



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**Meme Kanseri Tedavisine Yönelik Potansiyel Ribozomal Protein S6
Kinaz (RSK) İnhibitörlerinin In Siliko Tarama ile Belirlenmesi ve In
Vitro Etkinlik İncelenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevil KALIN

Tez Danışmanı

Dr. Öğretim Üyesi Ferah CÖMERT ÖNDER

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**Meme Kanseri Tedavisine Yönelik Potansiyel Ribozomal Protein S6 Kinaz (RSK)
İnhibitörlerinin In Siliko Tarama ile Belirlenmesi ve In Vitro Etkinlik İncelenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevil KALIN

Tez Danışmanı

Dr. Öğretim Üyesi Ferah CÖMERT ÖNDER

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri
koordinasyon birimince desteklenmiştir.

Proje No: TYL-2021-3815

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Sevil KALIN tarafından Dr. Öğretim Üyesi Ferah CÖMERT ÖNDER yönetiminde hazırlanan ve **16/01/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Meme Kanseri Tedavisine Yönelik Potansiyel Ribozomal Protein S6 Kinaz (RSK) İnhibitörlerinin *In Siliko* Tarama ile Belirlenmesi ve *In Vitro* Etkinlik İncelenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tıbbi Sistem Biyolojisi Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Ferah CÖMERT ÖNDER
(Danışman)

Prof. Dr. Mehmet AY

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

.....

.....

.....

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 16/01/2023

Doç. Dr. YENER PAZARCIK

Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

(İmza)

Sevil KALIN

16/01/2023

ÖNSÖZ

Genetik, epigenetik, stres ve çevresel ve biyolojik birçok faktöre bağlı olarak gelişen kanser hastalığı insan yaşamını tehdit eden anormal hücre büyümesidir. Meme kanseri sadece kadına özgü bir hastalık değildir. Erkek bireylerinde meme kanseri olabileceğinin bilinci geliştirilmelidir. Ulusal Meme Kanseri Kurumuna göre her 8 kadından 1'ine meme kanseri tanısı konmaktadır. Yakalanma riski bu kadar yüksek olan bir hastalık için yeni terapötiklerin araştırılması son derece önem arz etmektedir.

Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında meme kanserinin bir alt tipi olan üçlü negatif meme kanseri tedavisi için RSK1 ve RSK2 hedeflerine yönelik yeni ve seçici inhibitörlerinin *in siliko* yöntemler ile belirlenmesi ve *in vitro* etkinlik incelenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu tezin gerçekleştirilmesinde çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen ve tüm zorlukları benimle göğüsleyen saygıdeğer danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferah CÖMERT ÖNDER'e,

Tez çalışmalarım sırasında destekleri için Sayın Prof. Dr. Mehmet AY'a,

Bu tez kapsamında almaya hak kazandığım TÜBİTAK BİDEB 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Bu çalışmayı TYL-2021-3815 Proje No ile destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimine,

ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevil KALIN

Çanakkale, OCAK 2023

ÖZET

Meme Kanseri Tedavisine Yönelik Potansiyel Ribozomal Protein S6 Kinaz (RSK) İnhibitörlerinin *In Siliko* Tarama ile Belirlenmesi ve *In Vitro* Etkinlik İncelenmesi

Sevil KALIN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Sistem Biyolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ferah CÖMERT ÖNDER

16/01/2023, 110

90 kDa Ribozomal S6 Kinaz (RSK) ailesi Ras-MAPK sinyal yolağının aşağı akış efektörleri olup yüksek oranda korunmuş Ser/Thr kinazların bir grubudur. Dört izoformdan (RSK1-4) oluşan p90RSK ailesinin her bir izoformu NTKD ve CTKD kinaz alanlarına sahiptir. Çeşitli hücrel sinyal yolaklarının düzenlenmesinde rol alan p90RSK'lar birçok nükleer ve sitosolik hedefi fosforile ederek hücre hayatta kalması, büyümesi, hareketliliği ve çoğalmasını düzenlemektedir. RSK ifadesi ve aktivitesinin meme kanseri dahil olmak üzere birçok kötü huylu tümörde düzensiz olduğu bulunmuştur. Böylece, RSK dikkat çekici bir terapötik hedef haline gelmiştir. Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında RSK hedefli kanser tedavisi için yeni potansiyel inhibitör adaylarının *in siliko* sanal tarama ve moleküler modelleme yöntemlerinin kullanılması ile belirlenmesi çalışmaları Schrödinger ve Discovery Studio programları yardımıyla GLIDE/SP, CDOCKER ve Libdock algoritmaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *In siliko* sonuçlar standartlar ile karşılaştırıldığında potansiyel RSK1 ve RSK2 inhibitörleri belirlenmiştir. Belirlenen inhibitör adaylarının *in vitro* etkinlik çalışmaları MDA-MB-231, BT-549, BT20 ve MCF7 hücre hatları kullanılarak yapılmıştır. *In siliko* verilerden elde edilen sonuçlara göre leflunomide, karvedilol, ticagrelor, rutin, kateşin, kersetin bileşiklerinin meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşumu inhibisyonu, sitotoksosite ve hücre göçü engelleyici etkileri gözlemlenmiştir. Ek olarak, RSK3 ve RSK4 izoformları için homoloji modelleri yapılmıştır. Sonuç olarak, gerçekleştirilen *in siliko* ve *in vitro* çalışmalar sonraki çalışmalara öncülük edebilecektir.

Anahtar Kelimeler: p90RSK ailesi, ÜNMK, Sanal Tarama, Moleküler Yerleştirme, Homoloji Modelleme

ABSTRACT

Identification of Potential Ribosomal Protein S6 Kinase (RSK) Inhibitors for Breast Cancer Therapy with *In Silico* Screening and Investigation of *In Vitro* Activity

Sevil KALIN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Medical System Biology

Supervisor: Assist. Prof. Ferah CÖMERT ÖNDER, Ph.D.

16/01/2023, 110

The 90 kDa Ribosomal S6 Kinase family is a group of highly conserved Ser/Thr kinases that are downstream effectors of the Ras-MAPK signaling pathway. Each isoform of the p90RSK family which consists of four isoforms (RSK1-4), has NTKD and CTKD kinase domains. P90RSKs which are involved in the regulation of various cellular signaling pathways, regulate cell survival, growth, motility, and proliferation by phosphorylating many nuclear and cytosolic targets. The expression and activity of RSK have been found to be dysregulated in many malignant tumors including breast, prostate, and lung cancers. Thus, RSK has become an attractive therapeutic target. Therefore, within in the scope of this thesis, the determination of new potential inhibitor candidates for RSK-targeted cancer treatment by using *in silico* virtual screening and molecular modeling methods was carried out using GLIDE/SP and CDOCKER and Libdock algorithms with the help of Schrödinger and Discovery Studio programs. Potential inhibitors of RSK1 and RSK2 were identified when *in silico* results were compared with standards. *In vitro* efficacy studies of identified inhibitor candidates were performed using MDA-MB-231, BT-549, BT20 and MCF7 cell lines. According to the results obtained from *in silico* data, colony formation inhibition, cytotoxicity, and cell migration inhibitory effects of leflunomide, carvedilol, ticagrelor, rutin, catechin, and quercetin compounds were observed in breast cancer cell lines. In addition, homology models for RSK3 and RSK4 isoforms have been performed. As a result, *in silico* and *in vitro* studies performed may lead to further studies.

Keywords: p90RSK family, TNBC, Virtual Screening, Molecular Docking, Homology Modelling

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	iv
ETİK BEYAN.....	v
ÖNSÖZ.....	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	İx
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

4

2.1. <i>In Siliko</i> Yaklaşımlar.....	4
2.1.1. Ligand- ve Yapı-Esaslı İlaç Tasarımı.....	5
2.1.2. <i>In Siliko</i> Sanal Tarama Çalışmaları.....	5
2.1.3. İlaç Benzerliğini Tanımlama.....	6
2.1.4. Moleküler Yerleştirme.....	8
2.1.5. Homoloji Modelleme.....	9
2.2. Üçlü Negatif Meme Kanseri.....	12
2.3. p90 Ribosomal Protein S6 Kinaz (RSK) Ailesi.....	14
2.4. p90 Ribosomal Protein S6 Kinaz (RSK) Ailesi ve Üçlü Negatif Meme Kanseriindeki Rolü.....	15
2.4.1. RSK1.....	16
2.4.2. RSK2.....	17
2.4.3. RSK3.....	18
2.4.4. RSK4.....	19

2.5.	Bilinen Bazı p90RSK İnhibitörleri ve Kanser İlişkisi.....	20
2.5.1.	PMD-026.....	21
2.5.2.	SL0101.....	21
2.5.3.	BI-D1870.....	22
2.5.4.	LJH685 ve LJ308.....	23
2.5.5.	FMK.....	24
2.5.6.	BRD7389.....	24
2.5.7.	Diğer p90RSK İnhibitörleri.....	24
2.6.	RSK1 Hedefine Yönelik Gerçekleştirilen <i>In Siliko</i> Çalışmalar.....	25
2.7.	RSK2 Hedefine Yönelik Gerçekleştirilen <i>In Siliko</i> Çalışmalar.....	27
2.8.	RSK2 İlişkili Diğer İnsan Hastalıklarına Yönelik İnhibitörü.....	29
2.9.	ÜNMK Hücre Hatları.....	30
	ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	31
	MATERYAL YÖNTEM	
3.1.	MATERYAL.....	31
3.2.	YÖNTEM.....	32
3.2.1.	<i>In Siliko</i> Çalışmalar.....	32
3.2.2.	<i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	35
	DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	38
	ARAŞTIRMA BULGULARI	
4.1.	<i>In Siliko</i> Çalışmalar.....	38
4.1.1.	Ligand Esaslı İlaç Tasarımı.....	38
4.1.2.	Yapı Esaslı İlaç Tasarımı.....	53
4.1.3.	Homoloji Modelleme.....	58
4.2.	RSK2 İlişkili Diğer İnsan Hastalıklarına Yönelik Aday Terapötikler.....	66
4.3.	<i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	68
4.3.1.	Koloni Oluşumu İnhibisyonu ve Çoğalması.....	69
4.3.2.	MTT Testi.....	72
4.3.3.	Hücre Göçü Analizi.....	79

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER

81

KAYNAKÇA

88

EKLER

I

EK Tablo

I

Ek Tablo 1	FMK farmakofor model esaslı RSK1-CTKD (PDB:3RNY) ve ChemDiv veri tabanı triazol kütüphanesi moleküler yerleştirme sonuçları.....	I
Ek Tablo 2	FMK farmakofor modeli esaslı RSK1-CTKD (PDB:3RNY) ve ChemDiv veri tabanı indol kütüphanesi moleküler yerleştirme sonuçları.....	I
Ek Tablo 3	FMK farmakofor modeli esaslı RSK2-CTKD (PDB:4D9T) ve Chemdiv veri tabanı indol kütüphanesi moleküler yerleştirme sonuçları.....	II
Ek Tablo 4	FMK farmakofor modeli esaslı RSK2-CTKD (PDB:4D9T) ve Enamine veri tabanı protein mimetics kütüphanesi moleküler yerleştirme sonuçları.....	II
Ek Tablo 5	RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) ve Apexbt veri tabanı ile moleküler yerleştirme sonuçları.....	II
Ek Tablo 6	RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ilaç yeniden konumlandırma çalışması moleküler yerleştirme sonuçları.....	III
Ek Tablo 7	RSK1-NTKD (PDB:2Z7R) ve ChEMBL veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	III
Ek Tablo 8	RSK1-NTKD (PDB:2Z7R) ve Apexbt veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	IV
Ek Tablo 9	RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) ve Apexbt ve ChEMBL veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	IV
Ek Tablo 10	LJH685 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve Apexbt ve Drugbank veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	V
Ek Tablo 11	RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve ChemDiv veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	V
Ek Tablo 12	RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve Apexbt veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	VI
Ek Tablo 13	RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve çeşitli veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	VI

Ek Tablo 14	BI-D1870 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve InterBioScreen veri tabanı natural compound kütüphanesi ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	VI
Ek Tablo 15	BI-D1870 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve OTAVA veri tabanı drug-like green collection kütüphanesi ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	VII
Ek Tablo 16	BI-D1870 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve OTAVA veri tabanı in-house stock kütüphanesi ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	VII
Ek Tablo 17	RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve Drugbank veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	VIII
Ek Tablo 18	RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve InterBioScreen veri tabanı natural compound kütüphanesi ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları...	VIII
Ek Tablo 19	SL0101 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:3UBD) ve çeşitli veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	IX
Ek Tablo 20	BIX02565 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve çeşitli veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları.....	IX
Ek Tablo 21	Protein mimetics ADMET/RO5 sonuçları.....	X
Ek Tablo 22	Triazol ADMET/RO5 sonuçları.....	XI
Ek Tablo 23	RSK1 İndol türevleri ADMET/RO5 sonuçları.....	XII
Ek Tablo 24	RSK2 İndol türevleri ADMET/RO5 sonuçları.....	XIII
Ek Tablo 25	Protein mimetics toksisite sonuçları.....	XIV
Ek Tablo 26	Triazole toksisite sonuçları.....	XV
Ek Tablo 27	İndol türevleri toksisite sonuçları.....	XVI
EK Şekil		X
		VII
Ek Şekil 1.	RSK1(3RNY)-ligand kompleksi 2B etkileşim diyagramı (Triazol).....	X
		VII
Ek Şekil 2.	RSK1(3RNY)-ligand kompleksi 2B etkileşim diyagramı (indol türevleri).....	XX
Ek Şekil 3.	RSK2(4D9T)-ligand kompleksi 2B etkileşim diyagramı (indol türevleri).....	XX
		III
Ek Şekil 4.	RSK2(4D9T)-ligand kompleksi 2B etkileşim diyagramı (protein mimetics).....	XX
		VI

SİMGELER VE KISALTMALAR

ÜNMK	Üçlü Negatif Meme Kanseri
RSK 1	Ribozomal protein S6 Kinaz 1
RSK 2	Ribozomal protein S6 Kinaz 2
RSK 3	Ribozomal protein S6 Kinaz 3
RSK 4	Ribozomal protein S6 Kinaz 4
BDİT	Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
LEİT	Ligand Esaslı İlaç Tasarımı
YEİT	Yapı Esaslı İlaç Tasarımı
PDB	Protein veri bankası
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MDA-MB-231	Üçlü Negatif Meme Kanseri hücre hattı (insan)
BT-20	Üçlü Negatif Meme Kanseri hücre hattı (insan)
BT-549	Üçlü Negatif Meme Kanseri hücre hattı (insan)
MCF7	ER+ Meme Kanseri hücre hattı (insan)
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyen kinaz
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinazlar
AKT	Protein kinaz B
PDK1	Piruvat dehidrojenaz kinaz 1
µM	Mikromolar
nM	Nanomolar
Aa	Aminoasit

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Lipinski'nin 5 (Ro5) kuralı.....	7
Tablo 2	p90RSK ailesi izoformlarının bazı kristal yapıları.....	10
Tablo 3	<i>In siliko</i> belirlenen ve <i>in vitro</i> çalışılan ilaç etken maddeleri ve doğal ürünlerin toplu sonucu.....	87



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Tez iş akışı şematik gösterimi.....	3
Şekil 2	BDİT iş akışı şematik gösterimi.....	11
Şekil 3	İnsanda dört p90RSK izoformunun alan yapısı.....	13
Şekil 4	RSK2 aktivasyon modeli.....	14
Şekil 5	MAPK ve PI3K yollarının basitleştirilmiş şeması.....	16
Şekil 6	Bazı RSK inhibitörlerinin moleküler yerleştirme pozları.....	26
Şekil 7	Bazı antikanser etki gösteren p90RSK inhibitörlerinin açık yapıları.....	27
Şekil 8	BI-D1870 ve türevlerinin RSK2-NTKD ile moleküler yerleştirmesi.....	29
Şekil 9	ÜNМК hücre hatlarının mikroskopik görüntüleri.....	30
Şekil 10	BI-D1870 farmakofor modeli.....	39
Şekil 11	BRD7389 farmakofor modeli.....	39
Şekil 12	FMK farmakofor modeli.....	40
Şekil 13	LJH685 farmakofor modeli.....	40
Şekil 14	SL0101 farmakofor modeli.....	41
Şekil 15	A) RSK1-CTKD ve Ticagrelor kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.....	46
Şekil 16	A) RSK1-CTKD ve Karvedilol kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.....	47
Şekil 17	A) RSK2-CTKD ve Ticagrelor kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.....	48
Şekil 18	A) RSK2-CTKD ve Karvedilol kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.....	49
Şekil 19	3UBD ve yerleşen ligandların kompleksi.....	52

Şekil 20	3UBD ve ko-kristal ligandı ile karşılaştırmalı kurdela modelleri. A) SL0101, B) Kersitrin, C) Rutin hidrat.....	52
Şekil 21	A) RSK2-NTKD ve Leflunomid kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.....	54
Şekil 22	A) N1842 (Turuncu), Kersetin (Yeşil) ve Kateşin (Mavi) bileşiklerinin 4NUS ile kompleksi. B) Taksifolin 2B etkileşim diyagramı. C) Kateşin 2B etkileşim diyagramı. D) Kersetin 2B etkileşim diyagramı.....	56
Şekil 23	RSK3-NTKD için Z-skor değeri.....	59
Şekil 24	RSK3-NTKD için Ramachandran Plot grafiği.....	60
Şekil 25	RSK3-NTKD homoloji modeli.....	60
Şekil 26	RSK4-CTKD için Z-skor değeri.....	61
Şekil 27	RSK4-CTKD için Ramachandran Plot Grafiği.....	62
Şekil 28	RSK4-CTKD homoloji modeli.....	62
Şekil 29	RSK3-NTKD homoloji modeli.....	63
Şekil 30	RSK4-CTKD homoloji modeli.....	64
Şekil 31	RSK3-NTKD 3D modeli ve BRD7389'un bağlanma bölgesine yerleşmesi.....	64
Şekil 32	RSK3-NTKD-BRD7389 etkileşimleri.....	65
Şekil 33	RSK4-CTKD 3D modeli ve FMK'nın bağlanma bölgesine yerleşmesi.....	65
Şekil 34	RSK4-CTKD- FMK etkileşimleri.....	66
Şekil 35	A) BIX02565'in açık yapısı. B) BIX02565 ligandının farmakofor modeli ve özellikleri.....	67
Şekil 36	Karvedilol, leflunomide, ticagrelor, kersetin ve rutin bileşiklerin ÜNMK MDA-MB-231 hücre hattında koloni oluşumu üzerine inhibisyonu.....	69
Şekil 37	Kateşin, leflunomide, karvedilol, ticagrelor ve kersetin için ÜNMK BT-549 hücre hattında koloni oluşumu inhibisyonu etkisi.....	70
Şekil 38	Kersetin ve leflunomide bileşiklerinin ER+ MCF7 hücre hattında koloni inhibisyonu.....	71

Şekil 39	Bileşiklerin kombinasyonu ile ÜNМК hücre hatlarında koloni oluşumu inhibisyonu. A) MDA-MB-231, B) BT-549.....	72
Şekil 40	Kersetin ile ÜNМК MDA-MB-231 hücre hattı için 72 saat sitotoksosite analizi.....	73
Şekil 41	Katesin ve rutin ile ÜNМК MDA-MB-231 hücre hattı için 48 saat sitotoksosite analizi.....	73
Şekil 42	SL0101, kersetin, karvedilol ve ticagrelor ile ÜNМК BT-549 hücre hattı için 72 saat sitotoksosite analizi.....	74
Şekil 43	Rutin ve katesin ile ÜNМК BT-20 hücre hattı için 24 saat sitotoksosite analizi.....	75
Şekil 44	Kersetin, karvedilol ve SL0101 ile ÜNМК BT-20 hücre hattı için 24 saat sitotoksosite analizi.....	76
Şekil 45	Katesin ve rutin ile ÜNМК BT-20 hücre hattı için 24 saat sitotoksosite analizi.....	77
Şekil 46	Doksorubisin ve bileşikler ile MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatları için 48 ve 72 saat sitotoksosite analizleri.....	78
Şekil 47	Hücre göçü üzerine rutin (20 µM) ve leflunomidin (1 µM) kombinasyon sonuçları.....	80
Şekil 48	Hücre göçü üzerine karvedilolun (50 µM) etkisi.....	80

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Biyoinformatik, biyolojik veriler, matematik, yazılım mühendisliği ve bilgisayar teknolojilerini birleştiren disiplinler arası çalışmaları kapsar (Searls, 2000). 1970 Yılında Paulien Hogeweg isimli bir bilim insanı tarafından ilk defa biyoinformatik adı kullanılmıştır (Hogeweg, 2011). 21. Yüzyılın başlarında bilimde biyoinformatiğe duyulan ilgi 2001 yılında ortaya çıkan insan genom projesinden sonra artış göstermeye başlamıştır (Hogeweg, 2011). Günümüzde ise biyoinformatiğin bir alt dalı olan Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (BDİT)'na bağlı olarak potansiyel yeni ilaç adaylarının keşfi ve tasarımı için yapılan *in siliko* çalışmalar büyük önem kazanmıştır. Biyoaktif etkinliği bilinen veya bilinmeyen binlerce bileşik ve hedef arasındaki moleküller arası etkileşimler *in siliko* yöntemler ile aydınlatılabilmektedir. BDİT'in temeli binlerce aday molekülün düşük maliyet ve kısa bir zaman diliminde bilgisayar ortamında taranmasına ve hedefe yönelik bağlanma potansiyellerinin araştırılmasına yönelik çeşitli algoritmalara ve programlara dayanmaktadır. Böylece, hedefe yönelik araştırmalarda istenilen sonuçlara daha kısa bir zaman zarfında ulaşmak mümkün olabilmektedir. Bilgisayar ortamında taranan binlerce aday molekülün hedefe yönelik bağlanma potansiyellerinin araştırılması ile seçilen hit moleküllerin laboratuvar ortamına taşınması araştırmacıların başarı oranlarını arttırmaktadır. Kanser (Comert Onder vd., 2020, 2021a, 2021b, 2022; Mert, 2021), Covid-19 (Lazniewski vd., 2022), Alzheimer (Kumar vd., 2018; Comert Onder vd., 2022) gibi birçok hastalığın tedavisinde hedefe yönelik ilaç araştırmalarında *in siliko* yöntemlerden yararlanılmaktadır ve *in siliko* yöntemler büyük önem taşımaktadır.

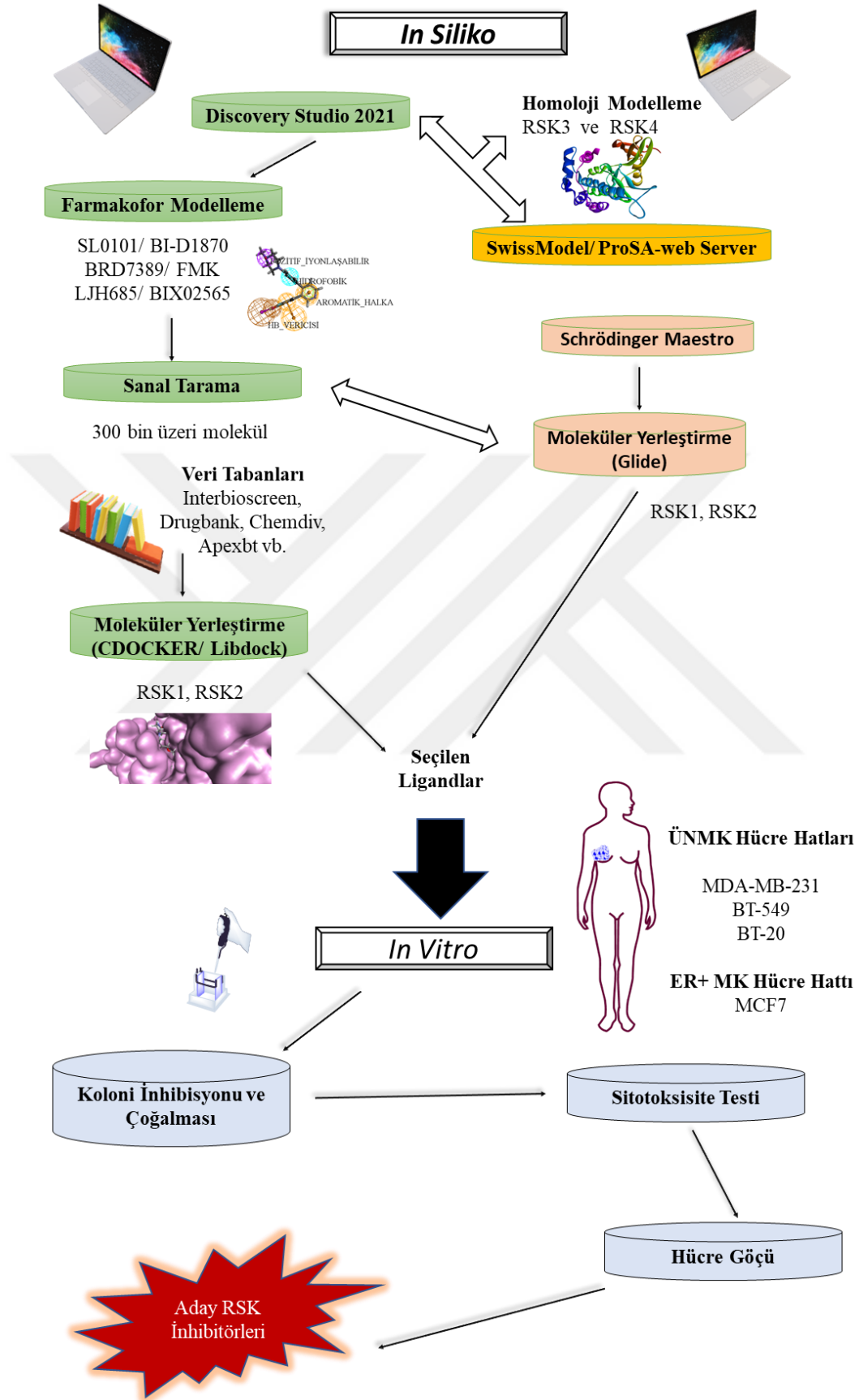
Hücre içi sinyal iletim yollarında rol alan 520'den fazla protein kinaz düzenleyicileri rapor edilmiştir (Blume-Jensen ve Hunter, 2001). Protein kinazların çoğunun bilinen tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin yukarı ya da aşağı akış efektörleri olarak rol oynadığı (Futreal vd., 2001) ve hareketlilik, bölünme, hücre farklılaşması, apoptoz gibi hücresel süreçlerin oluşumuna protein kinaz genlerinde meydana gelen değişikliklerin sebep olduğu bildirilmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2000). 4 Farklı izoformdan oluşan 90 kDa Ribozomal protein S6 kinaz (RSK) ailesi ise Ser/Thr protein kinazların bir grubudur. RSK'lar hücrede birçok sinyal yolağını düzenlerler ve biyolojik süreçler ile ilişkilidirler. Ras-MAPK

yolağının önemli aşağı akış yönlü efektörleri olarak RSK izoformlarının kanser için dikkat çekici birer terapötik hedef olduğu bildirilmiştir (Reipas vd., 2013; Romeo ve Roux, 2011; Sulzmaier ve Ramos, 2013). Bilinen RSK izoformlarının ifadesi ve aktivitesinin meme, prostat ve akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kötü huylu tümörde düzensiz olduğu rapor edilmiştir (Sung vd., 2021; Zhao vd., 2016; Houles ve Roux vd., 2018). Birden fazla sinyal yolağı üzerinde etkili olan p90RSK ailesi izoformları ile çalışmak kanserde ortak sinyal yolaklarını hedef alabilmek adına kanser terapi için son derece önem arz etmektedir. Bununla beraber, RSK inhibisyonu kanser tedavisinde umut verici bir terapötik stratejidir. RSK izoformlarının bilinen inhibitörleri olmasına rağmen bunların hiçbiri şu anda *in vivo* kullanım için uygun değildir (Youn vd., 2021). Bundan dolayı, kanser tedavisinde daha etkili ve spesifik RSK inhibitörlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Literatürde ihtiyaç olduğu bildirilen hedefe yönelik seçici RSK inhibitörlerinin belirlenmesi için *in siliko* çalışmalardan yararlanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında meme kanserindeki düzensizliği nedeniyle umut verici bir moleküler hedef olarak dikkat çeken RSK1 ve RSK2 için potansiyel seçici küçük molekül inhibitör adaylarının *in siliko* verilere dayanarak ortaya çıkartılması ve *in vitro* etkinliklerin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu tez çalışması sonrasında elde edilen *in siliko* sonuçlar ile protein-ligand arasındaki moleküller arası etkileşimler aydınlatılmıştır ve yeni moleküllerin tasarlanması için sonraki çalışmalara öncülük edilebilmiştir. RSK3-NTKD ve RSK4-CTKD için oluşturulan homoloji modeller sonraki *in siliko* çalışmalara örnek teşkil edebilecektir.

Sonuç olarak, ülkemizin öncelikli alanlarından biri olan Sağlık/Tıp/İlaç alanında RSK1 ve RSK2 hedefli meme kanseri tedavisi için önerilebilecek yeni inhibitör adaylarının *in siliko* yöntemler ile araştırılabilecek olması zaman kazancı ve maliyetin düşürülmesine de katkı sağlayabilecek olması bu tezin önemini ortaya koymaktadır.

Buna göre, bu tez çalışması kapsamında üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) tedavisi için RSK hedefine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar için iş akış şeması aşağıda verilmiştir.



Şekil 1. Tez iş akışı şematik gösterimi.

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kanser, kontrolsüz ve anormal hücre büyümesi olarak tanımlanan ve insan yaşamını kötü etkileyen ölümcül bir hastalıktır. Bu bölümde genel hatları ile *in siliko* yaklaşımlar ve p90RSK izoformları (1-4) anlatılmıştır. Ek olarak, *in siliko* yaklaşımların ve p90RSK ailesinin ÜNM kanserindeki önemine ve önceki çalışmalarına değinilmiştir.

2.1. *In Siliko* Yaklaşımlar

BDİT son yıllarda öncelikli alanlar araştırma konuları arasında yerini almıştır. Geleneksel ilaca giden yol, klinik öncesi ve klinik denemeleri içeren hem öncü bileşiklerin keşfi ve optimizasyonu hem de hedef belirleme ve doğrulama açısından riskli ve zaman alıcı bir süreçtir (Tang vd., 2006). Geleneksel ilaç tasarımının yeni bir ilacı piyasaya sürmek için yüksek maliyet (Paul vd., 2010), yetersiz ilaç emilimi, dağılımı, metabolizması, atılımı ve toksisitesi (ADMET) ve zayıf ilaç etkinliği (Giri ve Bader, 2015) ile sınırlamaları söz konusu olabilmektedir. BDİT ile yapılan çalışmalara artan ilginin temel sebepleri arasında geleneksel ilaç tasarımı ile karşılaştırıldığında zaman ve maliyeti azaltmaya yardımcı olması dolayısıyla, geleneksel ilaç tasarımında karşılaşılan sorunların en aza indirilebilecek olması yer almaktadır (Shaker vd., 2021). Bir diğer önemli husus bilgisayar ortamında çeşitli kimyasal kütüphanelerin taranmasıyla potansiyel ilaç adayları ve ilaç hedefleri arasındaki ilişkinin sayısal veriler, tahmini toksisiteleri ve optimizasyonları açısından *in siliko* değerlendirilerek *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara öncülük etmesidir (Shaker vd., 2021). BDİT yaklaşımları arasında yer alan Ligand-Esaslı İlaç Tasarımı (LEİT) (Vidal vd., 2011) ve Yapı-Esaslı İlaç Tasarımı (YEİT) (Jhoti ve Leach, 2007) hedef proteinin yapısı ve etkinliği bilinen ligand bilgisi ile ilişkilidir.

2.1.1. Ligand- ve Yapı-Esaslı İlaç Tasarımı

LEİT'in temel mantığı benzer biyolojik etkilere sahip yeni ilacı tahmin etmek için bilinen ilaçların fiziksel, yapısal ve kimyasal özellikleri gibi ön bilgilerini kullanmaya dayanmaktadır (Martin vd., 2002). LEİT benzerlik taraması, kantitatif yapı-aktivite ilişkisi ve farmakofor modelleme olarak sınıflandırılmıştır (Shaker vd., 2021). LEİT yöntemlerinden biri olan farmakofor modelleme ve farmakofor özellikler ilaç molekülünün genel yapısını anlamak için oluşturulmuş kavramlardır. İlaç bileşiğinin katalitik aktivitesinin belirlenmesi adına kullanılan farmakofor modelleri hidrojen bağı verici ve alıcı, hidrofobik bölge, iyonlaşabilir grup (pozitif-negatif) ve aromatik halka (Martin vd., 2002) gibi fizikokimyasal özellikleri içerir. Meme kanserine yönelik LEİT yaklaşımlarının kullanıldığı son yıllarda yapılan bazı çalışmalardan örnek olarak bahsedilmiştir. Buna göre, ÜNM kanserine yönelik yapılan bir çalışmada MELK hedef proteini üzerinden QSAR matematiksel modelleri oluşturulan partenolid türevlerinin standart ilaç olarak doksorubisine göre daha yüksek bağlanma ilgisi gösterdiği bildirilmiştir (Lawal vd., 2021). T47D meme kanserinde yüksek ifadeye sahip olan RON hedefi için bilinen inhibitörü LCRF-0004'ün yapısı esas alınarak benzerlik tarama çalışması rapor edilmiştir (Zarei vd., 2022).

LEİT'ten farklı olarak YEİT hedef proteinlerin kristal yapılarını kullanarak hedef proteinin bağlanma bölgesi ile ligandlar arasındaki bağlanma ilgisini hesaplamaya yönelik bir yaklaşımdır (Rognan, 2010). Meme kanseri ilişkili HER4/ErbB4 kinaz ve Er α protein hedeflerine yönelik çeşitli bitkilerin içerdikleri 62 tane doğal ürünün yapı esaslı sanal tarama çalışması yapılmıştır. ErB4 için -9,41 bağlanma ilgisi ile en iyi izopropiliden ve rografolid molekülü bildirilmiştir (Roy vd., 2022).

2.1.2. *In Siliko* Sanal Tarama Çalışmaları

Bilgisayar ortamında milyonlarca molekülü kapsayan sanal tarama çalışmaları için çeşitli kütüphaneler oluşturulmuştur. Sanal tarama stratejileri ligand ve hedef proteinin yapısal bilgilerine göre ligand- ve yapı-esaslı olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır (Vázquez vd., 2020). LEİT yaklaşımının alt basamağında yer alan ligand-esaslı sanal tarama etkinliği

bilinen liganda göre bilgisayar ortamındaki milyonlarca molekülün filtrelenmesi adına önemli bir basamaktır. Ligand-esaslı sanal tarama bilinen ligandın 3 boyutlu (3B) yapısı ve belirlenen fizikokimyasal özelliklerini esas alarak kütüphanelerdeki bileşiklerin bilinen ligandla olan moleküler benzerliklerine göre filtrelenmesini sağlamaktadır (Johnson ve Maggiora, 1990). Bununla beraber, YEİT yaklaşımın alt basamağında yer alan yapı-esaslı sanal tarama bilinen ligandından bağımsız olarak hedef proteinin 3B yapısı üzerindeki aktif bölgeye bağlanma ilgisi gösterebilen moleküllerin taranmasını sağlamaktadır. Meme kanserine yönelik yapılan sanal tarama çalışmalarında ZINC (Sohrab ve Kamal, 2022), ChEMBL ve ChEBI (İbrahim vd., 2022), InterBioScreen (Fu vd., 2022) gibi birçok veri tabanından yararlanılmıştır.

2.1.3. İlaç Benzerliğini Tanımlama

Bilgisayar ortamında yapılan bazı analizler moleküllerin insan sağlığı açısından zararı olup olmadığının bir göstergesini taşımaktadır. Bunlar arasında en başta ADMET (Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Atılım ve Toksisite), Lipinski ve Veber kuralları ve Toksisite testleri gelmektedir. ADMET tanımlayıcı parametreleri kan-beyin bariyeri (BBB), hepatoksisite, plazma protein bağlanması (PPB), sulu çözünürlük, CYP2D6, insan bağırsak emilim (HIA) olarak sıralanabilir (Pannon vd., 2013). Piyasaya çıkma sürecindeki aday ilaçlarda görülen sorunlar genelde istenmeyen toksisite ve farmakokinetik gibi problemlerdir. Bu sorunların erken bir şekilde belirlenmesi ilaç geliştirilmesi sürecinde son derece avantajlı olmaktadır. ADMET tahminlerinin *in siliko* olarak belirlenmesi aday ilaç moleküllerinin vücuda olan toksik etkilerinin ya da aktif olmayan başka metabolitlerinin oluşması ve hücre membranını geçemeyecek olanların belirlenmesidir. Bu sürecin bilgisayar ortamında yapılması ilaç adaylarının farmakokinetik profillerinin belirlenmesinde zaman açısından büyük kazanç sağlamaktadır (Pannon vd., 2013).

Lipinski'nin beş kuralı (Ro5) aday ilaç moleküllerinin ilaca olan benzerliklerini saptamak adına moleküler tanımlayıcı olarak kullanılan kurallardır (Lipinski vd., 2001). Bu kuralların, olası bir ilaç adayının etkinliğinin yanı sıra seçiciliğini artırmak içinde kullanılması gereklidir ve aday ilaçların fizikokimyasal özelliklerini belirleyerek ilaç

tasarımında yardımcı olabilmektedir (Chowrasia vd., 2021). Tablo 1’de Lipinski’nin beş kuralı (Ro5) verilmiştir.

Ames mutajenite (Ames mutagenicity (AMES)), Kemirgen karsinojenite (Rodent carcinogenicity (based on the U.S. National Toxicology Program (NTP) dataset)) ve Geliştirilen toksisite potansiyeli (Developmental Toxicity Potential (DTP)) gibi çeşitli toksisite testleri *in siliko* yöntemler ile yapılması mümkündür. Yapılan bu toksisite testlerinin amaçları doğrultusunda *in siliko* belirlenen öncü moleküllerin toksik ve mutajen etkilere sahip olup olmadıkları ileri *in vivo* çalışmalarında kemirgen sınıflarına karsinojen etki yaratıp yaratmadıkları gibi parametreler ile değerlendirilebilmektedir. Birkaç çalışmada bu testler Discovery Studio programında TOPKAT modülü ile gerçekleştirilmiştir (Wu vd., 2021; Zhong vd., 2022). Meme kanserinde ilaç benzerliğini tanımlamak adına sentezledikleri 4-oksokuinolin-3-karboksamit asiklonükleosit fosfanat hibritleri ile MCF7 hücre hattında *in vitro* çalışılmış ve toksisite değerleri *in siliko* hesaplanan bir molekül (15g) için öncü yeni ve potansiyel antikanser ajan olabileceği bildirilmiştir (Machado vd., 2022). HER2’ye yönelik bir çalışmada inhibitörlerini belirlemek için moleküller ADMET, Lipinski ve AMES gibi ilaç benzerlik testlerinden geçirilmiştir (Sohrab ve Kamal, 2022).

Tablo 1

Lipinski’nin 5 (Ro5) kuralı

(Özkan,2019)

No	Lipinski’nin 5 kuralı
1	Bileşik 10'dan az H-bağ alıcısına sahip olması (total Azot ve Oksijen atomları) Bileşiğin 5'ten az H-bağ vericisine sahip olması (total NH ve OH grupları)
2	Bileşik LogP değerinin 5'ten az olması
3	Bileşik moleküler ağırlığı 500'den az olması
4	Dönebilen bağ sayısının 10'dan az olması
5	Kutuplaşmış yüzey alanı (TPSA) Å ² ‘nin 140 Å ² ’den küçük olması

2.1.4. Moleküler Yerleştirme

Moleküler yerleştirme hedef makromolekül ile moleküllerin etkileşimini incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Moleküler yerleştirme anahtar-kilit modelini (Morrison vd., 2006) kullanarak ligand- ve yapı-esaslı sanal tarama yaklaşımları ile belirlenen moleküllerin hedef protein ile bağlanma ilgisinin belirlenmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, ligand ve proteinin en uygun konformasyonlarının simülasyonunda proteinlerin ve ligandların serbest enerjilerini en aza indirerek en kararlı yapının elde edilmesine olanak tanımaktadır (Morris ve Lim-Wilby, 2008; Audie ve Scarlata, 2007). Moleküler yerleştirme çalışmaları için çeşitli yazılımlar ve algoritmalar geliştirilmiştir. Yaygın olarak kullanılan moleküler yerleştirme yazılımlarından bazılarını Autodock (Morris vd., 2009), Autodock Vina (Trott ve Olson, 2010), CDOCKER ve LibDock (Lv vd., 2021)), Glide (Halgren vd., 2004), Gold (Verdonk vd., 2003), RDOCK (Li vd., 2003), ZDOCK (Chen vd., 2003) örnek olarak verilebilir. Moleküler yerleştirme sıkı yerleştirme, esnek yerleştirme, esnek-sıkı yerleştirme olarak sınıflandırılmaktadır (Fan vd., 2019). Glide yazılımı alan bilgisini kullanarak ekstra hassasiyet (XP-extra precision), standart hassasiyet (SP- standard precision) OPLS (Optimized potentials for liquid simulations) kuvvet alanı ile esnek yerleştirme olanağı sağlamaktadır (Halgren vd., 2004). CDOCKER yazılımı ise CHARMm (Chemistry at Harvard macromolecular mechanics) kuvvet alanını kullandığı bildirilmiştir (Wu vd., 2003). Bununla beraber Libdock yazılımının sıkı yerleştirme ve CDOCKER yazılımının yarı esnek olarak moleküler yerleştirmede kullanıldığı bildirilmektedir (Lv vd., 2021). Bir çalışmada MDA-MB-231 hücre hattındaki ishal önleyici Loperamide için moleküler mekanizması *in vitro* ve *in silico* yöntemler ile MDR1 ve JNK1 hedeflerine yönelik aydınlatılmıştır (Elia vd., 2022). Benzer bir çalışmada hedef olarak kullanılan p-glikoprotein ile doğal bir ürün olan Glabratephrin arasındaki bağlanma etkileşimleri fenilalanin 322, glutamin 721 amino asit (aa) kalıntıları üzerinde belirlenmiştir ve bağlanma enerjisi -10,95 kkal/mol olarak hesaplanmıştır (Abd-Ellatef vd., 2022). Meme kanserinde önemli bir hedef olan HER2'ye karşı ZINC43069427 ve ZINC95918662 bağlanma enerjileri sırasıyla -11.0 kkal/mol ve -8.50 kkal/mol olarak bildirilmiştir. Bununla beraber Lapatinib ile karşılaştırıldığında Asp863, Thr798, Leu726, Gly804 vb. aa kalıntılarında ortak etkileşimleri rapor edilmiştir (Sohrab ve Kamal, 2022).

2.1.5. Homoloji Modelleme

Bir proteinin *in siliko* olarak çalışılabilmesi için kristal yapısının olmadığı durumlarda öncelikle homoloji modelinin tanımlanmış olması gerekmektedir. 3 Boyutlu (3B) yapılarının tahmini için çeşitli homoloji modelleme algoritmaları geliştirilmiştir (Wiltgen, 2018). MODELER, SwissModel, Mod web ve Phyre2 programları aracılığıyla homoloji modellerin yapılması mümkün olabilmektedir (Shaker vd., 2021; Wiltgen, 2018). İlaç tasarımı ve geliştirilmesi için yeni hedeflerin 3B yapılarını literatüre kazandırmak yeni hedeflere yönelik çalışmalara öncülük etmektedir. Bu durum, homoloji modellemenin BDİT yaklaşımları için önemini ortaya koymaktadır. Protein Veri Bankası (PDB) homoloji modellemesi için şablon olarak kullanabileceğimiz 3B yapı elde etme imkanı sunmaktadır (<https://www.rcsb.org/>).

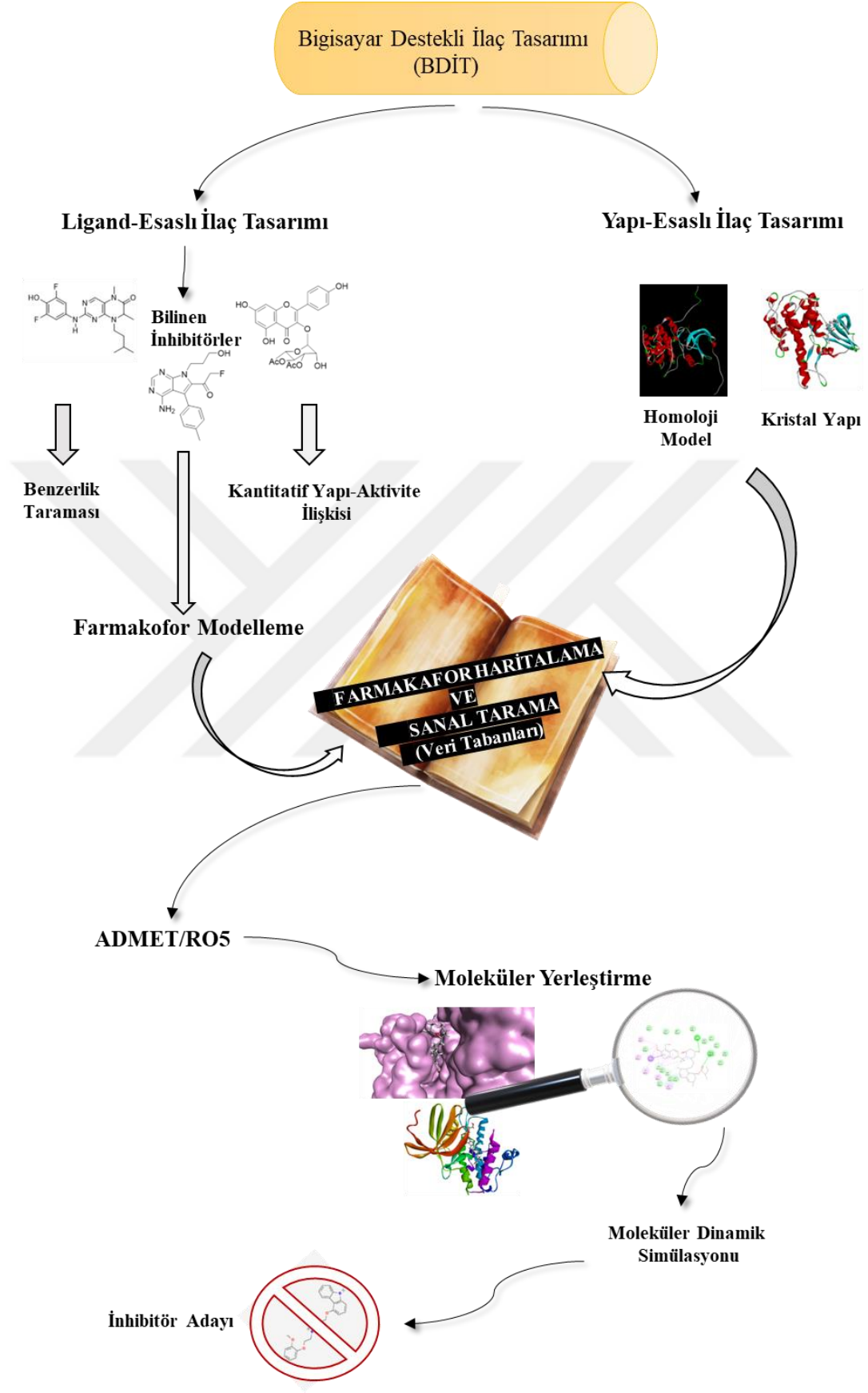
p90RSK ailesi her iki uç kinaz alanlarına bağlanabilme potansiyeline sahip özel bir protein kinaz grubudur. Hücre içi sinyal yollarının ortak bileşen proteini olan RSK izoformlarının aktivasyonlarını durdurmak adına hem C-uç hem de N-uç homoloji modellerini belirlemek sinyal yollarını inhibe edebilmek adına son derece kritiktir. NTKD AGC ailesi grubundan iken CTKD CAMK ailesine aittir. 1995 yılında Zhao ve arkadaşları insandan izole ettikleri RSK3 sekansını rapor etmişlerdir (Zhao vd., 1995). Bu sekans NCBI veri tabanında NP_066958.2 ribosomal protein S6 kinase alpha-2 isoform a [Homo sapiens] dizisi olarak yer almaktadır. Jagilinki ve arkadaşları 2016 yılında aynı sekansı kullanarak RSK3 izoformu C-uç kinaz alanı için 2WNT PDB kodunu şablon olarak kullanarak modeller programı ile homoloji model oluşturduklarını bildirmişlerdir (Jagilinki vd., 2016). Ek olarak, bir çalışmada 4JG8 kristal yapısı kullanılarak RSK3-CTKD homoloji modeli Schrödinger programı aracılığıyla oluşturulmuştur (Yoon vd., 2021). Buna göre PDB’de p90RSK ailesinin RSK1, RSK2 ve RSK4 izoformlarına ait rapor edilen bazı kristal yapıları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2

Aşağıdaki tabloda p90RSK ailesi için rapor edilen bazı kristal yapıları verilmiştir.

