



**HEDEFE DAYALI SANAL TARAMA YÖNTEMLERİ  
İLE YENİ ALLOSTERİK SHP-2 İNHİBİTÖR  
ADAYLARININ KEŞFİ VE BİYOLOJİK  
ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Mine İSAOĞLU**

**Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE**

**Doktora Tezi**

**Kimya Ana Bilim Dalı**

**2022**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANA BİLİM DALI

**HEDEFE DAYALI SANAL TARAMA YÖNTEMLERİ İLE YENİ ALLOSTERİK  
SHP-2 İNHİBİTÖR ADAYLARININ KEŞFİ VE BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

(Discovery of Novel Allosteric SHP-2 Inhibitor Candidates by Structure-Based Virtual  
Screening Methods and Investigation of Their Biological Activities)

DOKTORA TEZİ

Mine İSAOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Erzurum  
Ağustos, 2022

## KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Mine İSAOĞLU tarafından hazırlanan “*Hedefe Dayalı Sanal Tarama Yöntemleri İle Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitör Adaylarının Keşfi ve Biyolojik Etkinliklerinin Araştırılması*” başlıklı çalışması 08 / 08 / 2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, Kimya Bilim Dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

|               |                                                                         |                      |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Jüri Başkanı: | Prof. Dr. Öztekin ALGÜL<br><i>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi</i> | Aslı Islak İmzalıdır |
| Danışman:     | Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                 | Aslı Islak İmzalıdır |
| Jüri Üyesi:   | Prof. Dr. Murat GÜNEY<br><i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>         | Aslı Islak İmzalıdır |
| Jüri Üyesi:   | Prof. Dr. Hasan SEÇEN<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                    | Aslı Islak İmzalıdır |
| Jüri Üyesi:   | Prof. Dr. Harun BUDAK<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                    | Aslı Islak İmzalıdır |

Enstitü Yönetim Kurulunun  
.../.../.... tarih ve ..... sayılı  
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

**Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN**

**Enstitü Müdürü**

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma YÖK, TÜBİTAK ve BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı

Proje No: TÜBİTAK 2211/A Yurt İçi Doktora Genel Burs Programı

Proje No: TÜBİTAK 120Z828

Proje No: Atatürk Üniversitesi BAP FHD\_2022\_10235

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında sunulan “Hedefe Dayalı Sanal Tarama Yöntemleri İle Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitör Adaylarının Keşfi ve Biyolojik Etkinliklerinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

| Tez Bölümleri                   | Tezin Benzerlik Oranı (%) | Maksimum Oran (%) |
|---------------------------------|---------------------------|-------------------|
| Giriş                           | 7                         | 30                |
| Kuramsal Temeller               | 3                         | 30                |
| Materyal ve Metot               | 13                        | 35                |
| Araştırma Bulguları ve Tartışma | 3                         | 20                |
| Sonuçlar ve Öneriler            | 0                         | 20                |
| Tezin Geneli                    | 5                         | 25                |

**Not:** Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

| Tez Yazarı (Öğrenci)        | Tez Danışmanı               |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Mine İSAOĞLU                | Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE    |
| 16.8.2022                   | 16.8.2022                   |
| İmza: Aslı Islak İmzalıdır. | İmza: Aslı Islak İmzalıdır. |

\* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun ....../....../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun ....../....../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji, Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) Hücre Kültürü ve Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Hesaplamalı Biyoloji ve Moleküler Simülasyonlar Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı, TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı (Proje No: 120Z828), Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: FHD\_2022\_10235) ve Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı 2211/A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programıyla TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı; YÖK, TÜBİTAK ve Atatürk Üniversitesi'ne,

Çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirgemeyen, bana göstermiş olduğu anlayış, yardım ve yönlendirmelerinden dolayı saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE ve Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a,

Tezin hazırlanması aşamasında Tez İzleme Komitesi olarak altı aylık periyotlarla mevcut çalışmalarımı değerlendirip eleştiri ve önerileriyle katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Hasan SEÇEN ve Sayın Prof. Dr. Harun BUDAK'a, doktora eğitimimin başından itibaren her konuda rahatlıkla danıştığım, manevi desteğiyle de yanımda olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI ve Mahmut Kağan KARADAYI'ya, bilgisayar destekli ilaç molekülü tasarım ve geliştirme çalışmaları sırasında fikirlerinden istifade ettiğim, yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Serdar DURDAĞI ve ekibine, hücre kültürü çalışmalarının bir kısmının gerçekleşmesi ve deneylerin yürütülmesinde koordinasyonu sağlayan, laboratuvar imkanlarını sunan Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU ve ekibine, antiproliferatif aktivite çalışmalarını tamamlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e,

Ayrıca ilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burak ALAYLAR, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Selma SEZEN, Sayın Uzm. Biyolog Selin DOĞAN ve Sayın Uzm. Biyolog Taha Yasin KOÇ'a,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora tez çalışmamda da bana verdikleri destek ve gösterdikleri özveri için sevgili annem Sadife İSAOĞLU ve babam Yüksel İSAOĞLU'na,

Teşekkürlerimi sunarım.

Mine İSAOĞLU

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

#### HEDEFE DAYALI SANAL TARAMA YÖNTEMLERİ İLE YENİ ALLOSTERİK SHP-2 İNHİBİTÖR ADAYLARININ KEŞFİ VE BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mine İSAOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

**Amaç:** Bu çalışmada, potansiyel antikanser ajanlar olarak yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerinin *in silico* ilaç tasarım teknikleriyle modellenmesi ve bunlar arasından bazı doğal bileşiklerin *in vitro* biyolojik etkilerinin literatürde ilk kez araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışma iki temel aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, 250,000’den fazla kimyasal yapı içeren Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) kütüphanesinden “3 adet doğal peptit”, yapı ve ligant temelli ilaç tasarımı tekniklerinin bir arada uygulandığı çok adımlı tarama ve filtreleme yaklaşımları kullanılarak yeni potansiyel allosterik inhibitörler olarak tanımlanmıştır. İkinci aşamada ise *in vitro* testler kapsamında bu bileşiklerin SHP-2 inhibisyon aktiviteleri, 24, 48 ve 72. saatlerde MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki selektif sitotoksik-antiproliferatif etkileri ve genotoksik özellikleri belirlenmiştir.

**Bulgular:** Çalışma sonucunda, yeni allosterik inhibitör adayları 0,021-1,329  $\mu$ M aralığındaki IC<sub>50</sub> değerleriyle SHP-2’nin enzimatik aktivitesini inhibe etmiştir. NSC523374 (*L*-histidil-*L*-histidin; H-His-His-OH) (IC<sub>50</sub>: 1,83  $\mu$ M ve SI<sub>2</sub> 134,3) ve NSC374121 (*L*-histidil-*L*- tirozin; H-His-Tyr-OH) (IC<sub>50</sub>: 6,13  $\mu$ M ve SI: 3,7)’in 48. saatte MCF-7 hücrelerine karşı çok güçlü ve seçici bir sitotoksik-antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin en yüksek uygulama dozunda dahi genotoksik etkilerinin olmadığı ortaya konulmuştur.

**Sonuç:** Çalışmada elde edilen bulgular, bu araştırma kapsamında yeni ve güçlü allosterik SHP-2 inhibitörleri olarak rapor edilen imidazol içeren doğal kaynaklı dipeptitlerin, SHP-2 aşırı eksprese eden meme kanserinin tedavisi için umut verici antikanser ilaç adayları olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** SHP-2 inhibitörleri, allosterik modülasyon, meme kanseri, yapı temelli sanal tarama, ikili qsar modelleri, doğal kaynaklı peptitler

Ağustos 2022, 261 sayfa

## ABSTRACT

### DOCTORAL DISSERTATION

#### DISCOVERY OF NOVEL ALLOSTERIC SHP-2 INHIBITOR CANDIDATES BY STRUCTURE-BASED VIRTUAL SCREENING METHODS AND INVESTIGATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES

Mine İSAOĞLU

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

**Purpose:** In this study, it was aimed to model novel allosteric SHP-2 inhibitors as potential anticancer agents by *in silico* drug design techniques and to investigate *in vitro* biological effects of some natural compounds among them for the first time in the literature.

**Method:** The study consists of two main stages. In the first stage, “3 natural peptides” from the National Cancer Institute (NCI) library containing more than 250.000 chemical structures were identified as novel potential allosteric inhibitors using multi-step screening and filtering approaches in which structure- and ligand-based drug design techniques were applied together. In the second stage, SHP-2 inhibitory activities, selective cytotoxic-antiproliferative effects on MCF-7 breast cancer cells at 24, 48 and 72 hours, and genotoxic properties of these compounds were determined within the scope of *in vitro* assays.

**Findings:** As a result of the study, novel allosteric inhibitor candidates inhibited the enzymatic activity of SHP-2 with IC<sub>50</sub> values in the range of 0.021-1.329 µM. NSC523374 (*L*-histidyl-*L*-histidine; H-His-His-OH) (IC<sub>50</sub>: 1.83 µM and SI ≥ 134.3) and NSC374121 (*L*-histidyl-*L*-tyrosine; H-His-Tyr-OH) (IC<sub>50</sub>: 6.13 µM and SI: 3.7) were determined to have a highly potent and selective cytotoxic-antiproliferative effect against MCF-7 cells at 48 hours. Additionally, it has been demonstrated that these compounds do not have genotoxic effects even at the highest application dose.

**Results:** The findings of the study indicate that imidazole-containing dipeptides of natural origin, which are reported as novel and potent allosteric SHP-2 inhibitors within the scope of this research, may be promising anticancer drug candidates for the treatment of SHP-2-overexpressing breast cancer.

**Keywords:** SHP-2 inhibitors, allosteric modulation, breast cancer, structure-based virtual screening, binary qsar models, peptide natural products

August 2022, 261 pages

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                    |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....                                                                        | i    |
| ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....                                                         | ii   |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                     | iii  |
| ÖZET .....                                                                                         | iv   |
| ABSTRACT .....                                                                                     | v    |
| TABLolar DİZİNİ.....                                                                               | x    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                              | xii  |
| KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....                                                                | xvii |
| GİRİŞ.....                                                                                         | 1    |
| KURAMSAL TEMELLER.....                                                                             | 10   |
| Kanser .....                                                                                       | 10   |
| Tanımı ve epidemiyolojisi .....                                                                    | 10   |
| Kanser oluşumuna etki eden faktörler.....                                                          | 12   |
| Meme Kanseri .....                                                                                 | 14   |
| Tanımı .....                                                                                       | 14   |
| Epidemiyolojisi .....                                                                              | 15   |
| Meme kanseri araştırmalarında kullanılan hücre hatları .....                                       | 15   |
| Kanserle ilişkili Önemli HücreseL Düzenleyici Mekanizmalar: Fosforilasyon ve Defosforilasyon ..... | 19   |
| Kanser Gelişiminde PTF Enzim Ailesinin Rolü .....                                                  | 22   |
| SH2 Domaini ve SHP-2 Enziminin Yapısı ile Mekanizması.....                                         | 25   |
| Kanserde SHP-2 Enziminin Hedeflenmesi .....                                                        | 26   |
| SHP-2'nin İnhibisyonuna Yönelik Antikanser İlaç Geliştirme Çabaları.....                           | 29   |
| Allosterik Modülasyonun İlaç Keşif ve Geliştirme Sürecine Etkisi .....                             | 33   |
| Antikanser Ajanlar Olarak Doğal Ürünler .....                                                      | 36   |
| Peptit Yapısındaki Moleküllerin Olası Antikanser Etkinlikleri .....                                | 42   |
| Yeni Öncü İlaç Moleküllerinin Tanımlanmasında Kullanılan BDİT Yöntemleri .....                     | 45   |
| Yapı temelli ilaç tasarımı .....                                                                   | 49   |
| Ligant temelli ilaç tasarımı .....                                                                 | 60   |
| <i>In Vitro</i> Biyoaktivite Araştırmaları .....                                                   | 64   |
| SHP-2 enzim inhibisyonu testi.....                                                                 | 64   |

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Seçici antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi .....                                  | 66  |
| Genotoksik özelliklerin belirlenmesi .....                                                          | 70  |
| MATERYAL VE METOT .....                                                                             | 75  |
| Materyal .....                                                                                      | 75  |
| Biyolojik analizler için seçilen yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları ve SHP099'un temini ..... | 75  |
| Çalışmada kullanılan hücre hatlarının temini .....                                                  | 75  |
| Çalışmada kullanılan mutant maya suşunun temini .....                                               | 76  |
| Çalışmada kullanılan kimyasalların temin edilmesi .....                                             | 76  |
| Çalışmada kullanılan fosfataz aktivitesi ölçüm kitinin temini .....                                 | 77  |
| Çalışmada kullanılan laboratuvar malzemeleri .....                                                  | 77  |
| Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar .....                                                         | 78  |
| Çalışmada kullanılan çözeltiler ve besiyerlerinin hazırlanması .....                                | 79  |
| Metot .....                                                                                         | 87  |
| Bilgisayar destekli ilaç tasarım çalışmaları .....                                                  | 87  |
| <i>İn vitro</i> biyoaktivite araştırmaları .....                                                    | 94  |
| MTT analizi .....                                                                                   | 100 |
| Mutajenite araştırmalarında kullanılan mutant maya suşunun genetik özelliklerinin kontrolü .....    | 101 |
| <i>S. cerevisiae</i> RS112 test suşunun muhafaza edilmesi ve gecelik kültürlerin hazırlanması ..... | 103 |
| Maya DEL testi sonuçlarının değerlendirilmesi .....                                                 | 106 |
| ARAŞTIRMA BULGULARI .....                                                                           | 107 |
| Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Çalışmaları .....                                                  | 107 |
| Moleküler docking protokolünün validasyonu .....                                                    | 107 |
| Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları .....                                                    | 108 |
| MC <sup>TM</sup> /MD <sup>TM</sup> uygulamaları .....                                               | 125 |
| MD simülasyonları .....                                                                             | 126 |
| MM/PBSA hesaplamaları .....                                                                         | 138 |
| <i>İn Vitro</i> Biyoaktivite Araştırmaları .....                                                    | 139 |
| SHP-2 enzim inhibisyonu testi .....                                                                 | 139 |
| SHP-2 inhibitör aktivitelerinin tayini .....                                                        | 139 |
| MTT testi vasıtasıyla seçici antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi .....            | 142 |
| Maya DEL test sistemi ile genotoksik özelliklerin tayini .....                                      | 148 |

|                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi .....                                | 149 |
| Yeni SHP-2 allosterik inhibitörleri ve SHP099'un mutajenik özellikleri.....                                                  | 150 |
| TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                                                      | 153 |
| Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Çalışmaları .....                                                                           | 153 |
| Protein üzerindeki allosterik bağlanma bölgesinin değerlendirilmesi .....                                                    | 154 |
| Moleküler docking protokolünün validasyonu .....                                                                             | 155 |
| Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları.....                                                                              | 156 |
| MC <sup>TM</sup> /MD <sup>TM</sup> uygulamaları.....                                                                         | 164 |
| MD simülasyonları.....                                                                                                       | 168 |
| MM/PBSA hesaplamaları .....                                                                                                  | 172 |
| <i>İn Vitro</i> Biyoaktivite Araştırmaları .....                                                                             | 174 |
| SHP-2 enzim inhibisyonu testi.....                                                                                           | 174 |
| MTT testi vasıtasıyla seçici antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi.....                                      | 176 |
| Maya DEL test sistemi ile genotoksik özelliklerin tayini .....                                                               | 181 |
| KAYNAKLAR.....                                                                                                               | 184 |
| EKLER .....                                                                                                                  | 222 |
| EK 1. Yeni SHP-2 Allosterik İnhibitör Adayları ve SHP099'un SHP-2 <sup>WT</sup> 'ye Karşı Ortalama % Enzim Aktiviteleri..... | 222 |
| EK 2. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-His-OH'nin 24. Saatte MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....    | 223 |
| EK 3. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-His-OH'nin 48. Saatte MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....    | 224 |
| EK 4. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-His-OH'nin 72. Saatte MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....    | 224 |
| EK 5. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-Trp-Trp-OH'nin 24. Saatte MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....    | 225 |
| EK 6. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-Trp-Trp-OH'nin 48. Saatte MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....    | 225 |
| EK 7. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-Trp-Trp-OH'nin 72. Saatte MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....    | 226 |
| EK 8. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-Tyr-OH'nin 24. Saatte MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....    | 226 |
| EK 9. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-Tyr-OH'nin 48. Saatte MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....    | 227 |

|                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| EK 10. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-Tyr-OH'nin 72. Saatte<br>MCF-7 Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi.....   | 227 |
| EK 11. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-His-OH'nin 24. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 228 |
| EK 12. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-His-OH'nin 48. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 228 |
| EK 13. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-His-OH'nin 72. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 229 |
| EK 14. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-Trp-Trp-OH'nin 24. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 229 |
| EK 15. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-Trp-Trp-OH'nin 48. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 230 |
| EK 16. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-Trp-Trp-OH'nin 72. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 230 |
| EK 17. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-Tyr-OH'nin 24. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 231 |
| EK 18. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-Tyr-OH'nin 48. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 231 |
| EK 19. 0,015-245,76 µM Konsantrasyonlarda H-His-Tyr-OH'nin 72. Saatte<br>MCF10A Hücre Hattına Karşı Sitotoksik Aktivitesi ..... | 232 |
| EK 20. Yeni SHP-2 Allosterik İnhibitörleri ve SHP099'un Maya DEL Mutajenite<br>Testi Sonuçları .....                            | 233 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                                                   | 235 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Değişik Türde Kanserler İçin Üç Grup Risk Faktörü Örnekleri .....                                                                                                                                                        | 12 |
| <b>Tablo 2.</b> MCF10A ve MCF-7 Hücre Hatlarının Moleküler Bilgileri, Kültür Koşulları ve Köken Aldıkları Tümörlerin Klinik Özellikleri .....                                                                                            | 18 |
| <b>Tablo 3.</b> SHP-2 Enziminin İnsan Hastalıklarıyla Olan İlişkisi .....                                                                                                                                                                | 28 |
| <b>Tablo 4.</b> Kanser Tedavisi İçin Klinikte Güncel Olarak Geliştirilmekte Olan SHP-2 İnhibitörü Bazlı Terapötikler .....                                                                                                               | 32 |
| <b>Tablo 5.</b> Bazı Doğal Ajanlar ve Bu Ajanların Etki Mekanizmaları Kullanılarak Gerçekleştirilen <i>İn Vitro</i> ve <i>İn Vivo</i> Çalışmalar .....                                                                                   | 39 |
| <b>Tablo 6.</b> Bilgisayar Destekli İlaç Keşif Araçları Sayesinde Tanımlanan Klinik Olarak Onaylanmış İlaç Molekülleri .....                                                                                                             | 47 |
| <b>Tablo 7.</b> Docking Tabanlı ST Teknikleri Kullanılarak Elde Edilen Antikanser Öncü Molekül Örnekleri .....                                                                                                                           | 51 |
| <b>Tablo 8.</b> Çalışmada Biyoaktiviteleri <i>İn Vitro</i> Değerlendirilen Bileşiklerin CAS (Chemical Abstracts Service; Kimyasal Soyut Servisi) Kayıt Numaraları, Saflık Yüzdeleri ve Saflık Tayininde Kullanılan Yöntemler .....       | 75 |
| <b>Tablo 9.</b> Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Tipi ve Özellikleri .....                                                                                                                                                                | 76 |
| <b>Tablo 10.</b> Çalışmalar Sırasında Kullanılan Kimyasallar .....                                                                                                                                                                       | 76 |
| <b>Tablo 11.</b> Çalışmalarda Kullanılan Cam ve Plastik Malzemeler .....                                                                                                                                                                 | 77 |
| <b>Tablo 12.</b> Çalışmalarda Kullanılan Alet ve Cihazlar .....                                                                                                                                                                          | 78 |
| <b>Tablo 13.</b> MCT <sup>TM</sup> /MD <sup>TM</sup> Aracında Yapılan <i>İn Silico</i> Toksisite Profili Tahminlerinde Kullanılan İkili QSAR Modellerinin Tanımlanması ve Kesme Değerleri .....                                          | 91 |
| <b>Tablo 14.</b> Enzim ve İnhibitör Adaylarının Birlikte İnkübasyon İşleminde Pozitif Kontrol, Negatif (Kör) Kontrol ve Test Örneği Olarak Belirlenen Kuyucuklara Eklenmesi Gereken Bileşen Miktarları .....                             | 95 |
| <b>Tablo 15.</b> SHP-2 Enzim İnhibisyonu Deneyinde Test Bileşikleri İçin Belirlenen Uygulama Konsantrasyonları ve Bu Konsantrasyon Değerlerini Elde Etmede İlgili Kuyucuklara Eklenmesi Gereken Çalışma Çözeltisi ve DMSO Miktarları ... | 96 |
| <b>Tablo 16.</b> “İnhibitör Blank” Olarak İşaretli Kuyucuklara Eklenmesi Gereken Bileşen Miktarları .....                                                                                                                                | 97 |

|                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tablo 17.</b> Maya DEL Mutajenite Deneyinde Pozitif Kontrol, Negatif Kontrol ve Deney Gruplarının Hazırlanması.....                                                                                                                   | 105 |
| <b>Tablo 18.</b> Ko-kristalize Ligant SHP099'un Doğal Bağlanma Pozu ve Glide Yeniden Kenetlenme Pozları Arasında Hesaplanan RMSD Değerleri .....                                                                                         | 107 |
| <b>Tablo 19.</b> Glide/Prime IFD Metoduyla SHP-2'nin Allosterik Cebindeki Kritik Amino Asit Rezidüleriyle Birinci veya İkinci Pozda Etkileştiği Belirlenen 28 Adet Hit Ligant ve SHP099'un 2D Temsilleri ve Glide Docking Sonuçları..... | 109 |
| <b>Tablo 20.</b> Moleküler Docking Çalışmalarının Son Aşamasında Glide/Prime IFD Metoduyla Seçilen 28 Hit Bileşik ve SHP099 İçin SHP-2'nin Allosterik Bağlanma Cebinde Tespit Edilen Protein-Ligant Etkileşimleri.....                   | 112 |
| <b>Tablo 21.</b> 22 Adet Hit Ligant ve SHP099 İçin MC <sup>TM</sup> /MD <sup>TM</sup> Platformunda Üretilen Tahmini Kanser Terapötik Aktivite ve Toksisite Değerleri Tablosu.....                                                        | 127 |
| <b>Tablo 22.</b> MC <sup>TM</sup> /MD <sup>TM</sup> Analizleri Sonucunda Belirlenen 6 Adet Hit Ligant ve SHP099'un İlaç Olma Özelliklerinin İncelenmesi.....                                                                             | 130 |
| <b>Tablo 23.</b> 50 ns Simülasyon Süresi Boyunca Apo ve Holo Formlardaki SHP-2'nin A Zincirindeki Ca Atomlarının ve Ayrıca Holo Formlarda Ligantların Ortalama RMSD Değerleri .....                                                      | 132 |
| <b>Tablo 24.</b> 50 ns Simülasyon Süresi Boyunca SHP-2'nin A Zincirine ve A Zincirindeki C-SH2 Domaininde Bulunan Amino Asit Kalıntılarına Ait Ca Atomları İçin Hesaplanan Ortalama RMSF Değerleri .....                                 | 133 |
| <b>Tablo 25.</b> Apo ve Holo Formlarda Farklı SHP-2 Sistemlerine Ait Altı Bölgenin Ca Atomları İçin Hesaplanan Ortalama RMSF Değerleri.....                                                                                              | 134 |
| <b>Tablo 26.</b> SHP2-Ligant Kompleksleri İçin MD Simülasyonlarından Hesaplanan Ortalama MM/PBSA Bağlanma Serbest Enerjileri .....                                                                                                       | 138 |
| <b>Tablo 27.</b> SHP-2 Enzim Aktivitesi Ölçüm Deneylerinde Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitör Adayları ve SHP099 İçin Tayin Edilen SHP-2 IC <sub>50</sub> Değerleri .....                                                                   | 142 |
| <b>Tablo 28.</b> Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitörleriyle Muamele Edilen MCF-7 Hücrelerinin 24, 48 ve 72 Saatlik İnkübasyon Periyodunda IC <sub>50</sub> Değerleri .....                                                                   | 145 |
| <b>Tablo 29.</b> Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitörlerinin Uygulandığı MCF10A Hücre Hattında MTT Canlılık Testi Sonuçlarına Göre IC <sub>50</sub> Değerleri .....                                                                           | 146 |
| <b>Tablo 30.</b> Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitörlerinin MCF-7 Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi İçin Hesaplanan SI Değerleri .....                                                                                                        | 148 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Erkeklerde ve kadınlarda en sık rastlanan ilk 10 kanser türünün yaşa göre standartlaştırılmış (Dünya) insidans oranları .....                                                                                                       | 16 |
| <b>Şekil 2.</b> Erkeklerde ve kadınlarda en sık rastlanan ilk 10 kanser türünün yaşa göre standartlaştırılmış (Dünya) mortalite oranları .....                                                                                                      | 16 |
| <b>Şekil 3.</b> MCF10A hücre hattının mikroskoptaki görünümü.....                                                                                                                                                                                   | 18 |
| <b>Şekil 4.</b> MCF-7 hücre hattının mikroskoptaki görünümü .....                                                                                                                                                                                   | 19 |
| <b>Şekil 5.</b> Bir memeli hücresi içindeki PTM'ler .....                                                                                                                                                                                           | 20 |
| <b>Şekil 6.</b> Kinazlar ve fosfatazlarla katalizlenen fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonları .....                                                                                                                                         | 21 |
| <b>Şekil 7.</b> Fosfosinyalizasyon ağı .....                                                                                                                                                                                                        | 22 |
| <b>Şekil 8.</b> Kanserde PTF'ler tarafından düzenlenen sinyalizasyon yollarına genel bir şematik bakış .....                                                                                                                                        | 23 |
| <b>Şekil 9.</b> PTF enzimlerinin hücre içi lokalizasyonu ve regülasyonunun şematik bir gösterimi .....                                                                                                                                              | 25 |
| <b>Şekil 10.</b> SHP-2 enzimine ait N-SH2, C-SH2 ve PTF domainlerinin açık konformasyondaki yerleşimi .....                                                                                                                                         | 26 |
| <b>Şekil 11.</b> SHP-2'nin kapalı (inaktif) ve açık (aktif) biçimlerinin şematik gösterimi .....                                                                                                                                                    | 26 |
| <b>Şekil 12.</b> Birkaç farklı sinyalizasyon yolağının aktivasyonunda SHP-2'nin rolü.....                                                                                                                                                           | 28 |
| <b>Şekil 13.</b> SHP-2'nin katalitik ve allosterik bölgelerini hedefleyen bazı inhibitörlerin molekül yapıları ve IC <sub>50</sub> inhibitör konsantrasyonu değerleri .....                                                                         | 31 |
| <b>Şekil 14.</b> Allosterik inhibitör SHP099'un domainler arasındaki bir ara yüzeye eş zamanlı olarak bağlanması ve SHP-2 <sup>WT</sup> 'yi (Protein Veri Bankası (Protein Data Bank; PDB) kodu: 5EHR) inaktif bir konformasyonda kilitlemesi ..... | 31 |
| <b>Şekil 15.</b> Allosterinin tarihi .....                                                                                                                                                                                                          | 34 |
| <b>Şekil 16.</b> Allosterik regülasyonun şematik temsili .....                                                                                                                                                                                      | 35 |
| <b>Şekil 17.</b> Yeni onaylanmış tüm ilaçlar (01/01/1981-30/09/2019).....                                                                                                                                                                           | 37 |
| <b>Şekil 18.</b> 2020 yılında FDA tarafından onaylanan ilaçların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.....                                                                                                                                    | 38 |
| <b>Şekil 19.</b> Bakterilerden elde edilen bazı doğal biyoaktif bileşikler.....                                                                                                                                                                     | 39 |
| <b>Şekil 20.</b> Son 22 yılda SCI kapsamında yayınlanan “meme kanseri tedavisinde kullanım potansiyeli araştırılan doğal ürünler” konulu makaleler .....                                                                                            | 41 |

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 21.</b> <i>M. Genitalium</i> 'un elektron mikroskopuyla elde edilmiş görüntüsü.....                                                                                     | 42  |
| <b>Şekil 22.</b> 2016 yılı ve sonrasında farklı terapötik alanlar için onay almış ve aktif olarak geliştirilmekte olan peptitler.....                                            | 43  |
| <b>Şekil 23.</b> Reverse farmakoloji yaklaşımıyla ilaç keşif ve geliştirme sürecinde tarama testlerine genel bir bakış.....                                                      | 48  |
| <b>Şekil 24.</b> BDİT sürecinde temsili iş akış şeması .....                                                                                                                     | 49  |
| <b>Şekil 25.</b> SHP-2 <sup>WT</sup> enziminin X-ışını kristallografisi yöntemiyle elde edilen 3D yapısı.....                                                                    | 50  |
| <b>Şekil 26.</b> Bir küçük molekül kütüphanesinde ST sürecini ifade eden iş akış şeması.....                                                                                     | 52  |
| <b>Şekil 27.</b> Son 22 yılda SCI kapsamında yayınlanan “SBVS” ve “moleküler docking” tekniklerinin bir arada kullanıldığı makaleler .....                                       | 54  |
| <b>Şekil 28.</b> Moleküler düzeyde protein-ligant (ilaç) etkileşimleri ve biyolojik yanıt oluşumu .....                                                                          | 54  |
| <b>Şekil 29.</b> SHP-2'nin bir bisfosfotirozil peptidiyle açık (aktif bölge serbest) ve kapalı (aktif bölge bloke edilmiş) konformasyonları arasındaki denge durumu.....         | 65  |
| <b>Şekil 30.</b> Fosfataz aktivitesini ölçen DiFMUP analizi .....                                                                                                                | 66  |
| <b>Şekil 31.</b> Günümüzde kanserin bilinen 10 temel ayırt edici özelliği.....                                                                                                   | 67  |
| <b>Şekil 32.</b> MTT testinde canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucunda ortamda meydana gelen renk değişiminin izlenmesi.....                                            | 69  |
| <b>Şekil 33.</b> Tetrazolyum halkası içeren sarı renkli çözeltide indirgenme reaksiyonu sonucunda oluşan mor renkli formazan bileşiği.....                                       | 69  |
| <b>Şekil 34.</b> Standart genotoksikoloji bataryası .....                                                                                                                        | 72  |
| <b>Şekil 35.</b> DNA değişikliklerinin ölçümüne dayalı maya esaslı genotoksisite testleri .....                                                                                  | 73  |
| <b>Şekil 36.</b> Tam uzunluktaki SHP-2 <sup>WT</sup> 'nin aktivitesini ölçmek üzere BPS Bioscience® tarafından tasarlanmış 79330 katalog numaralı test sisteminin görüntüsü..... | 77  |
| <b>Şekil 37.</b> SHP-2 <sup>WT</sup> 'nin allosterik bağlanma bölgesinde SHP099 ligantı merkeze alınarak oluşturulan grid haritası.....                                          | 89  |
| <b>Şekil 38.</b> SHP-2 <sup>WT</sup> kristal yapısı üzerinde NCI veritabanından alınan 297,830 adet molekülün hiyerarşik tarama adımları.....                                    | 90  |
| <b>Şekil 39.</b> Glide/Prime IFD metoduyla çıktı olarak elde edilen 28 adet hit ligantın MC <sup>TM</sup> /MD <sup>TM</sup> analizlerinde izlenen prosedür .....                 | 92  |
| <b>Şekil 40.</b> Hazırlanan ana karışımın plakanın kuyucuklarına 19 µL hacimlerde olacak şekilde eklenmesi. ....                                                                 | 95  |
| <b>Şekil 41.</b> Hazırlanan mikropakanın okuyucuya yerleştirilerek 360 nm'lik bir eksitasyon dalga boyu ve 460 nm'de emisyon ile Fİ değerlerinin okunması .....                  | 96  |
| <b>Şekil 42.</b> <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunun gecelik taze kültürünün hazırlanması.....                                                                                    | 104 |

|                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 43.</b> Mutant <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunun YPAD besiyeri plağında 30 °C’de 3 günlük inkübasyon süresinin ardından canlandırılması. ....                                                                                          | 105 |
| <b>Şekil 44.</b> SHP099’un farklı Glide docking yaklaşımlarından elde edilen yeniden kenetlenme pozlarının karşılaştırılması. ....                                                                                                               | 107 |
| <b>Şekil 45.</b> Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları sonucunda tasarlanmış olan 28 adet hit bileşik için SHP-2’nin (5EHR.pdb) allosterik bölgesinde gözlemlenen protein-ligant etkileşimlerine ait 3D diyagramlar. ....                   | 122 |
| <b>Şekil 46.</b> SHP-2’nin allosterik bölgesine bağlı olan NSC523374’nün yapısı. ....                                                                                                                                                            | 123 |
| <b>Şekil 47.</b> SHP-2’nin allosterik bölgesine bağlı olan NSC374121’in yapısı. ....                                                                                                                                                             | 123 |
| <b>Şekil 48.</b> SHP-2’nin allosterik bölgesine bağlı olan NSC524592’nin yapısı. ....                                                                                                                                                            | 124 |
| <b>Şekil 49.</b> SHP-2’nin allosterik bölgesine bağlı olan SHP099’un yapısı. ....                                                                                                                                                                | 124 |
| <b>Şekil 50.</b> Apo ve holo formlarda SHP-2 proteininin A zincirindeki Ca atomlarına ait RMSD değerleri. ....                                                                                                                                   | 130 |
| <b>Şekil 51.</b> 50 ns’lik simülasyonlar süresince SHP099 ve hit ligantlar için çizilen “lig-fit-prot” grafiklerinin tek bir grafik penceresinde gösterilmesi. ....                                                                              | 131 |
| <b>Şekil 52.</b> 50 ns’lik simülasyonlar süresince SHP099 ve hit ligantlar için çizilen “lig-fit-lig” grafiklerinin tek bir grafik penceresinde gösterilmesi. ....                                                                               | 131 |
| <b>Şekil 53.</b> 50 ns’lik MD simülasyonları süresince apo formdaki, ayrıca farklı hit molekülleri ve SHP099 ile kompleks halindeki SHP-2 proteininin kristal yapısının Ca-RMSF analizi. ....                                                    | 133 |
| <b>Şekil 54.</b> 50 ns’lik simülasyon süresince SHP099 için elde edilen MD simülasyon sonuçları. ....                                                                                                                                            | 135 |
| <b>Şekil 55.</b> 50 ns’lik simülasyon süresince NSC685284 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. ....                                                                                                                            | 135 |
| <b>Şekil 56.</b> 50 ns’lik simülasyon süresince NSC524592 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. ....                                                                                                                            | 136 |
| <b>Şekil 57.</b> 50 ns’lik simülasyon süresince NSC523374 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. ....                                                                                                                            | 136 |
| <b>Şekil 58.</b> 50 ns’lik simülasyon süresince NSC374121 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. ....                                                                                                                            | 137 |
| <b>Şekil 59.</b> 50 ns’lik simülasyon süresince NSC152075 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. ....                                                                                                                            | 137 |
| <b>Şekil 60.</b> SHP099 için 0,0001-10,0 µM konsantrasyon aralığında BPS Bioscience® tarafından üretilen 79330 no.lu test kiti kullanılarak ölçülen % cinsinden SHP-2 <sup>WT</sup> enzim aktivitesi değerleriyle çizilen doz-yanıt eğrisi. .... | 139 |

|                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 61.</b> SHP099 için <i>in vitro</i> enzim inhibisyon testi sonuçları.....                                                                                                                                 | 140 |
| <b>Şekil 62.</b> H-His-Tyr-OH için <i>in vitro</i> enzim inhibisyon testi sonuçları. ....                                                                                                                          | 141 |
| <b>Şekil 63.</b> H-His-His-OH için <i>in vitro</i> enzim inhibisyon testi sonuçları. ....                                                                                                                          | 141 |
| <b>Şekil 64.</b> H-Trp-Trp-OH için <i>in vitro</i> enzim inhibisyon testi sonuçları.....                                                                                                                           | 142 |
| <b>Şekil 65.</b> 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-His-His-OH muamelesini takiben MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. ....                                     | 143 |
| <b>Şekil 66.</b> 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-Trp-Trp-OH muamelesini takiben MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. ....                                     | 144 |
| <b>Şekil 67.</b> 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-His-Tyr-OH muamelesini takiben MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. ....                                     | 145 |
| <b>Şekil 68.</b> 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-His-His-OH muamelesini takiben MCF10A hücrelerinin canlılık yüzdeleri. ....                                    | 146 |
| <b>Şekil 69.</b> 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-Trp-Trp-OH muamelesini takiben MCF10A hücrelerinin canlılık yüzdeleri. ....                                    | 147 |
| <b>Şekil 70.</b> 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-His-Tyr-OH muamelesini takiben MCF10A hücrelerinin canlılık yüzdeleri. ....                                    | 147 |
| <b>Şekil 71.</b> <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda üreme için lösin gereksinimini gösteren SCF besiyeri içeren bir plak örneği .....                                                                              | 148 |
| <b>Şekil 72.</b> <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda üreme için lösin gereksinimini gösteren SC-Leu-K besiyeri içeren bir plak örneği .....                                                                         | 148 |
| <b>Şekil 73.</b> <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda üreme için histidin gereksinimini gösteren SC-His besiyeri içeren bir plak örneği.....                                                                         | 149 |
| <b>Şekil 74.</b> <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda üreme için adenin gereksinimini gösteren SC-Ade besiyeri içeren bir plak örneği .....                                                                          | 149 |
| <b>Şekil 75.</b> 0,015-245,76 µM doz aralığında H-His-Tyr-OH'nin negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda (a) DEL ve (b) ICR tipi mutasyonlar meydana getirme sıklığı..... | 150 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 76.</b> 0,015-245,76 $\mu$ M doz aralığında H-His-His-OH'nin negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda (a) DEL ve (b) ICR tipi mutasyonlar meydana getirme sıklığı.....                                         | 151 |
| <b>Şekil 77.</b> 0,015-245,76 $\mu$ M doz aralığında H-Trp-Trp-OH'nin negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda (a) DEL ve (b) ICR tipi mutasyonlar meydana getirme sıklığı.....                                         | 151 |
| <b>Şekil 78.</b> 0,015-245,76 $\mu$ M doz aralığında SHP099'un negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında <i>S. cerevisiae</i> RS112 suşunda (a) DEL ve (b) ICR tipi mutasyonlar meydana getirme sıklığı.....                                                | 152 |
| <b>Şekil 79.</b> Bu tez kapsamında SHP-2'nin yeni potansiyel allosterik inhibitörlerinin keşfedilmesine yönelik yapı ve ligant temelli hesaplamalı tekniklerin kombine edildiği çalışmalarda kullanılan iş akış diyagramı .....                                 | 154 |
| <b>Şekil 80.</b> SHP099 ve SHP-2 <sup>WT</sup> enziminin X-ışını kristal yapısı, rezolüsyon: 1,7 Å (PDB kodu: 5EHR).....                                                                                                                                        | 155 |
| <b>Şekil 81.</b> SHP-2 <sup>WT</sup> 'nin allosterik bağlanma cebinde bulunan SHP099'un doğal bağlanma pozu ve bu bölgedeki kritik amino asit rezidüleriyle kurduğu önemli etkileşimler .....                                                                   | 155 |
| <b>Şekil 82.</b> Üç adet final hit ligant (mor renk) için üretilen Glide/Prime IFD pozlarında katyon- $\pi$ (kesikli yeşil çizgi ile ifade edilen) ve $\pi$ - $\pi$ (kesikli mavi çizgi ile ifade edilen) etkileşimlerinin 3D modeller üzerinde gösterimi. .... | 162 |
| <b>Şekil 83.</b> Çalışmada “final hit ligantlar” olarak tanımlanan ve biyolojik aktiviteleri ilk kez test edilen yeni allosterik SHP-2 inhibitör adaylarına ait molekül yapıları.....                                                                           | 174 |
| <b>Şekil 84.</b> Literatürde bilinen güçlü allosterik SHP-2 inhibitörlerinden bazılarının kimyasal yapıları .....                                                                                                                                               | 176 |

## KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

|                        |                                                                                          |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2D</b>              | : Two-Dimensional (İki Boyutlu)                                                          |
| <b>3D</b>              | : Three-Dimensional (Üç Boyutlu)                                                         |
| <b>5HT1</b>            | : 5-Hidroksitriptamin 1; Serotonin                                                       |
| <b>ACE</b>             | : Angiotensin-Converting Enzyme (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim)                         |
| <b>a.d.</b>            | : İstatistiksel Anlamlı Değil                                                            |
| <b>ade<sup>-</sup></b> | : Adenin Oksotrofu                                                                       |
| <b>ADME</b>            | : Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Eliminasyon                                       |
| <b>ADMET</b>           | : Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon ve Toksisite                            |
| <b>ALK</b>             | : Anaplastik Lenfoma Kinaz                                                               |
| <b>ANOVA</b>           | : Analysis of Variance (Varyans Analizi)                                                 |
| <b>Arg</b>             | : Arjinin                                                                                |
| <b>Asn</b>             | : Asparajin                                                                              |
| <b>Asp</b>             | : Aspartik Asit                                                                          |
| <b>ATCC</b>            | : American Type Culture Collection (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)                     |
| <b>BBSHK</b>           | : Baş-Boyun Skuamöz Hücre Karsinomu                                                      |
| <b>BDİT</b>            | : Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı                                                      |
| <b>BLA</b>             | : Biologics License Application (Biyolojik Lisans Başvurusu)                             |
| <b>BTLA</b>            | : B- and T-Lymphocyte Attenuator (B ve T Lenfosit Zayıflatıcı)                           |
| <b>CAS</b>             | : Chemical Abstracts Service (Kimyasal Soyut Servisi)                                    |
| <b>CDK</b>             | : Cyclin-Dependent Kinase (Siklin Bağımlı Kinaz)                                         |
| <b>CHARMM-GUI</b>      | : Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics Graphical User Interface                 |
| <b>ChEBI</b>           | : Chemical Entities of Biological Interest (Biyolojik Önem Arz Eden Kimyasal Varlıklar)  |
| <b>CNV</b>             | : Copy Number Variation (Kopya Sayısı Değişiklikleri)                                    |
| <b>c.o.</b>            | : Canlılık Oranı                                                                         |
| <b>CPP</b>             | : Cell-Penetrating Peptide (Hücre Penetrasyon Peptidi)                                   |
| <b>CTLA-4</b>          | : Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen-4 (Sitotoksik T-Lenfosit-İlişkili Protein-4) |
| <b>DAYTAM</b>          | : Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi                            |
| <b>DCIS</b>            | : Ductal Carcinoma In Situ (Duktal Karsinoma İn Situ)                                    |

|                        |                                                                                                |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>DEL</b>             | : Delesyon                                                                                     |
| <b>DiFMUP</b>          | : 6,8-Difloro-4-metilumbelliferil Fosfat                                                       |
| <b>DMEM</b>            | : Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri)                      |
| <b>DMSO</b>            | : Dimetilsülfoksit                                                                             |
| <b>DN</b>              | : Doğru Negatif                                                                                |
| <b>DP</b>              | : Doğru Pozitif                                                                                |
| <b>DTP</b>             | : The Developmental Therapeutics Program (Gelişimsel Tedavi Programı)                          |
| <b>DTT</b>             | : 1,4-Ditiotreitol                                                                             |
| <b>DXR</b>             | : Doxorubicin (Doksorubisin)                                                                   |
| <b>EC3</b>             | : Effective Concentration 3 (Efektif Konsantrasyon 3)                                          |
| <b>ECACC</b>           | : The European Collection of Authenticated Cell Cultures (Avrupa Hücre Kùltürleri Koleksiyonu) |
| <b>EGFR</b>            | : Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)                        |
| <b>ELP</b>             | : Elastin-Like Polypeptide (Elastin Benzeri Polipeptit)                                        |
| <b>EMS</b>             | : Etil Metan Sülfonat                                                                          |
| <b>ER</b>              | : Estrogen Receptor (Östrojen Reseptörü)                                                       |
| <b>ER+</b>             | : ER-Pozitif                                                                                   |
| <b>FBS</b>             | : Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)                                                      |
| <b>FDA</b>             | : The United States Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)               |
| <b>FI</b>              | : Fluorescence Intensity (Floresan Yoğunluk)                                                   |
| <b>Gab1</b>            | : Grb2-Associated-Binding Protein 1 (Grb2 ile İlişkili Bağlanma Proteini 1)                    |
| <b>GEF</b>             | : Guanine Nucleotide Exchange Factor (Guanin Nükleotid Değişim Faktörü)                        |
| <b>GIST</b>            | : Gastrointestinal Stromal Tümör                                                               |
| <b>Glide</b>           | : Grid-Based Ligand Docking with Energetics                                                    |
| <b>Glide/Prime IFD</b> | : Glide/Prime Induced Fit Docking (Glide/Prime İndüklenmiş Fit Yerleştirme)                    |
| <b>Glide/SP</b>        | : Glide/Standart Precision (Glide/Standart Kesinlik)                                           |
| <b>Glide/XP</b>        | : Glide/Extra Precision (Glide/Ekstra Kesinlik)                                                |
| <b>Gln</b>             | : Glutamin                                                                                     |

|                        |                                                                                                         |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GLOBOCAN</b>        | : Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence (Küresel Kanser İnsidansı, Mortalite ve Prevalansı) |
| <b>Glu</b>             | : Glutamik Asit                                                                                         |
| <b>Gly</b>             | : Glisin                                                                                                |
| <b>GROMACS</b>         | : Groningen Machine for Chemical Simulations                                                            |
| <b>HBA</b>             | : Hidrojen Bağ Akseptörü                                                                                |
| <b>HBD</b>             | : Hidrojen Bağ Donörü                                                                                   |
| <b>HCV</b>             | : Hepatit C Virüsü                                                                                      |
| <b>hEGF</b>            | : Human Epidermal Growth Factor (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü)                                        |
| <b>HER2-</b>           | : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative (İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2-Negatif) |
| <b>HIV</b>             | : Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)                                           |
| <b>His</b>             | : Histidin                                                                                              |
| <b>his<sup>-</sup></b> | : Histidin Oksotrofu                                                                                    |
| <b>his<sup>+</sup></b> | : Histidin Prototrofu                                                                                   |
| <b>HSD</b>             | : Honestly Significant Difference Test (Dürüstçe Anlamlı Fark Testi)                                    |
| <b>HTS</b>             | : High Throughput Screening (Yüksek Verimli Aktivite Tarama)                                            |
| <b>HTVS</b>            | : High Throughput Virtual Screening (Yüksek Verimli Sanal Tarama)                                       |
| <b>IARC</b>            | : The International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)            |
| <b>ICH</b>             | : The International Council for Harmonisation (Uluslararası Uyum Konseyi)                               |
| <b>ICR</b>             | : Intrachromosomal Homologous Recombination (Kromozomlar Arası Kırılma)                                 |
| <b>IκB</b>             | : Inhibitor of NF-κB (NF-κB İnhibitörü)                                                                 |
| <b>IL-8</b>            | : İnterlökin-8                                                                                          |
| <b>ILC</b>             | : Invasive Lobular Carcinoma (İnvaziv Lobüler Karsinom)                                                 |
| <b>Ile</b>             | : İzolösin                                                                                              |
| <b>IRS1</b>            | : Insulin Receptor Substrate 1 (İnsülin Reseptör Substrat 1)                                            |
| <b>İTK</b>             | : İnce Tabaka Kromatografisi                                                                            |
| <b>JAK</b>             | : Janus Kinase (Janus Kinaz)                                                                            |
| <b>JMML</b>            | : Juvenil Miyelomonositik Lösemi                                                                        |
| <b>KA</b>              | : Kromozom Aberasyonu                                                                                   |
| <b>KHDAK</b>           | : Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri                                                                    |
| <b>Kriyo-EM</b>        | : Kriyojenik Elektron Mikroskobu                                                                        |

|                                         |                                                                                                            |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>KRK</b>                              | : Kolorektal Kanser                                                                                        |
| <b>LBVS</b>                             | : Ligand-Based Virtual Screening (Ligant Temelli Sanal Tarama)                                             |
| <b>LC/MS</b>                            | : Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi)                       |
| <b>Leu</b>                              | : Lösin                                                                                                    |
| <b>leu+</b>                             | : Lösin Prototrofu                                                                                         |
| <b>LINCS</b>                            | : Linear Constraint Solver                                                                                 |
| <b>LOF</b>                              | : Loss of Function (İşlev Kaybı)                                                                           |
| <b>LS</b>                               | : Leopard Sendromu                                                                                         |
| <b>Lys</b>                              | : Lizin                                                                                                    |
| <b>MAPK</b>                             | : Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz)                                 |
| <b>MC</b>                               | : Monte-Carlo                                                                                              |
| <b>MCT<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup></b> | : MetaCore <sup>TM</sup> /MetaDrug <sup>TM</sup>                                                           |
| <b>MCC</b>                              | : Matthews Correlation Coefficient (Matthews Korelasyon Katsayısı)                                         |
| <b>MCF-7</b>                            | : Michigan Cancer Foundation-7 (Michigan Kanser Vakfı-7)                                                   |
| <b>MD</b>                               | : Moleküler Dinamik                                                                                        |
| <b>MEK</b>                              | : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz Kinaz)                       |
| <b>Met</b>                              | : Metiyonin                                                                                                |
| <b>MM/PBSA</b>                          | : The Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (Moleküler Mekanik Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı) |
| <b>MN</b>                               | : Mikronükleus                                                                                             |
| <b>MRTD</b>                             | : Maximum Recommended Therapeutic Dose (Maksimum Önerilen Terapötik Doz)                                   |
| <b>MSS</b>                              | : Merkezi Sinir Sistemi                                                                                    |
| <b>MTT</b>                              | : 3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum Bromür                                               |
| <b>NCI</b>                              | : National Cancer Institute (Ulusal Kanser Enstitüsü)                                                      |
| <b>NaCl</b>                             | : Sodyum Klorür                                                                                            |
| <b>NF-<math>\kappa</math>b</b>          | : Nükleer Faktör-Kappa B                                                                                   |
| <b>NGS</b>                              | : Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)                                                         |
| <b>NGU</b>                              | : Nongonococcal Urethritis (Gonokokal Olmayan Üretrit)                                                     |
| <b>NME</b>                              | : New Molecular Entity (Yeni Moleküler Girdi)                                                              |
| <b>NMR</b>                              | : Nükleer Manyetik Rezonans                                                                                |
| <b>NOS</b>                              | : Invasive Ductal Carcinoma (İnvaziv Duktal Karsinom)                                                      |

|                   |                                                                                                                      |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NPT</b>        | : Isothermal-Isobaric Ensemble (İzotermal-İzobarik Topluluk)                                                         |
| <b>NS</b>         | : Noonan Sendromu                                                                                                    |
| <b>OECD</b>       | : Organisation for Economic Co-operation and Development (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü)                     |
| <b>OPLS-AA</b>    | : All Atom Optimized Potential for Liquid Simulations                                                                |
| <b>OPLS3</b>      | : Optimized Potential for Liquid Simulations 3                                                                       |
| <b>OS</b>         | : Overall Survival (Genel Sağkalım)                                                                                  |
| <b>OSHK</b>       | : Oral Skuamöz Hücreli Karsinom                                                                                      |
| <b>PBS</b>        | : Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)                                                                  |
| <b>PD-1/PD-L1</b> | : Programmed Cell Death 1/Programmed Death-Ligand 1<br>(Programlanmış Ölüm Reseptörü 1/Programlanmış Ölüm Ligandı 1) |
| <b>PDAC</b>       | : Pankreas Duktal Adenokarsinomu                                                                                     |
| <b>PDB</b>        | : Protein Data Bank (Protein Veri Bankası)                                                                           |
| <b>Phe</b>        | : Fenilalanin                                                                                                        |
| <b>PI3K</b>       | : Phosphatidylinositol 3-Kinase (Fosfatidilinositol 3-Kinaz)                                                         |
| <b>PiD</b>        | : Pelvic Inflammatory Disease (Pelvik İnflamatuvar Hastalık)                                                         |
| <b>PK</b>         | : Protein Kinaz                                                                                                      |
| <b>PME</b>        | : Particle Mesh Ewald                                                                                                |
| <b>PR</b>         | : Progesteron Reseptörü                                                                                              |
| <b>PR+</b>        | : PR-Pozitif                                                                                                         |
| <b>PRL-3</b>      | : Phosphatase of Regenerating Liver-3 (Karaciğer Yenileyici Fosfataz-3)                                              |
| <b>Pro</b>        | : Prolin                                                                                                             |
| <b>P-S</b>        | : Potasyum Penisilin-Streptomisin Sülfat                                                                             |
| <b>PTF</b>        | : Protein Tirozin Fosfataz                                                                                           |
| <b>PTK</b>        | : Protein Tirozin Kinaz                                                                                              |
| <b>PTM</b>        | : Posttranslasyonel Modifikasyon                                                                                     |
| <b>pTyr</b>       | : Phosphotyrosyl (Fosfotirozil)                                                                                      |
| <b>QSAR</b>       | : Quantitative Structure-Activity Relationship (Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri)                                     |
| <b>RMSD</b>       | : Root-Mean-Square Deviation (Ortalama Karekök Sapması)                                                              |
| <b>RMSF</b>       | : Root-Mean-Square Fluctuation (Kök Ortalama Kare Dalgalanma)                                                        |
| <b>ROS</b>        | : Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)                                                                  |
| <b>rpm</b>        | : Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)                                                                   |
| <b>RTK</b>        | : Reseptör Tirozin Kinaz                                                                                             |
| <b>SAR</b>        | : Structure-Activity Relationship (Yapı-Aktivite İlişkisi)                                                           |

|                 |                                                                                  |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>SASA</b>     | : Solvent Accessible Surface Area (Solvent Erişilebilir Yüzey Alanı)             |
| <b>SBVS</b>     | : Structure-Based Virtual Screening (Yapı Temelli Sanal Tarama)                  |
| <b>SC-Ade</b>   | : Adenine Dropout Agar Plates (Adenin İçermeyen Sentetik Agar Plakları)          |
| <b>SC-His</b>   | : Histidine Dropout Agar Plates (Histidin İçermeyen Sentetik Agar Plakları)      |
| <b>SC-Leu-K</b> | : Synthetic Leucine Dropout Agar Plates (Lösin İçermeyen Sentetik Agar Plakları) |
| <b>SC-Leu-S</b> | : Liquid Leucine Dropout Medium (Lösin İçermeyen Sentetik Sıvı Besiyeri)         |
| <b>SCF</b>      | : Synthetic Complete Agar Plates (Sentetik Tamamlayıcı Agar Plakları)            |
| <b>s.d.</b>     | : Standart Sapma                                                                 |
| <b>Ser</b>      | : Serin                                                                          |
| <b>SH2</b>      | : Src Homoloji 2                                                                 |
| <b>SHK</b>      | : Skuamöz Hücreli Karsinom                                                       |
| <b>SHP-1</b>    | : SH2 Domaini İçeren PTF-1                                                       |
| <b>SHP-2</b>    | : Src Homoloji 2 Domaini İçeren Protein Tirozin Fosfataz-2                       |
| <b>SI</b>       | : Selectivity Index (Seçicilik İndeksi)                                          |
| <b>ST</b>       | : Sanal Tarama (Virtual Screening)                                               |
| <b>TDLU</b>     | : Terminal Duct Lobular Unit (Terminal Duktal Lobüler Ünitesi)                   |
| <b>TGF-β</b>    | : Transforming Growth Factor-Beta (Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta)         |
| <b>Thr</b>      | : Treonin                                                                        |
| <b>TIP3P</b>    | : Transferable Intermolecular Potential 3P                                       |
| <b>TK</b>       | : Tirozin Kinaz                                                                  |
| <b>TP</b>       | : Tanimoto Prioritization (Tanimoto Önceliklendirme)                             |
| <b>TPSA</b>     | : Topological Polar Surface Area (Moleküler Polar Yüzey Alanı)                   |
| <b>Trp</b>      | : Triptofan                                                                      |
| <b>Tyr</b>      | : Tirozin                                                                        |
| <b>Val</b>      | : Valin                                                                          |
| <b>VEGF</b>     | : Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)        |
| <b>VKİ</b>      | : Vücut Kitle İndeksi                                                            |
| <b>VMD</b>      | : Visual Molecular Dynamics                                                      |
| <b>WHO</b>      | : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)                                |

|             |                                                                                |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>WT</b>   | : Wild-Type (Yabanıl Tip)                                                      |
| <b>YN</b>   | : Yanlış Negatif                                                               |
| <b>YNB</b>  | : Yeast Nitrogen Base (Maya Nitrojen Bazı)                                     |
| <b>YP</b>   | : Yanlış Pozitif                                                               |
| <b>YPAD</b> | : Yeast Extract-Peptide-Adenine-Dextrose (Maya Özü-<br>Pepton-Adenin-Dekstroz) |

