

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**hFR α HEDEF PROTEİNİNE KARŞI PEPTİT-BAZLI PET-LİGANDLARIN
RASYONEL TASARIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ertuğrul İŞLEYEN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Atilla AKDEMİR

TEMMUZ 2021

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**hFR α HEDEF PROTEİNİNE KARŞI PEPTİT-BAZLI PET-LİGANDLARIN
RASYONEL TASARIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ertuğrul İŞLEYEN
(195309004)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Atilla AKDEMİR

TEMMUZ 2021

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195309004 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Ertuğrul İŞLEYEN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “hFR α HEDEF PROTEİNİNE KARŞI PEPTİT-BAZLI PET-LİGANDLARIN RASYONEL TASARIMI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Atilla AKDEMİR**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Binnur TEMEL**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Onur ALPTÜRK

İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **13 Temmuz 2021**

Savunma Tarihi : **5 Temmuz 2021**



Aileme,

ÖNSÖZ

Öncelikle, kişisel gelişimime olanak sağlayan Ali Raif İlaç Sanayi A.Ş.'ye, değerli yöneticilerimden Haluk Şerif Yıldırım, Feryal Gönenç Ülkücü, Prof. Dr. Serdar Ünlü, Ebru Çakmak, Ahmet Uğur Şahin, Nilay Dokurer ve değerli çalışma arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisans çalışmam boyunca gerek ders aşamasında gerekse tez projesinin ilerlemesinde değerli bilgi, tecrübe ve desteklerinden dolayı Tez Danışman Hocam Prof. Dr. Atilla Akdemir'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını eksik etmeyen değerli hocam Prof. Dr. Binnur Temel'e, Ecz. Serap İpek Dingiş Birgül'e ve değerli Sağlık Bilimleri Enstitüsü ile İlaç Araştırma Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

Projenin ortaya, çıkıp ilerlemesinde büyük emekleri olan değerli bilim insanları Prof. Dr. Güneş Esendağlı, Dr. Özgür Yılmaz, Dr. Öğr. Üyesi Onur Alptürk ve hocalarımla değerli araştırma ekiplerine teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan ve her zaman bana destek olan annem Selma Oruçoğlu ve kardeşim Ebru İşleyen'e teşekkür eder ve öğrenim hayatım boyunca hep destek olan rahmetli dedem Sadık İşleyen'i saygı ve sevgiyle anıyorum.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından, 'PET Görüntüleme Sistemlerinde Kullanılmak Üzere Tümör Mikro-Çevresini Yüksek Seçicilik ile Hedefleyen Radyonüklid İşaretli Moleküllerin Rasyonel Tasarımı ve Geliştirilmesi' (ProjeNumarası:116E662) projesi kapsamında desteklenmiştir.

Ayrıca, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 20201205 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Temmuz 2021

Ertuğrul İŞLEYEN
(Kimya Mühendisi)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ertuğrul İŞLEYEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ii
BEYAN.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
SEMBOLLER	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xvi
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanser Hastalığı ve Görüntüleme	1
1.1.1 PET Ligandları ve PET Görüntüleme	4
1.1.2 Kanser fizyopatolojisi ve biyobelirteçler	6
1.1.2.1 Risk değerlendirme biyobelirteçleri.....	8
1.1.2.2 Tedavi öngören biyobelirteçler	8
1.1.2.3 Tanısal biyobelirteçler.....	8
1.1.2.4 Tedavi sürecini izleyen biyobelirteçler	8
1.1.2.5 Tekrar olasılığını öngören biyobelirteçler.....	8
1.1.2.6 Farmakodinamik biyobelirteçler	9
1.2 Folik Asit Reseptör α (hFR α).....	9
1.2.1 Fizyopatolojisi.....	11
1.2.2 Ligandları	11
1.2.2.1 Vintafolid	11
1.2.2.2 Farletuzumab.....	12
1.2.3 Kristal yapıları.....	13
1.3 Bilgisayar Destekli İlaç Keşfi ve Tasarım Yöntemleri	13
1.3.1 <i>De novo</i> Ligand tasarım yöntemleri.....	14
1.3.2 Docking yöntemleri.....	15
1.3.3 Moleküler Dinamik (MD) yöntemleri.....	16
1.4 Proje Kapsamında Yapılanlar	17
2. MATERYAL VE METOT	18
2.1 Peptit-Bazlı Ligandların Tasarlanması.....	18
2.2 Docking Çalışmaları.....	19
2.3 Docking Sonuçlarının Analiz Edilmesi.....	20
2.4 Moleküler Dinamik (MD) Çalışmaları.....	21
3. BİRİNCİ NESİL TASARLANAN OLASI hFRα LİGANDLARIN İNCELENMESİ.....	22
3.1 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları.....	22
3.1.1 hFR α -Folik Asit kompleksinin incelenmesi	22
3.1.2 hFR α -RFDK kompleksinin incelenmesi	22
3.1.3 hFR α -RFAAK kompleksinin incelenmesi	27

3.1.4 hFR α -RPAAK kompleksinin incelenmesi	29
3.1.5 hFR α -RPDAK kompleksinin incelenmesi	31
3.1.6 hFR α -RKAFK kompleksinin incelenmesi	33
3.1.7 hFR α -KYDAK kompleksinin incelenmesi	35
3.1.8 hFR α -KFDAK kompleksinin incelenmesi.....	37
3.1.9 hFR α -KYAAK kompleksinin incelenmesi	39
3.1.10 hFR α -HRAFAK kompleksinin incelenmesi	41
3.1.11 hFR α -KYANK kompleksinin incelenmesi	43
3.1.12 hFR α -KYSK kompleksinin incelenmesi.....	45
3.1.13 hFR α -RFAADK kompleksinin incelenmesi	46
3.1.14 hFR α -RFSNK kompleksinin incelenmesi.....	49
3.1.15 hFR α -RPSNK kompleksinin incelenmesi.....	50
3.1.16 hFR α -RYSDDK kompleksinin incelenmesi	52
3.1.17 hFR α -RYSDEK kompleksinin incelenmesi.....	54
4. İKİNCİ NESİL OLASI hFRα LİGANDLARIN İNCELENMESİ.....	57
4.1 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları.....	57
4.1.1 hFR α -KHEFK kompleksinin incelenmesi.	57
4.1.2 hFR α -KRDAK kompleksinin incelenmesi.	59
4.1.3 hFR α -KSANK kompleksinin incelenmesi.....	61
4.1.4 hFR α -RFAFAK kompleksinin incelenmesi.....	64
4.1.5 hFR α -RWAAK kompleksinin incelenmesi	66
4.1.6 hFR α -RWEAK kompleksinin incelenmesi	68
4.1.7 hFR α -RWEFK kompleksinin incelenmesi.....	70
4.1.8 hFR α -RWHAK kompleksinin incelenmesi	72
4.1.9 hFR α -RWHDDK kompleksinin incelenmesi.....	74
4.1.10 hFR α -RWYAK kompleksinin incelenmesi	76
4.1.11 hFR α -RYSSK kompleksinin incelenmesi.....	78
4.1.12 hFR α -RYDAK kompleksinin incelenmesi	79
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	83
EKLER.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	102

KISALTMALAR

¹⁸F-FDG	: 2- (18F) Floro-2-deoksiglukoz
2D	: İki boyutlu
3D	: Üç boyutlu
ADCC	: Antikora Bağlı Hücresel Sitotoksiste
Ala	: Alanin
Arg	: Arjinin
Asn	: Asparajin
Asp	: Aspartik Asit
BRCA1	: Meme Kanseri Tip 1 Duyarlılık Proteini
BRCA2	: Meme Kanseri Tip 2 Duyarlılık Proteini
BT	: Bilgisayar Tomografisi
CADD	: Bilgisayar-Destekli İlaç Keşfi ve Tasarım
CDC	: Tamamlayıcıya Bağlı Hücresel Sitotoksiste
Cys	: Sistein
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DOTA	: 1,4,7,10-Tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik asit
EB	: Ek Bağlanma bölgesi
fs	: Femtosaniye
GBVI/WSA	: Generalized Born Volume Integral/Weighted Surface Area (Genelleştirilmiş Doğan Hacim İntegral/Ağırlıklı Yüzey Alanı)
Gln	: Glutamin
Glu	: Glutamik Asit
Gly	: Glisin
HB	: Hidrojen Bağı
hFRα	: İnsan Folik Asit Reseptör α
His	: Histidin
Ile	: İzolösin
ITC	: Isothermal Titration Calorimetry (İzotermal Titrasyon Kalorimetresi)
KeV	: Kilo elektron Volt
kDa	: Kilodalton
LBDD	: Ligand-Based Drug Design (Ligand-Temelli İlaç Tasarımı)
Leu	: Lösin
Lys	: Lizin
mAb	: Monoklonal Antikor
MD	: Moleküler Dinamik
Met	: Metiyonin
MeV	: Mega elektron Volt
MM/PBSA	: Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area (Moleküler Mekanik-Poisson Boltzmann Yüzey Alanı)
MR	: Manyetik Rezonans
ns	: Nanosaniye
PCFT	: Proton-Coupled Folate Transporter (Proton-Bağlı Folat Taşıyıcı)

PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PDB	: Protein Data Bank
Phe	: Fenilalanin
PLIF	: Protein-Ligand Interaction Fingerprint (Protein-Ligand Etkileşimi Parmakizi)
Pro	: Prolin
ps	: Pikosaniye
QSAR	: Quantitative structure–activity relationship (Nicel yapı-aktivite ilişkisi)
RFC	: Recuded Folate Carrier (Azaltılmış Folat Taşıyıcı)
RMSD	: Root-Mean-Square Deviation (Kök Ortalama Kare Sapma)
RMSF	: Root-Mean-Square Fluctuation (Kök Ortalama Kare Dalgalanma)
SBDD	: Structure-Based Drug Design (Yapı-Temelli İlaç Tasarımı)
Ser	: Serin
SPECT	: Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi
Thr	: Treonin
Trp	: Triptofan
Tyr	: Tirozin
Val	: Valin

SEMBOLLER

a	: Omurga Hidrojen Bağ Alıcısı
A	: Yan Zincir Hidrojen Bağ Alıcısı
C	: Toplam Yüzey Teması
d	: Omurga Hidrojen Bağ Vericisi
D	: Yan Zincir Hidrojen Bağ Donörü
H	: Hidrofobik Yüzey Teması
I	: İyonik Etkileşim
M	: Metal Ligasyonu
O	: Çözücü Hidrojen Bağı
P	: Kısmi Hidrofobik Temas
Q	: Yüklü Yüzey Teması
R	: Aren Etkileşimi
X	: Diğer Yüzey Teması
α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
γ	: Gama
Å	: Angstrom
π	: pi

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: PET-BT görüntülemeye kullanılan çeşitli radyonüklidlerin özellikleri. ...	6
Tablo 1.2: hFR α 'nin ekstrasellüler ve mutasyon içermeyen kristal yapıları.	13
Tablo 2.1: Bu proje esnasında sentezlenen peptitler.	19
Tablo 4.1: Bu proje esnasında önerilen yeni nesil peptitler.	57



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Tümör mikroçevresine genel bakış.	2
Şekil 1.2: (A) Prostat kanseri olan hastanın SPECT-BT görüntüsü ve (B) Trioid kanseri olan hastanın SPECT-BT görüntüsü.....	4
Şekil 1.3: (A) ¹⁸ F-FDG ilacının PET-BT görüntülenmesinde kullanımının şematik gösterimi ve (B) PET-BT ile tümör odaklarının görüntülenmesi.	5
Şekil 1.4: Biyobelirteçlerin kullanım şeması.....	7
Şekil 1.5: Folatın 2D molekül yapısı.	9
Şekil 1.6: hFR α 'yı hedefleyen potansiyel tedavi yaklaşımları.	10
Şekil 1.7: Folatın DNA ve bazı amino asitlerin sentezinde, protein ve DNA metilasyonunda önemli görevi bulunmaktadır.	11
Şekil 1.8: Vintafolid'in 2D molekül yapısı.	12
Şekil 1.9: Farletuzumab'ın etki mekanizmaları.....	12
Şekil 1.10: Bilgisayar destekli ilaç tasarımı için temsili iş akışı şeması.	14
Şekil 1.11: <i>De novo</i> Ligand tasarım yöntemlerinin şematik gösterimi.	15
Şekil 1.12: Induced-fit veya "el-eldiven" bağlanma modeli.	16
Şekil 1.13: Farklı ısılarda Boltzmann hız dağılımı gösterilmiştir.....	17
Şekil 2.1: (A) hFR α 'nın Folik Asit bağlanma bölgesinin genel yapısı ve (B) Bağlanma bölgesine ait EB, HB I ve HB II bölgeleri.	18
Şekil 2.2: <i>In silico</i> ortamda tasarlanan RFDAK peptidinin moleküler modelleme ile elde edilen örnek bağlanma ilişkileri.	21
Şekil 3.1: hFR α -Folik Asit kompleksinin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.	23
Şekil 3.2: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -Folik Asit kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	24
Şekil 3.3: Peptit I'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	25
Şekil 3.4: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	26
Şekil 3.5: Peptit II'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	27
Şekil 3.6: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFAAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	28

Şekil 3.7: Peptit III'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	29
Şekil 3.8: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RPAAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	30
Şekil 3.9: Peptit IV'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	31
Şekil 3.10: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RPDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	32
Şekil 3.11: Peptit V'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	33
Şekil 3.12: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RKFAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	34
Şekil 3.13: Peptit VI'nın tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	35
Şekil 3.14: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KYDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	36
Şekil 3.15: Peptit VII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	37
Şekil 3.16: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KFDK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	38
Şekil 3.17: Peptit VIII'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	39
Şekil 3.18: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KYAAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	40
Şekil 3.19: Peptit IX'un tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	41
Şekil 3.20: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -HRAFAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	42

- Şekil 3.21:** Peptit X'un tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 43
- Şekil 3.22:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KYANK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 44
- Şekil 3.23:** Peptit XI'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 45
- Şekil 3.24:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KYSAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 46
- Şekil 3.25:** Peptit XII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 47
- Şekil 3.26:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFAADK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 48
- Şekil 3.27:** Peptit XIII'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 49
- Şekil 3.28:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFSNK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 50
- Şekil 3.29:** Peptit XIV'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 51
- Şekil 3.30:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RPSNK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 52
- Şekil 3.31:** Peptit XV'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 53
- Şekil 3.32:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RYSDDK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 54
- Şekil 3.33:** Peptit XVI'nın tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 55
- Şekil 3.34:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RYSDEK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 56

- Şekil 4.1:** Peptit XVII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 58
- Şekil 4.2:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KHEFK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 59
- Şekil 4.3:** Peptit XVIII'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 60
- Şekil 4.4:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KRDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 61
- Şekil 4.5:** Peptit XIX'un tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 62
- Şekil 4.6:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KSANK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 63
- Şekil 4.7:** Peptit XX'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 64
- Şekil 4.8:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFAFAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 65
- Şekil 4.9:** Peptit XXI'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 66
- Şekil 4.10:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWAAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 67
- Şekil 4.11:** Peptit XXII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 68
- Şekil 4.12:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWEAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 69
- Şekil 4.13:** Peptit XXIII'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri..... 70
- Şekil 4.14:** (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWEFK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir..... 71

Şekil 4.15: Peptit XXIV'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	72
Şekil 4.16: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWHAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	73
Şekil 4.17: Peptit XXV'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	74
Şekil 4.18: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWHDDK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	75
Şekil 4.19: Peptit XXVI'nın tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	76
Şekil 4.20: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWYAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	77
Şekil 4.21: Peptit XXVII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	78
Şekil 4.22: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RYSSK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	79
Şekil 4.23: Peptit XXVIII'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.....	80
Şekil 4.24: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RYDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.....	81
Şekil A.1: RFDAK peptitin 2D molekül yapısı.....	88
Şekil A.2: RFAAK peptitin 2D molekül yapısı.....	88
Şekil A.3: RPAAK peptitin 2D molekül yapısı.....	89
Şekil A.4: RPDAAK peptitin 2D molekül yapısı.....	89
Şekil A.5: RKAFK peptitin 2D molekül yapısı.....	90
Şekil A.6: KYDAK peptitin 2D molekül yapısı.....	90
Şekil A.7: KFDAK peptitin 2D molekül yapısı.....	91
Şekil A.8: KYAAK peptitin 2D molekül yapısı.....	91
Şekil A.9: HRAFAK peptitin 2D molekül yapısı.....	92
Şekil A.10: KYANK peptitin 2D molekül yapısı.....	92
Şekil A.11: KYSK peptitin 2D molekül yapısı.....	93
Şekil A.12: RFAADK peptitin 2D molekül yapısı.....	93
Şekil A.13: RFSNK peptitin 2D molekül yapısı.....	94
Şekil A.14: RPSNK peptitin 2D molekül yapısı.....	94
Şekil A.15: RYSDDK peptitin 2D molekül yapısı.....	95

Şekil A.16: RYSDEK peptitin 2D molekül yapısı.	95
Şekil A.17: KHEFK peptitin 2D molekül yapısı.	96
Şekil A.18: KRDAK peptitin 2D molekül yapısı.	96
Şekil A.19: KSANK peptitin 2D molekül yapısı.	97
Şekil A.20: RFAFAK peptitin 2D molekül yapısı.	97
Şekil A.21: RWAAK peptitin 2D molekül yapısı.	98
Şekil A.22: RWEAK peptitin 2D molekül yapısı.	98
Şekil A.23: RWEFK peptitin 2D molekül yapısı.	99
Şekil A.24: RWHAK peptitin 2D molekül yapısı.	99
Şekil A.25: RWHDDK peptitin 2D molekül yapısı.	100
Şekil A.26: RWYAK peptitin 2D molekül yapısı.	100
Şekil A.27: RYSSK peptitin 2D molekül yapısı.	101
Şekil A.28: RYDAK peptitin 2D molekül yapısı.	101



hFR α HEDEF PROTEİNİNE KARŞI PEPTİT-BAZLI PET-LİGANDLARIN RASYONEL TASARIMI

ÖZET

Günümüzde pek çok hastalığın hızlı ve doğru teşhisi uygun tedavi yöntemlerinin seçilmesi ve değerli zamanın kaybedilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Pek çok kanser tipi için gerek bilimsel literatür gerekse biyoinformatik veri tabanlarından yararlanılarak hedefe uygun biyobelirteçlerin saptanması mümkündür. Bu bağlamda kanser hücrelerinde yer alan İnsan Folik Asit Reseptör α (hFR α) proteini yüksek miktarda eksprese olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle hFR α kanser görüntülenmesinde hedef biyobelirteç proteini olarak görev yapabileceği kabul edilmektedir.

Sağlık sektöründe onkolojik görüntüleme yöntemlerinden faydalanılarak kanser hastalığı tanısı için kullanılan yöntemlerin arasında büyük önem arz eden Pozitron Emisyon Tomografisi-Bilgisayarlı Tomografi (PET-BT), organ ve dokuların metabolik ve fonksiyonel durumlarını anatomik bilgiler çerçevesinde görüntüleyerek vücudumuzda saklı olan tümörlü dokular hakkında detaylı bir şekilde bilgiler sunabilmektedir. İdeal bir görüntüleme yöntemi olarak seçilen yöntemin avantajları olduğu gibi dezavantajlarımızda göz ardı etmememiz gerekmektedir. Bu teknolojinin kullanımında karşımıza çıkan en önemli dezavantaj patolojik alanları özgül ve hassas olarak işaretleyebilecek ajanların azlığı sebebi ile ciddi sınırlamalar getirmektedir. Sonuç olarak kanser hastalığının tespiti ve tedavi evreleri arasındaki farkları takip etmemizi zorlaştırmaktadır.

Bu tez çalışmasında özellikle tümör mikroçevresinde yer alan immün ve stromal hücrelere ait özgül biyobelirteçlere yüksek seçicilik ve ilgi ile bağlanabilecek PET ajanlarına alternatif olarak yeni peptit-bazlı PET-Ligandların geliştirilmesi planlanmıştır. Bu sayede, kanser odaklarının görüntülenmesinde alternatif teşkil eden yenilikçi ve rasyonel tasarıma sahip yeni nesil radyo-işaretleli tümör-tanıyıcı ajanların ilk örnek üretimi gerçekleştirilecektir.

Ön çalışmalarımızda moleküler modelleme tekniklerinden yararlanılarak hFR α 'ya bağlanması öngörülen 16 adet peptit-yapılı PET-Ligandlar tasarlanmıştır ve sentez için önerilmiştir. Tez çalışmaları esnasında sentezlenen 16 adet peptitin kapsamlı moleküler dinamik çalışmalarıyla hFR α hedef proteinine karşı olası bağlanma afinitesi ve dinamik bağlanma ilişkileri incelenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda hFR α 'ya bağlanması öngörülen 12 adet yeni peptit tasarlanmıştır ve sentez için önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser Görüntüleme, hFR α , Moleküler Modelleme, Moleküler Dinamik Simülasyonları, Docking, PET-Ligandları, *in silico* İlaç Tasarımı, Sanal Taramalar.

THE RATIONAL DESIGN OF PEPTIDE-BASED PET-LIGANDS AGAINST THE hFR α TARGET PROTEIN

SUMMARY

Today, rapid and accurate diagnosis of many diseases is of great importance in terms of choosing appropriate treatment methods and avoiding the loss valuable time. For many cancer types, it is possible to detect suitable biomarkers by using both scientific literature and bioinformatics databases. It has been found that the Human Folic Acid Receptor α (hFR α) protein is over expressed in many cancers. Therefore, it is accepted that hFR α can act as a biomarker protein in cancer imaging.

Positron Emission Tomography-Computed Tomography (PET-CT), which is of great importance among the methods used for the diagnosis of cancer disease by making use of oncological imaging methods, provides detailed information about the tumor tissues hidden in our body by displaying the metabolic and functional states of organs and tissues within the framework of anatomical information. The most important disadvantage is that it brings serious limitations due to the scarcity of agents that can mark pathological areas in a specific and sensitive way. As a result, it makes it difficult to follow the differences between the detection and treatment stages of cancer.

In this thesis, new peptide-based PET-Ligands were developed as an alternative to existing PET agents that can bind with high selectivity and affinity to specific biomarkers of immune and stromal cells, especially in the tumor microenvironment.

In our preliminary studies, 16 peptide-based PET-Ligands, which were predicted to bind to hFR α , were designed using molecular modeling techniques. Afterwards, the possible binding affinity and dynamic binding relationships of these peptides with the hFR α target protein were investigated. In the light of this information, 12 new peptides were designed and suggested for synthesis.

Keywords: Cancer Imaging, hFR α , Molecular Modeling, Molecular Dynamics Simulations, Docking, PET-Ligands, *in silico* Drug Design, Virtual Screening.

1. GİRİŞ

Günümüzde karşımıza çıkan birçok hastalık türünden biri olan kanser hastalığının tedavisinde etkili mücadelenin en önemli basamağı erken teşhisdur. Hastalığın teşhisi için kullanılan yaygın yöntemlerden biri olan PET-BT çekiminde vücuda verilen ^{18}F -FDG'yi incelediğimizde onaylı bir radyonükleid olmasına rağmen inflamasyon ve enfeksiyon gibi dokuda glikoz tüketiminin arttığı durumlarda ve glikozun akın ettiği beyin gibi organlar için ^{18}F -FDG seçiciliğini ve hassasiyetini yitirir [1-3]. Bu tür sebeplerden dolayı ve gelişen teknoloji ile beraber yeni alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak tümör hücrelerinde veya tümör kütlesi içerisinde yer alan hücrelerde bulunan özgül reseptörlere bağlanabilen radyofarmasötikler ise oldukça sınırlı sayıda olup şuan ki mevcut ihtiyaca cevap verememektedir.

Bu tez projesinin amacı, tümör hücrelerinde yüksek ekspresyon gösteren İnsan Folik Asit Reseptörü α (hFR α)'ya yüksek ilgi ve seçicilik ile bağlanabilen peptit-yapılı PET-Ligandların rasyonel tasarım yöntemiyle elde edilmesi esasına dayanır. İlk kez üretilecek olan bu görüntüleme ajanlarının ileride tam donanımlı olan hastanelerde PET-BT çekimlerinde kullanılarak verimliliğin ve hassasiyetin artırılması hedeflenmektedir.

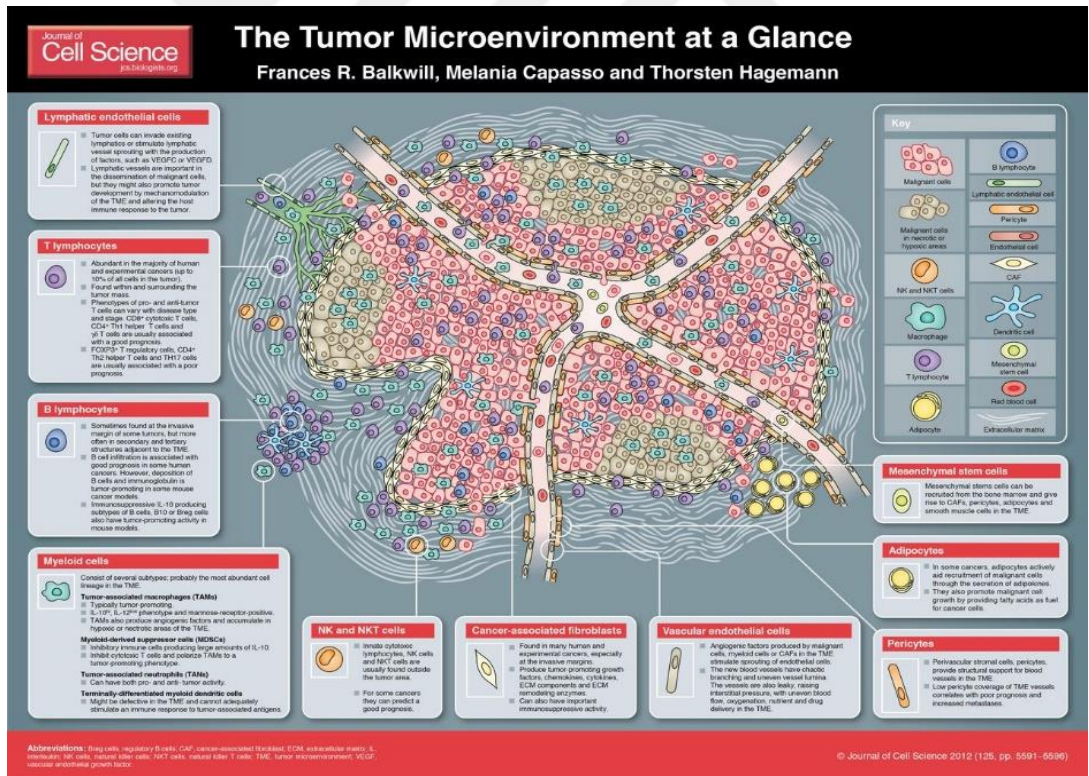
Ayrıca, bu peptit-bazlı PET-Ligandlarının geliştirilmesi için hem *in silico* hem de *in vitro* yöntemlerden faydalanılarak yeni peptit yapılarının önerilmesi sağlanacaktır.

1.1 Kanser Hastalığı ve Görüntüleme

Kanser zamanla gelişen ve patofizyolojisinde temel olarak yer alan hem onkojenlerin hem de tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğraması sonucunda hücre büyüme ve bölünme işlemlerinin hatalı olmasıdır. Bundan dolayı hücre büyümesi çevreden gelen sinyallere doğru yanıt vermez ve kontrolsüz büyüme başlar. Kanser en önemli tanımsal özelliği, vücudun çeşitli bölgelerinde ortaya çıkan ve diğer organlara yayılabilen anormal hücre bölünmeleridir. Anormal bölünen hücre topluluğu, çevrelediği doku veya organı baskılayarak dokunun veya organın işlevini yerine getirmesini engeller [4].

Tümör dokusunu incelediğimizde kümeler halindeki kanser hücrelerini görürüz. Bu görüntünün sebebi DNA’ında hasarlar birikmiş olan kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasıdır. Kanserler, yalnızca kötü huylu hücre kitleleri değildir, diğer birçok hücrenin de dahil edildiği ve dönüştürülmüş hücreler tarafından etrafındaki komşularını rahatlıkla manipüle ederek, kendisine yardım edecek şekilde değişikliğe uğratır. Bu değişikliğin sonucunda ‘tümör mikroçevresini’ oluştururlar. Tümör mikroçevresi sayesinde kanser hücreleri değişikliğe uğrayarak ilaç direnci kazanır. Bunun sonucunda hastaya verilen ilaçlar ister bitkisel olsun isterse sentetik moleküller olsun sadece 1 veya 2 aday etki gösterebilir. İmmünoterapinin etkinliğini azaltan en önemli etmen tümör mikroçevresi olarak bilinir.

Şekil 1.1’deki görüldüğü gibi tümör mikroçevresini tarif edecek olursak; Lenfatik endotel hücreleri, T ve B lenfositleri, Miyeloid türevi baskılayıcı hücreler, NK ve NKT hücreleri, Tümörle ilişkili makrofajlar, Kanserle ilişkili fibroblastlar, Damar endotel hücreleri, Perspektifler, Adipositler, Vasküler endotel hücreleri yer almaktadır [5].



Şekil 1.1: Tümör mikroçevresine genel bakış [5].

Metastazda, kanser hücreleri orijinal (birincil) tümörden ayrılır, kan veya lenf sistemi boyunca hareket eder ve vücutun diğer organlarında veya dokularında yeni bir tümör oluşturur. Yeni metastatik tümör, birincil tümör ile aynı kanser türüdür. İkincil bir

bölgede yeni hücrel ortama alışmasını ve bağışıklık hücreleriyle ölümcül mücadeleden kaçmasını gerektirir [6].

Kanser hastalığının görüntülenmesinde yararlanılan başlıca yöntemler Biyopsi, Ultrasonografi (USG), Mamografi, Nükleer Tıp Taramaları, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), Bilgisayarlı Tomografi (BT), Tek Foton Emisyonlu-Bilgisayarlı Tomografi (SPECT-BT) ve Pozitron Emisyon Tomografisi-Bilgisayarlı Tomografi (PET-BT) gibi farklı yöntemler mevcuttur [4].

Biyopsi, en yaygın kullanılan tıbbi testlerden biridir ve kuşku duyulan dokulardan örnek alınır. Biyopsi yöntemi alınan doku örneklerinin mikroskop altında hasta prognozunun belirlenmesine öncülük eden önemli yöntemlerden biridir [7]. En büyük dezavantajı biyopsi yerinde kanama, enfeksiyon ve doğru noktadan yeterince hücre alınmaması nedeni ile doğru tespit yapılamamasıdır.

Ultrasonografi, yüksek frekanslı ses dalgalarının biyolojik dokulardan geçerken özelliklerinden ve davranışından yararlanan benzersiz bir görüntüleme yöntemidir ve hem tanısal görüntüleme hem de tedavi aracı olarak kullanılabilir. Ağırlıklı olarak karın içi organlarının tümörlerinde (karaciğer, yumurtalık, rahim vb.), meme kanserinde, tiroit kanserinde ve yüzeysel tümörlerde kullanılmaktadır [4, 8].

Radyonüklid görüntüleme ve optik görüntüleme gibi geleneksel görüntüleme teknikleriyle karşılaştırıldığında, ultrason ile görüntülemenin ekonomik, rahatlık ve gerçek zamanlı görüntüleme gibi bazı avantajları vardır.

Manyetik Rezonans Görüntüleme, güçlü elektromanyetik alan ve radyo frekans dalgaları kullanarak organ ve dokuları 3D olarak görüntüleyebilir. Yüksek çözünürlüğe sahiptir ancak BT ve ultrasonografiye göre daha pahalı bir tekniktir. Ayrıca, cihaz güçlü elektromanyetik alan yaydığından dolayı metal protezi ve kalp pili olanlar bu çekime alınamazlar [9, 10].

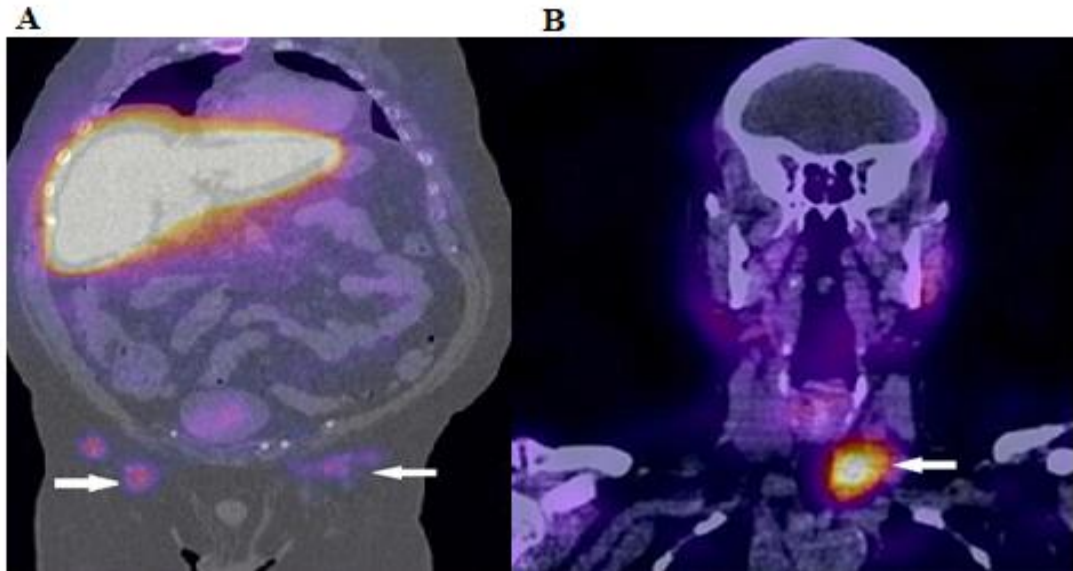
Mamografi, x ışınlarına dayalı bir teşhis yöntemidir ve meme kanserinin erken tanı ve tedavisinde yaygın olarak kullanılır [11]. Dezavantajları meme bölgesinin incelenirken iyi ve kötü huylu dokuların tespit edilememesidir ve değerli zamanın kaybedilmesidir.

Bilgisayarlı Tomografi, yönteminde yüksek dozlu x ışınları kullanılarak insan vücudundaki doku ya da organların farklı boyutlarda tarama işlemi yapılarak 3D görüntüsünün elde edilmesi sağlanır. Bu teknoloji ile bize tespit edilen tümörün şekli, büyüklüğü ve bulunduğu yer hakkında detaylı bilgi elde etmemize olanak

sağlamaktadır [4]. Ancak vücudumuza yüksek doz radyasyon alımına sebep olur. Yüksek maliyet, geniş hacim kaplaması ve metal artefakt oluşturmasıdır.

SPECT-BT klinik uygulamada gama kamerasını kullanarak kan dolaşımına enjekte edilen ve daha sonra belirli dokular tarafından alınan bir radyoaktif izleyicinin bilgisayarlı görüntüleme sisteminden yararlanılarak 3D bir görüntüsünün elde edilmesidir (Şekil 1.2) [12].

Kardiyovasküler görüntüleme, kök hücrelerin görüntülenmesi, onkolojik görüntülemeler, nöro görüntüleme ve ilaç keşfinde etkin kullanım alanlarına sahiptir [13]. Dezavantajları yüksek ekipman maliyeti, kurşun koruma, artan alan kullanımı, güç ve soğutma sistemi ve kamera ağırlığı gibi gereksinimlere ihtiyaç duymasıdır [14].



Şekil 1.2: (A) Prostat kanseri olan hastanın SPECT-BT görüntüsü ve (B) Trioid kanseri olan hastanın SPECT-BT görüntüsü [14].

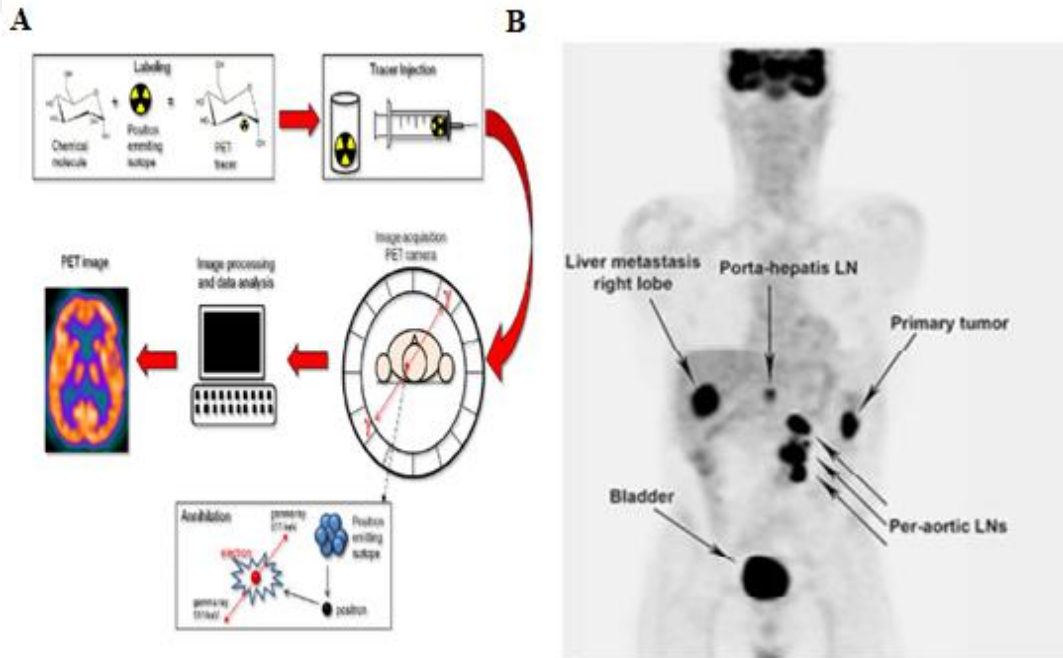
Kanser hastalığı tanısı için ideal bir görüntüleme yöntemi yoktur, her yöntemin avantaj ve dezavantajları vardır. Hangi durumda öncelikle hangi tetkikin gerekli olduğuna bilimsel kanıtlar ışığında karar verilir. Bu sebepten dolayı hastaya ve hastalığın aşamasına göre hangi tetkikin yapılması gerektiği çok değişkendir. Elde edilen veriler sayesinde uygun tedavi yöntemine geçilir.

1.1.1 PET Ligandları ve PET Görüntüleme

Pozitron emisyon tomografisi (PET) görüntülemesinin temelinde damardan intravenöz yoluyla verilen pozitron yayıcı metabolik radyoaktif ajanların vücuttaki anormal yapılarda birikmesi sonucunda bu radyofarmasötikten elde edilen 511 KeV fotonları

PET-BT cihazında algılanarak bilgisayar ortamında vücudun 3D görüntüsü elde edilmektedir [15]. Bu yöntemde pozitron yayan ve kısa ömürlü radyoaktif elementler (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{62}Cu , ^{68}Ga ve ^{82}Rb) kullanılmaktadır. Bu elementler ilgi duyulan alana veya kanser dokularında birikmeye eğimli olan moleküllere bağlanmaktadır.

Yaygın olarak kullanılan görüntüleme ajanlarından, ^{18}F -FDG vücuda verildikten sonra kanser hücrelerinin olduğu bölgelerde glikoz alımı yüksek olduğundan (Warburg etkisi) dolayı buralara akın edecektir. Bu glikoz tüketimi sona erdikten sonra kanser dokusunun etrafında toplanan görüntüleme ajanı sayesinde PET-BT çekimi yapıldıktan sonra parlak noktalar halinde ortaya çıkarak tespit edilmesini sağlamaktadır [16, 17]. Şekil 1.3’de PET-BT sistemi hakkında görsel bilgiler paylaşılmıştır.



Şekil 1.3: (A) ^{18}F -FDG ilacının PET-BT görüntülenmesinde kullanımının şematik gösterimi ve (B) PET-BT ile tümör odaklarının görüntülenmesi [18, 19].

PET-BT teknoloji sayesinde vücuttaki tümör kitlelerinin yerlerinin hastanın vücut anatomisini bozmadan ve ağrısız bir şekilde tespit edilmesini sağlar. Hastalar radyofarmasötik ile ilk enjeksiyon işleminden sonra PET-BT görüntüleme işlemi yarım saat kadar kısa bir sürede tamamlanabilmektedir. Akabinde hasta günlük yaşamına hemen dönebilmektedir. Tablo 1.1’de yer alan kullanılan radyonüklidlerin yarı ömrü sürelerinin kısa olmasından dolayı vücuttan gün sonuna kadar atılarak radyoaktif maddelerden arındırılmaktadır.

Tablo 1.1: PET-BT görüntülemesinde kullanılan çeşitli radyonüklidlerin özellikleri.

Radyonüklid	Yarı-ömür	Ortalama pozitron enerjisi
C-11	20 dk.	0.39 MeV
N-13	10 dk.	0.49 MeV
O-15	2 dk.	0.74 MeV
F-18	110 dk.	0.25 MeV
Cu-62	10 dk.	1.32 MeV
Ga-68	68.1 dk.	0.83 MeV
Rb-82	1.3 dk.	1.52 MeV

¹⁸F-FDG ilacı ile PET-BT görüntülemesi yapılırken şeker hastalarının belirli önlemler alması önem arz etmektedir. Çünkü radyoizleyici glikoz tüketiminin artmasıyla beraber kan seviyesinde değişikliğe sebep olabileceği gibi aynı zamanda beyin gibi glikozun akın ettiği organlar için hassasiyeti ve seçiciliği yitirir. Bunun yanı sıra hamile bayan ve bebekler için kullanılan radyoizleyiciler risk oluşturabilir. Radyo izleyicilerin üretim maliyetinin yüksek olması, yarı-ömürlerinin kısa sürmesi, nakliye taşıma işlemlerinin getirdiği zorluklar devamlı olarak kısıtlamalara yol açmaktadır. Hastanın maruz kaldığı radyoaktivitenin yanı sıra özellikle kanseri hedef alamayan mevcut radyoizleyicilerin nedeni ile kanseri erken evrede tespit edilmesini güçleştirmektedir. Erken evrede kanserin tespit edilmesi ve hastanın tedavi sürecinin başlatılması çok önemlidir. Mevcut radyoizleyici moleküllerin şu an ki ihtiyacı karşılayamaması bizleri yeni moleküller tasarlamaya ve kullanılan radyoizleyicilerin yerine alternatifler geliştirmeye sevk etmektedir.

PET-BT taraması onkolojide, gastrointestinal sistem (yemek borusu kanseri, kolorektal karsinom, lenfoma, karsinom meme, servikal ve yumurtalık karsinomu, böbrek kanseri, prostat kanseri, melanom, kas-iskelet sistemi tümörleri), nöroloji (demans, epilepsi, hareket bozuklukları, inme ve serebrovasküler hastalıkları, kardiyojoloji (miyokard canlılığı, koroner arter değerlendirilmesi, korner perfüzyon rezervi) gibi daha yeni ve daha spesifik izleyiciler sayesinde PET-BT görüntüleme tekniklerinin mevcut spesifik olmayan yöntemlerden hastalığın morfolojik, moleküler, fizyolojik ve genetik belirteçlerine dayalı olarak hastaya özel görüntüleme elde etmeyi amaçlamaktadır [16, 20].

1.1.2 Kanser fizyopatolojisi ve biyobelirteçler

Kanser hücrelerini boyut, yapı, işlev ve büyüme oranı bakımından normal hücrelerle kıyasladığımızda onlardan farklılık gösterir. Bu kötü huylu hücreler, sağlıklı

hücrelerde görülen normal büyüme kontrollerinden yoksundur ve kontrolsüz bir şekilde büyürler ve bu olayların sonucunda metastaz olayı gerçekleşir. Daha sonra bu kontrolsüz büyüme ile beraber kanser hücrelerinin yakınında yer alan yapıları istila etmesine ve ardından çevredeki doku ve organlara zarar vererek onların yok olmasına neden olur. Kanser hastalığının erken evrede tespit edilmesi ve hastalığın tedavi aşamasında izlenmesi gibi pek çok kritik aşamalarda yer alan biyobelirteçler sağlık hizmetlerinde yararlı uygulamaya sahiptir.

