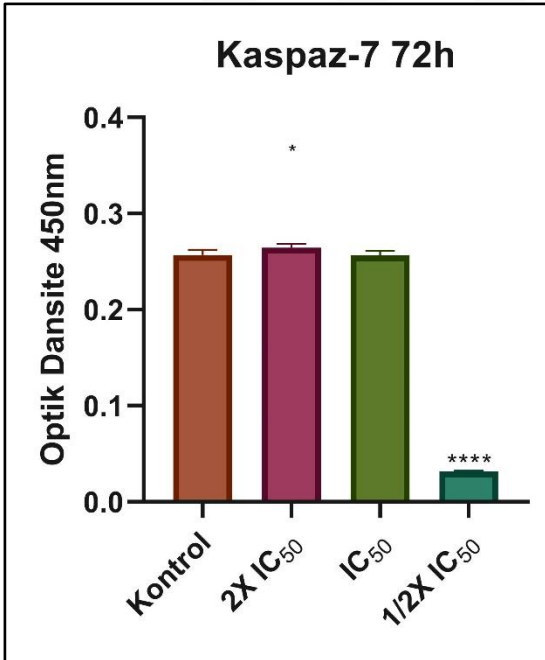
Şekil 4.43. 24 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-7 miktarı üzerine etkisi

Şekil 4.44'te gösterilen 48. saat inkübasyon sonuçlarına göre peptitin yalnızca IC₅₀ dozunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p \leq 0.01$, **).



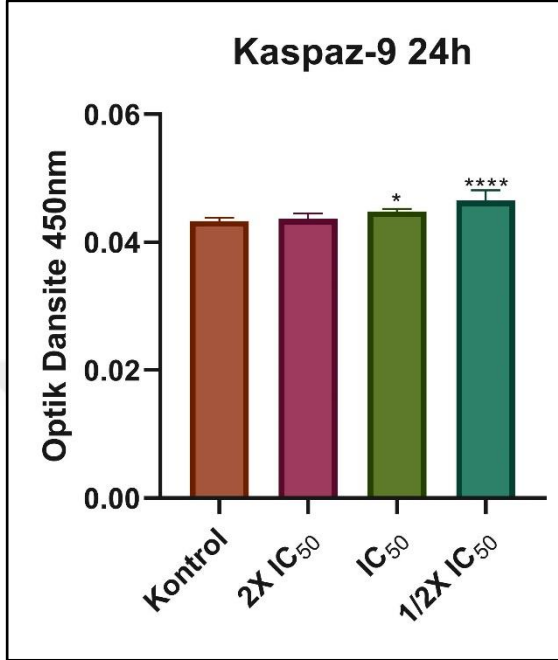
Şekil 4.44. 48 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-7 miktarı üzerine etkisi

Şekil 4.45'te ki 72. saat inkübasyon sonuçlarına göre peptitin 2X IC₅₀ dozunda anlamlı bir artış görülürken, 1/2X IC₅₀ dozunda anlamlı bir azalış ortaya çıkmıştır ($p \leq 0.0001$, ****, $p \leq 0.05$, *).



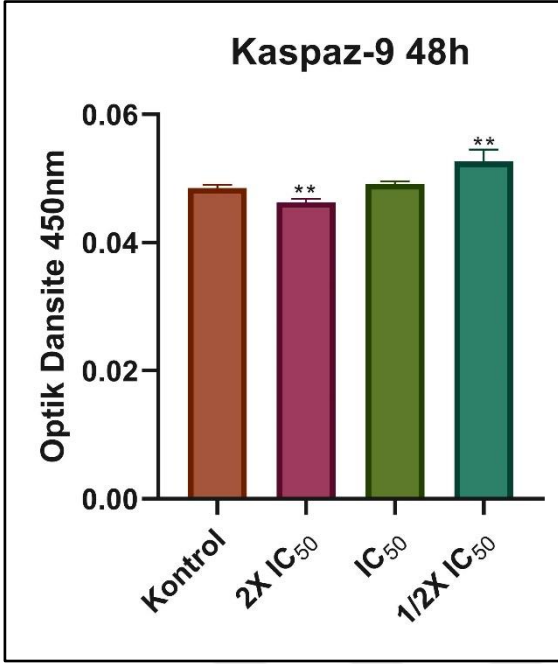
Şekil 4.45. 72 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-7 miktarı üzerine etkisi

Şekil 4.46’da Kaspaz-9 protein miktarları MCF7 hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla 24. saatlik inkübasyonda IC₅₀ ve 1/2X IC₅₀ dozlarında anlamlı bir artışa sahiptir ($p \leq 0.05, *$; $p \leq 0.0001, ****$).



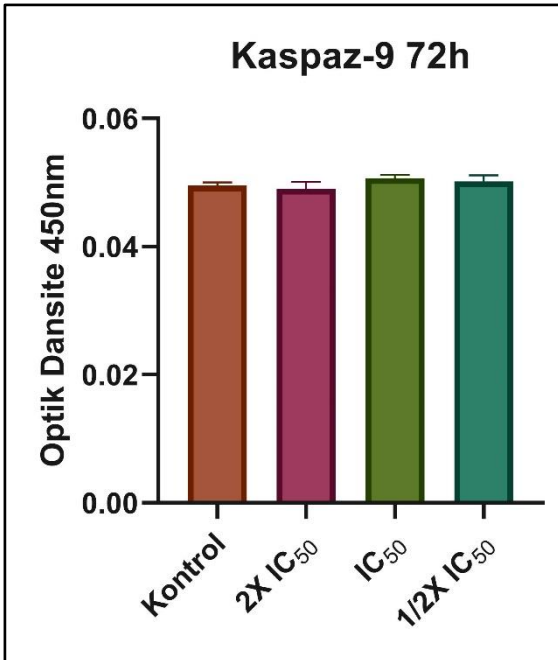
Şekil 4.46. 24 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-9 miktarı üzerine etkisi

Şekil 4.47’de 48. Saat inkübasyonu sonunda ise yalnızca peptitin 2X IC₅₀ dozunda kaspaz-9’un miktarı açısından anlamlı bir azalış varken 1/2x IC₅₀ dozunda anlamlı artış görülmüştür ($p \leq 0.01, **$).



Şekil 4.47. 48 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-9 miktarı üzerine etkisi

Şekil 4.48’de peptit 72 saatlik inkübasyon sonunda MCF7 hücrelerinde kaspaz-9 protein miktarlarında kontrole kıyasla herhangi bir değişim olmamıştır.

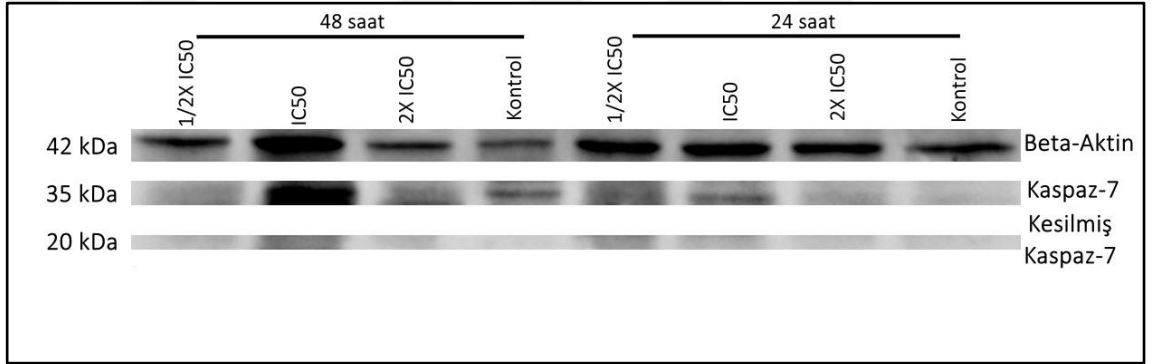


Şekil 4.48. 72 saat inkübasyon sonunda peptitin MCF7 hücrelerinde Kaspaz-9 miktarı üzerine etkisi

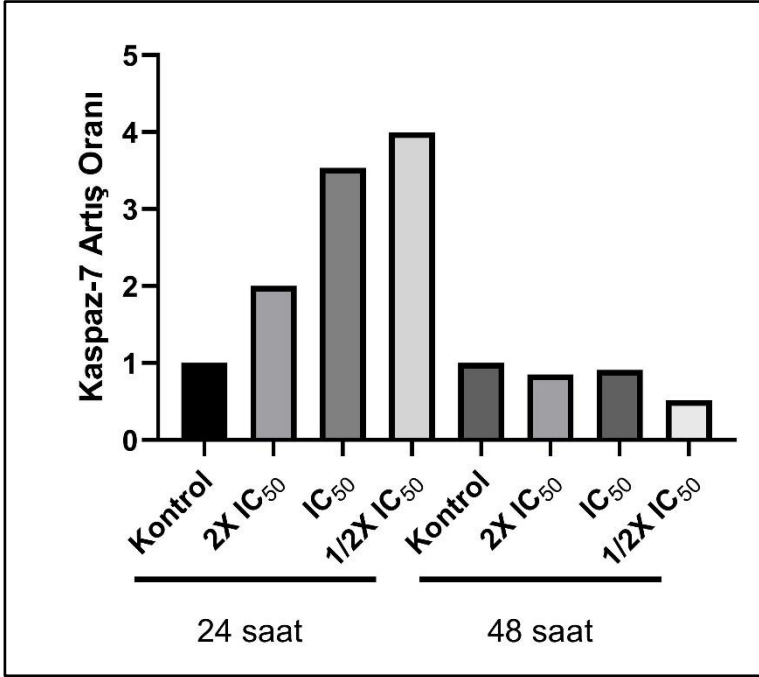
ELISA test sonuçlarına göre peptit MCF7 hücrelerindeki sitotoksik etkisini apoptozun içsel yolağı ile başarıyor gibi görünmektedir. Kaspaz-9, apoptozomun oluşması ile hareket ederek hücre ölümünün başlatıcısı olarak görev yapan en önemli kaspazdır. Kaspaz-7 ise başlayan bu apoptozun devam ettirilerek hücrenin belirli bir program çerçevesinde ölümünü devam ettiren kaspazdır. Her iki kaspaz seviyesinin belirli peptit dozlarındaki artışı peptitin MCF7 hücrelerini apoptoz ile öldürdüğünü bize göstermektedir.

4.10. Western Blot Sonuçları

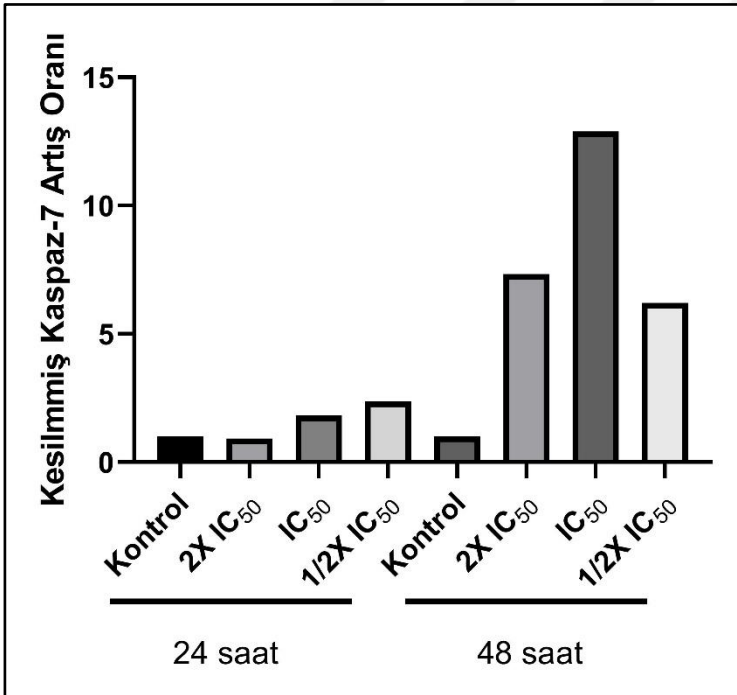
Belirlenen peptit dozlarının MCF7 hücrelerinde 24. ve 48. saat inkübasyon süreleri sonunda kaspaz-7 ve kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarı seviyesinde değişimler göstermiştir (Şekil 4.49, Şekil 4.50, Şekil 4.51).



Şekil 4.49. Peptit dozlarının MCF7 hücrelerinde iki farklı inkübasyon süreleri sonunda kaspaz-7 ve kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarlarındaki değişimin bant görüntüsü



Şekil 4.50. MCF7 hücrelerinde peptit dozlarının kaspaz-7 enzim miktarları üzerindeki değişimi



Şekil 4.51. MCF7 hücrelerinde peptit dozlarının kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarları üzerindeki değişimi

Peptitin belirlenen üç IC_{50} dozu MCF7 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kaspas-7 enzim miktarını arttırmıştır. Kontrole kıyasla kaspaz-7 enzim miktarı 2X IC_{50} dozunda 2 kat, IC_{50} dozunda 3.5 kat ve 1/2X IC_{50} dozunda 3.9 kat artmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise kontrole kıyasla kaspaz-7 enzim miktarı 2X IC_{50} dozunda 0.8 kat, IC_{50} dozunda 0.9 kat ve 1/2X IC_{50} dozunda 0.5 kat artmıştır.

Aynı şekilde kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarı 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 2X IC_{50} dozunda 0.9 kat, IC_{50} dozunda 1.8 kat ve 1/2X IC_{50} dozunda 2.3 kat artmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise 2X IC_{50} dozunda 7.3 kat, IC_{50} dozunda 12.8 kat ve 1/2X IC_{50} dozunda 6.2 kat artmıştır. 24. saat 1/2X IC_{50} dozunda kaspaz-7 miktarı ve 48. saat IC_{50} dozunda kesilmiş kaspaz-7 miktarı en yüksek orana sahiptir.

Peptitin ilk 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası kaspaz-7 miktarındaki artışı 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kesilmiş kaspaz-7 miktarının artışı ile devam etmiştir. ELISA sonuçlarında ilk 24 saatte kaspaz-7 miktarındaki artış western blot sonuçları ile farklılık göstermektedir. Ancak kesilmiş kaspaz-7 miktarındaki artış hücrelerin programlı ölümünün gerçekleştiğine işaret etmektedir.

5. TARTIŞMA

Önceki bölümlerde ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi günümüzde kanser için başlıca tedavi stratejileri arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi yer almaktadır. Bu mevcut klinik tedavi yöntemlerinin kendi avantajları, dezavantajları ve uygulama alanları bulunmaktadır. Tek bir tedavi yönteminin tatmin edici iyileştirici etkilere ulaşması zordur ve kombine tedavi bir dereceye kadar daha iyi bir genel tedavi sunabilir. Bu nedenle, yeni tedavi yöntemlerinin veya anti-tümör ilaçlarının araştırılması-geliştirilmesi acil ve karşılanmamış bir ihtiyaçtır.

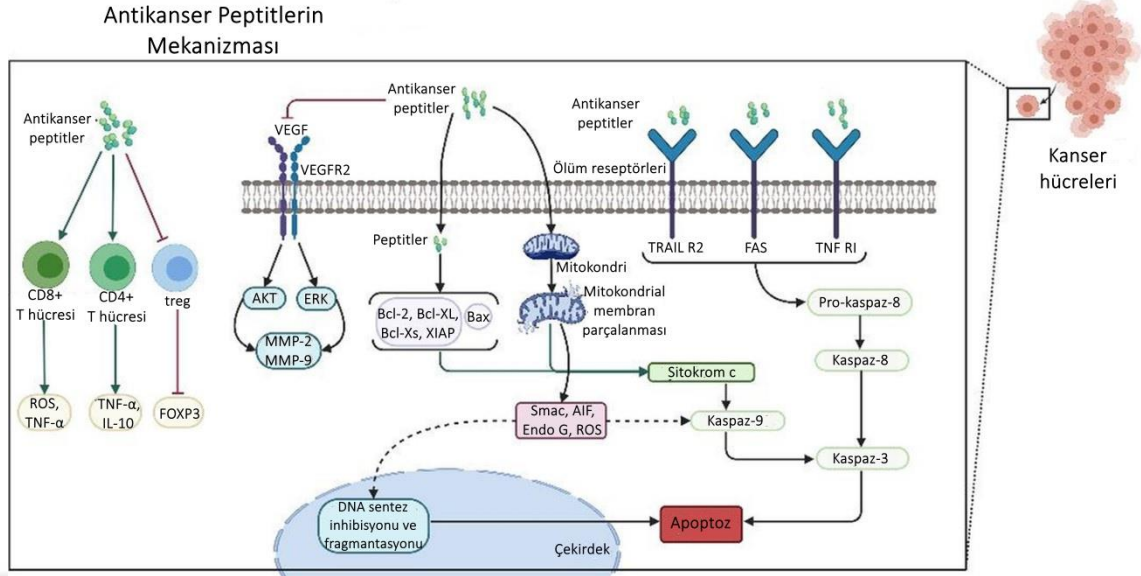
Anti-kanser peptidler kanser inhibisyonu alanında önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, bryostatin ailesinin en bol bulunan ve en iyi çalışılmış peptidlerinden biri olan Bryostatin 1, malign melanom, lenfoma ve yumurtalık karsinomu olan hastalarda Faz I çalışmalarında anti-tümör aktivite göstermiştir (Kollár vd. 2014; Wali vd. 2019). Aplidin (plitidepsin), tamamlanan Faz I klinik çalışmalarında düşük toksisite ile klinik çalışmalarda iyi tolere edilmektedir ve Faz II çalışmaları şu anda devam etmektedir. Bir Faz II klinik çalışmasında aplidin, ileri medüller tiroid karsinomu, ileri malign melanom, küçük hücreli akciğer kanseri ve ileri renal hücreli karsinoma karşı test edilmiştir (Kitagaki vd. 2015). Kasım 2019 itibarıyla, 20'den fazla ACP FDA ve EMA tarafından onaylanmıştır. Kyprolis, SomaKit TOC, Lutathera ve Gallium Dotatoc Ga68 gibi ACP'ler son yıllarda piyasaya sürülmüştür (Pan vd. 2020).

Giriş mekanizmaları baz alınarak peptitler biyolojik hedeflerine göre de 3 gruba ayrılırlar (Şekil 5.1).

1. Sinyal iletim yollarını hedefleyenler
2. Hücre döngüsünün regülasyonunu hedefleyenler
3. Hücre ölüm yollarını hedefleyenler (Bidwell ve Raucher 2009; Raucher ve Ryu 2015; Chiangjong vd. 2020).

Meme kanseri hücreleri antikanser ilaçlara karşı daha dirençli hale geldikçe, araştırmacılar bunları tedavi etmek için yeni yollar aramaktadırlar. Bu noktada, peptit tedavisi katı tümörler, özellikle de meme kanseri için uygulanabilir bir tedavi seçeneği olarak ortaya çıkmıştır. Peptitler, tümör hücrelerinin yüzeyine hassas bir şekilde bağlanmaları, düşük moleküler ağırlıkları ve normal hücrelere karşı düşük toksisiteleri nedeniyle cazip tedavilerdir (Lau ve Dunn 2018; Ahangarzadeh vd. 2019).

