

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OVER KANSER TEDAVİSİNDE RESEPTÖR HEDEFLİ *İN SİLİKO* LİGAND
TASARIMININ *İN VİTRO* İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Hilal ŞENTÜRK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2024

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OVER KANSER TEDAVİSİNDE RESEPTÖR HEDEFLİ *İN SİLİKO* LİGAND
TASARIMININ *İN VİTRO* İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Hilal ŞENTÜRK
185314005

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2024

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 185314005 numaralı Doktora Öğrencisi Hilal ŞENTÜRK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "OVER KANSER TEDAVİSİNDE RESEPTÖR HEDEFLİ İN SİLİKO LİGAND TASARIMININ İN VİTRO İNCELENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Binnur TEMEL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Engin ULUKAYA
İstinye Üniversitesi

Doç. Dr. Huri DEDEAKAYOĞULLARI
Biruni Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Beyza SERVET GÖNCÜ
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi **: 17 Temmuz 2024**
Savunma Tarihi **: 27 Haziran 2024**



Sevgili Aileme,

ÖNSÖZ

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 223S648 numaralı 1002 - Hızlı Destek Hızlı Destek - B projesi ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından 12162 numaralı TÜSEB - A Grubu Acil projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışmasında bana inanan, yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Fahri AKBAŞ'a, doktora öğrenimim süresince desteğini bir an olsun benden esirgemeyen, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanımız aynı zamanda idolüm Prof. Dr. Binnur TEMEL'e, benim için sahip olduğu tüm imkan kapılarını sonuna kadar açan, bilimsel bakış açısı ile bana yol gösteren ve bu çalışmanın büyük bir kısmının gerçekleştiği İSÜMKAM'ın müdürü kıymetli hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya, hocadan öte benim için her zaman bir dost olan sevgili hocam Doç. Dr. Huri DEDEAKAYOĞULLARI'na, bu çalışmanın bel kemiğini oluşturan hesaplamalı analizleriyle bana yol gösteren sevgili hocam Ilke UGUR MARION'a, ODTÜ'de beni misafir ederek çalışmamda emeği büyük olan sayın hocam Doç. Dr. Salih ÖZÇUBUKÇU ve her bilgisini benle paylaşan emeğini unutmayacağım Araş. Gör. Mehmet Seçkin KESİCİ'ye, İstinye Üniversitesi'nde beraber çalışmaktan kendimi hep şanslı hissettiğim her anımda yanımda olan en sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Yelda BİRİNCİ KUDU'ya, tez deneylerimde her zaman yanımda olan beraber çalışmaktan hep keyif aldığım Doç. Dr. Muradiye ACAR'a ve canım dostum halden anlayanı Dr. Öğr. Üyesi Merve ERKISA GENEL'e teşekkür ve saygılarımı sunarım. Ayrıca, üniversite hayatım boyunca aldığım en keyifli dersin hocası olan, Hilo'su olmaktan her zaman mutluluk duyacağım ve hiçbir zaman unutmayacağım çok kıymetli hocam Prof. Dr. VECDİ MELİH ALTAN'a özel teşekkürlerimi sunmak isterim. Doktora hayatım boyunca evden çok zaman geçirdiğim İSÜMKAM'da aile sıcaklığını bana hissettiren ve her derdime koşan başta Araş. Gör. Remzi Okan AKAR'a, Yaren ARASAN'a, Taner KASAPOĞLU'na ve Gizem BULUT'a teşekkürü bir borç bilirim. Bana kattığı ve katacağı her türlü iyilik ve yol arkadaşlığı için sevgili Murat Kaya KÖŞGER'e ayrıca teşekkür ederim.

En önemlisi, bu zorlu yolda yürürken üzüldüğüm ve mutlu olduğum her anda desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, varlıklarıyla bana güç veren, benim için her zaman en iyisini dileyen ve yapan değerli annem Nimet ŞENTÜRK'e ve kıymetli babam Adnan ŞENTÜRK'e sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Haziran 2024

Hilal ŞENTÜRK
(Y. Biyomühendis)

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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hilal Şentürk
İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	x
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı.....	5
1.2 Östrojen ve Östrojen Reseptörleri (ER).....	5
1.3 ER'lerin Yapısal Özellikleri.....	6
1.4 ER α ve ER β 'nin Hücreyel işlevi	7
1.5 ER'nin Çekirdek Düzenleyicileri.....	8
1.6 ER Ligandları	8
1.6.1 Endoöstrojenler	9
1.6.2 Fitoöstrojenler	9
1.6.3 Ksenoöstrojenler	9
1.6.4 Seçici östrojen modülatörleri (SERM).....	10
1.6.5 Metaloöstrojenler	11
1.7 ER α Agonistliği ve Antagonistliği.....	12
1.8 ER'lerinin Hücre İçi Mekanizmaları.....	13
1.8.1 ER'nin doğrudan (direkt) genomik sinyalizasyonu	13
1.8.2 ER'nin doğrudan olmayan (indirekt) genomik sinyalizasyonu	14
1.9 ER α ve ER β 'nin Fizyolojik Rollerini.....	15
1.10 ER α ve ER β 'nin Patofizyolojik Rollerini	16
1.10.1 Over (yumurtalık) kanseri	16
1.10.2 Meme kanseri	17
1.10.3 Prostat kanseri	18
1.11 ER α Hedefli Tedavilerin Over Kanserindeki Yeri.....	19
1.12 Hedefe Yönelik Tedaviler	20
1.12.1 Hedef molekülün belirlenmesi	20
1.13 Moleküler Hedefli Tedavi Türleri.....	22
1.14 Peptit Temelli Terapötikler	23
1.15 Peptit Temelli Terapötiklerin Geliştirilmesi	25
1.15.1 Uç koruması	25
1.15.2 Omurga modifikasyonu.....	26
1.15.3 Yan zincir modifikasyonu	26
1.15.4 Siklizasyon	27

1.16 Siklik (Halkasal) Peptitler	28
1.17 Siklizasyon İşleminde Kullanılan Yöntemler	29
1.18 Disülfid Bağlı Siklik Peptitler	30
1.19 Siklik Peptit Dizilerinin Tasarımı	32
1.20 Kanser Çalışmalarında Siklik Peptitlerin Aktiviteleri.....	35
1.21 ER α Hedefli Peptitlerin Tasarımı.....	36
1.22 LxxLL Motifi ve Hedeflenmesi	37
1.22.1 Küçük molekül LxxLL inhibitörleri.....	37
1.22.2 Lineer peptit LxxLL inhibitörleri.....	39
1.22.3 Disülfid köprülü (bağlı) inhibitör peptitler	40
1.22.4 Tiyoeter ve vinil sülfür köprülü (bağlı) inhibitör peptitler.....	41
1.22.5 Tümü hidrokarbon siklik peptitler	41
1.23 Hipotez	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
2.1 Kullanılan Materyaller ve Cihazlar	44
2.2 Cihazlar	45
2.3 RNA-Seq Analizi ile Hedef Molekülünün Belirlenmesi	46
2.4 Hücre Kültürü.....	47
2.4.1 Hücre hatlarının pasajlanması	47
2.4.2 Hücre hatlarının dondurulması (kriyoprezervasyon)	48
2.4.3 Hücre hatlarından total RNA izolasyonu ve cDNA çevrimi.....	48
2.4.4 Hücre hatlarından total protein izolasyonu	49
2.5 Gradyentli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gradient PCR)	49
2.6 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)	50
2.7 Western Blot.....	51
2.8 <i>İn Siliko</i> Modelleme Çalışmaları.....	52
2.9 Disülfid Bağlı Siklik Peptitlerin (SPler) Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu .	54
2.10 Disülfid Bağlı Peptitlerin Saflaştırılması	55
2.11 Hücre Hatlarına Uygulanan SP'lerin Biyoaktivite Ölçümleri	56
2.11.1 Sülförhodamin B (SRB) testi	56
2.11.1.1 MTT testi.....	56
2.11.1.2 ATP testi	57
2.12 Akış Sitometrisi.....	58
2.13 ELISA	58
2.14 İstatiksel Analizler	58
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	60
3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları	62
3.2.1 Total RNA izolasyonu.....	63
3.2.2 Komplementer DNA (cDNA) eldesi.....	63
3.2.3 Gradient polimeraz zincir reaksiyonu ile ESR1 gen çoğaltılması	63
3.2.4 RT-qPCR ile ESR1 gen amplifikasyonunun gösterimi.....	65
3.3 ER α 'ya Özgü Gerçekleştirilen Disülfid Bağlı Siklik Peptit Tasarımlarının <i>İn Siliko</i> Analiz Verileri.....	68
3.4 Disülfid Bağlı Siklik Peptitlerin Karakterizasyonu	74
3.5 ER α 'ya Yönelik Sentezlenen Siklik Peptitlerin Saflaştırılması.....	80
3.6 Farklı E2 Konsantrasyonlarının ER α (+) Hücrelerinin Proliferasyonuna Olan Etkisi	81
3.7 SP'lerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksiste/proliferasyona olan etkileri	82
3.8 SPlerin Farklı ER α Ekspresyon Seviyelerine Sahip Hücre Hatlarındaki Sitotoksiste/Proliferasyona Olan Etkileri.....	84

3.9 SP Kombinasyonlarının ve Tekli SP Tedavilerinin Hücre Canlılığına Olan Etkisi	87
3.10 SPK Tedavisinin ER α Sinyal Yolu ve Apoptoz İle İlişkili Gen ve Proteinlerin Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	89
3.11 ELISA	93
3.12 Akış Sitometrisi.....	94
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	102
KAYNAKLAR	104
ÖZGEÇMİŞ.....	128



KISALTMALAR

2D	: 2 boyutlu
3D	: 3 boyutlu
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAM	: İkili Hizalama Haritası
BCA	: Bikinkoninik asit tahlili
BSA	: Bovin Serum Albumin
DIEA	: N,N-Diisopropiletilamin
DMF	: Dimetilformamid
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
Fmoc	: Florenilmetoksikarbonil koruma grubu
HBTU	: Heksaflorofosfat Benzotriazol Tetrametil Uronyum
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
TBS	: Tris Tamponlu Salin
TFA	: Trifloroasetik Asit
TIPS	: Triizopropilsilil etinil
TSV	: Sekme ile Ayrılmış Değer
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

SEMBOLLER

°C	: Derece Santigrat
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
Cq	: Döngü eşiği
dk	: Dakika
g	: Gram
h	: Saat
kb	: Kilobaz çifti
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
OD	: Optik yoğunluk
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saniye
xg	: Bağlı merkezkaç kuvveti

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 : RNA-Seq analizi yapılan örnekler	46
Tablo 2.2 : RNA-Seq analiz grupları	47
Tablo 2.3 : qPCR'da kullanılan primerlerin dizileri.	51
Tablo 2.4 : Fmoc kimyasına dayalı katı-faz peptit sentez yöntemi basamakları	54
Tablo 3.1 : OVSAHO, CAO-3 ve BEAS-2B hücre hatlarından elde edilen total RNA'ların miktar ve saflık dereceleri.	63
Tablo 3.2 : OVSAHO ve CAO-3 hücre hatlarının <i>ACTIN</i> ve <i>ESR1</i> genlerinin amplifikasyon değerleri	66
Tablo 3.3 : MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının <i>ACTIN</i> ve <i>ESR1</i> genlerinin amplifikasyon değerleri	66
Tablo 3.4 : KCXLCRLLQ sekansında değişiklik gösteren amino asitlerin (I, S, H, K, D) protein bağlanma ilgisine etkisi.	68
Tablo 3.5 : Tek harfli amino asit kodundaki SP dizileri. Disülfür bağlantılı siklizasyon kırmızı renkli sistein aminoasitlerle temsil edilir.	69
Tablo 3.6 : Sentezlenen siklik peptitler ve moleküler kütleleri.	79

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	: Östrojen reseptörlerinin yapısı.....	7
Şekil 1.2	: Estron (E1), 17 β -estradiol (E2) ve estriolün (E3) kimyasal yapıları.....	9
Şekil 1.3	: ER, ER-ligand kompleksi ve sarmal 12'nin konumlandırılması.....	12
Şekil 1.4	: Östrojenin hücre içindeki sinyal yolları	14
Şekil 1.5	: Sentetik terapötik ilaçların yapıları. (a) dietilstilbestrol; (b) 4-hidroksitamoksifen; (c) raloksifen; (d) etinil estradiol 2.....	19
Şekil 1.6	: Siklizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.	30
Şekil 1.7	: Siklizasyon yöntemlerinin sadeleştirilmiş şematik gösterimi	30
Şekil 1.8	: Disülfür bağlı peptitlerin Fmoc sentezi ile yapılan siklizasyon basamakları.....	31
Şekil 1.9	: Azodikarboksilat aracılı disülfid bağlı siklik peptitlerin eldesi.	32
Şekil 1.10	: Nükleer koaktivatör bağlama inhibitörleri.	38
Şekil 2.1	: Fmoc kimyasına dayalı lineer peptitlerin sentezlenme aşamaları.	55
Şekil 3.1	: EdgeR tarafından oluşturulan diferansiyel ifade analizi MA grafiği.	60
Şekil 3.2	: Yumurtalık tümöründe sağlıklı dokulara nazaran yukarı(kırmızı) ve aşağı(yeşil) regüle edilen genler.....	61
Şekil 3.3	: Yumurtalık tümöründe sağlıklı doku örneklerinin karşılaştırılması için edgeR tarafından tespit edilen diferansiyel olarak eksprese edilmiş bazı genlerin ısı haritası (heatmap) grafiği.	62
Şekil 3.4	: MCF-7 ve OVSAHO hücre hatlarından elde edilen cDNA örneklerinin (1:5 sulandırılmış) farklı bağlanma sıcaklıkları altında elde edilmiş PCR örneklerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	64
Şekil 3.5	: MCF-7 ve OVSAHO hücre hatlarından elde edilen cDNA örneklerinin (1:2 sulandırılmış) farklı bağlanma sıcaklıkları altında elde edilmiş PCR örneklerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	64
Şekil 3.6	: Hücre hatlarındaki ESR1 mRNA amplifikasyon sonuçları.....	66
Şekil 3.7	: Farklı hücre hatlarının göreceli ESR1 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	67
Şekil 3.8	: EST ve KCKLCRLLQ sekanslarının ER α 'ya yanaştırılmış hallerinin üç boyutlu gösterimi.....	69
Şekil 3.9	: KCKLCRLLQ sekansının ER α 'ya yanaştırılmış ve bağ formlarının üç boyutlu gösterimi.....	70
Şekil 3.10	: KCKLCRLLQ sekansına ait zımbalanmış peptit ile ER α etkileşimlerinin atom seviyesinde gösterimi.	70
Şekil 3.11	: EST ve KCSLCRLLQ sekanslarının ER α 'ya yanaştırılmış hallerinin üç boyutlu gösterimi.....	71
Şekil 3.12	: KCSLCRLLQ sekansının ER α 'ya yanaştırılmış ve bağ formlarının üç boyutlu gösterimi.....	71
Şekil 3.13	: KCSLCRLLQ sekansına ait zımbalanmış peptit ile ER α etkileşimlerinin atom seviyesinde gösterimi	72
Şekil 3.14	: EST ve KCILCRLLQ sekanslarının ER α 'ya yanaştırılmış hallerinin üç boyutlu gösterimi.....	72

Şekil 3.15: KCILCRLQ sekansının ER α 'ya yanaştırılmış ve bağ formlarının üç boyutlu gösterimi.....	73
Şekil 3.16: KCILCRLQ sekansına ait zımbalanmış peptit ile ER α etkileşimlerinin atom seviyesinde gösterimi	73
Şekil 3.17: LP1 ve SP1'in kütle spektrumları ile 2D ve 3D yapıları.....	75
Şekil 3.18: LP2 ve SP2'nin kütle spektrumları ile 2D ve 3D yapıları	76
Şekil 3.19: LP3 ve SP3'ün kütle spektrumları ile 2D ve 3D yapıları	77
Şekil 3.20: SP1'den elde edilen HPLC kromatogramı.	80
Şekil 3.21: Saflaştırılmış SP1'e ait HPLC kromatogram.....	82
Şekil 3.22: SP2'e ait HPLC kromatogramı.....	80
Şekil 3.23: Saflaştırılmış SP2 için HPLC kromatogramı.	81
Şekil 3.24: SP3'e ait HPLC kromatogramı.....	81
Şekil 3.25: Saflaştırılmış SP3'e ait HPLC kromatogramı.....	83
Şekil 3.26: Farklı E2 konsantrasyonlarının 48 saat sonra MCF-7 ve OVSAHO hücreleri üzerindeki büyüme etkisi.	82
Şekil 3.27: E2 varlığında ve yokluğunda SP'lerin ve TPBM'nin MCF-7 hücrelerinin canlılığına olan etkileri.....	83
Şekil 3.28: SP'lerin ve TPBM'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücrelerine olan canlılık etkileri.....	86
Şekil 3.29: TPBM ve SPK'nın MCF-7 hücrelerinin canlılığına olan etkisi	89
Şekil 3.30: MCF-7 hücrelerinin ESR1 ve apoptoz ile ilişkili mRNA'ların RT-qPCR analizi	91
Şekil 3.31: TPBM ve SPKların IC ₉₀ dozları ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin apoptoz (p53, Bax, Bcl-2, kaspaz-8) ve ER α ile ilişkili (ER α ve TFF1) protein ekspresyonlarının A) temsili Western blot görüntüsü ile B) nicelik grafikleri.	93
Şekil 3.32: TPBM ve SPKların IC ₅₀ dozları ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin ER α inhibisyonu üzerindeki etkileri.....	94
Şekil 3.33: TPBM ve SPKların IC ₉₀ dozları ile 48 saat boyunca tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde A) Annexin V-FITC, B) Kaspaz-3/7 ve C) mitokondriyal membran potansiyeli değişim aktivasyonunun değerlendirilmesi	97

OVER KANSER TEDAVİSİNDE RESEPTÖR HEDEFLİ *IN SILICO* LİGAND TASARIMININ *IN VİTRO* İNCELENMESİ

ÖZET

İnsan östrojen reseptör alfa (ER α), büyüme, metabolizma ve gelişimde rol oynayan östrojenle indüklenebilen birçok genin transkripsiyonunu düzenleyen bir nükleer reseptör ailesi üyesidir. ER α 'nın dokularda aşırı ifade edilmesi ilişkili olduğu sinyal yollarını aktive etmesine neden olarak, hücrede DNA mutasyonlarının birikmesine, çoğalan hücrelerin neoplastik dönüşümüne ve tümörün ilerlemesine yol açar. Özellikle ER α ekspresyonu ve aktivasyonu hormona bağımlı kanser türlerinin gelişimi için birincil öneme sahiptir. Hormona bağımlı kanser tedavisinde ER α 'yı hedefleyen çalışmalar, hücrelerde apoptozu uyarması ve epitelyal mezenkimal geçişi inhibe etmesiyle kanser tedavisinde uygun bir terapötik hedef olduğunu göstermiştir. Ancak endokrin tedavisine karşı zamanla gelişen direncin üstesinden gelebilmek için ER α 'ya yönelik alternatif yaklaşımlar ligand bağlama alanından çıkıp ER α -DNA veya ER α -kofaktör etkileşimleri (reseptör kutusunun (NR) LxxLL motifinin hidrofobik oyuk) üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hedefli tedavilerde özellikle son yıllarda, terapötik peptitlerle, ER α -kofaktör etkileşimleri gibi protein-protein etkileşimlerinin (PPI) inhibe edilmesi hastalıkların tedavisinde genel bir strateji haline gelmiştir.

Lineer peptit motiflerine göre farmakolojik açıdan daha yüksek performans gösteren, hedefe daha iyi bir afinite ile bağlanan kıstırılmış (siklik) peptitler, yeni ve hedefe yönelik inhibitörler olarak kapsamlı bir şekilde son yıllarda araştırılmaktadır. Bu yüzden bu tez çalışmasında; ER α 'da yer alan çeşitli α -sarmal baskın protein-protein etkileşimlerini hedefleyen siklik peptitler, kofaktör bağlanma inhibitör bölgesi (LxxLL) baz alınarak tasarlanmıştır. Bu bölgeye özgü gerçekleştirilen *in silico* çalışmalarımızda, ER α 'ya bağlanan en kritik amino asitlerin kıstırılmadığı, aksine serbest bırakıldığı siklik peptit tasarımının mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu sayede, yeni dizayn edilen siklik peptitler, ER α 'ya hem özgün hem de biyoesdeğerliği yüksek bir biçimde bağlanan, literatürde sunulan motiflere büyük bir üstünlük sağlayacak şekilde *in silico* olarak hesaplanmıştır. Referans siklik peptit (SP1) ile tez kapsamında türetilen yeni siklik peptitler (SP2 ve SP3) Fmoc kimyası kullanılarak, katı-faz peptit sentez yöntemi ile sentezlenmiş ve DEAD yöntemi ile halkasallaştırılmıştır. Elde edilen lineer ve siklik ham peptitler LC-MS ile analiz edilip, karakterize edildikten sonra ters faz HPLC ile saflaştırılmış ve *in vitro* deneylerde kullanılmıştır. Tez çalışmasında ER α inhibitörü olarak TPBM ticari küçük molekülü, östrojen ile rekabet etmeden ER α 'ya karşı peptitlerimiz ile benzer etki mekanizmasına sahip olduğu için referans molekül olarak kullanılmıştır. Gerçekleştirdiğimiz *in vitro* çalışmalar neticesinde tasarladığımız yeni siklik peptitlerin sadece aktif formadaki ER α (östrojen (E2) ile kompleks haline gelmiş) üzerinde etkili olduğu, E2'den yoksun ortamdaki siklik peptitlerin ER α (+) hücrelerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlendi. Bu durum siklik peptitlerin tasarımında, sadece ER α 'nın aktif formunda açığa çıkan LxxLL motifine bağlandığının göstergesi olmuştur. Aynı zamanda E2 ile

desteklenmiş hücre kültürü ortamında SP'lerin ER α eksprese etmeyen kanser ve sağlıklı hücre hatlarında herhangi bir toksik etki gösterememiş sadece ER α eksprese eden hücreler üzerinde antiproliferatif etki göstermiş olması, peptitlerin ER α üzerinden hücre büyümesini inhibe ettiğini desteklemiştir. Ayrıca oluşturulan peptit kombinasyonlarının hücre hatları üzerinde antiproliferatif ve toksik etki gösterdiği hücre canlılık testleri vasıtasıyla belirtilmiştir.

En etkili kombinasyon grubun SP2 + SP3 ve SP1 + SP2 + SP3'ün hücrelerin ER α ile ilişki yollarında ve önemli apoptoz belirteçleri üzerindeki etkisi de hem gen hem de protein bazında açığa çıkarılmıştır. qPCR ve Western Blot'tan elde edilen veriler içsel apoptoz yolunda rol oynayan *p53*, *p21*, *Bax* ve *Bcl-2* 'nin yanı sıra dışsal apoptoz yolunda rol oynayan *kaspaz-8*'in değişen ekspresyon profilleri hücrelerin siklik peptit kombinasyon tedavisi sonrası her iki apoptoz yolu üzerinden etkileyebileceğini göstermiştir. Yapılan akış sitometrisi analizleri ile etkili kombinasyonlarla tedavi edilen hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesinin artışı ile Annexin V belirteçlerinin aşırı ifadesi hücreleri yoğun olarak erken ve geç apoptoza sürüklediğini desteklemiştir. Bunlara ilave, *Bcl-2* ekspresyonunun ve mitokondriyel membran bütünlüğünün ölçüldüğü akış sitometrisi analizlerinde siklik peptit kombinasyon tedavisi sonrasında hücrelerde *Bcl-2* inaktivasyonun ve mitokondriyel membran bütünlüğü bozulmuş hücre sayısındaki anlamlı artışlar *Bcl-2* sinyal yolunun etkisiz hale getirildiği ve apoptozun mitokondri yoluyla gerçekleştiğini kanıtlamıştır. Ayrıca hücrelere sadece peptit ve peptit kombinasyonları uygulandıktan sonra hücre içinde dağılım gösteren sitoplazmik ve nükleer ER α aktivasyonlarında düşüşün meydana gelmesi siklik peptitlerin ER α 'ya spesifik olduğunu kanıtlar nitelikte olmuştur. Buna ek olarak, MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda önemli bir rolü üstlenen hatta hormon direnci ile güçlü bir ilişkisi bulunan sitoplazmik ER α 'nın, siklik peptit tedavisinden sonrasında aktivitesinin çarpıcı bir şekilde azalmasının apoptozun bu yolak üzerinden indüklediği ilgi çekici bir bulgu olarak elde edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, ER α hedeflemesi için siklik peptitler tasarlanmış, sentezlenmiş ve ER α (+) hücreleri üzerindeki inhibitör etkisi çeşitli *in vitro* çalışmalarla desteklenmiştir. Sonuçlarımızda siklik peptitlerin hücrelerin hem içsel hem de dışsal apoptoz yolunda etkili olarak hücrelerin ölüm mekanizmalarını indüklediği sunulmuştur. Bu tez kapsamında geliştirdiğimiz yeni siklik peptitlerin, yeni teknolojilerle daha da iyileştirilmesinin mümkün olduğunu ve hali hazırda klinik tedavilere alternatif ya da yeni peptit kombinasyon tedavilerinin oluşturulmasında yardımcı bir yaklaşım olabileceğini göstermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Hesaplamalı kimya, koaktivatör bağlanma inhibitörleri, stabilize edilmiş siklik peptitler, insan östrojen reseptörü alfa (ER α), kanser

***IN VITRO* INVESTIGATION OF RECEPTOR TARGETED *IN SILICO* LIGAND DESIGN IN OVARIAN CANCER THERAPY**

SUMMARY

Human estrogen receptor alpha (ER α) is a nuclear receptor family member that regulates the transcription of many estrogen-inducible genes involved in growth, metabolism, and development. Overexpression of ER α in tissues activates its associated signaling pathways, leading to the accumulation of DNA mutations in the cell, neoplastic transformation of proliferating cells, and tumor progression. ER α expression and activation are of primary importance for developing hormone-dependent cancers. Studies targeting ER α in hormone-dependent cancer therapy have shown that it is a suitable therapeutic target in cancer treatment by inducing cell apoptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. However, to overcome the resistance to endocrine therapy that develops over time, alternative approaches to ER α are moving away from the ligand binding domain and focusing on ER α -DNA or ER α -cofactor interactions (the hydrophobic groove of the LxxLL motif of the receptor box (NR)). In targeted therapies, especially in recent years, the inhibition of protein-protein interactions (PPIs), such as ER α -cofactor interactions by therapeutic peptides, has become a general strategy for treating diseases.

Cyclic peptides, which bind to the target with a better affinity and perform pharmacologically better than linear peptide motifs, have been extensively investigated as novel and targeted inhibitors in recent years. Therefore, in this thesis, cyclic peptides targeting various α -helix-dominant protein-protein interactions in ER α were designed based on the cofactor binding inhibitor region (LxxLL). Our *in silico* studies have shown that it is possible to design cyclic peptides in which the most critical amino acids binding to ER α are not restricted but instead released. In this way, newly designed cyclic peptides have been calculated *in silico* that bind to ER α in a unique and highly bioequivalent manner, providing a major advantage over the motifs presented in the literature. The reference cyclic peptide (SP1) and the novel cyclic peptides derived in this thesis (SP2 and SP3) were synthesized by solid-phase peptide synthesis method using Fmoc chemistry and cyclized by DEAD method. The obtained linear and cyclic crude peptides were analyzed and characterized by LC-MS, purified by reverse phase HPLC, and used in *in vitro* experiments. In the thesis study, the TPBM commercial small molecule was used as a reference as it has a similar mechanism of action with our peptides against ER α without competing with estrogen as an ER α inhibitor. As a result of our *in vitro* studies, it was observed that the new cyclic peptides we designed were only effective on ER α (complexed with estrogen (E2)) in the active form, while cyclic peptides in E2-deprived medium did not affect ER α (+) cells. This indicated that the cyclic peptides' design binds only to the LxxLL motif exposed in the active form of ER α . At the same time, in an E2-supplemented cell culture medium, SPs did not show any toxic effect on cancer and healthy cell lines that do not express ER α but only showed the antiproliferative effect on ER α -expressing cells, supporting that the peptides inhibit cell growth via ER α . In addition,

the antiproliferative and toxic effects of the peptide combinations on cell lines were indicated by cell viability tests.

The effect of the most effective combination group, SP2 + SP3 and SP1 + SP2 + SP3, on ER α -related pathways and important apoptosis markers of cells was determined at both the gene and protein level. The data obtained from qPCR and Western blot showed that the altered expression profiles of p53, p21, Bax, and Bcl-2, which are involved in the intrinsic apoptosis pathway, as well as caspase-8, which is involved in the extrinsic apoptosis pathway, showed that the cells were affected through both apoptosis pathways after cyclic peptide combination therapy. Flow cytometry analyses showed that increased caspase 3/7 activity and over-expression of Annexin V markers in cells treated with the effective combinations intensely drove the cells to early and late apoptosis. In addition, flow cytometry analysis of Bcl-2 expression and mitochondrial membrane integrity showed that Bcl-2 inactivation and significant increases in the number of cells with impaired mitochondrial membrane integrity after cyclic peptide combination treatment supported that the Bcl-2 signaling pathway was inactivated and apoptosis occurred through mitochondria. In addition, the decrease in cytoplasmic and nuclear ER α activations distributed in the cell after treatment of cells with only peptides and peptide combinations proved that cyclic peptides were specific for ER α . In addition, cytoplasmic ER α , which plays an important role in the proliferation of MCF-7 cells and has a strong relationship with hormone resistance, decreased dramatically after cyclic peptide treatment, indicating that apoptosis is induced through this pathway.

In conclusion, within the scope of this thesis, cyclic peptides for ER α targeting were designed and synthesized, and their inhibitory effect on ER α (+) cells was supported by various *in vitro* studies. The results show that cyclic peptides induce cell death mechanisms by acting on both the cells' intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. It has been demonstrated that the new cyclic peptides we have developed within the scope of this thesis can be further improved with latest technologies and can be an alternative to current clinical treatments or a helpful approach to creating new peptide combination therapies.

Keywords: Computational chemistry, coactivator binding inhibitors, stabilized cyclic peptides, human estrogen receptor alpha (ER α), cancer

1. GİRİŞ

Östrojenler (estradiol (E2)), dokulardaki büyümeyi, farklılaşmayı düzenleyen steroid hormonlardır [1] ve hücre içindeki fonksiyonlarını östrojen reseptörleri (ER'ler) ile etkileşime girerek gerçekleştirirler. ER'ler, östrojen yanıt elemanları (ERE'ler) yoluyla gen transkripsiyonunu düzenleyen, böylece östrojenlerin normal biyolojik fonksiyonlarını kolaylaştıran ligand bağımlı transkripsiyon faktörleridir. Östrojenler, geleneksel ER'lere (ER α ve ER β) ve GPER1'e bağlanarak genomik ve genomik olmayan etkilerini hücre içinde gösterirler. Hücredeki anormal ER sinyali, çeşitli kanser türlerine [1], polikistik over sendromu ve endometriozis [2] gibi jinekolojik bozukluklar dahil olmak üzere birçok hastalığa neden olmaktadır. ER α ve ER β over kanserli hastaların çoğunda (%60-80) eksprese edilir. ER α , hücre çoğalmasını ve göçünü teşvik ederek yumurtalık kanser hücrelerinin gelişimine ve proliferasyonuna katkıda bulunur. Yumurtalık kanser tedavisinde, dolaşımdaki östrojen seviyelerini azaltan aromataz inhibitörleri ile tamoksifen gibi ER'ya karşı olan hormonal terapi uygulamalarının etkinliği literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir [3]. Yapılan hücre kültürüne dayalı çalışmalar, ER α 'nın yumurtalık kanseri hücrelerindeki işlevselliğini gösterimi için yumurtalık kanseri hücre hatları modelleri kullanılmıştır [4-6]. Büyüme düzenlemesine ek olarak E2, ER α aracılığıyla hücre göçünü ve epitelyal-mezenkimal geçişi de destekler. Bu değişiklikleri, E-cadherinin SNAIL- ve SLUG aracılı aşağı regülasyonu mekanizmasıyla gerçekleştirmektedir [7]. Fibronektin ve laminine bağlanan hücre dışı molekül fibulin, ER α aracılığıyla östrojen tarafından düzenlenir ve hücre-hücre etkileşimlerinde ve hareketliliğinde anahtar bir role sahiptir [8,9]. Ayrıca, ER α ekspresyonuna bağlı GPER1/epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyalinin büyüme yanıtı üzerinde destekleyici bir etkisi olduğu da öne sürülmüştür [10]. Literatürde yapılan bu çalışmalar, ER α 'nın yumurtalık kanser gelişimi için teşvik edici bir faktör olma eğiliminde olduğunu ve birçok büyüme sinyal yolağı ile ilişkili olarak kanser gelişimini desteklediğini göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı ER α , yumurtalık kanser tedavisinde kullanılabilecek uygun bir farmakolojik hedef olarak karşımıza çıkmaktadır [11]. Bu yüzden yumurtalık kanser

tedavi stratejisinde, ER α 'yı doğrudan veya dolaylı yollarla inhibe etmek etkili bir metot haline gelmektedir. Günümüz kanser tedavisinde ER sinyal yolağının çoklu inhibitörleri kullanılmaktadır ve etki mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır; (i) Endojen östrojen üretimini azaltan bileşikler (aromataz inhibitörleri (AI) ve gonadotropin salgılayan hormon agonistleri), (ii) ER α 'yı doğrudan antagonize eden bileşikler (seçici östrojen reseptörü modülatörleri ve seçici östrojen reseptörü indirgeyicileri (SERM'ler ve SERD'ler)). Seçici östrojen reseptörü modülatörleri (SERM), östrojenle rekabet etmek ve ilişkili olduğu kofaktörleri değiştirerek ER aktivitesini modüle etmek için tasarlanmış anti-östrojenlerdir [12]. Normal koşullar altında östrojene bağlı ER α 'daki H12'nin, ligandın ligand bağlama cebine kapanmasına ve mühürlemesine izin verir, bu da AF-2 yarığının oluşmasına yol açar. Reseptör üzerindeki LxxLL motifleri, bu yarığa çekirdek düzenleyicilerinin bağlanmasına izin verir ve transkripsiyon başlatılır. Fakat, ER α 'ya östrojen yerine bir SERM'in bağlanması, asılı yan zincirdeki sarmal 11 ve 12 arasında konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Bu durum, H12'nin ligand bağlama bölgesinin (LBD'yi) kapatmasını engeller ve H12'yi AF-2 yüzeyinin statik bölgesine ulaşmasını zorlaştırır. Böylelikle, H12'nin kendi LxxLL motifini kullanarak AF-2 yarığı ile koaktivatörün bağlanacağı cebi tıkar. Bu etkileşim, koaktivatör proteinlerin yapıya bağlanmasını önler, dolayısıyla reseptörün aktivasyonu bloke eder [13,14]. SERM'ler, ER α 'nın ligand bağımlı aktivasyonunu hedefler, ancak zamanla hücreler bu mekanizmaya karşı da direnç gösterirler. Özellikle meme kanserlerinin yaklaşık %30'u SERM'lere uzun süre maruz kaldıktan sonra direnç geliştirmektedir [15]. Gelişen bu direncin üstesinden gelebilmek için ER aktivitesini hedeflemenin alternatif yöntemleri ortaya çıkmaktadır. Seçici östrojen reseptörü indirgeyicileri (SERD'ler), reseptörün bozulması yoluyla ER α sinyalini inhibe etmek için geliştirilmiştir. ER α aktivitesini inhibe etmeye yönelik alternatif yaklaşımlar, ligand bağlama alanının ötesine geçer ve ER-DNA veya ER-kofaktör etkileşimlerini hedef alır. SERD'lerden biri olan elektrofil disülfid benzamidin (DIBA), tamoksifene dirençli ve ER α (+) olan kanser hücrelerinde, tamoksifene olan duyarlılığı geri kazandırdığı ve kombine tedavinin tamoksifene dirençli kanser geliştiren hastalar için bir seçenek olabileceği gösterilmiştir [16]. Shapiro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise başka bir SERD olan teofilini, 8-[(benziltiyo)metil]-(7CI,8CI) (TPBM)'yi ER α -DNA etkileşiminin engelleyen küçük bir inhibitör molekül olarak tanımlamışlardır [17]. Ayrıca TPBM, T47D meme kanseri hücrelerinde ER α aracılı transkripsiyonu inhibe ettiği ve bununla birlikte ER α (+) BG-

1 yumurtalık kanseri hücrelerinin östrojene bağımlı büyümesini inhibe ettiği de gösterilmiştir. ER α -kofaktör etkileşimlerinin inhibitörleri, korunmuş bir bölge olan reseptör kutusu (NR) LxxLL motifinin bilinen yapısı ve bağlandığı hidrofobik oyuk bölgesini hedef alınarak tasarlanmaktadır. Bu tür inhibitörler aynı zamanda seçici olarak ER α sinyalini hedefleyebilen potansiyeli yüksek tedaviler olarak gösterilmektedir. Sonuç olarak, ER α -kofaktör etkileşimlerinin inhibitörleri (terapötik peptitlerle protein-protein etkileşimlerinin (PPI) inhibe edilmesi) kanser tedavisinde güçlü bir strateji haline gelmiştir [18].

Protein-protein etkileşimleri (PPI'ler), hücrelerin işlev görmesini sağlayan hücre içindeki moleküler sinyal mekanizmalarının önemli bir bileşenidir [19]. Proteomik ve yapısal biyolojideki gelişmeler, çoğu hücrenel süreç ve biyolojik fonksiyonda yer alan birçok PPI'lerin keşfedilmesine yol açmıştır [20,21]. Küçük moleküller ve antikorlarla karşılaştırıldığında PPI'ler, inhibitör veya aktivatör olarak bir takım yapısal avantajlar içermektedir. Bu nedenle, PPI'lerin bilinen kristal yapısına dayanan yeni bir peptit ilaç keşif teknolojisi olan “peptitlerin rasyonel tasarımı” son yıllarda ilaç adaylarının keşfi için umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir [22,23]. İyi hedef özgüllüğü, azaltılmış toksisitesi ve diğer olumlu özellikleri sayesinde PPI'lerin son yıllarda terapötik peptitlerle inhibe edilmesi hastalıkların tedavisinde genel bir strateji haline gelmiştir [24,25]. Peptit türevli terapötiklerin rasyonel tasarımı genellikle altta yatan protein-peptit etkileşiminin yapısal karakterizasyonunu gerektirmektedir. Deneysel karakterizasyonun zor olabileceği göz önüne alındığında, güvenilir hesaplama araçlarına ihtiyaç vardır. Bu yaklaşımların başında, hedef PPI'lerin çözülmüş kristal yapısına dayanan bilgisayar destekli biyoinformatik teknolojisi gelmektedir. PPI'lerin bağlama arayüzünün biyoinformatik ve hesaplamalı analizi, etkileşen iki proteinin yüzeyindeki temel amino asitlerin tanımlanmasını sağlar [26,27]. Bununla birlikte, peptitlerin aktivitelerini ve fizikokimyasal özelliklerini geliştirmek için peptit siklizasyonu ve omurga modifikasyonu gibi optimizasyon işlemlerine gerek duyulmaktadır [28,29]. Siklizasyon modifikasyonu ile elde edilecek siklik peptitler, lineer peptitlerle karşılaştırıldığında daha yüksek stabilite, kolay üretim ve daha iyi hücre geçirgenliği gibi çeşitli avantajlara sahiptirler [30,31]. Şimdiye kadar 40'tan fazla siklik peptit, klinik kullanım için onaylanmıştır ve burada disülfit kaynaklı siklik peptit üretim yolu en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir [32,33]. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar; lanreotid ve romidepsin bu tür disülfit kaynaklı siklik

peptitlerden sadece bazılarıdır [33]. Disülfid kaynaklı siklik peptitler geleneksel olarak, sırasıyla 9-florenilmetiloksikarbonil (Fmoc)-katı faz peptit sentezi (SPPS) ile yapılan peptitil reçinelerinin bölünmesiyle hazırlanan lineer peptitlerin serbest veya korunmuş tiyol gruplarının hava veya iyot ile oksidasyonu yoluyla çözelti içinde sentezlenmesiyle oluşturulur. Siklik disülfid peptitleri sentezlemek için alternatif bir yaklaşım olarak, son zamanlarda disülfid bağlarının peptit zinciri yapımı sırasında olduğu disülfür güdümlü siklik peptit sentezi (DdCPS) kullanılmaktadır. İki farklı kükürt içeren peptit fragmanından katı faz disülfid ligasyonu (SPDSL) tarafından iki peptit fragmanı arasında çapraz bağlanan disülfid bağlanmanın ardından, molekül içi siklizasyona her reaksiyon merkezinin yakınlık etkisi katkıda bulunur ve moleküller arası amid bağı oluşumundan daha verimli ve daha yüksek bölgesel seçicilik oluşturulabilmektedir [34,35]. Bununla birlikte, bu sentezler sonunda, reaksiyon çözeltisinden N-terminal Fmoc-grubu ve diğer koruma gruplarının ortamdaki uzaklaştırılması gerektiğinden kapsamlı bir HPLC saflaştırması işlemi yapılması gerekmektedir.

ER α hedefli ilaçlara karşı zamanla geliştirilen direnç mekanizmalarının önüne gelebilmek için en umut vaat eden yaklaşım, ER α -kofaktör bağlanma bölgesini inhibe etmek olduğu yukarıda bahsedilmiştir. LxxLL motifli peptitler, steroid reseptörlerinin yüzeyine bağlanan peptit taklitlerini tasarlamak için kullanılmıştır ve klinikte halihazırda kullanılan terapötiklere direnç gösteren bazı vakalarda aday tedaviler olarak sunulabilmektedir [36-38]. Disülfür bağları doğrusal peptidleri stabilize edererek birçok peptit ilacın biyolojik etkilerinde önemli bir rol oynarlar [39,40]. Literatürde geliştirilen disülfür köprülü peptitlere ilişkin birkaç çalışma, özellikle ER α 'nın ortak aktivatör bölgesini hedef almıştır ve ER α -kofaktör bağlanma bölgesini inhibe eden ilk disülfid bağıyla stabilize edilmiş siklik (PERM-1), Leduc ve ark. tarafından geliştirilmiştir [41]. Daha sonraki çalışmalarda PERM-1'in farklı analogları tasarlanmış ve bunların ER α 'ya karşı daha yüksek sarmal karaktere ve daha düşük inhibisyon sabitine [42] daha yüksek bir afiniteye [43] ve ER α ve ER α aracılı transkripsiyonu önemli ölçüde etkileyerek ilgili pS2 geninin mRNA ekspresyonunu aşağı regüle edebildiği gösterilmiştir [44,45]. Sonuç olarak, yapılan çalışmalar neticesinde ER α 'ya özgü olan siklik peptitlerin disülfid reaksiyonuyla modifiye edilmesi reseptöre olan afinitelerini arttırdığını göstermiştir. Böylelikle, çeşitli kimyasal ortamlar altında birçok proteinin yapısal motiflerinin stabilize edilebileceği

ve etkinliğinin artırabileceği vurgulanmıştır [36,41-43]. Bu sayede, LxxLL imza motifi baz alınarak ER α hedefli siklik özgün peptit kütüphaneleri farklı yollarla oluşturulabilmektedir. Bunun neticesinde, farklı reaksiyonlarla ve modifikasyonlarla elde edilebilecek protein mimikleri ile ER α ifadesi yüksek olan kanser türleri için daha etkin bir tedavi yöntemi imkanı sunulabilecektir.

1.1 Tezin Amacı

Tezin temel amacı, ER α 'e özgü antagonist etki gösteren siklik peptitlerin *in siliko* yaklaşımdan faydalanarak etkinliğinin *in vitro* olarak kanser ve sağlıklı hücre hatları üzerinde incelenmesidir. Tezde yapılan hedefli tedavinin temelini oluşturan ER α , kanser gelişiminde önemli bir role sahip olması nedeniyle özellikle reseptör ekspresyonunun arttığı farklı kanser türlerinin tedavisinde önemli bir hedef olarak değerlendirilmektedir. Bu tez ile son yıllarda lineer antagonist peptitlerden üstün olduğu kabul edilen siklik antagonist peptit motiflerinin *in siliko* eldesi ile literatürde sunulan referans siklik peptitinden (SP1) daha etkin siklik peptit motiflerinin (SP2 ve SP3) elde edilmesi amaçlandı. Bu birincil amaçtan sonra, özellikle SP2 ve SP3'ün antagonist etkisini ve etkili olacağı gen, protein, hücreölüm ve transkripsiyon faktörü aktivasyon mekanizmalarını ayrıntılı bir şekilde açıklığa kavuşturmak için ER α (+) hücre hatları ile tedavi etmek tez çalışmasının ikincil amacını oluşturmuştur.

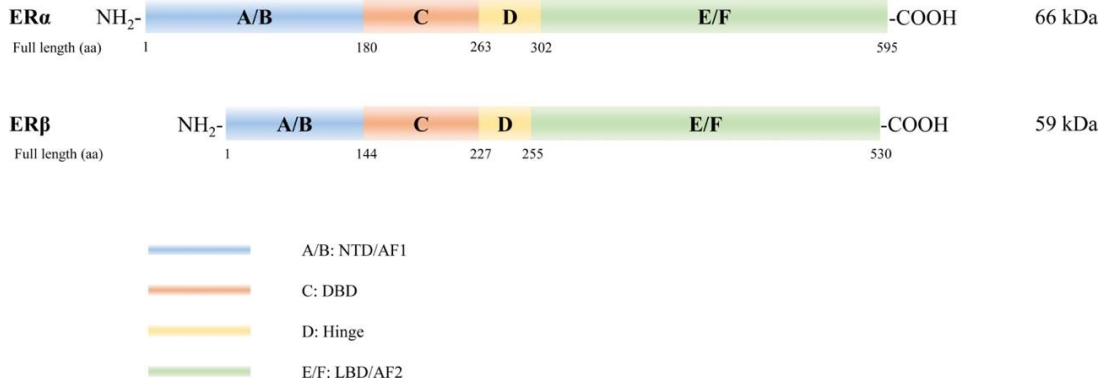
1.2 Östrojen ve Östrojen Reseptörleri (ER)

Östrojenler (estradiol (E2)), hem kadınlarda hem de erkeklerde vücutta çeşitli etkilere aracılık ederek üreme, kardiyovasküler, iskelet, endokrin, sinir ve bağışıklık sistemlerinde fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenleyen steroid hormonlardır [46]. Bu nedenle kısırlık, endometriozis, polikistik over sendromu ve çeşitli kanser türleri gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilir. E2, fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde önemli düzenleyici rollere katılırlar [1]. Özellikle, kadın üreme sisteminde oynadığı rol ve ikincil cinsel özelliklerin gelişimi, en önemli işlevi olarak kabul edilmektedir. Östrojenin hücreölüm reseptörleri, nükleer reseptör ailesindeki östrojen reseptörleri (ER alfa (ER α) ve ER beta (ER β)) ve membran östrojen reseptörleridir (mER'ler; G proteinine bağlı reseptör 30 (GPR30)). Östrojen ve ilgili reseptörlerinin hücre içindeki etkileşimlerinin geçmişi 500 milyon yıldan daha eskiye dayandığından oldukça

karmaşıktır [47]. İlginçtir ki, 1996 yılında yüksek homolojiye sahip başka bir östrojen reseptörü tanımlanana kadar östrojen fonksiyonlarının, 1962'de keşfedilen tek bir reseptör aracılığıyla aktive edildiğine inanılıyordu [48]. O zamandan beri, birincisi ER α ve ikincisi ER β olarak reseptörler yeniden adlandırıldı. Üçüncü östrojen reseptörü 2000'li yıllarda keşfedilip karakterize edildi [49,50] ve G proteinine bağlı reseptör 30 (GPR30)/G proteinine bağlı östrojen reseptörü 1 (GPER) olarak adlandırıldı.

1.3 ER'lerin Yapısal Özellikleri

Transkripsiyon düzenleyicilerinin nükleer hormon reseptörleri süper ailesinin üyeleri olarak östrojen reseptörleri ER α ve ER β 'nin yapıları çeşitli fonksiyonel alanlardan oluşur ve birçok ortak yapısal bölgeye sahiptir [51]. Temel fonksiyonel alanlar A/B, C, D ve E/F olarak adlandırılır ve her iki reseptörün tam formu Şekil 1.1'de gösterilmiştir. A/B bölgesi, gen transkripsiyon işlemlerine dahil olan amino-terminal alanını (NTD) temsil eder ve hedef dizilere bağlanmaya aracılık eden bir çinko parmağı içerir. C bölgesi, östrojen reseptör dimerizasyonuna ve kromatindeki spesifik dizilere bağlanmaya katkıda bulunan DNA bağlanma alanını (DBD) ifade eder. Bu temel dizilerin tamamı östrojen yanıt elemanları (ERE) olarak bilinir [52,53]. D alanı ise, C ve E alanlarını birbirine bağlayan ve şaperon proteinlerine bağlanabilen bir menteşe bölgesidir. Bu bölge aynı zamanda östrojen bağlanmasıyla, reseptör-ligand komplekslerinin çekirdeğe yer değiştirmesine izin veren nükleer lokalizasyon sinyalini de içerir. Ligand bağlanma alanı (LBD) olarak da bilinen karboksi terminalindeki E/F bölgesi, östrojen bağlanma alanının yanı sıra koaktivatörler ve ortak baskılayıcılar için bağlanma bölgelerini içerir. Son olarak, aktivasyon fonksiyonu (AF) alanları AF1 ve AF2 olarak bilinen östrojen reseptör transkripsiyonel aktivitesinin iki ek düzenleyicisi sırasıyla NTD ve DBD'de bulunur [54]. Bu reseptörlerin aracılık ettiği transkripsiyonel düzenleme mekanizmaları, AF1 ve AF2'nin sinerjistik etkilerini içerir [55]. AF2'nin aksine AF1'in aktive edilmesi için hormonların veya steroidlerin bağlanması gerekmez [56]. ER α ve ER β 'nin, NTD, DBD ve LBD alanları sırasıyla %16, %97 ve %59 benzerlik göstermektedir [57].



Şekil 1.1 : Östrojen reseptörlerinin yapısı. Altı yapısal ve işlevsel alan vurgulanmıştır: A, B alanı (amino-terminal veya NH₂-terminal alanı [NTD], aktivasyon fonksiyonu 1 [AF1]); C alanı (DNA bağlama alanı [DBD]); D alanı (C ve E alanını birbirine bağlayan menteşe bölgesi); E, F alanı (karboksil- veya COOH-terminali, ligand bağlama alanıdır [LBD], AF2) [11].

1.4 ERα ve ERβ'nin Hücresel İşlevi

Östrojenin biyolojik etkilerinin önemli araçları olan östrojen reseptörleri α ve β , homolog olmayan kromozomlar üzerinde bulunan sırasıyla ESR1 ve ESR2 genleri tarafından kodlanır. ER α ve ER β 'nin ekspresyonu doku ve hücrelerde büyük farklılıklar gösterir. ER α ağırlıklı olarak rahim, overlar (over) ve göğüslerde eksprese edilirken, ER β esas olarak sinir sistemi, overler, kardiyovasküler sistemler ve erkek üreme sisteminde eksprese edilir [57]. ER α ve ER β 'nin işlevleri, östrojenle ilişkili hastalıkların birçok terapötik tedavisiyle hedeflenebilir. Bu terapötik müdahaleler, tedavi stratejisini optimize etmek için ER α ve ER β mekanizmalarının anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır. Nükleer hormon reseptörleri gen ifadesini gerçekleştirmek için çekirdekte bulunur. Östrojen reseptörleri ise, inaktive edilmiş ER'ler esas olarak çekirdekte (~%95) bulunurken, geri kalanı sitoplazmada bulunur. Ancak membranda lokalize olan ER α , atipik bir G proteinine bağlı reseptör olarak görev yapar [58,59]. Ligand aktivasyonu genellikle şaperondan (Hsp90) ayrıldıktan sonra monomerin dimerizasyonuna yol açar ve sitozolik reseptörlerin çekirdeğe translokasyonunu sağlar. Diğer steroid hormon reseptörleri gibi ER'ler de transkripsiyonda homolog dimerler ve/veya heterodimerler olarak görev yapar, çekirdek düzenleyicileri bir araya getirir ve bunları östrojen yanıt elemanları (ERE'ler) ile birleştirir [60-62]. Aktifleştirilmiş östrojen reseptörleri, transkripsiyon faktörleriyle birleşerek dolaylı olarak DNA'ya bağlanabilir ve transkripsiyon, bir ligandın yokluğunda translasyon

sonrası modifikasyonla düzenlenebilirler [63]. ER'ler, ligand ve dokuya bağlı olan çok sayıda genin ekspresyonunu hem pozitif hem de negatif olarak düzenlerler.

1.5 ER'nin Çekirdek Düzenleyicileri

Hücre içinde transkripsiyonun başlatılması karmaşık bir süreçtir ve birçok proteinin hedef gen promotöründe etkileşimini gerektirir. ER tarafından transkripsiyonel aktivasyon, genel transkripsiyon faktörleri, koaktivatörler, korepresörler, kointegratörler, histon asetiltransferazlar ve histon deasetilazlar gibi transkripsiyonel düzenleyicilerin katılımını gerektirir [64-66]. Bu düzenleyicilerin tümü, transkripsiyonu ve hedef gen promoterlerinin ulaşılabilirliğini değiştirmek için etkileşime girerler. Koaktivatörler, transkripsiyonun gücünü artıran proteinlerdir. Koaktivatörler ile ER arasındaki temas, koaktivatörde mevcut olan LxxLL ("L" lösini, "X" ise herhangi bir kalıntıyı temsil eder) motifi aracılığıyla yapılır [67]. Ancak bu etkileşim için ER üzerinde gerekli olan bölge dizisi değişiklik gösterir. Koaktivatörler arasında p160 ailesinin üyeleri olan steroid reseptör koaktivatörü 1 (SRC-1), SRC-2 ve SRC-3 yer alır. p300 ve CREB bağlayıcı proteinler (CBP), DNA'ya bağlanmayıp SRC-1 gibi diğer transkripsiyon faktörleri tarafından promotörlere alındıkları için kointegratörler olarak adlandırılırlar. Korepresörler transkripsiyonu baskılar ve nükleer reseptör korepresörünü (NCoR) ve retinoid ve tiroid hormon reseptörü (SMRT) bu susturma mekanizmasının elemanlarındanıdır.