Biyobelirteç, DNA, RNA, protein, peptit ve biyomolekül kimyasal modifikasyonları gibi biyomolekülleri analiz ederek bir organizmadaki normal veya anormal biyolojik durumu tanımlayan ve objektif olarak ölçülen bir özellik olarak tanımlanır [21].

Biyobelirteç veya biyolojik belirteç terimi, hastalığın varlığını veya ilerlemesini veya tedavinin etkilerini ölçmek için kullanılan tıbbi işaretleyicilerdir [22].

Biyobelirteçler, ilaç sistemlerinin gelişimini, iyileştirilmesini ve ilerlemesi süreçlerinde aldığı kritik rolden dolayı oldukça önemlidir. Hastalık riskini tahmin etmek, gizli birincil kanserler için tarama yapmak, iyi huylu bulguları kötü huylu bulgulardan ayırmak, kanser teşhisi konmuş hastalar için prognozu belirlemek ve tahmin etmek dahil olmak üzere tedaviye yanıtın tahmini ve hastalığın ilerlemesinin izlenmesi için onkoloji de dahil pek çok hastalığın değerlendirilmesinde potansiyel uygulamaya sahiptir [23, 24]. Şekil 1.4'de yer alan kanser biyobelirteçleri kullanım amaçlarına göre gruplandırılırlar.

Kanserde Biyobelirteçlerinin Kullanımı						
Erken Tanı	Tanı	Kanser Tanısı Aldıktan Sonra				Tedavi Sonrası
Kanser riskinin belirlenmesi	Ayrıntılı tanı ve kanserin alt türünün belirlenmesi	Prognoz (hastalık gidişatı)	Tedaviye yanıtın tahmin edilmesi	Kişiyeye özel ve çoğunlukla nadir ilaç yan etkilerinin tahmin edilmesi	Tedaviye yanıtın ölçülmesi	Hastalık tekrarı (nüks, yinelenme)
Kalıtımsal kanser riski taşıyor muyum?	Hangi tür kansere sahibim?	Hastalığın gidişatı herkes için aynı mıdır?	Hastalığım bu tedaviye yanıt verecek mi?	İlaç normal dozda veya düşük dozda mı alacağım veya hiç mi almayacağım?	Hastalığım bu tedaviye nasıl yanıt verecek?	Hastalığım tekrar edecek mi?
Meme ve Yumurtalık kanseri için BRCA1 germ-line mutasyonu tespiti	İmmünohistokimyasal testler ile kanserin alt türünün belirlenmesi	örn. erken evre meme kanserinde kemoterapi kararı için Oncotype Dx testi ile 21 gen analizi	HER2 pozitif meme ve mide kanserleri anti-HER2 tedaviye iyi yanıt verir	örn. İrinotekan adlı ilacın, belli mutasyonu taşıyanlarda ciddi yan etkilere neden olması	4. evre meme kanserinde tedavi yanıtın CA15-3 ve CEA tümör belirteçleri ile ölçülmesi	Testis tümörü için AFP ve βHCG, Yumurtalık kanseri için CA125 tümör belirteçleri takibi

Şekil 1.4: Biyobelirteçlerin kullanım şeması [25].

Gelecekte kanserleri hızlı, doğru ve güvenilir bir şekilde tespit eden kanserin sonucunu tahmin eden ve tedavi seçimini etkileyen biyobelirteçler onkolojinin geleceği için çok önemli bir yere sahip olacaktır [26].

1.1.2.1 Risk değerlendirme biyobelirteçleri

Klinik uygulamalarda, belirgin bir hastalığı olmayan bir kişide ileride tıbbi durum geliştirme potansiyelini tespit etmeye olanak sağlayan biyobelirteçdir. Özellikle kanser hastalığında risk değerlendirme amacıyla tedavi etkinliğinin belirlenmesi ve klinik sonuçların tahmin edilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, göğüs kanseri geliştirmeye yatkınlığı olan bireyleri tanımlamak için risk değerlendirme biyobelirteçleri ile değerlendirilir [27].

1.1.2.2 Tedavi öngören biyobelirteçler

Onkolojide kanser dokusunun tespit edilmesinden sonra hastalığın türü, evresi ve uygulanacak olan tedavi yönteminin belirlenmesi açısından ön bilgi sahibi olmamıza olanak sağlamaktadır. Bunların yanı sıra tanımlanmış bir kanserin saldırganlığını belirleyerek bir tedaviye yanıt verme olasılığının yanıtını izlemek için kullanılır [28].

1.1.2.3 Tanısal biyobelirteçler

Bu biyobelirteçler bir hastanın belirli bir hastalık durumuna sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla hedef hastalığa özgü seçilerek kullanılır. Tanı amaçlı biyobelirteçler, son zamanlarda dışkı kanseri DNA'sını test ederek kolorektal kanserin tespiti ve ilerlemesinin belirlenmesi için uygulanmıştır [21].

1.1.2.4 Tedavi sürecini izleyen biyobelirteçler

Kanserin tespit edilmesinden sonra izlenen tedavi yolunun takip edilerek hastalığın iyileşme durumunun başarısı hakkında bilgi sahibi olmaya olanak sağlamaktadır. Örneğin, malign melanoma yanıtının izlenmesinde S100-beta protein önemli bir izleme biyobelirteçi olarak kullanılır [29].

1.1.2.5 Tekrar olasılığını öngören biyobelirteçler

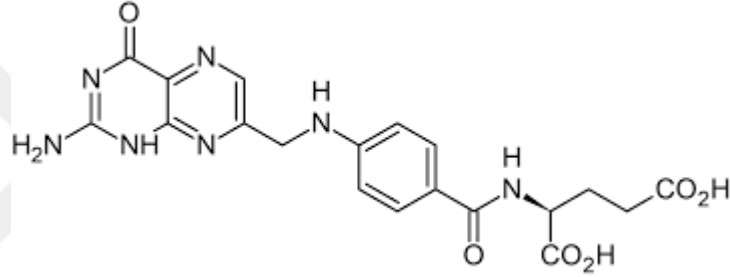
Kanser nüksünü tekrarlama olasılığını öngörmek ve tedavi yolunun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin, ONCOTYPE DX testi meme kanserinin tespit edilmesinde kullanılır [29].

1.1.2.6 Farmakodinamik biyobelirteçler

İnsanın genetik yapısındaki farklılıklar nedeniyle, kullanılan ilaçların kimyasal yapısının değişmesine neden olur. Bunun sonucunda alınan ilaçların metabolizmasının azalmasına veya vücutta yüksek düzeyde ilacın biriktiği tehlikeli durumlara yol açabilir. Bu nedenle, özellikle kanser tedavilerinde ilaç dozlama kararları, bu tür biyobelirteçlerin taramasından yararlanılarak doz seçimini yönetmek için kullanılabilir [30].

1.2 Folik Asit Reseptör α (hFR α)

Folat, hem DNA ve amino asit (metiyonin, sistein, serin, glisin ve histidin) biyosentez yollarında hem de DNA ve protein metilasyon reaksiyonlarında önemli rol oynayan B9 vitaminleridir [31, 32]. Şekil 1.5’de kimyasal yapısı görülmektedir.



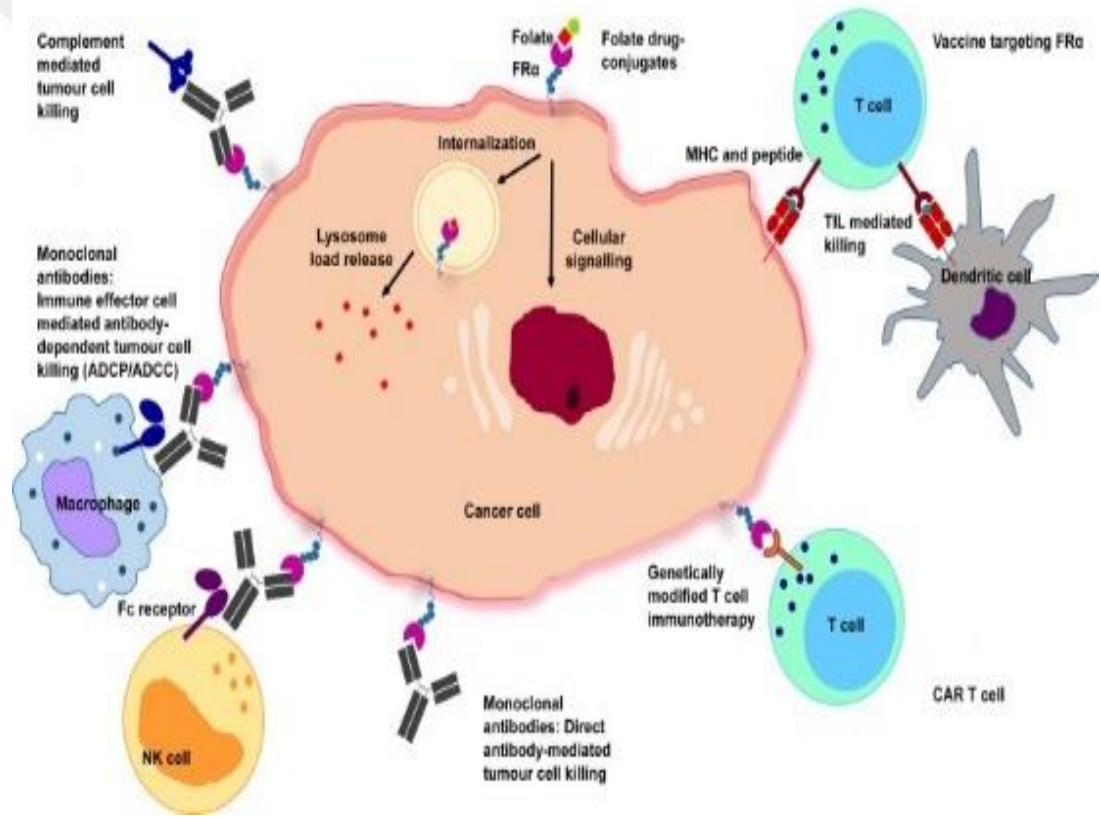
Şekil 1.5: Folatın 2D molekül yapısı.

Bu nedenle hücre bölünmesi, DNA sentezi ve onarımının temel bir bileşeni olan folatın vücuda yeterli miktarda alımı gereklidir. Özellikle hızlı bölünen hücreler için DNA sentezi ve replikasyonu, hücre bölünmesi, büyüme ve hayatta kalmada önemli role sahiptir [33]. Düzensiz folat metabolizmasına sahip olan insanlarda, embriyonik gelişimsel bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve beyin kusurları ile ilişkilendirilir. İnsanlar folatı sentezleyemezler ve besin takviyesi yoluyla almak zorundadır.

hFR α hücre zarlarında bulunan ve sistein açısından zengin hücre yüzeyi glikoproteinleridir. Nötr pH değerlerinde folata yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Folat-hFR α kompleksi daha sonra endositoz yoluyla hücrenin içersine alınırlar ve düşük pH değerli vesiküllerde folata daha düşük afinite duydukları için folatı serbest bırakırlar. hFR α çoğu dokuda çok düşük seviyelerde eksprese edilmesine rağmen, folat reseptörlerinden özellikle FR α , düşük folat koşulları altında hızlı bölünen hücrelerin folat talebini karşılamak için çok sayıda kanserde yüksek seviyelerde eksprese edilir [34].

Bu sebeple kanser hücrelerinde yer alan hFR α önemli bir biyobelirteç moleküldür. [32] hFR α potansiyel bir biyolojik hedef olarak akciğer, meme, yumurtalık tümörleri ve miyelojenöz lösemileri dahil birçok kanserin yüzeyinde aşırı eksprese olan reseptörlerden birisidir [35, 36].

Folik asit türevleri, folat ilaç konjugatları ve küçük moleküller, aşılarda, T hücresi tedavileri ve monoklonal antikorlar dahil kanser hastalığının tanınması için uygun çeşitli radyonüklidler kullanılarak hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarında başarılı bir şekilde folat reseptörünü hedeflediği tespit edilmiştir (Şekil 1.6). Klinik deneylerde kullanılan bazı radyoizleyiciler olarak ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ve ^{64}Cu yaygın olarak kullanımı mevcuttur [37].

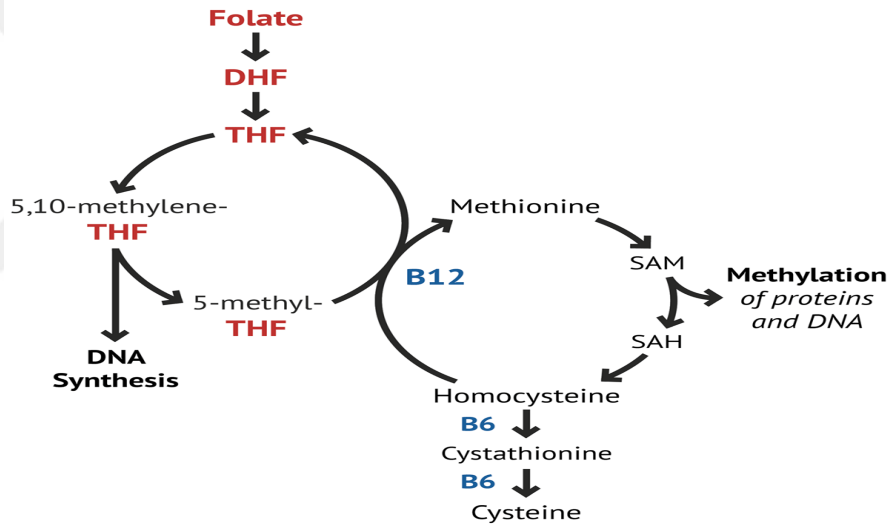


Şekil 1.6: hFR α 'yı hedefleyen potansiyel tedavi yaklaşımları [32].

hFR α 'ya tümör ekspresyonu, dağılımı, kanserin büyümesi ve metastazında önemli rol almasından dolayı hedeflenen kanser hücrelerinin tespiti ve tedavisi için gelecekte önem arz edeceği anlaşılmaktadır.

1.2.1 Fizyopatolojisi

Folat, DNA ve amino asit metabolizması yollarında önemli bir koenzimdir. Tetrahidrofolattan türetilen bir bileşikler grubudur (Şekil 1.7). Emilimi diyet folatının poliglutamat formu olup, kendiliğinden absorbe edilemez. Ancak absorpsiyondan önce jejunum içinde enzimler tarafından bölünmeyi gerektirir. Folat plazmada esas olarak albümine bağlanarak taşınır ve karaciğerde depolanır [38]. Çoğalan hücreler tarafından üç farklı mekanizma ile alınır. RFC (Reduced Folate Carrier) her yerde dağıtılan ve diyet folatının alımına yardımcı olan indirgenmiş folat taşıyıcısıdır. PCFT (Proton-Coupled Folate Transporter) hücrelere folat aktarımına aracılık etmek için transmembran proton gradyanını kullanan proton-bağlı folat taşıyıcısıdır. Ayrıca folat, 38 ila 45 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip dört glikopolipeptid elemanı (FR α , FR β , FR γ ve FR δ) olan folat reseptörleri ile taşınabilir [32, 34].



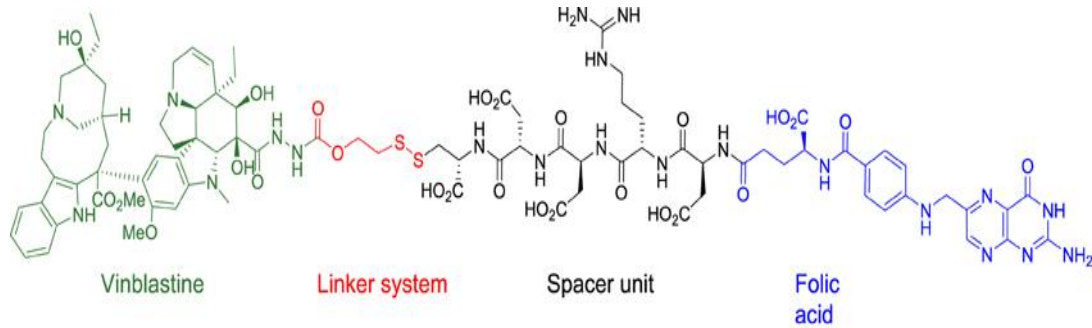
Şekil 1.7: Folatın DNA ve bazı amino asitlerin sentezinde, protein ve DNA metilasyonunda önemli görevi bulunmaktadır [38].

1.2.2 Ligandları

1.2.2.1 Vintafolid

Vintafolid onu kanser tedavisi için rasyonel bir hedef haline getiren benzersiz bir yapıya sahiptir. Preklinik çalışmalarda hFR α 'ya yüksek afinite ile bağlandığını göstermiştir. Bu nedenden dolayı çok spesifik ve güçlü aktiviteye sahiptir [39]. Anti kanser ilacı olan Vintafolid, Vinblastin ve Folatın birbirine bağlanmasından oluşan bir yapıya sahiptir (Şekil 1.8). Folat kısmı ile Vintafolid kanser hücrelerinde yüksek miktarda bulunan hFR α 'ya bağlanmasından sorumludur. Vintafolid- hFR α kompleksi

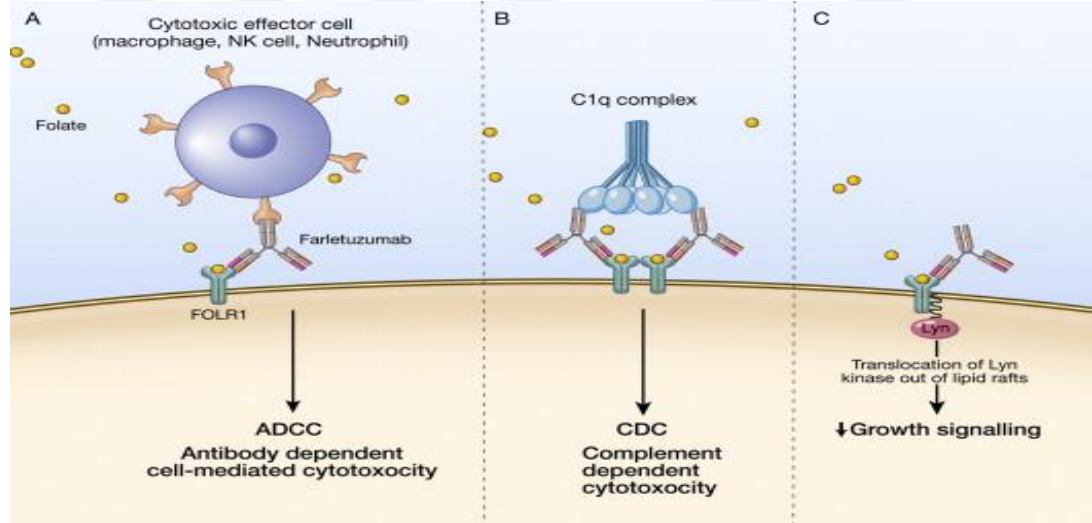
oluştuktan sonra folatta olduğu gibi kompleks endositoz ile hücre içine alınır ve orada linker bağı asidik ortamda kopar. Dolayısıyla, antikanser etkili Vinblastin kanser hücresinde serbest kalır ve kanser hücresinin büyümesini engeller [40]. Katı tümöre sahip bir çok hastada sınırlı iyileşmeler göstermiştir.



Şekil 1.8: Vintafolid'in 2D molekül yapısı.

1.2.2.2 Farletuzumab

Farletuzumab(MORab003), tamamen insanlaştırılmış monoklonal antikordur. Yumurtalık kanser tedavisinde kullanılan ve hFR α hedefleyen mAb olarak tümör hücreleri üzerinde eksprese edilir ve antitümör aktivitesini farklı etki modları yoluyla gösterir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9: Farletuzumab'ın etki mekanizmaları [41].

Antikoron hFR α bağlanması ile hücreye hem Antikora Bağlı Hücresel Sitotoksiste (ADCC) hem de Tamamlayıcıya Bağlı Hücresel Sitotoksiste (CDC) gerçekleşir. Farletuzumab ayrıca hücre zarının lipid sallarında hFR α kümelenmesini bozabilir. Bu nedenden dolayı Lyn kinaz enzimi üzerinden hücrenin büyümesi baskılanır [35, 41-43]. Farletuzumab, prelinik çalışmalarda yumurtalık kanseri için umut verici potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilmesi düşünülmektedir.

1.2.3 Kristal yapıları

hFR α ' ya ait 5 adet kokristal incelenmiştir. Tablo 1.2'deki literatür taramasında 4km6, 4km7 ve 4kmx asidik pH değerinde (pH 5.5) çözüldüğü anlaşılmıştır [44]. Bu pH değerinde ise hFR α 'nın folatı düşük afinite ile bağlanmaktadır. PDB kodu 4lrh kristal yapısı ise daha nötr pH değerinde (pH 6.5) çözülmüştür ve dolayısıyla folatı yüksek ilgi ile bağlanmaktadır. Ayrıca, bu kristal yapı folatın hFR α bağlanma bölgesiyle etkileşimleri açıkça görülmektedir [34]. Aynı zamanda bu yapı yüksek çözünürlüklüdür. Sonuç olarak sanal tarama çalışmaları için endojen ligandı folat bulunduran 4lrh kodlu kristal yapı seçilmiştir.

Tablo 1.2: hFR α 'nin ekstrasellüler ve mutasyon içermeyen kristal yapıları.

PDB	Çözünürlük (Å)	Ligand
4lrh	2.80	Folat
4km6	1.55	Folat
4km7	1.80	Folat
4kmx	2.20	Folat
5izq	3.60	Folat

1.3 Bilgisayar Destekli İlaç Keşfi ve Tasarım Yöntemleri

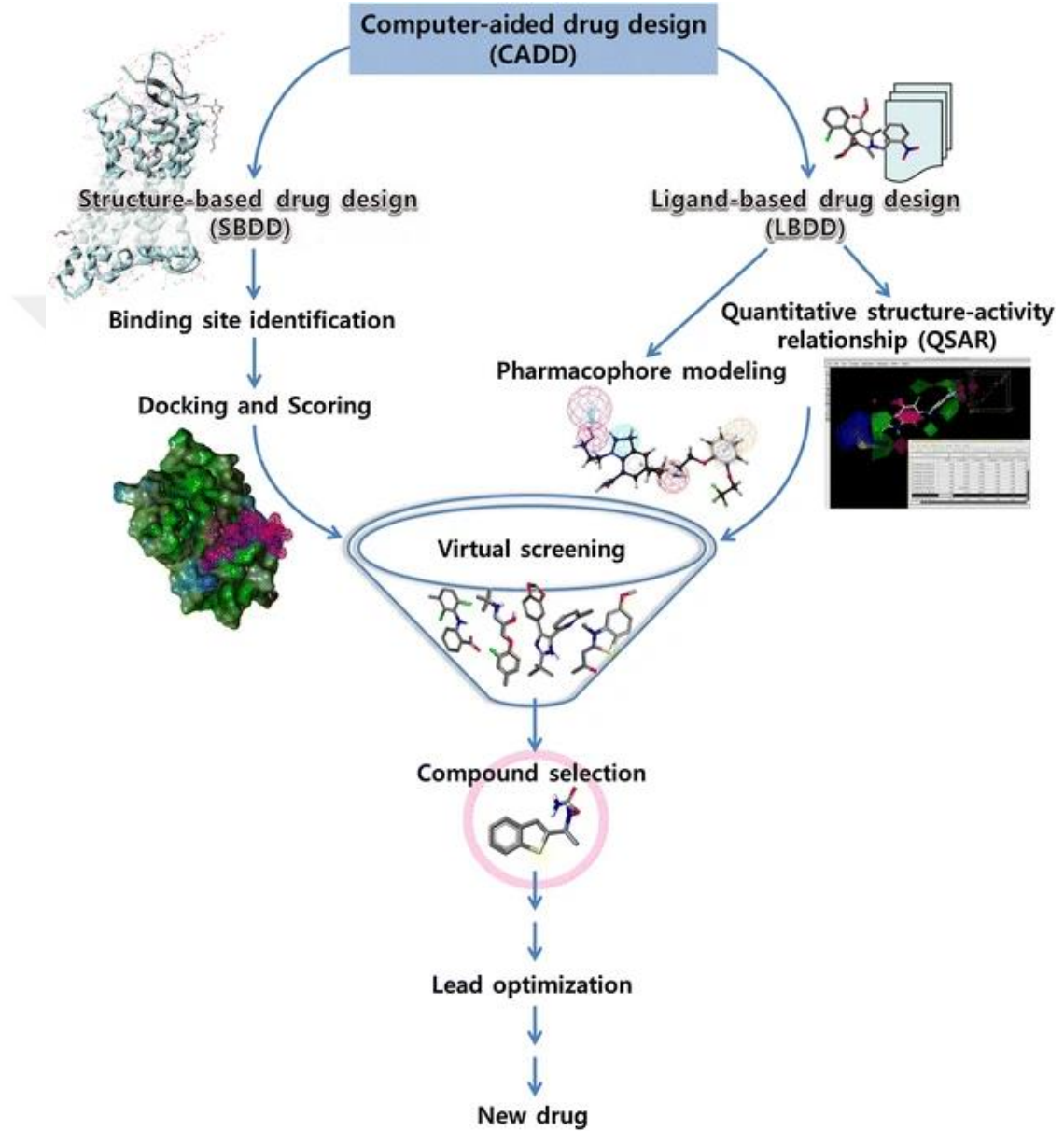
İlaç keşfi ve geliştirilmesi neredeyse 10 yıldan fazla zaman alması ve milyar dolarlık bir bütçe gerekmesi nedeni ile bu sürecin kısaltılması ve maliyet potansiyelini azaltmada bilgisayar destekli hesaplamalı yöntemler önemli rol oynamaktadır. Teknolojinin günden güne gelişmesi ile beraber *in silico* araçların farmasötik araştırma projelerinde kullanımı giderek artmaktadır.

Bilgisayar-destekli ilaç keşfi ve tasarım (CADD) yöntemleri ile ilaç aday olması güçlü olan moleküllerin keşfini veya tasarımını hesaplamalı kimyasal ve biyoloji yaklaşımlarını kullanarak yapılmaktadır. Amacı ise yüksek ilgi ile hedef proteine bağlanması öngörülen bileşiklerin tasarlanmasıdır.

Günümüzde farklı CADD yöntemleri bulunmaktadır (Şekil 1.10). Hedef protein ile ilgili herhangi bir 3D yapısal bilgi mevcut olmadığı ancak hedefe bağlanan ligandların bulunduğu durumlarda farmakofor modelleme ve 3D-QSAR gibi “Ligand-Based Drug Design (LBDD)” yöntemleri kullanılmaktadır. LBDD yöntemlerinde ligandlar incelenerek hedef proteinin olası bağlanma bölgesi hakkında bilgi elde edilerek yeni ligandların tasarımı amaçlanmaktadır. Ligand bazlı *de novo* ligand tasarımında ise protein hedef yapısı bilinmemekle birlikte tasarlanacak olan yeni molekül için, bilinen

bir ligand molekülüne benzerliğine dayalı bilgiler kullanılarak oluşturulması yöntemidir.

Bu projede ise hedef proteinin 3D yapısal bilgileri mevcut olduğu için “Structure-Based Drug Design (SBDD)” yöntemleri kullanılmıştır. SBDD yöntemlerinin kalbinde docking (kenetleme) çalışmaları yatmaktadır [45-47].

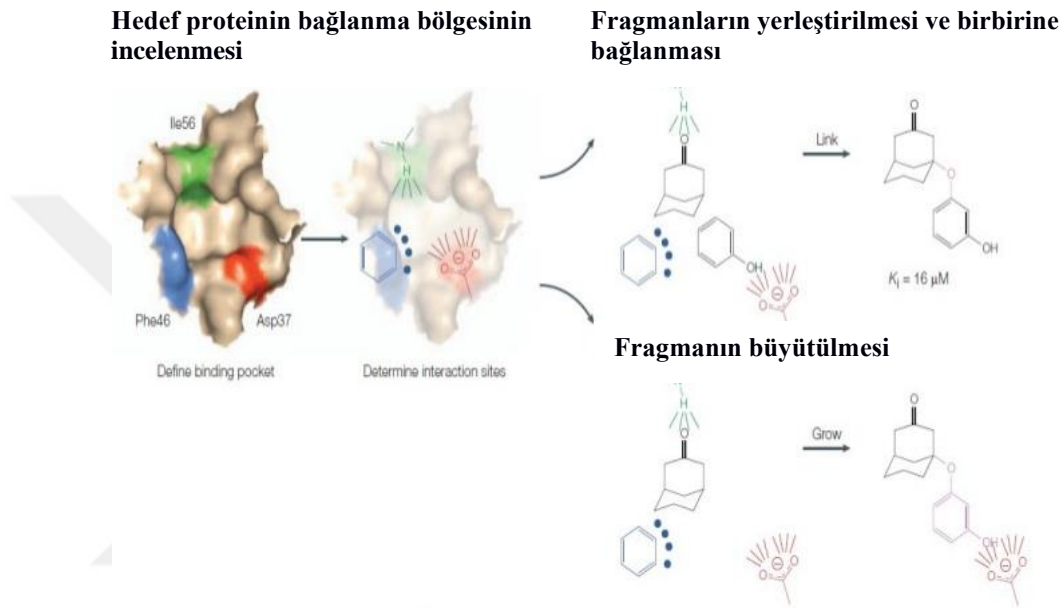


Şekil 1.10: Bilgisayar destekli ilaç tasarımı için temsili iş akışı şeması [45].

1.3.1 De novo Ligand tasarım yöntemleri

De novo kelimesi ‘başlangıçtan itibaren’ yani sıfırdan başlamak anlamına gelmektedir. Bu yöntemde öncelikle hedef proteinin bağlanma bölgesi incelenir ve ligand ile etkileşim kurabilecek bölgeler (pozitif yüklü, negatif yüklü, hidrojen bağ donörü,

hidrojen bağ akseptörü, aromatik bölge, hidrofobik bölge, polar bölge vb.) belirlenir (Şekil 1.11). Daha sonra 2 farklı yöntemle moleküller tasarlanabilir. İlk yöntemde farklı molekül fragmanları veya fonksiyonel gruplar bağlanma bölgesine yerleştirilir ve daha sonra bu fragmanlar/fonksiyonel gruplar birbirine bağlanarak moleküller tasarlanır. İkinci yöntemde ise bağlanma bölgesi içersine güçlü bağlar kuran bir fragman yerleştirilir ve bu fragmana uygun süstitusyon pozisyonlarına fonksiyonel gruplar ve küçük fragmanlar eklenerek moleküller tasarlanır.



Şekil 1.11: *De novo* Ligand tasarım yöntemlerinin şematik gösterimi [48].

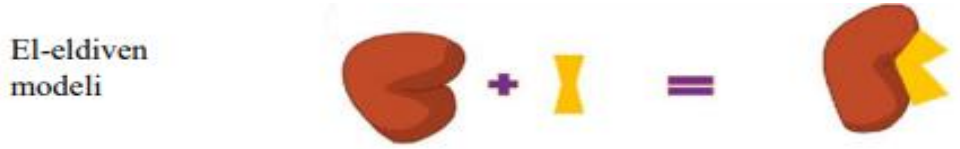
Tasarlanan moleküllerden bir sanal veri bankası oluşturulur ve bu moleküllerin hedef protein ile olası bağlanmaları daha sonra docking çalışmalarıyla incelenir [48-50].

1.3.2 Docking yöntemleri

Docking çalışmalarında amaç 3D molekül yapıları içeren sanal veri bankalarını hedef proteinin 3D yapısına karşı taranarak bağlanması öngörülen moleküllerin tespit edilmesidir. Veri bankasından ligandlar sırayla hedef proteinin bağlanma bölgesinde farklı konformasyonlarla yerleştirilmektedir. Hem poz ve hem uyum (şekil, elektrostatik, polar/apolar, vb.), hem de ligand-protein bağlanma gücü (skor) hesaplanmaktadır.

Zinc15, NIH ve Enamine gibi farklı veri bankaları sunan web sayfaları bulunmaktadır. Ayrıca, bu veri bankalar araştırma ekipleri tarafından da hazırlanabilmektedir. Bu çalışmada *de novo* ligand tasarım ile sanal veri bankası oluşturulmuştur.

Docking çalışmalarının en önemli dezavantajlarından birisi proteinin rijit tutulması ve ligandın konformasyonlarının üretilerek protein ile uyumun incelenmesidir. Oysa ki ligandın proteine bağlandığı zaman hem ligandın proteine şekil açısından uyum sağlaması, hem de proteinin liganda uyum sağlaması gerekmektedir. Bu gerçekleştirilemediği zaman bağlanma görülmemektedir. Bu bağlanma modeli induced-fit veya “el-eldiven” modeli denilmektedir (Şekil 1.12) [51, 52].



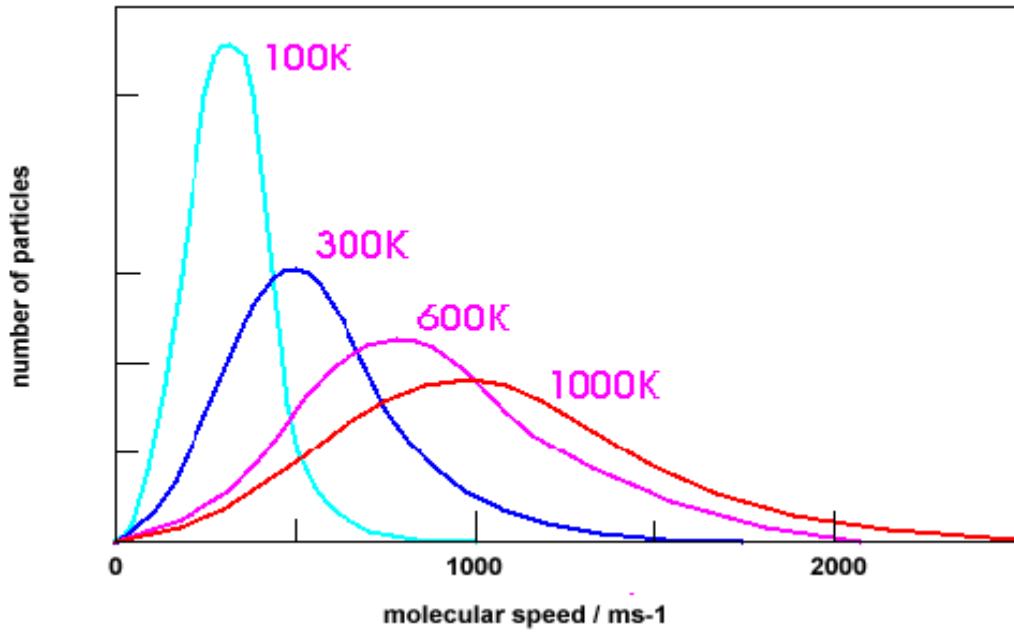
Şekil 1.12: Induced-fit veya “el-eldiven” bağlanma modeli [52].

Docking çalışmalarında protein rijit tutularak sadece ligandın proteine uyum sağlayabilmesi incelenmektedir. Dolayısıyla docking sonuçları, özellikle rijit olmayan protein bağlanma bölgeleri için gerçeği yansıtamamaktadır. Bu nedenle, docking sonuçlarının gerçekçiliğini incelemek için MD simülasyonları kullanılacaktır.

1.3.3 Moleküler Dinamik (MD) yöntemleri

Protein yapılarının dinamiklerinin, enerjilerinin ve stabilitelerinin incelenmesi için MD simülasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır. Fizyolojik şartlara benzer bir ortam oluşturmak için protein yapısı öncelikle bir periyodik kutucuğun içersine yerleştirilir ve kutuya su molekülleri ve fizyolojik konsantrasyonda Na^+ ve Cl^- iyonları eklenir. Bu nedenle sistem nötralize edilmiş olur. Sonra sistemde mevcut atomlara Boltzmann hız dağılımına uygun şekilde sistemin tüm atomlarına rastgele hız verilmektedir (Şekil 1.13). Sistem kısa bir süre (genelde 2 fs) için Newton'un kurallarına uygun bir şekilde hareket etmesine izin verilmektedir ve yeni koordinatlar hesaplanmaktadır. Tüm atomlar arasında etkileşim enerjileri (Örneğin; kovalent bağ, dihedral, açı, hidrofobik, elektrostatik, hidrojen bağ, vb.) hesaplanmaktadır. Bu veriler kullanılarak her atom için yeni akselerasyon (yani hız) hesaplanmaktadır ve sistem tekrar kısa bir süre için hareket etmesine izin verilmektedir. Sisteme ait olan atomların hızları bu sistemin ısısını ve basıncını meydana getirmektedir. Hesaplamalarda yapılan hatalardan dolayı sistemin ısısını ve basıncı değişmektedir. MD simülasyonunu fizyolojik şartlara yakın tutmak için genelde hem barostat ile basınç hem de termostat ile ısı sabit tutulmaktadır [52-55]. MD simülasyonlarıyla oluşturulan ligand-protein

yapıları daha sonra olası bağlanma afinitesi ve dinamik bağlanma etkileşimleri açısından incelenmektedir.



Şekil 1.13: Farklı ısılarda Boltzmann hız dağılımı gösterilmiştir [56].

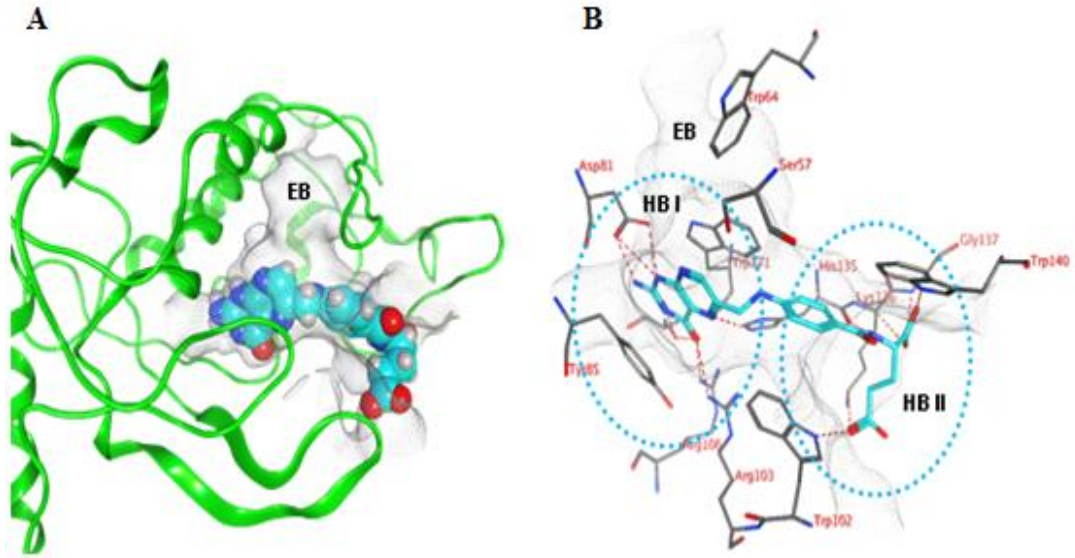
1.4 Proje Kapsamında Yapılanlar

Ön çalışmalarımızda tasarlanmış ve hFR α biyobelirteç proteinine yüksek ilgi ile bağlanması öngörülen 16 adet peptidin dinamik bağlanma ilişkileri ve bağlanma enerjileri MD simülasyon çalışmalarıyla detaylı olarak incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle tüm peptitler hFR α bağlanma bölgesine dock edilmiştir. Peptit pozlarının hFR α bağlanma bölgesiyle uyumu (şekil, elektrostatik etkileşim, H-aren bağı etkileşimi, hidrofobik ve hidrojen bağı etkileşimleri açısından) peptitlerin afinitesi göz önüne alınarak incelenmiştir ve en olası bağlanma pozları 10 ns süreli MD simülasyonları için seçilmiştir. Simülasyon ile elde edilen ligand-protein etkileşimleri incelenmiştir ve peptidin bağlanma bölgesi içerisinde dinamiği incelenmiştir. Ayrıca, peptitlerin protein bağlanma bölgesiyle etkileşim enerjileri hesaplanmıştır. Bu çalışmalar ile elde edilen bilgiler ışığında daha iyi güçlü bağlanması öngörülen peptitler tasarlanmıştır. Bu II. nesil peptitler de yine docking çalışmaları ve MD simülasyonları ile detaylı olarak incelenmiştir. Sonuç olarak 16 adet I. nesil peptit için bağlanma etkileşimleri incelenmiştir ve toplam 12 adet II. nesil peptit tasarlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Peptit-Bazlı Ligandların Tasarlanması

hFR α -Folik Asit kompleksinin kokristal yapısı (pdb: 4lrh; 2.8Å) incelenmiştir. Nötr ortamlarda hFR α 'ya karşı çok yüksek ilgi duyan folik asit, reseptörüyle çok sayıda hidrojen bağı kurmaktadır (Şekil 2.1). Folik asitin 2-aminopteridin-4-on sistemi Asp81, Arg103, Arg106, His135 ve Ser174 ile hidrojen bağları kurmaktadır (HB I bölgesi). Ayrıca, Tyr85 ve Trp171 ile π - π etkileşimleri kurmaktadır. Folik asitin peptit bağının amin grubu ve karboksilik asit grupları Trp102, Gly137 ve Trp140 ile hidrojen bağları kurmaktadır (HB II bölgesi). Ligandın bir negatif yüklü karboksilik asit grubu pozitif yüklü Lys137 ile elektrostatik bağ kurmaktadır (mesafe \sim 4Å). Kristal yapıda folik asit bağlanma bölgesinin hemen yanında Ser57 ve Trp64 bölgesinde bulunan ek bağlanma bölgesi (EB) olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgeyle ligandların da etkileşim kurabileceği öngörülmektedir ve peptit tasarımı için de bu bölgeyle etkileşim olması istenmiştir.



Şekil 2.1: (A) hFR α 'nın Folik Asit bağlanma bölgesinin genel yapısı ve (B) Bağlanma bölgesine ait EB, HB I ve HB II bölgeleri.

hFR α -Folik Asit bağlanma ilişkilerinden ilham alarak hFR α 'nın HB I, HB II ve EB bölgeleriyle etkileşim kurmasını ön gördüğümüz peptitler tasarlanmıştır. Bu peptitler

5-7 amino asit uzunluğunda olup, sırasıyla HB I ile etkileşim kurabilmek için Arg(R) ve Lys(K), EB ile etkileşim kurabilmek için Tyr(Y), His(H) veya Phe(F), HB II ve Lys136 ile etkileşim kurabilmek için Asp(D) veya Glu(E) amino asitlerinden oluşmaktadır. Bu amino asitler arasında linker olarak Ala(A) veya Gly(G) amino asitleri yerleştirilmektedir. Peptitlerin son amino asidi olarak DOTA takmak için uygun olan Lys(K) seçilmiştir. Lys(K) yan zincir NH₂ grubunu mümkün olduğunca protein ile etkileşimden korumak için (ve DOTA grubuna yer ayırmak için) siklik alifatik C12 zinciri kullanılmıştır.

Moleküler modelleme çalışmaları için toplam 70 adet peptit tasarlanmıştır. Daha sonra moleküler modelleme çalışmaları ile bu peptitlerin (70 adet) hFR α bağlanma bölgeleriyle olası bağlanma durumları benzer şekilde araştırılmıştır (Şekil 2.1). Bu araştırmalar sonucunda Tablo 2.1’de yer alan 16 adet peptitin seçilerek bağlanma bölgesine yüksek ilgi ile hedeflemesi uygun olanlar seçilmiş olup, devamında sentez için önerilmiştir.

Tablo 2.1: Bu proje esnasında sentezlenen peptitler.

Peptid No	Sekans	Peptid No	Sekans
I	RFDAK	IX	HRAFAK
II	RFAAK	X	KYNAK
III	RPAAK	XI	KYSAK
IV	RPDAK	XII	RFAADK
V	RKAFK	XIII	RFSNK
VI	KYDAK	XIV	RPSNK
VII	KFDAK	XV	RYSDDK
VIII	KYAAK	XVI	RYSDEK

2.2 Docking Çalışmaları

Peptitlerin 3D yapıları MOE ile hazırlanmıştır (v2019.0102, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Kanada). C-terminal Lys amino asidi DOTA grubu yerine C12 alifatik halka eklenmiştir. Peptitler daha sonra AMBER14:EHT ile minimize edilmiştir.