Meme kanseri hücrelerinde taşıma ajanlarının inhibitörleri olarak terapötik peptitler geliştirilmiştir. Transkripsiyon faktörleri (TF'ler) belirli hücrelerdeki gen ifadesinin zamanlamasını ve oranını düzenler. Meme kanseri hücrelerinde, çeşitli TF'ler hücrenin hayatta kalması, büyümesi, metastazı ve bölünmesi için önemlidir. Drager ve Mullen (1994), H13 bölgesinden c-Myc ile etkileşime giren ve DNA'ya bağlanmasını engelleyen kısa bir peptit (H1-S6A.F8A) geliştirmiştir. Bu peptit, değiştirilen iki amino asit (S6A ve F8A) sayesinde daha yüksek sarmallığa sahiptir. H1 peptidlerinin tetramerik c-Myc-92'ye bağlanması inhibisyon mekanizmasıdır (Drager ve Mullen 1994).



Şekil 5.1 Antikanser peptit etki mekanizmaları: mitokondriyal ilişkili yollar ve ölüm reseptörüyle indüklenen yollar (Karami Fath vd. 2022)

Bidwell vd. (2005) ayrı bir çalışmada H1-S6A.F8A peptidini hücrelere nüfuz edebilen ve kısa bir peptit için taşıma aracı olarak rol oynayabilen modifiye edilmiş elastin benzeri bir polipeptite kaynaştırmıştır (Pen-ELP-H1) (Bidwell III ve Raucher 2005).

Pen-ELP-H1, c-Myc nükleer lokalizasyonunu bozar ve immüno Floresan ve RT-PCR ile gösterildiği gibi transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder. İnsan MCF-7 kanser hücrelerinin büyümesi de bu peptit tarafından yavaşlatılmıştır (Giorello vd. 1998).

Meme kanseri hücrelerini hedefleyen diğer terapötik peptitler sitolitik ajanlardır. Sitolitik peptitler (5-30 AAs) amfifilik ve katyonik özelliklere sahiptir, bu da hücre zarlarına nüfuz etmelerine ve hücreleri öldürmelerine izin verir (Sani ve Separovic 2016).

Zhao vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada Ur11 ve Uk14 olmak üzere iki litik peptit sentezlenmiş ve bunlar matriks metaloproteinaza duyarlı bir bölünme bağlayıcısına sahip bir anyon peptit ile birleştirilmiştir. Kaplanmış peptitler MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına karşı kullanılmıştır. Sonuçlar, matriks metaloproteinazların kanser hücrelerinin sitolitik membranını yok edebileceğini göstermektedir (Zhao vd. 2017).

Meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı proteinler olarak terapötik peptitlerde tedavi stratejileri arasındadır. Tümör baskılayıcı terapötik peptitler, hücre döngüsündeki CDK'ları düzenleyen sentetik peptitlerdir ve G1 fazı hücrelerini tutukladıkları için meme kanseri tedavisinde etkili tedaviler olabilirler (Mazumder vd. 2004). Bu peptitlerin yan etkilere neden olma olasılığı daha düşüktür ve hızlı bir şekilde çıkarılabilirler (Marqus vd. 2017). Bu peptit, MCF-7 gibi farklı kanser hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde baskılar ve hücrelerin S fazına girmesini engeller (Fujimoto vd. 2000).

P53 yolağının onkösüpresif özellikleri onu cazip bir hedef haline getirmektedir. MDM2'nin bir p53 inhibitörü olarak ortaya çıkmasının ardından, vahşi tip TP53 eksprese eden insan tümörlerinde p53'ü yeniden aktive etmek için bu iki protein arasındaki etkileşimin farmakolojik olarak bozulması araştırılmıştır. Sonuç olarak, MDM2/p53 komplekslerinin (Nutlin gibi) oluşumuna müdahale edebilen farklı molekül sınıfları geliştirilmiştir (Arena vd. 2021). Pellegrino ve arkadaşları, MDM2/MDM4 komplekslerinin heterodimerizasyonuna müdahale ederek aktivitelerini engellemek için bir yöntem geliştirmiştir. MDM4 C-terminus kuyruğunu taklit eden bir peptidin MDM2'ye bağlanması, p53'ün MDM2 aracılı ubiquitinasyonunu bozduğunu ve p53'e bağlı transkripsiyon ve onkösüpresif aktiviteleri teşvik ettiğini keşfettiler (Pellegrino vd. 2015).

White vd. (2015) meme kanserinde BRCT2'nin C-terminal alanını hedefleyen bir peptit tanımlamıştır. BRCT2 DNA hasarı sinyali ile ilişkilendirilmiştir (White vd. 2015).

Meme kanseri hücrelerinde ölüm uyarıcıları olarak tasarlanan terapötik peptitler geliştirilmiştir. Çalışmalarda meme kanseri hücre ölümünü tetikleyen çeşitli peptitler keşfedilmiştir. KCCYSL peptidi ve KCCYSL sekansı içeren peptidler, meme kanserinde aşırı eksprese edilen insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) için spesifik peptidlerdir. Daha fazla etkinlik için, nükleer lokalizasyon sekansı peptidinin KCCYSL peptidine bağlanması, peptidin HER2 + hücrelerinin çekirdeğine translokasyonuna yol açarak hücre ölümüne neden olur (Ducharme ve Lapi 2020).

İlerleyen kanserli meme hücrelerinde seviyeleri artan bir diğer reseptör, peptit bazlı kanser tedavisi için hedeflenebilecek olan östrojen reseptörü α 'dır (ER α). Bu bağlamda, hedef protein için bir ligand ve E3 ubiquitin ligaz alımı için bir tanıma motifi içeren proteoliz hedefleyici kimeralar (PROTAC'lar) ER α degradasyonu ve kanserli hücre büyümesinin inhibisyonu için adaydır. Dai vd , ER α bağlayıcı ligand olarak laktam siklik peptide, bağlayıcı olarak 6-aminokaproik aside ve 1-6 bileşiği olarak bilinen E3 ligazı dahil etmek için hidroksillenmiş bir yapıya proteoliz hedefleyen kimeralar (PROTAC'lar) eklemiştir. 1-6 bileşiğinin ER α degradasyonunu indükleyerek MCF-7 hücre toksisitesi üzerinde $\sim 9.7 \mu\text{M}$ IC50 ile güçlü bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Dai vd. 2020).

Bcl-2 proteinlerinin yapısal özelliklerine dayanarak, kanser hücrelerinin apoptozunu indüklemek için çok sayıda peptit tasarlanmıştır (Valero vd. 2011). Örneğin, normalde anti-apoptotik Bcl-2 faktörü, mitokondride Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerini inhibe ederek hücre ölümüne neden olur. Bcl-2 faktörleri ayrıca endoplazmik retikulumdaki IP3 reseptörlerini (IP3R) inhibe eder ve kanserli hücrelerin hayatta kalmasını artırır. Kerkhofs vd. (2021) IP3 reseptör (IP3R) kanallarını hedef almış ve Bcl-2'nin BH4 alanının yapısını taklit eden Bcl-2 IP3 reseptör bozucu-2 (BIRD-2) adlı bir peptit sentezleyerek aşağı akış pro-apoptotik Ca²⁺-sinyal yolunu indüklemiştir. Peptit, IP3R-Bcl-2 etkileşimini bozarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açtı (Kerkhofs vd. 2021).

Pro-apoptotik peptitlerin avantajları arasında suda yüksek çözünürlük, düşük immünojenite, düşük maliyetli sentez ve etkili kimyasal modifikasyon yer almaktadır. Bununla birlikte, sınırlı tümör hücresi alımı, düşük seçicilik, zayıf tümör geçirgenliği ve düşük plazma stabilitesi gibi bazı engellerin üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Bu

sorunları ele almak için hücre içi yolla hücre içi dağıtım, ligand aracılı tümör hedefleme ve nanopartikül tabanlı ilaç dağıtım sistemleri gibi çeşitli stratejiler tartışılabilir (Min vd. 2018; Karami Fath vd. 2022).

Bu tez çalışması için hedef olarak seçilen SCARA5/L-ferritin etkileşiminin inhibisyonu ölüm uyarıcıları olarak tasarlanan peptit stratejisine dayanmaktadır. SCARA5 MCF7 hücrelerinde eksprese edilen bir membran proteindir ve meme kanseri tedavisi için hedef olarak kullanılma potansiyeli taşımaktadır (Geninatti Crich vd. 2015).

SCARA5'in son yıllarda kanserde son derece önemli olduğu gösterilmiştir (Ulker vd. 2018). Bu çalışmalar SCARA5'in tümörü baskılayan bir gen olabileceği ve klinik bir biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli taşıdığına dair raporlardır.

A549 hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada ana EMT düzenleyicisi ve transkripsiyonel baskılayıcı Snail1'in, EMT ile ilişkili hücre göçünü sağlamak için SCARA5'i baskıladığı gösterilmiştir (Liu vd. 2013).

Liu ve arkadaşları da hücre döngüsü ilerlemesi ve çoğalmasında rol oynayan spermle ilişkili antijen 5 (SPAG5)'in SCARA5'i aşağı regüle etmesinin hepatoselüler karsinomun ilerlemesini artırdığını ortaya koymuştur (Liu vd. 2018). Li ve arkadaşları SCARA5'in fosfoinositid 3-kinaz/protein kinaz B/mTOR yolunu düzenleyerek kolorektal kanser büyümesini baskıladığını ortaya koymuştur (Li vd. 2021).

SCARA5'in farklı kanser türlerinde düzensizliği bildirilmiş olsa da SCARA5'in mesane kanserindeki ekspresyonu ve fonksiyonel önemi tamamen bilinmemektedir. Bunun araştırıldığı bir çalışmada, SCARA5'in kötü prognoz ile negatif korelasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur ve SCARA5'in mesane kanserinin potansiyel bir biyobelirteci olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, SCARA5'in aşırı ekspresyonu mesane kanseri hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve göçünü azaltmıştır (Lu vd. 2023b).

SCARA5'in promotör metilasyonu ile aşağı regüle edildiği bir başka çalışmada SCARA5'in aşırı ekspresyonun nazofarenks karsinom hücrelerinin göçünü, invazyonunu ve proliferasyonunu inhibe ettiği raporlanmıştır. Böylece SCARA5'in nazofarenks karsinomunda yararlı bir klinik belirteç olabileceği vurgulanmıştır (Jiang vd. 2023).

Melanoma ve SCARA5 arasında ilişki olup olmadığını belirlemeye çalışan bir grup SCARA5 mRNA ifadesinin analizini Kanser Genom Atlas veri setleri kullanılarak gerçekleştirmiştir. Analiz sonucu SCARA5'in prognostik biyobelirteç olarak ve melanomada umut verici bir terapötik hedef olarak önemli bir potansiyele sahip olabileceği sonucuna varmışlardır (Ni vd. 2023).

SCARA5'in hangi yolak ve proteinler üzerinden etki ettiğine dair yapılan çalışmalar da mevcuttur.

Örneğin oral skuamöz hücreli karsinom hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada SCARA5'in sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) ve PI3K/AKT sinyal yolları ile ilişki olduğu belirlenmiştir. PI3K/AKT sinyal yolunun proliferasyon, migrasyon ve invazyon dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde

kilit bir rol oynadığı iyi bilinmektedir STAT3'ün birçok tümörün apoptoz direnç sürecinde rol oynadığına dair kanıtlar giderek artmaktadır. SCARA5 bu sinyal yollarının inhibisyonu yoluyla oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinin proliferasyonunu, EMT'sini inhibe etmiş ve apoptozu indüklemiş, böylece tümör baskılayıcı bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Huang vd. 2023).

Aynı sinyal yolağı üzerinde yapılan bir başka çalışmada sksozomal SCARA5'in fare ksenograftlarında kolorektal tümör büyümesini etkili bir şekilde baskıladığı raporlanmıştır. Daha ileri analizler, eksozomal SCARA5'in hem kolorektal karsinoma hücrelerinde hem de tümörlerde protein kinaz B ve fosfoinozimid 3-kinazın fosforilasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Fang vd. 2023).

2021 yılında retinoblastoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada SCARA5'in PI3K/AKT sinyal yolunu baskılayarak retinoblastoma hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe edebileceği ve apoptozunu teşvik edebileceği gösterilmiş, böylece retinoblastoma tedavisi için yeni bir strateji önermiştir (Wang vd. 2021).

Hem proto-onkogenlerin aktivasyonunun hem de tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun meme kanseri ilerlemesinde rol oynadığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Ancak, literatürde meme kanserinde SCARA5'i araştıran az çalışma bulunmaktadır.

Bir çalışmada, SCARA5 ekspresyon seviyeleri promoter metilasyonu ile ilişkili olarak 10 farklı hücre hattında araştırılmıştır. Ancak, bu hücre hatlarından sadece ikisi meme kanseri hücre hattıydı. Yazarlar meme kanseri hücre hatlarında aşağı regülasyon gözlemlmelerine rağmen, akciğer kanseri hücre hatlarını kullanarak daha fazla araştırma yapmışlardır (Yan vd. 2012).

You vd. (2017) SCARA5'in, ERK1/2, AKT ve STAT3'ün fosforilasyonunu azalttığını MMP-2, 3 ve 9, VEGF-A, VEGF-C, Bax, Cyclin B1, Cyclin D1 ve Cyclin E1 dahil olmak üzere aşağı akış sinyal efektörlerini aşağı düzenlediğini buna karşın E-cadherin, Bcl-2 ve kaspaz 3'ü yukarı düzenlendiğini bildirmiştir. SCARA5'in birden fazla sinyal yolağı ile ilişkili olduğunu ve meme kanserinin ilerlemesi ve metastazında kritik bir rol oynadığı belirtilmiştir (You vd. 2017).

Meme kanseri ve SCARA5 ilişkili başka bir çalışmada, meme tümörlerindeki SCARA5 ekspresyon seviyeleri ve 77 hastadan alınan kanserli olmayan doku örnekleri qRT-PCR ile analiz edilmiş ve ekspresyon seviyeleri SCARA5 gen promotörünün metilasyon seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. SCARA5 ekspresyonunun tümörlerde (%92.2) kanserli olmayan doku örneklerine kıyasla önemli ölçüde azaldığı ve bu aşağı regülasyonun promotörün hipermetilasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$). SCARA5 ekspresyonu ile meme tümörlerinin histolojik derecesi arasında da anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir ($p = 0.017$). Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar SCARA5'in promoter metilasyonu yoluyla meme kanseri tümörigenezinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Ulker vd. 2018). Bununla birlikte, SCARA5 çeşitli kanser türlerinde aday bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmış olsa da meme kanserindeki rolü belirsizliğini korumaktadır.

SCARA5 bu çalışmalar açısından tümörü baskılayan bir rolde karşımıza çıkarken literatürde yapılan bir başka çalışma bunun tam tersini ileri sürmektedir.

Bu çalışma Trombospondin tip 1 domain içeren 7A'nın (THSD7A) ve SCARA5 ile ilişkilidir. THSD7A'nın özofageal skuamöz hücreli karsinomda (ÖSHK) pro kanser rol oynadığı bildirilmiştir. THSD7A'nın aşağı yönlü itici geni olan SCARA5'in ÖSHK'nin teşvik edilmesinde kritik bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Öte yandan, SCARA5 üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında MDA-MB-231 dahil MK kök hücrelerinde yukarı regüle edilir (Conti vd. 2016). Daha da ilginç, önceki bulguların aksine, başka bir tümör çalışmasında glioma hücrelerinde, nöroblastlarda ve MK'de SCARA5 ekspresyonu bulunmuştur. Bununla birlikte SCARA5 naklinde yüksek ferritin seviyelerinin tümör metabolizmasını ve büyümesini destekleyebileceğini göstermiştir (Alkhateeb vd. 2010). Bu önemli farklılıklar, SCARA5 ifadesinin ve biyolojik işlevinin farklı dokularda bağımsız olabileceğini yansıtmaktadır. Çalışma ekibi bu farklılığın nedenlerini şu üç maddede sıralamışlardır. Birincisi, genetik mutasyonlar genlerin işlevini temelden değiştirebilir. İkincisi, farklı tümörlerdeki gen proteinleri farklı bağlanma durumları gösterebilir. Üçüncüsü, virüsler gibi diğer faktörlerin etkisi olabilir (Zhao vd. 2016). İlk olasılığı araştırmak için, üç ÖSHK hattının mutasyon bölgelerini ekzon dizilimi ile bulunmuş, bir proliferasyon deneyinde birbirleriyle karşılaştırmak için bir yabanil tip SCARA5 aşırı ekspresyon grubu ve bir mutant grubu oluşturulmuştur. Ayrıca yabanil tip SCARA5'in de kanseri teşvik etmede rol oynadığını göstermişlerdir. Bu nedenle, mutasyonların göz ardı edilebileceği, son iki olasılığın ise daha fazla araştırılması gerektiği sonucuna vararak çalışmayı yayınlamışlardır (Jumai vd. 2022).

SCARA5'in ifadesinin ve biyolojik işlevinin farklı dokularda bağımsız olabileceği doğal ligandı olan L-ferritine bağlanma hücre içinde FAK ile fiziksel bağlantı kurması ve sinyal yolağını aktif hale getirmesi ile ilişkili olabilir. Öncelikle SCARA5 ve L-ferritin arasındaki etkileşim tam olarak karakterize edilmemiş olsa da 2020 yılında yapılan bir çalışma bu etkileşime dair bulgular ortaya çıkarmıştır. Araştırma ekibi bu makalede SRCR bölgesi tarafından ligand tanınmasının genellikle Ca^{2+} gibi iki değerlikli katyonlara ihtiyaç duyduğunu bu nedenle SCARA5'in SRCR alanının ferritini Ca^{2+} bağımlı bir şekilde bağlaması şaşırtıcı olmadığını vurgulamışlardır. Devamında SCARA5'in *in vitro* ifade edilen CL bölgesi (Lys305–Met392) ve SRCR bölgesi (CL-SRCR) parçası monomeriktir ve CL bölgesi hızla bozunabilir, bu da SCARA5'in CL-SRCR kısmının kompakt bir trimerize durum yerine açık bir konformasyon benimseyebileceğini düşündürmektedir. Ferritin partikülleri nispeten büyük, ~12 nm çapında olduğundan, SCARA5'in açık konformasyonu ferritin partiküllerinin bağlanmasını ve içselleştirilmesini kolaylaştırabilmektedir. Böylece ferritin partikülleri için genel reseptörler olarak hareket edebileceklerini düşündürmekte olduğunu ifade etmişlerdir (Yu vd. 2020). Li vd. (2009) SCARA5'in hücre içi demir artışını kolaylaştırmak ve böbrek gelişimini desteklemek için ferritin reseptörü olarak hareket edebileceğini bildirmiştir (Li vd. 2009).

Ferritinin aynı zamanda hücrel ferroptoz için bir belirteçtir. Ferroptoz, hücre içi reaktif oksijen türlerinin birikimi ile karakterize edilen, düzenlenmiş hücre ölümünün demire bağlı bir şeklidir ve son zamanlarda çeşitli tümörlerin tedavisi için potansiyel bir yön olarak bildirilmiştir (Dixon vd. 2012; Battaglia vd. 2022). Ferritinin pankreas kanseri, hepatoselüler karsinom, akciğer adenokarsinomu ve glioma gibi çeşitli tümörlerde ferroptozda rol oynadığı ve kanser tedavisi için yeni bir yön sağladığı bildirilmiştir.