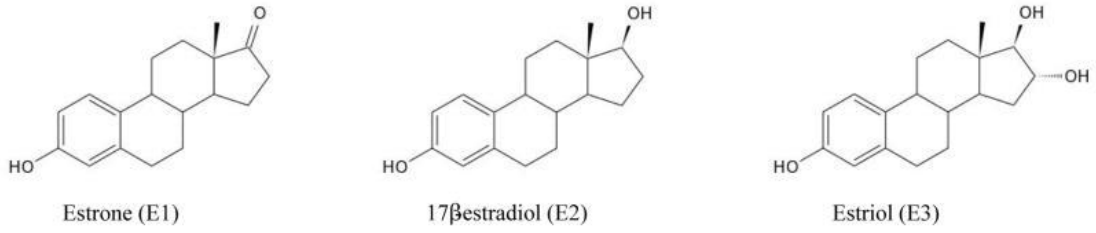
1.6 ER Ligandları

Vücutta doğal olarak üretilen östrojenlere ek olarak, çeşitli küçük organik ve inorganik moleküller dizisi, LBD alanını spesifik bir şekilde tanıma yetenekleri nedeniyle östrojen reseptörü ligandları olarak görev yaparlar. Bu ligandların çoğunluğu ERA'ya karşı daha yüksek seçicilik sergilerken, iki izoformun ligand bağlanma cepleri arasındaki oldukça yüksek benzerliğe rağmen yakın zamanda bir dizi ER β seçici bileşik de keşfedilmiştir. ERA ve ER β 'nın genellikle antagonistik bir şekilde etkili olurlar. Örneğin, ERA'nın meme dokusundaki mitojenik etkisi, meme karsinomunun gelişmesine yol açan hücrel proliferasyondan sorumluyken, ER β 'nın aktivasyonu memede anti-proliferatif bir etkiye sahiptir [68]. Benzer şekilde ER β 'nın prostat, kolon, akciğer ve beyin gibi diğer dokular üzerinde de anti-proliferatif etki gösterdiğine inanılmaktadır [69-71]. Buna göre, ER β 'yı seçici olarak aktive edebilen

küçük molekülü ligandların geliştirilmesi, kanserler ve nörolojik bozukluklar gibi endikasyonların tedavisinde de umut vaat eden bir yöntemdir [72,73].

1.6.1 Endoöstrojenler

Endoöstrojenler vücutta endojen olarak üretilen fizyolojik östrojenlerdir. Bu östrojenlere örnek olarak Şekil 1.2'deki estron (E1), estradiol veya östradiol (E2) ve estriol (E3) verilebilir. Endoöstrojenler, kadınlarda overler ve erkeklerde testisler gibi cinsiyet bezlerinin yanı sıra karaciğer, beyin ve adrenal bezler gibi diğer organlar tarafından kolesterolden üretilen steroidal bileşiklerdir. Östradiol hem kadınlarda hem de erkeklerde baskın form iken, estriol öncelikle hamilelik sırasında ve estron menopoz sırasında üretilir. Kadınlarda cinsel gelişim ve üreme fonksiyonlarındaki rolüne ek olarak östradiol, hem erkeklerde hem de kadınlarda lipid metabolizması, kardiyovasküler fonksiyon ve kemik gelişimi gibi çok sayıda başka fizyolojik fonksiyonda da rol oynar [74-76]. Endoöstrojenler aynı zamanda oral kontraseptiflerin ve hormon replasman tedavisinin de bileşenleridir.



Şekil 1.2 : Estron (E1), 17β-estradiol (E2) ve estriolün (E3) kimyasal yapıları [77].

1.6.2 Fitoöstrojenler

Fitoöstrojenler, bitkiler tarafından doğal olarak üretilen, steroidal olmayan polifenolik bileşiklerdir. Üç ana gruptan; izoflavonlar, kumestanlar ve lignanlardan oluşur. Estradiol ile kimyasal ve yapısal benzerlikleri olduğu için fitoöstrojenler, östrojen reseptörlerinin LBD alanına bağlanma ve estradiol bağlanmasını rekabetçi bir şekilde bloke etme yetenekleri sayesinde östrojenik veya antiöstrojenik etkiler gösterebilir [78]. Özellikle genistein, coumestrol ve liquiritigenin, ERa'ya kıyasla çok daha yüksek afiniteyle LBD alanına bağlanma yetenekleri sebebiyle ERβ'ya karşı daha seçicidirler. [79,80].

1.6.3 Ksenoöstrojenler

Ksenoöstrojenler "yabancı" östrojenler olarak tanımlanır. Ksenoöstrojenler son derece yüksek lipid çözünürlüğüne sahip olduklarından ve yapısal olarak doğal endojen

östrojenlere benzer olduklarından, östrojen reseptörlerine bağlanabilirler. Ksenoöstrojen kaynakları arasında plastikler, böcek ilaçları, kimyasallar ve su sistemleri bulunur [81,82].

1.6.4 Seçici östrojen modülatörleri (SERM)

Seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM'ler), östrojen reseptörü agonistleri veya antagonistleri olarak hedef organlardaki hücre içi östrojen reseptörleri ile etkileşime giren yapısal olarak farklı bileşiklerdir. ER α için kısmi bir agonist, ER β reseptörleri için ise saf bir antagonist olarak görev yapar [83]. İdeal olarak tasarlanmış bir SERM'in amacı, östrojenin kanserojen etki gösterdiği dokularda bir antagonist olarak görev yaparken, uterus, gastrointestinal, kemik, serum lipitleri gibi östrojenin yararlı etkilere sahip olduğu diğer dokularda agonist veya kısmi agonist olarak görev yapmaktır [84]. Hem menopoz öncesi hem de menopoz sonrası kadınlarda meme kansinomunun tedavisi için tasarlanan tamoksifen, raloksifen gibi FDA onaylı SERM'lerin fonksiyonu şu şekilde işler; (i) her iki ER reseptör izoformunun LBD'sine bağlanır ve 17- β -Estradiol (E2) bağlanmasını rekabetçi bir şekilde bloke eder, (ii) LBD bölgesine bağlandığında, yan zinciri sarmal 12'nin (H12) AF-2'nin aktif bir konformasyonunu oluşturmasını durdurur [85]. (iii) H-12, AF-2 hidrofobik oluğa sabitlenir ve ortak aktivatörün bağlanmasını kısıtlar. Ligand bağlanmasından sonra sarmal 12'nin yeniden konumlandırılması bu nedenle östrojenik ve anti-östrojenik etkiler için önem arz etmektedir [86,87]. Günümüzde, Tamoxifen, Raloxifene, Toremifene gibi belirgin aktiviteye sahip bir dizi SERM ilaç piyasasındaki yerini korumakta ve birçoğunun meme ve uterustaki doku seçiciliğinin antagonistik bir etkiye sahip olduğu klinik çalışmalarca ifade edilmektedir [88]. Fakat mevcut SERM'lerin tamoksifende olduğu gibi bazı sınırlamaları vardır. Östrojenle ilişkili meme kanseri hastaların tedavisinde tercih edilen bir ilaç olmasına rağmen, birkaç yıllık tedaviden sonra ilaca karşı direnç gelişir. Tamoksifenin meme kanserinin uzun süreli tedavisinde ve yüksek risk sahibi kadınlarda kanserin önlenmesi için yaygın olarak kullanılması sonucunda, sıcak basması, kardiyak anormallik, tromboembolik bozukluklar, oküler toksisite ve ilaca bağlı endometrial kanser gelişimi olduğu ortaya çıkmaktadır [89-91]. Toremifen ile uzun süreli tedavi gören kadınlarda endometrial kanser gelişme riski de daha yüksektir [92]. Raloksifen kullanımı da zamanla hastalarda kan pıhtısı, derin ven trombozu ve pulmoner emboli görülme sıklığını artırır. Bu yüzden meme kanseri üzerinde iyi bir anti-östrojenik etkisinin yanı sıra kemik ve serum lipit sentezi üzerinde östrojenik

etkiye sahip olan ve rahim üzerinde nötr etki gösteren 'ideal' bir SERM arayışı halen devam etmektedir. Çünkü, şu anda kullanılan mevcut ilaçlar bu mekanizmaları tam anlamıyla karşılayamamaktadır [93]. Bahsi geçilen SERM'lerin meme ve uterusta oluşturduğu bu zıt etki, H12 sarmalının agonist ve antagonist bağlanmasına yanıt olarak LBD alanı içinde iki farklı pozisyonu işgal etme yeteneği ile ilişkilendirilir. Başka bir deyişle H12 sarmalı, biyolojik bağlama bağlı olarak bu iki farklı konum arasında geçici olarak rezonansa girme eğilimi taşır. Ko-aktivatörlerin yokluğunda H12 sarmalı, SERM bağlanması üzerine ağırlıklı olarak LxxLL bölgesini işgal eder. Transkripsiyonel ortak aktivatörlerin hücrel konsantrasyonu arttıkça H12 sarmalı, LxxLL bölgesinden rekabetçi bir şekilde yer değiştirecek ve agonist bölgede yeniden birleşecek, böylece SERM bağlanmasına yanıt olarak LBD alanının transkripsiyonel aktivasyonunu mümkün kılacaktır. Bu durum SERM'lerin agonist veya antagonist olarak hareket etme yeteneğinin, farklı dokulardaki transkripsiyonel ortak aktivatörlerin yardımcı baskılayıcılara olan farklı oranlarından kaynaklandığını göstermektedir [94-96]. Bu iki zıt durumu terapötik açıdan ele alındığında ER agonistlerinin tasarımı, bağlanmalarının H12 sarmalının, E2'nin bağlanmasıyla indüklenene benzer bir şekilde LBD alanı içindeki agonist bölgeyi işgal edecek yönelimini destekleyecek şekilde olması gerekir. Diğer yandan, ER antagonistlerinin tasarımı, bağlanmalarının H12 sarmalını LBD alanı içinde yüksek afinite ile LxxLL bölgesini işgal edecek şekilde yeniden yönlendireceği ve böylece transkripsiyonel ortak aktivatörlerin artan hücrel seviyeleri tarafından rekabetçi bir şekilde yer değiştirilemeyeceği şekilde olmalıdır. Bu antagonist tasarım aslında tamoksifen ve raloksifen gibi SERM'ler tarafından geniş çapta benimsenmiştir [13,14]. Ancak, yeni nesil antagonistlerin, artık LBD alanı içindeki iç hidrofobik cebe bağlanmak için E2 ile rekabet etmek yerine LxxLL bölgesine yüksek afiniteyle doğrudan bağlanabilir olması gerekmektedir. Bu amaçla türetilen yeni küçük moleküllerin tasarlanması veya taranması daha da önem kazanmaktadır.

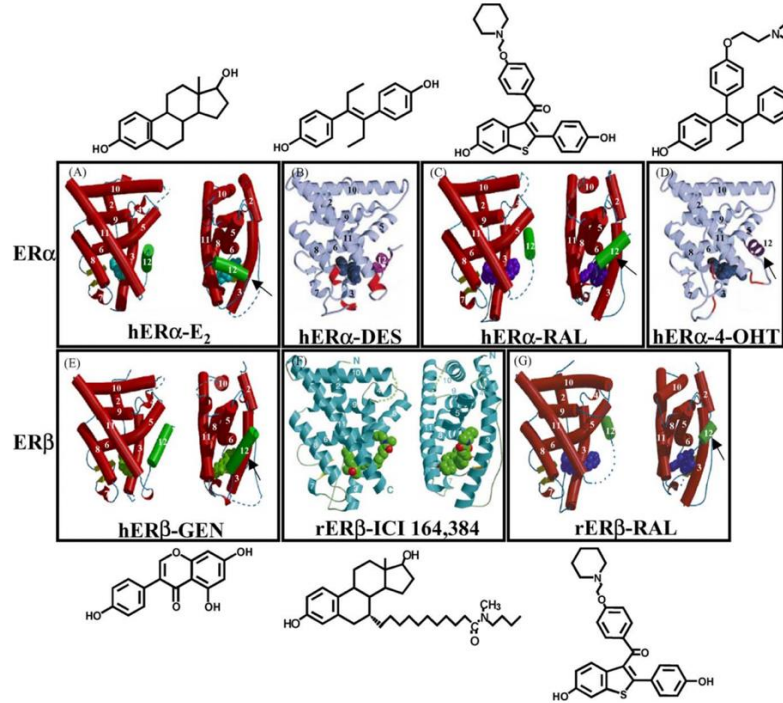
1.6.5 Metalöstrojenler

Metalöstrojenler östrojen reseptörünü (ER) aktive eden küçük iyonik metallerdir. Çalışmalar, metalöstrojenler ER'ye bağlandığında östrojenle düzenlenen genlerin transkripsiyonunda bir artış olduğunu ve bunun da östrojene bağımlı meme kanserinin gelişmesine neden olduğunu göstermiştir. Bir metalöstrojen olan metilcıva (MeHg) dış ortamda bulunur ve orta ila yüksek konsantrasyonlarda toksiktir. Bununla birlikte,

daha düşük konsantrasyonlarda MeHg, ER-pozitif meme kanserlerinin çoğalmasını teşvik edebilir ve hücreleri pro-apoptotik sinyallere karşı koruyabilmektedir [97].

1.7 ER α Agonistliği ve Antagonistliği

ER ile komplekslenen ligandların kristal yapıları, reseptör agonizmi ve antagonizmasının yapısal analizine ışık tutmaktadır. E2 ve raloksifen ile kompleks oluşturmuş insan ER'nin LBD'sine yönelik ilk çalışmalar, E2 ve raloksifenin ER içinde aynı bölgeye bağlanmasına rağmen yapısal farklılıklar ortaya çıkardığını göstermektedir. Sarmal 12 (Şekil 1.3A, yeşil), ER -E2 kompleksindeki [13,98] ligand bağlama cebinin üzerine konumlanır ve böylelikle koaktivatörlerle etkileşime girebilen fonksiyonel bir AF2 alanı ortaya çıkarır. Bunun tersine, raloksifenin yan zinciri bağlama cebine sığmayacak kadar uzun olduğundan sarmal 12'nin yerini işgal ederek [13,98] yeterli bir AF2 bölgesinin oluşumunu engeller. Çalışmalarda dietilstilbestrol (DES) (Şekil 1.3B), [99] ve ortak aktifleştirici GRIP1'in da insan ER'si ile olan etkileşimi doğrudan analiz edilmiştir. Raloksifen gibi, 4-hidroksitamoksifen de (tamoksifenin aktif metaboliti, 4-OHT) yan zincirde sarmal 12'nin yerini alır (Şekil 1.3D, ok) ve onu bağlı koaktivatörü taklit edecek bir konuma yerleştirerek bloke eder.



Şekil 1.3 : ER, ER-ligand kompleksi ve sarmal 12'nin konumlandırılması. İnsan ER'sinin E2, raloksifen ve 4-OHT ile oluşturduğu kompleks yapıların kristalizasyon çalışmaları. Her ligand için soldaki yapı önden görünümü temsil ederken sağdaki yapı sola doğru 90 derecelik bir dönüşü temsil etmektedir [100].

Kısaca, bir agonist molekül ER'ye bağlandığında reseptörde konformasyonel bir değişikliğe sebep olarak AF2 ortak aktifleştirici bağlanma bölgesini meydana getirir. Bu durumun aksine, tamoksifen, raloksifen veya ICI 164,384 gibi antagonistlerin büyük yan zinciri bağlanma boşluğundan dışarı çıkar ve sarmal 12'nin yerini alarak AF2'yi alanını bozar. Ligand bağlanmasından kaynaklanan moleküler yapı değişiklikleri ER üzerinde agonist veya antagonist etkiye sebep olur. Bunlara ilaveten, ER ve ER'nin LBD'sinde ikinci bir bağlanma bölgesi tanımlanmıştır [101]. Her ne kadar bu ikinci bölgeye birden fazla tetrahidrokrisen türevi yerleştirilmiş olsa da, klasik steroid bağlanma bölgesi hâlâ tercih edilen bölgedir.

1.8 ER'lerinin Hücre İçi Mekanizmaları

Bir steroid hormon olarak östrojen, plazma zarından hücre içine kolaylıkla girer. Hücre içindeki ER α ve ER β ile etkileşime girip DNA dizilerine bağlanarak doğrudan etki gösterir. Alternatif olarak östrojen, GPER1, ER α ve ER β ile etkileşime girerek hücre içi sinyalleşme basamaklarını da aktive edebilir. Östrojen-reseptör komplekslerinin doğrudan veya dolaylı olarak DNA'ya bağlanabildiği gen ekspresyonu düzenlemesine yol açan hücre ve moleküler olaylardaki farklılıklar nedeniyle, östrojen aracılı sinyalleşme olayları genomik ve genomik olmayan olarak ikiye ayrılır. Genomik etkiler, östrojen reseptör komplekslerinin hücre çekirdeğine göçünü ve östrojen yanıt elemanları (ERE'ler) olarak bilinen spesifik DNA dizilerinde kromatin ile doğrudan etkileşimi içerir. ERE'ler çeşitli gen promotörlerinde ve düzenleyici bölgelerde tanımlanmış olsa da östrojen reseptörleri tarafından düzenlenen insan genlerinin üçte birinden fazlasının ERE dizi elemanları içermediği rapor edilmiştir [102]. Öte yandan genomik olmayan etkiler, çeşitli hücre içi sinyal olayları yoluyla gen ifadesinin dolaylı olarak düzenlenmesini içerir. Östrojenin hücre içindeki iki sinyal yolu da Şekil 1.4'de gösterilmiştir.

1.8.1 ER'nin doğrudan (direkt) genomik sinyalizasyonu

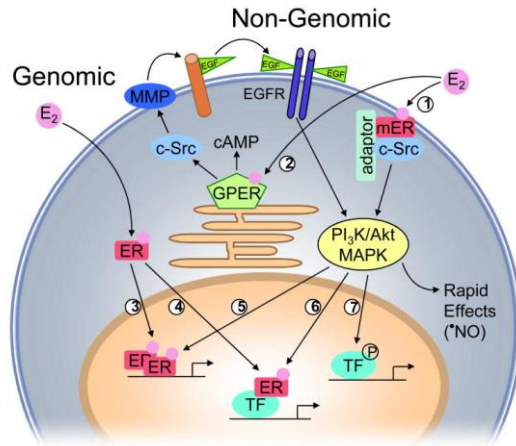
Doğrudan genomik sinyalizasyon, östrojenin hücre içindeki klasik mekanizması olarak bilinir. Bu süreçte nükleer östrojen reseptörleri ER α ve ER β , ligandla aktive edilen transkripsiyon faktörleri olarak görev yapar [103,104]. Genomik östrojen yolunda E2, hücre içi ER α ve ER β 'ya bağlanır ve E2-reseptör dimerizasyonunu indükleyen konformasyonel bir değişiklik meydana gelir [105]. Bu kompleks daha sonra

çekirdeğe aktarılır ve burada östrojen cevap elementi (ERE) sekansındaki kromatine, promoterlar içindeki veya yakınındaki hızlandırıcı (enhancer) bölgelere ve/veya hedef genlerin 3'-çevrilmemiş bölgelerine bağlanır [46,65]. Bağlanma sonucunda, östrojen aracılı gen ürünleri, normal koşullar altında otofajiyi, proliferasyonu, apoptozu, hayatta kalmayı, farklılaşmayı ve damar genişlemesi gibi bir takım olayları düzenler. Ancak patolojik durumlarda hücre içindeki bu sinyalizasyon bozulabilir. ER α ve ER β 'nın hücre içi konumu nedeniyle, aktivasyon bir saat veya daha uzun sürer ve bu da yavaş "genomik etki"ye yol açar.

1.8.2 ER'nin doğrudan olmayan (indirekt) genomik sinyalizasyonu

Östrojen yanıtının klasik genomik modeline uymadığı durumlarda, östrojen doğrudan hedef gen transkripsiyonu ve protein sentezini gerçekleştirmez [106]. Östrojenin genomik olmayan etkileri genellikle sinyal iletim mekanizmalarının aktivasyonunu, hücre içi ikinci habercilerin üretilmesini, cAMP regülasyonunu ve gen ekspresyonunda dolaylı değişikliklerle sonuçlanan sinyalleşme basamaklarının protein-kinaz aktivasyonunu içerir [107] ve bu şekilde hücre içindeki etkilerini gerçekleştirir). Protein-kinaz kaskadları dört ana gruba ayrılır. Bunlar:

- i) fosfolipaz C (PLC)/protein kinaz C (PKC'ler) yolu [108]
- ii) Ras/Raf/MAPK kaskadı 109,110
- iii) fosfatidil inositol 3 kinaz (PI3K)/Akt kinaz kaskadı 111 ile
- iv) cAMP/protein kinaz A (PKA) sinyal yoludur.



Şekil 1.4 : Östrojenin hücre içindeki sinyal yolları. Estradiol (pembe daire E2), genomik ve genomik olmayan etkilerini ER ve GPER1'e bağlanarak gerçekleştirir [112].

Genomik ve genomik olmayan sinyalizasyonların birbirine bağı olduğu, birçok çalışma tarafından desteklenmektedir [113-115]. Bu "çapraz konuşma (cross talking)" mekanizması her iki yolun bileşenlerinin protein-protein etkileşimlerini içermektedir. Bu nedenle, iki klasik östrojen reseptörü düzenleme yolunun birbiriyle çakışması, spesifik dokularda ve fizyolojik süreçlerde transkripsiyonel aktivitenin artmasına neden olabilmektedir.

1.9 ER α ve ER β 'nın Fizyolojik Roller

ER α ve ER β vücutta farklı işlevlere sahiptir ve birçok durumda zıt etki gösterirler. Örneğin, ER α büyüme ve çoğalmada önemli bir rol oynarken [116-119], ER β meme [9,120-122] ve kolon hücrelerinde [123,124] anti-proliferatif, farklılaştırıcı ve apoptotik etkiler gösterir. Ayrıca, iskelet kasında ER β ve yağ dokusunda ER α baskın olduğu için her iki reseptör de glukoz homeostazisinin sürdürülmesi için gereklidir [125]. Yapılan çalışmalar neticesinde, en yüksek ER mRNA ifadesinin prostat ve over dokularında olduğu tespit edilmiştir. Rahim, mesane, akciğer ve testis orta düzeyde ER ekspresyonuna sahipken, epididim, hipofiz bezi, timus, çeşitli beyin bölümleri ve omurilikte düşük ancak tespit edilebilir ER düzeylerine sahiptir. Daha yüksek ER ekspresyon seviyelerine sahip hedef dokuların ER ligandlarından daha fazla etkileneceği tahmin edilmektedir [126]. Normal meme dokusunda ER, dallanma morfogenezi için gereklidir ve ER α (-) farelerinde çok gelişmemiş bir duktal dallanma görülmüştür [127]. Hem kemirgenlerde [128] hem de kadınlardaki [129] yetişkin meme bezlerinde, ER α meme epitel hücrelerinin <10'unda eksprese edilirken ER β , meme epitel hücrelerinin %70-80'inde eksprese edilmesinin yanında göğüste yerleşik stroma ve immün hücrelerde de ifade edilir [130,131]. ER β (-) fareler, ER β 'nın meme dokusunun duktal büyümesi için gerekli olmadığını ancak terminal farklılaşması ve epitelyal dokunun organizasyonunu sürdürmek için gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır [132]. Prostatın gelişimi ve dallanma morfogenezi için ER α sinyalizasyonun önemi de bir diğer çalışma ile vurgulanmıştır [133]. Bununla birlikte yetişkin fare prostatında çok az ER α ifadesi bulunmaktadır ve gen ifadesinin çoğu stromal bölmede yer almaktadır. Öte yandan ER β , yetişkin fare ve insan prostatının epitelinde bol miktarda eksprese edilirken, stromada ve bağışıklık hücrelerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir [134,135].

1.10 ER α ve ER β 'nin Patofizyolojik Rollerini

1.10.1 Over (yumurtalık) kanseri

Over kanseri, genellikle geç teşhis edilmesi nedeniyle en ölümcül ve en yaygın üçüncü jinekolojik kanser türüdür [136]. Amerikan Kanser Derneği her yıl Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yeni kanser vakalarının ve ölümlerinin sayısını tahmin ederek en son verileri derlemektedir. Bu verilere dayanarak; 2024 yılı içerisinde toplamda, 19.680 yeni over kanseri vakasının olacağı ve 12.740 kişinin de over kanseri sebebiyle hayatını kaybedeceği öngörülmektedir [137]. Over tümörlerinin yüzde 80 ila 90'ı over yüzey epiteliinden kaynaklanırken (epitelyal over kanserleri (EOC)), yaklaşık yüzde 5'i granüloza hücrelerinden kaynaklanır 100. Hem steroid hormonların hem de gonadotropinlerin insanlarda over kanserinin etiyolojisine katkıda bulunduğuna dair kanıtlar mevcuttur. ER, insan over tümörlerinin yaklaşık üçte ikisinde ifade edilir. ER α , hem epitelyal hem de stromal kökenli tümörlerde eksprese edilirken, ER β , ağırlıklı olarak granüloza hücre kaynaklı tümörlerde ve daha az oranda epitelyal kökenli müsinöz tümörlerde bol miktarda eksprese edilir [138]. ER α ve ER β over kanserli hastaların çoğunda (%60-80) eksprese edilir. ER α , hücre çoğalmasını ve göçünü teşvik ederek over kanser hücrelerinin gelişimine ve proliferasyonuna katkıda bulunan bir faktördür. ER α ifadesinin over kanserindeki bu rolü nedeniyle, hormonal tedavi ilk tercih edilen tedavi seçeneğidir. Over kanser tedavisinde, dolaşımdaki östrojen seviyelerini azaltan aromataz inhibitörleri ile tamoksifen gibi hormonal terapilerin uygulanması tedavideki olumlu yanıtı göstermiştir [3]. Ayrıca, ER'lerin over kanseri hücre büyümesine aracılık etmedeki rolü hücre kültürü çalışmaları ile de desteklenmektedir. Bu çalışmalarda, orta ve yüksek düzeydeki ER α ekspresyonuna sahip over kanser hücre hatlarında, 17 β -estradiol (E2) varlığında anti-östrojenlerin uygulanmasının, over kanser hücre büyümesinin engellendiği hem *in vitro* [4-6] hem de *in vivo* 139 olarak gösterilmiştir. ER α ve ER β 'nin over kanseri üzerindeki rolleri izotip seçici agonistler kullanılarak karşılaştırılmış ve ER α yüksek seviyelerde eksprese edildiğinde büyüme tepkisine (ve gen ekspresyon değişikliklerine) ER α 'nın aracılık ettiği ifade edilmiştir [140]. Ayrıca bu sonuç, ER α ve ER β 'ya ait agonist ve antagonist moleküllerin kullanıldığı ayrı bir çalışma ile de doğrulanmıştır. Bu çalışmada, ER α agonisti olan 4,4',4''-(4-propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triil) trisfenol (PPT) büyümeyi uyarırken, ER α antagonisti olan 1,3-bis(4-hidroksifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoksi)fenol]-1H-pirazol dihidroklorür (MPP) büyümeyi inhibe

etmiştir [141]. Ayrıca, siRNA uygulamasıyla ER α 'nın hücre içinde işlevsizleştirilmesi, ortama ilave edilen östrojene rağmen hücre büyüme uyarımını nötralize etmiştir. Büyüme düzenlemesine ek olarak östrojen, ER α aracılığıyla hücre göçünü ve epitelyal-mezenkimal geçişe geçişi de destekler. Bu değişiklikleri, E-cadherinin SNAIL- ve SLUG aracılı aşağı gen regülasyonu aracılığıyla gerçekleştirir 7 Fibronektin ve laminin'e bağlanan hücre dışı molekül fibulin de ER α aracılığıyla östrojen tarafından düzenlenir ve hücre bağlanması ve hareketliliğinde anahtar bir role sahiptir [8,9]. ER α (-) over kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada ise, G1 agonistinin kullanımı tümör hücresi çoğalmasını uyarımış ve S fazındaki hücre sayısını arttırmıştır [142]. Albanito ve ark.'nın gerçekleştirdiği çalışmada ise, ER α ekspresyonuna bağlı GPER1/epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyalinin büyüme yanıtı üzerinde destekleyici bir etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir [10]. Özetle, östrojenler ER sinyalizasyon yoluyla over kanseri hücre hatlarının ve normal over yüzeyi epitel hücrelerinin çoğalmasını uyarılmaktadır [143,144]. Buna karşılık reseptörün bu etkileri, ER antagonistleri tarafından engellenebilmektedir [143]. Bu bulgulara rağmen, klinik çalışmalar tamoksifenin nüks eden over kanserini etkili bir şekilde önleyemediğini göstermektedir [145,146]. Bu sonuçlar diğer ilaç geliştirme çalışmalarına ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır.

1.10.2 Meme kanseri

Meme kanserinin oluşumu ve ilerlemesi birçok çevresel ve genetik faktörün etkisiyle gerçekleşse de östrojen hastalığın merkezinde bir role sahiptir [147]. Meme kanserinde östrojen sinyalizasyonunun rolü, ABD ve Almanya'da meme kanseri hastalarını oofektomi ile tedavi edebildiği ilk 1880'li yıllarda açığa çıkmıştır [148]. Östrojene uzun süreli maruziyet ise, menopoz sonrası kadınlarda meme kanseri için en önemli risk faktörüdür [149,150]. Çoklu gen mutasyonlarının (BRCA1, TP53 ve ERBB2), ER α ekspresyonu ile birlikte var oluyor oluşu, tümörün gelişimini ve ilerlemesini belirlemektedir [151]. Meme kanseri vakalarının yaklaşık %60-80'i ER α pozitifdir ve tamoksifen, raloksifen veya diğer SERM'ler ve aromataz inhibitörleri gibi anti-östrojen tedavilerine yanıt vermektedir [15]. Ancak tamoksifen ile tedavi edilen hastaların üçte biri zamanla tedaviye dirençli hale gelmektedir. Tamoksifen direncinin gelişmesinin nedeni, ER α ekspresyon seviyesinin değişimi ve ER α 'daki mutasyonlarla ilişkilendirilse de, direncin asıl nedeni bunlarla sınırlı değildir [152]. Araştırmalar ER ile bir dizi büyüme faktörü reseptörlerinin (HER2, EGFR, FGFR, IGFIR) yukarı

regülasyonu ile NFkB/mTOR yolu da dahil olmak üzere PI3K-PTEN/AKT yolağındaki değişikliklerden kaynaklandığı tanımlanmıştır. Bu yolları hedeflemek, gelecekte tamoksifen direnci sorununu çözmek için ipuçları sağlayabilmektedir [153]. Ayrıca meme kanserinde ER α ve ER β 'nin fonksiyonlarını daha ayrıntılı inceleyebilmek için meme kanseri hücre hatları (MCF-7, T47D ve MDA-MB-231) ile yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmalardan en ilginç, ER α (-) meme kanseri hücreleri MDA-MB-231'in ER α veya ER β 'yi eksprese edecek şekilde indüklenmesi durumunda, her iki reseptörün de proliferasyonu ve metastazı inhibe edebilmesidir. Bu durumdaki tek fark, ER α 'nın bir liganda ihtiyaç duyması iken, ER β 'nin ihtiyaç duymamasıdır [154]. T47D meme kanseri ile yürütülen çalışmada ise, E2 varlığında ER α 'nın c-MYC (MYC), siklin E, siklin D ve p45Skp2 gibi hücre döngüsü ile ilişkili genlerinin ekspresyonunu düzenlediğini ortaya çıkarılmıştır [120]. ER α 'nın tamoksifen ile inhibisyonu, siklin D1 ve c-myc ekspresyonunda bir azalmaya neden olurken, aşağı yöndeki Bcl-2 gibi hedeflerin baskılamasına ve hücre ölümünün artmasına neden olmuştur [155,156]. Ayrıca, meme kanseri hücre hatlarında ER β 'nin tamoksifenin anti-proliferatif etkilerini de arttırdığı gösterilmiştir [157].

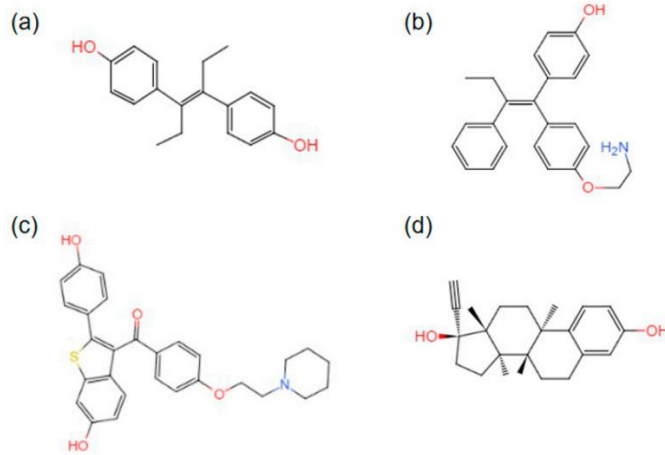
1.10.3 Prostat kanseri

Prostat dokusu hem ER α 'yı hem de ER β 'yi eksprese eder. ER α esas olarak malign olmayan insan prostatındaki stromal hücrelerinde ve nadiren de olsa bazal epitelyal hücrelerde de ifade edilir. ER β ekspresyonu ise esas olarak bazal epitelyal hücrelerde görülür [158-160]. ER α veya ER β 'nin prostat kanserindeki rolü hakkında birçok araştırma yapılmış ve elde edilen sonuçlar, ER α 'nın bir onkogen gibi davrandığını ve hücrelerin proliferasyonuna, inflamasyonuna ve karsinogenezine aracılık ettiğini göstermiştir. ER α ifadesinin susturulduğu farelerde, testosteron ve/veya östrojen tedavisinden sonra yüksek dereceli prostat intraepitelyal neoplazisi veya prostat kanserinin gelişmediği görülmektedir. [161]. Buna karşılık, prostat kanserinin ileri aşamalarında promotör DNA metilasyonu ile ekspresyonu azalan ER β 'nin anti-onkogenik bir rol oynadığı, ER β agonistlerinin prostat epitelinin proliferasyonunu önlediği vurgulanmıştır [162]. Çalışmalardan elde edilen diğer bulgular ER β 'nin prostat dönüşümündeki koruyucu rolünü desteklemektedir [163,164]. Bugüne kadar yapılan klinik öncesi ve klinik modellerden elde edilen bulgular, ER β 'ya karşı dizayn edilecek agonist ligandların veya yeni ilaç moleküllerin özellikle prostat kanserinin

başlangıç aşamalarında ve terapötik yaklaşımlarında yararlı olabileceğini düşündürmektedir [165].

1.11 ER α Hedefli Tedavilerin Over Kanserindeki Yeri

Östrojen reseptörü öncelikle meme kanserinde kapsamlı olarak incelenmiştir. Yapılan araştırmalar, östrojenin over kanserinin proliferasyonunda ve karsinogenezinde etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır [166]. Over kanseri olan hastaların çoğunun ER α (+) olduğu rapor edilmiştir [167]. Over kanserinin terapötik yaklaşımlarında, farklı klinik semptomlara ve ihtiyaçlara karşılık gelen çeşitli nonsteroidal bileşikler (agonist veya antagonist aktiviteye sahip) ve sentetik östrojen türevleri geliştirilmiştir. Yukarıda bahsedildiği üzere ER α ve ER β 'nın ligand bağlama alanları yüksek düzeyde homoloji göstermesine rağmen, reseptörlerin dokulardaki dağılımı ve fizyolojik etkileri birbirinden çok farklıdır. Başarılı bir şekilde araştırılan ve geliştirilen hedefli agonistler ve antagonistler, ER α , ER β ve GPER alt tipleri arasında ayırım yapmayı kolaylaştırmaktadır. Geliştirilen birçok ER hedefli ilaçlar Şekil 1.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5 : Sentetik terapötik ilaçların yapıları. (a) dietilstilbestrol; (b) 4-hidroksitamoksifen; (c) raloksifen; (d) etinil estradiol 2.

Fenolik stilben bileşiği dietilstilbestrolün (DES) yapısı, ER α ER β 'ya karşı E2'ninkinden yaklaşık dört kat daha yüksek bir bağlanma afinitesine sahiptir [168]. DES'in bu seçici yüksek ER α/β afinitesi araştırmalarda ER α/β aracılı biyolojik yanıtları ayırt etmek için kullanılmıştır. Tamoksifen, ER α (+) meme kanserlerinin tedavisinde başarılı olduğu için tekrarlayan ER α (+) over kanseri tümörlerinin tedavisindeki yeri araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda, 20 klinik çalışmanın meta-analizi, tamoksifen tedavisine ortalama genel hasta yanıt oranının yalnızca %13

olduğunu göstermiştir [167]. Platin tedavisine karşı dirençli over kanseri tedavisinde seçici östrojen reseptör modülatörlerinden, bilhassa tamoksifenin araştırıldığı çalışmalarda, hastaların sadece %9,6'sının tek başına tamoksifene karşı bir yanıt elde edilmiştir [169]. Raloksifen, menopoz sonrası osteoporozun tedavisi ve önlenmesi için kullanılan seçici bir östrojen reseptör modülatörüdür. Kemirgenlerle yapılan çalışmalarda raloksifen, granüloza/tek hücre kökenli iyi huylu ve kötü huylu over tümörleri ve epitelyal hücre kökenli iyi huylu tümörlerle ilişkilendirilmiştir [170]. Bununla birlikte, daha sonraki araştırmalar, raloksifenin kemirgenlerin overları üzerindeki etkilerinin dolaylı olduğunu, dolaşımdaki sürekli luteinize edici hormon düzeylerinin aracılık ettiği ve over morfolojisinde geri dönüşümlü değişikliklere yol açtığını göstermiştir [171]. 17 α -etinil-17 β -estradiol (aynı zamanda etinil estradiol olarak da bilinmektedir), *in vivo*'da uzun süre aktivitede gösterdiği için oral kontraseptiflerde kullanılan sentetik bir östrojendir. Etinil estradiolün ER α / β 'ya afinitesi 17 β -estradiolün yaklaşık iki katıdır [172]. Fulvestrant, herhangi bir agonistik etkisi olmayan bir östrojen reseptör antagonistidir. Fulvestrant ile tedavi edilen hastalar %38'lik bir genel yanıt oranı göstermiştir. Gerçekleştirilen bir faz II çalışmasında, 26 epitelyal over kanseri hastasından oluşan bir örneklem grubunda, fulvestrantın hastaların %35'inde hastalığı stabilize ettiği sonucuna ulaşılmıştır [173].

1.12 Hedefe Yönelik Tedaviler

1.12.1 Hedef molekülün belirlenmesi

Kanser, dünya çapında ciddi bir halk sağlığı sorunu olduğu ve her yıl on milyonlarca kişiye kanser tanısı konulup, hastaların yarısından fazlası kanser dolayısıyla hayatını kaybettiği [174] göz önünde bulundurulduğunda, özellikle çoklu ilaç direncinin oluşumu ve minimum yan etki gösteren tümöre özgü tedavilerin azlığı kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli problemdir. Kanser tedavisinde önemli gelişmelerin olmasına rağmen daha etkili ve hedefe yönelik tedavilere olan ihtiyaç halen devam etmektedir [175]. Hedefe yönelik tedavi kavramını ilk kez Paul Ehrlich, 1890'lerde tamamen hedefe özel olacak ve dolayısıyla herhangi bir ek toksisite göstermeyen güvenli bir "sihirli mermi (magic bullet)" olarak tanımlamıştır [176]. Bu teori başlangıçta kanserin etiyojisi ve biyolojisine ilişkin yeterli bilginin olmaması sebebiyle sadece bulaşıcı hastalıklar için geçerli kılınmıştır. Daha sonra bu kavram kanser tedavisini de kapsayacak şekilde genişletilmiştir [177]. Kanserde moleküler

hedefe yönelik tedavilerin başarılı bir şekilde geliştirilmesi için ideal hedeflerin belirlenmesi oldukça önemlidir. Belirli bir tümör tipine sahip hastaların çoğunluğunda mevcut olması ve karsinojenez ile güçlü bir ilişkisi olması durumunda, bir molekülün ilaç hedefi olarak geliştirilmesi önerilebilmektedir. Hücrelerdeki kanserin oluşumu, hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını destekleyen proteinlerde ve reseptörlerde meydana gelen mutasyonların ve modifikasyonların neden olduğu genetik değişiklik analiz edilerek belirlenir. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt edebildiğimiz bu spesifik genetik değişiklikler, moleküler hedefli ilaçların geliştirilmesinde moleküler hedefler olarak kullanılabilir [178]. Özetle, kanser tedavisindeki en hassas nokta, kemoterapötik ajanların kanser hücrelerine hedefli bir şekilde iletilmesi, tedavi etkinliğinin en üst düzeye çıkarılması ve sağlıklı dokuya verilen zararın en aza indirilmesidir. İdeal olarak, bir hedef adayın kanserli olmayan normal dokularda ifade edilmemesi gerekmektedir [179]. Bu şekilde geliştirilmeye çalışılan hedefe yönelik tedaviler, kanser hücresinin proliferasyonunu ve hücre döngüsü düzenlenmesini bloke eder, apoptoz veya otofaji indükler ve kanser hücrelerini öldürecek toksik maddelerin salınımını sağlar ve sağlıklı hücrelerde herhangi bir toksisiteye neden olmaz [180,181]. Bu konu üstünde yapılan araştırmalarla, kanserdeki spesifik moleküler hedeflerin fizyolojisinin ve özelliklerinin daha anlaşılır kılınması ile tümör büyümesini ve ilerlemesini inhibe edecek potansiyel moleküler stratejiler belirlenebilmektedir. Kanser biyobelirteçleri, normal ve kanser hücrelerin gen ve protein ekspresyonlarını karşılaştırmasına ve ekspresyonlarındaki değişiklikleri tanımlamasına olanak tanıyan genom dizilim teknolojileri kullanılarak belirlenebilmektedir [182]. Hedefli ilaç geliştirmede potansiyel moleküler hedeflerin belirlenmesinde bu yöntemin kullanılması oldukça önemli olup, doğru hedefler tanımlanabilmektedir [183,184]. Moleküler hedefli tedavi için seçilen hedefler arasında büyüme faktörleri, hücre içi ve membran reseptörleri, sinyal molekülleri, hücre döngüsü proteinleri, apoptoz modülatörleri, anjiyogenezi destekleyen moleküller ve diğer hücre içi proteinler yer almaktadır [185]. Ama maalesef, yalnızca kanser hücrelerinde ifade edilen bir hedef bulmak oldukça güçtür. Potansiyel terapötik hedefler olarak kabul edilen moleküllerin çoğunluğu, sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında yalnızca tümör dokularda aşırı ekspresyon gösteren moleküllerdir. Hedef molekül seçiminde karşılaşılan diğer bir zorluk ise, insan genomunun yalnızca onda birinin ilaçla hedeflenebilen molekülleri kodlaması ve bunların da yalnızca yarısının hastalıkla ilişkili olmasıdır [186]. Bu yüzden, bazı moleküller gerekli koşulları sağlayamadığı için, terapötik hedef olarak

kabul edebilememektedir. Moleküler hedefe yönelik tedavideki anahtar mekanizmalardan biri, tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesidir. Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, normal hücrelerin homeostazisini korumak için istenmeyen, hasarlı veya anormal hücrelerin ortadan kaldırılması olarak tanımlanmaktadır [187]. Apoptoz sürecinin devre dışı bırakılması, tümör oluşumunu teşvik etmede önemli bir rol oynamasının yanı sıra, birçok tümör tipinde de tedavi direncine yol açmaktadır [188]. Birçok anti-kanser ilaç, Bcl-2 ailesi proteinlerini, kaspazları ve apoptoz proteinlerinin inhibitörleri (IAP'ler) ve hücreSEL FLICE benzeri inhibitör proteini (c-FLIP)189 gibi bileşenleri hedef alarak kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebilmektedir [190]. Buna güzel bir örnek, Bcl-2 proteinlerine güçlü bağlanma yeteneği olduğu bildirilen antiapoptotik Bcl-2 inhibitörü venetoclax'tır [191]. Ayrıca, bir anti-HER2 monoklonal antikoru olan Trastuzumab ve küçük molekül bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib de, HER2(+) meme kanserinin tedavisi için 1998 ve 2001'de klinik olarak onaylanmıştır. İmatinibin klinikteki başarısı, küçük molekül kinaz inhibitörlerinin antikanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmasında öncü rol oynamıştır ve bir dizi anti-kanser molekül hedefli tedavinin, kanser hastalarına yönelik klinik kullanımı için onaylanmıştır. Bunlara ek olarak hedef proteinler, hormon reseptörüne bağlı meme, over ve prostat kanseri tedavisinde kullanılan östrojen reseptörü (ER) antagonistleri, aromataz inhibitörleri gibi hormonal ajanlar, immün kontrol noktası inhibitörleri (örneğin, programlanmış hücre ölümü proteini 1' (PD-1), programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1) ve sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein 4 (CTLA-4) antikorları) olabilmektedir [192,193]. Hedefe yönelik tedavilerin antikanser etkinliklerine rağmen, bu ilaçlar yalnızca hedeflenebilir mutasyonları veya anormalliklere sahip hastalar için geçerlidir. Ayrıca bu hedefli moleküller, normal hücreler üzerinde zamanla toksisiteye ve içsel veya kazanılmış ilaç direncinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu durum hedefli tedavilerinin etkinliğini engellemektedir [177]. Bu sınırlamalara rağmen, hedefe yönelik tedavi, bazı kanser türlerinde kayda değer sağkalım göstermesine neden olarak, kanser tedavisinde kişiselleştirilmiş tedavinin önünü açmıştır [194,195].

1.13 Moleküler Hedefli Tedavi Türleri

Moleküler hedefe yönelik tedavide kullanılan ajanlar; küçük moleküller (small molecules, peptitler), monoklonal antikolar (mAb), immünoterapötik kanser aşılı

ve gen terapisi olarak sınıflandırılmaktadır [196]. mAb'ler hücre dışı ligandları (bevacizumab, vasküler endotelyal büyüme faktörünü [VEGF] hedefler), membran reseptörlerini (trastuzumab HER2 ve cetuximab ve panitumumab EGFR'yi hedefler) ve membrana bağlı proteinleri (rituksimab CD20'yi hedefler) hedef alır. mAb'ler, hücre içindeki etkilerini bağlanma blokajı yaparak, ligand-reseptör etkileşiminin nötralizasyonu veya hedef molekülün içselleştirilmesini/bozunmasını sağlayarak gerçekleştirirler [197]. Küçük molekül hedefli bileşiklerin prensibi, genellikle protein hedeflerinin aktivitesini düzenlemek için tümör oluşumunun moleküler temelini hedeflemektir. Hedefin türüne bağlı olarak farklı seçici özelliklere sahiptir ve küçük boyutları nedeniyle (molekül ağırlığı <1000), çeşitli hücre içi ve hücre dışı yapılara bağlanma kapasitesine sahiptir [198]. Küçük molekül hedefli bileşiklerin protein hedefleri esas olarak enzimleri ve reseptörleri içermektedir. Küçük molekül hedefli bileşikler, reseptör üzerinde etki yaparken reseptör agonistleri ve reseptör antagonistleri olarak ikiye ayrılırlar. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) kanser tedavisinde kullanılmak üzere onayladığı ilaçların yan etkisinin, kemoterapötik süreçle karşılaştırıldığında, nüksetme veya metastatik durumdaki tedavi sürecinden kaynaklanan yan etkilerden daha az olduğunu göstermiştir. Ayrıca, küçük molekül hedefli bileşiklerin rezidüel hastalığı tedavi etmek için veya terapötik süreçlerde adjuvan olarak onay aldığına ilişkin örnekler de bulunmaktadır [199].

1.14 Peptit Temelli Terapötikler

Doğal amino asit bazlı terapötikler olan peptitler, potansiyel antikanser özelliklerinden dolayı dikkat çekmektedir. Terapötik peptitler, genellikle 500-5000 Da molekül ağırlığına sahip, iyi sıralanmış bir dizi amino asitten oluşan farmasötik ajan sınıfını temsil eder [200]. Terapötik peptitlere yönelik araştırmalar, insülin, oksitosin, vazopressin ve gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) dahil olmak üzere doğal insan hormonları ve bunların insan vücudundaki spesifik fizyolojik aktivitelerine ilişkin temel çalışmalarla başlamıştır [201]. Modern peptit temelli ilaç araştırmaları, kinazlar ve diğer enzimler, G proteinine bağlı reseptörler, iyon kanalları ve nükleer hormon reseptörlerinden oluşan 3000 ila 4000 protein hedefine yönelik gelişme göstermiştir [202]. Piyasada halihazırda yaklaşık 80 peptit bazlı ilaç bulunmakta olup, 150'den fazla peptit klinik geliştirme ve 400-600 peptit de klinik öncesi deneme

aşamasındadır [203]. Terapötik peptitler hücre yüzeyi ya da hücre içi reseptörlerine bağlanarak işlev gösterirler. Peptitler tıpkı antikolar gibi yüksek afinite ve özgüllükle hücre içi hedeflerine bağlanarak etkilerini düzenlerler. Peptit bazlı yaklaşımlar kanser tedavisinde birçok üstünlüğe sahiptir. Bunlar; terapötik peptitlerin sahip olduğu gelişmiş özgüllükleri, normal dokulara karşı gösterdikleri düşük toksisiteyi, kanserin ilerlemesinde rol oynayan çeşitli moleküler yolları hedefleyebilmesi ve farklı tasarımlarla modellenen hedeflerinden kaynaklanmaktadır [204-206]. Ayrıca, terapötik peptitlerin antikolara kıyasla daha az immünojenite göstermesi ve daha düşük üretim maliyetine neden olması diğer avantajları arasındadır [207,208]. Bu avantajlarının yanı sıra terapötik peptitlerin iki temel dezavantajı da bulunmaktadır [207]. Bunlardan ilki zayıf membran geçirgenliğine sahip olmalarıdır. Peptit ilaçlarının membran geçirgenliği, peptit uzunluğu ve amino asit bileşimi dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Peptitler genellikle hücre içi hedefleri hedeflemek için hücre zarını geçememektedir. Dolayısıyla bu durum peptitlerin, ilaç geliştirmedeki uygulamalarını sınırlamaktadır [209]. Terapötik peptitlerin ikinci dezavantajı ise zayıf *in vivo* stabiliteye sahip olmalarıdır. Doğal peptitler, amid bağlarıyla birleştirilen amino asit zincirlerinden oluşur, ancak ikincil veya üçüncül yapıların sağladığı stabiliteden yoksundurlar. Amid bağları, herhangi bir koruma olmadan, doğal ortama maruz kaldıklarında hücre içi enzimler tarafından kolayca hidrolize edilebilir veya yok edilebilirler. Bu doğal yapılarından dolayı, kısa yarı ömürlüdürler ve *in vivo*'da hızlı eliminasyon ile peptitlerin kimyasal ve fiziksel olarak kararsız hale gelmesine neden olmaktadır [210]. Buna ek olarak, peptitlerin oral yoldan verilmesi, enzimatik olarak bozunmaya açık hale getirerek peptitlerden düşük biyo-yararlanıma neden olmaktadır. Aynı zamanda, gastrointestinal sistemin asidik ortamı ve ince bağırsağın epitelyal bariyeri de peptit ilaçların emiliminde birtakım zorluklar yaratmaktadır [211,212]. Terapötik peptitlerin sahip olduğu bu dezavantajların iyileştirilmesi ve geliştirilmesi etkin bir tedavi yöntemi için oldukça önemlidir. Geçtiğimiz yıllarda piyasaya giren peptit ilaçlarının sayısı önemli ölçüde artmış olmasına rağmen etkili hedefleme stratejilerinde aynı oranda gelişim sağlanamamıştır. Terapötik peptitlerin kanser hücrelerine ve tümör bölgelerine uygulanmasındaki çeşitli zorluklar, farmakolojik olarak aktif peptitlerin ilaç ürünleri olarak formüle edilmesini zorlaştırmaktadır [203,213].

1.15 Peptit Temelli Terapötiklerin Geliştirilmesi

Modern peptid sentezi, 1963 yılında Nobel ödüllü Merrifield'in katı faz peptid sentezinin (SPPS) keşfiyle ortaya çıkmıştır [214]. Daha yakın zamanlarda, otomatik peptit sentezleyicilerin, özellikle de mikrodalga destekli versiyonlarının piyasaya sürülmesi, işlem için gereken zaman ve çabayı azaltırken aynı zamanda işlemi büyük ölçüde kolaylaştırmıştır [215]. Akış kimyası [216] ve çevrimiçi gerçek zamanlı izleme [217] gibi yeni teknolojilerin uygulanması, reaksiyon süresini en aza indirmenin yanı sıra reaktif kullanımının da önemli ölçüde optimize etmiştir. Bu gelişmeler, geleneksel yöntemlerle üretilmesi zor olan peptitlerin sentezini kolaylaştırmıştır. Peptitlerin biyolojik özgülüğünün yüksek ve immünojenitesinin oldukça düşük olmasına rağmen, zayıf proteolitik stabiliteye ve kısa yarı ömürlere sahiptirler. Bunlar ikincil yapılarının kaybına ve dolayısıyla zamana karşı aktivitenin azalmasına neden olmaktadır. Peptit bazlı terapötiklerin sınırlamalarını ortadan kaldıracak ve bunların farmasötik alanlardaki kullanımlarını genişletebilecek stratejiler oluşturmak için önemli girişimlerde bulunulmuştur. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, proteolitik bozunmayı önleyen, böylece yarı ömürlerini uzatan ve sonuçta terapötik etkinliklerini artıran çeşitli kimyasal modifikasyonlar ve hesaplamalı yaklaşımlar kullanılmıştır. Geliştirilmiş teknikler, ana peptit yapısını değiştirmeye gerek kalmadan yapının yeniden modellenmesi için alternatif bir yol sunar [218].

1.15.1 Uç koruması

Karboksipeptidazlar, serum aminopeptidazları ve diğer çeşitli proteazlar gibi peptidazlar, bir peptidin hem amino(N) hem de karboksi (C) terminalinde proteolize yol açabilmektedir [219,220]. N- veya C- terminalindeki farklı amino asit kalıntılarının, farklı derecelerde bozunma ve proteolize uğramaları neticesinde zayıf biyoyararlanıma yol açtığı tespit edilmiştir. Werle ve Bernkop-Schnürch'ün gerçekleştirdiği çalışmada, N-terminalindeki serin, treonin, glisin, alanin, valin ve metionin kalıntıları bakımından zengin peptitlerin, plazmadaki bozunmaya karşı önemli ölçüde dirençli olduğu bildirmiştir [221]. Biyoyararlanımı geliştirmek için, peptidin N- ve C-terminallerini değiştirmek, böylece ekzoproteazlar, yani aminopeptidaz ve karboksipeptidaz tarafından tanınma ihtimalini azaltmaktadır [222]. Ayrıca peptitlerin *in vivo* stabilitesini artırmak amacıyla N-terminal asetilasyonu veya C-terminal amidasyonu da başvurulan yöntemler arasındadır [223].