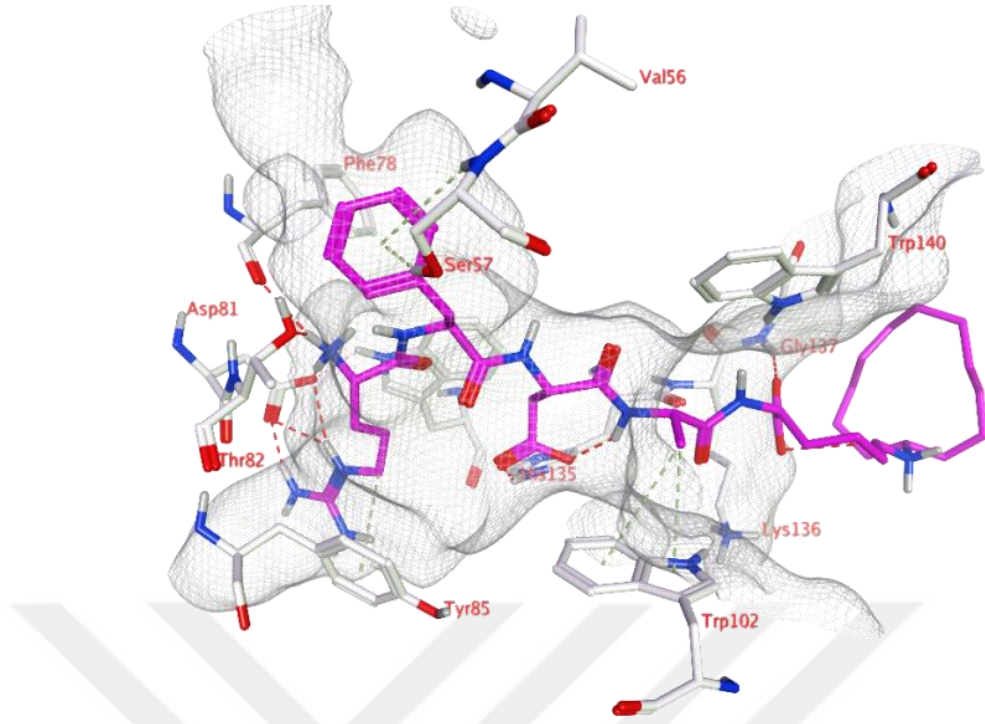
hFR α protein modeli olarak 4lrh kristal yapısı kullanılmıştır. Subunit A ve buna bağlı olan folik asit tutulmuştur ve diğer tüm moleküller silinmiştir. Daha sonra MOE

bilgisayar programının Protonate 3D yöntemi ile hidrojen atomları eklenmiştir ve AMBER14:EHT ile minimize edilmiştir.

Docking çalışmaları LeadIT programının FlexX docking yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (v2.3.2, BioSolveIT GmbH, St. Augustin, Almanya). Her peptit için en yüksek skor gösteren 3 poz incelenmek üzere kaydedilmiştir.

2.3 Docking Sonuçlarının Analiz Edilmesi

Bu çalışmalar sonucunda tasarlanmış olan peptitler ile hFR α bağlanma bölgesini hedefleyebileceğimiz öngörülmüştür. Örnek olarak moleküler modelleme sonucunda elde ettiğimiz RFDK peptitinin olası bağlanma ilişkileri gösterilmektedir (Şekil 2.2). Burada bağlanma bölgesi beyaz çizgili ağ ile gösterilmiştir, hidrojen bağı etkileşimleri kesik kırmızı çizgiler ile gösterilmiştir. Ayrıca, H-aren bağı etkileşimleri beyaz kesikli çizgiler ile gösterilmiştir. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi peptitin Arg1 ve serbest katyonik amin grubu HB I bölgesiyle hidrojen bağları etkileşimi kurmaktadır (Phe78 omurga karbonil grubu; Asp81 ve Thr82 yan zincirleri). Ayrıca, Arg1 bağla HB I bölgesinde bulunan Tyr85 ve Trp171 ile katyon- π etkileşimleri kurmaktadır. Peptitin Asp3 amino asidi HB I’in His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Peptitin ikinci amino asidi Phe2 EB bölgesiyle etkileşim halindedir (Ser57 ile H-aren bağları). Peptitin C-terminal karboksilik asit grubu ise Gly137 ile hidrojen bağı ve Lys136 ile elektrostatik etkileşim kurmaktadır (HB II bölgesi). Peptitin Ala4 amino asidi Trp102 ile hidrofobik etkileşim içindedir ve son amino asidi Lys5 ise protein bağlanma bölgesinin dışına doğru bakmaktadır.



Şekil 2.2: *In silico* ortamda tasarlanan RFDK peptidinin moleküler modelleme ile elde edilen örnek bağlanma ilişkileri.

2.4 Moleküler Dinamik (MD) Çalışmaları

Tablo 2.1’de yer alan ön çalışmalarımızla belirlediğimiz rasyonel tasarımla elde ettiğimiz 16 adet peptit yapılı-hFR α komplekslerinin MD simülasyonlarıyla Yasara Structure yazılımı (v18.8.9, YASARA Biosciences GmbH) yardımıyla gerçekleştirilecektir [57-59]. İlk etapta kompleksler küboid kutunun içerisine kutu ile kompleks arasındaki mesafe en az 10Å olacak şekilde yerleştirilecektir. Daha sonra kutuya su (0.997 g/ml; TIP3P) ve NaCl ilave edilecektir. Simülasyon periyodik sınır koşulları, PME yöntemi, sabit basınç (1 bar, Berendsen, standar ayarlar) sabit ısı (300K, Brendsen, standart ayarlar) ve AMBER14 kuvvet alanı ile yürütülecektir [59, 60]. Sistemde tüm bağlar LINCS ve SETTLE algoritmalarıyla sabitlenecektir ve simülasyon 2 x 1.25 fs adımlarla yürütülecektir [60, 61]. Simülasyon 10 ns boyunca yürütülecektir ve her 100 ps’de koordinatlar, hız ve enerjiler kaydedilecektir. MM/PBSA ve GBVI/WSA bağlanma enerjileri sırasıyla Yasara ve MOE (v2020.09, Chemical Computing Group Inc. Montreal, Kanada) ile hesaplanacaktır. Ayrıca ligand, protein ve bağlanma bölgesine ait RMSD ve RMSF değerleri ve Protein-Ligand İnteraction Fingerprint (PLIF) analizleri MOE ile hesaplanacaktır [62, 63].

3. BİRİNCİ NESİL TASARLANAN OLASI hFR α LİGANDLARIN İNCELENMESİ

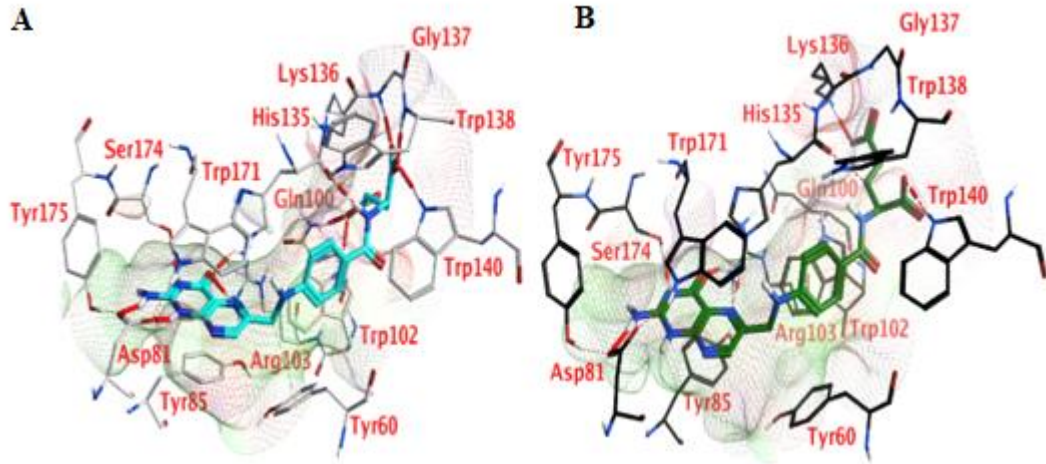
Tablo 2.1’de görüldüğü gibi grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda hFR α biyobelirteç proteinine bağlanması öngörülen 16 adet peptit-yapılı ve DOTA bağlama yeri içeren ligandlar tasarlanmış ve sentezlenmiştir.

3.1 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları

Ön çalışmalarda tasarlanan 16 adet peptitin (Tablo 2.1 ve Ek A) tasarım aşaması esnasında elde edilen hFR α -peptit komplekslerinin stabiliteleri ve ligand-protein etkileşimleri 10 ns’lik MD simülasyonlarıyla incelenmiştir.

3.1.1 hFR α -Folik Asit kompleksinin incelenmesi

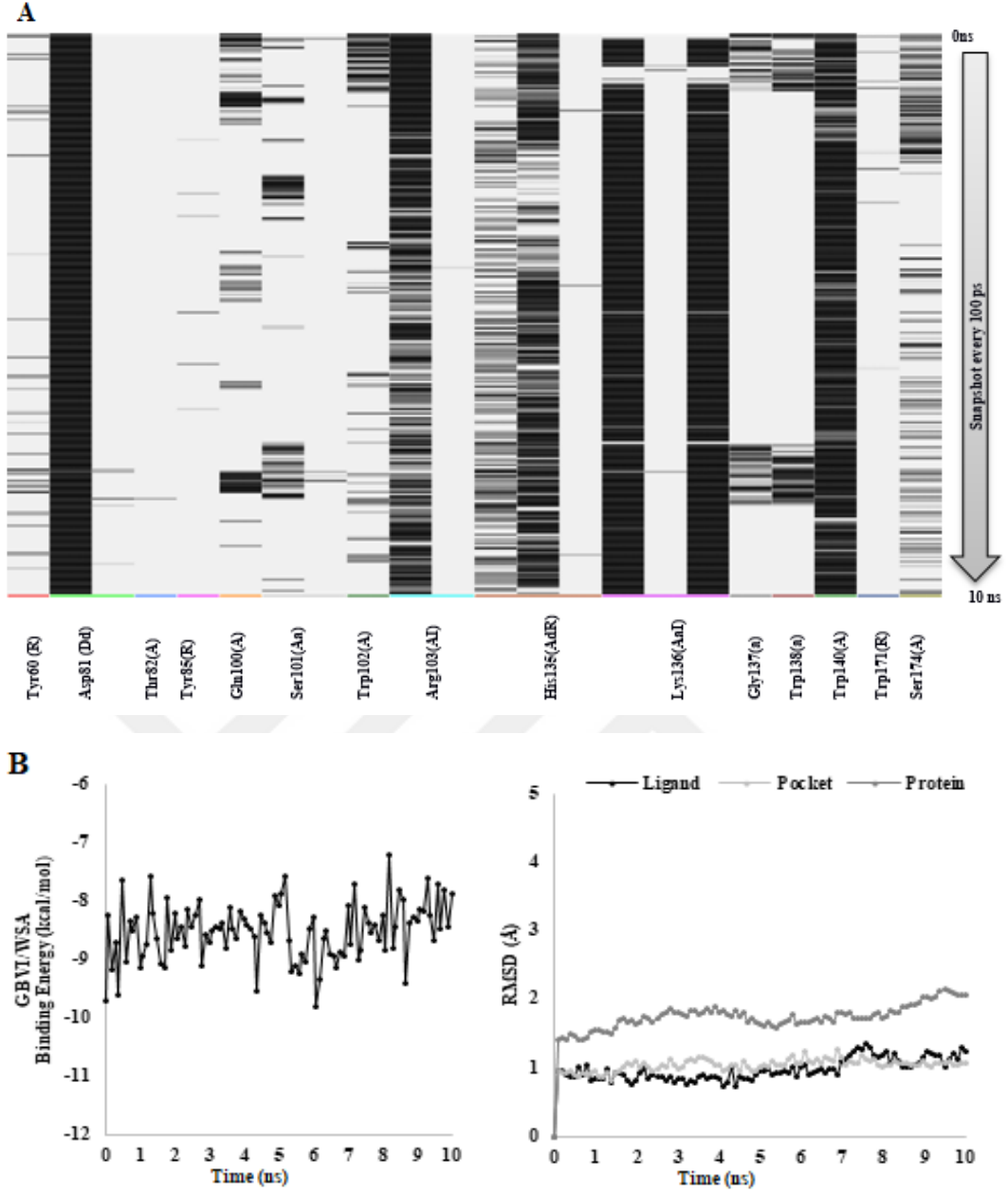
hFR α -Folik Asit kompleksinin etkileşimleri incelenmiştir ve daha önce anlatılmıştır (Şekil 2.1). Folik asitin pteridin halkasındaki amin grubu ile Asp81 amino asidinin yan zinciri arasında hidrojen bağı görülmektedir. Pteridin halkasının okso grubu ile Arg103 amino asidinin yan zinciri arasında da hidrojen bağı kurulmuştur. Bunlara ilaveten pteridin halkasındaki azotlardan biri Ser174 amino asidinin yan zinciri ile diğer bir azotu ise Asp81 amino asidinin yan zinciri ile hidrojen bağı oluştururken, Tyr85 amino asidi ile de hidrofobik etkileşim yapmaktadır. His135 amino asidinin omurgası ile ligandın amit grubuna ait azotu arasında hidrojen bağı görülmektedir. Ligandın uzun zincir sonunda bulunan karboksilik asit grubu ile Trp102 amino asidinin yan zinciri ve Gln100 amino asidinin yan zinciri arasında hidrojen bağları kurulmuştur. Aynı zamanda bu karboksilik asit grubu ile Lys136 amino asidi arasında elektrostatik etkileşim mevcuttur. Kısa zincir sonunda bulunan karboksilik asit grubu ile Gly137 amino asidinin omurgası, Trp138 amino asidinin omurgası ve Trp140 amino asidinin yan zinciri arasında hidrojen bağları görülmektedir.



Şekil 3.1: hFR α -Folik Asit kompleksinin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -Folik Asit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Folik asitin pteridin halkasındaki amin grubu ile Asp81 amino asidinin yan zinciri arasında hidrojen bağı görülmektedir. Pteridin halkasının okso grubu ile Arg103 amino asidinin yan zinciri arasında da hidrojen bağı kurulmuştur. Bunlara ilaveten pteridin halkasındaki azotlardan biri Ser174 amino asidinin yan zinciri ile hidrojen bağı yakalamıştır. Trp102 amino asidi ile kurulan hidrojen bağı kaybolmuştur. Lys136 amino asidindeki elektrostatik etkileşim yerini hidrojen bağına bırakmıştır. Trp140 amino asidinin yan zinciri ile kısa zincirdeki karboksilik asit arasında hidrojen bağı vardır, bu karboksilik asit grubunun 0 ns'de görünen diğer hidrojen bağları kaybolmuştur.

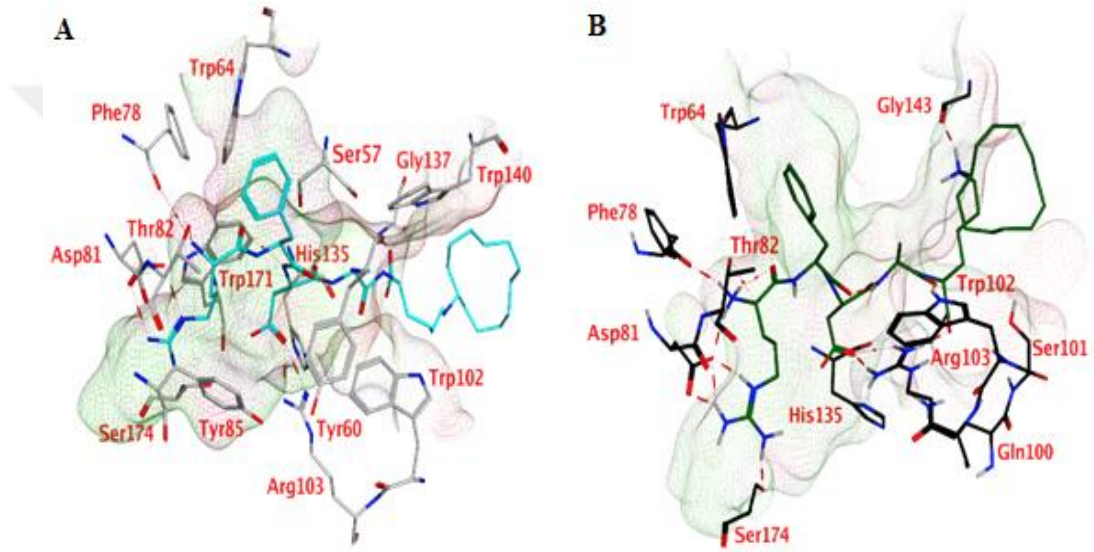
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi -9 kcal/mol ile -8 kcal/mol arasında bulunmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -Folik Asit kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.2 hFR α -RFDAK kompleksinin incelenmesi

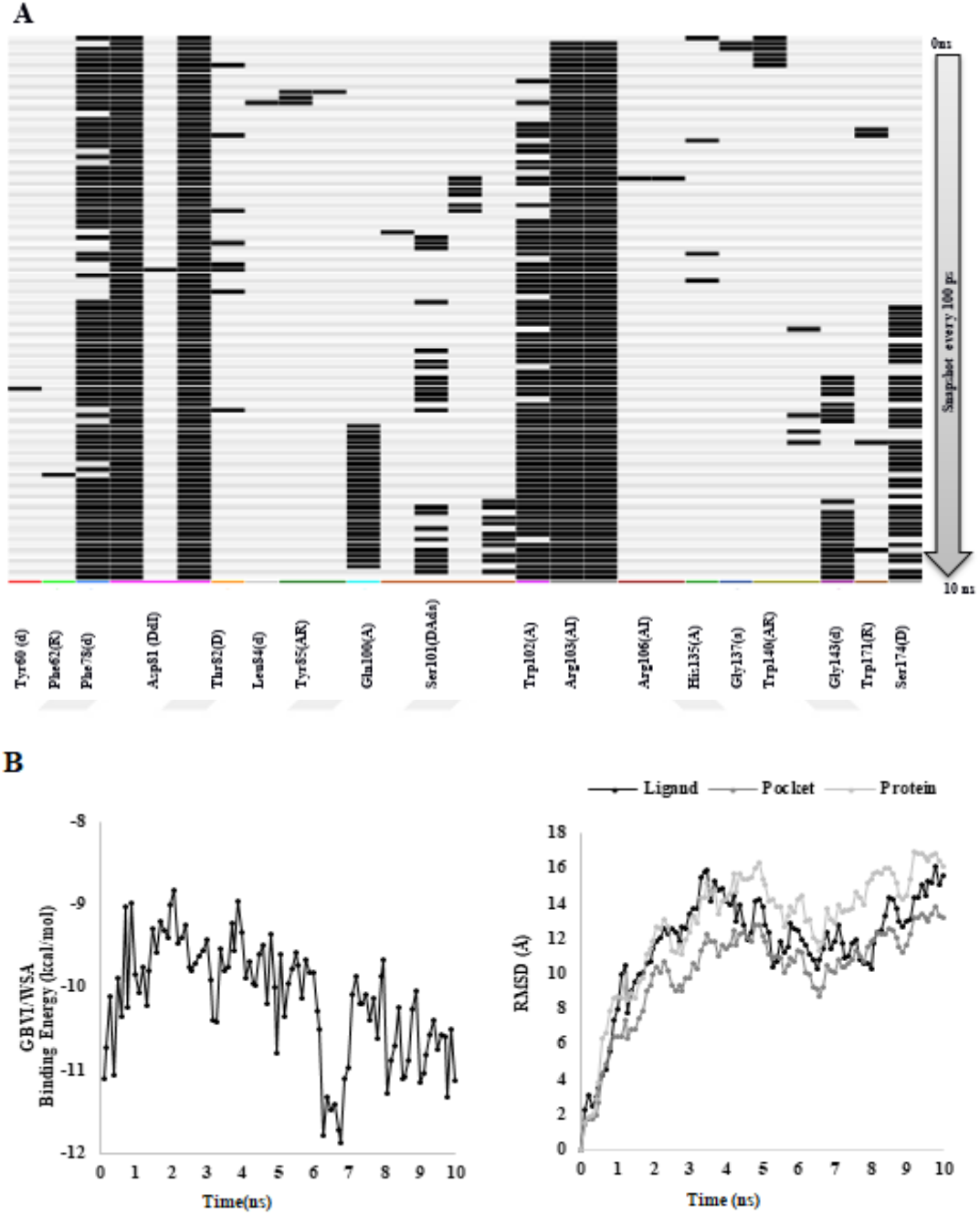
RFDAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.3). Arg1(L) amino asidi yan zincir proteinin Asp81 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi EB’de bulunan Trp64 yan zinciri ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Asp3(L) amino asidi Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Gly137 ve Trp140 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi ise protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.



Şekil 3.3: Peptit I'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82, Ser174 ve Phe78 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi Trp64 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Asp3(L) amino asidi Arg103 hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp102 hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi Gly143 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.

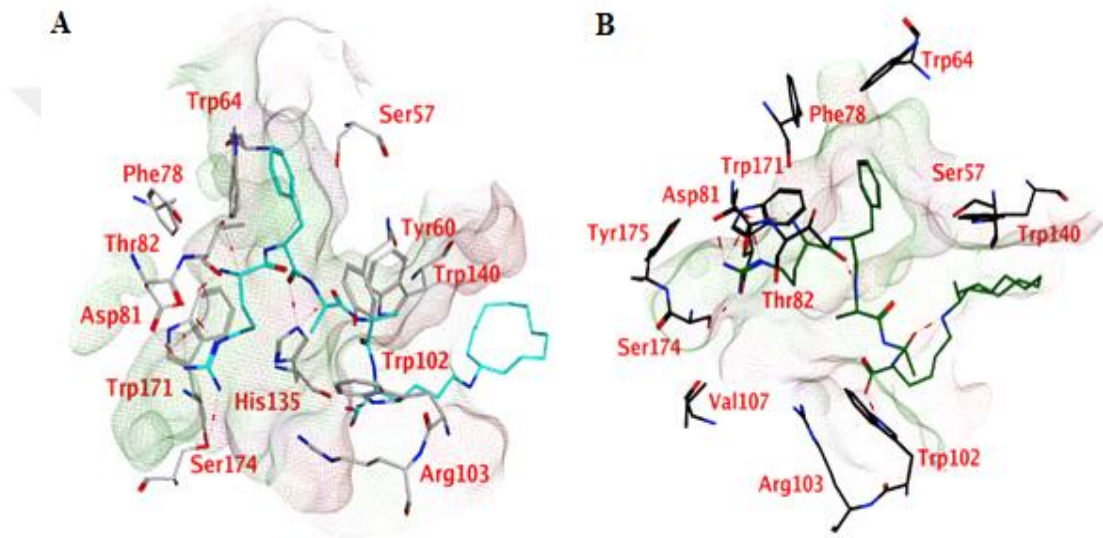
Kompleksin MD simülasyonu boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır fakat daha sonra yine -11 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFDK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyonu boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.3 hFR α -RFAAK kompleksinin incelenmesi

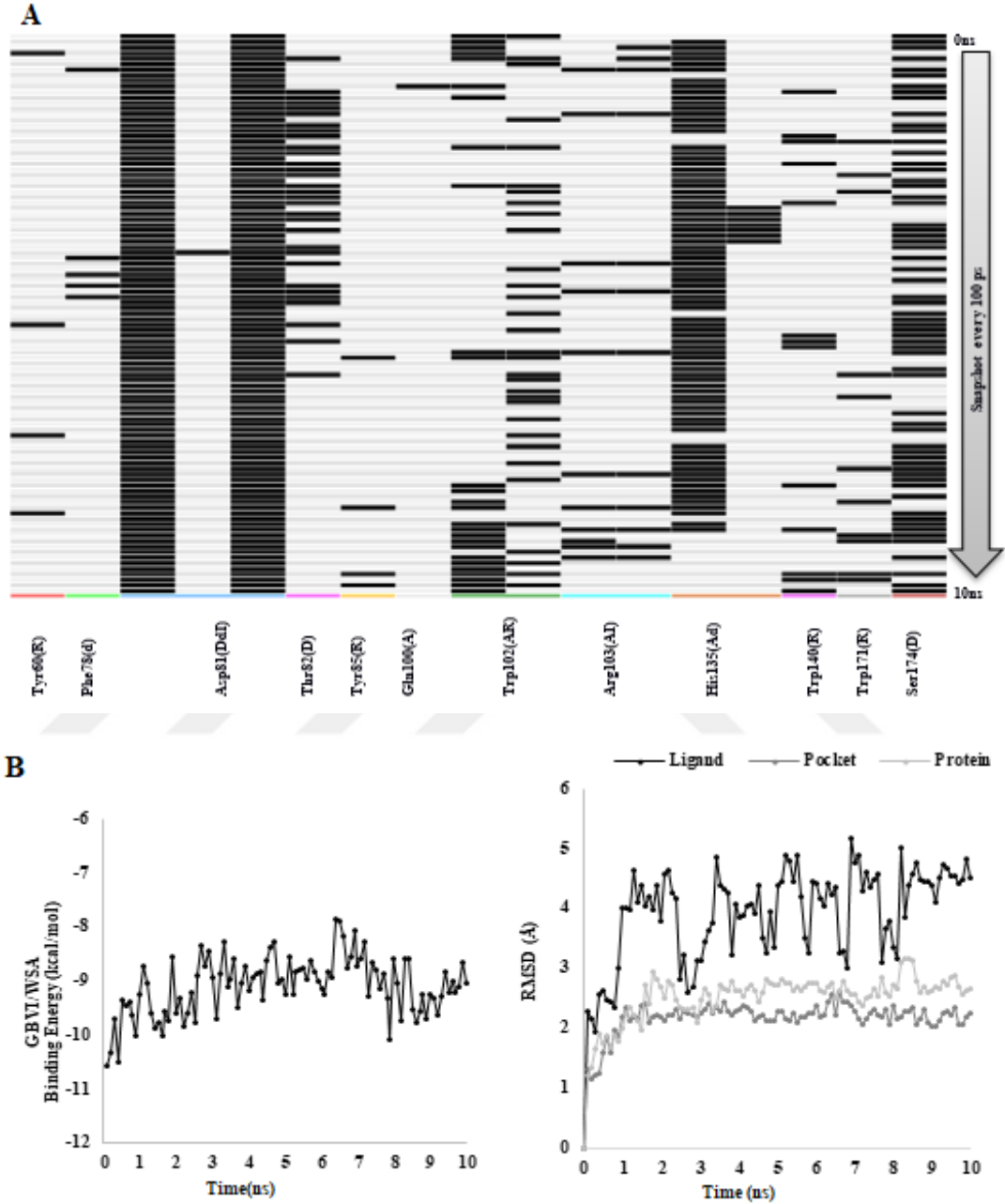
RFAAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.5). Arg1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Asp81 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi EB'de bulunan Ser57 yan zinciri ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp102 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi ise protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.



Şekil 3.5: Peptit II'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Ser174 ile oluşan hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim devam etmektedir. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi Trp64 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Ala3(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp102 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinin dışına doğru bakmaktadır. Dota Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.

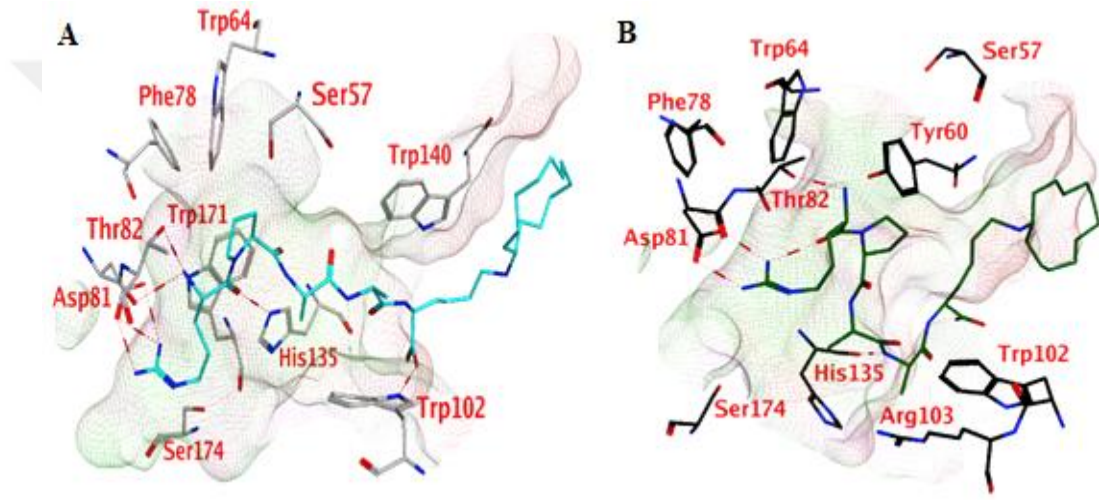
Kompleksin MD simülasyonu boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra -9 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFAAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyonu boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.4 hFR α -RPAAK kompleksinin incelenmesi

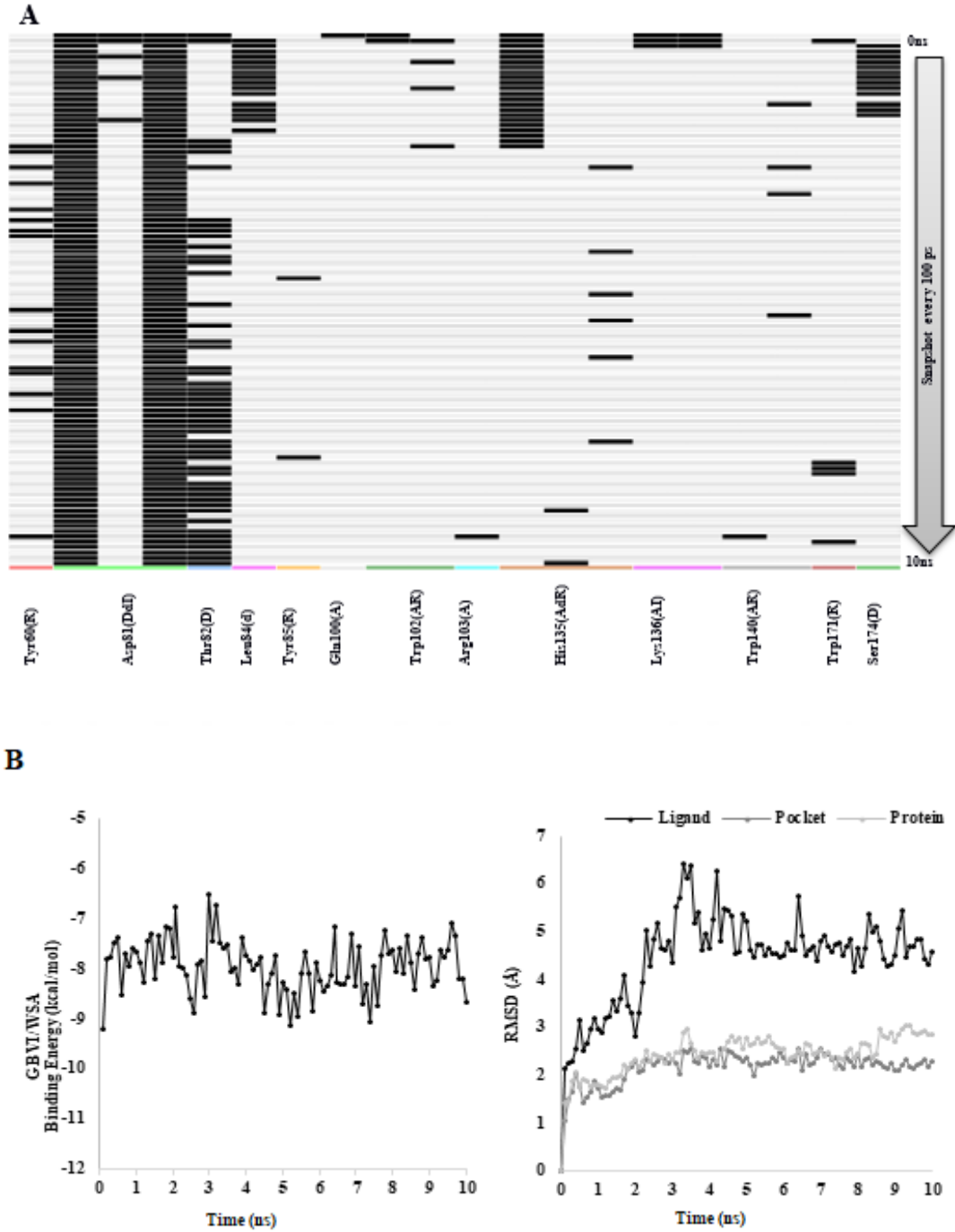
RPAAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.7). Arg1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Asp81 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Pro2(L) amino asidi EB'de bulunan Trp64 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi ile Trp102 ile hidrojen bağı ve Trp140 H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi ise protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.



Şekil 3.7: Peptit III'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Thr82 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Pro2(L) amino asidi Tyr60 ile hidrofobik etkileşime sahiptir ve Ser57 bağlanma bölgesinin dışında bulunmaktadır. Ala3(L) amino asidi His135 hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.

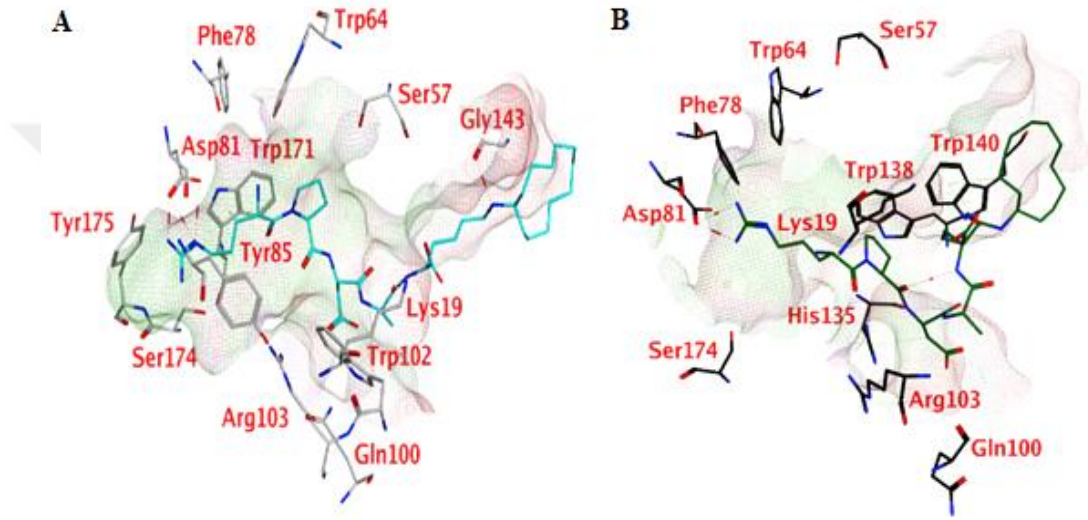
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -9 kcal/mol değerinden -8 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RPAAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.5 hFR α -RPDAK kompleksinin incelenmesi

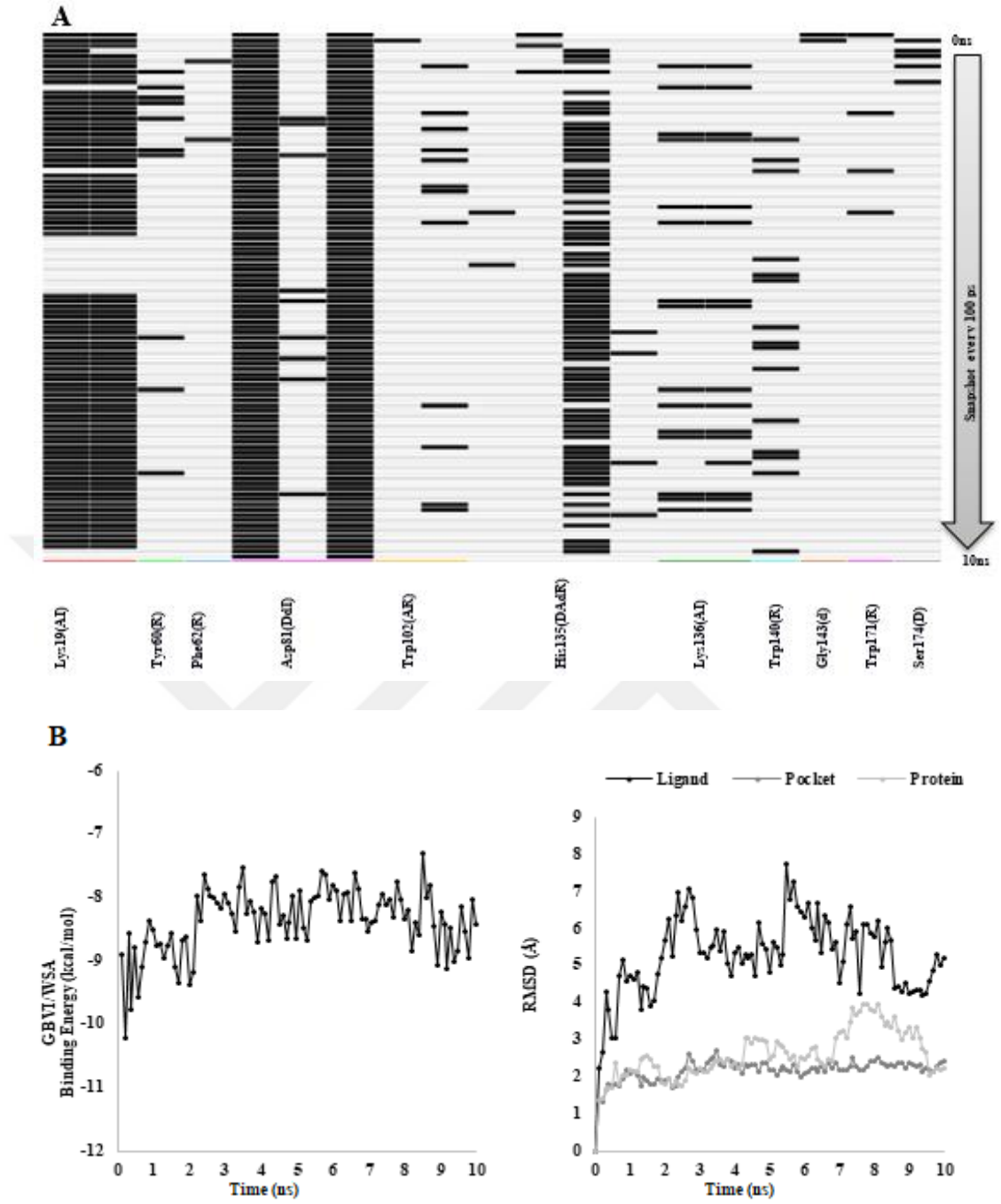
RPDAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Tyr175 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.9). Arg1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Tyr85 ile Trp171 H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Pro2(L) amino asidi EB'de bulunan Trp64 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Asp3(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Ala4(L) amino asidi Lys19 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi ise Gly143 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 3.9: Peptit IV'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Ser174 bağlanma bölgesinin dışarısında kalmaktadır. Pro2(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Asp3(L) amino asidi His135 H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Lys5(L) son amino asidi Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.

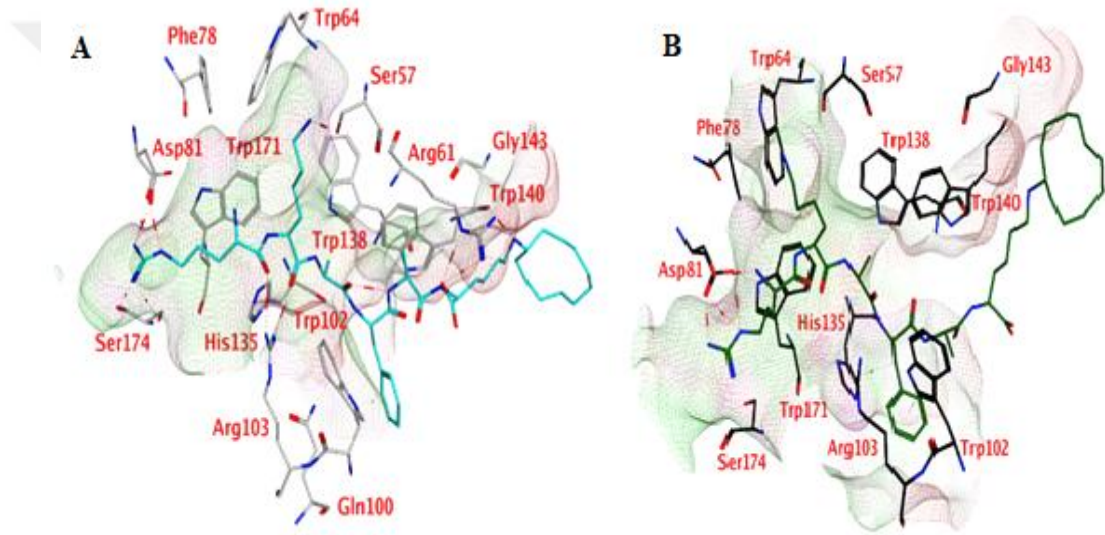
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -9 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine inmektedir, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RPDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.6 hFR α -RKFAK kompleksinin incelenmesi

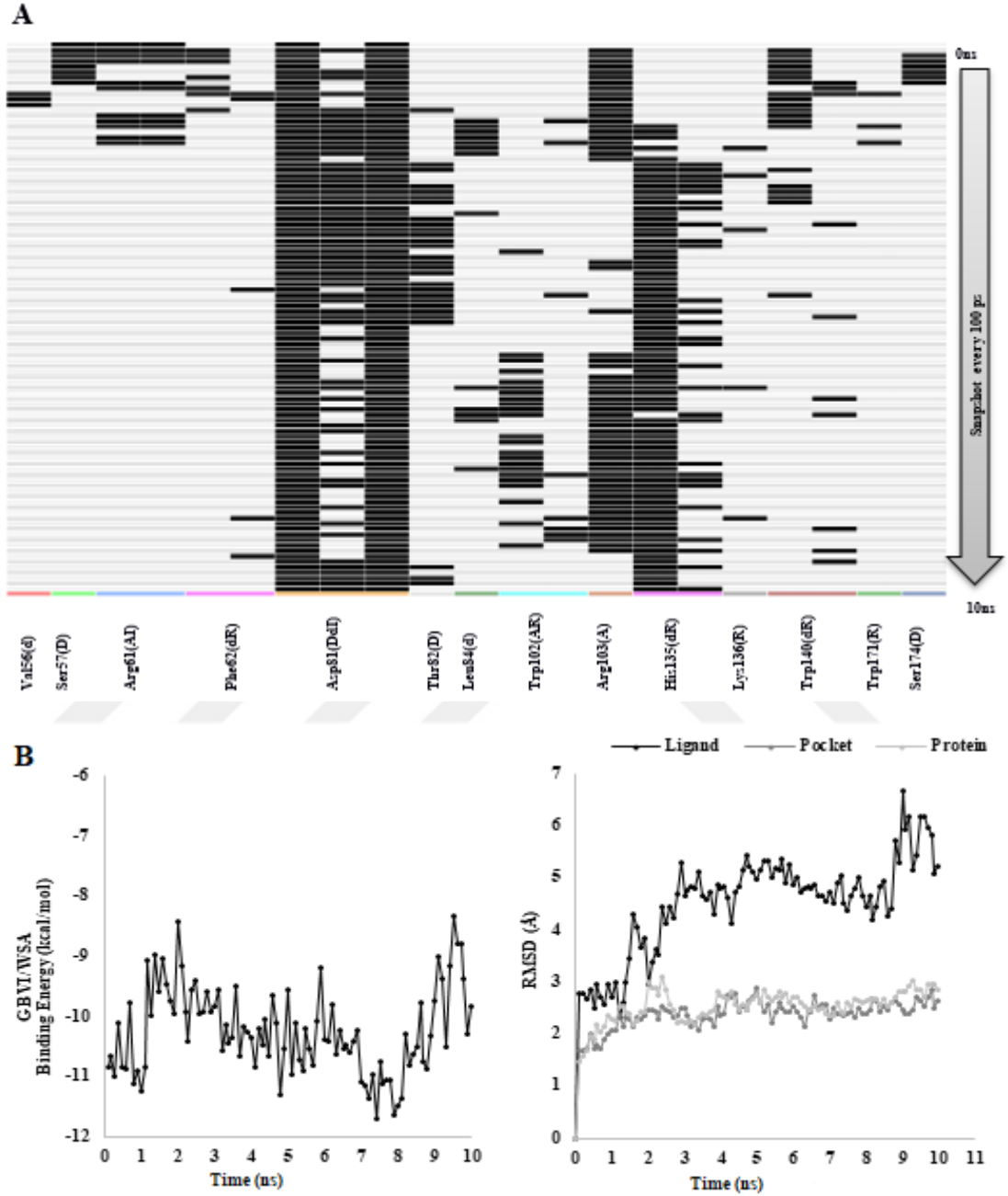
RKFAK dizili peptitin N-terminal amin grubu Trp171 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.11). Arg1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys2(L) amino asidi EB'de bulunan Ser57 ve Arg103 yan zinciri ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Phe4(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimine sahiptir. Ala5(L) amino asidi ise Arg61 ile hidrojen bağı etkileşimine sahiptir. Lys6(L) son amino asidi Trp140 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 3.11: Peptit V'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.11 ve 3.12). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, burada Ser174 ve Phe78 bağlanma bölgesinin dışında bulunmaktadır. Lys2(L) amino asidi ile hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Ala3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe4(L) amino asidi omurga ile Trp102 ve His135 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala5(L) amino asidi Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys(6) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.