### Simgeler

|                                       |                                                                         |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>A</b>                              | : Absorbans                                                             |
| <b>w/v</b>                            | : Ağırlık/hacim                                                         |
| <b>Ca</b>                             | : Alfa karbon                                                           |
| <b>-NH veya -NH<sub>2</sub></b>       | : Amino grubu                                                           |
| <b>Å</b>                              | : Angström                                                              |
| <b><math>\Delta G_{arom.}</math></b>  | : Aromatik etkileşimlerin $\Delta G$ 'ye katkısı                        |
| <b><math>pK_a</math></b>              | : Asidik iyonlaşma sabitesinin negatif logaritması                      |
| <b><math>k_a</math></b>               | : Asosiyasyon (birleşme) sabiti                                         |
| <b>atm</b>                            | : Atmosfer basıncı                                                      |
| <b><math>\Delta G_{rot.}</math></b>   | : Bağlanma serbest enerjisine uygulanan rotasyonel penaltıların katkısı |
| <b>dk</b>                             | : Dakika                                                                |
| <b>Da</b>                             | : Dalton                                                                |
| <b>°C</b>                             | : Derece santigrat                                                      |
| <b><math>k_d</math></b>               | : Disosiyasyon (ayrışma) sabiti                                         |
| <b><math>\Delta E_{ele.}</math></b>   | : Elektrostatik enerji katkısı                                          |
| <b>fs</b>                             | : Femtosaniye                                                           |
| <b>-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>   | : Fosfat grubu                                                          |
| <b>R</b>                              | : Gaz sabiti (=8,314 JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )               |
| <b><math>\Delta G</math></b>          | : Gibbs bağlanma serbest enerjisi                                       |
| <b>g</b>                              | : Gram                                                                  |
| <b><math>\Delta G_{H-bağ.}</math></b> | : Hidrojen bağlarının $\Delta G$ 'ye katkısı                            |
| <b>-OH</b>                            | : Hidroksil grubu                                                       |
| <b><math>\Delta E_{int.}</math></b>   | : İç enerjide net değişim                                               |
| <b><math>\Delta G_{iyonik}</math></b> | : İyonik etkileşimlerin $\Delta G$ 'ye katkısı                          |
| <b>-COO<sup>-</sup></b>               | : Karboksil grubu                                                       |
| <b>-C=O</b>                           | : Karbonil grubu                                                        |
| <b>T</b>                              | : Kelvin cinsinden sıcaklık                                             |

|                                              |                                                            |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>kb</b>                                    | : Kilobaz                                                  |
| <b>kDa</b>                                   | : Kilodalton                                               |
| <b>kcal</b>                                  | : Kilokalori                                               |
| <b><math>\Delta S</math></b>                 | : Konformasyonel entropi katkısı                           |
| <b><math>\Delta E_{MM}</math></b>            | : Ligant ve protein arasındaki gaz fazı etkileşim enerjisi |
| <b><math>\Delta G_{lipo.}</math></b>         | : Lipofilik etkileşimlerin $\Delta G$ 'ye katkısı          |
| <b>pGI<sub>50</sub></b>                      | : MCF-7 hücre hattının büyüme inhibisyonu                  |
| <b><math>\mu L</math></b>                    | : Mikrolitre                                               |
| <b><math>\mu m</math></b>                    | : Mikrometre                                               |
| <b><math>\mu M</math></b>                    | : Mikromolar                                               |
| <b>mg</b>                                    | : Miligram                                                 |
| <b>mL</b>                                    | : Mililitre                                                |
| <b>mM</b>                                    | : Milimolar                                                |
| <b><math>\Delta G_{bağ.}</math></b>          | : MM/PBSA bağlanma serbest enerjisi                        |
| <b>M<sub>A</sub></b>                         | : Molekül ağırlığı                                         |
| <b>ng</b>                                    | : Nanogram                                                 |
| <b>nm</b>                                    | : Nanometre                                                |
| <b>ns</b>                                    | : Nanosaniye                                               |
| <b>clogP</b>                                 | : <i>n</i> -Oktanöl:su partisyon katsayısı                 |
| <b><math>\Delta G_{SA}</math></b>            | : Nonpolar desolvasyon enerji terimi                       |
| <b><math>\Delta G_{nonpol.}</math></b>       | : Nonpolar enerji katkısı                                  |
| <b><math>\pi</math></b>                      | : Pi                                                       |
| <b><math>\Delta G_{PB}</math></b>            | : Poisson-Boltzmann örtük çözücü modeli                    |
| <b><math>\Delta G_{polar}</math></b>         | : Polar solvasyon enerji katkısı                           |
| <b>-NH<sup>3+</sup> veya =NH<sup>+</sup></b> | : Pozitif yüklü amin grupları                              |
| <b>Ki-67</b>                                 | : Proliferatif indeks                                      |
| <b><math>\Delta G_{solv.}</math></b>         | : Solvasyon serbest enerjisi                               |
| <b><math>\Delta G_0</math></b>               | : Standart bağlanma serbest enerjisi                       |
| <b><math>\Delta E_{vdW}</math></b>           | : Van der Waals enerjisi katkısı                           |
| <b>IC<sub>50</sub></b>                       | : Yarı-maksimum inhibitör konsantrasyonu                   |
| <b><i>g</i></b>                              | : Yerçekimi katsayısı                                      |

## GİRİŞ

Kanser, vücutta çeşitli hücre sinyalizasyon kaskadlarındaki düzensizliklerin neden olduğu 200'den fazla neoplastik hastalıktan oluşan bir gruptur (Kunnumakkara *et al.* 2019). Karmaşık bir yapısı olan bu tür hastalıklar farklı dokularda ve vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilmektedir. Bununla birlikte anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve yayılmasıyla karakterize edilmektedirler (Parsonidis *et al.* 2019). Yaşamı tehdit eden çok yönlü ve çok mekanizmalı bir hastalık olması kanserin tedavisini zorlaştırmaktadır. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci önde gelen ölüm nedeni olduğu için tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (Dadashpour and Emami 2018).

Kanser insidansının dünya genelinde önümüzdeki 20 yıl içerisinde yaklaşık olarak %70 oranında artacağı öngörülmektedir (Kunnumakkara *et al.* 2019). Bu artışın nüfusun büyümesi ve yaşlanması, sigara kullanımı, sedanter yaşam biçimi, yüksek vücut kitle indeksi (VKİ) dahil olmak üzere yaşam tarzı davranışlarındaki bazı değişikliklerin yanı sıra gelişmekte olan ülkelerde kanser riskini artıran üreme modellerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Doğan *et al.* 2020). Bununla birlikte Kanavos (2006), kansere bağlı insidans ve mortalite oranlarının, Türkiye dahil olmak üzere, en çok gelişmekte olan ülkelerde artış gösterdiğini rapor etmiştir.

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (The International Agency for Research on Cancer; IARC) birimlerinden Küresel Kanser Gözlemevi'nin bir parçası olan Küresel Kanser İnsidansı, Mortalite ve Prevalansı (Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence; GLOBOCAN)'nın raporuna göre, 2020 yılında dünya çapında 19,3 milyon yeni kanser vakası görülmüş ve kanserden yaklaşık 10 milyon kişi hayatını kaybetmiştir. Bununla birlikte, raporda daha önceki yıllarda en sık teşhis edilen kanser türünün akciğer kanseri olduğu bildirilirken; 2020 yılında yaklaşık 2,3 milyon (%11,7) yeni kadın meme kanseri vakası tespit edilmesi üzerine bu durumun değişiklik gösterdiğine dikkat çekilmiştir. Böylece kadın meme kanseri küresel kanser insidansının başlıca nedeni haline gelmiş ve ayrıca 685,000 ölüm sayısı ile dünyada kansere bağlı ölümler arasında beşinci sırayı (%6,9) almıştır (Sung *et al.* 2021).

Meme kanserinin tedavisi için kullanılan yöntemler arasında cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi, endokrin tedavi ve biyolojik ajanların tek başına veya kombinasyon halinde kullanıldığı hedefli terapiler bulunmaktadır. Kanser teşhis yöntemleri ve yönetiminde son 50 yılda kaydedilen önemli ilerlemelere rağmen, kanser tedavilerinin başarılı bir şekilde uygulanmasında onkoloji dahil olmak üzere ilaç endüstrisi ve hasta sağlığı için benzeri görülmemiş zorluklar yaşanmaktadır. Bu zorluklardan bazıları, yeni ilaç geliştirme

maliyetlerinin artması, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (The United States Food and Drug Administration; FDA) tarafından onaylanmış yüksek etkili antikanser ilaçların sayısının azalması ve mevcut ilaçlarda önemli düzeyde yan etkilerin saptanmasıdır (Sun *et al.* 2017; Kunnumakkara *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2020). Ayrıca kemoterapiye ve immünoterapiye rağmen hastalarda optimal sonucun elde edilememesi, meme kanserinin yönetiminde enzimlerin hedefe yönelik tedavilerine acilen ihtiyaç duyulduğunun bir göstergesidir (Ghemrawi *et al.* 2022).

Protein tirozin kinaz (PTK) ve protein tirozin fosfataz (PTF) ailelerinin koordineli olarak işlev göstermesiyle hücrelerde büyüme, farklılaşma, metabolizma, göç ve hayatta kalma gibi çok çeşitli süreçlerde kritik bir rol oynadığı bilinen tirozin fosforilasyon seviyeleri korunmaktadır. Tirozin fosforilasyonunun deregülasyonu, başta meme kanseri olmak üzere birçok kanser türüyle bağlantılıdır. Bu nedenle tirozin fosforilasyonu tarafından düzenlenen sinyalizasyon yollarının terapötik müdahaleler için yeni moleküler hedefler sunabileceği düşünülmektedir (Ghemrawi *et al.* 2022).

Son yıllarda kanser alanında yapılan araştırmaların odak noktalarından biri olan Src homoloji 2 (SH2) domaini içeren PTF-2 (SHP-2) adlı enzim hedefi, onkojenik potansiyele sahip olduğu bildirilen ilk reseptör olmayan (sitoplazmik) PTF'dir ve *PTPN11* geni tarafından kodlanmaktadır. SHP-2'nin çeşitli dokularda ve birçok hücre hattında yaygın olarak eksprese edildiği bilinmektedir. Bu enzim fizyolojik olarak transkripsiyonel düzenleme, sitokin sinyalizasyonu, hücresel farklılaşma, hücre döngüsünün devamlılığı, apoptoz, hücre adezyonu, tümör hücrelerinin proliferasyonu ve göçü gibi kritik süreçlere aracılık etmektedir. Aynı zamanda çekirdek ve mitokondrideki bazı olaylarda önemli bir görev üstlenmektedir (Liu *et al.* 2021a). Bugün SHP-2'nin en bilinen kritik düzenleyici rolü hücre büyüme ve farklılaşma yolağı olan mitojenle aktive edilen protein kinaz (mitogen-activated protein kinase; MAPK) ve hücre ölüm yolağı olan programlanmış ölüm reseptörü 1/programlanmış ölüm ligandı 1 (programmed cell death 1/programmed death-ligand 1; PD-1/PD-L1) gibi sinyalizasyon olayları üzerinedir (Wu *et al.* 2021).

İnsan hastalıklarının SHP-2 proteiniyle olan ilişkisi araştırmacıların eskiden beri ilgisini çeken bir konu olmuş ve zamanla bu konuda önemli yapısal ve fonksiyonel bilgiler elde edilmiştir. Örneğin; SHP-2'yi kodlayan *PTPN11* genindeki aktive edici mutasyonların çeşitli genetik bozukluklara neden olduğu ve birçok lösemi türünün yanı sıra akciğer, meme, kolon, nöroblastom, deri ve rahim ağzı kanserleri gibi solid tümörlerin oluşumuna katkı sağladığı belirlenmiştir (Vazhappilly *et al.* 2019; Kim *et al.* 2020; Liu *et al.* 2021b; Tong *et al.* 2021). Ayrıca son yıllarda yapılan birçok çalışmada SHP-2'nin meme, küçük hücreli dışı akciğer,

mide, yumurtalık ve oral skuamöz hücreli karsinom (OSHK) gibi kanser türlerinde aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir (Han *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2015; Gagné-Sansfaçon *et al.* 2016; Hu *et al.* 2017). Bu çalışmalarda aşırı SHP-2 ekspresyonu, özellikle çoğu meme kanseri hücre hattı ve dokuları için ön plandadır (Hu *et al.* 2014).

Meme karsinomlarında yüksek SHP-2 düzeyleri lenf nodu metastazları ve daha yüksek tümör derecesiyle pozitif korelasyon göstermektedir (Frankson *et al.* 2017). Ayrıca Muenst *et al.* (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, SHP-2 ekspresyonunun luminal A ve luminal B insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2-negatif (human epidermal growth factor receptor 2-negative; HER2-) olmak üzere iki farklı meme kanseri moleküler alt tipinde daha düşük bir genel sağkalım (overall survival; OS) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Genel olarak, anormal SHP-2 ekspresyonu, meme kanserinin başlangıcını ve ilerlemesini indükleyen önemli nedensel faktörlerden biri olarak kabul edilmekte ve bu durumun kanserin ilerlemesi ve prognozu üzerinde negatif yönde bir etki yaptığı bilinmektedir. Bu olumsuz etkinin SHP-2 enziminin MAPK yolağını aktive etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Böylece SHP-2, meme kanseri için potansiyel bir ilaç hedefi haline gelmekte ve meme kanseri hücrelerinde SHP-2'nin biyolojik fonksiyonlarının inhibe edilmesi yaklaşımı ile hücrelerde Ras/ERK ve fosfatidilinositol 3-kinaz (phosphatidylinositol 3-kinase; PI3K)/Akt sinyalizasyon yollarının aktivitelerinin engellenmesi yoluyla kanser hücrelerinin büyümesinin ve invazifliğinin azaltılması hedeflenmektedir (Huang *et al.* 2014; Reddy Bollu *et al.* 2017).

Bugüne dek geliştirilen küçük molekül SHP-2 inhibitörleri, farklı etki bölgeleri esas alınarak, “katalitik” ve “allosterik” bölge inhibitörleri olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Literatürde bildirilen ilk SHP-2 inhibitörleri enzimin katalitik bölgesini hedef almakla birlikte PTF bölgesinin yüksek düzeyde korunması nedeniyle seçicilikten yoksundur ve oral biyoyararlanımları zayıftır (Fodor *et al.* 2018). Bunun aksine allosterik inhibitörler genellikle katalitik bölge inhibitörlerinden daha seçici olmakta, daha iyi ilaç benzeri özellikler sergilemekte ve daha az polarlıktaki yapı iskeletlerine sahip olmaktadır (Bruder *et al.* 2020). Bu yüzden SHP-2'nin fonksiyonlarını modüle etmede katalitik bölgeden ziyade allosterik bölgelerin hedeflenmesi daha rasyonel bir yaklaşımı temsil etmektedir (Chio *et al.* 2014; Garcia Fortanet *et al.* 2016; Marsh-Armstrong *et al.* 2018; Guo *et al.* 2021).

Allosterik ceplere bağlanabilen küçük moleküller, PTF enzimleri gibi “farmakolojik olarak hedeflenemeyen (undruggable)” bir durumda olan biyolojik hedefler dahil olmak üzere, hastalıkla ilişkili pek çok proteinin fonksiyonlarının modüle edilmesinde olası yeni stratejilere yol açmaktadır (Krojer *et al.* 2020). Bunun güzel bir örneği, 2016 yılında Novartis AG firmasının araştırmacıları tarafından keşfedilen SHP099 (6-(4-amino-4-metilpiperidin-1-il)-3-

(2,3-diklorofenil)pirazin-2-amin) molekülüdür. Oldukça güçlü bir allosterik SHP-2 inhibitörü olduğu bilinen SHP099; iyi derecede seçicilik, çözünürlük ve oral biyoyararlanım özelliklerine sahiptir. Bununla birlikte KYSE-520 özofageal skuamoz hücreli kanseri ksenograft fare modelinde tümör büyümesini doza bağlı olarak ve yan etki görülmeden inhibe etmektedir. Bu özelliklerinden ötürü SHP099, yeni allosterik bölge inhibitörlerinin keşfine yönelik yapılan çalışmalarda araştırmacılara ışık tutmaktadır (Chen *et al.* 2016; Wang *et al.* 2020a).

Yeni allosterik PTF inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda çoğu kez doğal kaynaklı ürünlerin ilaç olma potansiyelleri araştırılmaktadır (Carr *et al.* 2014; Zargari *et al.* 2017; Qin *et al.* 2018; Kwon *et al.* 2021). Tarihsel olarak, doğal ürünler, özellikle kanser ve bulaşıcı hastalıklar için ilaç keşfinde ve ayrıca kardiyovasküler hastalıklar (örneğin, statinler) ve multiple skleroz (örneğin, fingolimod) dahil olmak üzere diğer terapötik alanlarda önemli rollere sahiptir (Atasanov *et al.* 2021). Doğal ürünler yeni allosterik bağlanma bölgelerinin, kimyasal karakteristiklerin ve yapı iskeletlerinin yanı sıra proteinlerde küçük moleküllerin indüklediği allosterik modülasyonun moleküler ve yapısal mekanizmalarının belirlenmesinde etkin bir rol oynamaktadır. Bu nedenle gelişmiş farmakolojik özelliklere sahip yeni ve seçici ilaçların geliştirilmesinde ilgi çekici bir strateji sunmaktadırlar (Bruder *et al.* 2020).

Doğal ürünler ve bunların türevleri, uzun süredir terapötik ajanlar ve kimyasal bileşikler için yapısal bir çeşitlilik kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bunlar tam sentetik ilaçlarla kıyaslandığında daha fazla sayıda oksijen ve daha az sayıda azot atomuna, daha fazla sayıda kiral merkeze ve daha çeşitli halka sistemlerine sahip olma eğilimleri dolayısıyla biyolojik hedeflerine karşı daha seçicidirler (Basmadjian *et al.* 2014). Ayrıca bu bileşiklerin çok çeşitli kimyasal yapıları sahip olması, bunların biyolojik işlev modülatörü olma özelliklerinin daha da yoğun bir şekilde araştırılmasına yol açmıştır (Hiebl *et al.* 2018; Jin *et al.* 2019; Koparde *et al.* 2019; Singh *et al.* 2021). Bugüne dek meme kanserine yönelik gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* deneylerde doğal ürünlerin nispeten düşük yan etki profiline sahip olduklarının bildirilmesi üzerine bu moleküllerin meme kanseri yönetiminde geleneksel tedavi yaklaşımlarının olağandışı yan etkilerini en aza indirebilecek alternatif bir yaklaşımı temsil ettiği kabul edilmektedir (Mitra and Dash 2018; Zhao *et al.* 2020; Dai *et al.* 2021).

Yapılan araştırmalar son 20 yılda FDA onaylı ilaçların yaklaşık üçte birinin doğal ürünler ve bunların türevleri olduğunu çarpıcı bir şekilde ortaya koymuştur (Thomford *et al.* 2018). Bu doğal moleküllerin kaynağına ilişkin Patridge *et al.* (2016) tarafından yapılan bir değerlendirmede %44'ünün memelilerden, %25'inin bitkilerden, %16'sının bakterilerden ve %12'sinin mantarlardan elde edildiği bilgisine ulaşılmaktadır. Ayrıca mikrobiyal türevlerin

1950 yılından önce onaylanan tüm Yeni Moleküler Girdi (New Molecular Entity; NME)'lerin %3,9'unu kapsaması ve 2000 yılından bu yana onaylanan tüm NME'ler arasında %8,9'luk bir paya sahip olması dolayısıyla bu moleküllerin ilaç olma potansiyellerinin araştırıldığı çalışmalar dikkate değerdir.

Bazı meme kanseri hücreleri (örneğin; MCF-7 ve MDA-MB-435) üzerinde antikanser etkinliğe sahip olduğu bilinen moleküller arasında peptitler bulunmaktadır. Böylece araştırmacılar, peptit yapılarını SHP-2 ile ilişkili meme kanserinin tedavisinde endike olabilecek yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerinin keşfi amacıyla antikanser aktivite yönünden taramaya başlamışlardır (Kostrzewa *et al.* 2018). Ayrıca farmasötik endüstrisinde de peptitlerin tedavi amaçlı kullanımlarının en fazla araştırıldığı alanlardan biri onkolojidir (Lau and Dunn 2018). Klinik çalışmalardan elde edilen veriler 2000'den fazla peptit molekülünün bu çalışmalar kapsamında değerlendirildiğini ve bunların içerisinde yaklaşık %18'inin kanser için endike olduğunu göstermektedir (Haggag *et al.* 2018).

Peptit yapıları bileşikler genellikle 2-50 amino asit kalıntısından (yaklaşık olarak  $10^2$ - $10^3$  Da) oluşmakta ve potansiyel terapötik etkinlikleri nedeniyle mevcut protein ve antikor yapıları ilaçlara kıyasla pek çok avantaj sunmaktadır (Marqus *et al.* 2017; Jakubczyk *et al.* 2020). Peptit molekülleri, küçük boyutlu olmaları ve proteinler veya rekombinant antikorlardan daha az immünojenik özellik göstermelerinden ötürü ilaç araştırmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca rekombinant teknoloji yerine sentetik bir teknolojiyle üretilibilmeleri, peptitlerin kitle birim başına daha fazla aktiviteyle daha düşük maliyetli olacak şekilde üretimine imkan tanımaktadır. Bununla birlikte peptitlerin etkinliklerinin, hedef afinitelerinin ve özgüllüklerinin yanı sıra oluşturdıkları metabolitlerin güvenli ve toksik etkilerinin de nispeten az olması bu molekülleri sentetik orijinli küçük moleküllere göre avantajlı kılmaktadır (Haggag *et al.* 2018). Bu sayede peptitler, kanser tedavisi için iyi ilaç adayları olarak günümüzde giderek daha fazla kabul görmektedir (Wang *et al.* 2017).

Yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerinin keşfi ve geliştirilmesi üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda klinik uygulamalarda test edilecek olan moleküllerin sayısı önemli ölçüde artırılmıştır. Buna paralel olarak daha iyi aktivite gösteren ve yan etki profili nispeten daha güvenli olan yeni antikanser ajanları elde etme imkanı da artmıştır (Liu *et al.* 2021a). Sitotoksik ve antitümör ajanlar genellikle selektif olmamaları ve kanser hücrelerinin yanında sağlıklı olanları da öldürmeleriyle bilinmektedirler. Dolayısıyla kanser tedavisine özgü aktif bileşiklerin belirlenmesinde ilaç moleküllerinin taranması ve bu moleküllerin etki mekanizmalarının iyi anlaşılması gerekmektedir. Başka bir deyişle, tümör hücrelerini sağlıklı

hücreler üzerinde minimum yan etki potansiyeliyle daha etkili ve seçici olarak hedefleyebilen yeni moleküllerin tanımlanması kanser tedavileri için esastır (Kocyigit *et al.* 2016).

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (BDİT) istenilen farmakolojik/toksikolojik özelliklere sahip özgün ilaç moleküllerinin tasarlanması ve geliştirilmesi, öncü bileşik elde etme süreçlerinin hızlandırılması ve preklinik aşamada test edilen ilaç adaylarının klinik aşamaya kadar ilerlemesini sağlayan hesaplamalı tekniklerin bütünü olarak tanımlanmaktadır (Kumar and Jha 2017). BDİT yaklaşımları hesaplamalı kimya ve bilgisayar teknolojisindeki güncel ilerlemelerin takip edilmesiyle ortaya çıkmış olup bu yaklaşımlar geçmişten günümüze ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamıştır (Eren ve Yalçın 2020). Bu yaklaşımların kullanılmasıyla geniş çaplı bir molekül kütüphanesinde bulunan biyoaktif moleküllerin çeşitli fizikokimyasal, farmasötik ve farmakokinetik özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır (Cerqueira *et al.* 2015).

BDİT teknikleri ilaç keşif ve geliştirme süreçlerinin verimliliğini artırmak amacıyla da ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu alanda çalışan araştırmacılar terapötik etkili maddelerin geliştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmalarda, özellikle büyük çaptaki molekül kütüphanelerinin ilaç hedeflerine karşı sanal olarak taranması yaklaşımını seçmektedirler. Sanal tarama (virtual screening; ST) çalışmalarındaki amaç, belirli bir proteini hedefleyebilen, arzu edilen özelliklere (örneğin; hit, ilaç benzeri veya öncü benzeri bir molekül) sahip bir dizi bileşiğin seçilerek istenmeyen özelliklere (örneğin; inaktif, reaktif ve toksik bir molekül) sahip bileşiklerin ayıklanmasıdır (Cerqueira *et al.* 2015). ST metodolojileri, yüksek verimli aktivite tarama (high throughput screening; HTS) yöntemlerine göre nispeten ucuzdur ve erken aşama ilaç keşfinin maliyetlerini büyük oranda düşürmektedir. Ayrıca mevcut ST algoritmaları, bugüne dek düşük ila orta mikromolar düzeyde etkinliğe sahip öncü moleküllerin belirlenmesi ve farmasötik olarak ilgili komplekslerin gerçek bağlanma modlarının bulunması gibi birçok başarı öyküsüne imza atmıştır (Varela-Rial *et al.* 2021).

Prensip olarak ST yönteminde, kimyasal kütüphanelerinde bulunan çok sayıda bileşik (örneğin;  $10^5$  ila  $10^7$  bileşik), bir hesaplama aracı tarafından bir sonraki aşamada deneysel olarak test edilecek daha az sayıda bileşiğe (örneğin;  $10^1$  ila  $10^3$  bileşik) indirgenmektedir. Literatürde yer alan önceki çalışmalarda *in vitro* yaklaşımlardan elde edilen hit molekül bulma oranlarının %0,01 ila %0,14 arasında değişkenlik gösterdiği, buna karşılık ST için hit molekül elde etme oranlarının ise %1-40 arasında olduğu bildirilmiştir. Bu sayede ST aşamasını başarıyla geçen bileşiklerin daha düşük bir maliyetle, daha yüksek oranda biyolojik olarak aktif oldukları sonucuna varılmıştır (Zhu *et al.* 2013; Neves *et al.* 2016).

ST'nin genel tanımında yapı temelli sanal tarama (structure-based virtual screening; SBVS) ve ligant temelli sanal tarama (ligand-based virtual screening; LBVS) yöntemleri olarak iki ana sınıfa ayrılan birçok farklı metodoloji yer almaktadır. SBVS yöntemleri hedefin üç boyutlu (three-dimensional; 3D) yapısının varlığını gerektirmektedir. Bu yöntemler molekül kütüphanesindeki her bir ligantın hedefin aktif bölgesine bağlanma özelliklerinin moleküler kenetlenme (docking) yöntemiyle teorik olarak incelenmesi, her ligant için öngörülen bağlanmaların belirlenmesi ve her ligantın hedefin aktif bölgesine ölçülü bir şekilde uyum gösterip göstermediğinin tespit edilmesi aşamalarından oluşmaktadır. Ardından bu bilgiler hedef proteine güçlü bir şekilde bağlanan ligantları, bağlanmayan ligantlardan ayırmak için kullanılmaktadır. ST'de yapı temelli yaklaşımlar özellikle hedef proteinlerin 3D yapılarının giderek daha fazla belirlenip kullanılabilir hale gelmesiyle, daha güvenilir ve daha doğru sonuçların elde edilebilmesi açısından ligant temelli yaklaşımlara göre oldukça büyük bir öneme sahiptir (Cerqueira *et al.* 2015).

İlaç öncü moleküllerinin keşfi için uygulanan SBVS yöntemleri içerisinde moleküler docking, en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Docking hesaplamalarında genellikle arama algoritması ve skorum fonksiyonu olarak iki farklı tür algoritma kullanılmaktadır. Arama algoritmasıyla ligantları reseptörün bağlanma cebine sığdırabilmek için çeşitli olası pozlar üretilebilmekte iken skorum işleviyle ligantların arama algoritması tarafından oluşturulan farklı pozları ve konumları bağlanma olayının tahmin edilen serbest enerjisine dayalı olarak belirli bir skor değerine göre sıralanabilmektedir (Neves *et al.* 2016). Moleküler docking yöntemleri özellikle geniş çaplı kimyasal kütüphanelerinin hızlı bir şekilde taranmasını sağlayabilmelerinden dolayı popülerdir (Varela-Rial *et al.* 2021).

Hızlı yöntemler kapsamında bulunan docking metotlarının yanı sıra protein-ligant bağlanma olaylarının daha gerçekçi bir biçimde ve daha ayrıntılı olarak simülasyonuna imkan tanıyan moleküler dinamiklere dayanan yöntemler de bulunmaktadır. Moleküler dinamik (MD) tekniğinde Newton'un hareket denklemleri ve farklı atomlar arasındaki etkileşimleri tanımlayan bir kuvvet aracılığıyla bir sistemin belirli bir zaman dilimi içerisindeki dinamikleri simüle edilebilmektedir (Varela-Rial *et al.* 2021). MD simülasyonları son yıllarda deneysel olarak bertaraf edilmesi zor olan karmaşık biyolojik problemlerin keşfinde en sık kullanılan teknolojilerden biri haline gelmiştir. Genellikle MD simülasyon metotlarıyla bir protein-ligant kompleksinin enerjik olarak izin verilen konformasyonel durumuna ulaşılmaya çalışılmaktadır. Böylece tüm simülasyon süresince ligantın farklı konformasyonlarının protein üzerindeki etkileri izlenebilmekte ve bu sayede araştırmacılar ilgili protein-ligant bağlanması hakkında son derece güvenilir bilgiler elde edebilmektedir (Wang *et al.* 2020a). Ek olarak, protein-ligant

arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesinde Gibbs bağlanma serbest enerjisi ( $\Delta G$ ) değerlerinin hesaplanması yaklaşımı da önemli bir yer tutmaktadır. Bu amaçla Moleküler Mekanik Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı (The Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area; MM/PBSA) yöntemi kullanılmakta ve bu yöntem sayesinde protein-ligant etkileşimlerinin  $\Delta G$  değerleri hızlı bir şekilde belirlenebilmektedir. Genel olarak MM/PBSA yaklaşımından elde edilen  $\Delta G$  değerleriyle deneysel sonuçlar tutarlılık göstermektedir. Böylece MD simülasyonu ve MM/PBSA yöntemlerinin bir arada kullanıldığı hesaplamalı metodolojiler sayesinde günümüzde protein-ligant komplekslerinin  $\Delta G$  değerleri yüksek verimli bir şekilde tayin edilebilmektedir (Liu and Zhang 2009; Ren *et al.* 2019; Timuçin 2021).

LBVS yöntemi, biyolojik hedefin bilinmediği veya 3D yapısının mevcut olmadığı durumlarda tercih edilen bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda deneysel değerlendirme için yeni hit moleküllerin tanımlanmasında, yapısal kuralları belirlemek amacıyla belirli bir hedefe karşı biyolojik aktiviteye sahip bir referans bileşik kümesinin ön bilgileri kullanılmaktadır. Kantitatif yapı-etki ilişkileri (quantitative structure-activity relationship; QSAR) yöntemi güncel olarak en çok kullanılan LBVS yöntemlerinden biridir. QSAR analizleri, yüksek tarama hızlarına ulaşılabilmesi ve hit molekül bulma oranlarının nispeten iyi olması nedeniyle ST çalışmalarında giderek daha fazla tercih edilmektedir. QSAR modelleri bilinen aktiviteye sahip bir dizi bileşik üzerinde geliştirildikten sonra, sürekli modeller ile biyolojik aktivitenin sayısal tahmini veya ikili modeller ile aktif ve aktif olmayan bileşikler arasında bir ayırım yapabilmek için deneysel olarak test edilmemiş kimyasal bileşiklere uygulanmaktadır. QSAR analizi sayesinde kimyasal bileşikler için moleküler parmak izleri veya tanımlayıcılar hesaplanmakta ve ardından elde edilen bulgular deneysel verilerle ilişkilendirilmektedir (Neves *et al.* 2016).

Literatürde gittikçe artan sayıda kanıt, yapı temelli hesaplamalı yöntemler ve deneysel çalışmaların kombine edilmesiyle allosterik modölatörlerin keşfinin mümkün olduğunu göstermiştir (Garcia Fortanet *et al.* 2016; Fodor *et al.* 2018; Lu *et al.* 2019a; Parsonidis *et al.* 2019). Bugüne dek PTF enzimlerini veya SH2 domainlerini inhibe etmek amacıyla geliştirilen küçük molekül inhibitörlerinin çok azı klinik test aşamasına kadar ilerleyebilmiştir (Cerulli *et al.* 2019). Bununla birlikte sadece 8 adet allosterik SHP-2 inhibitörü özelliğindeki molekül, kanser tedavisinde kullanılmak üzere klinik test aşamasına geçmeyi başarmıştır (Wang *et al.* 2021a; Song *et al.* 2022). Bu durum, SHP-2 ile ilişkili kanser terapilerinde kullanılmak üzere günümüzde daha fazla yeni allosterik SHP-2 inhibitörü özelliğindeki molekülün rasyonel olarak tasarlanmasına ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Ancak bu moleküllerin geliştirilerek antikanser ilaçlara dönüştürülmesine ilişkin klinik çalışmaların

gerçekleştirilmesinden önce temel ilaç araştırmalarının yapılması gerekmektedir (Tong *et al.* 2021; Zhou *et al.* 2021).

Bu tez çalışmasında yapı ve ligant temelli tekniklerin sıralı kombinasyonunu içeren bir dizi *in silico* analiz sonucunda yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları olarak belirlenen moleküllerin SHP-2 inhibisyon aktiviteleri, MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı seçici sitotoksik-antiproliferatif etkileri ve genotoksik özelliklerinin *in vitro* yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute; NCI) veritabanında bulunan 265,242 adet kimyasal yapı, SHP-2 enzimine karşı moleküler docking tabanlı SBVS teknikleri kullanılarak Schrödinger Moleküler Modelleme Programı Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) modülüyle taranmıştır. Bu aşamada ilgili ligant kütüphanesi en yüksek docking skorları ve SHP-2'nin allosterik bölgesinde gözlemlenen protein-ligant etkileşimleri temel alınarak filtrelenmiştir. Bir sonraki aşamada ise seçilen hit ligantların ilaç olma özellikleri, olası kanser terapötik aktiviteleri ve bazı toksikolojik parametreleri ikili QSAR modellerine dayalı olarak analiz yapan MetaCore™/MetaDrug™ (MC™/MD™) aracıyla hesaplanmıştır. Bunu takiben ulaşılan 6 adet hit bileşik için SHP-2'nin allosterik bölgesinde gözlemlenen protein-ligant etkileşimleri MD simülasyon tekniği kullanılarak GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) yazılım paketiyle daha ayrıntılı olarak analiz edilmiş ve oluşan protein-ligant komplekslerinin  $\Delta G$  değerleri MM/PBSA yöntemi kullanılarak g\_mmpbsa aracıyla tayin edilmiştir. Böylece dipeptit yapısındaki 3 adet doğal molekül “özgün allosterik SHP-2 inhibitör adayları” olarak tanımlanmıştır. *In vitro* biyolojik etkinlik değerlendirme çalışmaları kapsamında, ilk aşamada, seçilen yeni inhibitör adaylarının SHP-2 inhibisyon aktiviteleri floresan ölçümü esasına dayanan bir yöntem kullanılarak belirlenmiştir. İkinci aşamada, bu bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki seçici sitotoksik-antiproliferatif etkinlikleri, kontrol hücre modeli olarak MCF10A insan sağlıklı meme epitel hücre hattının kullanılmasıyla, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonrasında 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) yöntemiyle analiz edilmiştir. Moleküllerin genotoksik özellikleri ise, üçüncü aşamada, maya delesyon (DEL) testi kullanılarak incelenmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışma, ileride SHP-2'yi yüksek düzeyde eksprese eden meme kanseri hastalarının tedavisinde endike olabilecek ve güvenle kullanılabilecek yeni, güçlü ve doğal kaynaklı allosterik SHP-2 inhibitörlerinin belirlenmesi ve bu moleküllerin antikanser ilaç adayı olma potansiyellerine dair ilk verilerin literatüre kazandırılması bakımından önem arz etmektedir.

## KURAMSAL TEMELLER

### Kanser

#### Tanımı ve epidemiyolojisi

Kanser prevalansı hızla yaşlanan nüfus ve özellikle son yarım yüzyılda, genel nüfusta riskli sağlık davranışlarının ve çevrede/tüketici ürünlerinde kanserojen maddelerin varlığının artmasıyla birlikte günümüzde belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Ancak bu hastalığın tarih öncesi çağlardan beri insanlığı etkilediği bilinmektedir. Memelilerde kanserin bilinen en eski güvenilir kanıtı, fosilleşmiş dinozorlarda ve tarih öncesi çağlardan kalma insan kemiklerinde bulunan tümör kitleleridir. İnsan kanserini tanımladığı kabul edilen en eski yazılı kayıtlar ise 19. yüzyılda keşfedilen eski Mısır el yazmalarında, özellikle cerrahi, farmakolojik ve büyü yapılan tedavileri tanımlayan Edwin Smith ve George Ebers papirüslerinde ortaya çıkmıştır (Faguet 2015).

Kanser terimi, Hipokrat tarafından ilk kez M.Ö. 460-377 yılları arasında “şifa bulmayan yeni yapılanmaların tanımlanması”nda kullanılmıştır. Bu yapılanmaların vücut yüzeyinde büyümeleri ve genellikle ülserleşmeleri, kırmızı renkte ve sıcak olmaları, ağrılı seyretmeleri ve nispeten yavaş bir büyüme profili sergilemeleri nedeniyle Hipokrat bu lezyonlara “karsinos” ya da “karsinoma” adını vermiştir. Galen ise bu yapılanmaları yengece benzettiğinden ötürü bunları M.S. 2. yüzyılda “kanser” olarak adlandırmıştır. “Seratan” ise Türk tıp tarihinde kansere verilen addır. Bu terim “findık veya küçük yumru büyüklüğünde, ağrılı ve etrafı damarlarla örülü bir oluşum” olarak Tarsuslu Osman Hayri Efendi’nin “Kenzüshhatül Ebdaniye” (1928) adlı eserinde tanımlanmıştır (Atıcı 2007).

Kanser ya da diğer adıyla neoplazi, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünerek vücut dokusunu tahrip ettiği bir hastalıktır. Neoplazi, Yunanca’da “yeni büyüme” anlamına gelmektedir (Çetin 2014). Kanserde hücreler kontrolsüz ve dokular otonom olarak büyümekte, farklılaşma yetenekleri kaybolmakta ve metastaz yoluyla orijinal tümörden ayrılıp diğer organlara yayılmaktadır. Tümörler dokuların anormal kütleleridir ve tümörün büyümesi koordineli değildir. Çünkü değişimi tetikleyen uyarının kesilmesinden sonra bile büyüme olayı devam etmekte ve bir tümör vücudun herhangi bir yerinde büyüebilmektedir (Sidat *et al.* 2018).

Tümörler benign (iyi huylu; kanser olmayan) ve malign (kötü huylu; kanserli olan) olmak üzere iki çeşittir. Benign tümörler nispeten yavaş büyürler, genelde vücutta oluştukları

dokuda kalırlar ve kan veya lenf damarlarıyla vücudun diğer kısımlarına yayılmazlar. Ancak kötü huylu tümörlere dönüşme potansiyelleri mevcuttur. İyi huylu tümörler organizmada kolayca keşfedilebilirler ve cerrahi olarak çıkarılmaları nispeten kolaydır. Öte yandan malign tümörlerin büyümeleri başlangıçta yavaştır ve bu aşamada belirti vermezler. Bu tip tümörlerde hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalma, vücudun çeşitli bölgelerine yayılma ve komşu dokuları istila etme potansiyelinin yanı sıra ikincil tümör oluşturma kabiliyeti mevcuttur (Sidat *et al.* 2018). Malign tümöre sahip hastalar, kanser teşhisi almalarından sonraki 5 yıl içinde %1,1'den (prostat kanseri için) %92,3'e (pankreas kanseri için) kadar değişen oranda mortaliteye sahiptirler (Liu *et al.* 2017).

Günümüzde kanser, hem Türkiye'de hem de dünyada en önemli halk sağlığı sorunlarından ve ölüm nedenlerinden biridir. 2012 yılında tüm dünyada 8,2 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization; WHO) tarafından önümüzdeki yirmi yıl içinde yeni kanser vakalarının yaklaşık olarak %70 oranında artacağı öngörülmektedir. 2018 yılının başında kansere bağlı ölüm oranlarının Asya'da %57,3, Avrupa'da %20,3 ve Amerika'da ise %14,4 olduğu tahmin edilmektedir. Aynı yıl içerisinde 185 ülkede 36 adet farklı kanser türünü kapsayacak biçimde toplam 18,078,957 adet yeni kanser vakası bildirilmiş ve kanserden kaynaklı ölümlerin sayısı 9,555,027 olarak tespit edilmiştir (Bray *et al.* 2018).

Türkiye'de de kanserle ilişkili olarak benzer bir durumun süregeldiği bilinmektedir. Ülkemizde kanserden ölümlerin başlıca nedenleri arasında erkeklerde prostat, solunum sistemi ve mesane kanserleri yer almakta iken bayanlarda ise serviks-rahim-yumurtalık, meme ve kolon kanserleri ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte 2009-2018 yılları arasında özellikle meme kanserlerinin sebep olduğu çok sayıda ölüm (34,869 kişi) rapor edilmiştir (Keser Şahin *et al.* 2020).

Gelişmiş ülkelerde kanserin erken tanı ve tedavisinde kullanılan tekniklerin ilerlemesiyle birlikte kanser morbiditesi ve mortalitesi azalmaya başlamıştır ancak gelişmekte olan ülkelerde bu oranlar hala artış göstermeye devam etmektedir. On yıllarca süren araştırmalara rağmen günümüzde kansere bağlı ölüm oranları ve kanser rekürrensi halen yüksektir. Bu yüzden kanserin küratif tedavisinde etkin rol oynayabilecek yeni ajanların geliştirilmesi ve topluma sunulması oldukça büyük önem arz etmektedir (Jean-Quartier *et al.* 2018; Doğan *et al.* 2020).

## Kanser oluşumuna etki eden faktörler

Kanser risk faktörlerinin takibi hem veriye dayalı analitik yaklaşımların hem de karsinogenez için teoriye dayalı modellerin geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Bunlardan ilki 1950’li yıllarda sigara kullanımı ve akciğer kanseri üzerine çığır açan epidemiyolojik çalışmalarla başlatılmıştır. Sonuncusu ise 20. yüzyılın başlarında hayvanlar ve ardından insanlarda karsinojenitenin modellenmesiyle başlatılmış olup bu çalışmalardan iki yeni zıt model elde edilmiştir. Buna göre kanser risk faktörleri biyolojik yapıları, değiştirilebilirlikleri ve literatürdeki kullanımları esas alınarak üç farklı kategoriye ayrılmıştır (Tablo 1) (Wu *et al.* 2018).

**Tablo 1.** Değişik Türde Kanserler İçin Üç Grup Risk Faktörü Örnekleri (Wu *et al.* 2018)

| İntrinsik Risk Faktörleri<br>(Değiştirilemeyen)                                                    | İntrinsik Olmayan Risk Faktörleri                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                    | Endojen Risk Faktörleri<br>(Kısmen değiştirilebilen)                                                                                                                                          | Ekzojen Risk Faktörleri<br>(Değiştirilebilen)                                                                                                                                                      |
| <ul style="list-style-type: none"><li>DNA replikasyonunda meydana gelen rastgele hatalar</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>Biyolojik yaşlanma</li><li>Genetik duyarlılık</li><li>DNA tamir mekanizmaları</li><li>Hormonlar</li><li>Büyüme faktörleri</li><li>İnflamasyon</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>Radyasyon</li><li>Kimyasal karsinojenler</li><li>Tümör virüsleri</li><li>Sigara, egzersiz eksikliği ve besin dengesizliği gibi kötü yaşam tarzları</li></ul> |

Kanser risk faktörleri genel olarak birbirini dışlayan iki bileşene ayrılmaktadır. Bunlar “intrinsik” ve “intrinsik olmayan” şeklinde gruplandırılmaktadır. İntrinsik risk faktörleri DNA replikasyonundan kaynaklanan rastgele hataları ifade etmektedir. İntrinsik olmayan risk faktörleri ise bireye özgü olarak, endojen (iç kaynaklı) ve ekzojen (dış kaynaklı) risk faktörlerinden oluşmaktadır. Ayrıca kanserin karmaşık bir etyopatogenez gösterdiği ve çeşitli faktörlerin birbirleriyle etkileşerek (örneğin; gen-gen veya gen-çevre etkileşimleri) tümör gelişiminde rol oynayabileceği akılda tutulmalıdır (Wu *et al.* 2018).