Ayrıca, SCARA5'in ferritin hafif zincirine bağlanmasının servikal kanser hücrelerinde hücre ölümünün artmasına neden olduğu da ifade edilmiştir. ÖSHK hücreleri ve dokuları ile yapılan bir çalışmada SCARA5 ferritin hafif zinciri ile birleşerek ve hücre içi reaktif oksijen türleri ve Fe birikimini artırarak ferroptozu indükleyebileceği belirtilmiştir (Cutrin vd. 2018; Liu vd. 2022).

SCARA5 tek geçişli transmembran bir protein olduğu için hücre dışında L-ferritin ile etkileşimdeyken hücre içinde ise Fokal Adezyon Kinaz (FAK) proteini ile fiziksel olarak etkileşim halinde olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Wen vd. (2016), SCARA5'in aşırı ekspresyonunun osteosarkomda tümör proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiğini ve SCARA5'in aşırı ekspresyonunun bu tümör varlığında fosforilasyonu ve dolayısıyla FAK aktivasyonunu önemli ölçüde engellediğini belirtmektedir (Wen vd. 2016). FAK, çeşitli hücre tiplerinde hücre yapışma, hücre hareketi, proliferasyon ve sağkalımı düzenleyen bir protein tirozin kinazdır. FAK Oldukça yerleşik bir tümör markeridir. FAK çeşitli tümör tiplerinde aşırı eksprese edilir. Tümör ilerlemesi ve metastazında rol oynadığına inanılmaktadır (Yoon vd. 2015).

Huang vd. (2010), SCARA5'in FAK fosforilasyonunu önleyerek ve böylece FAK-Src-Cas yolunun aktivasyonunu inhibe ederek hepatoselüler karsinomda (HSK) bir tümör baskılayıcı olarak hareket edebileceğini göstermektedir. Bu çalışma ile, SCARA5'in reseptör olmayan bir tirozin kinaz olan FAK ile doğrudan fiziksel olarak birleşerek ve tirozin fosforilasyonunu modüle ederek fokal adezyona katıldığı gösterilmiştir. FAK'ın Tyr-397'de fosforilasyonu ve ardından diğer fokal adezyon kompleksi ile ilişkili proteinlerin (örn. paxillin ve p130CAS) fosforilasyonu, fokal adezyon oluşumu ve hücre göçü için gereklidir (Mitra vd. 2005). Aktive olan FAK, birçok tümör hücresinde Src ve p130CAS ile bir kompleks oluşturur ve bu da ikincil sinyal yolları aracılığıyla hücre hareketliliğini, istilasını, hücre döngüsü ilerlemesini, hayatta kalmayı, anjiyogenezi ve epitelyal-mezenkimal geçişi teşvik ederek tümör büyümesine ve metastazına yol açar (Lim vd. 2008; Huang vd. 2010b).

Yine aynı çalışmada SCARA5'in FAK tirozin fosforilasyon kaskadını ve FAK'ın Tyr-397'sini, Src'nin Tyr-416'sını ve p130CAS'ın Tyr-165'ini içeren aşağı akış sinyal yollarını inhibe edebileceğini göstermektedir. Tersine, SCARA5'in devre dışı bırakılması fokal adezyon kompleksi ile ilişkili sinyal iletim kaskadını uyarır.

Bununla birlikte, SCARA5 aşırı ekspresyonunun insan karaciğer hücre hattı MHCC-LM3 hücrelerinde hücre invazyonunu ve FAK sinyal yolunu inhibe edebilmesine rağmen, diğer HSK hatlarına kıyasla bu hatta ksenograft tümör büyümesi de dahil olmak üzere hücre proliferasyonu üzerinde aynı etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir. Bu veriler, SCARA5'in HSK örneklerinde tümör büyümesine ve/veya ilerlemesine katkıda bulunan birçok faktörden biri olarak hizmet ettiğini, SCARA5'in susturulmasına bağlı olarak FAK-Src-p130CAS yolağının aktivasyonunun, hücre çoğalmasından sorumlu sinyal yollarıyla iş birliğinin ve diğer malign özelliklerin HSK başlangıcında ve ilerlemesinde sinerjik bir role sahip olabileceği farklı genetik ve epigenetik sapmalar olduğunu göstermektedir (Huang vd. 2010b).

Literatürdeki bu veriler SCARA5'in biyolojik işlevinin farklılıklar gösterebileceğini göstermektedir. Bu nedenle SCARA5'in SCRC bölgesinin L-ferritin bağlanma bölgesine özgü tasarlanan sentetik peptitlerinin içerdği aminoasitlerden

çoğunluğu tirozin, glutamik asit, aspartik asit ve triptofan rezidülerinden oluşmaktadır. Bu aminoasitlerin kanser hücreleri üzerindeki olası etkilerine yönelik yapılan önceki çalışmaları göz önüne aldığımızda bizim tasarımımda bu aminoasitler mevcuttur. Örneğin tirozin sitotoksiteyi arttırırken (Marchand vd. 2006), glutamik asit ve aspartik asit tümör hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki göstermiştir (Yamaguchi vd. 2016).

Etkisi araştırılan peptitin hem aminoasit kompozisyonları hem de hücreye giriş mekanizmaları göz önüne alındığında pro-apoptotik bir aktivite sergileyerek kanser hücrelerinde programlı hücre ölümüne sebep olmuştur. Bulgular “4.7. Peptitin MCF7 Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik ve Proliferatif Etkiler” başlığı altında yer alan sitotoksik grafikleri bu görüşümüzü desteklemektedir. Hücreye giriş mekanizmaları göz önüne alındığında sentetik peptitler sinyal iletim yollarını hedefleyerek de etkisini göstermektedir. Bu bağlamda tez çalışmasında test edilen peptitimiz hücre ölüm yollarını hedefleyenler arasında yer almaktadır. Peptit dozları uygulandıktan sonraki 48 saat içinde hücrelerde proliferatif bir artış gözlemlendi ancak sonraki inkübasyon sürelerinde bu artış yerini sitotoksik bir etkiye bıraktı. Burada peptit SRCR bölgesine bağlanarak hücreye ferritin aracılı demir alımını durdurabilir. Ancak peptitin bağlanması ile SCARA5 proteininde meydana gelen konformasyonel değişiklik nedeniyle hücre içeri demir alındığı andaki yolağı (FAK-Src-Cas130) tetikleyerek hücreyi proliferasyon sürecine götürebilir (Huang vd. 2010b). Süreç sonunda demir alımı azalan hücre demirsizlikten ölüme gitmiş olabilir. Bu süreci proliferasyonun inhibisyonu olarak adlandırabiliriz.

Programlı hücre ölümünün en önemli baş rol oyuncularından biri de kaspazlardır. Cellat kaspazlardan biri olan kaspaz-7 MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 eksprese edilmediği için bu rolü üstlenmektedir. Bununla birlikte, çalışmalar kaspaz-7'nin hücre döngüsü ilerlemesini ve belirli hücre tiplerinin farklılaşmasını düzenlemek için işlev gördüğünü bildirmiştir (Hashimoto vd. 2011). Kaspaz-7'nin özellikle hormon reseptörleri aktif tümör hücrelerindeki rolü belirsizliğini korumaktadır. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada kaspaz-7 proliferasyon ve hücre büyümesi için gerekli olduğunu ve primer meme kanserindeki ekspresyonu, apoptoz oranı ile korelasyon göstermediği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca kaspaz-7'nin meme kanseri hücrelerinde apoptotik olmayan fonksiyon benzeri hücre çoğalmasına aracılık edebileceğini de vurgulamışlardır. Kaspaz-7'nin meme kanserinde aşırı eksprese edildiğini ve hastalığın östrojen reseptör durumu ile ilişkili olduğu yine bu çalışmada belirtilmiştir (Chaudhary vd. 2016).

Çalışmamızda MCF7 hücrelerine peptit uygulamasından 24 saat sonra ELISA sonuçlarına göre kaspaz-7 miktarının azalışı buna karşılık western blot sonucu yapılan analizlerdeki artışı apoptotik olmayan fonksiyonel hücre çoğalması durumu ile ilişkili olabilir. Çünkü peptit hücre ölüm yollarını hedefleyen bir tasarıma sahip olduğu için kaspaz-7'nin azalışını tetiklemiş olabilir. Ancak sitotoksik sonuçları da göz önüne alındığında kesilmiş kaspaz-7 miktarının 48 saatlik inkübasyon süresi ile artması peptitin hücre ölümünü tetiklediğini bize göstermektedir. SCARA5'in tümör baskılayıcı gen olduğuna dair son yıllardaki çalışmalar artsa da biyolojik olarak fonksiyonelliği konusunda daha fazla çalışma ve bulguya ihtiyaç vardır. Doğal ligandı ferritin ile olan etkileşiminin hücre içinde tetiklediği sinyal yolağının hangi hücresel süreçlere dahil olduğu konusunda yapılacak derin bir araştırma bu konudaki bilgimizi ve görüşlerimizi arttıracaktır.

Bu alışma iki boyutlu hücre kültürü ortam koşullarında gerçekleştirilmiştir. İki boyutlu hücre kültürü, basit ve düşük maliyetli, bakımı ve fonksiyonel testlerin performansı ile ilişkili nedenlerden ötürü avantajlıdır. Ancak iki boyutlu kültür hücreleri dokuların veya tümörlerin doğal yapılarını taklit etmez bu nedenle gerçek hücre ortamı temsil edilememektedir. İki boyutlu kültürler genellikle monokltrlerdir ve yalnızca bir hücre tipinin incelenmesine izin verir, bu da hücrelerin *in vivo* olarak ihtiyaç duyduğu tümör mikro ortamının veya nişlerin eksikliğine neden olur. Üç boyutlu hücre kültürü ise iki boyutlu kültürün gerçekleştiremediği *in vivo* doku formu, hücre-hücre ve hücre-hücre dışı etkileşimlerine izin verir. Üç boyutlu kültürlerin en önemli dezavantajı yorumlanması, tekrarlanabilirliği ve gerçekleştirmesi zor kültürlerdir. Yine de bu çalışmanın üç boyutlu kültür koşullarında tekrarlanması peptitin etkinliği konusunda farklı sonuçlar gösterebilme potansiyeli nedeni ile önemlidir.





6. SONUÇLAR

Bu veriler göz önüne alındığında;

1. SCARA5'in ligand bağlama bölgesi olan SRCR'nin üç boyutlu yapısı altı farklı hesaplamalı yaklaşım ile karşılaştırılarak modellendi. Modellenen yapılar VERIFY, ERRAT, PROVE, PROCHECK ve WHATCHECK algoritmaları ile karşılaştırıldı. Ayrıca QMEAN ve QMEANDisCo programları da bu karşılaştırmaya eklendi. En iyi skora sahip olan Robetta_cm modeli seçildi.

2. Modellenen SRCR bölgesinin post translasyonel modifikasyonları tanımlandı. N-glikolizasyon bölgesi tespit edildi. SRCR modelinin moleküler dinamik simülasyon çalışmaları ile stabilitesi test edildi.

3. SRCR'nin X-ışını kristalografisi ile ortaya çıkarılan yapısı modellenen yapı ile karşılaştırıldı ve yapının deneysel yapıya yakın olduğu doğrulandı.

4. SRCR ve L-Ferritin arasındaki etkileşim protein-protein docking yöntemi ile ortaya çıkarıldı. Bu bağlanmada yer alan amino asit rezidüleri belirlendi. SRCR domain'deki 20:Arg rezidüsü; L-Ferritin'in 49:Glu, 168:Tyr, 172:Arg rezidüleri ile hidrojen bağı ve tuz köprüleri oluşturmuştur. Yine SRCR domain'deki 17:Tyr rezidüsü, L-Ferritin'in 167:Glu, 46:Val, 48:Leu, 168:Tyr, 164:Gly rezidüleri ile hidrojen bağı kurmuştur.

5. SRCR domaini ve L-Ferritin arasındaki etkileşimin en iyi olduğu rezidüler olan 16-22. Aminoasitler ve 79. Aminoasitler peptid dizaynı için hedef bölge olarak seçildi.

6. SRCR/L-Ferritin etkileşimini inhibe edecek peptitler tasarlandı. MMGBSA dG Bağlama enerjisi-76.138 kcal/mol olan tasarım seçildi. Peptit ve SRCR docking pozu moleküler dinamik simülasyonla değerlendirildi.

7. Peptitin farmakokinetik ve farmakolojik özellikleri *in silico* yöntemlerle tahmin edildi. Peptitin suda çözünebilen ve toksisitesi olmayan bir yapıda olduğu sonucuna ulaşıldı.

8. Tez çalışması kapsamında yapılan hücre canlılığı testi sonuçlarına göre MCF-7 hücre hattında peptit farklı doz ve inkübasyon sürelerinde farklı sonuçlar sergilemiştir. Peptit 1. set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MCF7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. 400 -200 -100 -50 -25 -12.5 -6.25 ve -3.12 µg/ml'lik peptit dozları kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır.

9. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan peptit 2. set 24 saat sonunda 0.01 pM'lık konsantrasyonda sitotoksik bir etki göstermiştir. 48. saatte, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM ve 0.001pM'lik konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı bir sitotoksik etki göstermiştir.

10. Peptit 3. set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 400 -200 -100 -50 -25 -6.25 -3.12 ve 0.78 µg/ml'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir sitotoksik etki görülmüştür. 72 saat sonunda ilk dört doz 400 -200 -100 -50 µg/ml

sitotoksik bir etki sergilemiştir. 96 ve 120 saatlik inkübasyon sürelerinin hepsinde de tüm konsantrasyonlarda peptit MCF-7 hücrelerinde kontrole kıyasla anlamlı bir sitotoksosite göstermiştir.

11. Sulforadamin B testi sonuçlarına göre peptitin MCF-7 hücrelerine uygulanmasından sonraki 24 saat sonunda 25 ve 6.25 µg/ml'lik dozlarında kontrole kıyasla anlamlı bir azalış görülmektedir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise 200 - 25 -3.12 -1.56 µg/ml'lik dozlarında kontrole kıyasla anlamlı bir azalış görülmektedir.

12. İstatistiksel hesaplamalara göre peptitin MCF-7 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 188 µg/ml olarak hesaplandı.

13. ELISA sonuçlarına göre peptitin MCF-7 hücrelerindeki kaspaz-7 ve -9 enzim miktarındaki değişimleri ölçüldü. Kaspaz-7 için 48. saat inkübasyon süresi sonunda yalnızca IC₅₀ dozunda 72. saat inkübasyon sonuçlarına göre 2X IC₅₀ dozunda istatistiksel anlamda artış görülmüştür.

14. Kaspaz-9 protein miktarları MCF7 hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla 24. saatlik inkübasyonda IC₅₀ ve 1/2X IC₅₀ dozlarında anlamlı bir artışa sahiptir. 48. saat inkübasyon sonunda ise yalnızca 1/2X IC₅₀ dozunda anlamlı artış görülmüştür.

15. Western blot sonuçlarına göre peptit 24 saatlik inkübasyondan sonra MCF7 hücrelerinde kaspaz-7 miktarını arttırırken, 48 saatlik inkübasyon sonrası kesilmiş kaspaz-7 miktarı artmıştır.

SCARA5/L-ferritin etkileşiminin inhibe edilmesi farklı doz ve inkübasyon sürelerinde sitotoksik etkilerle sonuçlanmıştır.

Bu çalışma *in silico* yaklaşımlarla tasarlanan ilaç öncüllerinin kanser tedavisinde kullanılabilirliği açısından temel bir araştırmadır. SCARA5 transmembran bir protein olduğu için ligandının bağlanmasıyla hücre içi alanda geçirdiği konformasyonel değişiklik sonucu birçok sinyal yolağının tetikleyicisi gibi görünüyor. Bu yüzden SCARA5'in özellikle FAK proteini ile olan etkileşimi ortaya çıkarılarak hücrenin yaşamı ve ölümü arasındaki yeni dengelerin keşfine ışık tutacaktır.



7. KAYNAKLAR

- Abbass, J. and Nebel, J. C. 2020. Enhancing fragment-based protein structure prediction by customising fragment cardinality according to local secondary structure. *BMC Bioinformatics*, 21 (1): 170.
- Adams, J. M. and Cory, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26 (9): 1324-1337.
- Adcock, S. A. and McCammon, J. A. 2006. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chemical Reviews*, 106 (5): 1589-1615.
- Adrian-Scotto, M. and Vasilescu, D. 2008. Quantum molecular modeling of glycyl-adenylate. *J Biomol Struct Dyn*, 25 (6): 697-708.
- Ahangarzadeh, S., Kanafi, M. M., Hosseinzadeh, S., Mokhtarzadeh, A., Barati, M., Ranjbari, J. and Tayebi, L. 2019. Bicyclic peptides: types, synthesis and applications. *Drug Discovery Today*, 24 (6): 1311-1319.
- Ahmaditaba, M. A., Houshdar Tehrani, M. H., Zarghi, A., Shahosseini, S. and Daraei, B. 2018. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Peptide-Like Analogues as Selective COX-2 Inhibitors. *Iran J Pharm Res*, 17 (1): 87-92.
- Alberts, B. 2015. Molecular biology of the cell, New York, NY, Garland Science, p.
- Ali, J., Khan, R., Ahmad, N. and Maqsood, I. 2012. Random Forests and Decision Trees. *International Journal of Computer Science Issues(IJCSI)*, 9.
- Ali, R., Rani, R. and Kumar, S. 2013. New peptide based therapeutic approaches. *Advances in protein chemistry. Jeddah: OMICS Group eBooks*.
- Alkhateeb, A., Webb, B. and Connor, J. 2010. The L-ferritin receptor, Scara5, is expressed on breast cancer and glioma cells: a potential functional significance for cancer-associated high serum/CSF levels. *Cancer Research*, 70 (8_Supplement): 84-84.
- Alkhateeb, A. A., Han, B. and Connor, J. R. 2013. Ferritin stimulates breast cancer cells through an iron-independent mechanism and is localized within tumor-associated macrophages. *Breast Cancer Res Treat*, 137 (3): 733-744.
- Amaro, R. E., Baudry, J., Chodera, J., Demir, Ö., McCammon, J. A., Miao, Y. and Smith, J. C. 2018. Ensemble Docking in Drug Discovery. *Biophys J*, 114 (10): 2271-2278.
- Amiel, E., Alonso, A., Uematsu, S., Akira, S., Poynter, M. E. and Berwin, B. 2009. Pivotal Advance: Toll-like receptor regulation of scavenger receptor-A-mediated phagocytosis. *Journal of Leucocyte Biology*, 85 (4): 595-605.
- Anampa, J., Makower, D. and Sparano, J. A. 2015. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Med*, 13: 195.
- Andrews, P. R., Craik, D. J. and Martin, J. L. 1984. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J Med Chem*, 27 (12): 1648-1657.
- Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181 (4096): 223-230.