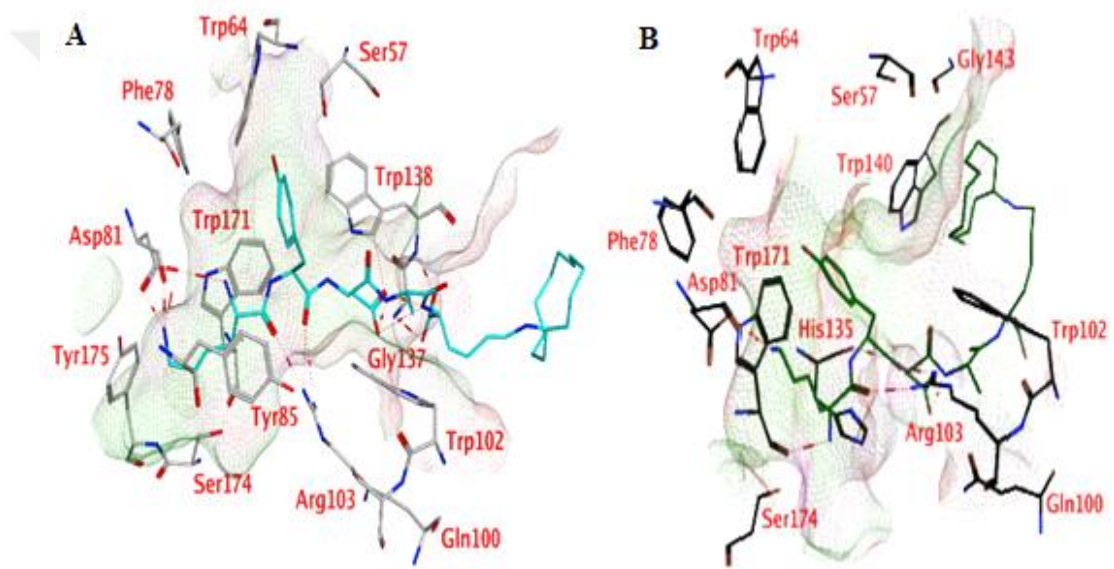
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RKAFK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.7 hFR α -KYDAK kompleksinin incelenmesi

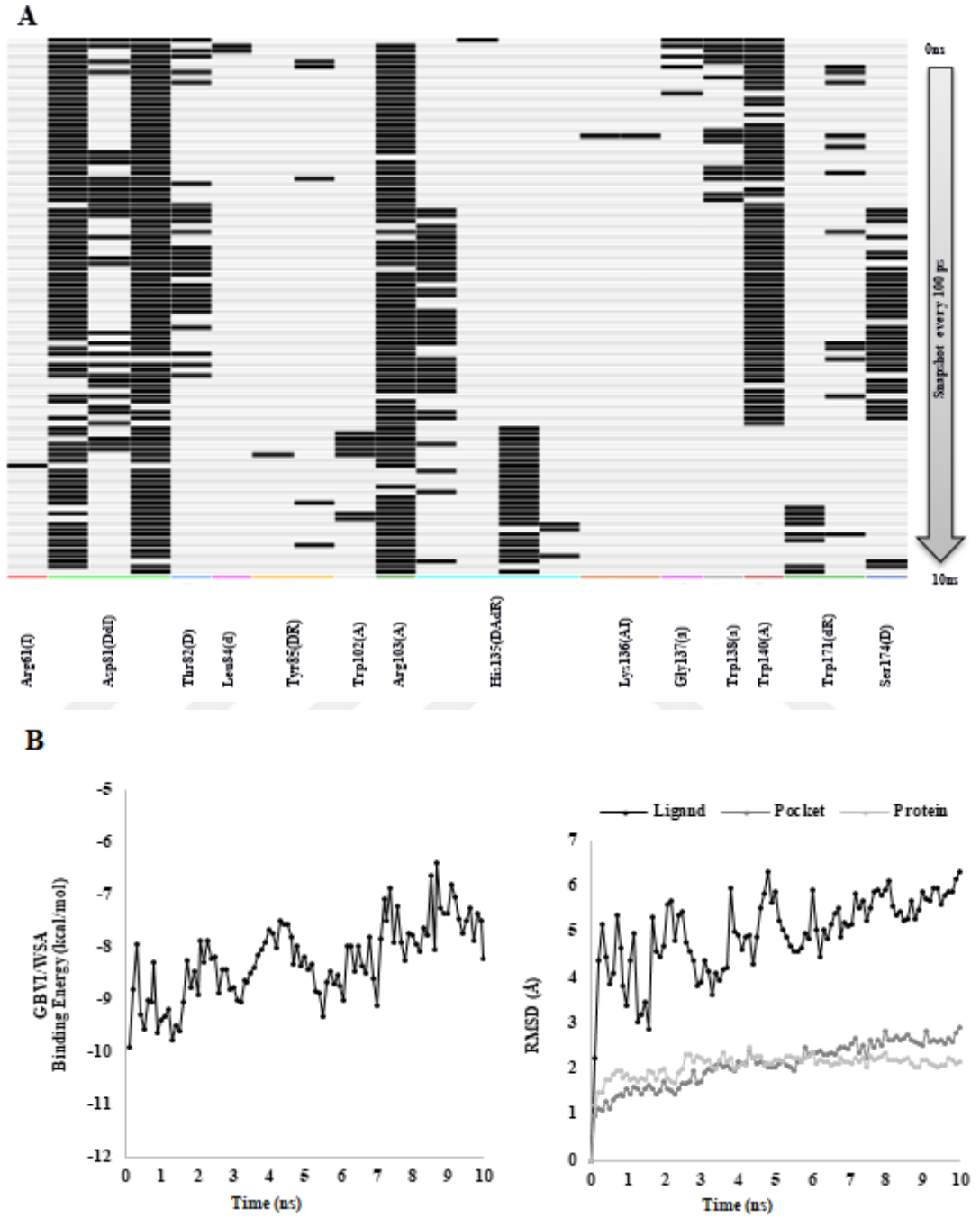
KYDAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Tyr175 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.13). Lys1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Tyr85 ile Trp171 H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi EB'de bulunan Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp64 ile Phe78 bağlanma bölgesinin dışında kalmaktadır. Asp3(L) amino asidi Trp138 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp138 ve Gly137 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.



Şekil 3.13: Peptit VI'nın tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.13 ve 3.14). Lys1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Trp171 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Ser174 bağlanma bölgesinin dışarısında kalmaktadır. Tyr2(L) amino asidi His135 ve Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimine sahiptir ve Trp 64 ile Phe78 bağlanma bölgesinin dışında kalmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Asp3(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Ala4(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Ayrıca, Gln100 bağlanma bölgesinin dışında kalmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.

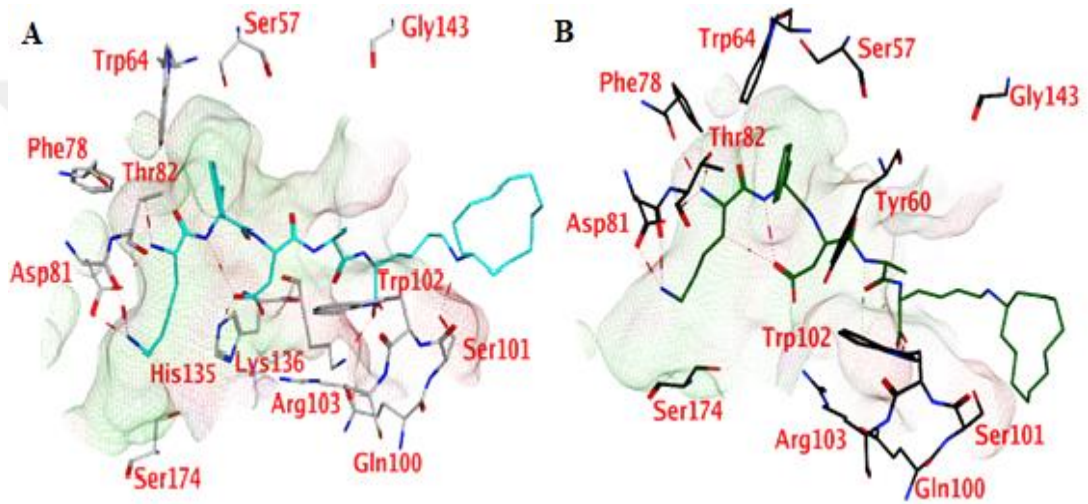
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -10 kcal/mol değerinden -9 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -8 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KYDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.8 hFR α -KFDAK kompleksinin incelenmesi

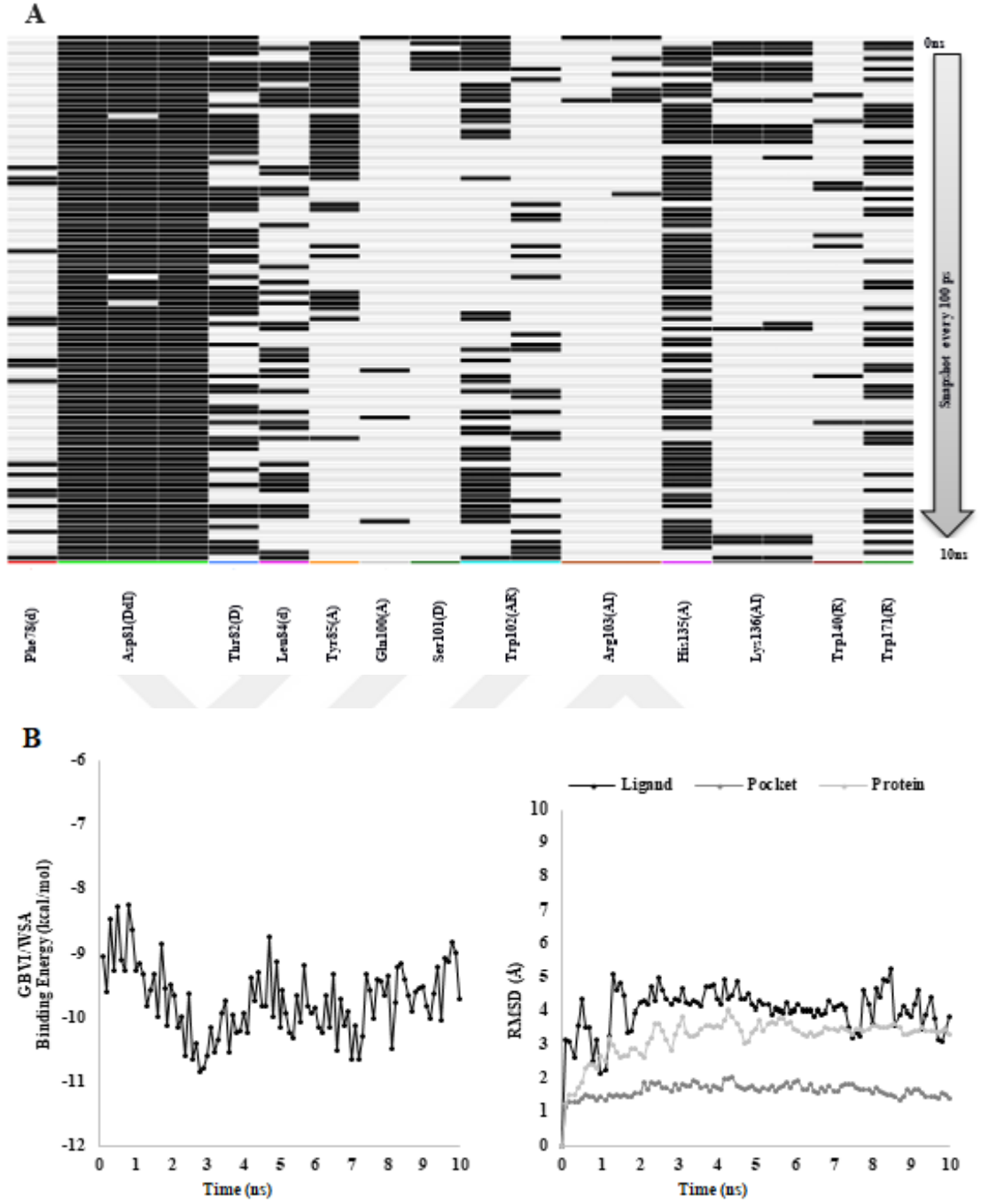
KFDAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.15). Lys1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Asp81 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi EB'de bulunan Trp64 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Asp3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Lys136 ve Trp102 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi ise Ser101 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 3.15: Peptit VII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.15 ve Şekil 3.16). Lys1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82 ve Phe78 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Ser174 bağlanma bölgesinin dışarısında kalmaktadır. Phe2(L) amino asidi Tyr60 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Asp3(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı ve hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.

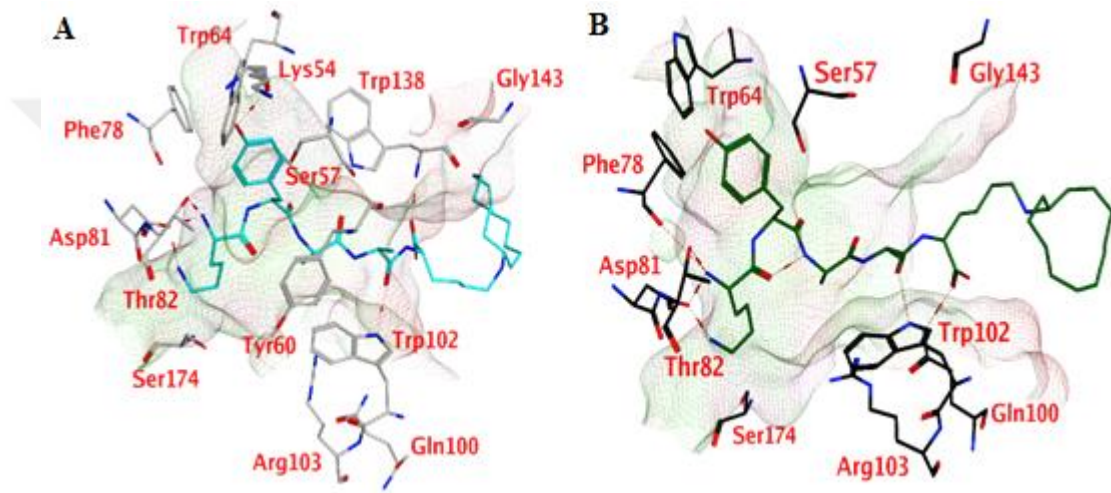
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -9 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KFDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.9 hFR α -KYAAK kompleksinin incelenmesi

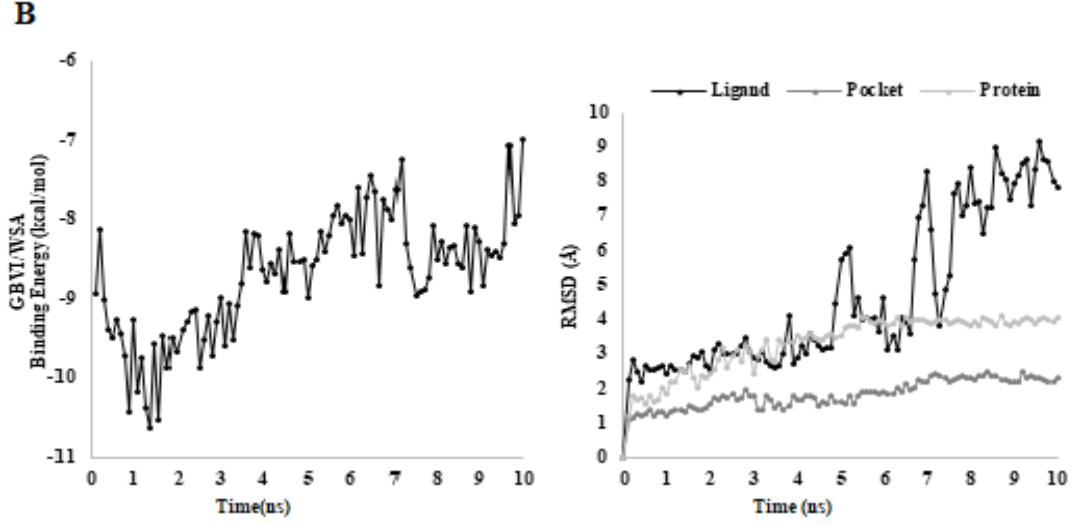
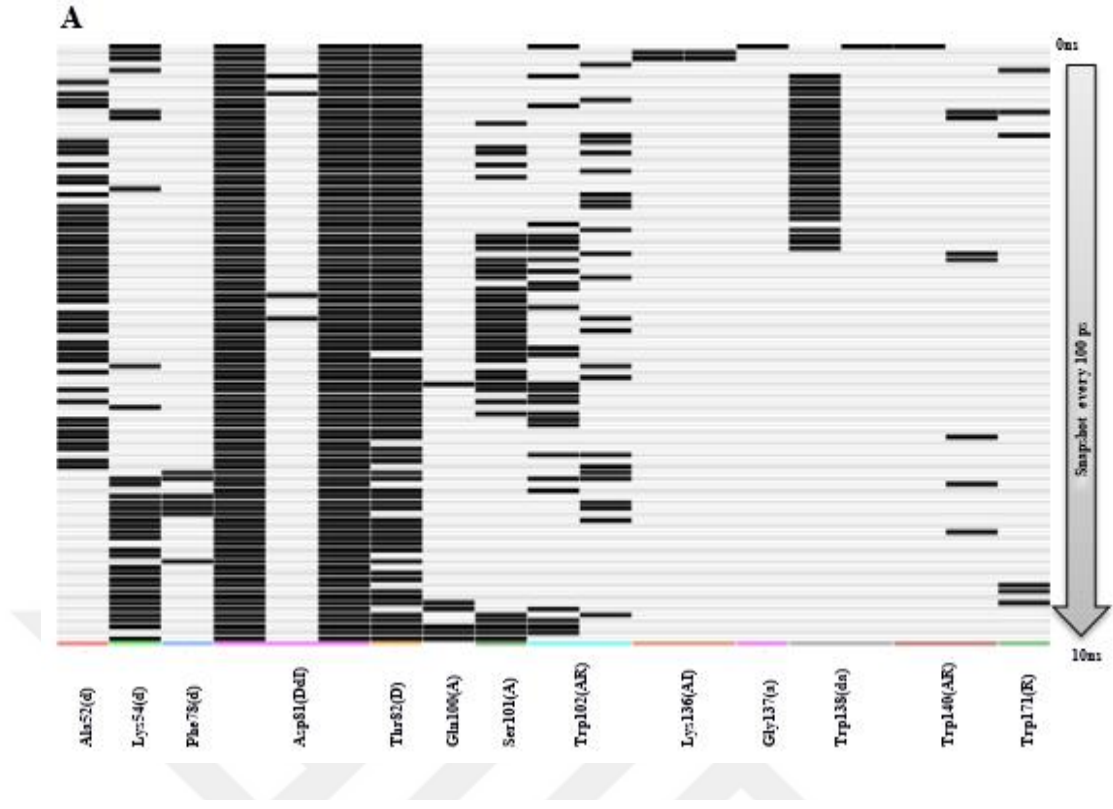
KYAAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.17). Lys1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Asp81 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi EB'de bulunan Lys54 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi Tyr60 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp102 ve Trp138 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.



Şekil 3.17: Peptit VIII'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.17 ve Şekil 3.18). Lys1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82 ve Phe78 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Ser174 bağlanma bölgesinin dışarısında kalmaktadır. Tyr2(L) amino asidi Trp64 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Ala3(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp102 ile hidrojen bağı ve H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Gln100 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.

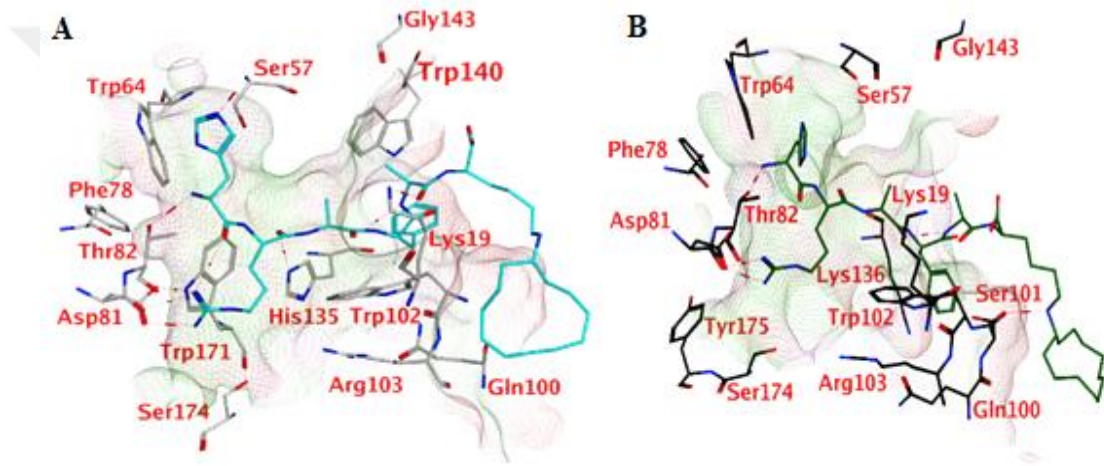
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -9 kcal/mol değerinden -8 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -7 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.18).



Şekil 3.18: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KYAAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.10 hFR α -HRAFAK kompleksinin incelenmesi

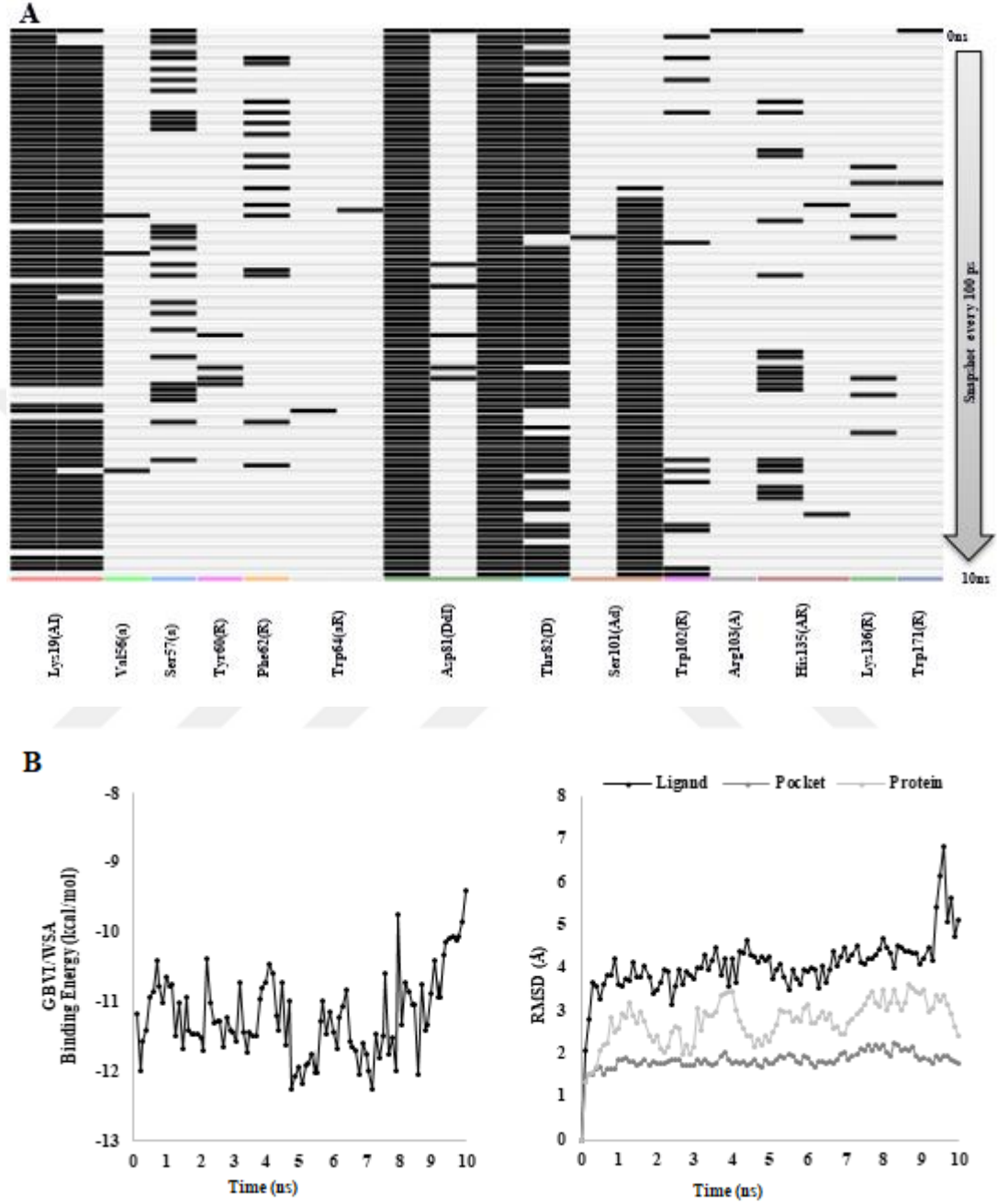
HRAFAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.19). His1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Ser57 hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Arg2(L) amino asidi EB’de bulunan Asp81 ile hidrojen bağı etkileşimi ve Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe4(L) amino asidi Trp102 H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala5(L) amino asidi Lys19 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys(6) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.



Şekil 3.19: Peptit IX'un tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20). His1(L) amino asidi sürekli olarak Thr82 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Ser174 bağlanma bölgesinin dışarısında kalmaktadır. Arg2(L) amino asidi Asp81 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Phe4(L) amino asidi Lys136 ve Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala5(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Lys(6) son amino asidi Ser101 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.

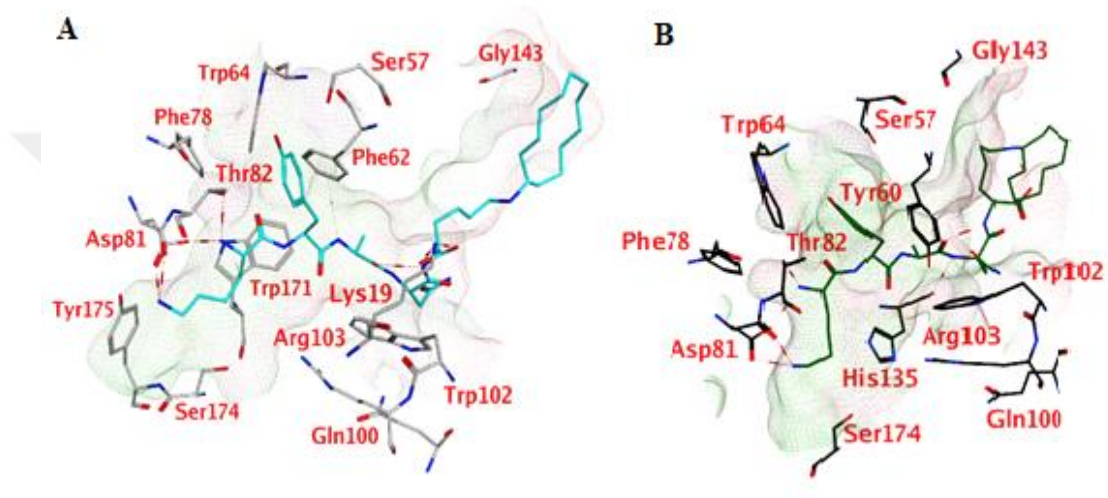
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -12 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -HRAFAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.11 hFR α -KYANK kompleksinin incelenmesi

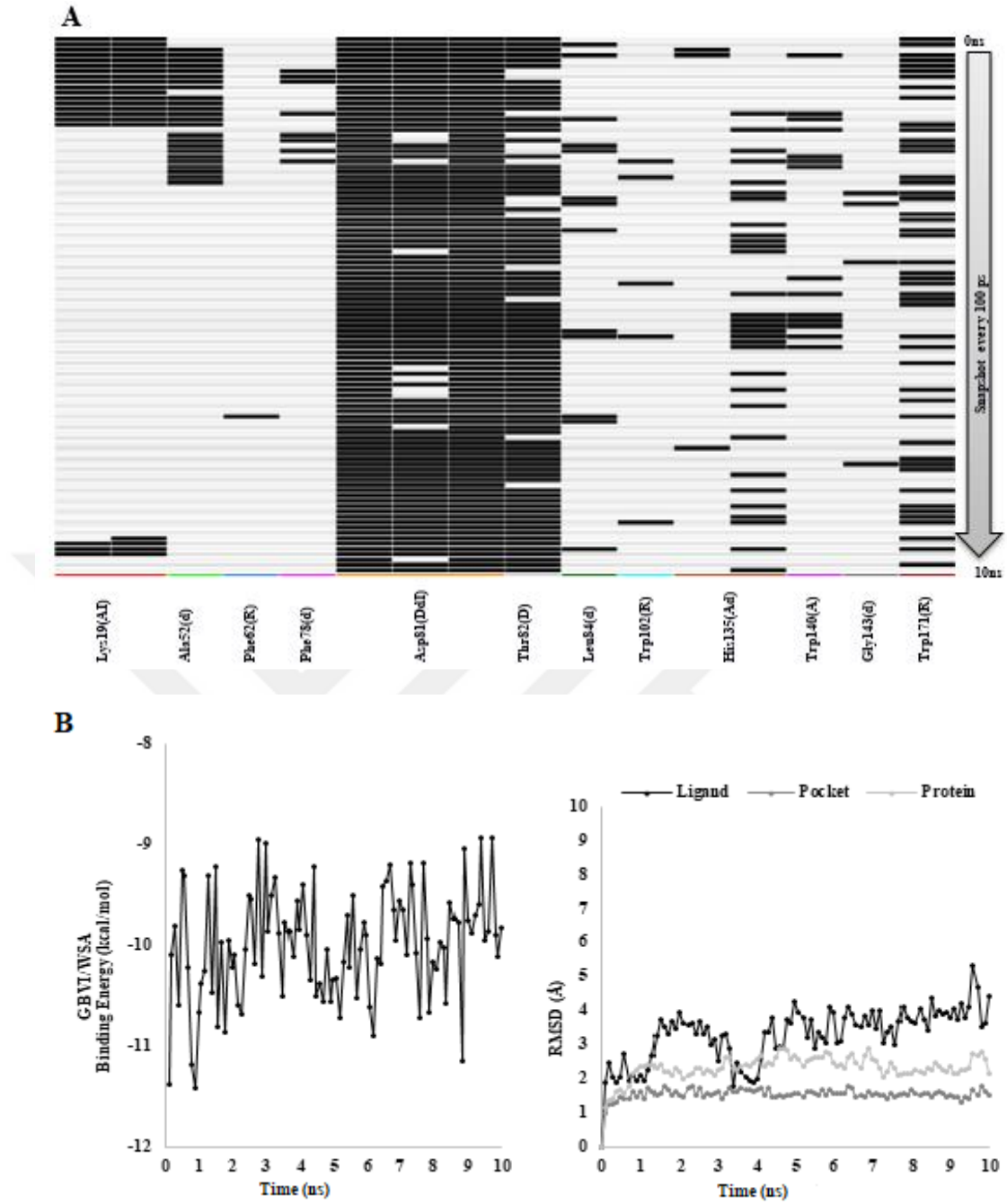
KYANK dizili peptidin N-terminal amin grubu Tyr175 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.21). Lys1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Thr82 ile hidrojen bağı ve Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Ala3(L) amino asidi Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Asn4(L) amino asidi Lys19 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.



Şekil 3.21: Peptit X'un tasarımı esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22). Lys1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Thr82 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Ser174 bağlanma bölgesinin dışarısında kalmaktadır. Tyr2(L) amino asidi Tyr60 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Ala3(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Asn4(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.

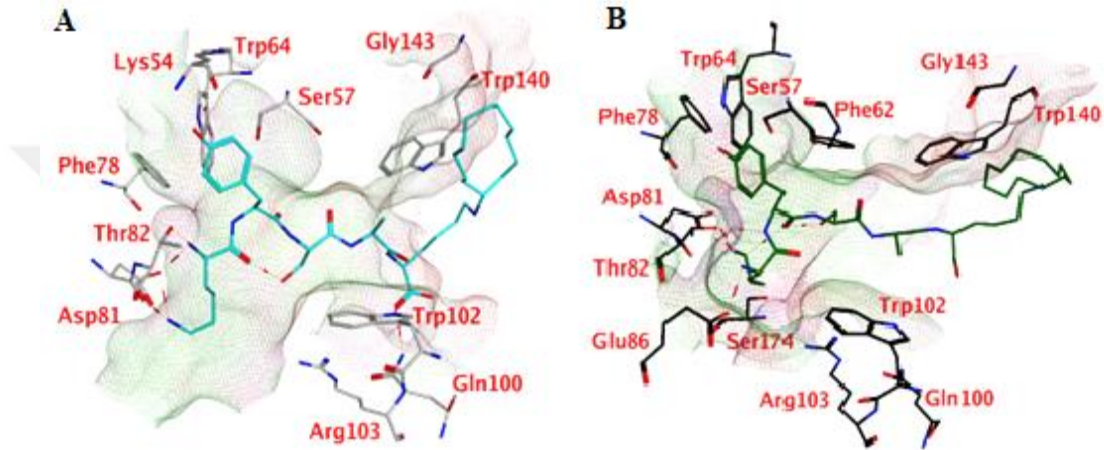
Kompleksin MD simülasyonu boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.22).



Şekil 3.22: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KYANK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.12 hFR α -KYSAK kompleksinin incelenmesi

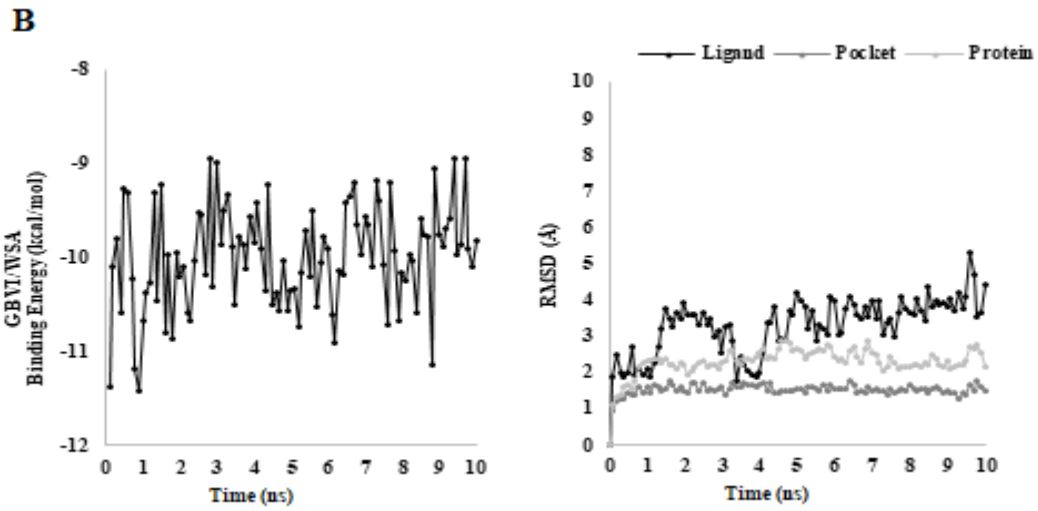
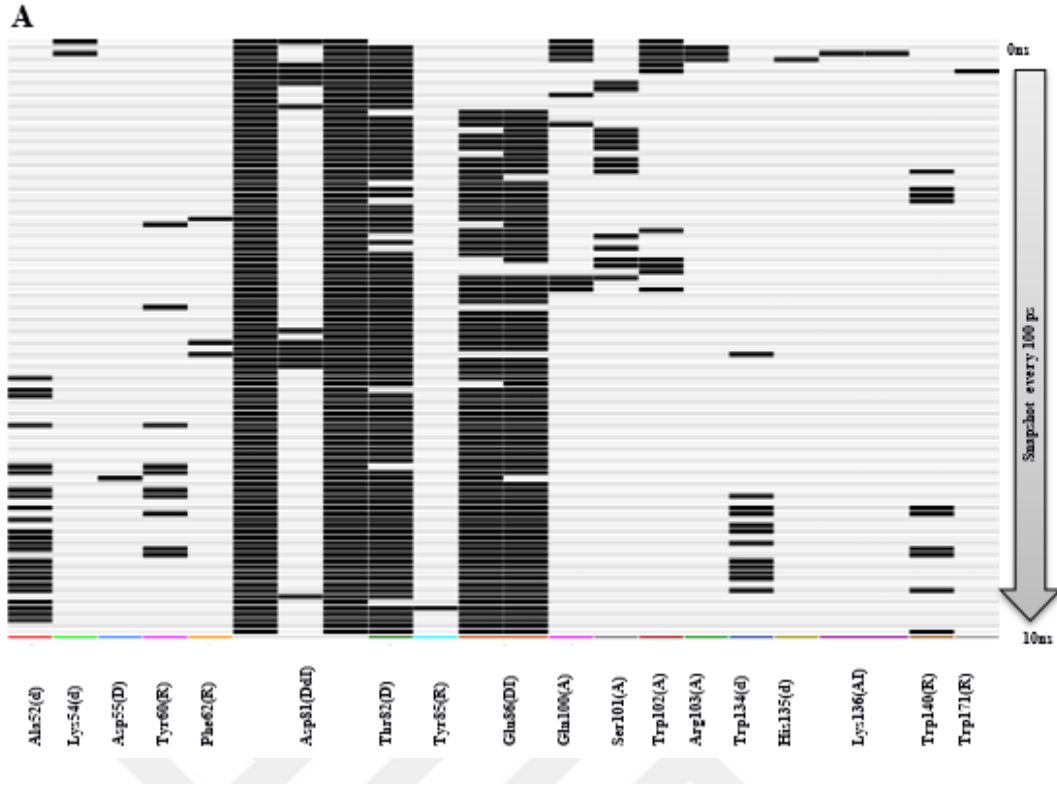
KYSAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.23). Lys1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Asp81 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi EB’de bulunan Lys54 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ser3(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Gln100 ve Trp102 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 3.23: Peptit XI'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.23 ve Şekil 3.24). Lys1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Glu86 ve Thr82 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi Trp64 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Ser3(L) amino asidi Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Lys5(L) son amino asidi Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.

Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.24).

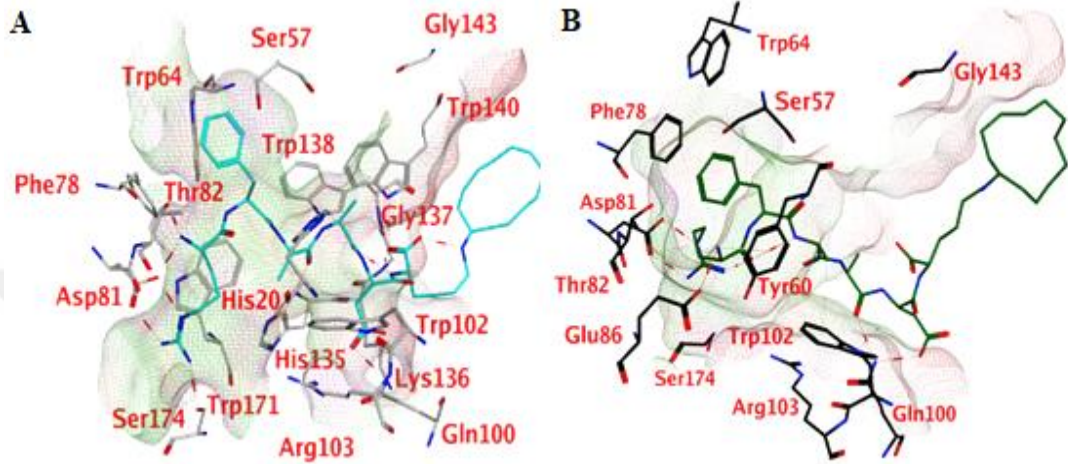


Şekil 3.24: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KYSK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.13 hFR α -RFAADK kompleksinin incelenmesi

RFAADK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.25). Arg1(L) amino asidi yan zinciri proteinin Asp81 ve Ser174 yan zinciri ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile

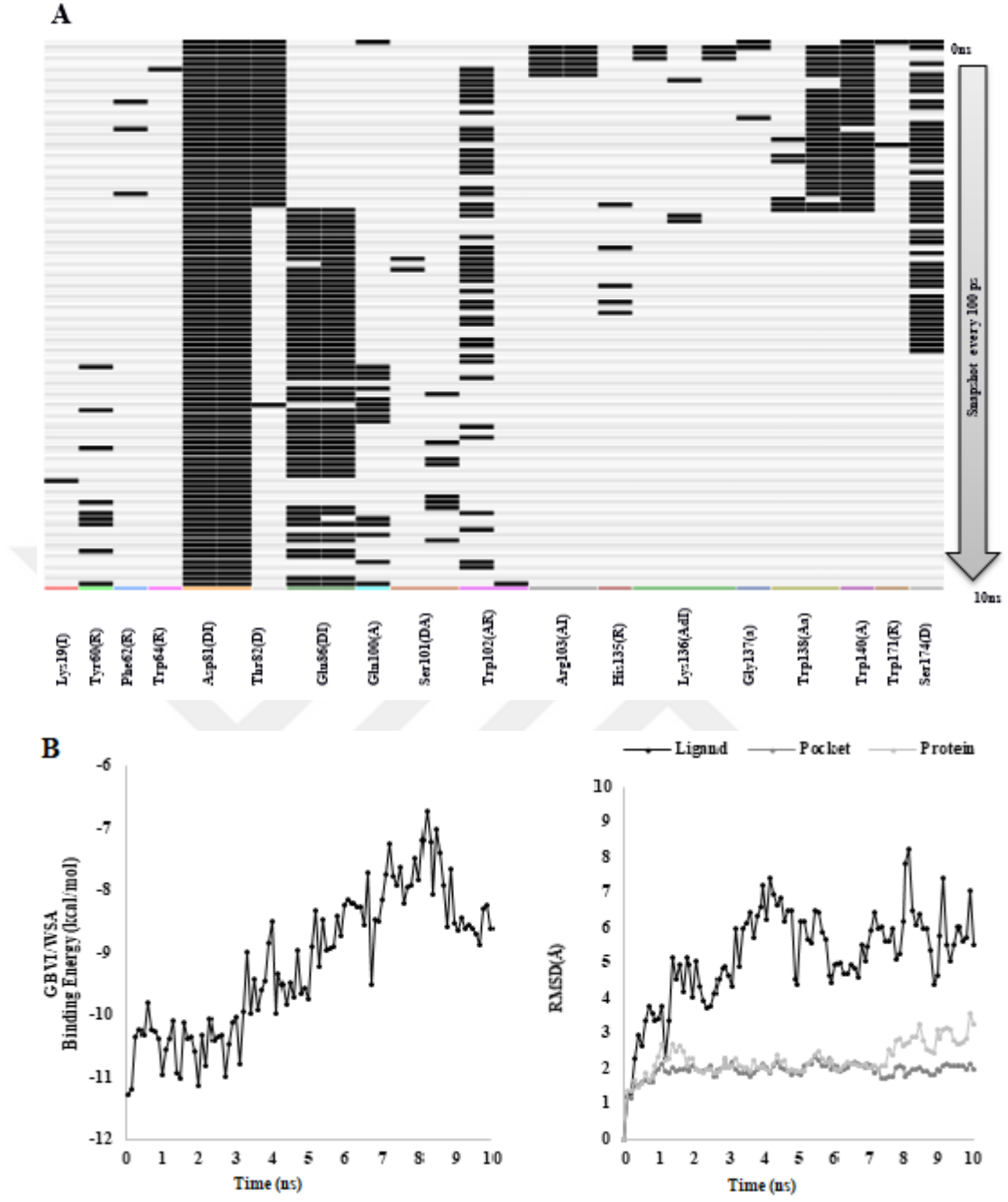
H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi EB'de bulunan Trp64 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Asp5(L) amino asidi ise Trp102, Gln100, Lys136, Gly137, Trp138 ve Trp140 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.