PDB Kod	Tanımı	Çözünürlük	Kaynak
2Z7Q	AMP-PCP'ye bağlı insan RSK1'in <i>N</i> -uç kinaz alanının kristal yapısı	2 Å	Ikuta vd., 2007
3RNY	İnsan RSK1 <i>C</i> -uç kinaz alanının kristal yapısı	2.7 Å	Li vd., 2012
4NUS	LJH685 ile kompleks RSK2 <i>N</i> -uç kinaz alanı	2.39 Å	Aronchick vd., 2014
3G51	p90 ribosomal S6 kinaz 2'nin <i>N</i> -uç kinaz alanının aktif konformasyonunun yapısal çeşitliliği	1.8 Å	Malakhova vd., 2009
4NW6	2-Amino-7-süstitüe benzoksazol bileşik 27 ile kompleks RSK2 <i>N</i> -uç kinaz alanı	1.74 Å	Costales vd., 2014
4D9T	(E)-Metil 3-(4-amino-7-(3-hidroksipropil)-5-p-tolil-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-6-il)-2-siyanoakrilat inhibitörü ile RSK2 <i>C</i> -uç kinaz alanı	2.4 Å	Serafimova vd., 2012
6G78	AMP-PNP ile kompleks RSK4 <i>N</i> -uç kinaz alanı S232E	2.5 Å	Chrysostomou vd., 2021
6G77	AMP-PNP ile kompleks RSK4 <i>N</i> -uç kinaz alanı	2.499 Å	Chrysostomou vd., 2021

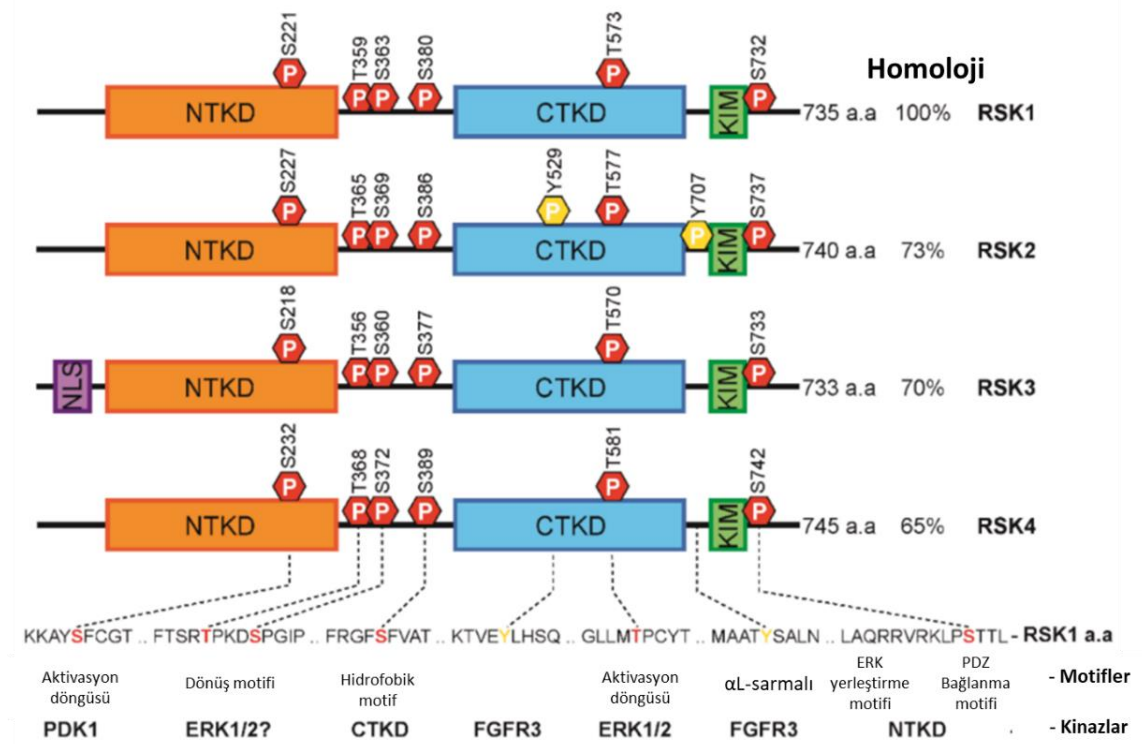
Buraya kadar anlatılan çalışmalar için şematik bir gösterimi aşağıda verilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. BDİT iş akışı şematik gösterimi.

2.2. p90 Ribosomal Protein S6 Kinaz (RSK) Ailesi

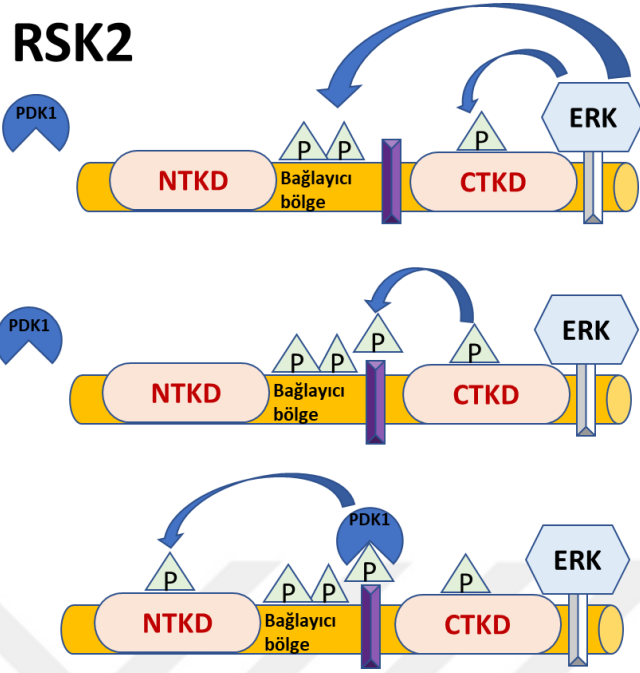
p90RSK ilk kez bir kurbağa türü olan *Xenopus laevis* oositlerinde 40S ribozomal alt birimini fosforile eden hücre içi protein S6 kinaz olarak keşfedilmiştir (Erikson and Maller, 1985). Moller ve arkadaşları tarafından 1994 yılında insandaki RSK izoformları tanımlanmıştır (Moller vd., 1994). p90RSK ailesi Ser/Thr protein kinazların bir grubudur ve memelilerde RSK1, RSK2, RSK3 ve RSK4 olmak üzere 4 izoformu rapor edilmiştir (Mao vd., 2022). RSK'lar, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazın (ERK) aşağı akış efektörleridir ve çoğalma, hareketlilik, farklılaşma, hayatta kalma ve tümörigenez düzenlenmesi dahil olmak üzere Ras/MAP kinaz yolunun biyolojik işlevlerine aracılık ettikleri bildirilmiştir (Gawecka vd., 2012; Houles ve Roux, 2018; Lara vd., 2012). Ayrıca, RSK'lar birçok nükleer ve sitosolik hedefleri fosforile ederek çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde yer alırlar (Clark vd., 2005). RSK'lar kansere neden olan iç ve dış etkenler sinyalleri çekirdeğe iletmek için MAPK sinyal kaskatını aktive ve modüle eder (Cho, 2007). Anahtar bir sinyal yolağı olan MAPK yolağı, normal hücre hayatta kalması, çoğalması, büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol alır. Ras-MAPK sinyal yolundaki sinyal bileşenlerinin birçoğunda gözlenen mutasyonlar veya aşırı ifadesi ile çeşitli insan hastalıklarının ve kanserlerinin ayırt edici özelliği olmasından dolayı yoğun araştırmaların konusu olmuştur (Anjum ve Blenis, 2008). RSK izoformları, yaklaşık 100 amino asit bağlayıcı bölge ve amino- ve karboksil- uç kısımları tarafından ayrılan iki özdeş olmayan kinaz alanı ile benzer bir genel yapıya sahiptir. Bu durum izoformları yapısal olarak benzersiz kılmaktadır. N-uç kinaz alanı (NTKD)'nın AGC protein kinaz ailesi ile yakından ilişkili olduğu diğerinin ise C-uç kinaz alanı (CTKD) kalmodulin protein kinaza (CAMK) homolog olduğu bildirilmiştir (Houles ve Roux, 2018; Smith vd., 2005; Romeo vd., 2012; Ikuta vd., 2007). Dört RSK izoformunda, düzenleyici bir bağlayıcı alanla bağlanan NTKD ve CTKD içerir (Casalvieri vd., 20017; Fisher ve Blenis, 1996). RSK, en uç karboksil ucunda ERK için bir yerleştirme yeri içerir ve RSK'nın ERK fosforilasyonu için gereklidir (Smith vd., 1999). p90 RSK izoformlarının bir bağlayıcı bölge ile bağlanan iki fonksiyonel alanı CTKD ve NTKD verilmiştir (Şekil 3). Bununla beraber RSK'lar altı adet korunmuş fosforilasyon bölgesi ve C-uç kuyruğunda ERK 1/2 yerleştirme alanı olan PDZ-bağlama motifi ve KIM motifi içerdikleri rapor edilmiştir (Youn vd., 2021).



Şekil 3. İnsanda dört p90RSK izoformunun alan yapısı.

(Youn vd., 2021)

RSK2 izoformu için rapor edilen aktivasyon döngüsü şu şekildedir. ERK, RSK2-CTKD üzerinde bulunan MAPK yerleştirme bölgesine bağlanır ve bağlayıcı bölgedeki Ser369 ve Thr577'deki kalıntıları fosforile ederek CTKD aktivasyon döngüsünü başlatır. Thr577'nin fosforilasyonu daha sonra Ser386'yı fosforile ederek CTKD'yi aktive eder. Ser386'nın fosforilasyonu, aktivasyon döngüsünde Ser227'de NTKD'yi fosforile etmek için PDK1'i uyaran PDK1'in yerleştirilmesine izin verir. PDK1 daha sonra ayrışır ve pSer386, NTKD'yi aktif bir konformasyonda stabilize etmek için aktivasyon döngüsünde pSer227 ile koordine ederek kinaz aktivitesini uyarmak için sinerji oluşturarak NTKD'de bir fosfat bağlama bölgesini bağlar. Aktive edilmiş RSK2 çok çeşitli sitoplazmik ve nükleer substratları fosforile eder (Huynh vd., 2020a). Basitleştirilmiş RSK2 aktivasyon modeli Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. RSK2 aktivasyon modeli.

(Huynh vd., 2020a)

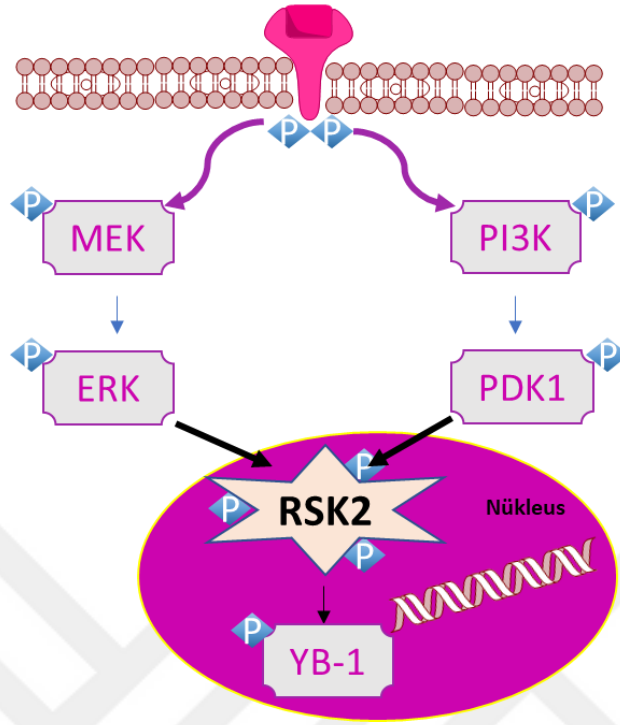
2.3. Üçlü Negatif Meme Kanseri

ÜNMK tüm meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturan en agresif alt tipidir. ÜNMK teşhisi, meme kanseri hücrelerinin büyümesini tetiklediği bilinen östrojen reseptörleri (ER), hormon epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2) ve progesteron reseptörleri (PR) için yapılan test sonuçlarının negatif çıkması ile konmaktadır. Genellikle meme kanserinin yüksek ölüm oranı, meme kanseri hücrelerinin metastazı ve ilaç direncinden kaynaklanmaktadır (Mamounas vd., 2012; Holohan vd., 2013) ÜNMK hücreleri bu reseptörlerden yoksun olduğu için hormon tedavileri ve belirtilen reseptörleri hedef alan ilaçlara olumlu yanıt vermedikleri bildirilmiştir <https://www.nationalbreastcancer.org/triple-negative-breast-cancer,2022>.

2.4. p90 Ribosomal Protein S6 Kinaz (RSK) Ailesinin Üçlü Negatif Meme Kanserindeki Rolü

p90RSK ifadesi ve etkinliğinin meme kanseri dahil olmak üzere birçok kötü huylu tümörde düzensiz olduğu bildirilmiştir (Sung vd., 2021; Zhao vd., 2016; Houles ve Roux vd., 2018). RSK (1-4) izoformlarının kanserlerde farklı ifade seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Zhao vd., 2016; Houles ve Roux, 2018; Clark vd., 2005; Lopez-Vicente vd., 2009). Bir çalışmada, RSK'nın östrojen reseptör ER+ meme kanserindeki terapötik önemine değinilmiştir (Faltas ve Holz, 2022). Birçok deneysel yaklaşımın bulguları p90RSK ailesini Ras/MAPK sinyal yolağının önemli bir aşağı regüle efektörü olarak açıkça ortaya koymaktadır. Bununla beraber, RSK'ların birden fazla insan hastalığındaki önemli rolleri olduğu giderek daha belirgin hale gelmektedir (Anjum ve Blenis, 2008). MAPK sinyal yolu ÜNМК'de oldukça aktiftir ve çalışmalar MAPK sinyal yolunun aşağı akış üyesi olan RSK2'nin ÜNМК için önemli bir ilaç hedefi olduğunu göstermektedir (Huynh vd., 2020a, 2020b). p90RSK izoformları MAPK ve PI3K gibi kanserdeki ana yolakları düzenledikleri için MAPK ve PI3K yolakları ile ilişkili şeması verilmiştir (Şekil 5). Buna göre MAPK ve PI3K sinyal yolakları RSK ve YB-1'in aktivasyonunda birleşmektedir. RSK2'nin fosforilasyonunda (P) yer alan bileşenleri ve aşağı akış hedeflerini göstermektedir. Büyüme faktörü ligandlarının hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasını takiben hem MAPK hem de PI3K yolakları aktive olur ve sitoplazmada aşağı akış substratları üzerinde bir dizi fosforilasyon olaylarının oluşmasına yol açar. Çoklu fosforilasyon bölgelerindeki Ser/Thr kalıntıları üzerinde fosforile olan aktifleştirilmiş RSK2, YB-1'i fosforile eder ve takibinde YB-1 çok çeşitli hücresel fonksiyonlarda yer alan genlerin transkripsiyonunu düzenler (Huynh vd., 2020a).

Büyüme Faktörü Reseptörleri (RTKs)



Şekil 5. MAPK ve PI3K yollarının şeması.

(Huyh vd., 2020a)

2.4.1. RSK1

p90RSK olarak bilinen p90 ribozomal S6 kinaz 1 (RSK1) dört p90RSK ailesi izoformundan biridir (Casalvieri vd., 2017; Anjum ve Blenis, 2008). RSK1, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazın (ERK1-2) doğrudan aşağı akış efektörüdür ve Ras/MAPK sinyal yolağında önemli bir rol oynar (Shimamura vd., 2000). RSK1 inhibisyonunun kanser hücrelerinde çoğalmayı engellediği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir. *In vivo* yapılan bir çalışmada RSK1 izoformunun ÜNMK kanserinin büyümesini ve metastatik yayılımını ve *in vitro* olarak hücre göçünü desteklediği rapor edilmiştir (Czaplinska vd., 2018). Aynı çalışmada ÜNMK tedavisi için anti-RSK1 bazlı terapötik stratejilerin geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Czaplinska vd., 2018). Ayrıca meme kanserine ek olarak RSK1'in kolon kanserinde aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir (Jin vd., 2020). Bununla birlikte RSK1 izoformunun düzensizliği pankreas kanseri (Cheng vd., 2021), lösemi (Watanabe vd., 2019),

servikal kanser (Mayer vd., 2021), akciğer kanseri (Lara vd., 2011), prostat kanseri (Shiota vd., 2014) gibi kanser türleri ile de ilişkilendirilmektedir.

2.4.2. RSK2

p90 Ribozomal protein S6 kinaz 2 (RPS6KA3, RSK2)'nin aşırı ifadesi, hematolojik ve epitelial kötü huylu tümörün birçok tipinin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Sulzmaier ve Ramos, 2013). Kanser tedavi yöntemlerinin arasında yer alan hedefe yönelik terapi kanser türüne bağlı olarak ilişkili kanser türünde aşırı ifade gösteren proteinlerin inhibisyonunu hedeflemektedir. RSK izoformlarından biri olan RSK2'nin lokal ileri meme kanserli hastaların %70'inde (Stratford vd., 2012) ve ÜNМК tümörlerinin %85'inde (Smith,2005) aktif olduğu bulunmuştur. Literatürde meme kanseri ile RSK2 arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yönelik birçok çalışma yer almaktadır (Mao vd., 2012; Zhao vd., 2021; Huynh vd., 2020a). MAPK/PDK1 sinyal yolağındaki bütünleyici rolü göz önüne alındığında, RSK metastatik ÜNМК için potansiyel bir kinaz hedefidir (Beeram vd., 2022). Bir çalışmada, H2A.X kinazı olarak Ser/Thr kinaz ribozomal S6 kinaz 2'nin (RSK2) Ser19 bölgesinde Akt tarafından fosforile edilebileceğini göstermiştir. Ayrıca Akt, H2A.X'in fosforilasyonunu inhibe etmek için RSK2'nin fosforilasyonunu pozitif olarak düzenlediğini, böylece RSK2 ile substrat histonu arasındaki ilgiyi etkileyerek meme kanseri hücrelerinin hayatta kalmasını ve göçünü teşvik ettiğini rapor etmişlerdir (Guo ve Kong, 2021). Bununla birlikte, RSK2'nin Akt aracılı fosforilasyonu H2A.X'in fosforilasyonunu düzenleyerek onkojenik aktiviteyi teşvik ettiğini ve bu bulgunun meme kanserinin patogenezi ve tedavi mekanizmalarını anlamak için yeni bakış açıları sağladığı bildirilmiştir (Guo ve Kong, 2021). Bir çalışmada, araştırmacılar RSK2'yi tümör hücrelerinde yeni bir otofaji kontrolcüsü olarak tanımlamışlardır. Bununla birlikte, meme kanseri hücrelerini otofaji ve ER stres yollarını kullanarak paklitaksel karşı daha duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Li vd, 2020). Stratford ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ÜNМК'de RSK2 inhibisyonunun tümör başlatan hücreleri ortadan kaldırarak hücre ölümünü teşvik ettiği rapor edilmiştir (Stratford vd., 2012). MCF7 meme kanseri hücrelerinde Her2/Erk1/2'nin artan ifadesi/ aktivasyonu ile RSK2'nin aktivasyonu, tipik olarak zayıf metastatik olan bu hücrelerde oldukça metastatik bir fenotip gelişimini desteklediği bildirilmiştir (Mao vd., 2012). RSK2, siRNA aracılığıyla diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla ÜNМК'nin büyümesi için önemli bir kinaz olarak

tanımlanmıştır. RSK2, ÜNМК içinde ideal bir moleküler hedef olarak belirlenmiştir (Huynh vd., 2020a). Aynı zamanda RSK2'nin yüksek ifadesi, meme kanserinde daha kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. RSK2'nin inhibe edilmesi meme kanserinin büyümesini engelleyebilir. Bu yüzden, RSK2 gibi meme kanserinde metastazı veya ilaç direncini etkileyen hedefler ile çalışmak meme kanseri tedavisini geliştirmek açısından son derece önem arz etmektedir. Sonuç olarak, RSK2 meme kanseri için ideal bir hedefdir. RSK2 izoformuyla ilgili  NМК (Zhao vd., 2021), servikal (Mayer vd., 2021), karaciğer (Liv d., 2019), mide (Wang vd., 2019) ve cilt (Zhao vd., 2021) gibi çeşitli kanser türlerinde *in siliko*  alışmaları mevcuttur. RSK2 ilişkili *in siliko*  alışmalar Bölüm 2.7 anlatılmıştır.

2.4.3. RSK3

p90 Ribozomal protein S6 kinaz A2 (RPS6KA2) olarak bilinen RSK3 izoformu hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynamaktadır (Pancholi ve diğerleri, 2008). RSK3, 6q27 kromozomu üzerinde yer alır ve kalp, beyin, kas ve akciğerde yüksek ifade düzeyine sahiptir (Moller vd., 1994). RSK3 izoformunun hücre döngüsü, hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşma gibi birçok hücresel süreci önemli bir efektör olarak düzenlediği bildirilmiştir (Wang vd., 2020; Romeo vd., 2012; Kwon vd., 2018). RSK3 izoformunun meme kanserinde aşağı yönlü düzenlendiği ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zhao vd., 2016). Bir çalışmada,  NМК'de MPN etki alanları 1 (MYSM1)'in RSK3'  baskıladığı, RSK3-fosfo-BAD yolu aracılığıyla hücresel apoptozu teşvik ederek çoğalmayı baskıladığı ve cis-platine karşı olan hücre direncinin azaldığı rapor edilmiştir (Guan vd., 2022). Ek olarak, RSK3 izoformunun yumurtalık kanserinde tümör baskılayıcı olduğu rapor edilmiştir (Bignone vd., 2007). RSK3 inhibisyonu pankreas kanserinde pro-apoptotik ve anti-proliferatif etkiler göstermiştir (Riedel vd., 2018). Öte yandan, RSK3 ve EGFR inhibitörlerinin kombine tedavisinin pankreas kanseri için kullanılabileceği bildirilmektedir (Riedel vd., 2018).

2.4.4. RSK4

p90 ribozomal S6 kinaz ailesinin bir Ser/Thr kinazı olan ribozomal S6 protein kinaz 4 (RSK4, RPS6KA6), X kromozomu (Xq21.1) üzerinde bulunur ve Ras/MAPK sinyal yolunun aşağı akışında önemli bir efektör olduğu gösterilmiştir (Sun vd., 2013). RSK4 izoformu için meme kanserindeki biyolojik rolünün tam olarak anlaşılamadığını ve çalışmaların arttırılması gerektiği vurgulanmıştır (Xu vd., 2021). Bir çalışmada RSK4 mRNA seviyesinin iyi huylu meme lezyonlarına göre invaziv meme karsinomunda yüksek oranda ifade edildiği bildirilmiştir (Thakur vd., 2007). Bazı çalışmalar, RSK4 inhibisyonunun meme kanserinde ilaç direncini tedavi edici terapötik etkisi olduğunu bildirmişlerdir (Serra vd., 2013; He vd., 2019). Öte yandan, Mei ve arkadaşları RSK4 izoformu için yüksek ifadesinin meme kanserinde PI3K/AKT sinyal yolağı aracılığıyla doksorubisin direncini tersine çevirdiğini bildirmişlerdir (Mei vd., 2020). Bu durum meme kanserinde RSK4 izoformunun hem onkogen hem de tümör baskılayıcı özellik gösterebileceğini düşündürmektedir. Akciğer ve mesane kanserleri ilaç direncinin erken gelişmesi ve metastatik yayılma nedeniyle çoğunlukla tedavi edilememektedirler. RSK4 akciğer ve mesane kanserleri için ilaç direnci ve metastazın destekleyicisi olarak tanımlanmıştır. RSK4 kinazın CRISPR yolu ile susturulması kanser hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirdiği ve *in vitro* ve *in vivo* deneylerinde metastazı engellediği rapor edilmiştir (Chrysostomou vd., 2021). Akut myeloid lösemide (AML) RSK4 ifadesinin sağlıklı bireylere göre önemli ölçüde düşük olduğu ve AML hastalarında RSK4 ifadesinin düşüklüğünün lösemiye yol açabileceği rapor edilmiştir (Rafiee vd., 2016). Ek olarak RSK4 izoformu böbrek (Ma vd., 2020; Ma vd., 2021), beyin (Chen vd., 2020), mide (Liang vd., 2020; Hu vd., 2020), kolorektal (Ye vd., 2018), tiroid (Yin vd., 2020), özofagus skuamöz hücreli karsinomu (Yuan vd., 2021) gibi çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir.

Genel olarak RSK izoformlarının işlevsel farklılıkları kanserde belirgindir. RSK1 ve/veya RSK2'nin ifadesi ve aktivitesi tümör büyümesini ve hayatta kalmasını desteklerken RSK3 ve RSK4 tümör baskılayıcılar olarak etki gösterdiği rapor edilmiştir (Bignone vd., 2007). Örneğin, RSK2'nin lokal ileri meme kanserli hastaların %70'inde (Stratford vd., 2012) ve ÜNMK tümörlerinin %85'inde (Smith vd., 2005) aktif olduğu bulunmuştur. Ayrıca, klinik sonuçlar meme kanserinde RSK1-3'ün aşırı ifade edildiğini göstermiştir (Zhao vd., 2016).

Bir çalışmada, ÜNM kanserinde cis-platin ilaç direncinin duyarlılığını arttırmak için RSK1 ve RSK2 izoformlarının hedeflenmesinin iyi bir strateji olacağı vurgulanmıştır (Jin vd., 2019). Özetle, RSK1 ve/veya RSK2 bir dizi kanserde yüksek seviyelerde ifade edilir ve tümör büyümesini ve hayatta kalmasını destekler. Bu nedenle, RSK1 ve RSK2 umut verici antikanser hedefleridir. RSK3 ve RSK4'ün genellikle tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği rapor edilmiştir ve tümörlerde ifade eksikliği kötü prognoz ile sonuçlanmaktadır (Houles ve Roux, 2018). Tüm bu sonuçlar, RSK aktivitesine bağlı olarak tümör hücrelerinin çoğalmasının RSK'nın tümör ilerlemesine karşı potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir.

2.5. Bilinen Bazı p90RSK İnhibitörleri ve Kanser İlişkisi

RSK'lar birçok kanser türünde etkiledikleri sinyal yolları aracılığıyla önemli roller oynarlar. Bugüne kadar, NTKD veya CTKD'yi hedef alan birkaç küçük molekül p90RSK inhibitörü tanımlanmıştır (Houles ve Roux, 2018; Casalvieri vd., 2017). Bunlar arasında SL0101, BI-D1870, BIX 02565, LJH685 ve LJH308 NTKD'nın yarışmalı inhibitörleri olarak davranırlar (Houles ve Roux, 2018; Sapkota vd., 2007; Hilinski vd., 2012). Florometilketon FMK, RSK1, RSK2 ve RSK4'ün CTKD'nın ATP-bağlanma bölgesindeki bir sistein kalıntısına tersinmez olarak bağlanır (Houles ve Roux, 2018; Casalvieri vd., 2017). Literatürdeki p90RSK inhibitörlerinin hiçbirinin RSK izoformları için seçicilik göstermediği (Houles ve Roux, 2018; Casalvieri vd., 2017) ve bu durumun sonuçlarının hem antitümör hem de pro-tümör etkilere yol açabileceği vurgulanmıştır (Smith vd., 2005; Dunn vd., 2020; Hilinski vd., 2012). Bununla birlikte, bunların hiçbirisi şu anda *in vivo* kullanım için yararlı olmadığı bildirilmiştir (Youn vd., 2021). Bu durum mevcut p90RSK inhibitörlerinin antikanser ajanlar olarak etkinliklerini sınırlayabileceği için RSK izoformları için hedefe yönelik seçici ve potansiyel moleküllerin belirlenmesi gerekmektedir. Aşağıda bazı antikanser etki gösteren p90RSK inhibitörleriyle ilgili yapılan çalışmalardan bahsedilmiştir.

2.5.1. PMD-026

PMD-026 şu anda RSK2 için bilinen metastatik ÜNМК'de faz I aşamasına geçmiş tek moleküldür (Beeram vd., 2022). PMD-026, RSK2'yi hedef alan ilk oral biyoyararlı küçük molekül inhibitörü olarak belirlenmiştir (Dunn vd., 2020). ÜNМК'yi tedavi etmek için geliştirilmiştir ve şu anda ileri meme kanseri için Faz 1/1b klinik denemesindedir (Beeram vd., 2022). PMD-026, RSK2 için yüksek seçiciliğe sahip faz1/b aşamasında olan tersinir ilk küçük molekül RSK1-4 inhibitörüdür (Huynh vd., 2020a; Dunn vd., 2020; Cho, 2007). Molekülün kimyasal yapısı için henüz literatürde bir bilgi yer almamaktadır. PMD-026, RSK ailesi izoformları için yüksek seçicilik gösterdiği ve *in vivo* deneylerde toksik etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (Dunn vd., 2020; Youn vd., 2021). Başka bir çalışmada, bu molekül için prostat kanseri üzerindeki kombine terapilerdeki etkisi araştırılmıştır (Ushijima vd., 2022). 22RV1 hücre hattında 72 saat için 2 µM Enzalutamide ve 5 µM PMD-026 ya da Darolutamide kombinasyonlarında sitotoksik etkilerinin tek başına PMD-026'dan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Ushijima vd., 2022). Jayanthan ve arkadaşları RSK2'nin HR+ meme kanserinin %80'inde ifade edilmesinden dolayı çalıştıkları T47D ve MCF7 hücre hattında *in vitro* büyümelerinin PMD-026'nın 3,7 ile 10,1 µM arasında değişen IC₅₀ değerlerinde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (Jayanthan vd., 2022).

2.5.2. SL0101

Flavonol rhamnoside SL0101, tropikal bitki *Fosteronia refrakta*'dan izole edilmiş hücre geçirgen bir kaemferol glikozittir. SL0101 tanımlanan ilk pan-RSK inhibitörüdür (Youn vd., 2021; Smith vd., 2007). SL0101 analogu olarak tasarlanan bileşiğin MCF7 meme kanseri hücre hattında SL0101'e göre 25 µM'da 2 kat daha iyi antiproliferatif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Mrozowski vd., 2013). SL0101'in MCF7 hücre hattındaki EC₅₀ değeri yaklaşık 50 µM olarak bildirilmiştir (Smith vd., 2005). Bu çalışmaya kıyasla SL0101'in bir analogu olan 3Ac-SL0101 bileşiğinin 25 µM'da MCF7 büyümesini inhibe ettiği ve normal meme epitel hücresi MCF-10A üzerinde inhibisyon göstermediği rapor edilmiştir (Smith vd., 2007). Bir diğer çalışmada analog olan C500-n-propil siklitol SL0101 bileşiğinin MDA-MB-231 hücre hattı için hayatta kalma veya çoğalmasını inhibe ettiği

bildirilmiştir (Ludwik vd., 2016). Bir çalışmada ise SL0101 molekülünün analogları başarılı bir şekilde geliştirilmiştir (Hilinski vd., 2012). SL0101 molekülünün RSK1 ve RSK2'nin NTKD'sini hedeflediği gösterilmiştir (Smith vd., 2007). Ayrıca, SL0101'in RSK2 izoformunun NTKD bölgesine bağlandığı 1.5 Å çözünürlükteki kristal yapı rapor edilmiştir (Utepbergenov vd., 2012). RSK2'nin ilk seçici inhibitörü olan SL0101 sağlıklı insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-10A üzerinde inhibitör etkinliği göstermezken ER+ MCF7 meme kanseri hücre hattında çoğalmayı inhibe ettiği bildirilmiştir (Clark vd., 2005). Ayrıca, SL0101 LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında da çoğalması üzerine inhibisyon etki göstermiştir (Clark vd., 2005).

2.5.3. BI-D1870

Dihidropteridinon BI-D1870 NTKD'yi hedefleyen bir ATP-rekabetçi pan-RSK inhibitörüdür (Sapkota vd., 2007). BI-D1870, tüm RSK izoformlarının etkinliklerini ortadan kaldırır ve diğer AGC kinaz proteinlerine göre RSK'lar için seçiciliğe sahiptir (Bain vd., 2007). BI-D1870 ile yapılan bir çalışmada IC₅₀ değerlerinin RSK1, RSK2, RSK3, RSK4 izoformları için sırasıyla 31 nM, 24 nM, 18 nM ve 15 nM olduğu ve tüm RSK aktivitesinin inhibisyonu için 10 nM derişimde etki ettiği rapor edilmiştir (Sapkota vd., 2007). BI-D1870'in diflorofenolpiridin türevleri olan LJH685 ve LJH308 molekülleri literatürde RSK inhibitörleri olarak tanımlanmışlardır (Aronchik vd., 2014). BI-D1870, antikanser ilaçlara karşı direncin üstesinden gelinmesine yardımcı olduğu ve P-glikoprotein kararlılığını azalttığı bildirilmiştir (Katayama vd., 2016). Bir çalışmada, BI-D1870 inhibitörünün HL60 hücrelerinde mitotik durdurmayı indükleyerek AML çoğalmayı inhibe ettiği ve fosforile RSK seviyelerinin AML hücrelerinde normal CD34+ kemik iliği hücrelerinden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Chae vd., 2020). A549 insan akciğer adenokarsinom hücrelerinde BI-D1870 ve cis-platin kombinasyonu ile apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Abdulrahman vd., 2020). Bir çalışmada BI-D1870 inhibitörünün hedef dışı etkisi bildirilmiştir (Neise vd., 2013). Farelerde, BI-D1870 inhibitörünün iyi tolere edildiği ve kan-beyin bariyerini (BBB) geçtiği bildirilmiştir (Pambid vd., 2014). Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde BI-D1870'in öldürücü etkisi gözlenmiştir (Steele vd., 2011). Mantle hücreli lenfomada RSK2'ye yönelik antikanser etkisi gözlemlenmiştir (Matsumura-Kimoto vd., 2020). Bununla birlikte, BI-D1870'in BTK (ibrutinib), AKT (ipatasertib) ve BCL2

(venetoklaks) inhibitörleri ile hücre karakteristiğine bağlı olarak büyüme önleyici etkileri rapor edilmiştir (Matsumura-Kimoto vd., 2020). Sapkota ve arkadaşları RSK izoformunun NTKD'ı inhibe eden BI-D1870 RSK seçici inhibitörünü geliştirmişlerdir. Bu bileşiklerin diğer protein kinazlarıda inhibe ettiği bulunmuştur (Sapkota vd., 2007). Bir çalışmada, kombine terapi için RSK2'nin N-uç kinaz alanı (NTKD) ve AKT için sırasıyla BI-D1870 ve ipatasertib inhibitörlerinin insan çoklu miyeloma hücre hatları (HMCL) üzerine uygulanmış antikanser etkisi ve BIM ve BID aktivasyonu ile apoptotik indüksiyonda artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Isa vd., 2022).

2.5.4. LJH685 ve LJI308

LJH685 ve LJI308, BI-D1870 molekülünden türetilen psödo-analoglarıdır (Aronchik vd., 2014, Cui vd., 2022). BI-D1870 molekülünden çok daha az hedef dışı etki gösterdikleri bildirilmiştir (Aronchik vd., 2014). LJH685 için *in vitro* yararlı *in vivo* deneylerde kullanışsız olduğunu rapor etmişlerdir (Jain vd., 2015). LJH685 inhibitörü esas alınarak sentezlenen bileşiklerin moleküler yerleştirme çalışmasında bir bileşiğin ÜNM kanserinde anti kanser etkisi gösterdiği bildirilmiştir ve bağlanma enerjisi LJH685 için -35,7467 kkal/mol hesaplanırken 7d molekülü için -32,8855 kkal/mol olarak hesaplanmıştır (Cui vd., 2022). Bu çalışmada ayrıca RSK'nın substratı olan p-YB1 içinde 7d molekülünün inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Cui vd., 2022). LJH685 ve BI-D1870 moleküllerinin melonom hücreleri üzerindeki kombine terapötik etkileri araştırılmıştır (Kosnopfel vd., 2017).

LJI308 inhibitörünün ÜNMK için geleneksel kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanılması önerilmiştir (Davies vd., 2015). Bir çalışmada meme kanserinde T359/S363'te RSK'nın fosforilasyonunu ve S102'de Y-box binding (YB-1) proteinini inhibe ettiği bildirilmiştir (Lettau vd., 2021). Mide kanserinde SL0101 ve LJI308 tarafından inhibe edilen RSK1 izoformunun PLK1 proteini fosforilasyonuna etkisi olmadığı rapor edilmiştir (Zhu vd., 2017).

2.5.5. FMK

Pirolopirimidin, 1-[4-amino-7-(3-hidroksipropil)-5-(4-metilfenil)pirol[2,3-d] pirimidin-6-il]-2-floroetanon (FMK) RSK1, RSK2 ve RSK4 CTKD katalitik bölgesindeki bir sistein kalıntısına tersinmez olarak kovalent bağ yapan bir inhibitördür (Cohen vd., 2005) (Cohen vd., 2005). Bir pan-RSK inhibitörü olmadığı bildirilmiştir. Bunun sebebi RSK3 izoformunun diğer izoformlarda bulunan sistein yan zincirinden yoksun olmasıdır (Jain vd., 2015; Cohen vd., 2005). FMK substratı YB1'in fosforilasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ederken tam inhibisyona ulaşamaz; bu da araştırmacılara aktivitenin RSK3'ten kaynaklandığını düşündürmüştür (Cohen vd., 2005). FMK ile yapılan bir *in vitro* çalışmada IC₅₀ değeri 15 nM ve hücresel EC₅₀ değeri 200 nM olarak RSK2'yi reaktif elektrofilik FMK kısmı ve CTKD'nin ATP-bağlanma bölgesinde Cys436'nın tiyol grubu ile kovalent bağlanarak inhibe ettiği bildirilmiştir (Cohen vd., 2007). Bununla birlikte, RSK2'nin FMK molekülü ile olan kovalent bağı aydınlatılmıştır (Lee ve Grossmann, 2012).

2.5.6. BRD7389

BRD7389, RSK1, RSK2, RSK3 inhibitörü olarak bilinmektedir (Fomina vd., 2010). BRD7389 inhibitörünün lösemide apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Chae vd., 2020). Aynı zamanda, BRD7389 ve BI-D1870 moleküllerinin melanom hücrelerde çoğalmayı inhibe ettiği bildirilmiştir (Theodosakis vd., 2017). Bir çalışmada, BRD7389 kolon kanserindeki hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (Park ve Cho, 2012).

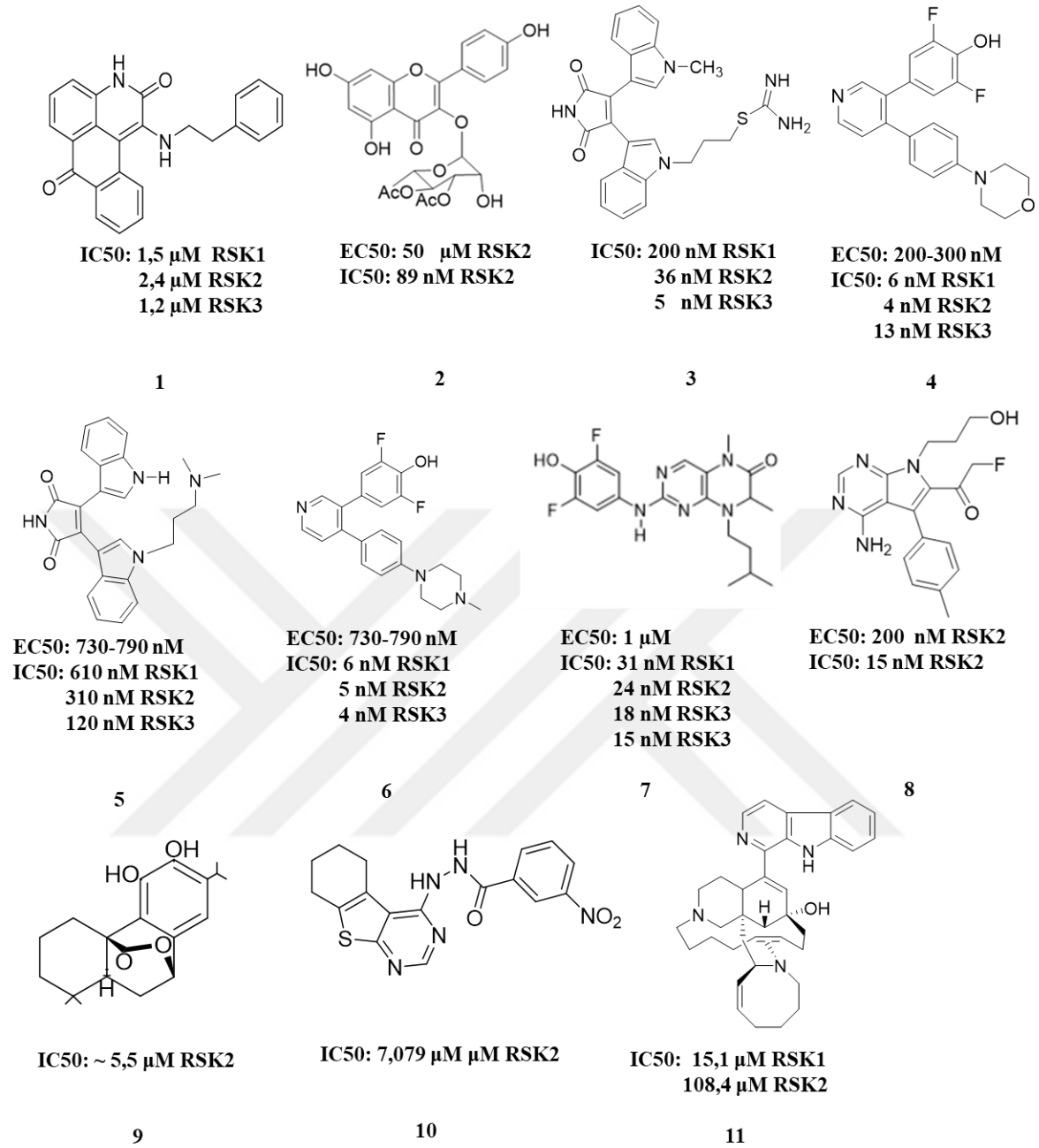
2.5.7. Diğer p90RSK İnhibitörleri

Yukarıdaki RSK inhibitörleri dışında bazı RSK inhibitörlerinin (GF1090203X, SB216763, staurosporin, NSC356821, NSC51023, indirubin-3'-oksim, purvalanol, Ro31-8220) olduğu bilinmektedir (Nyugen vd., 2006; Nyugen, 2008). P90RSK ailesinin CTK alanına yönelik yapılan bir çalışmada ruxolitinin (INCB18424), SB-203580 ve TG-100-115 ATP yarışmalı inhibitörlerinin yüksek hassasiyet gösterdikleri bildirilmiştir (Fruergaard vd.,

2022; Davis vd., 2011). CFI-400945 polo benzeri kinaz 4 (PLK4) inhibitörünün RSK ailesine bağlandığı bölge moleküler yerleştirme çalışmalarıyla gösterilmiştir (Abdullah ve Guruprasad, 2021). Mide kanseri ile yapılan bir çalışmada, karnosol molekülünü güçlü RSK2 inhibitörü olarak rapor etmişlerdir (Li vd., 2018). Bununla birlikte, luteolin meme kanserinde yeni RSK inhibitörü olarak bildirilmiştir (Reipas vd., 2013). Manzamine A (MZA) molekülünün RSK2 izoformuna kıyasla RSK1 izoformunun N- ve C-uç bölgeleriyle oluşturduğu kompleksin 10 kat daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Mayer vd., 2020). Son zamanlarda, AE007 isimli molekül kanserde etkili yeni RSK2 inhibitörü olarak keşfedilmiştir (Li vd., 2022). Şekil 6'da p90RSK ailesi izoformlarına yönelik bilinen bazı inhibitörlerin açık yapıları, IC₅₀ ve EC₅₀ değerleri verilmiştir.

2.6. RSK1 Hedefine Yönelik Gerçekleştirilen *In Siliko* Çalışmalar

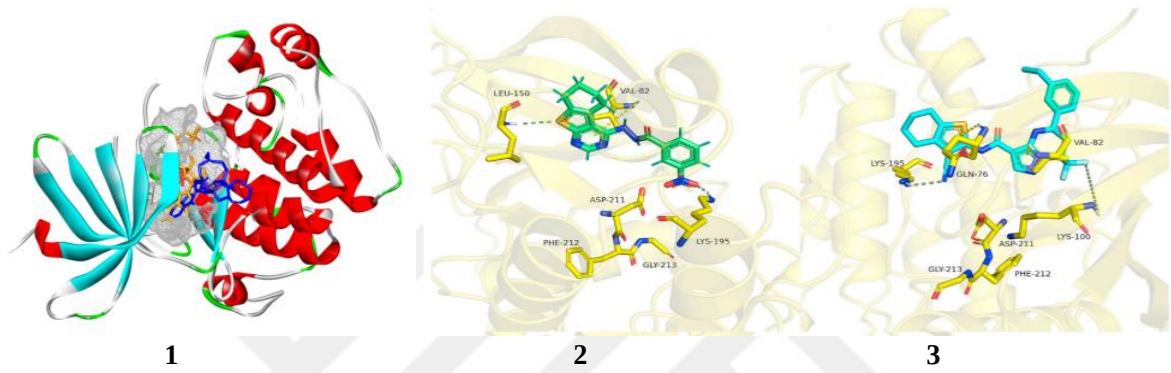
RSK1 hedefine yönelik yapılan çeşitli *in siliko* çalışmalarda genellikle 2Z7R, 2Z7Q, 3RNY PDB kodları kullanılmıştır. RSK1 izoformunun C-uç kinaz alanına yönelik moleküler yerleştirme çalışmaları sınırlıdır. 3RNY homoloji modelinin kullanıldığı Mayer ve arkadaşları RSK1 izoformu için MZA bileşiğini hem N- hem de C-uç kinaz alanında moleküler yerleştirme çalışmalarını Autodock vina programı aracılığıyla gerçekleştirmiştir. Bunun sonucunda sırasıyla -62,132 kkal/mol ve -55,497 kkal/mol hesaplamışlardır (Mayer vd., 2021). Bir çalışmada farklı olarak ERK2 ve RSK1'in heterodimerik yapısı (PDB:4NIF) kullanılmıştır (Boston vd., 2011; Jafari vd., 2021). Birçok kanser türünde etkili olan hedefler arasında yer alan RSK1 ve diğer hedefler için sentezledikleri 63 tane piriazol türevinin moleküler yerleştirme çalışması yapılmıştır ve RSK1'e (PDB:2Z7R) yönelik bulguları bilinen inhibitörü APIO-EE-07 -9,4 kkal/mol ile karşılaştırmalı olarak piriazol türevleri -5,2 kkal/mol ve -9,3 kkal/mol arasında hesaplanmıştır (Bennani vd., 2022). RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) hedefine yönelik Glide/SP algoritması kullanılarak yapılan bir çalışmada Luteolin, Apigenin ve Kaempferol sırasıyla -7,99 kkal/mol, -7,63 kkal/mol ve -7,54 kkal/mol olarak hesaplanmışlardır ve etkileşimleri Asp205, Thr204, Gln70, Asp142, Leu144 aa kalıntılarında gözlemlemişlerdir (Reipas vd., 2013).



Şekil 6. Antikanser etki gösteren bazı RSK inhibitörlerinin açık yapıları ve *in vitro* etkinlik değerleri. 1) BRD7389, 2) SL0101, 3) Ro31 8220, 4) LJ1308, 5) GF1090203X, 6) LJH685, 7) BI-D1870, 8) FMK, 9) Carnasol, 10) AE007, 11) MZA

(Yuan vd. 2021, Youn vd., 2021, Robert vd., 2005, Li vd., 2018, Li vd., 2022, Mayer vd., 2020)

İlaç yeniden konumlandırma çalışmasında FDA onaylı LDK378 bileşiğini ceritinib ile kıyaslı olarak RSK1-NTKD(PDB:2Z7R) hedefinde moleküler yerleştirme çalışmasını gerçekleştirmişlerdir ve -10 kkal/mol ve -30 kkal/mol bağlanma enerjileri ile ceritinib'ten daha iyi bağlandığını rapor etmişlerdir (Sahrawat ve Kaur, 2019). Şekil 7'de RSK1 ve RSK2 izoformlarının bazı moleküler yerleştirme pozları örnek olarak verilmiştir.

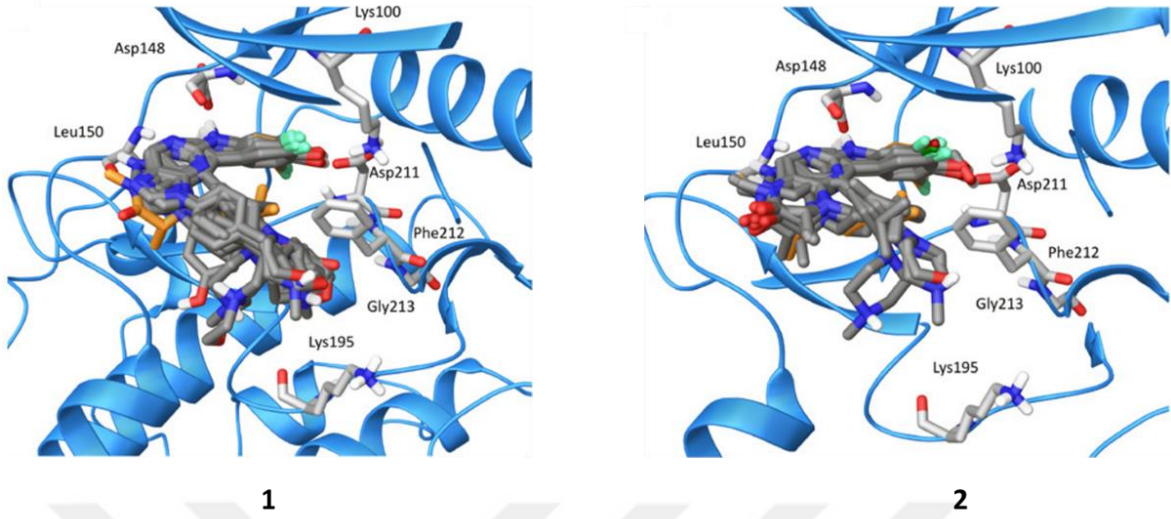


Şekil 7. Bazı RSK inhibitörlerinin moleküler yerleştirme pozları. (1) RSK1 (PDB 2Z7Q) ile MZA (mavi) moleküler yerleştirmesi (Mayer vd., 2021). (2) RSK2 (PDB 4NW6) ile bileşik C2 moleküler yerleştirmesi. (3) RSK2 (PDB 4NW6) ile bileşik C12 moleküler yerleştirmesi (Zhao vd., 2021).