1.15.2 Omurga modifikasyonu

Peptit omurgası modifikasyonları, peptit yapısındaki karbonil grubu oksijenin kükürt ile yer değiştirilmesiyle yapılabildiği gibi, peptitin herhangi bir pozisyonundaki nitrojenin veya α -karbondaki H atomlarının yer değiştirilmesini sağlayan reaksiyonlar aracılığıyla da yapılabilmektedir [224]. Bir peptit omurgasına gerçekleştirilebilecek diğer modifikasyon yöntemleri ise α -metilasyon ve N-metilasyon yöntemleridir. Amino asitlerin α -metilasyonu, peptit yapısını güçlendirir ve helikal peptitlerde özellikle bu modifikasyon kritik olan peptit dihedral açıları üzerinde etkilidir. N-metilasyonu, hidrojen bağı oluşumunu azaltır ve lipofiliteyi artırır. Böylece peptitin hücre membranından hücre içine daha kolay penetre olması sağlanır [225]. Böylelikle, omurga modifikasyonları, peptit analoglarının enzimatik stabilitesini ve biyolojik membran geçirgenliğini artırır [226]. Peptit omurga modifikasyonları, HIV proteaz inhibitörlerinin ve reseptör araçlarının geliştirilmesi gibi çeşitli alanlarda da kullanılmıştır [227,228]. İlerleyen çalışmalar ise peptit yapıları ile nanopartiküllerin kendi kendine birleşmesi (self-assembly) çalışmalarının da önünü açması beklenmektedir [229].

1.15.3 Yan zincir modifikasyonu

Moleküller için yapılan simülasyon çalışmaları, peptitin afinitesini ve seçiciliğini arttırmak için ana bağlanma kalıntılarında rasyonel olarak nasıl değişiklik yapmamız gerektiğine dair önemli bilgiler sunmaktadır. Peptitlerin hem endo hem de ekzoproteazlar tarafından tanınmasını azaltmak için omurga modifikasyonuna bir alternatif yöntem amino asit kalıntılarının kanonik olmayan yan zincirlerle birleştirilmesidir. Doğada bulunan ve bulunmayan (sentetik olarak üretilen) çok çeşitli olası yan zincir modifikasyonları bulunmaktadır [230,231]. Peptitlerin fiziksel özelliklerini iyileştirmek amacıyla peptit yapılarına doğal olmayan amino asitler eklenmiş ve proteolitik direnç kazandırılmıştır [232]. Bu analoglardan doğal olmayan yan zincirler özellikle proteazlara karşı dirençlidirler. Hedefleyici ve hücreye içine giren peptitlerdeki kanonik olmayan amino asitlerden en bilindik, D- Enantiyomer amino asit kalıntıları ailesidir. Tamamen D-amino asitlerden oluşan peptitler genellikle "retro-enantio" veya "retro-inverso" peptitler olarak bilinmektedir. Bu tür peptitler, fizyolojik koşullar altında proteolitik bozunmaya karşı direnç gösterdikleri için oldukça ilgi görmektedir [233]. D-peptit, ana L-peptide göre farklı yan zincir

oryantasyonu göstermektedir. Eğer bu bağlanma peptidin üç boyutlu yapısına bağlı bir konumda ise peptidin hedef ile etkileşimini azaltabilmektedir. Enantio izomerizasyonunun peptit dizisinin tersine çevrilerek birleştirilmesi, peptidin "retro-inverso" veya "retro-enantio" izomerini elde etmemizi sağlar. Retro-enantio peptidi, ters amid bağlarına sahip doğal L-izomerine benzer bir yan zincir topolojisi sergiler ve proteolitik bozunmaya karşı tam direnç gösterir [234]. Ayrıca, D-amino asitler gibi doğal olmayan amino asitler potansiyel immünojeniteyi de azaltabilmektedir [235].

1.15.4 Siklizasyon

Yukarıda bahsedilen peptit modifikasyon yöntemleri (yan zincirlerin, omurganın ve terminallerinin modifikasyonu) peptitlerin proteolitik bozunmaya karşı direnç göstermesini sağlayabilirken, peptitlerin hedeflerine karşı düşük afinite göstermelerine neden olmaktadır. Peptitleri stabilize etmek için en umut vaat eden metot, doğrusal peptitlerin siklizasyonudur. Bu metot peptit zımbalama yöntemi olarak da bilinmektedir ve özellikle sarmal peptitler için kullanılmaktadır. Bu yöntem, peptit zincirin sarmal yapısını koruyan ve stabilize eden aynı peptidin iki yan zinciri arasındaki bağlanmadan meydana gelmektedir. Bu işlemden kullanılan kimyasal bağlayıcılar, peptitleri stabilize ederek yapının yüklerini ve H-bağlanma potansiyelini azaltarak peptidin sulu ortamdaki çözünürlüğünü artırır [218]. Zımba motifinin dışında kalan çift bağlar molekülün esnekliğini sınırlar ve peptidin bağlanmasındaki ve dönüşlerindeki entropi kaybını azaltır [236]. Böylelikle siklik peptidin hedefine olan afinitesi ve seçiciliği artırılmış olunur [237-239]. Üstelik bu zımba motifi, sarmal yapı içindeki amid bağının gizlenmesini sağlayarak yapının proteazlara karşı direnç kazanır ve hücre zarından daha kolay nüfuz etmesini sağlar. Enzimatik hidrolize karşı olan bu koruma, kısa siklik peptitlerde oldukça etkilidir. Uzun siklik peptitlerde ise ikincil yapılar (sarmallar, dönüşler ve katlanmalar) siklizasyon ile stabilize edilerek hidrolize karşı direnç sağlanabilmektedir [240]. Siklik peptitler doğrusal peptit muadilleriyle karşılaştırıldığında, hedef yapısına bağlanmada sergilediği düşük entropi sayesinde gelişmiş bir biyolojik aktivite gösterirler [241]. Ayrıca çoğu siklizasyon yöntemi terminal kalıntılarını da içerecek şekilde dizayn edildiğinden siklik peptitlerin ekzoproteazlar tarafından korunması da sağlanmıştır [242].

1.16 Siklik (Halkasal) Peptitler

Siklik peptitler, siklik halka yapısına sahip polipeptit zincirlerdir. Siklik peptitler genellikle asit kararsız yan zincir koruma gruplarına sahip amino asitler ile omurga amini üzerinde baz kararsız olan bir florenilmetoksikarbonil (Fmoc) koruma grubu kullanılarak SPPS yöntemi ile sentezlenir [37]. Fmoc korumalı amino asitler genellikle çeşitli yan zincir koruma grupları ile kullanılır. Siklik peptitlerin standart SPPS'si için kullanılan yan zincir koruma grupları Tablo 1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 1.1 Siklik peptitlerin Fmoc bazlı katı fazlı peptit sentezinde kullanılan asit kararsız yan zincir koruma gruplarının listesi.

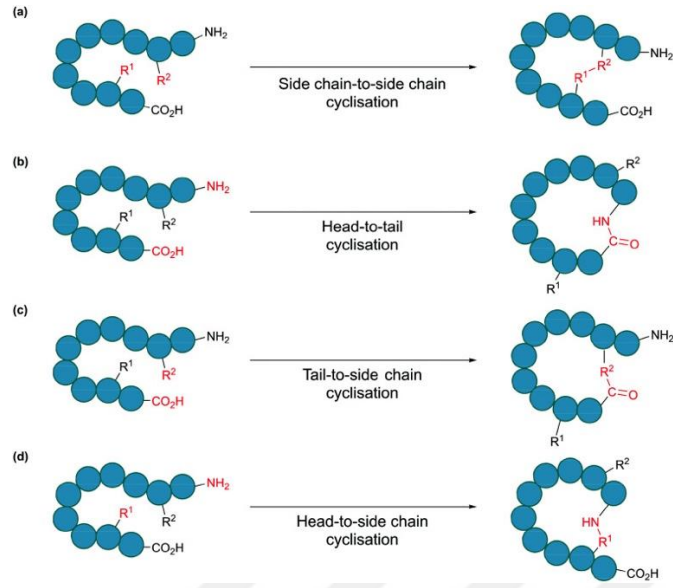
Amino acid	3-Letter code	1-Letter code	Side chain protecting group
Alanine	Ala	A	N/A
Cysteine	Cys	C	Trityl (Trt)
Aspartic acid	Asp	D	<i>tert</i> -Butyl (OtBu)
Glutamic acid	Glu	E	<i>tert</i> -Butyl (OtBu)
Phenylalanine	Phe	F	N/A
Glycine	Gly	G	N/A
Histidine	His	H	Trityl (Trt)
Isoleucine	Ile	I	N/A
Lysine	Lys	K	<i>tert</i> -Butoxy (Boc)
Leucine	Leu	L	N/A
Methionine	Met	M	N/A
Asparagine	Asn	N	Trityl (Trt)
Proline	Pro	P	N/A
Glutamine	Gln	Q	Trityl (Trt)
Arginine	Arg	R	Pentamethyldihydrobenzofurane (Pbf)
Serine	Ser	S	<i>tert</i> -Butyl (OtBu)
Threonine	Thr	T	<i>tert</i> -Butyl (OtBu)
Valine	Val	V	N/A
Tryptophan	Trp	W	<i>tert</i> -Butoxy (Boc)
Tyrosine	Tyr	Y	<i>tert</i> -Butyl (OtBu)

Siklik peptitler, birçok önemli hücre içi mekanizmaya ve düzenleyici yola aracılık eden protein-protein etkileşimlerini (PPI'ler) hedeflemek için yeni bir terapötik ajan sınıfı olarak ortaya çıkmıştır [37,243]. Özellikle PPI'ler'in hedeflenmesinde ve ilaç keşif çalışmalarında siklik peptitler güçlü bir moleküler hedef sınıfı olarak kabul edilir [244] ve literatürde başarılı sonuçları sunulmuştur [245]. Siklik peptitler, uygun şekilde

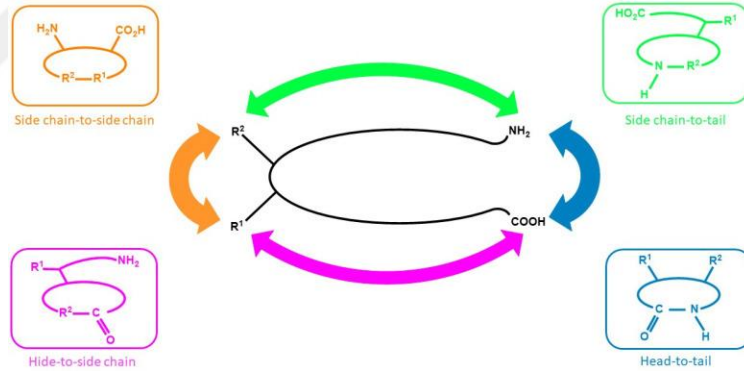
tasarlandığında, proteolitik bozunmaya karşı direnç gösterirler. Gerçekleştirilen çalışmalarda siklik peptitlerin, memeli hücrelerinin membranından geçerek çekirdeğe girdiği ve α -heliks aracılı hücre içi PPI'ları inhibe ettiği gösterilmiştir [237]. Literatürdeki çok sayıdaki çalışmada da siklik peptitlerin meme kanseri [246] akciğer kanseri [247] ve beyin kanserine [248] karşı anti-kanser etkinlik gösterdiği bulunmuştur. Peptit zincirlerinin zımbalanması için birkaç farklı strateji mevcuttur ve bu reaksiyonlar peptitin iki amino asit yan zincirlerinin birbirine bağlanmasına izin vererek gerçekleşir. Siklizasyon işlemi için uygulanan metot doğrultusunda, peptitte bulunan diğer fonksiyonel gruplara müdahale edilmeden peptit yapısının siklizasyonuna izin verilir ve her bir amino asidin kiral merkezini değiştirilmeden korunması sağlanır [249]. Siklizasyon reaksiyonları ayrıca, amino asitlerin kiralitesini bozmadan, uygulanan bir modifikasyon ile amino asit yan zincirine fonksiyonel gruplar da eklenebilmektedir. Son yıllarda birçok araştırma grubu [243,250-253] bu amaçla bazı farklı reaksiyonları uygulamaya çalışmış ve bazı ilerlemeler kat etmiştir.

1.17 Siklizasyon İşleminde Kullanılan Yöntemler

Siklizasyonda kullanılan temel yaklaşımlar genellikle dört genel sınıf altında incelenir. Bunlar; yan zincirden yan zincire, baştan kuyruğa (omurga siklizasyonu), baştan yan zincire ve yan zincirden kuyruğa doğru olan siklizasyon yöntemleridir (Şekil 1.6 ve Şekil 1.7). Yan zincirden yan zincire olan siklizasyonda, iki amino asit kalıntısının yan zincirleri arasında bir bağ meydana gelir (Şekil 1.6a). Bu duruma en iyi bilinen örnek, iki sistein kalıntısının tiyol işlevsellikleri arasında molekül içi disülfid bağ oluşumudur. Bu bağ, insülin ve antikor gibi büyük peptitlerde ve proteinlerde yaygın olarak bulunur ve yapının siklik formda olmasına sebep olur. Peptitlerdeki sistein kalıntılarının yaklaşık %50'sinin disülfid bağı oluşturduğu tahmin edilmektedir [254]. Baştan kuyruğa doğru olan siklizasyon ise yaygın olarak kullanılan bir başka yöntemdir. Bir amino asit zincirinde ilk kalıntı bir amino ucuna (yani N-terminaline) ve son kalıntı bir karboksil uca (yani C-terminaline) sahip olduğundan, polipeptitler tipik olarak yönlüdür. Bu şekilde açığındaki N- ve C-terminallerinin bir amid bağı yoluyla birleştirilmesiyle bir siklik yapı elde edilebilmektedir (Şekil 1.6b). Aynı zamanda, uygun bir yan zincir fonksiyonel grubuyla (Şekil 1.6c ve 1.6d) her iki uç arasında bir laktam, lakton veya tiyolaktan oluşumu, yan zincirden uca siklizasyonla meydana gelmektedir [255].



Şekil 1.6 : Siklizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi (a) yan zincirden yan zincire, (b) baştan kuyruğa, (c) kuyruktan yana zincire ve (d) baştan yan zincire olan halkasallaştırma [256].

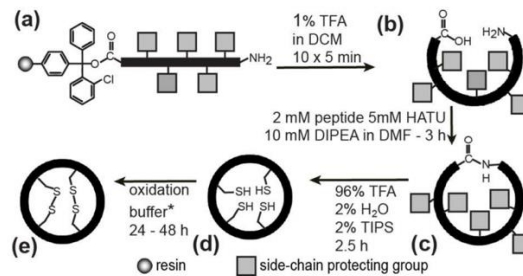


Şekil 1.7 : Siklizasyon yöntemlerinin sadeleştirilmiş şematik gösterimi [257].

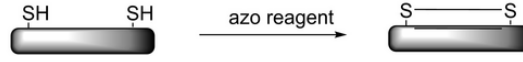
1.18 Disülfid Bağlı Siklik Peptitler

Doğal veya endojen peptitlerdeki disülfid bağları, önemli biyolojik olaylarda etkin rol oynayan ve peptidin üç boyutlu yapısına uygun ve korunaklı konformasyonlarla katlanmayı artırarak enzimatik kırılmaya karşı direnç kazandıran önemli yapısal bağlardır. Disülfür—disülfür bağı iki tiyol grubu (sistein) arasında meydana gelir [258]. Disülfid bağlı siklik peptitler geleneksel olarak 9-fluorenilmetoksi-karbonil" (Fmoc) koruma grubunun kullanıldığı katı faz peptit sentezi (SPPS) yöntemi ile sentezlenir. Bu yaklaşımda, peptit sentezi katı bir destek üzerinde gerçekleşir ve Fmoc grubu peptit zincirindeki serbest amino grubunu korumak için kullanılır. Bu yöntemle,

peptit sentezindeki ara ürünlerin kolayca ayrılması sağlanır ve peptitlerin istenilen uzunlukta sentezlenmesi mümkün kılınır. Siklik disülfid peptitleri sentezlemek için alternatif bir yaklaşım olarak da, son zamanlarda disülfid bağlarının peptit zinciri yapımı sırasında olduğu disülfür güdümlü siklik peptit sentezi (DdCPS) kullanılmaktadır. İki farklı kükürt içeren peptit fragmanı, katı faz disülfid ligasyonu (SPDSL) tarafından çapraz bağlanan disülfid bağının ardından, her reaksiyon merkezinin yakınlık etkisinin molekül içi siklizasyona katkıda bulunmasıyla, moleküller arası amid bağı oluşumundan daha verimli ve bölgesel olarak daha seçici bir şekilde oluşturulabilir [34,35]. Literatürde, disülfür açısından zengin fakat karmaşık siklik peptitlerin sentezi için de geliştirilen basit metodolojiler de mevcuttur [259] (Şekil 1.8). Ayrıca, disülfür bağlı siklik peptitlerin hem çözelti hem de katı fazda yüksek verimlilik ve saflıkta sentezi için de metodlar geliştirilmiştir. Buna örnek, dietilazodikarboksilat'ın (DEAD), peptitlerin bir disülfür bağı yoluyla siklizasyonu için etkili ve son derece kemo-seçici bir oksitleyici reaktif olarak uygulandığını gösteren çalışmadır. Bu metodun uygulanabilirliği hem çözelti hem de katı fazda gösterilmiş ve metionin ve triptofan gibi oksidasyona duyarlı kalıntılar içeren peptitlerin siklizasyonunu da kapsayacak şekilde genişletilebildiği vurgulanmıştır [260] (Şekil 1.9). Bununla birlikte, bu sentezler sonunda, reaksiyon çözeltisinden N-terminal Fmoc-grubu ve diğer koruma gruplarının ortamdan uzaklaştırılması gerektiğinden kapsamlı bir HPLC saflaştırması işlemi yapılması gerekmektedir. Siklik peptitlerin sentezinde, disülfid bağları genellikle sentezin son aşaması olan peptitlerin nihai korumasının kaldırılması ya da peptitlerin reçineden ayrılmasından sonra oluşturulur. Yüksek seyreltme ve iyot oksidasyonu altında hava veya DMSO oksidasyonu, disülfür bağlarının oluşması için kullanılan temel yöntemlerdir.



Şekil 1.8 : Disülfür bağlı peptitlerin Fmoc sentezi ile yapılan siklizasyon basamakları. (a) zincir uzaması, (b) doğrusal yan zincir korumalı başlatıcı, (c) siklik yan zincir korumalı peptit, (d) indirgenmiş, tamamen koruması kaldırılmış siklik peptit, (e) oksitlenmiş nihai siklik peptit [259].



Şekil 1.9 : Azodikarboksilat aracılı disülfid bağı siklik peptitlerin eldesi [260].

Peptit temelli ilaç tasarımlarında, siklik yapıda olup disülfür açısından zengin peptitler, yüksek stabiliteleri ve istenilen ilaç benzeri özelliklerinden dolayı özellikle tercih edilmektedir. Siklik disülfür açısından zengin peptitler, siklik omurga yapısının ve disülfür çapraz bağlarının kazandırdığı üstün özellikleri sayesinde yüksek pH ve sıcaklığa karşı direnç göstererek yüksek stabiliteye sahiptirler [261,262]. Bununla birlikte, yapıdaki disülfid bağlarının sayısına ve topolojik düzenlemelere göre de entropik etkileri değişmektedir. Yapılan çalışmalar, disülfür bağlarının peptitin konformasyonel özgürlüğünü kısıtladığını, böylece yapının termodinamik stabilitesini arttırdığını ve peptit entropisinin artan sayıdaki disülfür bağıyla orantılı olarak azaldığını göstermiştir [263,264]. Disülfid siklizasyonlarının oluşturulması kolaydır ancak diziyeye iki sisteinin dahil edilmesini gerektirir. Siklizasyon için ilave edilen bu iki tiyol grubundan oluşan disülfid bağı, istenmeyen konfigürasyonlara indirgeme ve yeniden oksidasyona neden olabilir. Bu yüzden iyi bir kimyasal hesaplamalı analiz sonucunda bu işlemin yapılmasına karar verilmelidir.

1.19 Siklik Peptit Dizilerinin Tasarımı

Peptit türevli terapötiklerin rasyonel tasarımı genellikle altta yatan protein-peptit etkileşiminin yapısal karakterizasyonunu gerektirmektedir. Deneysel karakterizasyonun zor olabileceği göz önüne alındığında, güvenilir hesaplama araçlarına ihtiyaç vardır. Bu yaklaşımların başında, hedef PPI'lerin çözülmüş kristal yapısına dayanan bilgisayar destekli biyoinformatik teknolojisi gelmektedir. PPI'lerin bağlama arayüzünün biyoinformatik ve hesaplamalı analizi, etkileşen iki proteinin yüzeyindeki temel amino asitlerin tanımlanmasını sağlar [26,27]. Farklı metotlarla stabilize edilmiş peptit yapı iskeleleri, hücre içi PPI'ları inhibe edecek şekilde tasarlanmıştır. Siklik peptit ilaç adayları, kristal yapıları açığa çıkarılmış hedefleri ile oluşturduğu kompleks yapı ile ele alınarak analiz edilir. Bu bağlamda öncelikle bilinmesi ve izlenmesi gereken birkaç adım bulunmaktadır;

- 1) Protein-peptit etkileşimlerinin daha iyi analiz edilip anlaşılması; Protein Veri Bankasında (PDB: www.pdb.org) [265] 3 boyutlu(3D) etkileşim veri tabanı (<http://3did.irbbarcelona.org>) gibi tamamlayıcı [266] veri depolarından protein-peptit komplekslerinin yüksek çözünürlüklü yapılarının tanımlanmasıyla bu komplekslerin temel özellikleri ve yapısal çalışmaları gerçekleştirilir [267,268].
- 2) Uygun dizinin seçilmesi: Siklik peptitler için en uygun diziyi seçmenin iki yolu vardır: (i) referans bir dizi varsa doğal bir protein sekansını taklit etmek ya da (ii) referans bir dizi yoksa yeni bir peptit dizisi tasarlamaktır [269]. Hutlinet ve arkadaşlarının [270] yaptığı çalışma sonucunda insan interaktomunda hedef olabilecek aday molekül sayısını 56.000 olduğu gösterilmiştir ve siklik peptitlerin özgüllüğü büyük ölçüde bu hedef proteinlerle ara yüz oluşturan amino asitlerin seçimiyle sağlanmaktadır. Eğer bir peptit dizisi sentetik olarak tasarlanacaksa olası dizi ihtimali oldukça fazladır. Bu yüzden siklik peptitlerin birincil dizisini tanımlamak için ya doğal bir peptit etkileşim dizisinden yola çıkılmalı ya da protein-protein ara yüzünden sarmal bir parçanın seçilmesi gerekmektedir. Tarama yöntemleri kullanılarak siklik peptit dizileri geliştirilebilir ve birincil dizilerinin hesaplamalı tasarımı yapılabilmektedir [271].
- 3) Hesaplamalı yaklaşım: Siklik peptitlerin geliştirilmesi maliyetli ve zaman gerektiren bir süreçtir. Ayrıca, siklik peptit tasarımında birçok değişkenin olması ve olası dizi sayısının çokluğu sınırlı fonlarla gerçekleştirilebilecek bir iş yükü olmaktan çıkmaktadır. Deneysel olarak test edilecek aday siklik peptitlerin sayısının azaltılmasına ve belirli deneysel gözlemlerin rasyonelleştirilmesine yardımcı olabilecek *in siliko* modellerin geliştirilmesi için hesaplamalı yöntemler kullanılmaktadır. En temel ve basit analizler, Pymol gibi popüler moleküler grafik yazılımı kullanılarak yapı etkileşimlerinin üç boyutlu olarak görselleştirilmesine dayanmaktadır [272]. Bu gibi yazılımlar, hidrojen bağlarının ve hidrofobik temasların bağlanma arayüzündeki konumlarını, aralığını ve önemli kalıntıların çıkarılmasını sağlar. İlgili peptitlerin birden fazla yapısı mevcut olduğundan, doğrusal dizilerin doğrudan halkasal optimizasyonuna bağlanması üzerine meydana gelen konformasyonel değişiklikleri çıkarmak mümkün olabilmektedir. [273,274]. X ışını kristalografisinden, NMR ölçümlerinden ve moleküler dinamik (MD)

simülasyonlardan türetilen protein-peptit kompleks yapılarının analizi, siklik peptit dizilerinin tasarımı için yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardır. Özellikle MD simülasyonları, moleküler esneklik ve bağlanma enerjilerinin tahminleri hakkında bilgi sağlayarak peptit tasarımı için yapı bazlı görselleştirme imkanı sunmaktadır. Teorik olarak, peptitlerin tasarımına yönelik herhangi bir MD yöntemi, siklik peptitlere de uyarlanabilmektedir ve bugüne kadar siklik peptitlere yönelik birkaç MD yöntemi uygulanmıştır [271,275].

- 4) Halkasal motifin seçimi ve konumlandırılması: Siklik peptitlere uygulanacak halkasal dönüşün seçimi ve yerleştirilmesi, peptitin hedefine bağlanmasına izin verecek yeterli esnekliği korunmasından, arzu edilen ikincil yapının nasıl stabilize edileceğine kadar birçok unsuru barındıran bir analizdir. Bunlara ek olarak, hücre içerisine gireceği zaman göstereceği biyolojik aktivitelerinin iyileştirilmesi ve hücre penetrasyonunu artırarak siklik peptitin aktivitesini etkileneceği modifikasyon aşamalarını da içermektedir [22]. Makrosiklizasyon reaksiyonunun verimli bir şekilde ilerlemesi için halkasallaştırılacak aminoasit kalıntılarının sarmalın aynı tarafına yerleştirilmesi gerekmektedir. Kullanılacak bu zimbalar, peptit sarmalının uzunluğu boyunca herhangi bir yere yerleştirilebilmektedir. Zimbaların yerleştirilmesinde dikkat edilmesi gereken nokta, zımbanın kritik etkileşimli amino asit kalıntılarının yerini almamasıdır. Böylelikle aynı bağlanma entalpisinde fakat daha düşük bir bağlanma entropisine sahip siklik peptit dizisi elde edilir. Bu temel prensip, BCL-2'yi [276], HIV integrasını [277] ve Rep Protein A'yı [278] hedefleyen, literatüre sunulmuş siklik peptitlerin çoğunluğunun tasarımına öncülük etmiştir.
- 5) Siklik peptit motifine fonksiyonellik kazandırılması: Birincil peptit diziyeye farklı amino asit kalıntılarının eklenmesiyle siklik peptitlere işlevsellik kazandırılabilir. Bu duruma, Dougherty ve ark. yaptığı çalışma örnek olarak gösterilebilir. Çalışmada hücreye nüfuz eden peptit (CPP) dizilerinin eklenmesiyle, siklik peptit hücre alımını artırabildiği gösterilmiştir [279]. MDM2'ye bağlayan siklik bir peptidin C terminaline siklik bir CPP'nin eklenmesi, iyileştirilmiş bir sitozolik geçiş göstermiştir. Ayrıca bu modifikasyonun küçük molekül inhibitörü olan nutlin 3a'ya benzer bir hücresel yarım maksimal etkili konsantrasyon (EC50) değerine sahip olduğu bulunmuştur. Oligomerizasyon/polimerizasyon yöntemleri de siklik peptitlerin

proteaz direncini arttırmada ve çok değerlikli etkileşimler oluşturmasını sağlamaktadır. Literatürde bu konuda yapılan birkaç çalışma bulunmaktadır [280,281].

Günümüzde siklik peptit tasarımında hesaplamalı tekniklerin uygulanması hala başlangıç aşamasında olup, potansiyelliğinin artırılması için teknikler ve yöntemler geliştirilmektedir. Siklik peptitin siklizasyonu, *in vitro* bağlanma afinitesi, hücresel aktivitesi ve biyolojik potansiyel özelliklerinin iyileştirilmesi için ileriki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.20 Kanser Çalışmalarında Siklik Peptitlerin Aktiviteleri

Tümörle ilişkili proteinler arasındaki etkileşimin küçük moleküllü ilaçlar tarafından hedeflenmesi, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde oldukça dikkat çekici bir strateji haline gelmiştir [282,283]. Siklik bir peptitin biyolojik etkisini inceleyebilmek için *in vitro* aktivite analizlerinden faydalanır ve bu analizler neticesinde, inhibisyon için hedeflenen molekülün etkili olduğu sinyal yolları ya da gen ekspresyon seviyelerinin değişmesi beklenir. Fakat öncelikle siklik peptitin hedefi ile etkileşime girdiğini doğrulamak gerekmektedir. Bu yüzden *in vitro* immünopresipitasyon (IP) ve proteinler arasındaki fiziksel etkileşimleri analiz etmek için kullanılan aşağı çekme (pull-down assay) metodları sıklıkla kullanılır. Bunun için siklik peptitler FITC etiketli olacak şekilde sentezlenir ve hücrelerle muamele edilir. Tedavi sonrası hücreler parçalanır ve siklik peptitlerle etkileşime giren proteinlerin immünopresipitasyonu lizata bir-FITC antikoru veya protein A/G-sefaroze eklenerek gerçekleştirilir [284-287]. Benzer şekilde biyotinlenmiş siklik peptitler, streptavidin agaroz boncukları üzerinde sabit hale getirilir ve hücre lizatları ile inkübe edilir [288]. Her iki durumda da, yakalanan proteinler daha sonra denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek siklik peptitin hedef protein ile olan etkileşimi Western blot yöntemi ile gösterilir. İlk hidrokarbonla zımbalanmış proapoptotik özellikli siklik peptit, BH3 alanına özgü (B hücreli lenfoma 2 ile etkileşime giren hücre ölümü aracısı (BIM) ve BH3 ile etkileşime giren alan ölüm agonisti (BID)) türetilen BCL-2'nin α sarmalına karşı tasarlanmıştır. Yapılan çalışmada, BIM ve BID tek i, i + 4 siklik 21 amino asitten oluşan (21-mer) peptitlerinin, yüksek sarmal yapı, proteaz direnci ve BCL-2, BCL-XL ve MCL'ye yüksek afiniteyle bağlanma eğilimi göstermiştir [276,289]. Yapılan başka bir çalışmada ise siklik bu peptitin K562 ve U937 lösemi

hücre hatlarındaki apoptozu indüklediği gösterilmiştir [289,290]. Siklik peptit tasarımları transkripsiyonel aktivasyonu düzenleyen bir protein-protein etkileşimini inhibe edecek şekilde dizayn edildiği takdirde, raportör gen analizleri ve RT-PCR metoduyla siklik peptitin *in vitro* etkinliğinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Literatürde yer alan SAHM1 siklik peptiti ile hücreler tedavi edildikten sonra Notch'a bağlı transkripsiyonel aktivasyon üzerindeki etkisi, yukarıda bahsedilen her iki analiz yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada, T-ALL (T hücreli akut lenfoblastik lösemi) hücreleri, SAHM1 peptiti ile tedavi edilerek ve Notch'a bağımlı hedef genlerin ekspresyonunun doza bağlı inhibisyonu RT-PCR ile gösterilmiş ve doğrulanmıştır [288]. Tümör protein 53'e (p53) inhibitör proteinlerinin (MDM2 ve MDMX) bağlanmasını engelleyecek bir molekülün p53'e bağlı hücre döngüsünü dururarak apoptozu indükleyebileceği hedefiyle gerçekleştirilen çalışmada, p53-MDM2/MDMX çift inhibitörlü siklik peptit tasarımının, bağlanma afinitesine ve hücresel aktivitesine yönelik umut vaat eden *in vitro* veriler elde edilmiştir [291]. Bu veriler, klinik p53'e yönelik optimize edilmiş siklik peptitlerin temelini oluşturmuştur [292]. METTL3 (RNA m6A modifikasyonunu katalize eden metiltransferaz) çeşitli kanser türlerinde bir onkogen olarak tanımlanmıştır ve terapötik inhibisyon için hedef aday gösterilmiştir. Li ve ark. tarafından yapılan çalışmada METTL3 etkileşimi için gerekli a-sarmal ikincil yapının oluşumuna sahip bir siklik peptit inhibitörü (RSM3) tasarlanmıştır. Çalışma sonucunda RSM3'ün, kanser gelişimini destekleyen sinyalleri inhibe ettiğini ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, *in vivo* çalışmalar *in vitro*'da alınan sonuçları desteklemiş, tümör modelinde RSM3 tedavisi sonrası tümör büyümesi önemli ölçüde baskılanmıştır [293]. Siklik peptitlerin *in vivo* aktivitesini incelendiği diğer üç farklı çalışmada da, farelerde oluşturulan kanser modellerinde tümör ilerlemesinin inhibe edildiği gösterilmiştir [276,284,288].

1.21 ERα Hedefli Peptitlerin Tasarımı

Protein-protein etkileşimleri (PPI'ler), bir veya spesifik aynı kökenli alanlar arasında bir protein ve ikinci bir proteinin bağlanma dizileri arasında meydana gelir. Bu etkileşimler, çözücünün erişebildiği yüzey alanında dipol-dipol, van der Waals, hidrojen bağı veya elektrostatik kuvvetler tarafından stabilize edilir. Ortaya çıkan kompleksler yalnızca farklı proteinler arasındaki etkileşimlerden değil aynı zamanda

ER α 'nın molekül içi katlanma aşamalarından da elde edilir. Bu etkileşimlerden kaynaklanan fizyolojik/patolojik etkileri inhibe etmeye yönelik protein-protein etkileşimlerinin bozulması, spesifik bağlanma motifine karşılık gelen kısa peptitlerle (tipik olarak 10 ila 30 amino asit) sağlanabilir. Çoğu peptit genellikle düşük bir özgüllük ve seçicilik sergilediği ve proteolize maruz kaldığından dolayı bazı dezavantajlara sahiptir [294]. Fakat, bu durumlar dezavantajlı görünse de, protein-protein etkileşimlerini hedeflemek, özellikle hücre sinyal yollarına, farklılaşma süreçlerine ve çoğalmasına müdahale etmek açısından çekici bir strateji olmaya devam etmektedir [295,296].

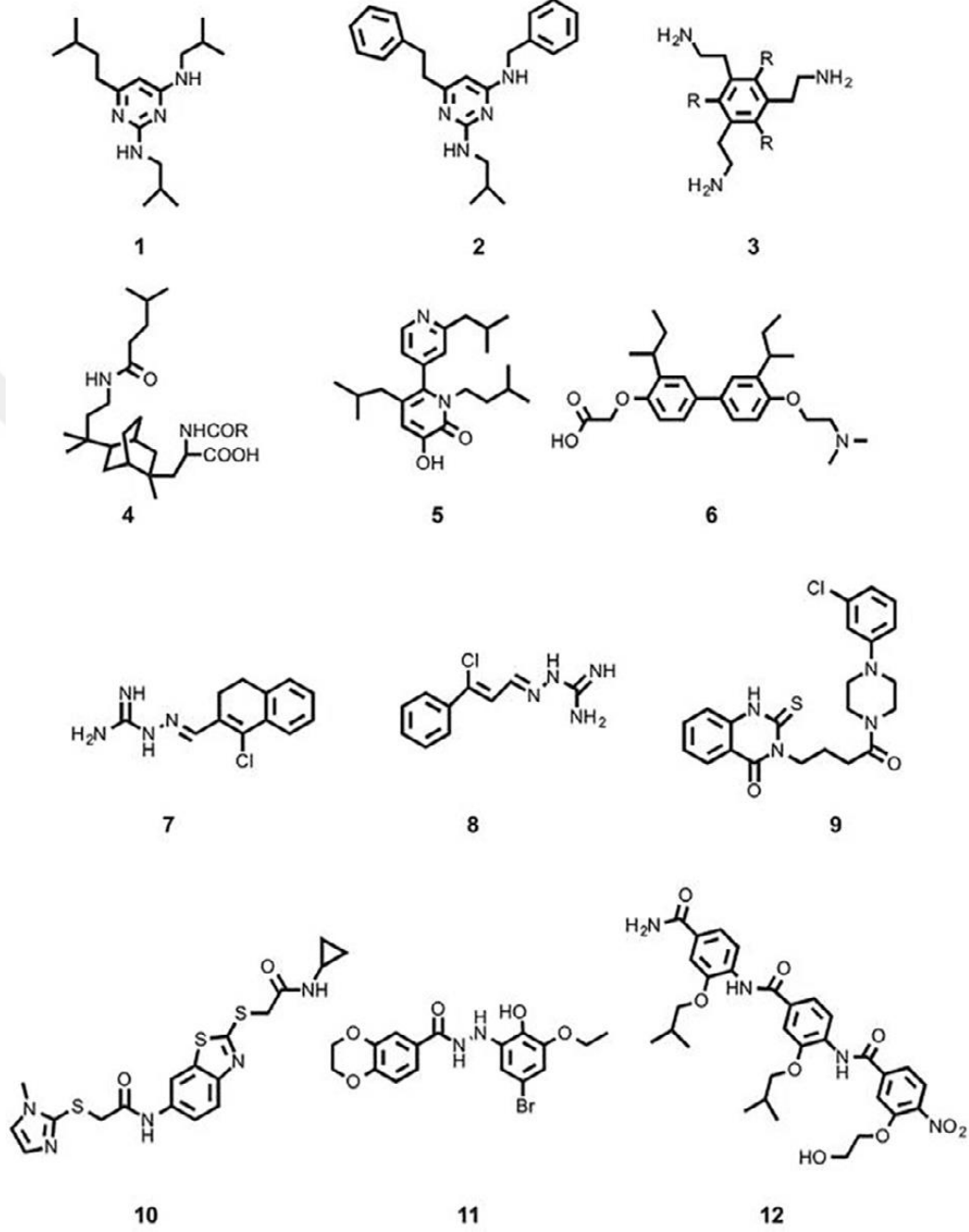
1.22 LxxLL Motifi ve Hedeflenmesi

ER α aracılı transkripsiyon, SRC/p160 ve CBP/p300 koaktivatör ailesinin reseptörün düzenleyici LxxLL konsensüs dizilerine doğrudan etkileşimi ile başlatılır. Reseptörün aktivasyonundaki bu önemli LxxLL motifi (L; lösin, X ise herhangi bir amino asittir) nükleer reseptör (NR) kutusu olarak adlandırılır ve koaktivatör proteinin α -sarmal peptidine karşılık gelir [297,298]. LxxLL motifi ER α 'ya bağlanmada rol alırken, motife komşu kalıntılar nükleer reseptör süper ailesi proteinleri arasında seçicilik/özgünlük kazandırır [299-301]. LxxLL motifini içeren çeşitli peptidomimetikler, terapötik olarak önemli ER α -koaktivatör etkileşimlerini engellemek için geliştirilmiştir. [41,43,302-305]. LxxLL peptit motifinin ikincil yapısını taklit eden birkaç sentetik küçük molekül de bu PPI'leri bozmak için geliştirilmiştir [306-316].

1.22.1 Küçük molekül LxxLL inhibitörleri

Birçok çalışma neticesinde ER α 'nın LxxLL motifine karşı birçok nükleer koaktivatör bağlama inhibitörleri (Şekil 1.10) sentezlenmiştir. Bu antagonistler ER α 'nın LxxLL bağlanma cebine yerleşerek koaktivatörlerin bağlanma yeteneğini engeller. Geliştirilen bu inhibitörler yapısal olarak, bir α -sarmal geometrisine sahip bir iskele içerirler ve LxxLL motiflerinin lösin yan zincirlerini taklit eden kısa hidrofobik yer değiştiricilere sahiptirler [317,318]. Bu hidrofobik yer değiştiriciler lösin yan zincirleri tarafından belli konformasyona yönlendirilirler. Geliştirilen inhibitör moleküller genellikle doğal peptitlerden daha az aktif olmalarına rağmen, yeni anti-östrojenlerin üretimi için umut verici bir yaklaşım olmuştur [306,308-313,319].

Bunlara ek olarak, antiöstrojenik aktivitesini ER α ve β 'nin E2 bağlama cebini işgal ederek gösterdiği bilinen kısmi antagonist 4 hidroksitamoksifenin, X-ışını çalışmaları sonucunda ER α 'nın LxxLL bağlanma cebini işgal edebildiği bulunmuştur [320].



Şekil 1.10 : Nükleer koaktivatör bağlama inhibitörleri [36]. 1.bileşik; 2,4-diizobütül amino-6-izopentil pirimidin, [306] 2.bileşik; pirimidin merkezli nükleer koaktivatör bağlama inhibitörü [307], 3.bileşik; amfipatik benzen [308], 4.bileşik; bisiklik [2.2.2] oktan [309], 5.bileşik; piridil piridon [310], 6.bileşik; bifenil proteomimetik [311], 7.bileşik; ERI-5 [312], 8. bileşik; guanilhidrazon [313], 9. ve 10.bileşikler; yüksek verimli tarama ile elde edilen de novo inhibitörler [314], 11.bileşik; ER α 'nın AF2 kısmına yönelik geliştirilen inhibitör molekül [315], 12.bileşik; koregülatör bağlanma düzenleyici olan ERX-11'dir [316].

1.22.2 Lineer peptit LxxLL inhibitörleri

1998'de Rosenfeld ve ark. LxxLL içeren motiflerin, nükleer reseptörlerin koaktivatör komplekslerini kendine bağlayacağı özel bir bağlanma alanı oluşturduğunu ve LxxLL kutusunun, koaktivatör komplekslerinin spesifik reseptör ve ligand etkileşimine katkıda bulunabileceğini göstermiştir [321]. McDonnell ve ark, ER α 'nın reseptörünün C-terminal AF-2 alanının, koaktivatör proteinleri kendine bağlayabileceği özel bir yüzey sağladığını, böylece reseptörün agonist ve antagonist etkilerinin ayırt edilebileceğini vurgulamıştır [322]. Daha sonra aynı çalışma grubu, estradiol veya tamoksifene bağlı ER α ile etkileşime giren peptitleri faj gösterimi yoluyla tarayarak ER α aktivitesini inhibe edebilecek LxxLL motifi içeren peptit dizilerini rapor etmiştir [299,323,324]. Katzenellenbogen ve ark. yaptığı çalışmada, NR-2 peptitinin, agonist bağlı ER α 'yı stabilize edebildiğini ve ER α -agonist kompleksinin yarı süresini artırabildiğini göstermiştir [325]. Brunsveld ve ark. yaptığı çalışmada ise, ribozom gösterim yoluyla ER α 'ya karşı yüksek oranda korunmuş spesifikliği yüksek peptit motifini PXLxxLLXXP bildirmişlerdir. Grup ayrıca, PXLxxLLXXP motifinde bulunan komşu prolinlerin, kristal yapı ve moleküler modelleme çalışmaları ile düzenlenerek ER α 'ya bağlanacak sarmal peptitlerin ikincil yapısını düzenleyebildiğini ve reseptöre olan bağlanma afinitelerinin geliştirilebildiğini göstermişlerdir [300]. Fakat, LxxLL motifine karşı geliştirilen lineer peptitlerin fizyolojik koşullar altında genellikle zayıf stabiliteye ve hücre geçirgenliğine sahip olmasından dolayı LxxLL motifli peptit tasarımlarına hücreye nüfuz eden sekans eklemesi yapılarak geliştirilmeye çalışılmıştır Bu çalışmalara örnek olarak, Cardoso ve ark. zengin arjinin kalıntıları içeren L-R9 ve L-R10 peptitlerin çeşitli memeli hücre hatlarında yüksek penetrasyona sahip olduğu göstermiştir [326]. 2009 yılında Brunsveld ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada ise, nona arjinin etiketli LxxLL peptit problemlerinin ER α 'ya bağlanabildiğini ve koaktivatörlerin bağlanmasıyla rekabet edebildiğini bildirmişlerdir [301]. Buna ek olarak sonuçlarında, peptitin ER α aracılı transkripsiyonu baskılayabildiğini ve ER α (+) MCF-7 hücrelerinde pS2 geninin mRNA'sını aşağı doğru düzenleyebildiğini göstermişlerdir. Yine de peptitlere uygulanan sekans ekleme modifikasyonları sonucu LxxLL'e karşı türetilen peptit yapılarının esnek ve kararsız olması sorunu ile karşılaşmıştır. Bu yüzden hedef motife bağlanma afinitesini arttırmak için stabilize edilmiş peptitler farklı yöntemlerle geliştirilmiştir. Disülfid

bağlı ile stabilizasyon [41], makrolaktam bağlanması [302,303], tüm hidrokarbon zımbalı peptit bağlanması [305], Tiyol-eter bağlanması [42,327] alkin hidrotiyolasyon bağlantısı [253] gibi bir çok yaklaşım ER α 'yı hedefleyebilen peptitlerde yan zincir çapraz bağlanması için uygulanmıştır.

1.22.3 Disülfid köprülü (bağlı) inhibitör peptitler

Kısıtlanmış peptitleri geliştirmek için kullanılan stratejiler genellikle, i ve i+4 kalıntılarının bir amid bağıyla (makrolaktam) veya i ve i+3 kalıntılarının bir disülfid köprüsüyle (bağıyla) köprülenmesinden oluşur. Kısıtlanmış peptitler, yapısal olarak kısıtlanmış ve stabilizasyonu yüksek peptitler olarak karşımıza çıkar ve bu konuda üstünde en çok çalışılan peptit türevleridir. Wemmer ve ark. yaptığı çalışmada disülfid bağı stratejisine dayalı peptitlerinin geliştirilebileceği bildirmiştir [328]. ER α 'ya yüksek spesifiklikte ve özgüllükte bağlanan kısa siklik peptitler ilk olarak Spatola ve ark. tarafından LxxLL motifini içeren (i, i + 3) disülfid bağı ile stabilize edilmiş peptit analogu (PERM1, H-Lys-c(DCys-Ile-Leu Cys)-Arg-Leu-Leu-Gln-NH₂) olarak türetilmiştir. PERM1'in Ki değerleri (ilgili reseptörün %50'sini işgal etmek için gerekli ilaç konsantrasyonu), zamanla çözülen floresans bazlı ortak aktiveleştirici etkileşim analizi ile ölçülmüş ve ER α 'ya karşı 25 nM ER β 'ya karşı da 390 nM değerinde olduğu gösterilmiştir. [41-43]. Ayrıca, X ışını kristalografisi çalışmalarına göre, PERM-1'in N-terminal ucunda bulunan bazik kalıntının (örneğin bir lizinin), ER α 'ya bağlanma afinitesi için önemli olan elektrostatik etkileşimlerde rol oynadığı vurgulanmıştır [43]. Sonraki yapılan çalışmalarda, güçlü bir hidrojen vericisi olan arjininin, lizin yerine motife konumlandırılmış ve bağlanma afinitesinde artış görülmüştür [42]. Daha sonra bu peptitlerin analoglarından oluşan bir dizi peptit analogu sentezlenmiş ve her iki ER alt tipi üzerinde test edilmiştir. Elde edilen PERM3 (H-Arg-c(D-Cys-Ile-Leu-Cys)-Arg-Npg-Leu Gln-NH₂) peptitin (Npg neopentilglisin'e karşılık gelmektedir) nanomolar altında bir Ki değeri (Ki = 70 pM) göstermiştir [43]. Böylelikle, ER α 'ya karşı hedeflenen en etkili disülfid bağı peptit PERM3 olmuştur. PERM1 peptidi, ER α 'yı güçlü bir şekilde bağlayabilen ilk bildirilen stabilize peptit olarak literatürde yer almıştır ve ER α -koaktivatör etkileşimlerini hedef alan diğer çalışmalar bu peptit dizisinden ilham alınarak geliştirilmiştir. Kurihara ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada R7 ile konjuge edilmiş PERM1 ve PERM3 peptitleri ER α pozitif T47D meme kanseri hücreleri üzerinde hücre penetrasyon verimliliğini incelemek için kullanılmıştır. R7-konjuge fragmentin, peptitlerin sarmal yapılarını

bozmadığını, PERM-3-R7 peptidinin ise ER α aracılı transkripsiyonu önemli ölçüde etkileyerek ilgili gen pS2'nin mRNA ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyebildiğini göstermişlerdir [44,45].

1.22.4 Tiyoeater ve vinil sülfür köprülü (bağlı) inhibitör peptitler

Spatola ve ark.'nın gerçekleştirdiği çalışmada, (i, i+3) aralıklı tiyoeater köprü ile amino asitlerin stabilize edildiği siklik peptit motiflerinin, bağlanma afinitesini önemli ölçüde arttırabildiğini bildirmiştir. Sistatyonin içeren PERM3'ün daha yüksek sarmal katlanma gösterdiğini ve ER α -koaktivatör etkileşimlerini (K_i, 6,9 nM) güçlü bir şekilde inhibe edebildiği bulunmuştur [42]. i, i+3 aralıklı tiyoeater köprüsüyle oluşturulan siklizasyonun, disülfür bağlı siklizasyondan daha etkili olmasına karşılık, i, i+3 tiyoeater köprüsünün veya bir i, i+4 laktam köprüsünün eklenmesiyle elde edilen siklizasyonunun bozucu/zararlı olduğu görülmüştür [43]. Metal katalizörü kullanılmadan foton-indüklü molekül içi tiyoeater makrosiklizasyonunu sağlayan bir zımbalama tekniği ile ER α -koaktivatör etkileşimlerini hedefleyen siklik peptitler başarılı bir şekilde tasarlanmıştır [253]. Literatürde yer alan vinil sülfür bağlı siklik peptitler (peptit2h), doğrusal analog peptiti (peptit1h) ile karşılaştırıldığında ER α 'ya yüksek bağlanma afinitesi ile hücre penetrasyonu göstermiş ve MCF-7 hücrelerine karşı anti-proliferatif aktivite gösterdiği bulunmuştur [253].

1.22.5 Tümü hidrokarbon siklik peptitler

İlk makrosiklik peptit sarmalları 1998'de Grubbs ve ark. tarafından sentezlenmiştir [329]. 2000 yılına gelindiğinde Verdine ve ark. peptitlerin ikincil yapısını, stabilitesini, bağlanma afinitesini ve hücre geçirgenliğini iyileştirecek tüm hidrokarbon stratejisini geliştirmiştir [330]. Bu metod, sentetik peptitlere makrosiklik çapraz bağların kurulması için rutenyum katalizli olefin metatezini (RCM) içermektedir. Hidrokarbon zımbalamanın yapı taşları, değişen uzunluklardaki terminal olefin bağları taşıyan α,α -disübtitüe edilmiş doğal olmayan amino asitlerden oluşur. Tek dönüşlü zımbalama için genellikle i, i + 4 konumlarında S-pentenilalanin kullanılırken, çift dönüşlü zımbalama için i, i + 7 konumlarında R-oktenilalanin/S-pentenilalanin veya S-oktenilalanin/R pentenilalanin kombinasyonu kullanılır [243]. α -heliksin ardışık dönüşleri arasında tümü hidrokarbon bağlantısı içeren peptitlerin terapötik potansiyelini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak; HIV-1 kapsidinin (kılıfının) bağlanmasını inhibe eden [331], Notch transkripsiyon

faktörü kompleksini doğrudan inhibe edebilen [288], p53 tümör baskılayıcı sinyal yolağını tekrardan aktive edebilen [284] ve Bcl-2 aracılı apoptozun devamlılığını sağlayan siklik peptitler [276] verilebilir. 2011 yılında Phillips ve ark. tarafından NR-koaktivatör peptitin ER α LBD'ye bağlı olduğu kristal yapı kompleksi (PDB, 2QGT) temel alınarak tümü hidrokarbon stratejisiyle siklik peptitler elde edilmiş ve peptit motifleri arasından SP6'nın (Ac-EKHKILS5RLLS5DS-NH₂), 75 nM'lik K_d değeri ile ER α 'ya en yüksek bağlanma afinitesini gösterdiği bulunmuştur [305]. Moore ve ark. etkileşim halindeki lösün ve izolösün kalıntılarını (I689LxxLL694 kutusunda Ile689 ve Leu693) taklit etmek için, siklik amino asit S5'in γ -pozisyonuna metil grubu ilave ederek yeni amino peptit motifleri oluşturmuşlardır. En iyi peptit motifinin (IC₅₀ = 89 nM), izolösün 689'un bir S- γ -metil zımbalı amino asitle yer değiştirdiği tasarımın olduğu ve yer değişikliği yapılmamış peptitlerden (390 ve 760 nM) önemli ölçüde daha yüksek afiniteye sahip olduğu belirtilmiştir [304]. ER α 'ya yüksek afiniteyle bağlanabilen tamamı hidrokarbonla siklik peptitlerin hücreye nüfuz etme kapasitesini arttırmak için, çeşitli moleküler dinamik simülasyonlarından faydalanılmıştır. Literatürde, yüksek hücre geçirgenliğine ve hücreyel aktiviteye sahip R4K1 peptiti tasarlanmış ve ER α 'ya karşı yüksek bağlanma afinitesi sergilediği ifade edilmiştir. Ayrıca, R4K1'in ER α ile koaktivatör arasındaki etkileşimi düşük nanomolar düzeyinde bozduğu *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Buna ek olarak, R4K1'in hücre içinde ER α aracılı gen ekspresyonunu baskıladığı ve sebeple ER α pozitif meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği de ifade edilmiştir [332]. ER α 'yı inhibe etme amacı ile LxxLL motifine benzer başarılı peptit mimiklerinin elde edildiği bir başka çalışma ise Montgomery ve ark. yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada, KLHRLQDS motifi üzerinden K ve R amino asitleri birbirine Diels Alder reaksiyonu ile bağlanmıştır. Bu motifte zımba görevi gören olefin K ve R amino asitlerini birbirine bağlarken L amino asitlerinden birini içine almaktadır. Bu çalışma ile Diels-Alder siklizasyonun, çeşitli kimyasal ortamlar altında çeşitli protein yapısal motiflerini stabilize etmede kullanılabilir bir yaklaşım olduğu ifade edilmiştir [333].