- Anonymous 1. Principles of Protein Structure, Comparative Protein Modelling, and Visualisation. Chapter 1: Secondary Structure and Backbone Conformation. <https://swissmodel.expasy.org/course/text/chapter1.htm>:
- Arena, A., Stigliano, A., Belcastro, E., Giorda, E., Rosado, M. M., Grossi, A., Assenza, M. R., Moretti, F. and Fierabracci, A. 2021. p53 activation effect in the balance of T regulatory and effector cell subsets in patients with thyroid cancer and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 12: 728381.
- Arosio, P., Ingrassia, R. and Cavadini, P. 2009. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790 (7): 589-599.
- Asao, T., Takahashi, F. and Takahashi, K. 2019. Resistance to molecularly targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Respir Investig*, 57 (1): 20-26.
- Baeten, L., Reumers, J., Tur, V., Stricher, F., Lenaerts, T., Serrano, L., Rousseau, F. and Schymkowitz, J. 2008. Reconstruction of protein backbones from the BriX collection of canonical protein fragments. *PLoS Comput Biol*, 4 (5): e1000083.
- Bagaria, A., Jaravine, V., Huang, Y. J., Montelione, G. T. and Guntert, P. 2012. Protein structure validation by generalized linear model root-mean-square deviation prediction. *Protein Sci*, 21 (2): 229-238.
- Bajorath, J. 2015. Computer-aided drug discovery. *F1000Res*, 4.
- Band, P. R. 2010. The birth of the subspecialty of medical oncology and examples of its early scientific foundations. *J Clin Oncol*, 28 (22): 3653-3658.
- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A., Hegg, R., Im, Y.-H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T. and Knott, A. 2012a. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 366 (2): 109-119.
- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S. B., Im, S. A., Hegg, R., Im, Y. H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A. et al. 2012b. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 366 (2): 109-119.
- Batchelor, M., Wolny, M., Baker, E. G., Paci, E., Kalverda, A. P. and Peckham, M. 2019. Dynamic ion pair behavior stabilizes single alpha-helices in proteins. *J Biol Chem*, 294 (9): 3219-3234.
- Battaglia, A. M., Sacco, A., Perrotta, I. D., Faniello, M. C., Scalise, M., Torella, D., Levi, S., Costanzo, F. and Biamonte, F. 2022. Iron administration overcomes resistance to erastin-mediated ferroptosis in ovarian cancer cells. *Frontiers in oncology*, 12: 868351.
- Bauer, A. and Stockwell, B. 2008. Neurobiological applications of small molecule screening. *Chem Rev*, 108 (5): 1774-1786.
- Baylin, S. B. and Jones, P. A. 2016. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8 (9).
- Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. and Corvaia, N. 2017. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*, 16 (5): 315-337.

- Begg, A. C., Stewart, F. A. and Vens, C. 2011. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer*, 11 (4): 239-253.
- Bencharit, S. and Border, M. B. 2012. Where are we in the world of proteomics and bioinformatics? *Expert Rev Proteomics*, 9 (5): 489-491.
- Benkert, P., Biasini, M. and Schwede, T. 2010. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27 (3): 343-350.
- Berdasco, M. and Esteller, M. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*, 19 (5): 698-711.
- Berger, A. and Linderstrom-Lang, K. 1957. Deuterium exchange of poly-DL-alanine in aqueous solution. *Arch Biochem Biophys*, 69: 106-118.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28 (1): 235-242.
- Berx, G. and van Roy, F. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1 (6): a003129.
- Bese, N. S., Munshi, A., Budrukkar, A., Elzawawy, A. and Perez, C. A. 2008. Breast radiation therapy guideline implementation in low- and middle-income countries. *Cancer*, 113 (8 Suppl): 2305-2314.
- Bhattacharya, D., Nowotny, J., Cao, R. and Cheng, J. 2016. 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucleic Acids Res*, 44 (W1): W406-409.
- Bidwell, G. L., 3rd and Raucher, D. 2009. Therapeutic peptides for cancer therapy. Part I - peptide inhibitors of signal transduction cascades. *Expert Opin Drug Deliv*, 6 (10): 1033-1047.
- Bidwell III, G. L. and Raucher, D. 2005. Application of thermally responsive polypeptides directed against c-Myc transcriptional function for cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 4 (7): 1076-1085.
- Birch, J. and Gil, J. 2020. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*, 34 (23-24): 1565-1576.
- Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, M. C., Gelmon, K., Nielsen, T. O., Blomqvist, C. et al. 2010. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*, 7 (5): e1000279.
- Bodade, R. G., Beedkar, S. D., Manwar, A. V. and Khobragade, C. N. 2010. Homology modeling and docking study of xanthine oxidase of *Arthrobacter* sp. XL26. *Int J Biol Macromol*, 47 (2): 298-303.
- Boehm, H. J., Boehringer, M., Bur, D., Gmuender, H., Huber, W., Klaus, W., Kostrewa, D., Kuehne, H., Luebbbers, T., Meunier-Keller, N. et al. 2000. Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening. *J Med Chem*, 43 (14): 2664-2674.

- Boehr, D. D., Dyson, H. J. and Wright, P. E. 2006. An NMR perspective on enzyme dynamics. *Chem Rev*, 106 (8): 3055-3079.
- Boggetto, N. and Reboud-Ravaux, M. 2002. Dimerization inhibitors of HIV-1 protease. *Biol Chem*, 383 (9): 1321-1324.
- Bolognesi, M. L. and Cavalli, A. 2016. Multitarget Drug Discovery and Polypharmacology. *ChemMedChem*, 11 (12): 1190-1192.
- Boohaker, R. J., Lee, M. W., Vishnubhotla, P., Perez, J. M. and Khaled, A. R. 2012. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. *Curr Med Chem*, 19 (22): 3794-3804.
- Bowers, K. J., Chow, D. E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., Klepeis, J. L., Kolossvary, I., Moraes, M. A., Sacerdoti, F. D. et al., 2006, Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters, *SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*, 43-43.
- Bowie, J. U., Lüthy, R. and Eisenberg, D. 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 253 (5016): 164-170.
- Bowie, J. U. and Eisenberg, D. 1994. An evolutionary approach to folding small alpha-helical proteins that uses sequence information and an empirical guiding fitness function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (10): 4436-4440.
- Boyd, D., Vecoli, C., Belcher, D. M., Jain, S. K. and Drysdale, J. W. 1985. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *Journal of Biological Chemistry*, 260 (21): 11755-11761.
- Böhmová, E., Machová, D., Pechar, M., Pola, R., Venclíková, K., Janoušková, O. and Etrych, T. 2018. Cell-penetrating peptides: a useful tool for the delivery of various cargoes into cells. *Physiol Res*, 67 (Suppl 2): S267-s279.
- Braunstein, L. Z., Taghian, A. G., Niemierko, A., Salama, L., Capuco, A., Bellon, J. R., Wong, J. S., Punglia, R. S., MacDonald, S. M. and Harris, J. R. 2017. Breast-cancer subtype, age, and lymph node status as predictors of local recurrence following breast-conserving therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 161 (1): 173-179.
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E. and Soerjomataram, I. 2021. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127 (16): 3029-3030.
- Bresgen, N., Jaksch, H., Lacher, H., Ohlenschläger, I., Uchida, K. and Eckl, P. M. 2010. Iron-mediated oxidative stress plays an essential role in ferritin-induced cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 48 (10): 1347-1357.
- Bron, C. and Kerbosch, J. 1973. Algorithm 457: finding all cliques of an undirected graph. *Commun. ACM*, 16 (9): 575-577.
- Brooks, B. and Karplus, M. 1983. Harmonic dynamics of proteins: normal modes and fluctuations in bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (21): 6571-6575.
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S. et al. 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*, 30 (10): 1545-1614.

- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual review of biochemistry*, 52 (1): 223-261.
- Brünger, A. T., Brooks, C. L., 3rd and Karplus, M. 1985. Active site dynamics of ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (24): 8458-8462.
- Brünger, A. T., Kuriyan, J. and Karplus, M. 1987. Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science*, 235 (4787): 458-460.
- Buchan, D. W. A. and Jones, D. T. 2017. EigenTHREADER: analogous protein fold recognition by efficient contact map threading. *Bioinformatics*, 33 (17): 2684-2690.
- Buchan, D. W. A. and Jones, D. T. 2019. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 47 (W1): W402-W407.
- Burkhardt, D. L. and Sage, J. 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 8 (9): 671-682.
- Burley, S. K., Berman, H. M., Bhikadiya, C., Bi, C., Chen, L., Di Costanzo, L., Christie, C., Dalenberg, K., Duarte, J. M., Dutta, S. et al. 2019. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Res*, 47 (D1): D464-D474.
- Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chao, H., Chen, L., Craig, P. A., Crichlow, G. V., Dalenberg, K., Duarte, J. M. et al. 2022. RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic Acids Research*, 51 (D1): D488-D508.
- Burri, R. 2008. Conformational behavior and aggregation of amyloid beta peptides.
- Buxbaum, E. 2015. Fundamentals of Protein Structure and Function, Cham, Springer International Publishing, p.
- Bytheway, I. and Cochran, S. 2004. Validation of Molecular Docking Calculations Involving FGF-1 and FGF-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (7): 1683-1693.
- Carnevali, P., Toth, G., Toubassi, G. and Meshkat, S. N. 2003. Fast protein structure prediction using Monte Carlo simulations with modal moves. *J Am Chem Soc*, 125 (47): 14244-14245.
- Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Crowley, M., Walker, R. C. and Zhang, W., 2008, Amber 10, *University of California*.
- Cavallaro, U. and Christofori, G. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4 (2): 118-132.
- Cha, Y., Erez, T., Reynolds, I., Kumar, D., Ross, J., Koytiger, G., Kusko, R., Zeskind, B., Risso, S. and Kagan, E. 2018. Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *British journal of pharmacology*, 175 (2): 168-180.

- Chaudhary, S., Madhukrishna, B., Adhya, A. K., Keshari, S. and Mishra, S. K. 2016. Overexpression of caspase 7 is ER α dependent to affect proliferation and cell growth in breast cancer cells by targeting p21(Cip). *Oncogenesis*, 5 (4): e219.
- Chen, J., Long, R., Wang, X. L., Liu, B. and Chou, K. C. 2016. dRHP-PseRA: detecting remote homology proteins using profile-based pseudo protein sequence and rank aggregation. *Sci Rep*, 6: 32333.
- Chiangjong, W., Chutipongtanate, S. and Hongeng, S. 2020. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). *Int J Oncol*, 57 (3): 678-696.
- Citron, M. L., Berry, D. A., Cirincione, C., Hudis, C., Winer, E. P., Gradishar, W. J., Davidson, N. E., Martino, S., Livingston, R., Ingle, J. N. et al. 2003. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol*, 21 (8): 1431-1439.
- Clayton, J. M. and Purcell, W. P. 1969. Hansch and Free-Wilson analyses of inhibitory potencies of some 1-decyl-3-carbamoylpiperidines against butyrylcholinesterase and comparison of the two methods. *Journal of Medicinal Chemistry*, 12 (6): 1087-1088.
- Coffman, L. G., Brown, J. C., Johnson, D. A., Parthasarathy, N., D'Agostino Jr, R. B., Lively, M. O., Hua, X., Tilley, S. L., Muller-Esterl, W. and Willingham, M. C. 2008. Cleavage of high-molecular-weight kininogen by elastase and tryptase is inhibited by ferritin. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294 (3): L505-L515.
- Colovos, C. and Yeates, T. O. 1993. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci*, 2 (9): 1511-1519.
- Consortium, T. U. 2022. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51 (D1): D523-D531.
- Conti, L., Lanzardo, S., Ruiiu, R., Cadenazzi, M., Cavallo, F., Aime, S. and Crich, S. G. 2016. L-Ferritin targets breast cancer stem cells and delivers therapeutic and imaging agents. *Oncotarget*, 7 (41): 66713.
- Conway, P., Tyka, M. D., DiMaio, F., Konerding, D. E. and Baker, D. 2014. Relaxation of backbone bond geometry improves protein energy landscape modeling. *Protein Sci*, 23 (1): 47-55.
- Cookson, B. T. and Brennan, M. A. 2001. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in microbiology*, 9 (3): 113-114.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W. and Kollman, P. A. 1995. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117 (19): 5179-5197.
- Cozzi, A., Corsi, B., Levi, S., Santambrogio, P., Albertini, A. and Arosio, P. 2000. Overexpression of Wild Type and Mutated Human Ferritin H-chain in HeLa

- Cells: IN VIVO ROLE OF FERRITIN FERROXIDASE ACTIVITY*. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (33): 25122-25129.
- Cozzi, A., Corsi, B., Levi, S., Santambrogio, P., Biasiotto, G. and Arosio, P. 2004. Analysis of the biologic functions of H- and L-ferritins in HeLa cells by transfection with siRNAs and cDNAs: evidence for a proliferative role of L-ferritin. *Blood*, 103 (6): 2377-2383.
- Cramer, R. D., 3rd, Patterson, D. E. and Bunce, J. D. 1989. Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA). *Prog Clin Biol Res*, 291: 161-165.
- Cutrin, J. C., Alberti, D., Bernacchioni, C., Ciambellotti, S., Turano, P., Luchinat, C., Crich, S. G. and Aime, S. 2018. Cancer cell death induced by ferritins and the peculiar role of their labile iron pool. *Oncotarget*, 9 (46): 27974.
- Czaplewski, C., Karczynska, A., Sieradzan, A. K. and Liwo, A. 2018. UNRES server for physics-based coarse-grained simulations and prediction of protein structure, dynamics and thermodynamics. *Nucleic Acids Res*, 46 (W1): W304-W309.
- Dai, Y., Cai, X., Shi, W., Bi, X., Su, X., Pan, M., Li, H., Lin, H., Huang, W. and Qian, H. 2017. Pro-apoptotic cationic host defense peptides rich in lysine or arginine to reverse drug resistance by disrupting tumor cell membrane. *Amino Acids*, 49 (9): 1601-1610.
- Dai, Y., Yue, N., Gong, J., Liu, C., Li, Q., Zhou, J., Huang, W. and Qian, H. 2020. Development of cell-permeable peptide-based PROTACs targeting estrogen receptor α . *European Journal of Medicinal Chemistry*, 187: 111967.
- Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V. 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7 (1): 42717.
- Das, R. and Baker, D. 2008. Macromolecular modeling with rosetta. *Annu Rev Biochem*, 77: 363-382.
- David, C. C. and Jacobs, D. J. 2014. Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins. *Methods Mol Biol*, 1084: 193-226.
- Dawood, S., Broglio, K., Buzdar, A. U., Hortobagyi, G. N. and Giordano, S. H. 2010. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *Journal of clinical oncology*, 28 (1): 92.
- Dayhoff, M. O. 1969. Computer analysis of protein evolution. *Sci Am*, 221 (1): 86-95.
- de Ruyck, J., Brysbaert, G., Blossey, R. and Lensink, M. F. 2016. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Adv Appl Bioinform Chem*, 9: 1-11.
- de Vries, S. J., van Dijk, M. and Bonvin, A. M. J. J. 2010. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature Protocols*, 5 (5): 883-897.

- de Vries, S. J. and Bonvin, A. M. J. J. 2011. CPORT: A Consensus Interface Predictor and Its Performance in Prediction-Driven Docking with HADDOCK. *PLOS ONE*, 6 (3): e17695.
- Desai, P. N., Shrivastava, N. and Padh, H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnol Adv*, 28 (4): 427-435.
- Dhingra, S., Sowdhamini, R., Cadet, F. and Offmann, B. 2020. A glance into the evolution of template-free protein structure prediction methodologies. *Biochimie*, 175: 85-92.
- Dickson, C. J., Madej, B. D., Skjevik, A. A., Betz, R. M., Teigen, K., Gould, I. R. and Walker, R. C. 2014. Lipid14: The Amber Lipid Force Field. *J Chem Theory Comput*, 10 (2): 865-879.
- Dieci, M. V., Orvieto, E., Dominici, M., Conte, P. and Guarneri, V. 2014. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist*, 19 (8): 805-813.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M. and Yang, W. S. 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *cell*, 149 (5): 1060-1072.
- Doman, T. N., McGovern, S. L., Witherbee, B. J., Kasten, T. P., Kurumbail, R., Stallings, W. C., Connolly, D. T. and Shoichet, B. K. 2002. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J Med Chem*, 45 (11): 2213-2221.
- Draeger, L. J. and Mullen, G. P. 1994. Interaction of the bHLH-zip domain of c-Myc with H1-type peptides. Characterization of helicity in the H1 peptides by NMR. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (3): 1785-1793.
- Dror, R. O., Dirks, R. M., Grossman, J. P., Xu, H. and Shaw, D. E. 2012. Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. *Annu Rev Biophys*, 41: 429-452.
- Duan, H. 2019. Biologically active cyclotides and their pharmaceutical progress. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm*, 36: 633-638.
- Ducharme, M. and Lapi, S. E. 2020. Peptide based imaging agents for HER2 imaging in oncology. *Molecular Imaging*, 19: 1536012120960258.
- Dunne, D. W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. and Joiner, K. A. 1994. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (5): 1863-1867.
- Durham, E., Dorr, B., Woetzel, N., Staritzbichler, R. and Meiler, J. 2009. Solvent accessible surface area approximations for rapid and accurate protein structure prediction. *J Mol Model*, 15 (9): 1093-1108.
- Dzutsev, A., Badger, J. H., Perez-Chanona, E., Roy, S., Salcedo, R., Smith, C. K. and Trinchieri, G. 2017. Microbes and Cancer. *Annu Rev Immunol*, 35: 199-228.

- Ece, A. and Sevin, F. 2010. Exploring QSAR on 4-cyclohexylmethoxypyrimidines as antitumor agents for their inhibitory activity of cdk2. *Letters in Drug Design & Discovery*, 7 (9): 625-631.
- Ece, A. 2023. Computer-aided drug design. *BMC Chemistry*, 17 (1): 26.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32 (5): 1792-1797.
- Elokely, K. M. and Doerksen, R. J. 2013. Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53 (8): 1934-1945.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U. and Sali, A. 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 5: Unit-5 6.
- Faget, D. V., Ren, Q. and Stewart, S. A. 2019. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer*, 19 (8): 439-453.
- Fang, Y., Wu, F., Shang, G. and Yin, C. 2023. SCARA5 in bone marrow stromal cell-derived exosomes inhibits colorectal cancer progression by inactivating the PI3K/Akt pathway. *Genomics*, 115 (4): 110636.
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. and Fares, Y. 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal transduction and targeted therapy*, 5 (1): 28.
- Feinstein, W. P. and Brylinski, M. 2015. Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets. *Journal of Cheminformatics*, 7 (1): 18.
- Felipe Lima, J., Nofech-Mozes, S., Bayani, J. and Bartlett, J. M. 2016. EMT in breast carcinoma—a review. *Journal of clinical medicine*, 5 (7): 65.
- Finn, R. D., Clements, J. and Eddy, S. R. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res*, 39 (Web Server issue): W29-37.
- Fischer, N., Haug, M., Kwok, W. W., Kalbacher, H., Wernet, D., Dannecker, G. E. and Holzer, U. 2010. Involvement of CD91 and scavenger receptors in Hsp70-facilitated activation of human antigen-specific CD4⁺ memory T cells. *European journal of immunology*, 40 (4): 986-997.
- Fiser, A. 2010. Template-based protein structure modeling. *Methods Mol Biol*, 673: 73-94.
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., Jeong, J. H. and Wolmark, N. 2002. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*, 347 (16): 1233-1241.
- Fisher, J., Devraj, K., Ingram, J., Slagle-Webb, B., Madhankumar, A. B., Liu, X., Klinger, M., Simpson, I. A. and Connor, J. R. 2007. Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293 (2): C641-649.