Yetişkin bir bireyde kanser gelişimi, hücre büyümesini kontrol eden birçok gendeki çoklu mutasyonların yanı sıra tümör hücrelerinin ve kanserin nihai büyümesini kolaylaştıran ya da hızlandıran tümör mikroçevresindeki metabolik değişikliklerin bir sonucudur. Çoğu yaşla birlikte çarpıcı bir biçimde artan insan kanserlerinin insidansı incelenerek bu hipotezin doğruluğu kanıtlanmıştır. Örneğin, kalın bağırsak kanseri insidansının 30 ila 80 yaşları arasında yaklaşık 1000 kat arttığı bilinmektedir. Bunu açıklayabilmek için hayvanlarda çok erken karsinogenez çalışmaları başlatılmış olup böylece bu gözlemin biyolojisini anlamaya dair önemli içgörüler elde edilmiştir. Çalışmaların sonuçları bir karsinojenin (genellikle DNA’da

bir değişiklik meydana getirerek kansere neden olan bir ajan) uygulanması ve kanserin gerçek tespiti arasında uzun bir gecikme süresi olduğunu ortaya koymaktadır. Bu alışmalar aynı zamanda genellikle DNA’yı mutasyona uğratan “başlatıcı (initiator)” ve mutasyon olayından sonra etkinlik gösteren “destekleyici (promotor)” ajanların iş birliğiyle hücre büyümesi sürecinin başlatıldığı ilkesini de doğurmuştur (Golemis *et al.* 2018).

Bu tür gözlemler 1950’li yıllarda “kanserin tek bir hücre içindeki bir dizi olayın nihai sonucu olduğu” önerisine yol açmıştır. Matematiksel modellemede ise kolon kanseri gibi yetişkinlerde görülen birçok insan kanserinin gelişiminde 6 adet olaya ihtiyaç duyulabileceği ileri sürölmüştür. Günümüzde hayvan modellerinde ve insanlarda gerçekleştirilen onlarca yıllık araştırmaların sonuçları “ok aşamalı karsinogenez” modelini desteklemektedir. Hücre büyümesi süreci hücrelerin büyümesini sağlayan “onkogenler” veya anormal büyümesini geciktiren “tümör baskılayıcı genler” gibi spesifik genlerde meydana gelen değişiklikleri takiben uyarılmakta ve başlatılmaktadır. Hücre popölasyonu genişledikçe tek bir hücrede bir dizi ek olayın ortaya çıkma ihtimali, bu hücrenin kontrol noktalarından, apoptozdan ve bağışıklık hücrelerinden kaçınmasıyla birlikte içinde gelişerek metastaz yapabileceği bir mikroçevreyi yeniden şekillendirme yeteneği kazanmasına dek artış göstermektedir. Onkogenlerde veya tümör baskılayıcı genlerdeki değişiklikler, DNA dizilerini etkileyen değişiklikler veya bu genlerin ekspresyonunu kontrol eden epigenetik değişikliklerdir (Golemis *et al.* 2018).

İnsan kanserlerinin çoğunda kanser oluşumuyla sonuçlanan tüm değişiklikleri mutlak olarak belirleyebilmek için kaç tane bağımsız olayın gerekli olduğunu pratik olarak ortaya koymak pek mümkün değildir. Bununla birlikte hem mutasyon kaynaklı değişikliklerin hem de kanserin ilerlemesine dahil olan süreçlerin intrinsik veya ekstrinsik olaylardan kaynaklanabileceği açıktır. Örneğin; DNA replikasyonundaki hataların ve ardından onarımdaki hataların mutasyonlara neden olması intrinsik bir mekanizmadır. Ayrıca mutajenik özellik taşıyan karsinojenler mutasyona neden olarak ekstrinsik mekanizmalar üzerinden etkinliklerini gösterebilmektedir. Obezite gibi önlenabilir ekstrinsik faktörlere yanıt olarak intrinsik yolla üretilen reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species; ROS) gibi bazı potansiyel mutajenlerin vücutta zararlı oranlarda üretilmesiyle ortaya çıkan mutasyonlar ise daha karmaşık bir oluşum sürecini ihtiva etmektedir. Eğer ortamda herhangi bir mutasyon kaynağı mevcutsa hücrenin biyokimyasındaki intrinsik ve ekstrinsik değişiklikler, mutasyon süreci başlatılmış olan hücrelerin ve kanser hücrelerinin büyümesini çeşitli metabolik mekanizmalar üzerinden hızlandırabilmektedir. Günümüzde yaygın olarak kabul edilen “ok aşamalı karsinogenez”

hipotezine ek olarak, yaşlanma sürecinde meydana gelen sistemik değişikliklerin de kanseri teşvik etmesinin muhtemel olduğu düşünülmektedir (Golemis *et al.* 2018).

## **Meme Kanseri**

### **Tanımı**

Meme kanseri, meme dokusundan köken alan hücrelerin düzensiz olarak büyümesi ve çoğalması anlamına gelmektedir. Sağlıklı erişkin kadınlarda meme dokusu glandüler ve stromal (destekleyici) elemanlardan oluşmaktadır. Glandüler dokularda süt üreten bezler (lobüller) ve süt kanalları bulunmakta iken stromal dokular ise değişik oranlarda adipoz ve fibroz bağ dokusu içermektedir (Kosova ve Arı 2008). Memede ayrıca hücresel sıvıların ve artıkların uzaklaşmasını sağlayan lenfatik doku mevcuttur (Sharma *et al.* 2010).

Tümörler memenin farklı bölgelerinde gelişebilmektedir ve çoğu tümör memedeki benign değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte malign meme tümörlerinin yaklaşık %95'i karsinomdur ve bu durum meme kanserindeki malign tümörlerin, süt kanalları ve lobüllerin epitel yüzeyinden oluştuğu anlamına gelmektedir (Guinebretiere *et al.* 2005).

Meme kanseri meme bezi dokusundaki herhangi bir hücrede meydana gelebilmekle birlikte benzersiz histopatolojik alt tiplere sahiptir. Bu durum, alt tiplerin morfolojik özelliklerinin çok çeşitli, immünohistokimyasal profillerinin farklı ve spesifik bir klinik seyir ve sonuca sahip olmasından ileri gelmektedir (Do Nascimento and Otoni 2020). Çoğu meme kanseri süt kanallarını kaplayan hücrelerde ortaya çıkmaktadır (duktal kanserler). Buna ek olarak, bazı meme tümörleri de lobülleri kaplayan hücrelerde başlamaktadır (lobüler kanserler). Memenin diğer dokularında meydana gelen tümöral oluşumlar ise nispeten az görülme sıklığına sahiptirler (Sharma *et al.* 2010).

Meme karsinomları terminal duktal lobüler ünitesinin (terminal duct lobular unit; TDLU) aynı segmentinden köken almakta ve genellikle duktal karsinoma in situ (ductal carcinoma in situ; DCIS) ve invaziv duktal karsinom (invasive ductal carcinoma; NOS) olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. DCIS, süt kanalları ve lobüllerle sınırlı epitel hücrelerinin invaziv (infiltratif) olmayan ve potansiyel olarak malign bir intraduktal proliferasyondur. Burada “invaziv karsinom” kavramı kanal duvarından stromaya nüfuz eden meme dokusunda bulunan neoplastik hücrelerin malign anormal proliferasyonunu ifade etmektedir. Bununla birlikte diğer bir meme kanseri çeşidi olan NOS, en yaygın görülen invaziv meme kanseri şeklidir ve yeni teşhis edilen meme kanseri vakalarının yaklaşık %50 ila %80'ini oluşturmaktadır. Vakaların geri kalanı ise invaziv lobüler karsinom (invasive lobular carcinoma; ILC) kapsamına dahil edilmektedir (Makki 2015; Do Nascimento and Otoni 2020).

Günümüzde invaziv meme karsinomunun alt tipleri ve histolojik varyantları iyi bilinmekte ve güncel histopatolojik uygulamalarda hücresel karakteristikler, hücre sayısı, salgı tipi ve yeri, immünohistokimyasal profil ve tümörün meme dokusundaki kesin konumundan ziyade, esas olarak “tümörün alt tipleri” ve “duktal ya da lobüler olup olmadığı” belirlenmektedir (Makki 2015; Do Nascimento and Otoni 2020).

### **Epidemiyolojisi**

Meme kanseri dünya çapında en sık rastlanan malign tümörlerden biridir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedenidir (Falah *et al.* 2017). 2018’de 2,1 milyon kadına yeni meme kanseri teşhisi konulduğu ve bu hastalıktan muzdarip olan 626,679 kadının öldüğü tahmin edilmektedir. Küresel meme kanseri insidansı 1980’de 641,000 vakadan başlayarak ve 2010 yılında 1,6 milyondan daha yüksek bir değere çıkarak yıl bazında %3,1’lik bir oranla artmaktadır ki bu eğilimin devam etmesi muhtemeldir (Harbeck *et al.* 2019).

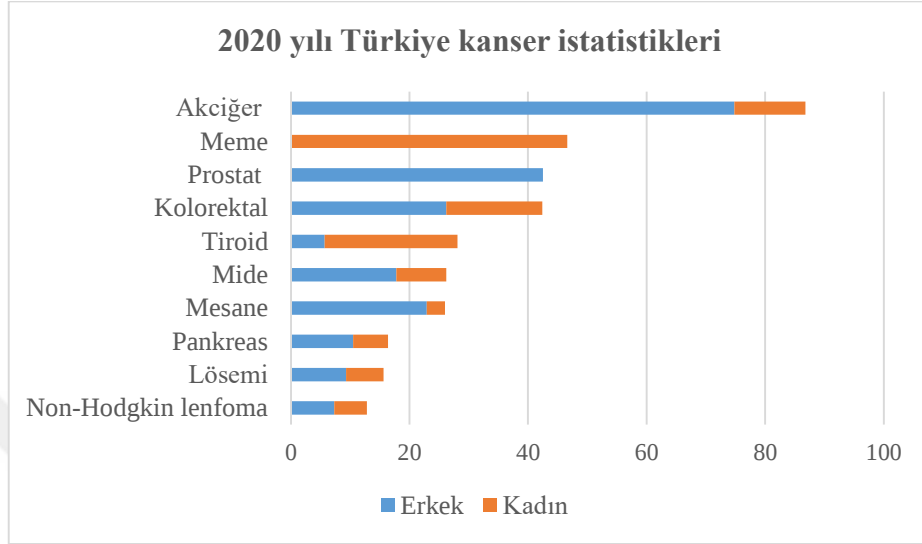
Birçok düşük ve orta gelirli ülkede meme kanseri insidansı nispeten düşük olmasına rağmen bireylerin kliniğe başvuruda gecikmesi, hastalığın geç tanınması ve tedavi olanaklarının sınırlı olması gibi etkenlerden ötürü mortalitesi genellikle daha yüksek olmaktadır. Ayrıca gelişmekte olan ülkelere meme kanseri teşhisi konan hastalar, gelişmiş ülkelerdeki meme kanseri hastalarından yaklaşık 10 yaş daha gençtir. Bununla birlikte tümörün biyolojisi de etnik kökene göre değişim göstermekte ve bu durum ölüm oranlarındaki farklılığı etkilemektedir (Harbeck *et al.* 2019). Meme kanseri türlerinin yaklaşık olarak %85’i, ailesinde meme kanseri öyküsü olmayan kadınlarda görülmektedir. Bunlar, kalıtsal mutasyonlardan ziyade, genel olarak yaşlanma sürecinin bir sonucu olarak meydana gelen genetik mutasyonlar nedeniyle oluşmaktadır (Pham 2015).

Türkiye’de meme kanseri insidansı 1994-2015 yılları arasında yaklaşık olarak iki kat bir artış göstermiştir. Bununla birlikte 2020 yılı içerisinde toplam 24,175 adet kadına meme kanseri teşhisi konulduğu rapor edilmiştir (Özmen *et al.* 2019; Ates and Bilgin 2021). GLOBOCAN’ın 2020 verilerine bakıldığında ise ülkemizde erkeklerin meme kanseri açısından risk grubunda olmadıkları görülmekte ve kadınlar arasında en sık rastlanan kanser çeşidinin “meme kanseri” olduğu bilgisine ulaşılmaktadır (Şekil 1). Ayrıca meme kanseri, cinsiyet ayrımı olmaksızın, akciğer kanserinden sonra ölüme en çok neden olan kanser türü olarak 2. sırada yer almaktadır (Şekil 2).

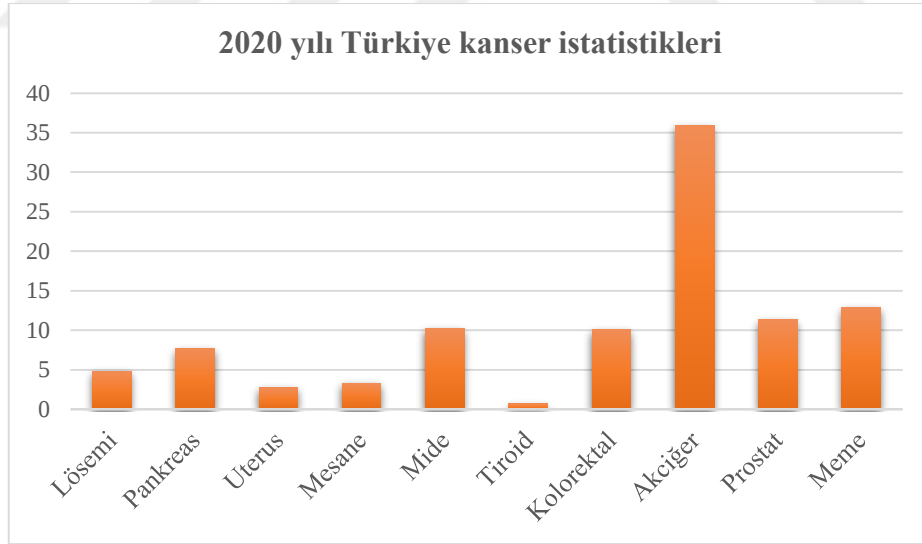
### **Meme kanseri araştırmalarında kullanılan hücre hatları**

Kanser araştırmalarında kullanılan *in vitro* ve *in vivo* hayvan modelleri karsinogenlerin tanımlanması, yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesi ve antikanser ilaçların taranmasına olanak

sağlamaktadır. Herhangi bir *in vitro* tümör modelinin en önemli bileşenlerinden biri bir kanser hücresi kaynağıdır. Kanser hücre hatlarının büyümesi kolaydır ve bu tip hücre toplulukları, deneysel sonuçların doğrudan karşılaştırılmasına izin vermekle birlikte tümör hücre biyolojisinin proliferasyon, apoptoz ve metastaz gibi moleküler mekanizmalarının incelenmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Katt *et al.* 2016; Çilesiz 2018).



**Şekil 1.** Erkeklerde ve kadınlarda en sık rastlanan ilk 10 kanser türünün yaşa göre standartlaştırılmış (Dünya) insidans oranları (her 100,000 kişi başına yıllık yeni kanser vaka sayısı) (GLOBOCAN 2020; Özdoğan 2021)



**Şekil 2.** Erkeklerde ve kadınlarda en sık rastlanan ilk 10 kanser türünün yaşa göre standartlaştırılmış (Dünya) mortalite oranları (her 100,000 kişi başına yıllık kansere bağlı yaşam kaybı sayısı) (GLOBOCAN 2020; Özdoğan 2021).

*In vivo* modellerle canlı bir sistemdeki metastatik sürecin karmaşıklığı simüle edilebilmektedir ancak bu sırada uygulama basamaklarının tek tek görselleştirilmesi ve nicel mekanik verilerin çıkartılması oldukça zordur. Öte yandan *in vitro* modellerde yalnızca sınırlı bir tümör mikroçevresi yakalandığından dolayı fizyolojik alaka düzeyi azalmış olup bu durum

çoğu deneysel değişkenin kontrolüne ve nicel analizine izin vermektedir (Katt *et al.* 2016). Yine de öngörülebilir bir gelecekte, geliştirilen yeni bir tedavinin toksisite risklerinin mutlaka hayvan deneyleriyle test edilmesi gerekecektir. Çünkü şu anda organizmanın genel toksisitesini değerlendirmenin tek yolu budur. Uygun *in vitro* hücre hattı testlerinde başarılı olduğu kanıtlanan ilaç rejimleri bir sonraki aşamada sınırlı sayıda hayvan modelinde test edilmelidir (Wilding and Bodmer 2014).

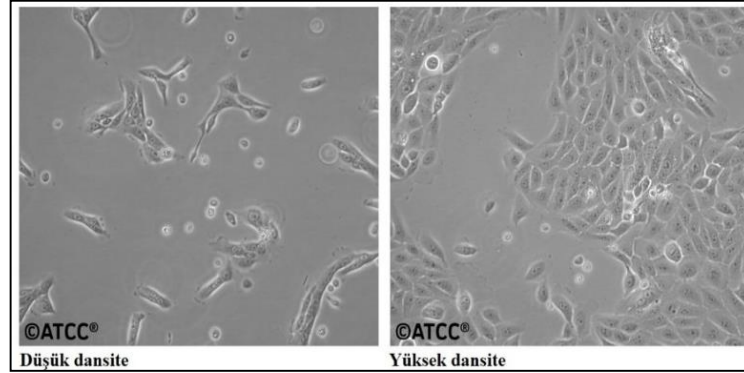
Genel olarak hücre hatlarının primer tümörlerden daha fazla genomik değişikliğe sahip olma eğiliminde oldukları bilinmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, belirli bir laboratuvar araştırması için en uygun hücre hattını/hatlarını seçmek birtakım teknik zorluklar içermektedir. Bu yüzden tümör örneklerine benzer profillere sahip hücre hatlarını seçmek daha uygundur. Örneğin; protein fosforilasyonu gibi sinyalizasyon yollarındaki değişiklikleri, belirli yollardaki mutasyonları veya bilinen onkogenik yollardaki genel değişiklik düzeylerini incelemek için tümöre en çok benzeyen bir hücre hattı ya da hücre grubu seçilmelidir (Sinha *et al.* 2015).

Kanser sferoidleri, tümör yanıtını ve tümörün kemoterapötiklere, kombinasyon terapilerine (örneğin; kemoterapötikler ve küçük molekül inhibitörleri), hedefe yönelik kemoterapiye ve ilaç dağıtım sistemlerine duyarlılığını değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Sferoidler hayvan testlerinin azaltılmasında ilaç adaylarının negatif seçimi ve yeni ilaç geliştirmede pozitif seçim için sıklıkla kullanılan yüksek verimli araçlardır. Antikanser ilaç tarama süreci tipik olarak sferoid oluşumunu, hücrelerin ilaçla inkübasyonunu, sferoid bütünlüğü ve büyüme kinetiklerinin ölçülmesini ve ayrıca hücre sağkalımının belirlenmesini içermektedir. Koloni oluşturma testi tek bir hücrenin bir koloniye dönüşme yeteneğini ölçmeye yaramakta ve günümüzde klonojenik sağkalımı değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır (Katt *et al.* 2016).

### ***MCF10A insan sağlıklı meme epitel hücre hattı***

MCF10A hücre hattı (Şekil 3), benign fibrokistik hastalığı olan bir hastadan elde edilen, kendiliğinden ölümsüzleştirilmiş ve malign olmayan bir meme epitel hücre dizisidir (Bessette *et al.* 2015). MCF10A, *p16* lokusu kaybı dahil olmak üzere, kültüre uyarlanmış meme epitel hücrelerinin tipik genetik modifikasyonlarıyla stabilize edilen ve diploide yakın bir karyotipe sahip olan hücrelerin bir topluluğudur. Bu hücreler normal *p53*'ü eksprese etmekte, yumuşak agarda koloni oluşturmamakta ve bağışıklığı baskılanmış olan farelerde çoğalamamaktadır (Imbalzano *et al.* 2009). Ayrıca östrojen reseptörlerini (estrogen receptor; ER) eksprese etmemektedir. *In vitro* çalışmalarda en yaygın kullanılan sağlıklı meme hücresi modeli

MCF10A insan meme epitel hücre hattıdır (Qu *et al.* 2015). MCF10A'nın klinikopatolojik özellikleri Tablo 2'de detaylı olarak verilmiştir.



**Şekil 3.** MCF10A hücre hattının mikroskoptaki görünümü (Kaynak: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection; ATCC), internet sayfası [www.atcc.org](http://www.atcc.org))

**Tablo 2.** MCF10A ve MCF-7 Hücre Hatlarının Moleküler Bilgileri, Kültür Koşulları ve Köken Aldıkları Tümörlerin Klinik Özellikleri (Kao *et al.* 2009; Gu *et al.* 2016; Dai *et al.* 2017)

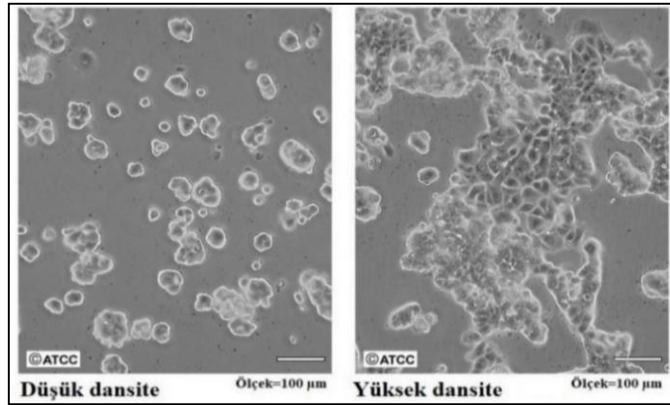
|                                   | MCF10A                | MCF-7                    |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| ER Durumu                         | Negatif               | Pozitif                  |
| Progesteron Reseptörü (PR) Durumu | Negatif               | Pozitif                  |
| HER2 Durumu                       | Negatif               | Negatif                  |
| BRCA1 Mutasyonu                   | Yok                   | Yok                      |
| Alt Tipi                          | Bazal B               | Luminal A                |
| Bazal Medyumu                     | DMEM/Ham F12          | RPMI, DMEM               |
| Tümör Tipi                        | Fibrokistik hastalık  | İnvaziv duktal karsinoma |
| Kaynağı                           | Redüksiyon mamoplasti | Plevral efüzyon          |

#### ***MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı***

MCF-7 hücre hattı (Şekil 4), günümüzde insan meme kanseriyle ilgili yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılan meme kanseri hücrelerinden meydana gelmektedir (Comşa *et al.* 2015; Lee *et al.* 2015a). Bu hücreler ilk defa Soule *et al.* (1973) tarafından metastatik hastalığı olan 69 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. MCF-7 ismi 1973'te kurulan Michigan Cancer Foundation-7 (Michigan Kanser Vakfı-7)'nin baş harflerinin kısaltılmasıyla oluşturulmuştur (Holliday and Speirs 2011).

MCF-7 hücre hattının, antikanser ilaçlar da dahil olmak üzere, dünya çapında gerçekleştirilen meme kanseri araştırmaları için uygun bir model hücre dizisi olduğu kanıtlanmıştır. Reseptör durumu ER-pozitif (ER+) ve PR-pozitif (PR+)'tir, ayrıca luminal A moleküler alt tipine sahiptir (Tablo 2). Normalde düşük metastatik potansiyele sahip olduğu

düşünülmektedir. Bununla birlikte zayıf derecede agresif ve invaziv olmayan bir hücre hattıdır (Comşa *et al.* 2015).

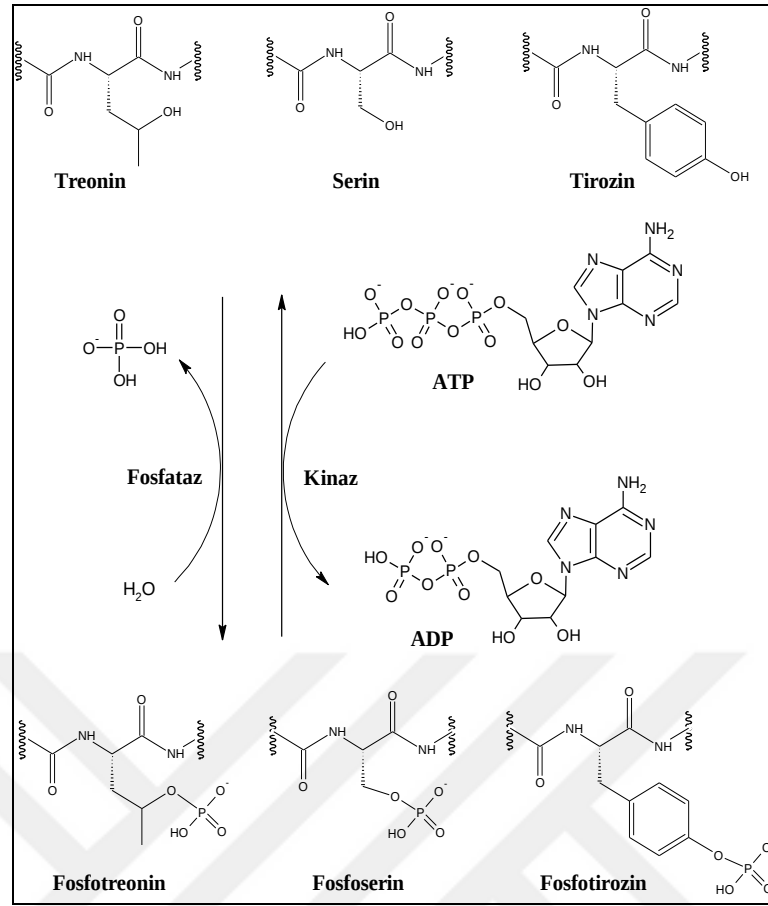


**Şekil 4.** MCF-7 hücre hattının mikroskoptaki görünümü (Kaynak: ATCC, internet sayfası [www.atcc.org](http://www.atcc.org))

### **Kanserle İlişkili Önemli Hücresel Düzenleyici Mekanizmalar: Fosforilasyon ve Defosforilasyon**

Posttranslasyonel modifikasyonlar (PTM'ler), translasyon işleminden sonra bir proteinin bir veya daha fazla amino asit kalıntısına kovalent olarak bazı kimyasal grupların eklenmesi sürecidir. Böylece ilgili proteinin fizikokimyasal özellikleri, geometrik konformasyonu, hücre altı lokasyonu ve diğer proteinlerle etkileşimi değiştirilebilmektedir. Bugün 300'den fazla PTM türü bilinmektedir, ancak bunlar arasından fosforilasyon, asetilasyon, übikitinasyon, *N*-glikozilasyon, nitrifikasyon ve propiyonilasyon dahil olmak üzere sadece birkaçı incelenmiştir (Şekil 5) (Liu *et al.* 2021c).

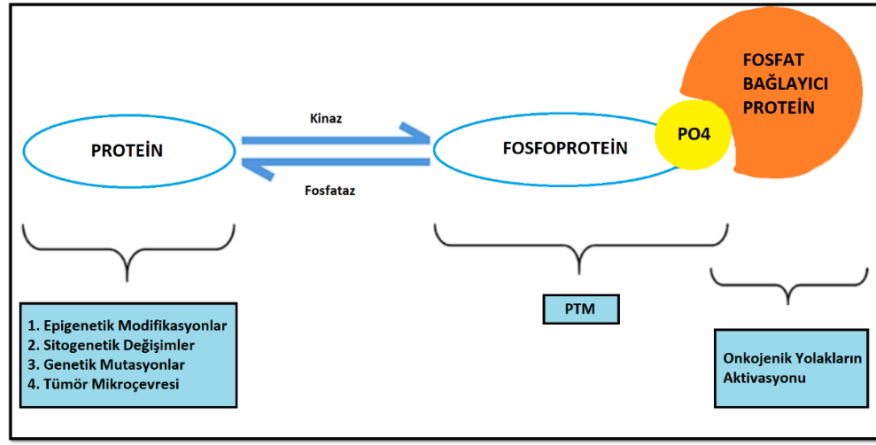




**Şekil 6.** Kinazlar ve fosfatazlarla katalizlenen fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonları (Bialy and Waldmann 2005)

Fosforilasyonun hücresel fonksiyonları düzenlemede önemli bir adım olduğu ve insan proteomunun yaklaşık %30'unun hücre bölünmesi, protein degradasyonu, sinyal iletimi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve protein etkileşimleri gibi kritik hücresel süreçlerde fosforile edildiği bilinmektedir. Bununla birlikte protein fosforilasyon bölgesinde meydana gelen mutasyonlar malign bir tümörün oluşması ve gelişmesine yol açabilmektedir. Günümüzde MAPK, PI3K/Akt, tirozin kinaz (TK), katedrin-katenin kompleksi, nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ve IκB (inhibitor of NF-κB; NF-κB inhibitörü) proteinleri, siklin bağımlı kinaz (cyclin-dependent kinase; CDK) ve transforme edici büyüme faktörü beta (transforming growth factor-beta, TGF-β) sinyalizasyonu gibi birçok fosforilasyon yolağının kanser gelişiminde önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (Liu *et al.* 2021c).

Fosforilasyon sinyalini artıran herhangi bir hata hücre büyümesini uyarak hücresel transformasyon sürecini başlatabilmektedir. Hücrelerde fosforilasyon sinyalinin dengesini korumak ve büyümeyi durdurmak amacıyla fosfotirozil (phosphotyrosyl; pTyr) proteininden -PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> grubunun çıkartılması gerekmektedir (defosforilasyon olayı). Aksi takdirde fosfoproteinden ayrılmamış olan -PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> gruplarına bağlanabilen “fosfat bağlayıcı proteinler”, onkojenik yolların aktivasyonuna neden olabilmektedir (Şekil 7) (Lee *et al.* 2008).

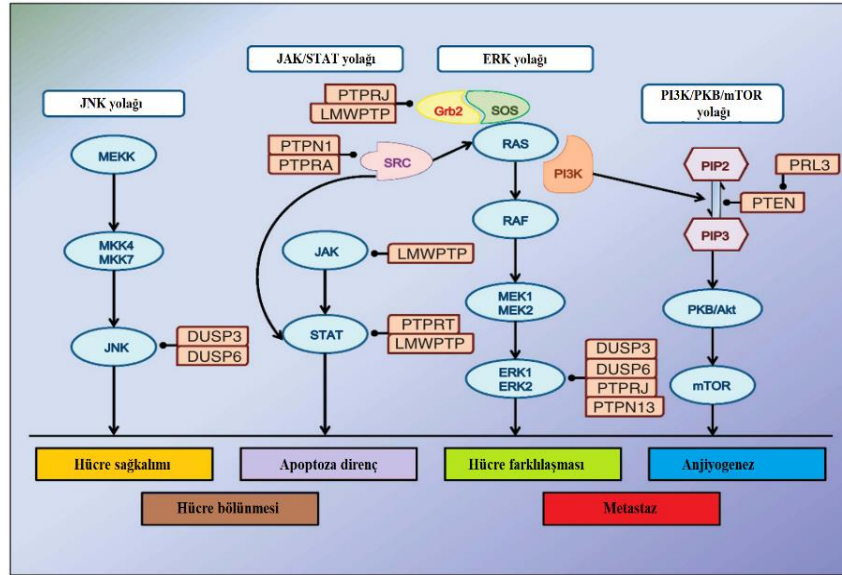


**Şekil 7.** Fosfosinyalizasyon ağı (Ardito *et al.* 2017)

Fosforilasyon-defosforilasyon kaskadındaki bir düzensizliğin kanser, diyabet ve otoimmün bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir (Zhang 2001; Lee *et al.* 2015b). Ayrıca anormal fosfataz aktivitesiyle ilişkili hastalıklar da iyi karakterize edilmiştir. Diğer taraftan PTF'ler için kinaz muadillerine göre daha az sayıda kimyasal molekülün varlığı ve geliştirilecek olan ilaçlarda fosfataz enzimlerinin yapısal benzerlikleri nedeniyle son derece ciddi yan etki riskinin bulunması gibi durumlar PTF'lerin büyük ölçüde undruggable olduğu düşüncesine katkı sağlamaktadır (Wang *et al.* 2019).

### Kanser Gelişiminde PTF Enzim Ailesinin Rolü

PTF (EC 3.1.3.48) enzimleri, katalitik bölgelerindeki amino asit dizilerine göre sınıf I, II, III ve IV olarak dört farklı gruba sınıflandırılabilen ve 107 üyeden oluşan büyük bir protein ailesidir (Pardella *et al.* 2020; Shen *et al.* 2020). PTF'ler fosforillenmiş tirozin kalıntısı taşıyan proteinlerden  $-PO_4^{3-}$  gruplarının uzaklaştırılması ve böylece aktive olmuş reseptör tirozin kinazların (RTK) aktivitelerinin sonlandırılmasından sorumludur (Doğan ve Güç 2004; Zhao *et al.* 2018). Ayrıca, PTK'lara benzer şekilde, hücrelerde kontrolsüz çoğalma, farklılaşma, anjiyogenez ve metastaz olaylarıyla ilişkili anormal hücrel süreçlerde rol oynayan çeşitli sinyalizasyon yollarının açılıp kapanmasında moleküler anahtarlar olarak hareket etmektedirler (Şekil 8) (Stebbing *et al.* 2014).



**Şekil 8.** Kanserde PTF'ler tarafından düzenlenen sinyalizasyon yollarına genel bir şematik bakış (Stebbing *et al.* 2014)

PTF'ler sinyal iletim yollarının hem negatif hem de pozitif düzenleyicisidirler. Böylece PTK'ların onkojenik rolünü aktive veya inhibe etmektedirler. Fonksiyonlarını PTK'ları doğrudan defosforilleyerek ya da dolaylı olarak onların akış aşağı (downstream) hedeflerine müdahalede bulunarak göstermektedirler. Bu noktada, PTF enzimlerinin tümör ilerlemesindeki ikili rolünün daha iyi anlaşılmasıyla farklı tümör sınıflarını hedef alan yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Pardella *et al.* 2020).

PTF aracılı sinyalizasyon yollarında meydana gelen bozulmaların kanser, otoimmün ve metabolik hastalıklar, nörolojik ve kardiyovasküler rahatsızlıklar dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın patogeneze katkıda bulunduğu bilinmektedir (Hendriks *et al.* 2012; Hendriks and Pulido 2013; Bollu *et al.* 2017; Hale *et al.* 2017; Kim *et al.* 2018). Ayrıca şimdiye dek yapılan çalışmalarda, çok sayıda fosfataz enziminin de farklı kanser türlerinin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin, çeşitli fosfatazları kodlayan *PTEN*, *PTPN1/9/10/12/13*, *CDC25A/B*, *DUSP3/4/5/23*, *PPP2R2A*, *PPM1D* ve *EYA2* genlerinde meydana gelen farklı türden değişikliklerin meme kanseri oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Stebbing *et al.* 2014).

PTF enzimlerinin fonksiyonlarının bozulmasına yol açan başlıca sebepler, genom çalışmaları esnasında ilgili proteinleri kodlayan genlerde yapılan değişiklikler ve bunun bir sonucu olarak proteinin amino asit diziliminde meydana gelen değişimler (tek bir amino asit polimorfizmi dahi olabilmektedir), çeşitli nedenlerden kaynaklanan aşırı protein ekspresyonu veya proteinlerin ekspresyon yeteneklerini kaybetmeleridir. Örneğin; bazı kanser ve yaygın malignite türlerinde *PTEN* (fosfataz ve tensin homolog geni) geninin kaybına bağlı olarak SHP-1 (SH2 domaini içeren PTF-1) enzim ekspresyonu azalmakta ve karsinogenez meydana

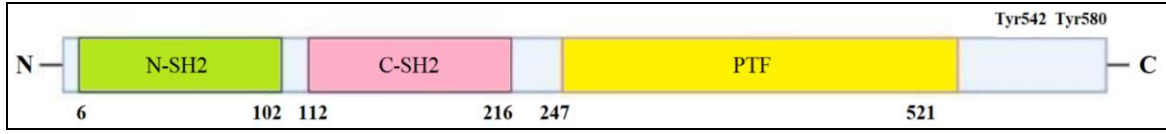
gelmektedir. Tümör baskılayıcı olarak işlev gören birkaç PTF enziminin yokluğu veya sıklıkla mutasyona uğraması ise kolon kanserinin gelişimine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca karaciğer yenileyici fosfataz-3 (phosphatase of regenerating liver-3; PRL-3) enziminin aşırı ekspresyonu sonucunda metastatik kolon kanserlerinin meydana geldiği bilinmektedir (Barr 2010).

PTF enzimleri hücrel lokalizasyonları, spesifiklikleri ve fonksiyonları temel alınarak üç farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlar arasında özellikle fonksiyonlarına göre sınıflandırma yaklaşımı antikanser ilaç geliştirme çalışmalarının en önemli odak noktalarından biridir. Bu sınıflandırma türünde PTF enzimleri “tümör baskılayıcı” ve “onkojenik” olarak iki farklı gruba ayrılmaktadır. Kanserde tümör baskılayıcı PTF enzimlerinde görülen fonksiyon kaybı genellikle gen delesyonu, mutasyonu ve promotör bölgelerin metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu olay sinyalizasyon yollarının hiperaktivasyonuna yol açmakta ve tümör oluşumunu teşvik etmektedir. Ayrıca kanserde tümörün oluşması, büyümesi ve metastazını takiben, vücutta PTF enzimlerinin ekspresyon seviyelerinin artışı ve böylece hastalarda sağkalım oranlarının azaldığı bilinmektedir. Bu bilgilerden hareketle, “tümör baskılayıcı fosfatazların yeniden aktivasyonu” veya “onkojenik fosfatazların inhibisyonu” yoluyla fosfataz ailesinin üyelerinin kanser tedavisinde hedeflenebileceği sonucuna varılmaktadır. Örneğin; literatürde onkojenik özelliklere sahip olduğu kabul edilen bazı PTF enzimlerinin meme kanserinde aşırı eksprese edildiği ve bu hastalıkla savaşmada yeni stratejiler geliştirme fırsatı sağladığı bildirilmiştir (Wang *et al.* 2006; Hu *et al.* 2014; Spring *et al.* 2015; Pardella *et al.* 2020; Shen *et al.* 2020). Bugüne kadar insan genomunda bulunan 100’den fazla fosfataz enziminden sadece birkaçının (örneğin; *PTPN11* ve *PTP1B*) kanser tedavisinde hedeflenebilir olup olmadığı araştırılmıştır ve bu biyolojik hedeflerin çoğu için klinik çalışmaların gerçekleştirilmesinden önce önemli temel araştırmaların yapılması gerekmektedir (Hoekstra *et al.* 2016; Bollu *et al.* 2017).

Günümüzde onkojenik PTF’lerin tümörün ilerlemesini desteklediğine yönelik kanıtlar artmasına rağmen şimdiye dek elde edilen inhibitörlerin sayısı hala son derece sınırlıdır. Bunun bir nedeni, PTF’lerin undruggable olması ve farmakolojik inhibitörlerinin tasarımlarının uzun bir süredir gecikmesidir. Diğer bir nedeni ise PTF enzimlerine ait aktif bölgelerin doğal karakteristikleri nedeniyle hücre içinde aktivite gösterebilecek spesifik inhibitörlerin geliştirilmesinde yaşanan zorluklardır. Yüksek oranda pozitif yüke sahip PTF aktif bölgesini hedefleyebilmek için negatif yüklü moleküllerin tanımlanması gerekmektedir ancak böyle moleküller de hücre geçirgenliği ve biyoyararlanım açısından yetersiz olacaktır. Alternatif olarak, yeni allosterik inhibitörlerin tanımlanması, hücre geçirgenliği nispeten yüksek olan ve

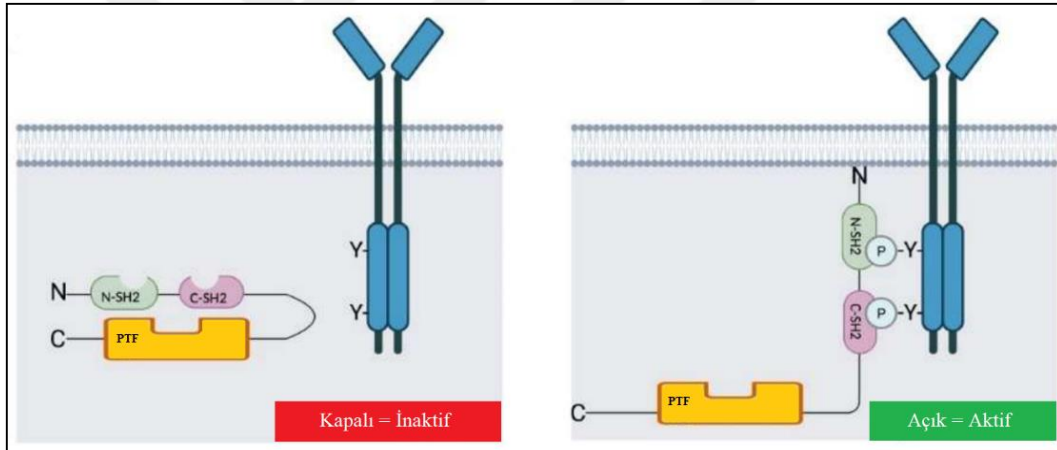


(Tyr542) kalıntısı, SHP-2'nin kararlı hal inhibisyonunu hafifletmek amacıyla N-SH2 domainiyle intramoleküler etkileşime girerken; fosforile edilmiş Tyr580 ise C-SH2 domainiyle etkileşime girerek fosfataz aktivitesini uyarmaktadır (Wang *et al.* 2021a).



**Şekil 10.** SHP-2 enzimine ait N-SH2, C-SH2 ve PTF domainlerinin açık konformasyondaki yerleşimi (Wang *et al.* 2021a)

Bazal durumda SHP-2 proteininin N-SH2 domaini, PTF domainine bağlanarak substrat erişimini bloke etmekte ve böylece PTF aktivitesini baskılamaktadır. SH2 domainleri uygun bir pTyr peptidine bağlandığında otoinhibitör etkileşimler ortadan kalkmakta, N-SH2 domaininin konformasyonu değişmekte (açık duruma gelir) ve enzim katalitik yönden fosfataz fonksiyonu gösteren aktif bir enzim haline dönüşmektedir (Şekil 11) (Chan and Feng 2006; Hellmuth *et al.* 2008; LaRoche *et al.* 2016; Xie *et al.* 2017).



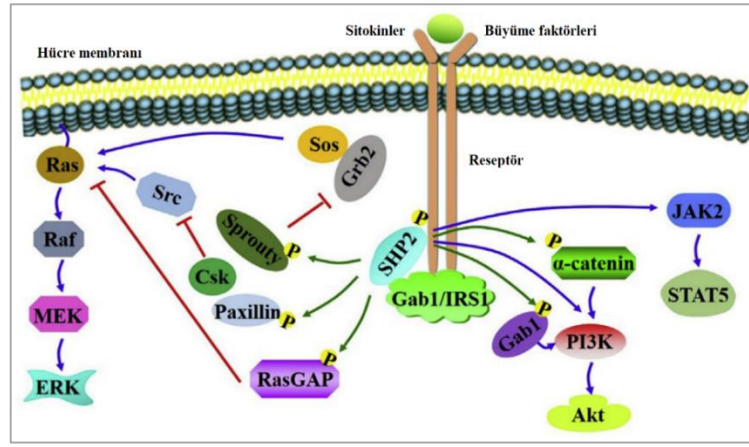
**Şekil 11.** SHP-2'nin kapalı (inaktif) ve açık (aktif) biçimlerinin şematik gösterimi (Wang *et al.* 2021a)

### Kanserde SHP-2 Enziminin Hedeflenmesi

PTF enzimleri birçok dokuda yaygın olarak eksprese edilmektedir. Ayrıca mitojenik aktivasyon, metabolik kontrol, transkripsiyon regülasyonu ve hücre göçü gibi çeşitli hücresel sinyalizasyon olaylarında düzenleyici bir rol oynamaktadır. SHP-2 enzimi, onkojenik özelliği literatürde ilk olarak bildirilen PTF enzimidir ve çoklu hücre tiplerinin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşması için gereklidir (Dong *et al.* 2021). Diğer fosfataz enzimlerinden farklı olarak, Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK kaskadı), janus kinaz (janus kinase; JAK), JAK/STAT, B ve T lenfosit zayıflatıcı (B- and T-lymphocyte Attenuator; BTLA), PI3K/Akt ve PD-1 gibi kanonik sinyalizasyon yollarının aktivasyonunu sürdürebilen sinyal güçlendirici bir bileşendir (Putlyeva *et al.* 2020; Shen *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020a; Song *et al.* 2021a).

Günümüzde SHP-2'nin RTK/Ras/ERK sinyalizasyonunun düzenlenmesine önemli katkılar sağladığı bilinmektedir. Ancak bu enzimin Ras/ERK sinyalizasyon yolağının aktivasyonunu nasıl tam olarak desteklediği halen tartışılmaktadır. Fonksiyonel çalışmalardan elde edilen bulgular SHP-2'nin aktive edilmiş PTK'lar veya sitokin reseptörleri aracılığıyla Ras aktivasyonunu geliştirdiğini göstermektedir. SHP-2 enzimi, fosfataza bağımlı ve bağımsız çoklu mekanizmalar yoluyla Ras/ERK sinyalinin sürekli aktivasyonu için gereklidir. Şekil 12'den de görüldüğü üzere, bu mekanizmalardan ilki, RasGAP alımının inhibisyonunun yanı sıra sprouty proteininin fosforilasyonu ve inaktivasyonu dahil olmak üzere Ras aktivasyonunun negatif düzenleyicilerinin tersine çevrilmesidir. İkincisi, SHP-2'nin doğrudan bir hedefi olan Tyr32 kalıntısında Ras'ın fosforilasyonunun Ras-Raf etkileşimini artırması ve böylece akış aşağı sinyalizasyonu geliştirmesidir. Üçüncüsü ise SHP-2'nin Src düzenleyici proteinleri defosforile etmesi ve sırayla Ras/ERK sinyalizasyonunu destekleyen Src aktivasyonuna yol açmasıdır. Elde edilen daha yeni kanıtlar, SHP-2'nin guanin nükleotid değişim faktörü (guanine nucleotide exchange factor; GEF) ile Ras aktivasyonunu teşvik etmek amacıyla SHP-2/Grb2/Sos/Grb2 ile ilişkili bağlanma proteini 1 (Grb2-associated-binding protein 1; Gab1) içeren fonksiyonel bir sinyalizasyon kompleksini oluşturan ana Grb2 bağlanma bölgesinin (fosforile edilmiş Tyr542) sağlanmasında bir iskele adaptörü olarak görev aldığını destekler niteliktedir. Ayrıca araştırmacılar tarafından SHP-2'nin Grb2 ile ilişkisinin ERK'in tam olarak aktivasyonu için yeterli olmadığı ve bazı büyüme faktörlerine yanıt olarak ERK'in sürekli sinyalizasyonunda Tyr580 kalıntısının da fosforile olması gerektiği hipotezi öne sürülmüştür (Shen *et al.* 2020; Wang *et al.* 2021a).

SHP-2 kanser hücrelerindeki onkogenik T lenfositlerinde PD-1 ve sitotoksik T-lenfosit-ilişkili protein-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4; CTLA-4)'ün sitoplazmik kuyruklarına alınmaktadır ve TCR zincirlerini, ZAP70'u ve yardımcı uyarıcı reseptör CD28'i defosforile ederek T hücrelerinin aktivasyonunu baskılamaktadır. Tüm bu moleküler mekanizmaların ötesinde SHP-2'nin tümör mikroçevresindeki rolünün günümüzde büyük ölçüde bilinmesine rağmen, antitümör immünitesindeki rolü halen keşfedilmeyi beklemektedir. Ancak tümör mikroçevresinin karmaşıklığı ve SHP-2'nin kanser hücrelerinin sinyalizasyon ağındaki önemli rolü göz önüne alındığında, bu enzimin terapötik potansiyelini daha iyi anlamak için hem tümör hem de bağışıklık hücrelerinde SHP-2'nin aktivitesini inhibe etmenin etkisini iyi incelemek gerekmektedir (Wang *et al.* 2021b).



**Şekil 12.** Birkaç farklı sinyalizasyon yolağının aktivasyonunda SHP-2'nin rolü (Shen *et al.* 2020)

Şekil 12'den görüldüğü üzere, SHP-2, negatif düzenleyiciler olan p120 RasGAP, paxillin ve sprouty proteinlerini defosforilleyerek ve Gab1, insülin reseptör substrat 1 (insulin receptor substrate 1; IRS1) gibi iskele proteinlerine bağlanarak Ras/Raf/MAPK yolağını düzenlemektedir. Benzer şekilde, JAK2/STAT5 yolaklarının düzenlenmesinde ve ayrıca p85 ile etkileşim yoluyla  $\alpha$ -katenin ve Gab1'i defosforile ederek PI3K/Akt sinyalinin modülasyonunda görev almaktadır (Shen *et al.* 2020).

Günümüzde SHP-2'nin aşırı ekspresyonunun farklı türdeki kanserlerin gelişimini desteklediği iyi bilinmektedir (Ma *et al.* 2020). SHP-2 hücre büyümesi, farklılaşması, hayatta kalması ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir sinyal dönüştürücü görevi görmektedir. Yapılan biyolojik analizler SHP-2'nin normal gelişim ve hematopoiezde de gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. *PTPN11* geninde meydana gelen mutasyonlar, bu genin ekspresyonunun artması veya azalması gibi deregülasyon durumları Noonan sendromu (NS), Leopard sendromu (LS), lösemiler ve solid tümörler dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarının oluşumuna yol açmaktadır (Tablo 3). Meme, mide ve prostat kanserlerinde SHP-2 mutasyonlarının nadiren meydana geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte bir onkoprotein olarak SHP-2, aşırı ekspresyon gibi diğer yollarla kanser sinyalizasyon mekanizmalarının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Shen *et al.* 2020).

**Tablo 3.** SHP-2 Enziminin İnsan Hastalıklarıyla Olan İlişkisi (Chakladar *et al.* 2020; Guo and Xu 2020)

| SHP-2 Fenotipi              | Hastalık Tanısı                                                                                                                                         |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fonksiyon kazancı mutasyonu | NS, juvenil miyelomonositik lösemi (JMML)                                                                                                               |
| Fonksiyon kaybı mutasyonu   | LS                                                                                                                                                      |
| Yüksek seviyede ekspresyon  | Meme, mide, prostat, küçük hücreli akciğer, tiroid, yumurtalık, kolon-rektum ve ağız kanseri, pankreatik duktal adenokarsinom, glioblastoma ve melanoma |
| Düşük seviyede ekspresyon   | Karaciğer kanseri                                                                                                                                       |
| Upregüle olmuş aktivite     | Lupus                                                                                                                                                   |

Meme kanseri, bugüne kadar, hem klinik hem de moleküler düzeyde iyi çalışılmış olan kanser türlerinden biridir. Ancak yapılan çalışmalarda *PTPN11*/SHP-2 ekspresyon seviyeleri ve meme kanserinin herhangi bir intrinsik moleküler alt tipi arasında bir korelasyon bulunamamıştır. SHP-2'nin aşırı ekspresyonunun ise luminal A (ER+ ve düşük proliferatif indeks (Ki-67)) ve luminal B/HER2- (ER+ ve yüksek Ki-67) hastalarında genel olarak kötü prognoz ve düşük sağkalım oranlarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Chakladar *et al.* 2020; Yuan *et al.* 2020a).