2.7. RSK2 Hedefine Yönelik Gerçekleştirilen *In Siliko* Çalışmalar

Hesaplamalı yöntemlerle RSK2 inhibitörü belirlemek için yapılan bazı çalışmalarda, bir polifenol olan kersetinin RSK2'ye bağlandığı bildirilmiştir (Chen vd., 2012). Benzer şekilde, yeşil çaydan türetilen bir polifenol olan epigallocateşin gallat (EGCG)'ın RSK2 katalitik bölgelerine karşı etkili olabileceğini belirlemek için moleküler yerleştirme ve tarama çalışmaları yapılmıştır ve bağlanma enerjilerini RSK2-CTKD (PDB:2QR8) için -13,95 kkal/mol ve RSK2-NTKD (PDB:3G51) için -13,17 kkal/mol olarak hesaplamışlardır (Chen vd., 2015). Nicel yapı-etkinlik ilişkisi (QSAR), ligand ve yapı esaslı sanal tarama, moleküler yerleştirme, MD, kuantum mekaniği, parça tabanlı ilaç tasarımı yöntemleri gibi hesaplama yaklaşımları, kinazların konformasyonel görüş, yapısal gereksinimleri hakkında

ayrıntılı bilgiler sağlar (Gagic vd., 2020). Arba, M. ve diğerleri tarafından 2019 yılında yaptıkları 3D-kantitatif yapı-etki ilişkisi (QSAR) [karşılaştırmalı moleküler alan analizleri (CoMFA) ve karşılaştırmalı moleküler benzerlik indeksleri analizi (CoMSIA)] kullanarak 21 adet diflorofenol piridin türevlerini RSK2 inhibitörü olarak modellemişlerdir. Bu çalışmada RSK2 kristal yapısı (PDB:4NUS) kullanılarak moleküler kenetleme çalışması sonucu 21 bileşik arasından bileşik 18'in uygun olduğu ve MD simulasyon çalışmaları ile de bu bileşiğin yeni RSK2 inhibitörü olabileceği bildirilmiştir (Arba vd., 2019). Cuello ve diğerleri biyoinformatik yaklaşımlar ile CTKD RSK inhibitörü olan FMK türevini geliştirerek rapor etmişlerdir (Cuello vd., 2007). Casalvieri ve diğerlerinin yaptıkları çalışmalarda RSK inhibisyonu üzerine yapı-etkinlik ilişkisi kurmak amaçlı sübstitüe pteridion ve pirimidinlerin *in siliko*, sentez ve *in vitro* çalışmalarını rapor etmişlerdir (Casalvieri vd., 2020a; Casalvieri vd., 2020b). Doğal ürün olan kaemferol ile yapılan moleküler yerleştirme çalışmasında kaemferol ve SL0101'in RSK2 NTKD aktif paketi üzerine moleküler yerleştirme değerleri sırasıyla -12,8 kkal/mol ve -13,3 kkal/mol olarak bulunmuştur. Her iki bileşiğin *in vitro* hücre çoğalması üzerine çalışması gerçekleştirilmiştir (Yoo vd., 2015). Zhao ve arkadaşları ligand- ve yapı-esaslı sanal tarama ile yaptıkları bir çalışmada ve bilinen RSK2 biyoaktif inhibitörlerinin yapılarına dayalı olarak modeller geliştirmişlerdir. ADMET ve moleküler yerleştirme sonuçlarına dayanarak 30 molekül seçip denedikten sonra meme kanseri ve cilt kanseri hücreleri üzerinde 5 bileşiğin RSK2'ye karşı inhibe edici etki sergilediğini rapor etmişlerdir (Zhao vd., 2021). BI-D1870, LJ1308 ve LJH685 inhibitörlerinin farmakofor modelleri kullanılarak RSK2 (4NUS) *in siliko* çalışmaları yapılmıştır ve lösemi, HEK293 hücre hatlarında *in vitro* çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Casalvieri vd., 2021). Benzer bir çalışma aynı inhibitörlerin farmakofor modelleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Warfield vd., 2021). Ek olarak, LJH685'in farmakofor modeli kullanılarak sanal tarama ve moleküler yerleştirme çalışması yapılmıştır (Ece, 2016). Meme kanserinde çalışılan bir diğer hedef olan RSK2'nin aşağı akışında bulunan ökaryotik uzama faktör 2 kinaz (eEF2K) hedefli yeni inhibitörlerin geliştirilmesi içinde yapılan *in siliko*, sentez ve *in vitro* çalışmalar rapor edilmiştir (Comert Onder vd., 2021a, 2021b 2020). Literatürde RSK2 ilişkili proteinlerine yönelik yapılan *in siliko* çalışmaların olması son derece önemlidir. RSK2 için daha önce yapılmış moleküler yerleştirme çalışmalarında elde edilen bazı pozları ve protein-ligand kompleksi arasındaki etkileşimler verilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. 1) 14 tane BI-D1870 bazlı bileşikler (koyu gri renkli karbon atomları), 2) RSK2 NTKD'nin ATP-bağlama bölgesi (mavi şerit gösterimi) 17 tane pürin ve pirolpirimidin bazlı bileşikler, amino asit kalıntıların (karbon atomları açık gri renkli) ve BI-D1870 ligandının referans için turuncu renkte moleküler yerleştirmesi.

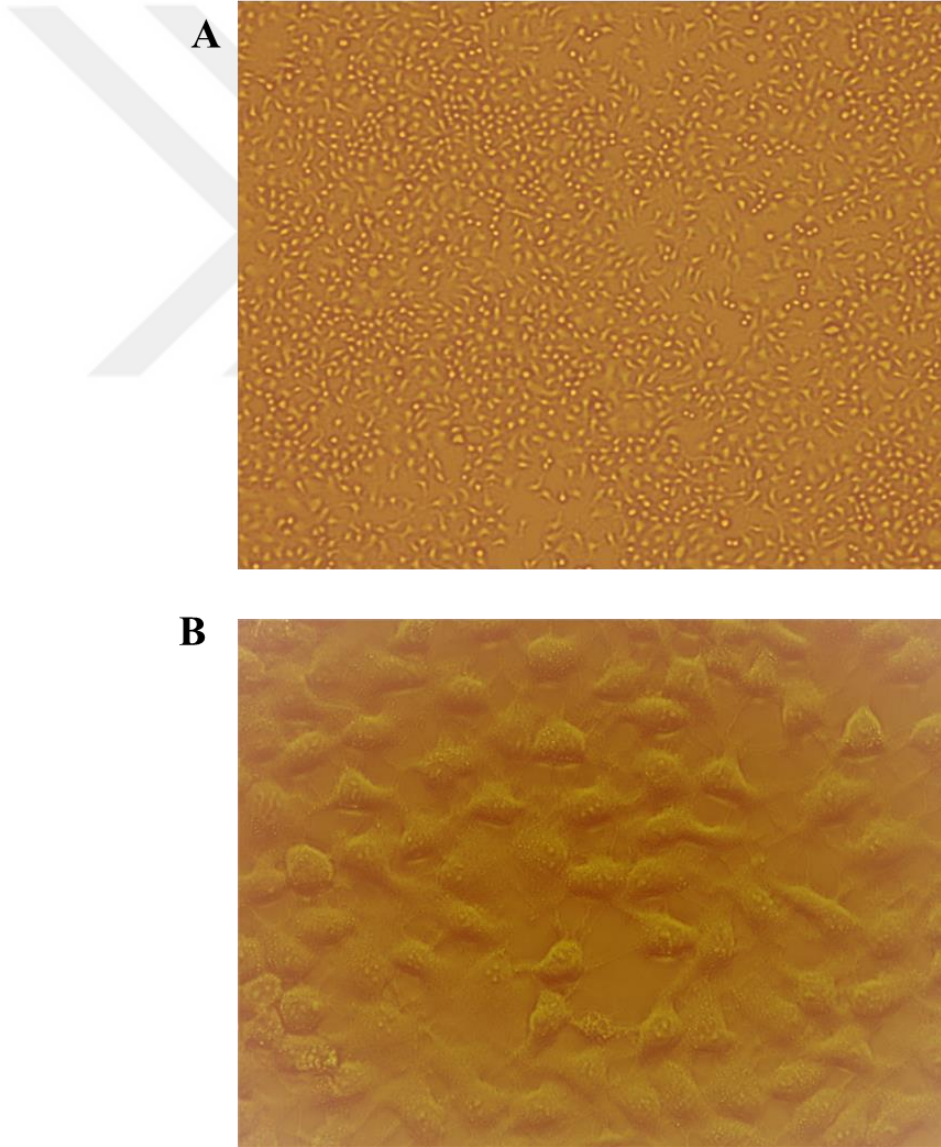
(Warfield vd., 2021)

2.8. RSK2 İlişkili Diğer İnsan Hastalıklarına Yönelik İnhibitörü

BIX02565 bir RSK2 inhibitörüdür (Kirrane vd., 2012). Gebelikle ilişki bir grup tümör hücrelerinde BIX02565 molekülünün reaktif oksijen türleri (ROS) birikimini indüklediği ve SOX8 ifadesini azalttığı rapor edilmiştir (Wu vd., 2021). Bir çalışmada, BIX02565 molekülünün kalp için hedef dışı bağlanmalarının olduğu ve bu yüzden *in vivo* kullanımda yararlı olmadığı bildirilmiştir (Fryer vd., 2012). Kirrane ve ark. kalp yetmezliği tedavisi için BIX02565 molekülünün dikkat çekici bir terapötik olduğunu vurgulamışlardır (Kirrane vd., 2012). Öte yandan başka bir çalışmada BIX02565 molekülünün kardiyoprotektör etkisine değinilmiş ve kalbi iskemi/reperfüzyondan koruyacağı varsayılmıştır (Shi vd., 2016).

2.9. ÜNМК Hücre Hatları

MDA-MB-231   l  negatif B alt tipinde adenokarsinom, BT-549   l  negatif B tipinde invaziv duktal karsinom ve BT-20   l  negatif A alt tipinde invaziv duktal karsinomdur (Dai vd., 2017). Ek olarak, meme kanseri hücre hattı olan östrojen reseptör pozitif (ER+) MCF7 hücre hattı çalışmalarımızda kullanılmıştır. Çalışmalarımızda kullanılan  NМК MDA-MB-231 hücre hattı mikroskopik görüntüleri verilmiştir (şekil 9a,b).



şekil 9.  NМК MDA-MB-231 hücre hattı mikroskopik görüntüleri. A) 4X B) 40X

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde *in siliko* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan materyaller ve yöntemler yer almaktadır.

3.1. MATERYAL

Bu kısımda tez kapsamında yapılan *in siliko* çalışmalarda kullanılan programlar ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve cihazlar verilmiştir.

Tez kapsamında moleküler modelleme çalışmaları için Discovery Studio 2021 (DS) ve Maestro (Schrödinger Release 2021-4) programları kullanılmıştır. RSK3-NTKD ve RSK4-CTKD izoformlarına yönelik homoloji modelleme için DS 2021 ve açık erişim kaynak Swiss model kullanılmıştır (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Elde edilen homoloji modellerin doğrulanması için Prosa web server (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) kullanılmıştır.

In vitro hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre hatları: ÜNMK (MDA-MB-231, BT-549 ve BT-20) ve ER+ (MCF7). Hücre hatları Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 (1:1) (Gibco-11320074), Fetal sığır serumu (FBS) (Serox-SF101-500) ve penisilin-streptomisin (PS) (Sigma-P4333) ile desteklenmiştir. Kolonilerin boyanmasında kristal viyole ve sitotoksosite testi için MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) (Sigma-M5655) reaktifi kullanılmıştır.

In vitro çalışmalarda kullanılan cihazlar, inkübatör (Panasonic-MCO-18AC), ters (inverted) mikroskop (Zeiss primo vert), Soğutmalı santrifüj (Centurion K2015 Serisi), mikrolaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO) kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

Tez kapsamındaki *in siliko* çalışmalar RSK1 ve RSK2 izoformlarının PDB’de verilen kristal yapıları ve bilinen inhibitörleri kullanılarak Farmakofor Modelleme, Sanal Tarama, ilaç olabilme özellikleri (ADMET, Lipinski ve Veber Kuralları, Toksisite tahminleri) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirlenen moleküller için Moleküler Yerleştirme çalışması yapılmıştır. RSK3 ve RSK4 izoformlarının homoloji modellemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında ilk aşamada yapılan *in siliko* çalışmaların verilerine göre başka hastalıklar için terapötik etkisi bilinen ilaçların ve kersetin, kateşin ve rutin gibi doğal ürünlerin temin edilmesi ile ÜNMK hücrelerinde *in vitro* incelemesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. In Siliko Çalışmalar

Ligand- ve Yapı Esaslı Sanal Tarama

LEİT yaklaşımı kullanılarak yapılan *in siliko* araştırmalar doğrultusunda p90RSK ailesi için bilinen inhibitörlerinin (BI-D1870, LJH685, FMK, BIX02565, SL0101, BRD7389) farmakofor modellerinin ve özelliklerinin oluşturulması, ilaç benzerliklerinin tanımlanması, ligand esaslı sanal tarama, moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. YEİT yaklaşımı kullanılarak yapılan araştırmalarda ise farmakofor modellerden bağımsız olarak çeşitli veri tabanlarına ilaç benzerliklerini tanımlama filtreleri uygulanmış filtrelenen ligandlar ile moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

LEİT ve YEİT yaklaşımı kullanılarak yapılan *in siliko* araştırmalar doğrultusunda PDB’de mevcut olan RSK1-CTKD (3RNY), RSK1-NTKD (2Z7R, 2Z7Q), RSK2-CTKD (4D9T), RSK2-NTKD (4NUS, 5D9K, 3UBD) p90RSK ailesi izoformlarının kristal yapıları kullanılmıştır. PDB’de mevcut olmayan RSK3-NTKD ve RSK4-CTKD izoformlarının homoloji modellemeleri yapılmıştır. Kristal yapıları belirlenen RSK izoformları için yapı-esaslı sanal tarama, moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

RSK3 ve RSK4 Homoloji Modelleme

Dizisi ya da sekansı bilinip 3B yapısı bilinmeyen yapıları oluşturmak için çeşitli homoloji modelleme araçları mevcuttur. Tez kapsamında RSK3-NTKD için NP_066958.2 (korunmuş alanı) NCBI sekansına dayanarak SWISS-MODEL ile 10 tane model oluşturulmuştur. Yüksek benzerlikte olan PDB şablonlarından *N*-uç oluşturmak için 4NW6 (RSK2-NTKD) PDB kodu şablon olarak seçilmiştir. Modeller Ramachandran plot grafiği, Z-skoru benzerlik oranları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Oluşturulan homoloji modelin yapısı Prosa web server ile doğrulanmıştır. DS 2021 programında PSI-BLAST modülü ile NP_066958.2 korunmuş RSK3 sekansının PDB veri bankasına yönelik benzerlik oranlarının tahmini ve şablon seçimi için yapılmıştır. Yüksek benzerlikte olan PDB şablonlarından *N*-uç oluşturmak için 4NW6 (RSK2-NTKD), PDB kodu şablon olarak seçilmiştir. Seçilen şablonlar daha sonra RSK3 sekansı ile hizalanıp Building Homology Model ile homoloji modelleri yapılmış verify 3D modülü ile yapısı doğrulanmıştır.

RSK4-CTKD kristal yapısını elde etmek için tez kapsamında CAG38803.1 (korunmuş alanı) NCBI sekansına dayanarak SWISS-MODEL ile 14 tane model oluşturulmuştur. Yüksek benzerlikte olan PDB şablonlarının arasından 2WNT şablon olarak seçilmiştir. Modeller Ramachandran plot grafiği, Z-skoru benzerlik oranları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Prosa web server ile oluşturulan homoloji modelin yapısı doğrulanmıştır. DS 2021 programında PSI-BLAST modülü ile CAG38803.1 korunmuş RSK4 sekansının PDB veri bankasına yönelik benzerlik oranlarının tahmini ve şablon seçimi için yapılmıştır. Yüksek benzerlikte olan PDB şablonlarından *C*-uç oluşturmak için 4D9T (RSK2-CTKD), PDB kodu şablon olarak seçilmiştir. Seçilen şablonlar daha sonra RSK4 sekansı ile hizalanıp Building Homology Model ile homoloji modelleri yapılmış verify 3D modülü ile yapısı doğrulanmıştır.

Farmakofor Model Oluşturulması

Tez kapsamında yapılan farmakofor modellemede RSK izoformları için bilinen inhibitörleri (SL0101, BI-D1870, FMK, BIX02565, BRD7389 ve LJH689) için DS 2021

programında farmakofor modeller oluşturulmuştur ve ligandların farmakofor özellikleri belirlenmiştir. PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)’den SDF formatında indirilen bilinen ligandların 3D yapıları kullanılarak Auto Pharmacophore Generation modülü ile her bir ligandın farmakofor modelinin hidrojen bağ alıcısı ve vericisi, hidrofobik özellik, negatif ve pozitif iyonlaşabilir özellik, aromatik halka gibi potansiyel özellikleri yansıtan en iyi farmakofor modeli elde edilmiştir. Bu modül sayesinde Genetik Fonksiyon Yaklaşımı model tahminine göre en yüksek seçiciliğe sahip olan ilk farmakofor yapısı seçilmiştir.

Farmakofor Haritalama, Sanal Tarama ve İlaç Benzerliğini Tanımlama

Çeşitli küçük molekül kimyasal veri tabanları yardımıyla ligand- ve yapı-esaslı sanal tarama çalışmaları yapılmıştır. Ligand- ve yapı-esaslı sanal tarama çalışmaları için NCI, Selleckchem, ChEMBL, ChemDiv, Enamine, InterBioScreen, Drugbank, OTAVA, Apexbt gibi çeşitli kimyasal veri tabanları Ligand Pharmacophore Mapping modülü ile farmakofor haritalama ve Screen Library modülü ile sanal tarama çalışmaları DS 2021 programında gerçekleştirilmiştir. Eşleşen ligandlara göre belirlenen moleküller için filtreleme yapılarak farmakokinetik ve ilaç olabilme özellikleri incelenmiştir. ADMET, Lipinski ve Veber kuralı (RO5) ve toksisite tahminleri (AMES mutajenite, rodent karsinojenite, toksisite gelişimi) sırasıyla ADMET tanımlayıcı, Lipinski’s and Veber kuralları ve Toksisite tahmin modülleri ile gerçekleştirilmiştir. Yapı-esaslı tarama çalışmalarında Selleckchem, InterBioScreen, Apexbt, ChEMBL, Drugbank, ChemDiv veritabanları ligandtan bağımsız olarak RO5 kuralı ve toksisite tahminleri filtrelemeleri uygulanmıştır.

Moleküler Yerleştirme

Moleküler yerleştirme çalışmaları için iki farklı program kullanılmıştır. DS 2021 ve Maestro programları yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Moleküler yerleştirme çalışması yapılmadan önce protein ve ligandlar en kararlı ve en düşük enerjili konformerlerini belirlemek için hazırlanmıştır. Protein hazırlamak için RSK1, RSK2 moleküllerinin kristal yapıları (PDB)’tan RSK1-CTKD (3RNY), RSK1-NTKD (2Z7R, 2Z7Q), RSK2-CTKD (4D9T), RSK2-NTKD (4NUS, 5D9K, 3UBD) alınarak DS 2021 ve Maestro programında su

moleküllerinin uzaklaştırılması ve eksik hidrojenlerin eklenmesi sonucu fizyolojik pH 7,4'te hazırlanmışlardır. Ligand hazırlanması için DS 2021 programında Prepare ligand, Full minimization modülleri ve Maestro programında Ligprep modülü kullanılmıştır. Kuvvet alanları DS 2021 için CHARMM esaslı iken Maestro için OPLS-2005 olarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. RSK1 (PDB:3RNY) ve RSK2 (PDB:4D9T) izoformlarının C-uç bölgelerinin kristal yapıları kullanılarak sanal taramadan çıkan aday moleküller ile moleküler yerleştirme çalışmaları DS 2021 programında CDOCKER ile yapılmıştır. Çıkan sonuçlar 2B etkileşim diyagramları, CDOCKER değerleri bağlanma konformasyonları açısından değerlendirilerek elde edilmiştir. Etkileşim ve bağlanma enerjileri kkal/mol olarak hesaplanmıştır. Ligand ile protein arasındaki moleküller arası etkileşimlerin ayrıntılı analizi 2B ligand etkileşimi ile belirlenmiştir. Yerleşen ligandlar DS Visualizer yardımıyla görselleştirilmiştir. Hedef-esaslı çalışmalarda RSK1-NTKD (PDB:2Z7R, 2Z7Q), RSK2-NTKD (PDB:4NUS, 5D9K) izoformlarının N-uç kinaz bölgelerinin kristal yapıları kullanılarak sanal taramadan çıkan aday moleküller ile moleküler yerleştirme çalışmaları Maestro Glide/SP yöntemi ile yapılmıştır. Sonuçlar bağlanma enerji değerlerine göre değerlendirilmiştir. Libdock ile yapılan moleküler yerleştirme RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) ve RSK2-NTKD (PDB:4NUS) izoformlarının kristal yapıları kullanılarak yapı bazlı çalışmalar için DS 2021 programında yapılmıştır.

3.2.2. *In Vitro* Çalışmalar

Tezin uygulama kısmında ise *in siliko* yöntemler ile belirlenen RSK1 ve RSK2 potansiyel inhibitörleri içerisinden temini mümkün olabilecekler ile RSK1 ve RSK2'nin aşırı ifade olduğu MDA-MB-231, BT-549 ve MCF7 hücre hatlarında çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, BT20 hücre hattında çalışmada kullanılan ilaç etken maddelerinin sitotoksik etkileri incelenmiştir. ÜNMK MDA-MB-231, BT-549 ve BT-20 kanser hücreleri ile doz- ve zaman- bağımlı olarak kısa zamanlı hücre çoğalması ve hayatta kalma ile koloni inhibisyonu ve çoğalması üzerine çalışmalar Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi – Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Kök Hücre Laboratuvarı (ÇOMÜDAM)'nda gerçekleştirilmiştir.

Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları için ÜNMK (MDA-MB-231, BT-549 ve BT20) ve MCF7 hücre hatları çalışılmıştır. Hücrelerin büyütüldüğü besi yerleri için DMEM-F12 (1:1) medya kullanılmıştır. Her bir medyanın içeriği %1 PS ve %10 FBS olarak ayarlanmıştır. Hücrelerin kültüre edilmesi için T75 ve T25'lik flasklar kullanılmıştır. Hücreler %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edilmiştir (Comert Onder vd., 2021a).

Koloni Oluşumu İnhibisyonu ve Çoğalması

Koloni oluşumu ve inhibisyon deneyi için 12 ve 24 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Uygulama için 10 ile 150 µM aralığında farklı derişimler ile uygulamalar yapılmıştır. Ayrıca, MDA-MB-231 ve BT-549 hücre hatlarında kombine terapi çalışmaları rutin (20 µM) sabit tutularak ilaç etken maddeleri (1:1) ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler 12 veya 24 kuyucuklu plakalarda kültüre edilmiştir (10-12 gün). Hücrelerin boyanması için kristal viyole metanol içindeki %1'lik çözeltisi kullanılmıştır (Comert Onder vd., 2021a).

Sitotoksite Analizi

MTT hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan kalorimetrik bir yöntemdir. Mitokondriyal metabolizmada rol alan NAD(P)H'ye bağlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri indirgenme reaksiyonu ile 3-(4,5-dimetil tiazol -2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür olan tetrazolyum boyası MTT'yi çözünmeyen formazanına dönüştürür.

Bu tez kapsamında ÜNMK (MDA-MB-231, BT-549 ve BT-20) hücre hatları 24 saat inkübe edildikten sonra çeşitli derişim aralıklarında 100 µM'a kadar ilaç dozları uygulanmıştır. İlaçların sitotoksik etkilerini (24-72 saat) belirlemek için hazırlanan MTT çözeltisinden her bir kuyucuk içerisine 10 µL MTT eklenip 2-4 saat 37 °C'de %5 CO₂ içeren

inkübatörde inkübe edilmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenerek 96 kuyucuklu plaka ELISA okuyucu ile 570 nm dalga boyunda okutulmuştur (Cömert Önder vd., 2016).

Hücre Göçü Analizi

Hücre göçü analizi 6 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. Pipet ucu yardımıyla ortasına çizik atılan hücreler ölü hücreleri uzaklaştırmak için PBS ile yıkanıp tek veya kombine dozlarda ilaç uygulamaları yapılmıştır. Uygulamadan sonra 0, 24 ve 48. saat aralıkları için mikroskop görüntüleri alınmıştır.

Veri Toplama Teknikleri

Tez çalışması kapsamında *in siliko* veriler çeşitli yazılımların kullanımına ilişkin elde edeceğimiz tekrarlı sonuçların görselleştirilmesi ve tablolaştırılması ile elde edilmiştir. *In vitro* hücre kültür çalışmaları mikroskop üzerinde gözlemlenmiştir. *In vitro* çalışmalarda istatistiksel analizler GraphPad Prism ile yapılmıştır ve $P<0.05$ veya $p<0.01$ anlamlı sonuçları değerlendirilmiştir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

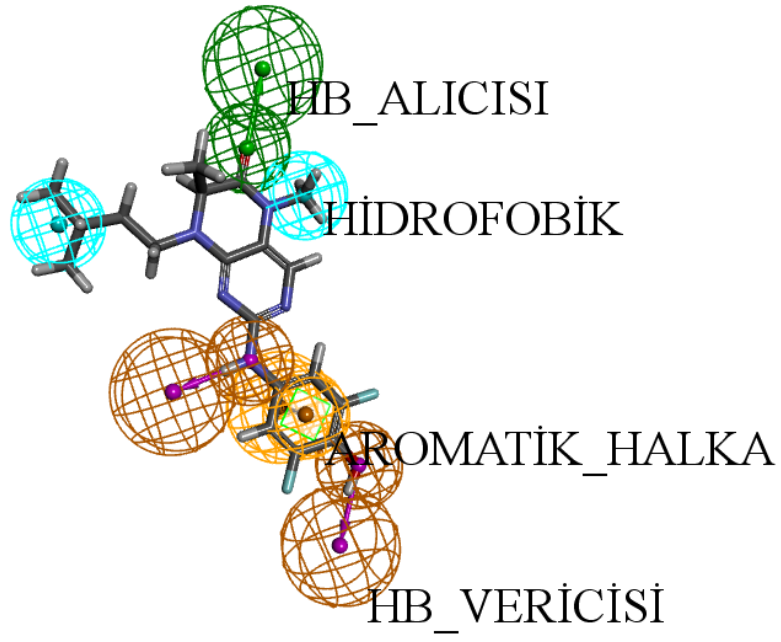
Bu bölümde potansiyel p90RSK1 ve p90RSK2 inhibitör aday moleküllerinin *in siliko* tarama ve ÜNM kanserine yönelik *in vitro* etkinlik sonuçlarına yer verilmiştir. p90RSK3 ve p90RSK4 izoformlarının homoloji model sonuçlarına yer verilmiştir.

4.1. In Siliko Çalışmalar

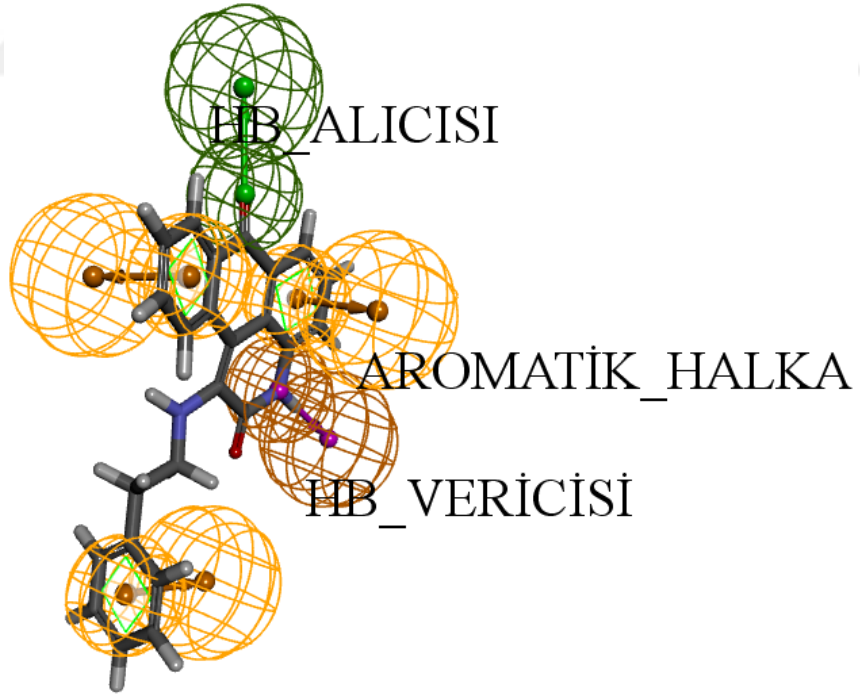
p90RSK ailesine yönelik LEİT ve YEİT çalışmaları DS 2021 ve Maestro aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. RSK3 ve RSK4 izoformları için homoloji modellemeleri SwissModel ve DS 2021 programları aracılığıyla elde edilen sonuçlardan aşağıda bahsedilmiştir.

4.1.1. Farmakofor Esaslı Çalışmalar

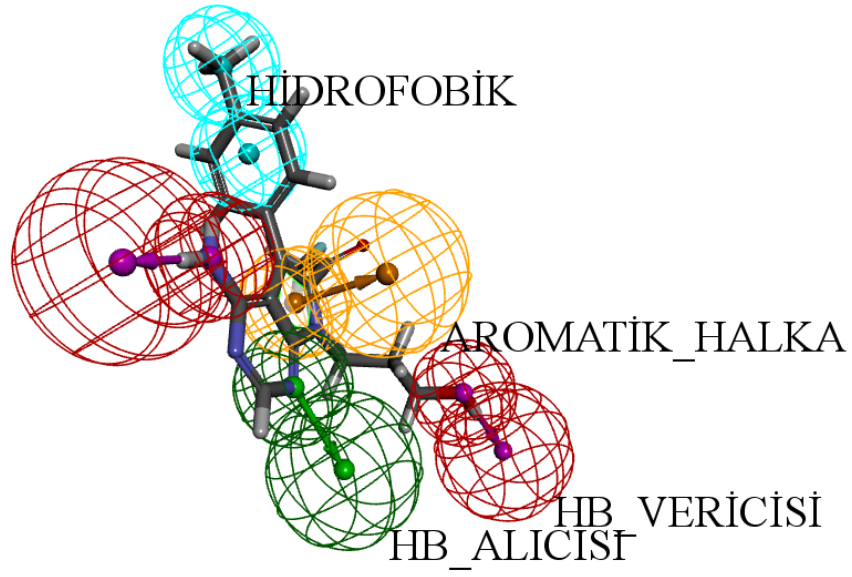
LEİT yaklaşımlarından biri olan farmakofor modelleme çalışmalarında p90RSK ailesi izoformları için bilinen 5 inhibitörünün (BI-D1870, BRD7389, FMK, LJH685, SL0101) farmakofor modelleri, farmakofor haritalama ve sanal tarama çalışmalarında kullanabilmek için oluşturulmuştur. Farmakofor modeller Şekil 10-14'te verilmiştir.



Şekil 10. BI-D1870 farmakofor modeli ve özellikleri.



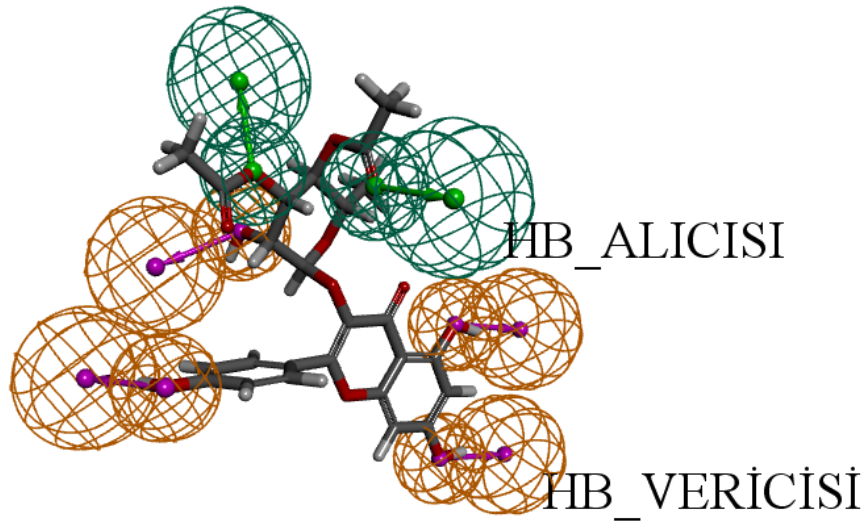
Şekil 11. BRD7389 farmakofor modeli ve özellikleri.



Şekil 12. FMK farmakofor modeli ve özellikleri.



Şekil 13. LJH685 farmakofor modeli ve özellikleri.



Şekil 14. SL0101 farmakofor modeli ve özellikleri.

Şekil 10-14'te verilen farmakofor modellere göre sırasıyla BI-D1870 ve FMK ligandları için hidrojen bağ alıcı ve vericisi, aromatik halka ve hidrofobik bölge, LJH685 ligandı için hidrojen bağ vericisi, hidrofobik bölge, aromatik halka, pozitif iyonlaşabilir özellik belirlenirken SL0101 ligandı için hidrojen bağ alıcısı ve vericisi, BRD7389 ligandı için hidrojen bağ alıcısı ve vericisi, aromatik halka gibi özellikleri belirlenmiştir.

Farmakofor Haritalama, Sanal Tarama, İlaç Benzerliğini Tanımlama ve Toksisite Tahmin Testleri

p90RSK izoformları için bilinen 5 inhibitör (BI-D1870, BRD7389, FMK, LJH685, SL0101) kullanılarak Bölüm 3.2.1.'de verilen küçük molekül kimyasal veri tabanlarına ait çeşitli kimyasal kütüphanelerinden DS 2021 programı aracılığıyla yapılan farmakofor-esaslı sanal tarama çalışmaları ile yaklaşık 800.000 molekül taranmıştır. Bilinen ligandların farmakokinetik özelliklerine göre eşleşen moleküllerin ADMET, RO5 ve toksisite testleri ile yapılan filtrelemelerinin sonuçlarına bu bölümde yer verilmiştir. ADMET/RO5 sonuçları AlogP98 (hücre geçirgenliği), kan-beyin bariyeri, sulu çözünürlük, bağırsak Emilimi, hepatotoksisite, sitokrom P450 inhibitörü, plazma protein bağlanması sayısal verileri esas alınarak değerlendirilmiştir. AlogP98 değeri 5'ten küçük ise hücre geçirgenliği ideal; sulu çözünürlük seviyesi değerleri 2 (az), 3 (iyi); Kan Beyin Bariyeri (KBB) seviyesi değerleri 2

(orta), 3 (az); 4 (Tanımlanmamış); Sitokrom P450 2D6 seviyesi: 1 (inhibitör), 0 (non-inhibitör), Hepatoksisite: True (inhibitör); False (non-inhibitör) insan Bağırsak Absorpsiyon seviyesi: 0 (iyi), 1 (orta) 2 (az); 3 (çok az); Plazma Protein Bağlanması: 0 (zayıf); 1 (güçlü) olarak kabul edilmiştir. Filtrelenen moleküllerin kemirgenler için karsinojenitelerine, mutajenite ve toksisite *in siliko* tahmin edilmiştir. FMK farmakoforuna bağlı olarak triazol, indol türevleri ve protein mimetics kütüphanelerinden çıkan en iyi ilk 10 ligand Ek Tablo 21-24'te verilmiştir.

Ek Tablo 21'de verilen RSK2 protein mimetics ADMET sonuçlarına göre ilk 10 ligandın AlogP98 değeri 5'ten küçük olup hücre geçirgenlikleri idealdir. Bununla beraber KBB, sulu çözünürlük ve absorpsiyon değerleri normal seyir halindedir ve hiçbir sitokrom P450'nin inhibitörü değildir. Ek Tablo 25'te verilen toksisite sonuçlarına göre Compound1199, Compound4104 ve Compound5787 bileşiklerinin potansiyel inhibitör adayları olabileceği öngörülmektedir.

Ek Tablo 22'de verilen RSK1 triazol ADMET sonuçlarına göre ilk 10 ligandın AlogP98 değeri 5'ten küçük olup hücre geçirgenlikleri idealdir. Bununla beraber KBB, sulu çözünürlük ve absorpsiyon değerleri normal halinde olup sitokrom P450'nin inhibitörü değildir. D291-0052 ligandı hariç diğer 9 molekül toksisite testlerini geçmişlerdir (Ek Tablo 26).

Ek Tablo 23-24'te verilen indol türevleri ADMET sonuçlarına göre RSK1 ve RSK2 için çıkan ilk 10 ligandın birkaç tanesi dışında AlogP98 değerleri 5'ten büyük olup hücre geçirgenliği için ideal değillerdir. Bununla beraber KBB, sulu çözünürlük ve absorpsiyon değerleri normal halinde olup sitokrom P450'nin inhibitörü değildir. Ek Tablo 27'de verilen *in siliko* toksisite tahminlerin sonuçlarına göre indol türevleri genellikle toksik olarak hesaplanmışlardır. Bunun dışında, V013-5841 ve V029-0817 ligandları toksik olmayan potansiyel olarak değerlendirilebilir. Sanal taramada taranan triazol ve indol türevli bileşikler farmakofor potansiyeli yüksek anti-kanser bileşikler olarak literatürde yer almaktadır (Jia vd., 2020; Sumrra vd., 2020). Terapötik etkisi bilinen indol türevli ilaçlar üzerine rapor edilen kombine *in siliko* ve *in vitro* bir çalışmada antikanser aktivite

gösterdiklerini destekler niteliktedir (Comert Onder vd., 2022). Triazol ve indol bileşikleri karşılaştırıldığında ise Ek Tablo ADMET sonuçlarına göre belirlenen ilk 10 ligandtan triazol ve protein mimetics ligandları indol türevlerine göre ilaç olabilme potansiyelleri daha yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

Bu tez kapsamında (Maestro ve DS 2021) programları ile 3 farklı yöntem (CDOCKER, Glide/SP, Libdock) kullanılarak p90RSK izoformları için moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve sonuçlarına yer verilmiştir. DS 2021 programında hazırlanan RSK1-CTKD (PDB:3RNY), RSK2-CTKD (PDB:4D9T) izoformlarına yönelik RSK ailesinin C-uç bölgesine inhibitör olarak tanımlanan FMK ligandı için taranan moleküllerin moleküler yerleştirmesi CDOCKER algoritması ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Libdock modülü kullanılarak RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) ve RSK2-NTKD (PDB:4NUS) izoformları için yapı-esaslı sanal tarama çalışması yapılmıştır. DS 2021 programında CHARMM esaslı kuvvet alanında etkileşim ve bağlanma enerjileri kkal/mol olarak hesaplanan ligandların tabloları ve yerleşen bazı ligandların DS Visualizer yardımıyla görselleştirilmiş 2B ligand etkileşim diyagramları EKLER bölümünde verilmiştir.

Schrödinger programında hazırlanan RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q, 2Z7R), RSK2-NTKD (PDB:4NUS, 5D9K, 3UBD) izoformları için RSK ailesinin N-uç bölgesine inhibitör olarak tanımlanan BI-D1870, LJH685 ve SL0101 ligandları kullanılarak taranan moleküller kullanılmıştır. Ayrıca, çeşitli veri tabanları ile yapı esaslı sanal tarama OPLS-2005 kuvvet alanında Glide/SP yerleştirme skorları kkal/mol olarak hesaplanan ligandların tabloları EKLER bölümünde verilmiştir.

DS 2021 Programı ile Yapılan Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

RSK1-CTKD (PDB:3RNY) ve RSK2-CTKD (PDB:4D9T) izoformlarının C-uç kinaz bölgelerinin kristal yapıları kullanılarak FMK ligandına dayalı sanal taramadan çıkan aday moleküller ile moleküler yerleştirme çalışmaları CDOCKER algoritması ile yapılmıştır. Libdock modülü kullanılarak RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) ve RSK2-NTKD (PDB:4NUS) izoformları için yapı esaslı sanal tarama çalışması yapılmıştır. Çıkan sonuçlar 2B etkileşimleri, CDOCKER, CDOCKER etkileşim değerleri bağlanma konformasyonları açısından değerlendirilerek elde edilmiştir.

RSK1 ve RSK2 Hedefine Yönelik Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

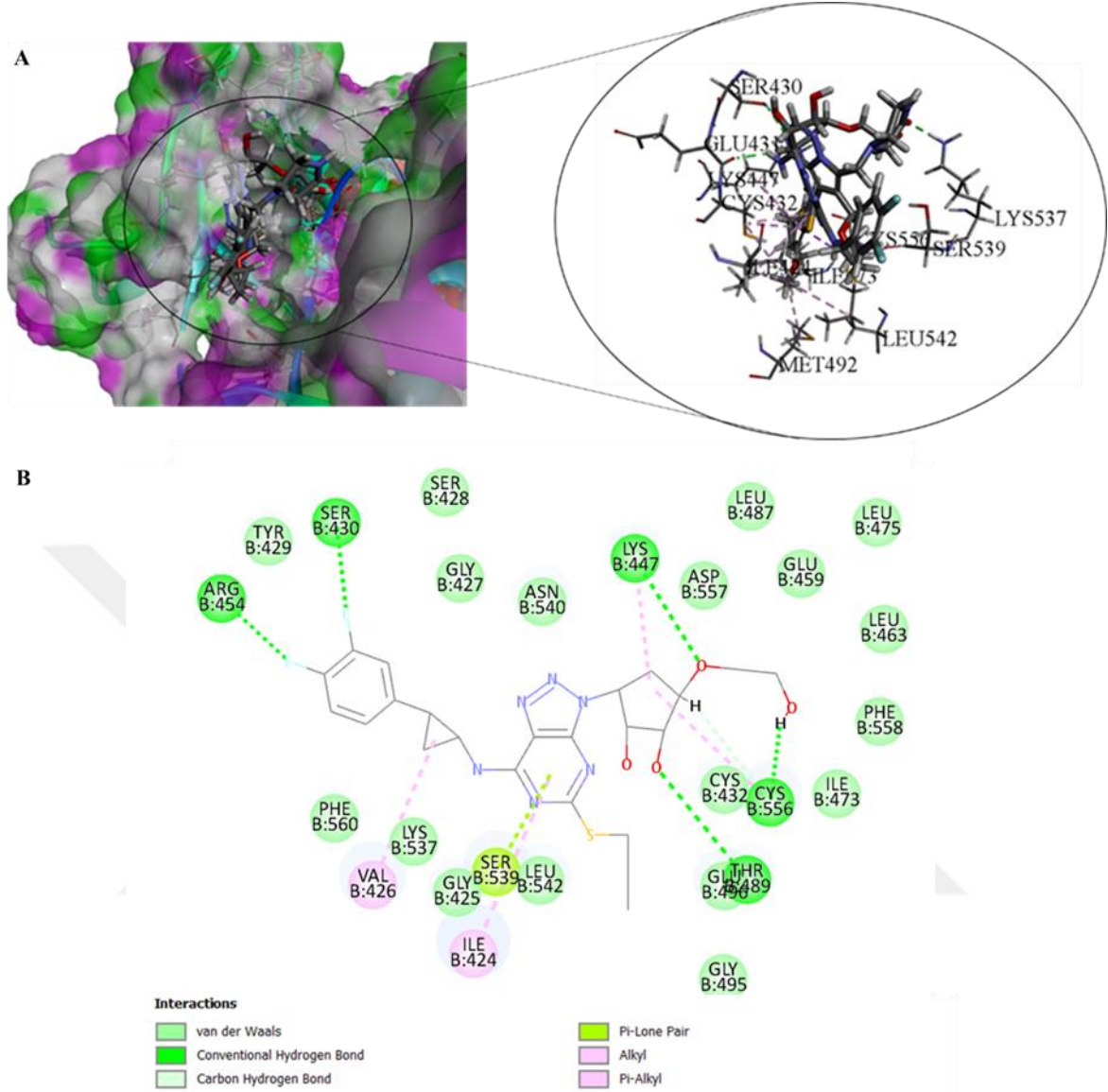
RSK1-CTKD (PDB:3RNY_B) (Li vd., 2012) kristal yapısı kullanılarak yapılan moleküler yerleştirme çalışmalarında C-uç spesifik bilinen FMK inhibitörü ile taranan ligandlar kullanılmıştır. FMK farmakofor modeline dayanarak RSK1-CTKD ile ChemDiv veri tabanında yapılan moleküler yerleştirme sonuçları EKLER bölümünde Ek Tablo 1 ve Ek Tablo 2’de verilmiştir. Eşleşen ligandların sırasıyla triazol ve indol türevleri kütüphanelerinin 2B etkileşim diyagramları Ek Şekil 1 ve Ek Şekil 2’de verilmiştir. Ek şekillerde verilen 2B etkileşim diyagramlarını değerlendirdiğimizde tüm ligandlarda geleneksel H-bağı, van der Waals, π -alkil ve alkil etkileşimleri ortak olarak gözlemlenmiştir. Bununla beraber, farklı olarak π -sigma, π -sülfür, sülfür, π - π , π -anyon ve π -katyon gibi etkileşimlerde bulgularımız arasındadır. Genelde, ortak olarak RSK1-CTKD ve RSK2-CTKD izoformları için Ile424, Cys432, Ser539, Asn540, Val426, Asp557 gibi amino asit (aa) kalıntıları etkileşimler gözlemlenmiştir. Li ve arkadaşları RSK1-CTKD için 3RNY PDB kodlu B zincirindeki bağlanma cebinde yer alan Lys447, Glu459, Asp557, Asp535, Asn540, Glu496, Leu691, Arg503, Asp499, Cys432, Cys556, Thr489 aa kalıntılarını rapor etmişlerdir (Li vd., 2012). Daha önceden yapılan RSK1-CTKD (3RNY) kristal yapısı kullanılarak MZA ile yapılan moleküler yerleştirme çalışmasında RSK1-MZA kompleksi için güçlü hidrojen bağı ve π -istifleme etkileşimleri bildirilmiştir. Bununla beraber, özellikle Asp557 ve Arg454 ile hidroksil grubu hidrojen bağları olduğu rapor edilmiştir. Sonuç olarak, Phe560 ve MZA’nın polisiklik grubu arasında alifatik-aromatik etkileşimler rapor

edilmiştir (Mayer, 2021). Glu 496, 3RNY-ATP bağlama cebi içinde yer alırken, 4D9T'nin Glu 500 kalıntısına karşılık gelmektedir (Mayer, 2021).

RSK2-CTKD (PDB:4D9T) kristal yapısı kullanılarak yapılan moleküler yerleştirme çalışmalarında C-uç için spesifik bilinen FMK inhibitörü ile taranan ligandlar kullanılmıştır. Homoloji modelinin oluşturulduğu çalışmada RSK2-CTKD için bağlanma cebinde Arg50, Thr493, Glu500, Glu463, Pro696, Cys560, Cys436, Lys451, Asp561, Asp539, Asp503, Asn544 aa kalıntıları tanımlanmıştır (Serafimova vd., 2012). Ayrıca, aynı çalışmada MZA'nın RSK2-CTKD'si ile tahmin edilen bağlanma ilgisinin RSK1'den daha düşük olmasını Glu500, Phe564, Val300 gibi aa kalıntıları üzerindeki gözlemledikleri daha az ve zayıf etkileşimleri ile açıklamışlardır (Mayer, 2021). FMK farmakofor modeline dayanarak RSK2-CTKD (PDB:4D9T) ile yapılan moleküler yerleştirme sonuçları için site-1 bağlanma konumu için indol ve protein mimetics kütüphanelerinin sonuçları Ek Tablo 3 ve 4'te verilmiştir. Ek Şekil 3 ve 4'te ve 2B etkileşim diyagramları verilmiştir.