- Fisher, R., Pusztai, L. and Swanton, C. 2013. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer*, 108 (3): 479-485.
- Flavahan, W. A., Gaskell, E. and Bernstein, B. E. 2017. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*, 357 (6348).
- Formisano, L., Nappi, L., Rosa, R., Marciano, R., D'Amato, C., D'Amato, V., Damiano, V., Raimondo, L., Iommelli, F. and Scorziello, A. 2014. Epidermal growth factor-receptor activation modulates Src-dependent resistance to lapatinib in breast cancer models. *Breast Cancer Research*, 16: 1-15.
- Franklin, M. C., Carey, K. D., Vajdos, F. F., Leahy, D. J., de Vos, A. M. and Sliwkowski, M. X. 2004. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*, 5 (4): 317-328.
- Frauenfelder, H., Hartmann, H., Karplus, M., Kuntz, I. D., Jr., Kuriyan, J., Parak, F., Petsko, G. A., Ringe, D., Tilton, R. F., Jr., Connolly, M. L. et al. 1987. Thermal expansion of a protein. *Biochemistry*, 26 (1): 254-261.
- Freyman, D. M., Wenck, M. A., Engel, J. C., Feng, J., Focia, P. J., Eakin, A. E. and Craig, S. P. 2000. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. *Chem Biol*, 7 (12): 957-968.
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K. et al. 2004. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (7): 1739-1749.
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C. and 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.
- Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C. and Pérez, J. M. 2003. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem*, 10 (3): 257-266.
- Fujimoto, K., Hosotani, R., Miyamoto, Y., Doi, R., Koshiba, T., Otaka, A., Fujii, N., Beauchamp, R. D. and Imamura, M. 2000. Inhibition of pRb phosphorylation and cell cycle progression by an antenapedia-p16INK4A fusion peptide in pancreatic cancer cells. *Cancer letters*, 159 (2): 151-158.
- Gabb, H. A., Jackson, R. M. and Sternberg, M. J. 1997. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J Mol Biol*, 272 (1): 106-120.
- Gabernet, G., Gautschi, D., Müller, A. T., Neuhaus, C. S., Armbrrecht, L., Dittrich, P. S., Hiss, J. A. and Schneider, G., 2019. In silico design and optimization of selective membranolytic anticancer peptides. *Scientific reports* 9, 1, 11282. Erişim Adresi.
- Galluzzi, L., López-Soto, A., Kumar, S. and Kroemer, G. 2016. Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. *Immunity*, 44 (2): 221-231.

- García-Aranda, M. and Redondo, M. 2017. Protein Kinase Targets in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 18 (12).
- García Rodríguez, J., García Colmenero, C., Clèries Soler, R. and Oleaga Sánchez, I. 2010. [Five years survival of women diagnosed with breast cancer during the period 1997-1999 in Toledo-Centro and Mancha Area, Spain]. *Rev Esp Salud Publica*, 84 (6): 843-850.
- Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A. and Asadullah, K. 2012. What makes a good drug target? *Drug Discov Today*, 17 Suppl: S24-30.
- Gaulton, A., Bellis, L. J., Bento, A. P., Chambers, J., Davies, M., Hersey, A., Light, Y., McGlinchey, S., Michalovich, D., Al-Lazikani, B. et al. 2011. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Research*, 40 (D1): D1100-D1107.
- Geninatti Crich, S., Cadenazzi, M., Lanzardo, S., Conti, L., Ruiiu, R., Alberti, D., Cavallo, F., Cutrin, J. C. and Aime, S. 2015. Targeting ferritin receptors for the selective delivery of imaging and therapeutic agents to breast cancer cells. *Nanoscale*, 7 (15): 6527-6533.
- Ghosh, S., Hevi, S. and Chuck, S. L. 2004. Regulated secretion of glycosylated human ferritin from hepatocytes. *Blood*, 103 (6): 2369-2376.
- Ghouzam, Y., Postic, G., de Brevern, A. G. and Gelly, J. C. 2015. Improving protein fold recognition with hybrid profiles combining sequence and structure evolution. *Bioinformatics*, 31 (23): 3782-3789.
- Gianni, L., Dafni, U., Gelber, R. D., Azambuja, E., Muehlbauer, S., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Baselga, J., Jackisch, C. et al. 2011. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 12 (3): 236-244.
- Gianni, L., Romieu, G. H., Lichinitser, M., Serrano, S. V., Mansutti, M., Pivot, X., Mariani, P., Andre, F., Chan, A., Lipatov, O. et al. 2013. AVEREL: a randomized phase III Trial evaluating bevacizumab in combination with docetaxel and trastuzumab as first-line therapy for HER2-positive locally recurrent/metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 31 (14): 1719-1725.
- Giordano, S. H., Temin, S., Kirshner, J. J., Chandarlapaty, S., Crews, J. R., Davidson, N. E., Esteva, F. J., Gonzalez-Angulo, A. M., Krop, I., Levinson, J. et al. 2014. Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*, 32 (19): 2078-2099.
- Giorello, L., Clerico, L., Pescarolo, M. P., Vikhanskaya, F., Salmona, M., Colella, G., Bruno, S., Mancuso, T., Bagnasco, L. and Russo, P. 1998. Inhibition of cancer cell growth and c-Myc transcriptional activity by a c-Myc helix 1-type peptide fused to an internalization sequence. *Cancer research*, 58 (16): 3654-3659.
- Glaysheer, S., Bolton, L. M., Johnson, P., Torrance, C. and Cree, I. A. 2014. Activity of EGFR, mTOR and PI3K inhibitors in an isogenic breast cell line model. *BMC Res Notes*, 7: 397.

- Godwin, R. C., Melvin, R. and Salsbury, F. R. 2016. Molecular dynamics simulations and computer-aided drug discovery. *Computer-aided drug discovery*: 1-30.
- Goodsell, D. S., Morris, G. M. and Olson, A. J. 1996. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit*, 9 (1): 1-5.
- Gordon, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111 (7): 927-930.
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G. et al. 2019. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179 (4): 813-827.
- Goyal, M., Dhanjal, J. K., Goyal, S., Tyagi, C., Hamid, R. and Grover, A. 2014. Development of dual inhibitors against Alzheimer's disease using fragment-based QSAR and molecular docking. *Biomed Res Int*, 2014: 979606.
- Granseth, E., von Heijne, G. and Elofsson, A. 2005. A study of the membrane-water interface region of membrane proteins. *J Mol Biol*, 346 (1): 377-385.
- Gromiha, M. M. 2010. Protein bioinformatics : from sequence to function, *Amsterdam* ;, Academic Press/Elsevier, p.
- Grunt, T. W. and Mariani, G. L. 2013. Novel approaches for molecular targeted therapy of breast cancer: interfering with PI3K/AKT/mTOR signaling. *Curr Cancer Drug Targets*, 13 (2): 188-204.
- Gschwend, D. A. and Kuntz, I. D. 1996. Orientational sampling and rigid-body minimization in molecular docking revisited: on-the-fly optimization and degeneracy removal. *J Comput Aided Mol Des*, 10 (2): 123-132.
- Guan, B., Zhang, C. and Zhao, Y. 2018. An Efficient ABC_DE-Based Hybrid Algorithm for Protein-Ligand Docking. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (4): 1181.
- Guedes, I. A., de Magalhães, C. S. and Dardenne, L. E. 2014. Receptor-ligand molecular docking. *Biophys Rev*, 6 (1): 75-87.
- Guimarães, C. R. and Mathiowetz, A. M. 2010. Addressing limitations with the MM-GB/SA scoring procedure using the WaterMap method and free energy perturbation calculations. *J Chem Inf Model*, 50 (4): 547-559.
- Gupta, R. and Brunak, S. 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput*: 310-322.
- Haase, V. H. 2013. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews*, 27 (1): 41-53.
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T. and Banks, J. L. 2004. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (7): 1750-1759.
- Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M. and Raetz, C. R. 1991. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*, 352 (6333): 342-344.

- Hanahan, D. and Folkman, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86 (3): 353-364.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100 (1): 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, Robert A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (5): 646-674.
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12 (1): 31-46.
- Harris, F., Dennison, S. R., Singh, J. and Phoenix, D. A. 2013. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. *Med Res Rev*, 33 (1): 190-234.
- Harrison, P. M. and Arosio, P. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1275 (3): 161-203.
- Harvey, S. C., Prabhakaran, M., Mao, B. and McCammon, J. A. 1984. Phenylalanine Transfer RNA: Molecular Dynamics Simulation. *Science*, 223 (4641): 1189-1191.
- Hashimoto, T., Kikkawa, U. and Kamada, S. 2011. Contribution of caspase (s) to the cell cycle regulation at mitotic phase. *PLoS One*, 6 (3): e18449.
- Hekkelman, M. L., Te Beek, T. A., Pettifer, S. R., Thorne, D., Attwood, T. K. and Vriend, G. 2010. WIWS: a protein structure bioinformatics Web service collection. *Nucleic Acids Res*, 38 (Web Server issue): W719-723.
- Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V. and Wargo, J. A. 2019. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat Med*, 25 (3): 377-388.
- Hernández-Rodríguez, M., Rosales-Hernández, M. C., Mendieta-Wejebe, J. E., Martínez-Archundia, M. and Basurto, J. C. 2016. Current Tools and Methods in Molecular Dynamics (MD) Simulations for Drug Design. *Curr Med Chem*, 23 (34): 3909-3924.
- Herrmann, F. and Suhai, S. 1994. Genetic Algorithms in Protein Structure Prediction. In: Computational Methods in Genome Research, Eds: Suhai, S., Boston, MA: Springer US, p. 173-190.
- Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D. M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W. and Lee, R. E. 2009. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *J Chem Inf Model*, 49 (2): 444-460.
- Higgins, D. G., Bleasby, A. J. and Fuchs, R. 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci*, 8 (2): 189-191.
- Hilchie, A., Hoskin, D. and Power Coombs, M. 2019. Anticancer activities of natural and synthetic peptides. *Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application*: 131-147.
- Honeycutt, J. D. and Andersen, H. C. 1987. Molecular dynamics study of melting and freezing of small Lennard-Jones clusters. *The Journal of Physical Chemistry*, 91 (19): 4950-4963.

- Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C. and Abola, E. E. 1996. Errors in protein structures. *Nature*, 381 (6580): 272.
- Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V. and Skrzypek, E. 2015. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res*, 43 (Database issue): D512-520.
- Horwitz, S. B. 1994. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann Oncol*, 5 Suppl 6: S3-6.
- Howell, A., Cuzick, J., Baum, M., Buzdar, A., Dowsett, M., Forbes, J. F., Hocht-Boes, G., Houghton, J., Locker, G. Y. and Tobias, J. S. 2005. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*, 365 (9453): 60-62.
- Huang, H.-J., Yu, H. W., Chen, C.-Y., Hsu, C.-H., Chen, H.-Y., Lee, K.-J., Tsai, F.-J. and Chen, C. Y.-C. 2010a. Current developments of computer-aided drug design. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 41 (6): 623-635.
- Huang, J., Zheng, D. L., Qin, F. S., Cheng, N., Chen, H., Wan, B. B., Wang, Y. P., Xiao, H. S. and Han, Z. G. 2010b. Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling. *J Clin Invest*, 120 (1): 223-241.
- Huang, J., Lv, C., Zhao, B., Ji, Z. and Gao, Z. 2023. SCARA5 inhibits oral squamous cell carcinoma via inactivating the STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways. *Open Med (Wars)*, 18 (1): 20230627.
- Huang, X., Pearce, R. and Zhang, Y. 2020. FASPR: an open-source tool for fast and accurate protein side-chain packing. *Bioinformatics*, 36 (12): 3758-3765.
- Huang, Y., Li, X., Sha, H., Zhang, L., Bian, X., Han, X. and Liu, B. 2017. Tumor-penetrating peptide fused to a pro-apoptotic peptide facilitates effective gastric cancer therapy. *Oncol Rep*, 37 (4): 2063-2070.
- Hutchinson, E. G. and Thornton, J. M. 1994. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci*, 3 (12): 2207-2216.
- International Human Genome Sequencing, C. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431 (7011): 931-945.
- Irwin, J. J. and Shoichet, B. K. 2005. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, 45 (1): 177-182.
- Iwaloye, O., Ottu, P. O., Olawale, F., Babalola, O. O., Elekofehinti, O. O., Kikiowo, B., Adegboyega, A. E., Ogbonna, H. N., Adeboboye, C. F., Folorunso, I. M. et al. 2023. Computer-aided drug design in anti-cancer drug discovery: What have we learnt and what is the way forward? *Informatics in Medicine Unlocked*, 41: 101332.
- Iwamoto, T. and Pusztai, L. 2010. Predicting prognosis of breast cancer with gene signatures: are we lost in a sea of data? *Genome Medicine*, 2 (11): 81.
- Jackson, S. P. and Bartek, J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461 (7267): 1071-1078.

- Jacobson, M. P., Pincus, D. L., Rapp, C. S., Day, T. J., Honig, B., Shaw, D. E. and Friesner, R. A. 2004. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins*, 55 (2): 351-367.
- Jain, A. N. 1996. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J Comput Aided Mol Des*, 10 (5): 427-440.
- Jain, A. N. 2008. Bias, reporting, and sharing: computational evaluations of docking methods. *J Comput Aided Mol Des*, 22 (3-4): 201-212.
- Jankowitz, R. C. and Davidson, N. E. 2013. Adjuvant endocrine therapy for breast cancer: how long is long enough? *Oncology (Williston Park)*, 27 (12): 1210-1216, 1224.
- Jézéquel, P., Campion, L., Spyrtos, F., Loussouarn, D., Campone, M., Guérin-Charbonnel, C., Joalland, M. P., André, J., Descotes, F., Grenot, C. et al. 2012. Validation of tumor-associated macrophage ferritin light chain as a prognostic biomarker in node-negative breast cancer tumors: A multicentric 2004 national PHRC study. *Int J Cancer*, 131 (2): 426-437.
- Jiang, X., Jiang, Y., An, D., Jiang, X., Zhou, S., Liu, Y., Tian, R., Li, Z., Zhao, X., Xiang, T. et al. 2023. Methylated tumor suppressor gene SCARA5 inhibits the proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma. *Epigenomics*, 15 (11): 635-650.
- Jiang, Y., Oliver, P., Davies, K. E. and Platt, N. 2006. Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (17): 11834-11845.
- Jisna, V. A. and Jayaraj, P. B. 2021. Protein Structure Prediction: Conventional and Deep Learning Perspectives. *Protein J*, 40 (4): 522-544.
- Jobin, M. L. and Alves, I. D. 2014. On the importance of electrostatic interactions between cell penetrating peptides and membranes: a pathway toward tumor cell selectivity? *Biochimie*, 107 Pt A: 154-159.
- Jones, D. T. and Swindells, M. B. 2002. Getting the most from PSI-BLAST. *Trends Biochem Sci*, 27 (3): 161-164.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. and Taylor, R. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 267 (3): 727-748.
- Jones, P. A., Issa, J. P. and Baylin, S. 2016. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet*, 17 (10): 630-641.
- Jorgensen, W. L. and Tirado-Rives, J. 1988. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J Am Chem Soc*, 110 (6): 1657-1666.
- Jorgensen, W. L. and Tiradorives, J. 1996. Monte Carlo vs molecular dynamics for conformational sampling. *J Phys Chem*, 100 (34): 14508-14513.
- Jumai, K., Zhang, T., Qiao, B., Ainiwaer, J., Zhang, H., Hou, Z., Awut, I., Niyaz, M., Zhang, L. and Sheyhidin, I. 2022. Highly Expressing SCARA5 Promotes

- Proliferation and Migration of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Immunol Res*, 2022: 2555647.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A. et al. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596 (7873): 583-589.
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K. et al. 2018. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27 (1): 112-128.
- Kabsch, W. and Sander, C. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22 (12): 2577-2637.
- Kalita, J., Shukla, R. and Tripathi, T. 2019. Structural basis of urea-induced unfolding of *Fasciola gigantica* glutathione S-transferase. *J Cell Physiol*, 234 (4): 4491-4503.
- Kallberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H. and Xu, J. 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc*, 7 (8): 1511-1522.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H. and Xu, J. 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc*, 7 (8): 1511-1522.
- Karami Fath, M., Babakhaniyan, K., Zokaei, M., Yaghoubian, A., Akbari, S., Khorsandi, M., Soofi, A., Nabi-Afjadi, M., Zalpoor, H., Jalalifar, F. et al. 2022. Anti-cancer peptide-based therapeutic strategies in solid tumors. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27 (1): 33.
- Karplus, M. and Kuriyan, J. 2005. Molecular dynamics and protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (19): 6679-6685.
- Kell, D. B. and Pretorius, E. 2014. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics*, 6 (4): 748-773.
- Kellenberger, E., Rodrigo, J., Muller, P. and Rognan, D. 2004. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins*, 57 (2): 225-242.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. and Sternberg, M. J. E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10 (6): 845-858.
- Kerkhofs, M., La Rovere, R., Welkenhuysen, K., Janssens, A., Vandenberghe, P., Madesh, M., Parys, J. B. and Bultynck, G. 2021. BIRD-2, a BH4-domain-targeting peptide of Bcl-2, provokes Bax/Bak-independent cell death in B-cell cancers through mitochondrial Ca²⁺-dependent mPTP opening. *Cell Calcium*, 94: 102333.
- Kesharwani, R. K., Singh, D. B., Singh, D. V. and Misra, K. 2018. Computational study of curcumin analogues by targeting DNA topoisomerase II: a structure-based drug

- designing approach. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, 7 (1): 15.
- Kim, L. C., Song, L. and Haura, E. B. 2009. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 6 (10): 587-595.
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A. et al. 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*, 44 (D1): D1202-1213.
- Kirton, S. B., Murray, C. W., Verdonk, M. L. and Taylor, R. D. 2005. Prediction of binding modes for ligands in the cytochromes P450 and other heme-containing proteins. *Proteins*, 58 (4): 836-844.
- Kishor, D., Deweshri, N., Vijayshri, R., Ruchi, S. and Ujwala, M. 2022. Molecular Docking: Metamorphosis in Drug Discovery. In: *Molecular Docking*, Eds: Erman Salih, I., *Rijeka*: IntechOpen, p. Ch. 3.
- Kishore, U. 2009. Target Pattern Recognition in Innate Immunity. Springer Science+Business Media.
- Kitagaki, J., Shi, G., Miyauchi, S., Murakami, S. and Yang, Y. 2015. Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics. *Anti-cancer drugs*, 26 (3): 259-271.
- Klebe, G., Abraham, U. and Mietzner, T. 1994. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J Med Chem*, 37 (24): 4130-4146.
- Klebe, G. and Abraham, U. 1999. Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *J Comput Aided Mol Des*, 13 (1): 1-10.
- Klon, A. E., Glick, M. and Davies, J. W. 2004a. Application of machine learning to improve the results of high-throughput docking against the HIV-1 protease. *J Chem Inf Comput Sci*, 44 (6): 2216-2224.
- Klon, A. E., Glick, M., Thoma, M., Acklin, P. and Davies, J. W. 2004b. Finding more needles in the haystack: A simple and efficient method for improving high-throughput docking results. *J Med Chem*, 47 (11): 2743-2749.
- Koehler Leman, J., Lyskov, S. and Bonneau, R. 2017. Computing structure-based lipid accessibility of membrane proteins with mp_lipid_acc in RosettaMP. *BMC Bioinformatics*, 18 (1): 115.
- Kollár, P., Rajchard, J., Balounová, Z. and Pazourek, J. 2014. Marine natural products: Bryostatins in preclinical and clinical studies. *Pharmaceutical biology*, 52 (2): 237-242.
- Kontoyianni, M., McClellan, L. M. and Sokol, G. S. 2004. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (3): 558-565.
- Kontoyianni, M., Sokol, G. S. and McClellan, L. M. 2005. Evaluation of library ranking efficacy in virtual screening. *Journal of Computational Chemistry*, 26 (1): 11-22.
- Kozma, D. and Tusnady, G. E. 2015. TMFoldRec: a statistical potential-based transmembrane protein fold recognition tool. *BMC Bioinformatics*, 16: 201.