Şekil 3.25: Peptit XII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptid kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.25 ve Şekil 3.26). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Glu86 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Tyr60 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi Phe78 ile hidrofobik etkileşim halindedir. Ala3(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Asp5(L) amino asidi Gln100 ile hidrojen bağı etkileşimi ve Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

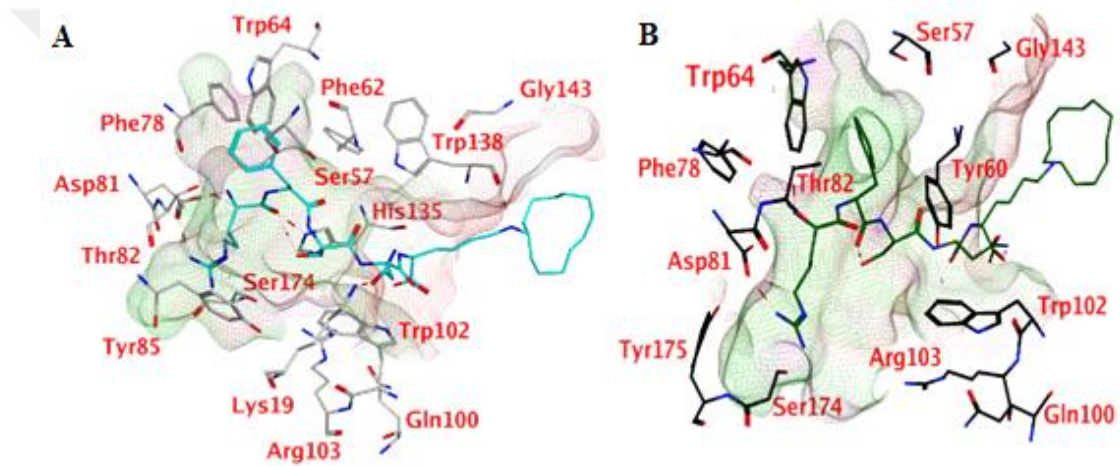
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.26).



Şekil 3.26: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFAADK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.14 hFR α -RFSNK kompleksinin incelenmesi

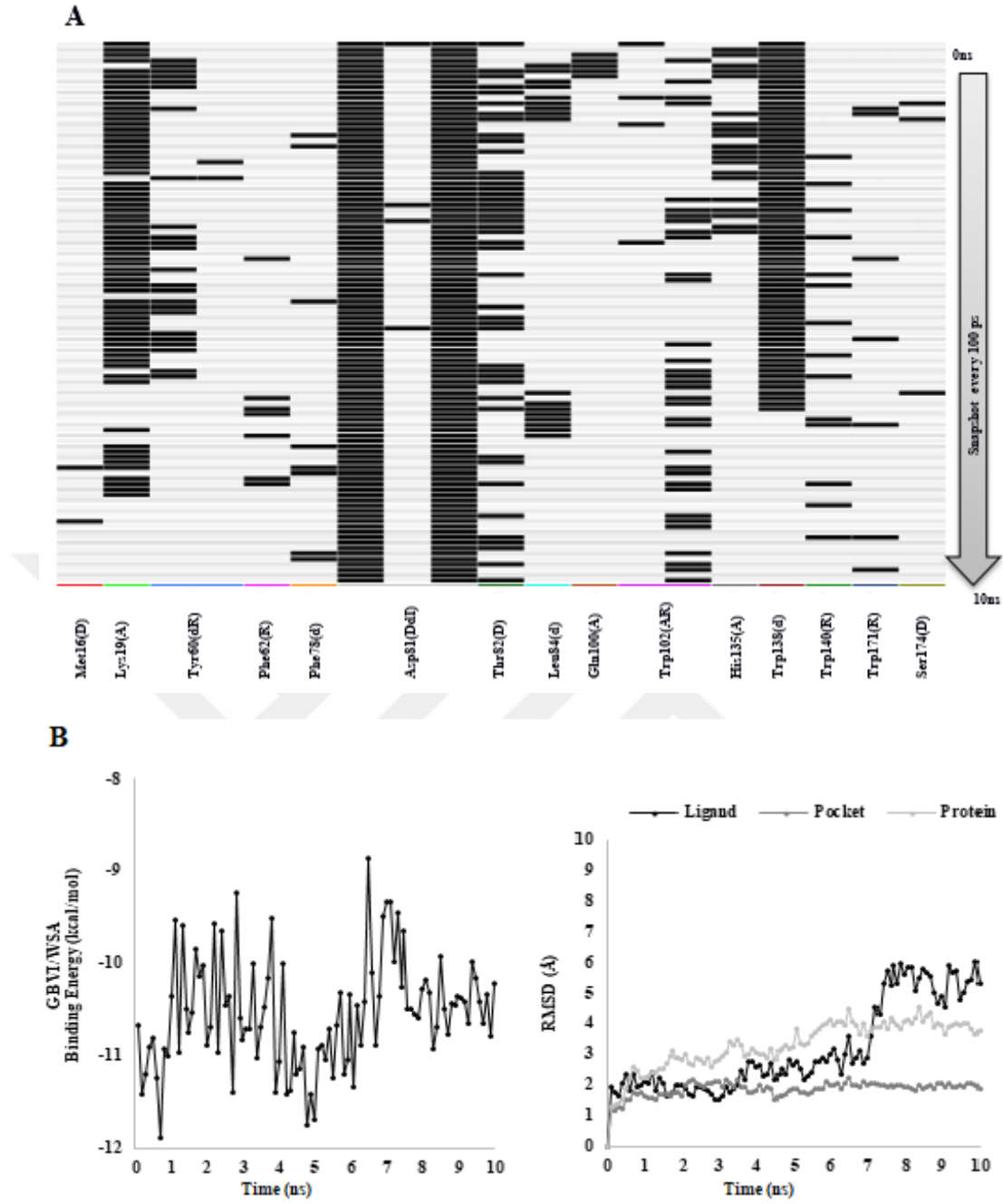
RFSNK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.27). Arg1(L) amino asidi yan zincirinin proteinin Asp81 ve His135 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Tyr85 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi EB'de bulunan Trp64 ile hidrofobik etkileşim ve Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ser3(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşiminde bulunmamaktadır. Asn4(L) amino asidi Lys19 ile hidrojen bağı etkileşimi ve Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi halindedir. Lys5(L) son amino asidi ise Trp138 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 3.27: Peptit XIII'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.27 ve Şekil 3.28). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Thr82 ile oluşan hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim devam etmektedir. Phe2(L) amino asidi Trp64 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Ser3(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Asn4(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşiminde bulunmamaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinin dışına doğru bakmaktadır.

Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -10 kcal/mol değerinden -11 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -10 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 3.28).

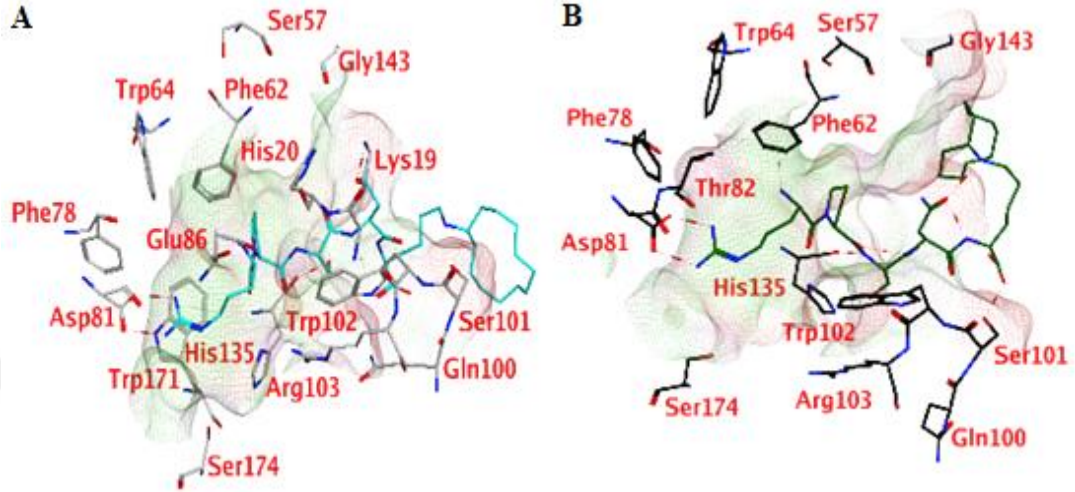


Şekil 3.28: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFSNK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.15 hFR α -RPSNK kompleksinin incelenmesi

RPSNK dizili peptidin N-terminal amin grubu Trp171 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.29). Arg1(L) amino asidi yan zincirinin proteinin Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Pro2(L) amino asidi EB'de bulunan Phe62 ile

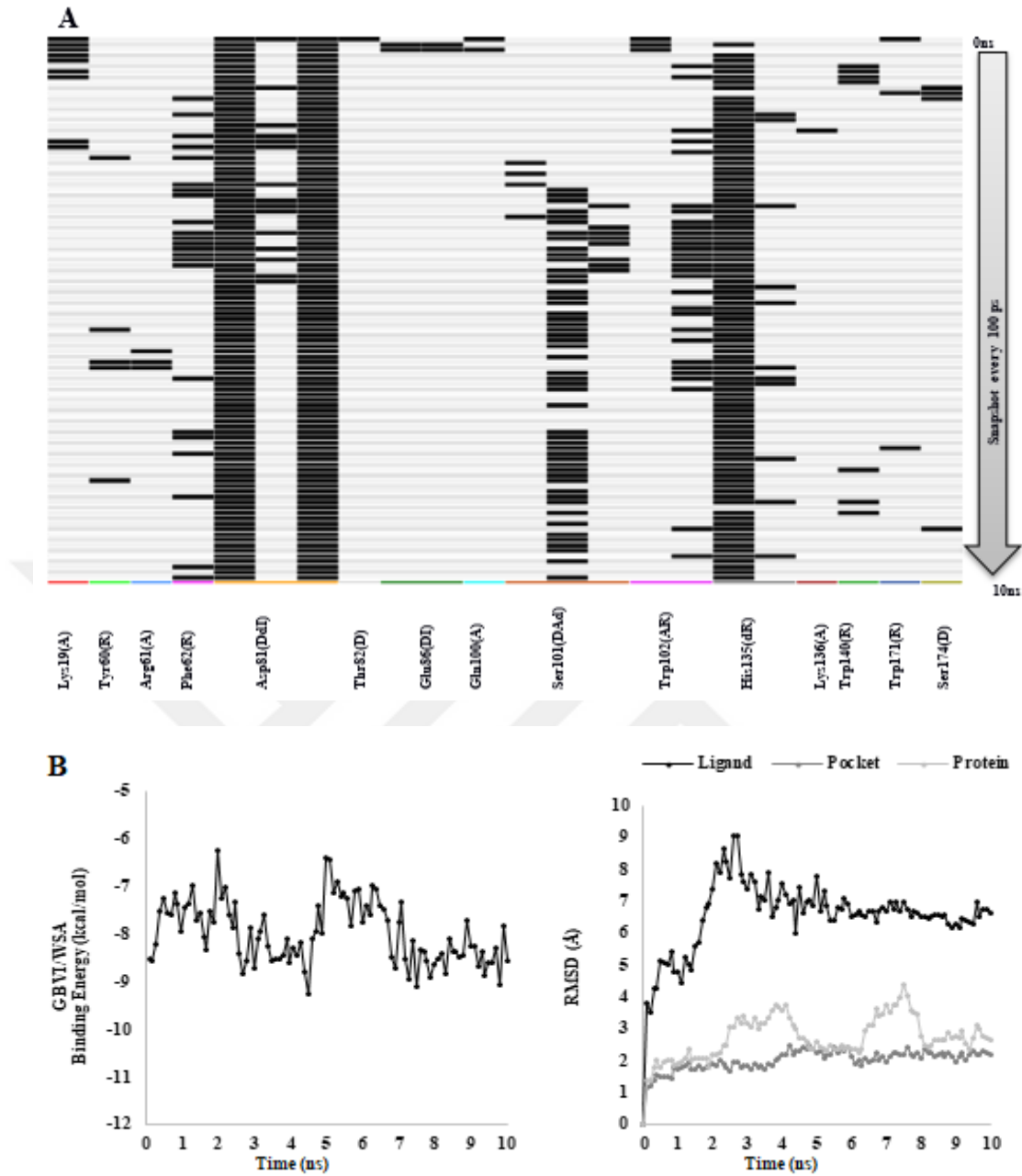
hidrofobik etkileşime sahiptir. Ser3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Asn4(L) amino asidi Lys19 ve Trp102 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Lys5(L) son amino asidi ise Ser101 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 3.29: Peptit XIV'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.29 ve 3.30). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim devam etmektedir. Ayrıca, Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Pro2(L) amino asidi Phe62 ile hidrofobik etkileşime sahiptir. Ser3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Asn4(L) amino asidi Ser101 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinin dışına doğru bakmaktadır.

Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -9 kcal/mol değerinden -7 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -8 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 3.30).

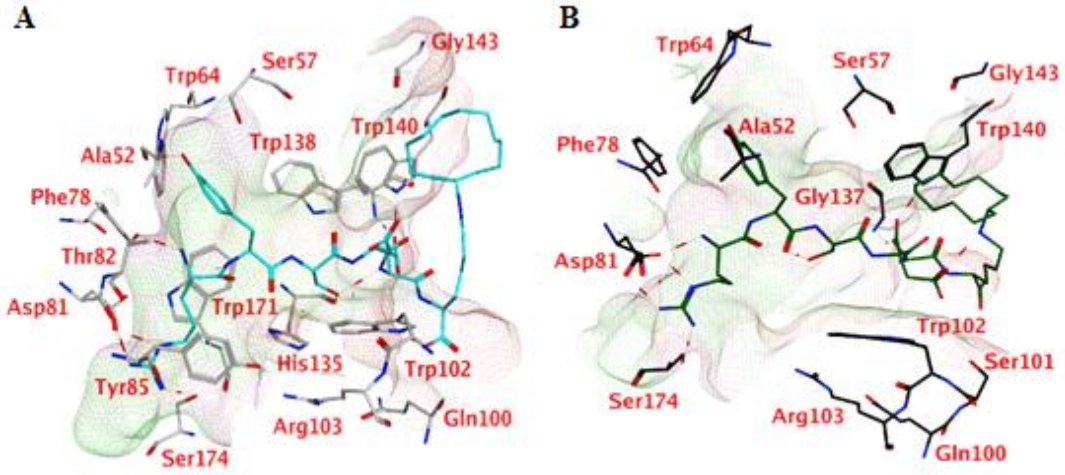


Şekil 3.30: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RPSNK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.16 hFR α -RYSDDK kompleksinin incelenmesi

RYSDDK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.31). Arg1(L) amino asidi yan zincirinin proteinin Asp81 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ve Tyr85 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi EB'de bulunan

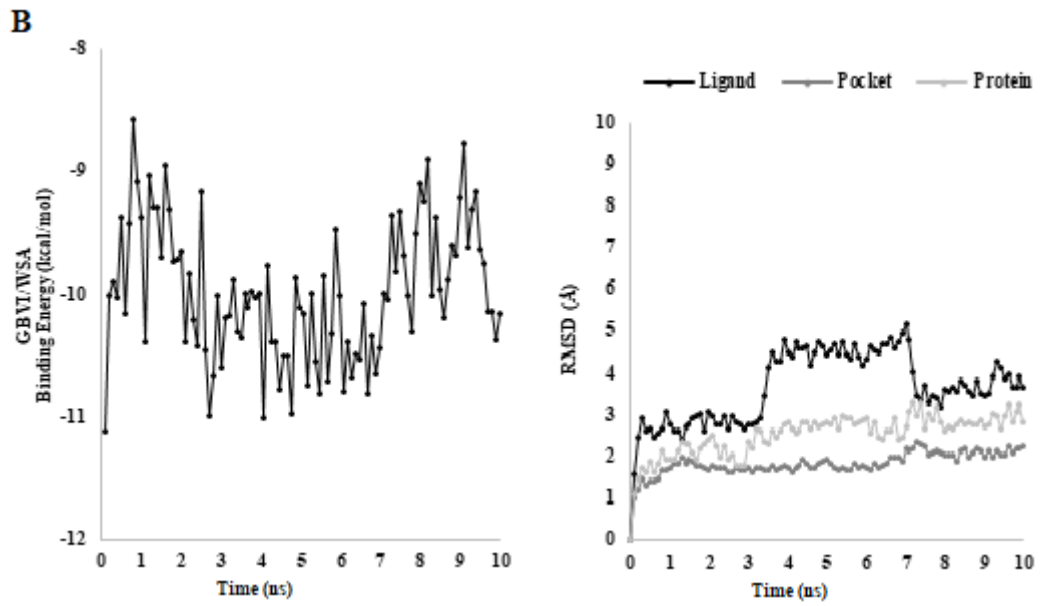
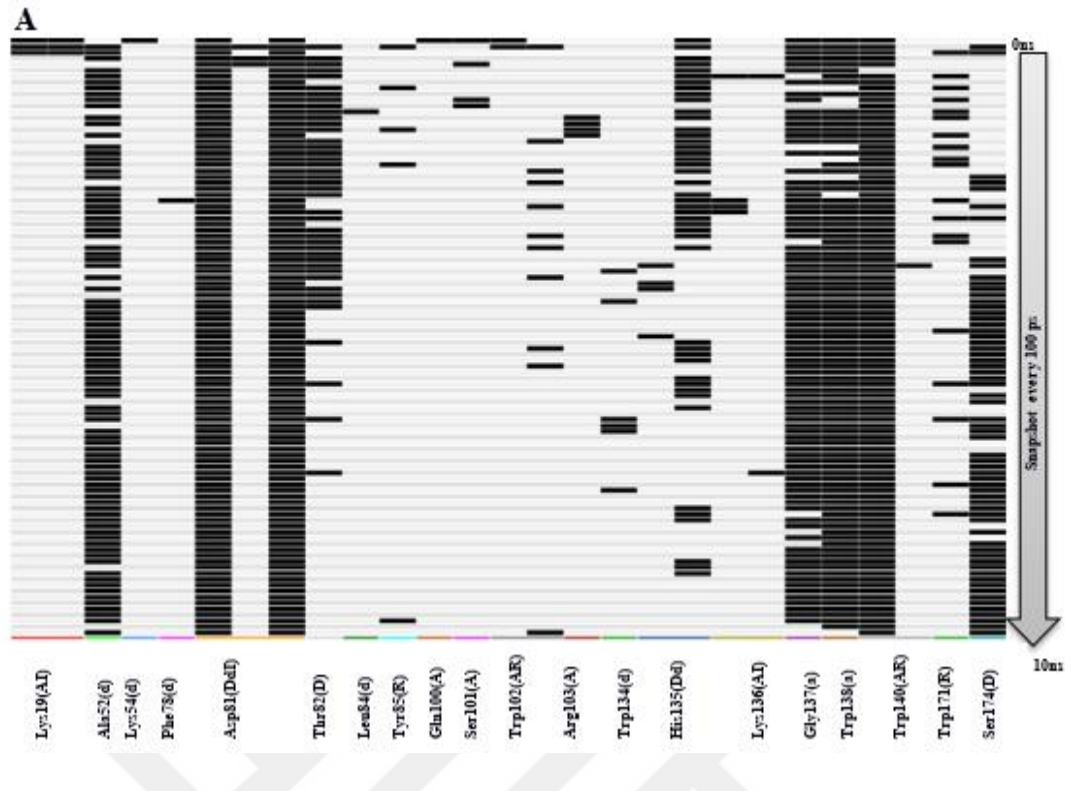
Ala52 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ser3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp102 ve His135 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp4(L) amino asidi Trp140 ve Trp138 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Asp5(L) amino asidi ise Trp102 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışına doğru bakmaktadır.



Şekil 3.31: Peptit XV'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.31 ve Şekil 3.32). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi Ala52 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ser3(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Asp4(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp5(L) amino asidi Trp140 ve Gly137 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -10 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -10 kcal/mol değerine dönmektedir (Şekil 3.32).

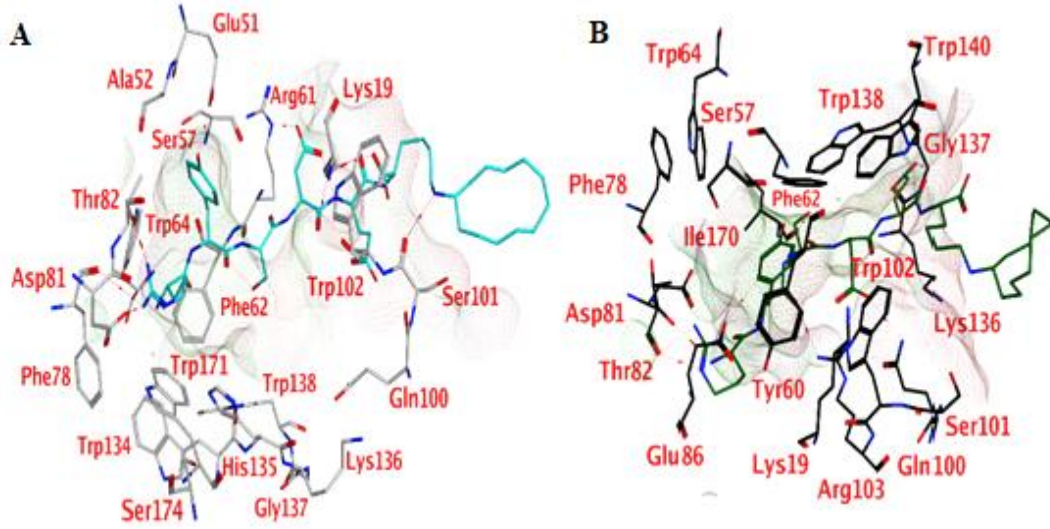


Şekil 3.32: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RYSDDK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

3.1.17 hFR α -RYSDEK kompleksinin incelenmesi

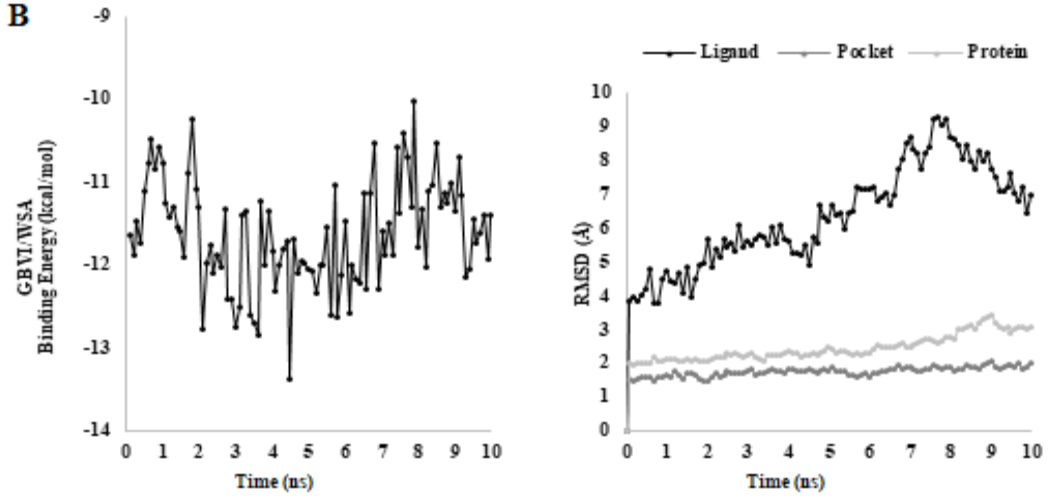
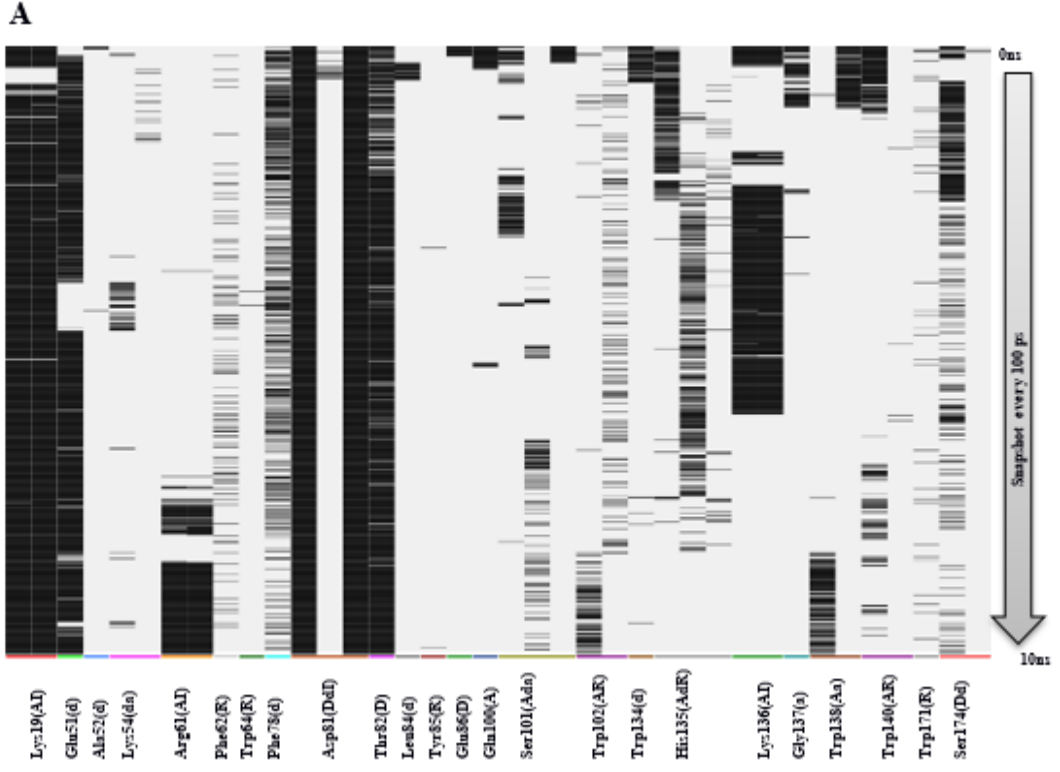
RYSDEK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 3.33). Arg1(L) amino asidi yan zincirinin proteinin Thr82 ve Phe78

ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ve Trp64 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi EB'de bulunan Glu51 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ser3(L) amino asidi Phe62 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp4(L) amino asidi Arg61 ve Lys19 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Glu5(L) amino asidi ise Lys19 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi Ser101 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 3.33: Peptit XVI'nın tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 3.33 ve Şekil 3.34). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Glu86 ve Thr82 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi Glu86 ile hidrojen bağı etkileşimi ve Tyr60 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Ser3(L) amino asidi Ile170 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp4(L) amino asidi Gln100 hidrojen bağı ve Trp138 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Glu5(L) amino asidi Gly137 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -11 kcal/mol değerinden -12 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -11 kcal/mol değerine çıkmaktadır.



Şekil 3.34: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RYSDEK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4. İKİNCİ NESİL OLASI hFR α LİGANDLARIN İNCELENMESİ

İlk aşamada tasarlanan ligandların yapılarını MD simülasyonlarıyla stabilitelelerini incelediğimizde bunlar arasında stabil kalan pozların olduğu ve bazılarının ise stabil olarak kalma durumlarının zamanla değiştiği gözlemlenmiştir. Bizim bu ön araştırmadan beklentimiz ise MD simülasyon boyunca bu stabil kalma durumlarının çok önemli değişikliğe uğramamasıdır. Onun için elimizdeki ligand adaylarının sayısını ne kadar nitelikli olarak arttırabilirsek ileride de bunlar arasından gelecekte kullanılmak amacıyla umut vadeden yapıları seçmemiz daha kolay olacaktır. Tablo 4.1’de tasarlanan birinci gruptaki peptitlerin incelenmesi sonrası geliştirilen ikinci nesil peptitler bulunmaktadır.

Tablo 4.1: Bu proje esnasında önerilen yeni nesil peptitler.

Peptid No	Sekans	Peptid No	Sekans
XVII	KHEFK	XXIII	RWEFK
XVIII	KRDAK	XXIV	RWHAK
XIX	KSANK	XXV	RWHDDK
XX	RFAFAK	XXVI	RWYAK
XXI	RWAAK	XXVII	RYSSK
XXII	RWEAK	XXVIII	RYDAK

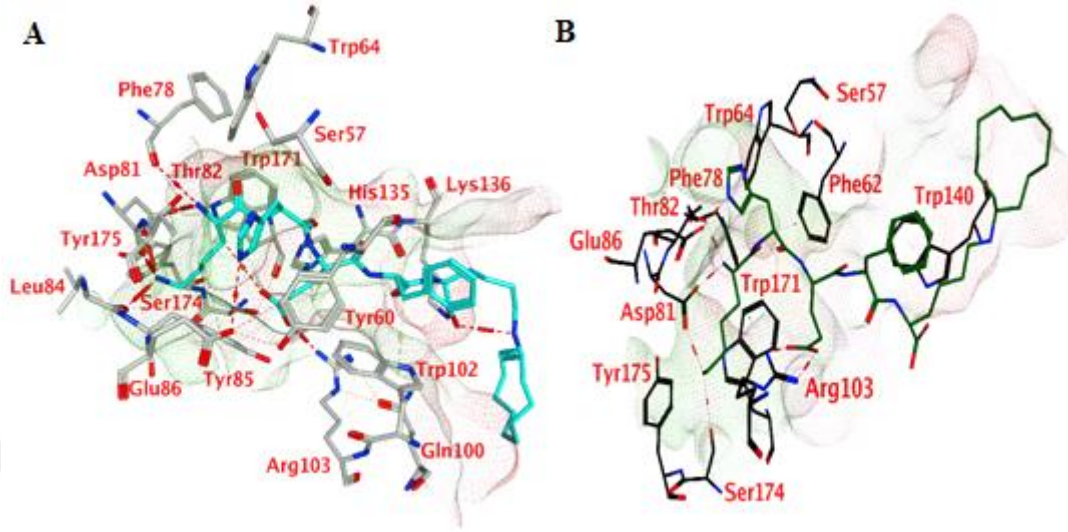
4.1 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları

Ön çalışmalarımızdan sonra tasarlanan ve sentezlenen 16 adet peptitin (Tablo 2.1 ve Ek A) rasyonel tasarımları incelendikten sonra geliştirilen II. nesil 12 adet peptitlerin hFR α ile olası stabiliteleleri ve ligand-protein etkileşimleri 10 ns’lik MD simülasyonlarıyla (Tablo 4.1 ve Ek A) incelenmiştir.

4.1.1 hFR α -KHEFK kompleksinin incelenmesi

KHEFK dizili peptitin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.1). Lys1(L) amino asidi Leu84 ve Thr82 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ve Tyr85 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. His2(L) amino asidi EB’de bulunan Glu86 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Tyr60 ile H-aren bağı etkileşimine sahiptir. Glu3(L) amino asidi Arg103 ve His135 ile

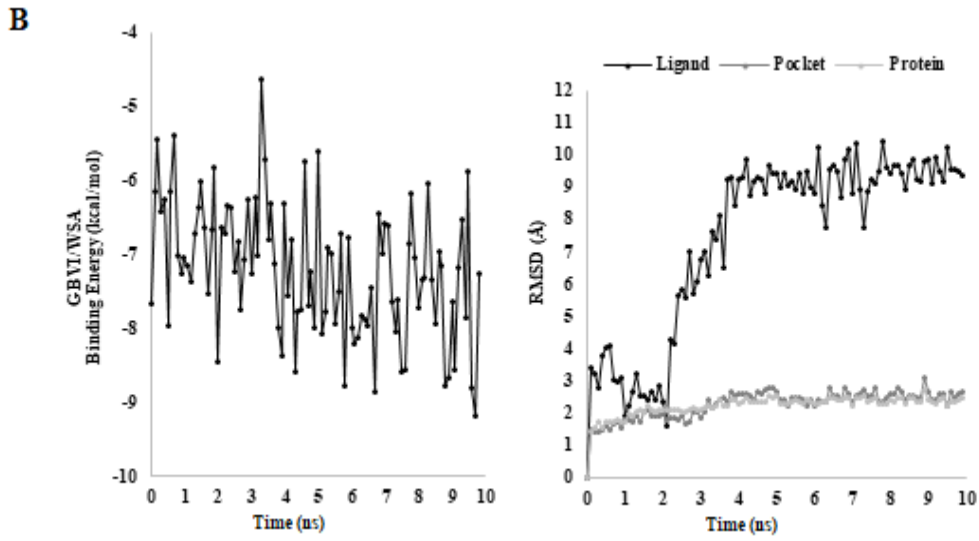
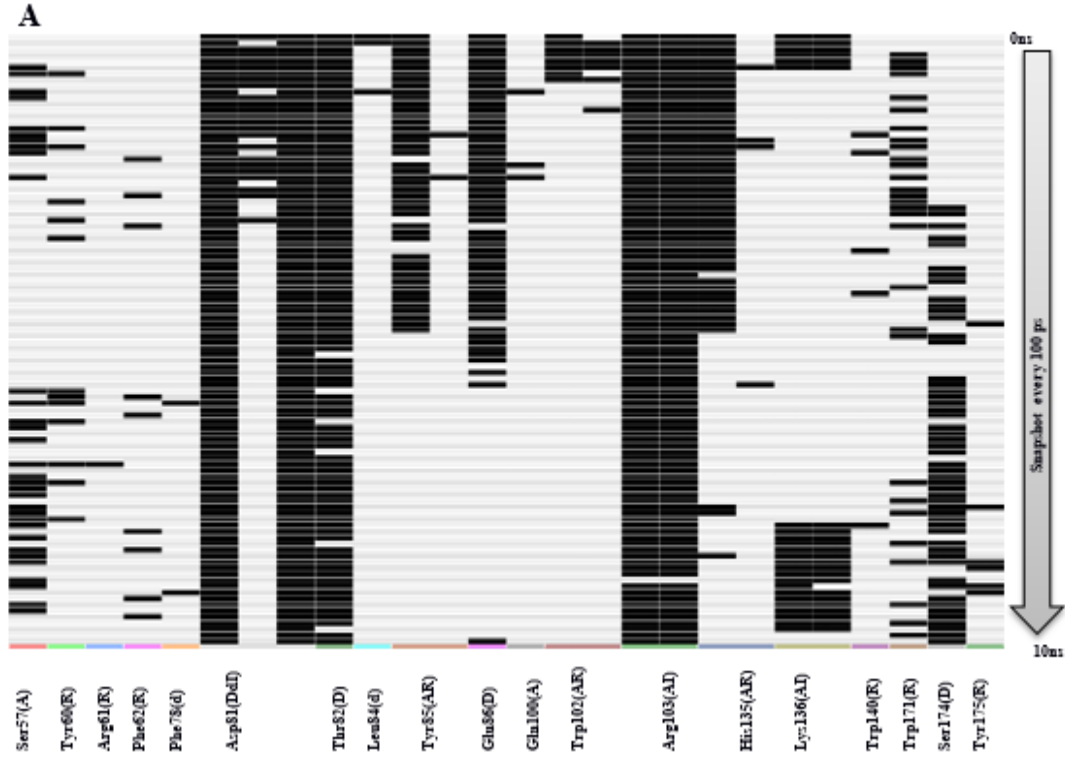
hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe4(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı ve Lys136 hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.



Şekil 4.1: Peptit XVII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Lys1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82, Ser174 ve Tyr175 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. His2(L) amino asidi Glu86 ile hidrojen bağı etkileşimi ve Phe62 ile H-aren bağı etkileşimine sahiptir. Glu3(L) amino asidi Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi ve Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe4(L) amino asidi Trp140 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -8 kcal/mol değerinden -6 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -7 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 4.2).

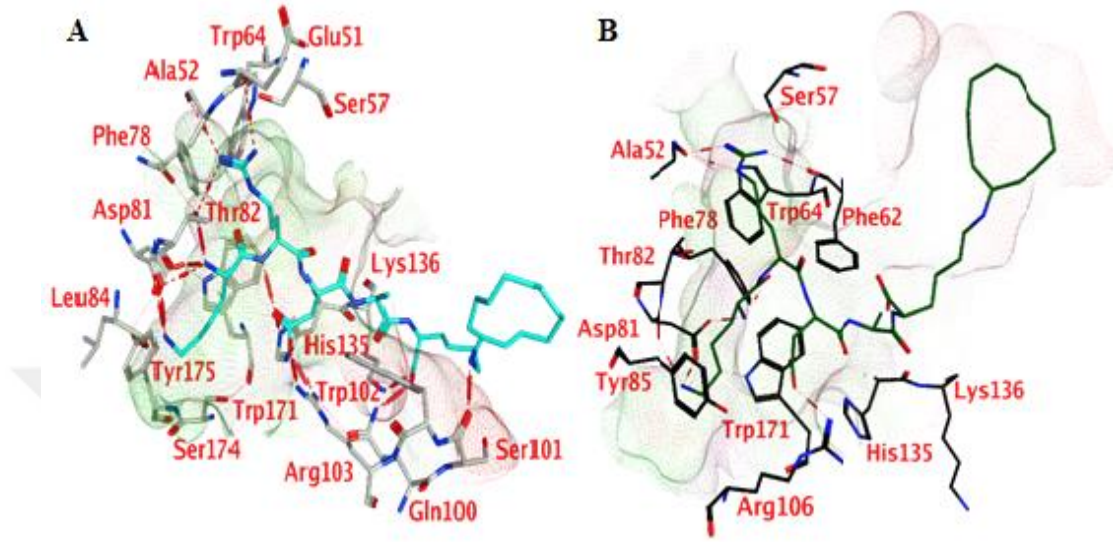


Şekil 4.2: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KHEFK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.2 hFR α -KRDAK kompleksinin incelenmesi

KRDAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.3). Lys1(L) amino asidi Asp81 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Arg2(L) amino asidi EB'de

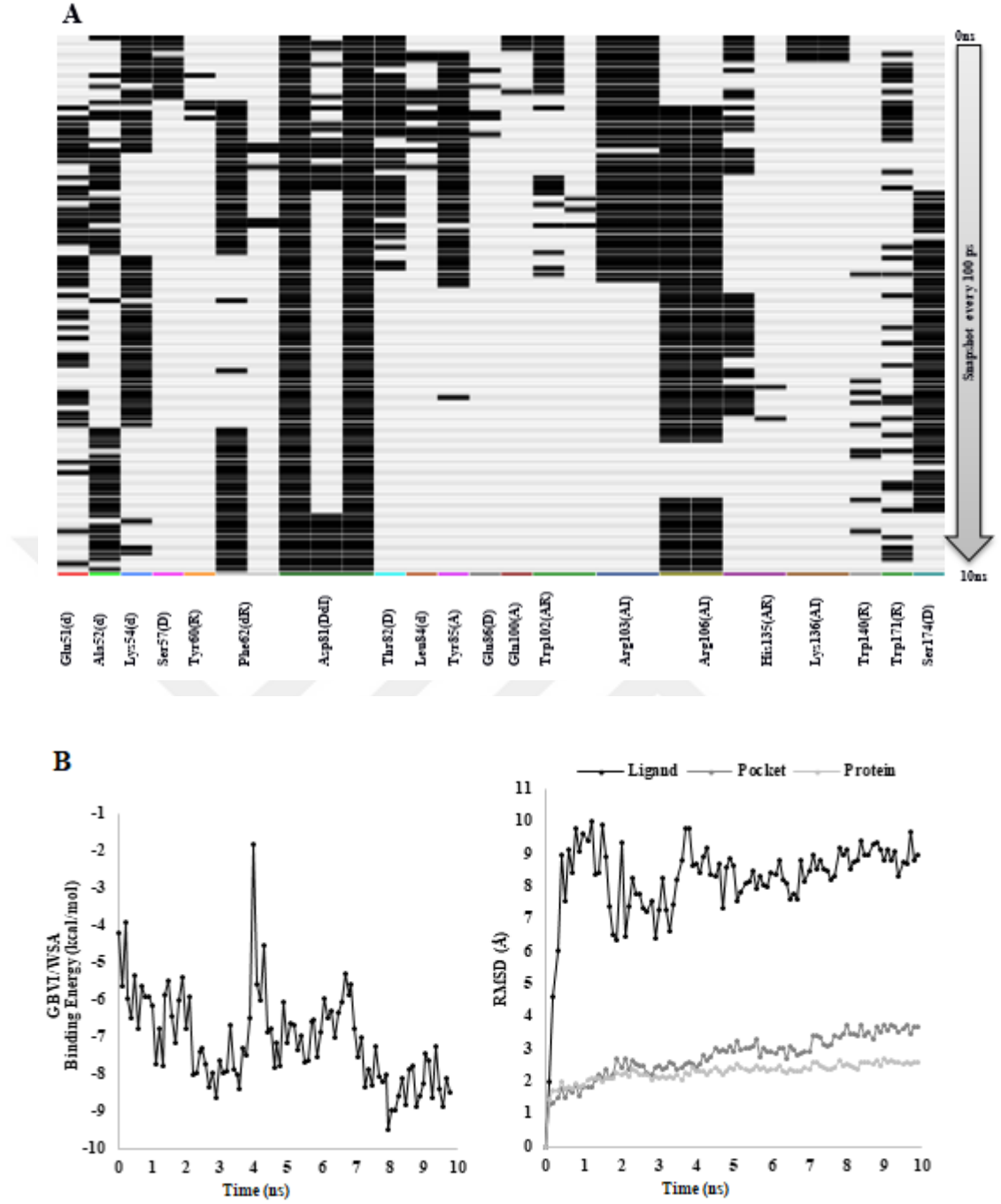
bulunan Glu51, Ala52 ve Thr82 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp3(L) amino asidi Arg103 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Gln100, Trp102 ve Lys136 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi Ser101 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 4.3: Peptit XVIII'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Lys1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Tyr85 ve Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Arg2(L) amino asidi Ala52 ve Phe62 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp3(L) amino asidi Arg106 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi His135 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -4 kcal/mol değerinden -6 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 4.4).