1.23 Hipotez

ER α hedefli terapilere karşı zamanla kazanılan direncin önüne geçmek için ER α -kofaktör etkileşimlerini inhibe etmek son yıllarda kullanılan bir stratejidir. ER α -kofaktör etkileşimlerinin inhibitörleri, E2 varlığında açığa çıkan korunmuş bir bölge

olan reseptör kutusu (NR) LxxLL motifinin hidrofobik oyuk bölgesini hedef alınarak tasarlanmaktadır. Bu amaçla bu tez çalışmasını ER α 'ya spesifik olacak siklik peptitlerin literatürde sunulan ER α inhibisyonunda kritik LxxLL imza motifine daha özgün ve ER α 'ya daha etkin bağlanabileceği bir şekilde *in siliko* olarak yeniden tasarlayarak elde edilmesi bu tezin hipotezini oluşturmuştur. İlerlettiğimiz *in vitro* çalışmalarımızdan aldığımız sonuçlar, yeni dizayn siklik peptitlerimizin ER α (+) hücre hatları üzerinde literatürde daha önce sunulan peptit motifinden daha iyi bir inhibitör etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Böylelikle, tez kapsamında alınan sonuçlar kurduğumuz hipotezimizi destekler nitelikte olmuştur.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstinye Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Merkezi'nde (İSÜMKAM), Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.

2.1 Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, Fetal sıgır serumu (FBS) (Wisent Bioproducts), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin) (Gibco), Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Wisent Bioproducts, Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries, 17 β -Estradiol (Sigma-Aldrich, Cat No E2758), %0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA) (Gibco), Fosfat tuz tamponu (PBS), (Gibco), Sulforhodamine B sodium salt, Chemcruz, Trikoloroasetik asit (TCA) (CAS 76-03-9) from AppliChem, TPBM (theophylline, 8-[(benzylthio)methyl]), CAS 6466-43-9, Merck), Adenosine 5'-triphosphate (ATP) assay mix (FLAAM-1VL), Sigma (USA), Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Asetik asit, Isolab, MTT (M5655) from Sigma (USA), Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore, Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore, Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore, Muse® Bcl-2 Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore kullanılmıştır. Siklik peptitlerin sentezlenmesinde kullanılan tüm reaktifler Sigma'dan temin edildi. Western Blot çalışmalarımızda, RIPA solüsyonu (Thermo), Halt Protease Inhibitor Cocktail 100 X, (Sigma), Pierce™ BCA Protein Assay Kit, (Sigma), Bovine Serum Albumin, (Sigma), TGX FastCast jel solüsyonları, BioRad, Western Blotting Luminol Reagent (sc-2048, Santa Cruz), 10X Yürütme tamponu, BioRad, Trizma Base, Sigma, Tween-20, Sigma, 2X Laemmli Sample Buffer, Chemcruz, Amonyum persülfat (BioRad), TEMED (BioRad), Anti- beta-aktin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Sodyum klorür

(Merck), Anti- Kaspaz-8 (sc-73526, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Anti- p53 (#9282, Cell Signaling Technology, USA), Anti- Bax (sc-23959, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Anti- Bcl-2 (sc-7382, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Anti- ER α (21244-1-AP, Proteintech, USA), Anti- TFF1 (13734-1-AP, Proteintech, USA), Anti-mouse IgG, HRP-linked (#7076, Cell Signaling Technology, USA), Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074, Cell Signaling Technology, USA), Hidroklorik asit, Tekkim, PageRuler Plus Prestained protein ladder, (Thermo) kullanılmıştır. PCR ve qPCR analizleri, N \ddot{u} kleik Asit Boyayıcısı (SafeView Classic G108, abm), GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, Almanya), 2 x SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline, UK), Agaroz, M3044, (Genaxxon Bioscience), High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo kullanılarak ger \check{c} ekleştirilmiştir. ELISA analizi, NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (#78833; Thermo Fisher Scientific), TransAM® ER Active Motif, Carlsbad, CA kitleri kullanılarak ger \check{c} ekleştirilmiştir.

2.2 Cihazlar

H \ddot{u} cre k \ddot{u} lt \ddot{u} ri \check{c} alışmalarında kullanılan ekipmanlar ve cihazlar; 10 μ l, 200 μ l ve 1000 μ l'lik pipet seti, Brand, 200 μ l \check{c} ok kanallı pipet, Brand, -80°C buzdolabı, Panasonic, MDF-U5386S-PE, Buzdolabı, Panasonic, MPR-721-PE, CO $_2$ ink \ddot{u} bat \ddot{u} ri, Panasonic, MCO-230AIC-PE, Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ABS-N, Inverted mikroskop, Nikon, Eclipse Ts2, Kuru sterilizat \ddot{u} r, Panasonic, MOV-212-PE, Laminer hava kabini class II, Telstar, Biovanguard, Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck, Orbital shaker, Lab companion, Otoklav, N \ddot{u} ve, OT90L, Pipet \ddot{u} r, Isolab, Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar, Santrif \ddot{u} j, Hitachi, CF16RN, Soğutmalđ santrif \ddot{u} j, Hitachi, CT15RE ve Vorteks, Scilogex, MX-F kullanılmıştır. PCR ve qPCR analizlerimiz de ise Jel g \ddot{u} r \ddot{u} nt \ddot{u} leme sistemi, General Electric, ImageQuant LAS 500, Thermal cycler, Bio-Rad, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad, ABD) ve Yatay Elektroforez Sistemi, Hoefer™ HE 33, Thermo Scientific cihazlarından faydalanılmıştır. Peptitlerin sentez, karakterizasyon ve saflaştırma aşamalarında Agilent 6530 Q-TOF (6530 Q-TOF LC/MS, Agilent), C18 HPLC column (Phenomenex Luna 5 μ m 100 Å , 250 x 10 mm), C18 HPLC (Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ 5 μ m, 150 x 4.6 mm), Dionex / Thermo UltiMate 3000 HPLC System, Liyofilizasyon cihazı, Telstar Cryodos Freeze Dryer) ve LC-MS (Agilent

Single Quadropole LC/MS) cihazları kullanılmıştır. Western Blot analizlerimiz için ise Dikey elektroforez, Bio-Rad Transfer cihazı, BioRad, 10016505C ve Jel görüntüleme sistemi, General Electric, ImageQuant LAS 500'den faydalanılmıştır.

2.3 RNA-Seq Analizi ile Hedef Molekülünün Belirlenmesi

Yumurtalık kanser hastalarından (tümör dokularından) ve sağlıklı bireylerin yumurtalık dokularından elde edilen RNA dizileri Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'ın gen ekspresyon verilerinin toplandığı Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) kaynağından çekildi. Yumurtalık tümörüne ve sağlıklı (kontrol) yumurtalık dokularına ait RNA-seq verileri, Proje numarası: PRJNA791375 olan, 3 tümör, 3 sağlıklı yumurtalık dokusu örneğinin Illumina HiSeq 2000 (Homo sapiens) teknolojisinden faydalanarak analiz edildiği çalışmadan (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE192410>, kaynak no: GSE192410) alındı. Her bir RNA-Seq verisi FastQ dosya formatına çevrildi ve kalite kontrolü yapıldı. Kalite kontrolünden geçen veriler bir sonraki analizlerde kullanıldı. Analizler yüksek verimli verilerin elde edilebildiği, kullanıcı dostu bir ara yüze sahip Chispter analiz yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. (<http://chipster.csc.fi/>) Chispter analizinde kullanılan örneklerin listesi Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: RNA-Seq analizi yapılan örnekler

Analiz	Örnek	Deney	Doku Türü
SRR17297761	SAMN24287898	SRX13475029	Yumurtalık Tümörü
SRR17297762	SAMN24287902	SRX13475030	Yumurtalık Tümörü
SRR17297763	SAMN24287903	SRX13475031	Yumurtalık Tümörü
SRR17297764	SAMN24287904	SRX13475032	Normal Yumurtalık Dokusu
SRR17297765	SAMN24287905	SRX13475033	Normal Yumurtalık Dokusu
SRR17297766	SAMN24287906	SRX13475034	Normal Yumurtalık Dokusu

Tablo 2.1'de sunulan verilerin adapter kısaltmasına (trimming) ihtiyaç duyulmamasından dolayı, bir sonraki adıma geçirildi ve verilerin referans genom ile HISAT2 hizalanması yapıldı. Bu aşamanın neticesinde her bir verinin hizalanmış dizileri (BAM dosyaları) elde edildi. BAM dosyaları HTSeq analizine tabii tutuldu ve RNA dizilerinin genom ile ne kadar eşleştiği hesaplandı. Sağlıklı ve tümör dokularından elde edilen her bir gene ait eşleşmiş hizalama sayılarının (TSV dosyaları) karşılaştırılması için Tablo 2.2'deki gibi gruplandırılma yapıldı.

Tablo 2.2 : RNA-Seq analiz grupları

Dosya ismi	Grup
SRR17297764_1.tsv	Kontrol
SRR17297765_1.tsv	Kontrol
SRR17297766_1.tsv	Kontrol
SRR17297761_1.tsv	Kanser
SRR17297762_1.tsv	Kanser
SRR17297763_1.tsv	Kanser

Farklı ifade edilen genlerin (Differential gene expression (DGE)) tanımlanması için edgeR aracı kullanıldı. EdgeR analizi sonucunda, sağlıklı yumurtalık ve yumurtalık tümörlerinden elde edilen RNA verilerinde, hangi genlerin farklı seviyelerde eksprese edildiği tespit edildi.

2.4 Hücre Kültürü

İnsan meme kanseri hücre hatları; MCF-7 (ATCC HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), insan over kanseri hücre hatları (OVSAHO, Sigma SCC294) ve CAO-3, ATCC HTB-75) ile BEAS-2B (ATCC CRL-3588) sağlıklı insan bronşiyal epitel hücre hatları *in vitro* çalışmalar için kullanıldı. Bu hücre hatları İstinye Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Merkezi'nde (İSÜMKAM) -80°C'de muhafaza edilmektedir. -80°C'den çıkarılan kriyotüpün içerisinde çözünmüş hücreler pipet yardımıyla daha önceden içerisine 5 ml besi ortamı (%1 penisilin streptomisin (10.000 U/ml penisilin/10 mg/ml streptomisin), %1 L-Glutamin, %10 fetal bovine serum (FBS) içeren RPMI 1640) konulan 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 800 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak hücreler aynı besiyeri (%10 FBS içeren RPMI 1640 içerisine gerektiğinde 500 pg/ml 17 β -Estradiol ilave edilerek [334] 25 cm²'lik flasklara 5 \times 10⁴ hücre/ml olacak şekilde aktarıldı. Flasklar 37°C'de %5 CO₂ ve %98 nem içeren ortamda kültüre edildi.

2.4.1 Hücre hatlarının pasajlanması

Hücreler kültür kaplarında uygun doluluk oranına ulaştığında tripsin ile kaldırılarak pasajlandı. Bu işlem hücrelerin kültüre edildiği flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yüzey yıkaması yapıldı. Yüzeye bağımlı kültüre olan hücrelerin yapıştığı yüzeyden ayırmak için %0.05 Tripsin-EDTA ile 3-5 dakika 37°C'de inkübatörde bekletildi. Tripsini inaktive etmek için için koyulan tripsin hacminin yaklaşık on katı serum ihtiva eden besiyeri ilave edildi. Hücreler 15 ml'lik veya 50 ml'lik santrifüj

tüplerine aktarıldı ve 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz olan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pelletin yoğunluğuna göre üzerine besiyeri ilave edilerek pellet süspansiyonu edildi. Hücre sayımı için süspansiyon pelletten 10 µl alındı ve 96 kuyulu plate içerisinde 10 µl %0,5 tripan mavisi (Sigma) ile karıştırıldı. Lamel ile kapatılmış Thoma lamının iki tarafına sayım kuyusundaki karışım yüklendi. İverted mikroskop ayarlanarak Thoma lamının alt ve üst tarafındaki 16 şar büyük karedeki parlak hücreler sayıldı, aritmetik ortalaması alındı ve hücrelerin canlılıkları hesaplandı.

2.4.2 Hücre hatlarının dondurulması (kriyoprezervasyon)

Hücreler aynı pasajlama prosedüründe olduğu gibi tripsin ile muamele edilerek hücre kültür flakları yüzeyinden ayrıldı ve santrifüj sonrası sayımları gerçekleştirildi. Hücre sayısına bağlı olarak her bir kriyotüpte yaklaşık 1×10^6 hücre ve 1 ml dondurucu ortam (%5-10 DMSO + %10 FBS + %80 DMEM) olacak şekilde hücreler kriyotüplere paylaştırıldı ve -80°C 'ye kaldırıldı.

2.4.3 Hücre hatlarından total RNA izolasyonu ve cDNA çevrimi

OVSAHO, CAO-3, MCF-7 ve MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücre hatlarından total RNA izolasyonu, GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) kullanılarak, üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Uyulan talimatlar çerçevesinde, ilk önce 2-ME (2-mercaptoethanol (2-ME) (M3148))/ Lysis Solution karışımı 1:100 olacak şekilde hazırlandı. 5 milyon hücreye kadar karışımdan 250 µl, 5 milyon-50 milyon hücreye kadar ise karışımdan 500 µl ilave edildi ve iyi bir pipetaj ile homojenize edildi. Filtrasyon kolonu (CP9346) ile 2 mL toplama tüpü (T5449) bir araya getirilerek lizat kolonun üstüne ilave edildi ve $12,000-16,000 \times g$ 'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre atıldı ve eşit hacimde %70 etanol solüsyonu eklendi. Bağlama kolonu (CP9471) ile 2 mL'lik toplama kolonu (T5449) bir araya getirildi ve lizat/etanol karışımı kolona ilave edildi. Maksimum hızda 15 sn santrifüjlendi. Santrifüj sonrası toplama kolonundaki sıvı atıldı ve 500 µL Wash Solution I (W3136) kolona ilave edilerek 15 sn en yüksek hızda santrifüjlendi. Santrifüj sonrası toplama kolonu atıldı ve yeni toplama kolonuna seyreltilmiş Wash Solution 2'den 500 µL ilave edildi ve 15 sn en yüksek hızda yeniden santrifüjlendi. Bu işlem bir kere daha tekrarlandı. Tercihen kolon yıkama solüsyonu ilave edilmeden

1 dakika daha santrifüjlendi. Bağlama kolonu temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 50 µL of Elution Solution (E8024) bağlama kolonuna aktarıldı. Tüpler maksimum hızda 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Örnekler kullanılacağı zamana kadar -80°C de muhafaza edildi. Elde edilen RNA alikotlarının miktarı ve saflığı, NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılarak A₂₆₀/A₂₈₀ ve A₂₆₀/A₂₃₀ oranları analiz edildi. RNA örneklerinin cDNA'ya çevrimi ise SensiFAST cDNA Synthesis Kit tarafından üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Talimatlar doğrultusunda, 1µg'a kadar olan total RNA örneği ile kit içeriğindeki 5x TransAmp buffer ve reverse transcriptase enzimi belirtilen miktarlarda karıştırılarak reaksiyon karışımı PCR tüplerine aktarıldı. PCR tüpleri Thermal cycler, Bio-Rad cihazına yerleştirildi ve primerin bağlanması için 25°C'de 10 dk, enzimin çalışması için 42°C'de 15 dk, enzimin inaktivasyonu için ise 85°C'de 5 dk olacak şekilde program ayarı yapıldı. Süre sonunda elde edilen cDNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar -20°C'de saklandı.

2.4.4 Hücre hatlarından total protein izolasyonu

Çalışmada kullanılan hücre hatları uygun hücre doluluk oranına ulaştığında hücreler tripsin ile muamele edilip toplandı ve santrifüj sonrası elde edilen hücre pelletlerine lizis tamponu eklendi. Örnekler 30 dakika boyunca -20°C'de tutuldu ve her 2 dakikada bir vortekslendi. Sürenin ardından örnekler 20 dakika boyunca 14000 rpm'de 4°C'de santrifüj edildi. Üst faz, Bisikoninik asit (BCA) [335] miktar tayini için ayrı bir santrifüj tüpüne alındı. Protein miktar tayini için öncelikle sığır serum albümin (BSA) proteinin farklı konsantrasyonlarına (200-1000 µg/ml) ait bir standart eğri grafiği çizildi. 96 kuyulu plakanın her kuyusuna 0, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml olacak şekilde 25'er µl BSA ve hücre lizatı (1/5 oranında distile su ile seyreltilerek) konuldu. Kuyulara 200 µl BCA solüsyonu (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Sigma) eklendikten sonra ve plaka 30 dakika 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plaka, spektrofotometrede 570 nm'de okunarak örneklerin total protein miktarları tayin edildi.

2.5 Gradyentli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gradient PCR)

İnsan östrojen reseptör alfa (ERα) ekspresyonundan sorumlu ESR1 gen bölgesine yönelik dizayn edilen F: GAGTATGATCCTACCAGACCCTTC R:

CCTGATCATGGAGGGTCAAATC primerlerinin DNA zincirine bağlanma derecesinin tespiti için Gradient Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi. Reaksiyon, MyTaq™ DNA Polymerase (BIO-21105, Bionline) kit aracılığıyla üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. PCR örnekleri olarak ER α + olan aynı zamanda tez çalışmamızda kullandığımız OVSAHO yumurtalık kanseri hücre hattı ile ER α + olduğu bilinen MCF-7 insan meme kanser hücre hattı kullanıldı. Kontrol hücre hatları olarak ER α - olduğu bilinen CAOV-3 yumurtalık kanseri hücre hattı ile ER α - olduğu bilinen MDA-MB-231 insan meme kanser hücre hattı deney planına dahil edildi. PCR reaksiyonu, başlangıç denatürasyonu 95°C'de 1 dk, (denatürasyonu 95°C'de 15 saniye, primer bağlanması 64-50°C'de 15 saniye, uzaması 72°C'de 10 saniye) x35 kez, son uzamayı 72°C'de 5 dk olarak ayarlandığı koşullar altında Thermal cycler, Bio-Rad cihazında gerçekleştirildi. PCR örneklerinin agaroz jelde gözlemlenebilmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Agarozdan gerekli miktar tartılarak, 1x TEA bufferında mikrodalgada ısıtılarak çözdürüldü. Agaroz jel elektroforez tankına aktarılmadan önce PCR örneklerindeki DNA örneklerinin görüntülenebilmesi için karışıma nükleik asit boyayıcısı eklendi. PCR örnekleri jele yüklendi ve mini yatay elektroforez sisteminde 90 mV'da koşuldu. İşlemin ardından jel görüntüsü jel görüntüleme sistemi tarafından alındı.

2.6 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR (RT-qPCR) analizi için, CFX96 Touch Real-Time PCR cihazı kullanıldı. Bu analiz öncelikle “Yumurtalık ve meme kanser hücre hatlarındaki ESR1'in haberci RNA (mRNA) ekspresyon seviyelerinin tayin edilmesi” adımı için gerçekleştirildi. Daha sonra bu metod, tedavi gören hücrelerden elde edilen cDNA örneklerindeki gen düzeylerinin tespitinde kullanıldı. RT-qPCR için, 2 x SensiFAST SYBR No-ROX reaksiyon karışımı her biri 20 pmol konsantrasyondaki ileri ve geri primerlerden (kullanılan tüm primer sekansları Tablo 2.3'de gösterilmiştir), 1,5 μ L cDNA'dan (seyreltme oranı 1:5) ve toplam hacmi 20 μ L'ye tamamlayacak DNaz/RNaz içermeyen su ile hazırlandı. PCR koşulları: 95°C'de 2 dakika süreyle başlangıç denatürasyonu, 40 döngü için amplifikasyon; her döngü, 95°C'de 5 saniye süreyle denatürasyon, 60°C'de 10 saniye süreyle bağlanma, 20 saniye boyunca 72°C'de polimerizasyonu içerecek şekilde ayarlanarak erime eğrisi analizi

yapıldı. Melting curve analizi gerçekleştirildi. Veriler, 2- $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılarak StepOne Plus v2.3 (Applied Biosystems) yazılımıyla analiz edildi [336].

Tablo 2.3 : qPCR'da kullanılan primerlerin dizileri.

Genler	Primer Dizileri
<i>TP53</i>	İleri (F): 5' TTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATG 3' Geri (R): 5' GCATTTTACAGATATGGGCCTTG 3'
<i>CDKN1A (p21)</i>	İleri (F): 5' CCAGCATGACAGATTTCTACCAC 3' Geri (R): 5' GATGTAGAGCGGGCCTTGA 3'
<i>BAX</i>	İleri (F): 5' CTGACGGCAACTTCAACTGG 3' Geri (R): 5' CAACCACCCTGGTCTTGATC 3'
<i>BCL-2</i>	İleri (F): 5' TCATGTGTGTGGAGAGCGTC 3' Geri (R): 5' TCACTTGTGGCCAGATAGG 3'
<i>CASP8</i>	İleri (F): 5' TCCAAATGCAAAGTGGATGATGAC 3' Geri (R): 5' GTCGTTGATTATCTTCAGCAGGC 3'
<i>PI-9</i>	İleri (F): 5' TGGCACACAGTACCTGCTGAGA 3' Geri (R): 5' GTGTTTCTGGACTCTTCTGCAG 3'
<i>ESR1</i>	İleri (F): 5' GAGTATGATCCTACCAGACCCTTC 3' Geri (R): 5' CCTGATCATGGAGGGTCAAATC 3'
<i>TFF1</i>	İleri (F): 5' CCAGTGTGCAAATAAGGGCTGC 3' Geri (R): 5' AGGCAGATCCCTGCAGAAGTGT 3'
<i>GREB1</i>	İleri (F): 5' GGTCTGCCTTGCATCCTGATCT 3' Geri (R): 5' TCCTGCTCCAAGGCTGTTCTCA 3'
<i>C-MYC (MYC)</i>	İleri (F): 5' TCATAACGCGCTCTCCAAGT 3' Geri (R): 5' CGTTCAGAGCGTGGGATGTT 3'
<i>CYCLIN D1 (CCND1)</i>	İleri (F): 5' TCTACACCGACAACCTCCATCCG 3' Geri (R): 5' TCTGGCATTTTGGAGAGGAAGTG 3'
<i>ACTB (Beta Actin, β-actin)</i>	İleri (F): 5' TTCCTGGGCATGGAGTCCT 3' Geri (R): 5' AGGAGGAGCAATGATCTTGATC 3'

2.7 Western Blot

Western Blot analizi için öncelikle tedavi edilen ve edilmeyen hücre gruplarından toplam protein izolasyonu RIPA Lysis Buffer ile izole edildi ve protein konsantrasyonlarının içeriği BCA yöntemiyle ölçüldü ³³⁵. Western blot yöntemi için ilk önce laemmlerli tamponu ile hücre hatlarından elde edilen protein örnekleri 30 μ g olacak şekilde ayarlandı ve 1:1 oranında karıştırılarak 95°C' de 5 dakika denatüre edildi. Bio-Rad TGX FastCast ile SDS PAGE üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Protein ladder ile örnekler jele yüklenip 120 voltta yürütme tamponuyla yürütüldü. Jelin membrana transfer için öncesinde pedler, jel ve nitroselüloz membran transfer tamponunda bir süre bekletildi. Trans-blot turbo transfer sisteminin kasedine üstten alta sırasıyla bir set transfer pedi, jel, membran ve tekrar bir set transfer pedi yerleştirilerek 2,5 amper ve 25 voltta 30 dakika süreyle proteinlerin membrana geçişi sağlandı. Transfer işlemi sonrası membran 1 saat oda

sıcaklığında 1X TBS-T (%0,1 Tween 20 içeren 1X TBS) ile hazırlanan %5'lik BSA içerisinde bekletilerek bloklandı. Bloklama sonunda membranlar ayrı primer antikolar ile üretici firmanın talimatları doğrultusundaki seyreltme katsayısıyla gece boyu 4°C 'de bekletildi. Primer antikor işaretlemesinde sonra membran ikincil antikora alınmadan önce 5 dakika 3 kez 1X TBS-T ile yıkandı ve membranlar primer antikorla uyumlu ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membran 3 er kez 10'ar dk TBS-T ile yıkandıktan sonra membran üzerindeki proteinleri tespit etmek için uygun Western substratı (Western Blotting Luminol Reagent) ile membran en az 1 dk. karanlıkta muamele edildi. Membrandaki antikor ile muamele edilmiş proteinlerin bant görüntülemesi ImageQuant LAS 500 cihazı ile gerçekleştirildi.

2.8 *In Silico* Modelleme Çalışmaları

ER α 'nın inhibisyonunda etkili olan nükleer reseptör kutusu olarak bilinen LXXLL motifi için türetilen ve kristal yapısı literatüre daha önceden sunulmuş KCILCRLQ sekansı, *in silico* modelleme çalışmalarımızda kullanıldı. Bu motifin taranması ve disülfid bağı ile oluşturulan zımbalama yönteminin tez çalışması kapsamında kullanılması Meddenovo İlaç Tasarım ve Danışmanlık A.Ş. (kısaca Meddenovo) tarafından önerildi. Modelleme çalışmaları Meddenovo tarafından aşağıdaki aşamalar çerçevesinde gerçekleştirildi.

Aşama 1: Hedef protein olan ER α 'nın kristal yapısı yeniden modelleme yöntemlerinden faydalanarak (eksik halkaları onarmak üzere) simülasyonlara hazır hale getirildi. Proteinin ve tasarlanan disülfid bağı zımbalanmış peptidin moleküler modelleme parametreleri hazırlandı ve Meddenovo'ya ait parAM-E yazılımı ile gerçekleştirildi.

Aşama 2: Protein data bankasından 1PCG kodlu ER α reseptörünün koaktivatör etkileşimlerinin seçici inhibitörlerinin sarmalla stabilize edilmiş siklik peptitlerin (<https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.1934759100>) kristal yapısı alındı. Bu kristal yapının KCXLCRLQ sekansı göz önünde bulundurularak deneme setine farklı amino asitler eklendi (serin (S), histidine (H), lizin (K), aspartik asit (D)) ve referans olarak izolösün setimizde kaldı. Kristal yapıdaki izolösün amino asidinde nokta mutasyonları uygulandı ve protein-peptit kompleksleri oluşturuldu.

Aşama 3: Oluşturulan komplekslerin 150 ns boyunca moleküler dinamik simülasyonları koşuldu. Simülasyonların analizi yapıldı. Kümeleme yöntemi

uygulandı ve kümelerden temsili yapılar seçildi. Temsili yapılar bioAIM ile ER α 'ya yanaştırıldı. Yanaştırılan pozlar yapısal olarak incelendi. Referans peptitin ana yapısından çok uzaklaşan pozlar elendi. Eleme sonucu kalan pozlar ve reseptörün oluşturduğu kompleks moleküler dinamik simülasyonlar için hazırlandı. 25 ns simülasyon koşuldu. 25 ns'lik simülasyonların sapması (deviasyonu) kontrol edildi. Deviasyonu çok olan kompleksler elendi ve geriye kalan simülasyonların 5ns'indeki yapılar bağlanma enerjisi hesaplamaları için seçildi. (5. ns deviasyonun sabitlendiği ilk nokta olarak seçildi.) Seçilen yapıların görsel analizi yapıldı. Seçilen yapılar örnekleme hızını artırmak üzere yeniden moleküler dinamik simülasyonuna maruz bırakıldı. 10 adet 1 ns simülasyon koşuldu. Bu simülasyonların üzerinde MMGBSA uygulanarak ortalama bağlanma enerjisi hesaplandı.

Aşama 4: Modellenen sistemlerin enerjileri hesaplandı ve elde edilen simülasyonlar analiz edilerek hedef proteine bağlanma ilgisi en yüksek disülfit bağlı zımbalanmış peptitler analiz edildi.

Detaylıca, ER α 'nın ortak aktifleştirici etkileşimlerinin seçici bir inhibitörü olan ana sarmalla stabilize edilmiş siklik peptitlerin kristal yapısı, Protein Veri Bankasından (PDB ID: 1PCG) alındı. Bu ana siklik peptitin kristal yapıdaki dizisi KcILCRLQ'dur; ve buradaki küçük 'c' harfi, sisteinin D-enantiyomerini temsil eder. Meddenovo Drug Design'in bioAIM yazılımı kullanılarak yerleştirmeye tabi tutulan alt dizileri oluşturmak için KcILCRLQ dizisinin 3. pozisyonuna tekli mutasyonlar uygulandı. Üretilen her dizinin en iyi pozunu korundu ve reseptörle oluşturulan ilgili kompleks, AMBER20 yazılımı kullanılarak moleküler dinamik simülasyonlar (MD) için hazırlandı [337]. Her kompleks aşamalı bir şekilde çözündü, nötrleştirildi, en aza indirildi ve ısıtıldı (NVT grubunda 0'dan 150K'ya ve NPT grubunda 150K'dan 300K'ya). Tüm simülasyonlarda, elektrostatik etkileşimler için parçacık ağı Ewald şemasıyla periyodik sınır koşulları uygulandı ve bağlı olmayan etkileşim kesme noktası 12,0 Å'ye ayarlandı. Hidrojen atomlarını içeren bağlar SHAKE algoritması kullanılarak sınırlandırıldı ve entegrasyon zaman adımı 2 fs'ye ayarlanarak belirlendi. NPT grubunda 5 ns boyunca üretim çalışmaları gerçekleştirildi, bunlardan 1 ns uzunluğunda 5 bağımsız MD simülasyonu başlatıldı ve bağlanma enerjisi hesaplamaları için kullanıldı. Ortalama bağlanma enerjisi, bu simülasyonlara genelleştirilmiş Born (igb = 8) ve yüzey alanı çözümü (MMGBSA) ile moleküler

mekanik uygulanarak hesaplandı. "MM/PBSA ve MM/GBSA yöntemleri ligand bağlanma afiniteleri tahmin edildi [338].

2.9 Disülfid Bağlı Siklik Peptitlerin (SPler) Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

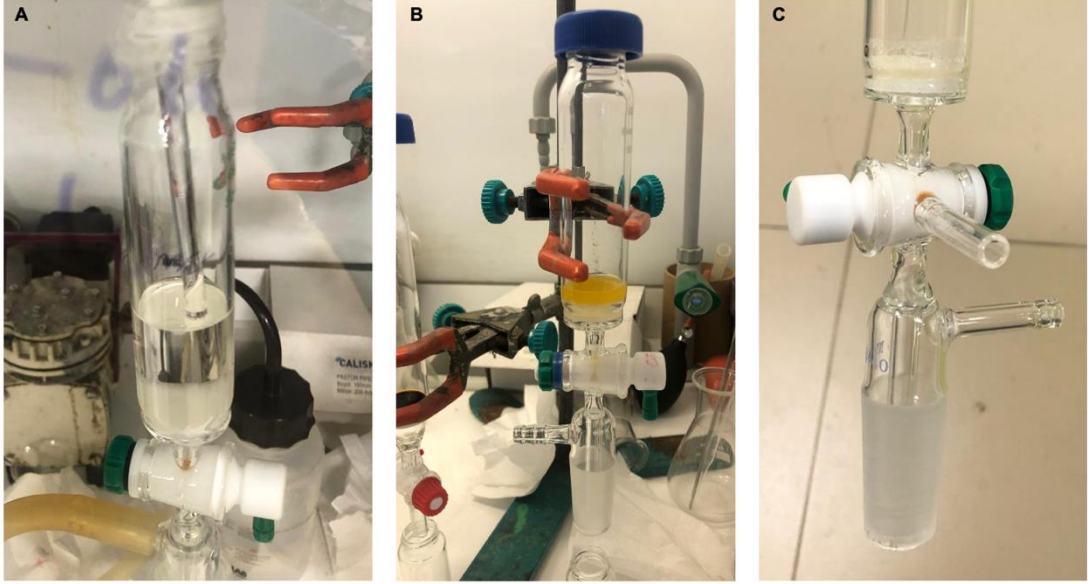
In siliko çalışmalarımız sonucu önerilen sekanslar ile referans sekansın da bulunacağı toplamda 3 disülfid bağlı peptitlerin sentezi Fmoc kimyasına dayalı katı-faz peptit sentez yöntemi ile gerçekleştirildi. Tablo 2.4 ve Şekil 2.1.'de peptit sentezinin aşamaları sunulmuştur.

Tablo 2.4 : Fmoc kimyasına dayalı katı-faz peptit sentez yöntemi basamakları

Residue	Fmoc-L-Amino Acid	mmol	Gereken (mg)	Piperidine	DMF	Aktivasyon	Birleşim	DMF
	Rink Amide	0.15	312.5					
9	Fmoc-Gln(Trt)	0.825	503.84					
8	Fmoc-Leu	0.825	291.57					
7	Fmoc-Leu	0.825	291.57					
6	Fmoc-Arg(Pbf)	0.825	535.24	✓	✓	✓	✓	✓
5	Fmoc-Cys(Trt)	0.825	483.21					
4	Fmoc-Leu	0.825	291.57					
3	Fmoc-Ile	0.825	291.57					
2	Fmoc-Cys(Trt)	0.825	483.21					
1	Fmoc-Lys(Boc)	0.825	386.25					

İlk olarak Fmoc korumalı Rink amid reçinesinin şişmesi ile senteze başlandı ve Fmoc grubunun korumasının kaldırılması %20 piperidin-DMF çözeltisi ile gerçekleştirildi. Fmoc korumalı amino asitler, reçinenin amin grubuyla reaksiyona girecek şekilde HBTU ve DIEA tarafından aktive edili. Bu adımlar, uygun amino asitler kullanılarak istenen diziyi elde etmek için tekrarlandı. Son amino asitin bağlanmasından sonra, son Fmoc grubunun korumasının kaldırılması ve tüm koruma gruplarının ve peptitin ayrıştırıcı karışımı sayesinde (TFA: H₂O: TIPS (95: 2.5: 2.5)) reçineden ayrılmasından sonra ham peptit elde edildi. Tüm reaksiyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Elde edilen ham peptit karışımı soğuk eter içerisinde çöktüldü ve 5000 rpm'de 4 dakika boyunca santrifüj edildi. Çökelti üç kez soğuk eterle yıkandı. Ham doğrusal (lineer) peptit, DMF/H₂O 8:2 (10 mg/mL) içinde çözüldü ve disülfid bağlı siklik peptitleri (SPler) elde etmek için oda sıcaklığında kuvvetli bir şekilde karıştırıldı. DMF (1 eşdeğer/mL) içindeki bir dietilasetilen dikarboksilat (DEAD) çözeltisi, 2 dakika boyunca yavaş yavaş ilave edildi ve reaksiyon, 30 dakika karıştırılmaya bırakıldı. Nihai karışım, MilliQ su ile 20 mL'ye seyreltildi ve solvent, dondurarak kurutucu ile çıkarıldı. Elde edilen SPler yarı preparatif C18 HPLC kolonu kullanılarak saflaştırıldı.

Her fraksiyonun saflığı, saf fraksiyonları birleştirmeden önce analitik C18 HPLC ile değerlendirildi. Peptitlerin linner ve siklik formlarının karakterizasyonu LC-MS cihazı ile gerçekleştirildi [260]. LCMS analizinde ESI (Elektrosprey İyonizasyon) kaynağı ile donatılmış Agilent 6530 Q-TOF kütle spektrometresi cihazı kullanılarak peptitler karakterize edildi.



Şekil 2.1 : Fmoc kimyasına dayalı lineer peptitlerin sentezlenme aşamaları. A) Rink amidin piperidin ile şişirilmesi B) Sentezlenen peptitin TFA: H₂O: TIPS (95: 2.5: 2.5) ilavesiyle muamele edilmesi C) peptitlerin eldesinden sonra geriye kalan reçine.

2.10 Disülfid Bağlı Peptitlerin Saflaştırılması

Halkasallaştırılmış peptitlerin ters faz HPLC analizi Dionex UltiMate 3000 HPLC sistemi ile 40 °C'de 0,5 mL/dakika akış hızında bir C18 kolonu kullanılarak gerçekleştirildi. Eluent olarak %0,1 trifloroasetik asit (1-90 dakika) içeren asetonitril/su gradyanı kullanıldı. Tüm peptitler MilliQ su içerisinde çözüldü. Peptitlerin konsantrasyonu 5 mg/mL olarak ayarlandı. Bu peptit çözeltisinin 0.2 mL'si, 0,5 mL enjeksiyon döngüsü kullanılarak bir parti için saflaştırıldı ve saflaştırma ardışık olarak tekrarlandı. Her fraksiyonun saflığı, saf fraksiyonları birleştirmeden önce analitik RP-HPLC ile değerlendirildi. Peptitlerin elüsyonu, %0,08 trifloroasetik asit (%5-100, 1-90 dakika, akış 0,5 mL/dakika) içeren bir asetonitril/su gradyanı kullanılarak sağlandı. Toplanan fraksiyonların saflığı analitik HPLC ile doğrulandıktan sonra peptitlerin liyofilizasyonu Telstar liyofilizasyon cihazı ile sağlandı ve peptitler – 20 °C'de saklandı.

2.11 Hücre Hatlarına Uygulanan SP'lerin Biyoaktivite Ölçümleri

2.11.1 Sülförhodamin B (SRB) testi

Bu metot, Amerika'da bu konularda referans merkez olarak kabul edilen NCI (National Cancer Institute)'nin de çalıştığı bir yöntem olduğundan, E2'nin hücrelerin proliferasyonu üzerindeki etkisinin bu yöntemle ifade edilmesi amacıyla uygulanacaktır. SRB testi için hücreler, kuyu başına $2,5-7,5 \times 10^3$ arası değişen sayıda E2 içermeyen 100 μL besi yeri ortamı içinde, 96 kuyulu hücre kültürü plaklarına ekildi. Hücrelerin adaptasyonunu sağlamak için, hücreler 24 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Sürenin ardından hücreler E2'nin farklı konsantrasyonlarıyla (10 pM-10 nM) ile muamele edildi ve 48 saat boyunca inkübe edildi. Tedavinin sonunda hücreler, 50 μL %50 (w/v) soğuk trikloroasetik asit (TCA) ile 4 °C'de 60 dakika boyunca fikse edildi. Ardından hücreler üç kez distile su ile yıkandı ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %1 asetik asit içindeki 50 μL %0,4 (w/v) SRB ile boyandı. Boyama süresi sonunda hücrelere bağlanmayan SRB boyasının kuyulardan uzaklaştırılması için hücreler %1'lik asetik asit solüsyonu ile beş kez yıkandı ve plakalar kurumaya bırakıldı. Proteine bağlı boyayı çözmek için 10 mM Tris baz çözeltisi (pH 10, 150 μL) ilave edildi ve 150 rpm'de 10 dakika boyunca hafifçe çalkalandı. Absorbans, mikropłaka okuyucusunda 530 nm'de ölçüldü. Her deney, üç tekrarlı iki bağımsız test olarak gerçekleştirildi. E2 ile tedavi edilen hücrelerin canlılığı, aşağıdaki denklem kullanılarak tedavi edilmeyen kontrol grubu hücrelerine göre hesaplandı.

2.11.1.1 MTT testi

Substratın canlı hücreler tarafından kromojenik ürüne dönüştürülmesine dayanan canlılık analizleri arasında MTT testi hala en çok yönlü ve popüler analizlerden biridir. MTT analizi, suda çözünür sarı boya olan MTT'nin [3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] mitokondriyal redüktazın etkisiyle çözünmeyen bir mor formazana dönüştürülmesini içerir. Formazan daha sonra çözündürülür ve konsantrasyon 570 nm'deki optik yoğunluk ile belirlenir [339]. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen MTT analizinde, uygun *in vitro* koşullarda büyütülen hücreler, optimum yoğunluk noktasına ulaştıklarında trypsin ile kültür yüzeyinden toplandı ve 96 kuyulu kültür plakanın her bir kuyusuna 100 μL 'de 5×10^3 olacak şekilde ekilerek gece boyunca kültür ortamına adaptasyonu sağlandı. Ertesi gün, SP'lerin ve TPBM'nin, 1 pM E2 varlığındaki seri dilüsyonları hazırlandı ve hücrelerle tedavi edildi. 48 saatlik

tedavinin ardından her bir kuyuya 20 µL MTT reaktifi eklendi ve 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT ile muamele tüm kuyulara 100 µl %10 SDS pipetlendi ve gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Çözünmüş kristaller 570 nm'deki absorbansı bir mikropilaka okuyucu ile ölçüldü. Her deney, üç tekrarlı iki bağımsız test olarak gerçekleştirildi.

2.11.2 ATP testi

Bu yöntem, kombinasyon tedavilerinin detaylı doz aralıklarının belirlenmesi için kullanıldı. Bu yöntemin prensibi, hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanır. ATP seviyesi ölçümü lüminesans teknolojisine dayandığı için, diğer canlılık yöntemlerinden çok daha hassastır ve düşük hücre sayılarında bile (20 hücreye kadar) canlı hücre sayısı ile yöntemde okunan RLU (relative light unit, bağıl ışık birimi) değerleri ile okunur. Bu nedenle, MTT gibi kolorimetrik testten daha hassas ve güvenilirdir. Ayrıca, kolorimetrik yöntemlerde interferans problemi olabilmektedir [340-342]. Bu yüzden, ATP testinin deney sonucunun güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. TPBM ve siklik peptit kombinasyonlarının (SPK) MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisini incelemek için ATP tahlili kullanıldı. İlk kombinasyon planı için hücreler, TPBM ile ön işleme tabi tutularak ön-tedavisi gerçekleştirildi. Ertesi gün hücreler, 48 saat boyunca her bir SP'nin 50 µM dozu ile tedavi edildi ve analiz edildi. İkinci kombinasyon planı için hücreler, SP'ler ve TPBM (her biri 12,5-100 µM) ile ön işleme tabi tutularak ön-tedavisi gerçekleştirildi. 24 saat sonra SP1 ile tedavi edilen gruplara SP2 ve SP3 (SP1+SP2, SP1+SP3), SP2 ile tedavi edilen gruplara SP1 ve SP3 (SP2+SP3), SP3 ile tedavi edilen gruplara SP2 ile SP1 ilave edilerek (SP1+SP2+SP3) 48 saat boyunca tedavi edilmesi sağlandı. (Her bir peptit aynı konsantrasyonda olacak şekilde (12,5–100 µM) uygulandı. Tedavi grubundaki hücrelerin ve kontrol grubundaki hücrelerin ATP içeriği, lusiferin-lusiferaz biyolüminesans reaksiyonundan faydalanan lüminometre cihazı kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar bağıl ışık birimi (RLU) olarak alındı ve tedavi edilen ve kontrol hücrelerinden elde edilen RLU değerlerine göre hücrelerin canlılık yüzdesi hesaplandı.

2.12 Akış Sitometrisi

SPKlar ve TPBM ile tedavi edilen hücrelerdeki apoptozun daha ayrıntılı bir şekilde belirlenmesi amacıyla Anneksin-V (Guava® Annexin Red Kit), kaspaz 3/7 (Muse® Caspase-3/7 Kiti) ve mitokondriyal membran potansiyel testi (Muse® MitoPotential Kit) akış sitometrisi ile ölçüldü. Hücreler kültür plaklarından toplandı ve kuyu başına 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekildi. Ertesi gün, hücreler SPKlar ve TPBM'nin IC₉₀ dozları ile 48 saat boyunca tedavi edildi. Tedavinin ardından hücreler tripsinle kaldırıldı ve üretici kitin talimatlarına göre hücreler her bir deney için ön muameleye tabii tutuldu. Sonuçlar, Muse™ Cell Analyzer cihazı (akım sitometrisi) kullanılarak elde edildi.

2.13 ELISA

Hücre kültür plaklarında uygun yoğunluğa ulaşan hücreler ortamdan tripsin ile kaldırılıp, kuyu başına 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekildi. Ertesi gün hücreler, SP'lerin, SPKların ve TPBM'nin IC₅₀ dozları ile tedavi edildi. 48 saatlik tedavinin ardından hücrelerin sitoplazmik ve nükleer ekstraktları NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction kiti kullanılarak ayrıştırıldı. Elde edilen hücresel ekstraktların ER α aktivasyonu, ER Transkripsiyon Faktörü ELISA kiti (TransAM®) ile analiz edildi. ELISA kitinin tabanı ER konsensüs bağlanma bölgesi (5'-GGTCACAGTGACC-3') ile kaplıdır. ELISA kiti için sırasıyla gerçekleştirilen adımlar; i) hücresel ekstraktlar kit içeriğindeki solüsyonlarla hazırlandı, kuyulara uygulanan hücresel ekstraktlardaki aktive edilmiş transkripsiyon faktörleri plağın yüzeyindeki oligonükleotide bağlanması sağlandı, ii) uygulanan birincil antikorun, DNA sekansına bağlanan ER α proteini üzerindeki ilgili epitopa bağlanması sağlandı, iii) ikincil HRP-konjuge antikor ortama ilave edildi. Işıma veren ilgili solüsyonlarının ilavesinin ardından kolorimetrik olarak plaka 450 nm'de okundu.

2.14 İstatiksel Analizler

Veriler ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) olarak sunuldu. Kontrol ve tedavi gruplarını karşılaştırmak için varyans analizi kullanıldı. P değerlerini belirlemek için student t-testi, tek yönlü ANOVA ve iki yönlü ANOVA kullanıldı. p değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve * (p < 0,05),

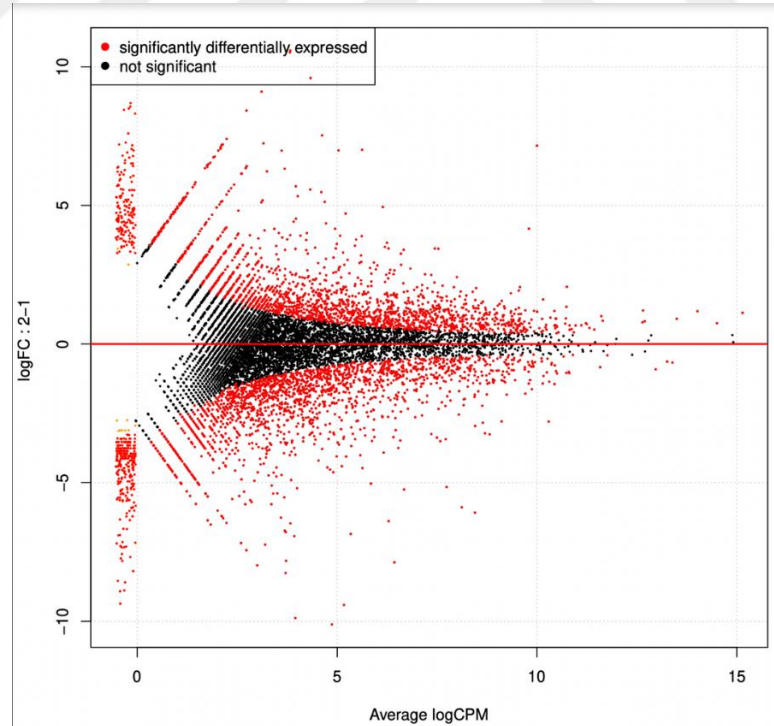
($p < 0,01$), * ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı sonuçları ifade etti. İstatistiksel analizler Prism yazılımı (versiyon 9.0.2; GraphPad Yazılımı) kullanılarak gerçekleştirildi.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 ERα'nın RNA-Seq Analizi ile Hedef Molekül Olarak Belirlenmesi

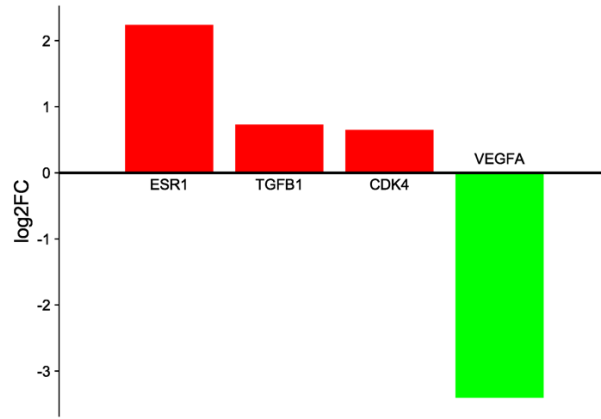
Yumurtalık kanser hastalarından (tümör dokularından) ve sağlıklı bireylerin yumurtalık dokularından elde edilen RNA dizilerinin, Chispter analiz yazılımı kullanılarak farklı ifade edilen genlerin (Differential gene expression (DGE)) analizi gerçekleştirildi. Bu genlerin tanımlanması için edgeR aracı kullanıldı. EdgeR algoritması, tüm genlerden gelen bilgileri kullandığı, ağırlıklı bir olasılık ve F testi teknikleri kullanarak dağılımı hesapladığı için tercih edilmiştir. EdgeR analizi kullanılarak MA grafiği çizildi (Şekil 3.1). MA grafiği, gen ifade farklılıklarını ve gen ifade düzeylerini karşılaştıran bir dağılım grafiğidir. Grafikteki y eksenini olan M (Log Fold Change (logFC)), gen ifade düzeylerindeki değişiklikleri ifade ederken, x eksenini olan A (Averaj İfade Düzeyi) ise, genin ortalama ifade düzeyini belirtir.



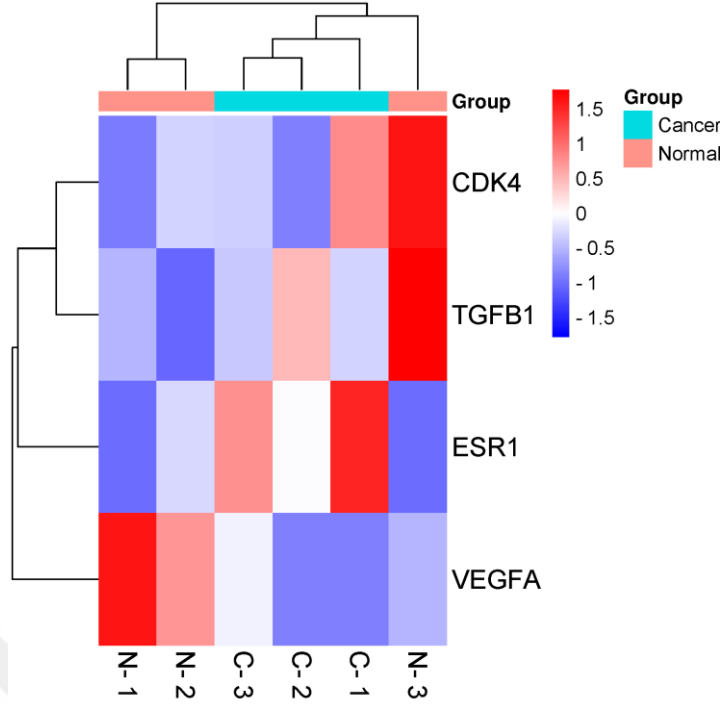
Şekil 3.1 : EdgeR tarafından oluşturulan diferansiyel ifade analizi için MA grafiği.

Her gen siyah bir nokta ile temsil edilirken, kırmızı noktalar anlamlı olarak farklı ekspresyon edilen genleri temsil eder. Artı yöndeki noktalar yukarı regülasyonu temsil ederken, eksi yöndeki noktalar aşağı regüle edilmiş genleri temsil eder.

EdgeR analizi sonucunda, tümör ve kontrol dokularında farklı düzeyde eksprese edilen genlerin listesinde ESR1 gibi (ER α 'nın kodlandığı gen olduğu için RNA-seq analizlerinde ESR1 geni üstünden ER α ekspresyonu hakkında bilgi sahibi olundu. Bu yüzden RNA-seq verileri hep ESR1 üzerinden verilmiştir) tümör dokularında sağlıklı dokulara kıyasla daha fazla ve daha az eksprese olan birkaç genin log2 kat değişimi (log2FC) değerleri Şekil 3.2'de, aynı genlerin Heat-map analizi ise Şekil 3.3'de gösterildi.



Şekil 3.2 : Yumurtalık tümöründe sağlıklı dokulara nazaran yukarı(kırmızı) ve aşağı(yeşil) regüle edilen genler (log2FC değerleri: ESR1 için 2.24, TGFB1 için 0.73, CDK4 için 0.65, VEGFA için -3.4).



Şekil 3.3 : Yumurtalık tümöründe sağlıklı doku örneklerinin karşılaştırılması için edgeR tarafından tespit edilen diferansiyel olarak eksprese edilmiş bazı genlerin ısı haritası (heatmap) grafiği.

Bu analizler neticesinde, sağlıklı yumurtalık ve yumurtalık tümörlerinden elde edilen RNA verilerinde, hangi genlerin farklı seviyelerde eksprese edildiği tespit edildi. Sonuçlarımız, ESR1'in (ENSG00000091831) yumurtalık tümör dokularında sağlıklı yumurtalık dokularına nazaran anlamlı bir ekspresyon farkı olduğu (FC (Fold change) = 2.24) bulundu. Kansere karşı geliştirilecek tedavi yöntemlerindeki amaç, her zaman tümör dokusunun sağlıklı dokuya nazaran daha fazla eksprese olan yapıyı bulmak ve bunları hedeflemektir. Bu yüzden bu sonuçlar bize, yumurtalık kanserinde ER α hedefli bir tedavi yönteminin başarı getirebileceğini gösterdi.

3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

RNA-Seq sonuçlarımızda, yumurtalık kanserine yönelik uygun bir hedef olduğu belirlenen ER α 'ya karşı sentezlenecek antagonist peptitlerin hücre hatları üzerinde denenebilmesi için hücre hatlarında da ER α 'nın yüksek oranda eksprese olması gerekmektedir. Bu yüzden literatürde ER α eksprese ettiği bilinen (+) OVSAHO ve MCF-7 hücreleri ile ER α eksprese etmediği bilinen (-) CAOV-3 ve MDA-MB-231 hücre hatları *in vitro* çalışmalarımızda kullanılmıştır. Kontrol grubu hücre hattı olarak BEAS-2B (ATCC CRL-3588) sağlıklı akciğer hücre hattı ile çalışılmıştır.

3.2.1 Total RNA izolasyonu

OVSAHO, CAOV-3, MCF-7,MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücre hatlarından elde edilen total RNA porsiyonlarının miktarı ve saflığı, NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre cihazı kullanılarak tayin edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 : OVSAHO, CAOV-3 ve BEAS-2B hücre hatlarından elde edilen total RNA'ların miktar ve saflık dereceleri.