- Krishnamoorthy, G. 2012. Motional dynamics in proteins and nucleic acids control their function: revelation by time-domain fluorescence. *Current Science*, 102 (2): 266-276.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305 (3): 567-580.
- Krovat, M. E., Steindl, T. and Langer, T. 2005. Recent Advances in Docking and Scoring. *Current Computer-Aided Drug Design*, 1 (1): 93-102.
- Kryshtafovych, A., Schwede, T., Topf, M., Fidelis, K. and Moult, J. 2019. Cover Image, Volume 87, Issue 12. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 87 (12): C1-C1.
- Kuczynski, E. A., Vermeulen, P. B., Pezzella, F., Kerbel, R. S. and Reynolds, A. R. 2019. Vessel co-option in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 16 (8): 469-493.
- Kufareva, I. and Abagyan, R. 2012. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol*, 857: 231-257.
- Kurz, T., Gustafsson, B. and Brunk, U. T. 2011. Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*, 50 (11): 1647-1658.
- Kuzmanic, A. and Zagrovic, B. 2010. Determination of ensemble-average pairwise root mean-square deviation from experimental B-factors. *Biophys J*, 98 (5): 861-871.
- Lam, S. D., Das, S., Sillitoe, I. and Orengo, C. 2017. An overview of comparative modelling and resources dedicated to large-scale modelling of genome sequences. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 73 (Pt 8): 628-640.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 (6822): 860-921.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26 (2): 283-291.
- Lau, J. L. and Dunn, M. K. 2018. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26 (10): 2700-2707.
- LeCun, Y., Bengio, Y. and Hinton, G. 2015. Deep learning. *Nature*, 521 (7553): 436-444.
- Lee, M. R., Tsai, J., Baker, D. and Kollman, P. A. 2001. Molecular dynamics in the endgame of protein structure prediction. *J Mol Biol*, 313 (2): 417-430.
- Lemer, C. M., Rooman, M. J. and Wodak, S. J. 1995. Protein structure prediction by threading methods: evaluation of current techniques. *Proteins*, 23 (3): 337-355.
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141 (7): 1117-1134.

- Lively, M. E., Mitchell, M. A. and Nicholas, J. A. 1990. Synthetic immunogens constructed from T-cell and B-cell stimulating peptides (T:B chimeras): preferential stimulation of unique T- and B-cell specificities is influenced by immunogen configuration. *Cell Immunol*, 125 (1): 65-78.
- Levi, S., Yewdall, S. J., Harrison, P. M., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A. and Arosio, P. 1992. Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem J*, 288 (Pt 2) (Pt 2): 591-596.
- Levis, M. 2017. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood*, 129 (26): 3403-3406.
- Levitt, M. and Warshel, A. 1975. Computer simulation of protein folding. *Nature*, 253 (5494): 694-698.
- Lewis, P. N., Momany, F. A. and Scheraga, H. A. 1973. Chain reversals in proteins. *Biochim Biophys Acta*, 303 (2): 211-229.
- Li, G., Xia, X., Long, Y., Li, J., Wu, J. and Zhu, Y. 2014. Research progresses and applications of antimicrobial peptides. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 26 (1): 17-25.
- Li, J., Tan, S., Chen, X., Zhang, C. Y. and Zhang, Y. 2011. Peptide Aptamers with Biological and Therapeutic Applications. *Current Medicinal Chemistry*, 18 (27): 4215-4222.
- Li, J. Y., Paragas, N., Ned, R. M., Qiu, A., Viltard, M., Leete, T., Drexler, I. R., Chen, X., Sanna-Cherchi, S., Mohammed, F. et al. 2009. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell*, 16 (1): 35-46.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y. and Su, Z. 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37 (2): 207-215.
- Li, Y., Peng, F., Tan, X., Wang, J. and Xu, Y. 2021. Tumor suppressive effect of scavenger receptor class A member 5 overexpression in colorectal cancer by regulating PI3K/AKT/mTOR pathway. *Genes & genomics*, 43 (10): 1189-1198.
- Lim, H., He, D., Qiu, Y., Krawczuk, P., Sun, X. and Xie, L. 2019. Rational discovery of dual-indication multi-target PDE/Kinase inhibitor for precision anti-cancer therapy using structural systems pharmacology. *PLoS Comput Biol*, 15 (6): e1006619.
- Lim, S.-T., Mikolon, D., Stupack, D. and Schlaepfer, D. 2008. FERM control of FAK function: implications for cancer therapy. *Cell cycle*, 7 (15): 2306-2314.
- Liu, B., Liu, B., Liu, F. and Wang, X. 2014. Protein binding site prediction by combining hidden Markov support vector machine and profile-based propensities. *ScientificWorldJournal*, 2014: 464093.
- Liu, H., Hu, J., Wei, R., Zhou, L., Pan, H., Zhu, H., Huang, M., Luo, J. and Xu, W. 2018. SPAG5 promotes hepatocellular carcinoma progression by downregulating SCARA5 through modifying β -catenin degradation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37 (1): 229.

- Liu, J., Hu, G., Chen, D., Gong, A., Soori, G., Dobleman, T. and Chen, X. 2013. Suppression of SCARA5 by Snail1 is essential for EMT-associated cell migration of A549 cells. *Oncogenesis*, 2 (9): e73-e73.
- Liu, M. and Wang, S. 1999. MCDOCK: a Monte Carlo simulation approach to the molecular docking problem. *J Comput Aided Mol Des*, 13 (5): 435-451.
- Liu, Y., Xiong, R., Xiao, T., Xiong, L., Wu, J., Li, J., Feng, G., Song, G. and Liu, K. 2022. SCARA5 induced ferroptosis to effect ESCC proliferation and metastasis by combining with Ferritin light chain. *BMC Cancer*, 22 (1): 1304.
- Lobley, A., Sadowski, M. I. and Jones, D. T. 2009. pGenTHREADER and pDomTHREADER: new methods for improved protein fold recognition and superfamily discrimination. *Bioinformatics*, 25 (14): 1761-1767.
- Lodish, H. F., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H. L., Amon, A. and Martin, K. C. 2016. Molecular cell biology, *New York*, W.H. Freeman, p.
- Loew, G. H., Villar, H. O. and Alkorta, I. 1993. Strategies for indirect computer-aided drug design. *Pharm Res*, 10 (4): 475-486.
- Lopez, G., Ezkurdia, I. and Tress, M. L. 2009. Assessment of ligand binding residue predictions in CASP8. *Proteins*, 77 Suppl 9 (Suppl 9): 138-146.
- Lorber, D. M. and Shoichet, B. K. 1998. Flexible ligand docking using conformational ensembles. *Protein Sci*, 7 (4): 938-950.
- Lowe, S. W., Cepero, E. and Evan, G. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432 (7015): 307-315.
- Lowery, A. J., Kell, M. R., Glynn, R. W., Kerin, M. J. and Sweeney, K. J. 2012. Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Res Treat*, 133 (3): 831-841.
- Lu, X.-S., Huang, M.-L., Chen, L.-B., Liu, S.-C., Huang, Z.-X. and Liu, S.-M. 2023a. SCARA5 as a downstream factor of PCAT29, inhibits proliferation, migration, and invasion of bladder cancer. *Genomics*, 115 (5): 110667.
- Lu, X. S., Huang, M. L., Chen, L. B., Liu, S. C., Huang, Z. X. and Liu, S. M. 2023b. SCARA5 as a downstream factor of PCAT29, inhibits proliferation, migration, and invasion of bladder cancer. *Genomics*, 115 (5): 110667.
- Lüthy, R., Bowie, J. U. and Eisenberg, D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356 (6364): 83-85.
- Lyumkis, D. 2019. Challenges and opportunities in cryo-EM single-particle analysis. *J Biol Chem*, 294 (13): 5181-5197.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S. et al. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B*, 102 (18): 3586-3616.
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. and Sherman, W. 2013. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27 (3): 221-234.

- Maresh, B. 2020. Machine learning algorithms-a review. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. [Internet], 9 (1): 381-386.
- Mayorov, V. N. and Crippen, G. M. 1994. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *J Mol Biol*, 235 (2): 625-634.
- Maisuradze, G. G., Liwo, A. and Scheraga, H. A. 2009. Principal component analysis for protein folding dynamics. *J Mol Biol*, 385 (1): 312-329.
- Malde, A. K., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P. C., Oostenbrink, C. and Mark, A. E. 2011. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7 (12): 4026-4037.
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. and Band, V. 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 10 (10): 955-960.
- Mamgain, S., Sharma, P., Pathak, R. K. and Baunthiyal, M. 2015. Computer aided screening of natural compounds targeting the E6 protein of HPV using molecular docking. *Bioinformation*, 11 (5): 236-242.
- Mamgain, S., Dhiman, S., Pathak, R. and Baunthiyal, M. 2018. In silico identification of agriculturally important molecule(s) for defense induction against bacterial blight disease in Soybean (*Glycine max*). *Plant Omics*, 11.
- Marchand, C., Krajewski, K., Lee, H. F., Antony, S., Johnson, A. A., Amin, R., Roller, P., Kvaratskhelia, M. and Pommier, Y. 2006. Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites. *Nucleic Acids Res*, 34 (18): 5157-5165.
- Marqus, S., Pirogova, E. and Piva, T. J. 2017. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *Journal of biomedical science*, 24 (1): 1-15.
- Marsh, D., Jost, M., Peggion, C. and Toniolo, C. 2007. Lipid chain-length dependence for incorporation of alamethicin in membranes: electron paramagnetic resonance studies on TOAC-spin labeled analogs. *Biophysical journal*, 92 (11): 4002-4011.
- Martínez, V. G., Moestrup, S. K., Holmskov, U., Mollenhauer, J. and Lozano, F. 2011. The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. *Pharmacol Rev*, 63 (4): 967-1000.
- Martyna, G. J., Tobias, D. J. and Klein, M. L. 1994. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101 (5): 4177-4189.
- Masoud, V. and Pagès, G. 2017. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J Clin Oncol*, 8 (2): 120-134.
- Mazola, Y., Guirola, O., Palomares, S., Chinea, G., Menéndez, C., Hernández, L. and Musacchio, A. 2015. A comparative molecular dynamics study of thermophilic and mesophilic β -fructosidase enzymes. *J Mol Model*, 21 (9): 228.
- Mazumder, S., DuPree, E. and Almasan, A. 2004. A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Current cancer drug targets*, 4 (1): 65-75.

- McGale, P., Taylor, C., Correa, C., Cutter, D., Duane, F., Ewertz, M., Gray, R., Mannu, G., Peto, R., Whelan, T. et al. 2014. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet*, 383 (9935): 2127-2135.
- McGregor, D. P. 2008. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*, 8 (5): 616-619.
- McIlwain, D. R., Berger, T. and Mak, T. W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5 (4): a008656.
- McPhail, S., Johnson, S., Greenberg, D., Peake, M. and Rous, B. 2015. Stage at diagnosis and early mortality from cancer in England. *Br J Cancer*, 112 Suppl 1 (Suppl 1): S108-115.
- Meacham, C. E. and Morrison, S. J. 2013. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501 (7467): 328-337.
- Mehraj, U., Dar, A. H., Wani, N. A. and Mir, M. A. 2021a. Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 87 (2): 147-158.
- Mehraj, U., Qayoom, H. and Mir, M. A. 2021b. Prognostic significance and targeting tumor-associated macrophages in cancer: new insights and future perspectives. *Breast Cancer*, 28 (3): 539-555.
- Mehraj, U., Sofi, S., Alshehri, B. and Mir, M. A. 2022. Expression pattern and prognostic significance of CDKs in breast cancer: An integrated bioinformatic study. *Cancer Biomark*, 34 (3): 505-519.
- Meng, E. C., Shoichet, B. K. and Kuntz, I. D. 1992. Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of Computational Chemistry*, 13 (4): 505-524.
- Meng, S. and Wang, F. 2011. Research progresses of antimicrobial peptides with anticancer activities. *Chin. J. Biochem. Pharm*, 32: 77-80.
- Meng, X. Y., Zheng, Q. C. and Zhang, H. X. 2009. A comparative analysis of binding sites between mouse CYP2C38 and CYP2C39 based on homology modeling, molecular dynamics simulation and docking studies. *Biochim Biophys Acta*, 1794 (7): 1066-1072.
- Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J.-C. and Monsigny, M. 1998. Membrane Permeabilization and Efficient Gene Transfer by a Peptide Containing Several Histidines. *Bioconjugate Chemistry*, 9 (2): 260-267.
- Mieog, J. S., van der Hage, J. A. and van de Velde, C. J. 2007. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Surg*, 94 (10): 1189-1200.
- Miller, L. D., Coffman, L. G., Chou, J. W., Black, M. A., Bergh, J., D'Agostino, R., Jr., Torti, S. V. and Torti, F. M. 2011. An iron regulatory gene signature predicts outcome in breast cancer. *Cancer Res*, 71 (21): 6728-6737.
- Milner-White, E. J. and Poet, R. 1986. Four classes of beta-hairpins in proteins. *Biochem J*, 240 (1): 289-292.

- Min, K. A., Maharjan, P., Ham, S. and Shin, M. C. 2018. Pro-apoptotic peptides-based cancer therapies: Challenges and strategies to enhance therapeutic efficacy. *Archives of pharmacal research*, 41: 594-616.
- Mir, M. 2023. Therapeutic potential of Cell Cycle Kinases in Breast Cancer (Springer-Nature), p.
- Mir, M. A., Qayoom, H., Mehraj, U., Nisar, S., Bhat, B. and Wani, N. A. 2020. Targeting Different Pathways Using Novel Combination Therapy in Triple Negative Breast Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 20 (8): 586-602.
- Mir, M. A. and Gul, A. 2022. Chapter 8 - The extracellular matrix in breast cancer. In: Role of Tumor Microenvironment in Breast Cancer and Targeted Therapies, Eds: Mir, M. A.: Academic Press, p. 195-220.
- Mir, M. A. and Haq, B. u. 2022. Chapter 10 - Targeting tumor microenvironment for breast cancer treatment. In: Role of Tumor Microenvironment in Breast Cancer and Targeted Therapies, Eds: Mir, M. A.: Academic Press, p. 249-277.
- Mir, M. A. and Mir, A. Y. 2022. Chapter 5 - Role of regulatory T cells in cancer. In: Role of Tumor Microenvironment in Breast Cancer and Targeted Therapies, Eds: Mir, M. A.: Academic Press, p. 113-136.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. and Schlaepfer, D. D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6 (1): 56-68.
- Muegge, I. and Martin, Y. C. 1999. A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *J Med Chem*, 42 (5): 791-804.
- Mukhopadhyay, S. and Gordon, S. 2004. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology*, 209 (1-2): 39-49.
- Murphy, J. E., Tedbury, P. R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J. H. and Ponnambalam, S. 2005. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*, 182 (1): 1-15.
- Murthy, R. K., Loi, S., Okines, A., Paplomata, E., Hamilton, E., Hurvitz, S. A., Lin, N. U., Borges, V., Abramson, V., Anders, C. et al. 2020. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*, 382 (7): 597-609.
- Nami, B. and Wang, Z. 2017. HER2 in Breast Cancer Stemness: A Negative Feedback Loop towards Trastuzumab Resistance. *Cancers (Basel)*, 9 (5).
- Navarro, S., Aleu, J., Jiménez, M., Boix, E., Cuchillo, C. M. and Nogués, M. V. 2008. The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (2): 324-337.
- Nedeljković, M. and Damjanović, A. 2019. Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer—how we can rise to the challenge. *Cells*, 8 (9): 957.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. and Lehninger, A. L. 2000. Lehninger : principles of biochemistry, New York, Worth Publishers, p.