Çalışmamızda mevcut bilimsel verilerin ışığında, birçok meme kanseri hücre hattı ve dokularında SHP-2 proteininin aşırı eksprese edildiği ve bu durumun hücrelerde fenotipik bir transformasyonu indüklediği sonucuna ulaşılmıştır (Zhou *et al.* 2008; Li *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015; Guo and Xu 2020). Nitekim Shen *et al.* (2020), SHP-2'nin inhibisyonuyla kanser hücrelerinin büyümesinin engellenerek hayatta kalma oranlarının azaltılabileceği ve malign hücrelerin sağlıklı meme epiteli fenotipine farklılaşmasının teşvik edebileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte aynı çalışmada, SHP-2'nin meme kanserinde bir onkoprotein olarak işlev gördüğü ve MAPK yolağını aktive ederek kanserin başlangıcını, ilerlemesini ve metastazını desteklediği rapor edilmiştir. Böylece tarafımızdan SHP-2'nin aktivitesinin inhibe edilmesinin meme kanserinin tedavisinde etkili bir strateji olduğu bulgulanmıştır. Ek olarak Hu *et al.* (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, SHP-2'nin, ERK, JNK/SAPK, *p38*/RK ve BMK1/ERK5 sinyalizasyon yolları vasıtasıyla MAPK hücrel sinyal iletimini engelleme potansiyelinin olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, mevcut çalışma kapsamında allosterik SHP-2 inhibitörü özellikleri ilk kez rapor edilen bileşiklerin, literatürde SHP-2 yönünden aşırı eksprese olduğu bilinen MCF-7 hücre hattı üzerine antikanser aktivite gösterebileceği hipotezi de desteklenmiştir.

### **SHP-2'nin İnhibisyonuna Yönelik Antikanser İlaç Geliştirme Çabaları**

Son yıllarda potansiyel bir kanser terapötik hedefi olan SHP-2'nin küçük molekülü inhibitörlerini keşfetmek oldukça ilgi çekici bir yaklaşım haline gelmiştir. Bu noktada özellikle, SHP-2'nin allosterik bölgelerini işgal eden inhibitörlerin araştırılmasına odaklanılmaktadır (Dong *et al.* 2021; Tang *et al.* 2022; Ye *et al.* 2022).

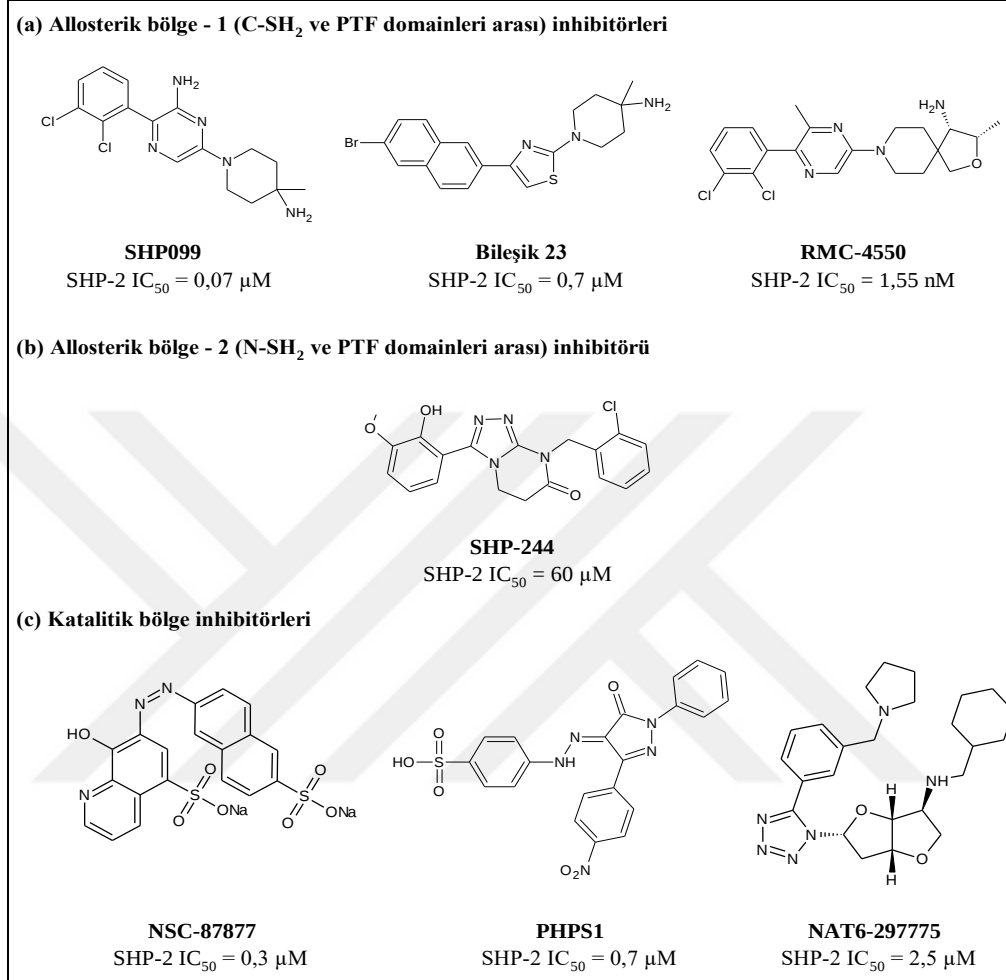
Geçmişte klinik uygulamalarda kullanılmak üzere birçok PTK inhibitörü niteliğindeki ilacın başarıyla geliştirilmiş olmasına rağmen, PTF inhibitörlerinin geliştirilmesinde bu ilaçların zayıf farmasötik özellikler göstermesi ve biyolojik fonksiyonlarının nispeten az anlaşılmasından ötürü aynı başarı sağlanamamıştır (Reddy *et al.* 2017; Xie *et al.* 2017). PTF'leri hedef alan küçük molekül inhibitörlerinin geliştirilmesi bu enzimlerin katalitik bölgelerinin yüksek oranda korunmuş olması ve pozitif yüklü yapılarından dolayı oldukça zordur. Ayrıca

literatürde SHP-2 inhibitörü olarak bildirilen bazı moleküllerin (örneğin; NSC-87877, SPI-112, NAT6-297775, PHPS1, II-B08 ve Cryptotanshinone) seçicilik bakımından diğer PTF inhibitörlerine göre tatmin edici bir üstünlük sağlamadığı bildirilmiştir (Xie *et al.* 2017). Bu nedenle ileride özellikle kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek daha etkili yeni PTF inhibitörlerinin tanımlanması ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir hedef haline gelmektedir (Reddy *et al.* 2017; Xie *et al.* 2017; Shen *et al.* 2020).

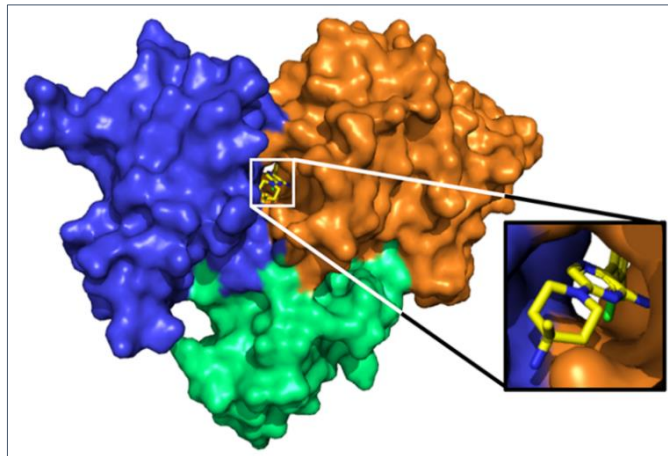
Son 20 yılda çok sayıda SHP-2 inhibitörü tanımlanmış olup bunlardan sadece birkaçının molekül yapısı Şekil 13'te verilmiştir (Song *et al.* 2021a). SHP099 bileşiği, 2015 yılında ilk allosterik SHP-2 inhibitörü olarak geliştirilmiş ve ilerleyen yıllarda kanserde SHP-2'nin biyolojik fonksiyonları üzerine daha fazla mekanik araştırmanın yapılmasını teşvik etmiştir. PTF'leri hedef alan katalitik bölge inhibitörlerinin düşük seçiciliği ve hedef dışı etkileri göz önüne alındığında, SHP099'un yabancıl tip SHP-2 (wild-type SHP-2; SHP-2<sup>WT</sup>)'yi otoinhibe olmuş (kapalı) bir konformasyonda stabilize ederek SHP-2'nin aktivitesini güçlü ve seçici bir şekilde inhibe etmesi katalitik inhibitörlere önemli bir üstünlük sağlamıştır (Şekil 14) (Wang *et al.* 2020a). Ayrıca SHP099, *in vitro* ortamda ve fare tümör ksenograft modellerinde kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ederek SHP-2 enziminin düzensizliğinden kaynaklanan kanser türlerinin tedavisinde oral kullanıma uygun geçerli bir yeni terapötik seçenek olduğunu kanıtlamıştır (Chen *et al.* 2016; Garcia Fortanet *et al.* 2016).

Yapılan çalışmalarla SHP099 molekülünün epidermal büyüme faktörü reseptörü (epidermal growth factor receptor; EGFR), FLT-3 ve KIT gibi onkogenik sürücü RTK'larla aktive edilen SHP-2 enziminin inhibisyonu yoluyla insan tümöründen türeyen hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Chen *et al.* 2016; Tani *et al.* 2020). Bununla birlikte bağışıklık sistemi baskılanmış KYSE-520 fare ksenograftları kullanılarak insan özofagus skuamöz hücreli karsinomuna yönelik gerçekleştirilen *in vivo* deneylerde SHP099'un 100 mg/kg dozda günlük olarak oral yoldan uygulanmasının farelerde mevcut tümör hacmini %97 oranında azalttığı ve tümörün büyümesini %61 oranında inhibe ederek önemli düzeyde antikanser aktivite gösterdiği saptanmıştır (Salamoun and Wipf 2016; Shen *et al.* 2020). Wang *et al.* (2021b) tarafından yapılan bir çalışmada SHP-2'nin SHP099 ile inhibisyonunun RTK/KRAS güdümlü kanserlerde umut verici bir terapötik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca SHP099'un klinikteki hastalara mitojenle etkinleşen protein kinaz kinaz (mitogen-activated protein kinase kinase; MEK), anaplastik lenfoma kinaz (ALK) inhibitörleri veya PD-1 antikoru gibi diğer antikanser ilaçlarla birlikte kombinasyon halinde verilmesinin tümör büyümesinin kontrolünde monoterapiden daha etkili sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır. Günümüzde allosterik SHP-2 inhibitörü özelliği taşıyan yalnızca 8 adet molekül

(JAB-3068, JAB-3312, TNO155, RMC-4630, RLY-1971, BBP-398, ERAS-601 ve SH3809), yetişkinlerde ileri ya da metastatik solid tümörlerin tedavisi için tek başına veya başka bir ilaçla kombinasyon halinde faz 1/2 klinik çalışmalarına kadar ilerleyebilmiştir (Tablo 4) (Liu *et al.* 2020a; Song *et al.* 2021a; Wang *et al.* 2021a; Song *et al.* 2022).



**Şekil 13.** SHP-2'nin katalitik ve allosterik bölgelerini hedefleyen bazı inhibitörlerin molekül yapıları ve IC<sub>50</sub> inhibitör konsantrasyonu değerleri (Song *et al.* 2021a)



**Şekil 14.** Allosterik inhibitör SHP099'un domainler arasındaki bir ara yüzeye eş zamanlı olarak bağlanması ve SHP-2<sup>WT</sup>'yi (Protein Veri Bankası (Protein Data Bank; PDB) kodu: 5EHR) inaktif bir konformasyonda kilitlemesi (Köhn 2020)

**Tablo 4.** Kanser Tedavisi İçin Klinikte Güncel Olarak Geliştirilmekte Olan SHP-2 İnhibitörü Bazlı Terapötikler (Liu *et al.* 2020a; NCT04843033; Wang *et al.* 2021a)

| SHP-2 İnhibitörü | Kombinasyon Partneri                                                          | Faz  | Endikasyonlar                                                                                                                                                           |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TNO155           | Tek ajan; Nazartinib [EGFR]                                                   | 1    | Gelişmiş EGFR mutanlığı veya <i>KRAS</i> G12 mutanlığı KHDAA <sup>a</sup> , özofagus SHK <sup>b</sup> , BBSHK <sup>c</sup> , melanom                                    |
|                  | Spartalizumab [PD-1]; Ribociclib [CDK4/6]                                     | 1b   | KHDAK, BBSHK, özofagus SHK, GİST <sup>d</sup> , KRK <sup>e</sup>                                                                                                        |
|                  | MRTX849 [ <i>KRAS</i> G12C]                                                   | 1/2  | <i>KRAS</i> G12C mutasyonu taşıyan ileri derecedeki solid tümörler                                                                                                      |
|                  | JDQ443 [ <i>KRAS</i> G12C]; Spartalizumab [PD-1] + JDQ443 [ <i>KRAS</i> G12C] | 1/2  | <i>KRAS</i> G12C mutasyonu taşıyan ileri derecedeki solid tümörler                                                                                                      |
|                  | Dabrafenib [BRAF V600E] + LTT462 [ERK1/2]                                     | 1    | Gelişmiş veya metastatik BRAF V600 KRK                                                                                                                                  |
| RMC-4630         | Tek ajan                                                                      | 1    | İleri derecedeki nükseden veya tedaviye dirençli solid tümörler                                                                                                         |
|                  | Cobimetinib [MEK]; Osimertinib [EGFR]                                         | 1b/2 | Nükseden/refrakter solid tümörler, gelişmiş veya metastatik EGFR mutanlığı KHDAK                                                                                        |
|                  | Sotorasib [ <i>KRAS</i> G12C]                                                 | 1    | <i>KRAS</i> G12C mutasyonu taşıyan ileri derecedeki solid tümörler                                                                                                      |
|                  | Pembrolizumab [PD-1]                                                          | 1    | <i>KRAS</i> mutasyonları ve amplifikasyonları, BRAF sınıf III mutasyonları veya NF1 LOF <sup>f</sup> mutasyonları olan ileri derecedeki ya da metastatik solid tümörler |
| JAB-3068         | Tek ajan                                                                      | 1/2a | KHDAK, KRK, PDAC <sup>g</sup> , özofagus SHK, BBSHK ve meme kanseri dahil ileri derecedeki solid tümörler                                                               |
|                  | Tek ajan                                                                      | 1    | KHDAK, KRK, PDAC, özofagus SHK, BBSHK ve meme kanseri dahil ileri derecedeki solid tümörler                                                                             |
| JAB-3312         | Tek ajan                                                                      | 1    | KHDAK, KRK, PDAC, özofagus SHK, BBSHK, meme kanseri ve diğer solid tümörler                                                                                             |
| RLY-1971         | Tek ajan                                                                      | 1    | İleri derecedeki veya metastatik solid tümörler                                                                                                                         |
| BBP-398          | Tek ajan                                                                      | 1/1b | İleri derecedeki <i>KRAS</i> G12C veya EGFR mutanlığı KHDAK, diğer MAPK yolağı değişiklikleri olan solid tümörler                                                       |
| ERAS-601         | Tek ajan; bir MEK inhibitörü                                                  | 1/1b | Spesifik moleküler değişikliklere sahip ileri derecedeki veya metastatik solid tümörler                                                                                 |
| SH3809           | Tek ajan                                                                      | 1    | İleri derecedeki solid tümörler                                                                                                                                         |

<sup>a</sup>KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, <sup>b</sup>SHK: Skuamöz hücreli karsinom, <sup>c</sup>BBSHK: Baş-boyun skuamöz hücre karsinomu, <sup>d</sup>GİST: Gastrointestinal stromal tümör, <sup>e</sup>KRK: Kolorektal kanser, <sup>f</sup>LOF: Loss of function (işlev kaybı), <sup>g</sup>PDAC: Pankreas duktal adenokarsinomu.

Genel olarak klinikte SHP-2 inhibitörlerinin antitümör etkinliğini sınırlayan prelinik ve klinik mekanizmaların biyokimyasal ve genomik olarak araştırılması, gelecekte yeni kombinasyon stratejilerinin ve yeni nesil SHP-2 allosterik inhibitörlerinin geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayacaktır (Wang *et al.* 2021a). SHP-2'nin allosterik yolla inhibisyonuna yönelik yapılan güncel çalışmalarda belirlenen inhibitörlerdeki ilaç seçiciliğinin, hücre geçirgenliğinin, oral biyoyararlanımının ve *in vivo* potensin artırılmasına odaklanılmaktadır. Böylece SHP-2'nin biyolojik fonksiyonlarının daha ileri anlaşılmasıyla birlikte geliştirilen inhibitörlerde yapılan optimizasyonlar ve farmakolojik etkilerin de iyi değerlendirilmesi yoluyla gelecekte daha fazla sayıda molekülün klinik aşamalara kadar ilerlemesi mümkün olacaktır (Shen *et al.* 2020).

### **Allosterik Modülasyonun İlaç Keşif ve Geliştirme Sürecine Etkisi**

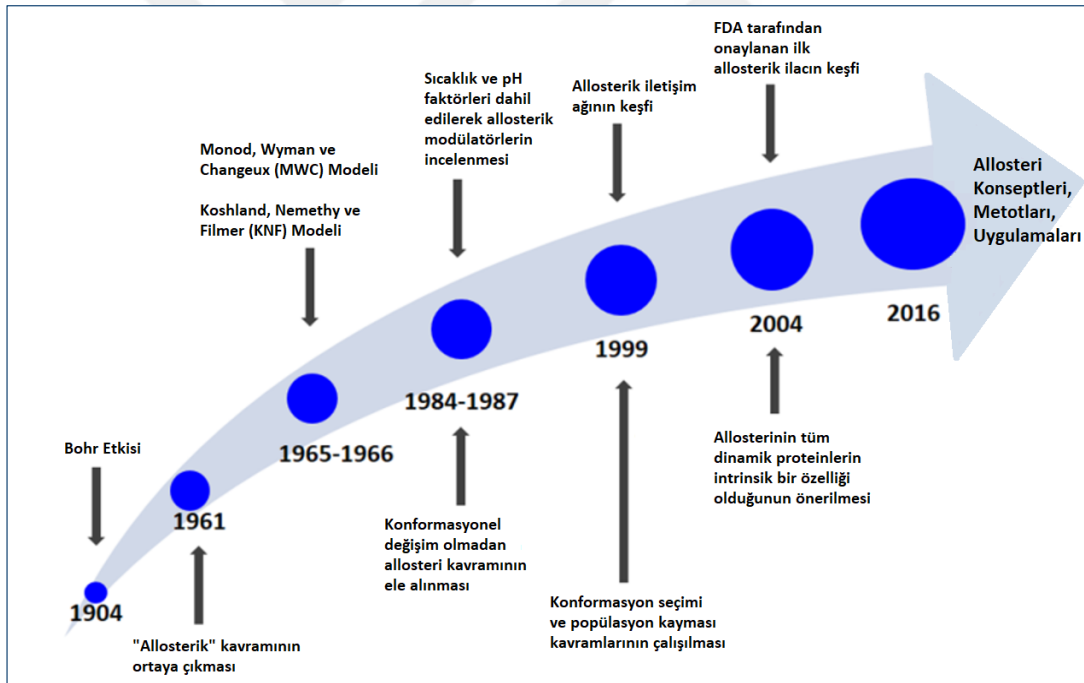
Allosteri, bir proteinin aktif bölgesinin uzağında yapılan bir pertürbasyon (müdahale) sonucunda proteinin başka bir bölgesinde ortaya çıkan reversibl fonksiyonel ve konformasyonel değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Hücrelerde yaygın olarak rastlanan allosterik düzenlemeler kovalent (örneğin; rezidü mutasyonları, fosforilasyon ve küçük moleküllerle gerçekleştirilen kimyasal reaksiyonlar) ve kovalent olmayan (örneğin; proteinler, lipidler ve DNA/RNA ile kurulan moleküller arası etkileşimler) olaylardan, çevresel düzensizliklerden (örneğin; pH, sıcaklık ve radyasyonun etkisi) ve ışık absorpsiyonundan ileri gelmektedir (Lu *et al.* 2019b; Sheik Amamuddy *et al.* 2020).

Pertürbasyon allosterik bir efektörün bağlanmasıyla başlamakta ve bir gerilme enerjisi yaratarak bir sonraki atom tabakasını hareket ettirmeye zorlamaktadır. Böylece allosterik bölgeye yakın atomların yeniden yönlendirilmesini tetiklemekte ve bu olay bir sonraki tabakayı da etkileyerek işlemin aynı şekilde devamlılığını sağlamaktadır. Allosterik pertürbasyon bir dalga gibi yayılması gibi proteinin allosterik bölgesinden ortosterik bölgesine geçmekte ve ortosterik bölgenin konformasyonel dinamiklerinin ince ayarlamalarının yapılmasına yol açmaktadır. Bu yapısal yaklaşıma ek olarak, yakın bir zamanda dinamik yönlendirmeli allosteri kavramı ortaya konulmuştur. Bu kavram allosterik pertürbasyonun proteinin ortosterik bölgesi de dahil olmak üzere tamamına yayıldığı, üstelik proteinin tüm vibrasyonel modunu ve konformasyonel popülasyonunu değiştirdiği fikrine dayanmaktadır. Günümüzde allosteri sayısız hücresel sürecin eşsiz bir şekilde düzenlenmesine katkı sağlayarak hücresel canlılığın birçok yönüyle ilişkilendirilmekte ve bu nedenle “yaşamın ikinci sırrı” olarak kabul edilmektedir (Lu *et al.* 2019b).

Allosterik regülasyon proteinler ve biyomoleküler düzeneklerin karmaşık sinyal kaskadlarını etkin hale getirmesi ve aktivite seviyelerini modüle etmesi, sinyal iletimini

sağlaması, hücrel ortamda enzim katalizi ve gen regülasyonu esnasında bağlanma partnerlerinin birbirine adapte olabilmesi için genellikle tercih edilen bir mekanizmadır. X-ışını kristallografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve çeşitli biyofiziksel tekniklerdeki gelişmeler atomik çözünürlükte makromoleküler protein sistemlerinin ve dinamik konformasyonel süreçlerin detaylı olarak incelenmesini mümkün kılmaktadır. Bu gelişmeler allosterik regülasyonun hesaplamalı ve deneysel çalışmalarının entegrasyonunu kolaylaştırmış olup aynı zamanda yeni kavramsal bakış açılarının oluşmasına da imkan tanımıştır (Sheik Amamuddy *et al.* 2020). Şekil 15'te allosteri kavramının ortaya çıkışı ve onu takip eden gelişmeler kronolojik bir şekilde sıralanmıştır.

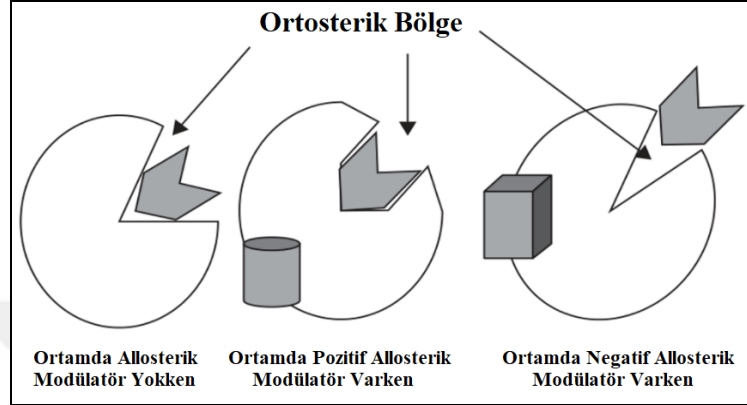
Allosteri yönlendirmeli konformasyonel değişiklikler iki ayrı konformasyonel geçiş durumu olarak ifade edilemez. Aksine, çeşitli konformasyonlardan oluşan bir popülasyonu kapsayan bir denge durumu olarak kabul edilebilir. Allosteri, biyomakromoleküllerin doğal bir özelliğidir ve allosterik mekanizmalarda meydana gelen işlevsel bozukluklar çeşitli hastalıklar meydana getirmektedir (Sheik Amamuddy *et al.* 2020).



Şekil 15. Allosterinin tarihi (Liu and Nussinov 2016)

Ortosterik ve allosterik ilaçlar moleküler etki mekanizmaları bakımından birbirlerinden farklıdır. Ortosterik ilaçlar aktif bölgeye genellikle biyolojik kofaktörler veya substratlarla yarışmalı olarak bağlanmaktadır. Allosterik ilaçlar (modülatörler) ise allosterik bölgeye bağlandıklarında aktif bölgeyi ya modifiye etmekte (genelde protein aktivitesini artırıcı yönde) ya da inhibe etmektedirler (Şekil 16). Allosterik bağlanma bölgeleri ortosterik bölgelere kıyasla önemli ölçüde daha az korunmaktadır ancak geliştirilen allosterik ilaçlar ortosterik ilaçlara göre

daha yüksek spesifikliğı ve daha düşük toksisite riskine sahiptir. Ortosterik bölgenin nispeten fazla korunaklı olması ortosterik bir ilacın sadece hedef proteine değıl, aynı zamanda istenmeyen homolog protein ailesi üyelerine de bağlanmasına neden olmaktadır ki bu durum ilacın yan etki profiline büyük bir katkıda bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda hedef dışı toksik etkilerin en fazla rastlandığı ilaç grubunun antikanser ilaçlar olduğu tespit edilmiştir (Lin *et al.* 2019; Lamore *et al.* 2020; Sheik Amamuddy *et al.* 2020).



**Şekil 16.** Allosterik regülasyonun şematik temsili (Grover 2013)

Şekil 16’da ifade edildiğı üzere, ortosterik bölgelere substratların/enzimlerin yarışmalı inhibitörleri veya enzimlerin/reseptörlerin agonistleri ya da yarışmalı antagonistleri bağlanmaktadır. Allosterik bölge aktif bölgeden uzak olmasına rağmen, bir modülatör allosterik bölgeye bağlandığında protein konformasyonunda birtakım değışiklikler meydana getirmektedir. Pozitif allosterik modülatörlerin bağlanması ya substratların/agonistlerin afinitesinde artışa yol açmakta ya da bunun ardından gelecek olan eylemleri hızlandırmaktadır. Negatif allosterik modülatörler ise ortosterik bölgelerin afinitelerini değıştirmek suretiyle veya sonraki adımlar için gerekli protein konformasyon değışikliklerini önleyerek inhibitör işlevi görmektedir (Grover 2013).

Allosterik ilaçlar, ortosterik ilaçlara benzer şekilde, kovalent veya kovalent olmayan şeklinde sınıflandırılmaktadır. Kovalent olmayan modülatörlerin düşük dozda kullanıldığı allosterik ilaç rejimlerinde ilgili protein yapılarının aktif ve inaktif konformasyonları arasında mevcut olan konformasyonel değışim mekanizması istenilen etkiyi karşılayabilmektedir. Ayrıca ilacın allosterik bölgeye bağlanması serbest enerji yüzeyinde inaktif konformasyona doğru bir kaymaya yol açmaktadır. Ortamda düşük konsantrasyonda bulunan ilaç moleküllerinin miktarı azaldığında proteinin aktif ve inaktif konumları arasındaki enerji bariyerleri yüksekse, aktif konformasyona geri dönmek uzun bir zaman alabilmektedir. Kovalent allosterik ilaçların tersinmez etki mekanizmalarının aksine, kovalent olmayan allosterik mekanizmaların tersinir veya tersinmez olduğunu kesin olarak söylemek zordur ancak tersinmez etkilerin görülme olasılığı daha fazladır (Nussinov and Tsai 2013).

Günümüzde allosterik araştırmalara yapılan yatırımların sürekli olarak artmasına rağmen, onaylanmış toplam 3700’den fazla ilaç arasından sadece 19 tanesi allosterik bölgelere bağlanarak farmakolojik etkinliklerini göstermektedir. Yapılan bu karşılaştırma allosterik ilaç keşif sürecinin zorluğunu ortaya koymaktadır. Bu durum büyük olasılıkla allosterik ilaçların bağlanma afinitelerinin nispeten düşük olmasından, ortosterik ligantlara kıyasla daha yüksek hidrofobisiteye sahip olmalarından ve sıklıkla tespit edilen olumsuz yapı-aktivite ilişkilerinden (structure-activity relationship; SAR) kaynaklanmaktadır. Bugüne kadar *in silico* yöntemler kullanılarak keşfedilen sadece 1 adet allosterik ilaç (Enasidenib) FDA tarafından onaylanmıştır (Dogra *et al.* 2018). Bu nedenle, allosterik bağlanmada protein-ligant etkileşimlerinin aydınlatılmasına genel olarak ihtiyaç duyulmaktadır (Sheik Amamuddy *et al.* 2020).

### **Antikanser Ajanlar Olarak Doğal Ürünler**

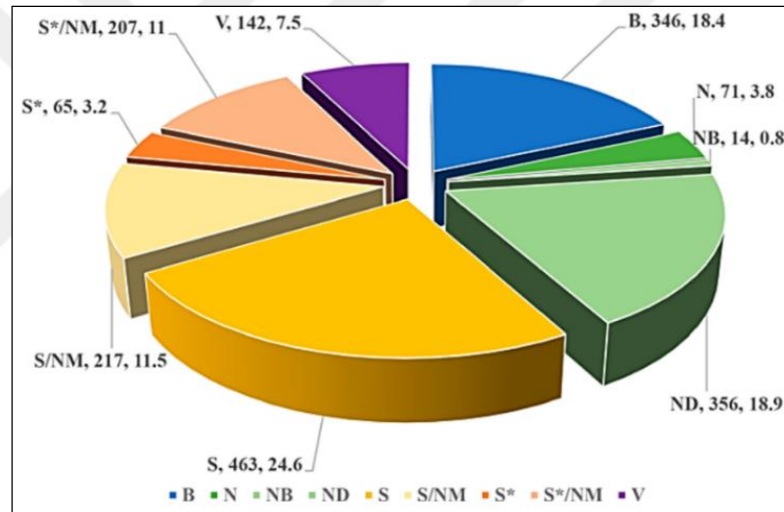
1929 yılında Alexander Fleming tarafından Penisilin’in *Penicillium notatum*’dan keşfedilmesi ve bu ajanın 1940’lı yıllarda geniş bir terapötik kullanıma sahip olduğunun anlaşılmasının ardından tıp alanında “antibiyotiklerin altın çağı” dönemi başlamıştır. Böylece yeni doğal biyoaktif bileşiklerin doğada mevcut olan kaynaklardan araştırılması yaklaşımı popülerlik kazanmıştır (Cragg and Newman 2013).

Doğal ürünler canlı organizmalardan elde edilen primer veya sekonder metabolitlerdir. Sekonder metabolitler ise bazı bitkiler ve mikrobiyal türlerin suşları tarafından üretilen çeşitli kimyasal yapılara sahip bileşiklerdir. Primer metabolitlerin aksine, sekonder metabolitler bir organizmanın büyümesi ve gelişmesi için doğrudan gerekli değildir. Ancak sekonder metabolitler yapısal olarak eşsiz ve seçici bir biyoaktivite potansiyeline sahip olmaları yönünden doğal ürünleri yeni ilaçların keşfinden önemli bir kaynak haline getirmektedir (Lankatillake *et al.* 2019; Bruce 2020; Gunathilaka *et al.* 2020).

Doğanın ürettiği bileşikler, türlerin uzun, seçici ve evrimsel sürecinin bir sonucu olarak çok çeşitli kimyasal yapılar sergilemektedir. Ayrıca insanların yaşam koşullarının iyileştirilmesine her zaman büyük bir katkı yaptıkları bilinmektedir. Geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaları ve bilimsel açıdan kanıtlanmış çok çeşitli biyolojik etkilerinden ötürü doğal ürünler, yüksek bir bilimsel ve endüstriyel değere sahiptirler. Doğal bileşiklerin gösterdiği özellikler yeni doğal moleküllerin tanımlanmasında, sahip oldukları biyolojik aktivitelerin değerdendirilmesinde, biyolojik etki mekanizmalarının anlaşılmasında ve tedaviye yönelik yeni uygulamaların geliştirilmesinde önemli ilerlemelere yol açabilecek nitelikteki bilimsel araştırmaları sürekli olarak teşvik etmektedir. Günümüzde tıp alanında çok önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen kanser, enfeksiyonlar, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalık için uygun maliyetli, etkili ve güvenilir bir tedavi seçeneği halen

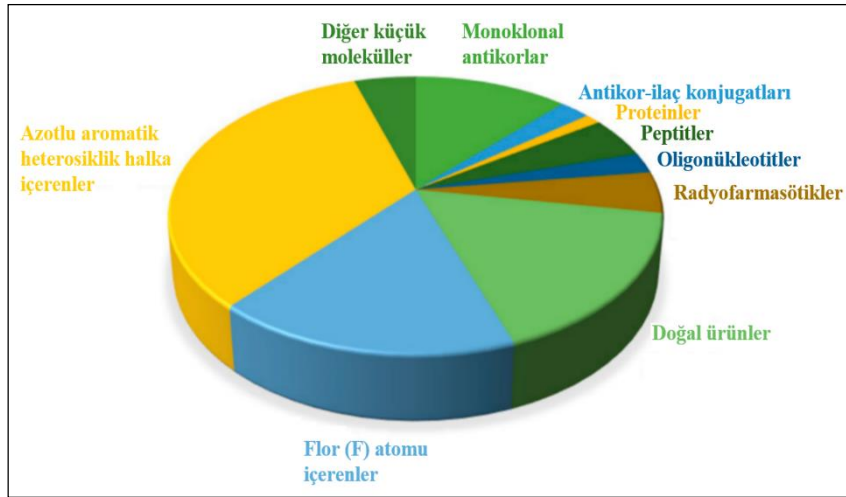
bulunmamaktadır. Bu sebeple bahsi geçen hastalıkların tedavisinde en sık araştırılan konu, doğal kaynaklardan yeni ilaçların geliştirilmesidir (Seca and Moujir 2020).

Brown and Wobst (2021), 2010-2019 yılları arasında onaylanan 289 adet NME ve 89 adet Biyolojik Lisans Başvurusu (Biologics License Application; BLA)’nu kapsayan tedavi alanlarının analizini yapmış olup buna göre FDA’dan onay alan ilk 5 tedavi alanının onkoloji (tüm onayların %25’i), enfeksiyon (%14’ü), merkezi sinir sistemi (MSS) bozuklukları (%12’si), metabolik bozukluklar (%7’si) ve kardiyovasküler hastalıklar (%6’sı) olduğunu tespit etmişlerdir. Yakın bir zamanda Newman and Cragg (2020) ise FDA tarafından 1981-2019 yılları arasında onaylanan ilaçlarda doğal ürünlerin rolünü değerlendirmişler ve mevcut reçeteli tüm ilaçların %35’inden fazlasının doğal ürünlerden elde edildiği tahmininde bulunmuşlardır. Ayrıca yeni onaylanan ilaçların %3,8’inin doğal ürünler, %18,9’unun doğal ürün türevleri, %22,5’inin doğal ürün taklitleri ve %3,2’sinin doğal ürünlerden ilham alan sentetik ilaçlar olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 17).



**Şekil 17.** Yeni onaylanmış tüm ilaçlar (01/01/1981-30/09/2019). “B” Biyolojik makromolekül; “N” değiştirilmemiş doğal ürün; “NB” botanik ilaç (tanımlanmış karışım); “ND” doğal ürün türevi; “S” sentetik ilaç; “S\*” sentetik ilaç (doğal ürün farmakoforu); “/NM” doğal ürün taklidi; “V” aşı, n=1881 (Newman and Cragg 2020)

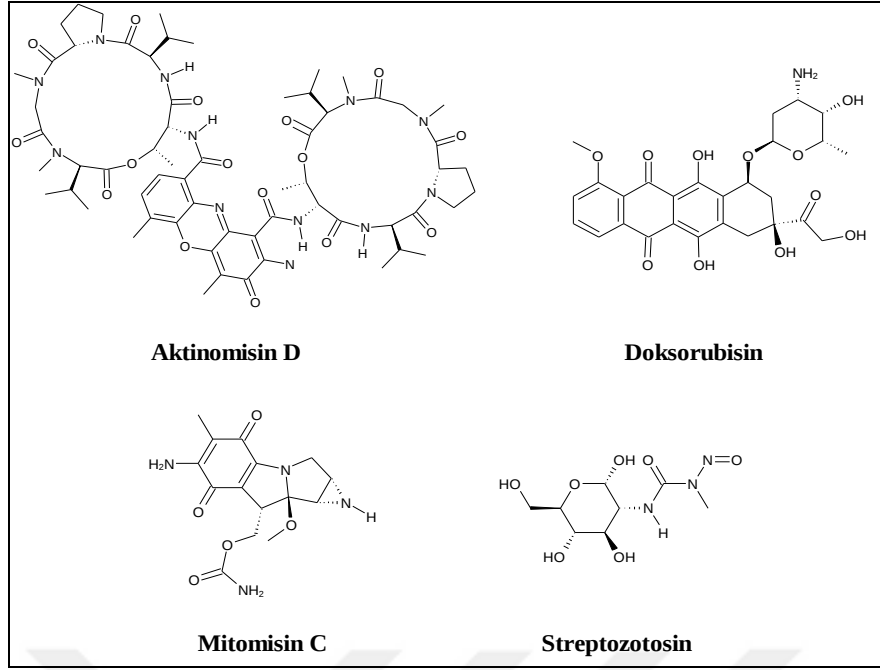
Doğal kaynaklı moleküller, yeni ilaç geliştirme konusunda çalışan küresel ilaç şirketleri için son derece önemli bir kaynak teşkil etmektedir. Çünkü bu moleküller ilaç endüstrisinde yarı sentetik kompleks yapıları ilaçların geliştirilmesinde doğrudan bir hammadde kaynağı, öncü ilaç etken maddelerinin tasarımında bir prototip ve yeni ilaçların keşfinde taksonomik belirteçler olarak kullanılmaktadır (Calixto 2019). Şekil 18’de 2020 yılında FDA tarafından onay alan ilaçların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması gösterilmektedir (G de la Torre and Albericio 2021). Buna göre, doğal ürünlerin sahip olduğu benzersiz kimyasal yapılar, 2020 yılında FDA’nın onayladığı tüm ilaçların kimyasal çeşitliliği arasından yaklaşık %30’luk bir payı temsil etmektedir.



**Şekil 18.** 2020 yılında FDA tarafından onaylanan ilaçların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması. Bazı ilaçlar aynı anda iki farklı sınıfa dahil olabilmektedir (G de la Torre and Albericio 2021).

İlaç etken maddesi olarak kullanılan doğal ürünlerin bilinen başlıca kaynakları bitkiler, bakteriler ve mantarlardır (Blagodatski *et al.* 2020). Bakteri ve mantarlar (yani mikroorganizmalar), yapısal olarak çeşitli biyoaktif metabolitleri üretmekle sorumlu olan dünya çapında çeşitli habitatların üyeleridir. Bugüne dek mikroorganizmalar tarafından üretilen yapısal olarak çeşitli sekonder metabolitlerin antibiyotik, anti-inflamatuvar, antikanser ve antidiyabetik etkinliklere sahip oldukları bilinmektedir ve ayrıca bunlardan bazıları günümüz farmasötik endüstrisinin en önemli ürünlerindendir (Cragg and Newman 2013). Bugün, %50-60'ı bitki ve %5'i mikrobiyal kökenli olan 1 milyondan fazla doğal bileşiğin izole edildiği ve bunlardan %20-25'inin biyolojik açıdan aktif olarak sınıflandırıldığı bilinmektedir. Mikrobiyal kaynaklı biyoaktif doğal bileşiklerin %10'u ise mikroplardan, %45'i *Actinomycetes*'ten, %38'i mantarlardan ve %17'si bakterilerden elde edilmiştir (Mushtaq *et al.* 2018).

Bakteriyel metabolitlerin terapötik kullanımlarının araştırılmasına 1940 yılında gram pozitif *Actinomycetes*'ten "Aktinomisin D" antibiyotiğinin elde edilmesinin ardından başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda, çoğunluğu *Streptomyces* türlerinden olmak üzere, antrasiklinler (örneğin; Daunorubisin, Doksorubisin ve Epirubisin), Mitomisin C gibi mitozanlar, Bleomisin ve antrasenonlar (örneğin; Streptozotosin, Mitramisin ve Pentostatin) gibi pek çok önemli antikanser ilaç etken maddesi izole edilmiştir (Mushtaq *et al.* 2018). Şekil 19'da bakterilerden elde edilen ve kemoterapötik ajan olarak kullanılan doğal bileşiklerden bazılarının molekül yapısı gösterilmiştir. Günümüzde sitotoksik bileşiklerin ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin doğal kaynaklardan araştırılması yaklaşımı halen kullanılmaktadır (Blagodatski *et al.* 2020).



**Şekil 19.** Bakterilerden elde edilen bazı doğal biyoaktif bileşikler (Mushtaq *et al.* 2018)

Kanser ve enfeksiyon hastalıkları dünya çapında önemli ölüm nedenleri arasında sayılmaktadır. Bununla birlikte WHO tarafından 2030 yılında kanser insidansının 11 milyon üzerine çıkacağı öngörülmektedir. Klinikte kullanılan antineoplastik ajanların ve antibiyotiklerin tedaviye direnç geliştirmeleri ve istenmeyen yan etkilere sahip olmalarından dolayı antikanser ve antimikrobiyal etkili yeni ilaçlara olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Seca and Moujir 2020). Bugüne dek, çok sayıda doğal ürün ve doğal kimyasal yapıdan türevlendirilen küçük sentetik ajanın farklı türden malignitelerin tedavisinde antitümör etkinlik potansiyellerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlenmesine dair birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalardan bazıları Tablo 5'te görülmektedir (Wang *et al.* 2020b).

**Tablo 5.** Bazı Doğal Ajanlar ve Bu Ajanların Etki Mekanizmaları Kullanılarak Gerçekleştirilen *İn Vitro* ve *İn Vivo* Çalışmalar (Wang *et al.* 2020b)

| Doğal Ajanın İsmi | Bulunduğu Kaynak       | Etki Mekanizması                                                                                                      | Model                                                      | Çalışma/Kanser Türü                   |
|-------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Artesunat         | <i>Artemisia annua</i> | Vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor; VEGF) inhibisyonu yoluyla anjiyogenezi önleme | HeLa ve HepG2<br>Klinik insan denemesi                     | Etki mekanizması<br>Kolorektal kanser |
| Kamptotesin       | Nyssaceae              | DNA topoizomerez I'in inhibisyonu                                                                                     | L1210 hücreleri ve SV40 ile enfekte olmuş maymun hücreleri | Etki mekanizması                      |

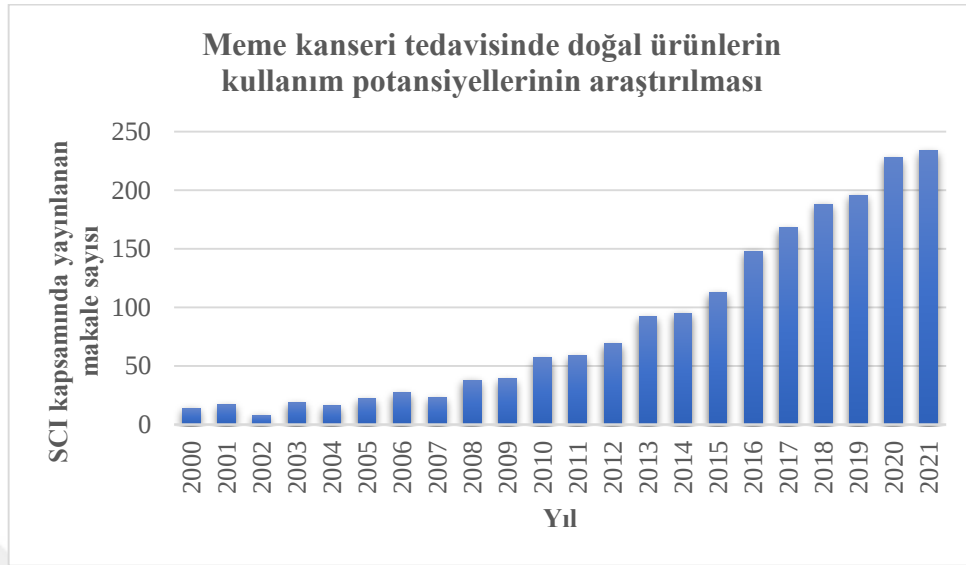
**Tablo 5.** (devam)

|                                            |                                 |                                                                                                        |                                               |                                                         |
|--------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|                                            |                                 |                                                                                                        | Klinik insan denemesi                         | Malign solid tümör ve metastatik kolorektal kanser      |
| Kolşisin                                   | Meadow saffron                  | Mikrotübül destabilizasyonu                                                                            | Mide kanseri hücre hatları                    | Gastrik kanser                                          |
| Geniposit                                  | Gardeniae Fructus               | Apoptotik kaskadların (PKCd/ JNK/Fas/kaspaz8 ve kaspaz 3) aktivasyonu                                  | C6 glioma hücreleri<br>HSC-3 kanser hücreleri | Etki mekanizması<br>OSHK                                |
| Podofilotoksin                             | American mandrake veya mayapple | Topoizomeraz II ile DNA etkileşimi sonucunda hücre döngüsünün bozulması                                | Akciğer kanseri hücre hatları                 | Etki mekanizması                                        |
| Taksanlar                                  | Yew trees                       | Hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi ve hücrelerde apoptozun tetiklenmesi                       | CHO hücreleri<br>Klinik insan denemesi        | Etki mekanizması<br>Akciğer, meme ve yumurtalık kanseri |
| Vinka ( <i>Catharanthus</i> ) alkaloidleri | Madagascar periwinkle           | Tübülinle etkileşim sonucunda mikrotübül fonksiyonlarının bozulması ve hücre çoğalmasının engellenmesi | HeLa hücreleri<br>Klinik insan denemesi       | Etki mekanizması<br>Akciğer kanseri                     |

Antikanser ajan olarak keşfedilen veya geliştirilen doğal moleküllerin çoğunun prelinik çalışma sonuçları, klinik çalışmalarda elde edilen bulgulardan daha umut vericidir. Bununla birlikte klinik öncesi çalışmalar, doğal bileşiklerin etki mekanizmalarının anlaşılmasında çok değerli bilgilerin elde edilmesine halen büyük oranda öncülük etmektedir. Doğal bileşiklerin kanser tedavilerine dahil edilmesiyle birlikte farklı kanser türlerinin nedenleri ve ilerlemesini anlamanın yanı sıra bu bileşiklerin ve karşılık gelen analoglarının etki mekanizmalarının, dozlarının ve farmakolojik profillerinin de daha iyi anlaşılması mümkün olacaktır (Wang *et al.* 2020b).

Doğal ürünlerin meme, akciğer ve prostat kanseri tedavisinde kullanım potansiyellerinin belirlenmesine dair gerçekleştirilen mevcut çalışmaların sayısı, diğer kanser türleri için gerçekleştirilen çalışmaların sayısından nispeten fazladır. Meme kanseri bu üç farklı kanser türü arasında doğal ürünler üzerinde en fazla araştırma yapılan kanser türüdür. Meme kanserinin tedavisinde doğal ürünlerin kullanım potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla 2000-2020 yılları arasında çok sayıda araştırma yapılmış ve bu araştırmaların sayısı geçmişten günümüze dek artış göstermiştir (Şekil 20) (Zhang *et al.* 2020). Literatürden elde edilen güncel bilgiler, doğal ürünlerin meme kanserinin agresifliğine karşı savaşma, kanser hücrelerinin çoğalmalarını

engelleme ve kanserle ilişkili yolları modüle etme kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Mitra and Dash 2018).

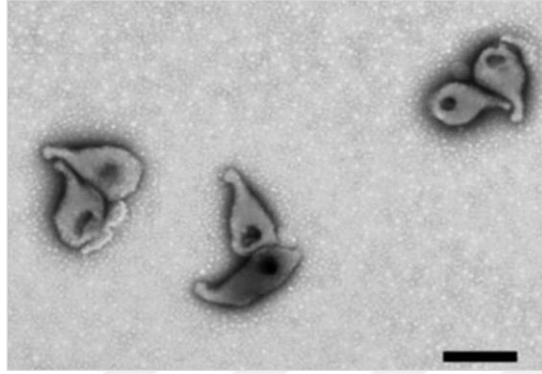


**Şekil 20.** Son 22 yılda SCI kapsamında yayınlanan “meme kanseri tedavisinde kullanım potansiyeli araştırılan doğal ürünler” konulu makaleler (2000-2021) (Kaynak: Web of Science)

Biyolojik Önem Arz Eden Kimyasal Varlıklar (Chemical Entities of Biological Interest; ChEBI) veritabanı küçük kimyasal bileşiklere odaklanan moleküler varlıklara ücretsiz olarak erişilebilen bir sözlüktür. Söz konusu moleküler varlıklar, ya doğal ürünler ya da canlı organizmaların süreçlerine müdahale etmek için kullanılan sentetik ürünlerdir (De Matos *et al.* 2010). Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda, allosterik SHP-2 inhibitörü oldukları ilk kez bu çalışmayla bildirilen *L*-histidil-*L*-histidin (H-His-His-OH) (CHEBI ID: 74051) ve *L*-triptofil-*L*-triptofan (H-Trp-Trp-OH) (CHEBI ID: 74876) bileşiklerinin *Mycoplasma genitalium* tarafından bir metabolik reaksiyon esnasında üretilen bakteriyel metabolitler oldukları; bununla birlikte *L*-histidil-*L*- tirozin (H-His-Tyr-OH) (CHEBI ID: 74059)’in ise metabolizma sonucu oluşan herhangi bir ara ürünü veya ürünü temsil ettiği ChEBI veritabanından doğrulanmıştır. Bu noktada doğal ürünlerin meme kanserindeki etki potansiyeli göz önüne alındığında, bu çalışmanın konusunu oluşturan üç adet doğal bileşiğin, günümüzde hem *in vitro* hem de *in vivo* meme kanseri modeli olarak sıklıkla kullanılan MCF-7 hücre hattına karşı selektif sitotoksik-antiproliferatif etkilerinin araştırılmasına karar verilmiştir (Dunpall *et al.* 2016).