Hücre Hattı	Nükleik Asit	Miktar	A260(Abs)	A280(Abs)	260/280	260/230
BEAS-2B	438,5	ng/ul	10,963	0,006	2,600	-0,870
OVSAHO	1225,3	ng/ul	30,633	16,645	1,840	2,220
CAOV-3	1614,1	ng/ul	40,351	19,514	2,07	2,14
MCF-7	7243,8	ng/ul	38,839	17,743	1,95	2,02
MDA-MB-231	8828,0	ng/ul	30,823	15,230	1,84	1,99

Gerçekleştirilecek ileriki çalışmalar için Tablo 3.1'deki RNA miktarları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

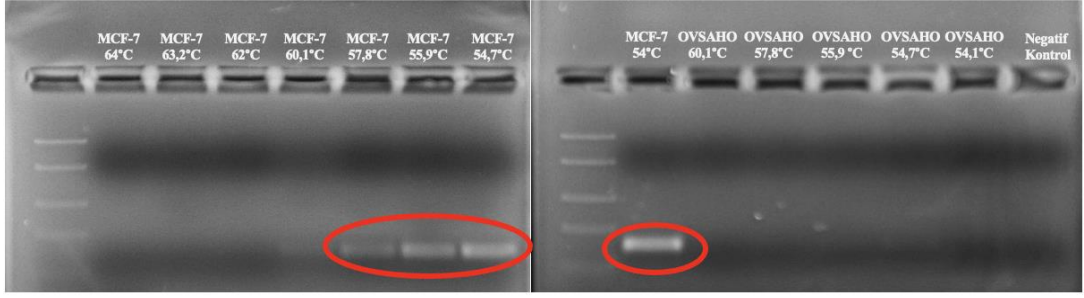
3.2.2 Komplementer DNA (cDNA) eldesi

OVSAHO, CAOV-3, MCF-7,MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücre hatlarından elde edilen total RNA örneklerinin cDNA'ya çevrimi kit tarafından gerçekleştirildi. Kit için gerekli hücresel RNA miktarları Tablo 3.1'deki veriler baz alınarak en çok 1 µg olacak şekilde hesaplanıp ve sulandırıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda gereken hacimde kit bileşenleri ile reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışımın paylaştırıldığı PCR tüpleri Thermal cycler, Bio-Rad cihazına yerleştirildi ve primerin bağlanması için 25°C'de 10 dk, enzimin çalışması için 42°C'de 15 dk, enzimin inaktivasyonu için ise 85°C'de 5 dk olacak şekilde program ayarı yapıldı. Süre sonunda elde edilen cDNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar -20°C'de saklandı.

3.2.3 Gradient polimeraz zincir reaksiyonu ile ESR1 gen çoğaltılması

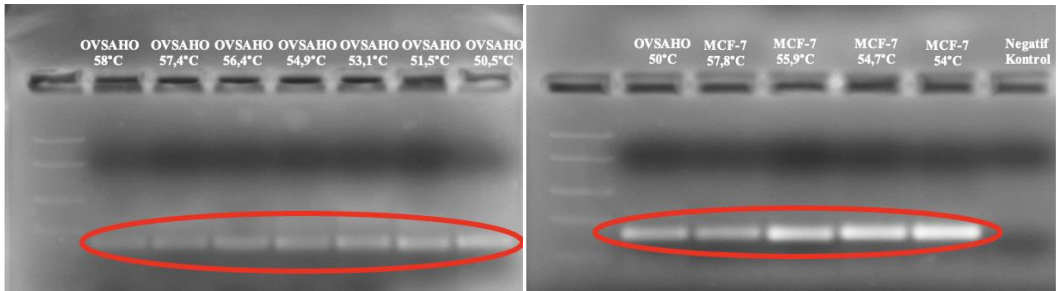
ESR1 genine yönelik tasarlanan primer setinin hangi bağlanma sıcaklığı derecesinde cDNA örneklerine bağlandığını tespit edebilmek için Gradient Polimeraz Zincir Reaksiyonu gerçekleştirildi. Deneyde OVSAHO ve MCF-7 hücre hatlarının cDNA örnekleri kullanıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilen reaksiyon karışımına ilk olarak cDNA örnekleri 1:5 oranında sulandırılarak ve bağlanma derecesi 64-54°C arasında değişecek şekilde bir deney düzeneği hazırlandı.

%2'lik olarak hazırlanan agaroz jel 90 mV altında yaklaşık 35 dakika koşulması sağlandı. Jel görüntüleme sisteminden alınan jel görüntüsü Şekil 3.4'deki gibidir.



Şekil 3.4 : MCF-7 ve OVSAHO hücre hatlarından elde edilen cDNA örneklerinin (1:5 sulandırılmış) farklı bağlanma sıcaklıkları altında elde edilmiş PCR örneklerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.

Şekil 3.4'de görüldüğü üzere primerin DNA'ya bağlanma derecesinin 57.8°C, 55.9°C, 54.7°C ve 54°C olarak ayarlandığı reaksiyon koşullarında ESR1 genine ait bant sadece MCF-7 hücrelerinde gözlemlendi. OVSAHO cDNA'ı bu koşullar altında herhangi bir gen amplifikasyonu göstermedi. ESR1 geninin OVSAHO cDNA'ındaki gösterimi için ikinci bir gradient PCR reaksiyonu tasarlandı. Bu ikinci reaksiyonda tüm cDNA örnekleri 1:2 oranında sulandırılarak hazırlandı ve primerin bağlanma derecesi olarak 58°C -50°C aralığı seçildi. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.5'deki gibidir.



Şekil 3.5 : MCF-7 ve OVSAHO hücre hatlarından elde edilen cDNA örneklerinin (1:2 sulandırılmış) farklı bağlanma sıcaklıkları altında elde edilmiş PCR örneklerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.

Şekil 3.5’de görüldüğü üzere primerin DNA’ya bağlanma derecesinin 58°C-50°C olarak ayarlandığı reaksiyon koşullarında ESR1 genine ait bant her bağlanma derecesinde gözlemlendi. Şekil 3.4 ile kıyaslandığında cDNA miktarının artırılması MCF-7 hücrelerine ait bantların parlaklığını ve kalınlığını artırırken OVSAHO hücre hatlarında bant görmemizi sağladı. Bu durum cDNA örneklerindeki DNA miktarının farklı olduğunu OVSAHO hücre hatlarının cDNA miktarının MCF-7 hücrelerinden elde edilen cDNA miktarından daha az olduğunu gösterdi. Bu durumda qPCR analizlerinde OVSAHO cDNA miktarının daha fazla konulmasına ve primer bağlanma sıcaklığının 53-50°C arasında seçilmesine karar verildi.

3.2.4 RT-qPCR ile ESR1 gen amplifikasyonunun gösterimi

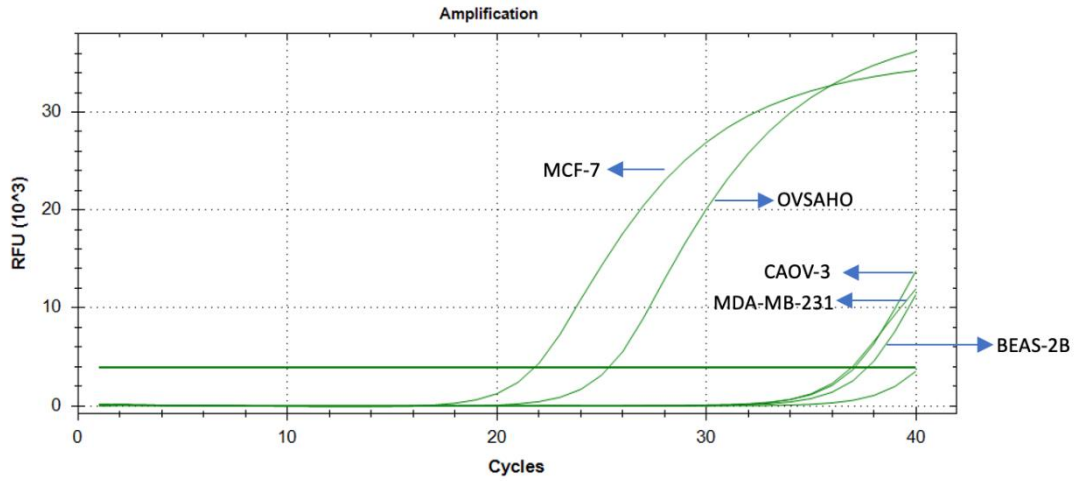
In vitro çalışmalarda kullanılması planlanan hücre hatlarının *ESR1* mRNA ekspresyonundaki farklılıkları göstermek için RT-qPCR yöntemi kullanıldı. Göreli gen ekspresyonunu ölçmek için referans gen olarak β -aktin tercih edildi. Hiçbir tedaviye maruz kalmayan hücrelerden elde edilen RNA örneklerinden dönüştürülen cDNA materyali ile RT-qPCR gerçekleştirildi (Şekil 3.6) ve elde edilen Cq değerlerinin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hesaplamaları Tablo 3.2 ve Tablo 3.3’de sunuldu. Elde edilen sonuçlar, MCF-7 hücre hattının, OVSAHO hücre hattına göre *ESR1* mRNA ekspresyon seviyelerinde önemli ölçüde daha fazla eksprese olduğunu (yaklaşık 8 kat, $p<0,0001$) gösterdi (Şekil 3.7A). MCF-7 ile MDA-MB-231 hücrelerinin *ESR1* mRNA ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında ise 10^4 kattan fazla ($p<0,0001$) olduğu bulundu (Şekil 3.7B). Ayrıca, CAO-3 hücre hattının da aynı MDA-MB-231 gibi ER α (-) bir hücre hattı olduğu fakat MDA-MB-231 hücrelerine göre anlamlı derecede daha fazla *ESR1* mRNA seviyesine sahip olduğu gösterildi ($p<0,05$). (Şekil 3.7C). İlginç olarak çalışmamızda normal hücre olarak kullanmayı planladığımız BEAS-2B hücrelerinin MDA-MB-231’den anlamlı derecede farklı bir *ESR1* gen ekspresyonuna sahip olduğunu bulduk (~3,5 kat, $p<0,0001$) (Şekil 3.7D). OVSAHO ve CAO-3 hücrelerinin *ESR1* mRNA seviyelerine bakarak OVSAHO’nun ER α (+), CAO-3 hücrelerinin ise ER α (-) olduğu doğrulandı $p<0,0001$) (Şekil 3.7E).

Tablo 3.2 : OVSAHO ve CAO-3 hücre hatlarının *ACTIN* ve *ESR1* genlerinin amplifikasyon değerleri

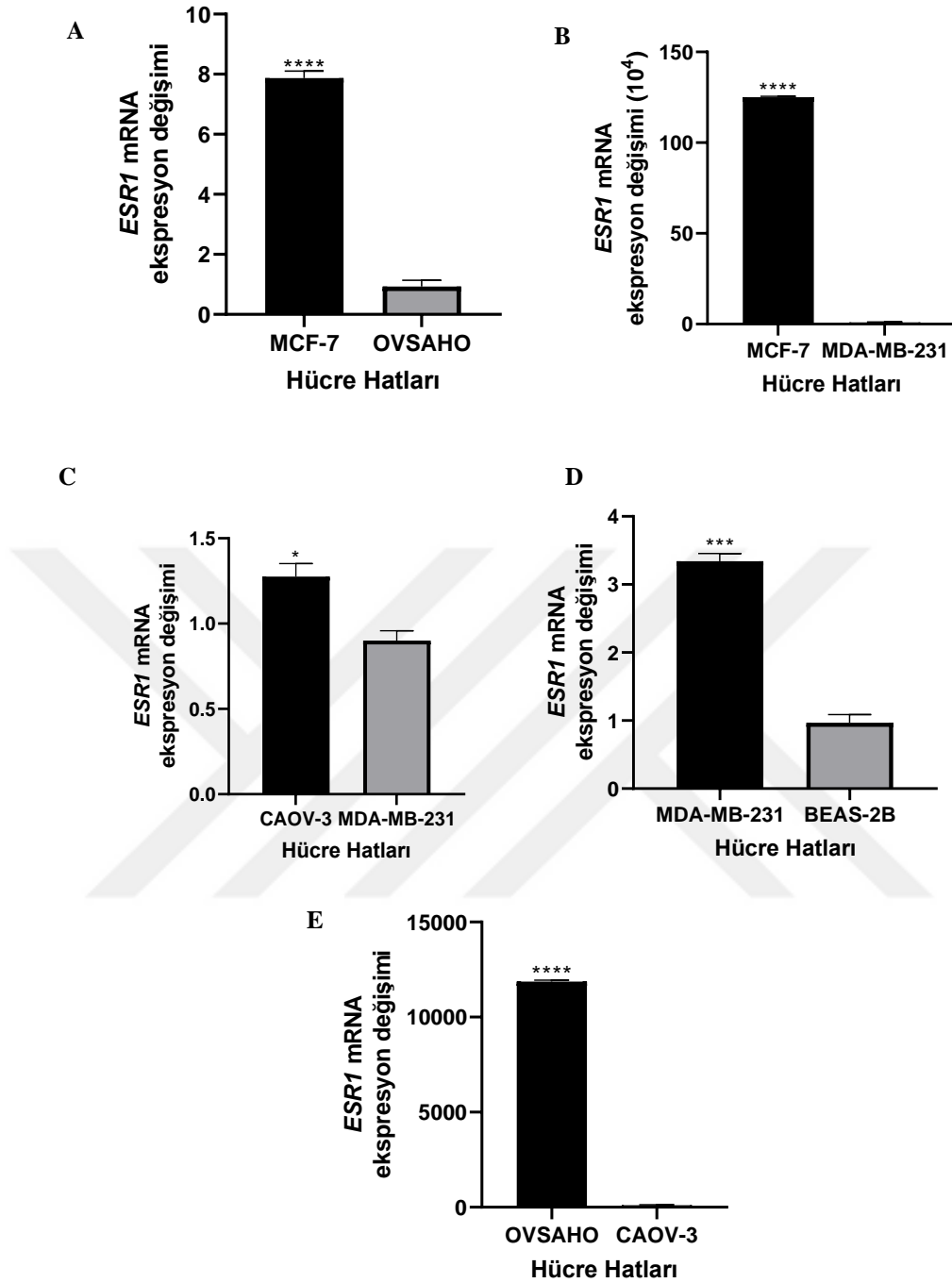
	OVSAHO	CAOV-3	Δ Ct Değeri (Deneysel)	Δ Ct Değeri (Kontrol)	Delta Delta Ct Değeri	Ekspresyon Düzeyindeki Kat Değişimi (Fold Change)
	Ort. Cq Değeri	Ort. Cq Değeri	Δ CTE	Δ CTC	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
ACTIN (Referans Gen)	15,24	13,48	10,09	23,6	-13,52	11747
ESR1 (İlgili Gen)	25,33	37,09				

Tablo 3.3 : MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının *ACTIN* ve *ESR1* genlerinin amplifikasyon değerleri

	MCF-7	MDA-MB-231	Δ Ct Değeri (Deneysel)	Δ Ct Değeri (Kontrol)	Delta Delta Ct Değeri	Ekspresyon Düzeyindeki Kat Değişimi (Fold Change)
	Ort. Cq Değeri	Ort. Cq Değeri	Δ CTE	Δ CTC	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
ACTIN (Referans Gen)	15,24	13,48	7,05	23,98	-16,93	124864
ESR1 (İlgili Gen)	25,33	37,09				



Şekil 3.6 : Hücre hatlarındaki ESR1 mRNA amplifikasyon sonuçları(RFU = bağlı floresans birimi).



Şekil 3.7 : Farklı hücre hatlarının göreceli ESR1 mRNA ekspresyon düzeyleri. A) Meme kanseri (MCF-7) ve over kanseri (OVSCHO) hücrelerinin karşılaştırılması. B) Meme kanseri hücre hatlarının (MCF-7 ve MDA-MB-231) karşılaştırılması. C) Meme kanseri (MDA-MB-231) ve over kanseri (CAOV-3) hücre hatlarının karşılaştırılması. D) Normal hücre hattı (BEAS-2B) ve meme kanseri (MDA-MB-231) hatlarının karşılaştırılması. E) Over kanseri hücre hatlarının karşılaştırılması. RT-qPCR sonuçları için hata çubukları, üçlü tekrarlı en az üç bağımsız deneyden elde edilen ortalamanın ortalama \pm standart hatasını (SEM) temsil eder. RT-qPCR verilerinin istatistiksel analizi için bağımsız t-testi yapıldı. *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$ ve ****, $p < 0,0001$ kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

3.3 ER α 'ya Özgü Gerçekleştirilen Disülfit Bağlı Siklik Peptit Tasarımlarının *In Siliko* Analiz Verileri

Protein data bankasından 1PCG kodlu (<https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.1934759100>) ER α 'ya ait protein kristal yapısına karşılık KCXLCRLLQ sekansında bir tasarım gerçekleştirildi. (X izolösün amino asidini temsil etmektedir) Görsel inceleme ile KCXLCRLLQ sekansındaki X amino asitinin izolösün gibi bir hidrofobik gurup yerine artı yüklü veya hidrofilik gruplardan birinin gelmesinin etkileşimi artıracağı tespit edildi. Bunun yanı sıra, eksi yüklü bir amino asidin gelmesinin de etkileşimi dolayısıyla da peptidin bağlanmasını azaltacağını öngördük. Amino asitlerin farklı büyüklüklerini de göz önüne alarak, X grubu için aşağıdaki amino asitler deneme setine eklendi: serin (S), histidine (H), lizin (K), aspartik asit (D). Referans olarak izolösün aminoasiti deneme setinde bırakıldı. Kristal yapıdaki izolösün amino asidinde nokta mutasyonları uygulanarak protein-peptit kompleksleri oluşturuldu. Bu komplekslerin 25 ns boyunca moleküler dinamik simülasyonlarını koşuldu. Bu simülasyonun 10. ns'indeki yapıyı başlangıç noktası seçerek paralel simülasyonlar da ayrıyeten koşuldu. Paralel simülasyonlar üzerinde MMGBSA yaklaşımını kullanarak peptidin proteine bağlanma ilgisini ölçüldü. Sonuçlar Tablo 3.4'de sıralanmıştır.

Tablo 3.4 : KCXLCRLLQ sekansında değişiklik gösteren amino asitlerin (I, S, H, K, D) protein bağlanma ilgisine etkisi.

Amino asit	I	S	H	K	D
Bağlanma ilgisi (kcal/mol)	-42.7 \pm 3.4	-44.7 \pm 4.0	-36.8 \pm 3.7	-42.9 \pm 3.5	-36.7 \pm 3.6

Hipotezimizi doğrular şekilde hidrofilik (S) ve artı yüklü (K) amino asitler referansa göre (I) bağlanma ilgisini artırmış, negatif yüklü amino asit (D) ise bağlanma ilgisini düşürdüğü görüldü. Başlangıçta histidin bağlanmasının etkiyi artırmasını beklemekteydik, fakat histidin bağlanma ilgisini düşürdüğü görüldü. Buradaki ilgi kaybının histidin amino asidinin protonlanma durumunun doğru seçilmemiş olma durumundan kaynaklandığı ihtimali bulunmakatadır. Bu noktada modellenmenin çeşitlendirilmesi gerekirdi. Fakat *in vitro* deneyler açısından 3 amino asit testinin (üç aday zımbalanmış peptit motifinin) yeterli bulunması sebebiyle histidin çeşitlendirmesine gidilmemiştir. Böylelikle *in vitro* deneyler için ER α 'ya özgü ilgisi

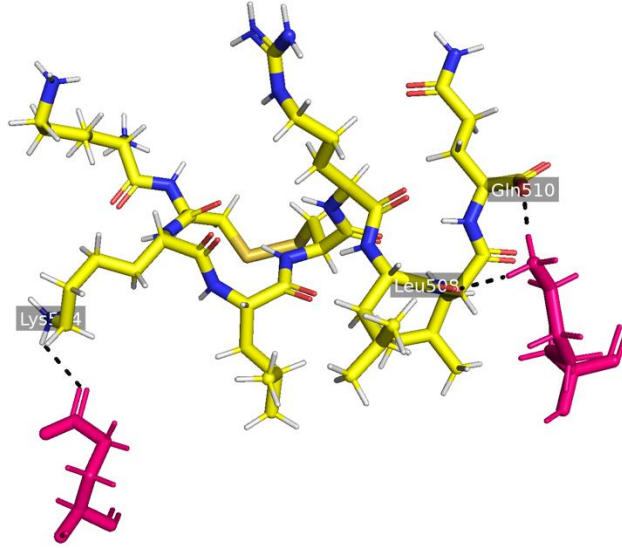
yüksek iki siklik peptit (KC*KLCRLLQ ve KC*SLCRLLQ) ile referans peptit (KC*ILCRLLQ, (C* = D Sistein)) önerilmiştir (Tablo 3.5). Moleküler dinamik simülasyonları her bir peptit sekansı ve östrojen (EST) yapısı ile birlikte ER α 'ya yanaştırılmış ve her bir pozun 3 boyutlu gösterimi Şekil 3.8, 3.11 ve 3.14'de sunulmuştur. Önerilen peptit sekansların (SPler) ER α ile yapmış olduğu bağların 3 boyutlu yapısı ise her bir peptit için sırasıyla Şekil 3.9, 3.12 ve 3.15'te gösterilmiştir. Aday SP'lerin amino asit kalıntıları, LigPlot programı kullanılarak 2 boyutlu olarak görselleştirildi. SP1'in (Şekil 3.10), SP2'nin (Şekil 3.13) ve SP3'ün (Şekil 3.16) amino asit kalıntıları ile ER α 'nın amino asit kalıntıları arasındaki etkileşimin görselleştirme sonuçları, bağ ve hidrofobik temasları vurguladı.

Tablo 3.5 : Tek harfli amino asit kodundaki SP dizileri. Disülfür bağlantılı siklizasyon kırmızı renkli sistein aminoasitlerle temsil edilir.

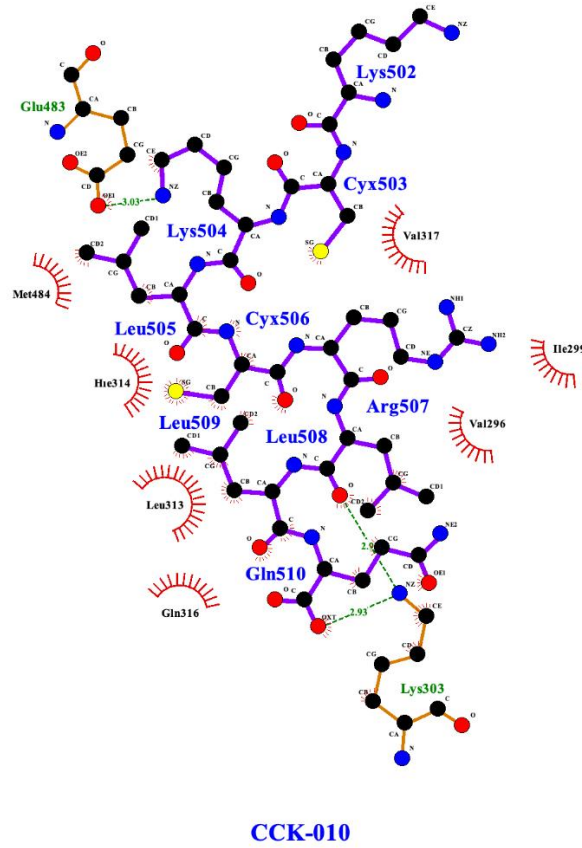
Peptit	Sekans
SP1	K c I L C R L L Q
SP2	K c K L C R L L Q
SP3	K c S L C R L L Q



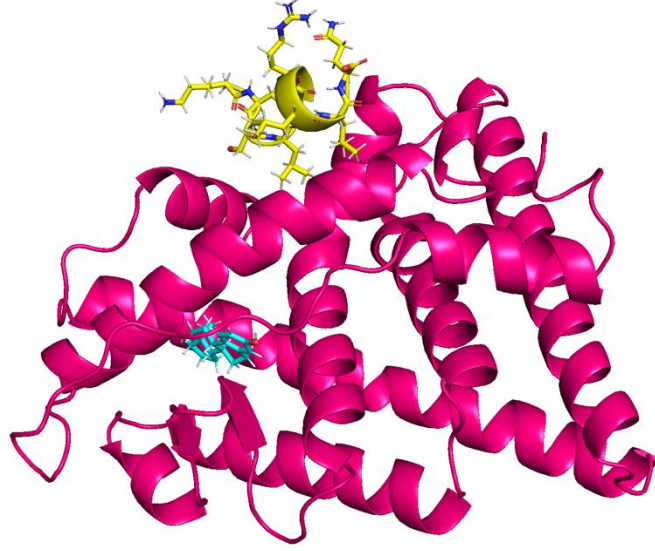
Şekil 3.8 : EST ve KCKLCRLLQ sekanslarının ER α 'ya yanaştırılmış hallerinin üç boyutlu gösterimi. Sarı, pembe ve mavi sırasıyla zımbalanmış peptidi, proteini ve östrojeni göstermektedir. Yapılar moleküler dinamik simülasyonun 10. ns'den çekilmiştir.



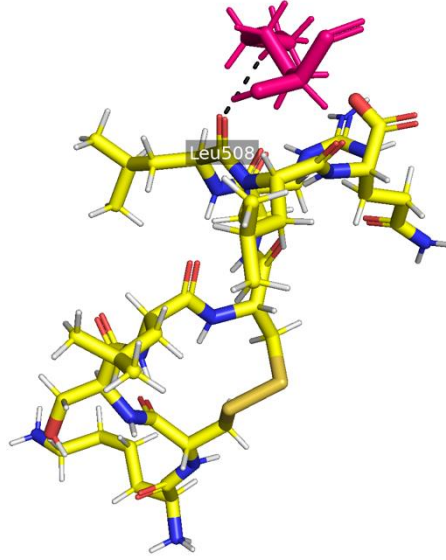
Şekil 3.9 : KCKLCRLIQ sekansının ER α 'ya yanaştırılmış ve bağ formlarının üç boyutlu gösterimi. Sarı ve pembe sırasıyla zımbalanmış peptidi ve proteini göstermektedir. Yapılar moleküler dinamik simülasyonun 10. ns'den çekilmiştir.



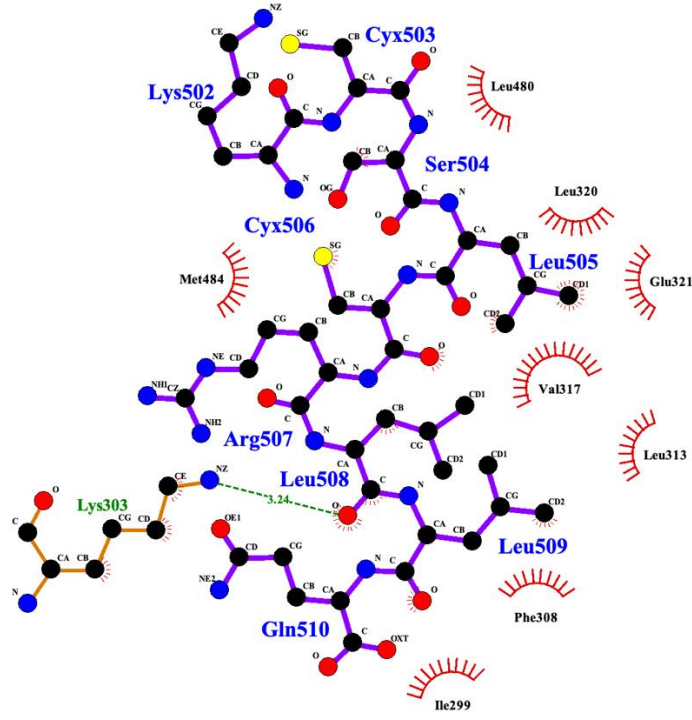
Şekil 3.10 : KCKLCRLIQ sekansına ait zımbalanmış peptit ile ER α etkileşimlerinin atom seviyesinde gösterimi. Aradaki yeşil çizgiler polar etkileşimleri ifade ederken, kırmık yapıda olanlar hidrofobik etkileşimleri temsil etmektedir.



Şekil 3.11 : EST ve KCSLCRLLQ sekanslarının ERα'ya yanaştırılmış hallerinin üç boyutlu gösterimi. Sarı, pembe ve mavi sırasıyla zımbalanmış peptidi, proteini ve östrojeni göstermektedir. Yapılar moleküler dinamik simülasyonun 10. ns'den çekilmiştir.

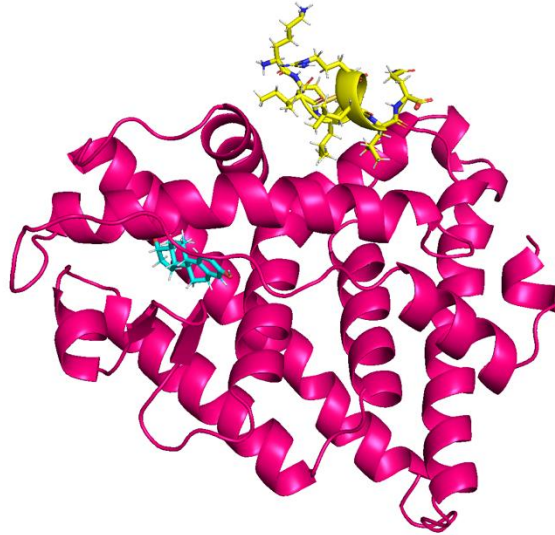


Şekil 3.12 : KCSLCRLLQ sekansının ERα'ya yanaştırılmış ve bağ formlarının üç boyutlu gösterimi. Sarı ve pembe sırasıyla zımbalanmış peptidi ve proteini göstermektedir. Yapılar moleküler dinamik simülasyonun 10. ns'den çekilmiştir.

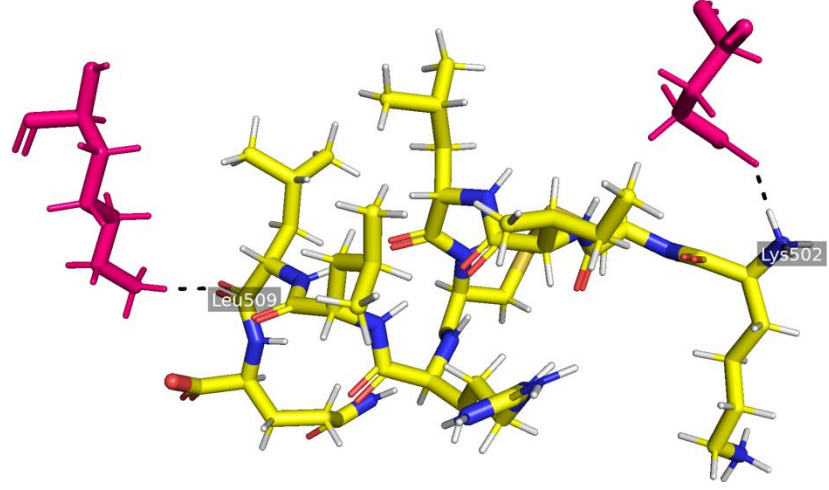


CCS-010

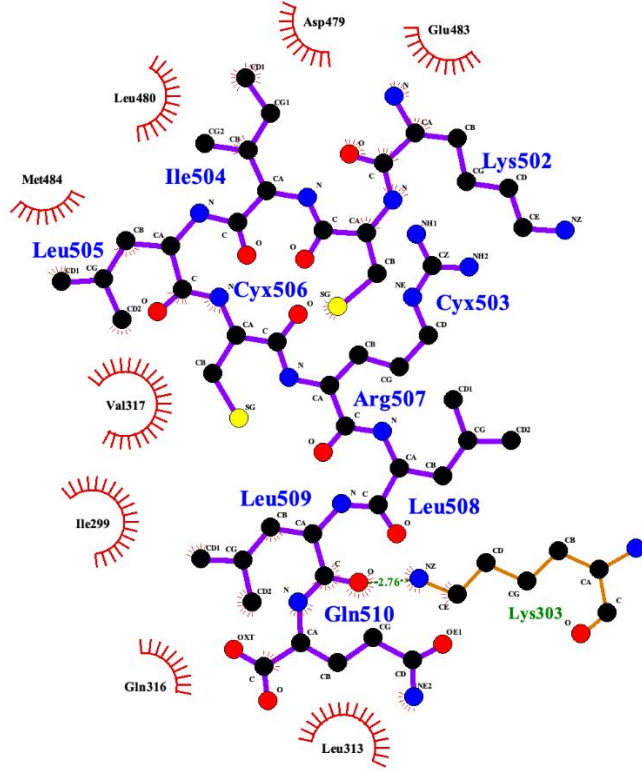
Şekil 3.13 : KCSLCRLQLQ sekansına ait zımbalanmış peptit ile ER α etkileşimlerinin atom seviyesinde gösterimi. Aradaki yeşil çizgiler polar etkileşimleri ifade ederken, kırmık yapıda olanlar hidrofobik etkileşimleri temsil etmektedir.



Şekil 3.14 : EST ve KCILCRLQLQ sekanslarının ER α 'ya yanaştırılmış hallerinin üç boyutlu gösterimi. Sarı, pembe ve mavi sırasıyla zımbalanmış peptidi, proteini ve östrojeni göstermektedir. Yapılar moleküler dinamik simülasyonun 10. ns'den çekilmiştir.



Şekil 3.15 : KCILCRLQLQ sekansının ER α 'ya yanaştırılmış ve bağ formlarının üç boyutlu gösterimi. Sarı ve pembe sırasıyla zımbalanmış peptidi ve proteini göstermektedir. Yapılar moleküler dinamik simülasyonun 10. ns'den çekilmiştir.

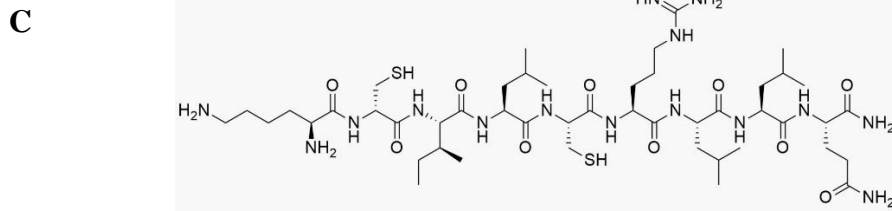
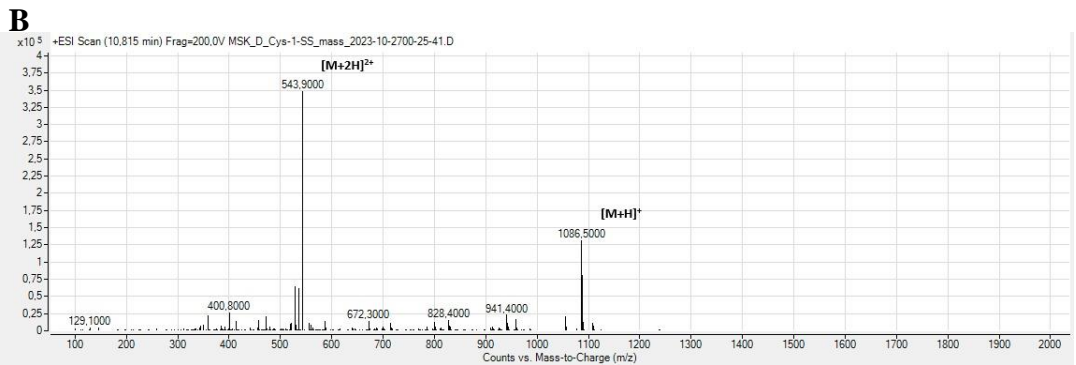
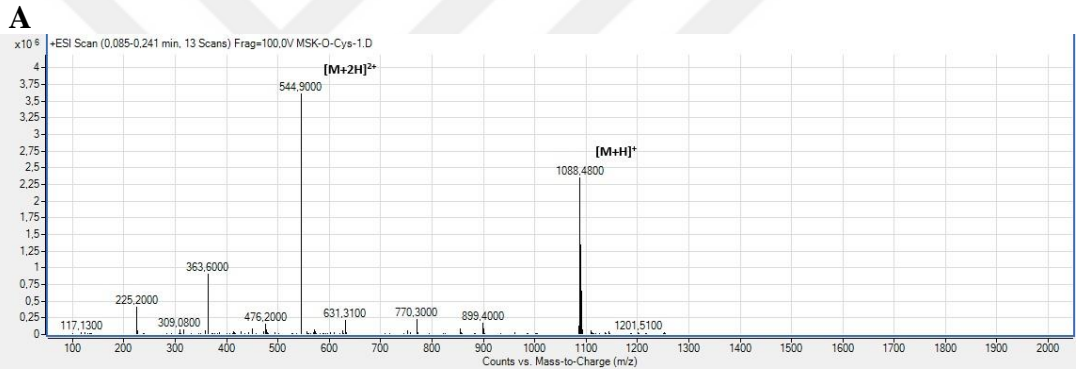


CCI-010

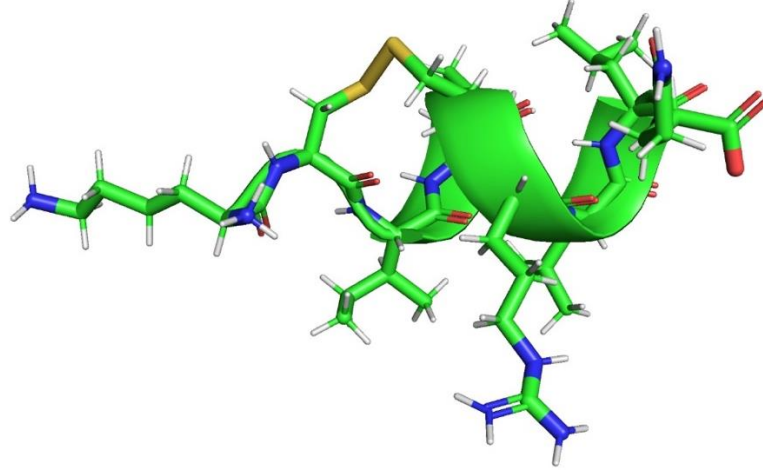
Şekil 3.16 : KCILCRLQLQ sekansına ait zımbalanmış peptit ile ER α etkileşimlerinin atom seviyesinde gösterimi. Aradaki yeşil çizgiler polar etkileşimleri ifade ederken, kırık yapıda olanlar hidrofobik etkileşimleri temsil etmektedir.

3.4 Disülfid Bağlı Siklik Peptitlerin Karakterizasyonu

In-silico analizlerimiz ve literatürdeki referans sekansı (SP1: KcILCRLlQ) sonucunda önerilen yeni SP'ler (SP2: KcKLCRLlQ ve SP3: KcSLCRLlQ), Fmoc kimyasına dayalı katı faz peptid sentezi yöntemi ile sentezlendi. Doğrusal peptitler (LP1-3), dietilasetilen dikarboksilat (DEAD) aracılı siklizasyon işlemiyle halkasallaştırıldı. Tüm peptitler LC-MS ile karakterize edildi. Kütle spektrumlarında hem SP1 hem de LP1 için iki ana moleküler iyon zirvesi vardır (Şekil 3.17A-3.17B). Bunlar her iki peptid için de $[M+H]^+$ ve $[M+2H]^{2+}$ 'dir. LP1 ve SP1 için $[M+H]^+$ pikleri arasındaki kütle farkı 2 Da'dır ve bu, siklizasyon reaksiyonunda iki hidrojen atomunun ortadan kaldırılması sonucunda disülfür köprüsü oluşumunu göstermektedir. Ayrıca, LP1'in lineer formu ile (Şekil 3.17C) SP1'in 3 boyutlu yapısı Şekil 3.17D'de verilmiştir.

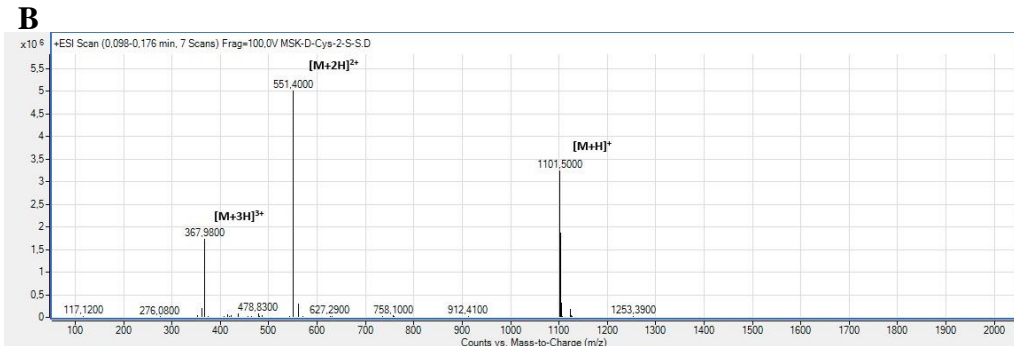
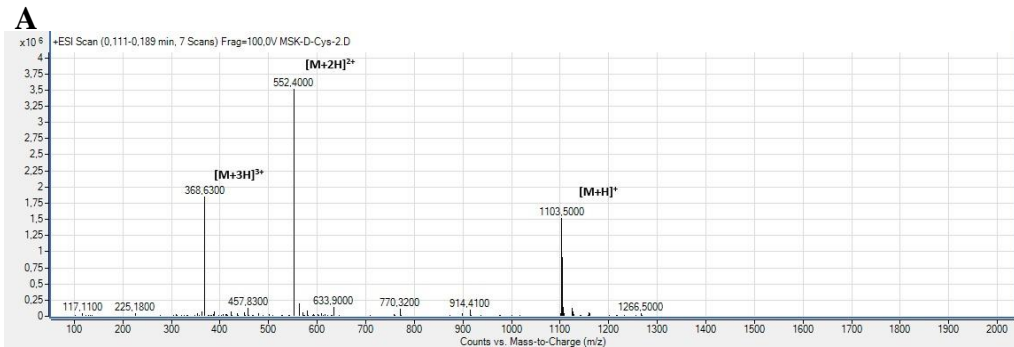


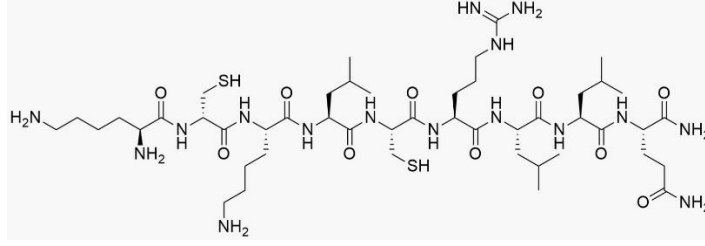
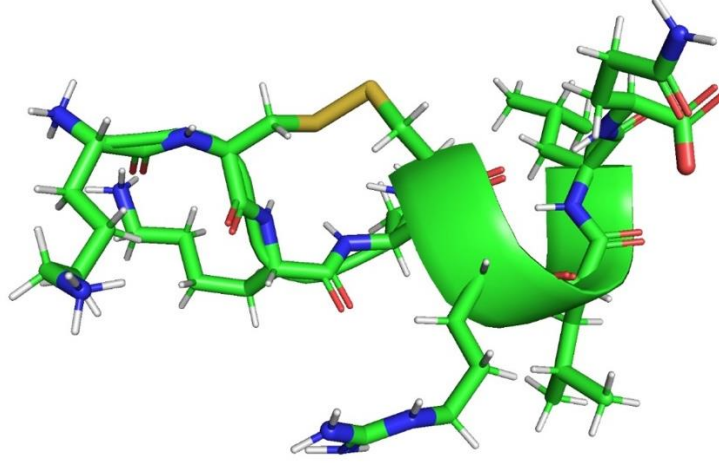
D



Şekil 3.17 : A) LP1'in kütle spektrumu. $[M+H]^+ = 1088,6$ ve $[M+2H]^{2+} = 544,8$ için hesaplanmıştır. B) SP1'in kütle spektrumu. $[M+H]^+ = 1086,6$ ve $[M+2H]^{2+} = 543,8$ için hesaplanmıştır. C) LP1'in doğrusal formunun birincil yapısı. D) SP1'in 3 boyutlu yapısı.

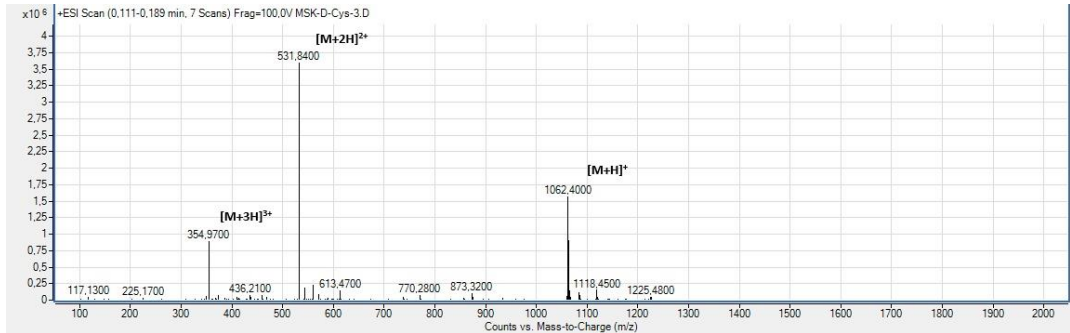
LP2 ve SP2'nin kütle spektrumunda üç ana moleküler iyon zirvesi vardır (Şekil 3.18A-3.18B). Bunlar, her iki peptit için de $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ ve $[M+3H]^{3+}$ 'dır. LP2 ve SP2 için $[M+H]^+$ pikleri arasındaki kütle farkı 2 Da'dır ve bu, siklizasyon reaksiyonunda iki hidrojen atomunun ortadan kaldırılması sonucunda disülfür köprüsü oluşumunu göstermektedir. Ayrıca, LP2'nin lineer formu ile (Şekil 3.18C) SP2'nin 3 boyutlu yapısı Şekil 3.18D'de verilmiştir.

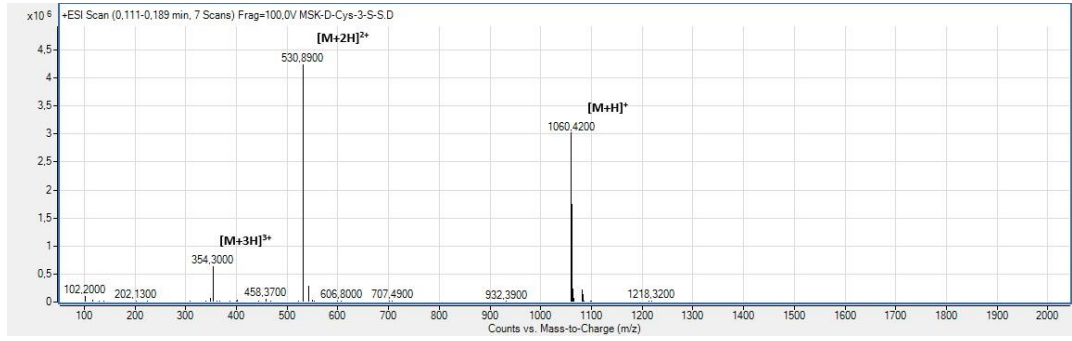
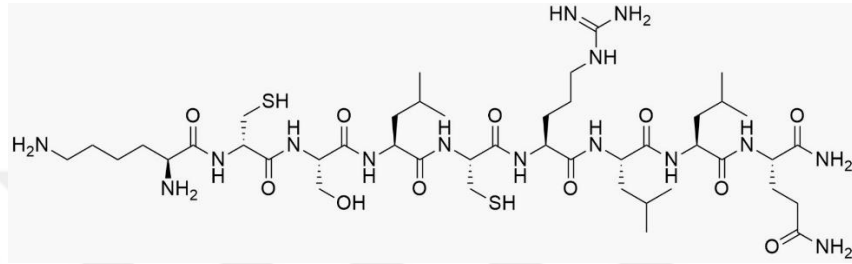
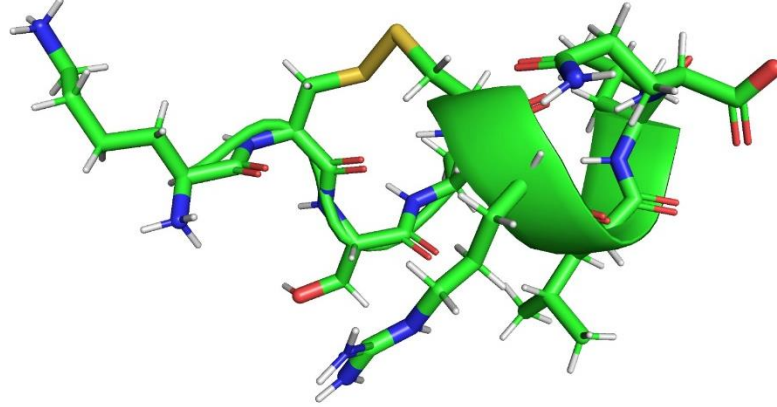


C**D**

Şekil 3.18 : A) LP2'nin kütle spektrumu. $[M+H]^+ = 1062,6$, $[M+2H]^{2+} = 531,8$ ve $[M+3H]^{3+} = 354,9$ için hesaplanmıştır. B) SP2'nin kütle spektrumu. $[M+H]^+ = 1060,6$, $[M+2H]^{2+} = 530,8$ ve $[M+3H]^{3+} = 354,2$ için hesaplanmıştır C) LP2'nin doğrusal formunun birincil yapısı. D) SP2'in 3 boyutlu yapısı.

Kütle spektrumlarında hem SP3 hem de LP3 için üç ana moleküler iyon zirvesi vardır (Şekil 3.19A-3.19B). Bunlar, her iki peptit için de $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ ve $[M+3H]^{3+}$ 'dir. LP3 ve SP3 için $[M+H]^+$ pikleri arasındaki kütle farkı 2 Da'dır ve bu, siklizasyon reaksiyonunda iki hidrojen atomunun ortadan kaldırılmasının bir sonucu olarak disülfür köprüsü oluşumunu göstermektedir. Buna ilaveten, LP3'ün lineer formu ile (Şekil 3.19C) SP3'ün 3 boyutlu yapısı Şekil 3.19D'de verilmiştir.

A

B**C****D**

Şekil 3.19 : A) LP3'ün kütle spektrumu. $[M+H]^+ = 1103,6$, $[M+2H]^{2+} = 552,3$ ve $[M+3H]^{3+} = 368,6$ için hesaplanmıştır B) SP3'ün kütle spektrumu. $[M+H]^+ = 1101,6$, $[M+2H]^{2+} = 551,3$ ve $[M+3H]^{3+} = 367,9$ için hesaplanmıştır. C) LP3'ün doğrusal formunun birincil yapısı. D) SP3'ün 3 boyutlu yapısı.

Siklizasyonu tamamlanmış (S-S) peptitlerin kütesini hesaplanmasında belirtilen güçlü piklerin, kütle-yük oranının (m/z) yükü (z) ile çarpımına denk olması gerekir. Bu yüzden SP1 için denkleminiz Şekil 3.17B'ye göre aşağıdaki gibi oluşturulur;

$$\text{Kütle (m)} = 543,9 * (\text{yük1}), 1086,5 * (\text{yük2}) \text{ şeklinde yazılır.} \quad (5.1)$$

Sonrasında denklem;

$$m + 1 = 543,9 * (z + 1) \text{ ve } m = 1086,5 * (z) \text{ şeklinde yazılarak}$$

$$m = 543,9 * z + 542,9, m = 1086,5 * (z) \text{ olarak eşitlenir.}$$

Buradan $z = 1$ elde edilir.

İlk pikin protonlanmamış kütlesi;

$$(543.9 - 1) * 2 = 1085,5$$

İkinci pikin protonlanmamış kütlesi;

$$(1086.5 - 1) * 1 = 1085,8 \text{ olarak hesaplanmıştır.}$$

İki pikten elde edilen kütlelerin ortalaması ise $\frac{1085,5+1085,8}{2} = 1085,65$ olarak

hesaplanır. Bu hesaba dayalı olarak peptidin 1086 Da olduğu bulundu. Fakat bu sayı peptidin nihai moleküler ağırlığını ifade etmez. Peptit sentezi aşamasında, sentezi tamamlanmış peptidin resinden ayrılması için konulan TFA grupları peptidin serbest uçlarına bağlanır. Bu bağlanmadan dolayı MC/MS'de hesaplanan moleküler kütleyle TFA'nın moleküler ağırlığının da eklenmesi gerekmektedir. Analizlerimiz sonucu KCILCRLQ sekansına sahip siklizasyonu tamamlanmış (S-S) 9-mer peptitte 3 TFA grubu bulunmaktadır. Bu yüzden 3 TFA grubunun kütlesi $114,02 \text{ g} * 3 = 342,06 \text{ gr}$ şeklinde hesaplanarak protonlanmamış KCILCRLQ (S-S) peptidin kütlesine ilave edildi. KCILCRLQ (S-S) peptidin kütlesi $1428,06 \text{ g/mol}$ olarak hesaplandı. Yukarıda verilen bilgiler ve hesaplamalar doğrultusunda diğer iki siklik peptit motif için moleküler kütle hesaplaması gerçekleştirildi.

SP2; KCKLCRLQ sekansına sahip siklizasyonu tamamlanmış (S-S) ikinci 9-mer peptidin üç belirgin piki için denklem Şekil 3.18B baz alınarak oluşturulur;

$$K\ddot{u}t\ddot{u}l\ddot{e} (m) = 367,98 * y\ddot{u}k1 = 551.4 * y\ddot{u}k2 = 1101.5 * y\ddot{u}k3 \quad (5.2)$$

şekilinde yazılır.

Sonrasında denklem;

$$m + 2 = 367.98 * (z + 2), m + 1 = 551.4 * (z + 1), m = 1101.5 (z) \quad \text{olarak eşitlenir}$$

ve buradan $z = 1$ elde edilir.

SP2'ye ait piklerin yükü ve kütlesine dayalı hesaplama ile ;

İlk pikin protonlanmamış kütlesi;

$$(367.98 - 1) * 3 = 1100,9$$

İkinci pikin protonlanmamış kütlesi;

$$(551.4 - 1) * 2 = 1100,8$$

Üçüncü pikin protonlanmamış kütlesi;

$$(1101,5 - 1) * 1 = 1100,5$$

Üç pikten elde edilen kütlelerin ortalaması ise $\frac{1100,9+1100,8+1100,5}{3} = 1100,73$ olarak hesaplanır. Analizlerimiz sonucu SP2; KCKLCRLLQ sekansına sahip siklizasyonu tamamlanmış (S-S) 9-mer peptitte 4 TFA grubu bulunmaktadır. Bu yüzden 4 TFA grubunun kütlesi $114,02 \text{ g} * 4 = 456,08 \text{ gr}$ şeklinde hesaplanarak protonlanmamış KCKLCRLLQ (S-S) peptitin kütlesine ilave edildi. KCKLCRLLQ (S-S) peptitin kütlesi $1557,08 \text{ g/mol}$ olarak hesaplandı.

SP3; KCSLCRLLQ sekansına sahip siklizasyonu tamamlanmış (S-S) üçüncü 9-mer peptitin üç belirgin piki için Şekil 3.19B'ye dayalı denklem;

$$\text{Kütle (m)} = 354,3 * \text{yük1} = 530,89 * \text{yük2} = 1060,42 * \text{yük3} \quad (5.3)$$

şekilinde yazılır.

Sonrasında denklem; $m + 2 = 354,3 * (z + 2)$, $m + 1 = 530,89 * (z + 1)$, $m = 1060,42 (z)$ ve buradan $z = 1$ elde edilir.