- Nelson, J. C., Beitsch, P. D., Vicini, F. A., Quiet, C. A., Garcia, D., Snider, H. C., Gittleman, M. A., Zannis, V. J., Whitworth, P. W., Fine, R. E. et al. 2009. Four-year clinical update from the American Society of Breast Surgeons MammoSite brachytherapy trial. *Am J Surg*, 198 (1): 83-91.
- Ni, Q., Li, X., Huang, H. and Ge, Z. 2023. Decreased expression of SCARA5 predicts a poor prognosis in melanoma using bioinformatics analysis. *Front Oncol*, 13: 1015358.
- Nielsen, D. L., Andersson, M. and Kamby, C. 2009. HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Cancer treatment reviews*, 35 (2): 121-136.
- Nilges, M., Clore, G. M. and Gronenborn, A. M. 1988. Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms. Circumventing problems associated with folding. *FEBS Lett*, 239 (1): 129-136.
- Nilsson, L., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Brünger, A. T. and Karplus, M. 1986. Structure refinement of oligonucleotides by molecular dynamics with nuclear Overhauser effect interproton distance restraints: application to 5' d(C-G-T-A-C-G)2. *J Mol Biol*, 188 (3): 455-475.
- Nosé, S. 1984. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics*, 81 (1): 511-519.
- Nosé, S. 2002. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics*, 100 (1): 191-198.
- Oancea, E., Teruel, M. N., Quest, A. F. and Meyer, T. 1998. Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol*, 140 (3): 485-498.
- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. and Jensen, J. H. 2011. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7 (2): 525-537.
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Muller, S. and Wollscheid, B. 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 30 (6): 884-886.
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M. C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C. and Fridman, W. H. 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29 (8): 1093-1102.
- Paik, S., Tang, G., Shak, S., Kim, C., Baker, J., Kim, W., Cronin, M., Baehner, F. L., Watson, D., Bryant, J. et al. 2006. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 24 (23): 3726-3734.
- Pan, X., Xu, J. and Jia, X. 2020. Research progress evaluating the function and mechanism of anti-tumor peptides. *Cancer Management and Research*: 397-409.
- Pandey, T., Shukla, R., Shukla, H., Sonkar, A., Tripathi, T. and Singh, A. K. 2017. A combined biochemical and computational studies of the rho-class glutathione s-

- transferase sll1545 of *Synechocystis* PCC 6803. *Int J Biol Macromol*, 94 (Pt A): 378-385.
- Paquet, E. and Viktor, H. L. 2015. Molecular dynamics, monte carlo simulations, and langevin dynamics: a computational review. *Biomed Res Int*, 2015: 183918.
- Parker, M. W. 2003. Protein structure from x-ray diffraction. *J Biol Phys*, 29 (4): 341-362.
- Pathak, R. K., Taj, G., Pandey, D., Kasana, V. K., Baunthiyal, M. and Kumar, A. 2016. Molecular modeling and docking studies of phytoalexin(s) with pathogenic protein(s) as molecular targets for designing the derivatives with anti-fungal action on *Alternaria* spp. of Brassica. *Plant Omics*, 9: 172-182.
- Pathak, R. K., Gupta, A., Shukla, R. and Baunthiyal, M. 2018. Identification of new drug-like compounds from millets as Xanthine oxidoreductase inhibitors for treatment of Hyperuricemia: A molecular docking and simulation study. *Comput Biol Chem*, 76: 32-41.
- Patrick, G. L. 2023. An introduction to medicinal chemistry, Oxford university press, p.
- Pauling, L. and Corey, R. B. 1951. Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 37 (5): 235-240.
- Pearson, W. R. 2016. Finding Protein and Nucleotide Similarities with FASTA. *Curr Protoc Bioinformatics*, 53: 3 9 1-3 9 25.
- Pellegrino, M., Mancini, F., Lucà, R., Coletti, A., Giacchè, N., Manni, I., Arisi, I., Florenzano, F., Teveroni, E. and Buttarelli, M. 2015. Targeting the MDM2/MDM4 interaction interface as a promising approach for p53 reactivation therapy. *Cancer research*, 75 (21): 4560-4572.
- Pence, H. E. and Williams, A. 2010. ChemSpider: An Online Chemical Information Resource. *Journal of Chemical Education*, 87 (11): 1123-1124.
- Perez, E. A., Romond, E. H., Suman, V. J., Jeong, J.-H., Sledge, G., Geyer Jr, C. E., Martino, S., Rastogi, P., Gralow, J. and Swain, S. M. 2014. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *Journal of clinical oncology*, 32 (33): 3744.
- Perilla, J. R., Goh, B. C., Cassidy, C. K., Liu, B., Bernardi, R. C., Rudack, T., Yu, H., Wu, Z. and Schulten, K. 2015. Molecular dynamics simulations of large macromolecular complexes. *Curr Opin Struct Biol*, 31: 64-74.
- Perola, E., Walters, W. P. and Charifson, P. S. 2004. A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. *Proteins*, 56 (2): 235-249.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A. et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406 (6797): 747-752.
- Peto, R., Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Pan, H. C., Clarke, M., Cutter, D., Darby, S., McGale, P., Taylor, C. et al. 2012. Comparisons between different

- polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*, 379 (9814): 432-444.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H. and Ferrin, T. E. 2021. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci*, 30 (1): 70-82.
- Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M. and Morris, M. C. 2015. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers (Basel)*, 7 (1): 179-237.
- Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S. 2011. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunological reviews*, 240 (1): 11-24.
- Ponder, J. W. and Case, D. A. 2003. Force fields for protein simulations. *Adv Protein Chem*, 66: 27-85.
- Pontius, J., Richelle, J. and Wodak, S. J. 1996. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *J Mol Biol*, 264 (1): 121-136.
- PrabhuDas, M. R., Baldwin, C. L., Bollyky, P. L., Bowdish, D. M., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M. and Loike, J. 2017. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *The Journal of Immunology*, 198 (10): 3775-3789.
- Predescu, C., Lerer, A. K., Lippert, R. A., Towles, B., Grossman, J. P., Dirks, R. M. and Shaw, D. E. 2020. The u-series: A separable decomposition for electrostatics computation with improved accuracy. *J Chem Phys*, 152 (8): 084113.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C. et al. 2019. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*, 18 (1): 41-58.
- Pusztai, L., Broglio, K., Andre, F., Symmans, W. F., Hess, K. R. and Hortobagyi, G. N. 2008. Effect of molecular disease subsets on disease-free survival in randomized adjuvant chemotherapy trials for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 26 (28): 4679-4683.
- Qayoom, H., Mehraj, U., Sofi, S., Aisha, S., Almilaibary, A., Alkhanani, M. and Mir, M. A. 2022. Expression patterns and therapeutic implications of CDK4 across multiple carcinomas: a molecular docking and MD simulation study. *Med Oncol*, 39 (10): 158.
- Qiao, X., Wang, Y. and Yu, H. 2019. Progress in the mechanisms of anticancer peptides. *Sheng wu Gong Cheng xue bao= Chinese Journal of Biotechnology*, 35 (8): 1391-1400.
- Rajendran, V., Shukla, R., Shukla, H. and Tripathi, T. 2018. Structure-function studies of the asparaginyl-tRNA synthetase from *Fasciola gigantica*: understanding the role of catalytic and non-catalytic domains. *Biochem J*, 475 (21): 3377-3391.
- Ralston, R. and Bishop, J. M. 1985. The product of the protooncogene c-src is modified during the cellular response to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (23): 7845-7849.

- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V. 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*, 7: 95-99.
- Ramsay, R. R., Popovic-Nikolic, M. R., Nikolic, K., Uliassi, E. and Bolognesi, M. L. 2018. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med*, 7 (1): 3.
- Ramsey, J. D. and Flynn, N. H. 2015. Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol Ther*, 154: 78-86.
- Rana, G., Pathak, R. K., Shukla, R. and Baunthiyal, M. 2020. In silico identification of mimicking molecule(s) triggering von Willebrand factor in human: a molecular drug target for regulating coagulation pathway. *J Biomol Struct Dyn*, 38 (1): 124-136.
- Raucher, D. and Ryu, J. S. 2015. Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment. *Trends Mol Med*, 21 (9): 560-570.
- Ray, T., Kar, D., Pal, A., Mukherjee, S., Das, C. and Pal, A. 2018. Molecular targeting of breast and colon cancer cells by PAR1 mediated apoptosis through a novel pro-apoptotic peptide. *Apoptosis*, 23 (11-12): 679-694.
- Richardson, J. S. 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem*, 34: 167-339.
- Ritchie, D. W. 2003. Evaluation of protein docking predictions using Hex 3.1 in CAPRI rounds 1 and 2. *Proteins*, 52 (1): 98-106.
- Rost, B., Schneider, R. and Sander, C. 1997. Protein fold recognition by prediction-based threading. *J Mol Biol*, 270 (3): 471-480.
- Roth, B. L., Sheffler, D. J. and Kroeze, W. K. 2004. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov*, 3 (4): 353-359.
- Roth, C. M., Neal, B. L. and Lenhoff, A. M. 1996. Van der Waals interactions involving proteins. *Biophys J*, 70 (2): 977-987.
- Roudi, R., Syn, N. L. and Roudbary, M. 2017. Antimicrobial Peptides As Biologic and Immunotherapeutic Agents against Cancer: A Comprehensive Overview. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Ruddat, V. C., Mogul, R., Chorny, I., Chen, C., Perrin, N., Whitman, S., Kenyon, V., Jacobson, M. P., Bernasconi, C. F. and Holman, T. R. 2004. Tryptophan 500 and arginine 707 define product and substrate active site binding in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry*, 43 (41): 13063-13071.
- Sahoo, G., Samal, D., Khandayataray, P. and Murthy, M. K. 2023. A Review on Caspases: Key Regulators of Biological Activities and Apoptosis. *Molecular Neurobiology*, 60 (10): 5805-5837.
- Salsbury, F. R., Jr. 2010. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. *Curr Opin Pharmacol*, 10 (6): 738-744.
- Sani, M.-A. and Separovic, F. 2016. How membrane-active peptides get into lipid membranes. *Accounts of chemical research*, 49 (6): 1130-1138.

- Schrödinger, L., The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- Schuler, L. D., Daura, X. and Gunsteren, W. F. v. 2001. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry*, 22.
- Schulz-Gasch, T. and Stahl, M. 2003. Binding site characteristics in structure-based virtual screening: evaluation of current docking tools. *J Mol Model*, 9 (1): 47-57.
- Schüttelkopf, A. W. and van Aalten, D. M. 2004. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60 (Pt 8): 1355-1363.
- Seeliger, D. and de Groot, B. L. 2010. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des*, 24 (5): 417-422.
- Segovia-Mendoza, M., González-González, M. E., Barrera, D., Díaz, L. and García-Becerra, R. 2015. Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Am J Cancer Res*, 5 (9): 2531-2561.
- Senior, A. W., Evans, R., Jumper, J., Kirkpatrick, J., Sifre, L., Green, T., Qin, C., Zidek, A., Nelson, A. W. R., Bridgland, A. et al. 2019. Protein structure prediction using multiple deep neural networks in the 13th Critical Assessment of Protein Structure Prediction (CASP13). *Proteins*, 87 (12): 1141-1148.
- Senior, A. W., Evans, R., Jumper, J., Kirkpatrick, J., Sifre, L., Green, T., Qin, C., Zidek, A., Nelson, A. W. R., Bridgland, A. et al. 2020. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*, 577 (7792): 706-710.
- Shah, J. K. and Maginn, E. J. 2011. A general and efficient Monte Carlo method for sampling intramolecular degrees of freedom of branched and cyclic molecules. *J Chem Phys*, 135 (13): 134121.
- Shamova, O., Orlov, D., Stegemann, C., Czihal, P., Hoffmann, R., Brogden, K., Kolodkin, N., Sakuta, G., Tossi, A., Sahl, H.-G. et al. 2009. ChBac3.4: A Novel Proline-Rich Antimicrobial Peptide from Goat Leukocytes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 15 (1): 31-42.
- Shao, C., Anand, V., Andreeff, M. and Battula, V. L. 2022. Ganglioside GD2: a novel therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1508 (1): 35-53.
- Sheu, M., Baldwin, W. W. and Brunson, K. W. 1985. Cytotoxicity of rabbit macrophage peptides MCP-1 and MCP-2 for mouse tumor cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 28 (5): 626-629.
- Shoichet, B. K., Leach, A. R. and Kuntz, I. D. 1999. Ligand solvation in molecular docking. *Proteins*, 34 (1): 4-16.
- Shukla, H., Khan, S. R., Shukla, R., Krishnan, M. Y., Akhtar, M. S. and Tripathi, T. 2018a. Alternate pathway to ascorbate induced inhibition of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 111: 161-169.

- Shukla, R., Shukla, H., Kalita, P., Sonkar, A., Pandey, T., Singh, D. B., Kumar, A. and Tripathi, T. 2018b. Identification of potential inhibitors of *Fasciola gigantica* thioredoxin1: computational screening, molecular dynamics simulation, and binding free energy studies. *J Biomol Struct Dyn*, 36 (8): 2147-2162.
- Sibanda, B. L. and Thornton, J. M. 1985. Beta-hairpin families in globular proteins. *Nature*, 316 (6024): 170-174.
- Sibanda, B. L., Blundell, T. L. and Thornton, J. M. 1989. Conformation of beta-hairpins in protein structures. A systematic classification with applications to modelling by homology, electron density fitting and protein engineering. *J Mol Biol*, 206 (4): 759-777.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66 (1): 7-30.
- Sievers, F. and Higgins, D. G. 2014. Clustal omega. *Curr Protoc Bioinformatics*, 48: 3 13 11-13 13 16.
- Singh, D. B. 2014. Success, Limitation and Future of Computer Aided Drug Designing. *Translational Medicine*, 04.
- Singh, D. B. and Dwivedi, S. 2016. Structural insight into binding mode of inhibitor with SAHH of Plasmodium and human: interaction of curcumin with anti-malarial drug targets. *J Chem Biol*, 9 (4): 107-120.
- Singh, D. B. 2020. Computer-Aided Drug Design, *Singapore*, Springer Singapore, p.
- Singh, D. B. and Tripathi, T. 2020. Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics, *Singapore*, Springer Singapore, p.
- Singh, D. V., Agarwal, S., Kesharwani, R. K. and Misra, K. 2013. 3D QSAR and pharmacophore study of curcuminoids and curcumin analogs: interaction with thioredoxin reductase. *Interdiscip Sci*, 5 (4): 286-295.
- Singh, M., Kumar, V., Sikka, K., Thakur, R., Harioudh, M. K., Mishra, D. P., Ghosh, J. K. and Siddiqi, M. I. 2020. Computational Design of Biologically Active Anticancer Peptides and Their Interactions with Heterogeneous POPC/POPS Lipid Membranes. *Journal of chemical information and modeling*, 60 (1): 332-341.
- Singh, N. and Warshel, A. 2010. Absolute binding free energy calculations: on the accuracy of computational scoring of protein-ligand interactions. *Proteins*, 78 (7): 1705-1723.
- Singh, S., Singh, D. B., Singh, A., Gautam, B., Ram, G., Dwivedi, S. and Ramteke, P. W. 2016. An Approach for Identification of Novel Drug Targets in *Streptococcus pyogenes* SF370 Through Pathway Analysis. *Interdiscip Sci*, 8 (4): 388-394.
- Skolnick, J. 2006. In quest of an empirical potential for protein structure prediction. *Curr Opin Struct Biol*, 16 (2): 166-171.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J. and Pegram, M. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England journal of medicine*, 344 (11): 783-792.

- Smith, J., Cusack, S., Tidor, B. and Karplus, M. 1990. Inelastic neutron scattering analysis of low-frequency motions in proteins: Harmonic and damped harmonic models of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *The Journal of Chemical Physics*, 93 (5): 2974-2991.
- Smyth, M. S. and Martin, J. H. 2000. x ray crystallography. *Mol Pathol*, 53 (1): 8-14.
- Soding, J., Biegert, A. and Lupas, A. N. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res*, 33 (Web Server issue): W244-248.
- Soding, J. and Remmert, M. 2011. Protein sequence comparison and fold recognition: progress and good-practice benchmarking. *Curr Opin Struct Biol*, 21 (3): 404-411.
- Sofi, S., Mehraj, U., Qayoom, H., Aisha, S., Almilaibary, A., Alkhanani, M. and Mir, M. A. 2022. Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) in cancer: molecular docking and dynamic simulations of potential CDK1 inhibitors. *Med Oncol*, 39 (9): 133.
- Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M. and Jensen, J. H. 2011. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7 (7): 2284-2295.
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J. and Baker, D. 2013. High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure*, 21 (10): 1735-1742.
- Sonkar, A., Shukla, H., Shukla, R., Kalita, J., Pandey, T. and Tripathi, T. 2017. UDP-N-Acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) of *Acinetobacter baumannii* (AbMurA): Structural and functional properties. *Int J Biol Macromol*, 97: 106-114.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S. et al. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (14): 8418-8423.
- Sparano, J. A., Wang, M., Martino, S., Jones, V., Perez, E. A., Saphner, T., Wolff, A. C., Sledge, G. W., Jr., Wood, W. C. and Davidson, N. E. 2008. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 358 (16): 1663-1671.
- Spitale, A., Mazzola, P., Soldini, D., Mazzucchelli, L. and Bordoni, A. 2009. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol*, 20 (4): 628-635.
- Still, W. C., Tempczyk, A., Hawley, R. C. and Hendrickson, T. 1990. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, 112 (16): 6127-6129.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumieny, R., Haas, J. and Schwede, T. 2019. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36 (6): 1765-1771.

- Su, A. I., Lorber, D. M., Weston, G. S., Baase, W. A., Matthews, B. W. and Shoichet, B. K. 2001. Docking molecules by families to increase the diversity of hits in database screens: computational strategy and experimental evaluation. *Proteins*, 42 (2): 279-293.
- Su, X. D., Zhang, H., Terwilliger, T. C., Liljas, A., Xiao, J. and Dong, Y. 2015. Protein Crystallography from the Perspective of Technology Developments. *Crystallogr Rev*, 21 (1-2): 122-153.
- Subramani, A., Wei, Y. and Floudas, C. A. 2012. ASTRO-FOLD 2.0: an Enhanced Framework for Protein Structure Prediction. *AIChE J*, 58 (5): 1619-1637.
- Sugiki, T., Kobayashi, N. and Fujiwara, T. 2017. Modern Technologies of Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Three-dimensional Structure Determination of Proteins Open Avenues for Life Scientists. *Comput Struct Biotechnol J*, 15: 328-339.
- Sulimov, V. B., Kutov, D. C. and Sulimov, A. V. 2019. Advances in Docking. *Curr Med Chem*, 26 (42): 7555-7580.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71 (3): 209-249.
- Swain, S. M., Tang, G., Geyer, C. E., Jr., Rastogi, P., Atkins, J. N., Donnellan, P. P., Fehrenbacher, L., Azar, C. A., Robidoux, A., Polikoff, J. A. et al. 2013. Definitive results of a phase III adjuvant trial comparing three chemotherapy regimens in women with operable, node-positive breast cancer: the NSABP B-38 trial. *J Clin Oncol*, 31 (26): 3197-3204.
- Taban, Q., Mumtaz, P. T., Masoodi, K. Z., Haq, E. and Ahmad, S. M. 2022. Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action. *Cell Commun Signal*, 20 (1): 2.
- Talele, T. T., Khedkar, S. A. and Rigby, A. C. 2010. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. *Current topics in medicinal chemistry*, 10 (1): 127-141.
- Talevi, A. and Bellera, C. L. 2020. Challenges and opportunities with drug repurposing: finding strategies to find alternative uses of therapeutics. *Expert Opin Drug Discov*, 15 (4): 397-401.
- Tan, Y. Z., Aiyer, S., Mietzsch, M., Hull, J. A., McKenna, R., Grieger, J., Samulski, R. J., Baker, T. S., Agbandje-McKenna, M. and Lyumkis, D. 2018. Sub-2 Å Ewald curvature corrected structure of an AAV2 capsid variant. *Nat Commun*, 9 (1): 3628.
- Thachuk, C., Shmygelska, A. and Hoos, H. H. 2007. A replica exchange Monte Carlo algorithm for protein folding in the HP model. *BMC Bioinformatics*, 8: 342.
- Thomas, S., Izard, J., Walsh, E., Batich, K., Chongsathidkiet, P., Clarke, G., Sela, D. A., Muller, A. J., Mullin, J. M., Albert, K. et al. 2017. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Res*, 77 (8): 1783-1812.