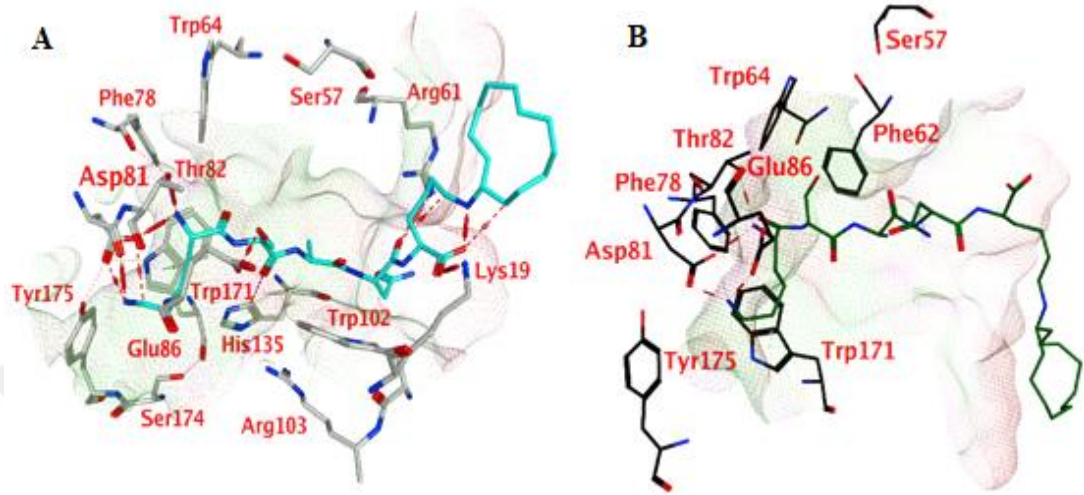


Şekil 4.4: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KRDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.3 hFR α -KSANK kompleksinin incelenmesi

KSANK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.5). Lys1(L) amino asidi Asp81 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Ser2(L) amino asidi EB'de

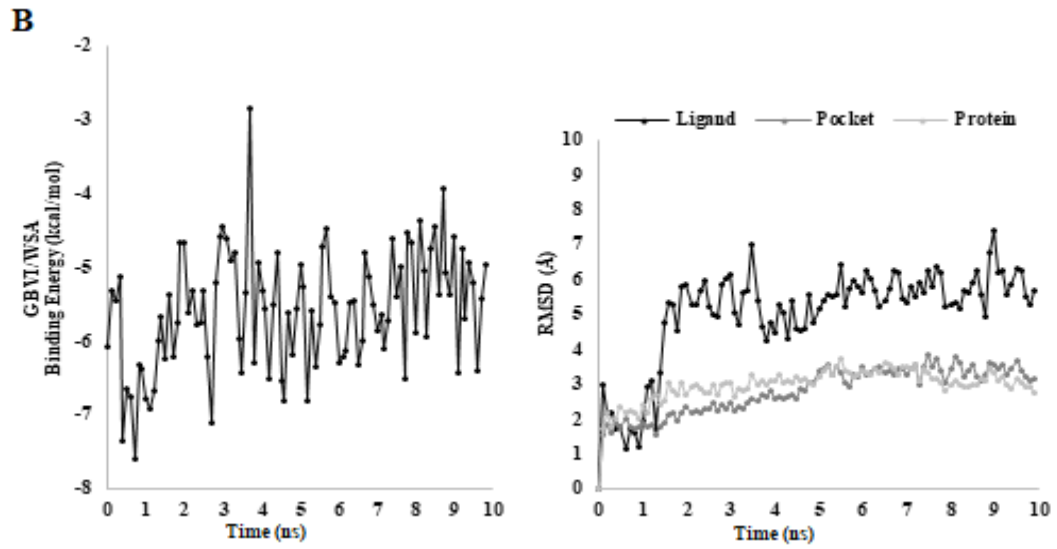
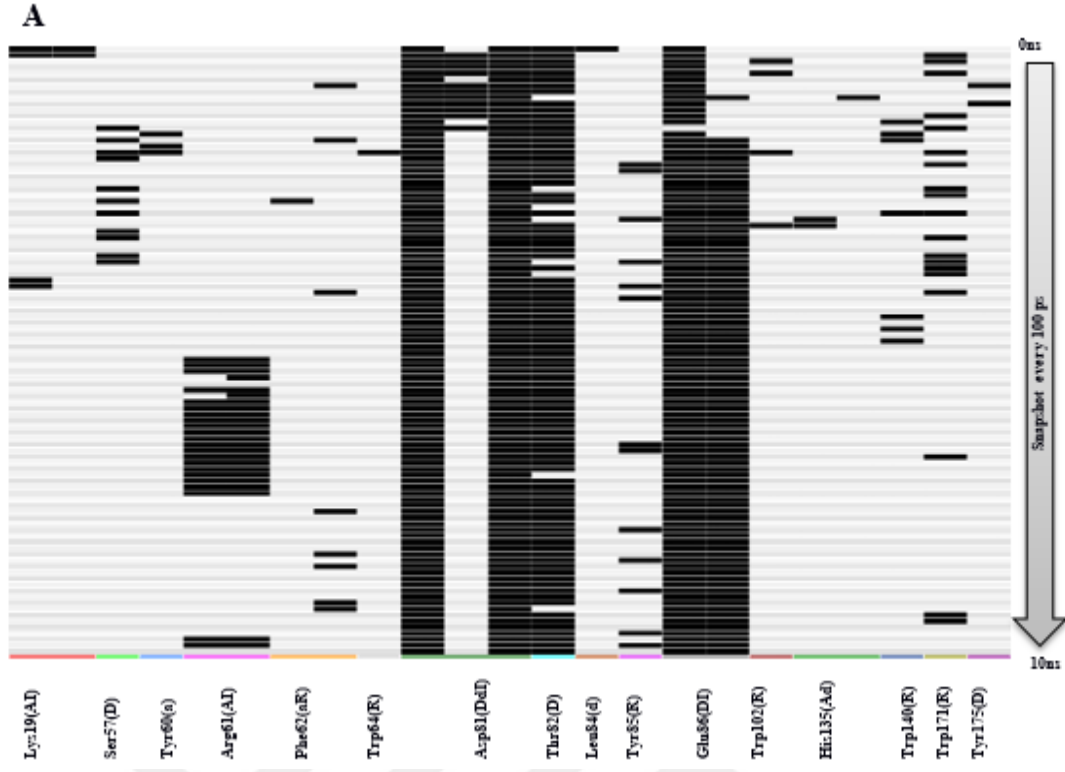
bulunan Glu86 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Asn4(L) amino asidi Lys19 ve Arg61 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.



Şekil 4.5: Peptit XIX'un tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Lys1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Glu86 ve Thr82 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ser2(L) amino asidi Phe62 ile H-aren bağı etkileşimine sahiptir. Ala3(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Asn4(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

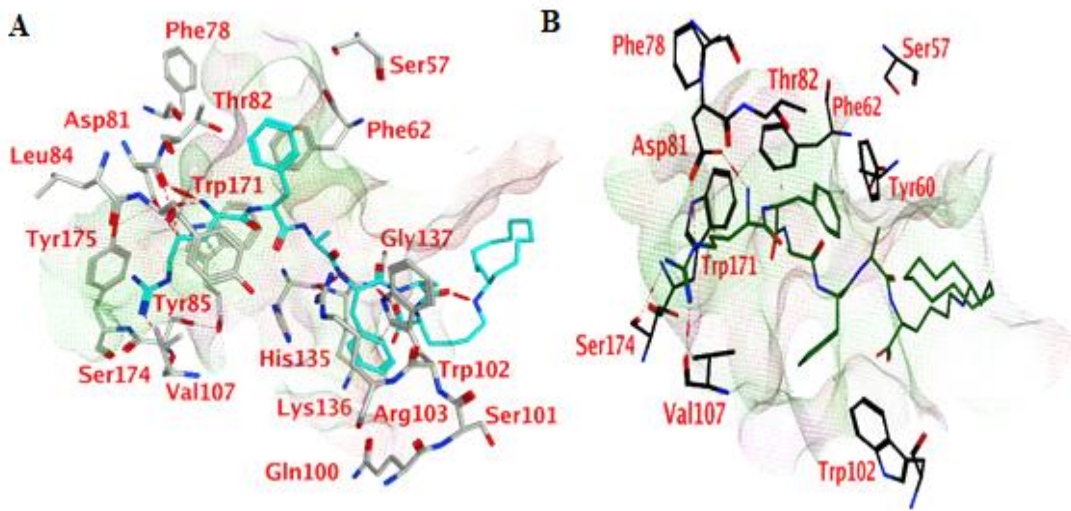
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -6 kcal/mol değerinden -5 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -5 kcal/mol değerine dönmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -KSANK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.4 hFR α -RFAFAK kompleksinin incelenmesi

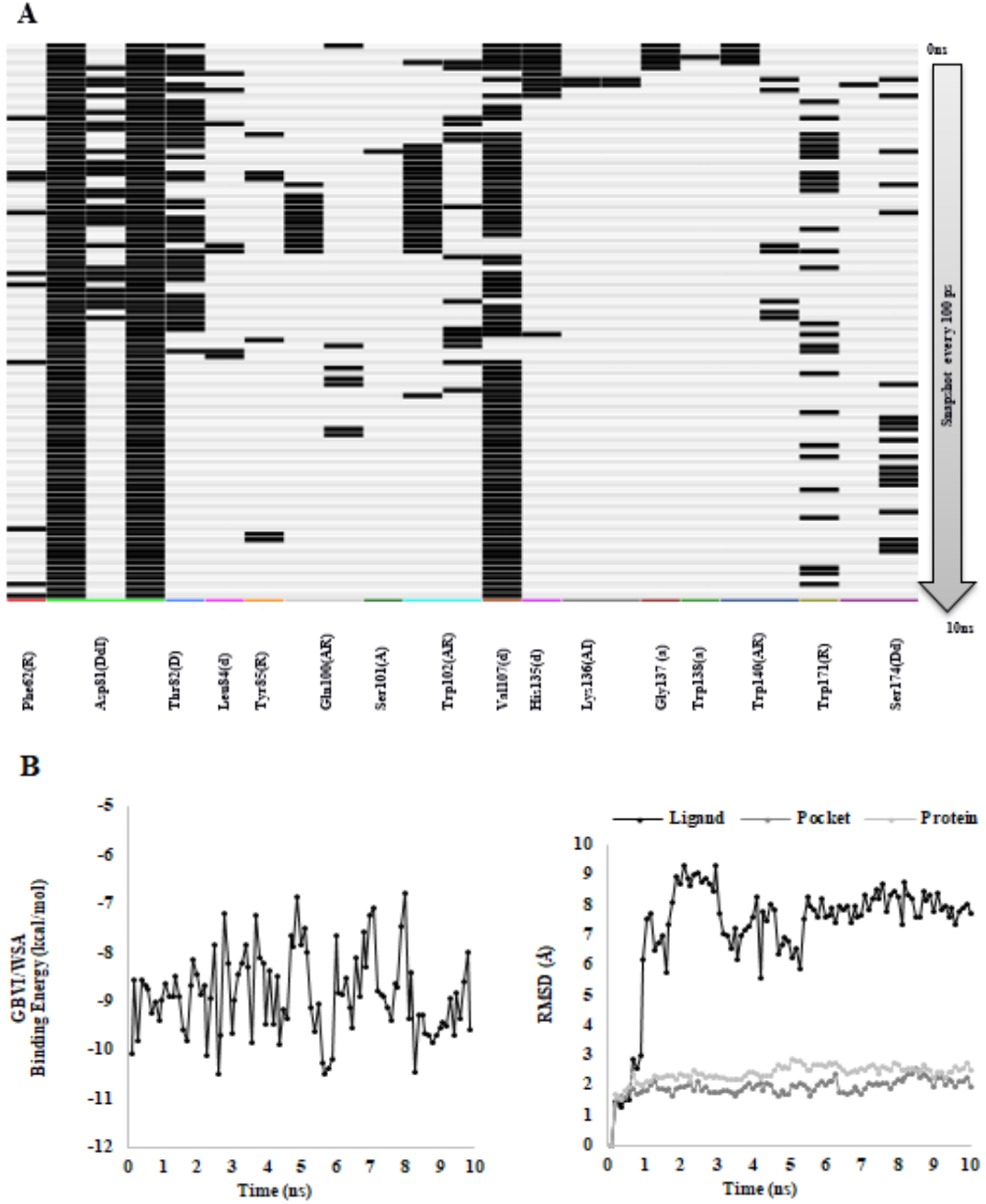
RFAFAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Tyr175 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.7). Arg1(L) amino asidi Thr82 ve Val107 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Tyr85 ve Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Phe2(L) amino asidi EB'de bulunan Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe4(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala5(L) amino asidi Gly137 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.



Şekil 4.7: Peptit XX'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Val107 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe2(L) amino asidi Tyr60 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe4(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala5(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Lys6(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

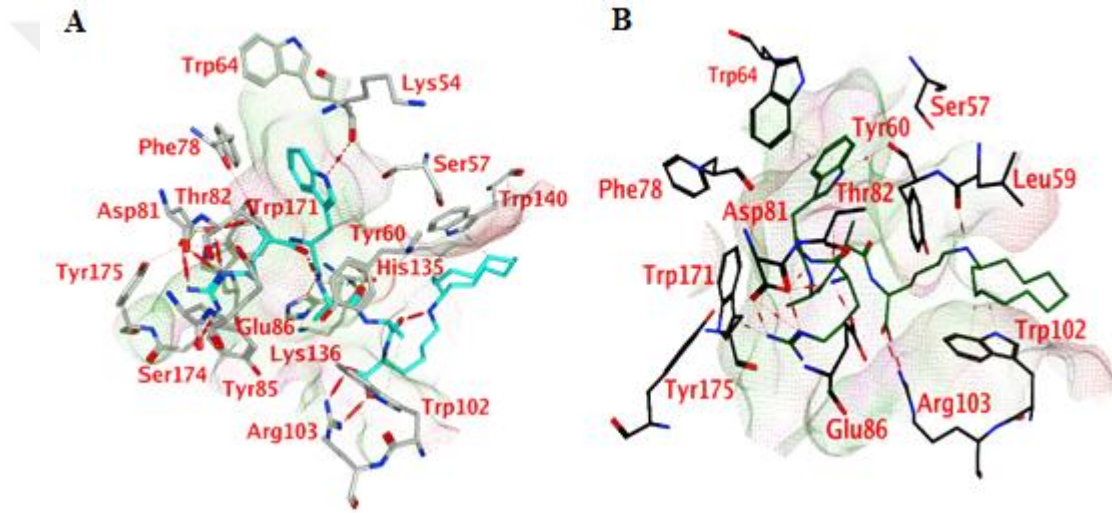
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -10 kcal/mol değerinden -8 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -10 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RFAFAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.5 hFR α -RWAAK kompleksinin incelenmesi

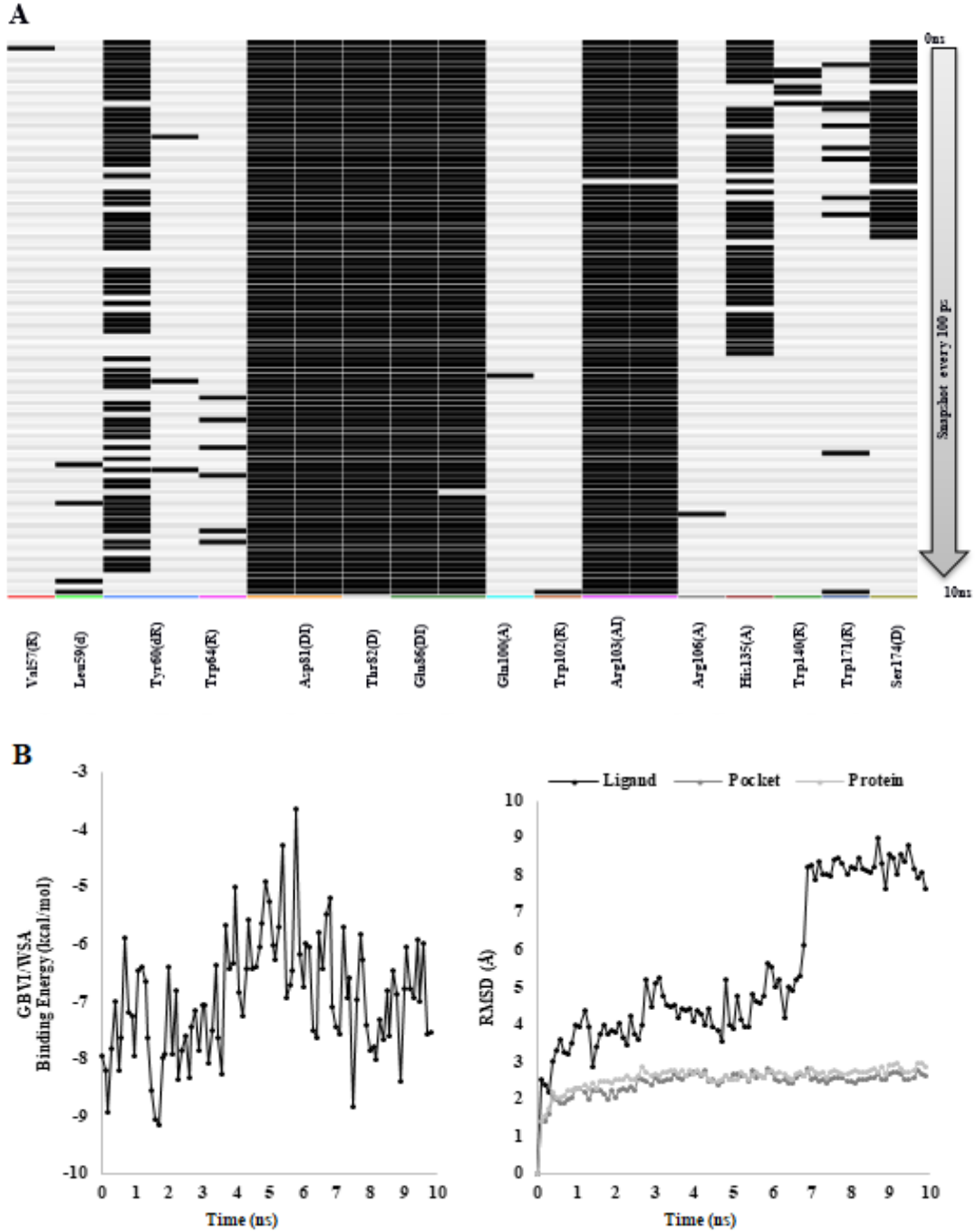
RWAAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.9). Arg1(L) amino asidi Asp81, Glu86 ve Ser174 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi EB’de bulunan Lys54 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi Tyr60 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp102 ve Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır. Dota Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 4.9: Peptit XXI'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82 ve Glu86 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile de H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi Tyr64 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala3(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Ala4(L) amino asidi Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi Leu59 ile hidrojen bağı etkileşimi ve Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.

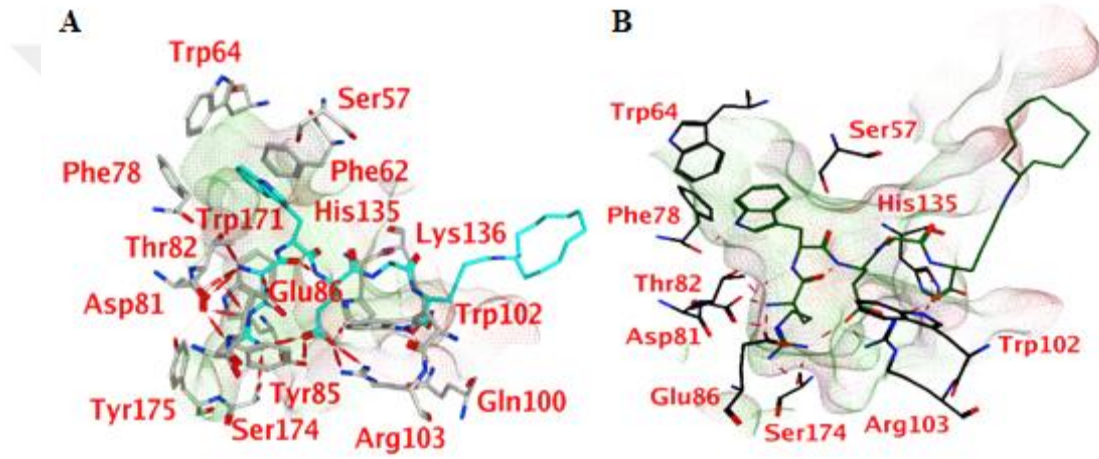
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -8 kcal/mol değerinden -9 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -8 kcal/mol değerine dönmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWAAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.6 hFR α -RWEAK kompleksinin incelenmesi

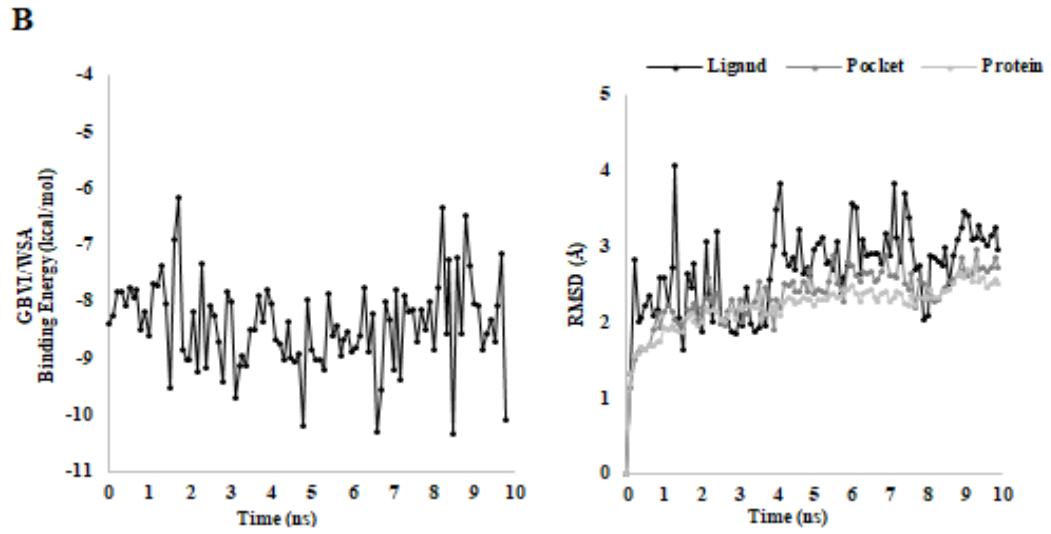
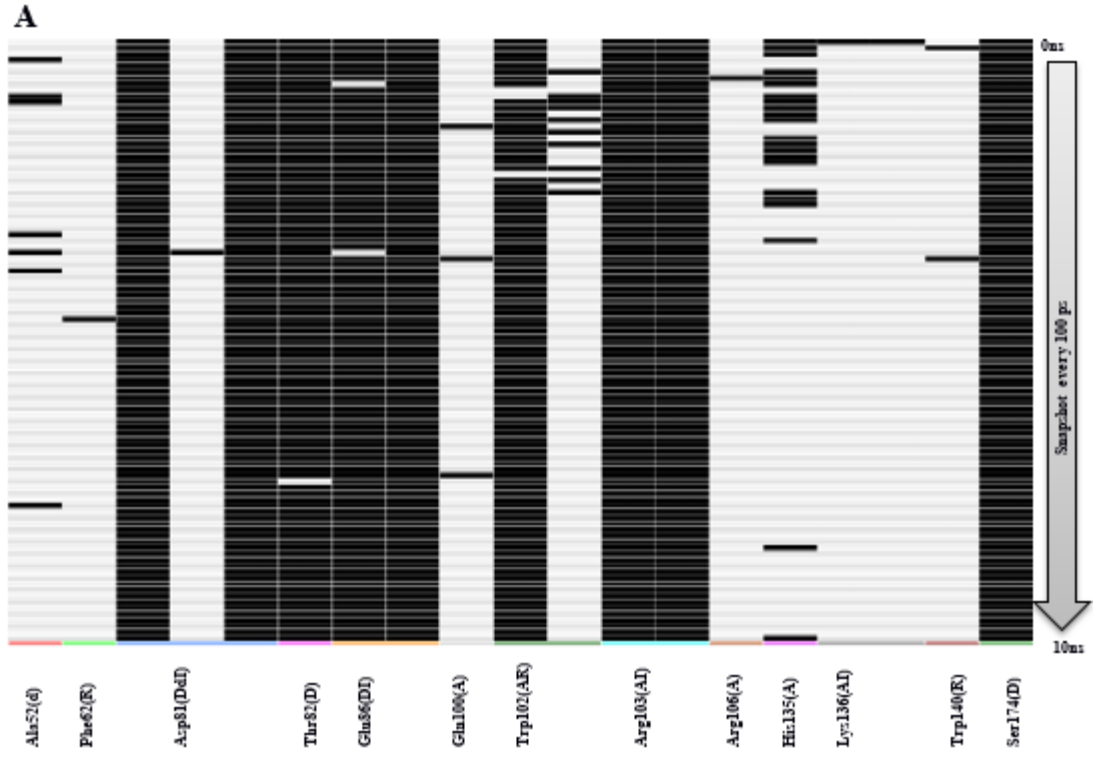
RWEAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.11). Arg1(L) amino asidi Asp81, Glu86 ve Ser174 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi EB'de bulunan Phe62 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Glu3(L) amino asidi Tyr85, Arg103 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Ala4(L) amino asidi Gln100, Trp102 ve Lys136 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.



Şekil 4.11: Peptit XXII'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82, Glu86 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi Trp64 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Phe78 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Glu3(L) amino asidi Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Trp102, Arg103 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

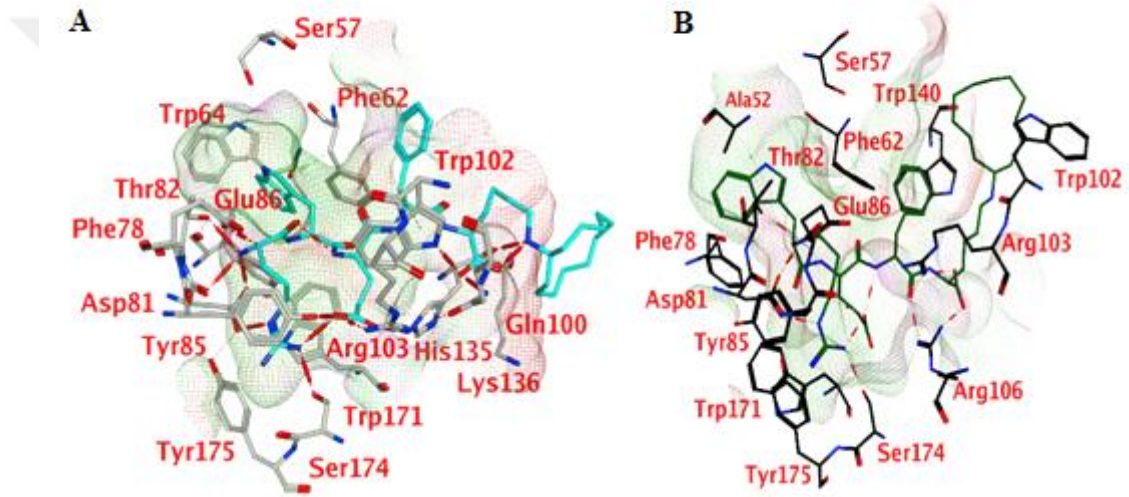
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -9 kcal/mol değerinden -8 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -10 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWEAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.7 hFR α -RWEFK kompleksinin incelenmesi

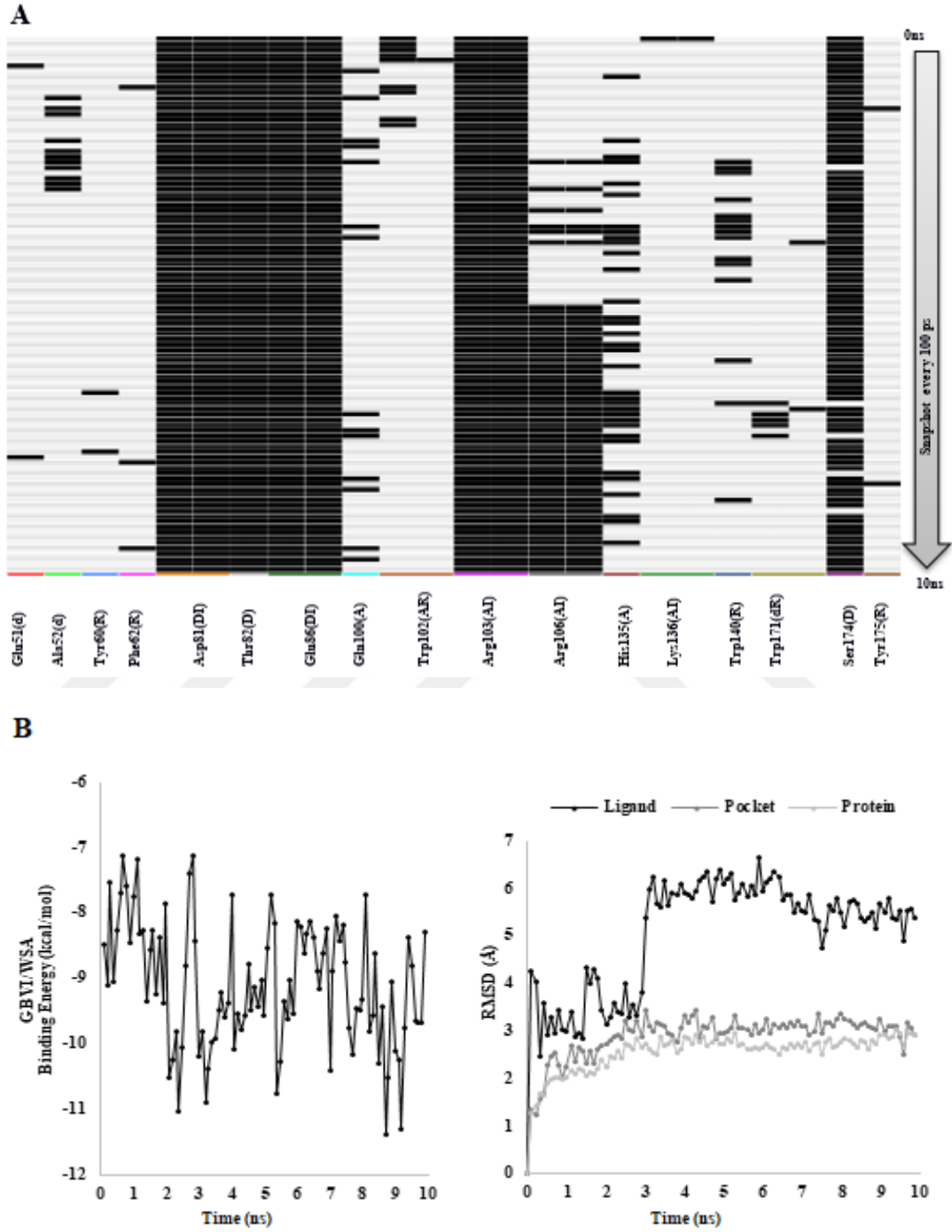
RWEFK dizili peptidin N-terminal amin grubu Phe78 omurga karbonil grubu ve Thr82 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.13). Arg1(L) amino asidi Asp81, Glu86 ve Ser174 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi EB’de bulunan Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Glu3(L) amino asidi Tyr85, Arg103 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Phe4(L) amino asidi Gln100 ve Trp102 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Lys5(L) son amino asidi His135 ve Lys136 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 4.13: Peptit XXIII'ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82, Glu86 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Tyr85 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Trp2(L) amino asidi Ala52 ve Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi ve Trp64 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Glu3(L) amino asidi hiçbir bağı etkileşimi kurmamaktadır. Phe4(L) amino asidi Arg103 ve Arg106 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp140 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

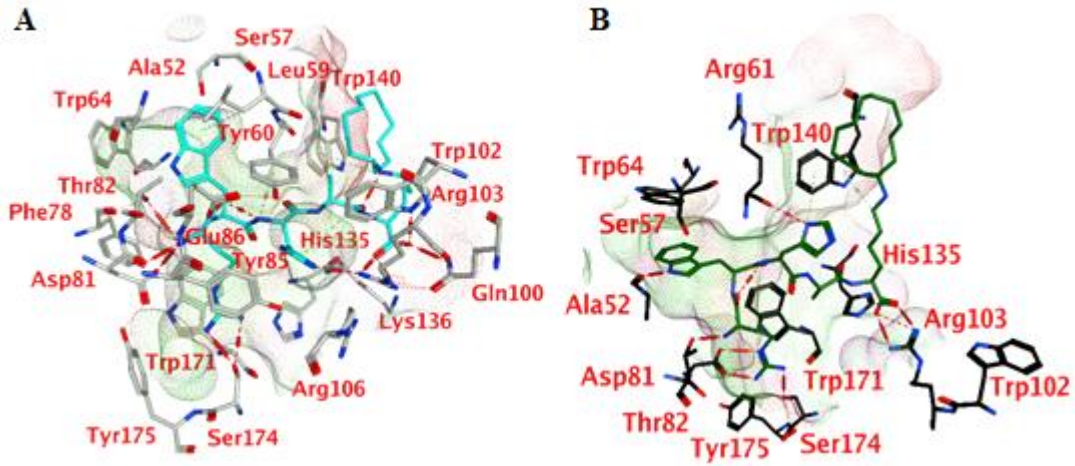
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -8 kcal/mol değerinden -9 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -8 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWEFK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.8 hFR α -RWHAK kompleksinin incelenmesi

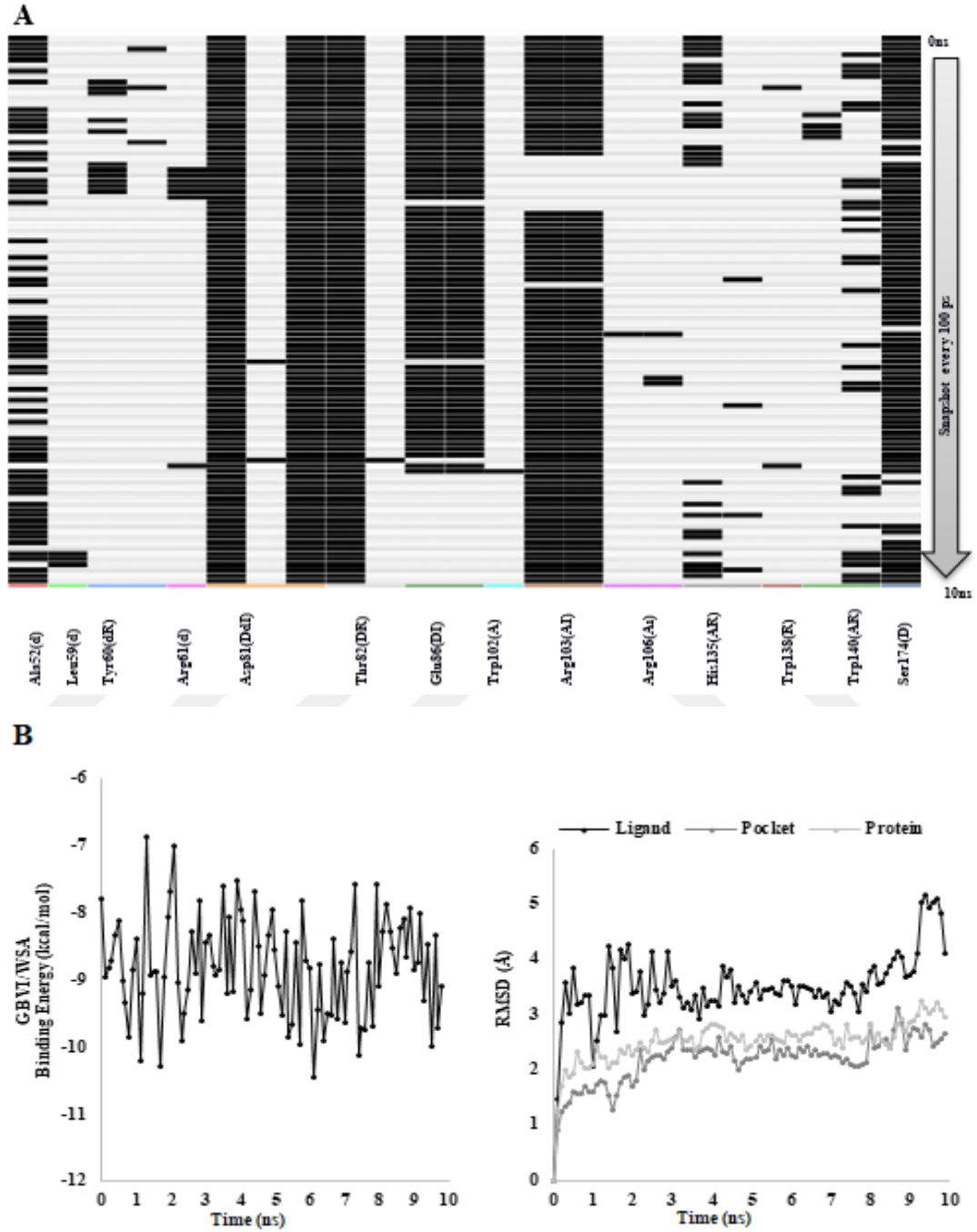
RWHAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Tyr175 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.15). Arg1(L) amino asidi Thr82, Glu86 ve Ser174 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi EB’de bulunan Leu59 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. His3(L) amino asidi Arg103 ve Arg106 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Tyr60 ve Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Gln100, Trp102 ve Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır. Dota Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 4.15: Peptit XXIV’ün tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns’lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82, Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi Ala52 hidrojen bağı etkileşimi ve Trp64 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. His3(L) amino asidi Arg61 hidrojen bağı etkileşimi ve Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Arg103 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.

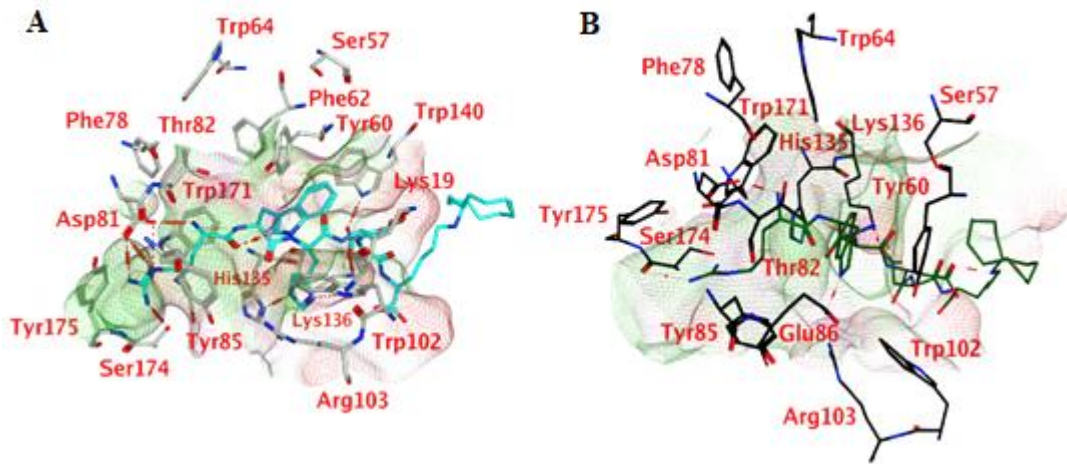
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -8 kcal/mol değerinden -9 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine dönmektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWHAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.9 hFR α -RWHDDK kompleksinin incelenmesi

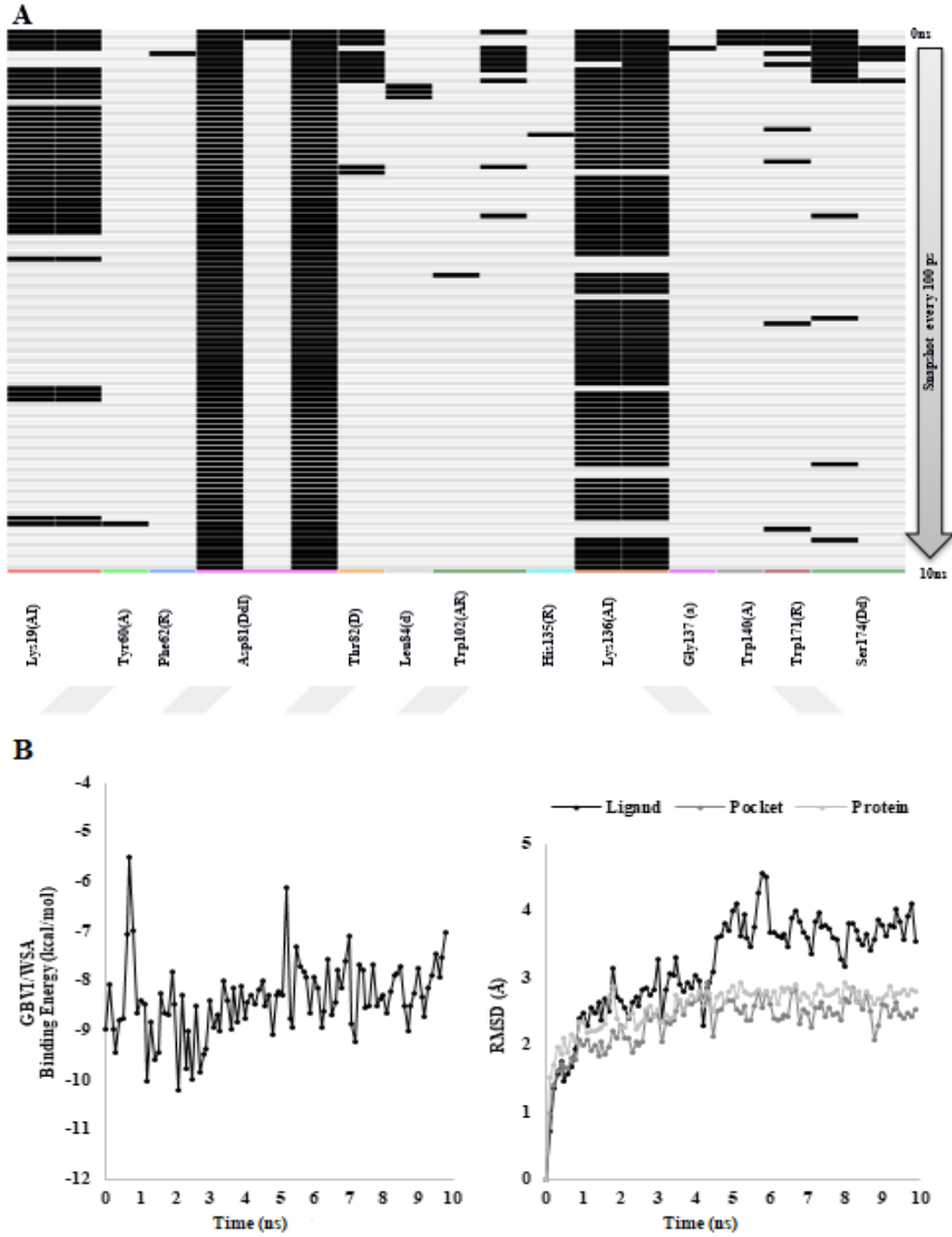
RWHDDK dizili peptidin N-terminal amin grubu Tyr175 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.17). Arg1(L) amino asidi Ser174 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Trp2(L) amino asidi EB'de bulunan Tyr60 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. His3(L) amino asidi Trp102 ile hem hidrojen bağı hem de H-aren bağı etkileşimi ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp4(L) amino asidi Lys19 ile hidrojen bağı ve Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp5(L) amino asidi Ser101, Lys136 ve Trp140 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.



Şekil 4.17: Peptit XXV'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi Glu86 ile hidrojen bağı etkileşimi ve Tyr60 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. His3(L) amino asidi Lys136 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp4(L) amino asidi hiçbir bağ etkileşimi kurmamaktadır. Asp5(L) amino asidi Lys136 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys6(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır.