Şekil 3.19B'deki piklerin yükü ve kütlesine dayalı hesaplama ile ;

İlk pikin protonlanmamış kütlesi;

$$(354,3 - 1) * 3 = 1059,9$$

İkinci pikin protonlanmamış kütlesi;

$$(530,89 - 1) * 2 = 1061,58$$

Üçüncü pikin protonlanmamış kütlesi;

$$(1060,42 - 1) * 1 = 1059,42$$

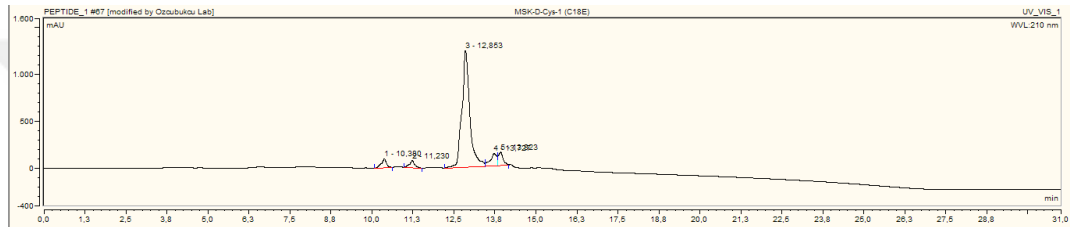
Üç pikten elde edilen kütlelerin ortalaması ise $\frac{1059,9+1061,58+1059,42}{3} = 1060,3$ olarak hesaplanır. Analizlerimiz sonucu SP3; KCSLCRLLQ sekansına sahip siklizasyonu tamamlanmış (S-S) 9-mer peptitte 3 TFA grubu bulunmaktadır. Bu yüzden 3 TFA grubunun kütlesi $114,02 \text{ g} * 3 = 342,06 \text{ gr}$ şeklinde hesaplanarak protonlanmamış KCSLCRLLQ (S-S) peptitin kütlesine ilave edildi. KCKLCRLLQ (S-S) peptitin kütlesi $1402,06 \text{ g/mol}$ olarak hesaplandı. Tüm SPlerin sahip olduğu dizileri ve moleküler kütleleri Tablo 3.6'da gösterildi.

Tablo 3.6 : Sentezlenen siklik peptitler ve moleküler kütleleri.

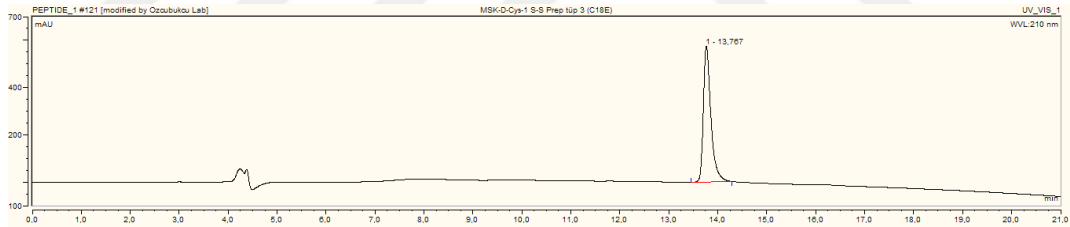
Siklik Peptit	Siklik Peptit Sekansı	Moleküler Kütle (g/mol)
SP1	KCILCRLLQ	1428,06
SP2	KCKLCRLLQ	1557,08
SP3	KCSLCRLLQ	1402,06

3.5 ER α 'ya Yönelik Sentezlenen Siklik Peptitlerin Saflaştırılması

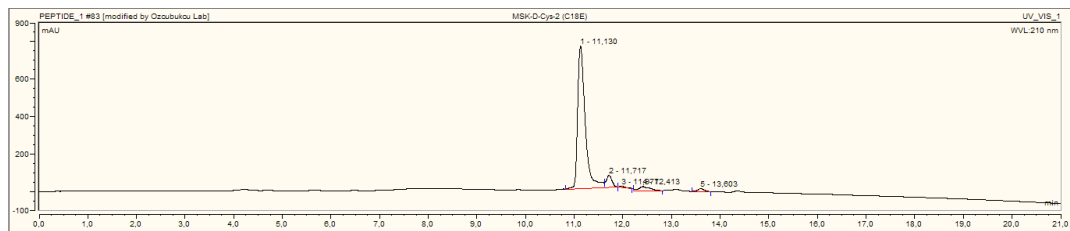
In silico analizlerimizden elde ettiğimiz sekans önerilerimize dayanarak referans sekansımızın (SP1; KC***I**LC**R**LLQ) ve hedef proteine (ER α 'ya) bağlanma ilgisi en yüksek iki disülfid bağlı zımbalanmış peptit sekansı SP2; KC***K**LC**R**LLQ ve SP3; KC***S**LC**R**LLQ (C* = D Sistein) sentezi Fmoc kimyasına dayalı katı-faz peptit sentez yöntemi ile gerçekleştirildi. Sentezlenen peptitler kütle spektrometresi ile analiz edildi ve peptitlerin saflık dercesi analitik RP-HPLC cihazı ile değerlendirildi. SP1'e ait kromatogramlar şekil 3.20 ve Şekil 3.21'de, SP2'ye ait kromatogramlar Şekil 3.22 ve Şekil 3.23'te, SP3'e ait kromatogramlar Şekil 3.24 ve Şekil 3.25'te sunulmuştur.



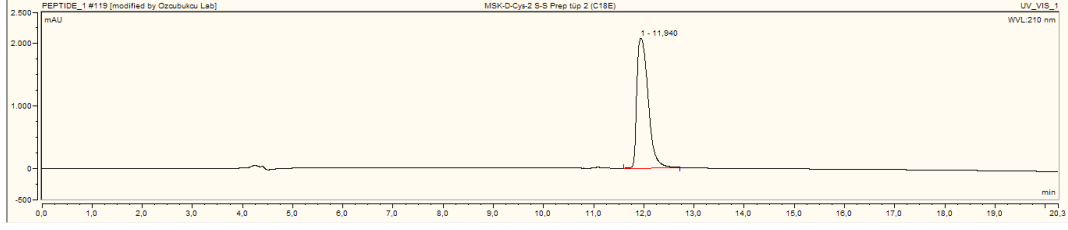
Şekil 3.20 : SP1'den elde edilen HPLC kromatogramı (mAU = mili OD, 210 nm). X eksini süreyi gösterirken, y eksenini absorbanı göstermektedir.



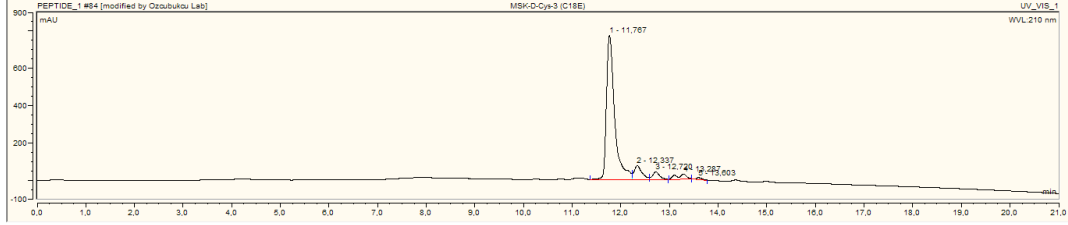
Şekil 3.21 : Saflaştırılmış SP1'e ait HPLC kromatogramı (mAU = mili OD, 210 nm).



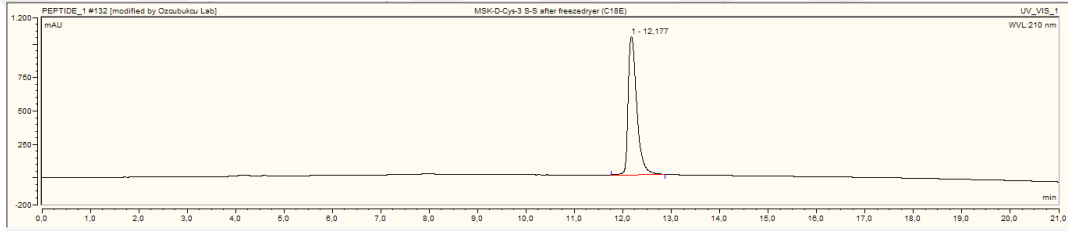
Şekil 3.22 : SP2'ye ait HPLC kromatogramı (mAU = mili OD, 210 nm).



Şekil 3.23 : Saflaştırılmış SP2 için HPLC kromatogramı (mAU = mili OD, 210 nm).



Şekil 3.24 : SP3'e ait HPLC kromatogramı (mAU = mili OD, 210 nm).



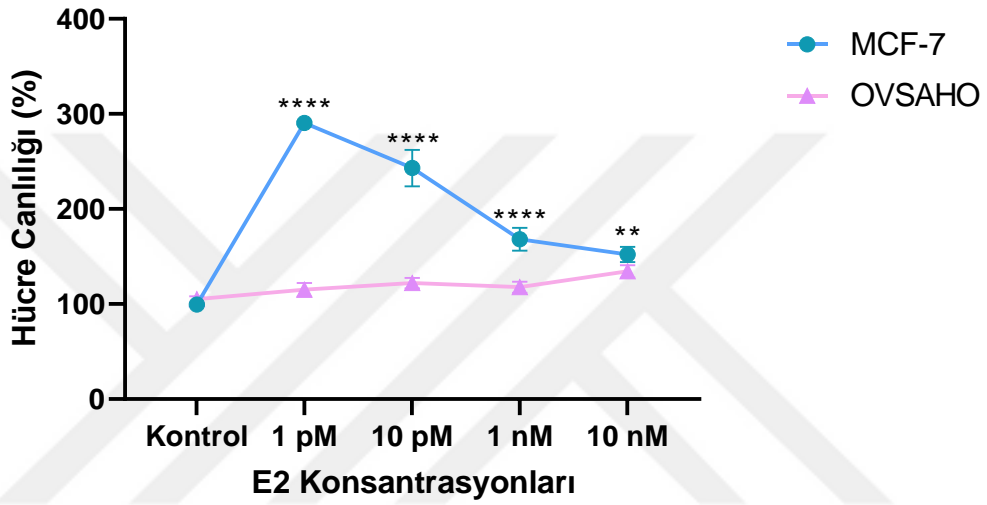
Şekil 3.25 : Saflaştırılmış SP3'e ait HPLC kromatogramı (mAU = mili OD, 210 nm).

Şekillerden de anlaşılacağı üzere saf halde elde edilen siklik peptitlerin kromatogramlarında herhangi bir safsızlık belirtisi (asimetrik ve çoklu pik gibi istenmeyen durumlar) yoktur. Bu durum siklik peptitlerin başarılı bir şekilde saflaştırıldığını göstermektedir.

3.6 Farklı E2 Konsantrasyonlarının ER α (+) Hücrelerinin Proliferasyonuna Olan Etkisi

E2'nin MCF-7 ve OVSAHO hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek için hücreler, farklı konsantrasyonlardaki E2 ile muamele edildi. Böylece hücre canlılığının test edilmesi amacıyla siklik peptitlerin hangi hücrelere hangi E2 konsantrasyonunda uygulanacağı belirlendi. Bu analiz için hücreler 96 kuyucuklu plakalara uygun yoğunlukta ekildi ve ertesi gün farklı E2 konsantrasyonları ile muamele edildi. 48 saat sonra hücre canlılığı SRB yöntemi kullanılarak ölçüldü ve tek yönlü ANOVA testi ile analiz edildi. Sonuçlar karşılaştırıldığında tüm E2 konsantrasyonlarında MCF-7 hücre canlılığında kontrol grubuna göre istatistiksel

olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü (Şekil 3.26). Ancak en yüksek artışın (yaklaşık 2,9 kat daha fazla, $p<0,0001$) en düşük konsantrasyondaki (1 pM) E2'ye ait olduğu kaydedildi. Diğer E2 konsantrasyonlarının (10 pM, 1 nM ve 10 nM) hücre canlılığını kontrol grubuna göre sırasıyla 2,4 ($p<0,0001$), 1,68 ($p=0,004$) ve 1,5 ($p=0,02$) kat arttırdığı bulundu. OVSAHO hücrelerinde ise farklı E2 konsantrasyonların uygulandığı hücre kültür ortamında over kanser hücrelerin büyümesinde anlamlı derecede bir proliferasyon artışı saptanmadı.

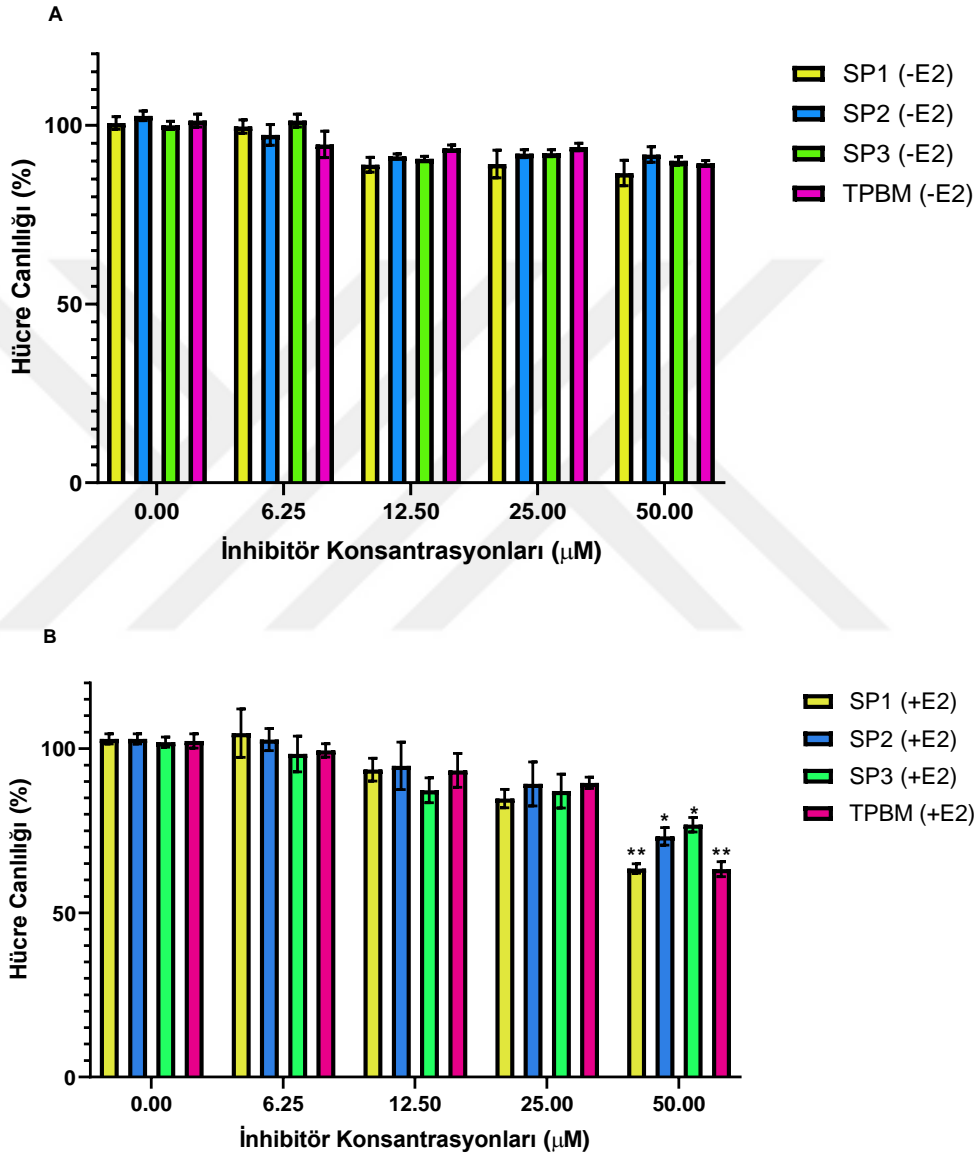


Şekil 3.26 : Farklı E2 konsantrasyonlarının 48 saat sonra MCF-7 ve OVSAHO hücreleri üzerindeki büyüme etkisi. SRB sonuçları için hata çubukları, üçlü tekrarlı en az üç bağımsız deneyden elde edilen ortalamanın ortalama \pm standart hatasını (SEM) temsil eder. SRB verilerinin istatistiksel analizi için tek yönlü ANOVA analizi gerçekleştirildi. **: $p<0,01$ ve ****: $p<0,0001$ kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

3.7 SP'lerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksikite/proliferasyona olan etkileri

SP1'in (referans) ve yeni dizayn SP'lerin (SP2-3) E2 içeren ve içermeyen besiyeri ortamlarıyla MCF-7 hücrelerine uygulandığında hücreler üzerinde oluşacak etkilerin karşılaştırmalı analizi yapıldı. Bunun için ER α -pozitif MCF-7 hücreleri, uygun yoğunlukta 96 kuyucuklu plakaya ekildi. Ertesi gün, farklı konsantrasyonlardaki SP'ler ve TPBM (50-6.25 μ M aralığında), E2 ihtiva eden (1 pM) ve etmeyen kültür ortamı ile hücrelere uygulandı ve 48 saat boyunca tedavi edildi. Tedavinin sonunda hücre canlılığı MTT analiz ile tespit edildi. Tedavi gruplarından alınan canlılık anlamlılık seviyeleri, her bir peptidin kontrol grubuyla karşılaştırılması yoluyla ölçüldü. E2 ihtiva

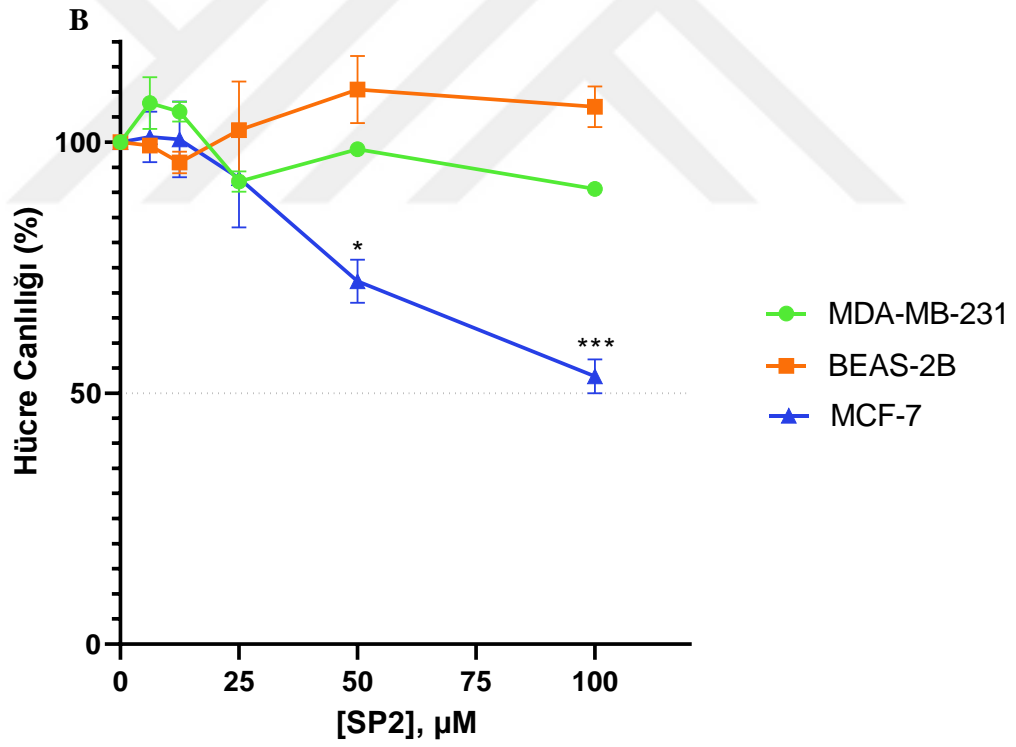
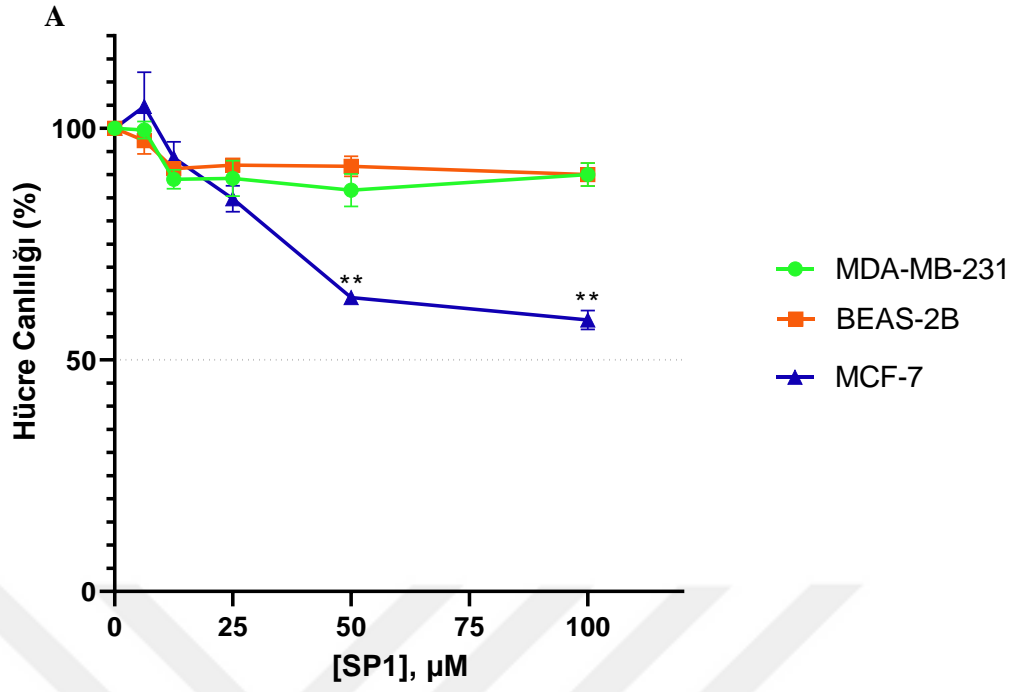
etmeyen ortamda hücelere uygulanan SP'ler ve TPBM'nin, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermezken (Şekil 3.27A), 1 pM E2 varlığında tüm inhibitörlerin 50 µM konsantrasyonları hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttı (Şekil 3.27B). 50 µM SP1, SP2, SP3 ve TPBM hücre canlılığını sırasıyla %37 (p=0,0051), %27 (p<=0,0323), %23 (p=0,0164) ve %37 (p=0,0048) oranında düşürdü.

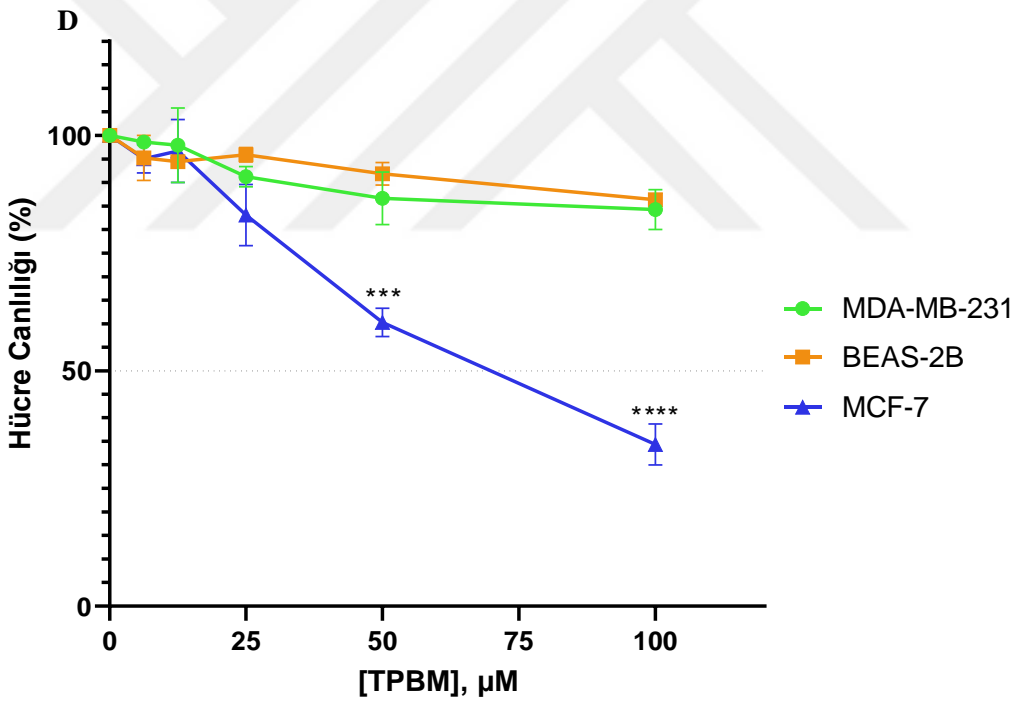
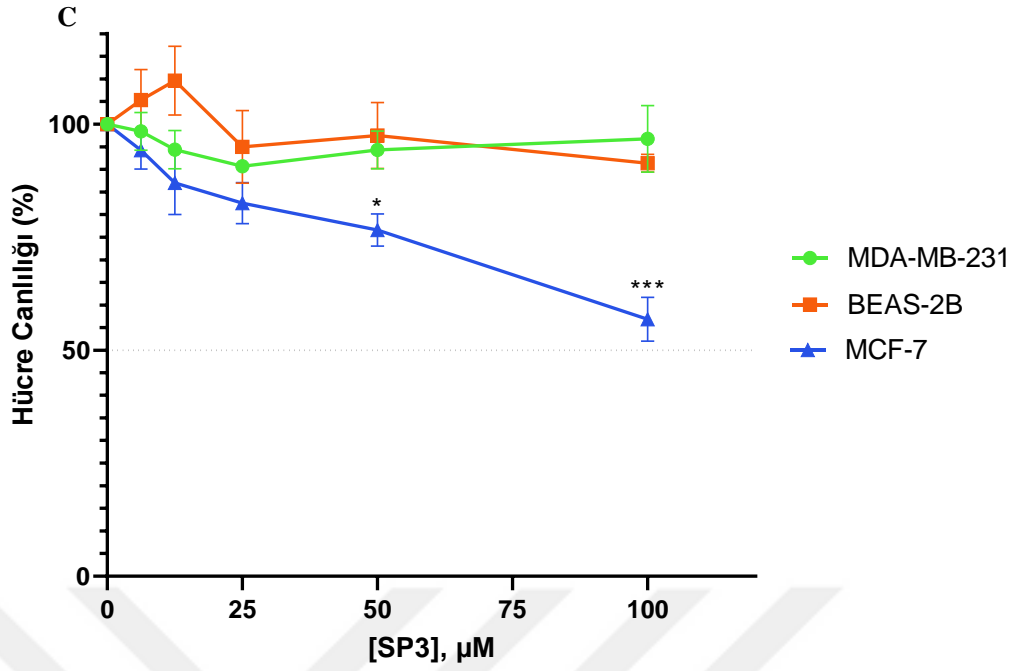


Şekil 3.27 : E2 varlığında ve yokluğunda SP'lerin ve TPBM'nin MCF-7 hücrelerinin canlılığına olan etkileri. A) E2 ihtiva etmeyen ortamlarla hücelere uygulanan inhibitör molekülleri gösterirken B) E2 ihtiva eden ortamlarla MCF-7 hücrelerinin uygulanan inhibitörlerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini gösterir. MTT sonuçları için hata çubukları üçlü tekrarlı en az üç bağımsız deneyden elde edilen ortalamanın ortalama ± standart hatasını (SEM) temsil eder. MTT verilerinin istatistiksel analizi için iki yönlü ANOVA analizi gerçekleştirildi. *; p<0,05 ve **; p<0,01 ve kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

3.8 Splerin Farklı ER α Ekspresyon Seviyelerine Sahip Hücre Hatlarındaki Sitotoksosite/Proliferasyona Olan Etkileri

SP'lerin MCF-7, MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücre hatları üzerindeki etkilerini ölçmek için hücreler, uygun yoğunlukta 96 kuyucuklu plakaya ekildi. Peki. Ertesi gün hücreler, farklı konsantrasyonlarda (100-6,25 μ M) SP'ler ve TPBM ile 48 saat boyunca tedavi edildi. Tedavinin sonunda hücre canlılığı MTT analizi ile ölçüldü. Sonuçlarda SP1, BEAS-2B ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre canlılığını azaltmazken, MCF-7 hücre hattında hücre canlılığını 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %36,5 ($p=0,0038$) ve %41,4 oranında ($p<0,0061$) (Şekil 3.28A) azalttığı görüldü. Aynı şekilde SP2'nin tüm konsantrasyonları BEAS-2B ve MDA-MB-231 hücre hatlarında etkisiz olduğu gözlemlendi. Ancak MCF-7 hücre hattı için 50 ve 100 μ M SP2, hücre canlılığını sırasıyla %27,7 ($p=0,0407$) ve %46,65 ($p=0,0002$) oranında inhibe etti (Şekil 3.28B). SP3 de tıpkı SP1 ve SP2 gibi MCF-7'ye göre çok daha az ER α eksprese eden MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücrelerinin canlılığında herhangi bir değişikliğe neden olmadı. Bununla birlikte, MCF-7 hücre hattında, 25 uM SP3 hücre canlılığını %17,45 azaltırken, 50 uM SP3 %23,4 ($p=0,0172$) ve 100 uM SP3 hücre canlılığını %43,15 azalttı ($p<0,001$) (Şekil 3.28C). Ticari bir ER α inhibitörü olan TPBM, SP'ler gibi yalnızca MCF-7 hücreleri üzerinde etki gösterdi. 50 ve 100 μ M TPBM, hücre canlılığını kontrol grubuna göre sırasıyla %39,7 ($p=0,0009$), %65,65 ($p<0,0001$) oranında azalttı. TPBM'nin IC₅₀ değeri 63,3 μ M olarak bulundu (Şekil 3.28D).



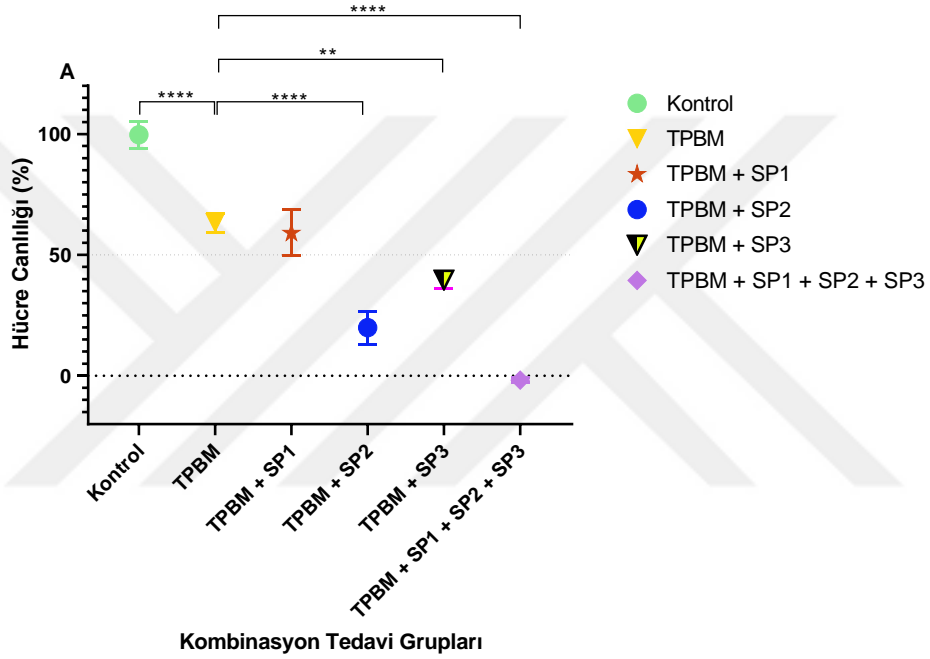


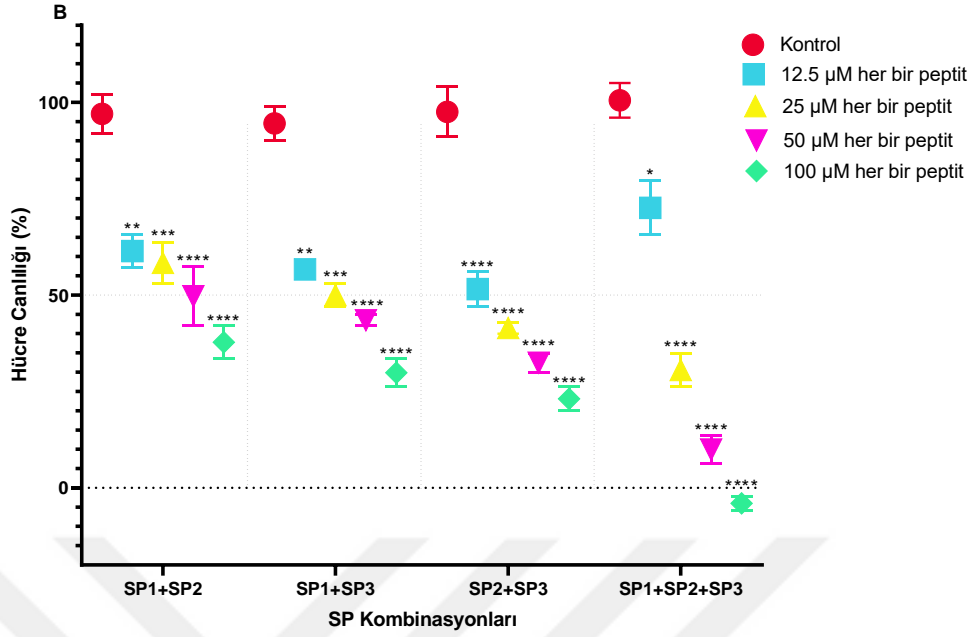
Şekil 3.28 : SPlerin ve TPBM'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücrelerine olan canlılık etkileri. MTT sonuçları için hata çubukları, üçü tekrarlanmış en az üç bağımsız deneyden elde edilen ortalamanın ortalama \pm standart hatasını (SEM) temsil eder. MTT verilerinin istatistiksel analizi için iki yönlü ANOVA yapıldı. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ ve ****: $p < 0,001$ kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

3.9 SP Kombinasyonlarının ve Tekli SP Tedavilerinin Hücre Canlılığına Olan Etkisi

TPBM ve SP kombinasyonlarının (SPK) MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisini daha iyi incelemek için ATP analizi kullanıldı. İlk kombinasyon tedavi planı için hücreler, 96 oyuklu plakanın her bir kuyusuna uygun yoğunlukta ekildi. Ertesi gün, hücreler TPBM'nin IC₅₀ dozu ile muamele edilerek ön tedavisi yapıldı. Ertesi gün ön tedavi görmüş hücrelere ayrı ayrı 50 µM SP1, SP2 ve SP3 ilave edildi. 48 saatlik tedavinin ardından hücre canlılığı ATP analizi ile tespit edildi. İkinci kombinasyon planı için hücreler, 96 oyuklu plakanın her bir kuyusuna uygun yoğunlukta ekildi. Ertesi gün, hücrelere SP1, SP2 ve SP3 ve TPBM (her bir inhibitör 12,5-100 µM aralığında) uygulanarak hücrelerin ön tedavisi gerçekleştirildi. Ardından SP1 ile tedavi edilen gruplara SP2 ve SP3 (SP1+SP2, SP1+SP3), SP2 ile tedavi edilen gruplara SP1 ve SP3 (SP2+SP3), SP3 ile tedavi edilen gruplara SP2 ve SP1 (SP1+SP2+SP3) ilave edildi (Ön tedavi ve tedavi uygulamasında her bir peptit aynı konsantrasyonda (12,5–100 µM) hücrelere uygulandı). İkinci peptit tedavisinden 48 saat sonra hücre canlılıkları ATP analizi sayesinde bağıl ışık birimleri (RLU) olarak elde edildi ve hücre canlılıkları hesaplandı. Her deney için tedavi grubu kendi kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, IC₅₀ dozu ile ön işleme tabi tutulan MCF-7 hücrelerinin SP1, SP2 ve SP3 tedavisinden sonra hücre canlılığında önemli bir azalma olduğu görüldü (Şekil 3.29A). Tüm kombine tedavi gruplarında kontrole göre anlamlı bir canlılık inhibisyonu gözlemlendi. Kombine TPBM ve SP grupları sadece TPBM tedavi grubu ile karşılaştırıldığında, TPBM+SP2'nin hücre canlılığını %68.6 oranında (p<0.0001) azalttığı tespit edilirken, TPBM + SP3, ~%37.4 (p<0.01) oranında düşürdüğü gözlemlendi. TPBM + SP1 + SP2 + SP3, kombinasyonun hücreler üzerinde toksik etki gösterdiği görüldü. Sadece peptit kombinasyonlarının (SPK) MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisini incelediğimiz deney verilerine göre (Şekil 3.29B); SP1+SP2 kombinasyonunun 12,5, 25, 50 ve 100 µM dozları, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını sırasıyla %65,6 (p<0,01), %63,7 (p<0,001), %57,4 (p<0,0001) ve %42'ye (p<0,0001) kadar düşürdü. SP1+SP3 kombinasyonunun 12,5, 25, 50 ve 100 µM dozları, hücre canlılığını kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sırasıyla, %57,2 (p<0,01), %53,0 (p<0,001), %42,0'a (p<0,0001) ve %33,5'e (p<0,0001) kadar düşürdüğü bulundu. SP2+ SP3 kombinasyon grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, canlılık inhibisyonunda diğer SPKlara göre daha etkiliydi. P2+P3 kombinasyonu 12,5, 25, 50

ve 100 μ M dozlarında hücre canlılığını %56,1 ($p<0,0001$), %47,0 ($p<0,0001$), %34,9 ($p<0,0001$) ve %26,23'e ($p<0,0001$) kadar düşürdüğü, çalışmamızın tek üçlü tedavi grubu olan SP1+SP2+SP3'ün ise en iyi anti-proliferatif etkiye sahip kombinasyon grubu olduğu bulundu. SP1+SP2+SP3'ün 12,5, 25 ve 50 μ M dozları kontrol grubuna göre hücre canlılığını sırasıyla %20,4 ($p<0,05$), %65,1 ($p<0,0001$) ve %93,8 ($p<0,0001$) oranında azaltırken; 100 μ M dozunun hücreler üzerinde toksik etkisi olduğu görüldü.



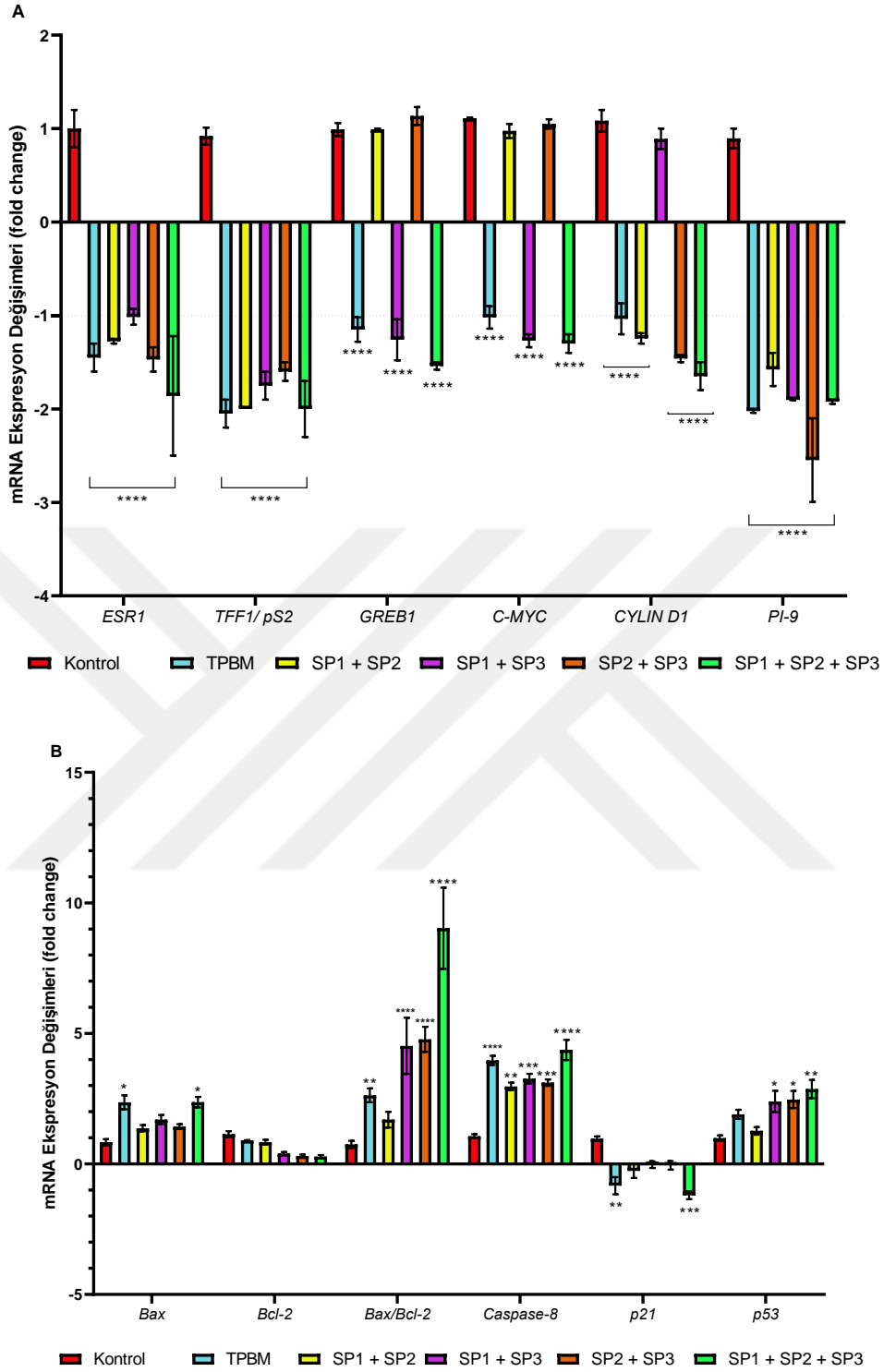


Şekil 3.29 : TPBM ve SPK'nın MCF-7 hücrelerinin canlılığına olan etkisi. A) IC₅₀ dozunda TPBM ile ön tedaviden sonra SP'lerle tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdesi. B) Farklı SP konsantrasyonları ile ön tedaviden sonra aynı dozlarla tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdesi. Hata çubukları, en az üç bağımsız deneyin üçlü tekrarlanmış verilerinden elde edilen ortalama ± standart hatasını (SEM) temsil eder. ATP verilerinin istatistiksel analizi için iki yönlü ANOVA yapıldı. *; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 ve ****; p<0,001 kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

3.10 SPK Tedavisinin ER α Sinyal Yolu ve Apoptoz İle İlişkili Gen ve Proteinlerin Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

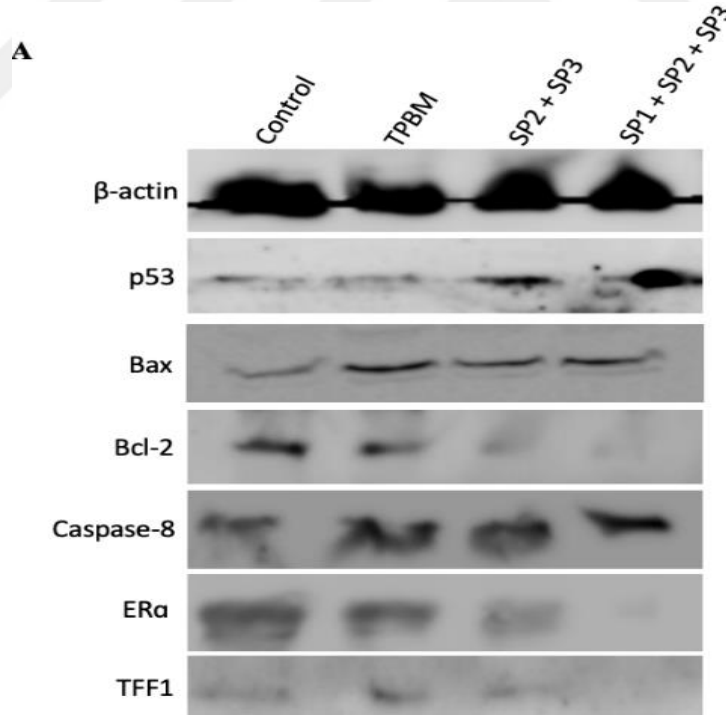
MCF-7 hücreleri SPKların IC₅₀ dozları ile 48 saat boyunca tedavi edildi ve ardından ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile değerlendirildi. Tüm tedavi gruplarının ER α ve hedef genleri üzerindeki etkisini incelemek için; *ESR1*, *TFF1*/ *pS2*, *GREB1*, *c-Myc*, *CCND1* ve *PI-9* genleri qPCR analizine dahil edildi. Ayrıca SPKların apoptozu nasıl indüklediğini daha ayrıntılı olarak göstermek için *kaspaz-8*, *p21* ve *p53* seviyelerinin yanı sıra *Bax* ve *Bcl-2* ekspresyonları da analiz edildi. Sonuçlar, kontrol grubuna kıyasla SPKların ve TPBM'nin *ESR1* ve hedef mRNA ekspresyonlarını düşürdüğünü (Şekil 3.30A), özellikle *ESR1* ve *TFF1* mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi (p<0,0001). Tüm SPKlar *ESR1* mRNA ekspresyon seviyesini düşürdüğü ve en etkili grubun ~1,5 kat azaltan SP1 + SP2 + SP3 olduğu bulundu. Diğer SPKlar; SP1 + SP3

~1 kat ve SP2 + SP3 ~1,3 kat *ESR1* mRNA ekspresyonunu düşürdü. Ligand bağlı (aktive edilmiş) ER α 'nın transkripsiyonunu başlatan *TFF1*'in mRNA ekspresyon düzeyi de tüm tedavi gruplarında önemli ölçüde düşüş gösterdi ($p<0.0001$). Şekil 13A'da sunulan tedavi gruplarının sırasına göre, *TFF1* mRNA ifadelerinde sırasıyla ~2,05 kat, 2 kat, 1,75 kat, 1,6 kat ve 2 kat azalma görüldü. ER α aracılı hücre döngüsü ilerlemesi ve çoğalmasında rol oynayan *GREB1*, *c-MYC* ve *siklin D1*'in ile apoptozu inhibe eden bir granzim B inhibitörü olan *PI-9*'un mRNA ekspresyon seviyeleri tedavi grupları arasında değişiklik gösterdi. *GREB1* mRNA ekspresyon seviyeleri SP1+SP3 ve SP1+SP2+SP3 kombinasyonlarında 1 kattan fazla azalırken, *c-MYC* mRNA ekspresyon seviyelerinin de yaklaşık 1,3 kat azaldığı görüldü (Şekil 3.30A). Kontrole kıyasla SP1 + SP2 ve SP2 + SP3 kombinasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmedi. *Siklin D1* mRNA ekspresyon seviyelerine bakıldığında ise, SP1 + SP2 kombinasyon grubunda 1,2 kat, SP2 + SP3 grubunda ~1,5 kat ve SP1 + SP2 + SP3 üçlü kombinasyon grubunda ~1,7 kat azaldığı görüldü. Kontrole kıyasla SP1 + SP3'te anlamlı bir fark gözlenmedi. *PI-9* mRNA ekspresyonu tüm tedavi gruplarında sırasıyla yaklaşık 1,6, 2, 2,5 ve 2 kat azaldı (Şekil 3.30A). Sonuç olarak SP1 + SP2 + SP3, *ESR1* mRNA'sını ve çalışmamıza dahil ettiğimiz tüm *ESR1* hedef mRNA'larını anlamlı bir farkla azalttı. Ek olarak hücrel apoptotik mekanizmanın temel düzenleyicilerden olan *p53*, *p21*, *Bcl-2*, *Bax* ve *kaspaz-8*'in mRNA ekspresyon seviyeleri tedavi grupları ve kontrol grubu arasında kıyaslandı. TPBM tedavisi haricinde SP1 + SP2 + SP3 grubunda *Bax* mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir artış gözlendi ($p<0,05$) (Şekil 3.30B). Tüm tedavi gruplarında kontrole göre *Bcl-2* mRNA ekspresyonunda düşüş görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi. SPKlardaki *Bax*: *Bcl-2* oranları karşılaştırıldığında SP1 + SP3, SP2 + SP3 ve SP1 + SP2 + SP3'ün kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı görüldü ($p<0,0001$). *Kaspaz-8* mRNA ekspresyon düzeyi ise tüm tedavi gruplarında önemli ölçüde arttı. *p21* mRNA ekspresyonuna bakıldığında ise SPKlar arasında en etkili grubun SP1 + SP2 + SP3 olduğu görüldü ($p<0,0001$). Yüksek *p53* mRNA ekspresyonu MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği bilinmektedir ve tedavi grupları karşılaştırıldığında SP1 + SP3 ($p<0,05$), SP2 + SP3 ($p<0,05$) ve SP1 + SP2 + SP3 ($p<0,01$) hücrelerinde anlamlı düzeyde artış görüldü (Şekil 3.30B).

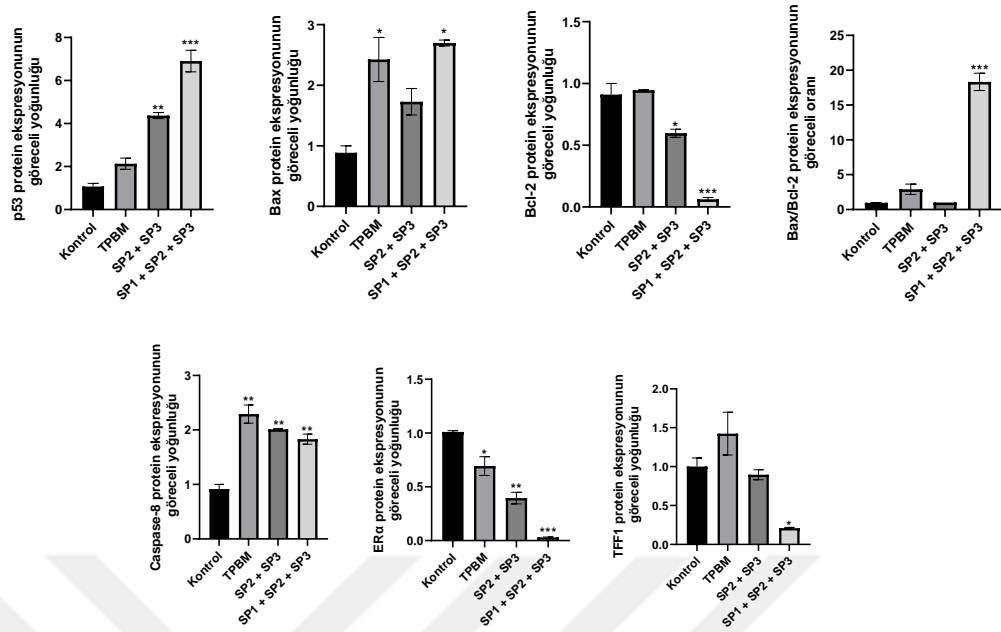


Şekil 3.30 : MCF-7 hücrelerinin ESR1 ve apoptoz ile ilişkili mRNA'ların RT-qPCR analizi. Beta aktin kontrol gen olarak kullanıldı. A) MCF-7 hücrelerinde TPBM ve SPKların IC₅₀ dozu ile tedavisinden sonra ESR1 aracılı mRNA ekspresyon seviyeleri ile B) apoptoz düzenleyicilerinin mRNA seviyeleri. Çubuklar, üçü tekrarlanmış en az üç bağımsız deneyin ortalama ± standart hatasını (SEM) temsil eder. RT-qPCR verilerinin istatistiksel analizi için iki yönlü ANOVA yapıldı. *, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001 ve ****, p<0,001 kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

MCF-7 hücreleri SP2 + SP3 ve SP1 + SP2 + SP3 kombinasyonlarının IC₉₀ dozu ile tedavi edildikten sonra elde edilen hücresel proteinlerin Western Blot analizi neticesinde alınan bantlar Şekil 3.31A'da sunuldu. Elde edilen bantların beta aktine'e kıyasla alınan ışımlarının göreceli analizine göre her bir antikordan alınan bant yoğunluğu grafik olarak sunulurken buradaki anlamlı farklılıklar gösterildi (Şekil 3.31B). Şekil 3.31B'deki p53 protein ekspresyon seviyelerinin, kontrole kıyasla tüm SPKlarda önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Bax protein ekspresyonu TPBM ve SP1 + SP2 + SP3 tedavi gruplarında anlamlı derecede artarken ($p < 0.05$), Bcl-2 protein ekspresyon seviyeleri kontrole göre azaldı. Özellikle SP2 + SP3 ($p < 0,05$) ve SP1 + SP2 + SP3 ($p < 0,0001$) tedavi gruplarında etkili ve anlamlı bir azalma oldu. SP1 + SP2 + SP3'ün Bax/Bcl-2 oranında anlamlı bir artışa yol açtığı görüldü ($p < 0.0001$). Kaspaz 8'in protein düzeyleri kontrole göre SPKlarda anlamlı düzeyde arttı ($p < 0.01$). Ayrıca ER α protein ekspresyon düzeylerinde SP2+SP3 ($p < 0.01$), SP1+SP2+SP3 ($p < 0.001$) gruplarında anlamlı bir azalma tespit ettik. TFF1 protein ekspresyon düzeyindeki etkili düşüş ise SP1+SP2+SP3 kombinasyonunda gözlemlendi ($p < 0,001$).