- Thomas, S. M. and Brugge, J. S. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology*, 13 (1): 513-609.
- Tissenbaum, H. A. and Guarente, L. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 410 (6825): 227-230.
- Trevizani, R., Custodio, F. L., Dos Santos, K. B. and Dardenne, L. E. 2017. Critical Features of Fragment Libraries for Protein Structure Prediction. *PLoS One*, 12 (1): e0170131.
- Trott, O. and Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, 31 (2): 455-461.
- Tukler Henriksson, J., Coursey, T. G., Corry, D. B., De Paiva, C. S. and Pflugfelder, S. C. 2015. IL-13 Stimulates Proliferation and Expression of Mucin and Immunomodulatory Genes in Cultured Conjunctival Goblet Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56 (8): 4186-4197.
- Turing, A. M., 1950, Computing machinery and intelligence. *Mind*, LIX (236), 433–460.
- Ulker, D., Ersoy, Y. E., Gucin, Z., Muslumanoglu, M. and Buyru, N. 2018. Downregulation of SCARA5 may contribute to breast cancer via promoter hypermethylation. *Gene*, 673: 102-106.
- UniProt, C. 2023. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res*, 51 (D1): D523-D531.
- Vajdic, C. M. and van Leeuwen, M. T. 2009. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer*, 125 (8): 1747-1754.
- Valero, J. G., Sancey, L., Kucharczak, J., Guillemain, Y., Gimenez, D., Prudent, J., Gillet, G., Salgado, J., Coll, J. L. and Aouacheria, A. 2011. Bax-derived membrane-active peptides act as potent and direct inducers of apoptosis in cancer cells. *J Cell Sci*, 124 (Pt 4): 556-564.
- van Aalten, D. M., Bywater, R., Findlay, J. B., Hendlich, M., Hooft, R. W. and Vriend, G. 1996. PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *J Comput Aided Mol Des*, 10 (3): 255-262.
- van der Hage, J. A., van de Velde, C. J., Julien, J. P., Tubiana-Hulin, M., Vandervelden, C. and Duchateau, L. 2001. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol*, 19 (22): 4224-4237.
- Vanommeslaeghe, K., Guvench, O. and MacKerell, A. D., Jr. 2014. Molecular mechanics. *Curr Pharm Des*, 20 (20): 3281-3292.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A. et al. 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*, 50 (D1): D439-d444.
- Veldhuizen, E. J., Schneider, V. A., Agustindari, H., Van Dijk, A., Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L., Bikker, F. J. and Haagsman, H. P. 2014. Antimicrobial and

- immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides. *PLoS One*, 9 (4): e95939.
- Venger, B. H., Hansch, C., Hatheway, G. J. and Amrein, Y. U. 1979. Ames test of 1-(X-phenyl)-3,3-dialkyltriazenes. A quantitative structure-activity study. *J Med Chem*, 22 (5): 473-476.
- Venkatachalam, C. M. 1968. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers*, 6 (10): 1425-1436.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A. et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291 (5507): 1304-1351.
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D. Y., Diéras, V., Guardino, E. et al. 2012. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*, 367 (19): 1783-1791.
- Vichai, V. and Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*, 1 (3): 1112-1116.
- Vilar, S., Cozza, G. and Moro, S. 2008. Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery. *Curr Top Med Chem*, 8 (18): 1555-1572.
- Vögeli, B., Kazemi, S., Güntert, P. and Riek, R. 2012. Spatial elucidation of motion in proteins by ensemble-based structure calculation using exact NOEs. *Nat Struct Mol Biol*, 19 (10): 1053-1057.
- Vrieling, C., van Werkhoven, E., Maingon, P., Poortmans, P., Weltens, C., Fourquet, A., Schinagel, D., Oei, B., Rodenhuis, C. C., Horiot, J. C. et al. 2017. Prognostic Factors for Local Control in Breast Cancer After Long-term Follow-up in the EORTC Boost vs No Boost Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 3 (1): 42-48.
- Wali, A. F., Majid, S., Rasool, S., Shehada, S. B., Abdulkareem, S. K., Firdous, A., Beigh, S., Shakeel, S., Mushtaq, S. and Akbar, I. 2019. Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. *Saudi pharmaceutical journal*, 27 (6): 767-777.
- Walsh, M. K., Marlon, J. R., Goring, S. J., Brown, K. J. and Gavin, D. G. 2015. A Regional Perspective on Holocene Fire–Climate–Human Interactions in the Pacific Northwest of North America. *Annals of the Association of American Geographers*, 105 (6): 1135-1157.
- Wander, S. A., O'Brien, N., Litchfield, L. M., O'Dea, D., Morato Guimaraes, C., Slamon, D. J. and Goel, S. 2022. Targeting CDK4 and 6 in Cancer Therapy: Emerging Preclinical Insights Related to Abemaciclib. *Oncologist*, 27 (10): 811-821.
- Wang, J., Wang, S., Chen, L. and Tan, J. 2021. SCARA5 suppresses the proliferation and migration, and promotes the apoptosis of human retinoblastoma cells by inhibiting the PI3K/AKT pathway. *Mol Med Rep*, 23 (3): 202.
- Wang, J. J., Lei, K. F. and Han, F. 2018. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22 (12): 3855-3864.

- Wang, R., Lai, L. and Wang, S. 2002. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des*, 16 (1): 11-26.
- Wang, T., Yuan, X. S., Wu, M. B., Lin, J. P. and Yang, L. R. 2017. The advancement of multidimensional QSAR for novel drug discovery - where are we headed? *Expert Opin Drug Discov*, 12 (8): 769-784.
- Wang, T., Qiao, Y., Ding, W., Mao, W., Zhou, Y. and Gong, H. 2019a. Improved fragment sampling for ab initio protein structure prediction using deep neural networks. *Nature Machine Intelligence*, 1 (8): 347-355.
- Wang, W., Knovich, M. A., Coffman, L. G., Torti, F. M. and Torti, S. V. 2010. Serum ferritin: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800 (8): 760-769.
- Wang, X., Zhang, H. and Chen, X. 2019b. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2 (2): 141.
- Wang, Y., Xiao, J., Suzek, T. O., Zhang, J., Wang, J. and Bryant, S. H. 2009. PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules. *Nucleic Acids Res*, 37 (Web Server issue): W623-633.
- Wang, Z., Li, C., Ellenburg, M., Soistman, E., Ruble, J., Wright, B., Ho, J. X. and Carter, D. C. 2006. Structure of human ferritin L chain. *Acta Crystallographica Section D*, 62 (7): 800-806.
- Wang, Z. M., Li, C. E., M.P., Soitsman, E. M., Ruble, J. R., Wright, B. S., Ho, J. X. and Carter, D. C. 2011. Structure of Human Ferritin L. Chain.
- Warburg, O. 1930. The metabolism of tumours. *Constable*.
- Warburg, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, 123 (3191): 309-314.
- Webb, B. and Sali, A. 2016. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54 (1): 5.6.1-5.6.37.
- Weernink, P. A. O. and Rijkse, G. 1995. Activation and Translocation of c-Src to the Cytoskeleton by Both Platelet-derived Growth Factor and Epidermal Growth Factor (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270 (5): 2264-2267.
- Wei, G.-W. 2019. Protein structure prediction beyond AlphaFold. *Nature Machine Intelligence*, 1 (8): 336-337.
- Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. and Weiner, P. 1984. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 106 (3): 765-784.
- Wen, X., Wang, N., Zhang, F. and Dong, C. 2016. Overexpression of SCARA5 inhibits tumor proliferation and invasion in osteosarcoma via suppression of the FAK signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 13 (3): 2885-2891.
- White, E. R., Sun, L., Ma, Z., Beckta, J. M., Danzig, B. A., Hacker, D. E., Huie, M., Williams, D. C., Edwards, R. A. and Valerie, K. 2015. Peptide library approach to uncover phosphomimetic inhibitors of the BRCA1 C-terminal domain. *ACS chemical biology*, 10 (5): 1198-1208.

- Wider, G. 2005. NMR techniques used with very large biological macromolecules in solution. *Methods Enzymol*, 394: 382-398.
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z. and Woolsey, J. 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res*, 34 (Database issue): D668-672.
- Wolf, A. and Kirschner, K. N. 2013. Principal component and clustering analysis on molecular dynamics data of the ribosomal L11·23S subdomain. *J Mol Model*, 19 (2): 539-549.
- Wong, A. L. and Lee, S.-C. 2012. Mechanisms of resistance to trastuzumab and novel therapeutic strategies in HER2-positive breast cancer. *International journal of breast cancer*, 2012.
- Worwood, M., Dawkins, S., Wagstaff, M. and Jacobs, A. 1976. The purification and properties of ferritin from human serum. *Biochemical Journal*, 157 (1): 97-103.
- Wouters, O. J., McKee, M. and Luyten, J. 2020. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018. *Jama*, 323 (9): 844-853.
- Wu, S. and Zhang, Y. 2007. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res*, 35 (10): 3375-3382.
- Wu, T. Y., Wagner, K. W., Bursulaya, B., Schultz, P. G. and Deveraux, Q. L. 2003. Development and characterization of nonpeptidic small molecule inhibitors of the XIAP/caspase-3 interaction. *Chem Biol*, 10 (8): 759-767.
- Xie, M., Liu, D. and Yang, Y. 2020. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biology*, 10 (7): 200004.
- Xu, D. and Zhang, Y. 2011. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys J*, 101 (10): 2525-2534.
- Xu, J., Li, M., Kim, D. and Xu, Y. 2003. RAPTOR: optimal protein threading by linear programming. *J Bioinform Comput Biol*, 1 (1): 95-117.
- Xu, J. and Zhang, Y. 2010. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics*, 26 (7): 889-895.
- Xue, H., Li, J., Xie, H. and Wang, Y. 2018. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *Int J Biol Sci*, 14 (10): 1232-1244.
- Yamaguchi, Y., Yamamoto, K., Sato, Y., Inoue, S., Morinaga, T. and Hirano, E. 2016. Combination of aspartic acid and glutamic acid inhibits tumor cell proliferation. *Biomed Res*, 37 (2): 153-159.
- Yan, N., Zhang, S., Yang, Y., Cheng, L., Li, C., Dai, L., Dai, L., Zhang, X., Fan, P. and Tian, H. 2012. Therapeutic upregulation of Class A scavenger receptor member 5 inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer science*, 103 (9): 1631-1639.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12 (1): 7-8.

- Yang, X., Wang, Y., Byrne, R., Schneider, G. and Yang, S. 2019. Concepts of artificial intelligence for computer-assisted drug discovery. *Chemical reviews*, 119 (18): 10520-10594.
- Yeatman, T. J. 2004. A renaissance for SRC. *Nature Reviews Cancer*, 4 (6): 470-480.
- Yoon, H., Dehart, J. P., Murphy, J. M. and Lim, S.-T. S. 2015. Understanding the roles of FAK in cancer: inhibitors, genetic models, and new insights. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63 (2): 114-128.
- You, K., Su, F., Liu, L., Lv, X., Zhang, J., Zhang, Y. and Liu, B. 2017. SCARA5 plays a critical role in the progression and metastasis of breast cancer by inactivating the ERK1/2, STAT3, and AKT signaling pathways. *Mol Cell Biochem*, 435 (1-2): 47-58.
- Yu, B., Cheng, C., Wu, Y., Guo, L., Kong, D., Zhang, Z., Wang, Y., Zheng, E., Liu, Y. and He, Y. 2020. Interactions of ferritin with scavenger receptor class A members. *Journal of Biological Chemistry*, 295 (46): 15727-15741.
- Yu, H., Ha, T., Liu, L., Wang, X., Gao, M., Kelley, J., Kao, R., Williams, D. and Li, C. 2012. Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- κ B activation in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823 (7): 1192-1198.
- Yuan, S., Norgard, R. J. and Stanger, B. Z. 2019. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov*, 9 (7): 837-851.
- Yuriev, E. and Ramsland, P. A. 2013. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. *J Mol Recognit*, 26 (5): 215-239.
- Zardecki, C., Dutta, S., Goodsell, D. S., Lowe, R., Voigt, M. and Burley, S. K. 2022. PDB-101: Educational resources supporting molecular explorations through biology and medicine. *Protein Sci*, 31 (1): 129-140.
- Zhang, B., Shi, W., Li, J., Liao, C., Yang, L., Huang, W. and Qian, H. 2017. Synthesis and biological evaluation of novel peptides based on antimicrobial peptides as potential agents with antitumor and multidrug resistance-reversing activities. *Chem Biol Drug Des*, 90 (5): 972-980.
- Zhang, N. and Zhao, H. 2016. Enriching screening libraries with bioactive fragment space. *Bioorg Med Chem Lett*, 26 (15): 3594-3597.
- Zhang, S., Huang, W.-C., Li, P., Guo, H., Poh, S.-B., Brady, S. W., Xiong, Y., Tseng, L.-M., Li, S.-H. and Ding, Z. 2011. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nature medicine*, 17 (4): 461-469.
- Zhang, W., Yang, J., He, B., Walker, S. E., Zhang, H., Govindarajoo, B., Virtanen, J., Xue, Z., Shen, H. B. and Zhang, Y. 2016. Integration of QUARK and I-TASSER for Ab Initio Protein Structure Prediction in CASP11. *Proteins*, 84 Suppl 1 (Suppl 1): 76-86.
- Zhang, Y. and Skolnick, J. 2004. SPICKER: a clustering approach to identify near-native protein folds. *J Comput Chem*, 25 (6): 865-871.

- Zhao, H., Qin, X., Yang, D., Jiang, Y., Zheng, W., Wang, D., Tian, Y., Liu, Q., Xu, N. and Li, Z. 2017. The development of activatable lytic peptides for targeting triple negative breast cancer. *Cell death discovery*, 3 (1): 1-8.
- Zhao, L., Mao, Y., Zhou, J., Zhao, Y., Cao, Y. and Chen, X. 2016. Multifunctional DDX3: dual roles in various cancer development and its related signaling pathways. *American journal of cancer research*, 6 (2): 387.
- Zhou, H. and Skolnick, J. 2007. Ab initio protein structure prediction using chunk-TASSER. *Biophys J*, 93 (5): 1510-1518.
- Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M. and Cohen, P. L. 2012. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *The Journal of Immunology*, 189 (7): 3508-3520.
- Zoete, V., Cuendet, M. A., Grosdidier, A. and Michielin, O. 2011. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 32 (11): 2359-2368.
- Zwanzig, R., Szabo, A. and Bagchi, B. 1992. Levinthal's paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (1): 20-22.

ÖZGEÇMİŞ

ORHAN KOÇAK

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2017-2024	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-2017	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2008-2012	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Yıldırım, K., Şimşek, E., Koçak, O., Bozkurt, S., Özyurt Koyuncu, Ö., Çoban, A.Y. (2023). Resazurin Microplate Test Method for Rapid Determination of Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant Acinetobacter Baumannii Isolates. Laboratory Medicine, <https://doi.org/10.1093/labmed/lmad099>.
- 2- Şimşek, E., Koçak, O., Yıldırım, K., Kuruoğlu, A., Taşkın, N. D., Bozkurt, S., İmir, N., Ataş, C., Akçit, E. T., Çoban, M., & Çoban, A. Y. (2023). The Anti-angiogenic and Anti-microbial Effect of Diosmin: Potential Receptor Interactions via Molecular Docking. Revista Brasileira de Farmacognosia, 33(2), 422-431. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00365-y>.
- 3- Koçak, O., & Şimşek, E. (2022). A paradox from a neurotransmitter: the opposite effects of substance P and its physiological fragments SP (1-7) and SP (9-11) on the proliferation of human breast cancer cells and the migration capabilities of HUVEC cells. World Cancer Research Journal, 9: e2163. https://doi.org/10.32113/wcrj_20221_2163.
- 4- Koçak, O., & Şimşek, E. (2021). Proliferative effects of metamizole sodium on U-87 MG glioblastoma cell line: a pain killer or a killer? World Cancer Research Journal, 8: e1987 https://doi.org/10.32113/wcrj_20215_1987.

5- Koçak, O., Taşkın, N. D., & Şimşek, E. (2019). The Antiangiogenic Effects of Tamoxifen might be Attributed to Receptor Binding Capacity of its Solvent Dimethylsulfoxide in Breast Cancer: A Molecular Docking Study. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 30(2), 1-8. <https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v30i230265>.

6. Şimşek, E., Aydemir, E., İmir, N. G., Koçak, O., Kuruoğlu, A., & Fişkın, K. (2015). Dimethyl sulfoxide-caused changes in pro- and anti-angiogenic factor levels could contribute to an anti-angiogenic response in HeLa cells. *Neuropeptides*, 53, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.07.002>

Ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- BARAN Meltem, KOÇAK Orhan, TANYEL AKÇİT Esra, ŞİMŞEK Ece, YILDIRIM Kübra, ÇOBAN Ahmet Yılmaz (2023). Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Dinmeyen Bir Sancı mı?. 1st International Conference on Trends in Advanced Research (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).

2- ŞİMŞEK Ece, KOÇAK Orhan (2022). Scavenger Receptors and Its importance In Cancer. *ICOMNAS* (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).

3- ŞİMŞEK Ece, KOÇAK Orhan, ÇOBAN Ahmet Yılmaz, KOCAOĞLU CENKÇİ Serap, ÖZEN KÜÇÜKÇETİN İkbâl, ÇOMAK GÖÇER Emine Mine, KAMARLI ALTUN Hülya, TUFAN İsmail, ÖZTÜRK Oğuz, ÖZGÜN BAŞIBÜYÜK Gülüşan, KORKMAZ YAYLAGÜL Nilüfer, TONAK Hasan Atacan, BAŞIBÜYÜK Hasan Hüseyin, KENCEBAY MANAS Ceren (2021). MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattında Serotonin Reseptör Antagonisti Palonosetronun Pro ve Anti-anjiyogenik Faktörler Üzerine etkilerinin in vitro araştırılması. *ICONSAD 21* (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).

4- YILDIRIM Kübra, ŞİMŞEK Ece, BOZKURT Serhat, KOÇAK Orhan, KOYUNCU ÖZYURT Özlem, ÇOBAN Ahmet Yılmaz (2020). *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Kolistin Direncinin Belirlenmesinde Kolorimetrik Yeni Hızlı Bir Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemi. TMC 2020 Çevrimiçi Mikrobiyoloji Sempozyumu (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).

5- KOÇAK Orhan, ŞİMŞEK Ece (2017). Metamizole could act as an angiogenic factor depending on the interaction of VEGFR2: a molecular docking study. VI. International Congress of Molecular Medicine Molecular Medicine from the updates till the future (Özet Bildiri/Poster).

6- ODABAŞ KÖSE Elif, AYDEMİR Esra, ŞİMŞEK Ece, KOÇAK Orhan (2017). Kaempferol; A Possible Prodrug for Gram (-) Bacteria. VI. International Congress of Molecular Medicine, 2(01), 116-116. (Özet Bildiri/Poster)

7- ŞİMŞEK Ece, KOÇAK Orhan, KORKMAZ Selçuk, EKŞİ Elçin (2016). Homology modelling of Scara5 protein. 4th BAU drug design congress (Özet Bildiri/Poster).

8- ŞİMŞEK Ece, İMİR Nilüfer, AYDEMİR Esra, KOÇAK Orhan, GÖKTÜRK Ramazan Süleyman, YEŞİLADA Erdem, FIŞKIN Kayahan (2014). Ebenus boissieri Ekstratının HeLa Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

9- BERBER Kübra, KOÇAK Orhan, KURUOĞLU Aykut, ÖNEL Bircan, AYDEMİR Esra (2012). İki Antikanserojen İlaç Birbirlerinin Etkilerini Arttırabilir Mi? 19. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler

1. Sağlık Bilimlerinde Güncel Tartışmalar 7 (2023)., ALTINKAYNAK Altınay, BARAN Meltem, KOÇAK Orhan, TANYEL AKÇİT Esra, ŞİMŞEK Ece, Bilgin Yayınevi, Editör: Ali BİLGİLİ, Başak HANEDAN, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 1071, ISBN:978-625-6925-20-5, Türkçe(Bilimsel Kitap).

2. Nüklear Membran Reseptör Proteinleri, Bölüm adı:(Bölüm 2. Üç Boyutlu Yapısı NMR İle Belirlenmiş Proteinler) (2022)., KOÇAK Orhan, Efe Akademi Yayınları, Editör:Şimşek, Ece, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 177, ISBN:978-625-6995-00-0, Türkçe(Bilimsel Kitap).

Burslar ve Ödüller

1. 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı (Biyoteknolojik İlaç Teknolojileri), Destekleniyor, 2021- 1, 01.03.2021 - 30.09.2023.

2. Åbo Akademi Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Diagnostik alanında katkıda bulunan tam zamanlı araştırma, Burs (Ocak-Haziran-1050 Euro / ay) Ziyaretçi araştırmacı, Finlandiya / Turku