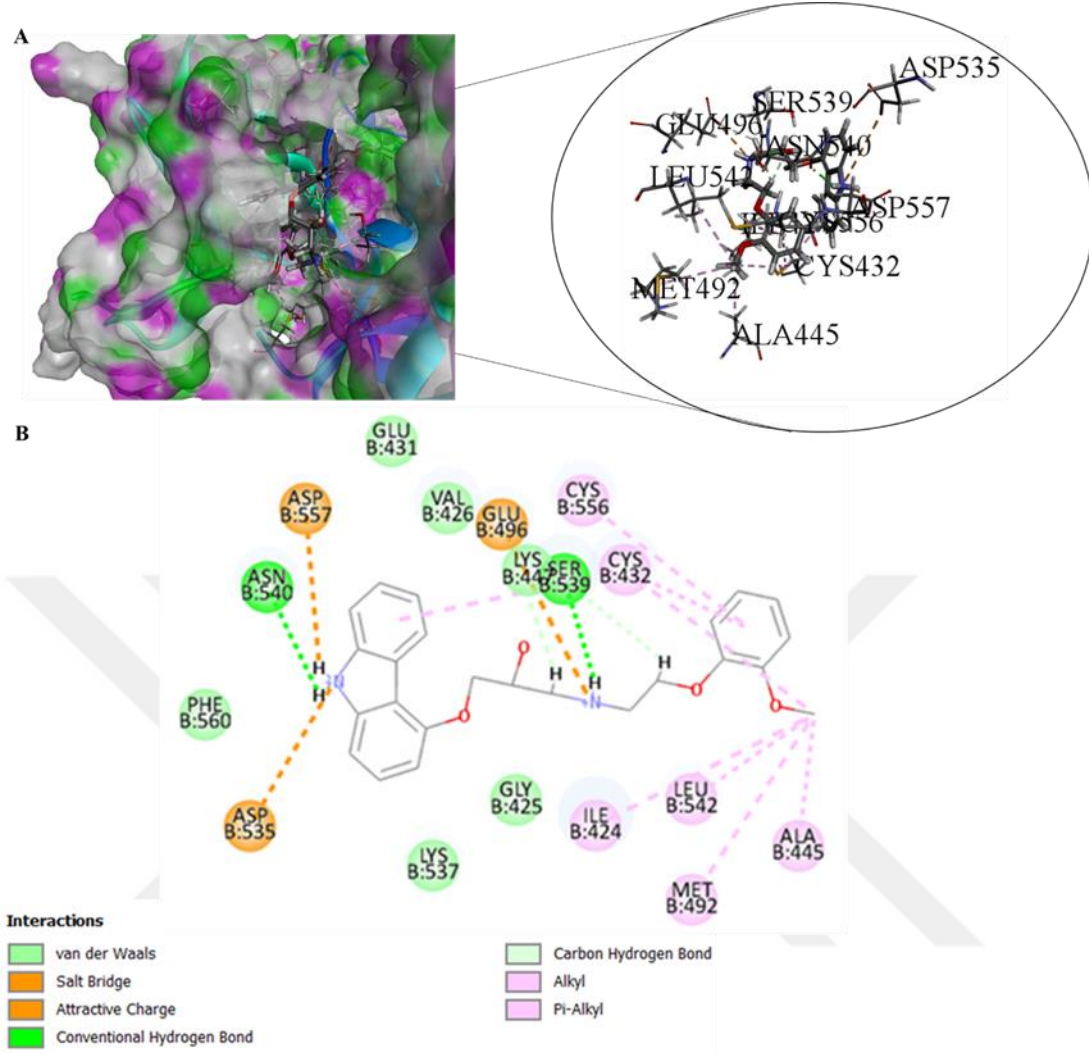
RSK1-CTKD ve RSK2-CTKD ile yapılan farmakofor esaslı sanal tarama Drugbank sonuçlarında ortak moleküller elde edilmiştir. Piyasadan temini mümkün olan ticagrelor ve karvedilol molekülleri *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır. RSK1 ve RSK2 izoformları için -CDOCKER etkileşim enerji değerleri sırasıyla ticagrelor (-56,17 kkal/mol), ticagrelor (-49,90 kkal/mol); karvedilol (-56,25 kkal/mol), karvedilol (-44,03 kkal/mol) olarak hesaplanmıştır.

İki izoform için 2B etkileşim diyagramları karşılaştırıldığında farklı aa kalıntılarında farklı etkileşimler olduğu belirlenmiştir. Ticagrelor-RSK1 kompleksi için önceki RSK1-CTKD çalışmasıyla uyumlu olarak Cys556, Lys447, Thr489, Cys432 aa kalıntılarında C-H bağı, π alkil, alkil, van der Waals etkileşimleri gözlemlenmiştir. Ligandın bağlanma boşluğuna yerleşmesi ve bağlanma etkileşimleri Şekil 15'te verilmiştir.



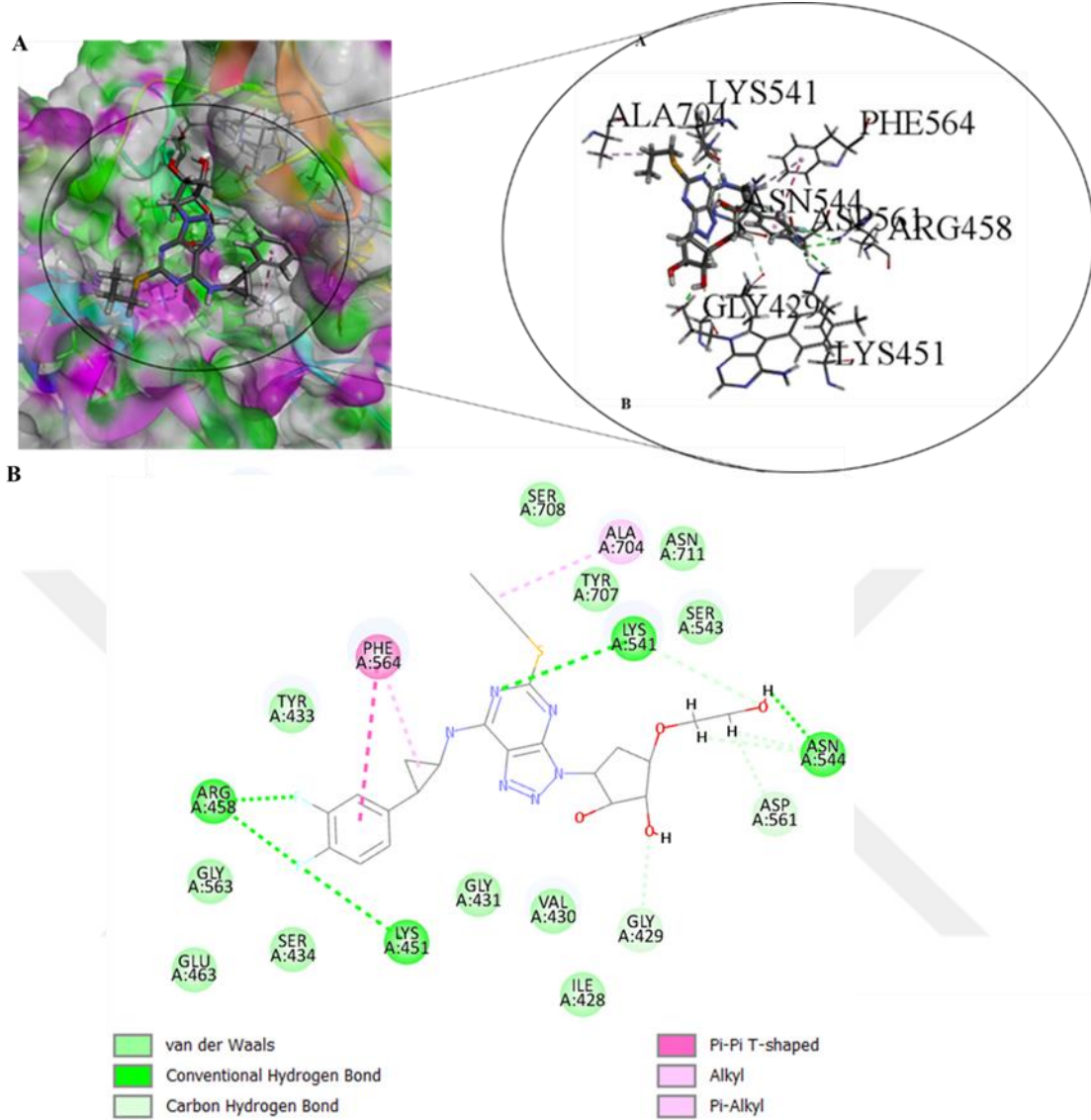
Şekil 15. A) RSK1-CTKD ve Ticagrelor kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.

Karvedilol-RSK1 kompleksinde önceki RSK1-CTKD çalışması ile uyumlu olarak Cys556, Cys432, Glu496, Asp557, Asn540, Asp535, Lys447 aa kalıntılarının üzerinde çekici yük, tuz köprüsü, geleneksel H-bağı gibi etkileşimler gözlemlenmiştir. Ligandın bağlanma boşluğuna yerleşmesi ve bağlanma etkileşimleri Şekil 16'da verilmiştir.



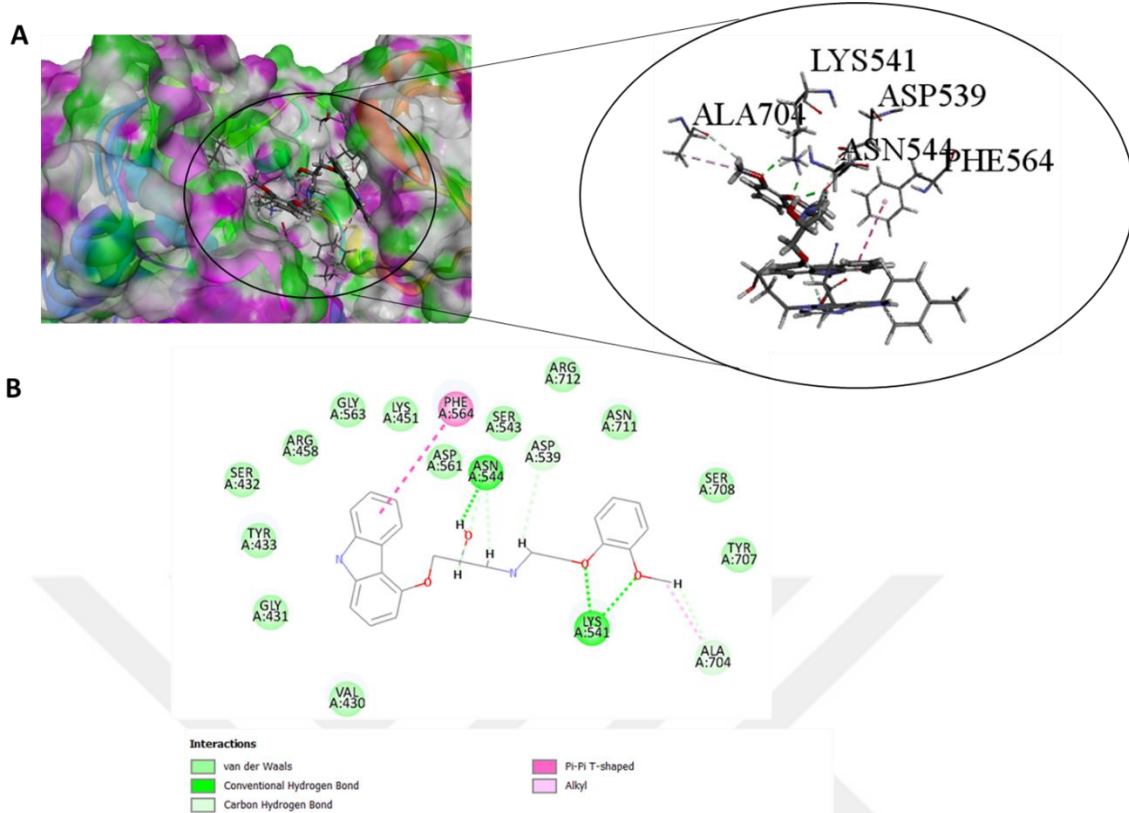
Şekil 16. A) RSK1-CTKD ve Karvedilol kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.

Öte yandan, Ticagrelor-RSK2 kompleksi için Ser434, Asp561, Lys700, Val430, Phe564, Arg458, Asp539 vb. gibi aa kalıntılarında geleneksel H-bağı, π - π , π -alkil etkileşimleri gözlemlenmiştir. Ligandın bağlanma boşluğuna yerleşmesi ve bağlanma etkileşimleri Şekil 17’de verilmiştir.



Şekil 17. A) RSK2-CTKD ve Ticagrelor kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.

Bunlarla birlikte, Karvedilol-RSK2 kompleksi için Phe564, Asp539, Lys541, Asn544 gibi aa kalıntılarında van der Walls, alkil ve geleneksel H-bağı etkileşimleri belirlenmiştir. Sonuç olarak aynı moleküllerin farklı izoformlar için bağlanma ilgilerinin ve bağlanma konumlarının farklı olduğu sonucuna varılmıştır. RSK2-CTKD (Seramifova vd., 2012) için bulgularımız önceki çalışmaları ile uyumludur. Ligandın bağlanma boşluğuna yerleşmesi ve bağlanma etkileşimleri Şekil 18’de verilmiştir.



Şekil 18. A) RSK2-CTKD ve Karvedilol kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.

Schrödinger Programı ile Yapılan Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

Bu bölümde ligand esaslı sanal tarama stratejisi ile RSK2-NTKD (PDB:4NUS, 5D9K, 3UBD) izoformlarının kristal yapıları kullanılarak RSK ailesinin *N*-uç bölgesine inhibitör olarak tanımlanan BI-D1870, LJH685 ve SL0101 ligandları ile Glide/SP bağlanma enerjileri kkal/mol olarak elde edilmiştir.

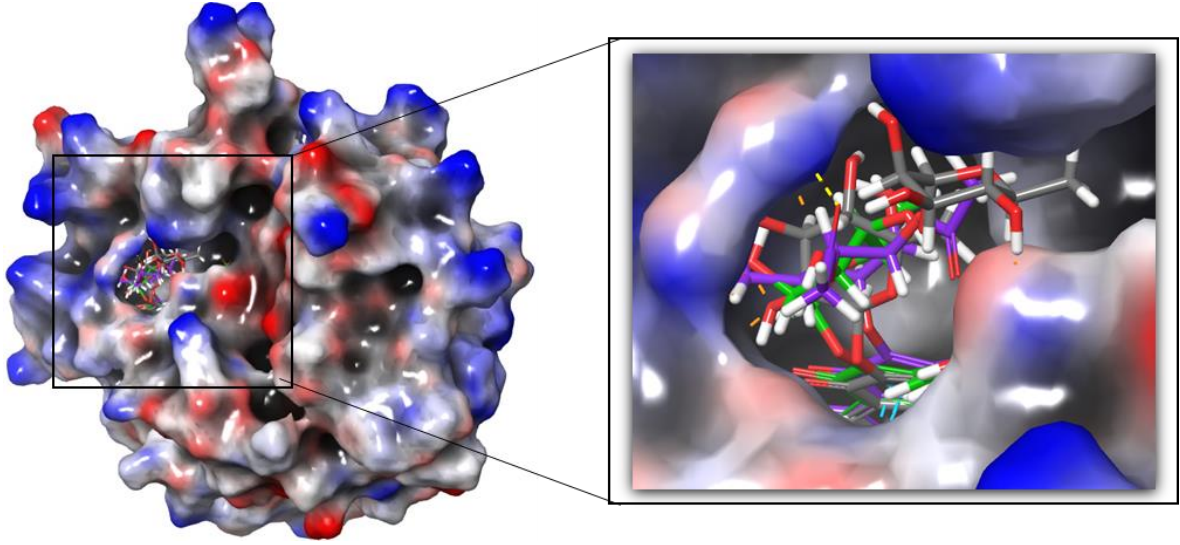
RSK2 Hedefine Yönelik Moleküler Yerleştirme Çalışması

RSK2-NTKD (PDB:4NUS, 5D9K, 3UBD) kristal yapıları ile yapılan moleküler yerleştirme çalışmalarında kristal yapıların kendi ligandları LJH685, BI-D1870 ve SL0101 farmakofor modelleri kullanılarak bölüm 3.2.1.'deki veri tabanlarına ait çeşitli kimyasal kütüphanelerindeki ligandlar taranmıştır. Sonuçlar EKLER bölümünde verilmiştir.

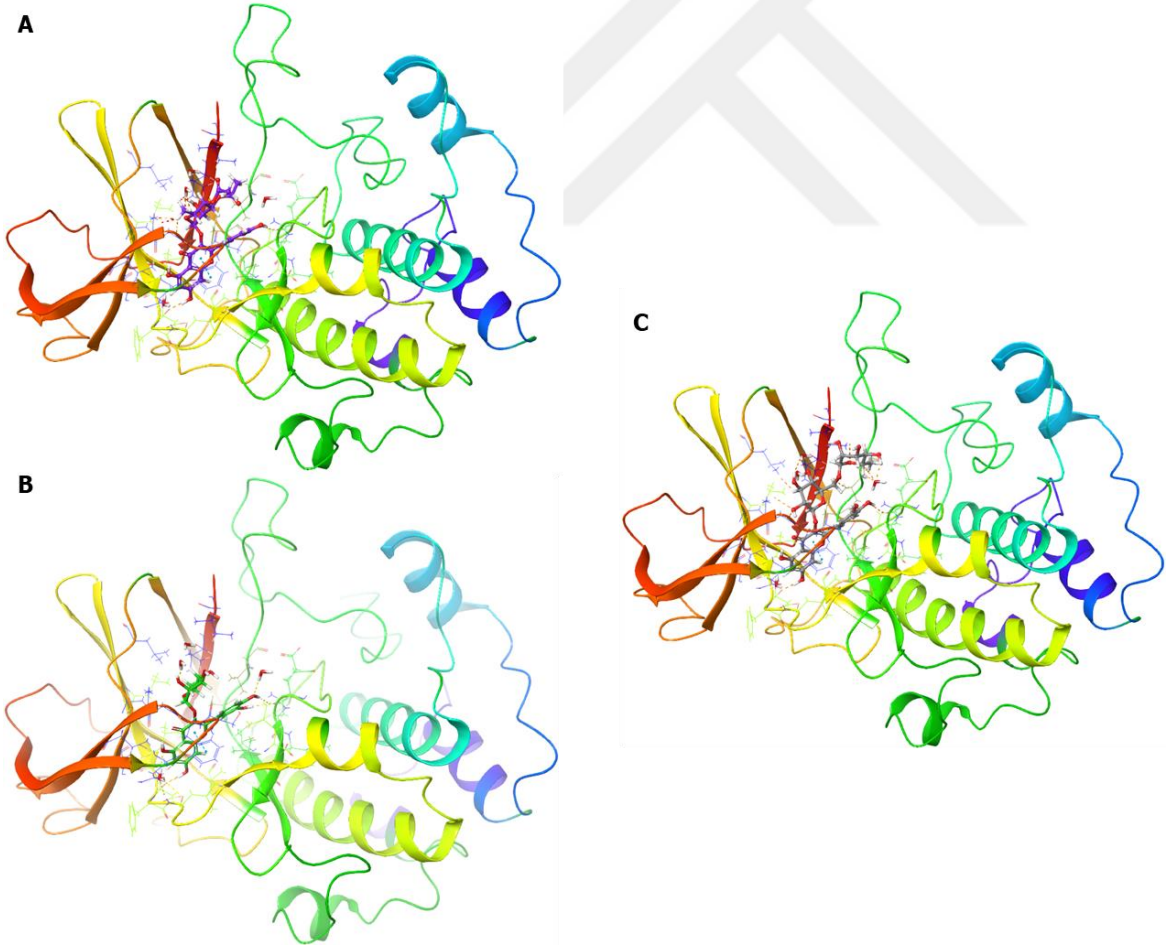
Glide/SP modülü ile hesaplanan RSK2-LJH685 kompleksinin bağlanma enerjisi -9,27 kkal/mol olarak bulunmuştur. RSK2-NTKD (4NUS) kristal yapısı ile yapılan moleküler yerleştirme çalışmasında LJH685 farmakofor modeli kullanılarak veri tabanlarının kimyasal kütüphanelerindeki en iyi bağlanma ilgisine sahip ligandları seçilmiştir. Compound289 (-9,26 kkal/mol), DB03916 (-9,04 kkal/mol), DB11871 (-9,01 kkal/mol), Compound1926 (-8,72 kkal/mol), DB08774 (-8,54 kkal/mol), DB12868 (-8,19 kkal/mol), DB05414 (-8,03 kkal/mol) olarak hesaplanan ligandların (Ek Tablo 10) potansiyel RSK2-NTKD inhibitörü olabilecekleri LJH685 bağlanma enerjilerinin yakınlığından dolayı düşünülmektedir. LJH685 ve RSK2-NTKD arasında Asp154, Asp211, Lys100, Leu150 aa kalıntıları ile H bağı etkileşimleri gözlemlenmiştir. Ek olarak, 4NUS için ligand bağlanma cebinde Phe156, Thr157, Glu197, Leu200, Gly75, Leu74, Val82, Phe212, Thr210, Ala98, Val131, Asp148, Phe149, Leu147 aa kalıntılarının da yer aldığı saptanmıştır.

5D9K-BI-D1870 kompleksinin bağlanma enerjisi -9,36 kkal/mol olarak Glide/SP modülü ile hesaplanmıştır. BI-D1870 farmakofor modelinden elde edilen ligandların en iyi bağlanma ilgisine sahip olanları InterBioScreen ve OTAVA chemicals veri tabanlarından seçilmiştir. Sonuçlar Ek Tablo 14-16'da verilmiştir. Seçilen ligandların bağlanma ilgileri STOCK1N-66635 (-9,62 kkal/mol), STOCK1N-66821 (-9,62 kkal/mol), STOCK1N-70762 (-9,04 kkal/mol), STOCK1N-66563 (-8,94 kkal/mol), STOCK1N-66623 (-8,94 kkal/mol); Compound57219 (-8,81 kkal/mol), Compound56963 (-8,80 kkal/mol), Compound57221 (-8,77 kkal/mol), Compound56297 (-8,76 kkal/mol), Compound56292 (-8,74 kkal/mol); Compound99035 (-8,83 kkal/mol), Compound231146 (-8,81 kkal/mol), Compound230822 (-8,80 kkal/mol), Compound231149 (-8,77 kkal/mol), Compound229959 (-8,76 kkal/mol) olarak hesaplanmışlardır. BI-D1870 bilinen inhibitörüne olan bağlanma enerjilerinin yakınlığından dolayı potansiyel RSK2-NTKD inhibitör adayları olabilecekleri öngörülmektedir. 5D9K kristal yapısı için bağlanma cebinde yer alan aa kalıntıları Val82, Lys100, Ala98, Phe79, Gln76, Phe212, Asp211, Thr210, Val131, Gly75, Leu74, Leu147, Phe149, Asp148, Leu150, Gly153, Arg151 olarak belirlenmiştir. 5D9K-BI-D1870 kompleksi için Leu150, Asp148, Asp211 aa kalıntılarında H-bağı etkileşimleri gözlemlenmiştir.

3UBD-SL0101 kompleksinin bağlanma enerjisi -9,41 kkal/mol olarak Glide/SP modülü ile hesaplanmıştır. SL0101 farmakofor modelinden elde edilen ligandların en iyi bağlanma afinitesine sahip olanları çeşitli veri tabanlarından seçilmiştir. Sonuçlar Ek Tablo 19’da verilmiştir. Seçilen ligandların bağlanma ilgileri Kersitrin (-11,14 kkal/mol), DB1266 (-10,94 kkal/mol), DB16403 (-10,84 kkal/mol), DB02485 (-10,00 kkal/mol), DB01698 (rutin) (-9,96 kkal/mol), DB15919 (-9,73 kkal/mol), Rutin hidrat (-9,96 kkal/mol), Rutin (Rutoside)-1 (-9,96 kkal/mol), STOCK1N-90894 (-8,023 kkal/mol), L865-0118 (-8,016 kkal/mol) olarak hesaplanmışlardır. Seçilen ligandların SL0101 bilinen inhibitörüne olan bağlanma enerjilerinin yakınlığından dolayı potansiyel RSK2-NTKD inhibitör adayları olabilecekleri öngörülmektedir. Seçilen ligandların arasından temin edilebilen rutin bileşiği meme kanserine yönelik *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır. Önceki çalışmalarda MOE1 programı aracılığıyla yapılan RSK2 (PDB:3UBD) hedefine yönelik moleküler yerleştirme çalışmasında 3UBD bağlanma cebinde yer alan Asn198, Thr210, Phe212, Glu197, Leu200, Val131, Leu214, Ala98, Leu100, Asp148, Leu147 aa kalıntılarını ve SL0101 ve Rutin için sırasıyla Asp148, Glu197, Lys100, Phe79, Leu200 aa kalıntılarında H-H bağı, π - π ve π -H, Asp148 H-H bağı etkileşimlerini bildirmişlerdir. Bununla beraber SL0101 ve Rutin için sırasıyla -8,311 kkal/mol ve -5,695 kkal/mol bağlanma enerjileri hesaplanmıştır (Osman vd., 2020). 3UBD homoloji modelinin oluşturulduğu çalışmada SL0101 ve RSK için Phe79, Val131, Leu147, Leu150, Leu200 korunmuş amino asitleri ve Phe79’un RSK2 inhibisyonundaki rolü rapor edilmiştir (Utepbergenov vd., 2012). Aynı çalışmada bağlanma cebi için Leu155, Leu150, Leu200, Leu102, Leu147, Phe212, Phe79, Val131, Ile50, Ile52, Leu214, Asp148, Lys100, Glu197 aa kalıntıları bildirilmiştir (Utepbergenov vd., 2012). Seçilen ligandlar ile 3UBD kompleksinin 3B görüntüsü Şekil 19 ve ko-kristal ligandı ile kompleksleri ve kurdela modelleri Şekil 20’de verilmiştir.



Şekil 19. 3UBD ve yerleşen ligandların kompleksi.



Şekil 20. 3UBD ve ko-kristal ligandı ile kurdela modelleri. A) SL0101, B) Kersitrin, C) Rutin hidrat.

4.1.2. Hedefe Yönelik Sanal Tarama Çalışmaları

Bu bölümde p90RSK ailesi izoformlarının bilinen kristal yapıları kullanılarak yapılan sanal tarama sonuçları verilmiştir. DS 2021 ve Schrödinger programlarında RSK1 (PDB:2Z7Q, 2Z7R) ve RSK2 (PDB:4NUS, 5D9K) kristal yapıları kullanılarak Glide/SP ve RSK1 (PDB:2Z7Q), RSK2 (PDB:4NUS) kristal yapıları kullanılarak Libdock ile hedefe yönelik sanal tarama çalışmaları yapılmıştır.

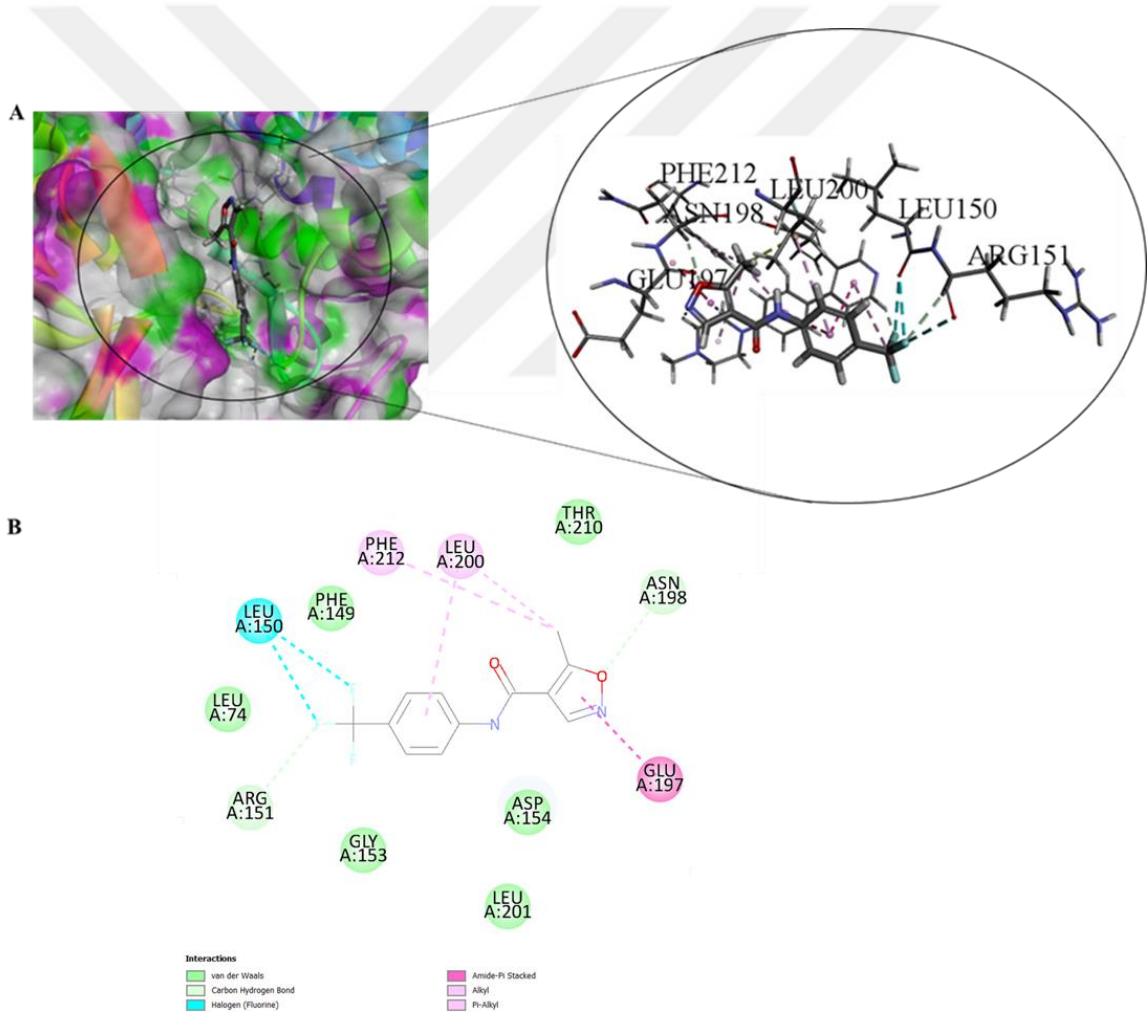
DS 2021 Programı ile Yapılan Yapı Esaslı Sanal Tarama Çalışmaları

Bu tez kapsamında Libdock modülü kullanılarak yapılan yapı esaslı sanal tarama çalışmalarında Selleckchem ve Apexbt veri tabanları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Ek Tablolarda verilmiştir. Çalışmalarda RSK1 (PDB:2Z7Q) ve RSK2 (PDB:4NUS) N-uç kinaz alanı kristal yapıları kullanılmıştır.

RSK1 ve RSK2 Hedefine Yönelik Moleküler Yerleştirme Çalışması

Yapı esaslı sanal tarama çalışmalarında SelleckChem ve Apexbt veri tabanı ile DS 2021 Libdock yöntemleri kullanılmıştır. Veri tabanı bilinen ligandından bağımsız olarak ADMET ve RO5 ile ilaç adayı olamayacak moleküllerin filtrelenmesi sağlanmıştır ve moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçları Ek Tablo 5 ve Tablo 6'da verilmiştir. RSK1-NTKD (2Z7Q), RSK2-NTKD (4NUS) izoformlarının Libdock sonuçları sırasıyla RSK1 için Apexbt veritabanı kinaz inhibitörleri kütüphanesi kullanılmıştır. Seçilen moleküllerden bazılarının Libdock skorları Compound253 (138,67 kkal/mol), Compound250 (138,39 kkal/mol), Compound148 (130,60 kkal/mol) olarak hesaplanmıştır. Sırasıyla RSK1-NTKD ile gösterdikleri etkileşimleri Asp187, Phe206, Ala117, Phe73 aa kalıntılarında halojen, H bağı, π - π ve Asp187, Phe206, Ala117, Phe73 aa kalıntılarında C-H bağı, π -anyon, π - π , Asp187, Asp205, Phe73, Phe206, Arg186 aa kalıntılarında π -anyon, π -alkil, van der Waals olarak belirlenmiştir. RSK2 izoformu için SelleckChem veri tabanının biyoaktif bileşikler kütüphanesi kullanılmıştır. Seçilen moleküllerden bazılarının Libdock

skorları Andarine (113,22 kkal/mol), Vatalanib (109,67 kkal/mol), Rucaparib (106,305 kkal/mol), Leflunomide (93,20 kkal/mol) olarak hesaplanmıştır. RSK2-NTKD ile sırasıyla gösterdikleri etkileşimleri Asp154, Phe212, Lys195 aa kalıntılarındaki π -anyon, π -alkil, π - π gibi Leu74, Glu197, Leu200, Phe212 aa kalıntılarındaki π -katyon, π -sigma, alkil gibi Asp154, Leu200, Lys72, Leu150 aa kalıntılarındaki π -anyon, C-H bağı, π - π , alkil olarak belirlenmiştir. Bunlar arasından, romatizma ilacı olarak kullanılan Leflunomide etken maddesi *in vitro* çalışmalara dahil edilmiştir. Leflunomide Glu197, Leu200, Leu150, Arg151 aa kalıntılarındaki alkil, C-H bağı, halojen, π -alkil etkileşimleri gözlemlenmiştir. Ligandın bağlanma boşluğuna yerleşmesi ve etkileşimleri Şekil 21’de verilmiştir.



Şekil 21. A) RSK2-NTKD ve Leflunomid ile kompleksi. B) 2B etkileşim diyagramı.

Schrödinger Programı ile Yapılan Yapı Esaslı Sanal Tarama Çalışmaları

Bu tez kapsamında Glide/SP yöntemi ile yapılan moleküler yerleştirme çalışmalarında RSK1 (PDB:2Z7Q, 2Z7R) ve RSK2 (PDB:4NUS, 5D9K) *N*-uç kinaz alanı kristal yapıları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Ek Tablolarda verilmiştir.

RSK1 Hedefine Yönelik Moleküler Yerleştirme Çalışması

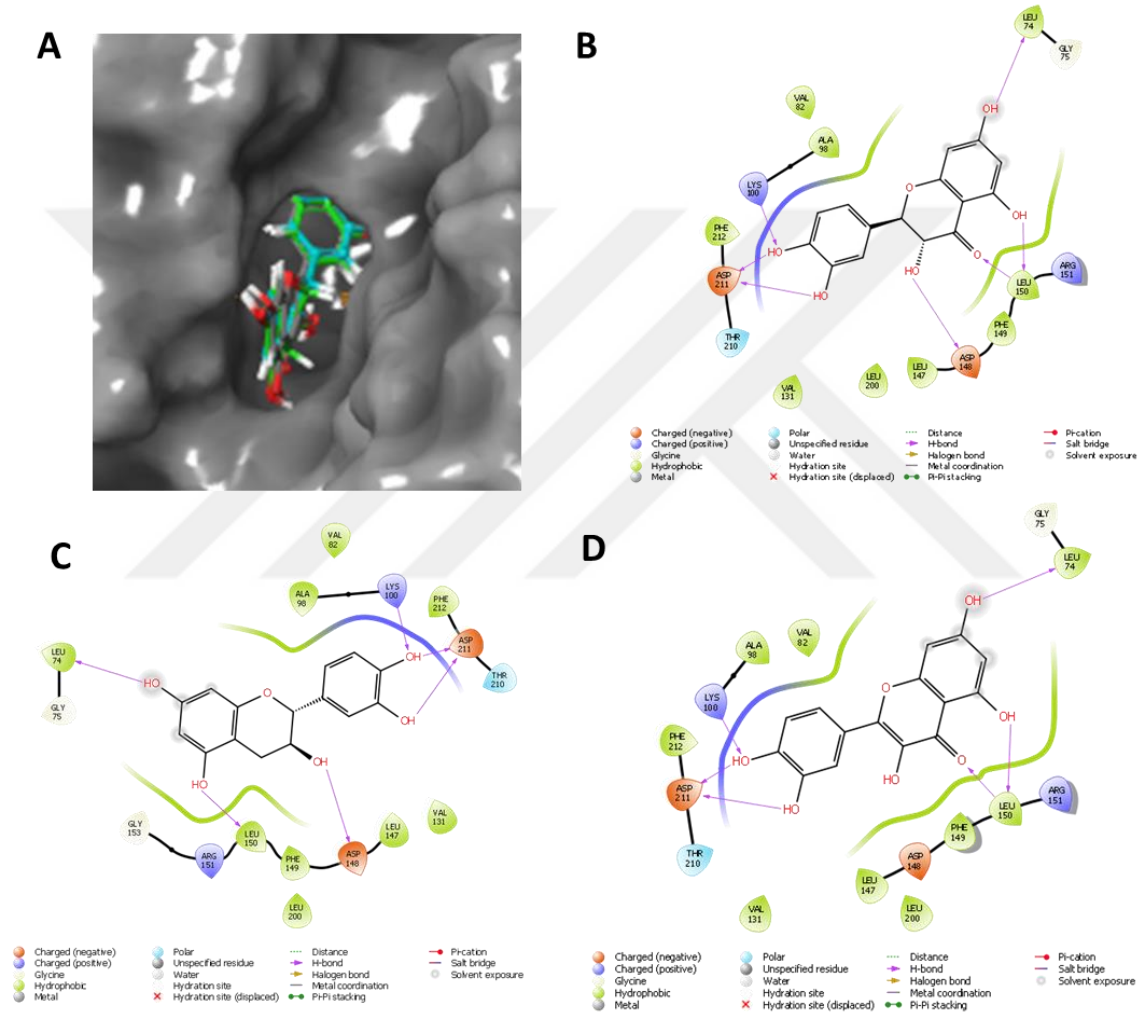
RSK1-NTKD (PDB:2Z7R) kristal yapısı kullanılarak yapılan yapı esaslı sanal tarama çalışmasında seçilen ligandların bağlanma enerjileri CHEMBL2105759 (-8,88 kkal/mol), CHEMBL535 (-8,75 kkal/mol), CHEMBL1789941 (-8,57 kkal/mol) CHEMBL723 (-8,07 kkal/mol); B1051 (-9,90 kkal/mol), B1540 (-9,51 kkal/mol), C4009 (-9,23 kkal/mol), A8412 (-9,05 kkal/mol), A4604 (-8,98 kkal/mol) olarak hesaplanmışlardır. Sonuçlar, sırasıyla Ek Tablo 7 ve Ek Tablo 8’de verilmişlerdir. Bu tezde, temin edilebilen CHEMBL723 (karvedilol) *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır.

RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) kristal yapısı ile taranan Apexbt ve CheMBL veri tabanlarında bağlanma enerjileri en iyi olan moleküller A8412 (-10,48 kkal/mol), A4115 (-8,92 kkal/mol), B1540 (-8,69 kkal/mol), CHEMBL1201774 (-8,75 kkal/mol), CHEMBL1208646 (-8,55 kkal/mol), CHEMBL190 (-8,55 kkal/mol), CHEMBL311498 (-7,71 kkal/mol) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, Ek Tablo 9’da verilmiştir. Bu tezde temin edilebilen CHEMBL311498 (kateşin) *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır.

RSK2 Hedefine Yönelik Moleküler Yerleştirme Çalışması

4NUS kristal yapısı ile veri tabanlarından taranan moleküllerin yerleştirme değerleri Ek Tablo 11-13 verilmiştir. Bölüm 4.1.1.’de verilen LJH685 bağlanma enerjisine yakın olarak yapı esaslı sanal taramadan elde edilen veriler G731-0269 (-8,81 kkal/mol), G731-0126 (-8,76 kkal/mol), G731-0389 (-8,71 kkal/mol); N1842 (-10,10 kkal/mol), N1841 (-9,475 kkal/mol), A8394 (-9,475 kkal/mol), N1828 (-9,47 kkal/mol), C4445 (-9,33 kkal/mol);

CHEMBL311498 (-9,72 kkal/mol), CHEMBL535 (-8,70 kkal/mol); Orantinib (-8,90 kkal/mol), Resveratrol (-8,18 kkal/mol) olarak hesaplanmışlardır. CHEMBL311498 (kateşin) ve N1841 (kersetin) *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır. N1842, kersetin ve kateşin bileşiklerin bağlanma boşluğuna yerleşmesi ve 2B etkileşim diyagramları Şekil 22’de verilmiştir.



Şekil 22. A) N1842 (Turuncu), Kersetin (Yeşil) ve Kateşin (Mavi) bileşiklerinin 4NUS ile kompleksi. B) Taksifolin 2B etkileşim diyagramı. C) Kateşin 2B etkileşim diyagramı. D) Kersetin 2B etkileşim diyagramı.

5D9K kristal yapısı ile veri tabanlarından yapılan yapı esaslı sanal tarama çalışmalarında elde edilen sonuçlar Ek Tablo 17-18 verilmiştir. Bölüm 4.1.1.’de verilen BI-D1870 bağlanma enerjisine yakın olarak DB14128 (-10,19 kkal/mol), DB15688 (-9,28

kkal/mol), DB02483 (-9,21 kkal/mol), DB16325 (-9,19 kkal/mol), DB00157 (-9,15 kkal/mol); STOCK1N-02221 (-9,61 kkal/mol), STOCK1N-06786 (-8,82 kkal/mol), STOCK1N-00557 (-8,76 kkal/mol) olarak hesaplanmışlardır.

Son olarak bilinen meme kanseri ilaçları ve meme kanseri ilaç adayları PubChem veri tabanından taranmıştır. Taranan bileşikler ve kimlik numaraları yanlarında verilmiştir. Goserelin asetat (16052011), Sunitinib (5329102), Ruxolitinib (25126798), Rucaparib (9931954), Merck5 (5494425), BI-2536 (11364421), Ribociclib (44631912), 6-Mercaptopurine (667490), LGK974 (46926973), Entinostat (4261), Celecoxib (2662), ML364 (70789348), Lenvatinib (9823820), PRI-724 (71509318), Lapatinib (208908), Niraparib (24958200), Ipatasertib (24788740), Iniparib (9796068), Idelalisib (11625818), Enzalutamide (15951529), Camptothecin (24360), Pablociclib (5330286), Anastrozole (2187), Methotrexate (126941), ICG-001 (11238147), Epirubicin (41867), Olaparib (23725625), Fulvestrant (104741), Pazopanib (10113978), Nitroxoline (19910), Fluorouracil (3385), Curcumin (969516), Alpelisib (56649450), Afatinib (10184653), Regorafenib (11167602), Talazoparib (135565082), Prednisolone (5755), Pyrotinib (51039030), Docetaxel (148124), Gemcitabine (60750), Veliparib (11960529), Paclitaxel (36314), Axitinib (6450551), Osimertinib (71496458), Capivasertib (25227436), Abemaciclib (46220502), Exemestane (60198), Taselisib (51001932), Raloxifene (5035), Toremifene (3005573), Onc201 (73777259), Nilotinib (644241), Bicalutamide (2375), HCQ (3652), Telmisartan (65999), Dabrafenib (44462760), Doxorubicin (31703), Taxane (9548828), Letrozole (3902), Crizotinib (11626560), Losartan (3961), Mitomycin (5746), Daunorubicin (30323), Cobimetinib (16222096), Erlotinib (176870), Topotecan (60700), Dasatinib (3062316), Tucatinib (51039094), 5-Nitrothiazole (541661), TTI-101 (1324494), Sorafenib (216239), Abiraterone (132971), Nazartinib (72703790), Gefitinib (123631), Melatonin (896), Avitinib (72734520), SRI37892 (41550022), Ceritinib (573793459), CQ (2719), Pablociclib (5330286), Ixabepilone (6445540), Vinblastine (13342), Olmutinib (54758501), Gedatolisib (44516953), Cabozantinib (25102847), Bosutinib (5328940), Vandetanib (3081361), Trametinib (11707110), 2-deoxy_D_glucose (82756). Belirlenen bu ilaçlar RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve RSK1-NTKD (PDB:2Z7R) kristal yapıları kullanılarak p90RSK ailesine yönelik bilinen inhibitörleri ile karşılaştırmalı olarak Glide SP algoritması ile moleküler yerleştirme çalışması yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre RSK1'e en iyi bağlanan ilk 5 meme kanseri ilacı sırasıyla Gosereline asetat (-8,93 kkal/mol), Sunitinib (-8,75 kkal/mol), Merck5 (-8,60 kkal/mol) Ruxolitinib (-8,57 kkal/mol), Capivasertib (-8,50 kkal/mol) olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber, bilinen NTKD inhibitörleri BRD7389 (8,02 kkal/mol), BI-D1870 (-7,70 kkal/mol), SL0101(-7,29 kkal/mol), LJH685 (-6,13 kkal/mol) olarak hesaplanmıştır. İlaçların bağlanma enerjilerine göre elde edilen sonuçları karşılaştırıldığında RSK1 için hesaplanan ChEMBL2105759 (-8,88 kkal/mol), ChEMBL535 (-8,75 kkal/mol), ChEMBL1789941 (-8,57 kkal/mol); B1051(-9,90 kkal/mol), B1540 (-9,51 kkal/mol), C4009 (-9,23 kkal/mol), A8412(-9,05 kkal/mol), A4604 (-8,98 kkal/mol) değerlerin meme kanseri ilaçlarına göre yakın olduğu ve etkileşimlerinin benzer veya aynı olduğu görülmüştür. Buna göre belirlediğimiz bu sonuçlar ile potansiyel ilaç adaylarının ileriki çalışmaları için öncülük edilebileceği öngörülmektedir.

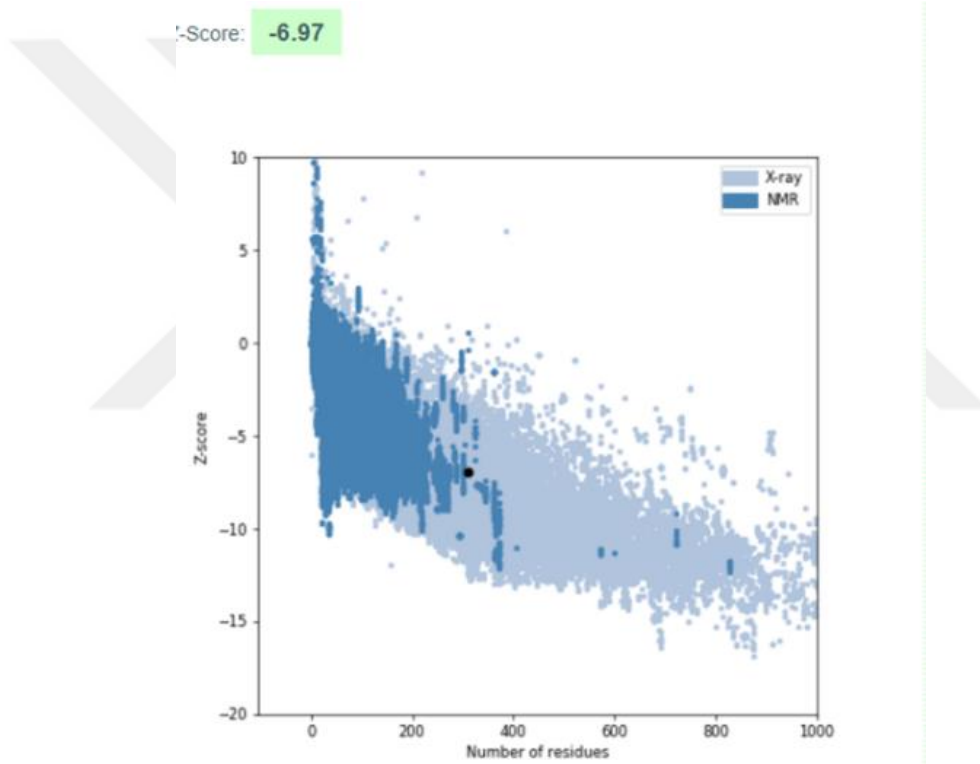
RSK2-NTKD hedefi için hesaplanan en iyi 5 meme kanseri ilacı skorları Sunitinib (-8,11 kkal/mol), Rucaparib (-7,83 kkal/mol), Ruxolitinib (-7,80 kkal/mol), Gosereline asetat (-7,66 kkal/mol) ve Gefinitib (-7,51 kkal/mol) olarak belirlenmişlerdir. Meme kanseri ilaçlarının RSK2-NTKD'si için bölüm 4.1.1'deki bilinen *in silico* belirlenen ligandlardan daha düşük bağlanma enerjisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, 4.1.1. ve 4.1.2. bölümlerde belirlenen örnek olarak G731-0389 (-8,71 kkal/mol); N1842 (-10,10 kkal/mol), N1841 (-9,475 kkal/mol), A8394 (-9,475 kkal/mol), N1828 (-9,47 kkal/mol), C4445 (-9,33 kkal/mol); ChEMBL311498 (-9,72 kkal/mol), ChEMBL535 (-8,70 kkal/mol) hesaplanan değerlerin yüksek ve yakın olduğundan dolayı potansiyel ilaç adayları olarak ileriki çalışmaları için öncülük edilebileceği öngörülmektedir.

4.1.3. Homoloji Modelleme

Bu bölümde tez kapsamında SwissModel ve DS 2021 programları aracılığıyla oluşturulan RSK3-NTKD ve RSK4-CTKD homoloji modellerinin sonuçları verilmiştir.

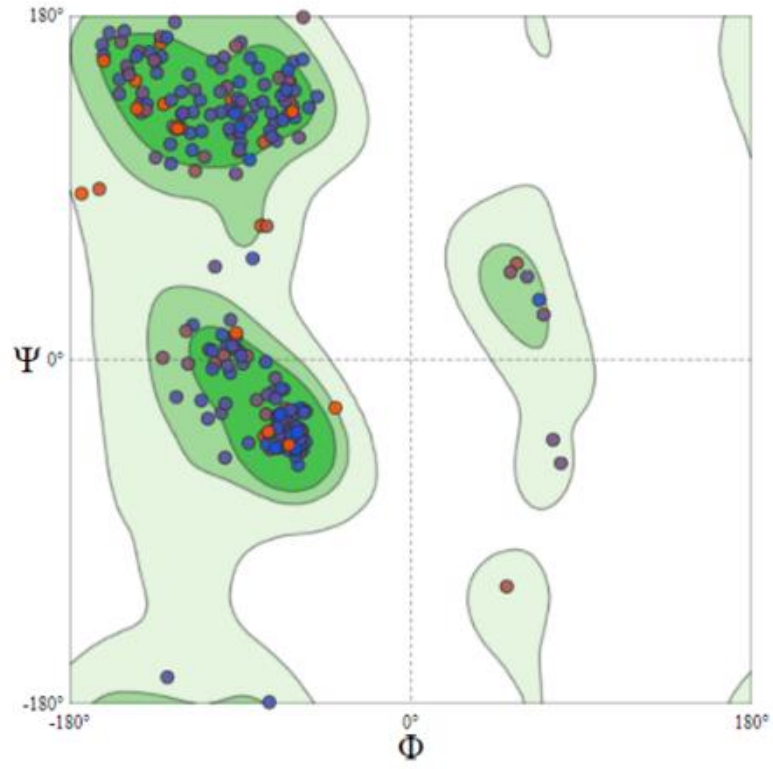
RSK3 Homoloji Modellemesi

Tez kapsamında RSK3 için yapılması planlanan homoloji modelleri farklı şablonlar kullanılarak oluşturulmuştur. En iyi modeli seçilmiştir. Modeller Ramachandran plot grafiği, Z-skoru benzerlik oranları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. RSK3-NTKD için en iyi sonucun sekans benzerliği % 90,42 ile 4NW6.1.A şablonu ile olduğu belirlenmiştir (Şekil 25). Z-skoru -6,97 (Şekil 23) ve Ramachandran değeri % 96,42 (Şekil 24) olarak elde edilmiştir.