*M. Genitalium* (Şekil 21), 1980 yılında tanımlanmış erkek ve dişi üreme yollarını kolonize eden Mollicutes sınıfından bir bakteridir. İlk kez Londra’da bulunan Aziz Mary Hastanesi’ndeki Genitoüriner Tıp kliniğine başvuran gonokokal olmayan üretritli (nongonococcal urethritis; NGU) 13 erkek bireyden 2’sinin üretrasından izole edilmiştir (Taylor-Robinson 2002). Serbest yaşayan herhangi bir hücrenin en küçüğü olarak bilinmektedir ve genomunun küçük boyutu (580 kb) göz önüne alındığında, tam olarak dizilenen ilk

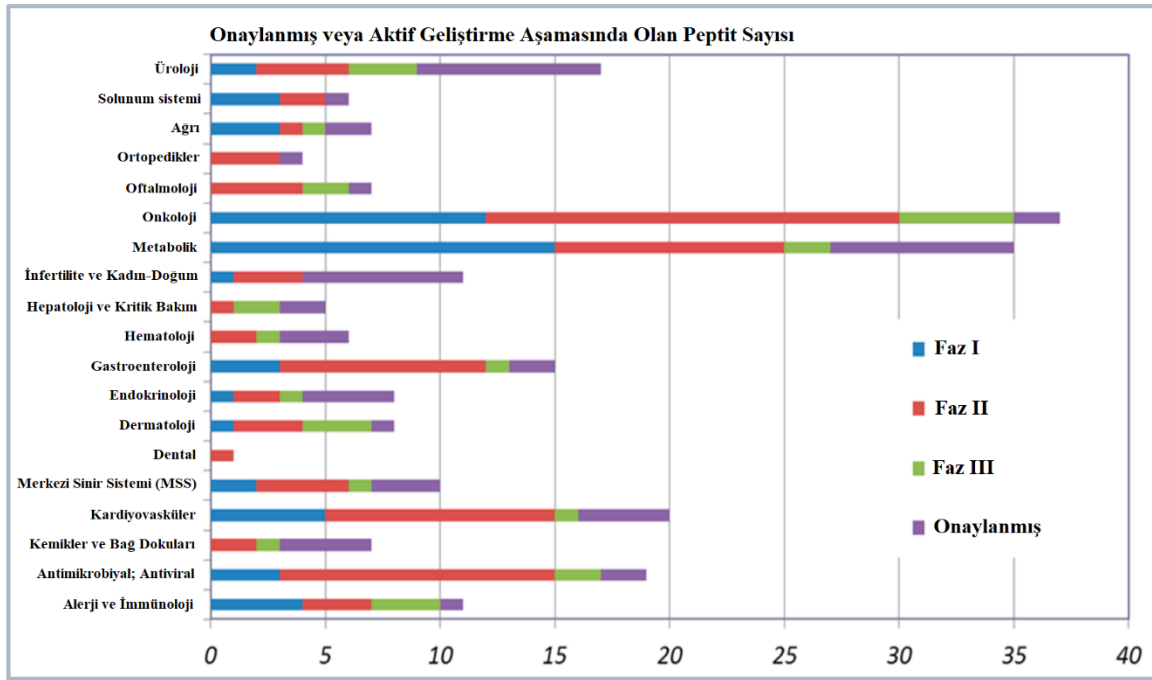
bakterilerden biri olmasının yanı sıra kimyasal olarak da sentezlenen ilk genomdur (Manhart *et al.* 2011). Bugüne dek servisit, endometrit ve pelvik inflamatuvar hastalık (pelvic inflammatory disease; PID) gibi çeşitli sendromlarla ilişkilendirilen *M. Genitalium*'un, yüksek düzeyde eksprese edilmiş doğuştan gelen bağışıklık sensörleri aracılığıyla akut inflamatuvar sinyalleri ortaya çıkaran konak epitel hücrelerine yapışarak ürogenital sistemde iltihaplanmaya neden olduğu bilinmektedir (Gnanadurai and Fifer 2020; Martínez-Torró *et al.* 2020).



**Şekil 21.** *M. Genitalium*'un elektron mikroskopuyla elde edilmiş görüntüsü (Ölçek: 500 nm) (Gnanadurai and Fifer 2020)

#### **Peptit Yapısındaki Moleküllerin Olası Antikanser Etkinlikleri**

Çeşitli kaynaklardan izole edilen/tanımlanan peptitler, uzun bir süredir “biyomalzemeler” olarak kabul edilmekte ve özellikle biyomedikal ve gıda endüstrilerindeki biyolojik uygulamalarıyla tanınmaktadır. Bugün Amerika Birleşik Devletleri’nde klinik uygulamalar için geliştirilen yaklaşık 60 adet FDA lisanslı peptit esaslı ilaç bulunmaktadır ve aynı zamanda buradaki birçok kuruluşa ait ürünler klinik araştırma ve ticarileştirme süreçlerinin farklı aşamalarındadır. Bildirilen raporlar, dünya çapında 150’ye yakın peptit molekülünün farklı araştırma ve düzenleyici onay aşamalarında olduğunu göstermektedir (Şekil 22) (Ganguly *et al.* 2020).



**Şekil 22.** 2016 yılı ve sonrasında farklı terapötik alanlar için onay almış ve aktif olarak geliştirilmekte olan peptitler (Henninot *et al.* 2018)

Şekil 22 incelendiğinde, 2016 yılı itibarıyla dünya çapında mevcut olan peptit esaslı moleküllerden 170 tanesinin klinik geliştirmenin farklı aşamalarında olduğu ve ayrıca 200’den fazla molekülün etkinliğinin de prelinik aşamalarda değerlendirildiği anlaşılmaktadır. Bu rakamlar terapötik alan ile bölündüğünde, “onkoloji” ve “metabolik hastalıklar”ın iki baskın terapötik alan olduğu ortaya çıkmaktadır. Peptitler küresel ilaç satışlarının sadece bir kısmını oluşturmakta ve peptitlerin doğal fonksiyonlarını ele alan teknolojilerdeki gelişmeler sayesinde bu moleküllerin tasarımlarının ve geliştirilmelerinin olumlu yönde etkileneceği ve böylece peptit ilaçlarına olan talebin de sürekli olarak artmaya devam edeceği öngörülmektedir (Henninot *et al.* 2018).

Terapötik peptitler, protein ve antikor yapısındaki ilaçlara göre nispeten küçük boyutludur, sentetik olarak erişilebilirlikleri daha yüksek düzeydedir, immünojenisiteleri daha azdır ve hücre membranlarına daha iyi nüfuz edebilme kabiliyetleri sayesinde biyoyararlanımları daha yüksektir. Ayrıca belirli bir hedefe karşı yüksek aktivite, spesifite ve afinite özellikleri sergilemektedirler. Terapötik peptitlerin ilaç-ilac etkileşimlerini minimal düzeyde göstermeleri ve toksik etkileri en aza indirmeye yardımcı olacak şekilde karaciğer veya böbrek gibi belirli bazı organlarda birikim göstermemeleri nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere büyük bir potansiyel barındırdığı bilinmektedir. Bu moleküller, aynı zamanda, yeni mekanizmalar yoluyla reseptör ve enzim gibi yerleşik hedefler ve geleneksel olarak undruggable olarak kabul edilen yeni hedefler üzerinde fonksiyonel

hareketliliğe sahip olma özellikleri sayesinde onkolojide yenilikçi bir ilaç adayı sınıfı olarak ön plana çıkmaktadır (Marqus *et al.* 2017; Conibear *et al.* 2020).

Günümüzde ilaç adayları olarak addedilen peptit yapısındaki moleküllerin hormonlar, nörotransmitterler, büyüme faktörleri ve antibakteriyel ajanlar olarak hareket ederek insan fizyolojisinde kritik roller üstlendiği bilinmektedir. Ancak peptitlerin sahip olduğu doğal özellikler, bunların ilaç olarak kullanımı esnasında hem güçlü hem de zayıf birtakım yönlerinin olduğuna dikkati çekmektedir (Henninot *et al.* 2018). Bu zayıf yönlerden bazıları plazma yarı ömürlerinin ve oral biyoyararlanımlarının düşük olması, ayrıca kandaki proteazlarla kolayca parçalanabilmeleri nedeniyle *in vivo* stabilitelerinin az olmasıdır. Peptitlerin stabilitesi ve biyoyararlanımını artırmak amacıyla kimyasal yapılarında çeşitli modifikasyonlar yapılabilmektedir. Ayrıca hem doğal hem de modifiye edilmiş peptitlerin, peptit-ilac ve peptit-nanopartikül konjugatları halinde hastalara verilmesi sonucunda bu moleküller vücuttaki hedeflerine daha etkin bir şekilde ulaştırılabilmekte ve böylece yukarıda bahsi geçen dezavantajlar ortadan kaldırılabilir (Bidwell III and Raucher 2009; Marqus *et al.* 2017; Conibear *et al.* 2020).

Antikanser tedavide kanser hücrelerini yok etmek amacıyla biyoaktif terapötik peptitlerin kullanımını içeren çalışmalarda, 10 kDa'dan daha düşük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin solid tümörlere nüfuz edebilme kabiliyetinin daha ileri düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Pankreas ve meme kanseri gibi birçok kanser türünde mevcut tümör hücrelerinin çoğunlukla kollajen ve hyaluronik asit olmak üzere stromal bileşenleri önemli düzeyde ürettikleri bilinmektedir. Monoklonal antikorlar gibi büyük molekül yapısına sahip olan ajanlar düşük difüzyon katsayıları ve hücrelerde yüksek interstisyel sıvı basıncı nedeniyle tümördeki stromal tabakayı aşamamakta ve böylece hücrelere penetrasyonları önemli ölçüde engellenmektedir. Bu noktada, solid tümörlere penetre olması beklenen moleküllerin düşük molekül ağırlığına sahip olmasının peptit ilaçlarının geliştirilmesinde bir avantaj sağladığı kabul edilmektedir (Scodeller and Asciutto 2020).

Bugüne kadar antikanser aktivite gösteren peptit bazlı ilaçlar için tümörde anjiyogenezin inhibisyonu, apoptoz ve nekroz indüksiyonu, interferon yolları üzerinden immün sistem modülasyonu, kinazların ve proteazların inhibisyonu ve matriks onkoproteinleri ve transkripsiyon faktörleri gibi fonksiyonel proteinlerle etkileşim olmak üzere çok çeşitli etki mekanizmaları bildirilmiştir (Angell *et al.* 2018). Ayrıca hayvan zehirleri ve toksinler, deniz hayvanları, bitki ekstraktları, mikroorganizmalar ve algler gibi doğal kaynaklardan elde edilen peptitlerin sitotoksik aktivitelerinin değerlendirilmesi veya faj gösteriminin ya da sentetik

kütüphanelerin taranması gibi hedeflenmemiş yaklaşımlarla antikanser aktiviteye sahip birçok yeni peptit molekülü keşfedilmiştir (Conibear *et al.* 2020).

Peptitlerin antikanser etkinliklerinin gösterilmesine dair yapılan çalışmalara örnek vermek gerekirse; Giorello *et al.* (1998), H1-S6A,F8A peptidine *Antennapedia*'nın penetratin dizisini ekledikten sonra oluşan füzyon peptidinin (RQIKIWFQNRRMKWKKNELKRAFAALRDQI) MCF-7 meme kanseri hücre hattında proliferasyonu inhibe ettiğini, apoptozu indüklediğini ve c-Myc aktivitesini engellediğini bildirmişlerdir. Terui *et al.* (1999), endotelyal interlökin-8 (IL-8)'e bağlanabilen bir pentapeptidin (NH<sub>2</sub>-AVLPR) HL-60, Jurkat, Daudi ve K-562 lösemi hücre hatlarında apoptozu indüklediğini ve *in vivo* ortamda antitümör etkinliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bae *et al.* (2000), bir peptit kütüphanesinde bulunan arjinin açısından zengin bazı hekzapeptitlerin VEGF ile VEGF165 arasındaki etkileşimleri inhibe ettiğini keşfetmişlerdir. Ayrıca RRKRRR hekzapeptidinin bir çıplak (nude) fare modelinde VEGF salgılayan HM7 insan kolon kanseri hücrelerinin büyümesi ve metastazını önlediğini belirlemişlerdir. Berezov *et al.* (2001), Trastuzumab (Herceptin) gibi monoklonal antikörleri taklit edebilen peptit yapısındaki küçük moleküllerin meme ve yumurtalık kanserinde %30 oranında daha fazla eksprese olan HER2'ye ait ürünlerden birini inaktive ettiğini tespit etmişlerdir. Bu sayede YCDGFYACYMDV-NH<sub>2</sub> dodekapeptidinin HER2 reseptörüne bağlandığını ve *in vitro* ortamda yapısal büyümeyi sağlayan sinyalizasyon özelliklerini antagonize ettiğini bildirmişlerdir. Kim *et al.* (2012), bir dekapeptit (AFNIHNRNLL) yapısını *Mytilus coruscus*'a ait bir proteinden izole ettikten sonra bu peptidin meme, prostat ve akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. İlgili dekapeptidin kanser hücrelerinde apoptozu etkili bir şekilde indüklediğini, sağlıklı karaciğer hücrelerinde ise bu tür bir etkinliğin görülmediğini bildirmişlerdir. Bidwell III *et al.* (2013), bir elastin benzeri polipeptit (elastin-like polypeptide; ELP) ile baktenesin ve c-Myc inhibitör peptidinden (H1-S6A,F8A) türetilen bir hücre penetrasyon peptidini (cell-penetrating peptide; CPP) kaynaştırdıktan sonra yeni oluşan peptit yapısına BAC-ELP-H1 adını vermişlerdir. Ardından, bu füzyon peptidinin insan ve sıçan glioma hücrelerindeki proliferasyonu *in vitro* ortamda inhibe ettiğini ve sıçanda gelişen gliomadaki tümör hacmini %80 oranında azalttığını tespit etmişlerdir.

### **Yeni Öncü İlaç Moleküllerinin Tanımlanmasında Kullanılan BDİT Yöntemleri**

İlaç pazarına yeni bir ürün kazandırmak maliyetli, zaman alıcı ve insan gücü açısından zahmetli bir süreçtir. İlaç keşif ve geliştirme çabaları yaklaşık olarak 800 milyon ila 1,8 milyar Amerikan doları arasında bir maliyet gerektirmekte ve ortalama 10-15 yıl sürmektedir. Kombinatoriyal kimyadaki mevcut yenilikler ilaç keşif çalışmalarının genişletilmesine ve HTS

yöntemlerinin geliştirilmesine öncülük eden çeşitli molekül veri bankalarının sayısının artmasına neden olmuştur. Buna rağmen, piyasaya başarılı bir şekilde giren yeni ilaç molekülerinin sayısı son birkaç yılda azalış göstermiştir. Bu yüzden ilaç keşfinin ön aşamalarında üst düzey ilaç şirketleri ve diğer araştırma grupları tarafından BDİT yöntemlerinin kullanılması, ilaç geliştirme sürecini daha düşük maliyetli olacak şekilde hızlandırmak ve son aşamadaki başarısızlıkları en aza indirmek açısından önemli hale gelmiştir (Macalino *et al.* 2015).

Son zamanlarda ilaç keşif sürecinde yeni ligantların tanımlanmasına yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda hesaplamalı, biyoinformatik ve deneysel yaklaşımların bir arada kullanıldığı “rasyonel ilaç tasarımı” olarak adlandırılan alana yönelim mevcuttur. *In silico*, “bilgisayar destekli” anlamına gelen bir terimdir. Bu ifade 1989 yılında *in vitro*, *in vivo* ve *in situ* gibi Latince ifadelerle bir benzetme olarak ortaya çıkmıştır. Yani “*in silico* ilaç tasarımı” ifadesi, ilaçların hesaplamalı yöntemler kullanılarak keşfedildiği ya da tasarlandığı rasyonel dizayn anlamına gelmektedir. Günümüzde hem hesaplamalı hem de deneysel yöntemler ilaç keşif ve geliştirme sürecinde önemli roller üstlenmekte ve çoğu zaman birbirinin tamamlayıcısı olarak sayılmaktadır (Vu *et al.* 2015; Ugariogu *et al.* 2020).

BDİT, ilaç-reseptör etkileşimlerini simüle etmede hesaplamalı yöntemlerin kullanıldığı özel bir disiplindir. İlaç tasarımında *in silico* yaklaşımlar farmakolojik olarak aktif bileşiklerin vücutta proteinler veya nükleik asitler gibi makromoleküler hedeflerle etkileşim sonucunda bir biyolojik aktiviteye sahip oldukları varsayımına dayanmaktadır. Bu türden etkileşimlerin analizi ve tahmini esnasında dikkate alınması gereken temel faktörler arasında sterik etkiler, elektrostatik kuvvet, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağlarının oluşumu yer almaktadır. Genel olarak BDİT yöntemleriyle ligantlar hakkında mevcut kimyasal ve biyolojik bilgilerden yararlanma, yeni ilaçların tanımlanması ve optimize edilmesi gibi farklı hedefler tanımlanmaktadır. Ayrıca bugüne dek ilaçlarda istenmeyen birtakım özelliklere (örneğin; zayıf aktivite, yetersiz absorpsiyon, dağılım, metabolizasyon ve eliminasyon (ADME) özellikleri ve yüksek toksisite potansiyeli) sahip olan bileşikler ortadan kaldırmak ve en umut verici ilaç adaylarını seçmek için çeşitli *in silico* filtreler tasarlanmıştır. Güncel BDİT uygulamaları potansiyel bağlanma bölgelerinin tespiti, ilaç adayı moleküllerin oluşturulması ve oluşturulan bu moleküllerin biyolojik bir hedefle kenetlenmesini içeren çeşitli yapısal analizleri kapsamaktadır (Ugariogu *et al.* 2020).

*In silico* ilaç keşif süreci terapötik bir hedefin tanımlanması, makromoleküler hedefe karşı taranacak olan küçük molekül bileşiklerinin bir kütüphanesinin oluşturulması, seçilen hit moleküllerin protein bağlanma bölgelerine kenetlenerek aralarındaki etkileşimlerin test

edilmesinin ardından farmakokinetik çalışmalara tabii tutulması ve en son aşamada ise farmakokinetik parametreleri uygun bulunan moleküllerin “ilaç öncü maddesi” olarak tanımlanmasını içeren bir dizi aşamadan meydana gelmektedir (Ugariogu *et al.* 2020). Günümüzde *in silico* tekniklerin kullanımının giderek yaygınlaşması ve bilgisayarlı teknolojilerde kaydedilen ilerlemeler sayesinde daha güçlü, biyoyararlanımı yüksek, daha az toksik ve yan etkileri en aza indirilmiş olan yeni ilaç moleküllerine ulaşma olasılığı da giderek artmaktadır. Tablo 6’da BDİT yöntemleri kullanılarak geliştirilen klinik olarak onaylanmış ilaç örnekleri özetlenmiştir (Özbüyükkaya 2012; Bisht and Singh 2017; Maltarollo *et al.* 2019).

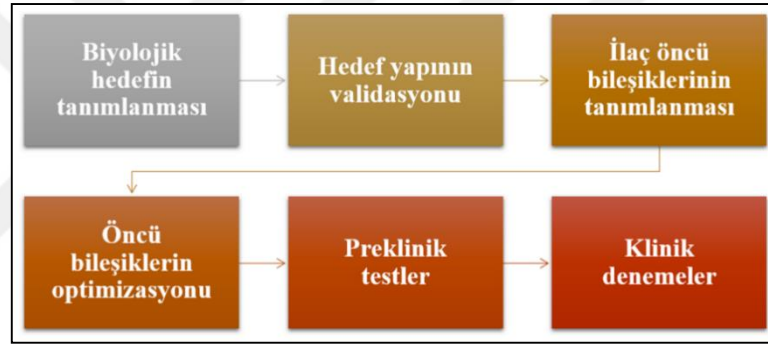
**Tablo 6.** Bilgisayar Destekli İlaç Keşif Araçları Sayesinde Tanımlanan Klinik Olarak Onaylanmış İlaç Molekülleri (Özbüyükkaya 2012; Bisht and Singh 2018)

| İlacın Adı   | Onaylanma Yılı | Farmakodinamik Özellik                                                              |
|--------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Kaptopril    | 1981           | Anjiyotensin dönüştürücü enzim (angiotensin-converting enzyme; ACE) inhibitörü      |
| Norfloksasin | 1983           | Bakteriyel DNA giraz inhibitörü                                                     |
| Sakinavir    | 1995           | İnsan immün yetmezlik virüsü (human immunodeficiency virus; HIV) proteaz inhibitörü |
| Dorzolamid   | 1995           | Karbonik anhidraz II inhibitörü                                                     |
| Losartan     | 1995           | Anjiyotensin II reseptör blokörü                                                    |
| İndinavir    | 1996           | HIV proteaz inhibitörü                                                              |
| Zolmitriptan | 1997           | Selektif 5-hidroksitriptamin 1 (5HT <sub>1</sub> ; serotonin) agonisti              |
| Tirofiban    | 1998           | Fibrinojen antagonisti                                                              |
| Oseltamivir  | 1999           | Nöraminidaz inhibitörü                                                              |
| İmatinib     | 2003           | PTK inhibitörü                                                                      |
| Erlotinib    | 2004           | EGFR tirozin kinaz inhibitörü                                                       |
| Raltegravir  | 2007           | HIV integras inhibitörü                                                             |
| Aliskiren    | 2007           | Renin inhibitörü                                                                    |
| Boseprevir   | 2011           | Hepatit C virüsü (HCV) proteaz inhibitörü                                           |

BDİT yöntemleri genel olarak aktif olma olasılığı bir hayli yüksek, kolay sentezlenebilen, ADME özellikleri güçlü ve nispeten düşük toksik etkiye sahip yeni moleküllerin tasarlanmasına izin veren yapım algoritmalarını kullanmakta ve ilaç geliştirme sürecinin farklı aşamalarında uygulanabilir olmaktadır. Örneğin; ST teknikleri büyük çaplı molekül kütüphanelerinde potansiyel hit bileşiklerin filtrelenmesi amacıyla HTS deneylerinden önce kullanılabilmekte ve böylece sentezlenecek ve ardından da biyolojik etkinliği test edilecek olan bileşiklerin sayısı önemli ölçüde azaltılabilmektedir. Ek olarak, BDİT yaklaşımları ilaçların klinik çalışmalardan çekilmesinin ana nedenleri arasında sayılan güvenlilik, etkililik, zayıf ADME özellikleri ve yüksek toksisiteyle ilişkili sorunları tespit edebilmek amacıyla da

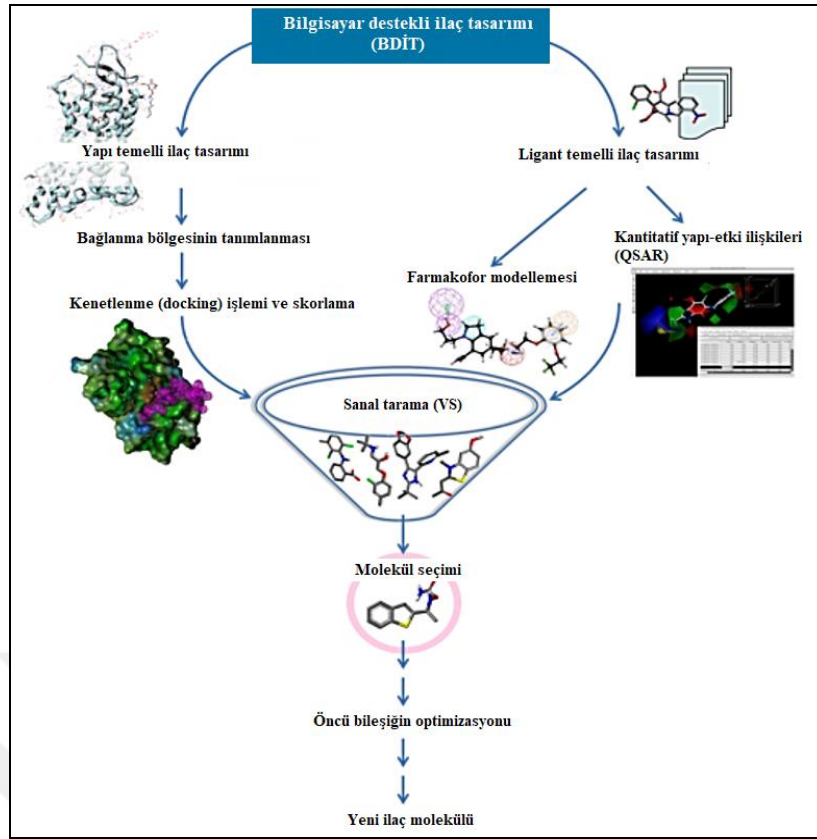
kullanılabilmektedir. Böylece bu yaklaşımlar öncü bileşiğin optimizasyon sürecini hızlandırmakla birlikte; gelişmiş düzeyde bir ADME ve toksikolojik profillemeye sayesinde ilaçların potansiyel etkinliklerinin artırılması ve toksisitelerinin azaltılmasında da önemli bir rol oynamaktadır (Berdigaliyev and Aljofan 2020).

Bir ilaç tasarlanırken o ilacın güvenliliği ve etkililiği, biyoyararlanımı, yan etki profili, metabolik açıdan stabilitesi ve hedef dokuya seçici olarak dağıtılması gibi birçok parametrenin dikkate alınması gerekmektedir (Ugariogu *et al.* 2020). Ancak biyofarmasötik endüstrilerinde bir ilacın tasarlanmasından önce, araştırma konusu olan hastalığın biyokimyasının yanı sıra bu hastalığa neden olan metabolik yolların ve proteinlerin iyi anlaşılmasına odaklanılmaktadır. Bu aşamadan sonra ise hastalıkla ilişkili proteinlerin biyolojik fonksiyonlarını modüle etmeye yönelik yeni bileşiklerin tasarımı gerçekleştirilmektedir (Vu *et al.* 2015). Şekil 23'te reverse (ters) farmakoloji yaklaşımı kullanılarak genden ilaca doğru gerçekleştirilen ilaç keşif ve geliştirme süreci ifade edilmiştir.



**Şekil 23.** Reverse farmakoloji yaklaşımıyla ilaç keşif ve geliştirme sürecinde tarama testlerine genel bir bakış (Ebhoimen *et al.* 2020)

İlaçların keşfi ve geliştirilmesinde kullanılan BDİT yöntemleri yapı ve ligant temelli olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 24). Yapı temelli yaklaşımda reseptör veya enzim gibi bir hedefin 3D yapısı potansiyel ligantların oluşturulması ya da çeşitli bileşik kütüphanelerinin taranması amacıyla kullanılmaktadır. Böylece seçilen moleküller laboratuvar ortamında sentezlenerek biyolojik aktiviteleri test edildikten sonra, gerekirse farmakokinetik özellikleri de optimize edilmektedir. Ligant temelli yaklaşımda ise kimyasal yapıları farklı olan ve biyolojik aktivitesi daha önceden belirlenmiş bir seri molekülün teorik tahmini yapı-aktivite modelleri hesaplamalı yöntemler kullanılarak oluşturulmaktadır. Ardından bu modeller, yapısal olarak optimize edildikten sonra seçilen moleküllerin etki gücünün artırılması veya molekül veritabanlarının belirli bir aktivite türü için sanal olarak taranması gibi olaylarda NME'lerin tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır (Macalino *et al.* 2015).



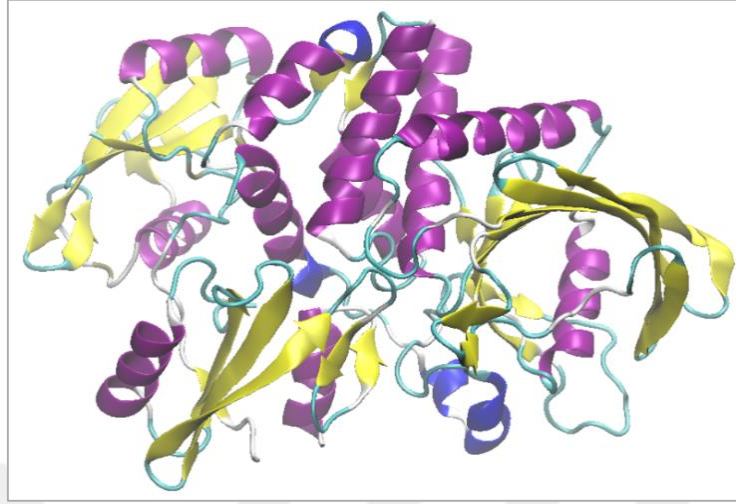
**Şekil 24.** BDİT sürecinde temsili iş akış şeması (Macalino *et al.* 2015)

Şekil 24’te görüldüğü üzere ilaç keşif ve geliştirme çalışmaları kimyasal ve yapısal biyoloji, hesaplamalı kimya, organik sentez ve farmakoloji gibi birçok bilimsel disiplini bir arada içeren çok yönlü araştırmalardır. Buna göre yeni bir ilaç molekülü geliştirilirken öncelikle uygun bir aday bileşik (ligant) keşfedilmeli veya tasarlanmalıdır. Ardından bu bileşiğin biyolojik hedefine olan afinitesi belirlenmeli ve hedef-ligant arasındaki olası bağlanma modelleri araştırılmalıdır (Macalino *et al.* 2015).

### Yapı temelli ilaç tasarımı

Yapı temelli ilaç tasarımı; hedef proteinlerin X-ışını kırınımı, NMR veya moleküler simülasyon (örneğin, homolog protein modellemesi) çalışmalarından elde edilen mevcut yapısal modellerinin kullanıldığı tekniklerin bütünüdür. Son zamanlarda Arjmand *et al.* (2018), X-ışını kristal yapıları ve moleküler docking tekniğinin bir arada kullanımıyla antikanser etkili yeni kromon esaslı bakır (II) inhibitörlerini tasarlamış, sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir. Genel olarak X-ışını kırınımı veya çok boyutlu NMR tekniğiyle bir makromolekülün 3D yapısı elde edildikten sonra (Şekil 25), özellikle elektrostatik ve hidrofobik alanlar, hidrojen bağı ve anahtar rezidüler dahil olmak üzere reseptör üzerinde bulunan ilaç bağlanma bölgelerinin fizikokimyasal özelliklerini analiz etmede moleküler modelleme yazılımları kullanılabilir. Ardından küçük molekül veri bankalarının taranmasında veya moleküler şekli reseptörün bağlanma bölgesiyle eşleşen ve bağlanma afinitesi yüksek olan moleküllerin

tanımlanmasında çeşitli ilaç tasarım tekniklerinden faydalanılmaktadır. Bir sonraki aşamada, yüksek bağlanma afinitesine sahip olan moleküller sentezlenmekte ve ilaç olarak daha ileri geliştirilmeleri amacıyla biyolojik aktiviteleri test edilmektedir (Lin *et al.* 2020).



**Şekil 25.** SHP-2<sup>WT</sup> enziminin X-ışını kristallografisi yöntemiyle elde edilen 3D yapısı (PDB kodu: 5EHR)

### ST

ST terminolojisi 1980’li yılların sonlarında kavramsallaştırılmış olup yöntemin temel konsepti bugüne kadar değişmemiştir. ST’nin arkasındaki konsept basittir, yani “çeşitli molekülleri içeren sanal kütüphanelerden potansiyel olarak aktif bileşikleri almak ve önceliklendirmek”tir. ST uygulamalarının ilk başarılı girişimi Abbott laboratuvarlarında yeni bir dopamin D1-reseptör agonistinin keşfedilmesidir. Bu keşif modern ST döneminin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Modern ST teknikleri hızlı, gelişmiş, otomatik ve kullanıcı dostudur (Kumar *et al.* 2015).

Son yıllarda hesaplamalı kaynakların ve küçük molekül veri bankalarının hızlı gelişimi ilaç öncüsü bileşiklerin geliştirilmesinde büyük atılımlara yol açmıştır. Yeni ilaç hedeflerinin sayısı katlanarak arttıkça, ilaç keşif sürecini hızlandırmak için hesaplamalı yöntemlerin kullanımı da giderek yaygınlaşmaktadır. Bu durum, ST teknolojisi için molekül veritabanlarında yüksek verimli docking, homoloji ve farmakofor araştırmaları gibi BDİT ve kimyasal biyoinformatik tekniklerini kapsayan çeşitli yaklaşımların kullanımlarının artmasına yol açmıştır. ST, BDİT yöntemlerinin önemli bir parçasıdır. Ayrıca potansiyel ilaç öncüsü bileşikleri belirlemenin muhtemel en ucuz yoludur ve günümüzde bu teknoloji sayesinde elde edilen birçok başarı öyküsü bulunmaktadır (Tablo 7) (Lin *et al.* 2020).

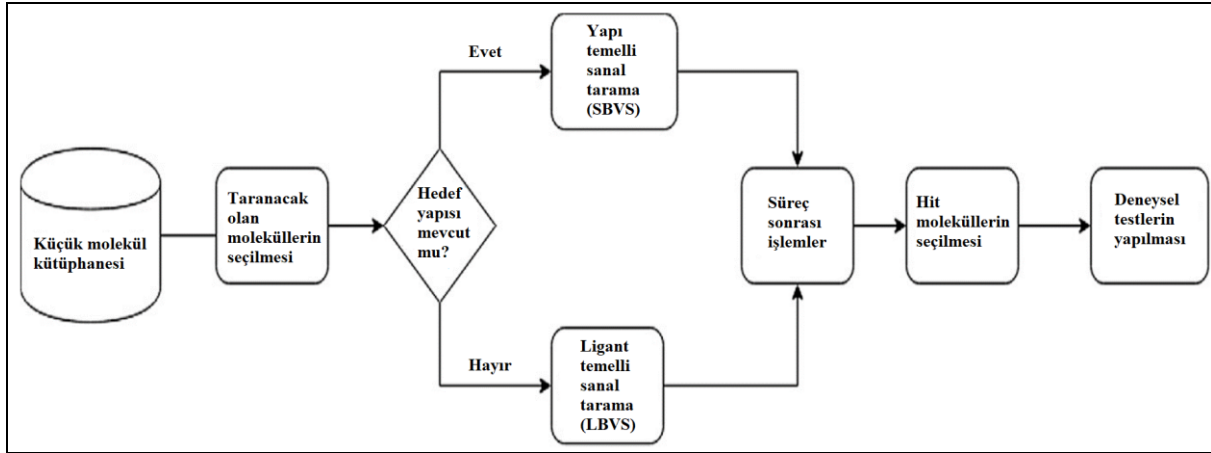
**Tablo 7.** Docking Tabanlı ST Teknikleri Kullanılarak Elde Edilen Antikanser Öncü Molekül Örnekleri (Kumar *et al.* 2015)

| Bileşiğin Adı     | Hedefin Adı          | Aktivite Sonucu                   | Referans                     |
|-------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Bileşik #1 (DIMN) | AR                   | IC <sub>50</sub> = 3,0 µM         | Song <i>et al.</i> 2012      |
| Bileşik 13        | EGFR kinaz           | IC <sub>50</sub> = 3,5 µM         | Li <i>et al.</i> 2012        |
| S3I-201           | STAT3                | IC <sub>50</sub> = 86,0 µM        | Siddiquee <i>et al.</i> 2007 |
| NSC13000          | NQO2                 | IC <sub>50</sub> = 420,0 µM       | Nolan <i>et al.</i> 2012     |
| Bileşik 10 ve 12  | ERCC1-XPA etkileşimi | K <sub>d</sub> = 27,4 ve 66,8 µM  | Barakat <i>et al.</i> 2012   |
| Chk#2 ve Chk#4    | Chk1                 | IC <sub>50</sub> = 9,6 ve 49,5 µM | Li <i>et al.</i> 2011        |

İlaç keşfinde yeni öncü bileşiklerin tanımlanmasında kullanılan öncelikli teknik, biyolojik hedefler için büyük kimyasal kütüphanelerin fiziksel olarak taranmasına izin veren HTS tekniğidir. Bu deneylerde 1 milyondan fazla bileşiğin biyokimyasal analizi tek tek gerçekleştirilmekte ve bu sayede yeni öncü bileşikler tanımlanmaktadır. Ancak bu teknoloji çok geniş bir zaman aralığı ve büyük bir maliyet gerektirmektedir. Bu nedenle, alternatif olarak, daha ucuz ve daha verimli olan “yüksek verimli sanal tarama (high throughput virtual screening; HTVS)” hesaplamalı tekniği ortaya çıkmıştır. HTVS tekniği yeni bir ilacın erken geliştirme aşamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tekniğin en önemli amacı, büyük çaptaki molekül kütüphanelerinden biyolojik bir aktiviteye sahip olabilecek yeni küçük molekülü ligantların yapısını belirlemektir. HTVS’nin bu amacı, HTS yönteminin amacıyla uyumludur fakat HTVS tekniklerinin farmakolojik aktivite ölçümlerinde gereken bileşik sayısını önemli ölçüde azaltarak birçok deneysel maliyetten tasarruf edilebilmesi ve deneysel çalışmaların tüm moleküller üzerinde gerçekleştirilme zorunluluğunun olmaması gibi birtakım avantajları mevcuttur (Lin *et al.* 2020).

ST yaygın olarak kullanılan bir teknik olmasına rağmen yapılan deneylerin güvenilirliğini artırmak için seçilen protokolün valide olması gerekmektedir. Bu amaçla, kullanılan arama yöntemi ve skorlama fonksiyonunun, başlangıçtaki hedef yapısıyla kompleks haline getirilmiş ligantın deneysel bağlanma modunu yeniden üretip üretmediğini değerlendirmek önem arz etmektedir. Validasyon çalışmaları, ST teknikleri için büyük bir öneme sahiptir. Çünkü bu çalışmalarla daha pahalı ve zaman alıcı olan deneysel testlere yönlendirilecek “aktif olmayan” moleküllerin sayısı önemli ölçüde azaltılabilmektedir. Seçilen hit molekülleri, bir sonraki aşamada, kimyasal sentez veya ticari satın alma yoluyla elde edildikten sonra enzimatik ve farmakolojik aktivitelerinin belirlendiği *in vitro* ve *in vivo* deneysel çalışmalara tabii tutulmaktadır. Bu sonuçlara dayanarak, en umut verici bileşikler, farmakokinetik özelliklerin iyileştirilmesi ve böylece etki gücü ve/veya seçicilik gibi

özelliklerinin optimizasyonu amacıyla genellikle teorik (hesaplamalı olmayan) faza döndürülmektedir (Guedes *et al.* 2014). Güncel ST yaklaşımları, hedef yapı ve aktif moleküllerin ön bilgisine bağlı olarak, SBVS ve LBVS olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 26). BDİT çalışmalarında, SBVS ve LBVS teknikleri, birlikte veya birbirlerinden bağımsız olarak kullanılabilir (Li 2020).



**Şekil 26.** Bir küçük molekül kütüphanesinde ST sürecini ifade eden iş akış şeması (Li 2020)

### ***Moleküler kenetlenme (docking)***

Moleküler kenetlenme (docking), *in silico* ilaç tasarımında en çok kullanılan moleküler modelleme tekniklerinden biridir (Ribeiro 2014). Belirli bir hedef bağlanma bölgesinde bir bileşiğin olası bağlanma modlarını öngörebilen ve ilgili molekülün bağlanma cebinde bulunan özelliklerle uygunluğu ve tamamlayıcılığına dayanarak bağlanma afinitesini (biyoafinitesini) tahmin edebilen yapı temelli ilaç tasarım yöntemlerindendir. Bununla birlikte bağlanma bölgesiyle kenetlenmiş bileşiklerin doğru bir şekilde skorlanarak sıralanması, yeni ilaç etken maddelerinin keşfi veya mevcut olan öncü bileşiklerin optimizasyonu için kritik bir adımdır (Cheng *et al.* 2012; Hung and Chen 2014; Surabhi and Singh 2018).

Günümüzde geniş kapsamlı küçük molekül veri bankalarını taramak ve buradan ilaç adayı olabilecek molekülleri seçmek için ucuz ve hızlı sonuç veren docking algoritmaları kullanılmaktadır. Bu algoritmalar arasındaki farklılıklar ligant ve reseptör yapılarına yönelik oluşturulan 3D modeller ve bu yapılarda izin verilen serbestlik derecelerinden ileri gelmektedir. Bir ligantın bağlanması sonucunda yapısında birçok konformasyonel değişim meydana geldiği bilinen protein yapıları iyi derecede karakterize edilse dahi, genellikle ligant bağlı protein konformasyonları kesin olarak bilinmemektedir. Bu sebeple birçok docking yaklaşımı ligantı esnek, protein yapısını ise rijit olarak kabul etmektedir (Eldridge *et al.* 1997; Ece 2011).

Hesaplamalı protein-ligant docking çalışmalarını gerçekleştirebilmek için incelenen hedef proteinin atomik çözünürlükte bir 3D yapısı mevcut olmalıdır. Bu amaçla

kullanılabilecek en güvenilir kaynaklardan biri PDB'dir. Buradan elde edilen 3D protein yapılarının kalitesi, gerçekleştirilecek olan docking çalışmalarının başarısını doğrudan etkilemektedir. Makromolekülün yapısındaki ufak değişiklikler hesaplamalı docking deneylerinin sonucunu ciddi bir şekilde değiştirebilmektedir. Proteinlerin kristal yapılarına ait atomik çözünürlük değerlerinin ideal olarak 2,5 Å'un altında olması gerektiği belirlenmiştir (Ece 2011).

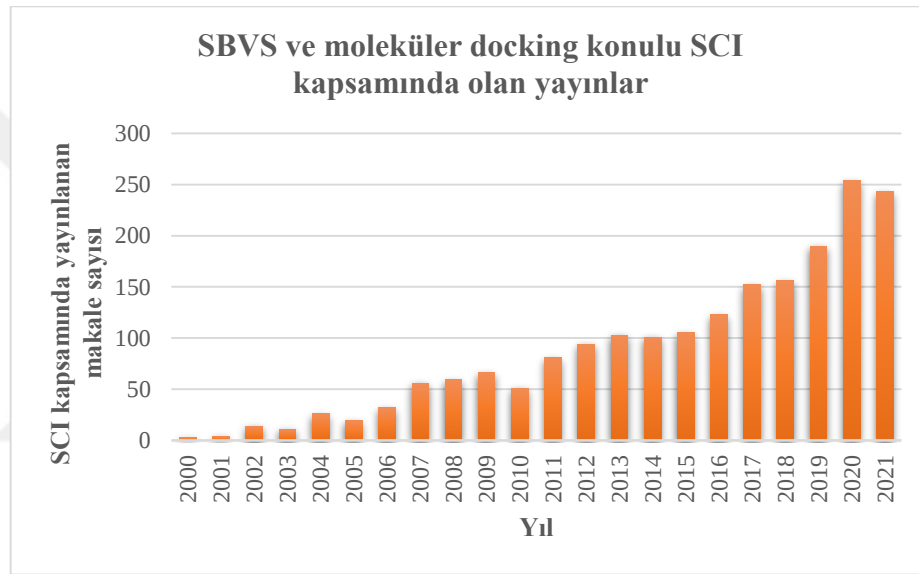
Ligant ve hedef protein arasındaki toplam bağlanma afiniteleri karşılaştırıldığı zaman alternatif ligant konformasyonları arasındaki enerji farklılıklarının az olduğu görülmektedir. Ayrıca, esnek ligantların, bir *in vivo* ortama benzer şekilde solüsyon içerisinde bulundukları durumlarda sahip oldukları minimum enerjili konformasyonlara göre daha farklı biyoaktif konformasyonlar kazanabildiği görüşü de nispeten yaygındır. İlaç benzeri küçük moleküller genellikle esnektir ve bu moleküllerin %70'i 2 ila 8 arasında dönebilen bağ içermektedir. Ligantların çoklu konformasyonlarının rijit bir docking algoritmasıyla değerlendirilmesi ise ligantın esnek varsayıldığı yaklaşımların kullanımını gündeme getirmektedir. Ligant esnekliği, tipik olarak, gruplandırma, fragmentasyon ve simülasyon teknikleri veya genetik algoritmalar gibi kombinatoriyal optimizasyon protokollerinin kullanıldığı docking yaklaşımlarında ele alınmaktadır. Hesaplama sürelerinin ligantın konformasyon sayısının artmasıyla orantılı bir şekilde artış göstermesinden dolayı taranacak konformasyonel alanın kapsamı ile analiz süresi arasında bir denge olması gerekmektedir (Ece 2011).

Moleküler docking metodolojisi belirlenen hedefe yönelik bir ligantın en düşük enerjili konformasyonu ile birlikte uygun bağlanma pozunun (oryantasyon) tahmini ve biyoafinitesinin tayini gibi iki temel hedefi içermektedir (Meng *et al.* 2011). Ayrıca çeşitli arama algoritmaları (örneğin; artan yapı ve konformasyonel tarama gibi sistematik metotlar, Monte Carlo ve genetik algoritmalar gibi rastgele veya olasılıklı metotlar, MD ve enerji optimizasyonu gibi simülasyon yöntemleri) ve skorumlama fonksiyonları (örneğin; kuvvet alanı temelli, ampirik ve bilgi temelli skorumlama fonksiyonları) ligantın farklı konformasyonlarını oluşturmak ve analiz etmek için kullanılan temel araçlardır (Ülgen 2012; Ribeiro 2014).

Mevcut metotlara uygun olarak güvenilir ve daha doğru sonuçlar veren yeni algoritmaların geliştirilmesinde, uygulama aşamasında kullanılacak stratejilerin daha iyi planlanmasında ve yapılan çalışmaların gereken ölçüde güvenilirliğinin sağlanmasında bilgisayar gücüne duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Geleneksel HTS yöntemlerine kıyasla, *in silico* yöntemlerin, geniş kapsamlı bileşik kütüphanelerinde kısa bir süre içerisinde aktivite odaklı tarama yapabilme imkanı sağlaması, ilaç olma potansiyeli yüksek olan

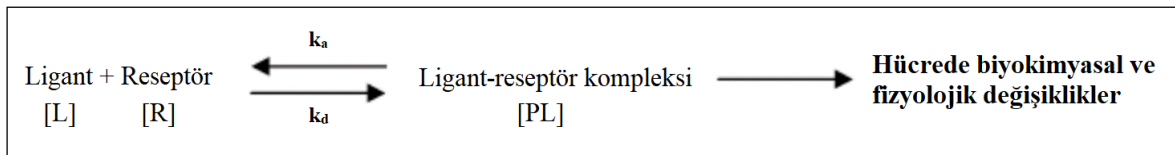
bileşiklere daha az maliyetli olacak şekilde ve daha kolay ulaşmayı mümkün kılmaktadır (Meng *et al.* 2011; Jean-Quartier *et al.* 2018).

Günümüzde *in silico* araçların yeni ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında kritik bir öneme sahip olduğunun anlaşılmasıyla birlikte literatürde son yıllarda SBVS ve moleküler docking yöntemlerinin bir arada kullanıldığı araştırmaların sayısının artması da beklenen bir durumdur (Şekil 27). Ayrıca bu tez çalışmasında SHP-2 overeksprese meme kanserinin tedavisine yönelik terapötik madde olarak kullanım potansiyeline sahip yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerinin tanımlanması amacıyla SBVS teknikleri kullanılmıştır. Bu sayede *in vitro* biyolojik aktivite çalışmaları kapsamında test edilecek final hit moleküllerin, SHP-2'ye karşı olası inhibitör etkinliklerinin yüksek olacağı öngörülmektedir.



**Şekil 27.** Son 22 yılda SCI kapsamında yayınlanan “SBVS” ve “moleküler docking” tekniklerinin bir arada kullanıldığı makaleler (2000-2021) (Kaynak: Web of Science)

Moleküler modellemede ilaç-reseptör etkileşimlerini anlamak için moleküler tanıma işlemi simüle edilmektedir. Ligant ve reseptörün moleküler tanıma olaylarının çoğu Şekil 28'deki etkileşim türünü içermektedir (Salahudeen *et al.* 2017).



**Şekil 28.** Moleküler düzeyde protein-ligant (ilaç) etkileşimleri ve biyolojik yanıt oluşumu

Şekil 28'de  $k_a$  asosiyasyon (birleşme) sabitini ifade eden deneysel bir değerdir ve ligantın biyoaktivitesini hesaplamak için gereklidir (Eşitlik 1 ve 2). Protein-ligant komplekslerine ait  $\Delta G$  değerlerinin hesaplanmasında sterik ve elektrostatik parametreler, enzim

ve inhibitörün hidrojen bağı yapma kapasiteleri, moleküllerin rijiditesi, desolvasyon, rotasyonel ve translasyonel entropi gibi faktörler önem arz etmektedir (Kitchen *et al.* 2004).

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (\text{Eşitlik 1})$$

$$K_a = K_d^{-1} = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Moleküler docking işlemi yapılırken kullanılan programların arama algoritmalarına göre çeşitli pozlar oluşturulmakta ve ardından bu pozların bağlanma serbest enerjileri skorlanmaktadır. Eşitlik 3'te çeşitli kenetlenme algoritmalarının oluşturulmasında kullanılan genel bağlanma serbest enerji fonksiyonu verilmiştir (Kantarcıoğlu 2017).

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta G_{H\text{-bağ.}} \sum_{H\text{-bağ.}} f(\Delta r, \Delta \alpha) + \Delta G_{iyonik} \sum_{iyonik} f(\Delta r, \Delta \alpha) + \Delta G_{arom.} \sum_{arom.} f(\Delta r, \Delta \alpha) + \Delta G_{lipo.} \sum_{lipo.} |A_{lipo.}| + (\Delta G_{rot.} \times N_{rot.}) \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Eşitlik 3'te buna göre,  $\Delta G_0$  standart bağlanma serbest enerjisini ifade etmektedir.  $\Delta G_{H\text{-bağ.}}$  hidrojen bağlarının,  $\Delta G_{iyonik}$  iyonik etkileşimlerin,  $\Delta G_{arom.}$  aromatik etkileşimlerin ve  $\Delta G_{lipo.}$  lipofilik etkileşimlerin bağlanma serbest enerjisine olan katkısını tanımlamaktadır.  $\Delta G_{rot.}$  ise bağlanma serbest enerjisine uygulanan rotasyonel penaltıları belirtmektedir (Kantarcıoğlu 2017).