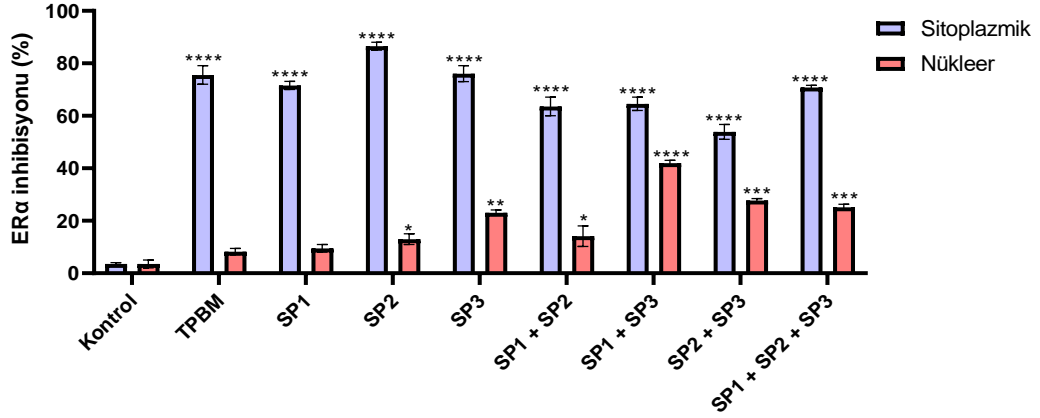
B



Şekil 3.31 : TPBM ve SPKların IC₉₀ dozları ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin apoptoz (p53, Bax, Bcl-2, kaspaz-8) ve ERα ile ilişkili (ERα ve TFF1) protein ekspresyonlarının A) temsili Western blot görüntüsü ile B) nicelik grafikleri. Beta-aktin, kontrol olarak kullanıldı. Protein seviyeleri, TPBM veya SPKlara kıyasla beta-aktin'e karşı her bir gruptan elde edilen protein bantlarından ölçülen ortalamanın ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak temsil edilir. qPCR verilerinin istatistiksel analizi için tek yönlü ANOVA uygulandı *; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

3.11 ELISA

TPBM ve disülfid bağlı siklik peptitlerin tekli ve kombine tedavilerinin IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hem sitoplazmik hem de nükleer ekstraktları elde edilerek, gruplar arasındaki ERα aktivasyon farklılıkları ELISA yöntemi ile incelendi. Sonuçlarımız, hücrelerin sitoplazmik ekstraktlarında anlamlı derecede yüksek bir ERα inhibisyonu olduğunu gösterdi. Tedavi gruplarından toplanan nükleer ekstraktlarda ise ERα inhibisyonunda anlamlı derece farklılıkların görülmesine rağmen sitoplazmik ERα inhibisyonu kadar etkili bir artış gözlenmedi (Şekil 3.32). Tekli ve kombine peptit tedavilerinin ERα inhibisyonunda oldukça etkili olduğu açığa çıkarıldı ve apoptozu sitoplazmik ERα inhibisyonu yoluyla daha hızlı indükleyerek geç apoptozun görüldüğü akış sitometrisi sonuçlarıyla benzerlik gösterdi (Şekil 3.32).

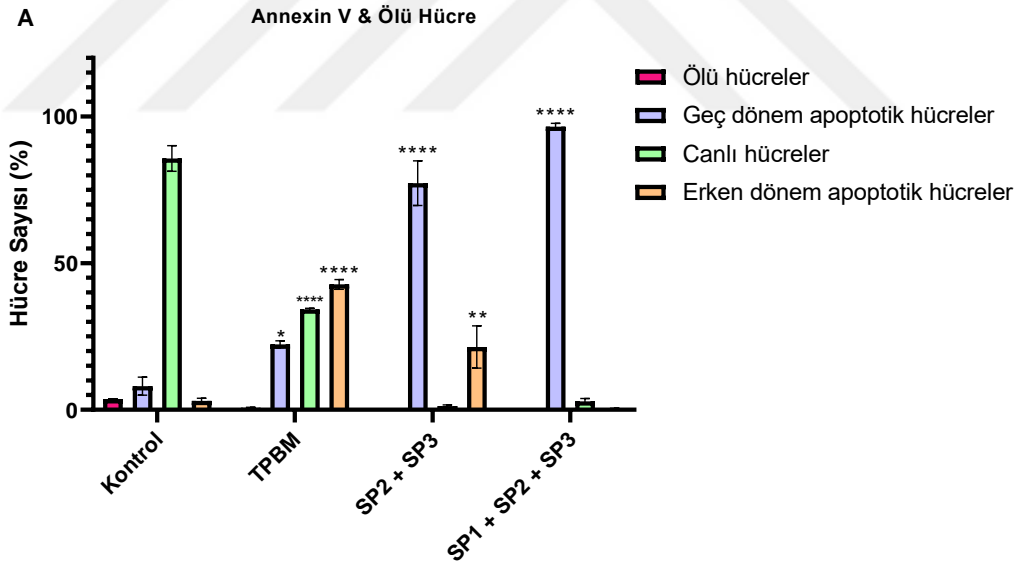


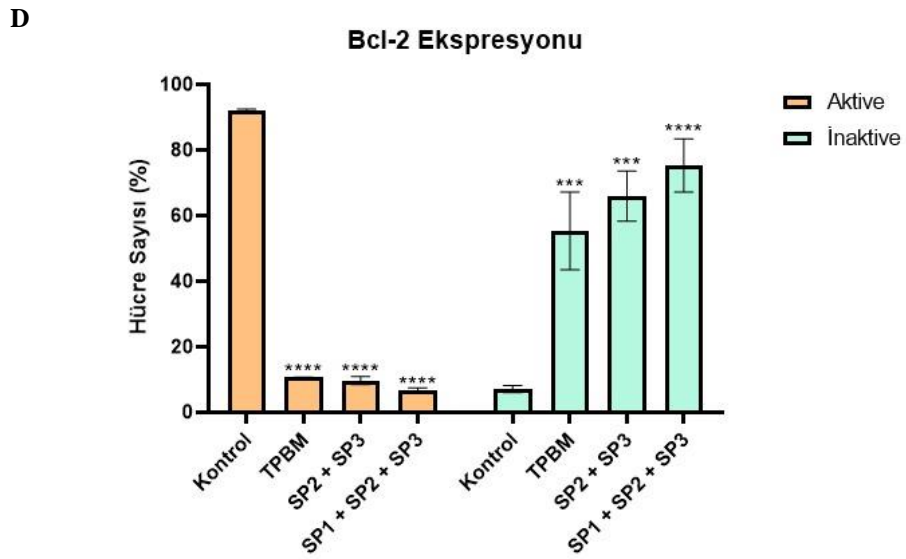
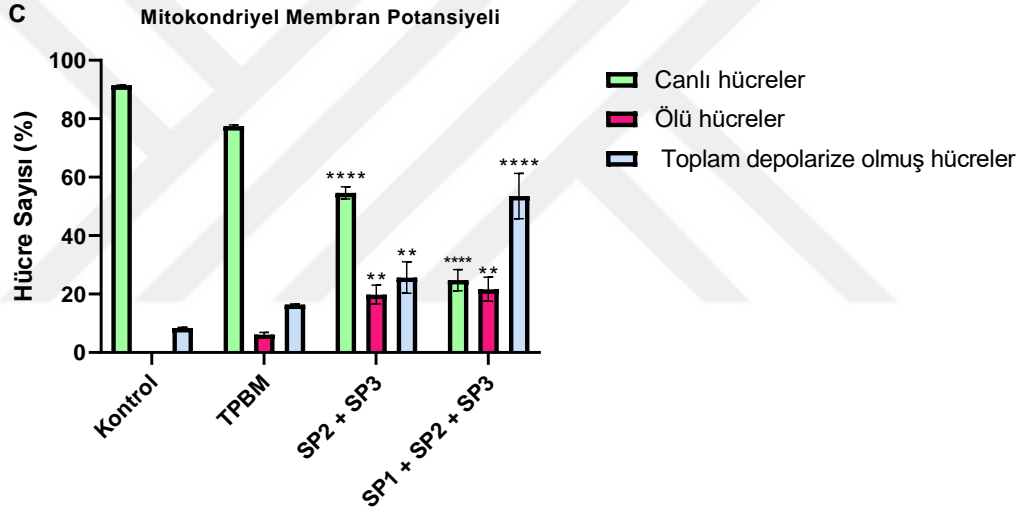
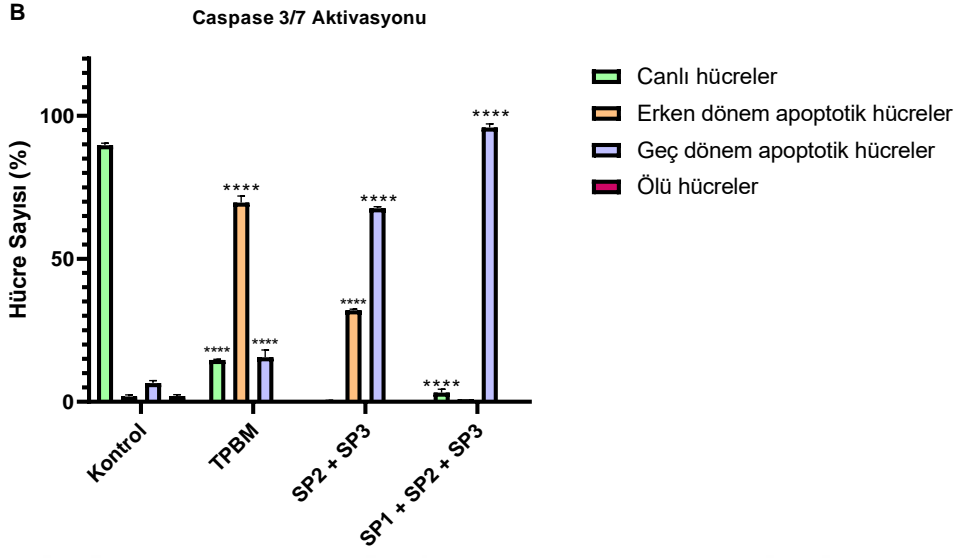
Şekil 3.32 : TPBM ve SPKların IC₅₀ dozları ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin ERα inhibisyonu üzerindeki etkileri. Sitoplazmik ve nükleer ekstraktlardan elde edilen veriler kendi kontrol grubu ile kıyaslanmış olup, her veri ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak temsil edilir. ELISA verilerinin istatistiksel analizi için iki yönlü ANOVA uygulandı *; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 ve ****; p<0,0001 kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

3.12 Akış Sitometrisi

Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının ayrıntılı incelenmesi için, MCF-7 hücreleri SP2+SP3 ile SP1+SP2+SP3 kombinasyonlarının IC₉₀ dozu ile 48 saat boyunca tedavi edildi. Tedavi sonrasında Annexin-V ölçümüne göre; toplam apoptotik hücre oranları SP2+SP3'de %98,66 (erken + geç) iken, SP1+SP2+SP3 grubunda toplam apoptotik hücre sayısının %97,07 olduğu belirlendi. (Şekil 3.33A). TPBM tedavi grubunda ise toplam apoptotik hücre oranı %65,08 (erken + geç) olarak bulundu. Her iki SPK, TPBM tedavi grubuyla karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücrelerin oranının önemli ölçüde arttığı gözlemlendi (p<0,0001). Erken apoptotik hücreler tüm tedavi gruplarında kontrole göre anlamlı düzeyde artmasına rağmen, artışın TPBM'de SPKlara göre daha fazla olduğu bulundu. Bu durumun aksine SPKlarda geç dönem apoptotik hücre sayısının TPBM tedavi grubu hücrelere göre daha fazla olduğu belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda her iki peptid kombinasyon tedavisinin de annexin-V pozitif hücre sayısını önemli ölçüde arttırdığı, canlı hücre sayısını ise önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi. Apoptotik hücre ölüm oranlarının akış sitometrisindeki kaspaz-3/7 analizi ile değerlendirilmesi sonucunda ise MCF-7 hücre hattında 48 saatlik SPC tedavisi sonrasında toplam apoptotik hücre sayısının SP2+SP3 grubunda %96,75 olarak belirlenirken, SP1+SP2+SP3 grubunda ise bu oran %99,6 (erken + geç) olarak ölçüldü. (Şekil 3.33B). Üçlü peptid tedavisi ile geç apoptotik değişiklikler anlamlı derecede artarken (p<0,0001), hem erken hem de geç apoptotik

hücre yoğunlukları SPKlar arasında farklılık gösterdi. Tüm bu sonuçlar, SPK tedavisinin MCF-7 hücrelerinde kaspaz-7 aktivitesinde önemli ölçüde artış olduğunu gösterdi ($p < 0,0001$). Apoptotik sürecin önemli bir yönü olan mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştiği toplam hücre oranı SP2+SP3 grubunda %25,65 iken SP1+SP2+SP3 grubunda bu oran %53,55 olarak belirlendi (Şekil 3.33C). Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondri aracılı apoptozu düzenlediğinden, akış sitometrisi ile Bcl-2'nin Ser70 fosforilasyonunu tayin edildi (Şekil 3.34D). Şekil 3.34D'de görüldüğü gibi, siklik peptit kombinasyon tedavisi sonrasında hücrelerde Bcl-2 defosforilasyonu (inaktivasyon) meydana geldi. Kontrol grubuna nazaran SPK tedavisinin ardından MCF-7 hücrelerinde anlamlı bir Bcl-2 defosforilasyonu gözlemlendi. TPBM tedavisinin ardından hücrelerin yaklaşık %55 oranında ($p < 0,001$), SP2+SP3 tedavisinin ardından hücrelerin yaklaşık %66'ında ($p < 0,001$) ve üçlü kombinasyon tedavisinin ardından hücrelerin yaklaşık %75'inde ($p < 0,0001$) Bcl-2 inaktivasyon oranı saptandı. Bu durum tüm tedavi gruplarında Bcl-2 sinyal yolunun etkisiz hale getirildiği anlamını taşımaktadır.





Şekil 3.33 : TPBM ve SPKların IC₉₀ dozları ile 48 saat boyunca tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde A) Annexin V-FITC, B) Kaspaz-3/7 ve C) mitokondriyal membran potansiyeli değişim aktivasyonunun değerlendirilmesi, A-B) Her grafikte canlı, ölü, erken apoptotik ve geç apoptotik hücrelerin yüzdeleri sunulmaktadır. C) Mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkiler, hücreleri canlı ölü ve toplam depolarize hücrelere bölerek yüzde olarak gösterildi. D) Bcl-2 aktivasyonundaki değişikliklerin değerlendirilmesi. Hücre yüzdesi, en az iki bağımsız deneyin ortalama ± standart hatası (SEM) olarak sunuldu. Akış sitometrisi verilerinin istatistiksel analizi için iki yönlü ANOVA gerçekleştirildi. *; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,0001 kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder.

Bu tez kapsamında, linner peptitlerin konformasyonel olarak esnek olmaları, hücre içine geçişlerinin zor olması ve proteazlara karşı kararsız olması gibi bir çok dezavantajlarından dolayı terapötik disülfid bağlı siklik peptitler, *in siliko* olarak ER α -kofaktör etkileşimlerini hedef alacak şekilde ER α aktivitesini inhibe etmeye yönelik tasarlanmıştır. Literatürdeki bu inhibisyonu sağlayan LxxLL hedefli peptitlerin, steroid reseptörlerinin yüzeyine bağlanan peptit taklitlerini tasarlamak için kullanılmış ve klinikte halihazırda kullanılan terapötiklere direnç gösteren bazı vakalarda aday tedaviler olarak sunulabileceği belirtilmiştir [36-38]. Proteinlerin yapısal stabilitesini korumada etkili kovalent bağlar olan disülfid bağları, birçok peptit temelli ilacın biyolojik etkilerinde önemli rol oynamasının yanı sıra, lineer peptitlerin stabilizasyonunda kullanılmaktadır [39,40]. Literatürde ER α 'nın koaktivatör bölgesini hedef alan özel olarak geliştirilmiş disülfür köprülü peptitlerle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. İlk ER α -kofaktör bağlanma bölgesine yönelik disülfid bağıyla stabilize edilmiş peptit peptidomimetik östrojen reseptör modülatörü 1 (PERM-1) H-Lys-cyclo(D-Cys-Ile-Leu-Cys) Arg-Leu-Leu-Gln-NH₂) geliştirilmiştir. Bu çalışmada, disülfid bağlı peptidin a-sarmal konformasyonunu kristalize edilmiş ve i, i+3 konumlarındaki D/L-Cys kombinasyonunun idealleştirilmiş bir a-sarmalını taklit edebileceğini öne sürmüşlerdir [41]. Bir sonraki çalışma da ise PERM-1'in farklı analogları tasarlanmış ve sistatyonin mimiğinin sistin muadiline göre daha yüksek sarmal karaktere sahip olduğu ve ER α 'ya karşı daha düşük inhibisyon sabitine sahip olduğu gösterilmiştir [42]. İlerleyen çalışmalarda, PERM-3 (H-Arg-c(D-Cys-Ile-Leu-Cys)-Arg-Npg-Leu Gln-NH₂)) peptid analogu tasarlanmış ve peptidin daha yüksek afiniteye sahip olduğu ifade edilmiştir [43]. Başka bir çalışmada konjuge ettikleri PERM1 ve PERM3 peptitlerini, ER α -pozitif T47D meme kanseri hücrelerinde hücre penetrasyon verimliliğini incelemek için kullanmışlardır. Sonuçlar, R7-konjuge fragmanın, peptitlerin sarmal yapısını bozmadığını, PERM-3-R7 peptidinin ise ER α

aracılı transkripsiyonu önemli ölçüde etkileyerek ilgili *pS2* geninin mRNA ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyebildiğine dikkat çekmişlerdir [44,45]. Tez kapsamında yürüttüğümüz çalışmalar neticesinde, ER α hedefli yeni terapötik peptitleri disülfit köprüleriyle sarmal hale getirdik ve terapötik disülfit bağlı siklik peptitlerin (SPler) MCF-7 hücreleri üzerindeki etkinliğini kapsamlı bir şekilde test ettik. Tezde kullanılan SPler aktif formdaki ER α (E2 ile kompleks oluşturmuş) için özel olarak tasarlanmış olup literatürde sunulan referans peptite nazaran bağlanma enerjisi yönünden ER α 'ya daha yüksek bir ilgi ile bağlandığı gösterilmiştir (Tablo 3.4). Bu tasarım modelimizin *in siliko* verilerini destekler nitelikteki *in vitro* sonuçlarımız, E2'den yoksun ortamdaki SPlerin MCF-7 hücreleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını (Şekil 3.27A), SPlerin anti-proliferatif etkilerinin ancak optimum E2 konsantrasyonunun varlığında gözlemlendiğini göstermiştir (Şekil 3.27B). Aynı zamanda, E2 takviyesi ile uygulanan SPlerin, ER α 'yı eksprese etmeyen meme kanseri ve normal hücre hatları üzerinde herhangi bir etki göstermeyip yalnızca ER α 'yı eksprese eden MCF-7 hücreleri üzerinde antiproliferatif etki göstermesi, SPlerin hücrelerde ER α yoluyla hücre büyümesini inhibe ettiğini vurgulamıştır (Şekil 3.28). Ancak SPlerin tekli tedavi uygulamaları MCF-7 hücreleri üzerinde IC₅₀ etkisi oluşturmadığından bu SPlerin kombinasyon gruplarının (SPKlar) MCF-7 hücrelerine uygulanmasına karar verilmiştir. Sonuçlar SPKların MCF-7 hücrelerindeki büyüme inhibisyonunu açıkça göstermiştir. TPBM ile ön tedavisi yapılan MCF-7 hücrelerine uygulanan SPler canlılığı etkili bir şekilde daha da azaltırken (Şekil 3.29A), yalnızca SPKların tedavi edildiği gruplarda da önemli anti-proliferatif ve toksik etkiler gözlemlenmiştir (Şekil 3.29B). ER α ve ilişkili hücre içi hedeflerinin, SPKların IC₅₀ dozları ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde mRNA ekspresyon seviyelerinin (Şekil 3.30) ile SPKların IC₉₀ dozları ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde protein ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde aşağı regüle edildiği (Şekil 3.31), dolayısıyla SPKların ER α ve hedeflerini inhibe ettiği doğrulanmıştır. Ligand bağlı (aktive olmuş) ER α 'nın transkripsiyonunu başlattığı ilgili gen *TFF1* ekspresyonlarında tüm SPK tedavilerinde gözlemlenen düşüş, ER α aracılı hücre döngüsünün ilerlemesi ve çoğalmasında görev alan *GREB1*, *c-MYC* ve *cyclin D1* ifadelerinde belli SPK'lardaki anlamlı derecedeki azalmalar ve östrojenle aktive olmuş östrojen reseptörünün gen ifadesini düzenlediği *PI-9* ifadesinin tüm tedavi gruplarında anlamlı olarak azalması SPK'ların ER α 'ya spesifik bir inhibitör etkisi olduğunu gen düzeyinde göstergesi olmuştur (Şekil 3.30A).

Çalışmamızda seçtiğimiz önemli apoptoz belirteçlerinin mRNA ekspresyon profilinin, SPK tedavisi sonrasında MCF-7 hücrelerinde apoptozu anlamlı düzeyde indüklediği vurgulanmıştır (Şekil 3.30B). SPK tedavisinin ardından hücrelerdeki içsel apoptoz yolunun etkinliğini gösteren önemli belirteçler incelendiğinde, *p53* ve *Bax*'ın ifade seviyeleri kontrole nazaran tüm siklik peptit tedavi gruplarında önemli ölçüde arttığı, *Bcl-2*'nin ise tedavi gruplarında aşağı doğru regüle olması ve hücrelerin ölüme mi yoksa hayatta mı kalacağına işaret eden *Bax:Bcl-2* oranının kontrole nazaran tedavi gruplarındaki artışı, MCF-7 hücrelerinde içsel apoptozun uyarıldığını düşündürmüştür (Şekil 3.30B). Dışsal apoptoz başlatıcı kaspaz olarak görev yapan ve hedef proteinleri parçalayan efektör kaspazlara ileten *kaspaz 8*'in tedavi gruplarındaki anlamlı artışı, MCF-7 hücrelerinde apoptozun dışsal yolla da indüklendiğini yine aynı şekilde düşündürmüştür. *p21* ifadeleri siklik peptit tedavi grupları arasında kıyaslandığında özellikle üçlü kombinasyon tedavisinde anlamlı düzeyde bir düşüş yakalanmıştır (Şekil 3.30B). Yüksek *p21* seviyesinin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu destekleyebilmesi [343], bu açıdan da hücre büyümesini *p21* üzerinden azaltılabileceği öngörülmüştür. Gen ekspresyon düzeyindeki değişikliklerin tümü analiz edildiğinde en etkili SPK'larla ileriki çalışmalar da kullanılmak üzere seçilmiştir. Siklik peptitlerin primer olarak hedef aldığı ER α ve ilişkili yollarının yanı sıra apoptozla ilişkili önemli protein ifadelerinin analiz edildiği Western Blot'tan alınan sonuçlar, gen ekspresyon ekspresyon düzeyindeki qPCR sonuçlarımız ile örtüşmektedir (Şekil 3.31). ELISA sonuçlarımız ise bize tekli ve kombine peptit tedavilerinin MCF-7'nin nükleer ve sitoplazmik ER α 'nın etkili bir şekilde inhibe ettiğini açıkça göstermiştir (Şekil 3.32). Literatürdeki çalışmalar tarafından nükleer ER α 'nın, apoptotik genlerin baskılanması veya anti apoptotik genlerin yukarı regülasyonu ile hücrelerin hayatta kalma mekanizmasını teşvik ettiği iyi bir şekilde karakterize edilmiştir [347,348]. Bunun yanı sıra, çeşitli çalışmalar da sitoplazmik ER α 'nın çeşitli sinyal yolları sayesinde hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı [349-351], özellikle hücrenin S fazına giriş ve hücre proliferasyonu için gerekli olduğu [352], ER α fonksiyonunun bloke edilmesinin koloni oluşturma potansiyelini azalttığı [353] ve endokrin tedavisi direnciyle ilişkili olduğunu [354] göstermiştir.

ELISA analizi sonucunda görülen sitoplazmik ER α inhibisyonundaki dramatik yükselişler, MCF-7 hücrelerin siklik peptit tedavi sonrası çoğu aktif ER α 'nın sitoplazmada inhibe ederek, hücre apoptozu indüklediği ile ilişkilendirilebilir (Şekil 3.32). Buna ilaveten, peptit tedavisinin ardından MCF-7 hücrelerinin sitoplazmasında

inaktive edilen ER α 'ların nükleere geçişinin önlenmesi, buradaki inhibisyonun sitoplazmik inhibisyondan daha az olmasına neden olmuş olabilir. Buradan siklik peptitlerin hücre çekirdeğine ulaştığı, buradaki aktif ER α 'ların inhibe edilebilmesinden anlaşılrsa da, nükleer ER α inaktivasyonun sitoplazmik inhibisyona göre düşük olmasının bir sebebi de, siklik peptitlerin hücre çekirdeğine geçişinin kısıtlı olması ve bu yüzden çekirdekte lokalize olan ER α 'ya daha az etki etmiş olması da ihtimal dahilindedir. Peptit tedavisinin ardından hücrelerde meydana gelen ölüm mekanizmalarını daha iyi analiz etmek için tez çalışmamızda akış sitometrisinden faydalanılmıştır. Normal hücrelerde fosfatidilserin (PS), plazma zarının iç yüzeyinde bulunur ve hücrelerde apoptoz indüklendiği takdirde PS'nin plazma zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine translokasyonu meydana gelir. Anneksin V-FITC membranda PS'yi tanımlamada prob olarak kullanılır ve apoptotik hücrelerin sayısı membranı üzerindeki fosfatidilserine maruz kalan Anneksin V'in bağlanma yoğunluğuna bakılarak tespit edilir [344,345]. SPKların IC₉₀ dozuyla tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Anneksin-V pozitif hücre sayısının arttığı bulunmuştur (Şekil 3.33A). Bu sonuç bize hücrelerin yoğun bir şekilde peptit tedavisinden sonra apoptozun tetiklendiğini göstermiştir. Kaspaz ailesi proteinleri, klasik apoptoz yolunda anahtar araçlar olduğundan, bunların proteolitik aktivitelerinin saptanması için hücrelerdeki kaspaz-3/7 aktiviteleri incelenmiş ve tedavi sonrasında apoptotik hücre yüzdesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.33B). MCF-7 hücreleri kaspaz-3 ekspresyonuna sahip olmadığından testte görülen yalnızca artış kaspaz 7 aktivasyonuna ait olduğu kabul edilmiştir [346]. Mitokondri, memeli hücrelerinde apoptozun aktive edilmesinde anahtar rol oynar ve Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondriyal iç ve dış membran arasındaki boşluktan, sitozolde hücreleri parçalayan kaspaz proteazlarını aktive eden proteinlerin salınımını düzenler. Mitokondriyal akış sitometrisi analizi neticesinde depolarize hücre sayısındaki artış, MCF-7 hücrelerinde SPKların apoptoz arttırıcı etkisini kanıtlamıştır (Şekil 3.33C). Fosforilasyon yoluyla Bcl-2'nin inaktivasyonu, içsel apoptoz için önemli bir göstergedir ve çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz Bcl-2 defosforilizasyonunun analizi neticesinde anti-apoptotik Bcl-2'nin tedavi gruplarında kontrole kıyasla daha yüksek seviyede inaktif formda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.33D). Bcl-2 inaktivasyonundaki bu artış, apoptozun mitokondri aracılı yoluyla gerçekleştiğini göstererek diğer akış sitometrisi sonuçları ile birlikte Bcl-2 ailesi proteinlerinin mitokondri aracılı apoptozu düzenlediği kanıtlanmıştır.

Sonuçta bu tez kapsamında elde edilen tüm veriler dikkate alındığında, ER α -kofaktör bağlanma bölgesindeki LxxLL imza motifine spesifik olarak geliştirdiğimiz yeni terapötik siklik peptitlerin, MCF-7 hücrelerindeki ER α transkripsiyon faktör aktivasyonunu engellediğine ve hücrelerdeki apoptoz yolunun aktive edildiğine dair değerli kanıtları sunulmuştur.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

ER α 'nın koaktivatör bağlanmalarının protein-protein etkileşim düzeyinde engelleyen kısıtılmış peptitler yapısal olarak stabilize olduğundan, hücre membranından kolaylıkla geçer ve ER α 'nın doğrudan inhibisyonunu sağlar. Bu yaklaşım, ER α (+) gibi meme ve over kanserleriyle mücadele için yeni ve umut verici bir tedavi stratejidir. Bu tez çalışmamız, LxxLL imza motifine bağlanan, disülfid bağlı siklik peptit türevlerinin reseptör inhibisyonuna olan etkilerini ER α ifadesi yüksek kanser hücre hatları üzerindeki biyoaktivite incelemelerini sunmaktadır. Tez kapsamında geliştirdiğimiz LxxLL motifine özgü disülfid bağlı siklik peptitler literatürde sunulan referans siklik peptitten daha düşük bir bağlanma enerjisi göstererek ER α 'ya daha spesifik ve daha düşük bir bağlanma sabiti ile bağlandığı bulunmuştur. Yeni dizayn edilen siklik peptitlerimiz (SP2 ve SP3) ile referans siklik peptit (SP1) ilk defa DEAD siklizasyonu ile elde edilerek literatüre katkı sağlanmıştır. Tezde kullanılan tüm siklik peptitler (SPler) *in vitro* çalışmalarımızda sadece E2 varlığında aktivite göstermiş, bu da aktif forma geçen ER α üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. İlerleyen *in vitro* çalışmalarımızda SPlerin sadece ER α 'yı ifade eden hücre hatlarında etkili olduğu, ER α ifadesi düşük olan hücre hatlarında herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlendi. Bu durum SPler'in aktif ER α 'ya spesifik olarak bağlanarak etki gösterdiğini, peptitlerimizin güçlü bir inhibitör aday olabileceği gösterdi. Ayrıca oluşturulan peptit kombinasyonların (SPKlar) hücre hatları üzerinde anti-proliferatif ve toksik etki gösterdiği ATP testi ile belirtilmiştir. Hücre inhibisyonunda en etkili SPKların ER α ile ilişki hedeflerinde ve önemli apoptoz belirteçleri üzerindeki etkisi hem gen ve hem protein bazında açığa çıkarılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarda ER α 'yı ve ER α 'nın hedef genlerinin ekspresyonunu düşürdüğünü, apoptoz mekanizmasındaki önemli belirteçlerin ise apoptozu indükleyecek düzeyde değiştiği bulunmuştur. Elde edilen veriler siklik peptitlerimizin apoptoz yolunu hem intrinsik (iç) yolak ve hem de dış uyaranlar ile tetiklenen ekstrinsik (dış) yolaklarca uyardığı yönündedir. İlk olarak *p53* hücre stresin önemli bir belirteçidir ve içsel yolun kritik bir aktivatörü olduğundan siklik peptit tedavi sonrası hücrelerde *p53* ekspresyonu anlamlı düzeyde artışı

saptanmıştır. Ayrıca, elde ettiğimiz qPCR sonuçlarında, peptit tedavisinden sonra hücrelerde *kaspaz-8* seviyelerindeki artışa dikkat çekilmiştir. Yapılan akış analizleri ile bu sonuçlar doğrulanmış etkili SPKların MCF-7 hücrelerinde yoğun olarak erken ve geç dönem apoptoza neden olduğunu göstermiştir. Diğer yandan qPCR sonuçlarında ve akış sitometrisi verilerinden anlaşılacağı üzere pro-apoptotik *Bax* ekspresyonunun tedavi gruplarında artması ile anti-apoptotik *Bcl-2*'nin aşağıya doğru düzenlenmesinin yanında mitokondriyel membran bütünlüğünün bozulması hücrelerin apoptozunda içsel yolağın rol oynadığının güçlü göstergesi olmuştur. Gerçekleştirilen ELISA analizi neticesinde, hücrelerdeki sitoplazmik ve nükleer ER α inaktivasyonunun peptit tedavisinden sonra anlamlı düzeyde artması, tedavi grubundaki hücrelerin ER α transkripsiyon aktivasyonunun önemli ölçüde engellendiği saptanmıştır. Özellikle hastalıkların direnç mekanizmasıyla ve kanser hücrelerin progresyonu ile ilişkilendirilen sitoplazmik ER α aktivasyonunun inhibe edildiği sonucuna varılmıştır. Nükleer ER α 'nın sitoplazmik ER α kadar inaktive olmamasının sebebi de dizayn edilen peptitlerin hücre zarından kolaylıkla geçip hücre çekirdeğinden yeteri kadar geçememesi olabilir. Bunun için de farklı modifikasyonlarla peptit motifinin iyileştirilerek hücre çekirdeğinden geçişi kolaylaştıracak tasarımlar öne sürülebilir. Tez çalışması sonucunda, bu yeni ER α hedefli SP'lerin sadece ER α (+) MCF-7 hücrelerine karşı inhibitör aktivite göstermesi ve apoptozu uyarması, SP'lerin mevcut klinik tedavilere alternatif veya yeni peptit kombinasyon tedavilerinin oluşturulmasına aday bir yaklaşım olabileceğini göstermiştir. İleriki çalışmalarla kombinasyon peptit tedavilerinin moleküler mekanizmasının daha iyi aydınlatılabileceği gibi, tekli siklik peptit tedavilerin hücre içi etkinliğini daha da arttırabilmek için yeni siklizasyon yöntemlerinden veya taşıyıcı sistemlerden faydalanılabilmesi muhtemeldir. İleriki çalışmalarda, SP'lerin sitoplazmik ER α 'nın inhibisyonunda daha etkin olduğu göz önünde bulundurulduğunda, özellikle ER α (+) hücrelerindeki sitoplazmik ER α 'nın kofaktör inhibitörlerine karşı oluşturdukları yanıtlarının hücre proliferasyonuna ve ölüm mekanizmalarını nasıl etkilediği daha ayrıntılı bir şekilde incelenip aydınlatılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Faltas, C. L., LeBron, K. A. & Holz, M. K.** (2020). Unconventional estrogen signaling in health and disease. *Endocrinology* 161, 161(4).
- [2] **Tang, F., Chu, L., Shu, W., He, X., Wang, L., & Lu, M.** (2019). Selection and validation of reference genes for quantitative expression analysis of miRNAs and mRNAs in Poplar. *Plant Methods*, 15(1).
- [3] **Langdon, S. P., Herrington, C. S., Hollis, R. L. & Gourley, C.** (2020). Estrogen signaling and its potential as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancers* 12, 1647
- [4] **Langdon, S., Hawkes, M., Lawrie, S., Hawkins, R., Tesdale, A., Crew, A., Miller, W., & Smyth, J.** (1990). Oestrogen receptor expression and the effects of oestrogen and tamoxifen on the growth of human ovarian carcinoma cell lines. *British Journal of Cancer*, 62(2), 213–216.
- [5] **Langdon, S., Hirst, G., Miller, E., Hawkins, R., Tesdale, A., Smyth, J., & Miller, W.** (1994). The regulation of growth and protein expression by estrogen *in vitro*: A study of 8 human ovarian carcinoma cell lines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 50, 131-135.
- [6] **Langdon, S. P., Ritchie, A., Young, K., Crew, A. J., Smyth, J. F., Miller, W. R., Sweeting, V., Bramley, T., Hillier, S., Hawkins, R. A., & Tesdale, A. L.** (1993). Contrasting effects of 17 β -estradiol on the growth of human ovarian carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *International journal of cancer* 55, 459-464.
- [7] **Park, S.-H., Cheung, L. W. T., Wong, A. S. T. & Leung, P. C. K.** (2008). Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor α . *Molecular endocrinology* 22, 2085-2098
- [8] **Clinton, G. M., Rougeot, C., Derancourt, J., Roger, P., Defrenne, A., Godyna, S., Argraves, W. S., & Rochefort, H.** (1996). Estrogens increase the expression of fibulin-1, an extracellular matrix protein secreted by human ovarian cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 316-320.
- [9] **Moll, F., Katsaros, D., Lazennec, G., Hellio, N., Roger, P., Giacalone, P., Chalbos, D., Maudelonde, T., Rochefort, H., & Pujol, P.** (2002). Estrogen induction and overexpression of fibulin-1C mRNA in ovarian cancer cells. *Oncogene* 21, 1097-1107.
- [10] **Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Musti, A. M., Ando, S., & Maggiolini, M.** (2007). G Protein–Coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 β -Estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer research* 67, 1859-1866.
- [11] **Chen, P., Li, B. & Ou-Yang, L.** (2022). Role of estrogen receptors in health and disease. *Frontiers in endocrinology* 13, 839005

- [12] Nilsson, S., & Koehler, K. F. (2005). Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: Molecular and Cellular Pharmacology. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 96, 15-25.
- [13] Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J., & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
- [14] Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The structural basis of Estrogen Receptor/Coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937.
- [15] Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Cancer* 9, 631-643.
- [16] Wang, L. H., Yang, X. Y., Zhang, X., An, P., Kim, H., Huang, J., Clarke, R., Osborne, C. K., Inman, J. K., Appella, E., & Farrar, W. L. (2006). Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer cell* 10, 487-499.
- [17] Mao, C., Patterson, N. M., Cherian, M. T., Aninye, I. O., Zhang, C., Montoya, J. B., Cheng, J., Putt, K. S., Hergenrother, P. J., Wilson, E. M., Nardulli, A. M., Nordeen, S. K., & Shapiro, D. J. (2008). A New Small Molecule Inhibitor of Estrogen Receptor α Binding to Estrogen Response Elements Blocks Estrogen-dependent Growth of Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 283, 12819-12830.
- [18] Shanle, E. K. & Xu, W. (2010). Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews* 62, 1265-1276
- [19] Tomkins, J. E. & Manzoni, C. (2021). Advances in protein-protein interaction network analysis for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 155, 105395
- [20] Bonetta, L. (2010). Interactome under construction. *Nature* 468, 851-852.
- [21] Vidal, M., Cusick, M. E. & Barabási, A.-L. (2011). Interactome networks and human disease. *Cell* 144, 986-998.
- [22] Hill, T. A., Shepherd, N. E., Diness, F. & Fairlie, D. P. (2014). Constraining cyclic peptides to mimic protein structure motifs. *Angewandte Chemie International Edition* 53, 13020-13041.
- [23] Nevola, L. & Giralt, E. (2015). Modulating protein–protein interactions: the potential of peptides. *Chemical Communications* 51, 3302-3315.
- [24] Drucker, D. J. (2020). Advances in oral peptide therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 19, 277-289.
- [25] London, N., Raveh, B., Movshovitz-Attias, D. & Schueler-Furman, O. (2010). Can self-inhibitory peptides be derived from the interfaces of globular protein–protein interactions? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78, 3140-3149.
- [26] Cukuroglu, E., Engin, H. B., Gursoy, A. & Keskin, O. (2014). Hot spots in protein–protein interfaces: Towards drug discovery. *Progress in biophysics and molecular biology* 116, 165-173.
- [27] Geppert, T., Hoy, B., Wessler, S. & Schneider, G. (2011). Context-based identification of protein-protein interfaces and “hot-spot” residues. *Chemistry & biology* 18, 344-353.

- [28] Villar, E. A., Beglov, D., Chennamadhavuni, S., Porco, J. A., Kozakov, D., Vajda, S., & Whitty, A. (2014). How proteins bind macrocycles. *Nature chemical biology* 10, 723-731.
- [29] Wójcik, P. & Berlicki, Ł. (2016). Peptide-based inhibitors of protein–protein interactions. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 26, 707-713.
- [30] Craik, D. J. & Du, J. (2017). Cyclotides as drug design scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* 38, 8-16.
- [31] Sanner, M. F., Zoghebi, K., Hanna, S., Mozaffari, S., Rahighi, S., Tiwari, R. K., & Parang, K. (2021). Cyclic peptides as protein kinase Inhibitors: Structure–Activity relationship and Molecular Modeling. *Journal of chemical information and modeling* 61, 3015-3026.
- [32] Jing, X. & Jin, K. (2020). A gold mine for drug discovery: Strategies to develop cyclic peptides into therapies. *Medicinal research reviews* 40, 753-810
- [33] Zorzi, A., Deyle, K. & Heinis, C. (2017). Cyclic peptide therapeutics: past, present and future. *Current opinion in chemical biology* 38, 24-29.
- [34] Kemp, D. S. & Galakatos, N. G. (1986). Peptide synthesis by prior thiol capture. 1. A convenient synthesis of 4-hydroxy-6-mercaptodibenzofuran and novel solid-phase synthesis of peptide-derived 4-(acyloxy)-6-mercaptodibenzofurans. *The Journal of Organic Chemistry* 51, 1821-1829.
- [35] Taguchi, A., Kobayashi, K., Cui, Y., Takayama, K., Taniguchi, A., & Hayashi, Y. (2019). Disulfide-Driven Cyclic Peptide Synthesis of Human Endothelin-2 with a Solid-Supported Npys-Cl. *The Journal of Organic Chemistry* 85, 1495-1503.
- [36] Qin, W., Xie, M., Qin, X., Fang, Q., Yin, F., & Li, Z. (2018). Recent advances in peptidomimetics antagonists targeting estrogen receptor α -coactivator interaction in cancer therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28, 2827-2836.
- [37] Verdine, G. L., & Hilinski, G. J. (2012). Stapled peptides for intracellular drug targets. In *Methods in enzymology* (Vol. 503, pp. 3-33). Academic Press.
- [38] Skowron, K. J., Booker, K., Cheng, C., Creed, S., David, B. P., Lazzara, P. R., Lian, A., Siddiqui, Z., Speltz, T. E., & Moore, T. W. (2019). Steroid receptor/coactivator binding inhibitors: An update. *Molecular and cellular endocrinology* 493, 110471.
- [39] Schteingart, C. D., & Lau, J. L. (2017). From natural peptides to market. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (Vol. 50, pp. 543-586). Academic Press.
- [40] Johnson, M., Liu, M., Struble, E. & Hettiarachchi, K. (2015). Characterization of cyclic peptides containing disulfide bonds. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 109, 112-120.
- [41] Leduc, A., Trent, J. O., Wittliff, J. L., Bramlett, K., Briggs, S. L., Chirgadze, N., Wang, Y., Burris, T. P., & Spatola, A. F. (2003). Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor–coactivator interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 11273-11278.
- [42] Galande, A. K., Bramlett, K. S., Burris, T. P., Wittliff, J. L. & Spatola, A. F. (2004). Thioether side chain cyclization for helical peptide formation: inhibitors of estrogen receptor–coactivator interactions. *The Journal of peptide research* 63, 297-302.

- [43] Galande, A. K., Bramlett, K., Trent, J. O., Burris, T. P., Wittliff, J. L., & Spatola, A. F. (2005). Potent inhibitors of LxxLL-Based Protein–Protein interactions. *ChemBioChem* 6, 1991-1998.
- [44] Nagakubo, T., Demizu, Y., Kanda, Y., Misawa, T., Shoda, T., Okuhira, K., Sekino, Y., Naito, M., & Kurihara, M. (2014). Development of Cell-Penetrating R7 Fragment-Conjugated helical peptides as inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription. *Bioconjugate Chemistry* 25, 1921-1924.
- [45] Demizu, Y., Misawa, T., Nagakubo, T., Kanda, Y., Okuhira, K., Sekino, Y., Naito, M., & Kurihara, M. (2015). Structural development of stabilized helical peptides as inhibitors of estrogen receptor (ER)-mediated transcription. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23, 4132-4138.
- [46] Fuentes, N. & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology* 116, 135-170.
- [47] Callard, G., Tarrant, A., Novillo, A., Yacci, P., Ciaccia, L., Vajda, S., Chuang, G., Kozakov, D., Greytak, S., Sawyer, S., Hoover, C., & Cotter, K. (2011). Evolutionary origins of the estrogen signaling system: Insights from amphioxus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 127, 176-188.
- [48] Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 5925-5930.
- [49] Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J. & Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632.
- [50] Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. & Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630.
- [51] Schwabe, J. W. R. & Teichmann, S. A. (2004). Nuclear receptors: the evolution of diversity. *Science's STKE* 2004(217).
- [52] Scheidereit, C., Krauter, P., Von Der Ahe, D., Janich, S., Rabenau, O., Cato, A., Suske, G., Westphal, H., & Beato, M. (1986). Mechanism of gene regulation by steroid hormones. *Journal of steroid biochemistry* 24, 19-24.
- [53] Truss, M. & Beato, M. (1993). Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine reviews* 14, 459-479.
- [54] Kumar, K. K., Burgess, A. W. & Gulbis, J. M. (2014). Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells. *Protein Science* 23, 551-565.
- [55] Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., & Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477-487.
- [56] Kumar, R., Zakharov, M. N., Khan, S. H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., & Jasuja, R. (2011). The dynamic structure of the estrogen receptor. *Journal of amino acids* 2011, 1–7.
- [57] Jia, M., Dahlman-Wright, K. & Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 29, 557-568.
- [58] Hager, G. L., Lim, C. S., Elbi, C. & Baumann, C. T. (2000). Trafficking of nuclear receptors in living cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74, 249-254.

- [59] **Evinger Iii, A. J. & Levin, E. R.** (2005). Requirements for estrogen receptor α membrane localization and function. *Steroids* 70, 361-363.
- [60] **Burris, T. P., Solt, L. A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., Lundasen, T., Hughes, T., & Kojetin, D. J.** (2013). Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacological reviews* 65, 710-778.
- [61] **Nelson, E. R., Wardell, S. E. & McDonnell, D. P.** (2013). The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols: implications for the treatment and prevention of osteoporosis. *Bone* 53, 42-50.
- [62] **Smith, C. L. & O'malley, B. W.** (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocrine reviews* 25, 45-71.
- [63] **Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G., & Gustafsson, J.** (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacological reviews* 58, 773-781.
- [64] **McKenna, N. J., Lanz, R. B. & O'Malley, B. W.** (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews* 20, 321-344.
- [65] **Klinge, C. M.** (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-251.
- [66] **Tremblay, G. B. & Giguere, V.** (2002). Coregulators of estrogen receptor action. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 12(1).
- [67] **Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. & Parker, M. G.** (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.
- [68] **Chang, E. C., Frasor, J., Komm, B. & Katzenellenbogen, B. S.** (2006). Impact of estrogen receptor β on gene networks regulated by estrogen receptor α in breast cancer cells. *Endocrinology* 147, 4831-4842.
- [69] **Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A. & Minutolo, F.** (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 90, 13-29.
- [70] **Rudolph, A., Toth, C., Hoffmeister, M., Roth, W., Herpel, E., Jansen, L., Marx, A., Brenner, H., & Chang-Claude, J.** (2012). Expression of oestrogen receptor β and prognosis of colorectal cancer. *British journal of cancer* 107, 831-839.
- [71] **P Pinton, G., Thomas, W., Bellini, P., Manente, A. G., Favoni, R. E., Harvey, B. J., Mutti, L., & Moro, L.** (2010). Estrogen Receptor β Exerts Tumor Repressive Functions in Human Malignant Pleural Mesothelioma via EGFR Inactivation and Affects Response to Gefitinib. *PloS one* 5, e14110.
- [72] **Stettner, M., Kaulfuß, S., Burfeind, P., Schweyer, S., Strauss, A., Ringert, R., & Thelen, P.** (2007). The relevance of estrogen receptor- β expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 2626-2633.
- [73] **Harris, H. A., Albert, L. M., Leathurby, Y., Malamas, M. S., Mewshaw, R. E., Miller, C. P., Kharode, Y. P., Marzolf, J., Komm, B. S., Winneker, R. C., Frail, D. E., Henderson, R. A., Zhu, Y., & Keith, J. C.** (2003).

- Evaluation of an estrogen receptor-B agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 144, 4241-4249.
- [74] **Vandenput, L. & Ohlsson, C.** (2009). Estrogens as regulators of bone health in men. *Nature Reviews Endocrinology* 5, 437-443.
- [75] **Sudhir, K. & Komesaroff, P. A.** (1999). Cardiovascular actions of estrogens in men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84, 3411-3415.
- [76] **Komesaroff, P. A., Sudhir, K. & Esler, M. D.** (1999). Effects of estrogen on stress responses in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84, 4292-4296.
- [77] **Farooq, A.** (2015). Structural and functional diversity of estrogen receptor ligands. *Current topics in medicinal chemistry* 15, 1372-1384.
- [78] **Turner, J. V., Agatonovic-Kustrin, S. & Glass, B. D.** (2007). Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. *Journal of pharmaceutical sciences* 96, 1879-1885.
- [79] **Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., Van Der Saag, P. T., Van Der Burg, B., & Gustafsson, J. A.** (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- [80] **Mersereau, J. E., Levy, N., Staub, R. E., Baggett, S., Zogric, T., Chow, S., Ricke, W. A., Tagliaferri, M., Cohen, I., Bjeldanes, L. F., & Leitman, D. C.** (2008). Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor β agonist. *Molecular and cellular endocrinology* 283, 49-57.
- [81] **Reddy, V., McCarthy, M. & Raval, A. P.** (2022). Xenoestrogens impact brain estrogen receptor signaling during the female lifespan: A precursor to neurological disease? *Neurobiology of disease* 163, 105596.
- [82] **Oyelowo, T.** (2007). *Mosby's Guide to Women's Health: A Handbook for Health Professionals*. Elsevier Health Sciences.
- [83] **Gustafsson, K. L., Movérare-Skrtic, S., Farman, H. H., Engdahl, C., Henning, P., Nilsson, K. H., Scheffler, J. M., Sehic, E., Islander, U., Levin, E., Ohlsson, C., & Lagerquist, M. K.** (2022). A tissue-specific role of membrane-initiated ER α signaling for the effects of SERMs. *Journal of Endocrinology* 253, 75-84.
- [84] **Tripathi, K. D.** (1994). *Essentials of medical pharmacology*.
- [85] **Katzenellenbogen, J. A., Mayne, C. G., Katzenellenbogen, B. S., Greene, G. L. & Chandarlapaty, S.** (2018). Structural underpinnings of oestrogen receptor mutations in endocrine therapy resistance. *Nature Reviews Cancer* 18, 377-388.
- [86] **Schulman, I. G. & Heyman, R. A.** (2004). The flip side: Identifying small molecule regulators of nuclear receptors. *Chemistry & biology* 11, 639-646.
- [87] **Y Maximov, P., M Lee, T. & Craig Jordan, V.** (2013). The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Current clinical pharmacology* 8, 135-155.
- [88] **Dayan, G., Lupien, M., Auger, A., Anghel, S. I., Rocha, W., Croisetièrre, S., Katzenellenbogen, J. A., & Mader, S.** (2006). Tamoxifen and Raloxifene Differ in Their Functional Interactions with Aspartate 351 of Estrogen Receptor α . *Molecular pharmacology* 70, 579-588.
- [89] **Li, F., Dou, J., Wei, L., Li, S. & Liu, J.** (2016). The selective estrogen receptor modulators in breast cancer prevention. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 77, 895-903.

- [90] **Gottardis, M. M., Robinson, S. P., Satyaswaroop, P. G. & Jordan, V. C.** (1988). Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer research* 48, 812-815.
- [91] **Ascenzi, P., Bocedi, A. & Marino, M.** (2006). Structure–function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Molecular aspects of medicine* 27, 299-402.
- [92] **Sawaki, M., Wada, M., Sato, Y., Mizuno, Y., Kobayashi, H., Yokoi, K., Yoshihara, M., Kamei, K., Ohno, M., & Imai, T.** (2011). High-dose toremifene as first-line treatment of metastatic breast cancer resistant to adjuvant aromatase inhibitor: a multicenter phase II study. *Oncology Letters* 3, 61-65.
- [93] **Das, S., Kulkarni, S., Singh, Y., Kumar, P. & Thareja, S.** (2022). Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) for the treatment of ER+ breast cancer: An overview. *Journal of Molecular Structure* 1270, 133853.
- [94] **Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J.** (2007). Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiological reviews* 87, 905-931.
- [95] **Bourguet, W., Germain, P. & Gronemeyer, H.** (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in pharmacological sciences* 21, 381-388.
- [96] **Heldring, N., Pawson, T., McDonnell, D., Treuter, E., Gustafsson, J., & Pike, A. C.** (2007). Structural Insights into Corepressor Recognition by Antagonist-bound Estrogen Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 282, 10449-10455.
- [97] **Gaudet, H. M., Christensen, E., Conn, B., Morrow, S., Cressey, L., & Benoit, J.** (2018). Methylmercury promotes breast cancer cell proliferation. *Toxicology reports* 5, 579-584.
- [98] **Pike, A. C. W., Brzozowski, A. M. & Hubbard, R. E.** (2000). A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74, 261-268.
- [99] **Jordan, V. C., Collins, M. M., Rowsby, L. & Prestwich, G.** (1977). A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *Journal of Endocrinology* 75, 305-316.
- [100] **Karnezis, A. N., Cho, K. R., Gilks, C. B., Pearce, C. L. & Huntsman, D. G.** (2017). The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies. *Nature Reviews Cancer* 17, 65-74.
- [101] **van Hoorn, W. P.** (2002). Identification of a second binding site in the estrogen receptor. *Journal of medicinal chemistry* 45, 584-589.
- [102] **O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K. & Hansen, U.** (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular endocrinology* 18, 1859-1875.
- [103] **Marino, M., Galluzzo, P. & Ascenzi, P.** (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current genomics* 7, 497-508.
- [104] **O'Malley, B. W.** (2005). A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. *Molecular Endocrinology* 19, 1402-1411.
- [105] **Le Dily, F. & Beato, M.** (2018). Signaling by steroid hormones in the 3D nuclear space. *International journal of molecular sciences* 19, 306.

- [106] **Prossnitz, E. R. & Barton, M.** (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology* 7, 715-726.
- [107] **Wehling, M.** (1994). Nongenomic actions of steroid hormones. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 5, 347-353.
- [108] **Marino, M., Pallottini, V. & Trentalance, A.** (1998). Estrogens cause rapid activation of IP3-PKC- α signal transduction pathway in HEPG2 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 245, 254-258.
- [109] **Garcia Dos Santos, E., Dieudonne, M. N., Pecquery, R., Le Moal, V., Giudicelli, Y., & Lacasa, D.** (2002). Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology* 143, 930-940.
- [110] **Watters, J. J., Campbell, J. S., Cunningham, M. J., Krebs, E. G. & Dorsa, D. M.** (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138, 4030-4033.
- [111] **Marino, M., Acconcia, F. & Trentalance, A.** (2003). Biphasic estradiol-induced AKT phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells. *Molecular biology of the cell* 14, 2583-2591.
- [112] **Meyer, M. R., Haas, E., Prossnitz, E. R. & Barton, M.** (2009). Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Molecular and cellular endocrinology* 308, 9-16.
- [113] **Björnström, L. & Sjöberg, M.** (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology* 19, 833-842
- [114] **Silva, E., Kabil, A. & Kortenkamp, A.** (2010). Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways—distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicology and applied pharmacology* 245, 160-170.
- [115] **Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S. & Marc, J.** (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochimica medica* 24, 329-342.
- [116] **Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Marsico, S., Panno, M. L., Cenni, B., Picard, D., & Andò, S.** (2001). Estrogen receptor α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Molecular pharmacology* 60, 595-602.
- [117] **Ewan, K. B., Oketch-Rabah, H. A., Ravani, S. A., Shyamala, G., Moses, H. L., & Barcellos-Hoff, M. H.** (2005). Proliferation of estrogen receptor- α -positive mammary epithelial cells is restrained by transforming growth factor- β 1 in adult mice. *The American journal of pathology* 167, 409-417.
- [118] **Sun, P., Gao, M., Wei, L., Mustea, A., Wang, J., Könsgen, D., Lichtenegger, W., & Sehoul, J.** (2006). An estrogen receptor α -dependent regulation of estrogen receptor β -related receptor β in the proliferation of endometrial carcinoma cells. *International journal of gynecological cancer* 16, 564-568.
- [119] **Teng, J., Wang, Z.-Y., Jarrard, D. F. & Bjorling, D. E.** (2008). Roles of estrogen receptor α and β in modulating urothelial cell proliferation. *Endocrine-related cancer* 15, 351.
- [120] **Ström, A., Hartman, J., Foster, J. S., Kietz, S., Wimalasena, J., & Gustafsson, J.** (2004). Estrogen receptor β inhibits 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 1566-1571.