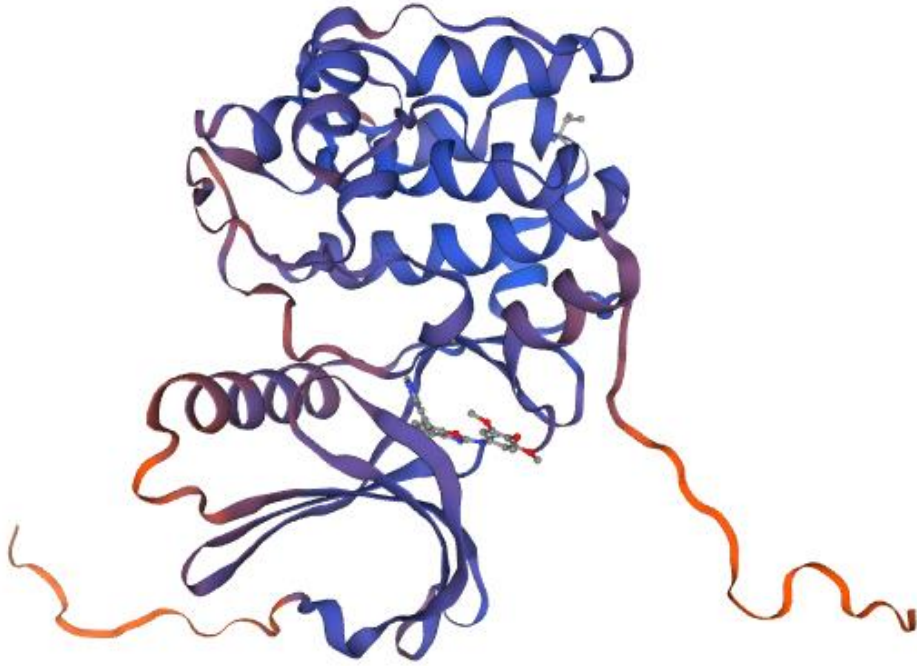


Şekil 23. RSK3-NTKD için Z-skoru.

(<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>)



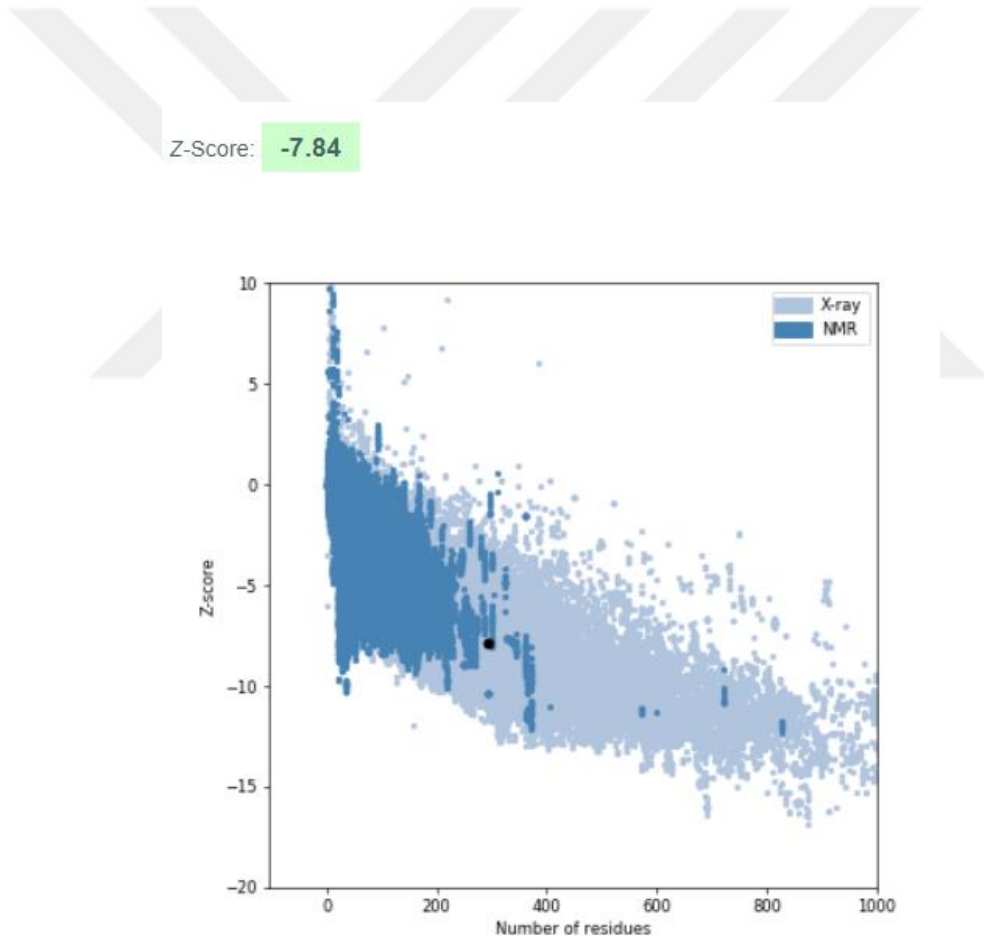
Şekil 24. RSK3-NTKD için Ramachandran Plot grafiği.



Şekil 25. RSK3-NTKD homoloji modeli.

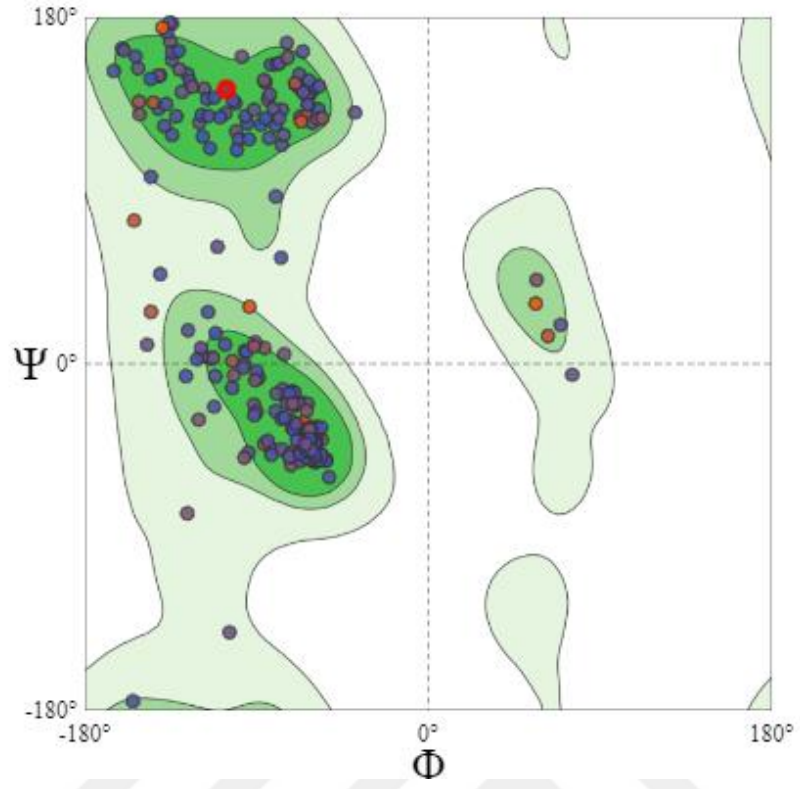
RSK4-CTKD Homoloji Modellemesi

RSK4-CTKD için CAG38803.1 (NCBI-korunmuş alan) sekansı ile SwissModel aracılığıyla 14 farklı şablon kullanılarak homoloji modeller oluşturulmuştur. Modeller Ramachandran plot grafiği (Şekil 27), Z-skoru benzerlik oranları ve yapı analizleri (prosa web server) dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Tüm veriler değerlendirildiğinde en iyi sonucun sekans benzerliği % 72,22 ile 2WNT.1.A şablonu ve yapı analizi doğrulaması -7,84 Z-skor (Şekil 26) değeri ile oluştuğu belirlenmiştir. Ramachandran değeri % 96,23 olarak belirlenmiştir. Şekil 28’de oluşturulan homoloji model verilmiştir.

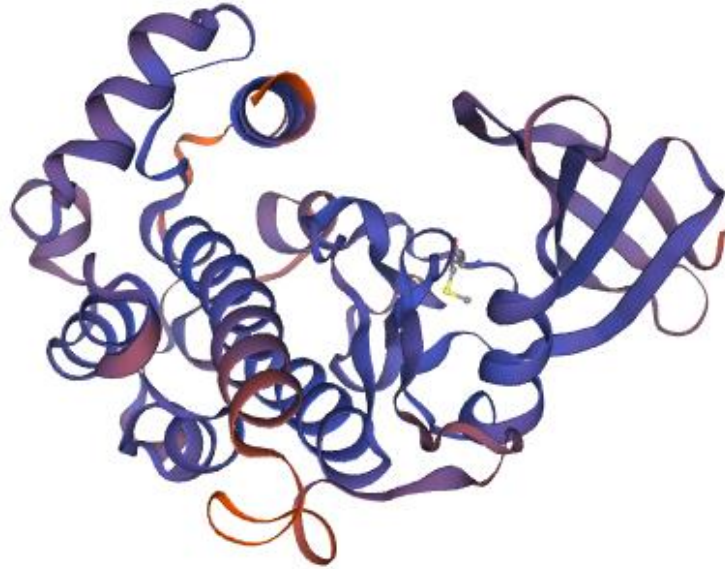


Şekil 26. RSK4-CTKD için Z-skoru.

(<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>)



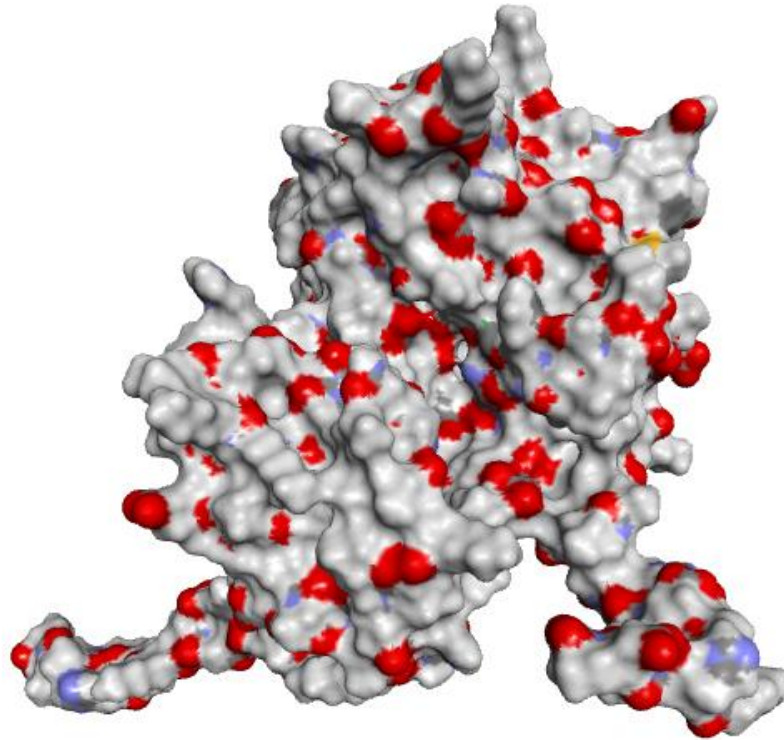
Şekil 27. RSK4-CTKD için Ramachandran Plot Grafiği.



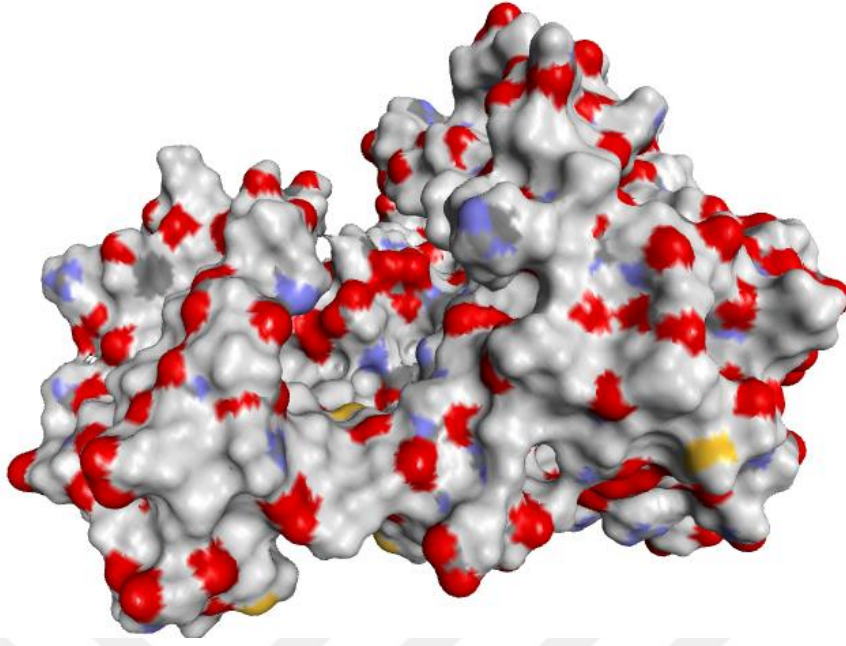
Şekil 28. RSK4-CTKD homoloji modeli.

DS 2021 Homoloji Model Sonuçları

RSK3-NTKD ve RSK4-CTKD izoformları için homoloji modelleri DS2021 programı kullanılarak ayrıca yapılmıştır. Daha önceden yapılan çalışmalarda şablon olarak RSK3-CTKD için 4JG8 (RSK2-CTKD) (Yoon vd., 2021) ve 2WNT (Jagilinki vd., 2016) kullanılmıştır. Bununla beraber, Chrysostomou ve arkadaşları RSK4-NTKD için 6G76, 6G77 ve 6G78 PDB kodlu homoloji modelleri rapor etmişlerdir (Chrysostomou vd., 2021). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, RSK3-CTKD için RSK3I inhibitörü tanımlanmıştır (Yoon vd., 2021). Aynı çalışmada RSK3-CTKD grid için Lys534, Arg531, Arg585, Leu623 ve Pro615 aa kalıntıları rapor edilmiştir. Benzer bir çalışmada, RSK3-CTKD aktif bölgesi için Lys534, Asp532, Thr574, Thr570 (fosforilasyon kalıntısı) olarak bildirmişlerdir (Jagilinki vd., 2016). Bu tez çalışmasında farklı olarak daha önceden yapılmamış RSK3-NTKD için 4NW6 ve RSK4-CTKD için 4D9T şablonları kullanılarak homoloji modeller oluşturulmuş en iyileri seçilmiştir (Şekil 29-30). Oluşturulan homoloji modellerin bilinen ligandları ile CDOCKER çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ligand-izoform komplekslerinin CDOCKER sonuçları ve 2B etkileşim diyagramları aşağıda ayrıntılandırılmıştır.

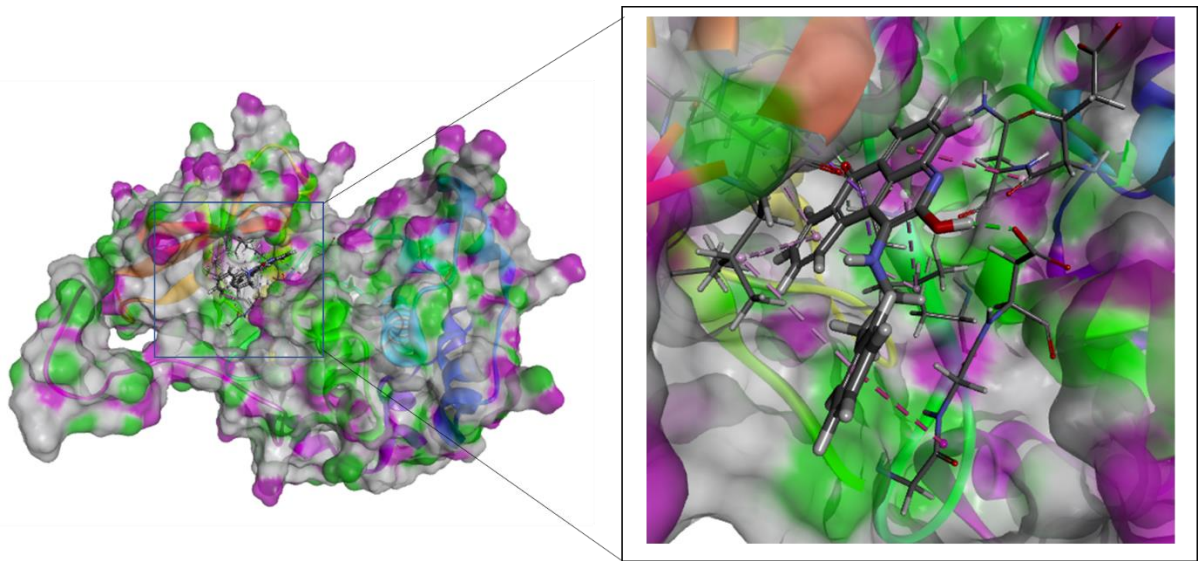


Şekil 29. RSK3-NTKD homoloji modeli.

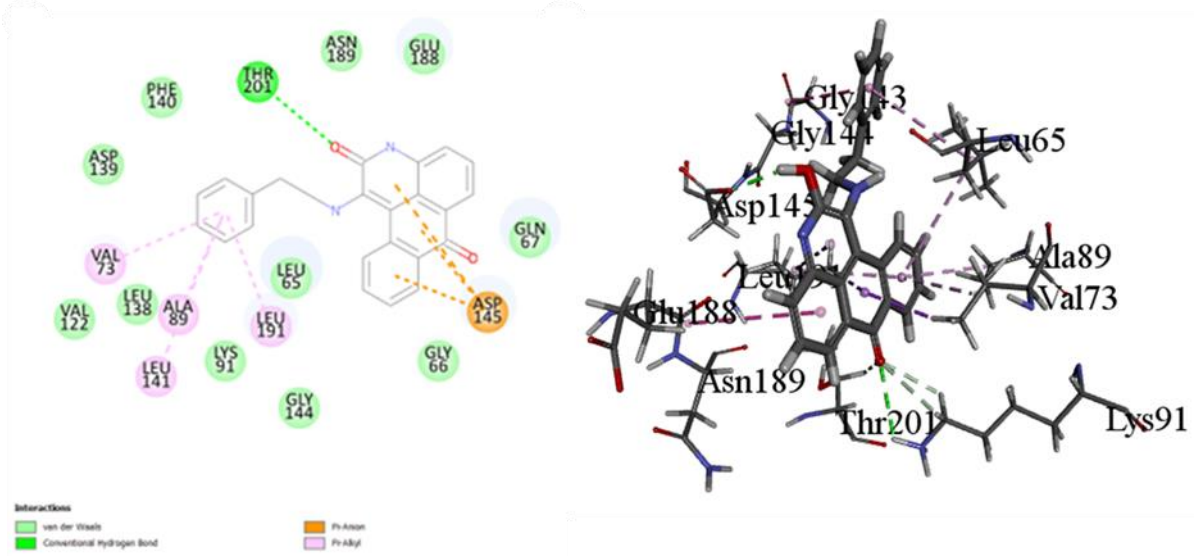


Şekil 30. RSK4-CTKD homoloji modeli.

Sonuç olarak, BRD7389 için CDOCKER değeri -22,95 kkal/mol olarak hesaplanmış ve Val73, Ala89, Leu141, Leu191, Asp145, Thr201 gibi aa kalıntılarındaki π -anyon, geleneksel H-bağı, van der Waals, π -alkil gibi etkileşimleri gözlemlenmiştir (Şekil 32). RSK3-NTKD ve BRD7389 kompleksi Şekil 31’de verilmiştir.

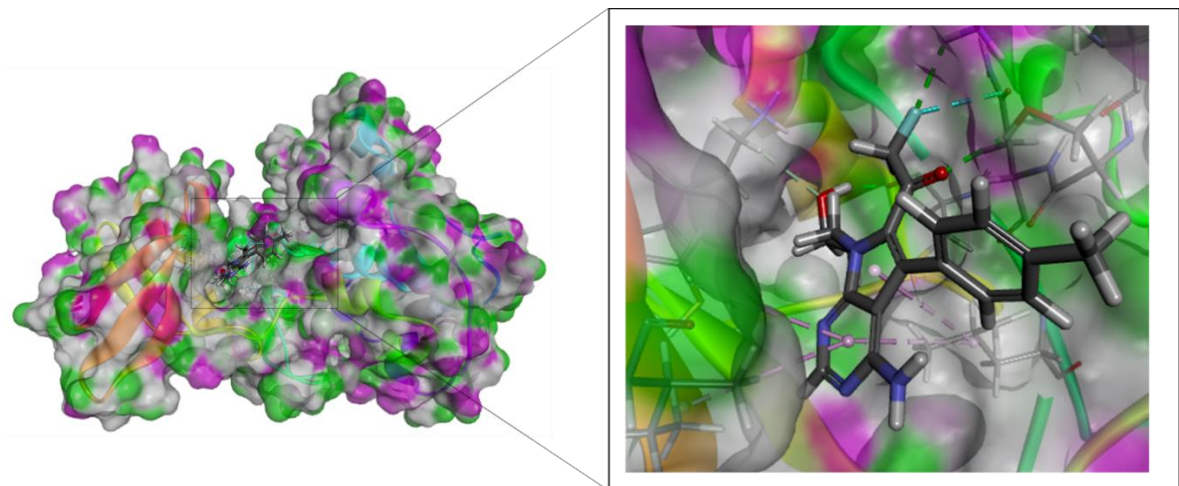


Şekil 31. RSK3-NTKD 3D modeli ve BRD7389’un bağlanma boşluk bölgesine yerleşmesi.

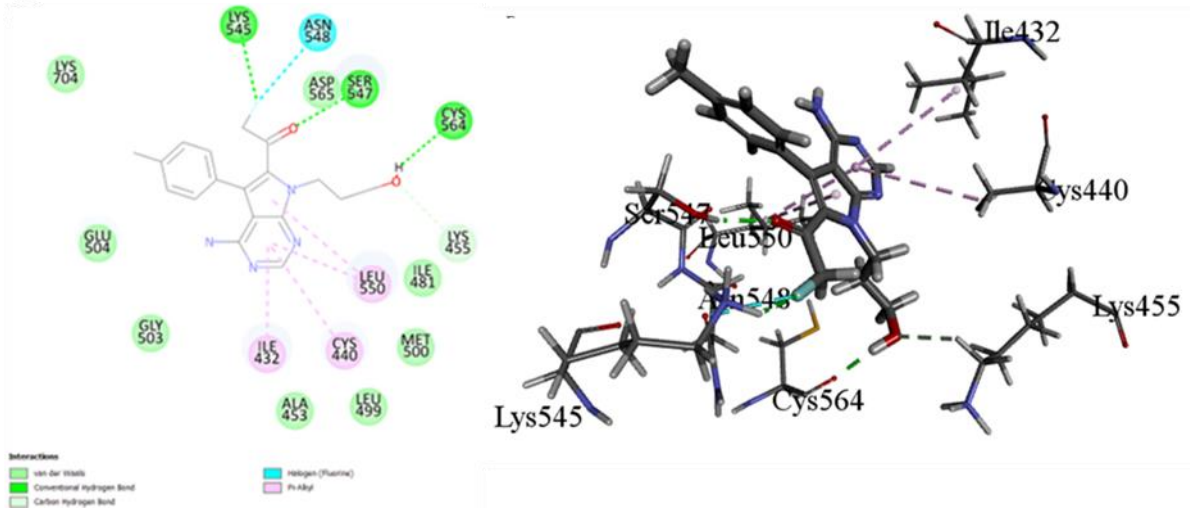


Şekil 32. RSK3-NTKD-BRD7389 etkileşimleri.

Ayrıca, FMK için CDOCKER değeri -16,84 kkal/mol olarak hesaplanmış ve Asn548, Asp565, Cys564, Ile432, Ser547 gibi aa kalıntılarında π -alkil, alkil, halojen, geleneksel H-bağı ve van der Waals etkileşimleri gözlemlenmiştir (Şekil 34). RSK4-CTKD ve FMK kompleksi Şekil 33’te verilmiştir.



Şekil 33. RSK4-CTKD 3D modeli ve FMK’nın bağlanma boşluk bölgesine yerleşmesi.

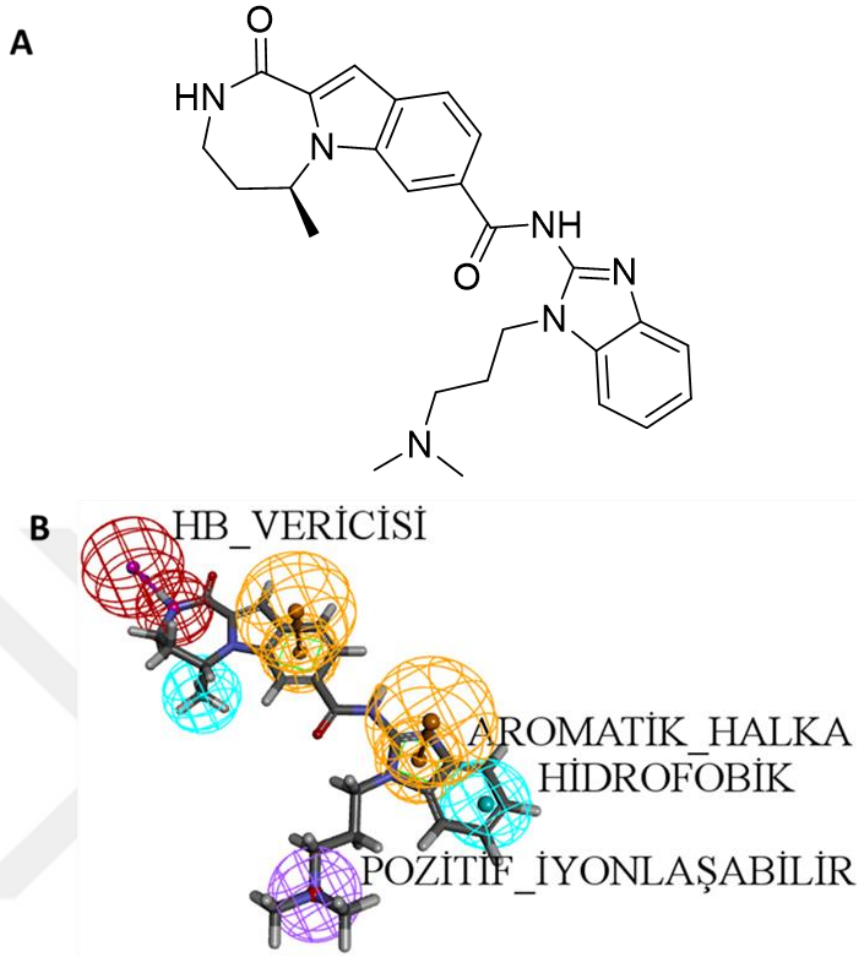


Şekil 34. RSK4-CTKD- FMK etkileşimleri.

Protein veri bankasında homoloji modelleri olmayan RSK3-NTKD ve RSK4-CTKD izoformları için elde edilen sonuçlara göre RSK3 için şablon olarak DS2021 ve SwissModel uyumlu çıkmıştır. Fakat, RSK4-CTKD için SwissModel’de 2WNT izoformunu şablon olarak kullanırken DS 2021 programında RSK4-CTKD için 4D9T izoformunu şablon olarak kullanılmıştır. Oluşturulan homoloji modellerin doğrulanmasında literatürle uyumlu olarak p90RSK ailesinin CTKD inhibitörü olan FMK ligandı RSK4-CTKD izoformu ile bağlanma göstermiştir (Houles ve Roux, 2018; Casalvieri vd., 2017). Literatürde belirtildiği üzere RSK3-NTKD bağlanmasına sahip olan BRD7389 bağlanması *in siliko* olarak görselleştirilmiştir. Böylece, RSK3 ve RSK4 izoformları için ileride yapılacak *in siliko* çalışmalara öncülük edilebilecektir.

4.2. RSK2 İlişkili Diğer İnsan Hastalıklarına Yönelik Adaylar

Kardiyovasküler hastalıklarda RSK2-NTKD inhibitörü olarak etkinliği bilinen BIX02565 ligandına yönelik yapılan LEİT çalışmasında oluşturulan farmakofor modeli için hidrojen bağ vericisi, hidrofobik bölge, aromatik halka, pozitif iyonlaşabilir özellik gibi farmakokinetik özellikleri belirlenmiştir.



Şekil 35. A) BIX02565'in açık yapısı. B) BIX02565 ligandının farmakofor modeli ve özellikleri.

BIX02565 ile farmakofor haritalama çalışması çeşitli veri tabanları aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. ADMET ve Ro5 testleri ile filtrelenen moleküllerin daha sonra Glide/SP yöntemi ile OPLS-2005 kuvvet alanında RSK2-NTKD (PDB:5D9K) kristal yapısı ile moleküler yerleştirme çalışması yapılmıştır. RSK2 ve BIX02565 ligandı arasındaki bağlanma enerjisi (-6,57 kkal/mol) olarak hesaplanmıştır. Standartta göre yüksek bağlanma enerjilerine sahip moleküller sırasıyla DB11871 (-8,64 kkal/mol), DB07812 (-7,53 kkal/mol), DB08073 (-7,47 kkal/mol), DB02112 (-7,30 kkal/mol), DB15982 (-7,30 kkal/mol), DB03231 (-7,287 kkal/mol), DB08569 (-7,13 kkal/mol,) DB02155 (-7,01 kkal/mol) , Z250-1340 (-6,99 kkal/mol), K822-0251 (-6,98 kkal/mol), J047-0203 (-6,96 kkal/mol) (ChemDiv), Compound133176 (-6,84 kkal/mol) (OTAVA), Ipatasertib (-6,57 kkal/mol) (Selleckchem) olarak hesaplanmıştır. Standart ve RSK2 arasında Asp148 aa

kalıntısının üzerinde H-bağı etkileşimi gözlenmiştir. Bağlanma enerjileri Ek Tablo 20’de verilmiştir.

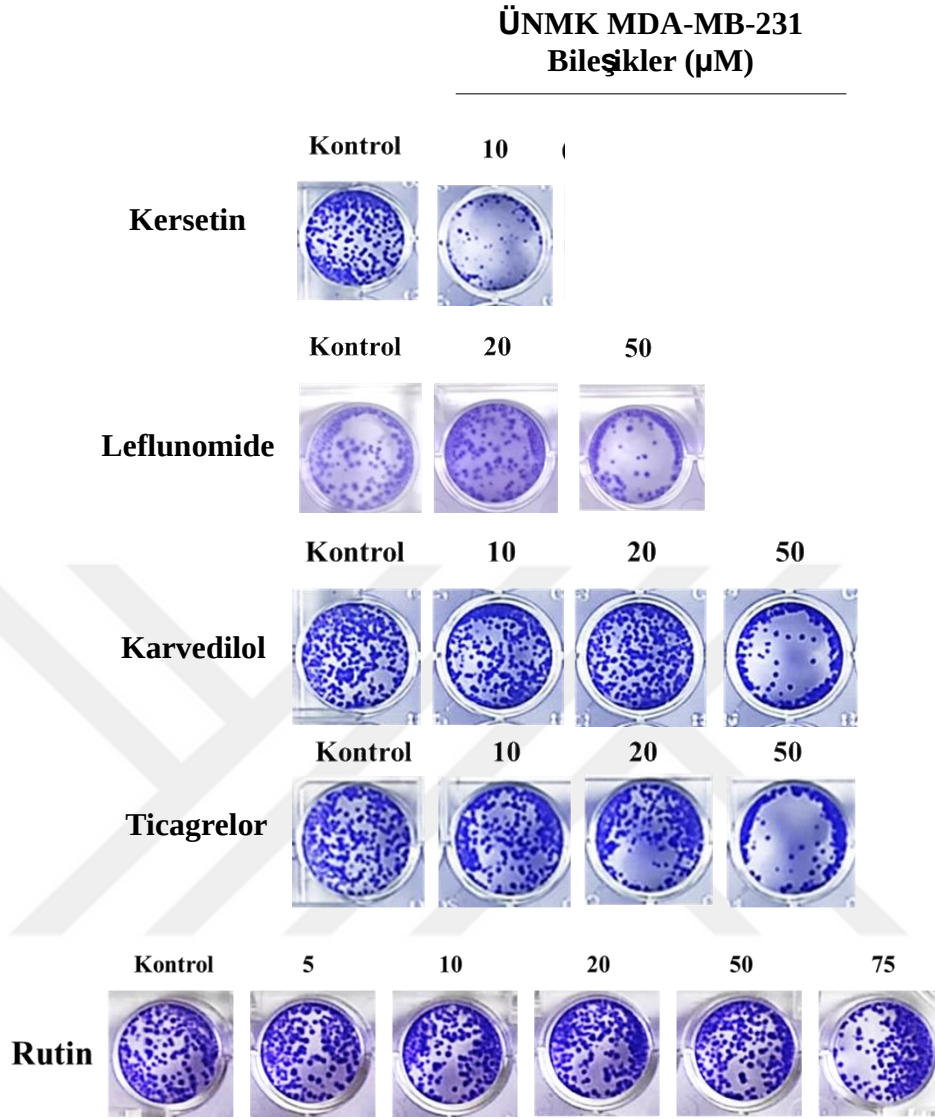
4.3. *In Vitro* Çalışmalar

Bu bölümde bölüm 4.1.1. verilen sonuçlara göre *in siliko* çalışmaların sonucu olarak temin edilebilen ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan karvedilol, leflunomide ve ticagrelor gibi ilaç etken maddelerinin ve kersetin, kateşin, rutin gibi doğal biyoaktif bileşenlerin farklı derişimlerde 24-72 saat aralığında ÜNMK hücre hatları (MDA-MB-231, BT-549 ve BT20) ile MTT sitotoksosite analizi ve MDA-MB-231, BT-549 hücre hatları koloni inhibisyonu ve çoğalması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, ER+ meme kanseri hücre hattında (MCF7), RSK2 yüksek ifade gösterdiği için bu hücre hattında da *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ticagrelor (Brilinta), Karvedilol (Arlec) kalp ve Leflunomide (Arava) romatizma hastalıklarında kullanılan FDA onaylı ilaçlardır.

4.3.1. Koloni Oluşumu İnhibisyonu ve Çoğalması

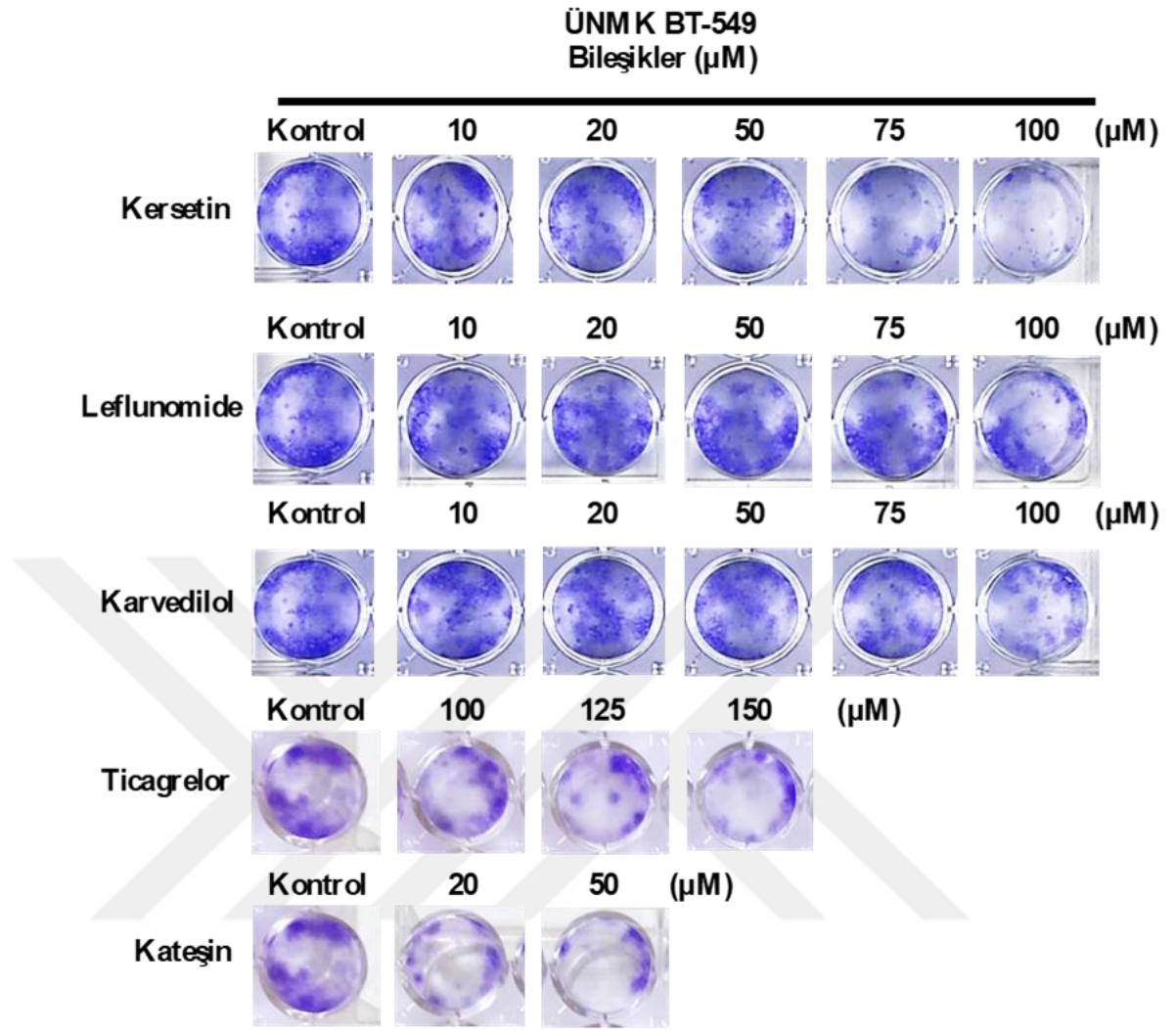
Bu tezde leflunomide, karvedilol, ticagrelor, rutin, kersetin, kateşin bileşikleri değişen derişimlerde (5-150 μ M) ÜNMK MDA-MB-231, BT-549 ve ER+ MCF7 hücrelerinde koloni oluşumunu inhibe edici etkilerinin doz bağımlı çalışması yapılmıştır.

Kersetin ve ilaç (karvedilol, leflunomide ve ticagrelor) etken maddelerinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde koloni oluşumu üzerine inhibisyon etkisi sırasıyla 10 μ M, 50 μ M, 50 μ M ve 50 μ M gözlemlenmiştir. Doğal ürün rutin ise 75 μ M’da inhibisyon etki göstermemiştir. Sonuçlar Şekil 36’da verilmiştir.



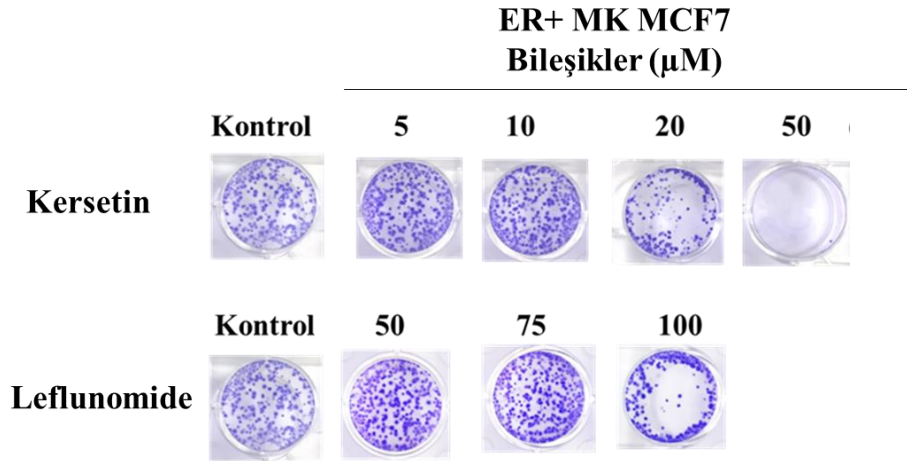
Şekil 36. Karvedilol, leflunomide, ticagrelor, kersetin ve rutin bileşiklerin ÜNMK MDA-MB-231 hücre hattında koloni oluşumu üzerine inhibisyonu.

BT-549 hücre hattında yapılan koloni oluşumu inhibisyonu çalışmasında bulgularımız arasında kersetin için 50 µM'da koloni sayısında azalma ile 75 µM'da inhibisyon etkisi göstermeye başlamıştır. Leflunomide ve karvedilol bileşikleri 100 µM'da etki gösterirken ticagrelor 125 µM, kateşin bileşiği 20 µM'da etki göstermiştir. Sonuçlar Şekil 37'de verilmiştir.



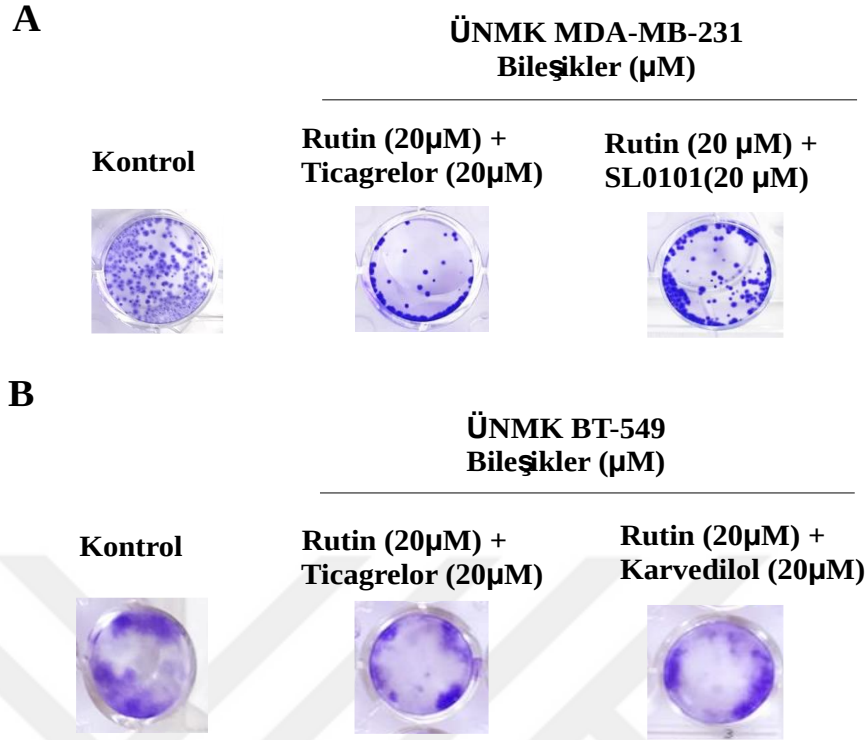
Şekil 37. Kateşin, leflunomide, karvedilol, ticagrelor ve kersetin için ÜNMK BT-549 hücre hattında koloni oluşumu inhibisyonu etkisi.

ER+ MCF7 hücre hattında denenen bileşiklerden kersetin 20 µM’da inhibisyon etkisi göstermeye başlamıştır. Leflunomide ise MCF7 hücrelerinin çoğalmasını 100 µM’da inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 38’de verilmiştir.



Şekil 38. Kersetin ve leflunomide bileşiklerinin ER+ MCF7 hücre hattında koloni inhibisyonu.

Koloni inhibisyon deneylerinin sonucuna göre MDA-MB-231 hücre hattında Rutin bileşiğini 20 μM’da sabit tutarak diğer bileşiklerin derişimlerine göre kombinasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha önceden MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatlarında yapılan kombinasyon çalışmalarında rutin bileşiğinin adjuvan ajan olduğu rapor edilmiştir (Iriti vd., 2017). Bulgularımız bu çalışmayı destekler niteliktedir. Rutin bileşiği MDA-MB-231 hücre hattında 50 μM’da etki gösteren ticagrelorun etkinliğini 20 μM’a kadar düşürdüğü gözlemlenmiştir. Daha önceki yapılan bir çalışmada MDA-MB-453 hücre hattında 20 μM flutamide ile kombinasyon halinde çalışılan SL0101 20 μM için hücre canlılığını anlamlı derecede inhibe ettiği rapor edilmiştir (Naderi ve Liu, 2010). RSK2 bilinen inhibitörü olan SL0101 bileşiği ile yapılan kombinasyon çalışmasında inhibisyon etkisinin rapor edilen değer ile uyumlu olarak 20 μM’da gözlemlendiği görülmektedir (Şekil 39).

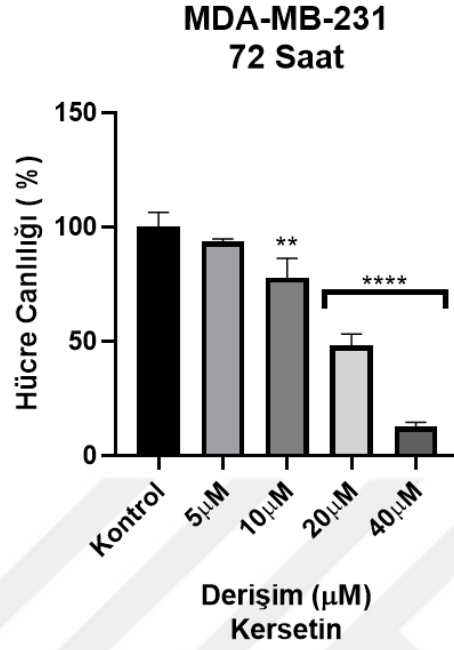


Şekil 39. Bileşiklerin kombinasyonu ile ÜNMK hücre hatlarında koloni oluşumu inhibisyonu. A) MDA-MB-231, B) BT-549.

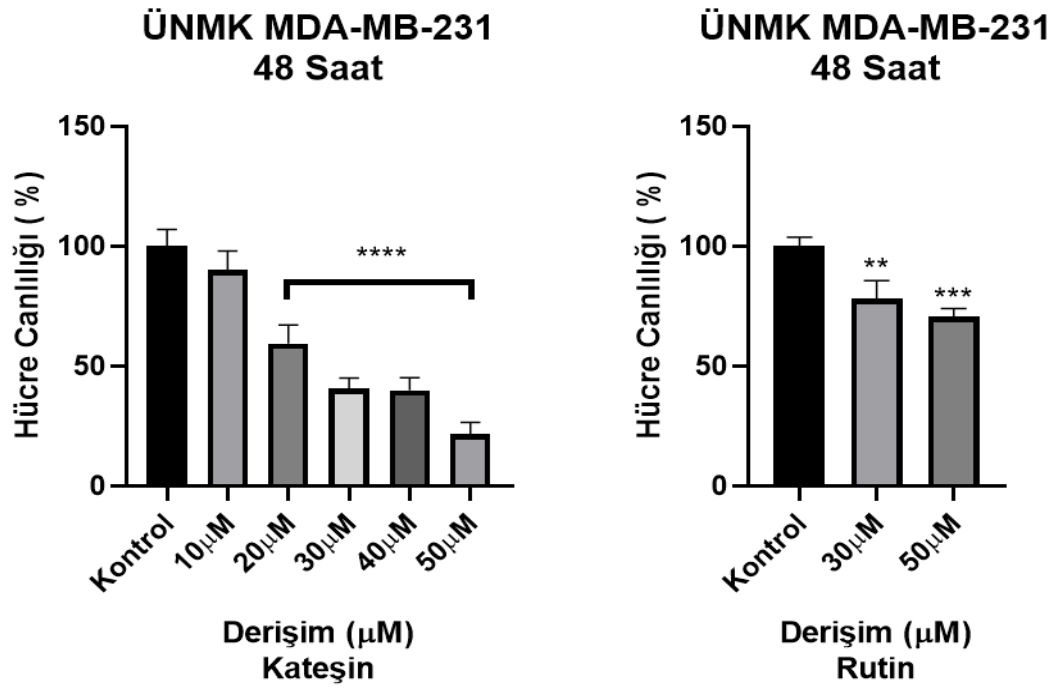
4.3.2. Hücre Canlılık Analizi (Sitotoksosite testi)

ÜNMK hücrelerinde romatizma ve kalp hastalığında kullanılan ilaç etken maddeleri leflunomide ve karvedilol ile rutin, kersetin ve kateşin doğal ürünlerinin ve bilinen RSK2 inhibitörü SL0101 için MTT testi ile sitotoksosite analizi gerçekleştirilmiştir. Bu bileşikler için artan derişimlerde (5-50 µM) kısa zamanlı hücre çoğalması üzerine sitotoksik etkileri MDA-MB-231, BT549 ve BT-20 hücre hatları üzerinde çalışılmıştır. Grafikler GraphPad Prism7 programı ile çizilmiştir. Anlamlı sonuçlar students t-testi ile ($p < 0,05$) yıldız işareti ile verilmiştir.

Zaman-bağımlı olarak yapılan uygulamalar sonrası 72 saat için kersetin MDA-MB-231 hücre hattında 20 µM’da sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 40). Bununla beraber MDA-MB-231 hücre hattında kateşinin 48 saat uygulaması için 20 µM’da rutine göre sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 41).