Genel olarak moleküler docking çalışmalarında AutoDock, AutoDock Vina ve Glide gibi çeşitli programlar kullanılmaktadır (Li 2020). Glide docking modülü bağlanma bölgesinde bulunan bir ligantın olası konformasyonlarını araştırmada hiyerarşik bir filtreleme sistemi kullanmaktadır. Reseptörün şekli ve özellikleri bir grid üzerinde birden fazla alanla belirtilmekte ve docking işlemi ilerledikçe hesaplamalar giderek daha doğru bir hale gelmektedir. Minimum torsiyonel açılar kapsamlı bir şekilde araştırıldıktan sonra liganta ait bir dizi başlangıç konformasyonu üretilmekte ve ilgili konformerler kombinatoryal biçimde kümelenmektedir. Konformasyonel arama, arama alanını önemli ölçüde daraltan ve dikkate alınması gereken poz sayısını azaltan kaba bir konumlandırma ve skorelama aşamasıyla başlamaktadır. Seçilen konformasyonların enerjileri All Atom Optimized Potential for Liquid Simulations (OPLS-AA) kuvvet alanı kullanılarak reseptörün bağlanma bölgesinde minimize edilmektedir. Daha sonrasında en düşük enerjiye sahip docking pozlarının torsiyonel minimum değerleri incelenmekte ve bir Monte Carlo prosedürüyle ligantın periferik gruplarının oryantasyonu yapılmaktadır. Minimize edilen pozlar kuvvet alanına dayalı bileşenleri ve solvasyonu da hesaba katan ek terimleri içeren ChemScore fonksiyonunun daha sofistike bir versiyonu olan GlideScore kullanılarak yeniden skorlanmaktadır (Sperandio *et al.* 2011).

Wang *et al.* (2016), on farklı kenetlenme aracının örnekleme ve skorlama güçlerini değerlendirdikleri çalışmalarında Glide Ekstra Kesinlik (Glide/Extra Precision; Glide/XP) modülünün poz tahminleriyle ilgili olarak en güvenilir çözümleri sunduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında, SHP-2 enziminin allosterik bölgesindeki protein-ligant etkileşimleri sırasıyla Schrödinger moleküler modelleme paketinde bulunan Glide/HTVS, Glide Standart Kesinlik (Glide/Standart Precision; Glide/SP, Glide/XP ve Glide/Prime İndüklenmiş Fit Yerleştirme (Glide/Prime Induced Fit Docking; Glide/Prime IFD) modülleri kullanılarak tahmin edilmiştir.

Glide/HTVS, Glide/SP, Glide/XP ve Glide/Prime IFD gibi çeşitli docking işlemlerinde kullanılan algoritmalar, skorlama fonksiyonlarının farklılığı sayesinde çok sayıda molekülü elimine edebilme kapasitesine sahiptir (Kantarcıoğlu 2017). Glide/HTVS modu belirlenen enzime karşı milyonlarca bileşiğin nispeten kısa sürede taranmasında kullanılabilecek bir docking yaklaşımıdır. Glide/SP ise yaklaşık 100,000 adet molekülü taramak için daha uygundur. Glide/XP modu desolvasyon enerjisi ve yük penaltıları gibi çeşitli penaltıları  $\Delta G$  hesaplamalarına dahil etmekte ve yaklaşık olarak 1,000 moleküle kadar gerçekleştirilen kenetlenme çalışmalarında tercih edilmektedir. Hidrofobik etkileşimlerin de dikkate alındığı Glide/XP yaklaşımı kullanılan skorlama fonksiyonu farklılığı nedeniyle Glide/SP'den daha hassastır. Glide/SP modu protein ve ligantın bağlanmasındaki kusurları daha makul kılabilen yumuşatılmış bir docking modu iken, buna karşılık Glide/XP modu ilgili moleküller açısından daha zorlayıcı bir fonksiyona sahiptir ve belirlenmiş fizikokimyasal ilkeleri ihlal etme eğilimi gösteren ligant pozları için çeşitli penaltılar uygulamaktadır. Glide/SP ve Glide/XP hesaplamalarında kullanılan algoritmalar sırasıyla Eşitlik 4 ve 5'te verilmiştir (Friesner *et al.* 2006; Kantarcıoğlu 2017; Sayın 2019).

$$\begin{aligned} \Delta G = & C_{\text{lipo.lipo.}} \Sigma f(r_r) + \Sigma g(\Delta r)h(\Delta a) + C_{\text{Hbağ.-nötr.-yük.}} + \Sigma g(\Delta r)h(\Delta a) + \\ & C_{\text{Hbağ.-yük.-yük.}} + \Sigma g(\Delta r)h(\Delta a) + C_{\text{maks.-metal-iyon}} \Sigma f(r_{lm}) + (C_{\text{rot}}H_{\text{rot}}) + \\ & (C_{\text{polar-hidrofob.}} \times V_{\text{polar-hidrofob.}}) + (C_{\text{coul.}} \times E_{\text{coul.}}) + (C_{\text{vdW}} \times E_{\text{vdW}}) + \\ & \text{solvasyon terimleri} \end{aligned} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Eşitlik 4, ligant ve reseptör arasındaki lipofilik-lipofilik etkileşimleri, protein ve ligantın nötr ve yüklü atomları arasındaki hidrojen bağ etkileşimlerini, metal ve ligant atomları arasındaki iyonik etkileşimleri, polar ve hidrofobik atomların rotasyonel enerji terimlerini, elektrostatik ve van der Waals etkileşimlerini, ayrıca ortamdaki çözücü ve çözünmüş durumda olan moleküllerden kaynaklanan solvasyon enerji terimlerini içermektedir (Sayın 2019).

$$\begin{aligned} \text{XP GlideScore} = & E_{\text{coul.}} + E_{\text{vdW}} + (E_{\text{hidrofob. etk.}} + E_{\text{nötral-nötral hidr. bağ.}} + \\ & E_{\text{yükü-lü-yükü hidr. bağ.}} + E_{\pi-\pi \text{ ve katyon-}\pi \text{ etk.}} + E_{\text{hidr. bağ. çifti}} + E_{\text{lipofilik etk. çifti}}) \\ & + (E_{\text{desolvasyon}} + E_{\text{ligant gerginliği}}) \end{aligned} \quad (\text{Eşitlik 5})$$

Glide/Prime IFD, docking işlemi esnasında protein ve ligant yapılarına esneklik kazandırmayı amaçlamaktadır. Bu olay esnek ligantın Glide/SP veya Glide/XP yaklaşımlarından biri kullanılarak rijit reseptöre iteratif olarak kenetlenmesinin ardından ilgili ligantın uygun bir konformasyona sahip olabilmesi için proteinin aktif bölgesinin Prime yapı tahmin aracıyla iyileştirilmesine dayanmaktadır. Protokol esasen dört adımdan oluşmaktadır. İlk aşamada rijit docking yaklaşımı kullanılarak ligant pozları oluşturulmaktadır. Bir sonraki aşamada üretilen her bir poz için protein konformasyonları örneklenmektedir. Üçüncü aşamada ligant molekülü optimize edilmiş yani yan zincirleri yönlendirilmiş olan protein konformasyonlarına yeniden kenetlenmektedir. Son aşamada da reseptör gerginliği ve solvasyon terimleriyle birlikte her pozla ilişkili bağlanma serbest enerjileri skorlanarak; ligantlar arasında GlideScore değerlerine göre bir sıralama yapılmaktadır (Zhong *et al.* 2009; Clark *et al.* 2016; Kantarcıoğlu 2017).

### **MD simülasyonları**

MD simülasyonlarında atomlar arası etkileşimleri yöneten genel bir fizik modeline dayalı olarak bir proteindeki veya diğer moleküler sistemlerdeki her atomun belirli bir zaman diliminde nasıl hareket edeceğinin tahmin edilmesi amaçlanmaktadır. Böylece bu teknik sayesinde ligant bağlanması ve konformasyonel değişimler gibi önemli biyomoleküler süreçler yakalanabilmekte ve femtosaniye (fs;  $10^{-15}$ ) zamansal çözünürlükte tüm atomların pozisyonları ortaya çıkartılabilmektedir. MD simülasyon yöntemi genellikle X-ışını kristallografisi, NMR ve kriyojenik elektron mikroskobu (kriyo-EM) gibi çeşitli yapısal biyoloji teknikleriyle bir arada kullanılmaktadır (Hollingsworth and Dror 2018).

Tipik bir tüm atomlu MD simülasyonunda bir ilacın tüm atomları ve hedef proteininin fizyolojik çözücü ortamındaki hareketleri, bir dizi ayırık kısa zaman adımında (örneğin, 2 fs) yüzlerce nanosaniye (ns;  $10^{-9}$ ) veya daha uzun bir zaman aralığı boyunca simüle edilmektedir. Böylece her zaman adımında her bir atom üzerindeki kuvvetler, Newton'un hareket yasalarına göre, atomik konum ve hızdan hesaplanmaktadır. Bu işlemler sonucunda elde edilen yörüngeler ise bir biyomoleküler sisteme ait dinamiksel ve davranışsal özelliklerin incelenmesinde ve ayrıca ligantların reseptöre bağlanma afinitelerinin tahmin edilmesinde kullanılmaktadır. MD simülasyonlarının ilaç keşif ve geliştirme sürecindeki uygulamaları protein-ligant

bağlanmasının araştırılmasından bu bağlanma olayının serbest enerjisinin hesaplanmasına kadar geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır (Choi *et al.* 2019).

MD simülasyonları, izole edilmiş veya inhibitörlerle kompleks halindeki proteinlerin yapısal ve dinamik özelliklerinin incelenmesi bakımından, mevcut zamanın bir fonksiyonu olarak moleküler hareketlerin detaylarına önemli bir bakış açısı getirmekte ve aynı zamanda deneysel olarak zor elde edilen proteinlerin fonksiyonlarının anlaşılmasında deneysel araştırmalara yakın bilgiler sunmaktadır (Farrokhzadeh *et al.* 2019). Bu teknikler, genel olarak, bir ligantın bağlanma cebiyle yaptığı temel etkileşimlerin tanımlanmasında, bir ligant tarafından bağlanma cebinde indüklenen yeniden düzenleme olaylarının tahmin edilmesinde veya potansiyel ligant pozlarının test edilmesi ve iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca allosterik ilaçların tasarım ve optimizasyon süreçlerinde de önemli roller üstlenmektedirler (Hollingsworth and Dror 2018).

Günümüzde büyük kapsamlı molekül veri bankalarının taranmasında moleküler docking ve diğer HTVS yöntemleri önemli bir yer tutmasına rağmen; MD simülasyon teknikleri, başarılı hit moleküllerin keşfi ve optimizasyonunda kritik öneme sahip olan ilaç-hedef bağlanma etkileşimlerinin tahmin edilmesi ve kapsamlı olarak değerlendirilmesine imkan tanınması gibi yönleriyle giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Klasik “anahtar-kilit” ligant bağlanma teorisine göre rijit bir protein yapısına anahtar görevi gören küçük moleküller bağlanmaktadır. Ancak eldeki mevcut bilgiler, ligantların reseptöre bağlanması sonucunda 3D protein yapılarında birtakım konformasyonel değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir. Bu durum, protein-ilâç bağlanmasında “anahtar-kilit” hipotezinin geçersiz olduğunu ifade etmektedir. Çoğu moleküler docking programı bir ilacın reseptöre bağlanması sırasında neler olduğuna dair yalnızca statik bir fikir vermektedir. Bu nedenle konformasyonel değişikliklerin daha fazla araştırılmasına izin verecek yönde ilaç-hedef bağlanma etkileşimlerinin incelenmesinde MD simülasyon tekniği sıklıkla tercih edilen bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır (Choi *et al.* 2019).

### ***MM/PBSA hesaplamaları***

MM/PBSA gibi moleküler mekanik enerji ve örtük (kapalı) solvasyon modellerini birleştiren hesaplamalı yöntemler serbest enerji hesaplamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler docking çalışmalarında kullanılan çoğu empirik skorlama fonksiyonundan farklı olarak, MM/PBSA metodunda her bir enerji terimi için farklı parametrelere uyacak büyük bir eğitim setine ihtiyaç duyulmamaktadır (Hou *et al.* 2011).

MM/PBSA yaklaşımında moleküler docking çalışmalarından elde edilen ligant-protein komplekslerine ait  $\Delta G$  değerleri, kompleksin serbest enerjisiyle bağlanmamış bileşenlerin (örneğin; reseptör ve ligant) serbest enerjileri arasındaki fark olarak tahmin edilmektedir. Her bir bileşenin serbest enerjisinin tahmininde hem entropik hem de entalpik terimler dikkate alınmaktadır. Toplam  $\Delta G$  ise ligant ve protein arasındaki gaz fazı etkileşim enerjisinin ( $\Delta E_{MM}$ ), gaz fazından çözünmüş sıvı faza geçişle ilişkili solvasyon serbest enerjisinin ( $\Delta G_{solv.}$ ) ve ligant bağlanmasıyla ilişkili konformasyonel entropideki değişimin ( $-T\Delta S$ ) toplamı olarak hesaplanmaktadır (Eşitlik 6) (Poli *et al.* 2020).

$$\Delta G = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv.} - T\Delta S \quad (\text{Eşitlik 6})$$

MM/PBSA metodunda  $\Delta E_{MM}$ , moleküler mekaniğe dayalı olarak, iç enerji ( $\Delta E_{int.}$ ), elektrostatik etkileşim ( $\Delta E_{ele.}$ ) ve van der Waals etkileşim enerjileri ( $\Delta E_{vdw}$ ) gibi farklı bileşenler dikkate alınarak hesaplanmaktadır (Eşitlik 7) (Poli *et al.* 2020).

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{int.} + \Delta E_{ele.} + \Delta E_{vdw} \quad (\text{Eşitlik 7})$$

Solvasyon serbest enerjisi olan  $\Delta G_{solv.}$ , polar ve nonpolar bileşenlerin toplamı olarak tahmin edilmektedir (Eşitlik 8). Burada polar katkı Poisson-Boltzmann örtük çözücü modeli ( $\Delta G_{PB}$ ) kullanılarak hesaplanırken; nonpolar katkı ise nonpolar desolvasyon enerji terimine ( $\Delta G_{SA}$ ) dayalı olarak hesaplanmaktadır. Poisson-Boltzmann modeline bir alternatif olarak, çoğunlukla Genelleştirilmiş Born modelleri kullanılmaktadır. Genelleştirilmiş Born modellerinin kullanımıyla gerçekleştirilen tahminlerin doğruluk oranları nispeten az olmaktadır ancak bu modeller daha hızlı bir şekilde tahmin yapmaya imkan tanımlarından dolayı tercih edilmektedir (Poli *et al.* 2020).

$$\Delta G_{solv.} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} \quad (\text{Eşitlik 8})$$

Günümüzde  $\Delta G$  hesaplamaları farklı amaçlar için uygulanabilmektedir. Bunlar arasında, biyoaktif yapısı bilinmeyen bir bileşiğin hedef bağlanma bölgesine en güvenilir şekilde yerleştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen kapsamlı poz tahmini çalışmaları, yapı-aktivite ilişkilerinin daha iyi rasyonelize edilmesi ve öncü bileşiklerin optimizasyon çalışmaları için gerekli kılavuzların oluşturulması yer almaktadır. Böylece ligant-protein komplekslerinin  $\Delta G$  değerleri ligant ve proteinin farklı konformasyonlara sahip olduğu tüm MD trajektorisinden çıkarılan birkaç farklı anlık görüntü kullanılarak hesaplanmakta ve nihai  $\Delta G$  değeri farklı anlık görüntüler için tahmin edilen enerjilerin ortalaması alınarak elde edilmektedir. MM/PBSA yöntemi kısa MD simülasyonlarından çıkarılan anlık görüntülere veya enerjisi minimize edilmiş ligant-protein komplekslerine uygulanabilmektedir. Bu durum, tek bir ligant-protein kompleksiyle ilişkili  $\Delta G$  değerinin hesaplanmasında gereken süreyi önemli ölçüde azaltmakta

ve böylece çok sayıda kompleksin makul bir süre içerisinde değerlendirilmesine izin vermektedir. Ayrıca MM/PBSA metodu, ST çalışmaları esnasında yeni hit moleküllerin tanımlanması amacıyla kullanılan moleküler docking tabanlı ST yaklaşımlarının tarama gücü ve hit molekül bulma oranlarının iyileştirilmesinde bir yeniden skorlama protokolü olarak uygulanmaktadır (Poli *et al.* 2020).

### **Ligant temelli ilaç tasarımı**

#### **LBVS**

LBVS metodlarında bir küçük molekül veri bankasındaki etkin bileşikleri tanımlamak amacıyla ligant benzerliği yaklaşımı kullanılmaktadır. İlaç olmaya aday bir molekülün hedef yapıya uygunluğunu ölçen yapı temelli yöntemlerle kıyaslandığında, ligant temelli yöntemlerde aktif bileşiklere benzeyen moleküller doğrudan aranabilmektedir. Bu noktada benzer moleküllerin benzer biyolojik etkinliğe sahip olabileceği varsayımı yapılabilir ancak bu her zaman doğru değildir. Ligant temelli yöntemlerin temel farklılığı, kimyasal yapıların ifade biçimleri ve benzerlik ölçümlerinden ileri gelmektedir (Li 2020).

Ligant temelli yaklaşımların kullanılması özellikle hedef proteinin 3D kristal yapısının bilinmediği durumlarda faydalıdır. Ayrıca bu yaklaşımlar enzime bağlanma veya enzim aktivitesi için gerekli temel özelliklere sahip olmayan bileşikleri elimine etmek üzere SBVS yöntemlerinin uygulanmasından önce moleküler veri bankalarının filtrelendiği bir ön işlem olarak kullanılabilir. LBVS uygulamalarında enzimin aktif bölgesine bağlandığı bilinen bir dizi molekülün aktivite bilgisi gereklidir. Ligant yapıları temel alınarak gerçekleştirilen ST çalışmalarının esası, uygulanan yöntemle göre arama kriterlerinin değiştirilebilir olmasıyla birlikte referans moleküllerle benzer özelliklere sahip moleküllerin tespit edilmesi amacıyla moleküler veri bankalarının taranmasına dayanmaktadır (Kenar 2008; Hamza *et al.* 2012).

Moleküler benzerlik, fragment arama, 3D şekil eşleştirme, QSAR ve farmakofor eşleştirme yöntemleri yaygın olarak kullanılan LBVS yaklaşımlarındandır. Moleküler parmak izi yöntemi, benzer parmak izlerine sahip molekülleri tanımlamak için kimyasal veri bankalarının taranmasında kullanılmaktadır. Farmakofor eşleştirme yöntemlerinde bir dizi aktif ligantın ortak farmakoforik özellikleri tanımlandıktan sonra, bu özellikler esas alınarak kimyasal veri bankaları taranmakta ve ardından moleküllerin aktivitesi çeşitli QSAR modelleri oluşturularak tahmin edilmektedir. Farmakofor terimi, ligant ve hedef protein arasındaki bağlanma etkileşimlerini tanımlayan kimyasal özelliklerin 3D oryantasyonunu ifade etmektedir. Bir farmakofor modeli, aktif moleküllerin 3D yapılarının çakıştırılması sonucunda

ortak özelliklerin belirlenmesiyle oluşturulabilmekte ve ardından bu model moleküler veri bankalarının taranmasında kullanılabilmektedir (Kenar 2008).

### ***İlaç benzerlik özelliklerinin incelenmesi ve farmakokinetik etkiler ile toksisite profillerinin in silico tahmini***

Yeni keşfedilen ilaç adayı moleküllerin belirli biyolojik hedefler üzerinde *in vitro* aktivite potansiyellerinin araştırılması ve bu moleküllerin farmakokinetik ve fizikokimyasal özelliklerinin ilaç keşif sürecinin erken aşamalarında incelenmesi önerilmektedir. 1990'ların sonunda ilaç geliştirme alanında yaşanan yüksek maliyetli geç evre başarısızlıklarının, geliştirilmek üzere seçilen moleküllerin zayıf farmakokinetik özellikleri ve güçlü toksik etkilerinden ileri geldiği kanıtlanmıştır. Böylece ilaç keşif ve geliştirme sürecinin erken dönemlerine, *in vitro* toksisite analizlerine ek olarak, *in vitro* ADME çalışmaları da dahil edilmiştir (Lakshminarayana *et al.* 2015).

Bir bileşiğe ait fizikokimyasal parametreler, söz konusu bileşiğin absorpsiyon ve oral biyoyararlanımının yanı sıra diğer ADME özelliklerini de etkilemektedir. Küçük molekül ilaçlarının çok büyük kümelerinin deneysel ve hesaplamalı analizlerinin gerçekleştirilmesi sonucunda Lipinski'nin beş kuralı oluşturulmuştur. Bu kurala göre ilaç olma potansiyeli taşıyan küçük moleküller şu özelliklere sahip olmalıdır: molekül ağırlığı ( $M_A \leq 500$ ), hesaplanan logP değeri yani *n*-oktanol:su partiyon katsayısı ( $\text{clogP} \leq 5$ ), hidrojen bağ donörü (HBD) sayısı  $\leq 5$  ve hidrojen bağ akseptörü (HBA) sayısı  $\leq 10$ . Bu parametrelerden iki ya da daha fazlasının ihlali, ilacın oral biyoyararlanımındaki olası problemleri işaret etmektedir (Tatar *et al.* 2016). Veber'in kuralında ise moleküler polar yüzey alanı (topological polar surface area; TPSA)  $\leq 140 \text{ \AA}^2$  olan ve en fazla 10 adet dönebilen bağa sahip bileşiklerin iyi bir oral biyoyararlanıma sahip olabileceği fikri öngörülmektedir (Lipinski 2004; Clark 2011; Lakshminarayana *et al.* 2015).

Günümüzde ilaç şirketlerinin kimyasal sentez kapasitelerinin ve uzmanlaşmış biyoteknoloji kurumlarında gerçekleştirilen biyolojik aktivite tarama çalışmalarının önemli ölçüde artış göstermesinden dolayı yeni keşfedilen çok sayıdaki ilaç adayı molekülün absorpsiyon, dağılım, metabolizasyon, eliminasyon ve toksisite (ADMET) profillerinin erken aşamalarda değerlendirilmesinde kullanılabilecek iyi donanımlı *in silico* araçlara duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Van de Waterbeemd and Gifford 2003).

### ***MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> analizi***

MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup>, Clarivate Analytics tarafından sağlanan internet tabanlı bir sistem biyolojisi analiz sunucusudur. Bu platformda mevcut olan hastalık ve ayrıca 40'tan fazla

ADMET QSAR modelleri kullanılarak; ligantların terapötik aktiviteleri ve farmakokinetik özellikleri *in silico* olarak tahmin edilebilmektedir (Ekins *et al.* 2006; Kantarcıoğlu 2017).

MD<sup>TM</sup> veritabanı QSAR, kural tabanlı yöntemler ve sistem biyolojisi yaklaşımlarının tüm temel özelliklerini bir çatı altında birleştiren ve bu sayede endobiyotiklerin/ksenobiyotiklerin ADMET özelliklerinin insanlar üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi amacıyla deneysel çalışmalardan elde edilen tüm verileri hesaplamalı tahminlere entegre ederek kullanıma sunan bir platformdur (Ekins *et al.* 2006). Bu platformda, terapötik aktivite veya toksik etki gibi özelliklerin tahminine yönelik QSAR modellerinin oluşturulmasında ChemTree<sup>TM</sup>'nin özyinelemeli bölümlleme algoritması kullanılmakta ve böylece çeşitli yapısal tanımlayıcılar söz konusu biyolojik etkilerle ilişkilendirilmektedir. Bu amaçla model oluşturmada kullanılan eğitim seti, en iyi sonuçları vermek üzere, pozitifler ve negatifler olarak tanımlanan sırasıyla istenilen özelliğe sahip olan ve bu özelliğe sahip olmayan kimyasalları yaklaşık olarak eşit sayıda içermelidir. Belirli bir terapötik aktivitenin tahmini için kullanılan modelin eğitim setinde ya onaylanmış ilaçlar (piyasadaki mevcut ilaç sayısı 100'den büyükse) ya da klinik deneylerdeki ilaç adayları ve *in vivo* aktiviteye sahip preklinik aşamadaki bileşikler bulunmaktadır. Toksik etkilerin tahmininde kullanılan eğitim setinde ise *in vivo* ortamda söz konusu toksisite türüne neden olan kimyasallar ve ilaçlar yer almaktadır. Her bir modelde aktif/toksik bileşikler "1" aktivite değerini almakta iken; aktif olmayan/toksik olmayan bileşikler ise "0" aktivite değerini almaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, eğitim setlerinin yaklaşık olarak eşit miktarda "1" ve "0" içermesidir (Myshkin *et al.* 2012; Tutumlu 2019; Clarivate Analytics, internet sayfası [www.genego.com](http://www.genego.com)).

MD<sup>TM</sup> platformunda bir QSAR modelinin oluşturulmasında kullanılan prosedür başlıca;

- i. Eğitim seti için doğru negatif kimyasalların seçilmesi,
- ii. Her bir negatif kimyasalın benzerliğinin, tüm pozitif kimyasallara göre hesaplanması ve en yüksek benzerlik değerinin kaydedilmesi,
- iii. 0,9 benzerlikten başlayarak eğitim seti için çeşitli negatif ilaçların üretilmesi,
- iv. 0,9 ila 0,4 arasında toplam altı aralık oluşturulması,
- v. Son aşamada meydana gelen eğitim setinin, modelde en iyi negatif ilaçları seçmek üzere varsayılan ChemTree parametreleriyle özyinelemeli bölümlleme analizine tabi tutulması,
- vi. Test setindeki moleküllerin sayısının, eğitim setindeki moleküllerin yaklaşık %15-20'sini oluşturması suretiyle; bir önceki adımda belirlenen en iyi eğitim setinden 10 rastgele eğitim ve test seti oluşturulması,

- vii. Modelin eğitim setine dayalı olarak oluşturulması ve bu harici eğitim setiyle doğrulanması

aşamalarından meydana gelmektedir. Oluşturulan modellerin kalitesi duyarlılık (Eşitlik 9), spesifiklik (Eşitlik 10), doğruluk (Eşitlik 11) ve Matthews korelasyon katsayısı (Matthews correlation coefficient; MCC) (Eşitlik 12) ile değerlendirilmektedir. Bu parametrelerin en yüksek değerine sahip olan modeller seçilerek terapötik aktivite ve/veya toksisite tahminlerinde kullanılmaktadır (Myshkin *et al.* 2012).

$$\text{Duyarlılık} = \frac{DP}{(DP+YN)} \quad (\text{Eşitlik 9})$$

$$\text{Spesifiklik} = \frac{DN}{(DN+YP)} \quad (\text{Eşitlik 10})$$

$$\text{Doğruluk} = \frac{DP+DN}{(DP+YN+DN+YP)} \quad (\text{Eşitlik 11})$$

$$\text{MCC} = \frac{(DP \times DN) - (YP \times YN)}{\sqrt{(DP+YP)(DP+YN)(DN+YP)(DN+YN)}} \quad (\text{Eşitlik 12})$$

Eşitlik 9, 10, 11 ve 12’de belirtilen DP, YP, DN ve YN kısaltmaları sırasıyla doğru pozitif, yanlış pozitif, doğru negatif ve yanlış negatif terimlerini ifade etmektedir. Duyarlılık, doğru tahmin edilen “pozitif”lerin; spesifiklik ise doğru tahmin edilen “negatif”lerin bir ölçüsüdür. Doğruluk, modelin gerçek değere ne kadar yakın olduğunun bir ifadesidir. MCC ise deneysel değerlerle tahmin edilen değerler arasındaki korelasyon katsayısıdır. Bu dört parametre bir arada, MD<sup>TM</sup> platformundaki QSAR modellerinin uygunluk, sağlamlık ve tahmin gücü gibi özelliklerini ölçmeye yaramaktadır (Oktay 2020).

QSAR modellerinin güvenilirliği, test setindeki moleküller ve eğitim setindeki bu moleküllere en benzer olan moleküller arasındaki yapısal benzerliğin yüzde olarak tahmin edilmesine dayanan bir yaklaşımla belirlenmektedir. MD<sup>TM</sup> yazılımında bu yaklaşımın uygulanması için “Tanimoto önceliklendirme (Tanimoto Prioritization; TP)” özelliği kullanılmaktadır. Böylece bu yazılımda ikili QSAR modelleri aracılığıyla yeni moleküllerin eğitim setindeki moleküllerle yapısal benzerlikleri kıyaslanarak, 25 farklı terapötik aktivite ve 26 farklı toksik etki türünün değerlendirme tahminleri yapılabilmektedir. Buna göre; test edilen bir molekülün terapötik bir aday olabilmesi için hesaplanan tahmini terapötik aktivite değerinin  $\geq 0,5$  aralığında olması, toksik etki değerinin ise 0,5 veya 0,5’ten daha küçük olması gerekmektedir (Erdogan Orhan *et al.* 2019; Balkan 2020; Ünver *et al.* 2020).

MetaCore yazılımı yeni nesil dizileme (next generation sequencing; NGS), gen ekspresyonu, kopya sayısı değişiklikleri (copy number variation; CNV)’ler, metabolik proteomik, mikroRNA ve tarama verilerinin fonksiyonel analizinde kullanılan bir

biyoinformatik paketidir. Manuel olarak derlenebilen yüksek kalitedeki MetaCore veritabanı kullanılarak moleküler etkileşimler ve yollar, küçük molekül bileşiklerin biyolojik etkinlikleri, kimyasal metabolizma olayları ve toksisiteleri hakkında kapsamlı bilgiler elde edilebilmektedir (Kantarcıoğlu 2017).

### ***In Vitro* Biyoaktivite Araştırmaları**

#### **SHP-2 enzim inhibisyonu testi**

Enzimler, biyolojik sistemlerde meydana gelen spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandıran proteinlerdir. Çok sayıda önemli fizyolojik sürecin düzenlenmesine dahil olduklarından dolayı, enzimlerin biyolojik fonksiyonlarını inhibe edebilen moleküller farmakolojik müdahaleler için mükemmel bir odak noktası oluşturmaktadır. Bir enzim inhibitörü, belirli bir enzimin veya enzim grubunun işlevini bloke ederek metabolik yolları seçici olarak bozmakta ve böylece hastalıkların tedavisinde terapötik bir ajan görevi görmektedir. Antibakteriyel, antifungal, antikanser ve antiparaziter ilaç gruplarında yer alan etken maddelerin birçoğunun enzim inhibitörü özelliğinde olduğu ve ayrıca piyasadaki mevcut ilaçların %47'sinin etkinliklerini enzim hedeflerini inhibe ederek gösterdikleri bilinmektedir (Ramsay and Tipton 2017; Kushwaha *et al.* 2020). Buradan hareketle enzimlerin yapısal ve fonksiyonel bozukluklarından kaynaklanan çeşitli hastalıkların tedavisinde yeni bileşiklerin ve mekanizmaların tanımlanmasına yönelik çalışmaların devam ettirilmesinin bazı terapötik alanlar için oldukça önemli bir yere sahip olduğu sonucuna varılmaktadır (Liu *et al.* 2019; Parsonidis *et al.* 2019; Sarver *et al.* 2019).

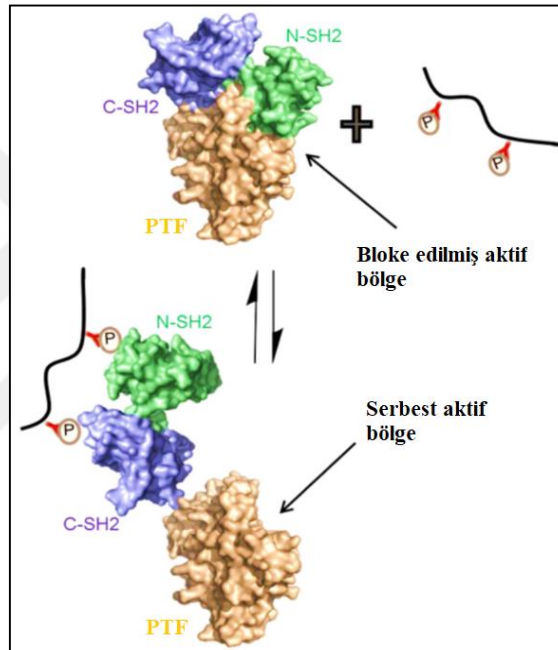
Arzu edilen farmakolojik özelliklere sahip küçük molekül modülatörlerinin keşfi ve geliştirilmesi, sırasıyla aşağıdaki adımların uygulanmasını içeren çok aşamalı bir süreçtir (Sancenon *et al.* 2015).

- i. Belirli terapötik alanlar için “farmakolojik olarak hedeflenebilen (druggable)” durumdaki ilaç hedeflerinin tanımlanması ve valide edilmesi,
- ii. Seçilen hedefe güçlü ve selektif olarak bağlanabilen ve bu hedefin moleküler fonksiyonunu stimüle veya inhibe edebilen küçük moleküllerin *in vitro/in silico* olarak taranması, tanımlanması ve karakterizasyonu/profillemesi,
- iii. *In vivo* prelinik ve klinik çalışmalarla ilaç adaylarının farmakolojik ve toksikolojik açıdan değerlendirilmesi.

İlaç keşif sürecinin ilk aşamalarında belirli bir biyolojik hedefle fizyolojik olarak ilişkili küçük molekül inhibitörlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu, hücre içeren veya içermeyen bir ortamda uygun maliyetli, sağlam, ölçeklenebilir ve önceden valide edilmiş analizler

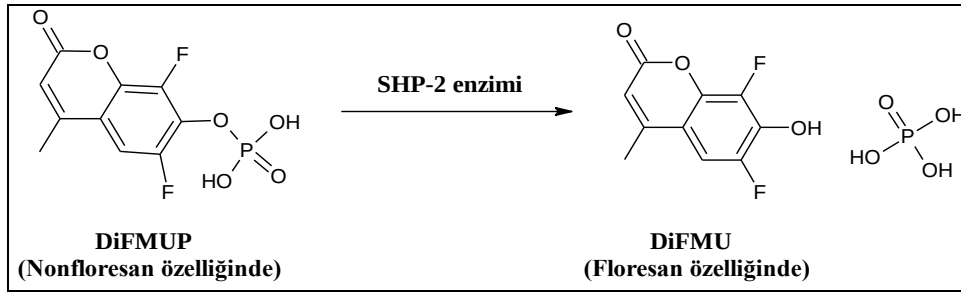
vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Yapılan bu analizler, önemli ölçüde, makromoleküler hedefin veya bu hedefin akış aşağısında bulunan sinyalizasyon moleküllerinin aktivitesindeki değişimlerin güvenilir ve nicel olarak tespit edilmesi ve ölçülmesine dayanmaktadır (Sancenon *et al.* 2015).

SHP-2 enzimi fonksiyonel olarak aktif durumda iken endojen substratları tanımak ve ayrıca biyolojik reaksiyonlarda katalizör olarak görev almaktan sorumludur. Bu enzimin aktivasyonu, SH2 domainlerine bağlanabilen bistirozilfosforillenmiş peptitlerden ileri gelmektedir (Şekil 29). Aktivasyon olayının son aşamasında enzimin otoinhibe olmuş bölgesi serbest hale geçmekte ve bu sayede SHP-2'nin fosfataz aktivitesi ortaya çıkmaktadır (Chen *et al.* 2016; Garcia Fortanet *et al.* 2016).



**Şekil 29.** SHP-2'nin bir bisfosfotirozil peptidiyle açık (aktif bölge serbest) ve kapalı (aktif bölge bloke edilmiş) konformasyonları arasındaki denge durumu (Garcia Fortanet *et al.* 2016)

Bu tez çalışmasında SHP-2 enziminin yeni allosterik inhibitörlerinin keşfedilmesine yönelik gerçekleştirilen *in silico* analizler kapsamında tanımlanan aday inhibitörlerin SHP-2 inhibisyon aktiviteleri, SHP-2'nin katalitik aktivitesinin biyokimyasal yolla ölçümüne olanak tanıyan ve hızlı sonuç veren bir *in vitro* test yöntemiyle belirlenmiştir. Floresan ölçümlerine dayanan bu yöntemde SHP-2'nin katalitik aktivitesinin ölçümü için taşıyıcı substrat olarak 6,8-difloro-4-metilumbelliferil fosfat (DiFMUP) bileşiği kullanılmıştır (Şekil 30) (Welte *et al.* 2005).



**Şekil 30.** Fosfataz aktivitesini ölçen DiFMUP analizi (Garcia Fortanet *et al.* 2016)

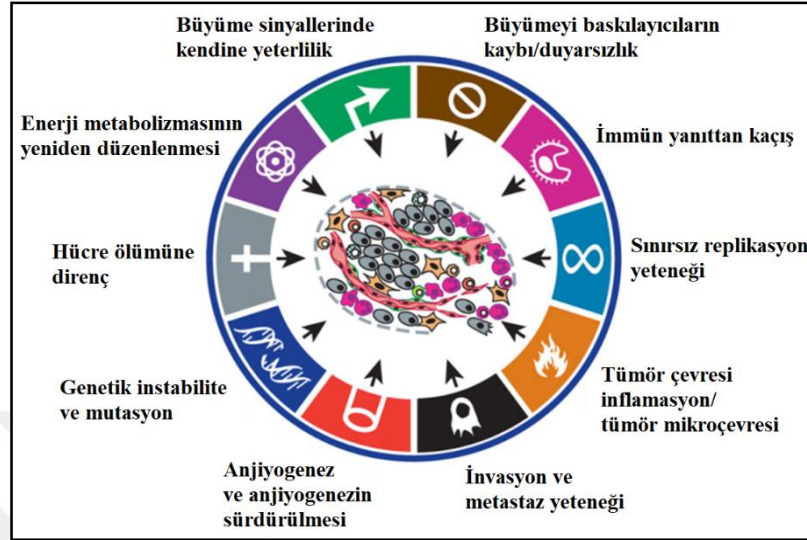
### Seçici antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi

Sitotoksiste, hücrelerde meydana gelen birtakım moleküler olayların sonucunda çeşitli makromoleküllerin sentezinin engellenmesi ve böylece hücrelerin yapı ve fonksiyonlarında belirgin hasarların ortaya çıkmasıdır (Murray *et al.* 2007). Canlı hücreler çeşitli fiziksel, kimyasal veya biyolojik etkenlere maruz kaldıkları zaman, söz konusu etkenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelerde değişen oranlarda sitotoksik etkiler gözlenebilmektedir. Sitotoksik bir madde, hücrelerin proliferasyon yeteneğini kaybetmesine veya apoptoz, otofaji ve nekroz gibi çeşitli hücre ölüm tipleriyle yok olmasına neden olabilmektedir (Galluzzi *et al.* 2009; Kocaçalışkan 2018).

Hanahan and Weinberg (2000), insan kanserlerinin gelişimi sırasında kazanılan kanserin 6 temel biyolojik kabiliyetini (ayırt edici özelliğini) önermişlerdir (Şekil 31). Bunlar, proliferatif sinyalizasyonu sürdürme, anjiyogenezi indüklemeye, invazyon ve metastazı aktive etme, büyüme baskılayıcılarından kaçma, hücre ölümüne direnme ve replikatif ölümsüzlüğü sağlamadır. Ardından 2011 yılında, aynı araştırmacılar, bu 6 temel biyolojik ayırt edici özelliğe düzensiz metabolizma, genomik kararsızlık, bağışıklık sisteminden kaçma ve inflamasyon özelliklerini de eklemişlerdir (Şekil 31) (Hanahan and Weinberg 2011). Böylece kanserin her bir ayırt edici özelliğini değerlendirebilmek amacıyla farklı *in vitro* analiz teknikleri geliştirilmiştir. Araştırmacılar ise bu yöntemleri yanıt aradıkları spesifik araştırma sorusuna/sorularına bağlı olarak seçmektedir (Ediriweera *et al.* 2018).

*In vitro* testler canlı organizmalar dışında kontrollü koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Bugün, kanser ilaçlarının keşfinde kullanılabilecek olan çok çeşitli *in vitro* test sistemleri mevcuttur. Bunlar arasında başlıca hücre canlılığı/sitotoksiste ve antiproliferatif aktivite testleri, hücre migrasyon ve invazyon analizleri, anjiyogenezi izlemede ve enerji metabolizmasının tespitinde kullanılan testler ve apoptoz, senesens ile birlikte oksidatif stres tarama testleri yer almaktadır. Ayrıca gen ve protein ekspresyon analizleri için geliştirilmiş teknikler ve gen mutasyonları ile kromozomal değişikliklerin saptanmasında kullanılan testler de bu alanda yapılan çalışmalara önemli katkılar sağlamaktadır. Her *in vitro*

test sisteminin kendi içerisinde sınırlamaları mevcuttur. Bu yüzden araştırma problemine kesin olarak yanıt verebilecek uygun yöntemlerin seçimi dikkatlice yapılmalıdır. Bununla birlikte test metodunun/metotlarının seçiminde maliyet, gerekli ekipman ve yöntemler gibi faktörler de önceden ele alınmalıdır (Ediriweera *et al.* 2018).



**Şekil 31.** Günümüzde kanserin bilinen 10 temel ayırt edici özelliği (Hanahan and Weinberg 2011; Pehlivanoğlu *et al.* 2019)

*In vitro* hücre canlılığı ve sitotoksite testleri kültüre alınmış hücrelerle gerçekleştirilmekte ve çeşitli kimyasal maddelerin (örneğin; saf bileşikler, doğal kaynaklardan elde edilen organik ekstraktlar, nanoilaçlar, peptitler, inhibitör özelliğindeki RNA sekansları, küçük moleküller, sentezlenmiş ilaç etken maddeleri ve hormonlar) sitotoksik özelliklerini belirlemede ve ilaçların taranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Florento *et al.* 2012; Bahuguna *et al.* 2017; Ediriweera *et al.* 2018; Cheremnykh *et al.* 2019). Bu testler sayesinde, geliştirme aşamalarında bulunan antikanser ilaçların hem toksisite hem de tümör hücrelerinin büyümesini inhibe etme potansiyelleri eş zamanlı olarak belirlenebilmektedir. Deneyler esnasında test maddelerinin hücrelerin morfolojisi ve büyüme oranları üzerindeki etkileri dikkate alınmaktadır. Bu testlerle hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi, hücre yapışması, ATP üretimi, koenzim üretimi ve nükleotit alım aktivitesi gibi çeşitli hücresel fonksiyonlarda meydana gelen değişiklikler izlenebilmektedir (Aslantürk 2017).

Sitotoksitenin belirlenmesinde kolorimetrik (örneğin; MTT, SRB ve XTT testleri), florometrik (örneğin; alamarBlue ve CFDA-AM testleri), luminometrik (örneğin, ATP biyoluminesans testi) ve enzimatik (örneğin, LDH enzim salıverilmesi testi) ölçüm yöntemlerinin farklı hücre kültürü metotlarıyla kombine edilerek kullanılması, çeşitli kimyasal maddelere maruziyet sonrasında oluşabilecek hücresel hasarları kantitatif olarak tayin edebilmek ve hücre metabolizasyonunda meydana gelen değişimleri izlemek açısından önem

arz etmektedir (Sylvester 2011; Grbović *et al.* 2013; McCauley 2013). Bu test sistemleriyle çok sayıda maddenin toksik özellikleri kısa bir süre içerisinde tespit edilebilmektedir. Böylece sitotoksik olduğu belirlenen ajanların bir sonraki aşama olan *in vivo* hayvan deneylerinde gereksiz kullanımının önüne geçilmiş olmaktadır. Ayrıca hücre kültürüyle yapılan sitotoksikite çalışmalarından elde edilen sonuçların *in vivo* çalışmalardan alınan verilerle uyumlu olduğu bilinmektedir (Tokur ve Aksoy 2017).

Hücre kültürü tekniği kanser, aşı araştırmaları, ilaç geliştirme ve *in vitro* sitotoksikite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Zang *et al.* 2012; Gilbert and Boutros 2016; Bácskay *et al.* 2017; Chen *et al.* 2018). Bu teknikler herhangi bir canlının doku ya da organlarından alınan hücrelerin yapay ortamda yaşatılabilmesi ve ayrıca etik kaygılar taşımaması gibi nedenlerden ötürü *in vitro* sitotoksik özelliklerin araştırılmasında oldukça pratiktir (Zucco *et al.* 1998). Bununla birlikte test materyallerinin sitotoksik etkilerinin hem sağlıklı hem de kanser hücre hatlarında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine imkan tanımaktadırlar. Bu sayede araştırmacılar bir ilaç etken maddesinin kanser hücrelerini selektif olarak öldürüp öldürmeyeceğini kolaylıkla tespit edebilmektedir (Eastman 2017).

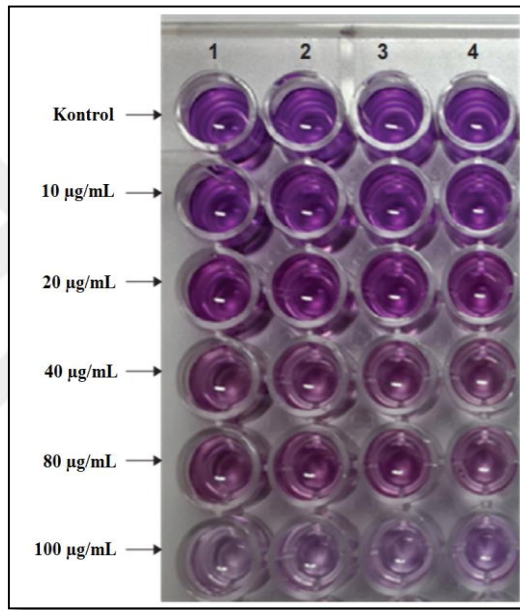
Güncel antikanser ilaç geliştirme çalışmalarında “hücrelerin öldürülmesi” yaklaşımı yerine “büyümelerinin inhibisyonu” yaklaşımına odaklanılmaktadır ve herhangi bir molekülün belirli bir hücre fenotipi üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmanın en ucuz ve en bilinen yolu hücre hattı kullanımıdır (Eastman 2017). Hücre hatları, öncelikli olarak, Avrupa Hücre Kültürleri Koleksiyonu (The European Collection of Authenticated Cell Cultures; ECACC) ve ATCC gibi hücre bankalarından satın alınabilmektedir. Primer hücre kültürlerinin yapısı, protein ekspresyon paternleri, metabolizmaları ve genetik kodları *in vivo* hücrelerle aynıdır. Ayrıca uygulama esnasında herhangi bir etkene karşı çok hassastırlar ve sınırlı yaşam ömrüne sahiptirler. Günümüzde meme kanserinin tedavisine yönelik yeni antikanser bileşiklerin tanımlanması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda sıklıkla kullanılan hücre hatlarından biri MCF-7’dir (Bácskay *et al.* 2017).

### ***MTT hücre canlılığı testi***

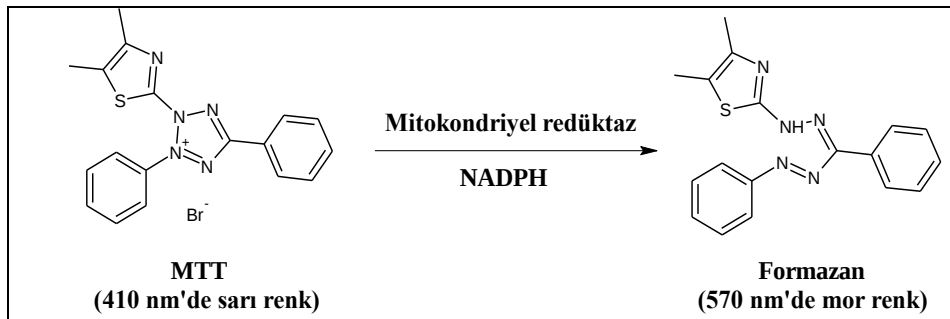
Kolorimetrik esasa dayanan hücre canlılığı ve antiproliferatif analizlerin çoğunda bir substrat molekülü canlı hücrelerde bulunan hücre içi enzimler tarafından renkli bir ürüne dönüştürülmekte ve oluşan rengin yoğunluğu ortamdaki canlı hücrelerin sayısı ile nispeten orantılı olmaktadır (Şekil 32). Antikanser ilaçların keşfinde kullanılmak üzere farklı ilkelere sahip bir dizi kolorimetrik ve florometrik sitotoksikite/antiproliferatif aktivite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu nedenle bir araştırma çalışmasından beklenen sonuçları iyileştirmek ve test maddelerinin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik/antiproliferatif etkilerinin nasıl ortaya

çıkacağına dair geçerli bir sonuca varmak açısından doğru hücre bazlı testin seçilmesi önemli bir adımdır (Ediriweera *et al.* 2018).

MTT suda çözünmeyen bir tetrazolyum tuzudur ve fenol kırmızısı içermeyen medyum veya tuz solüsyonlarında hazırlandığı zaman sarımtırak renkli bir solüsyon meydana getirmektedir. Tetrazolyum halkası süksinat dehidrogenaz enzimleriyle parçalandığında, MTT mor renkli ve suda çözünmeyen formazana dönüşmektedir (Şekil 33) (Uluçam 2017). İlgili dönüşüm canlı hücrelerde mitokondri sayesinde gerçekleşmektedir. Renk reaksiyonu sonucunda oluşan formazanın izopropanol veya başka bir çözücü içerisinde çözülmesinin ardından bir spektrofotometre yardımıyla 570 nm'deki absorbansı ölçülmekte ve böylece ilgili hücre topluluğundaki canlı hücrelerin sayısı belirlenebilmektedir (Bácskay *et al.* 2017).



**Şekil 32.** MTT testinde canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucunda ortamda meydana gelen renk değişiminin izlenmesi (Aravinthan *et al.* 2015)



**Şekil 33.** Tetrazolyum halkası içeren sarı renkli çözeltide indirgenme reaksiyonu sonucunda oluşan mor renkli formazan bileşiği (Zerbinati *et al.* 2018)

Testin sonucunda canlılığını kaybetmemiş ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış olan hücreler mor renkte boyanırken; ölü veya mitokondileri çalışmayan hücreler boyanmamaktadır.

Tetrazolyum tuzunun metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından indirgenmesinden ötürü bu yöntemle sadece canlı hücreler saptanabilmektedir. Çoğalmaya devam eden hücreler, proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha aktif olduğundan dolayı MTT ile hücrelerin canlılık oranlarının yanı sıra hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenebilmektedir.

MTT hücre canlılığı testi sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, mitojenlerin ve medyum komponentlerinin canlı hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılmasında, sitotoksik ve sitostatik ajanların *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesinde, hücrelerin büyümesi ve/veya apoptozunu değerlendirmek suretiyle ilaçların duyarlılığının indirekt olarak test edilmesinde kullanılmaktadır (Kocaçalışkan 2018). *In vitro* sitotoksikite ve canlılık testlerinin sonucunda hedef hücre hatları üzerinde yüksek derecede antiproliferatif ve sitotoksik etkinlik gösteren bileşikler antikanser ilaç adayları olarak değerlendirilmektedir.