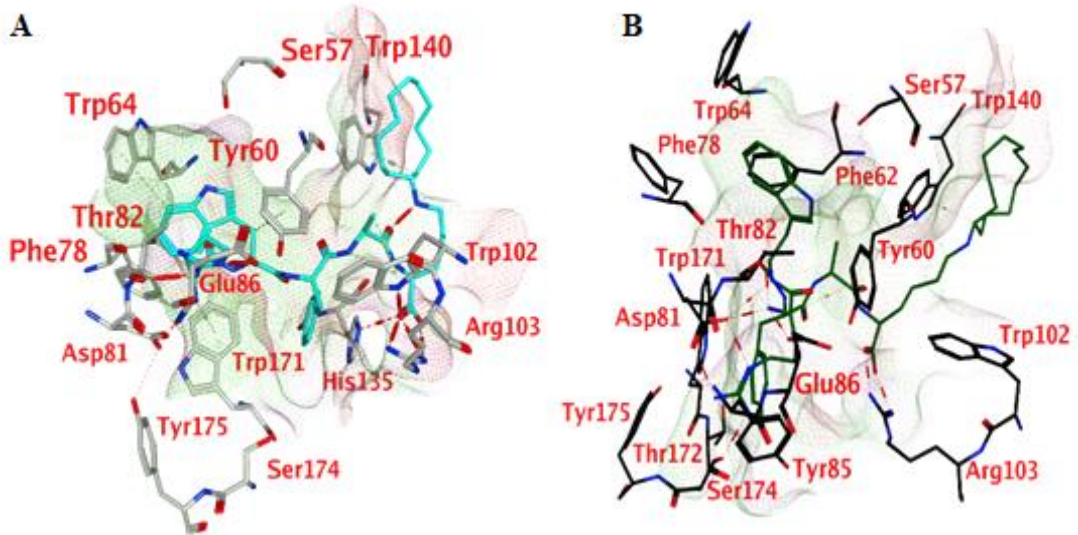
Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -9 kcal/mol değerinden -8 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -7 kcal/mol değerine çıkmaktadır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWHDDK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.10 hFR α -RWYAK kompleksinin incelenmesi

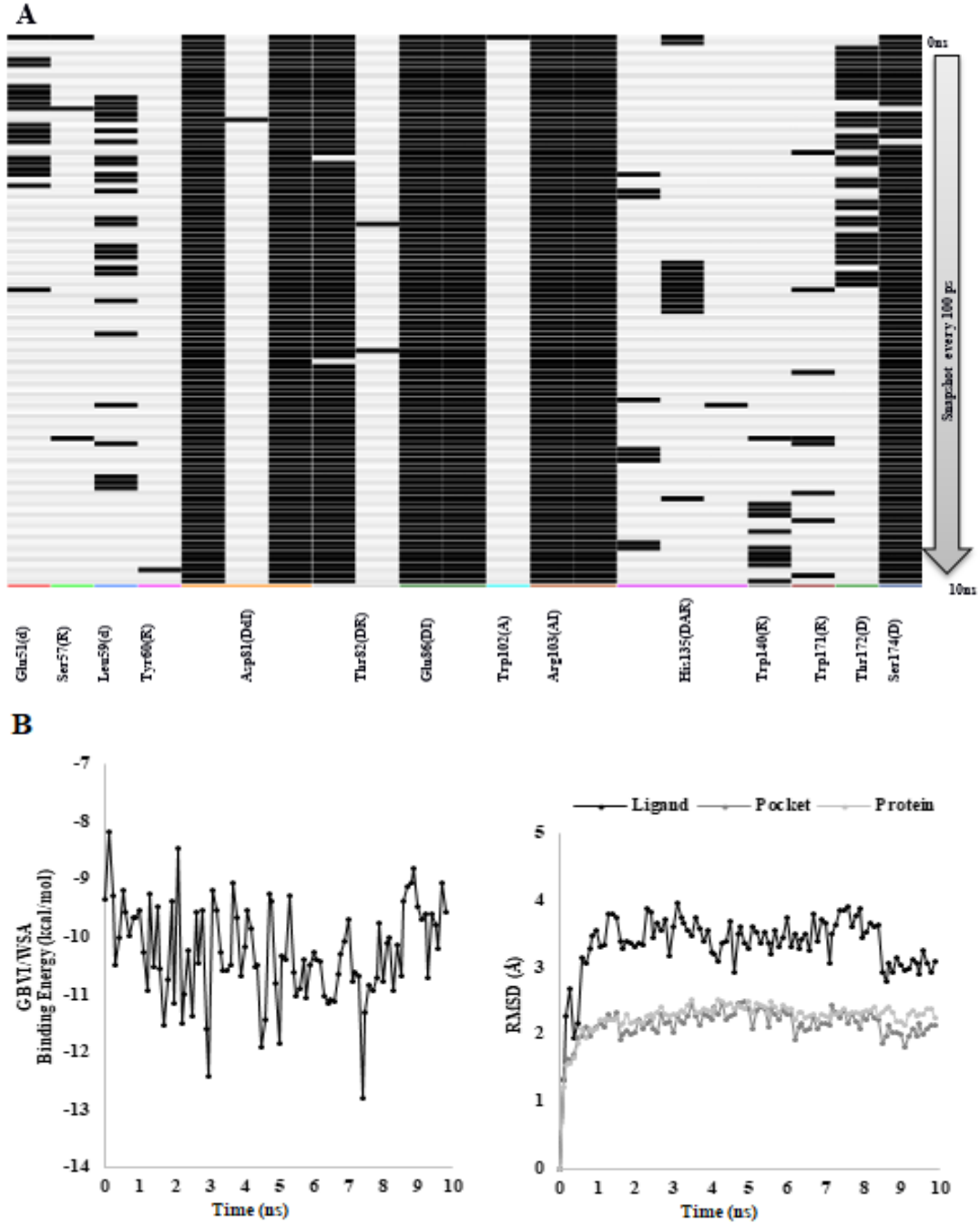
RWHAK dizili peptitin N-terminal amin grubu Tyr175 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.19). Arg1(L) amino asidi Thr82 ve Glu86 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi mevcuttur. Trp2(L) amino asidi EB'de bulunan Tyr60 ve Trp64 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Tyr3(L) amino asidi Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi ve His135 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Arg103 ve His135 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Trp102 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır. Dota Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.



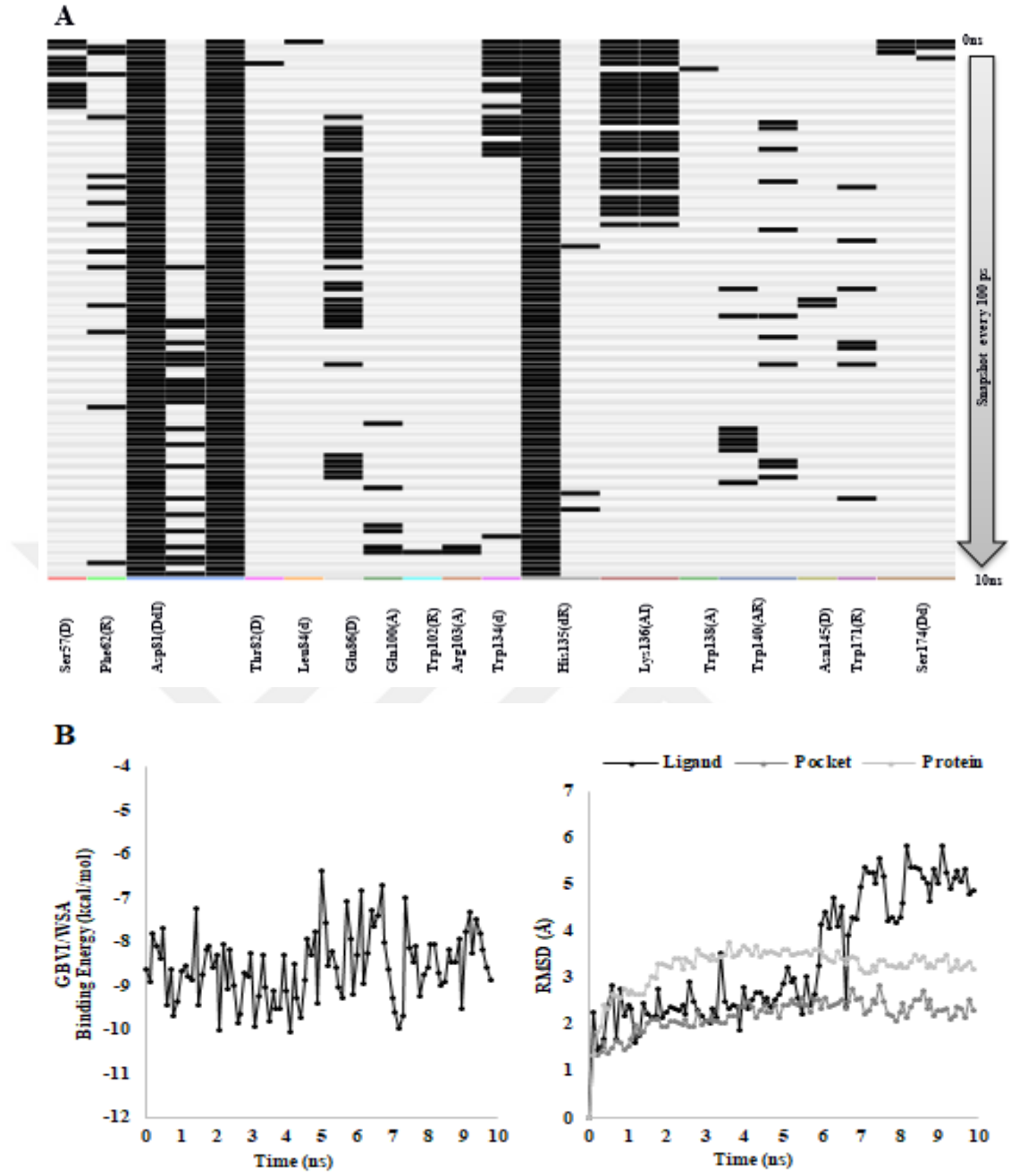
Şekil 4.19: Peptit XXVI'nin tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81, Thr82, Glu86 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Ayrıca, Tyr60 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Trp2(L) amino asidi Phe62 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Tyr3(L) amino asidi Trp171 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.

Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -9 kcal/mol değerinden -8 kcal/mol değerine kadar çıkmaktadır, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RWYAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

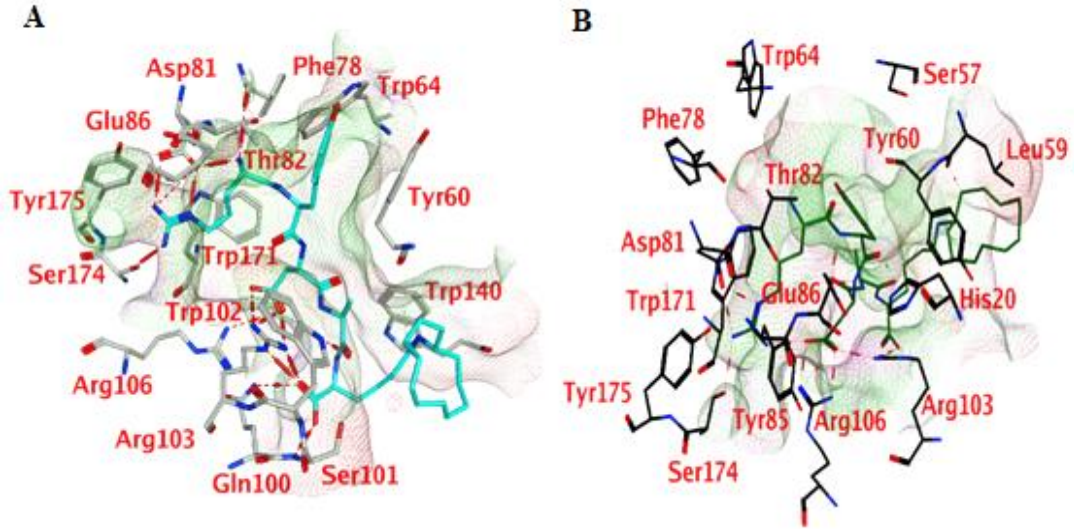


Şekil 4.22: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RYSSK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

4.1.12 hFR α -RYDAK kompleksinin incelenmesi

RYDAK dizili peptidin N-terminal amin grubu Tyr175 omurga karbonil grubu ve Asp81 yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır (Şekil 4.23). Arg1(L) amino asidi Asp81, Thr82 ve Ser174 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi EB'de bulunan Thr82 ile H-aren bağı

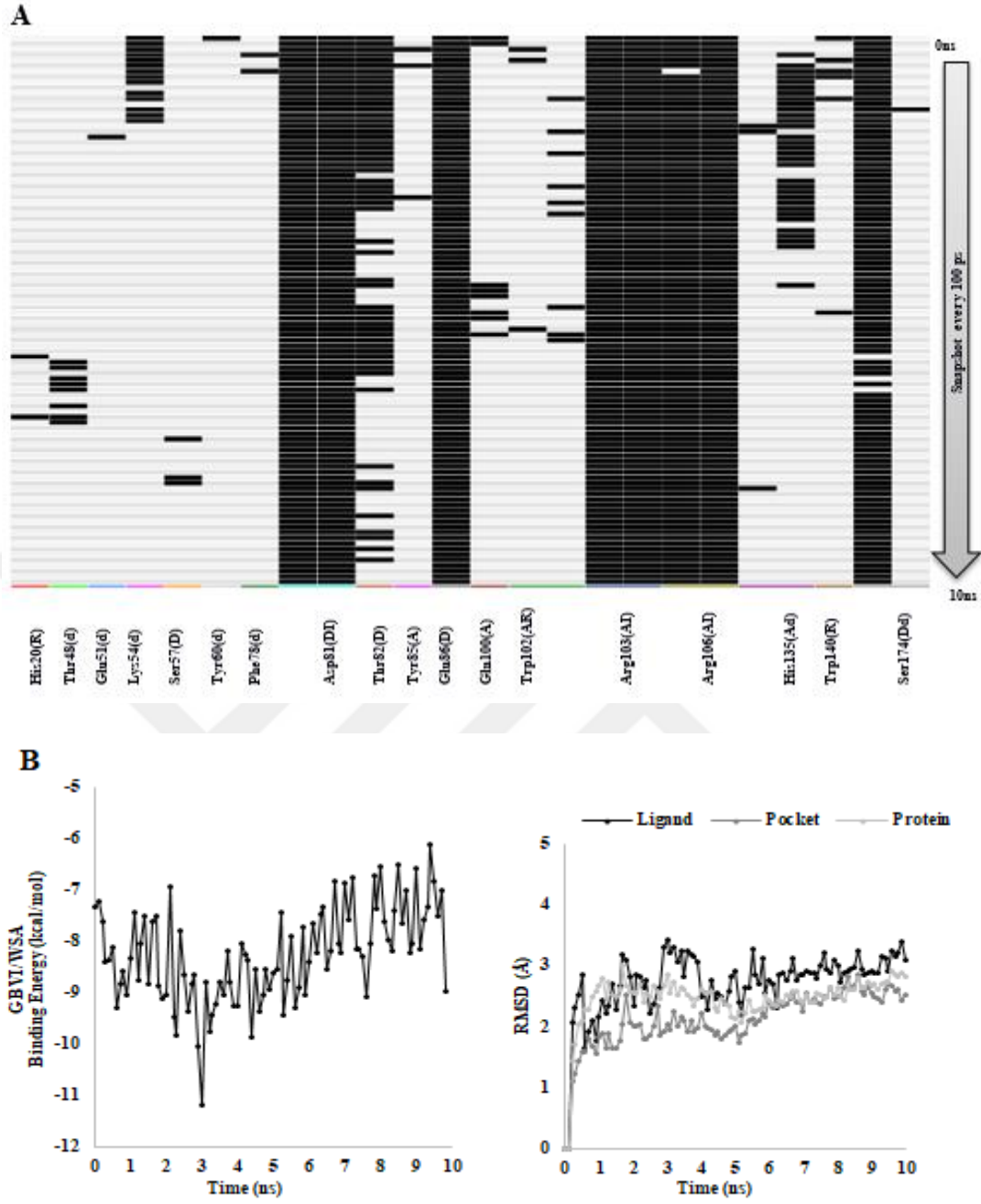
etkileşimi kurmaktadır. Ayrıca, Tyr60 ile hidrofobik etkileşim kurmaktadır. Asp3(L) amino asidi Arg103 ve Arg106 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Gln100, Ser101, Trp102 ve Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi Trp140 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.



Şekil 4.23: Peptit XXVIII'in tasarım esnasında elde edilen (0 ns, A) ve 10 ns'lik MD simülasyonu sonrasında (B) elde edilen ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

10 ns MD simülasyonu esnasında hFR α -peptit kompleksinin konformasyonunda RMSD değerlerinde ve PLIF verilerinde görüldüğü gibi çok önemli değişiklikler gözlenmemektedir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24). Arg1(L) amino asidi sürekli olarak Asp81 ve Ser174 ile hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim kurmaktadır. Tyr2(L) amino asidi His20 ile H-aren bağı ve Glu86 ile hem H-aren bağı hem de hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Asp3(L) amino asidi Glu86, Tyr85, Arg103 ve Arg106 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Ala4(L) amino asidi Arg103 ile hidrojen bağı etkileşimi kurmaktadır. Lys5(L) son amino asidi protein bağlanma bölgesinden dışarı doğru bakmaktadır. Dota Leu59 ile hidrojen bağı ve Tyr60 ile H-aren bağı etkileşimi kurmaktadır.

Kompleksin MD simülasyon boyunca GBVI/WSA bağlanma enerjisi ilk önce -7 kcal/mol değerinden -8 kcal/mol değerine kadar inmektedir, fakat daha sonra yine -9 kcal/mol değerine inmektedir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: (A) Simülasyon esnasında protein-ligand etkileşimi parmak izi (PLIF) (B) hFR α -RYDAK kompleksinin bağlanma enerjisi (kcal/mol) olarak gösterilmiştir. MD simülasyon boyunca ligand, bağlanma bölgesi ve proteinin RMSD değerleri gösterilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ön çalışmalarında kanser hücrelerinin birçoğunda upregüle durumda olan hFR α biyobelirteç proteine karşı yüksek ilgi ile bağlanması öngörülen 16 adet peptit tasarlanmış ve daha sonra da sentezleri gerçekleştirilmiştir. Sunulan tez çalışması esnasında bu peptitlerin moleküler modelleme çalışmalarıyla hFR α ile kurdukları olası bağlanma ilişkileri incelenmiştir. Bu ilk nesil 16 peptitten 4 tanesi hFR α biyobelirteç proteinine yüksek ilgi ile bağlanması öngörülmektedir.

İlk nesil peptitlerin moleküler modelleme sonuçları ışığında 12 adet ikinci nesil peptit tasarlanmıştır. Bu peptitlerin de benzer şekilde moleküler modelleme çalışmalarıyla hFR α biyobelirteç proteini ile bağlanmaları incelenmiştir. İkinci nesil 12 peptitten 6 tanesi hFR α biyobelirteç proteinine yüksek ilgi ile bağlanması öngörülmektedir.

Yapılan çalışmalar her ne kadar kapsamlı olsa da peptitlerin hFR α 'ya afiniteleri *in vitro* deneylerle tespit edilerek bu çalışmada elde edilen sonuçların doğrulanması önerilmektedir. Laboratuvarımızda mevcut olan Isothermal Titration Calorimetry (ITC) cihazı bu çalışmalar için uygundur. hFR α plazmidleri elde edilmiştir, ancak yeterince yüksek miktarlarda bu protein henüz elde edilememektedir. Bu sorun çözüldüğü takdirde 28 adet peptitin ITC deneylerle hFR α 'ya afinitesi incelenmesi önerilmektedir.

Projenin tamamlanmasına doğru 24 çekirdekli İş İstasyonu satın alınmıştır. Daha yüksek hesap gücüne sahip olan İş İstasyonu ile bu tezde incelenen 28 adet peptitin hFR α 'ya bağlanma etkileşimleri 10 ns yerine 250 ns'lik MD simülasyonlarla incelenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Delbeke, D., et al.** (2006). Procedure guideline for tumor imaging with 18F-FDG PET/CT 1.0. *J Nucl Med*, 47(5), 885-895.
- [2] **Sharma, P. and A. Mukherjee.** (2016). Newer positron emission tomography radiopharmaceuticals for radiotherapy planning: an overview. *Ann Transl Med*, 4(3), 53.
- [3] **Yamamoto, Y., et al.** (2008). Detection of hepatocellular carcinoma using 11C-choline PET: comparison with 18F-FDG PET. *J Nucl Med*, 49(8), 1245-1248.
- [4] **Fass, L.** (2008). Imaging and cancer: a review. *Mol Oncol*, 2(2), 115-152.
- [5] **Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann.** (2012). The tumor micro environment at a glance. *J Cell Sci*, 125(Pt 23), 5591-5596.
- [6] **Fares, J., et al.** (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 28.
- [7] **Scarborough, M.T.** (2004). The biopsy. *Instr Course Lect*, 53, 639-644.
- [8] **Wu, L. and X. Qu.** (2015). Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. *Chem Soc Rev*, 44(10), 2963-2997.
- [9] **Adams, K.E., et al.** (2007). Comparison of visible and near-infrared wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer. *J Biomed Opt*, 12(2), 024017.
- [10] **Wu, M. and J. Shu.** (2018). Multimodal Molecular Imaging: Current Status and Future Directions. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, 1382183.
- [11] **Reeves, R.A. and T. Kaufman.** (2020), in *StatPearls: Treasure Island (FL)*.
- [12] **Yandrapalli, S. and Y. Puckett.** (2021), in *StatPearls: Treasure Island (FL)*.
- [13] **Khalil, M.M., et al.** (2011). Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int J Mol Imaging*, 2011, 796025.
- [14] **Bybel, B., et al.** (2008). SPECT/CT imaging: clinical utility of an emerging technology. *Radiographics*, 28(4), 1097-1113.
- [15] **Shukla, A.K. and U. Kumar.** (2006). Positron emission tomography: An overview. *J Med Phys*, 31(1), 13-21.
- [16] **Kapoor, M. and A. Kasi.** (2021), in *StatPearls: Treasure Island (FL)*.
- [17] **Fahim Ul, H. and G.J. Cook.** (2012). PET/CT in oncology. *Clin Med (Lond)*, 12(4), 368-372.
- [18] **Faria Dde, P., et al.** (2014). PET imaging in multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 9(4), 468-482.
- [19] **Yeatman, T.J., M. Yang, and D. Coppola.** (2018). Whole Genome Sequencing Analysis of a Stage IV Colon Cancer Patient with a 10-Year Disease-Free Survival following Systemic Chemotherapy/Bevacizumab. *Case Rep Gastroenterol*, 12(3), 729-736.
- [20] **Anand, S.S., H. Singh, and A.K. Dash.** (2009). Clinical Applications of PET and PET-CT. *Med J Armed Forces India*, 65(4), 353-358.
- [21] **Goossens, N., et al.** (2015). Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*, 4(3), 256-269.
- [22] **Maruvada, P., et al.** (2005). Biomarkers in molecular medicine: cancer detection and diagnosis. *Biotechniques*, Suppl, 9-15.

- [23] **Strimbu, K. and J.A. Tavel.** (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 463-466.
- [24] **Henry, N.L. and D.F. Hayes.** (2012). Cancer biomarkers. *Mol Oncol*, 6(2), 140-146.
- [25] **Biyomarker, Tümör Markeri, Biyobelirteç Nedir? Kanserde Ne Gibi Rolü Vardır?.** (2021). Retrieved Nisan 15,2021, Available from: <https://www.drogan.com/biyomarker-tumor-markeri-biyobelirtec-nedir-kanserde-ne-gibi-rolu-vardir/>.
- [26] **Chatterjee, S.K. and B.R. Zetter.** (2005). Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol*, 1(1), 37-50.
- [27] **Struewing, J.P., et al.** (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, 336(20), 1401-1408.
- [28] **FDA-NH Bismark Working Group.** (2016). *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. The Food and Drug Administration and The National Institutes of Health.*
- [29] **Cancer Biomarker.** (2021). Retrieved Nisan 15,2021, Available from: https://en.m.wikipedia.org/wiki/Cancer_biomarker.
- [30] **Cancer biomarkers.** (2021). Retrieved Nisan 21,2021, Available from: <https://www.creative-diagnostics.com/cancer-biomarkers.htm>.
- [31] **Locasale, J.W.** (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*, 13(8), 572-583.
- [32] **Cheung, A., et al.** (2016). Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget*, 7(32), 52553-52574.
- [33] **Kelemen, L.E.** (2006). The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer*, 119(2), 243-250.
- [34] **Chen, C., et al.** (2013). Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature*, 500(7463), 486-489.
- [35] **Ledermann, J.A., S. Canevari, and T. Thigpen.** (2015). Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments. *Ann Oncol*, 26(10), 2034-2043.
- [36] **Salazar, M.D. and M. Ratnam.** (2007). The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer Metastasis Rev*, 26(1), 141-152.
- [37] **Ke, C.Y., C.J. Mathias, and M.A. Green.** (2004). Folate-receptor-targeted radionuclide imaging agents. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(8), 1143-1160.
- [38] **Folate.** (2021). Retrieved Mart 08, 2021. Available from: <https://medschool.co/tests/megaloblastic/folate>.
- [39] **Vergote, I. and C.P. Leamon.** (2015). Vintafolide: a novel targeted therapy for the treatment of folate receptor expressing tumors. *Ther Adv Med Oncol*, 7(4), 206-218.
- [40] **Basmadjian, C., et al.** (2014). Cancer wars: natural products strike back. *Front Chem*, 2, 20.
- [41] **Thomas, A., J. Maltzman, and R. Hassan.** (2013). Farletuzumab in lung cancer. *Lung Cancer*, 80(1), 15-18.
- [42] **Fernandez, M., F. Javaid, and V. Chudasama.** (2018). Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chem Sci*, 9(4), 790-810.

- [43] **Lin, J., et al.** (2013). The antitumor activity of the human FOLR1-specific monoclonal antibody, farletuzumab, in an ovarian cancer mouse model is mediated by antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Biol Ther*, 14(11), 1032-1038.
- [44] **Wibowo, A.S., et al.** (2013). Structures of human folate receptors reveal biological trafficking states and diversity in folate and antifolate recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(38), 15180-15188.
- [45] **Macalino, S.J., et al.** (2015). Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch Pharm Res*, 38(9), 1686-1701.
- [46] **Bajorath, J.** (2015). Computer-aided drug discovery. *F1000Res*, 4.
- [47] **Kapetanovic, I.M.** (2008). Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. *Chem Biol Interact*, 171(2), 165-176.
- [48] **Schneider, G. and U. Fechner.** (2005). Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nat Rev Drug Discov*, 4(8), 649-663.
- [49] **Devi, R.V., S.S. Sathya, and M.S. Coumar.** (2015). Evolutionary algorithms for de novo drug design - A survey. *Applied Soft Computing*, 27, 543-552.
- [50] **Mouchlis, V.D., et al.** (2021). Advances in de Novo Drug Design: From Conventional to Machine Learning Methods. *Int J Mol Sci*, 22(4).
- [51] **Leelananda, S.P. and S. Lindert.** (2016). Computational methods in drug discovery. *Beilstein J Org Chem*, 12, 2694-2718.
- [52] **Eren D., Y.İ.** (2020). Rasyonel İlaç Tasarımında Moleküler Mekanik ve Moleküler Dinamik Yöntemlerin Kullanılma Amacı. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 44(2): 334-355.
- [53] **Ganesan, A., M.L. Coote, and K. Barakat.** (2017). Molecular dynamics-driven drug discovery: leaping forward with confidence. *Drug Discov Today*, 22(2), 249-269.
- [54] **Borhani, D.W. and D.E. Shaw.** (2012). The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *J Comput Aided Mol Des*, 26(1), 15-26.
- [55] **Hollingsworth, S.A. and R.O. Dror.** (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.
- [56] **Maxwell Boltzmann Distribution.** (2021). Retrieved Haziran 03, 2021. Available from: https://ibchem.com/IB/ibnotes/full/sta_htm/Maxwell_Boltzmann.htm.
- [57] **Essmann, U., et al.** (1995). A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *Journal of Chemical Physics*, 103(19), 8577-8593.
- [58] **Krieger, E. and G. Vriend.** (2014). YASARA View-molecular graphics for all devices-from smartphones to workstations. *Bioinformatics*, 30(20), 2981-2982.
- [59] **Maier, J.A., et al.** (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput*, 11(8), 3696-3713.
- [60] **Miyamoto, S. and P.A. Kollman.** (1992). Settle-an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8), 952-962.
- [61] **Hess, B., et al.** (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), 1463-1472.
- [62] **Demir-Yazici, K., et al.** (2020). Novel Indole-Based Hydrazones as Potent Inhibitors of the alpha-class Carbonic Anhydrase from Pathogenic Bacterium *Vibrio cholerae*. *Int J Mol Sci*, 21(9).

[63] **Guzel-Akdemir, O., et al.** (2020). Development of Thiazolidinones as Fungal Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Int J Mol Sci*, 21(8).

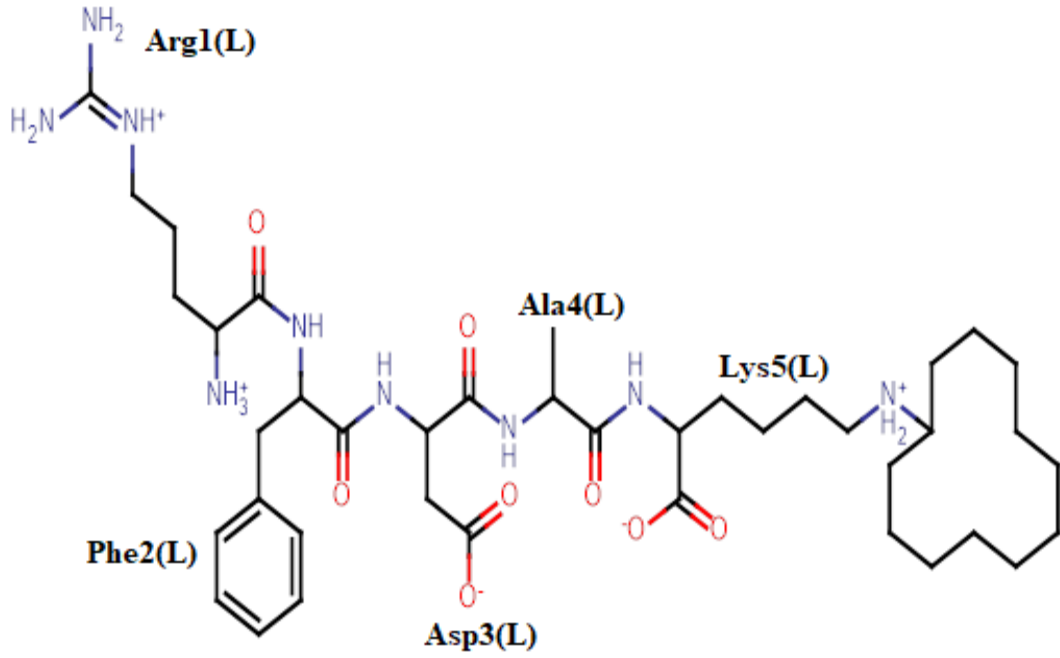


EKLER

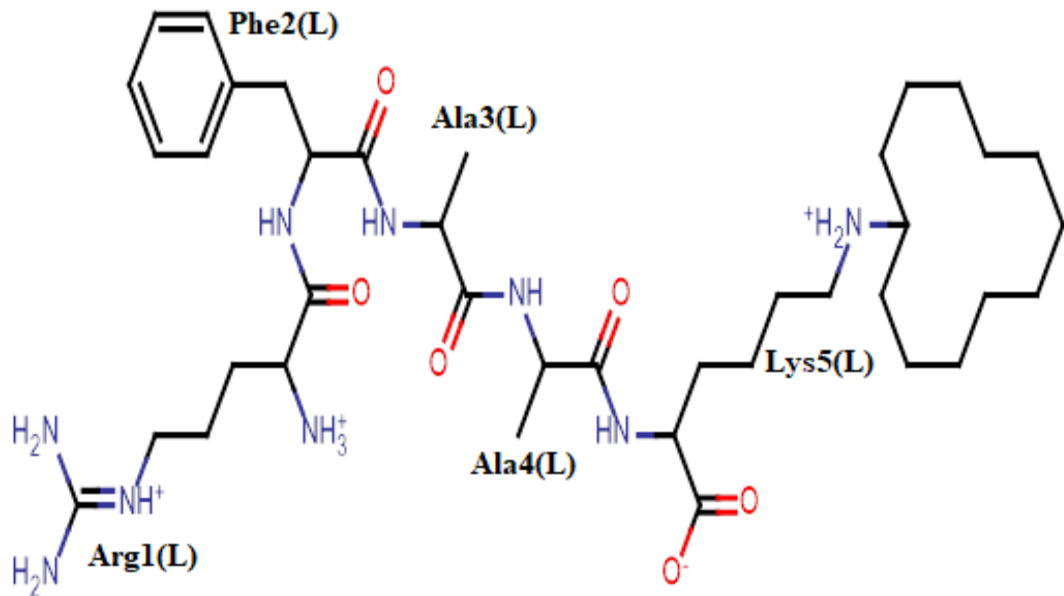
EK A: Şekiller



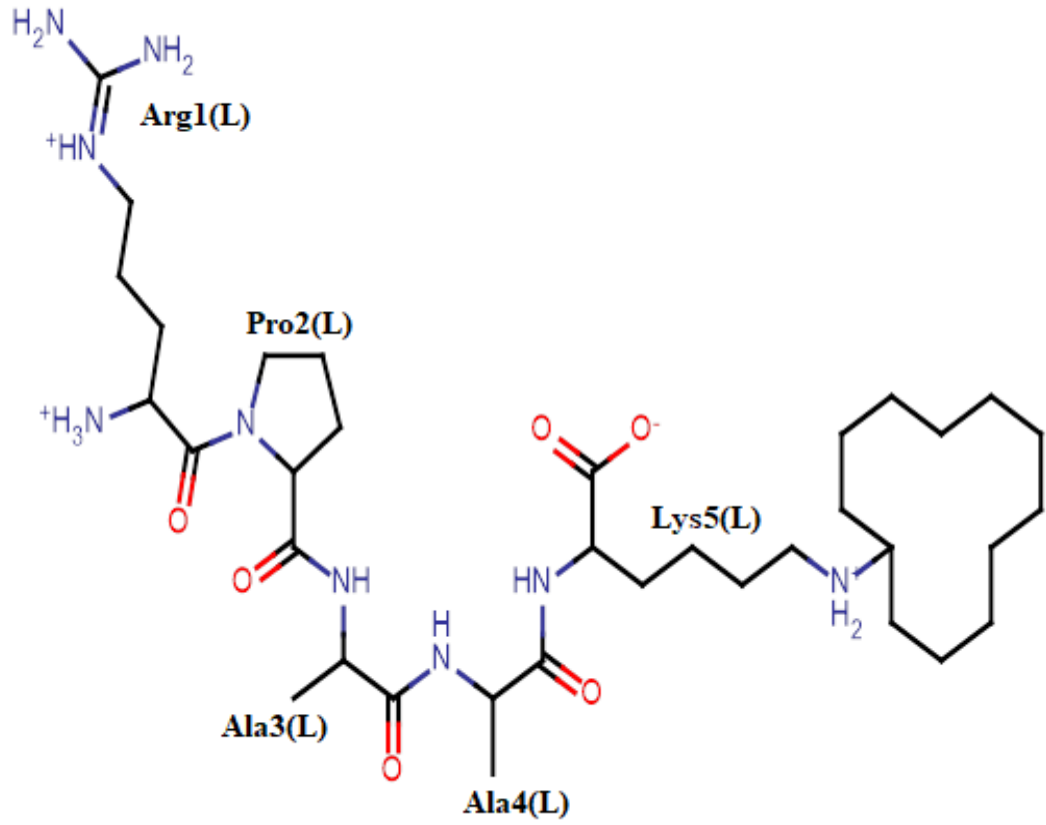
EK A



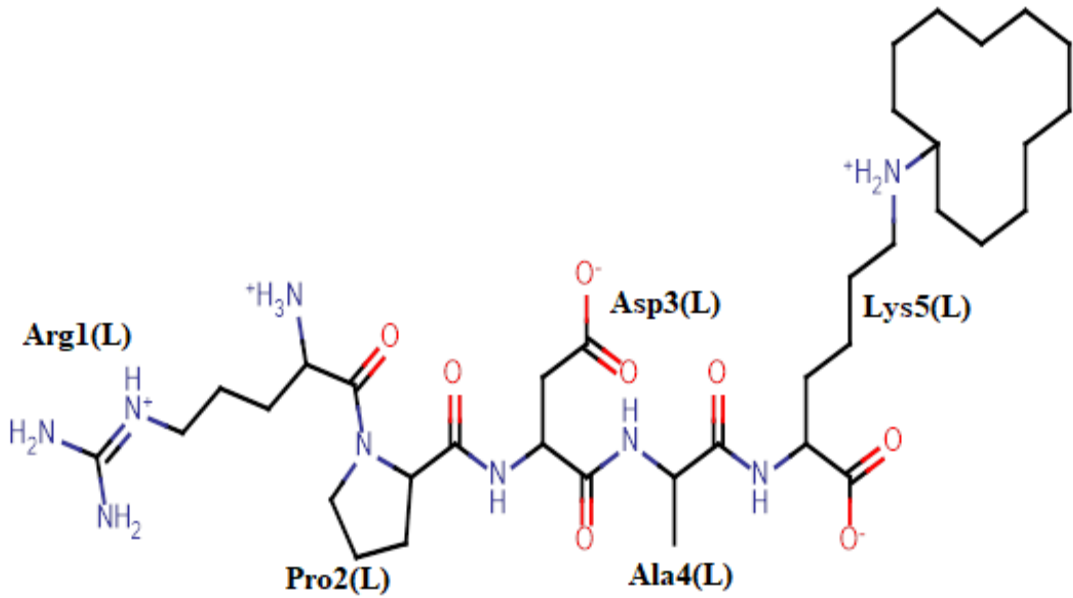
Şekil A.1: RFDAAK peptidin 2D molekül yapısı.



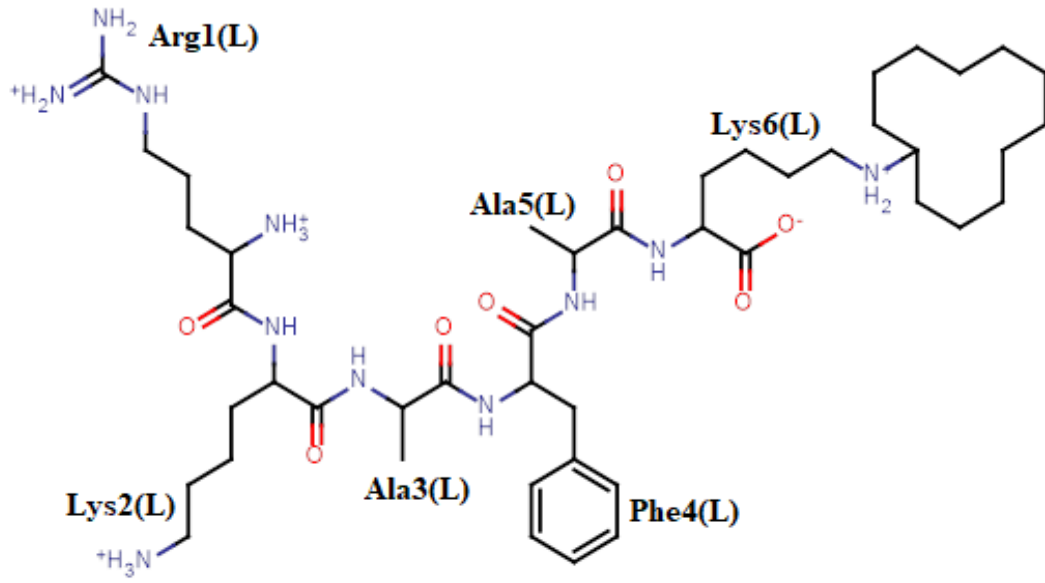
Şekil A.2: RFAAK peptidin 2D molekül yapısı.



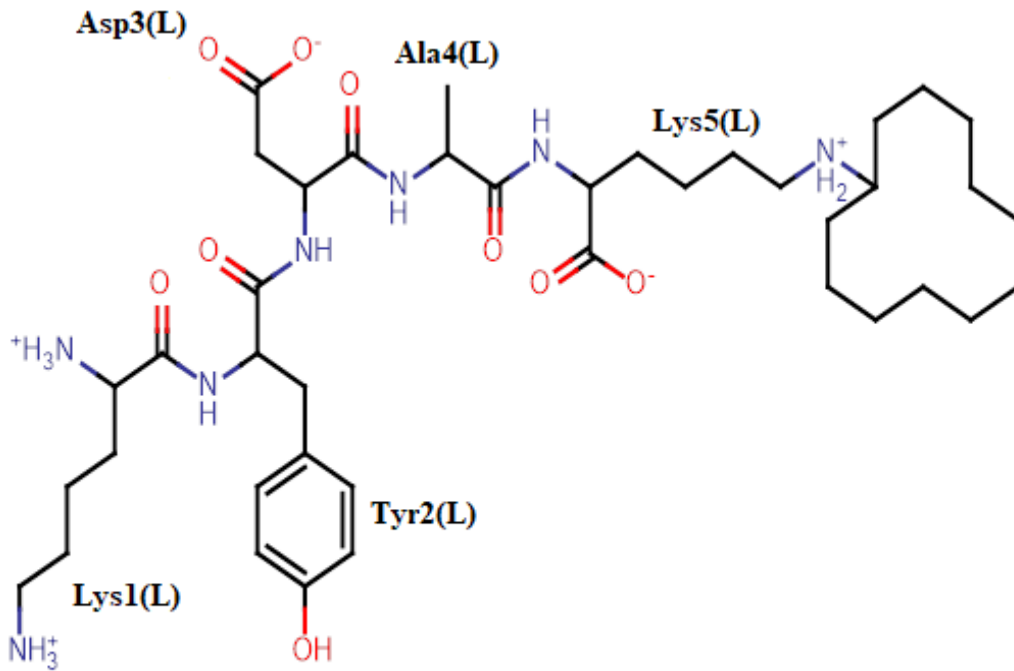
Şekil A.3: RPAAK peptidin 2D molekül yapısı.



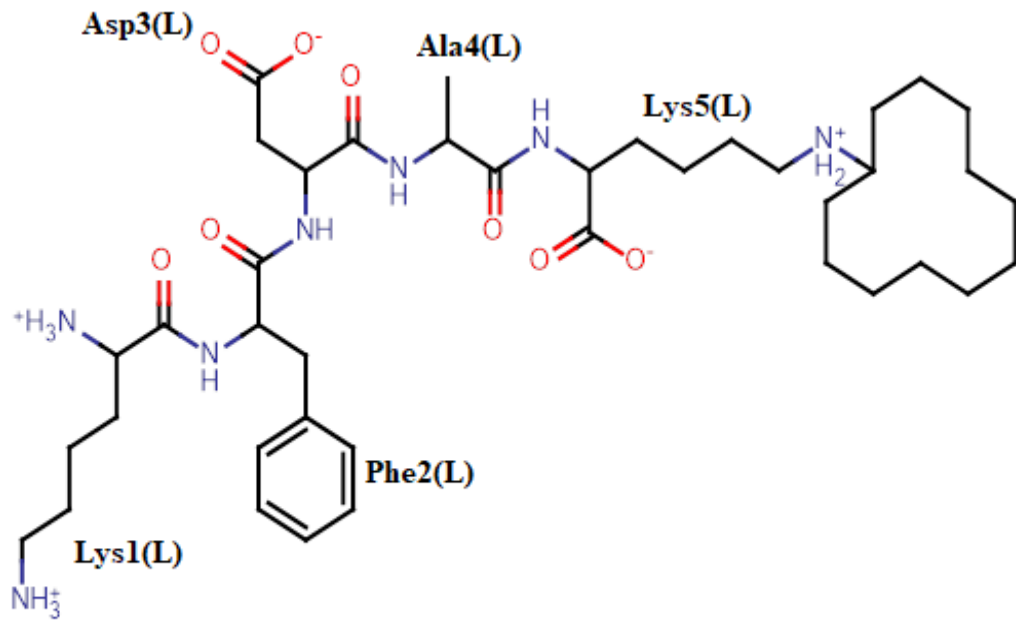
Şekil A.4: RPDAK peptidin 2D molekül yapısı.