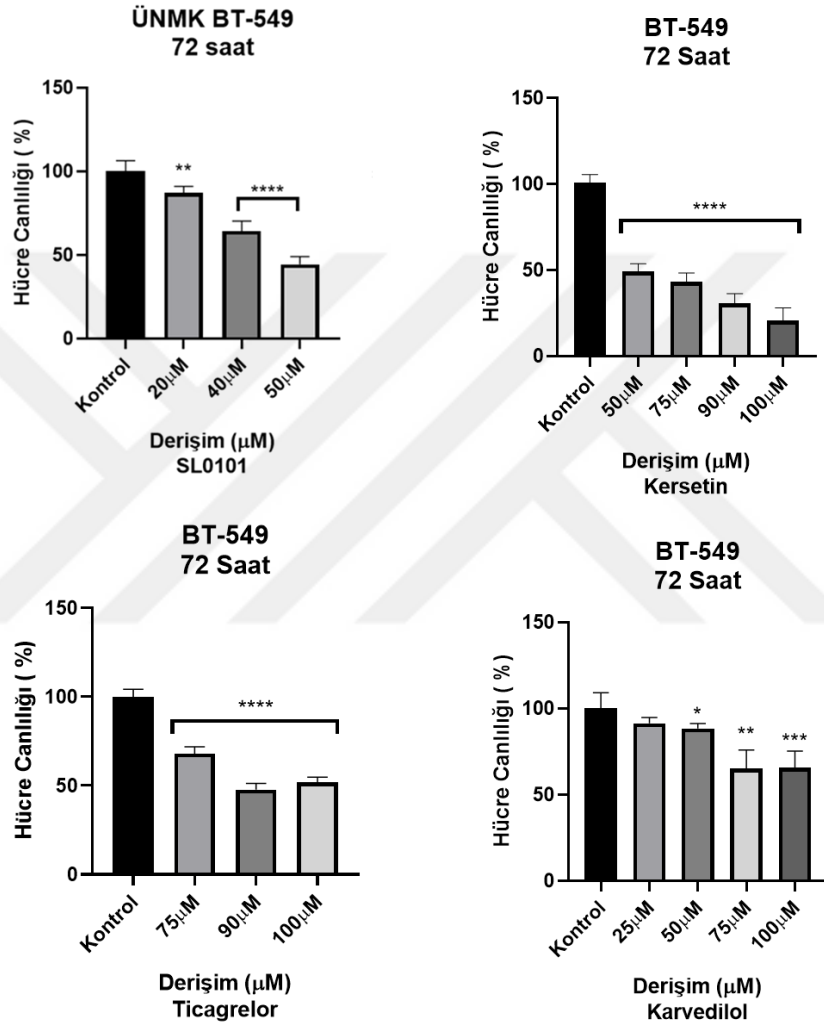


Şekil 40. Kersetin ile ÜNMK MDA-MB-231 hücre hattı için 72 saat sitotoksosite analizi.



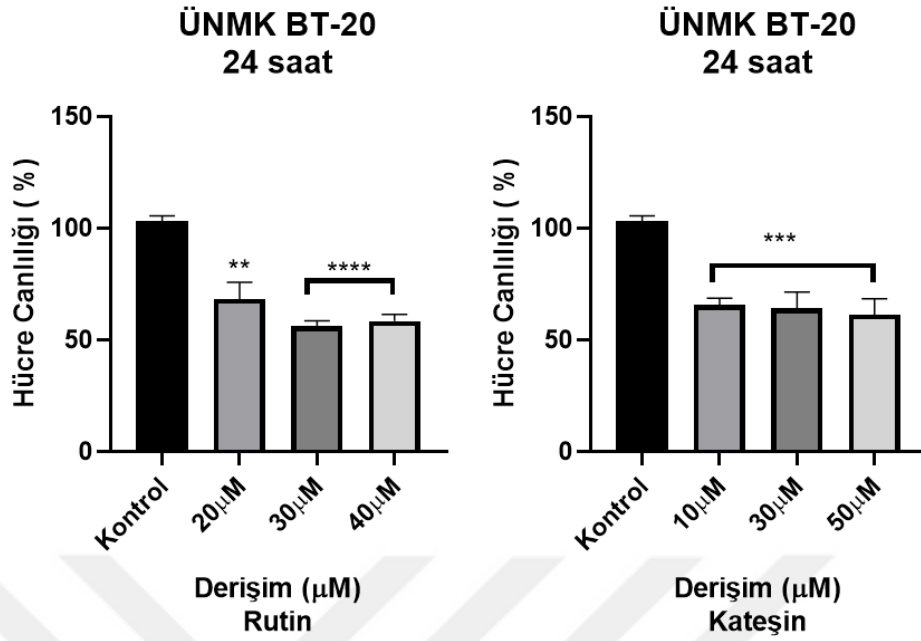
Şekil 41. Kateşin ve rutin ile ÜNMK MDA-MB-231 hücre hattı için 48 saat sitotoksosite analizi.

BT-549 ÜNMK hücre hattında 72 saat uygulama sonrasında elde ettiğimiz verilere göre p90RSK ailesi için inhibitör olan SL0101'in 50 μ M'da sitotoksik etkisi gözlemlenmiştir. Kersetin BT-549 hücre hattında 50 μ M'da, ticagrelor ve karvedilol 90 μ M'da etki göstermeye başlamıştır (Şekil 42).



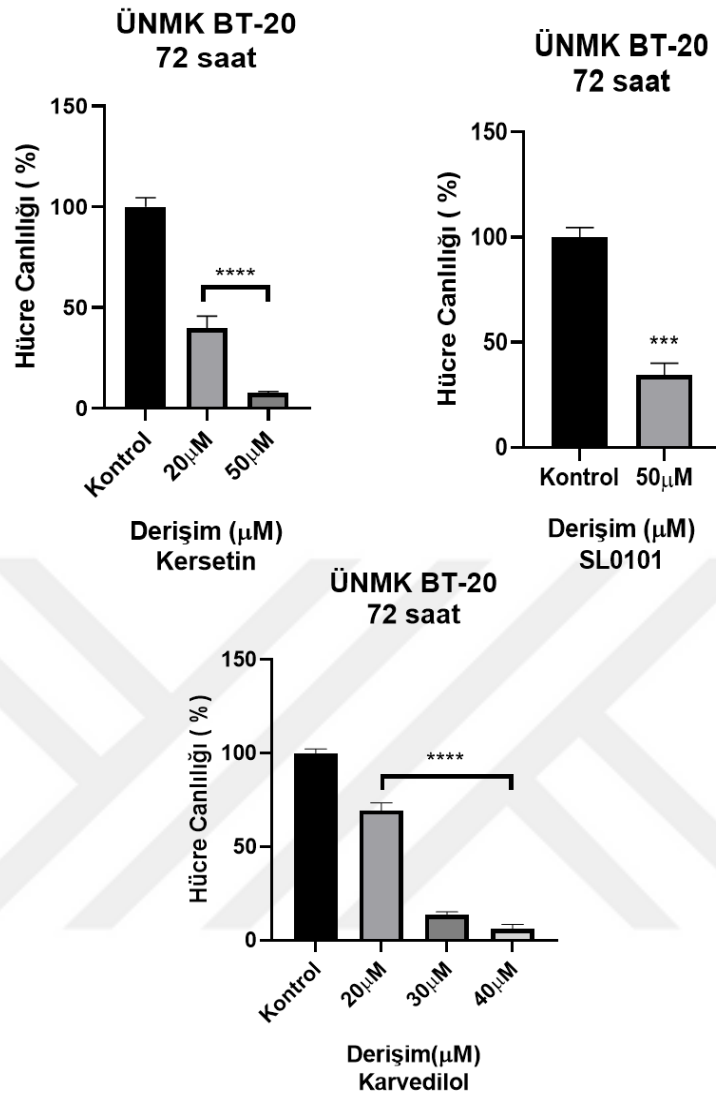
Sekil 42. SL0101, kersetin, karvedilol ve ticagrelor ile ÜNMK BT-549 hücre hattı için 72 saat sitotoksosite analizi.

BT-20 hücre hattında denenen doğal ürünler rutin ve kateşin bileşikler 24 saat için sırasıyla 30 μ M ve 10 μ M'da sitotoksik etki göstermeye başlamıştır (Şekil 43).



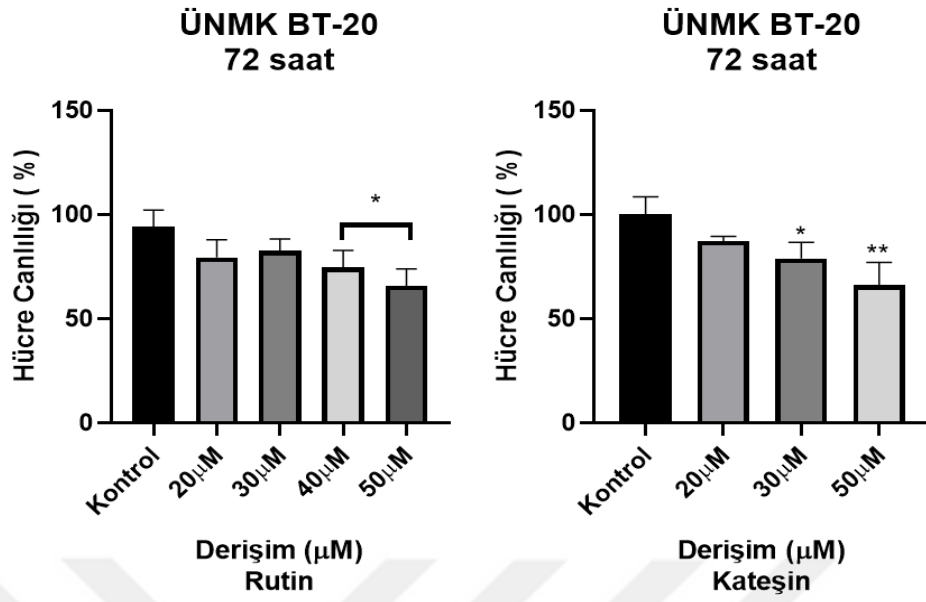
Şekil 43. Rutin ve katesin ile ÜNMK BT-20 hücre hattı için 24 saat sitotoksikite analizi.

BT-20 hücre hattında 72 saat için yapılan hücre canlılık analizi sonuçlarına göre karvedilol (~25 µM) ve kersetin (~20 µM) bileşiklerinin diğer bileşiklere göre yüksek sitotoksik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Bir çalışmada, SL0101'in BT-20 hücre hattı için etkili olduğu bildirilmiştir, fakat *in vitro* değerini rapor etmemişlerdir (Lommel vd., 2016). Bulgularımız bu yayını destekler niteliktedir. Sonuç olarak, SL0101 bileşiğinin 50 µM'a yakın sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 44'te verilmiştir.



Şekil 44. Kersetin, karvedilol ve SL0101 ile ÜNMK BT-20 hücre hattı için 24 saat sitotoksosite analizi.

BT-20 hücre hattında uygulanan rutin ve kateşin bileşiklerinin diğer bileşiklere göre sitotoksik etkileri daha az olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 45).

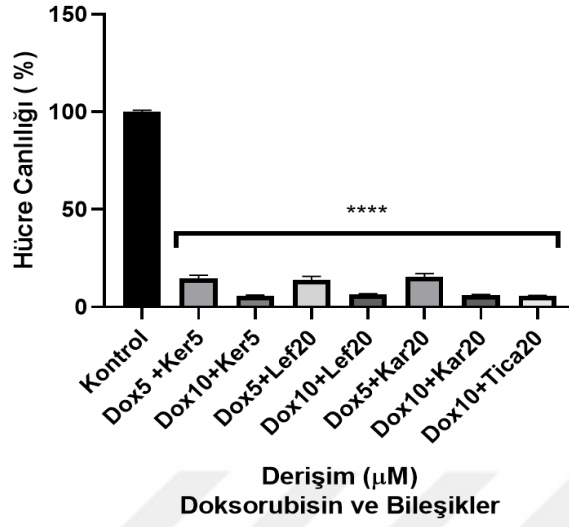


Şekil 45. Kateşin ve rutin ile ÜNMK BT-20 hücre hattı için 24 saat sitotoksosite analizi.

Kanser tedavisi için kemoterapide sıkça kullanılan doksorubisin ve ilaçların etkin dozlarını düşürmeye yönelik kombine bir şekilde MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatlarında sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır. Örnek olarak, daha önceden MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatları kullanılarak yapılmış bir çalışmada 10 µM platikodin D bileşiği ile 5 µM'daki doksorubisin bileşiklerinin kombine terapisinin daha güçlü antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Tang vd., 2014). MDA-MB-231 hücre hattı için sabit tutulan ilaç dozlarında değişen 5 ve 10 µM'lık dozlarda doksorubisin uygulanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında 5 µM kersetin ve 5 µM doksorubisin kombinasyonunun en düşük dozda MDA-MB-231 hücresinde sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 46a). MCF7 hücre hattında ise 0,5 µM'da sabit tutulan doksorubisinle kombine halde artan dozlarda ilaç uygulaması yapılmıştır. Sonuç olarak, doksorubisin ile ilaç kombinasyonlarının 25 µM için ilaç etken madde dozlarının azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 46b). Bu sonuçlara göre 231 ve MCF-7 hücrelerinde doksorubisin derişiminin sırasıyla 1 ve 0,1'e düşürülmesi daha uygun IC50 değerini verecektir.

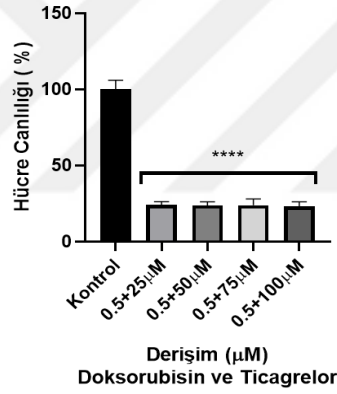
A

**MDA-MB-231
48 Saat**

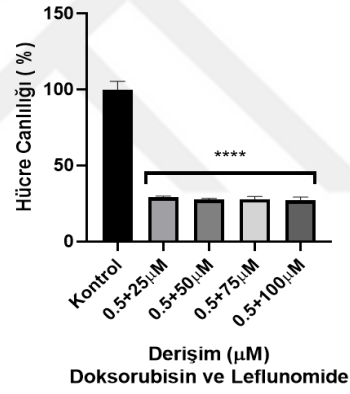


B

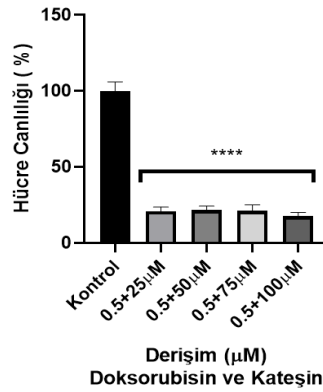
**MCF-7
72 saat**



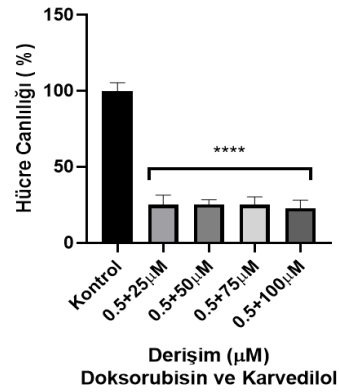
**MCF-7
72 saat**



**MCF-7
72 saat**



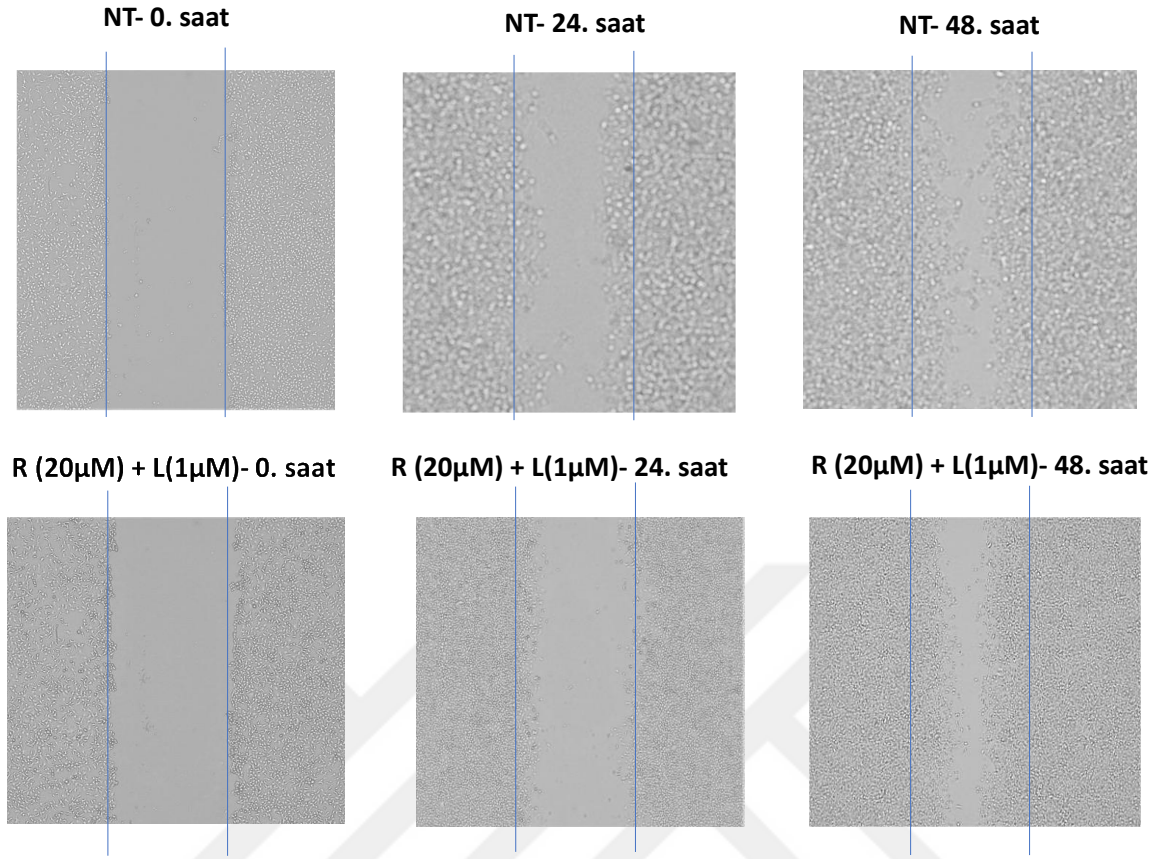
**MCF-7
72 saat**



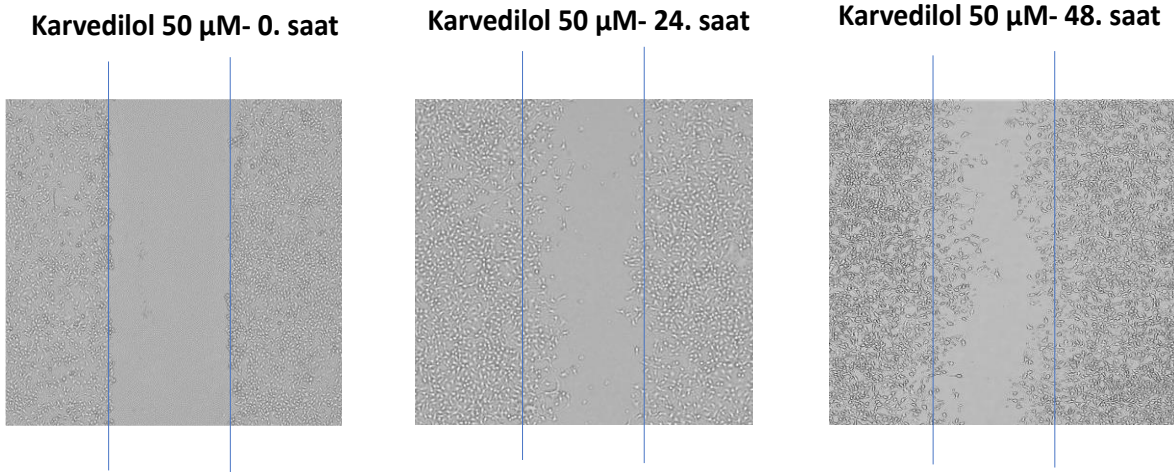
Şekil 46. Doksorubisin ve bileşikler ile MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatları için 48 ve 72 saat sitotoksisite analizleri. A) MDA-MB-231 B) MCF7

4.3.3. Hücre Göçü Analizi

Yapılan koloni inhibisyonu ve sitotoksosite sonucunda etki değerleri belirlenen ilaçlar tek ve kombine olarak MDA-MB-231 hücre hattında hücre göçü analizi için kullanılmışlardır. Önceki çalışmalarda Rutin bileşimini yeni C-met inhibitörü olarak ve MDA-MB-231 hücre hattında hücre göçünün 100 nM, 200 nM ve 300 nM’da sırasıyla % 43,4, % 59,3 ve % 78,8 inhibe ettiği rapor edilmiştir (Elsayed vd., 2017). Norepineprin ile kombine olarak kullanılan karvedilol MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatlarında doz ve zaman bağımlı olarak hücre göçü ve istilasında inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Dezong vd., 2014). Bununla birlikte, kersetinin MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saat için 10 veya 50 μ M’da yara iyileşmesini azalttığı rapor edilmiştir (Srinivasan vd., 2016). Mitokondriyal fizyon hücre göçünü azalttığından dolayı leflunomidin mitokondriyal fizyon proteinlerinin aktivatörü olduğunu buna bağlı olarak hücre göçünü azalttığı rapor edilmiştir (Humphries vd., 2020). Bulgularımızda, rutin (20 μ M) ile kombinasyon olarak uygulanan leflunomide (1 μ M) ile hücre göçünü azalttığı yönündedir. Elde edilen sonuçlar Şekil 47’de verilmiştir. Karvedilol ise 50 μ M’da etki göstermiştir (Şekil 48).



Şekil 47. Hücre göçü üzerine rutin (20 µM) ve leflunomidin (1 µM) kombinasyon sonuçları.



Şekil 48. Hücre göçü üzerine karvedilolun (50 µM) etkisi.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bilinen kinaz inhibitörleri ile genellikle hedef dışı bağlanmalar sonrasında özgünlük ve seçicilik sorunları ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, hedefe özgü ve daha güvenli inhibitörler geliştirmek önem kazanmaktadır. Bilgisayar destekli çalışmalar gelecek vadede ilaç adaylarının belirlenebilmesi için giderek artan bir öneme sahiptir. Günümüzde *in siliko* çalışmalar ile yeni ve güvenli ilaç adaylarının rasyonel tasarımına yardımcı olmak, pazarlanan ilaçları yeniden konumlandırmak, *in vitro* ve *in vivo* araştırmalara öncülük etmek mümkün olabilmektedir. *In siliko* yaklaşımlar uygulanabilir, genellikle daha ucuz ve deneysel ilaç keşif yöntemlerinden daha hızlıdır. Böylelikle, biyomoleküllerin aktivitesini açıklamak, ilaç hedefi ile etkileşim için moleküler belirleyicileri tanımlamak ve daha verimli ilaç adayları geliştirmek için farmakofor modelleme, sanal tarama, moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik simülasyon gibi *in siliko* yöntemlerin kullanımı ile mümkün olabilmektedir (Gagic vd., 2020). İlaç keşif çalışmalarında *in siliko* çalışmaların başarılı bir şekilde uygulandığı rapor edilmiştir (Gagic vd., 2020; Lu vd., 2018).

Bu tez çalışmasında *in siliko* çalışmalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde p90RSK ailesi izoformları için bilinen 6 inhibitörünün (BI-D1870, BIX02565, BRD7389, FMK, LJH685, SL0101) en iyi farmakofor özelliklerine sahip olan modelleri seçilmiştir. Böylelikle farmakofor haritalama ve sanal tarama çalışmalarına öncülük etmesi hususunda fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenebilmiştir. Bir çalışmada, BI-D1870'in yapı iskelesi olarak kullanılmasıyla daha uzun ömürlü RSK inhibitörlerinin geliştirilmesi önerilmiştir (Pambid vd., 2014). Buna göre, BI-D1870 ve BI-D1870 türevli LJH685'in farmakofor modelleri kullanılmıştır.

Önceki çalışmalarda, RSK2 için Leu74, Leu150 ve Lys195 aa kalıntılarındaki etkileşimler gözlemlenmiştir (Li vd., 2022). Ikuta ve arkadaşları tarafından RSK1 izoformu için Asp142, Asp205, Leu144 ve Asn192 aa kalıntılarındaki etkileşimler gözlemlenmiştir (Ikuta vd., 2007). MNZA ile yapılan RSK1-NTKD ve RSK2-NTKD moleküler yerleştirmelerinde RSK1 için Asp148, Gln 70, Lys194, Leu68 ve Phe150 RSK2 için Asp154, Leu74, Phe149 etkileşimleri gözlemlenmiştir (Mayer vd., 2021). Bir çalışmada,

Kaemferol, RSK2'nin *N*-ucuna bağlandığını, RSK2 *N*-uç alanının ve küçük molekül yerleştirme ve homoloji modellemesinin sonuçları mutajenez deneyleriyle doğrulandığını ve Val82 ve Lys100'ün kaemferol bağlanması ve RSK2 aktivitesi için kritik amino asitler olduğunu rapor etmişlerdir (Yao vd., 2009). *C*-uç ile yapılan bir çalışmada RSK2 ve doğal ligand kompleksinin etkileşimleri Cys436, Thr493, Cys560 olarak belirlenmiştir (Seremifova vd., 2012). Bu durumda p90RSK ailesi gibi çift yönlü özel proteinlerin *N*- ve *C*-uç bağlanma farklılıklarını da *in siliko* olarak belirlenebilmektedir. Farklı ligandlar ile eşleşen farklı uçların etkileşim gözlemleyebildiğimiz aa kalıntılarında farklı olduğunu söylememiz mümkündür.

4NUS-LJH685 kompleksinin bağlanma etkileşimleri Glide/XP yöntemi kullanılarak Lys100, Leu150 aa kalıntıları ile bildirilmiştir (Guttula vd., 2020). Glide/XP ile yapılan diğer bir çalışmada LJH685 -12.28 kkal/mol olarak hesaplanmıştır (Ece, 2016). Glide/SP yöntemi kullanarak yapılan etkileşim bulgularımızda ise 4NUS-LJH685 kompleksi için Leu150, Lys100, Asp154, Asp211'dir ve ko-ligandı -9.27 kkal/mol olarak hesaplanmıştır. Öte yandan 5D9K-BI-D1870 kompleksinin bağlanma etkileşimleri Leu-150, Asp-148, Asp-211 olarak bildirilmiştir (Guttula vd., 2020). Buna eşdeğer olarak bulgularımız önceki çalışma ile örtüşmektedir (Guttula vd., 2020). RSK2 NTD modelinin riboz bölgesinde Asp154'ün yan zincir karboksilat grubu ve Glu197'nin oksijen atomu hidrojen bağları oluşturacak şekilde konumlandırıldığı rapor edilmiştir (Nyugen, 2006). Leu150'nin frekansı RSK2 proteini ve molekülünün bağlanması için önemli bir aa kalıntısı olarak rol oynamaktadır (Guttula, 2020). RSK2-NTKD için bir anahtar aa kalıntısının Leu150 olduğu bildirilmiştir (Guttula, 2020). Guttula ve arkadaşları, RSK2 proteini ve ligandlar arasında Gly-75, Leu-147, Gly-153, Phe-149, Leu150, Gln-76, Asp-154, Val-82, Ala-98, Lys-100 Leu-74, Glu-197 aa kalıntıları üzerinde çeşitli etkileşimler rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada, BI-D1870 türevleri ve RSK2 (PDB:5D9K) arasındaki etkileşimler Asp148, Leu150, Asp154, Asp211, Gly213, Phe212, Glu197, Lys72, Asn198 aa kalıntıları üzerinde gözlemlenmiştir (Casalveri ve diğerleri, 2020). Bu tez çalışması kapsamındaki sonuçlara göre literatürle uyumlu olarak Leu150, Asp154 ve Asp148 gibi anahtar aa kalıntıları ile etkileşimlerin olduğu gözlemlenmiştir.

Bölüm 4.2.1’deki sonuçlara göre farklı hedefler için bilinen meme kanseri ilaçlarının moleküler yerleştirme değerlerinin Sunitinib (-8.11 kkal/mol), Rucaparib (-7,83 kkal/mol), Ruxolitinib (-7,80 kkal/mol), Gosereline asetat (-7,66 kkal/mol) ve Gefinitib (-7,51 kkal/mol) bilinen kendi ligandlarının LJH685 moleküler yerleştirme değerlerine yakın olduğu saptanmıştır. Buna göre, LJH685 farmakoforundan veya 4NUS kristal yapısının kullanıldığı yapı esaslı sanal tarama çalışmalarından seçilen G731-0389 (-8,71 kkal/mol); N1842 (-10,10 kkal/mol), N1841 (-9,475 kkal/mol), A8394 (-9,475 kkal/mol), N1828 (-9,47 kkal/mol), C4445 (-9,33 kkal/mol); ChEMBL311498 (-9,72 kkal/mol), ChEMBL535 (-8,70 kkal/mol) ligandlarının bilinen meme kanseri ilaçlarına yakın potansiyel ilaç adayları olabilecekleri düşünülmektedir.

In silico çalışmaların sonuçlarına göre terapötik etkisi bilinen ilaçların ikincil etkilerinin kanser hücrelerinde belirlenebilmesi amacıyla RSK’ların aşırı ifade edildiği ÜNMK MDA-MB-231 ve BT-549 hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi, koloni inhibisyon ve çoğalması üzerine etkileri doz- ve zaman-bağımlı çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Literatürde RSK1 ve 2’nin ifadesinin yüksek olduğu MDA-MB-231 hücre hattı ile çalışmaların sayısı fazla olsa da BT-20 (Lommel vd., 2016) ve BT-549 (Jin vd., 2019) hücre hatları ile RSK ilişkisini araştıran çalışmalarda mevcuttur. Bu nedenle, bu tez çalışmasında ÜNMK BT549 ve BT20 hücre hatları ile karşılaştırmalı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, RSK ifadesinin yüksek olduğu bildirilen ER+ MCF7 hücre hattında çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 4.4.2.’de verilen MTT analiz sonuçları $p < 0,001$ ve $p < 0,005$ ve anlamlı sonuçları açısından değerlendirilmiştir. Leflunomide 24 saat için düşük dozlarda MDA-MB-231 hücre hattında etkili olduğu saptanmıştır. 72 saat için BT-549’da kersetin ve SL0101 bileşikler sitotoksik etki göstermişlerdir. Bununla beraber, BT-20 için sitotoksikite çalışmaları yapılan bileşikler arasında kersetin, karvedilol ve SL0101 $p \leq 0,001$ anlamlı değerleri ile gösterdikleri sitotoksik etkileri bulgularımız arasındadır.

Literatürde farklı çalışmalar ile rapor edilen romatizma ilacı olarak kullanılan leflunomid bileşiğinin iyi bir anti-tümör ajan olduğu vurgulanmıştır (Zhang ve Chu, 2018).

Bir başka çalışmada ise leflunomide nanopartiküllerinin MDA-MB-231 hücre hattındaki anti-tümör etkisi rapor edilmiştir (Zewail vd., 2022). Kalp ilacı olarak satılan karvedilol için trastuzumab ile tedavi edilen HER2 pozitif meme kanserli hastalarda kardiyo toksisiteyi önlediği bildirilmiştir (Guglin vd., 2019). Karvedilol için MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında yapılmış daha önceki çalışmalarında hücre göçü ve istilası potansiyelini önemli ölçüde azalttığı ve iki farklı hücre hattı için α - veya β -adrenerjik reseptörü bloke ederek iki farklı sinyal yolunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Dezong vd., 2014). Bu tez kapsamında farklı olarak leflunomide ve karvedilol bileşiklerinin RSK ailesine yönelik potansiyel inhibitör adayları oldukları *in siliko* çalışmalarca desteklenmiştir. Bunun ışığında Bölüm 4.4.'te verilen *in vitro* sonuçlara göre RSK2'nin yüksek ifade edildiği ÜNMK ve ER+ meme kanser hücre hatlarında farklı dozlarda göstermiş oldukları inhibisyon etkileri doğrultusunda *in siliko* çalışmalarımızın doğruluğunu göstermektedir.

Rutin ÜNMK C-met inhibitörü olarak tanımlanmış ve antikanser etkinliği vurgulanmıştır (Elsayed vd., 2017). Ayrıca, rutin için daha önceden yapılmış bir çalışmada MDA-MB-231 ve MCF7 meme kanserinde 20 μ M'da ilaç direncini tersine çevirdiği bildirilmiştir (Iriti vd., 2017).

Bir çalışmada kateşin'in meme kanserindeki rolüne ve potansiyel terapötik etkisine değinilmiştir (Xiang vd., 2016; Romano ve Martel, 2021). Başka bir çalışmada MDA-MB-468 ve MCF7 hücre hatlarında 500 μ M'da kateşin hidrat bileşiğinin ÜNMK MDA-MB-468 ve ER+ MCF7 hücre hattına göre daha çok antikanser etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Ramirez-Medrano vd., 2021). Bu tez kapsamında Bölüm 4.4.'te elde edilen verilere göre BT-549 hücre hattı için koloni inbisyonunu desteklediği ve BT-20 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığını göstermektedir.

Daha önceki çalışmalar kersetin bileşiğinin ÜNMK hücreleri üzerindeki etkisini bildirmişlerdir (Srinivasan vd., 2016; Kundur vd., 2019). Srinivasan ve arkadaşları kersetin ile 1 μ M için MDA-MB-231 hücre hattında anti-proliferatif etki rapor etmişlerdir (Srinivasan vd., 2016). Kundur ve arkadaşları kersetin ile MDA-MB-231 hücre hattında yaptıkları koloni oluşumu deneyinde 20 μ M derişimde azalma gözlemlemişlerdir (Kundur vd., 2019).

Kersetin bileşiminin rapor edilen bilgisayar destekli çalışmalarında RSK2 için -9,40 kkal/mol olarak hesaplanmıştır ve potansiyel inhibitör olduğu vurgulanmıştır (Chen vd., 2012; Amanzadeh vd., 2019). Bundan farklı olarak bu tezde kersetin için Glide/SP -9,48 kkal/mol bağlanma enerjisi hesaplanmıştır. Bizim çalışmalarımız da bu skoru destekler niteliktedir. Bu tezde kersetin diğer meme kanseri hücrelerine karşı araştırılmıştır ve inhibisyon etkisi gözlemlenmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada fisetin ve kersetinin kombine çalışması 4T1, MDA-MB-231, T47D, BT549 ve MCF7 hücre hatlarında denenmiştir (Hosseini vd., 2022). Daha önceden BT-20 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada kersetin 24 saat için 50 μ M'lara kadar $p < 0,05$ anlamlı değerini rapor etmişlerdir (Satapel vd., 2013). Bulgularımız kersetin bileşiminin BT-20 hücre hattı için 20 μ M'da $p < 0,01$ anlamlı değerinde olduğunu göstermektedir.

Gareau ve arkadaşları Ticagrelor bileşiminin farklı meme kanseri hücre hatlarındaki (MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-231, fare 4T1) etkisini araştırmışlardır. İnsan meme kanseri hücre hatlarında bu bileşimin tümör hücresi-trombosit etkileşimlerinin önlenmesini ve meme kanseri yayılmasının Ticagrelor kullanımı ile azaldığını söylemişlerdir (Gareau vd., 2018). Tümör hücresi kaynaklı trombosit kümeleşmesinin kanserin metastatik potansiyelini arttırdığı ve buna bağlı olarak Ticagrelor bileşiminin kolon ve meme kanseri hastalarında metastatik yayılımı azaltmak için kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (Chauhan vd., 2019). Bir başka çalışmada MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde Ticagrelor'un büyük tümör hücresi kaynaklı trombosit-trombosit kümelerinin oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Wright vd., 2020). Bu tezde ise ticagrelor MDA-MB-231 BT-549 hücre hattında koloni inhibisyonu ve rutinle kombinasyonu çalışılmıştır. Bulgularımız, MDA-MB-231 için ticagrelorun ve rutinle sadece ticagrelordan daha fazla inhibisyon etkisi gösterdiği yönündedir.

RSK2 proteini hem kardiyovasküler hem de kanser hastalıkları için potansiyel bir hedeftir. Elde ettiğimiz bulgulardan yola çıkarak RSK2'nin hem meme kanseri hem de kalp hastalıklarındaki olan rolü bize kalp hastalıklarında kullanılan karvedilol ve ticagrelor bileşiklerinin ÜNMK hücre hatları üzerindeki inhibe edici etkisini göstermiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında *in siliko* çalışmalar ve *in vitro* deneyler arasında bir korelasyon elde edilmiştir. Bilinmeyen çeşitli potansiyel inhibitör adayları ise *in siliko* sanal tarama ve moleküler yerleştirme çalışmalarımızla belirlenmiştir. Moleküler yerleştirme çalışmalarında (-9,36 kkal/mol) olarak hesaplanan BI-D1870 bilinen inhibitörüne en yakın çıkan STOCK1N-66635 (-9,62 kkal/mol), STOCK1N-66821 (-9,62 kkal/mol), STOCK1N-02221 (-9,61 kkal/mol), STOCK1N-70762 (-9,04 kkal/mol), DB14128 (-10,19 kkal/mol), DB1568 (-9,28 kkal/mol), DB02483 (-9,21 kkal/mol), DB16325 (-9,19 kkal/mol), DB00157 (-9,15 kkal/mol) ligandlarının potansiyel RSK2-NTKD inhibitör adayları olabilecekleri düşünülmektedir.

Böylelikle, Ülkemizin öncelikli alanları içerisinde yer alan Sağlık/Tıp/İlaç alanında RSK hedefli kanser tedavisi için önerilebilecek yeni inhibitörlerin *in siliko* yöntemler ile araştırılması ve ayrıca zaman ve emek kazancı ile maliyetin düşürülmesine katkı sağlayabilecek olması açısından tezin önemini ortaya koymaktadır. Meme kanserine yönelik literatürde geçen RSK2 ilişkili *in siliko* çalışmalar yetersizdir. Bu kadar önemli bir hedef olan RSK2 izoformu için yeni ve seçici inhibitörlerinin geliştirilmesi ve araştırmaların artırılması gerekmektedir.

Tez kapsamında *in siliko* belirlenen ilaç etken maddeleri ve doğal ürünlerin *in vitro* toplu sonuçları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3

In siliko belirlenen ve *in vitro* çalışılan ilaç etken maddeleri ve doğal ürünlerin toplu sonucu.

No	Ligand	Yöntem	PDB kodu ve Yerleştirme Skorları (kkal/mol)	Hücre Hatları ve <i>in vitro</i> etkin dozlar (Koloni İnhibisyonu ve çoğalması, Hücre göçü analizi, Kombinasyon, Sitotoksisite)			
				MDA-MB-231	BT-549	BT20	MCF7
1	Karvedilol	CDOCKER ve Glide/SP	4D9T (-44,03) 3RNY (-56,25) 2Z7R (-8,07)	50 µM (Kİ) ve (H)	100 µM (Kİ) 75 µM (M)	20µM (M)	-
2	Ticagrelor	CDOCKER	4D9T (-49,90) 3RNY (-56,17)	50 µM (Kİ)	100 µM (Kİ) 75 µM (M)	-	-
3	Leflunomide	Libdock	4NUS (93,20)	50 µM (Kİ)	100 µM (Kİ)	-	100 µM (Kİ)
4	Kateşin	Glide/SP	4NUS (-9,72) 2Z7Q (-7,71)	20 µM (M)	20 µM (Kİ)	-	-
5	Kersetin	Glide/SP	4NUS (-9,48)	10 µM (Kİ) 10 µM (M)	75 µM (Kİ) 50 µM (M)	20µM (M)	20 µM (Kİ)
6	Rutin (Adjuvant)	Glide/SP	3UBD (-9,96)	R 20 µM* + SL- 20 µM Ve R- 20 µM* + T- 20 µM (K) R 20 µM* + Lef- 1 µM (H) 30 µM (M)	R- 20 µM* + Kar -20 µM Ve R --20 µM* + T- 20 µM (K)	-	-
7	SL0101 (bilinen inhibitor)	Glide/SP	3UBD (-9,41)	-	40 µM (M)	50µM (M)	-
8	Doksorubisin (kontrol)			Dox-5 µM* + Ker 5 µM Lef-20 µM Kar-20 µM Dox-10µM* + Ker 5 µM Lef-20 µM Kar-20 µM T-20 µM (K)	-	-	0,5 µM* + Lef-25µM Kar-25µM T-25µM Kat-25µM (K)

Sabit değer: *, Dox:Doksorubisin , Koloni İnhibisyonu ve Çoğalması: (Kİ), MTT: (M), Kombinasyon: (K), Hücre Göçü Analizi: (H), Ticagrelor: (T), Karvedilol: (Kar), Leflunomide: (Lef), Rutin: (R), SL0101: (SL), Kersetin: (Ker), Kateşin: (Kat)

KAYNAKÇA

- Abd-Ellatef, G. E. F., Gazzano, E., El-Desoky, A. H., Hamed, A. R., Kopecka, J., Belisario, D. C., Costamagna C., Marie M.A.S., Fahmy S.R., Abdel-Hamid A.Z. ve Riganti, C. (2022). Glabratephrin reverses doxorubicin resistance in triple negative breast cancer by inhibiting P-glycoprotein. *Pharmacological Research*, 175, 105975.
- Abdullah, M. ve Guruprasad, L. (2021). Identification of 3D motifs based on sequences and structures for binding to CFI-400945, and deep screening-based design of new lead molecules for PLK-4. *Chemical Biology & Drug Design*, 98(4), 522-538.
- Abdulrahman, N., Siveen, K. S., Joseph, J. M., Osman, A., Yalcin, H. C., Hasan, A., Uddin S., ve Mraiche, F. (2020). Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase potentiates cisplatin activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(11), 1536-1545.
- Anjum, R. ve Blenis, J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(10), 747-758.
- Arba, M., Azali, H., Ombe, S., Armid, A., ve Usman, I. (2019). 3D-QSAR, molecular docking and dynamics simulation of difluorophenol pyridine derivatives as RSK2 inhibitor. *J Appl Pharm Sci*, 9(06), 001-9.
- Aronchik, I., Appleton, B. A., Basham, S. E., Crawford, K., Del Rosario, M., Doyle, L. V., Estacio W. F., Lan J., Lindvall M. K., Luu C. A., Ornelas E., Venetsanakos E., Shafer C. M. ve Jefferson, A. B. (2014). Novel potent and selective inhibitors of p90 ribosomal S6 kinase reveal the heterogeneity of RSK function in MAPK-driven cancers. *Molecular Cancer Research*, 12(5), 803-812.
- Audie, J. ve Scarlata, S. (2007). A novel empirical free energy function that explains and predicts protein–protein binding affinities. *Biophysical chemistry*, 129(2-3), 198-211.
- Beeram, M., Wang, J. S., Mina, L. A., Chalasani, P., Shatsky, R. A., Wesolowski, R., Shatsky R. A., Wesolowski R., Hurvitz S. A., Trivedi M. S., Han H. S., Patnaik A., Huynh M., Jayanthan A., Pambid M. R., Yue L., Los G., Dunn S. E. ve Dorr, A. (2022).

Abstract P5-17-12: First-in-human expansion study of oral PMD-026 in metastatic triple negative breast cancer patients. *Cancer Research*, 82(4_Supplement), P5-17.

Bennani, F. E., Doudach, L., Karrouchi, K., Tarib, A., Rudd, C. E., Ansar, M. H. ve Faouzi, M. E. A. (2022). Targeting EGFR, RSK1, RAF1, PARP2 and LIN28B for several cancer type therapies with newly synthesized pyrazole derivatives via a computational study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-25.

Bignone, P. A., Lee, K. Y., Liu, Y., Emilion, G., Finch, J., Soosay, A. E., Charnock, F. M., Beck, S., Dunham, I., Mungall, A. J. ve Ganesan, T. S. (2007). RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer. *Oncogene*, 26(5), 683-700.

Boston, S. R., Deshmukh, R., Strome, S., Priyakumar, U., MacKerell, A. D. ve Shapiro, P. (2011). Characterization of ERK docking domain inhibitors that induce apoptosis by targeting Rsk-1 and caspase-9. *BMC cancer*, 11(1), 1-12.

Casalvieri, K. A., Matheson, C. J., Backos, D. S. ve Reigan, P. (2017). Selective targeting of RSK isoforms in cancer. *Trends in cancer*, 3(4), 302-312.

Casalvieri, K. A., Matheson, C. J., Backos, D. S. ve Reigan, P. (2020a). Molecular docking of substituted pteridinones and pyrimidines to the ATP-binding site of the N-terminal domain of RSK2 and associated MM/GBSA and molecular field datasets. *Data Brief*. 28(29), 105347.a

Casalvieri, K. A., Matheson, C. J., Backos, D. S. ve Reigan, P. (2020b). Substituted pteridinones as p90 ribosomal S6 protein kinase (RSK) inhibitors: A structure-activity study. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 28(5), 115303.

Casalvieri, K. A., Matheson, C. J., Warfield, B. M., Backos, D. S. ve Reigan, P. (2021). N-Substituted pyrrolopyrimidines and purines as p90 ribosomal S6 protein kinase-2 (RSK2) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 41, 116220.

Clark, D. E., Errington, T. M., Smith, J. A., Frierson, H. F., Weber, M. J. ve Lannigan, D. A. (2005). The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer research*, 65(8), 3108-3116.

- Chae, H. D., Dutta, R., Tiu, B., Hoff, F. W., Accordi, B., Serafin, V., Youn M., Huang M., Sumarsonol N., Davis K. L., Lacayol N. J., Pigazzi M., Horton T. M., Kornblau S. M. ve Sakamoto, K. M. (2020). RSK inhibitor BI-D1870 inhibits acute myeloid leukemia cell proliferation by targeting mitotic exit. *Oncotarget*, 11(25), 2387.
- Chauhan, M., Thomas, A., Goodall, A., Wright, J. ve Adlam, D. (2019). Aspirin and ticagrelor for the prevention of tumour cell induced platelet aggregation. *Annals of Oncology*, 30, v792.
- Chen, R., Li, L. ve Weng, Z. (2003). ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(1), 80-87.
- Chen, L., Xu, T., Jia, Q., Wang, X., Li, M. ve Liang, G. (2020). RSK4: a new prognostic factor in glioma. *Pathology-Research and Practice*, 216(8), 153020.
- Cheng, D. K., Oni, T. E., Thalappillil, J. S., Park, Y., Ting, H. C., Alagesan, B., Prasad N. V., Addison K., Rivera K. D, Pappin D. J., Aelst L. V. ve Tuveson, D. A. (2021). Oncogenic KRAS engages an RSK1/NF1 pathway to inhibit wild-type RAS signaling in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(21), e2016904118.
- Cho, Y. Y. (2017). RSK2 and its binding partners in cell proliferation, transformation and cancer development. *Archives of pharmacal research*, 40(3), 291-303.
- Chrysostomou, S., Roy, R., Prischi, F., Thamlikitkul, L., Chapman, K. L., Mufti, U., Peach, R., Ding, L., Hancock, D., Moore, C., Molina-Arcas, M., Mauri, F., Pinato, D.J., Abrahams, J.M., Ottaviani, S., Castellano, L., Giamas, G., Pascoe, J., Moonamale, D., Pirrie, S., Gaunt, C., Billingham, L., Steven, N.M., Cullen, M., Hrouda, D., Winkler, M., Post, J., Cohen, P., Salpeter, S.J., Bar, V., Zundeleovich, A., Golan, S., Leibovici, D., Lara, R., Klug, D.R., Yaliraki, S.N., Barahona, M., Wang, Y., Downward, J., Skehel, J.M., Ali, M.M.U., Seckl, M.J. ve Pardo, O. E. (2021). Repurposed floxacins targeting RSK4 prevent chemoresistance and metastasis in lung and bladder cancer. *Science translational medicine*, 13(602), eaba4627.
- Chowrasia, D., Jafri, A., Azad, I., Rais, J., Sharma, N., Khan, F., Kumar A., Kumar S. ve Arshad, M. (2021). In vitro and in silico growth inhibitory, anti-ovarian & anti-lung

- carcinoma effects of 1, 5 diarylpenta-1, 4-dien-3-one as synthetically modified curcumin analogue. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-18.
- Cohen, M. S., Zhang, C., Shokat, K. M. ve Taunton, J. (2005). Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science*, 308(5726), 1318-1321.
- Cohen, M. S., Hadjivassiliou, H. ve Taunton, J. (2007). A clickable inhibitor reveals context-dependent autoactivation of p90 RSK. *Nature chemical biology*, 3(3), 156-160.
- Comert Onder, F., Kahraman, N., Bellur Atici, E., Cagir, A., Kandemir, H., Tatar, G., Tok T. T., Kara G., Karliga B., Durdagi S., Ay M. ve Ozpolat, B. (2021a). Target-driven design of a coumarinyl chalcone scaffold based novel EF2 Kinase inhibitor suppresses breast cancer growth *in vivo*. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 4(2), 926-940. *Correction to "Target-Driven Design of a Coumarinyl Chalcone Scaffold Based Novel EF2 Kinase Inhibitor Suppresses Breast Cancer Growth In Vivo"*. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 4(3), 1247-1247.
- Comert Onder, F., Durdagi, S., Kahraman, N., Uslu, T.N., Kandemir, H., Atici, E.B., Ozpolat, B., Ay, M. (2021b). Novel inhibitors of eukaryotic elongation factor 2 kinase: In silico, synthesis and in vitro studies. *Bioorganic Chemistry*. 116, 105296.
- Cömert Önder, F., Ay, M., Aydoğan Türkoğlu, S., Tura Köçkar, F. ve Celik, A. (2016). Antiproliferative activity of *Humulus lupulus* extracts on human hepatoma (Hep3B), colon (HT-29) cancer cells and proteases, tyrosinase, β -lactamase enzyme inhibition studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1), 90-98.
- Comert Onder, F., Durdagi, S., Sahin, K., Ozpolat, B. ve Ay, M. (2020). Design, synthesis, and molecular modeling studies of novel coumarin carboxamide derivatives as eEF-2K inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(3), 1766-1778.
- Comert Onder, F., Siyah, P., Durdagi, S., Ay, M. ve Ozpolat, B. (2022). Novel Etodolac Derivatives as Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase (eEF2K) Inhibitors for Targeted Cancer Therapy. *RSC Medicinal Chemistry*.
- Costales, A., Mathur, M., Ramurthy, S., Lan, J., Subramanian, S., Jain, R., Atallah, G., Setti, L., Lindvall, M., Appleton, B.A., Ornelas, E., Feucht, P., Warne, B., Doyle, L., Basham, S.E., Aronchik, I., Jefferson, A.B. ve Shafer, C. M. (2014). 2-Amino-7-

- substituted benzoxazole analogs as potent RSK2 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(6), 1592-1596.
- Cuello, F., Snabaitis, A. K., Cohen, M. S., Taunton, J. ve Avkiran, M. (2007). Evidence for direct regulation of myocardial Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 phosphorylation and activity by 90-kDa ribosomal S6 kinase (RSK): effects of the novel and specific RSK inhibitor fmk on responses to α 1-adrenergic stimulation. *Molecular Pharmacology*, 71(3), 799-806.
- Cui, Y. M., Li, W., Shen, T. Z., Tao, Y. X., Liu, B. Q., Li, X. L., Zhang R. H., Jiang D. W. ve Xiao, W. L. (2022). Design, synthesis and anti-breast cancer evaluation of biaryl pyridine analogues as potent RSK inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*
- Czaplinska, D., Gorska, M., Mieczkowski, K., Peszynska-Sularz, G., Zaczek, A. J., Romanska, H. M. ve Sadej, R. (2018). RSK1 promotes murine breast cancer growth and metastasis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 56(1), 11-20.
- Davies, A. H., Reipas, K., Hu, K., Berns, R., Firmino, N., Stratford, A. L. ve Dunn, S. E. (2015). Inhibition of RSK with the novel small-molecule inhibitor LJI308 overcomes chemoresistance by eliminating cancer stem cells. *Oncotarget*, 6(24), 20570.
- Davis, M. I., Hunt, J. P., Herrgard, S., Ciceri, P., Wodicka, L. M., Pallares, G., Hocker M., Treiber D. K. ve Zarrinkar, P. P. (2011). Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology*, 29(11), 1046-1051.
- Dezong, G., Zhongbing, M., Qinye, F. ve Zhigang, Y. (2014). Carvedilol suppresses migration and invasion of malignant breast cells by inactivating Src involving cAMP/PKA and PKC δ signaling pathway. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(4), 991.
- Dunn, S. E., Jayanthan, A., Huynh, M. M., Flahive, E., Pambid, M. R., Dorr, A. ve Los, G. (2020). Abstract P3-10-10: PMD-026, a first-in-class oral p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor for triple negative breast cancer (TNBC).
- Ece, A. (2016). e-Pharmacophore mapping combined with virtual screening and molecular docking to identify potent and selective inhibitors of P90 ribosomal S6 kinase (RSK). *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 241-248.