MTT gibi iki boyutlu (two-dimensional; 2D) hücre kültürlerinde gerçekleştirilen ilaç doz-yanıt çalışmaları, tipik olarak, bir ilaca 72 saate kadar maruz kalan hücrelerde ilaç etkinliğinin ve potensinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Larsson *et al.* 2020). Genel olarak, ilaç-doz yanıt eğrileri, bir ilacın ilgili konsantrasyonlarıyla ilişkili inhibitör yetenekleri arasındaki ilişkiyi ölçmeye ve analiz etmeye yarar. Doz-yanıt eğrileri  $IC_x$  ile ifade edilmekte ve ilaç geliştirme çalışmalarında bu eğrilerin kullanılması, ilaca maruz kalmadan büyütülen hücrelerle bir karşılaştırma yapılarak, canlı bir hücre popülasyonunu %x oranında azaltmak için gereken ilaç dozlarının belirlenmesinde faydalı olmaktadır. Hücre popülasyonlarının boyutundaki bu değişiklik ise hücre ölümünün artması veya hücre çoğalmasının baskılanmasından kaynaklanmaktadır. İlaç keşif çalışmalarında bir ilacın etkinliğini belirlemede en sık kullanılan parametre  $IC_{50}$  değeridir. Düşük bir  $IC_{50}$  değeri, bir ilacın düşük konsantrasyonlarda güçlü bir etkiye sahip olduğu ve bu nedenle hastalara uygulandığında daha az sistemik toksisite göstereceği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte ilaç doz-yanıt eğrileri sinerjistik kombinasyon tedavileri ve ilaçların etki mekanizmaları hakkında önemli bilgiler vermektedir (Berrouet *et al.* 2020).

### **Genotoksik özelliklerin belirlenmesi**

İnsan genomu yaşam için gerekli bilgileri taşıyan kalıtsal makromolekül olan DNA'dan oluşmaktadır. Kimyasal bir molekül olarak DNA, bu rolü yerine getirme kapasitesini etkileyen değişikliklere karşı oldukça hassastır. Hücreler DNA moleküllerini kopyalamak, DNA'nın yapısının değiştirilip değiştirilmediğini tespit etmek ve DNA'nın yapısında meydana gelen değişiklikleri onarmak için yüksek düzeyde bir gelişmişliğe sahip çeşitli biyokimyasal yolları kullanmaktadır. Değişiklikleri önlemek ve genomu yavru hücrelere aktarabilmek için replikasyonun doğru olması, hücre bölünmesi esnasında kromozomların hücrelere doğru bir

şekilde dağıtılması ve DNA'daki hasarların tespit edilerek onarılması gerekmektedir. Sağlıklı ya da kanserli bir hücrenin kaderi, genomik yapısının mevcut bütünlüğüne ve ayrıca bu bütünlüğü koruma yeteneğine sıkı sıkıya bağlıdır. Sağlıklı hücrelerde DNA'nın yapısında meydana gelen herhangi bir değişiklik önlenilmekte, böylece bu hücreler canlılıklarını koruyabilmekte ve genetik materyallerinin bir kopyasını bir sonraki nesle aktarabilmektedir (Swift and Golsteyn 2014).

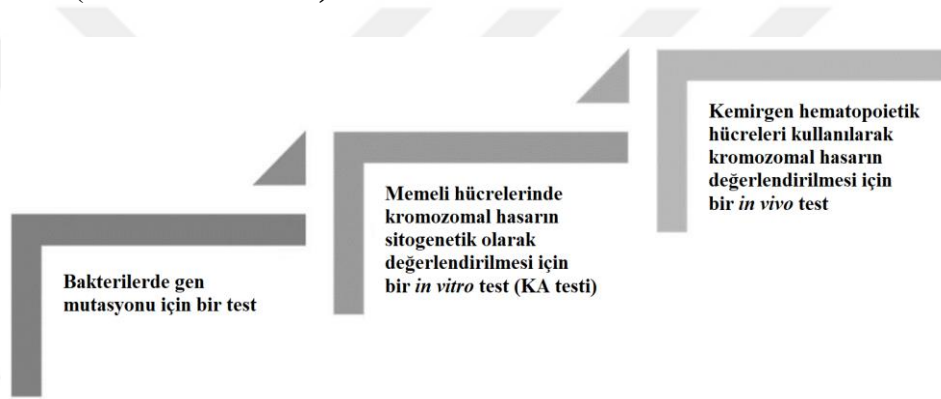
Genotoksisite, genotoksinler tarafından indüklenen gen mutasyonlarını, yapısal kromozom anormalliklerini ve rekombinasyonu içeren yıkıcı genetik değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Genotoksinler ekleme, DEL, duplikasyon ve halka oluşumu gibi yollarla DNA sekansına ve kromozom yapısına zarar verebilen ajanlardır. Bunlar organizma üzerindeki etkilerine göre karsinojenler, mutajenler ve teratojenler olarak üç gruba ayrılmaktadır (Savale 2018). Yeni bir ilacın genotoksisite testleri yapılmadan piyasaya sürülmesi imkansızdır. Günümüzde FDA gibi düzenleyici kurumlar tarafından, klinik denemelerin gerçekleştirilmesi ve pazarlama izni alınmasından önce, tüm yeni ilaçlar için genotoksisite testlerinin yapılması tavsiye edilmektedir (Barabadi *et al.* 2019).

Genotoksik olaylar kimyasal bir ajana maruziyetin ardından somatik ve/veya germ hücrelerinde meydana gelen genetik değişikliklerin neden olduğu etkilerle ilgilidir. Kimyasal ajanlar, doğrudan veya dolaylı etkileşimler yoluyla, DNA sekanslarında birtakım değişikliklere sebep olmakta ve bu genetik değişikliklerin bir sonucu olarak da maruz kalan hücre popülasyonlarında ölüm ve/veya mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Somatik hücrelerde meydana gelen bazı değişikliklerin kanser veya nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir (OECD 2015). Alternatif olarak, eğer germ hücrelerinde genetik bir hasar meydana gelirse, bu durum üreme kusurları veya nihai olarak genetik hastalıklara yol açabilecek nitelikteki bazı kalıtsal değişiklikleri ortaya çıkartmaktadır (Hasselgren *et al.* 2019).

Genotoksik ajanlar, farklı tiplerde genomik DNA hasarına neden olabilmektedir. Ökaryotik hücrelerde DNA lezyonları DNA'nın yapısında meydana gelen hasarları tespit edebilen kontrol noktası proteinleri sayesinde belirlenebilmekte ve böylece bu lezyonlar DNA onarım proteinleriyle restore edilmektedir. Onarılmamış veya yanlış onarılmış durumdaki lezyonlara ait DNA parçaları DNA molekülünün yapısında birtakım değişiklikler meydana getirmektedir. Bu yüzden genotoksik ajanların neden olduğu DNA değişikliklerinin tespiti, kimyasal maddelerin genotoksik etkinliklerinin tanımlanmasında bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Eki 2018).

Genotoksisite testleri insanda karsinojen ve mutajen etkili kimyasal ajanları tanımlamak amacıyla DNA, gen ve kromozom hasarlarının belirlenmesine yönelik çeşitli *in vitro* ve *in vivo*

yaklaşımları kapsamaktadır. Potansiyel insan karsinojenlerinin tespit edilmesi ve bunların düzenlenmesi için öncelikle genotoksik etkinliklerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilecek olan çalışmalarda, her bir maddenin genotoksik etkisinin/etkilerinin belirlenmesinde tek bir testin yeterli olmadığı açıktır. Bu sebeple kimyasal ajanların genotoksik potansiyellerinin belirlenmesinde mevcut ortak görüş, bakteri ve memeli hücre kültürü analizlerinin kemirgen deney hayvanlarının kullanımını içeren *in vivo* test sistemleriyle desteklenmesi yönündedir (Şekil 34). Şekil 34'teki test bataryası, gen ve kromozom düzeyinde mutasyonlara yol açan genotoksik hasarlara ait risk karakterizasyonlarının nispeten basit, çok sıkı ve ekonomik bir şekilde yapılmasına olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte günümüzde çeşitli bileşiklerin genotoksitesini değerlendirmede kullanılan stratejiler yeni tekniklere değil, yalnızca geleneksel testlere dayanmaktadır (Turkez *et al.* 2017).



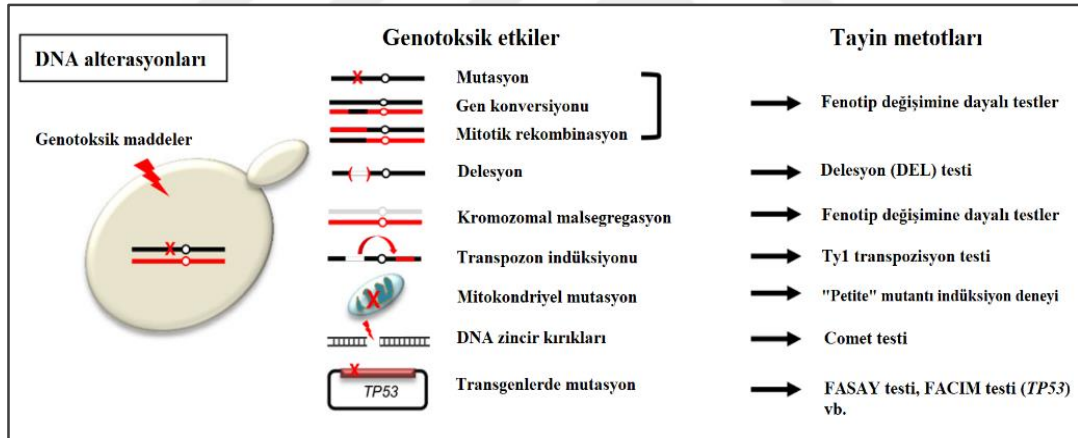
**Şekil 34.** Standart genotoksikoloji bataryası (Turkez *et al.* 2017)

Genetik hasarların ölçülmesi, toksisite testlerinde özellikle kimyasal maddelerin karsinojenik özelliklerinin belirlenmesinde temel mekanizma olarak kabul edilmektedir. Günümüzde genotoksisite Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD) ve Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation; ICH) gibi çeşitli uluslararası yetkili kuruluşlar tarafından önerilen bir dizi kısa süreli test sistemi kullanılarak değerlendirilmektedir (ICH 2012; OECD 2015). ICH S2(R1) kılavuzunda yer alan standart genotoksisite test bataryası araştırmacılara eşit derecede bir kabul edilebilirliğe sahip birbirinden farklı iki adet genotoksisite test protokolü sunmaktadır (EMA 2012). Birinci seçenekte, bakterilerde gen mutasyonu için bir test sistemi (örneğin, Ames testi), memeli hücreleriyle kromozomal hasarın sitogenetik olarak değerlendirilmesinde bir *in vitro* test sistemi (örneğin; mikronükleus (MN) testi ya da kromozom aberasyonu (KA) testi) veya bir *in vitro* memeli hücresi gen mutasyon testi (örneğin; fare lenfoma timidin kinaz testi) ve ayrıca kromozomal hasarların tespitinde kemirgen hematopoietik hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen bir *in vivo* test sistemi bulunmaktadır. İkinci seçenekte ise Ames testine ek

olarak, iki farklı tip dokunun kullanıldığı *in vivo* test sistemleri mevcuttur. Bu *in vivo* testler genellikle kemirgen hematopoietik hücrelerinin kullanıldığı MN testi ve karaciğer hücrelerinde DNA hasarının ölçümüne imkan tanıyan Comet testi olmaktadır (Guo *et al.* 2019). Endüstri sektörüne bağlı olarak, ilaçlar için ICH S2 (R1) kılavuzu gibi düzenleyici veri gereksinimlerini desteklemek amacıyla yayınlanmış kılavuz niteliğindeki belgelerde ana hatlarıyla belirtildiği üzere nispeten farklı test kombinasyonlarına da ihtiyaç duyulabilmektedir (EMA 2012; Hasselgren *et al.* 2019).

### **Maya DEL test sistemi**

Güncel olarak, esaslı *Saccharomyces cerevisiae* test organizmasında mutajen kaynaklı DNA değişikliklerine dayanan çok farklı türde genotoksisite test sistemi geliştirilmiştir (Şekil 35). Bu maya esaslı testlerde, Ames testiyle paralel olarak, oksotrofik genlerde ileri ve geri mutasyonların uyarılması sağlanmaktadır. DNA değişiklikleri dışında bir genotoksisite göstergesi olarak kullanılan diğer değişiklikler ise gen konversiyonu, mitotik rekombinasyon, DEL, kromozomal malsegregasyon, DNA zincir kırıkları, transpozon indüksiyonu ve mitokondriyel DNA veya transgenlerdeki DNA hasarıdır (Eki 2018).



**Şekil 35.** DNA değişikliklerinin ölçümüne dayalı maya esaslı genotoksisite testleri (Eki 2018)

Rekombinasyon, DEL ve karsinogenez arasındaki ilişkinin anlaşılmasıyla birlikte, genomik delesyonlara sebep olan intrakromozomal homolog rekombinasyon frekansını ölçmek için maya, insan, fare, tütün ve arabidopsis gibi çeşitli canlı sistemleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında uygulanabilirlik açısından en kolay olan ve en güvenilir sonuçlar veren test sisteminin maya DEL test sistemi olduğu belirlenmiştir. Bu test kapsamında yapılan çalışmalarda en çok kullanılan maya suşu, diploid genom yapısına sahip *S. cerevisiae* RS112'dir. RS112 mutant maya ırkı *ADE2* lokusunda heteroallelik mutasyonlar taşımaktadır. Ayrıca hem histidin (*his*<sup>-</sup>) hem de adenin (*ade*<sup>-</sup>) oksotrofudur. Bu özelliklerinden dolayı kromozom içi DEL rekombinasyon frekansının yanı sıra kromozom içi gen konversiyon frekansının

belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Bu iki rekombinasyon türünün oluşum ve kontrol mekanizmaları birbirinden farklıdır ve çeşitli genotoksik ajanların etki mekanizmalarına göre farklı yanıtların alındığı bu iki özellik, çeşitli karsinojen maddelerin etki mekanizmalarının araştırılmasında önemli bir avantaj sağlamaktadır (Brennan and Schiestl 2004; Eki 2018).

DEL testinde ökaryotik maya hücreleri test organizması olarak kullanılmakta ve bu testin, genotoksik özelliklerin belirlenmesinde Ames testine eşdeğer olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte bugüne dek çeşitli kimyasal bileşikler için DEL ve Ames testlerinden elde edilen genotoksisite sonuçlarında %92'lik bir benzerlik oranı saptanmıştır. Maya delesyon testinde kullanılan mutant RS112 suşu kısa tekrarlarla kesintiye uğramasından dolayı *HIS3* lokusundan değiştirilmiştir. Böylece DEL testiyle bir test maddesinin mutajenitesi, histidin içermeyen ortam üzerine kaplama yoluyla veya mikrotitre plakaları aracılığıyla bir kolorimetrik okuma yönteminin kullanılması vasıtasıyla mutant RS112 suşunun histidin prototrofu (*his*<sup>+</sup>) özelliğindeki fenotipe geri dönüşmesi sayesinde belirlenebilmektedir (Ranganatha *et al.* 2016).

Maya DEL test sistemiyle diğer birçok kısa dönem mutajenite testlerinde zayıf oranda belirlenebilen ve ancak deney hayvanları üzerinde yapılan uzun dönem *in vivo* çalışmalar sonucunda kansere neden olduğu anlaşılan çok sayıda bileşik için pozitif yönde yanıt alınabilmektedir. Örneğin; *Salmonella typhimurium* adlı bakterinin genetik materyalinde var olan nokta mutasyonlarının geri çevrilmesine dayanan ve mutajenite araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılan Ames/*Salmonella* testi sayesinde karsinojenik etkili maddelerin yalnızca %50'si doğru bir şekilde tespit edilebilmektedir. Günümüze dek yapılan çalışmalar, kimyasal ajanların karsinojenik etkinliklerini belirlemede maya DEL testinin diğer kısa dönem genotoksisite test sistemlerine göre daha başarılı sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır (Brennan and Schiestl 2004; Kirpnick *et al.* 2005). Yüksek hassasiyete sahip spesifik bir yöntem olduğu bilinen maya DEL testi ilaç etken maddesi olma potansiyeline sahip bileşiklerin hem geliştirme aşamasında hem de ilaç olarak piyasaya sürüldükten sonra ilacı kullanan kişiler üzerindeki genetik etkileri ve güvenliğini araştırmak amacıyla kullanılmaktadır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

#### Biyolojik analizler için seçilen yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları ve SHP099'un temini

Bu çalışmada, SBVS ve ligant temelli ilaç tasarımı yöntemlerinin bir kombinasyonuyla yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları olarak tanımlanan dipeptit yapısındaki 3 adet doğal molekül ve *in vitro* biyolojik etkinlik testlerinde referans olarak kullanılan SHP099 bileşiği ticari satın alma yoluyla temin edilmiştir. Tablo 8 incelendiğinde, yeni aday inhibitörler ve SHP099'un saflık oranlarının %95'in üzerinde olduğu görülmektedir. WHO'ya göre, ilaç etkeni olarak kabul edilen aktif bir bileşenin “biyolojik etki gücü” miktarının doğruluğuyla orantılı olup kalite göstergesi olarak genellikle etiketli miktarın %95-110'unu karşılayan değerler kabul edilmektedir (Singh *et al.* 2018). Böylece yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları ve SHP099 bileşiği, daha ileri bir saflaştırma prosesine ihtiyaç duyulmaksızın *in vitro* çalışmalar kapsamında doğrudan kullanılmıştır.

**Tablo 8.** Çalışmada Biyoaktiviteleri *In Vitro* Değerlendirilen Bileşiklerin CAS (Chemical Abstracts Service; Kimyasal Soyut Servisi) Kayıt Numaraları, Saflık Yüzdeleri ve Saflık Tayininde Kullanılan Yöntemler

| Molekülün Adı | CAS Numarası | Saflık (%) | Saflık Analizinde Kullanılan Metot |
|---------------|--------------|------------|------------------------------------|
| H-His-His-OH  | 306-14-9     | ≥ 98,0     | İTK <sup>a</sup>                   |
| H-His-Tyr-OH  | 35979-00-1   | > 97,0     | İTK                                |
| H-Trp-Trp-OH  | 20696-60-0   | > 99,0     | İTK                                |
| SHP099        | 1801747-42-1 | 99,8       | LC/MS <sup>b</sup>                 |

<sup>a</sup>İTK: İnce tabaka kromatografisi, <sup>b</sup>LC/MS: Sıvı Kromatografisi/Kütle spektrometresi (Liquid Chromatography Mass Spectroscopy).

#### Çalışmada kullanılan hücre hatlarının temini

Bu çalışmada kullanılan MCF-7 insan meme kanseri (ATCC® HTB-22™) ve MCF10A insan sağlıklı meme epiteli (ATCC® CRL-10317™) hücre hatları Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'nden uygun şartlar altında temin edilmiştir. Bu hücrelere ait köken bilgisi ve genel özellikler Tablo 9'da verilmiştir.

### Çalışmada kullanılan mutant maya suşunun temini

Maya DEL test sisteminin uygulanması için gerekli olan mutant *S. cerevisiae* RS112 ırkı Prof. Dr. Robert H. Schiestl (Departments of Pathology, Environmental Health and Radiation Oncology, Geffen School of Medicine and School of Public Health UCLA, CA 90095, USA) tarafından sağlanmıştır. Bu ırkın genotipi *MATa/α ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-Δ98 trp5-27/TRP5 arg4-3/ARG4 ade2-40/ade2-101 ilv1-92/ILV1 HIS3::pRS6/his3-Δ200 LYS2/lys2-801* özelliğindedir.

**Tablo 9.** Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Tipi ve Özellikleri

| ATCC® Kodu      | HTB22™                      | CRL-10317™                       |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Adı             | MCF-7                       | MCF10A                           |
| Büyüme Özelliği | Adherent (yapışan)          | Adherent (yapışan)               |
| Organizma       | <i>Homo sapiens</i> (insan) | <i>Homo sapiens</i> (insan)      |
| Morfolojisi     | Epitelyal                   | Epitelyal                        |
| Kaynak          | Organ                       | Organ                            |
|                 | Hücre tipi                  | Hücre tipi                       |
|                 | Meme                        | Meme                             |
|                 | adenokarsinoma              | Fibrokistik meme epiteli hücresi |

### Çalışmada kullanılan kimyasalların temin edilmesi

Bu çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıktadır. Bu kimyasallar ve tedarik edildikleri firmaların isimleri Tablo 10’da verilmiştir.

**Tablo 10.** Çalışmalar Sırasında Kullanılan Kimyasallar

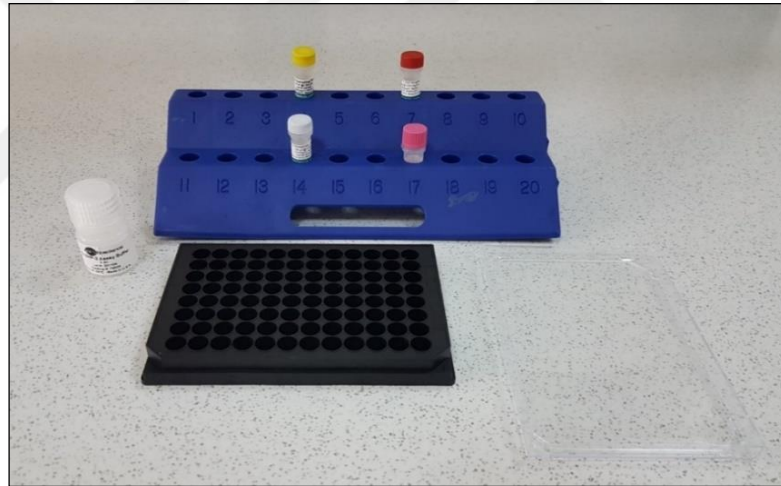
| Kimyasal Adı                                                                                 | Üretici Firma  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Agar                                                                                         | Fluka®         |
| Amino Asit İçermeyen Maya Nitrojen Bazı (Yeast Nitrogen Base; YNB)                           | Sigma-Aldrich® |
| At Serumu                                                                                    | Biowest®       |
| D-Glukoz (Dekstroz)                                                                          | Merck®         |
| Dulbecco’nun Modifiye Eagle Besiyeri (Dulbecco’s Modified Eagle Medium; DMEM) - High Glucose | Sigma-Aldrich® |
| DMEM/Besleyici Karışım Hams’ın F12 Besiyeri (1:1)                                            | Gibco®         |
| Dimetilsülfoksit (DMSO)                                                                      | Merck®         |
| Doksorubisin Hidroklorür                                                                     | Sigma-Aldrich® |
| Etil Metan Sülfonat (EMS)                                                                    | Sigma-Aldrich® |
| Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum; FBS)                                                  | Sigma-Aldrich® |
| Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline; PBS)                                       | Sigma-Aldrich® |
| Gliserol                                                                                     | Sigma-Aldrich® |
| Hidrokortizon                                                                                | Sigma-Aldrich® |

**Tablo 10.** (devam)

|                                                                                       |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| İnsan Epidermal Büyüme Faktörü (Human Epidermal Growth Factor; hEGF)                  | Sigma-Aldrich® |
| İnsülin                                                                               | Sigma-Aldrich® |
| Kolera Toksini                                                                        | Sigma-Aldrich® |
| L- Formundaki Tüm Amino Asitler                                                       | Sigma-Aldrich® |
| Maya Özütü-Pepton-Adenin-Dekstroz (Yeast Extract-Peptone-Adenine-Dextrose; YPAD) Agar | Fluka®         |
| MTT                                                                                   | Sigma-Aldrich® |
| Potasyum Penisilin-Streptomisin Sülfat (P-S)                                          | Sigma-Aldrich® |
| Tripsin-EDTA                                                                          | Gibco®         |

### Çalışmada kullanılan fosfataz aktivitesi ölçüm kitinin temini

Bu çalışma için yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları ve SHP099'un SHP-2 inhibisyon aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılan 79330 katalog numaralı test kiti (Şekil 36) hazır olarak BPS Bioscience® firmasından satın alınmıştır.



**Şekil 36.** Tam uzunluktaki SHP-2<sup>WT</sup>'nin aktivitesini ölçmek üzere BPS Bioscience® tarafından tasarlanmış 79330 katalog numaralı test sisteminin görüntüsü

### Çalışmada kullanılan laboratuvar malzemeleri

Bu tez çalışmasında kullanılan cam ve plastik malzemelere ait bilgiler Tablo 11'de sunulmuştur.

**Tablo 11.** Çalışmalarda Kullanılan Cam ve Plastik Malzemeler

| Laboratuvar Malzemesi Adı                        | Üretici Firma |
|--------------------------------------------------|---------------|
| 96 Kuyucuklu Plaka                               | Corning®      |
| Cam Erlen (250 ve 1000 mL)                       | Isolab®       |
| Eppendorf Tüpleri (1,5 ve 2 mL)                  | Isolab®       |
| Hidrofilik Enjektör Filtresi (0,22 µm Por Çaplı) | Millex®       |

**Tablo 11.** (devam)

|                                                    |                    |
|----------------------------------------------------|--------------------|
| Hücre Kültürü Kapları (25 cm <sup>2</sup> )        | Corning®           |
| Mikroskop Lameli                                   | Isolab®            |
| Otoklav Şişesi (1000 mL)                           | Isolab®            |
| Parafilm                                           | Bemis®             |
| Pipet Uçları (0,5-10, 10-200 ve 100-1000 µL)       | Eppendorf®         |
| Steril Kriyovial (2 mL)                            | Isolab®            |
| Steril Petri Kabı (15 cm)                          | Isolab®            |
| Steril Santrifüj Tüpleri (15 ve 50 mL)             | Corning®           |
| Steril Serolojik Pipetler (5 ve 10 mL)             | Corning-Costar®    |
| Steril Tek Kullanımlık Drigalski Özese             | Lp Italiana®       |
| Steril Tek Kullanımlık İnokülasyon Döngüsü (10 µL) | Fisher Scientific® |

### Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 12’de alfabetik sıraya göre listelenmiştir.

**Tablo 12.** Çalışmalarda Kullanılan Alet ve Cihazlar

| Alet/Cihaz Adı                       | Marka ve Model                                                                                                              |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Buzdolabı                            | Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF                                                                                                    |
| Buz Makinesi                         | Scotsman, ITALY, AC45                                                                                                       |
| Class II Laminar Kabin               | Esco, SINGAPORE, AC2-4E1                                                                                                    |
| Derin Dondurucu                      | Nuaire, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK                                                                     |
| ELISA Mikroplaka Okuyucu             | Epoch, BioTek Instruments, U.S.A. (MCF-7 hücre hattı için) ve µQuant™, BioTek Instruments, U.S.A. (MCF10A hücre hattı için) |
| Hassas Terazı                        | Mettler Toledo, CHINA, AL204                                                                                                |
| Hemositometre (Thoma Lami)           | Isolab®, GERMANY                                                                                                            |
| Isı Kontrollü Çalkalamalı İnkübatör  | Zhicheng, CHINA/ZHWY-200B                                                                                                   |
| İnkübatör                            | Binder, GERMANY, BD53                                                                                                       |
| Kameralı Işık Mikroskopu             | Leica, GERMANY, DM 750                                                                                                      |
| Karbondioksitli Etüv                 | Nuarie, NU-4750                                                                                                             |
| Manyetik Karıştırıcı                 | Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083                                                                                           |
| Masa Tipi Çalkalamalı İnkübatör      | Daihan Scientific, KOREA, WiseTherm HB-96                                                                                   |
| Mikrodalga Fırın                     | Arçelik, TÜRKİYE, MD592                                                                                                     |
| Mikroplaka Floresan Spektrofotometre | Agilent, Cary Eclipse, U.S.A., MY17170001                                                                                   |

**Tablo 12. (devam)**

|                                 |                                                                |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Mini Karıştırıcı                | IKA, U.S.A., M51, SN 03017581                                  |
| Otoklav                         | Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN030787253                           |
| Otomatik Pipet Setleri          | Eppendorf, GERMANY, 0,1-2,5, 1-10, 10-100, 20-200, 100-1000 µL |
| Saf Su Cihazı                   | GFL, GERMANY, 2004                                             |
| Santrifüj                       | Hettich, GERMANY, Mikro 22 R                                   |
| Sıcak Su Banyosu                | Memmert, GERMANY, 854                                          |
| Steril Kabin                    | Esco, SINGAPORE, AC2-4E1                                       |
| Ters (Inverted) Işık Mikroskobu | Carl Zeiss, Primovert                                          |
| Ultra Saf Su Cihazı             | Merck-Millipore, GERMANY, Direct-Q 3UV                         |
| Vorteks                         | IKA, U.S.A., MS2                                               |

### **Çalışmada kullanılan çözeltiler ve besiyerlerinin hazırlanması**

Çalışmalar esnasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı, besiyerlerinin formülleri ve bunların kullanıldıkları yerler aşağıda belirtilmiştir.

#### ***1X yoğunluktaki SHP-2 deney tamponu***

SHP-2 enzim inhibisyon deneyinde ortamın pH değerini sabit tutmak amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca 5 µM SHP-2 aktive edici peptit ve 0,2 ng/µL SHP-2 enzim solüsyonları da 1X yoğunluktaki SHP-2 deney tamponuyla hazırlanmıştır.

| <u>İçerik</u>                       | <u>3,5 mL için</u> |
|-------------------------------------|--------------------|
| 5X yoğunluktaki SHP-2 deney tamponu | 700 µL             |
| Distile su                          | 2800 µL            |

Bu çözeltinin hazırlanmasında 2800 µL distile su içerisine 700 µL 5X yoğunluktaki SHP-2 deney tamponu eklenir. Oluşan karışım vortekslendikten sonra kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanır.

#### ***5 µM’lık SHP-2 aktive edici peptit solüsyonu***

Fonksiyonel olarak inaktif durumdaki SHP-2 enzimini fosfataz aktivitesi yönünden aktif hale getirmek amacıyla kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u>                              | <u>450 µL için</u> |
|--------------------------------------------|--------------------|
| 100 µM SHP-2 aktive edici peptit solüsyonu | 22,5 µL            |
| 1X yoğunluktaki SHP-2 deney tamponu        | 427,5 µL           |

Bu çözeltinin hazırlanmasında 427,5 µL 1X yoğunluktaki SHP-2 deney tamponuna 100 µM konsantrasyonundaki SHP-2 aktive edici peptit solüsyonundan 22,5 µL eklenir. Karışım vortekslelendikten sonra kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklanır.

#### ***0,2 ng/µL SHP-2 enzim solüsyonu***

Test bileşiklerinin SHP-2 aktivitesini inhibe etme oranının belirlenmesinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u>                       | <u>2650 µL için</u> |
|-------------------------------------|---------------------|
| 0,53 mg/mL SHP-2 enzim solüsyonu    | 1 µL                |
| 1X yoğunluktaki SHP-2 deney tamponu | 2649 µL             |

Konsantrasyonu 0,53 mg/mL olan SHP-2 enzim solüsyonu -80 °C’den çıkartıldıktan sonra 14,000 rpm (revolutions per minute; dakikadaki devir sayısı) hızda 3 dakika boyunca santrifüjlenir. Ardından 1 µL’lik bir hacim alınarak 2649 µL 1X yoğunluktaki SHP-2 deney tamponuna eklenir. Karışım vortekslelendikten sonra kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklanır.

#### ***MCF-7 hücre kültürü medyum***

MCF-7 hücrelerinin kültüre edilmesinde, pasajlanmasında ve dondurulmasında kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u>        | <u>100 mL için</u> |
|----------------------|--------------------|
| Yüksek glukozlu DMEM | 88 mL              |
| FBS                  | 10 mL              |
| L-Glutamin           | 1 mL               |
| P-S solüsyonu        | 1 mL               |

MCF-7 hücreleri için kültür ortamı 10 mL FBS, 1 mL L-glutamin ve 1 mL P-S solüsyonunun 88 mL hazır DMEM besiyerine eklenmesiyle hazırlanmıştır. Çalışmalar sırasında günlük olarak hazırlanan taze besiyeri kullanılmış ve solüsyonlar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

#### ***MCF10A hücre kültürü medyum***

MCF10A hücrelerinin kültüre edilmesinde, pasajlanmasında ve dondurulmasında kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u>      | <u>530,9 mL için</u> |
|--------------------|----------------------|
| DMEM/Ham F12 (1:1) | 500 mL               |
| At serumu          | 25 mL                |

|                |        |
|----------------|--------|
| hEGF           | 100 µL |
| Kolera toksini | 50 µL  |
| İnsülin        | 500 µL |
| Hidrokortizon  | 250 µL |
| P-S solüsyonu  | 5 mL   |

MCF10A hücreleri için kültür ortamı 25 mL at serumu, 100 µL 20 ng/mL hEGF, 50 µL 100 ng/mL kolera toksini, 500 µL 0,01 mg/mL insülin, 250 µL 500 ng/mL hidrokortizon ve 5 mL P-S solüsyonunun 500 mL 1:1 oranında DMEM/Ham F12 içeren besiyerine eklenmesiyle hazırlanmıştır. Çalışmalar sırasında günlük olarak hazırlanan taze besiyeri kullanılmış olup solüsyonlar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

### ***FBS***

Hücre kültürü ortamı için en sık kullanılan büyüme takviyesidir. İçeriğinde embriyonik büyümeyi teşvik eden faktörlerden yüksek miktarda bulunmaktadır.

Bu çözeltinin kullanıma hazır hale getirilmesinde -20 °C’de muhafaza edilen FBS oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra laminar akımlı kabin içerisinde 50 mL’lik steril falkon tüplerine 30-40 mL’lik hacimlerde paylaştırılır. Bu tüplerin her biri -20 °C’de muhafaza edilir ve kullanılacağı zaman -20 °C’deki buzdolabından çıkartılarak 37 °C’ye ayarlanmış su banyosunda çözündürülür.

### ***P-S solüsyonu***

P-S kombinasyonunun gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı etkili olması nedeniyle hücre kültürlerinin bakteriyel kontaminasyonunu önlemek amacıyla kullanılmıştır (Grover 1961).

Bu çözeltinin kullanıma hazır hale getirilmesinde P-S solüsyonu laminar akımlı kabin içerisinde 15 mL’lik steril falkon tüplerine paylaştırılır ve tüpler -20 °C’de muhafaza edilir. Kullanılacağı zaman -20 °C’deki buzdolabından çıkartılır ve 37 °C’deki su banyosunda çözündürülür.

### ***5 mg/mL’lik MTT solüsyonu***

Sitotoksosite ve antiproliferatif aktivite tayininde hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçmek için kullanılmıştır.

|               |                   |
|---------------|-------------------|
| <u>İçerik</u> | <u>50 mL için</u> |
| MTT           | 500 mg            |

PBS

50 mL

Bu çözeltinin hazırlanmasında toz halindeki MTT'den 500 mg tartılır ve 50 mL PBS ile çözülür. Çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilir ve 15 mL'lik 10 adet steril falkon tüpüne her birinde 5 mL MTT solüsyonu olacak şekilde eşit biçimde paylaştırılır. Her bir falkon tüpüne 5 mL PBS eklenerek son konsantrasyonlar 5 mg/mL'ye ayarlanır. Çözeltiler kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanır.

### ***YPAD agar plakları***

Mutajenite çalışmalarında test organizmasının canlandırılması amacıyla kullanılmıştır.

#### **İçerik**

**600 mL için**

YPAD agar tozu

42 g

Distile su

600 mL

Bu besiyerinin hazırlanma aşamasında, üretici firmanın önerisi doğrultusunda, toz halindeki 42 g YPAD agar tartılır ve bir manyetik karıştırıcı vasıtasıyla 600 mL distile su içerisinde iyice çözülür. Çözelti 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir ve oda sıcaklığında 45 °C'ye kadar soğutularak petri kaplarına dökülür.

### ***Amino asit karışımı***

Mutajenite çalışmalarında maya hücrelerinin geliştirilmesinde kullanılan besiyerlerine gereken miktarda eklenmiştir.

#### **İçerik**

**100 mL için**

L-Arjinin

0,6 g

Homoserin

3,0 g

L-İzolösin

0,9 g

L-Lizin

0,9 g

L-Metiyonin

0,6 g

L-Fenilalanin

1,5 g

L-Triptofan

1,2 g

L-Valin

4,5 g

L-Lösin

0,9 g

L-Histidin.HCl

0,6 g

Bu karışımın hazırlanmasında yukarıda verilen her bir amino asit sırasıyla belirtilen miktarlarda alınarak 100 mL distile su içeren 20 mL'lik cam deney tüplerinde bir manyetik

karıştırıcı vasıtasıyla homojen bir şekilde çözülür. Çözelti kullanılıncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilir.

***Sentetik tamamlayıcı agar plakları (Synthetic complete agar plates; SCF)***

Test organizmasının canlandırılması, tek kolonilerin eldesi ve canlılık yüzdesinin hesaplanması için gereklidir.

| <u>İçerik</u>       | <u>600 mL için</u> |
|---------------------|--------------------|
| YNB                 | 4 g                |
| Dekstroz            | 12 g               |
| Agar                | 10 g               |
| L-Arjinin.HCl       | 235 µL             |
| Homoserin           | 235 µL             |
| L-Lizin             | 235 µL             |
| L-Triptofan         | 2340 µL            |
| L-Fenilalanin       | 2340 µL            |
| L-Metiyonin         | 2340 µL            |
| L-İzolösin          | 2340 µL            |
| L-Valin             | 2340 µL            |
| L-Lösin             | 2340 µL            |
| L-Histidin.HCl      | 2340 µL            |
| L-Tirozin           | 21 mg              |
| Urasil              | 14 mg              |
| L-Adenin hemisülfat | 21 mg              |
| Distile su          | 583 mL             |

Bu besiyerinin hazırlanmasında kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 583 mL distile suya 4 g YNB, 12 g dekstroz, 10 g agar, 235 µL L-arjinin.HCl, 235 µL homoserin, 235 µL L-lizin, 2340 µL L-triptofan, 2340 µL L-fenilalanin, 2340 µL L-metiyonin, 2340 µL L-izolösin, 2340 µL L-valin, 2340 µL L-lösin, 2340 µL L-histidin.HCl, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adenin hemisülfat eklenir. Karışım bir manyetik karıştırıcı yardımıyla homojenize edilir ve ardından 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Çözelti oda sıcaklığında 45 °C’ye kadar soğutulduktan sonra her biri 25-30 mL besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülür. Bu besiyeri steril bir ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilir.

***Lösin içermeyen sentetik agar plakları (Synthetic leucine dropout agar plates; SC-Leu-K)***

Test organizmasının lösin amino asidinin sentezinden sorumlu gen bölgesini taşıdığını doğrulamak için kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u>       | <u>600 mL için</u> |
|---------------------|--------------------|
| YNB                 | 4 g                |
| Dekstroz            | 12 g               |
| Agar                | 10 g               |
| L-Arjinin.HCl       | 235 µL             |
| Homoserin           | 235 µL             |
| L-Lizin             | 235 µL             |
| L-Triptofan         | 2340 µL            |
| L-Fenilalanin       | 2340 µL            |
| L-Metiyonin         | 2340 µL            |
| L-İzolösin          | 2340 µL            |
| L-Valin             | 2340 µL            |
| L-Histidin.HCl      | 2340 µL            |
| L-Tirozin           | 21 mg              |
| Urasil              | 14 mg              |
| L-Adenin hemisülfat | 21 mg              |
| Distile su          | 583 mL             |

Bu besiyerinin hazırlanmasında 4 g YNB, 12 g dekstroz, 10 g agar, 235 µL L-arjinin.HCl, 235 µL homoserin, 235 µL L-lizin, 2340 µL L-triptofan, 2340 µL L-fenilalanin, 2340 µL L-metiyonin, 2340 µL L-izolösin, 2340 µL L-valin, 2340 µL L-histidin.HCl, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adenin hemisülfat 583 mL distile suya eklenerek homojen bir şekilde çözülür. Oluşan karışım 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Çözelti oda sıcaklığında 45 °C’ye kadar soğutulduktan sonra her biri 25-30 mL besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına paylaştırılır. Bu besiyeri steril bir ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilir.

***Lösin içermeyen sıvı medyum (Liquid leucine dropout medium; SC-Leu-S)***

Lösin amino asidinin sentezinden sorumlu gen bölgesini taşıdığı doğrulanan test organizmasının geliştirildiği sıvı besi ortamıdır. Bu besiyerinin SC-Leu-K besiyerinden tek farkı, agar içermemesidir. Böylece SC-Leu-K besiyerini hazırlamada kullanılan bileşenler aynı miktarlarda ancak agar hariç olacak şekilde SC-Leu-S besiyerinin içeriğine sırasıyla eklenir. Karışım bir manyetik karıştırıcı vasıtasıyla homojenize edildikten sonra 250 mL hacimli vida

kapaklı cam deney tüplerine paylaştırılır. Besiyeri otoklavda 121 °C’de 15 dakika boyunca steril edilir ve kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklanır.

#### ***Histidin içermeyen agar plakları (Histidine dropout agar plates; SC-His)***

Test organizmasının ortamda pozitif mutajen varlığında histidin sentezinden sorumlu gen bölgesinin kırıldığını gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u>       | <u>600 mL için</u> |
|---------------------|--------------------|
| YNB                 | 4 g                |
| Dekstroz            | 12 g               |
| Agar                | 10 g               |
| L-Arjinin.HCl       | 235 µL             |
| Homoserin           | 235 µL             |
| L-Lizin             | 235 µL             |
| L-Triptofan         | 2340 µL            |
| L-Fenilalanin       | 2340 µL            |
| L-Metiyonin         | 2340 µL            |
| L-İzolösin          | 2340 µL            |
| L-Valin             | 2340 µL            |
| L-Lösin             | 2340 µL            |
| L-Tirozin           | 21 mg              |
| Urasil              | 14 mg              |
| L-Adenin hemisülfat | 21 mg              |
| Distile su          | 583 mL             |

Bu besiyerinin hazırlanmasında 583 mL distile suya 4 g YNB, 12 g dekstroz, 10 g agar, 235 µL L-arjinin.HCl, 235 µL homoserin, 235 µL L-lizin, 2340 µL L-triptofan, 2340 µL L-fenilalanin, 2340 µL L-metiyonin, 2340 µL L-izolösin, 2340 µL L-valin, 2340 µL L-lösin, 21 mg L-tirozin, 14 mg urasil ve 21 mg L-adenin hemisülfat eklenir. Karışım bir manyetik karıştırıcı yardımıyla homojenize edilir ve ardından 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Çözelti oda sıcaklığında 45 °C’ye kadar soğutulduktan sonra her biri 25-30 mL besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülür. Bu besiyeri steril bir ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### ***Adenin içermeyen agar plakları (Adenine dropout agar plates; SC-Ade)***

Test organizmasının adenin bazının sentezinden sorumlu gen bölgesini taşıdığını doğrulamak amacıyla kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u>          | <u>600 mL için</u> |
|------------------------|--------------------|
| YNB                    | 4 g                |
| Dekstroz               | 12 g               |
| Agar                   | 10 g               |
| <i>L</i> -Arjinin.HCl  | 235 µL             |
| Homoserin              | 235 µL             |
| <i>L</i> -Lizin        | 235 µL             |
| <i>L</i> -Tryptofan    | 2340 µL            |
| <i>L</i> -Fenilalanin  | 2340 µL            |
| <i>L</i> -Metiyonin    | 2340 µL            |
| <i>L</i> -İzolösin     | 2340 µL            |
| <i>L</i> -Valin        | 2340 µL            |
| <i>L</i> -Lösin        | 2340 µL            |
| <i>L</i> -Histidin.HCl | 2340 µL            |
| <i>L</i> -Tirozin      | 21 mg              |
| Urasil                 | 14 mg              |
| Distile su             | 583 mL             |

Bu besiyerinin hazırlanmasında 4 g YNB, 12 g dekstroz, 10 g agar, 235 µL *L*-arjinin.HCl, 235 µL homoserin, 235 µL *L*-lizin, 2340 µL *L*-triptofan, 2340 µL *L*-fenilalanin, 2340 µL *L*-metiyonin, 2340 µL *L*-izolösin, 2340 µL *L*-valin, 2340 µL *L*-lösin, 2340 µL *L*-histidin.HCl, 21 mg *L*-tirozin ve 14 mg urasil 583 mL distile suya eklenerek homojen bir şekilde çözülür. Oluşan karışım 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Çözelti oda sıcaklığında 45 °C’ye kadar soğutulduktan sonra her biri 25-30 mL besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına paylaştırılır. Bu besiyeri steril bir ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### ***100 µg/mL EMS çözeltisi***

Test organizmasındaki mutagenezi indüklemek amacıyla DNA’ya zarar veren bir ajan olarak (pozitif kontrol) kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u> | <u>10 mL için</u> |
|---------------|-------------------|
| EMS           | 42 µL             |
| Distile su    | 9958 µL           |

Bu çözeltinin hazırlanmasında 15 mL hacmindeki steril bir falkon tüpe 9958 µL distile su konulur ve içerisine 42 µL EMS eklenir. Karışım vortekslendikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edilir.

### **%30'luk Gliserol solüsyonu**

Histidin ve adenin oksotrofu olduğu doğrulan test organizmasının stok kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u> | <u>100 mL için</u> |
|---------------|--------------------|
| Gliserol      | 30 mL              |
| Ultra saf su  | 70 mL              |

Bu çözeltinin hazırlanmasında 70 mL ultra saf su içerisine 30 mL gliserol eklenir. Çözelti 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanarak steril edilir. Kullanılincaya kadar +4 °C'de saklanır.

### **%70'lik Etil alkol (EtOH) çözeltisi**

Çalışma ortamının sterilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

| <u>İçerik</u>  | <u>1000 mL için</u> |
|----------------|---------------------|
| Saf etil alkol | 700 mL              |
| Ultra saf su   | 300 mL              |

1000 mL'lik bir balon joje içerisine 700 mL saf etanol ve 300 mL ultra saf su konulmasıyla hazırlanır. Oluşan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

## **Metot**

### **Bilgisayar destekli ilaç tasarım çalışmaları**

Tüm SBVS uygulamaları Schrödinger moleküler modelleme paketi kullanılarak Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü'ndeki Hesaplamalı Biyoloji ve Moleküler Simülasyonlar Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Ligant kaynağı olarak NCI Gelişimsel Tedavi Programı (The Developmental Therapeutics Program; DTP) çerçevesinde geliştirilen açık erişim NCI veritabanı kullanılmıştır (Ihlenfeldt *et al.* 2002). Reseptör yapısının ve ligantların hazırlanmasında, reseptör grid haritasının oluşturulmasında ve ligant docking işlemlerinde gerekli olan modüllere erişim Maestro'nun arayüzü üzerinden sağlanmıştır (Nagpal *et al.* 2012; Mustyala *et al.* 2015). Ligant temelli ilaç tasarım çalışmaları için seçilen moleküllerin ilaç olma özellikleri, tahmini kanser terapötik aktivite değerleri ve bazı toksikolojik parametreleri *in silico* olarak MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> platformunda hesaplanmıştır. Tüm MD simülasyon çalışmaları GROMACS simülasyon paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein-ligant komplekslerinin 50 ns MD simülasyonu için bağlanma serbest enerjilerinin tahmininde GROMACS paketine entegre g\_mmpbsa aracı kullanılmıştır (Kumari *et al.* 2014).

### ***Reseptör yapısının elde edilmesi ve hazırlanması***

Bu tez çalışmasına başlanmadan önce insan SHP-2 kristal yapısı rapor edilmiştir. Böylece, bu tezde, tüm moleküler modelleme çalışmaları (örneğin; protein hazırlama, moleküler docking ve MD simülasyonları) tam uzunluktaki SHP-2'nin yüksek çözünürlüklü X-ışını kristal yapısı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1,7 Å çözünürlüğe sahip, 526 adet amino asitten oluşan SHP-2<sup>WT</sup> enziminin kristal yapısı PDB'den 5EHR.pdb koduyla indirilmiştir (Chen *et al.* 2016; Garcia Fortanet *et al.* 2016; Wang *et al.* 2020c). Bu yapı, bir allosterik SHP-2 inhibitörü olan SHP099 ile birlikte kristalize edilmiş SHP-2 proteinini içermektedir. SHP099 molekülü, PTF domainindeki katalitik bölge yerine, tünel benzeri allosterik bölgeye bağlanarak SHP-2'nin aktif olmayan konformasyonunu çoklu hidrojen bağ etkileşimleriyle stabilize etmekte ve böylece inhibitör aktivitesini önemli ölçüde geliştirmektedir (Wu *et al.* 2020; Yuan *et al.* 2020b; Liu *et al.* 2021a).

Çalışmamızda yeni allosterik SHP-2 inhibitör adaylarının tanımlanması amacıyla yukarıda bahsi geçen protein yapısı üzerinde SHP099'un bağlanma bölgesi esas alınmıştır (Kostrzewa *et al.* 2017; Liu *et al.* 2019; Kwon *et al.* 2021). Bu amaç doğrultusunda monomerik proteinin A zinciri Maestro'da Protein Hazırlama Sihirbazı kullanılarak moleküler docking işlemi için hazır hale getirilmiştir (Salmas *et al.* 2017; Parsonidis *et al.* 2019). Protein hazırlama işleminden önce makromolekülün yapısında bulunan su molekülleri ve fosfat iyonları temizlenmiştir. Ardından ağır atomlara hidrojen atomları eklenmiş, atomlar arasındaki bağ mertebeleri belirlenmiş, disülfid bağları oluşturulmuş, gerekliyse eksik yan zincirler eklenmiş ve döngü (loop) yapıları Maestro'da Prime modülü kullanılarak düzeltilmiştir. Hidrojen bağ ağı, nötr pH değerinde amino asit yan zincirlerinin hidroksil ve tiyol gruplarının, ayrıca asparajin (Asp) ve glutaminin amid grupları ile histidinin imidazol halkasının yeniden oryantasyonuyla optimize edilmiştir. Rezidülerin iyonize olabilen gruplarının asidik iyonlaşma sabitesinin negatif logaritması ( $pK_a$ ) tahminleri ve bunların optimizasyonları PROPKA modülü kullanılarak pH  $7,0 \pm 2,0$  da gerçekleştirilmiştir (Rostkowski *et al.* 2011). Proteinin enerji minimizasyonu 0,3 Å ortalama karekök sapması (root-mean-square deviation; RMSD) ve Optimized Potential for Liquid Simulations 3 (OPLS3) kuvvet alanı kullanılarak yapılmıştır (Harder *et al.* 2016).