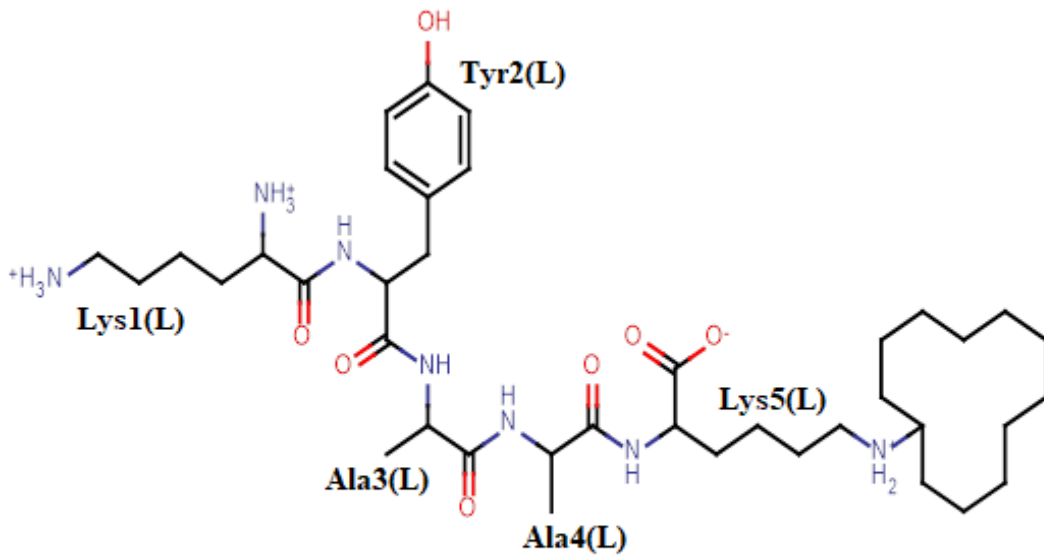
Şekil A.5: RKAFK peptidin 2D molekül yapısı.



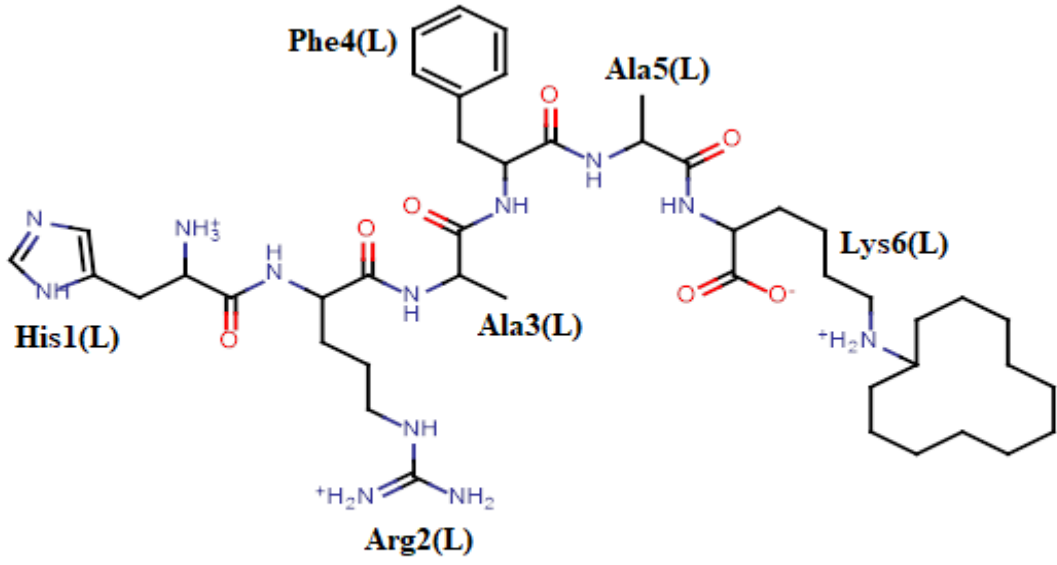
Şekil A.6: KYDAK peptidin 2D molekül yapısı.



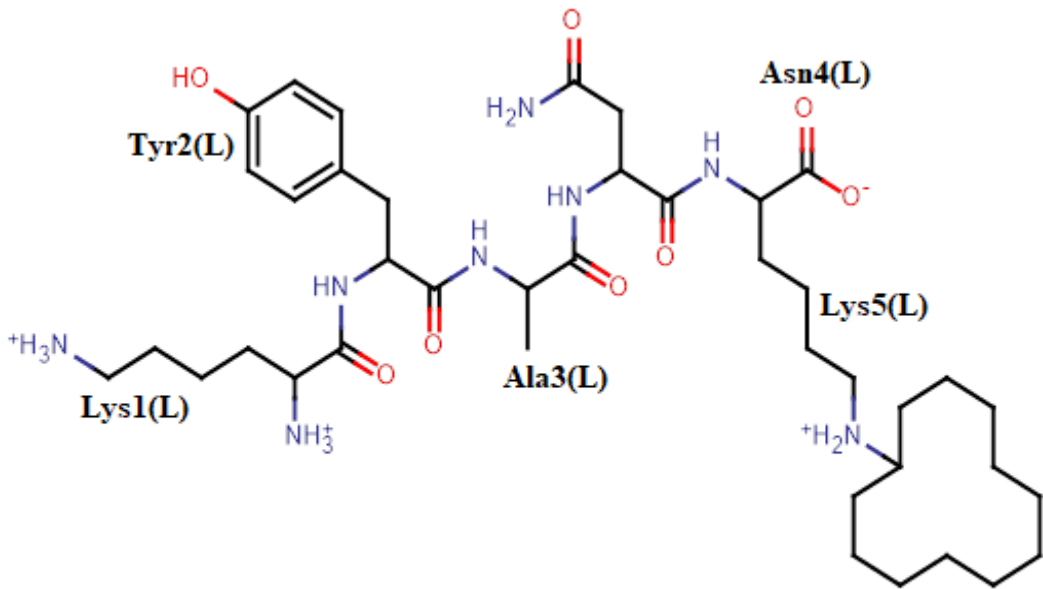
Şekil A.7: KFDAK peptidin 2D molekül yapısı.



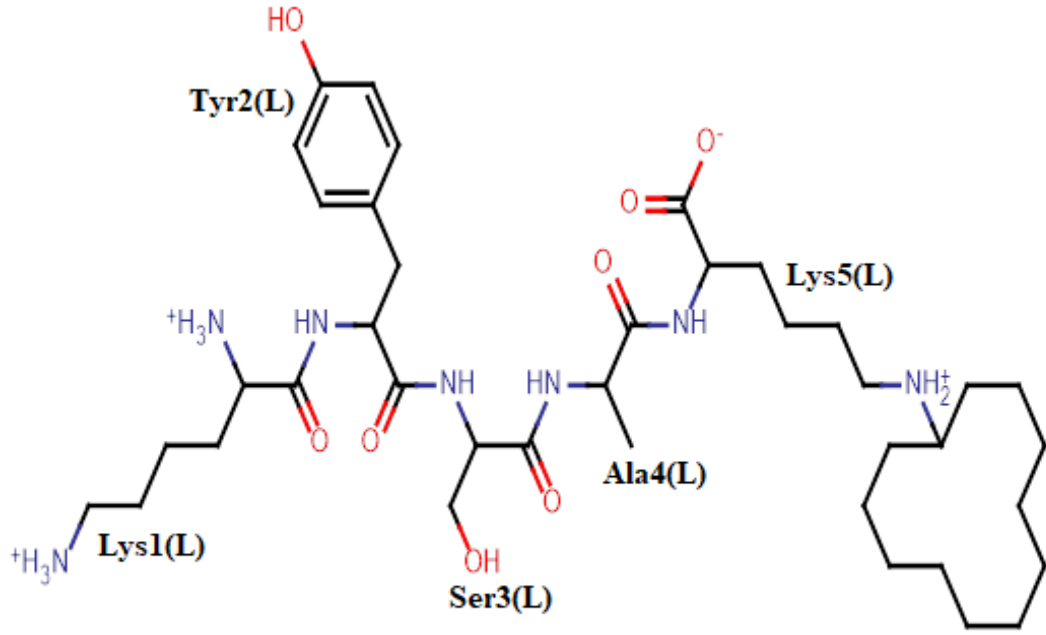
Şekil A.8: KYAAK peptidin 2D molekül yapısı.



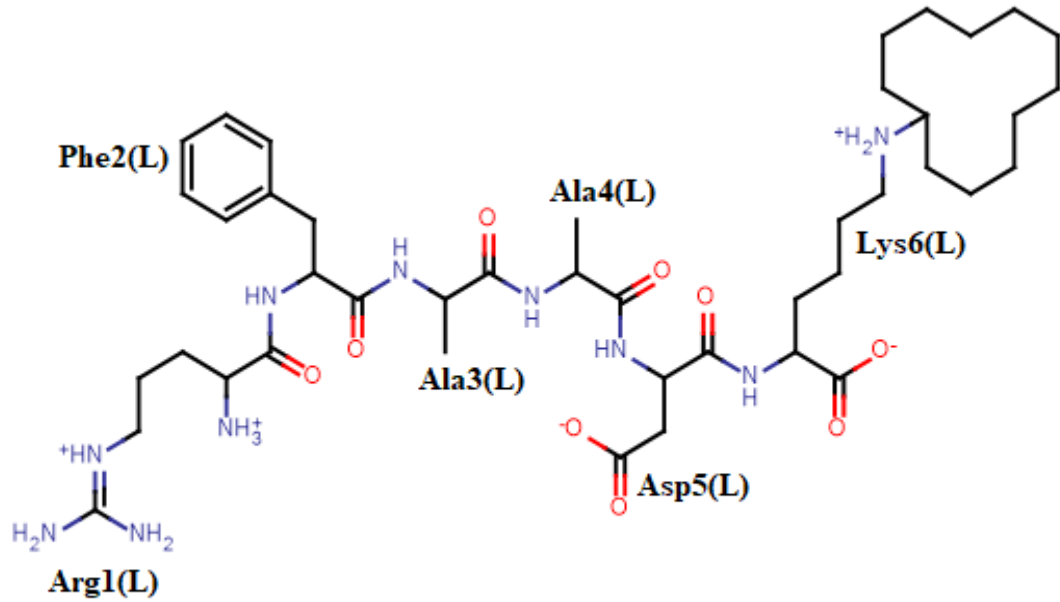
Şekil A.9: HRAFAK peptidin 2D molekül yapısı.



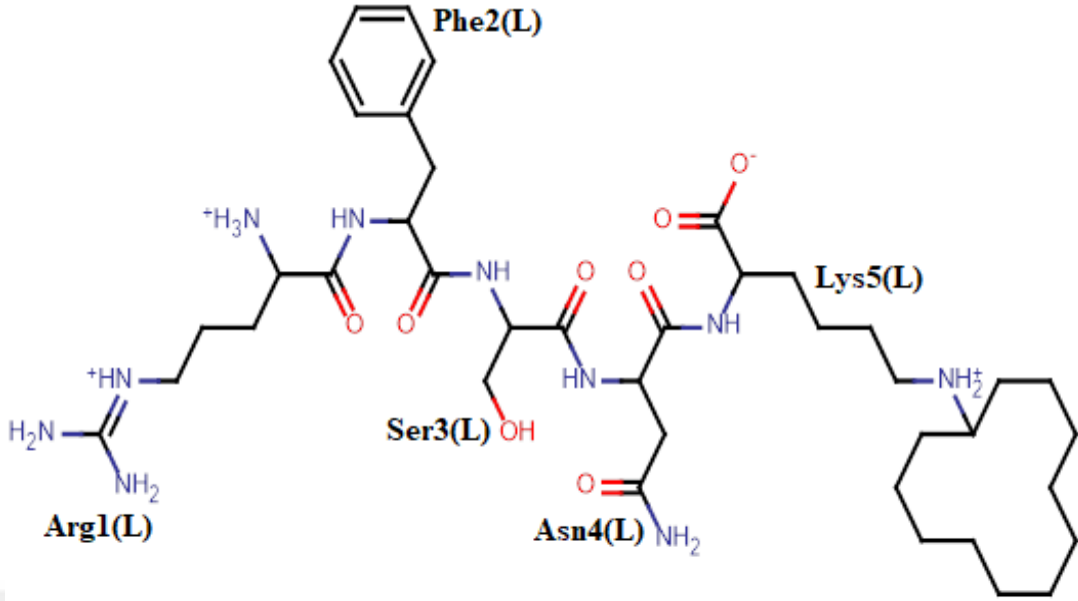
Şekil A.10: KYANK peptidin 2D molekül yapısı.



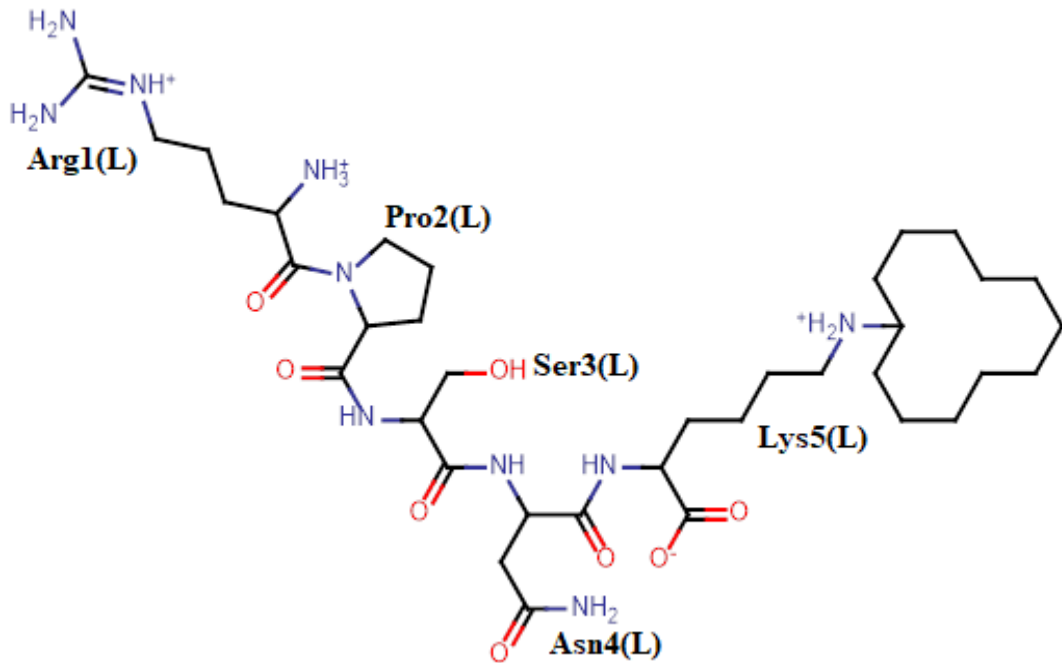
Şekil A.11: KYSAK peptidin 2D molekül yapısı.



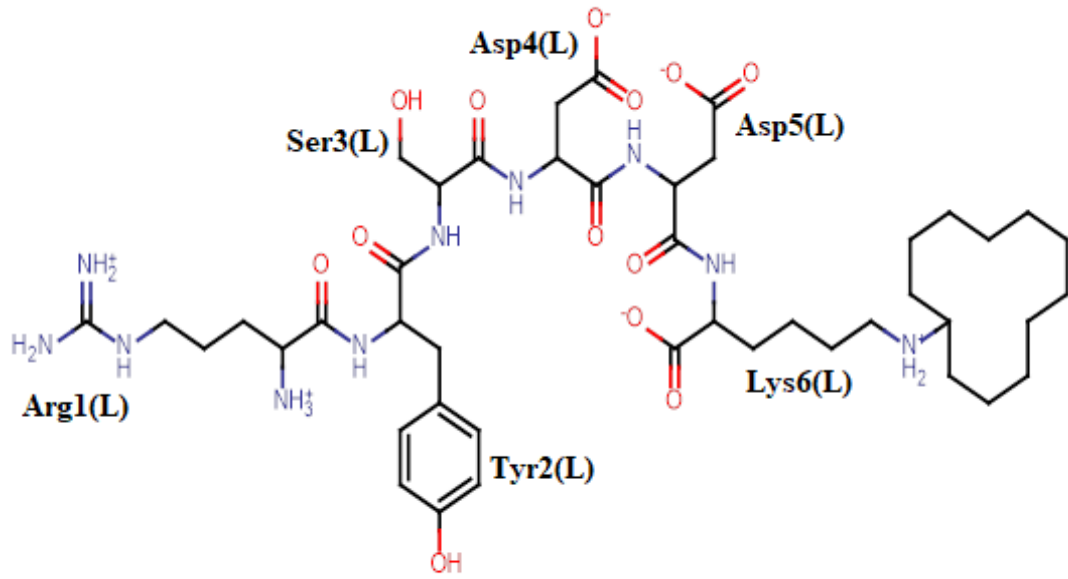
Şekil A.12: RFAADK peptidin 2D molekül yapısı.



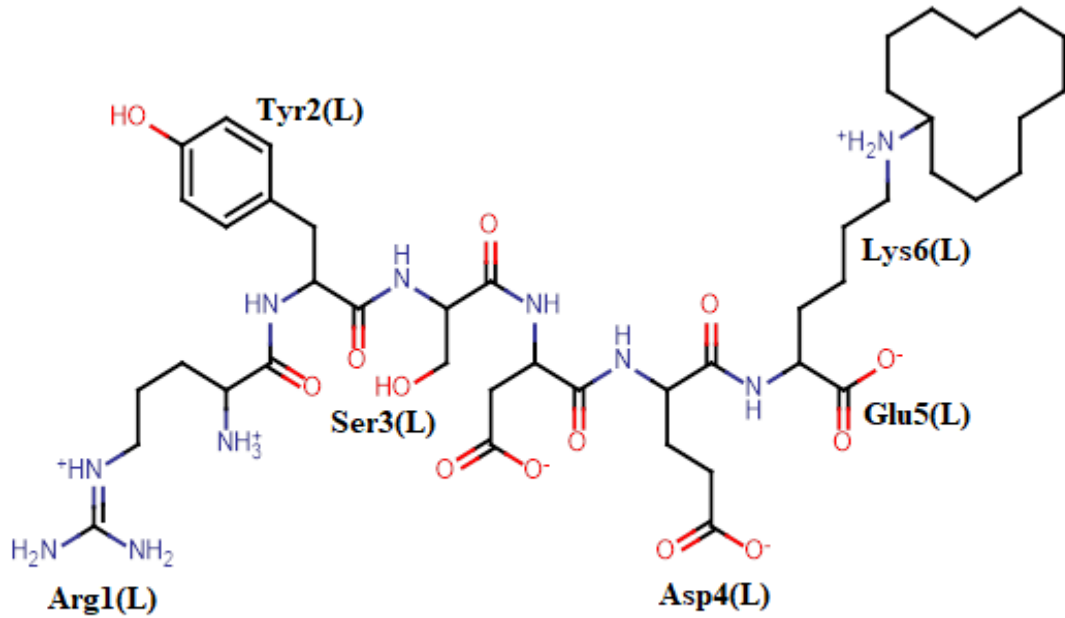
Şekil A.13: RFSNK peptidin 2D molekül yapısı.



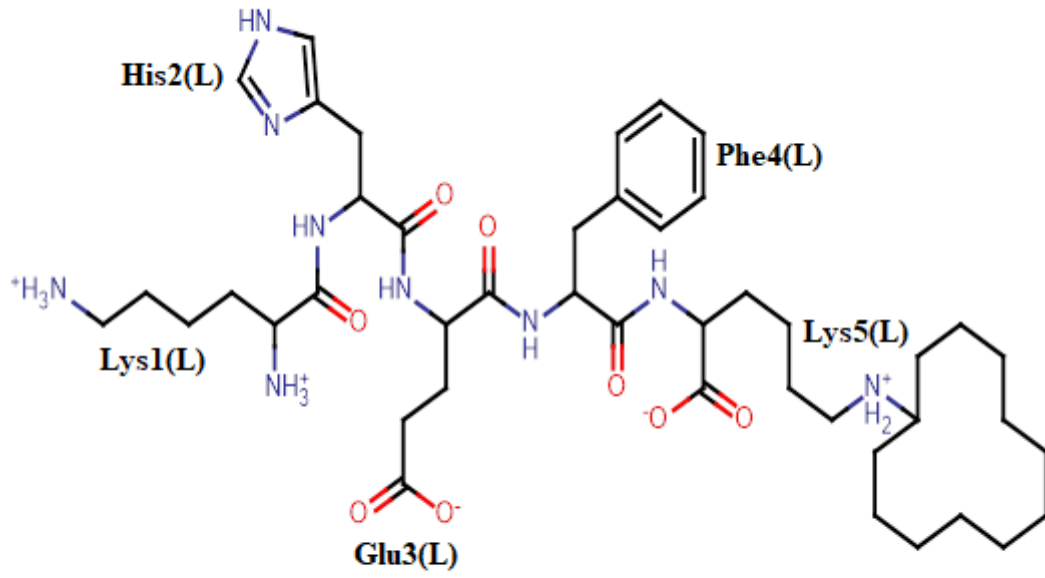
Şekil A.14: RPSNK peptidin 2D molekül yapısı.



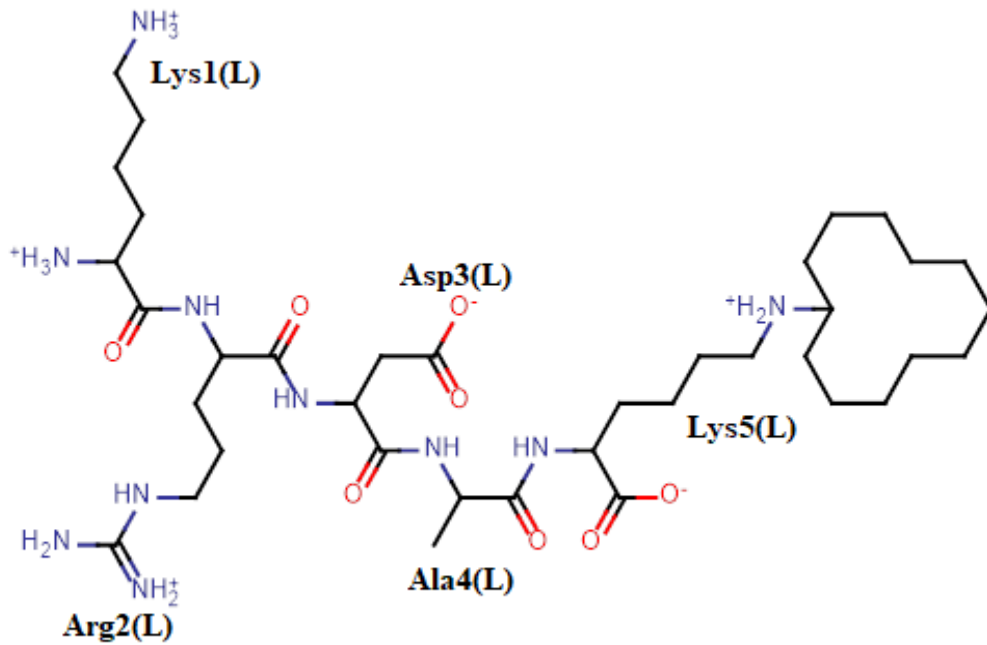
Şekil A.15: RYSDDK peptidin 2D molekül yapısı.



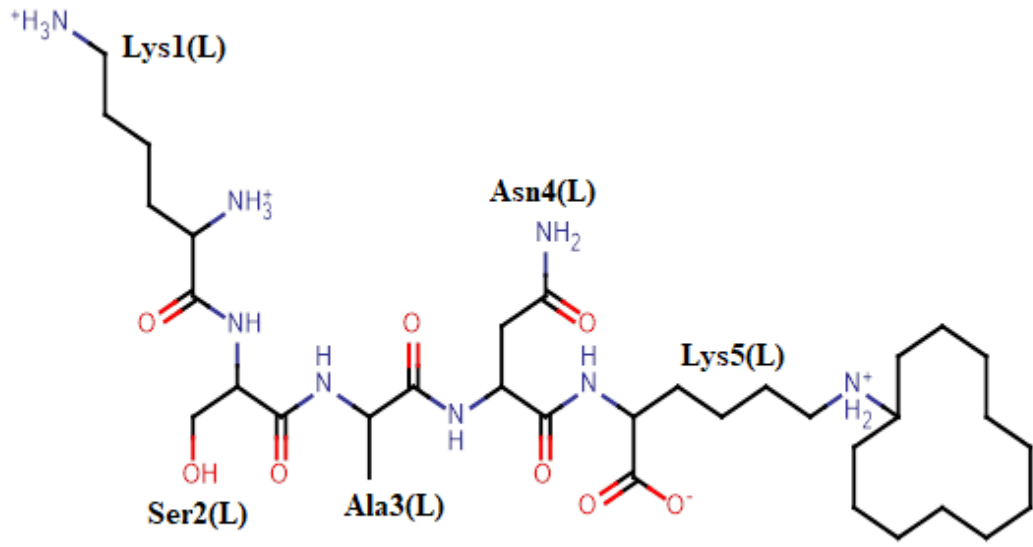
Şekil A.16: RYSDEK peptidin 2D molekül yapısı.



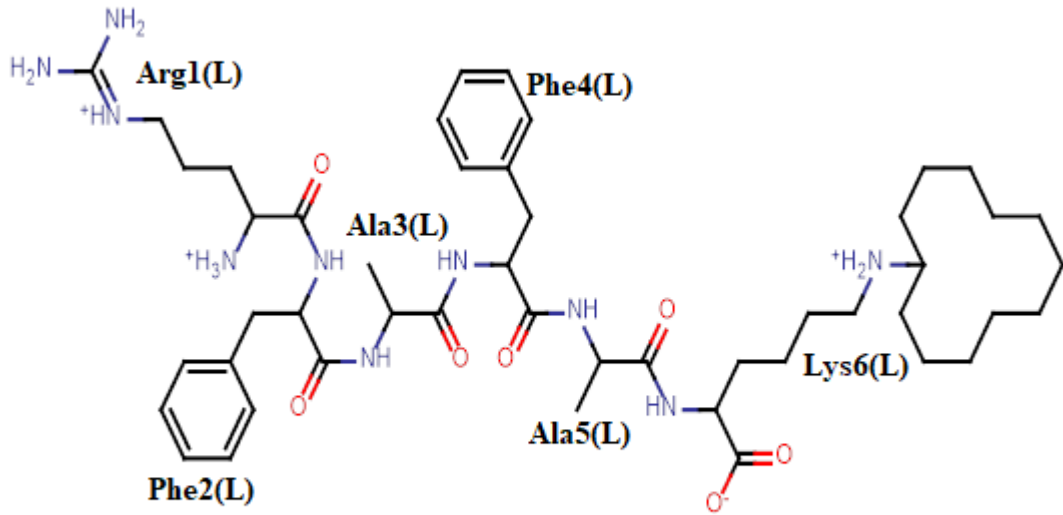
Şekil A.17: KHEFK peptitin 2D molekül yapısı.



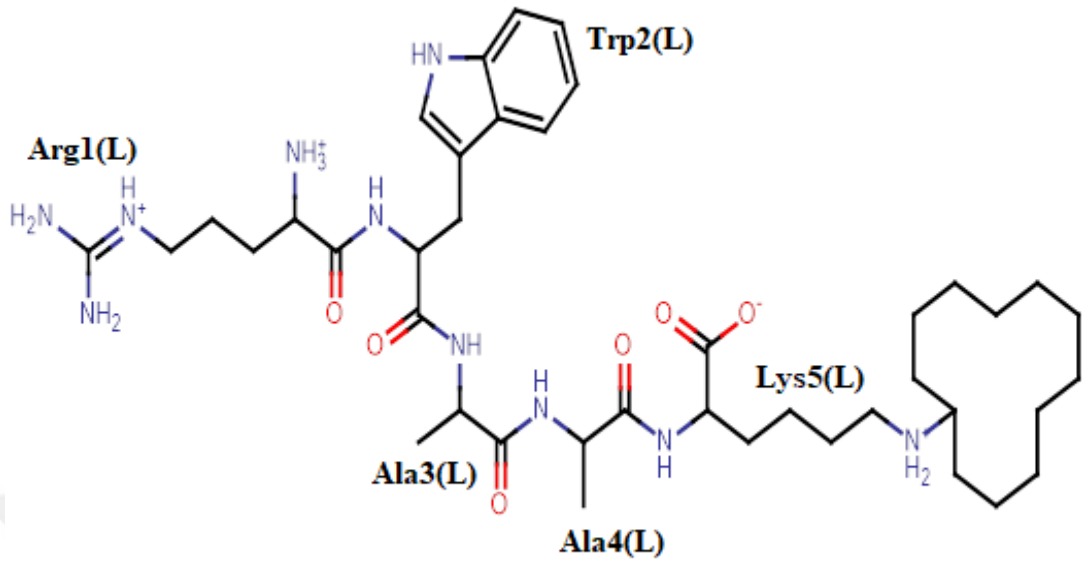
Şekil A.18: KRDAK peptitin 2D molekül yapısı.



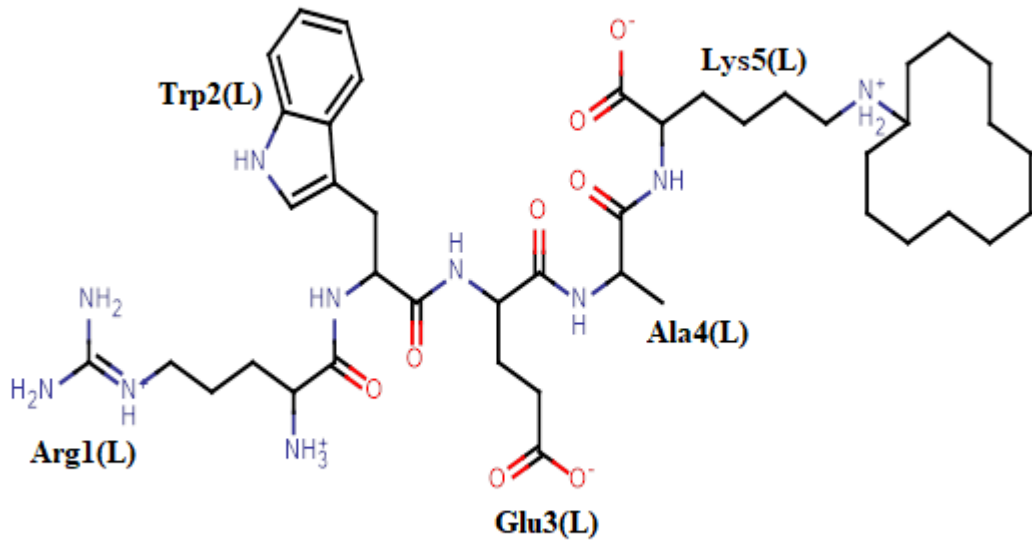
Şekil A.19: KSANK peptidin 2D molekül yapısı.



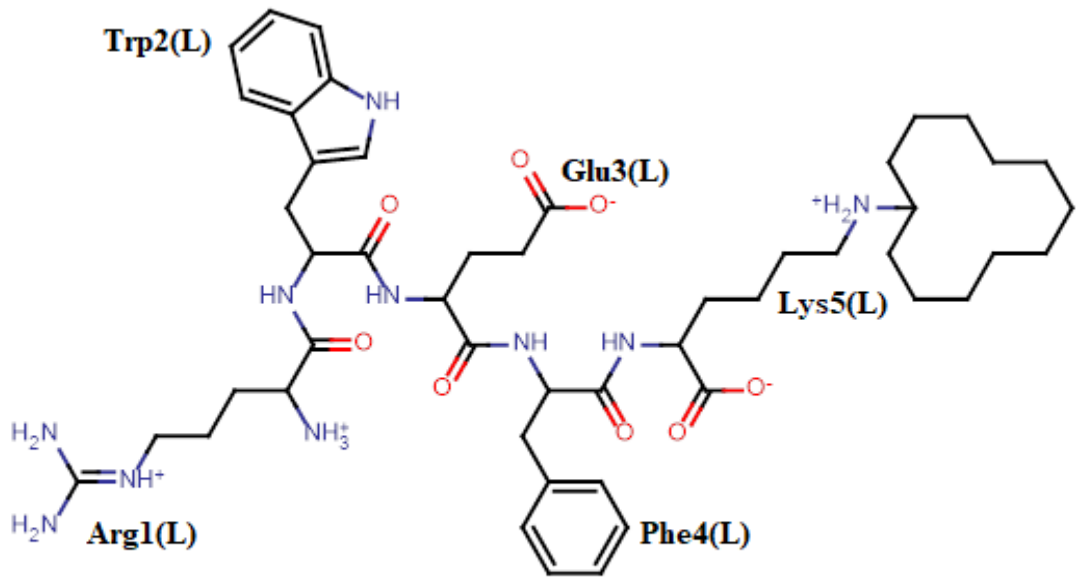
Şekil A.20: RFAFAK peptidin 2D molekül yapısı.



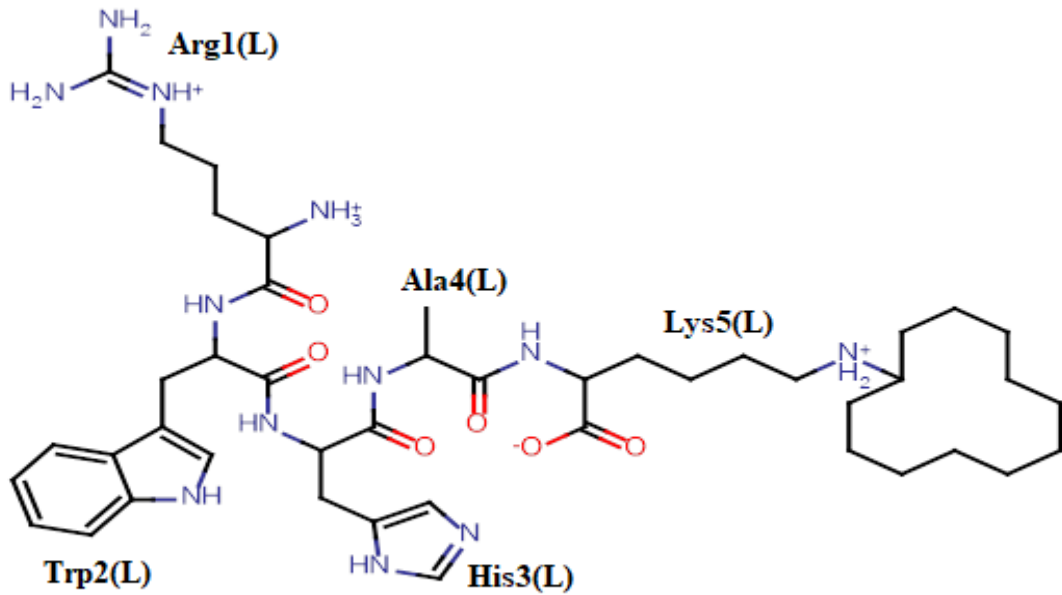
Şekil A.21: RWAAC peptidin 2D molekül yapısı.



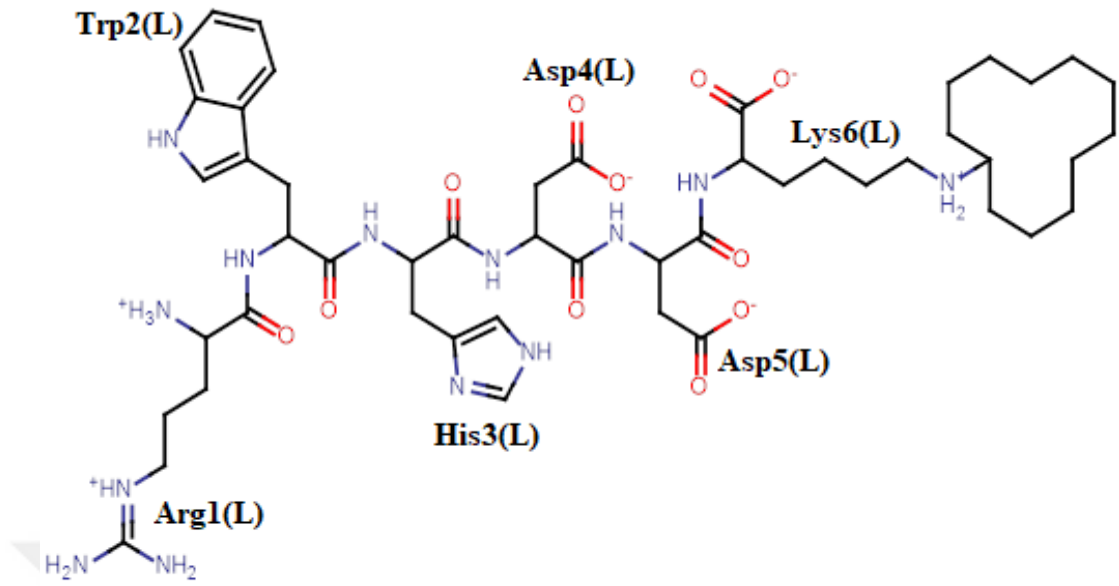
Şekil A.22: RWEAC peptidin 2D molekül yapısı.



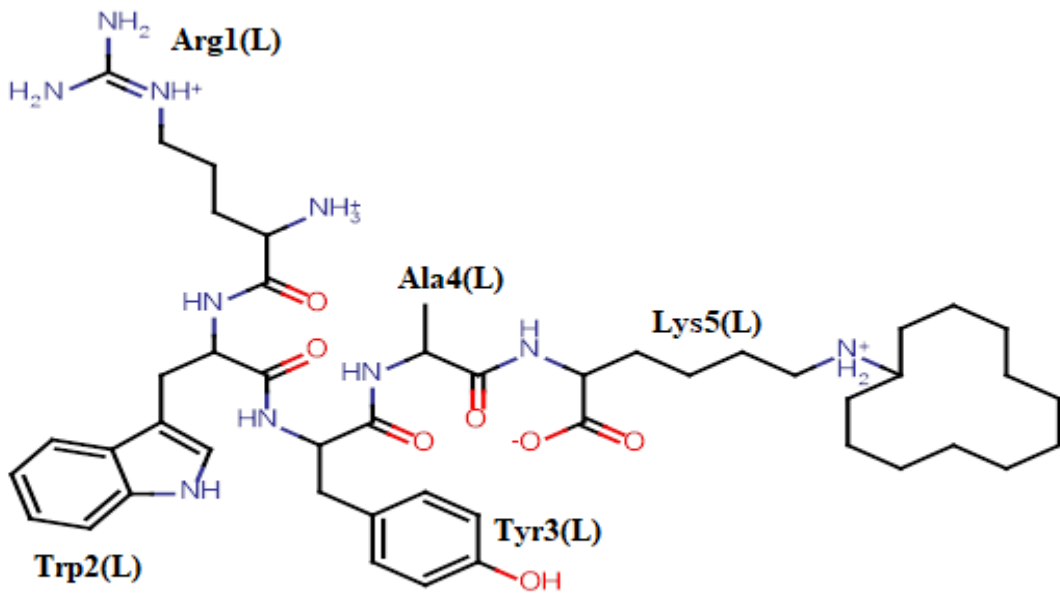
Şekil A.23: RWEFK peptidin 2D molekül yapısı.



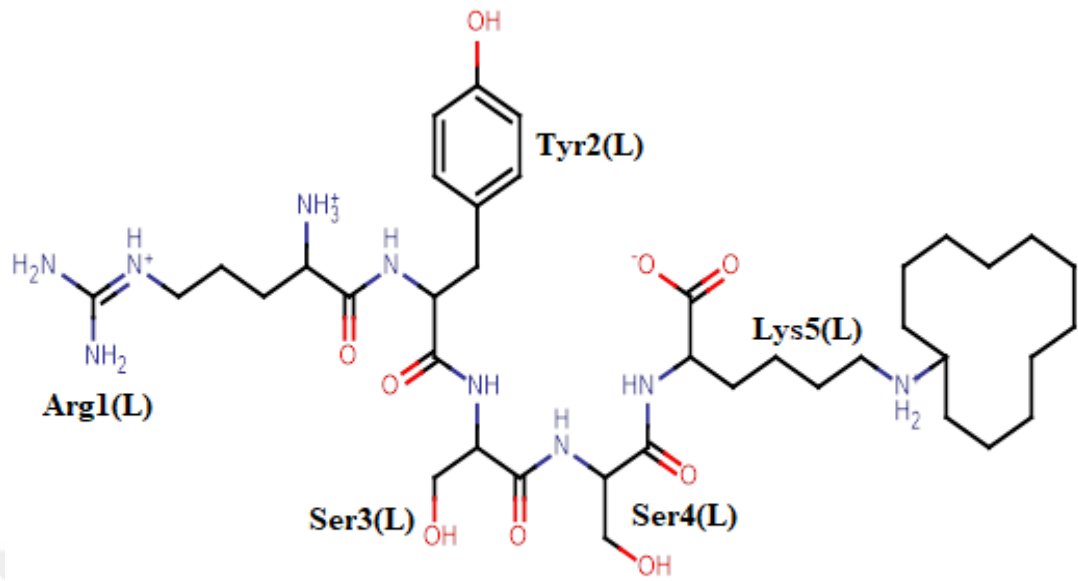
Şekil A.24: RWHAK peptidin 2D molekül yapısı.



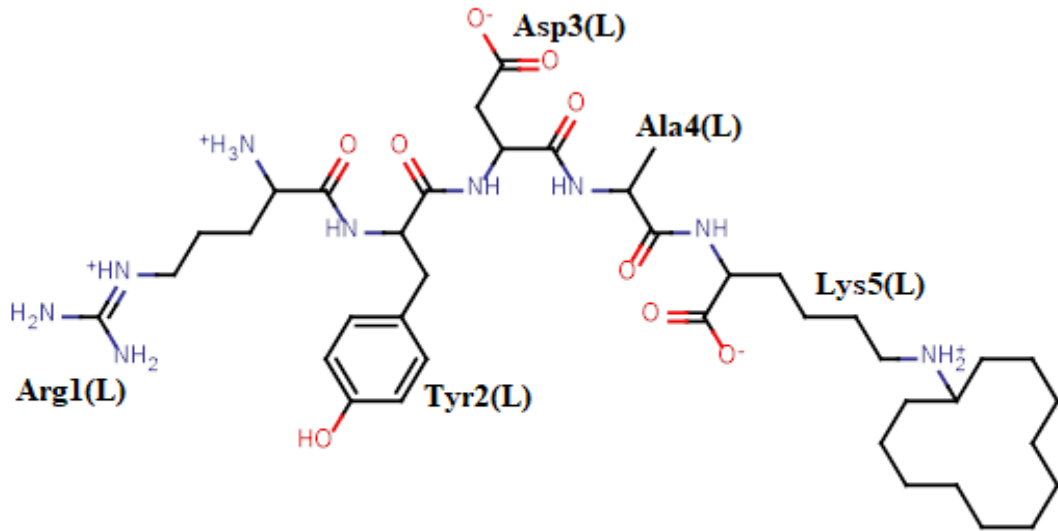
Şekil A.25: RWHDDK peptidin 2D molekül yapısı.



Şekil A.26: RWYAK peptidin 2D molekül yapısı.



Şekil A.27: RYSSK peptidin 2D molekül yapısı.



Şekil A.28: RYDAK peptidin 2D molekül yapısı.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ertuğrul İŞLEYEN

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Ön Lisans** : 2008, Namık Kemal Üniversitesi, Muratlı Meslek Yüksekokulu, Kimya Bölümü.
- **Lisans** : 2013, İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.

MESLEKİ DENEYİM:

- 2015-..... Kıdemli Kalite Kontrol Uzmanı, Ali Raif İlaç A.Ş.

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **İşleyen E., Akdemir A.,** 2021. hFR α hedef proteine yüksek ilgi ile bağlanması öngörülen PET-Ligandların rasyonel tasarımı. *International 9. Drug Chemistry Conference*, Nisan 08-11, Antalya, Türkiye.