- Elia, S. G., Al-Karmalawy, A. A., Nasr, M. Y. ve Elshal, M. F. (2022). Loperamide potentiates doxorubicin sensitivity in triple-negative breast cancer cells by targeting MDR1 and JNK and suppressing mTOR and Bcl-2: In vitro and molecular docking study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(1), e22938.
- Elsayed, H. E., Ebrahim, H. Y., Mohyeldin, M. M., Siddique, A. B., Kamal, A. M., Haggag, E. G. ve El Sayed, K. A. (2017). Rutin as a novel c-Met inhibitory lead for the control of triple negative breast malignancies. *Nutrition and cancer*, 69(8), 1256-1271.
- Fan, J., Fu, A. ve Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83-89.
- Faltas, C. ve Holz, M. K. (2022). RSK as a Therapeutic Target for ER+ Breast Cancer. *The FASEB Journal*, 36.
- Fisher, T. L. ve Blenis, J. (1996). Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. *Molecular and cellular biology*, 16(3), 1212-1219.
- Fruergaard, M. U., Fælled Nielsen, C. J., Kjeldsen, C. R., Iversen, L., Andersen, J. L., & Nissen, P. (2022). Activation and inhibition of the C-terminal kinase domain of p90 ribosomal S6 kinases. *bioRxiv*, 2022-02.
- Fryer, R. M., Muthukumarana, A., Chen, R. R., Smith, J. D., Mazurek, S. N., Harrington, K. E., Dinallo R. M., Burke J., DiCapua F. M., Guo X., Kirrane T. M., Snow R. J., Zhang Y., Soleymanzadeh F., Madwed J. B., Kashem M. A., Kugler S. Z., O'Neill M. M., Harrison P. C., Reinhart G. A. ve Boyer, S. J. (2012). Mitigation of off-target adrenergic binding and effects on cardiovascular function in the discovery of novel ribosomal S6 kinase 2 inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 340(3), 492-500.
- Fomina-Yadlin, D., Kubicek, S., Walpita, D., Dančik, V., Hecksher-Sørensen, J., Bittker, J. A., Sharifnia T., Shamji A., Clemons P. A., Wagner B. K. ve Schreiber, S. L. (2010). Small-molecule inducers of insulin expression in pancreatic α -cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15099-15104.
- Fu, L., Zhao, L., Liang, M., Ran, K., Fu, J., Qiu, H., Li F. ve Shu, M. (2022). Identification of potential CAMKK2 inhibitors based on virtual screening and molecular dynamics simulation. *Molecular Simulation*, 1-9.

- Gagic, Z., Ruzic, D., Djokovic, N., Djikic, T. ve Nikolic, K. (2020). In silico methods for design of kinase inhibitors as anticancer drugs. *Frontiers in chemistry*, 7, 873.
- Gareau, A. J., Brien, C., Gebremeskel, S., Liwski, R. S., Johnston, B. ve Bezuhly, M. (2018). Ticagrelor inhibits platelet–tumor cell interactions and metastasis in human and murine breast cancer. *Clinical & experimental metastasis*, 35(1), 25-35.
- Giri, S. ve Bader, A. (2015). A low-cost, high-quality new drug discovery process using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Drug discovery today*, 20(1), 37-49.
- Guan, X., Meng, X., Zhu, K., Kai, J., Liu, Y., Ma, Q., Tong Y., Zheng H., Xie S., Ma X., Wang Y., Lu R. ve Guo, L. (2022). MYSM1 induces apoptosis and sensitizes TNBC cells to cisplatin via RSK3–phospho-BAD pathway. *Cell death discovery*, 8(1), 1-11.
- Guo, Z. F. ve Kong, F. L. (2021). Akt regulates RSK2 to alter phosphorylation level of H2A. X in breast cancer. *Oncology Letters*, 21(3), 1-1.
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T. ve Banks, J. L. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1750-1759.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- He, J., McLaughlin, R. P., van der Noord, V., Foekens, J. A., Martens, J. W., van Westen, G., Zhang Y. ve Van de Water, B. (2019). Multi-targeted kinase inhibition alleviates mTOR inhibitor resistance in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 178(2), 263-274.
- Hilinski, M. K., Mrozowski, R. M., Clark, D. E. ve Lannigan, D. A. (2012). Analogs of the RSK inhibitor SL0101: optimization of in vitro biological stability. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(9), 3244-3247.
- Hogeweg, P. (2011, Mar 31). The Roots of Bioinformatics in Theoretical Biology. *PLoS Comput Biol.*, 7(3): e1002021.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. ve Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714-726.

- Hosseini, S. S., Ebrahimi, S. O., Haji Ghasem Kashani, M. ve Reisi, S. (2022). Study of quercetin and fisetin synergistic effect on breast cancer and potentially involved signaling pathways. *Cell Biology International*, 47, 98-109.
- Houles, T. ve Roux, P. P. (2018, February). Defining the role of the RSK isoforms in cancer. In *Seminars in cancer biology*, Academic Press, 48, 53-61.
- Hu, C., Dai, J., Lin, X., Meng, Y. ve Liang, H. (2020). Effect of RSK4 on biological characteristics of gastric cancer. *Cancer management and research*, 12, 611.
- Humphries, B. A., Cutter, A. C., Buschhaus, J. M., Chen, Y. C., Qyli, T., Palagama, D. S., Eckley S., Robison T. H., Bevoor A., Chiang B., Haley H. R., Sahoo S., Spinosa P. C., Neale D. B., Boppiseti J., Sahoo D., Ghosh P., Lahann J., Ross B. D., Yoon E., Luker K. E. ve Luker, G. D. (2020). Enhanced mitochondrial fission suppresses signaling and metastasis in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 22(1), 1-18.
- Huynh, M. M., Jayanthan, A., Pambid, M. R., Los, G. ve Dunn, S. E. (2020a). RSK2: A promising therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 24(1), 1-5.a
- Huynh, M. M., Pambid, M. R., Jayanthan, A., Dorr, A., Los, G. ve Dunn, S. E. (2020b). The dawn of targeted therapies for triple negative breast cancer (TNBC): a snapshot of investigational drugs in phase I and II trials. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 29(11), 1199-1208.b
- Ibrahim, M. A., Badr, E. A., Abdelrahman, A. H., Almansour, N. M., Mekhemer, G. A., Shawky, A. M., Moustafa M. F. ve Atia, M. A. (2022). In Silico targeting human multidrug transporter ABCG2 in breast cancer: Database screening, molecular docking, and molecular dynamics study. *Molecular Informatics*, 41(2), 2060039.
- Ikuta, M., Kornienko, M., Byrne, N., Reid, J. C., Mizuarai, S., Kotani, H. ve Munshi, S. K. (2007). Crystal structures of the N-terminal kinase domain of human RSK1 bound to three different ligands: Implications for the design of RSK1 specific inhibitors. *Protein Science*, 16(12), 2626-2635.
- Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E. M., Kabala-Dzik, A., Azzimonti B., Dziedzic A., Rimondini L. ve Wojtyczka, R. D. (2017). Rutin, a quercetin

- glycoside, restores chemosensitivity in human breast cancer cells. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1529-1538.
- Isa, R., Horinaka, M., Tsukamoto, T., Mizuhara, K., Fujibayashi, Y., Taminishi-Katsuragawa, Y., Okamoto H., Yasuda S., Kawaji-Kanayama Y., Matsumura-Kimoto Y., Mizutani S., Shimura Y., Taniwaki M., Sakai T. Ve Kuroda, J. (2022). The Rationale for the Dual-Targeting Therapy for RSK2 and AKT in Multiple Myeloma. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 2919.
- Jafari, S., Farsani, F. M., Ganji, M. ve Ganjalikhany, M. R. (2021). The functional regulatory details of ERK2 in complex with RSK1: an in silico insight. *RSC advances*, 11(19), 11048-11056.
- Jain, R., Mathur, M., Lan, J., Costales, A., Atallah, G., Ramurthy, S., Subramanian S., Setti L., Feucht P., Warne B., Doyle L., Basham S., Jefferson A. B., Lindvall M., Appleton B. A. ve Shafer, C. M. (2015). Discovery of potent and selective RSK inhibitors as biological probes. *Journal of medicinal chemistry*, 58(17), 6766-6783.
- Jayanthan, A., Yue, L., Huynh, M. M., Los, G. ve Dunn, S. E. (2022). PMD-026, a first in class oral RSK inhibitor, demonstrates activity against hormone receptor positive breast cancer with acquired CDK4/6 inhibitor resistance. *Cancer Research*, 82(12_Supplement), 5378-5378.
- Jia, Y., Wen, X., Gong, Y. ve Wang, X. (2020). Current scenario of indole derivatives with potential anti-drug-resistant cancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 200, 112359.
- Katayama, K., Fujiwara, C., Noguchi, K. ve Sugimoto, Y. (2016). RSK1 protects P-glycoprotein/ABCB1 against ubiquitin–proteasomal degradation by downregulating the ubiquitin-conjugating enzyme E2 R1. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Kirrane, T. M., Boyer, S. J., Burke, J., Guo, X., Snow, R. J., Soleymanzadeh, L., Swinamara A., Zhang Y., Madwed J. B., Kashem M., Kugler S. ve O'Neill, M. M. (2012). Indole RSK inhibitors. Part 2: optimization of cell potency and kinase selectivity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(1), 738-742.
- Kosnopfel, C., Sinnberg, T., Sauer, B., Niessner, H., Schmitt, A., Makino, E., Forschner A., Hailfinger S., Garbe C. ve Schitteck, B. (2017). Human melanoma cells resistant to

- MAPK inhibitors can be effectively targeted by inhibition of the p90 ribosomal S6 kinase. *Oncotarget*, 8(22), 35761.
- Kumar, A., Tiwari, A. ve Sharma, A. (2018). Changing paradigm from one target one ligand towards multi-target directed ligand design for key drug targets of Alzheimer disease: an important role of in silico methods in multi-target directed ligands design. *Current neuropharmacology*, 16(6), 726-739.
- Kwon, N. H., Lee, M. R., Kong, J., Park, S. K., Hwang, B. J., Kim, B. G., Lee E. S., Moon H. G. ve Kim, S. (2018). Transfer-RNA-mediated enhancement of ribosomal proteins S6 kinases signaling for cell proliferation. *RNA biology*, 15(4-5), 635-648.
- Lara, R., Mauri, F. A., Taylor, H., Derua, R., Shia, A., Gray, C., Nicols A., Shiner R. J., Schofield E., Bates P. A., Waelkens E., Dallman M., Lamb J., Zicha D., Downward J., Seckl M. J. ve Pardo, O. E. (2011). An siRNA screen identifies RSK1 as a key modulator of lung cancer metastasis. *Oncogene*, 30(32), 3513-3521.
- Lara, R., Seckl, M. J. ve Pardo, O. E. (2013). The p90 RSK Family Members: Common Functions and Isoform Specificity. *p90 RSK Family in Cancer: Functions and Isoform Specificity. Cancer research*, 73(17), 5301-5308.
- Lawal, H. A., Uzairu, A. ve Uba, S. (2021). QSAR, molecular docking studies, ligand-based design and pharmacokinetic analysis on Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) inhibitors as potential anti-triple-negative breast cancer (MDA-MB-231 cell line) drug compounds. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 1-20.
- Lee, C. U. ve Grossmann, T. N. (2012). Reversible covalent inhibition of a protein target. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(35), 8699-8700.
- Lettau, K., Zips, D. ve Toulany, M. (2021). Simultaneous targeting of rsk and akt efficiently inhibits yb-1-mediated repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in breast cancer cells. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 109(2), 567-580.
- Li, L., Chen, R. ve Weng, Z. (2003). RDOCK: refinement of rigid-body protein docking predictions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(3), 693-707.

- Li, D., Fu, T. M., Nan, J., Liu, C., Li, L. F. ve Su, X. D. (2012). Structural basis for the autoinhibition of the C-terminal kinase domain of human RSK1. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(6), 680-685.
- Li, J., Kritzer, M. D., Michel, J. J. C., Le, A., Thakur, H., Gayanilo, M., Passariello C. L., Negro A., Danial J. B., Oskouei B., Sanders M., Hare J. M., Hanauer A., Dodge-Kafka K. ve Kapiloff, M. S. (2013). Anchored p90 ribosomal S6 kinase 3 is required for cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation research*, 112(1), 128-139.
- Li, B., Xu, N., Wan, Z., Ma, L., Li, H., Cai, W., Chen X., Huang Z. ve He, Z. (2019). Isobavachalcone exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects on human liver cancer cells by targeting the ERKs/RSK2 signaling pathway. *Oncology reports*, 41(6), 3355-3366.
- Li, L. Y., Chen, X. S., Wang, K. S., Guan, Y. D., Ren, X. C., Cao, D. S., Sun X. Y., Li A., Tao Y., Zhang Y., Yin M., Wang X., Wu M., Yang J. ve Cheng, Y. (2020). RSK2 protects human breast cancer cells under endoplasmic reticulum stress through activating AMPK α 2-mediated autophagy. *Oncogene*, 39(43), 6704-6718.
- Liu, B. W., Yu, Z. H., Chen, A. X., Chi, J. R., Ge, J., Yu, Y. ve Cao, X. C. (2019). Estrogen receptor- α -miR-1271-SNAI2 feedback loop regulates transforming growth factor- β -induced breast cancer progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 1-12.
- Lommel, M. J., Trairatphisan, P., Gäbler, K., Laurini, C., Muller, A., Kaoma, T., Vallar L., Sauter T. ve Schaffner-Reckinger, E. (2016). L-plastin Ser5 phosphorylation in breast cancer cells and in vitro is mediated by RSK downstream of the ERK/MAPK pathway. *The FASEB Journal*, 30(3), 1218-1233
- Liang, H., Hu, C., Lin, X., He, Z., Lin, Z. ve Dai, J. (2020). MiR-548d-3p Promotes Gastric Cancer by Targeting RSK4. *Cancer Management and Research*, 12, 13325.
- López-Vicente, L., Armengol, G., Pons, B., Coch, L., Argelaguet, E., Lleonart, M., Hernández-Losa J, de Torres I ve Ramon y Cajal, S. R. (2009). Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is down-regulated in human tumors. *Clinical Cancer Research*, 15(14), 4546-4553.

- Lu, W., Zhang, R., Jiang, H., Zhang, H. ve Luo, C. (2018). Computer-aided drug design in epigenetics. *Frontiers in chemistry*, 6, 57.
- Lv, N., Kong, Q., Zhang, H. ve Li, J. (2021). Discovery of novel *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a inhibitors by multistep virtual screening and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 41, 128001.
- Jhoti, H. ve Leach, A. R. (Eds.). (2007). *Structure-based drug discovery* (Vol. 1). Dordrecht: Springer.
- Jin, Y., Huynh, D. T. N., Kang, K. W., Myung, C. S. ve Heo, K. S. (2019). Inhibition of p90RSK activation sensitizes triple-negative breast cancer cells to cisplatin by inhibiting proliferation, migration and EMT. *BMB reports*, 52(12), 706.
- Jin, G., Yan, M., Liu, K., Yao, K., Chen, H., Zhang, C., Yi Y., Reddy K., Gorja D. R., Laster K. V., Guo Z. ve Dong, Z. (2020). Discovery of a novel dual-target inhibitor against RSK1 and MSK2 to suppress growth of human colon cancer. *Oncogene*, 39(43), 6733-6746.
- Johnson, M. A. ve Maggiora, G. M. (1990). *Concepts and applications of molecular similarity*. Wiley.
- Ma, J., Li, M., Chai, J., Wang, K., Li, P., Liu, Y., Zhao D., Xu J., Yu K., Yan Q., Guo S., Wang Z. ve Fan, L. (2020). Expression of RSK4, CD44 and MMP-9 is upregulated and positively correlated in metastatic ccRCC. *Diagnostic Pathology*, 15(1), 1-10.
- Ma, J., Wang, K., Chai, J., Xu, T., Wei, J., Liu, Y., Wang Y., Xu J., Li M. ve Fan, L. (2021). High RSK4 expression constitutes a predictor of poor prognosis for patients with clear cell renal carcinoma. *Pathology-Research and Practice*, 227, 153642.
- Ma, C., Liu, M., Zhang, J., Cai, H., Wu, Y., Zhang, Y., Ji Y., Shan H., Zou Z., Yang L., Liu L., Xu H., Lei H., Liu C., Zhou L., Cao Y., Zhou H. ve Wu, Y. (2022). ZCL-082, a boron-containing compound, induces apoptosis of non-Hodgkin's lymphoma via targeting p90 ribosomal S6 kinase 1/NF- κ B signaling pathway. *Chemico-biological interactions*, 351, 109770.
- Machado, T. R., Faro, L. V., do Nascimento Mello, A. L., Silva, D. D. O., Abraham-Vieira, B. D. A., Rodrigues, C. R., Silva R. H. S., Junior C. S. V., Sola-Pena M., Boechat F. C. S., de Souza M. C., Zancan P., de Souza M. B. V. ve de Souza, A. M. (2022). 4-

- oxoquinoline-3-carboxamide acyclonucleoside phosphonates hybrids: human MCF-7 breast cancer cell death induction by oxidative stress-promoting and in silico ADMET studies. *Journal of Molecular Structure*, 134542.
- Malakhova, M., Kurinov, I., Liu, K., Zheng, D., D'Angelo, I., Shim, J. H., Steinman V., Bode A. M. ve Dong, Z. (2009). Structural diversity of the active N-terminal kinase domain of p90 ribosomal S6 kinase 2. *PLoS One*, 4(11), e8044.
- Mamounas, E. P., Anderson, S. J., Dignam, J. J., Bear, H. D., Julian, T. B., Geyer Jr, C. E., Taghian A., Wickerham D. L. ve Wolmark, N. (2012). Predictors of locoregional recurrence after neoadjuvant chemotherapy: results from combined analysis of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 and B-27. *Journal of clinical oncology*, 30(32), 3960.
- Mao, S., Chen, Y., Feng, W., Zhou, S., Jiang, C., Zhang, J., Liu X., Qian T., Liu K., Wang Y., Yao C., Gu X. ve Yu, B. (2022). RSK1 promotes mammalian axon regeneration by inducing the synthesis of regeneration-related proteins. *PLoS Biology*, 20(6), e3001653.
- Martin, Y. C., Kofron, J. L. ve Traphagen, L. M. (2002). Do structurally similar molecules have similar biological activity?. *Journal of medicinal chemistry*, 45(19), 4350-4358.
- Matsumura-Kimoto, Y., Tsukamoto, T., Shimura, Y., Chinen, Y., Tanba, K., Kuwahara-Ota, S., Fujibayashi Y., Nishiyama D., Isa R., Yamaguchi J., Kawaji-Kanayama Y., Kobayashi T., Horiike S., Taniwaki M. ve Kuroda, J. (2020). Serine-227 in the N-terminal kinase domain of RSK2 is a potential therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Cancer medicine*, 9(14), 5185-5199.
- Mayer, A.; Hall, M.L.; Lach, J.M.; Clifford, J.; Chandrasena, K.; Canton, C.; Kontoyianni, M. Effect of the Marine β -carboline Alkaloid Manzamine A on RSK1 vs RSK2 Inhibition: a Biochemical and Computational Study. *Preprints 2020*, 2020110174
- Mert, N. M. (2021). Designing of selective and potent inhibitors against histone deacetylase enzymes (HDAC6 VE HDAC10) via in silico screening and molecular modeling techniques for the treatment of cancer/Kanser tedavisi için siliko tarama ve moleküler modelleme teknikleri ile histon deasetilaz enzimlerine (HDAC6 VE HDAC10) karşı

seçici ve etkili inhibitörlerin tasarlanması (Doctoral dissertation, Kadir Has Üniversitesi).

- Mrozowski, R. M., Vemula, R., Wu, B., Zhang, Q., Schroeder, B. R., Hilinski, M. K., Clark D. E., Hecht S. M., O'Doherty G. A. ve Lannigan, D. A. (2013). Improving the affinity of SL0101 for RSK using structure-based design. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(2), 175-179.
- Morris, G. M. ve Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. In *Molecular modeling of proteins* (pp. 365-382). Humana Press.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. ve Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- Morrison, J. L., Breitling, R., Higham, D. J. ve Gilbert, D. R. (2006). A lock-and-key model for protein-protein interactions. *Bioinformatics*, 22(16), 2012-2019.
- Naderi, A. ve Liu, J. (2010). Inhibition of androgen receptor and Cdc25A phosphatase as a combination targeted therapy in molecular apocrine breast cancer. *Cancer letters*, 298(1), 74-87.
- Neise, D., Sohn, D., Stefanski, A., Goto, H., Inagaki, M., Wesselborg, S., Budach W., Stühler K. ve Jänicke, R. U. (2013). The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor BI-D1870 prevents gamma irradiation-induced apoptosis and mediates senescence via RSK-and p53-independent accumulation of p21WAF1/CIP1. *Cell death & disease*, 4(10), e859-e859.
- Nguyen, T. L., Gussio, R., Smith, J. A., Lannigan, D. A., Hecht, S. M., Scudiero, D. A., Shoemaker R. H. ve Zaharevitz, D. W. (2006). Homology model of RSK2 N-terminal kinase domain, structure-based identification of novel RSK2 inhibitors, and preliminary common pharmacophore. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(17), 6097-6105.
- Nguyen, T. L. (2008). Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 8(7), 710-716.

- Osman, S. M., Ayoub, N. A., Hafez, S. A., Ibrahim, H. A., El Raey, M. A., El-Emam, S. Z., Seada A. A. ve Saadeldeen, A. M. (2020). Aldose reductase inhibitor form *Cassia glauca*: A comparative study of cytotoxic activity with Ag nanoparticles (NPs) and molecular docking evaluation. *PloS one*, 15(10), e0240856.
- Özkan, H. (2019). N-Alkillenmiş Tetrazol Türevi Bileşiklerin Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Atılım (ADME) Özelliklerinin Araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 14(2), 384-394.
- Pambid, M. R., Berns, R., Adomat, H. H., Hu, K., Triscott, J., Maurer, N., Zisman N., Ramaswamy V., Hawkins C. E., Taylor M. D., Dunham C., Guns E. ve Dunn, S. E. (2014). Overcoming resistance to Sonic Hedgehog inhibition by targeting p90 ribosomal S6 kinase in pediatric medulloblastoma. *Pediatric blood & cancer*, 61(1), 107-115.
- Pancholi, S., Lykkesfeldt, A. E., Hilmi, C., Banerjee, S., Leary, A., Drury, S., Johnston S., Dowsett M. ve Martin, L. A. (2008). ERBB2 influences the subcellular localization of the estrogen receptor in tamoxifen-resistant MCF-7 cells leading to the activation of AKT and RPS6KA2. *Endocrine-related cancer*, 15(4), 985-1002.
- Park, Y. S. ve Cho, N. J. (2012). EGFR and PKC are involved in the activation of ERK1/2 and p90 RSK and the subsequent proliferation of SNU-407 colon cancer cells by muscarinic acetylcholine receptors. *Molecular and cellular biochemistry*, 370(1), 191-198.
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R. ve Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature reviews Drug discovery*, 9(3), 203-214.
- Rafiee, M., Keramati, M. R., Ayatollahi, H., Sadeghian, M. H., Barzegar, M., Asgharzadeh, A. ve Alinejad, M. (2016). Down-regulation of ribosomal S6 kinase RPS6KA6 in acute myeloid leukemia patients. *Cell Journal (Yakhteh)*, 18(2), 159.
- Ramirez-Medrano, L., Mahadeo, A. ve Delgado-Cruzata, L. (2021). The growth of the MDA-MB-468, but not the MCF-7 breast cancer cell line, is inhibited by (-)-catechin hydrate. *The FASEB Journal*, 35.

- Reipas, K. M., Law, J. H., Couto, N., Islam, S., Li, Y., Li, H., Cherkasov, A., Jung, K., Cheema, A. S., Jones, S. J., Hassell, J. A. ve Dunn, S. E. (2013). Luteolin is a novel p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor that suppresses Notch4 signaling by blocking the activation of Y-box binding protein-1 (YB-1). *Oncotarget*, 4(2), 329.
- Roff  , M., Lupinacci, F. C., Soares, L. C., Hajj, G. N. ve Martins, V. R. (2015). Two widely used RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, alter mTORC1 signaling in a RSK-independent manner. *Cellular Signalling*, 27(8), 1630-1642.
- Romano, A. ve Martel, F. (2021). The Role of EGCG in Breast Cancer Prevention and Therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 21(7), 883-898.
- Romeo, Y., Zhang, X. ve Roux, P. P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochemical Journal*, 441(2), 553-569.
- Rognan, D. (2010). Structure-based approaches to target fishing and ligand profiling. *Molecular Informatics*, 29(3), 176-187.
- Roy, A., Anand, A., Garg, S., Khan, M. S., Bhasin, S., Asghar, M. N. ve Emran, T. B. (2022). Structure-based in silico investigation of agonists for proteins involved in breast cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, Article ID 7278731.
- Sahrawat, T. R. ve Kaur, P. (2019). Polypharmacological study of Ceritinib using a structure based in silico approach. DOI. 10.21931/RB/2019.04.02.3.
- Sapkota, G. P., Cummings, L., Newell, F. S., Armstrong, C., Bain, J., Frodin, M., Grauert M., Hoffmann M., Schnapp G., Steegmaier M., Cohen P. ve Alessi, D. R. (2007). BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochemical Journal*, 401(1), 29-38.
- Searls, D. B. (2000). Using bioinformatics in gene and drug discovery. *Drug Discovery Today*, 5(4), 135-143.
- Serafimova, I. M., Pufall, M. A., Krishnan, S., Duda, K., Cohen, M. S., Maglathlin, R. L., McFarland, J.M., Miller, R.M., Frodin, M. ve Taunton, J. (2012). Reversible targeting of noncatalytic cysteines with chemically tuned electrophiles. *Nature chemical biology*, 8(5), 471-476.

- Serra, V., Eichhorn, P. J., García-García, C., Ibrahim, Y. H., Prudkin, L., Sánchez, G., Rodríguez O., Antón P., Parra J. L., Marlow S., Scaltriti M., Pérez-García J., Prat A., Arribas J., Hahn W. C., Kim S. Y. ve Baselga, J. (2013). RSK3/4 mediate resistance to PI3K pathway inhibitors in breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 123(6), 2551-2563.
- Shaker, B., Ahmad, S., Lee, J., Jung, C. ve Na, D. (2021). In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*, 137, 104851.
- Shi, X., O'Neill, M. M., MacDonnell, S., Brookes, P. S., Yan, C. ve Berk, B. C. (2016). The rsk inhibitor bix02565 limits cardiac ischemia/reperfusion injury. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 21(2), 177-186.
- Shiota, M., Yokomizo, A., Takeuchi, A., Itsumi, M., Imada, K., Kashiwagi, E., Inokuchi J., Tatsugami K., Uchiumi T. ve Naito, S. (2014). Inhibition of RSK/YB-1 signaling enhances the anti-cancer effect of enzalutamide in prostate cancer. *The Prostate*, 74(9), 959-969.
- Siegel R. L., Miller K. D. ve Jemal A. (2021). Cancer statistics, 2021. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33.
- Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Malarkey, K. ve Sturgill, T. W. (1999). Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 2893-2898.
- Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Xu, Y., Errington, T. M., Hecht, S. M. ve Lannigan, D. A. (2005). Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer research*, 65(3), 1027-1034.
- Smith, J. A., Maloney, D. J., Hecht, S. M. ve Lannigan, D. A. (2007). Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor, SL0101. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(14), 5018-5034.
- Smith, J. A. (2005). Poteet-Smith, C. E.; Xu, Y.; Errington, T. M.; Hecht, S. M.; Lannigan, D. A. *Cancer Res*, 65, 1027–103

- Sohrab, S. S. ve Kamal, M. A. (2022). Screening, Docking, and Molecular Dynamics Study of Natural Compounds as an Anti-HER2 for the Management of Breast Cancer. *Life*, 12(11), 1729.
- Srinivasan, A., Thangavel, C., Liu, Y., Shoyele, S., Den, R. B., Selvakumar, P. ve Lakshmikuttyamma, A. (2016). Quercetin regulates β -catenin signaling and reduces the migration of triple negative breast cancer. *Molecular carcinogenesis*, 55(5), 743-756.
- Stapel, J., Oppermann, C., Richter, D. U., Ruth, W. ve Briese, V. (2013). Polyphenol compounds with anti-carcinogenic qualities: Effects of quercetin (flavonol), chrysin (flavon), kaempferol (flavanol), naringenin (flavanon) and hesperidin (flavanoid) on in vitro breast cancer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(29), 2187-2196.
- Steele, A., Prentice, A. G., Last, V., Hoffbrand, A. V. ve Wickremasinghe, R. G. (2011). 2.32 The p90RSK Inhibitor BI-D1870 Induces Apoptosis in CLL Cells. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 11, S179.
- Stratford, A. L., Reipas, K., Hu, K., Fotovati, A., Brough, R., Frankum, J., Takhar, M., Watson, P., Ashworth, A., Lord, C. J., Lasham, A., Print, C. G., ve Dunn, S. E. (2012). Targeting p90 ribosomal S6 kinase eliminates tumor-initiating cells by inactivating Y-box binding protein-1 in triple-negative breast cancers. *Stem Cells*, 30(7), 1338-1348.
- Sulzmaier, F. J. ve Ramos, J. W. (2013). RSK isoforms in cancer cell invasion and metastasis. *Cancer research*, 73(20), 6099-6105.
- Sumrra, S. H., Habiba, U., Zafar, W., Imran, M. ve Chohan, Z. H. (2020). A review on the efficacy and medicinal applications of metal-based triazole derivatives. *Journal of Coordination Chemistry*, 73(20-22), 2838-2877.
- Sun, Y., Cao, S., Yang, M., Wu, S., Wang, Z., Lin, X. ve Liao, D. J. (2013). Basic anatomy and tumor biology of the RPS6KA6 gene that encodes the p90 ribosomal S6 kinase-4. *Oncogene*, 32(14), 1794-1810.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and

- mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209-249.
- Takada, I., Yogiashi, Y. ve Makishima, M. (2016). The ribosomal S6 kinase inhibitor BI-D1870 ameliorated experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Immunobiology, 221(2), 188-192.
- Tang, Y., Zhu, W., Chen, K. ve Jiang, H. (2006). New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery. Drug discovery today: technologies, 3(3), 307-313.
- Tang, Z. H., Li, T., Gao, H. W., Sun, W., Chen, X. P., Wang, Y. T., ve Lu, J. J. (2014). Platycodin D from Platycodonis Radix enhances the anti-proliferative effects of doxorubicin on breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Chinese medicine, 9(1), 1-7.
- Thakur, A., Rahman, K. W., Wu, J., Bollig, A., Biliran, H., Lin, X. Nassar H., Grignon D. J., Sarkar F. H. Ve Liao, J. D. (2007). Aberrant expression of X-linked genes RbAp46, Rsk4, and Cldn2 in breast cancer. Molecular Cancer Research, 5(2), 171-181.
- Theodosakis, N., Micevic, G., Langdon, C. G., Ventura, A., Means, R., Stern, D. F. ve Bosenberg, M. W. (2017). p90RSK blockade inhibits dual BRAF and MEK inhibitor-resistant melanoma by targeting protein synthesis. Journal of Investigative Dermatology, 137(10), 2187-2196.
- Trott, O. ve Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of computational chemistry, 31(2), 455-461.
- Ushijima, M., Shiota, M., Matsumoto, T., Kashiwagi, E., Inokuchi, J. ve Eto, M. (2022). An oral first-in-class small molecule RSK inhibitor suppresses AR variants and tumor growth in prostate cancer. Cancer Science, 113(5), 1731.
- Uteperbergenov, D., Derewenda, U., Olekhovich, N., Szukalska, G., Banerjee, B., Hilinski, M. K., Lannigan D. A., Stukenberg T. ve Derewenda, Z. S. (2012). Insights into the inhibition of the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) by the flavonol glycoside SL0101

- from the 1.5 Å crystal structure of the N-terminal domain of RSK2 with bound inhibitor. *Biochemistry*, 51(33), 6499-6510.
- Vázquez, J., López, M., Gibert, E., Herrero, E. ve Luque, F. J. (2020). Merging ligand-based and structure-based methods in drug discovery: An overview of combined virtual screening approaches. *Molecules*, 25(20), 4723.
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W. ve Taylor, R. D. (2003). Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(4), 609-623.
- Vidal, D., Garcia-Serna, R. ve Mestres, J. (2011). Ligand-based approaches to in silico pharmacology. In *Chemoinformatics and Computational Chemical Biology* (pp. 489-502). Humana Press, Totowa, NJ.
- Wang, L., Wang, X., Chen, H., Zu, X., Ma, F., Liu, K., Bode A. M., Dong Z. ve Kim, D. J. (2019). Gossypin inhibits gastric cancer growth by direct targeting of AURKA and RSK2. *Phytotherapy Research*, 33(3), 640-650.
- Wang, M., Wan, H., Wang, S., Liao, L., Huang, Y., Guo, L., Liu F., Shang L., Huang J., Ji D., Xia X., Jiang B., Chen D. ve Xiong, K. (2020). RSK3 mediates necroptosis by regulating phosphorylation of RIP3 in rat retinal ganglion cells. *Journal of Anatomy*, 237(1), 29-47.
- Warfield, B. M., Casavieri, K. A., Matheson, C. J., Backos, D. S. ve Reigan, P. (2021). Substituted pteridinones, pyrimidines, pyrrolopyrimidines, and purines as p90 ribosomal S6 protein kinase-2 (RSK2) inhibitors: Pharmacophore modeling data. *Data in brief*, 38, 107433.
- Watanabe, D., Nogami, A., Okada, K., Akiyama, H., Umezawa, Y. ve Miura, O. (2019). FLT3-ITD Activates RSK1 to Enhance Proliferation and Survival of AML Cells by Activating mTORC1 and eIF4B Cooperatively with PIM or PI3K and by Inhibiting Bad and BIM. *Cancers*, 11(12), 1827.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer F. T., Beer T., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R. Ve Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.

- Wiltgen, M. (2018). Algorithms for structure comparison and analysis: homology modelling of proteins. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*; Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K., Schönbach, C., Eds, 38-61.
- Wright, J. R., Chauhan, M., Shah, C., Ring, A., Thomas, A. L., Goodall, A. H. ve Adlam, D. (2020). The TICONC (Ticagrelor-Oncology) study: implications of P2Y12 inhibition for metastasis and cancer-associated thrombosis. *Cardio Oncology*, 2(2), 236-250..
- Wu, G., Robertson, D. H., Brooks III, C. L. ve Vieth, M. (2003). Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER—A CHARMM-based MD docking algorithm. *Journal of computational chemistry*, 24(13), 1549-1562.
- Wu, S., Shao, M., Zhang, Y. ve Shi, D. (2021). Activation of RSK2 upregulates SOX8 to promote methotrexate resistance in gestational trophoblastic neoplasia. *Laboratory Investigation*, 101(11), 1494-1504.
- Xiang, L. P., Wang, A., Ye, J. H., Zheng, X. Q., Polito, C. A., Lu, J. L., Li Q. S. Ve Liang, Y. R. (2016). Suppressive effects of tea catechins on breast cancer. *Nutrients*, 8(8), 458.
- Xu, J., Jia, Q., Zhang, Y., Yuan, Y., Xu, T., Yu, K., Chai J., Wang K., Chen L., Xiao T. ve Li, M. (2021). Prominent roles of ribosomal S6 kinase 4 (RSK4) in cancer. *Pathology-Research and Practice*, 219, 153374.
- Yao, K., Cho, Y. Y., Pugliese, A., Malakhova, M., Bode, A. ve Dong, Z. (2009). Abstract# 4098: A regulatory mechanism of RSK2 N-terminal kinase activity. *Cancer Research*, 69(9_Supplement), 4098-4098.
- Ye, Q., Wang, X., Jin, M., Wang, M., Hu, Y., Yu, S., Yang Y., Yang J. ve Cai, J. (2018). Effect of RSK4 on biological characteristics of colorectal cancer. *World journal of surgical oncology*, 16(1), 1-9.
- Yin, Y., Che, K., Hu, J., Hua, H., Dong, A., Wang, J., Yu J., Zhang Q., Zhao S., Zhao Y., Wang P., Wang F., Wang Y., Chi J. Ve Sun, W. (2020). Hypermethylation of the RSK4 promoter associated with BRAF V600E promotes papillary thyroid carcinoma. *International Journal of Oncology*, 56(5), 1284-1293.
- Youn, M., Gomez, J. O., Mark, K. ve Sakamoto, K. M. (2021). RSK Isoforms in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines*, 9(7), 726.

- Yoo, S. M., Cho, S. J. ve Cho, Y. Y. (2015). Molecular targeting of ERKs/RSK2 signaling axis in cancer prevention. *Journal of Cancer Prevention*, 20(3), 165.
- Yuan, Y., Xu, J., Jiang, L., Yu, K., Ge, Y., Li, M., He H., Niu Q., Shi X., Fan L., Chen Z., Zhao Z., Li S., Xu Y., Wang Z. ve Li, H. (2021). Discovery, Optimization, and Structure–Activity Relationship Study of Novel and Potent RSK4 Inhibitors as Promising Agents for the Treatment of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(18), 13572-13587.
- Zarei, O., Faham, N., Vankayalapati, H., Raepfel, S. L., Welm, A. L. ve Hamzeh-Mivehroud, M. (2022). Ligand-based Discovery of Novel Small Molecule Inhibitors of RON Receptor Tyrosine Kinase. *Molecular Informatics*, 41(1), 2000181.
- Zewail, M., E. Gaafar, P. M., Ali, M. M. ve Abbas, H. (2022). Lipidic cubic-phase leflunomide nanoparticles (cubosomes) as a potential tool for breast cancer management. *Drug Delivery*, 29(1), 1663-1674.
- Zhang, C. ve Chu, M. (2018). Leflunomide: a promising drug with good antitumor potential. *Biochemical and biophysical research communications*, 496(2), 726-730.
- Zhang, S., Hamid, M. R., Wang, T., Liao, J., Wen, L., Zhou, Y., Wei P., Zou X., Chen G., Chen J. ve Zhou, G. (2020). RSK-3 promotes cartilage regeneration via interacting with rpS6 in cartilage stem/progenitor cells. *Theranostics*, 10(15), 6915.
- Zhao, Y., Chen, R. F., Deng, Z. K., Zhang, L. X., Cheng, Y., Chen, A. F. ve Cao, D. S. (2021). Discovery of novel p90 ribosomal S6 kinase 2 inhibitors for potential cancer treatment through ligand-based and structure-based virtual screening methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 217, 104402.
- Zhao, H., Martin, T. A., Davies, E. L., Ruge, F., Yu, H., Zhang, Y., Teng X. U. ve Jiang, W. G. (2016). The clinical implications of RSK1-3 in human breast cancer. *Anticancer research*, 36(3), 1267-1274.
- Zhao, Y., Chen, R. F., Deng, Z. K., Zhang, L. X., Cheng, Y., Chen, A. F. ve Cao, D. S. (2021). Discovery of novel p90 ribosomal s6 kinase 2 inhibitors for potential cancer treatment through ligand-based and structure-based virtual screening methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 217, 104402.

Zhu, L., Xing, S., Zhang, L., Yu, J. M., Lin, C., & Yang ve W. J. (2017). Involvement of Polo-like kinase 1 (Plk1) in quiescence regulation of cancer stem-like cells of the gastric cancer cell lines. *Oncotarget*, 8(23), 37633.



EKLER

Ek Tablo 1

FMK farmakofor model esaslı RSK1-CTKD (PDB:3RNY) ve ChemDiv veri tabanı triazol kütüphanesi moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	-CDOCKER (kkal/mol)	No	Ligands	-CDOCKER (kkal/mol)
1	D217-0760	28,40	11	D217-0160	24,17
2	D291-0052	27,05	12	D291-0211	24,03
3	Y508-3163	26,25	13	D291-0027	23,98
4	D291-0057	25,93	14	D291-0209	23,44
5	D291-0181	25,84	15	D217-0310	22,69
6	Y500-5836	25,47	16	4027-0010	22,61
7	D217-0301	24,95	17	D291-0179	21,95
8	D291-0210	24,94	18	7445-0113	20,27
9	D291-0079	24,69	19	C592-1980	17,90
10	D217-0151	24,53	20	C592-1983	16,94

Ek Tablo 2

FMK farmakofor modeli esaslı RSK1-CTKD (PDB:3RNY) ve ChemDiv veri tabanı indol kütüphanesi moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	-CDOCKER (kkal/mol)	No	Ligands	-CDOCKER (kkal/mol)
1	V022-8669	51,84	11	V014-1497	39,59
2	V013-5841	49,25	12	P091-0574	36,92
3	V014-1486	48,51	13	P095-0553	36,30
4	V012-2291	47,14	14	V031-0867	35,72
5	V019-4827	45,06	15	V015-3605	35,20
6	V014-4714	44,99	16	V029-5925	33,95
7	V011-9716	44,88	17	V029-0817	33,88
8	V015-3610	44,21	18	V029-7257	32,82
9	V013-5456	42,36	19	V031-0947	32,67
10	L881-0368	39,87	20	V031-0891	32,64

Ek Tablo 3

FMK farmakofor modeli esaslı RSK2-CTKD (PDB:4D9T) ve Chemdiv veri tabanı indol kütüphanesi moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	-CDOCKER (kcal/mol)	No	Ligands	-CDOCKER (kcal/mol)
1	V012-2291	43,18	10	V029-0817	25,97
2	V013-5841	39,09	11	V031-0947	25,53
3	V022-8669	38,75	12	V015-3605	23,02
4	V015-3610	38,68	13	V031-0866	22,94
5	V014-4714	31,98	14	V029-0805	22,04
6	V031-0867	31,30	15	V029-7257	20,13
7	V013-5456	30,07	16	V029-5876	18,76
8	V031-0937	28,26	17	Y040-3130	16,70
9	L881-0368	26,45			

Ek Tablo 4

FMK farmakofor modeli esaslı RSK2-CTKD (PDB:4D9T) ve Enamine veri tabanı protein mimetics kütüphanesi moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	-CDOCKER (kcal/mol)	No	Ligands	-CDOCKER (kcal/mol)
1	Compound4818	43,53	7	Compound6682	29,01
2	Compound131	40,69	8	Compound6461	28,40
3	Compound1199	35,02	9	Compound2493	22,46
4	Compound1089	31,06	10	Compound5304	20,49
5	Compound4104	29,49	11	Compound7164	11,86
6	Compound5787	29,49			

Ek Tablo 5

RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) ve Apexbt veri tabanı ile moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	M.A.	Libdock Score (kcal/mol)	No	Ligands	M.A.	Libdock Score (kcal/mol)
1	Compound253	415,37	138,67	6	Compound10	366,41	123,56
2	Compound250	396,87	138,39	7	Compound33	481,01	121,68
3	Compound14	326,37	130,60	8	Compound5	488,74	121,47
4	Compound27	380,53	126,78	9	Compound113	359,41	114,32
5	Compound14	366,41	126,42	10	Compound8	428,92	105,96

M.A.: Molekül Ağırlığı

Ek Tablo 6.

RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ilaç yeniden konumlandırma çalışması moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	M.A.	Libdock Score (kkal/mol)	No	Ligands	M.A.	Libdock Score (kkal/mol)
1	Andarine	441,36	113,22	6	Selumetinib	457,68	97,35
2	Vatalanib	346,82	109,67	7	Vismodegib	421,29	95,86
3	Rucaparib	323,37	106,31	8	Belinostat	318,35	94,34
4	Vorinostat	264,33	105,39	9	Leflunomide	270,21	93,20
5	Linifanib	324,34	98,70	10	Veliparib	244,30	89,77

M.A.: Molekül Ağırlığı

Ek Tablo 7

RSK1-NTKD (PDB:2Z7R) ve ChEMBL veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kkal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kkal/mol)
1	CHEMBL2105759	-8,88	8	CHEMBL483254	-8,22
2	CHEMBL535	-8,75	9	CHEMBL1229517	-8,16
3	CHEMBL1789941	-8,57	10	CHEMBL477	-8,14
4	CHEMBL1208646	-8,44	11	CHEMBL1493	-8,11
5	CHEMBL190	-8,44	12	CHEMBL4066936	-8,11
6	CHEMBL1201273	-8,33	13	CHEMBL1540	-8,10
7	CHEMBL15870	-8,22	14	CHEMBL723	-8,07

Ek Tablo 8

RSK1-NTKD (PDB:2Z7R) ve Apexbt veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	B1051	-9,90	11	A8307	-8,78
2	B1540	-9,51	12	B1523	-8,74
3	C4009	-9,23	13	A3135	-8,72
4	A8412	-9,05	14	A4115	-8,66
5	A4604	-8,98	15	A3556	-8,64
6	A4143	-8,93	16	A4152	-8,60
7	B3288	-8,92	17	A3741	-8,60
8	A4141	-8,88	18	B6007	-8,60
9	B6099	-8,86	19	A3760	-8,58
10	A8617	-8,79	20	A3012	-8,57

Ek Tablo 9

RSK1-NTKD (PDB:2Z7Q) ve Apexbt ve ChEMBL veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	A8412	-10,48	1	CHEMBL1201774	-8,75
2	A4115	-8,92	2	CHEMBL1208646	-8,55
3	B1540	-8,69	3	CHEMBL190	-8,55
4	A8565	-8,38	4	CHEMBL713	-8,06
5	A3135	-8,36	5	CHEMBL1752	-8,02
6	A5096	-8,34	6	CHEMBL727	-7,89
7	B5929	-8,33	7	CHEMBL221959	-7,82
8	A3016	-8,32	8	CHEMBL1789941	-7,78
9	B6099	-8,29	9	CHEMBL311498	-7,71
10	A3760	-8,23	10	CHEMBL1540	-7,69
11	C4009	-8,03			

Ek Tablo 10

LJH685 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve Apexbt ve Drugbank veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	LJH685	-9,27	8	DB07146	-8,18
2	Compound289	-9,26	9	DB05414	-8,03
3	DB03916	-9,04	10	DB07567	-7,86
4	DB11871	-9,01	11	DB09272	-7,81
5	Compound1926	-8,72	12	DB15982	-7,79
6	DB08774	-8,54	13	DB07809	-7,78
7	DB12868	-8,19			

Ek Tablo 11

RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve Chemdiv veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	G731-0269	-8,81	11	G731-0418	-8,39
2	G731-0126	-8,76	12	G731-0319	-8,30
3	G731-0389	-8,71	13	G731-0260	-8,26
4	G731-0252	-8,57	14	C301-3986	-8,18
5	F688-0005	-8,48	15	8007-1839	-8,18
6	8020-1592	-8,46	16	G731-0140	-8,16
7	Y512-4796	-8,46	17	3996-0040	-8,14
8	G731-0151	-8,41	18	G731-0461	-8,13
9	7790-2744	-8,40	19	G731-0114	-8,12
10	8017-1180	-8,40	20	G731-0082	-8,11

Ek Tablo 12

RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve Apexbt veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	N1842	-10,10	10	A2168	-8,60
2	N1841	-9,48	11	B5389	-8,56
3	A8394	-9,48	12	A2689	-8,56
4	N1828	-9,47	13	A8640	-8,52
5	C4445	-9,33	14	A3392	-8,47
6	A5803	-9,26	15	A3847	-8,39
7	B1540	-8,99	16	N1958	-8,34
8	B2062	-8,86	17	N1852	-8,32
9	A3353	-8,83	18	A3792	-8,32

Ek Tablo 13

RSK2-NTKD (PDB:4NUS) ve çeşitli veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	CHEMBL311498	-9,72	3	CHEMBL535	-8,70
2	Orantinib	-8,90	4	Resveratrol	-8,18

Ek Tablo 14

BI-D1870 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve InterBioScreen veri tabanı natural compound kütüphanesi ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	STOCK1N-66635	-9,62	11	STOCK1N-56104	-8,41
2	STOCK1N-66821	-9,62	12	STOCK1N-89882	-8,31
3	STOCK1N-70762	-9,04	13	STOCK1N-84176	-8,28
4	STOCK1N-66563	-8,94	14	STOCK1N-66728	-8,19
5	STOCK1N-66623	-8,94	15	STOCK1N-66738	-8,19
6	STOCK1N-69124	-8,83	16	STOCK1N-79967	-8,18
7	STOCK1N-77544	-8,48	17	STOCK1N-67118	-8,18
8	STOCK1N-66090	-8,46	18	STOCK1N-73733	-8,13
9	STOCK1N-66557	-8,46	19	STOCK1N-66572	-8,10
10	STOCK1N-97012	-8,44	20	STOCK1N-95674	-8,09

Ek Tablo 15

BI-D1870 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve OTAVA veri tabanı drug-like green collection kütüphanesi ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	Compound57219	-8,81	11	Compound59824	-8,43
2	Compound56963	-8,80	12	Compound56812	-8,42
3	Compound57221	-8,77	13	Compound152398	-8,30
4	Compound56297	-8,76	14	Compound152399	-8,30
5	Compound56292	-8,74	15	Compound165804	-8,28
6	Compound56965	-8,72	16	Compound147686	-8,21
7	Compound56966	-8,66	17	Compound134741	-8,14
8	Compound56962	-8,65	18	Compound134160	-8,13
9	Compound82902	-8,62	19	Compound137822	-8,04
10	Compound56943	-8,54	20	Compound139217	-8,04

Ek Tablo 16

BI-D1870 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve OTAVA veri tabanı in-house stock kütüphanesi ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	Compound99035	-8,83	11	Compound234108	-8,64
2	Compound231146	-8,81	12	Compound45717	-8,62
3	Compound230822	-8,80	13	Compound230795	-8,54
4	Compound231149	-8,77	14	Compound230825	-8,47
5	Compound229959	-8,76	15	Compound234446	-8,43
6	Compound229954	-8,74	16	Compound230636	-8,42
7	Compound230827	-8,72	17	Compound241533	-8,30
8	Compound230828	-8,66	18	Compound241534	-8,30
9	Compound230826	-8,65	19	Compound43448	-8,28
10	Compound230821	-8,65	20	Compound160935	-8,21

Ek Tablo 17

RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve Drugbank veri tabanı ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	DB14128	-10,19	11	DB01767	-8,81
2	DB15688	-9,28	12	DB13138	-8,80
3	DB02483	-9,21	13	DB03797	-8,76
4	DB16325	-9,19	14	DB12988	-8,76
5	DB00157	-9,15	15	DB02812	-8,75
6	DB01690	-8,93	16	DB03546	-8,72
7	DB07618	-8,92	17	DB04518	-8,67
8	DB07268	-8,88	18	DB07648	-8,66
9	DB14859	-8,85	19	DB16390	-8,65
10	DB02323	-8,84	20	DB04716	-8,64

Ek Tablo 18

RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve InterBioScreen veri tabanı natural compound kütüphanesi ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	STOCK1N-02221	-9,61	11	STOCK1N-03516	-8,46
2	STOCK1N-06786	-8,82	12	STOCK1N-08624	-8,45
3	STOCK1N-00557	-8,76	13	STOCK1N-07076	-8,43
4	STOCK1N-02076	-8,73	14	STOCK1N-10445	-8,43
5	STOCK1N-14887	-8,63	15	STOCK1N-11604	-8,38
6	STOCK1N-02016	-8,62	16	STOCK1N-11580	-8,33
7	STOCK1N-13181	-8,57	17	STOCK1N-01207	-8,25
8	STOCK1N-04109	-8,53	18	STOCK1N-14707	-8,24
9	STOCK1N-12131	-8,52	19	STOCK1N-12003	-8,22
10	STOCK1N-07194	-8,47	20	STOCK1N-08753	-8,20

Ek Tablo 19

SL0101 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:3UBD) ve çeşitli veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	Kersitrin-1	-11,14	13	DB04158	-9,40
2	DB12665	-10,94	14	DB03300	-9,33
3	DB16403	-10,84	15	DB03020	-9,21
4	DB02485	-10,00	16	DB02421	-9,16
5	DB01698(Rutin)	-9,96	17	DB02930	-8,94
6	Rutin hydrate 1	-9,96	18	DB01763	-8,91
7	Rutin (Rutoside)-1	-9,96	19	DB02082	-8,85
8	DB15919	-9,73	20	DB03488	-8,82
9	DB01792	-9,67	21	DB12895	-8,63
10	DB16120	-9,61	22	DB04071	-8,63
11	DB03461	-9,50	23	STOCK1N-90894	-8,02
12	DB01690	-9,43	24	L865-0118	-8,02

Ek Tablo 20

BIX02565 farmakofor modeli esaslı RSK2-NTKD (PDB:5D9K) ve çeşitli veri tabanları ile Glide/SP moleküler yerleştirme sonuçları

No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)	No	Ligands	Glide/SP (kcal/mol)
1	BIX02565	-6,57	12	J047-0203	-6,96
2	DB11871	-8,64	13	Compound133176	-6,84
3	DB07812	-7,53	14	Ipatasertib	-6,57
4	DB08073	-7,47	15	DDR1-1N-1	-6,50
5	DB02112	-7,30	16	Brivanib alaninate	-6,48
6	DB15982	-7,30	17	STOCK1N-82073	-6,47
7	DB03231	-7,30	18	Compound163854	-6,47
8	DB08569	-7,13	19	Y508-0610	-6,31
9	DB02155	-7,01	20	D291-0052	-6,19
10	Z250-1340	-6,99	21	C272-0016	-6,07
11	K822-0251	-6,98	22	6011-0830	-6,03

Ek Tablo 21
Protein mimetics ADMET/RO5 sonuçları

No	Ligand	Moleküler Ağırlık	AlogP98	Çözünürlük	CYP2D6	Hepatoksisite	KBB	Absorpsiyon Seviyesi	Plazma Protein Bağlanma
1	Compound4818	467,602	2,566	2	False	True	4	1	True
2	Compound131	489,584	1,739	3	False	False	4	0	False
3	Compound1199	441,522	2,306	2	False	True	4	3	True
4	Compound1089	417,457	3,538	2	False	True	3	0	True
5	Compound4104	559,654	2,532	2	False	True	4	2	True
6	Compound5787	449,522	2,932	2	False	False	4	0	True
7	Compound6682	153,88	2,711	2	False	True	4	0	True
8	Compound6461	391,463	3,836	2	False	False	2	0	True
9	Compound2493	389,495	1,749	3	False	True	3	0	False
10	Compound5304	472,529	4,673	2	False	True	4	1	True
11	Compound7164	369,338	2,138	3	True	True	3	0	True

Sulu Çözünürlük seviyesi: 0 (aşırı az); 1 (çok az, fakat mümkün); 2 (az); 3 (iyi)
Kan Beyin Bariyeri (KBB) seviyesi: 0 (çok yüksek geçiren); 1 (yüksek); 2 (orta), 3 (az); 4 (Tanımlanmamış)
Sitokrom P450 2D6 seviyesi: True (inhibitör); False (non-inhibitör)
Hepatoksisite: True (inhibitör); False (non-inhibitör)
İnsan Bağırsak Absorpsiyon seviyesi: 0 (iyi); 1 (orta); 2 (az); 3 (çok az)
Plazma Protein Bağlanması: 0 (zayıf); 1 (güçlü)
AlogP98: AlogP98< 5 (hücre geçirgenliği ideal)

Ek Tablo 22
Triazol ADMET/RO5 sonuçları

No	Ligand	Moleküler Ağırlık	AlogP98	Çözünürlük	CYP2D6	Hepatoksisite	KBB	Absorpsiyon Seviyesi	Plazma Protein Bağlanma
1	D217-0760	304,344	1,119	4	False	False	3	0	True
2	D291-0052	415,469	2,258	3	False	True	4	0	True
3	Y508-3163	472,948	3,571	2	False	True	4	1	True
4	D291-0057	480,339	2,52	2	False	True	4	1	True
5	D291-0181	401,443	1,909	3	False	True	4	0	True
6	Y500-5836	452,529	3,392	3	False	True	4	1	False
7	D217-0301	296,71	0,778	4	False	True	3	0	True
8	D291-0210	421,861	2,087	2	False	True	4	0	True
9	D291-0079	435,888	2,436	2	False	True	4	1	True
10	D217-0151	276,291	0,6	4	False	False	3	0	True

Sulu Çözünürlük seviyesi: 0 (aşırı az); 1 (çok az, fakat mümkün); 2 (az); 3 (iyi)
Kan Beyin Bariyeri (KBB) seviyesi: 0 (çok yüksek geçirgen); 1 (yüksek); 2 (orta), 3 (az); 4 (Tanımlanmamış)
Sitokrom P450 2D6 seviyesi: True (inhibitör); False (non-inhibitör)
Hepatoksisite: True (inhibitör); False (non-inhibitör)
İnsan Bağırsak Absorpsiyon seviyesi: 0 (iyi); 1 (orta); 2 (az); 3 (çok az)
Plazma Protein Bağlanması: 0 (zayıf); 1 (güçlü)
AlogP98: AlogP98< 5 (hücre geçirgenliği ideal)

Ek Tablo 23
RSK1 İndol türevleri ADMET/RO5 sonuçları

No	Ligand	Moleküler Ağırlık	AlogP98	Çözünürlük	CYP2D6	Hepatoksisite	KBB	Absorpsiyon Seviyesi	Plazma Protein Bağlanma
1	V022-8669	482,573	5,15	1	False	True	4	1	False
2	V013-5841	444,569	5,09	2	False	False	1	0	False
3	V014-1486	484,513	5,08	1	False	False	1	0	False
4	V012-2291	496,575	5,69	1	False	True	4	1	False
5	V019-4827	499,432	5,93	1	False	True	4	1	False
6	V014-4714	482,549	5,68	1	False	True	4	1	False
7	V011-9716	450,596	4,661	2	False	True	1	0	False
8	V015-3610	468,547	4,664	2	False	True	4	0	False
9	V013-5456	467,026	5,27	1	False	True	1	0	False
10	L881-0368	496,966	3,682	2	False	True	4	2	True

Sulu Çözünürlük seviyesi: 0 (aşırı az); 1 (çok az, fakat mümkün); 2 (az); 3 (iyi)
Kan Beyin Bariyeri (KBB) seviyesi: 0 (çok yüksek geçirgen); 1 (yüksek); 2 (orta), 3 (az); 4 (Tanımlanmamış)
Sitokrom P450 2D6 seviyesi: True (inhibitör); False (non-inhibitör)
Hepatoksisite: True (inhibitör); False (non-inhibitör)
İnsan Bağırsak Absorpsiyon seviyesi: 0 (iyi); 1 (orta); 2 (az); 3 (çok az)
Plazma Protein Bağlanması: 0 (zayıf); 1 (güçlü)
AlogP98: AlogP98< 5 (hücre geçirgenliği ideal)

Ek Tablo 24
RSK2 İndol türevleri ADMET/RO5 sonuçları

No	Ligand	Moleküler Ağırlık	AlogP98	Çözünürlük	CYP2D6	Hepatoksisite	KBB	Absorpsiyon Seviyesi	Plazma Protein Bağlanma
1	V012-2291	496,575	5,69	1	False	True	4	1	False
2	V013-5841	444,569	5,09	2	False	False	1	0	False
3	V022-8669	482,573	5,15	1	False	True	4	1	False
4	V015-3610	468,547	4,66	2	False	True	4	0	False
5	V014-4714	482,549	5,68	1	False	True	4	1	False
6	V031-0867	453,575	5,882	1	False	False	4	1	True
7	V013-5456	467,026	5,27	1	False	True	1	0	False
8	V031-0937	481,629	6,791	1	False	True	4	2	True
9	L881-0368	496,966	3,682	2	False	True	4	2	True
10	V029-0817	363,453	4,227	2	False	False	2	0	True

Sulu Çözünürlük seviyesi: 0 (aşırı az); 1 (çok az, fakat mümkün); 2 (az); 3 (iyi)
Kan Beyin Bariyeri (KBB) seviyesi: 0 (çok yüksek geçirgen); 1 (yüksek); 2 (orta), 3 (az); 4 (Tanımlanmamış)
Sitokrom P450 2D6 seviyesi: True (inhibitör); False (non-inhibitör)
Hepatoksisite: True (inhibitör); False (non-inhibitör)
İnsan Bağırsak Absorpsiyon seviyesi: 0 (iyi); 1 (orta); 2 (az); 3 (çok az)
Plazma Protein Bağlanması: 0 (zayıf); 1 (güçlü)
AlogP98: AlogP98< 5 (hücre geçirgenliği ideal)

Ek Tablo 25

Protein mimetics toksisite sonuçları

No	Ligand	AMES	DTP	RAT NTP		MOUSE NTP	
				Male	Female	Male	Female
1	Compound4818	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
2	Compound131	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
3	Compound1199	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
4	Compound1089	Non-mutajen	Toksik	karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
5	Compound4104	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
6	Compound5787	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
7	Compound6682	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
8	Compound6461	Mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
9	Compound2493	Mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
10	Compound5304	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen

Ek Tablo 26

Triazole toksisite sonuçları

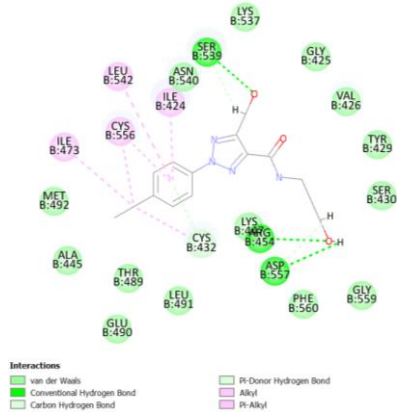
No	Ligand	AMES	DTP	RAT NTP		MOUSE NTP	
				Male	Female	Male	Female
1	D217-0760	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
2	D291-0052	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
3	Y508-3163	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
4	D291-0057	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
5	D291-0181	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
6	Y500-5836	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
7	D217-0301	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
8	D291-0210	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
9	D291-0079	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
10	D217-0151	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen

Ek Tablo 27

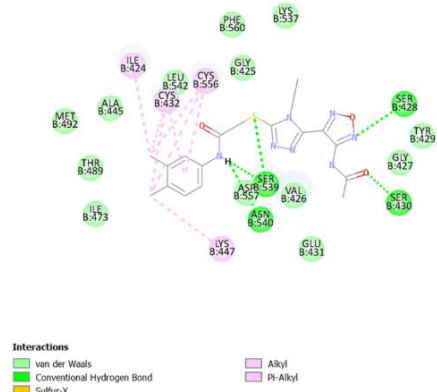
İndol türevleri toksisite sonuçları

No	Ligand	AMES	DTP	RAT NTP		MOUSE NTP	
				Male	Female	Male	Female
1	V012-2291	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
2	V013-5841	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
3	V022-8669	Non-mutajen	Toksik	Karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
4	V015-3610	Non-mutajen	Non-toksik	Karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
5	V014-4714	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
6	V031-0867	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
7	V013-5456	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
8	V031-0937	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
9	L881-0368	Non-mutajen	Toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen
10	V029-0817	Non-mutajen	Non-toksik	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen	Non-karsinojen

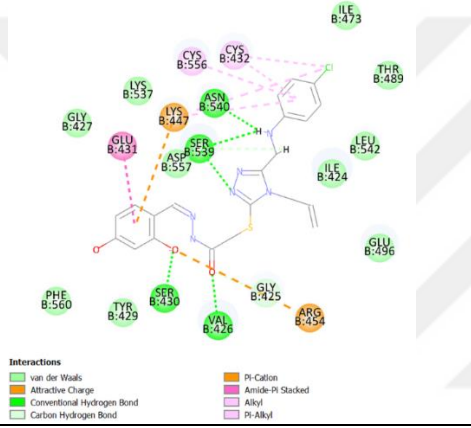
Ligand 1



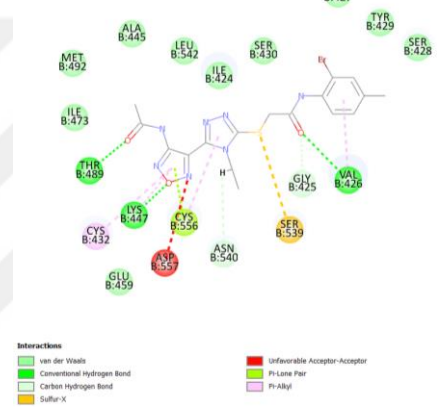
Ligand 2



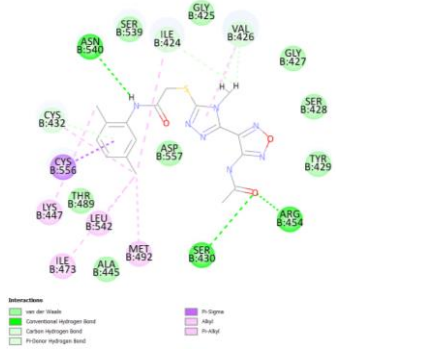
Ligand 3



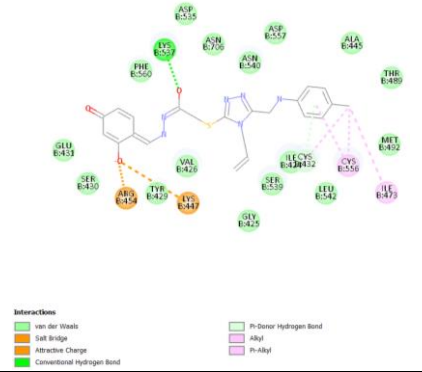
Ligand 4



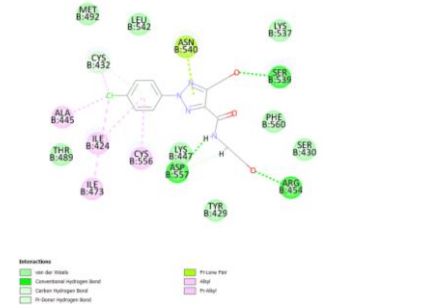
Ligand 5



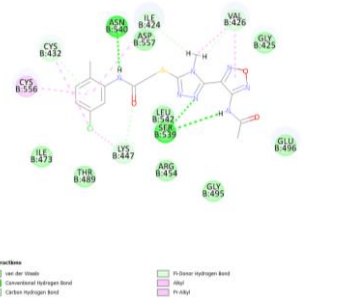
Ligand 6



Ligand 7



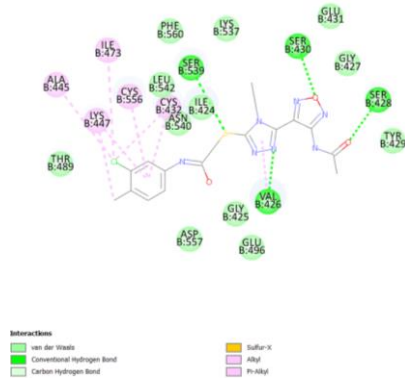
Ligand 8



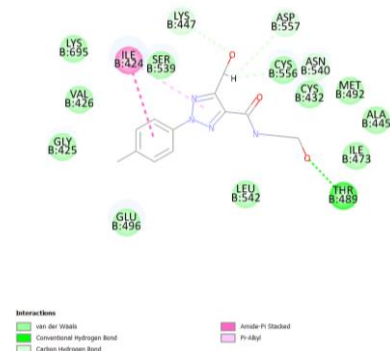
Ek Şekil 1. RSK1 (3RNY)-ligand kompleksi 2B etkileşim diyagramı (Triazol).

Ek Şekil 1'in devamı.

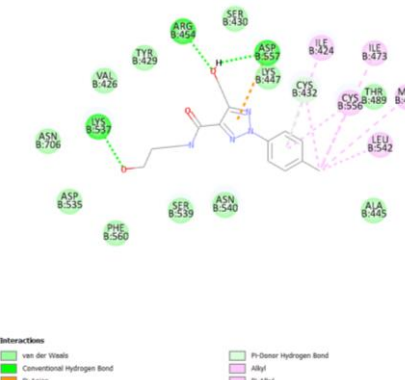
Ligand 9



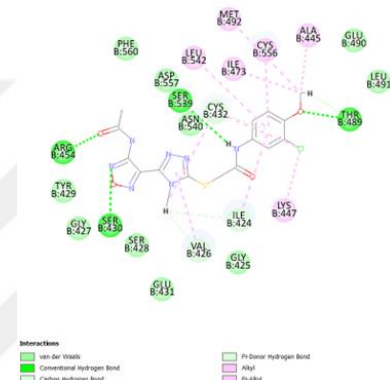
Ligand 10



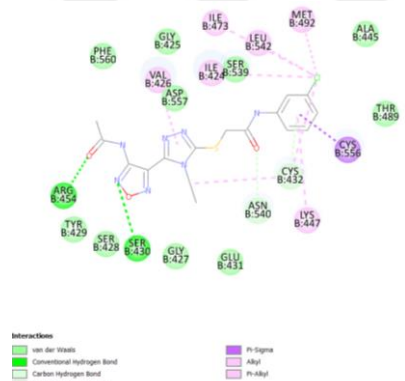
Ligand 11



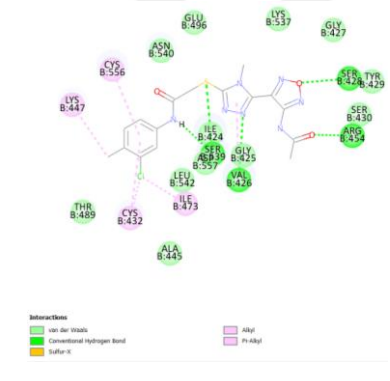
Ligand 12



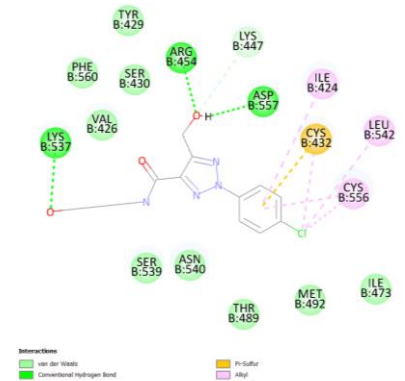
Ligand 13



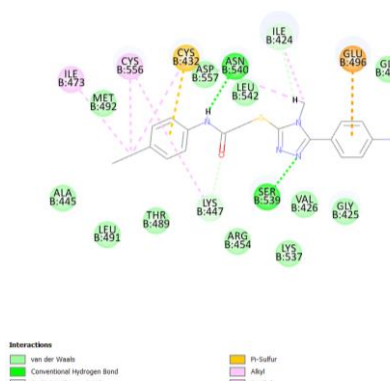
Ligand 14



Ligand 15

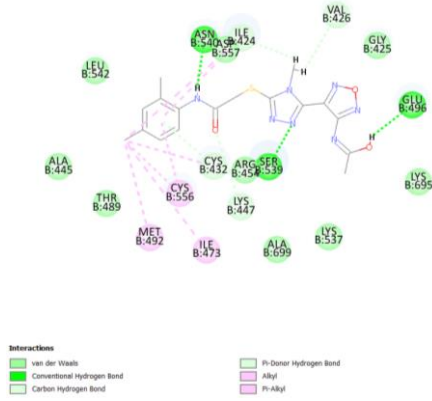


Ligand 16

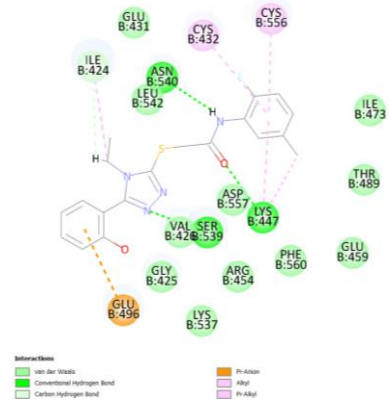


Ek Şekil 1'in devamı.

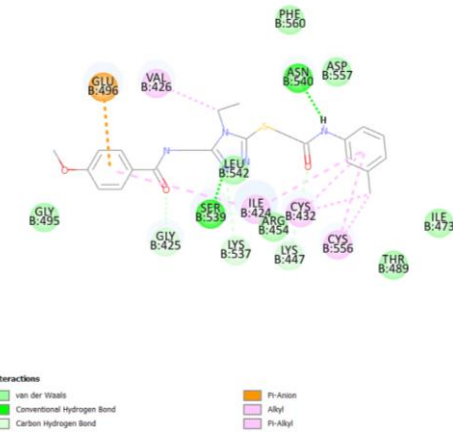
Ligand 17



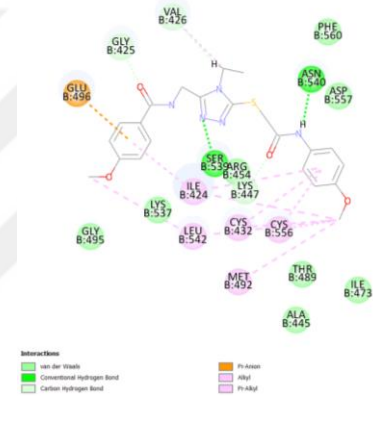
Ligand 18



Ligand 19



Ligand 20



Ligand 1



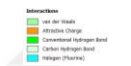
Ligand 2



Ligand 3

Interaktionsarten

 van der Waals	 H-Brücke
 elektrostatische Ladung	 π -Brücke
 konventioneller Wasserstoff-Bond	 π -Stack
 π -Wasserstoff-Bond	
 Wasserstoff (kationisch)	



Ligand 4



Ligand 5



Ligand 6



Ligand 7

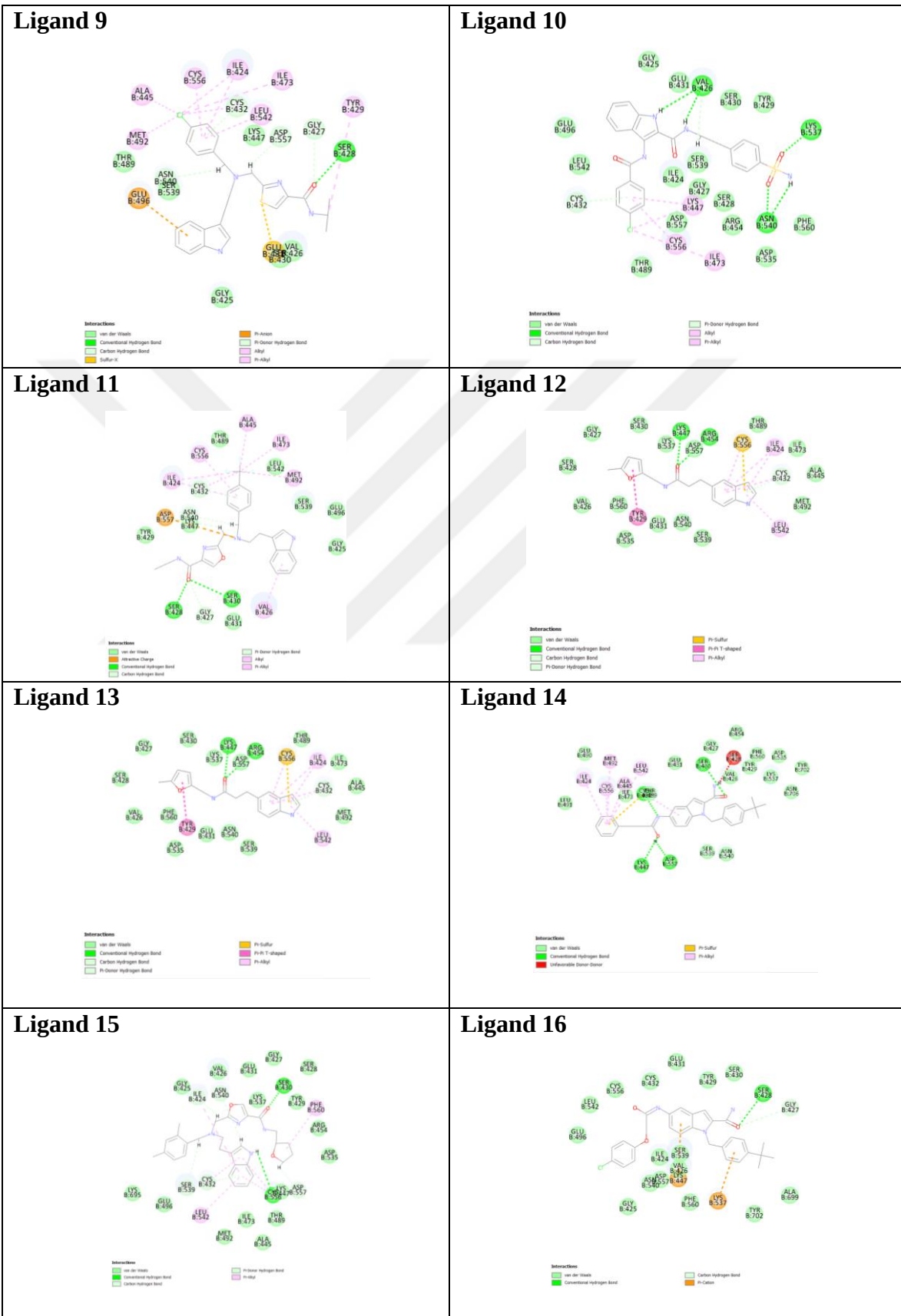


Ligand 8



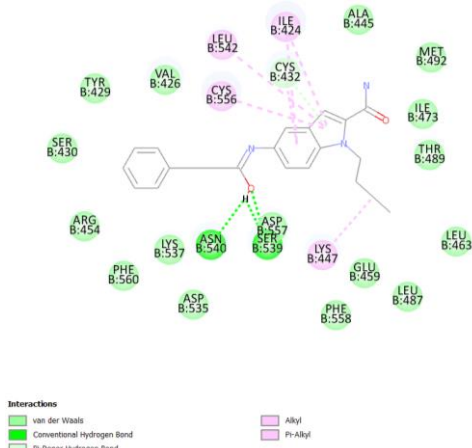
Ek Şekil 2. RSK1 (3RNY)-ligand kompleksi 2B etkileşim diyagramını (indol türevleri).

Ek Şekil 2'nin devamı.

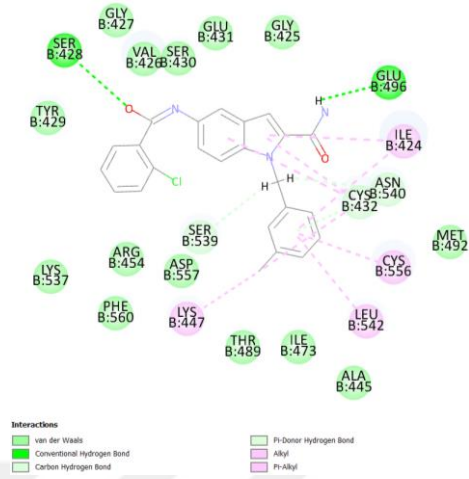


Ek Şekil 2'nin devamı.

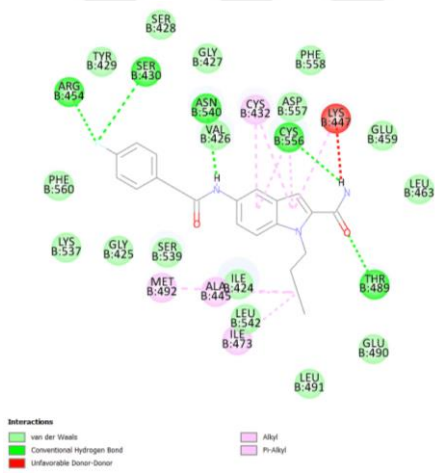
Ligand 17



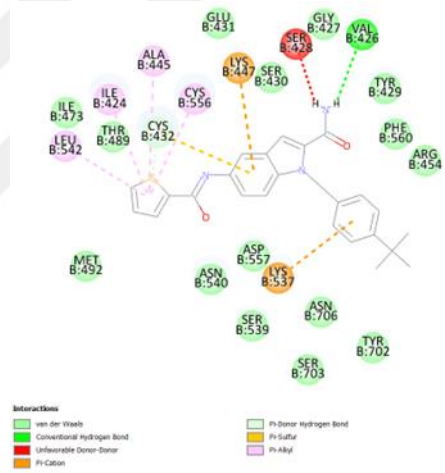
Ligand 18

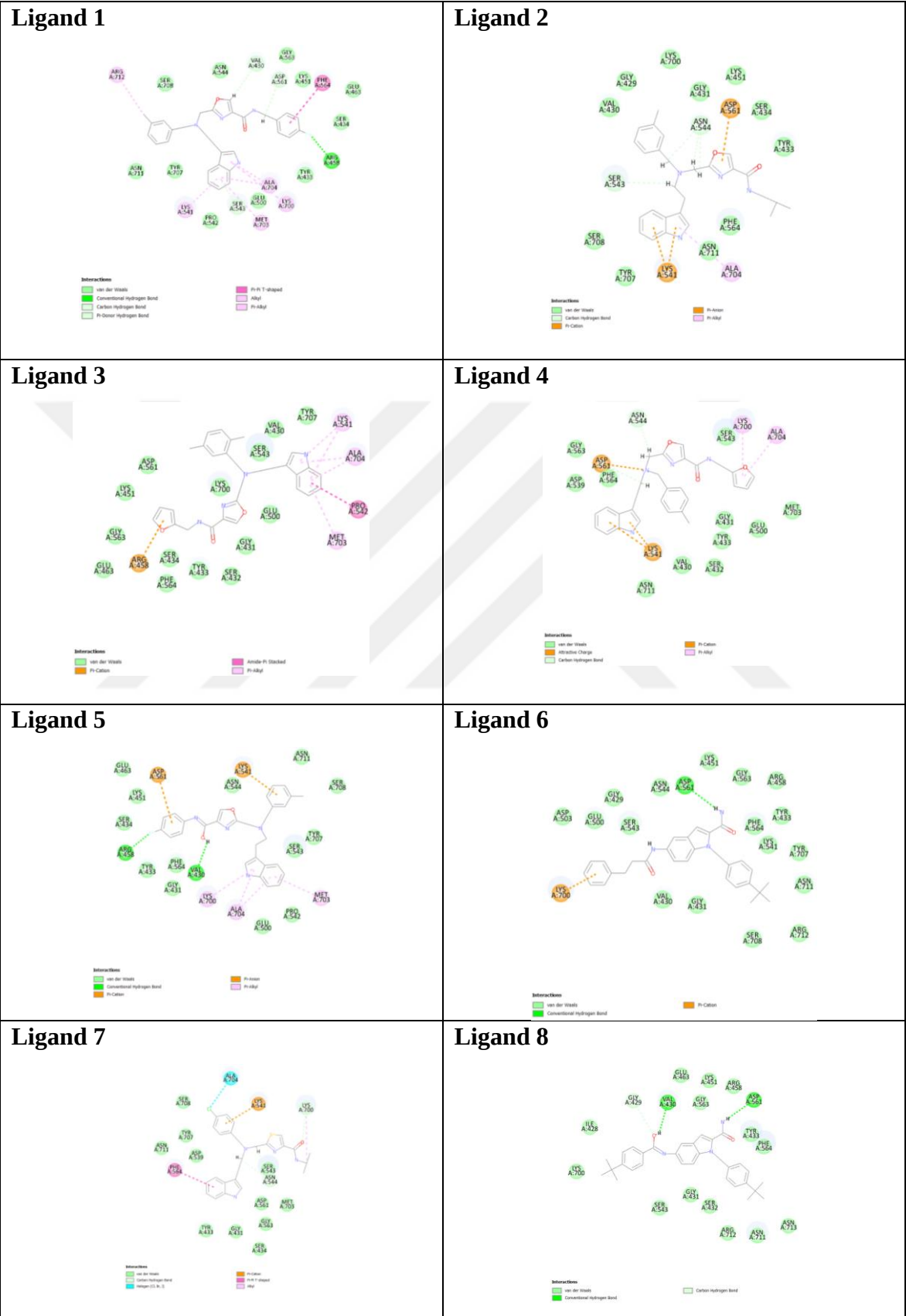


Ligand 19



Ligand 20

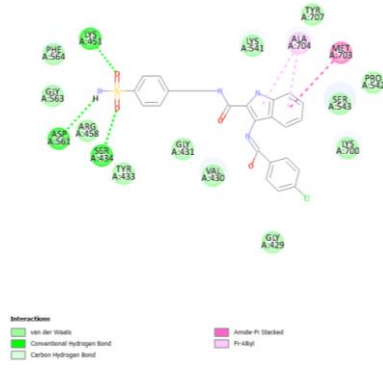




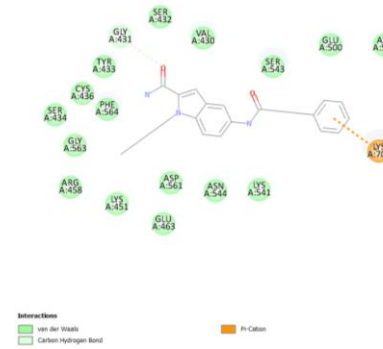
Ek Şekil 3. RSK2 (4D9T)-ligand kompleksi 2B etkileşim diyagramı (indol türevleri).

Ek Şekil 3 devamı.

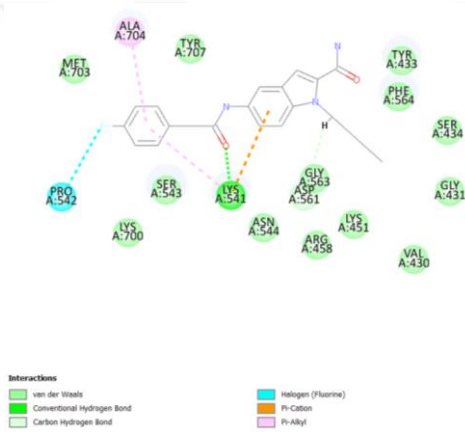
Ligand 9



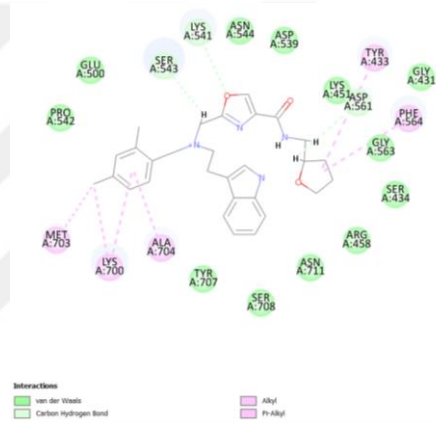
Ligand 10



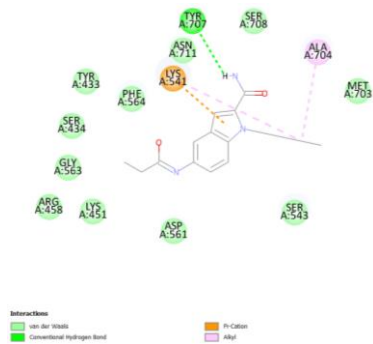
Ligand 11



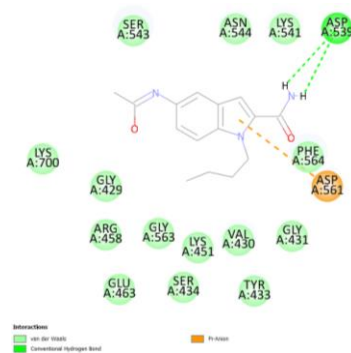
Ligand 12



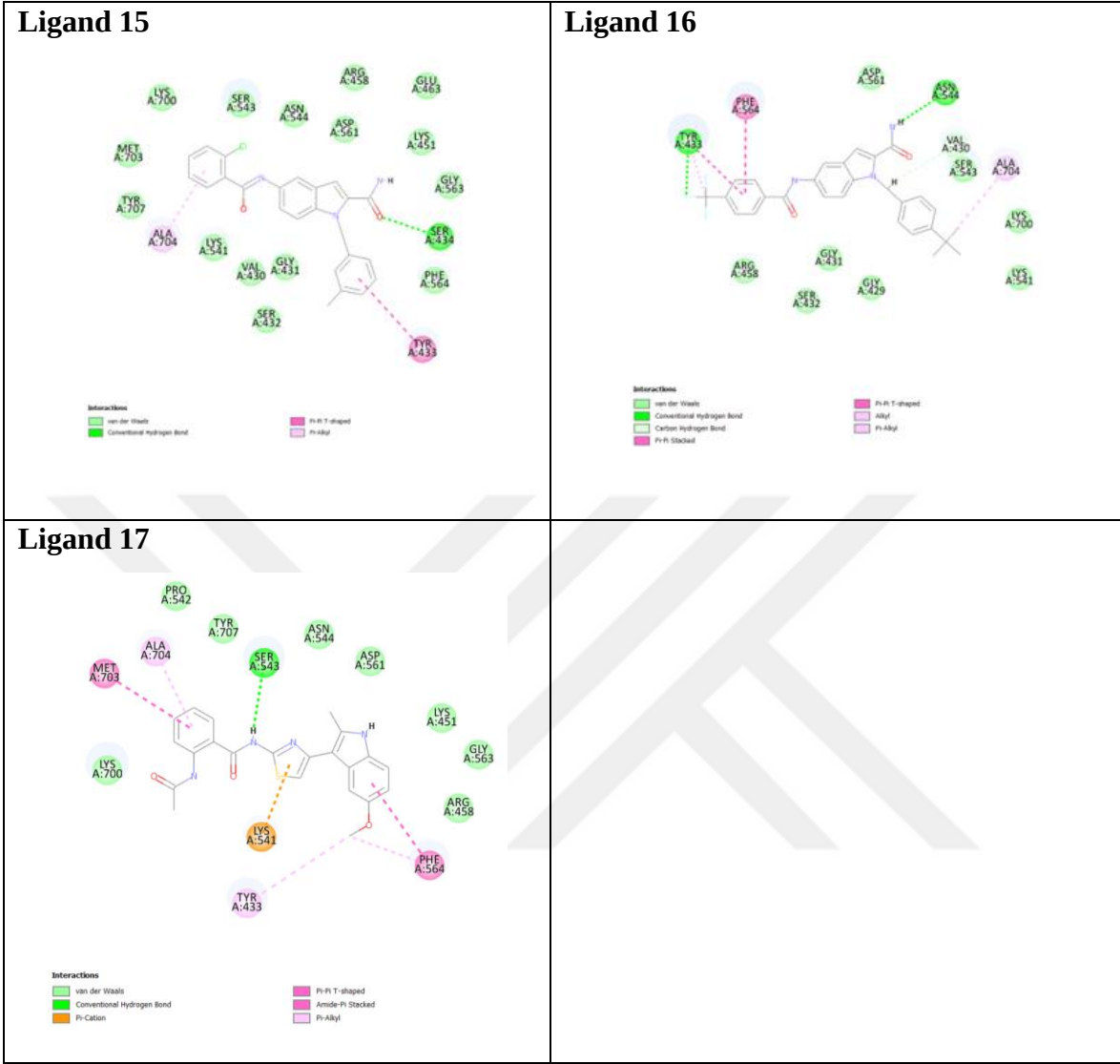
Ligand 13

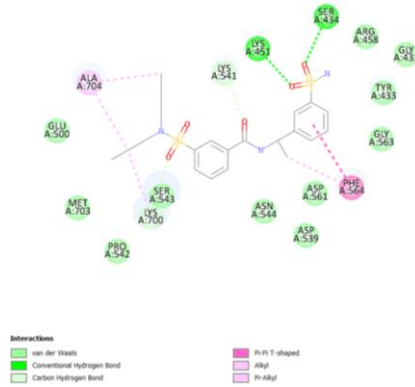
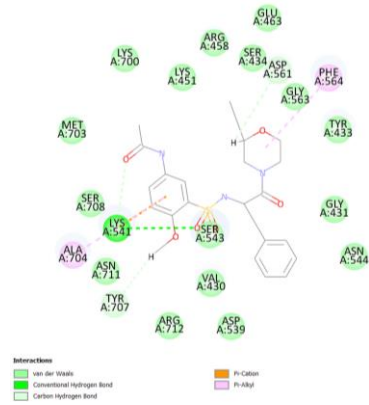
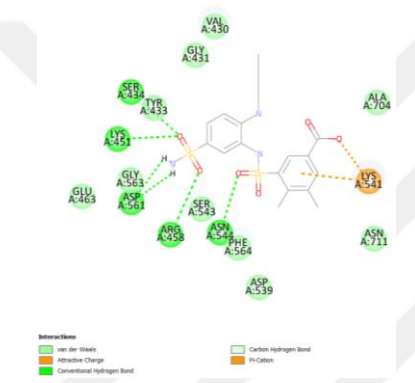
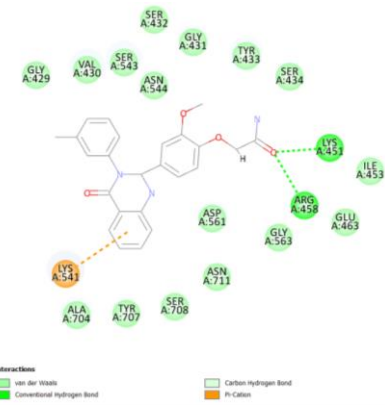
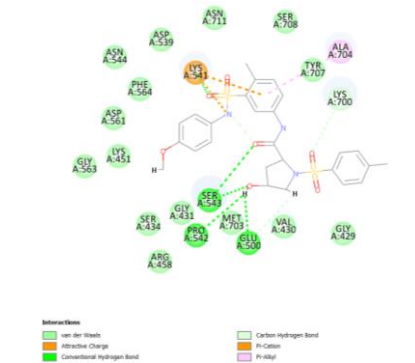
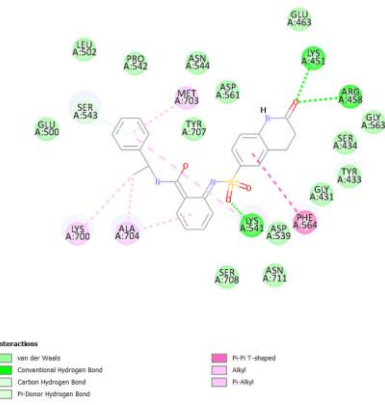


Ligand 14



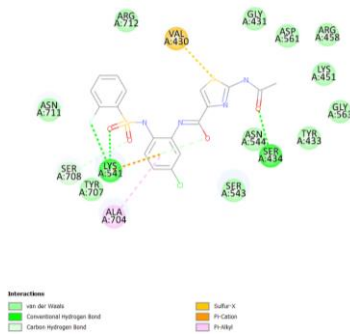
Ek Şekil 3 devamı.



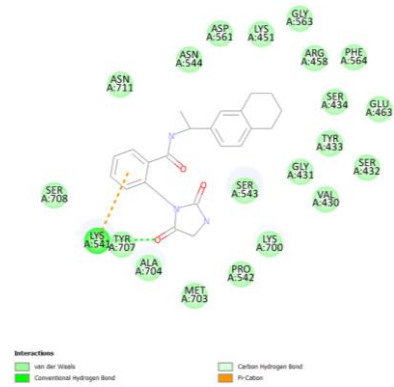
Ligand 1**Ligand 2****Ligand 3****Ligand 4****Ligand 5****Ligand 6****Ek Şekil 4. RSK2 (4D9T)-ligand kompleksi 2B etkileşim diyagramı (protein mimetics).**

Ek Şekil 4'ün devamı.

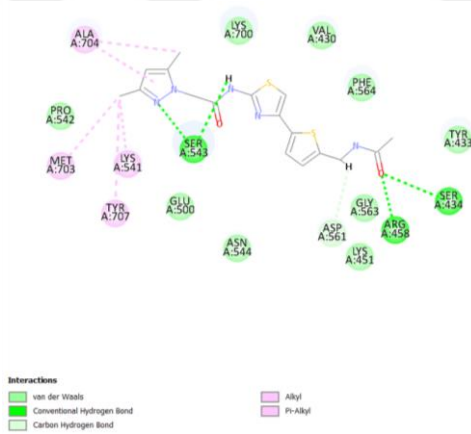
Ligand 7



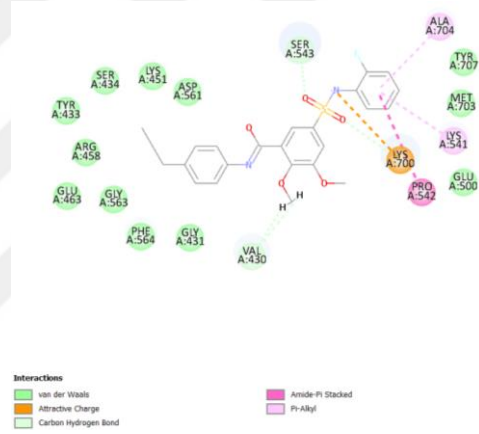
Ligand 8



Ligand 9



Ligand 10



Ligand 11