- [121] **Pravettoni, A., Mornati, O., Martini, P., Marino, M., Colciago, A., Celotti, F., Motta, M., & Negri-Cesi, P.** (2007). Estrogen receptor beta (ERbeta) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: Studies on the possible mechanism of action in DU145 cells. *Molecular and cellular endocrinology* 263, 46-54.
- [122] **Dey, P., Jonsson, P., Hartman, J., Williams, C., Ström, A., & Gustafsson, J.** (2012). Estrogen Receptors β 1 and β 2 Have Opposing Roles in Regulating Proliferation and Bone Metastasis Genes in the Prostate Cancer Cell Line PC3. *Molecular endocrinology* 26, 1991-2003.
- [123] **Hartman, J., Edvardsson, K., Lindberg, K., Zhao, C., Williams, C., Ström, A., & Gustafsson, J.** (2009). Tumor Repressive Functions of Estrogen Receptor β in SW480 Colon Cancer Cells. *Cancer research* 69, 6100-6106.
- [124] **Bielecki, A., Roberts, J., Mehta, R. & Raju, J.** (2011). Estrogen receptor- β mediates the inhibition of DLD-1 human colon adenocarcinoma cells by soy isoflavones. *Nutrition and cancer* 63, 139-150.
- [125] **Barros, R. P. A. & Gustafsson, J.-Å.** (2011). Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell metabolism* 14, 289-299.
- [126] **Pearce, S. T. & Jordan, V. C.** (2004). The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 50, 3-22.
- [127] **Couse, J. F. & Korach, K. S.** (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine reviews* 20, 358-417.
- [128] **Saji, S., Jensen, E. V., Nilsson, S., Rylander, T., Warner, M., & Gustafsson, J.** (2000). Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland. *Breast Cancer Research* 2, 1-1.
- [129] **Cheng, G., Butler, R., Warner, M., Gustafsson, J., Wilczek, B., & Landgren, B.** (2013). Effects of short-term estradiol and norethindrone acetate treatment on the breasts of normal postmenopausal women. *Menopause* 20, 496-503.
- [130] **Speirs, V., Skliris, G. P., Burdall, S. E. & Carder, P. J.** (2002). Distinct expression patterns of ER α and ER β in normal human mammary gland. *Journal of clinical pathology* 55, 371-374.
- [131] **Li, S., Han, B., Liu, G., Li, S., Ouellet, J., Labrie, F., & Pelletier, G.** (2009). Immunocytochemical localization of sex steroid hormone receptors in normal human mammary gland. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 58, 509-515.
- [132] **Förster, C., Mäkela, S., Wärri, A., Kietz, S., Becker, D., Hultenby, K., Warner, M., & Gustafsson, J.** (2002). Involvement of estrogen receptor β in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15578-15583.
- [133] **Omoto, Y., Imamov, O., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å.** (2005). Estrogen receptor α and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 1484-1489.
- [134] **Prins, G. S. & Birch, L.** (1997). Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* 138, 1801-1809.
- [135] **Tsurusaki, T., Aoki, D., Kanetake, H., Inoue, S., Muramatsu, M., Hishikawa, Y., & Koji, T.** (2003). Zone-Dependent Expression of Estrogen Receptors α and β in Human Benign Prostatic Hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 1333-1340.

- [136] **Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S. & Salehiniya, H.** (2019). Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *International journal of women's health*, 287-299.
- [137] **Siegel, R. L., Giaquinto, A. N. & Jemal, A.** (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: a cancer journal for clinicians* 74, 12-49.
- [138] **Chu, S., Mamers, P., Burger, H. G. & Fuller, P. J.** (2000). Estrogen receptor isoform gene expression in ovarian stromal and epithelial tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85, 1200-1205.
- [139] **Langdon, S., Crew, A., Ritchie, A., Muir, M., Wakeling, A., Smyth, J., & Miller, W.** (1994). Growth inhibition of oestrogen receptor-positive human ovarian carcinoma by anti-oestrogens *in vitro* and in a xenograft model. *European Journal of Cancer* 30, 682-686.
- [140] **O'Donnell, A. J. M., Macleod, K. G., Burns, D. J., Smyth, J. F. & Langdon, S. P.** (2005). Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-related cancer* 12, 851-866.
- [141] **Chan, K. K., Leung, T. H., Chan, D. W., Wei, N., Lau, G. T., Liu, S. S., Siu, M. K., & Ngan, H. Y.** (2014). Targeting estrogen receptor subtypes (ER α and ER β) with selective ER modulators in ovarian cancer. *J. Endocrinol* 221, 325-336.
- [142] **Zhu, C. X., Xiong, W., Wang, M. L., Yang, J., Shi, H. J., Chen, H. Q., & Niu, G.** (2018). Nuclear G protein-coupled oestrogen receptor (GPR30) predicts poor survival in patients with ovarian cancer. *Journal of International Medical Research* 46, 723-731.
- [143] **Syed, V., Ulinski, G., Mok, S. C., Yiu, G. K. & Ho, S.-M.** (2001). Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer research* 61, 6768-6776.
- [144] **Nash, J. D., Ozols, R. F., Smyth, J. F. & Hamilton, T. C.** (1989). Estrogen and anti-estrogen effects on the growth of human epithelial ovarian cancer *in vitro*. *Obstetrics & Gynecology* 73, 1009-1016
- [145] **Jäger, W., Sauerbrei, W., Beck, E., Maassen, V., Stumpfe, M., Meier, W. & Jänicke, F.** (1995). Unbound MEDLINE A randomized comparison of triptorelin and tamoxifen as treatment of progressive ovarian cancer. *In: Anticancer Research* 15 (1995) 6B, 2639-2642, 2639-2642.
- [146] **Hatch, K. D., Beecham, J. B., Blessing, J. A. & Creasman, W. T.** (1991). Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. A gynecologic oncology group study of second-line therapy in 105 patients. *Cancer* 68, 269-271.
- [147] **Hankinson, S. E., Colditz, G. A. & Willett, W. C.** (2004). Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Research* 6, 1-6.
- [148] **Love, R. R. & Philips, J.** (2002). Oophorectomy for breast cancer: history revisited. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 1433-1434.
- [149] **Darbre, P. D. & Charles, A. K.** (2010). Environmental oestrogens and breast cancer: evidence for combined involvement of dietary, household and cosmetic xenoestrogens. *Anticancer Research* 30, 815-827.
- [150] **Fernandez, S. V. & Russo, J.** (2010). Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicologic pathology* 38, 110-122.

- [151] **Njiaju, U. O. & Olopade, O. I.** (2012). Genetic determinants of breast cancer risk: a review of current literature and issues pertaining to clinical application. *The breast journal* 18, 436-442.
- [152] **Mills, J. N., Rutkovsky, A. C. & Giordano, A.** (2018). Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Current opinion in pharmacology* 41, 59-65.
- [153] **Ali, S., Rasool, M., Chaoudhry, H., Pushparaj, P. N., Jha, P., Hafiz, A., Mahfooz, M., Sami, G. A., Kamal, M. A., Bashir, S., Ali, A., & Jamal, M. S.** (2016). Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation* 12, 135.
- [154] **Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C. & Vignon, F.** (2001). ER β inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 142, 4120-4130.
- [155] **Butt, A. J., McNeil, C. M., Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L.** (2005). Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocrine-related cancer* 12, S47-S59.
- [156] **Nehra, R., Riggins, R. B., Shajahan, A. N., Zwart, A., Crawford, A. C., & Clarke, R.** (2010). BCL2 and CASP8 regulation by NF- κ B differentially affect mitochondrial function and cell fate in antiestrogen-sensitive and-resistant breast cancer cells. *The FASEB Journal* 24, 2040.
- [157] **Lattrich, C., Stegerer, A., Häring, J., Schöler, S., Ortmann, O., & Treeck, O.** (2013). Estrogen receptor β agonists affect growth and gene expression of human breast cancer cell lines. *Steroids* 78, 195-202.
- [158] **Lau, K.-M., LaSpina, M., Long, J. & Ho, S.-M.** (2000). Expression of estrogen receptor (ER)- α and ER- β in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer research* 60, 3175-3182.
- [159] **Leav, I., Lau, K., Adams, J. Y., McNeal, J. E., Taplin, M., Wang, J., Singh, H., & Ho, S.** (2001). Comparative studies of the estrogen receptors β and α and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *The American journal of pathology* 159, 79-92.
- [160] **Royuela, M., De Miguel, M., Bethencourt, Sanchez-Chapado, M., Fraile, B., Arenas, M., & Paniagua, R.** (2001). Estrogen receptors alpha and beta in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *Journal of endocrinology* 168, 447-454.
- [161] **Ricke, W. A., McPherson, S. J., Bianco, J. J., Cunha, G. R., Wang, Y., & Risbridger, G. P.** (2007). Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *The FASEB journal* 22, 1512-1520.
- [162] **Weihua, Z., Lathe, R., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å.** (2002). An endocrine pathway in the prostate, ER β , AR, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13589-13594.
- [163] **Bardin, A., Boulle, N., Lazennec, G., Vignon, F. & Pujol, P.** (2004). Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-related cancer* 11, 537-551.
- [164] **Ślusarz, A., Jackson, G. A., Day, J. K., Shenouda, N. S., Bogener, J. L., Browning, J. D., Fritsche, K. L., MacDonald, R. S., Besch-Williford, C. L.,**

- & Lubahn, D. B.** (2012). Aggressive prostate cancer is prevented in ER α KO mice and stimulated in ER β KO TRAMP mice. *Endocrinology* 153, 4160-4170.
- [165] **Di Zazzo, E., Galasso, G., Giovannelli, P., Di Donato, M. & Castoria, G.** (2018). Estrogens and their receptors in prostate cancer: therapeutic implications. *Frontiers in oncology* 8, 2.
- [166] **Simpkins, F., Hevia-Paez, P., Sun, J., Ullmer, W., Gilbert, C. A., Da Silva, T., Pedram, A., Levin, E. R., Reis, I. M., Rabinovich, B., Azzam, D., Xu, X., Ince, T. A., Yang, J., Verhaak, R. G., Lu, Y., Mills, G. B., & Slingerland, J. M.** (2012). Src Inhibition with saracatinib reverses fulvestrant resistance in ER-positive ovarian cancer models *in vitro* and *in vivo*. *Clinical cancer research* 18, 5911-5923.
- [167] **Simpkins, F., Hevia-Paez, P., Sun, J., Ullmer, W., Gilbert, C. A., Da Silva, T., Pedram, A., Levin, E. R., Reis, I. M., Rabinovich, B., Azzam, D., Xu, X., Ince, T. A., Yang, J., Verhaak, R. G., Lu, Y., Mills, G. B., & Slingerland, J. M.** (2012). New insights on the role of hormonal therapy in ovarian cancer. *Steroids* 78, 530-537.
- [168] **Kuiper, G. G. J. M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., HäGgblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J.** (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138, 863-870.
- [169] **Williams, C., Simera, I. & Bryant, A.** (2010). Tamoxifen for relapse of ovarian cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*
- [170] **Neven, P., Goldstein, S. R., Ciaccia, A. V., Zhou, L., Silfen, S. L., & Muram, D.** (2002). The effect of raloxifene on the incidence of ovarian cancer in postmenopausal women. *Gynecologic oncology* 85, 388-390.
- [171] **Cohen, I. R., Sims, M. L., Robbins, M. R., Lakshmanan, M. C., Francis, P. C., & Long, G. G.** (2000). The reversible effects of raloxifene on luteinizing hormone levels and ovarian morphology in mice. *Reproductive Toxicology* 14, 37-44.
- [172] **Blair, R. M., Fang, H., Branham, W. S., Hass, B. S., Dial, S. L., Moland, C. L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., & Sheehan, D. M.** (2000). The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences* 54, 138-153.
- [173] **Argenta, P. A., Thomas, S. G., Judson, P. L., Downs, L. S., Geller, M. A., Carson, L. F., Jonson, A. L., & Ghebre, R.** (2009). A phase II study of fulvestrant in the treatment of multiply-recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 113, 205-209.
- [174] **Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A.** (2021). Cancer statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians* 71, 7-33
- [175] **Marqus, S., Pirogova, E. & Piva, T. J.** (2017). Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *Journal of biomedical science* 24, 1-15.
- [176] **Valent, P., Groner, B., Schumacher, U., Superti-Furga, G., Busslinger, M., Kralovics, R., Zielinski, C., Penninger, J. M., Kerjaschki, D., Stingl, G., Smolen, J. S., Valenta, R., Lassmann, H., Kovar, H., Jäger, U., Kornek, G., Müller, M., & Sörgel, F.** (2016). Paul Ehrlich (1854-1915) and his contributions to the foundation and birth of translational medicine. *Journal of innate immunity* 8, 111-120.

- [177] Lee, Y. T., Tan, Y. J. & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European journal of pharmacology* 834, 188-196.
- [178] Røslund, G. V. & Engelsen, A. S. T. (2015). Novel points of attack for targeted cancer therapy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 116, 9-18.
- [179] Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A. & Asadullah, K. (2011). What makes a good drug target? *Drug discovery today* 16, 1037-1043.
- [180] Charlton, P. & Spicer, J. (2016). Targeted therapy in cancer. *Medicine* 44, 34-38.
- [181] Peters, G. J. (2019). From 'targeted therapy' to targeted therapy. *Anticancer Research* 39, 3341-3345.
- [182] Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *science* 339, 1546-1558.
- [183] De Palma, M. & Hanahan, D. (2012). The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. *Molecular oncology* 6, 111-127.
- [184] Padma, V. V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine* 5, 1-6.
- [185] Chabner, B. A. & Roberts Jr, T. G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* 5, 65-72.
- [186] Owens, J. (2007). Determining druggability. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 187-187.
- [187] Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international* 2014(1), 150845.
- [188] Zivny, J., Pytlik, R. & Andera, L. (2010). The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. *Current pharmaceutical design* 16, 11-33.
- [189] Day, T. W. & Safa, A. R. (2009). RNA interference in cancer: targeting the anti-apoptotic protein c-FLIP for drug discovery. *Mini reviews in medicinal chemistry* 9, 741-748.
- [190] De Almagro, M. C. & Vucic, D. (2012). The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental oncology*
- [191] Zhu, H. & Almasan, A. (2017). Development of venetoclax for therapy of lymphoid malignancies. *Drug design, development and therapy*, 685-694.
- [192] Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., Yang, W., Tian, C., Miao, Z., Wang, T., & Yang, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal transduction and targeted therapy* 6, 1-48.
- [193] Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology* 20, 651-668.
- [194] Keefe, D. M. K. & Bateman, E. H. (2019). Potential successes and challenges of targeted cancer therapies. *JNCI Monographs* 2019(53).
- [195] Habeeb, N. W., Kulasingam, V., Diamandis, E. P., Yousef, G. M., Tsongalis, G. J., Vermeulen, L., Zhu, Z., & Kamel-Reid, S. (2016). The use

of targeted therapies for precision medicine in oncology. *Clinical Chemistry* 62, 1556-1564.

- [196] **Gerber, D. E.** (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician* 77, 311-319.
- [197] **Min, H.-Y. & Lee, H.-Y.** (2022). Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Experimental & molecular medicine* 54, 1670-1694.
- [198] **Roskoski Jr, R.** (2020). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacological research* 152, 104609.
- [199] **Sun, G., Rong, D., Li, Z., Sun, G., Wu, F., Li, X., Cao, H., Cheng, Y., Tang, W., & Sun, Y.** (2021). Role of small molecule targeted compounds in cancer: progress, opportunities, and challenges. *Frontiers in cell and developmental biology* 9, 694363.
- [200] **Henninot, A., Collins, J. C. & Nuss, J. M.** (2018). The current state of peptide drug discovery: back to the future? *Journal of medicinal chemistry* 61, 1382-1414.
- [201] **Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S. & Price, D.** (2013). The future of peptide-based drugs. *Chemical biology & drug design* 81, 136-147.
- [202] **Hopkins, A. L. & Groom, C. R.** (2002). The druggable genome. *Nature reviews Drug discovery* 1, 727-730.
- [203] **Muttenthaler, M., King, G. F., Adams, D. J. & Alewood, P. F.** (2021). Trends in peptide drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 20, 309-325.
- [204] **Faraji, N., Arab, S. S., Doustmohammadi, A., Daly, N. L. & Khosroushahi, A. Y.** (2022). ApInAPDB: a database of apoptosis-inducing anticancer peptides. *Scientific Reports* 12, 21341.
- [205] **Tyagi, A., Tuknait, A., Anand, P., Gupta, S., Sharma, M., Mathur, D., Joshi, A., Singh, S., Gautam, A., & Raghava, G. P.** (2014). CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins. *Nucleic acids research* 43, D837-D843.
- [206] **Fath, M. K., Babakhaniyan, K., Zokaei, M., Yaghoobian, A., Akbari, S., Khorsandi, M., Soofi, A., Nabi-Afjadi, M., Zalpoor, H., Jalalifar, F., Azargoonjahromi, A., Payandeh, Z., & Bahrami, A. A.** (2022). Anti-cancer peptide-based therapeutic strategies in solid tumors. *Cellular & Molecular Biology Letters* 27, 33 (2022).
- [207] **Fosgerau, K. & Hoffmann, T.** (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today* 20, 122-128.
- [208] **Davda, J., Declerck, P., Hu-Lieskovan, S., Hickling, T. P., Jacobs, I. A., Chou, J., Salek-Ardakani, S., & Kraynov, E.** (2019). Immunogenicity of immunomodulatory, antibody-based, oncology therapeutics. *Journal for immunotherapy of cancer* 7, 1-9.
- [209] **Lau, J. L. & Dunn, M. K.** (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry* 26, 2700-2707.
- [210] **Diao, L. & Meibohm, B.** (2013). **Pharmacokinetics and pharmacokinetic–pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides.** *Clinical pharmacokinetics* 52, 855-868.
- [211] **Hamman, J. H., Enslin, G. M. & Kotzé, A. F.** (2005). Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. *BioDrugs* 19, 165-177.
- [212] **Bruno, B. J., Miller, G. D. & Lim, C. S.** (2013). Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic delivery* 4, 1443-1467.

- [213] **Zhang, Y., Zhang, H., Ghosh, D. & Williams Iii, R. O.** (2020). Just how prevalent are peptide therapeutic products? A critical review. *International journal of pharmaceuticals* 587, 119491.
- [214] **Merrifield, R. B.** (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* 85, 2149-2154.
- [215] **Collins, J. M., Porter, K. A., Singh, S. K. & Vanier, G. S.** (2014). High-efficiency solid phase peptide synthesis (HE-SPPS). *Organic letters* 16, 940-943.
- [216] **Mijalis, A. J., Thomas, D. A., Simon, M. D., Adamo, A., Beaumont, R., Jensen, K. F., & Pentelute, B. L.** (2017). A fully automated flow-based approach for accelerated peptide synthesis. *Nature chemical biology* 13, 464-466.
- [217] **Sletten, E. T., Nuno, M., Guthrie, D. & Seeberger, P. H.** (2019). Real-time monitoring of solid-phase peptide synthesis using a variable bed flow reactor. *Chemical Communications* 55, 14598-14601.
- [218] **Barman, P., Joshi, S., Sharma, S., Preet, S., Sharma, S., & Saini, A.** (2023). Strategic Approaches to improvise peptide drugs as next generation therapeutics. *International journal of peptide research and therapeutics* 29, 61.
- [219] **Lee, A. C.-L., Harris, J. L., Khanna, K. K. & Hong, J.-H.** (2019). A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design. *International journal of molecular sciences* 20, 2383.
- [220] **Puente, X. S., Gutiérrez-Fernández, A., Ordóñez, G. R., Hillier, L. W. & López-Otín, C.** (2005). Comparative genomic analysis of human and chimpanzee proteases. *Genomics* 86, 638-647.
- [221] **Werle, M. & Bernkop-Schnürch, A.** (2006). Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino acids* 30, 351-367.
- [222] **Di, L.** (2015). Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *The AAPS journal* 17, 134-143.
- [223] **Georgieva, J. V., Brinkhuis, R. P., Stojanov, K., Weijers, C. a. G. M., Zuilhof, H., Rutjes, F. P. J. T., Hoekstra, D., Van Hest, J. C. M., & Zuhorn, I. S.** (2012). Peptide-mediated blood-brain barrier transport of polymersomes.
- [224] **Lenci, E. & Trabocchi, A.** (2020). Peptidomimetic toolbox for drug discovery. *Chemical Society Reviews* 49, 3262-3277.
- [225] **Chatterjee, J., Rechenmacher, F. & Kessler, H.** (2013). N-methylation of peptides and proteins: an important element for modulating biological functions. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 254-269.
- [226] **Ahn, J.-M., Boyle, N. A., MacDonald, M. T. & Janda, K. D.** (2002). Peptidomimetics and peptide backbone modifications. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2, 463-473.
- [227] **Pu, J., Wang, Q., Xu, W., Lu, L. & Jiang, S.** (2019). Development of protein- and peptide-based HIV entry inhibitors targeting gp120 or gp41. *Viruses* 11, 705.
- [228] **Recum, H. A. v. & Pokorski, J. K.** (2013). Peptide and protein-based inhibitors of HIV-1 co-receptors. *Experimental Biology and Medicine* 238, 442-449.
- [229] **Shah, S. S., Casanova, N., Antuono, G. & Sabatino, D.** (2020). Polyamide backbone modified cell targeting and penetrating peptides in cancer detection and treatment. *Frontiers in chemistry* 8, 218.
- [230] **Niehaus, E., Janevska, S., Von Bargen, K. W., Sieber, C. M. K., Harrer, H., Humpf, H., & Tudzynski, B.** (2014). Apicidin F: characterization and

genetic manipulation of a new secondary metabolite gene cluster in the rice pathogen *Fusarium fujikuroi*. *PLoS one* 9, e103336.

- [231] Laird, D. W., LaBarbera, D. V., Feng, X., Bugni, T. S., Harper, M. K., & Ireland, C. M. (2007). Halogenated cyclic peptides isolated from the sponge *Corticium* sp. *Journal of natural products* 70, 741-746.
- [232] Werner, H. M., Cabaltega, C. C. & Horne, W. S. (2016). Peptide backbone composition and protease susceptibility: impact of modification type, position, and tandem substitution. *ChemBioChem* 17, 712-718.
- [233] Wei, X., Zhan, C., Shen, Q., Fu, W., Xie, C., Gao, J., Peng, C., Zheng, P., & Lu, W. (2015). A d-Peptide Ligand of Nicotine Acetylcholine Receptors for Brain-Targeted Drug Delivery. *Angewandte Chemie* 127, 3066-3070.
- [234] Li, Z., Xie, J., Peng, S., Liu, S., Wang, Y., Lu, W., Shen, J., & Li, C. (2017). Novel strategy utilizing extracellular cysteine-rich domain of membrane receptor for constructing d-peptide mediated targeted drug delivery systems: a case study on Fn14. *Bioconjugate Chemistry* 28, 2167-2179.
- [235] Hervé, M., Maillére, B., Mourier, G., Texier, C., Leroy, S., & Ménez, A. (1997). On the immunogenic properties of retro-inverso peptides. Total retro-inversion of T-cell epitopes causes a loss of binding to MHC II molecules. *Molecular immunology* 34, 157-163.
- [236] Moiola, M., Memeo, M. G. & Quadrelli, P. (2019). Stapled peptides—a useful improvement for peptide-based drugs. *Molecules* 24, 3654.
- [237] Dougherty, P. G., Sahni, A. & Pei, D. (2019). Understanding cell penetration of cyclic peptides. *Chemical Reviews* 119, 10241-10287.
- [238] Chow, H. Y., Zhang, Y., Matheson, E. & Li, X. (2019). Ligation technologies for the synthesis of cyclic peptides. *Chemical reviews* 119, 9971-10001.
- [239] Reguera, L. & Rivera, D. G. (2019). Multicomponent reaction toolbox for peptide macrocyclization and stapling. *Chemical reviews* 119, 9836-9860.
- [240] Malde, A. K., Hill, T. A., Iyer, A. & Fairlie, D. P. (2019). Crystal structures of protein-bound cyclic peptides. *Chemical reviews* 119, 9861-9914.
- [241] Joo, S. H. (2012). Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools. *Biomolecules & therapeutics* 20, 19.
- [242] Qian, Z., Rhodes, C. A., McCroskey, L. C., Wen, J., Appiah-Kubi, G., Wang, D. J., Guttridge, D. C., & Pei, D. (2016). Enhancing the cell permeability and metabolic stability of peptidyl drugs by reversible bicyclization. *Angewandte Chemie International Edition* 56, 1525-1529.
- [243] Walensky, L. D. & Bird, G. H. (2014). Hydrocarbon-stapled peptides: principles, practice, and progress: miniperspective. *Journal of medicinal chemistry* 57, 6275-6288.
- [244] Wells, J. A. & McClendon, C. L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein–protein interfaces. *Nature* 450, 1001-1009.
- [245] Arkin, M. R., Tang, Y. & Wells, J. (2014). A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chemistry & biology* 21, 1102-1114.
- [246] Mansouri, W., Fordyce, S. B., Wu, M., Jones, D., Cohn, D., Lin, Q., Feustel, P., Sharma, T., Bennett, J. A., & Andersen, T. T. (2018). Efficacy and tolerability of AFPep, a cyclic peptide with anti-breast cancer properties. *Toxicology and Applied Pharmacology* 345, 10-18.
- [247] Xiao, W., Ma, W., Wei, S., Li, Q., Liu, R., Carney, R. P., Yang, K., Lee, J., Nyugen, A., Yoneda, K. Y., Lam, K. S., & Li, T. (2019). High-affinity

- peptide ligand LXY30 for targeting $\alpha\beta 1$ integrin in non-small cell lung cancer. *Journal of hematology & oncology* 12, 1-18.
- [248] **Chen, J., Ma, R., Sun, S., Zhu, X., Xu, X., & Mu, Q.** (2018). Synthesis and biological evaluation of cyclopeptide GG-8-6 and its analogues as anti-hepatocellular carcinoma agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26, 609-622.
- [249] **Tian, Y., Jiang, Y., Li, J., Wang, D., Zhao, H., & Li, Z.** (2017). Effect of stapling architecture on physiochemical properties and cell permeability of stapled α -helical peptides: a comparative study. *ChemBioChem* 18, 2087-2093.
- [250] **Klein, M. J., Schmidt, S., Wadhvani, P., Bürck, J., Reichert, J., Afonin, S., Berditsch, M., Schober, T., Brock, R., Kansy, M., & Ulrich, A. S.** (2017). Lactam-stapled cell-penetrating peptides: cell uptake and membrane binding properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 60, 8071-8082.
- [251] **Bird, G. H., Madani, N., Perry, A. F., Princiotta, A. M., Supko, J. G., He, X., Gavathiotis, E., Sodroski, J. G., & Walensky, L. D.** (2010). Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 14093-14098.
- [252] **De Araujo, A. D., Hoang, H. N., Kok, W. M., Diness, F., Gupta, P., Hill, T. A., Driver, R. W., Price, D. A., Liras, S., & Fairlie, D. P.** (2014). Comparative α -Helicity of cyclic pentapeptides in water. *Angewandte Chemie International Edition* 53, 6965-6969.
- [253] **Tian, Y., Li, J., Zhao, H., Zeng, X., Wang, D., Liu, Q., Niu, X., Huang, X., Xu, N., & Li, Z.** (2016). Stapling of unprotected helical peptides via photo-induced intramolecular thiol-yne hydrothiolation. *Chemical Science* 7, 3325-3330.
- [254] **Bošnjak, I., Bojović, V., Šegvić-Bubić, T. & Bielen, A.** (2014). Occurrence of protein disulfide bonds in different domains of life: a comparison of proteins from the Protein Data Bank. *Protein engineering, design & selection* 27, 65-72.
- [255] **Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J.** (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in microbiology* 10, 435128.
- [256] **Hayes, H. C., Luk, L. Y. P. & Tsai, Y.-H.** (2021). Approaches for peptide and protein cyclisation. *Organic & biomolecular chemistry* 19, 3983-4001.
- [257] **Ramadhani, D., Maharani, R., Gazzali, A. M. & Muchtaridi, M.** (2022). Cyclic peptides for the treatment of cancers: a review. *Molecules* 27, 4428.
- [258] **Hahn, M., Winkler, D., Welfle, K., Misselwitz, R., Welfle, H., Wessner, H., Zahn, G., Scholz, C., Seifert, M., Harkins, R., Schneider-Mergener, J., & Höhne, W.** (2001). Cross-reactive binding of cyclic peptides to an anti-TGF α antibody Fab fragment: an X-ray structural and thermodynamic analysis. *Journal of molecular biology* 314, 293-309.
- [259] **Cheneval, O., Schroeder, C. I., Durek, T., Walsh, P., Huang, Y., Liras, S., Price, D. A., & Craik, D. J.** (2014). Fmoc-based synthesis of disulfide-rich cyclic peptides. *The Journal of organic chemistry* 79, 5538-5544.
- [260] **Serre, A. R. E., Nwokolo, G. C., Spencer, H. L. M., Bell, T. J., Barnieh, F. M., Hughes, L., Falconer, R. A., & Morais, G. R.** (2023). Azodicarboxylate-Mediated Peptide Cyclisation: Application to Disulfide Bond Formation in Solution and Solid Phase. *European Journal of Organic Chemistry* 26, e202300789.

- [261] **Barkan, D. T., Cheng, X., Celino, H., Tran, T. T., Bhandari, A., Craik, C. S., Sali, A., & Smythe, M. L.** (2016). Clustering of disulfide-rich peptides provides scaffolds for hit discovery by phage display: application to interleukin-23. *BMC bioinformatics* 17, 1-16.
- [262] **Colgrave, M. L. & Craik, D. J.** (2004). Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry* 43, 5965-5975.
- [263] **Fass, D.** (2012). Disulfide bonding in protein biophysics. *Annual review of biophysics* 41, 63-79.
- [264] **Manteca, A., Alonso-Caballero, Á., Fertin, M., Poly, S., De Sancho, D., & Perez-Jimenez, R.** (2017). The influence of disulfide bonds on the mechanical stability of proteins is context dependent. *Journal of Biological Chemistry* 292, 13374-13380.
- [265] **Berman, H. M.** (2000). The protein data bank. *Nucleic acids research* 28, 235-242.
- [266] **Stein, A., Ceol, A. & Aloy, P.** (2010). 3did: identification and classification of domain-based interactions of known three-dimensional structure. *Nucleic acids research* 39, D718-D723.
- [267] **Vanhee, P., Stricher, F., Baeten, L., Verschueren, E., Lenaerts, T., Serrano, L., Rousseau, F., & Schymkowitz, J.** (2009). Protein-peptide interactions adopt the same structural motifs as monomeric protein folds. *Structure* 17, 1128-1136.
- [268] **London, N., Movshovitz-Attias, D. & Schueler-Furman, O.** (2010). The structural basis of peptide-protein binding strategies. *Structure* 18, 188-199.
- [269] **You, Y., Liu, H., Zhu, Y. & Zheng, H.** (2023). Rational design of stapled antimicrobial peptides. *Amino Acids* 55, 421-442.
- [270] **Huttlin, E. L., Bruckner, R. J., Paulo, J. A., Cannon, J. R., Ting, L., Baltier, K., Colby, G., Gebreab, F., Gygi, M. P., Parzen, H., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Pontano-Vaites, L., Swarup, S., White, A. E., Schweppe, D. K., Rad, R., Erickson, B. K. & Harper, J. W.** (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* 545, 505-509.
- [271] **Bluntzer, M. T. J., O'Connell, J., Baker, T. S., Michel, J. & Hulme, A. N.** (2021). Designing stapled peptides to inhibit protein-protein interactions: an analysis of successes in a rapidly changing field. *Peptide Science* 113, e24191.
- [272] **DeLano, W. L.** (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr* 40, 82-92.
- [273] **Shim, S. Y., Kim, Y. W. & Verdine, G. L.** (2013). A new i, i+ 3 peptide stapling system for α -helix stabilization. *Chemical Biology & Drug Design* 82, 635-642.
- [274] **Wu, T., He, P., Wu, W., Chen, Y. & Lv, F.** (2018). Targeting oncogenic transcriptional corepressor Nac1 POZ domain with conformationally constrained peptides by cyclization and stapling. *Bioorganic Chemistry* 80, 1-10.
- [275] **Tan, Y. S., Lane, D. P. & Verma, C. S.** (2016). Stapled peptide design: principles and roles of computation. *Drug Discovery Today* 21, 1642-1653.
- [276] **Walensky, L. D., Kung, A. L., Escher, I., Malia, T. J., Barbuto, S., Wright, R. D., Wagner, G., Verdine, G. L., & Korsmeyer, S. J.** (2004). Activation of apoptosis *in vivo* by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *science* 305, 1466-1470.

- [277] Long, Y., Huang, S., Zawahir, Z., Xu, Z., Li, H., Sanchez, T. W., Zhi, Y., De Houwer, S., Christ, F., Debyser, Z., & Neamati, N. (2013). Design of cell-permeable stapled peptides as HIV-1 integrase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 56, 5601-5612.
- [278] Frank, A. O., Feldkamp, M. D., Kennedy, J. P., Waterson, A. G., Pelz, N. F., Patrone, J. D. & Fesik, S. W. (2013). Discovery of a potent stapled helix peptide that binds to the 70N domain of replication protein A. *Journal of medicinal chemistry* 57, 2455-2461.
- [279] Dougherty, P. G., Wen, J., Pan, X., Koley, A., Ren, J., Sahni, A., Basu, R., Salim, H., Kubi, G. A., Qian, Z., & Pei, D. (2019). Enhancing the cell permeability of stapled peptides with a cyclic cell-penetrating peptide. *Journal of medicinal chemistry* 62, 10098-10107.
- [280] Tran, P. T., Larsen, C. Ø., Røndbjerg, T., De Foresta, M., Kunze, M. B. A., Marek, A., Løper, J. H., Boyhus, L., Knuhtsen, A., Lindorff-Larsen, K., & Pedersen, D. S. (2017). Diversity-Oriented Peptide Stapling: A Third Generation Copper-Catalysed Azide–Alkyne Cycloaddition Stapling and Functionalisation Strategy. *Chemistry—A European Journal* 23, 3490-3495.
- [281] Lee, Y. J., Han, S. & Lim, Y. b. (2016). Simultaneous Stabilization and Multimerization of a Peptide α -Helix by Stapling Polymerization. *Macromolecular rapid communications* 37, 1021-1026.
- [282] Wu, D., Li, Y., Zheng, L., Xiao, H., Ouyang, L., Wang, G., & Sun, Q. (2023). Small molecules targeting protein–protein interactions for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*.
- [283] Cheng, S.-S., Yang, G.-J., Wang, W., Leung, C.-H. & Ma, D.-L. (2020). The design and development of covalent protein-protein interaction inhibitors for cancer treatment. *Journal of hematology & oncology* 13, 1-14.
- [284] Bernal, F., Tyler, A. F., Korsmeyer, S. J., Walensky, L. D. & Verdine, G. L. (2007). Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide. *Journal of the American Chemical Society* 129, 2456-2457.
- [285] Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., Katz, S. G., Tu, H., Kim, H., Cheng, E. H., Tjandra, N., & Walensky, L. D. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 1076-1081.
- [286] Pitter, K., Bernal, F., LaBelle, J. & Walensky, L. D. (2008). Dissection of the BCL-2 family signaling network with stabilized α -helices of BCL-2 domains. *Methods in enzymology* 446, 387-408.
- [287] Stewart, M. L., Fire, E., Keating, A. E. & Walensky, L. D. (2010). The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nature chemical biology* 6, 595-601.
- [288] Moellering, R. E., Cornejo, M., Davis, T. N., Del Bianco, C., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Kung, A. L., Gilliland, D. G., Verdine, G. L., & Bradner, J. E. (2009). Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature* 462, 182-188.
- [289] LaBelle, J. L., Katz, S. G., Bird, G. H., Gavathiotis, E., Stewart, M. L., Lawrence, C., Fisher, J. K., Godes, M., Pitter, K., Kung, A. L., & Walensky, L. D. (2012). A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. *The Journal of clinical investigation* 122, 2018-2031.
- [290] Okamoto, T., Segal, D., Zobel, K., Fedorova, A., Yang, H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C. S., Smith, B. J., Deshayes, K., & Czabotar, P. E. (2014).

Further insights into the effects of pre-organizing the BimBH3 helix. *ACS Chemical Biology* 9, 838-839.

- [291] **Chang, Y. S., Graves, B., Guerlavais, V., Tovar, C., Packman, K., To, K., Olson, K. A., Kesavan, K., Gangurde, P., Mukherjee, A., Baker, T., Darlak, K., Elkin, C., Filipovic, Z., Qureshi, F. Z., Cai, H., Berry, P., Feyfant, E., Shi, X. E. & Sawyer, T. K.** (2013). Stapled α -helical peptide drug development: A potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E3445-E3454.
- [292] **Li, H., Chen, X., Wu, M., Song, P. & Zhao, X.** (2022). Bicyclic stapled peptides based on p53 as dual inhibitors for the interactions of p53 with MDM2 and MDMX. *Chinese Chemical Letters* 33, 1254-1258.
- [293] **Li, Z., Feng, Y., Han, H., Jiang, X., Chen, W., Ma, X., Mei, Y., Yuan, D., Zhang, D., & Shi, J.** (2023). A Stapled Peptide Inhibitor of METTL3-METTL14 for Cancer Therapy. *bioRxiv*, 2023-2009.
- [294] **Lafont, V., Schaefer, M., Stote, R. H., Altschuh, D. & Dejaegere, A.** (2007). Protein-protein recognition and interaction hot spots in an antigen-antibody complex: free energy decomposition identifies "efficient amino acids". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 67, 418-434.
- [295] **Dalgarno, D. C., Botfield, M. C. & Rickles, R. J.** (1997). SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. *Peptide Science* 43, 383-400.
- [296] **Bakail, M. & Ochsenbein, F.** (2016). Targeting protein-protein interactions, a wide open field for drug design. *Comptes Rendus Chimie* 19, 19-27.
- [297] **Mahajan, M. A. & Samuels, H. H.** (2005). Nuclear hormone receptor coregulator: role in hormone action, metabolism, growth, and development. *Endocrine reviews* 26, 583-597.
- [298] **Chang, C., Norris, J. D., Grøn, H., Paige, L. A., Hamilton, P. T., Kenan, D. J., Fowlkes, D., & McDonnell, D. P.** (1999). Dissection of the LxxLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors α and β . *Molecular and cellular biology*.
- [299] **Norris, J. D., Paige, L. A., Christensen, D. J., Chang, C., Huacani, M. R., Fan, D., Hamilton, P. T., Fowlkes, D. M., & McDonnell, D. P.** (1999). Peptide antagonists of the human estrogen receptor. *Science* 285, 744-746.
- [300] **Fuchs, S., Nguyen, H. D., Phan, T. T. P., Burton, M. F., Nieto, L., De Vries-Van Leeuwen, I. J., Schmidt, A., Goodarzifard, M., Agten, S. M., Rose, R., Ottmann, C., Milroy, L., & Brunsveld, L.** (2013). Proline primed helix length as a modulator of the nuclear receptor-coactivator interaction. *Journal of the American Chemical Society* 135, 4364-4371.
- [301] **Carraz, M., Zwart, W., Phan, T., Michalides, R. & Brunsveld, L.** (2009). Perturbation of estrogen receptor α localization with synthetic nona-arginine LxxLL-peptide coactivator binding inhibitors. *Chemistry & biology* 16, 702-711.
- [302] **Geistlinger, T. R., McReynolds, A. C. & Guy, R. K.** (2004). Ligand-selective inhibition of the interaction of steroid receptor coactivators and estrogen receptor isoforms. *Chemistry & biology* 11, 273-281.
- [303] **Geistlinger, T. R. & Guy, R. K.** (2003). Novel selective inhibitors of the interaction of individual nuclear hormone receptors with a mutually shared

- steroid receptor coactivator 2. *Journal of the American Chemical Society* 125, 6852-6853.
- [304] Speltz, T. E., Fanning, S. W., Mayne, C. G., Fowler, C., Tajkhorshid, E., Greene, G. L., & Moore, T. W. (2016). Stapled peptides with γ -methylated hydrocarbon chains for the estrogen receptor/coactivator interaction. *Angewandte Chemie* 128, 4324-4327.
- [305] Phillips, C., Roberts, L. R., Schade, M., Bazin, R., Bent, A., Davies, N. L., Moore, R., Pannifer, A. D., Pickford, A. R., Prior, S. H., Read, C. M., Scott, A., Brown, D. G., Xu, B., & Irving, S. L. (2011). Design and structure of stapled peptides binding to estrogen receptors. *Journal of the American Chemical Society* 133, 9696-9699.
- [306] Rodriguez, A. L., Tamrazi, A., Collins, M. L. & Katzenellenbogen, J. A. (2004). Design, synthesis, and *in vitro* biological evaluation of small molecule inhibitors of estrogen receptor α coactivator binding. *Journal of medicinal chemistry* 47, 600-611.
- [307] Parent, A. A., Gunther, J. R. & Katzenellenbogen, J. A. (2008). Blocking estrogen signaling after the hormone: pyrimidine-core inhibitors of estrogen receptor-coactivator binding. *Journal of medicinal chemistry* 51, 6512-6530.
- [308] Gunther, J. R., Moore, T. W., Collins, M. L. & Katzenellenbogen, J. A. (2008). Amphipathic benzenes are designed inhibitors of the estrogen receptor α /steroid receptor coactivator interaction. *ACS chemical biology* 3, 282-286.
- [309] Zhou, H.-B., Collins, M. L., Gunther, J. R., Comminos, J. S. & Katzenellenbogen, J. A. (2007). Bicyclo [2.2. 2] octanes: close structural mimics of the nuclear receptor-binding motif of steroid receptor coactivators. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17, 4118-4122.
- [310] Becerril, J. & Hamilton, A. D. (2007). Helix mimetics as inhibitors of the interaction of the estrogen receptor with coactivator peptides. *Angewandte Chemie-International Edition In English-* 46, 4471
- [311] Williams, A. B., Weiser, P. T., Hanson, R. N., Gunther, J. R. & Katzenellenbogen, J. A. (2009). Synthesis of biphenyl proteomimetics as estrogen receptor- α coactivator binding inhibitors. *Organic letters* 11, 5370-5373.
- [312] Shao, D., Berrodin, T. J., Manas, E., Hauze, D., Powers, R., Bapat, A., Gonder, D., Winneker, R. C., & Frail, D. E. (2004). Identification of novel estrogen receptor α antagonists. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 88, 351-360.
- [313] LaFrate, A. L., Gunther, J. R., Carlson, K. E. & Katzenellenbogen, J. A. (2008). Synthesis and biological evaluation of guanylhydrazone coactivator binding inhibitors for the estrogen receptor. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16, 10075-10084.
- [314] Sun, A., Moore, T. W., Gunther, J. R., Kim, M., Rhoden, E., Du, Y., Fu, H., Snyder, J. P., & Katzenellenbogen, J. A. (2011). Discovering Small-Molecule Estrogen Receptor α /Coactivator Binding Inhibitors: High-Throughput Screening, Ligand Development, and Models for Enhanced Potency. *ChemMedChem* 6, 654-666.
- [315] Singh, K., Munuganti, R. S. N., Leblanc, É., Lin, Y. L., Leung, E., Lallous, N., Butler, M., Cherkasov, A., & Rennie, P. S. (2015). In silico discovery and validation of potent small-molecule inhibitors targeting the activation function 2 site of human oestrogen receptor α . *Breast Cancer Research* 17, 1-17.

- [316] **Raj, G. V., Sareddy, G. R., Ma, S., Lee, T. K., Viswanadhapalli, S., Li, R., Liu, X., Murakami, S., Chen, C. C., Lee, W. R., Mann, M., Krishnan, S. R., Manandhar, B., Gonugunta, V. K., Strand, D. W., Tekmal, R. R., Ahn, J., & Vadlamudi, R. K.** (2017). Estrogen receptor coregulator binding modulators (ERXs) effectively target estrogen receptor positive human breast cancers. *Elife* 6, e26857.
- [317] **Fletcher, S. & Hamilton, A. D.** (2006). Targeting protein–protein interactions by rational design: mimicry of protein surfaces. *Journal of the Royal Society Interface* 3, 215-233
- [318] **Fry, D. C.** (2006). Protein–protein interactions as targets for small molecule drug discovery. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules* 84, 535-552
- [319] **Gunther, J. R., Parent, A. A. & Katzenellenbogen, J. A.** (2009). Alternative inhibition of androgen receptor signaling: peptidomimetic pyrimidines as direct androgen receptor/coactivator disruptors. *ACS chemical biology* 4, 435-440.
- [320] **Wang, Y., Chirgadze, N. Y., Briggs, S. L., Khan, S., Jensen, E. V., & Burris, T. P.** (2006). A second binding site for hydroxytamoxifen within the coactivator-binding groove of estrogen receptor β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9908-9911.
- [321] **McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R. T., Assa-Munt, N., Milburn, M. V., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G.** (1998). Determinants of coactivator LxxLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes & development* 12, 3357-3368.
- [322] **Norris, J. D., Fan, D., Stallcup, M. R. & McDonnell, D. P.** (1998). Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6679-6688.
- [323] **Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-Å. & Laudet, V.** (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature reviews Drug discovery* 3, 950-964.
- [324] **Paige, L. A., Christensen, D. J., Grøn, H., Norris, J. D., Gottlin, E. B., Padilla, K. M., Chang, C., Ballas, L. M., Hamilton, P. T., McDonnell, D. P., & Fowlkes, D. M.** (1999). Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER α and ER β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3999-4004.
- [325] **Gee, A. C., Carlson, K. E., Martini, P. G. V., Katzenellenbogen, B. S. & Katzenellenbogen, J. A.** (1999). Coactivator peptides have a differential stabilizing effect on the binding of estrogens and antiestrogens with the estrogen receptor. *Molecular endocrinology* 13, 1912-1923.
- [326] **Tünnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R. M., Stöckl, M., Herrmann, A., & Cardoso, M. C.** (2007). Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society* 14, 469-476.
- [327] **Hu, X. & Zhang, Z.** (2016). Understanding the genetic mechanisms of cancer drug resistance using genomic approaches. *Trends in Genetics* 32, 127-137.
- [328] **Pease, J. H., Storrs, R. W. & Wemmer, D. E.** (1990). Folding and activity of hybrid sequence, disulfide-stabilized peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 5643-5647.

- [329] **Blackwell, H. E. & Grubbs, R. H.** (1998). Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis. *Angewandte Chemie International Edition* 37, 3281-3284
- [330] **Schafmeister, C. E., Po, J. & Verdine, G. L.** (2000). An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides. *Journal of the American Chemical Society* 122, 5891-5892.
- [331] **Zhang, H., Zhao, Q., Bhattacharya, S., Waheed, A. A., Tong, X., Hong, A., Heck, S., Curreli, F., Goger, M., Cowburn, D., Freed, E. O., & Debnath, A. K.** (2008). A cell-penetrating helical peptide as a potential HIV-1 inhibitor. *Journal of molecular biology* 378, 565-580.
- [332] **Speltz, T. E., Danes, J. M., Stender, J. D., Frasor, J. & Moore, T. W.** (2018). A cell-permeable stapled peptide inhibitor of the estrogen receptor/coactivator interaction. *ACS chemical biology* 13, 676-684.
- [333] **Montgomery, J. E., Donnelly, J. A., Fanning, S. W., Speltz, T. E., Shangguan, X., Coukos, J. S., Greene, G. L., & Moellering, R. E.** (2019). Versatile peptide macrocyclization with Diels–Alder cycloadditions. *Journal of the American Chemical Society* 141, 16374-16381.
- [334] **De Haven Brandon, A., Box, G., Hallsworth, A., Court, W., Matthews, N., Herodek, B., Arteagabeitia, A. B., Valenti, M., & Kirkin, V.** (2020). Identification of ovarian high-grade serous carcinoma cell lines that show estrogen-sensitive growth as xenografts in immunocompromised mice. *Scientific reports* 10, 10799.
- [335] **Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., & Klenk, D.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150, 76-85.
- [336] **Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods* 25, 402-408.
- [337] **Macke, T. J., Svrcek-Seiler, W., Brown, R. A., Kolossváry, I., Bomble, Y. J., Case, D. A. & Wang, J.** (2010). AmberTools users' manual.
- [338] **Genheden, S. & Ryde, U.** (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert opinion on drug discovery* 10, 449-461.
- [339] **Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D.** (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold spring harbor protocols* 2018, pdb-prot095505
- [340] **Andreotti, P. E., Cree, I. A., Kurbacher, C. M., Hartmann, D. M., Linder, D., Harel, G., ... & Bruckner, H. W.** (1995). Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer research* 55, 5276-5282.
- [341] **Dexter, S. J., Cámara, M., Davies, M. & Shakesheff, K. M.** (2003). Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials* 24, 27-34.
- [342] **Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A. Y. & Demirci, M.** (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in vitro* 22, 232-239.
- [343] **Russell, A., Hendley, J. & Germain, D.** (1999). Inhibitory effect of p21 in MCF-7 cells is overcome by its coordinated stabilization with D-type cyclins. *Oncogene* 18, 6454-6459.

- [344] **Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. & Yan, G.** (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 23, 525-531
- [345] **Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & Van Oers, M. H.** (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.
- [346] **Tian, T.** (2023). MCF-7 cells lack the expression of Caspase-3. *International Journal of Biological Macromolecules* 231, 123310
- [347] **Marino, M. & Ascenzi, P.** (2008). Membrane association of estrogen receptor α and β influences 17β -estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73, 853-858.
- [348] **JavanMoghadam, S., Weihua, Z., Hunt, K. K. & Keyomarsi, K.** (2016). Estrogen receptor alpha is cell cycle-regulated and regulates the cell cycle in a ligand-dependent fashion. *Cell cycle* 15, 1579-1590.
- [349] **Wong, W. P. S., Tiano, J. P., Liu, S., Hewitt, S. C., May, C. L., Dalle, S., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Korach, K. S., & Mauvais-Jarvis, F.** (2010). Extranuclear estrogen receptor- α stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 13057-13062.
- [350] **Cheskis, B., Greger, J., Cooch, N., McNally, C., Mclarney, S., Lam, H., Rutledge, S., Mekonnen, B., Hauze, D., & Nagpal, S.** (2008). MNAR plays an important role in ERA activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Steroids* 73, 901-905.
- [351] **Vallabhaneni, S., Nair, B. C., Cortez, V., Challa, R., Chakravarty, D., Tekmal, R. R., & Vadlamudi, R. K.** (2010). Significance of ER–Src axis in hormonal therapy resistance. *Breast cancer research and treatment* 130, 377-385.
- [352] **Lombardi, M., Castoria, G., Migliaccio, A., Barone, M. V., Di Stasio, R., Ciociola, A., Bottero, D., Yamaguchi, H., Appella, E., & Auricchio, F.** (2008).Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *The Journal of Cell Biology* 182, 327-340.
- [353] **Basak, P., Chatterjee, S., Weger, S., Bruce, M. C., Murphy, L. C., & Raouf, A.** (2015). Estrogen regulates luminal progenitor cell differentiation through H19 gene expression. *Endocrine-related cancer* 22, 505.
- [354] **de Leeuw, R., Neefjes, J. & Michalides, R.** (2011). A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. *International journal of breast cancer*. 2011(1), 232435.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Hilal ŞENTÜRK
Doğum Tarihi ve Yeri :
E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik
- **Yüksek lisans** : 2017, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri, Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2018-2020, Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü
- 2020-Günümüz Araştırma Görevlisi, İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Şentürk H.** (2023). Designing of stapled peptide-based antagonists specific for human estrogen receptor alpha (ER α) and investigation of their binding affinity and effects on breast cancer, International Conference on Cancer Research and Clinical Trials (CRCT-2023) 13 Eylül 2023, Novotel Milano Malpensa Airport, Milan, Italy
- **Tezden üretilen yayın: Şentürk, H., Dedeakayoğulları, Huri., Ugur- Marion, I., Özçubukçu, Salih., Kesici, M. S., Unsal-Beyge, S., Acar, Muradiye., Erkısa, M., Akbaş, F. & Ulukaya. E.** (2024). Human Estrogen Receptor Alpha (ER α) Targeted Cyclic Peptides Inhibit Cell Growth and Induce Apoptosis in MCF-7 Cells. Turkish Journal of Biochemistry. Kabul edildi, basım aşamasında. Manuscript DOI: 10.1515/tjb-2024-0123.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Bagirova, M., Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Ullah, I., Cosar, G., Aydogdu, M., **Senturk, H.**, & Ergenoglu, B. (2016). Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis. Parasite Immunology, 38(11), 651–662. <https://doi.org/10.1111/pim.12360>
- Uysal, B. a. A., Kotan, G., Guneser, M. B., Dincer, A. N., **Senturk, H.**, & Rafiqi, A. M. (2021). Investigation of the effect of different chelation solutions on penetration of resin-based and bioceramic sealers with a novel method.

Microscopy Research and Technique, 84(7), 1571–1576.
<https://doi.org/10.1002/jemt.23717>

- Bulut, H., Durmuş, E., Haciosmanoğlu, E., Bozali, K., **Şentürk, H.**, & Koçyiğit, A. (2021). *Cuscuta campestris* tedavisi ile Mide Kanseri Hücrelerinde Apoptozun İndüklenmesi ve Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu Yoluyla Proliferasyonun Engellenmesi. *S.b. Ankara Eğitim Ve Araştırma Hastahanesi Tıp Dergisi*, 54(2), 271–280. <https://doi.org/10.20492/aeahtd.889902>
- Bulut, H., Teloğlu, E. Ş., **Şentürk, H.**, Üstünova, S., Güleken, Z., & Selek, Ş. (2022). The Effect of Evening Primrose and St. John's Wort Oils on Jak/STAT Signaling Pathways in Mice with Multiple Sclerosis Modeled. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 24(2), 225–235. <https://doi.org/10.24938/kutfd.986098>
- Polo, P. G., Çolak-Al, B., **Şentürk, H.**, & Rafiqi, A. M. (2022). Gut bacteria after recovery from COVID-19: a pilot study. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 26(22).