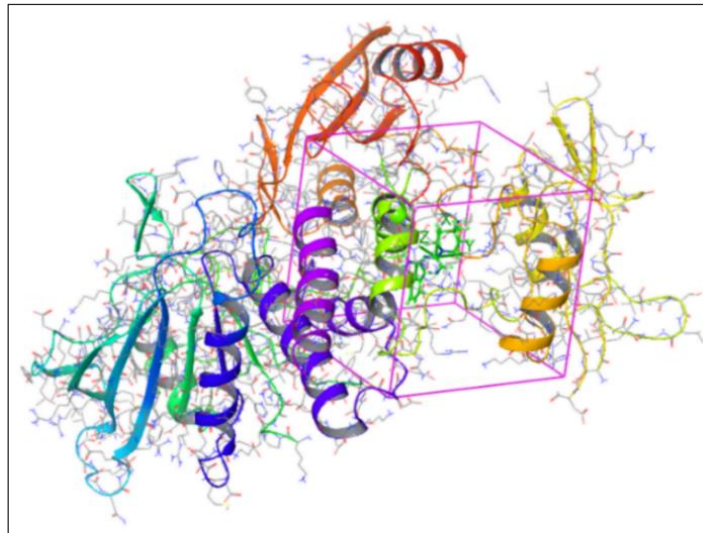
### ***Ligant yapılarının elde edilmesi ve hazırlanması***

SBVS uygulamaları için öncelikle taranacak olan bileşikler içeren bir küçük molekül kütüphanesinin oluşturulması gerekmektedir (Lionta *et al.* 2014). Bu tezde, SBVS çalışmalarında kullanılmak üzere piyasada ticari olarak bulunan moleküllerden oluşan bir koleksiyon olan NCI veritabanı kullanılmış olup bu açık erişim veritabanından 265,242 adet

ligant yapısı elde edilmiştir. Molekül ağırlığı 900 Da'nın üzerinde olan moleküller ayıklandıktan sonra geriye kalan ligantların 3D yapılarının hazırlanması ve bu yapılara ait geometrilerin OPLS3 kuvvet alanıyla optimizasyonunda LigPrep modülü kullanılmıştır (Nwibo *et al.* 2015; Rehman *et al.* 2019). Tautomerizasyon ve iyonizasyon durumları ise Maestro'da Epik modülü ile  $\text{pH } 7,0 \pm 2,0$  da tayin edilmiştir (Shelley *et al.* 2007).

### ***Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları***

Moleküler docking işlemleri ve hesaplamalar Glide modülü kullanılarak yapılmıştır (Friesner *et al.* 2004; Halgren *et al.* 2004; Friesner *et al.* 2006). Reseptör üzerinde docking çalışmalarının gerçekleştirileceği bölgeyi tanımlamak amacıyla, Şekil 37'de dikdörtgen prizma şeklinde gösterilen tarama alanı (grid haritası) oluşturulmuştur (Bayrak ve Yıldız 2014). Allosterik bağlanma bölgesinin elektrostatik ve van der Waals potansiyelleri bu bölgedeki rezidüler dikkate alınarak grid esaslı bir yöntem vasıtasıyla hesaplanmıştır (Ramachandran and Piramanyagam 2017). Literatür bilgisine dayalı olarak, SHP-2 enziminin allosterik bölge rezidülerinin arjinin-111 (Arg111), fenilalanin-113 (Phe113), histidin-114 (His114), glisin-115 (Gly115), His116, lösin-117 (Leu117), Leu125, lizin-129 (Lys129), Leu136, Arg138, treonin-218 (Thr218), Thr219, Arg220, izolösin-221 (Ile221), serin-228 (Ser228), Arg229, glutamik asit-232 (Glu232), valin-243 (Val243), Lys244, glutamin-245 (Gln245), Gly246, Glu249, Glu250 ve Thr253 olduğu bilinmektedir (Wu *et al.* 2019). Reseptör üzerinde oluşturulan grid haritası allosterik bölgedeki rezidüler üzerinde ortalanmıştır.

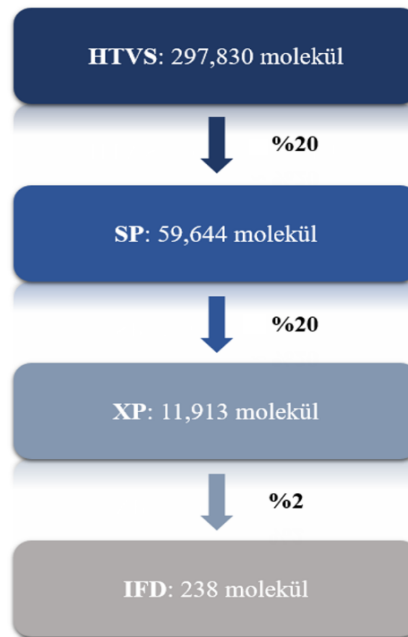


**Şekil 37.** SHP-2<sup>WT</sup>'nin allosterik bağlanma bölgesinde SHP099 ligantı merkeze alınarak oluşturulan grid haritası (PDB kodu: 5EHR, A zinciri)

Hedef proteinin allosterik bölgesinde bulunan amino asitlerin dönebilen bağları ve ligantlar esnek olarak ele alınmıştır. SBVS çalışmalarında kullanılan ligant tarama prosedürü Schrödinger Maestro paket programının Glide/HTVS, Glide/SP, Glide/XP ve Glide/Prime IFD

docking algoritmalarını içeren hiyerarşik bir tarama yaklaşımına dayanmaktadır (Şekil 38) (Friesner *et al.* 2004; Kantarcıoğlu 2017; Aksoydan *et al.* 2018). Bu hiyerarşik yaklaşımın uygulanmasında her bir aşama için varsayılan parametreler kullanılmıştır (Kufareva *et al.* 2014; Mateev *et al.* 2022).

İlk olarak NCI veritabanından alınan ve LigPrep modülüyle hazırlanarak elde edilen 297,830 adet küçük molekül özelliğindeki ligant, Glide/HTVS yöntemi kullanılarak SHP-2'nin allosterik bölgesine kenetlenmiş ve böylece inhibitör aktivitesine sahip olması muhtemel en yüksek bağlanma skorunu veren moleküller kabaca filtrelenmiştir. Ardından Glide/HTVS modunda her bileşik için 1 poz kurtarılarak filtrelenen en yüksek skora sahip bileşiklerin ilk %20'si (59,644 molekül) alınarak; Glide/SP modülüyle ikinci bir docking işlemi uygulanmıştır (Akyol 2021; Ali *et al.* 2021). Benzer şekilde Glide/SP yaklaşımından her bileşik için 5 poz kaydedilerek elde edilen en yüksek skora sahip moleküllerin ilk %20'si (11,913 molekül) tutulmuş (Begum *et al.* 2015; Kanan *et al.* 2019) ve bu moleküller ile daha doğru alınabilen Glide/XP algoritmasının kullanılmasıyla bileşik başına 10 poz korunarak üçüncü bir docking işlemi gerçekleştirilmiştir (Kumar and Ramanathan 2021). Son aşamada Glide/XP çıktısı olarak belirlenen skoru en yüksek olan ilk 238 adet (oran %2'dir) ligant (Aksoydan *et al.* 2018; Venkatesan *et al.* 2021), protein-ligant etkileşimlerinin daha ileri analiz edilebilmesi açısından Glide/Prime IFD metodolojisiyle taranmış ve bileşik başına 20 adet poz kaydedilen bu ligantların her birinin ilk iki IFD pozunda allosterik bölgedeki amino asit kalıntılarıyla beklenen moleküller arası etkileşimlerin var olup olmadığı kontrol edilmiştir (Miller *et al.* 2021; Nguyen *et al.* 2021; Xu *et al.* 2022).



**Şekil 38.** SHP-2<sup>WT</sup> kristal yapısı üzerinde NCI veritabanından alınan 297,830 adet molekülün hiyerarşik tarama adımları

### *MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> uygulamaları*

SBVS çalışmalarının en son aşamasında Glide/Prime IFD metodolojisiyle gerçekleştirilen moleküler docking çalışmalarından elde edilen 238 adet hit ligantın docking skorlarının ve SHP-2'nin allosterik bölgesindeki amino asit kalıntılarıyla kurdukları moleküller arası etkileşimlerin incelenmesinin ardından yapılan değerlendirmelere göre 28 adet hit ligant seçilmiştir. Ardından bu ligantların Lipinski kurallarına göre ilaç olma özellikleri, potansiyel kanser terapötik aktivite değerleri ve bazı toksikolojik parametreleri Clarivate Analytics tarafından geliştirilen MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> adlı internet sunucusuyla tahmini olarak hesaplanmıştır (Lipinski 2004; Mollica *et al.* 2019; Sayın 2019).

Ligant yapısına dayalı olarak gerçekleştirilen MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> analizlerinde kanser terapötik aktivitesi için kesim noktası değeri 0,5 olarak belirlenmiş ve  $\geq 0,5$  aralığındaki değerler “antikanser aktivite potansiyeli mevcut” olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kanser terapötik aktivitesine sahip olabileceği öngörülen hit ligantlar için yapılan farklı türde toksisite analizlerinde her bir toksisite modeli için  $\leq 0,5$  aralığında bulunan değerler “nontoksik” olarak tanımlanmıştır. Tablo 13'te toksisite analizleri sırasında kullanılan ikili QSAR parametrelerinin tanımı ve referans değerleri verilmiştir (Tutumlu 2019).

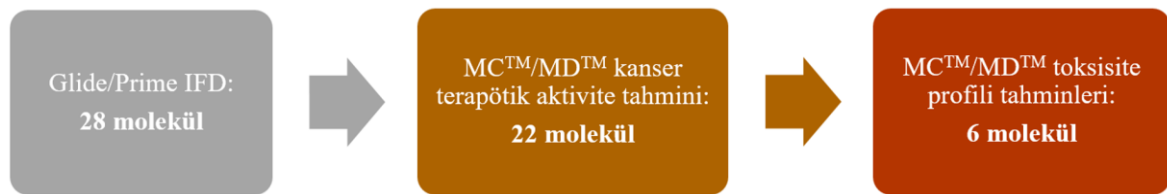
**Tablo 13.** MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> Aracında Yapılan *In Silico* Toksisite Profili Tahminlerinde Kullanılan İkili QSAR Modellerinin Tanımlanması ve Kesme Değerleri (Kantarcıoğlu 2017)

| Toksisite Özelliği                                                         | Açıklama                                                        | Önerilen Değer veya Değer Aralığı |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Akciğer Toksisitesi                                                        | Pulmoner toksisiteyi indüklemeye potansiyelidir.                | $\geq 0,5$                        |
| AMES Toksisitesi                                                           | Mutajenik olma potansiyelidir.                                  | $\geq 0,5$                        |
| Anemi                                                                      | Anemiye neden olma potansiyelidir.                              | $\geq 0,5$                        |
| Böbreklerde Kilo Kazancı                                                   | Böbreklerde ağırlık artışı oluşturma potansiyelidir.            | $\geq 0,5$                        |
| Böbrek Nekrozu                                                             | Böbrek nekrozunu indüklemeye potansiyelidir.                    | $\geq 0,5$                        |
| Deri Hassasiyeti, Efektif Konsantrasyon 3 (Effective concentration 3; EC3) | Cilt hassaslaştırma potansiyeli %EC3 olarak ifade edilmektedir. | $> 10$                            |
| Dişi Farelerde Karsinojenite                                               | Dişi farelerde karsinojenite indüklemeye potansiyelidir.        | $\geq 0,5$                        |
| Dişi Sıçanlarda Karsinojenite                                              | Dişi sıçanlarda karsinojenite indüklemeye potansiyelidir.       | $\geq 0,5$                        |
| Erkek Farelerde Karsinojenite                                              | Erkek farelerde karsinojenite indüklemeye potansiyelidir.       | $\geq 0,5$                        |
| Erkek Sıçanlarda Karsinojenite                                             | Erkek sıçanlarda karsinojenite indüklemeye potansiyelidir.      | $\geq 0,5$                        |

**Tablo 13. (devam)**

|                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                       |            |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Epididim Toksisitesi                                                         | Epididim toksisitesini indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                    | $\geq 0,5$ |
| Genotoksisite                                                                | Genotoksisiteyi indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                           | $\geq 0,5$ |
| Hepatotoksisite                                                              | Hepatotoksisiteyi indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                         | $\geq 0,5$ |
| Karaciğerde Kilo Kazancı                                                     | Karaciğerde ağırlık artışı oluşturma potansiyelidir.                                                                                                                                                                                  | $\geq 0,5$ |
| Karaciğer Kolestazı                                                          | Karaciğer kolestazını indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                     | $\geq 0,5$ |
| Karaciğer Nekrozu                                                            | Karaciğer nekrozunu indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                       | $\geq 0,5$ |
| Karaciğerde Lipid Birikimi                                                   | Karaciğerde lipid akümülyasyonunu indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                         | $\geq 0,5$ |
| Kardiyotoksisite                                                             | Kardiyotoksisiteyi indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                        | $\geq 0,5$ |
| Karsinojenite                                                                | Sıçanlarda ve farelerde karsinojenite indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                     | $\geq 0,5$ |
| Maksimum önerilen terapötik doz (maximum recommended therapeutic dose; MRTD) | Bir ilacın etkinliğinin artmadığı ve yan etkilerinin faydalı etkilerinden daha ağır basmaya başladığı üst sınırı tahmin etmek amacıyla kullanılmaktadır (Liu <i>et al.</i> 2016). Birimi $\log[\text{mg/kg-g}\ddot{u}\text{n}]$ 'dür. | $\geq 0,5$ |
| Nazal Patoloji                                                               | Nazal patolojiye neden olma potansiyelidir.                                                                                                                                                                                           | $\geq 0,5$ |
| Nefron Hasarı                                                                | Nefron hasarını indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                           | $\geq 0,5$ |
| Nefrotoksisite                                                               | Nefrotoksisiteyi indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                          | $\geq 0,5$ |
| Nörotoksisite                                                                | Nörotoksisiteyi indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                           | $\geq 0,5$ |
| Sitotoksisite Modeli, -logGI <sub>50</sub>                                   | MCF-7 hücre hattının büyüme inhibisyonunu (pGI <sub>50</sub> ) ifade etmektedir.                                                                                                                                                      | $< 6$      |
| Testis Toksisitesi                                                           | Testis toksisitesini indüklemeye potansiyelidir.                                                                                                                                                                                      | $\geq 0,5$ |

MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> terapötik aktivite tahminleri ve toksisite analizleri için uygulama adımları Şekil 39'da gösterilmiştir.



**Şekil 39.** Glide/Prime IFD metoduyla çıktı olarak elde edilen 28 adet hit ligantın MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> analizlerinde izlenen prosedür

### MD simülasyonları

MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> toksisite analizleri sonrasında seçilen hit ligantların IFD pozlarına ait kristal yapılarının tüm atom MD simülasyon çalışmaları biyo(makro)moleküllerin solüsyon içerisinde simüle edilebilmesine olanak sağlayan GROMACS yazılım paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Berendsen *et al.* 1995; Bowers *et al.* 2006) Ayrıca sistem girdilerinin

oluşturulmasında CHARMM-GUI (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics Graphical User Interface) solüsyon oluşturma arayüzünden faydalanılmıştır (Jo *et al.* 2008).

Belirlenen Glide/Prime IFD pozları protein ve simülasyon kutusunun kenarları arasında 10 Å mesafe olacak şekilde bir dikdörtgen kutu içerisine yerleştirilmiştir. Kutunun içinde bulunan su molekülleri TIP3P (Transferable Intermolecular Potential 3P) modeliyle işlenmiştir (Jorgensen *et al.* 1983). Termodinamik denge izotermal-izobarik topluluk (isothermal-isobaric ensemble; NPT) ile sağlanmıştır (McDonald 1972; Oktay 2020). Simülasyonlar esnasında 310 K sıcaklık ve 1 atm basınç koşulları, sırasıyla Nosé-Hoover termostat ve Parrinello-Rahman barostat yöntemleri kullanılarak muhafaza edilmiştir (Nosé 1984; Rühle 2008). Sistemin nötralizasyonu, 0,15 M sodyum klorür (NaCl) ilavesiyle, Monte-Carlo (MC) iyon yerleştirme yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Kantarcıoğlu 2017). Bağ uzunlukları LINCS (Linear Constraint Solver) algoritması kullanılarak sınırlandırılmış ve uzun mesafedeki elektrostatik etkileşimleri hesaplamak için Particle Mesh Ewald (PME) yöntemi kullanılmıştır (Essmann *et al.* 1995; Hess *et al.* 1997). Coulomb ve van der Waals etkileşimlerinin hesaplanmasında ise kesme noktası mesafelerinin her ikisi de 12 Å değerine ayarlanmıştır. Sistemin potansiyel enerjisinin hesaplanmasında CHARMM36m kuvvet alanı kullanılmıştır (Huang *et al.* 2017). Varsayılan olarak, simülasyonlara başlamadan önce sistemin rahatlatılması ve enerjisinin minimize edilmesi işlemleri GROMACS tarafından gerçekleştirilmiştir. Simülasyon süreleri 50 ns uzunluğunda tutulmuş ve her birinden, başlangıç yapısı dahil olmak üzere, 501 görüntü toplanmıştır. Dinamik trajektorilerin görselleştirilmesi Visual Molecular Dynamics (VMD) yazılım paketiyle gerçekleştirilmiştir (Humphrey *et al.* 1996). Grafikler xmgrace programıyla hazırlanmıştır.

Ligant RMSD değerleri “lig-fit-prot” ve “lig-fit-lig” yaklaşımlarıyla belirlenmiştir. Lig-fit-prot, bir ligantın RMSD değerini, ilgili protein-ligant kompleksinin bu komplekse ait ilk bağlanma moduyla karşılaştırarak ölçmektedir. Lig-fit-lig ise bir ligantın RMSD değerini, bu ligantın ilk konformasyonu ile kıyaslama yaparak hesaplamaktadır (Bryant *et al.* 2017). Ayrıca RMSD hesaplamaları ligantların hidrojen olmayan atomları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir (Himmetoğlu 2020).

### ***MM/PBSA hesaplamaları***

MD simülasyonlarının uygulandığı her protein-ligant kompleksinin  $\Delta G$  değeri MM/PBSA hesaplamaları yoluyla tahmin edilmiştir. Bağlanma serbest enerjisi hem bağ hem de bağ olmayan etkileşimleri içeren vakum potansiyel enerjisinin yanı sıra polar ve nonpolar terimleri dikkate alan solvasyon enerjisinin hesaba katılmasıyla belirlenmiştir. Polar çözünme enerjisi terimi Poisson-Boltzmann denklemi çözülerek tahmin edilmiştir. Bununla birlikte

nonpolar çözünme enerjisi terimi solvent erişilebilir yüzey alanı (solvent accessible surface area; SASA) yöntemiyle hesaplanmıştır (Botelho *et al.* 2020). Tüm MM/PBSA hesaplamaları GROMACS yazılımıyla uyumlu g\_mmpbsa aracı kullanılarak yapılmıştır (Kumari *et al.* 2014). MM/PBSA hesaplamalarına toplam 50 ns'lik MD simülasyonları esnasında kaydedilen trajektori görüntülerinden son 250 tanesi dahil edilmiştir. Böylece elde edilen ayrı görüntülerin her biri için hesaplanan MM/PBSA değerlerinin ortalaması alınmış ve standart sapmalar hesaplanmıştır.

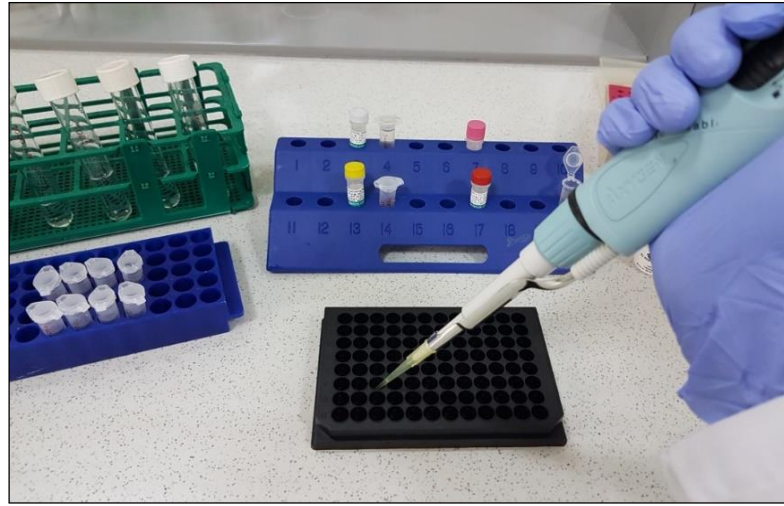
### ***İn vitro* biyoaktivite araştırmaları**

#### ***SHP-2 enzim inhibisyonu testi***

Bu testin amacı *in silico* çalışmalar kapsamında SHP-2 enzimini allosterik olarak inhibe edebileceği belirlenen yeni aday bileşiklerin *in vitro* koşullarda SHP-2 inhibisyon aktivitelerinin doğrulanmasıdır. Floresan ölçümlerine dayanan ilgili test prosedüründe SHP-2'nin katalitik aktivitesi taşıyıcı substrat olarak DiFMUP bileşiğinin kullanılmasıyla belirlenmiştir (Chen *et al.* 2016; Garcia Fortanet *et al.* 2016; Bagdanoff *et al.* 2019). Homojen tam uzunluktaki SHP-2 için ölçümler satın alınan inhibitör tarama test kiti vasıtasıyla üretici firmanın talimatları izlenerek 96 kuyucuklu siyah polistiren bir plaka üzerinde oda sıcaklığı koşullarında gerçekleştirilmiştir.

SHP-2 enzim inhibisyon aktivitesi çalışmasının basamakları aşağıda verildiği gibidir:

1. İnhibitör aktiviteleri 0,003-10,0  $\mu$ M doz aralığında (Chen *et al.* 2016; Sarver *et al.* 2019) test edilecek yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları ve SHP099'a ait stok çözeltiler uygun miktarda DMSO kullanılarak arzu edilen son konsantrasyondan 10 kat daha yüksek bir konsantrasyonda hazırlanır. Test maddelerinin çalışma çözeltilerinin hazırlanmasında ise bu stok çözeltilerden belirli oranlarda seyreltmeler yapılır.
2. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 8,5  $\mu$ L distile su, 5  $\mu$ L 5X SHP-2 deney tamponu, 5  $\mu$ L 5  $\mu$ M'lık SHP-2 aktive edici peptit solüsyonu ve 0,5  $\mu$ L 250 mM'lık 1,4-ditiyotreitöl (DTT) içeren ana karışımdan 19  $\mu$ L konulur (Şekil 40 ve Tablo 14).



**Şekil 40.** Hazırlanan ana karışımın plakanın kuyucuklarına 19  $\mu$ L hacimlerde olacak şekilde eklenmesi

3. Plaka üzerinde “test örneği” olarak işaretlenen kuyucukların her birine farklı konsantrasyonlardaki inhibitör solüsyonlarından Tablo 15’te belirtilen miktarlarda aktarılır ve üzerlerine bu bileşenin hacmini 5  $\mu$ L’ye tamamlayacak ölçüde DMSO eklenir.
4. Deneyde inhibitör solüsyonu içermeyen ancak SHP-2 enzimini içeren kuyucuklar “pozitif kontrol” olarak; sadece ana karışım ve tampon içeren kuyucuklar ise “kör kontrol (blank)” olarak kullanılır. “Test örneği” kuyucuklarıyla birlikte tüm kuyucuklara eklenmesi gereken bileşen miktarları Tablo 14’te detaylı olarak verilmiştir.

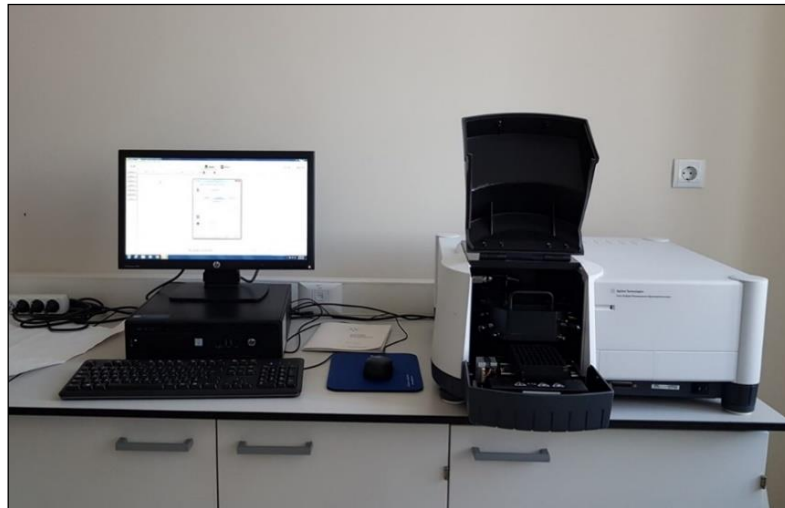
**Tablo 14.** Enzim ve İnhibitör Adaylarının Birlikte İnkübasyon İşleminde Pozitif Kontrol, Negatif (Kör) Kontrol ve Test Örneği Olarak Belirlenen Kuyucuklara Eklenmesi Gereken Bileşen Miktarları

| Ortam Bileşeni                                | Pozitif Kontrol Kuyucuğu ( $\mu$ L) | Test Örneği Kuyucuğu ( $\mu$ L) | Kör Kontrol (Blank) Kuyucuğu ( $\mu$ L) |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|
| Distile Su                                    | 8,5                                 | 8,5                             | 8,5                                     |
| 5X SHP-2 Deney Tamponu                        | 5                                   | 5                               | 5                                       |
| 5 $\mu$ M SHP-2 Aktive Edici Peptit Solüsyonu | 5                                   | 5                               | 5                                       |
| 250 mM DTT                                    | 0,5                                 | 0,5                             | 0,5                                     |
| Test İnhibitörü Solüsyonu                     | -                                   | 5                               | -                                       |
| İnhibitör Tamponu-DMSO                        | 5                                   | -                               | 5                                       |
| 0,2 ng/ $\mu$ L SHP-2 Enzim Solüsyonu         | 1                                   | 1                               | -                                       |
| 1X SHP-2 Deney Tamponu                        | -                                   | -                               | 1                                       |
| Toplam Hacim                                  | 25                                  | 25                              | 25                                      |

**Tablo 15.** SHP-2 Enzim İnhibisyonu Deneyinde Test Bileşikleri İçin Belirlenen Uygulama Konsantrasyonları ve Bu Konsantrasyon Değerlerini Elde Etmede İlgili Kuyucuklara Eklenmesi Gereken Çalışma Çözeltisi ve DMSO Miktarları

| Test Materyali Son Konsantrasyonu (µM) | Çalışma Çözeltisi Hacmi (µL) | DMSO Hacmi (µL) |
|----------------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 0,003                                  | 0,1 µM çözeltiden 1,5        | 3,5             |
| 0,03                                   | 1,0 µM çözeltiden 1,5        | 3,5             |
| 0,3                                    | 10,0 µM çözeltiden 1,5       | 3,5             |
| 0,6                                    | 10,0 µM çözeltiden 3,0       | 2,0             |
| 1,0                                    | 10,0 µM çözeltiden 5,0       | -               |
| 2,5                                    | 100,0 µM çözeltiden 1,25     | 3,75            |
| 5,0                                    | 100,0 µM çözeltiden 2,5      | 2,5             |
| 10,0                                   | 100,0 µM çözeltiden 5,0      | -               |

5. “Test örneği” kuyucuklarında bulunan farklı dozlardaki inhibitör solüsyonları ile birlikte 0,2 ng/µL SHP-2 enzimi 1 saat boyunca inkübe edilir.
6. 1 Saatlik inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından her bir kuyucuğa 19 µL distile su, 2,5 µL 5X SHP-2 deney tamponu, 0,5 µL 250 mM DTT ve 0,5 µL 1 mM DiFMUP içeren karışımdan 25 µL eklenir ve plaka karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılır.
7. Kuyucuklardaki örneklerin floresan yoğunluk (fluorescence intensity; Fİ) değerleri 360 nm/460 nm’lik eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçüm yapabilen bir floresan mikropilaka okuyucusu vasıtasıyla kaydedilir (Şekil 41).



**Şekil 41.** Hazırlanan mikropilakanın okuyucuya yerleştirilerek 360 nm’lik bir eksitasyon dalga boyu ve 460 nm’de emisyon ile Fİ değerlerinin okunması

8. Pozitif kontrol ve test örneği kuyucuklarında ölçülen Fİ değerleri için “kör kontrol (blank)” düzeltilmesi yapılır. Ayrıca yeni aday inhibitörler için bu test literatürde ilk

kez gerçekleştirildiğinden ötürü, “test örneği” kuyucukları için belirlenen uygulama dozlarına ait “inhibitör kontrol” solüsyonları hazırlanır (Tablo 16). Böylece “blank” düzeltilmesi yapılmış test örneği kuyucuklarında kaydedilen Fİ değerlerinden, karşılık gelen “inhibitör kontrol” solüsyonlarını içeren kuyucularda ölçülen Fİ değerleri çıkartılarak yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları için final Fİ değerleri belirlenir.

**Tablo 16.** “İnhibitör Blank” Olarak İşaretli Kuyucuklara Eklenmesi Gereken Bileşen Miktarları

| Ortam Bileşeni                           | İnhibitör Blank Kuyucuğu (µL) |
|------------------------------------------|-------------------------------|
| Distile Su                               | 8,5                           |
| 5X SHP-2 Deney Tamponu                   | 5                             |
| 5 µM SHP-2 Aktive Edici Peptit Solüsyonu | 5                             |
| 250 mM DTT                               | 0,5                           |
| Test İnhibitörü Solüsyonu                | 5                             |
| İnhibitör Tamponu-DMSO                   | -                             |
| 0,2 ng/µL SHP-2 Enzim Solüsyonu          | -                             |
| 1X SHP-2 Deney Tamponu                   | 1                             |
| Toplam Hacim                             | 25                            |

- Hesaplanan final Fİ değerlerinden yola çıkarak her bir inhibitör adayı ve SHP099’un, SHP-2 enziminin aktivitesi üzerinde gözlenen inhibisyon etkisi % olarak ifade edilir. Bu noktada pozitif kontrol kuyucuğundaki SHP-2 enziminin aktivitesi %100 olarak kabul edilir. Test örneği kuyucuklarındaki SHP-2’nin % aktivitesi ise Eşitlik 13’te verilen formüle göre hesaplanır.

$$\% \text{ SHP} - 2 \text{ enzim aktivitesi} = \frac{F\dot{I}_{\text{test örneği}}}{F\dot{I}_{\text{pozitif kontrol}}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 13})$$

- GraphPad Prism 9 yazılımında test edilen uygulama dozlarının logaritmasının x eksenine ve % enzim aktivitesi değerlerinin y eksenine yerleştirilmesiyle oluşturulan grafiklerden her bir inhibitör adayı ve SHP099 için SHP-2 IC<sub>50</sub> değeri tayin edilir.

Bu aşamada SHP-2 IC<sub>50</sub> değeri, SHP-2 enziminin aktivitesinde %50 düşüşe neden olan inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (Fassy *et al.* 2017). Çalışmada test bileşikleri ve SHP099’a ait SHP-2 IC<sub>50</sub> değerleri sekiz farklı uygulama konsantrasyonu kullanılarak tayin edilmiştir. Her deney iki kopya halinde gerçekleştirilmiş ve veriler üç bağımsız deneyden elde edilmiştir (Chen *et al.* 2006). İstatistiksel analizler tek yönlü varyans analizi (one-way analysis of variance; one-way ANOVA) ve Tukey’in dürüstçe anlamlı fark testi (Tukey’s honestly significant difference test; Tukey HSD) post-hoc testi kullanılarak GraphPad Prism 9

programında gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (s.d.) olarak gösterilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklar  $P < 0,05$  olduğunda anlamlı kabul edilmiştir (Kostrzewa *et al.* 2018; Wandjou *et al.* 2020).

### ***MTT testi vasıtasıyla seçici antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi***

Çalışmada SHP-2 inhibisyonu sağladıkları tespit edilen bileşiklerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı seçici antiproliferatif ve sitotoksik aktiviteleri Ark *et al.* (2017) ve Önder (2019) tarafından yayınlanan hücre kültürü protokolleri kullanılarak ve bu protokollerde ufak modifikasyonlar yapılarak MTT testi ile değerlendirilmiştir. Kontrol hücre grubu olarak MCF10A insan sağlıklı meme epitel hücreleri kullanılmıştır.

### ***Hücre hatlarının sıvı azottan çıkartılması ve ekilmesi***

Dondurulmuş hücre viyalleri  $-196^{\circ}\text{C}$ 'deki sıvı azot tankından çıkartıldıktan sonra  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda hızlıca çözündürülmüştür. Hücre süspansiyonları laminar akımlı kabin içerisinde 15 mL'lik steril falkonlara alınmış ve üzerlerine sıcaklığı önceden  $37^{\circ}\text{C}$ 'ye getirilmiş 5 mL tam besiyeri eklenmiştir. MCF-7 ve MCF10A hücre hatları için sırasıyla DMEM ve DMEM/Ham F12 besiyerleri kullanılmıştır. Falcon tüpleri oda sıcaklığında 10 dakika  $400 \times g$ 'de santrifüj edildikten sonra üzerlerindeki süpernatant atılmış ve pellet 5 mL tam besiyeriyle yeniden süspanse edilmiştir. Ardından süspansiyonda bulunan canlı hücreler hemositometreyle sayılmıştır. Sayım yapılan hücre süspansiyonlarından  $7 \times 10^5$  adet hücre alınarak 15 mL'lik steril falkonlara aktarılmış ve son hacim tam besiyeriyle 5 mL'ye tamamlanmıştır. Bu 5 mL'lik hücre süspansiyonları  $25 \text{ cm}^2$ 'lik flasklara ekilmiş ve kültür kapları  $37^{\circ}\text{C}$  sıcaklık, %5  $\text{CO}_2$  ve %97 nem içeren etüv koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Bir sonraki gün hücrelerin tutundukları yüzeyi kaplama oranları faz kontrast mikroskopuyla kontrol edilmiş ve bu işlemin ardından T25 kültür kabının besiyeri 5 mL tam besiyeriyle değiştirilmiştir. Her iki hücre grubu %80'lik bir hücre yoğunluk oranı (konfluent) elde edilinceye dek büyütülmüş ve bu süreçte iki günde bir besiyeri idamesi yapılmıştır.

### ***Hemositometre ile hücrelerin sayımı***

Hücrelerin sayımında tripan mavisini tekniği kullanılmıştır. Bu yöntemde tripan mavisini içine alan hücreler ölü (mavi), boyayı içine almayan hücreler (parlak beyaz) ise canlı hücreler olarak değerlendirilmektedir (Önder 2019; Vembadi *et al.* 2019). Hücrelerin sayımı için bir santrifüj tüpüne resüspanse kültürden 20  $\mu\text{L}$  alınmış ve üzerine eşit hacimde %0,4'lük (w/v) tripan mavisini eklenmiştir. Pipetaj ile tripan mavisini ve hücre süspansiyonlarının karışması sağlandıktan sonra kültürden 15  $\mu\text{L}$  alınmış ve Thoma lamının lamelle birleştiği noktadan yavaşça bırakılmıştır. Böylece hücre süspansiyonu lam ve lamel arasında yayılmıştır. Lam

mikroskop altına alındıktan sonra 40x büyütme oranında 16 büyük kare kullanılarak canlı hücrelerin sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Falkondaki hücre süspansiyonlarının 1 mL’inde bulunan hücre sayıları Eşitlik 14’e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre/mL} = (\text{Sayılan toplam canlı hücre} \times 2 \times 10^4) / \text{Sayılan kare sayısı} \quad (\text{Eşitlik 14})$$

#### ***Hücre hatlarının pasajlanması***

25 cm<sup>2</sup>’lik flasklarda konfluent durumuna ulaşan hücreler laminar akımlı kabinde 37 °C sıcaklıkta bulunan 5 mL PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine sıcaklığı 37 °C’ye getirilmiş %0,05’lik tripsin-EDTA çözeltisinden 1 mL eklenmiştir. Hücreler tutundukları flask yüzeyinden ayrıldıktan sonra üzerlerine 5 mL tam besiyeri konulmuş ve oluşan süspansiyon 15 mL’lik steril bir falkona aktararak oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 400 x g’de santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatant kısmı atılarak, pellet üzerine 15 mL tam besiyeri konulmuş ve hücre süspansiyonu 5’er mL’lik hacimlerde üç adet 25 cm<sup>2</sup>’lik flasklara bölünmüştür. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri 5 mL tam besiyeriyle değiştirilmiş ve hücrelerin kapladıkları alanın yüzdesi faz kontrast mikroskopuyla kontrol edilmiştir. Hücreler T25 kültür kabının %80’ini kaplayıncaya kadar üzerlerindeki besiyerleri tam besiyeriyle değiştirilmiştir.

#### ***Hücrelerin dondurulması***

Hücreler T25 kültür kabının %80’ini kapladıktan sonra laminar akımlı kabin içerisinde sıcaklığı 37 °C olan 5 mL PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine 37 °C’deki %0,05’lik tripsin-EDTA çözeltisinden 1 mL konulmuş ve hücreler flask yüzeyinden tam olarak ayrıldıktan sonra üzerlerine 5 mL tam besiyeri eklenmiştir. Hücre süspansiyonu 15 mL’lik steril bir falkona alındıktan sonra oda sıcaklığı koşullarında 400 x g’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Bu işlemin ardından süpernatant atılmış ve pellet içeriğinde 200 µL steril DMSO ve 1800 µL FBS bulunan dondurma vasatıyla yeniden süspanse edilmiştir. Son aşamada hücre süspansiyonu 2 mL’lik kriyoviallere bölüştülerek sıvı azot tankında dondurulmuştur.

#### ***Test bileşiklerine ait stok solüsyonların hazırlanması, uygulama dozlarının belirlenmesi ve hücre kültürüne uygulanması***

Yeni allosterik SHP-2 inhibitör adaylarına ait stok çözeltilerin hazırlanması amacıyla maddeler uygun miktarda DMSO içerisinde çözülmüş ve hücrelere ait büyütme besiyerleri kullanılarak hazırlanan stok çözeltiler seri bir şekilde dilüe edilmiştir. Bu işlem esnasında her bir çalışma çözeltisi için DMSO yüzdesi, hücreler için toksik olmayan seviyede yani %1’in altında olacak şekilde ayarlanmıştır (Adilović *et al.* 2020; Nguyen *et al.* 2020). Tüm solüsyonlar hücrelere ilaç uygulaması yapılmasından hemen önce taze olarak hazırlanmıştır.

Hücre kültürü deneylerinde test bileşiklerine ait uygulama konsantrasyonları 0,015, 0,06, 0,24, 0,96, 3,84, 15,36, 61,44 ve 245,76 µM olarak belirlenmiştir. Düşük mikromolar konsantrasyonlar dahil olmak üzere mikromolar seviyedeki çeşitli konsantrasyonları içeren bu doz aralığı test bileşiklerinin SHP-2 enziminin aktivitesini %50 oranında inhibe eden dozları kapsamaları bakımından önemlidir. Sitotoksitenin değişimini belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde MTT hücre canlılığı testi uygulanmıştır.

### MTT analizi

Ortalama olarak 24 saatte %80 hücre yoğunluğuna kadar çoğaltılan MCF-7 ve MCF10A hücreleri  $1,0 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde mikropalakalarda 100 µL hacmindeki kültür ortamına alınmıştır. Ardından her bir madde için MCF-7 ve MCF10A hücrelerine 0,015-245,76 µM arasında değişen konsantrasyonlarda ilaç uygulaması yapılmıştır. MCF-7 ve MCF10A hücrelerinin proliferasyonundaki azalmayı veya sitotoksik etkileri karşılaştırabilmek amacıyla pozitif kontrol uygulamasında çeşitli dozlarda Doksorubisin (Doxorubicin; DXR) solüsyonları kullanılmıştır (Sharma *et al.* 2011; Jokar *et al.* 2015; Abd Razak *et al.* 2019; Georgiev *et al.* 2019; Abdulhadi 2021; Luo *et al.* 2022). Negatif kontrol olarak sadece ilgili besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanılmış olup kör için ayrılan kuyucuklara ise yalnızca 200 µL besiyeri konulmuştur. Bu şekilde hazırlanan kültürler 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş hava koşullarında 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından kuyucuklar bileşiklerin MTT ile interferansını önlemek amacıyla önce PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu mikropalkanın her bir kuyucuğuna içinde 20 µL MTT olan 100 µL besiyeri eklenmiştir. Hazırlanan mikropalakalar 37 °C’de 4 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde kuyucuklarda bulunan karışımlar uzaklaştırılmıştır. Son olarak her bir kuyucuğa 150 µL DMSO ilave edilmiş ve mor renkli formazan kristallerinin iyi çözünmesini sağlamak için pipetaj işlemi uygulanmıştır. Örneklerin absorbansı bir mikropalaka okuyucusu kullanılarak 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Test bileşiklerinin MCF-7 ve MCF10A hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi yüzde (%) canlılık cinsinden aşağıda yer alan Eşitlik 15 kullanılarak hesaplanmış ve sitotoksik etkilerin görüldüğü konsantrasyonlarda hücre canlılıkları tayin edilmiştir.

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = [(A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}}) / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}})] \times 100 \quad (\text{Eşitlik 15})$$

% Hücre büyüme inhibisyonu veya % sitotoksite ise Eşitlik 16 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Sitotoksite} = 100 - (\% \text{ Hücre canlılığı}) \quad (\text{Eşitlik 16})$$

### ***MTT verilerinin istatistiksel analizi***

Deneylerde her bir konsantrasyon değeri birbirinden bağımsız iki farklı kuyucukta tekrar edilmiştir. Veriler en az üç bağımsız deneyden elde edilmiş ve ortalama  $\pm$  s.d. olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar iki yönlü ANOVA (two-way ANOVA) ile karşılaştırılmış olup post-hoc test olarak Tukey testi kullanılmıştır. Grafiklerin çizimi ve istatistiksel analizler için GraphPad Prism 9 yazılımından faydalanılmıştır. Bu yazılımla aynı zamanda test bileşiklerinin IC<sub>50</sub> değerleri doğrusal olmayan regresyon hesaplamalarıyla belirlenmiştir. P< 0,05 olan değerlerin istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği kabul edilmiştir (Van den Brand *et al.* 2019; Sibuh *et al.* 2020; Esteghlal *et al.* 2021; Şenol *et al.* 2021).

### ***Seçicilik indeksi (Selectivity index; SI) değerlerinin hesaplanması***

Bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki “seçici sitotoksik ve antiproliferatif etkinlikleri”ni tayin etmek amacıyla SI değerleri kullanılmıştır (Badisa *et al.* 2014; Rashidi *et al.* 2017). Bu değerler her bir molekül için MCF10A hücre hattı için hesaplanan IC<sub>50</sub> değerinin, MCF-7 hücre hattı için hesaplanan IC<sub>50</sub> değerine bölünmesiyle hesaplanmıştır. SI değeri 2’den büyük olan moleküllerin MCF-7 hücre hattında yüksek oranda seçici sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği kabul edilmiştir.

### ***Maya DEL test sistemiyle genotoksik özelliklerin tayini***

MTT analizi ile hücre canlılığının belirlenmesinin ardından yeni allosterik SHP-2 inhibitörleri ve SHP099’un genotoksik özellikleri maya DEL testiyle Brennan and Schiestl (2004), Kirpnick *et al.* (2005) ve Orhan (2010) tarafından yayınlanan test prosedürleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu testin amacı antikanser ilaç adayı olma potansiyeli taşıyan kimyasal bileşiklerin insan sağlığına zararlı etkilerini belirlemek ve bu sayede daha kaliteli ilaç adaylarının seçilmesine katkı sağlamaktır (Custer and Sweder 2008).

### ***Mutajenite araştırmalarında kullanılan mutant maya suşunun genetik özelliklerinin kontrolü***

#### ***Histidin gereksinimi***

Bu testin uygulanma amacı *S. cerevisiae* RS112 mutant maya suşunun his<sup>-</sup> olduğunun kanıtlanmasıdır. Bunun için öncelikle SC-Leu-S besiyerinde maya suşunun gecelik kültürü hazırlanmıştır. Ardından bir miktar kültür steril bir öze ile alınarak, SC-His ve SCF besiyeri plaklarına yayma ekim yöntemiyle inoküle edilmiştir. 30 °C’de 2-3 günlük inkübasyon

süresinin ardından tüm plaklardaki üreme durumu kontrol edilmiş olup üremenin yalnızca SCF plaklarında görülmesi kullanılan mutant maya suşunun his<sup>-</sup> olduğunu kanıtlamıştır.

### ***Lösin gereksinimi***

Bu test *S. cerevisiae* RS112 mutant maya suşunun ortamda lösin amino asidi yokluğunda gelişebildiğini kanıtlamak amacıyla uygulanmıştır. SC-Leu-S besiyeri kullanılarak gecelik kültürü hazırlanan maya suşundan bir miktar alınarak, bu kültürün SC-Leu-K ve SCF besiyeri plaklarına yayma ekim yöntemiyle inokülasyonu sağlanmıştır. 30 °C’de 2-3 günlük inkübasyon süresinin ardından plaklardaki üreme durumu kontrol edilmiş ve maya hücrelerinin her iki besiyerinde de gelişebildiğinin görülmesiyle birlikte kullanılan mutant maya suşunun lösin prototrofu (leu<sup>+</sup>) olduğu kanıtlanmıştır.

### ***Adenin gereksinimi***

Bu testin uygulanma amacı *S. cerevisiae* RS112 mutant maya suşunun ade<sup>-</sup> olduğunun doğrulanmasıdır. Bunun için öncelikle SC-Leu-S besiyerinde maya suşunun gecelik kültürü hazırlanmıştır. Bu kültürden steril bir özeyle bir miktar alınmış olup alınan kültürün SC-Ade ve SCF besiyeri plaklarına yayma ekim yöntemiyle inokülasyonu sağlanmıştır. 30 °C’de 2-3 günlük inkübasyon süresinin ardından tüm plaklardaki üreme durumu kontrol edilmiştir. Buna göre yalnızca SCF plaklarında üreme görülmesi kullanılan mutant maya suşunun ade<sup>-</sup> olduğunu kanıtlamıştır.

### ***Test bileşikleri ve pozitif mutajenin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi***

Maya DEL mutajenite deneyinde mutant *S. cerevisiae* RS112 suşu için pozitif mutajen olarak EMS kullanılmıştır. Bu deneyden elde edilecek sonuçların sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi amacıyla EMS’nin farklı konsantrasyonlardaki uygulama çözeltileri DMSO kullanılarak hazırlanmış ve bu çözeltilerin her biri maya hücreleriyle muamele edildikten sonra kültürler SCF besiyeri plaklarına inoküle edilmiştir. Maya hücreleri 30 °C’de 2-3 gün süreyle inkübe edilerek geliştirildikten sonra maya kolonileri sayılarak kontrol grubuyla kıyaslama yapılmıştır. Bunun sonucunda EMS’nin farklı dozlarına maruz kalan maya hücreleri için “%canlılık oranı (%c.o.)” değerleri tespit edilmiş olup denemeler istatistiksel açıdan anlamlı olan DEL oranlarının gözlemlenebildiği %c.o. değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sayede EMS için en makul olan uygulama konsantrasyon aralığı belirlenmiştir.

Yeni allosterik SHP-2 inhibitörleri ve SHP099 için maya DEL test sistemiyle gerçekleştirilen mutajenite çalışmalarında bu maddelerin uygun test konsantrasyonlarının

belirlenmesinden hemen önce maya hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri tayin edilmiştir. Bu amaçla çözücü olarak DMSO kullanılarak farklı dozlarda hazırlanan test solüsyonlarıyla muamele edilen maya hücreleri SCF besiyeri plaklarına inoküle edildikten sonra 30 °C’de 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Böylece test maddelerinin mutant maya suşu üzerindeki sitotoksik etkileri “deney” ve “kontrol” grubu olarak önceden işaretlenen plaklarda gelişen kolonilerin sayılması ve birbiriyle kıyaslanmasıyla belirlenmiştir. Ayrıca deneyler esnasında istatistiksel açıdan önemli DEL oranlarının gözlemlenebildiği %c.o. değerleri seçilerek kullanılmıştır.

Bu aşamada öngörülen ideal uygulama konsantrasyonlarının üst limiti petri kabı başına 5000 µg olarak belirlenmiştir (Ciaravino *et al.* 1995; Parry *et al.* 2010; ICH 2012; Otabe *et al.* 2019). Elde edilen sonuçların anlamlı olması açısından bu çalışma, her bir test maddesinin sekiz farklı dozuyla farklı zaman aralıklarında deneyin üç kez tekrarlanması suretiyle gerçekleştirilmiştir (Brennan and Schiestl 1999; Tugcu *et al.* 2018).

#### **S. cerevisiae RS112 test suşunun muhafaza edilmesi ve gecelik kültürlerin hazırlanması**

Maya DEL mutajenite deneyinde test organizması olarak kullanılan mutant *S. cerevisiae* RS112 suşu -87 °C sıcaklıkta uzun süreli olarak saklanabilmektedir. Bu amaçla genetik işareti doğrulanmış olan maya test suşu, SC-Leu-S besiyeri kullanılarak içerisinde  $1 \times 10^7$  hücre/mL olacak şekilde 30 °C’de çoğaltılmıştır. Bu maya kültürüne kültürün 1 mL’si başına 0,09 mL %30’luk gliserol eklendikten sonra vorteksleme yoluyla homojen bir kültür solüsyonu oluşturulmuştur. Bu yeni kültür solüsyonu 1 mL’lik hacimlere bölünerek steril eppendorf tüplerine paylaştırılmıştır. Ardından tüpler kuru buz içerisinde 30 dakika bekletildikten sonra -87 °C’lik dondurucuya konulmuştur.

Mutajenite deneylerinde kullanılacak olan gecelik taze kültürler -87 °C’de muhafaza edilen stok kültürlerden hazırlanmıştır. Bunun için, stok kültür, oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra SC-Leu-S besiyeri kullanılarak çalkalamalı inkübatörde 30 °C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızı koşullarında yaklaşık 1 gece (11-14 saat) boyunca geliştirilmiştir (Şekil 42). Bu sürenin bitiminde inkübatörden alınan kültürler deneysel çalışmalar başlayana kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



**Şekil 42.** *S. cerevisiae* RS112 suşunun gecelik taze kültürünün hazırlanması

***S. cerevisiae* RS112 test suşu kullanılarak mutajenite deneyinin gerçekleştirilmesi**

Mutajenite çalışmalarına bir ön hazırlık niteliğinde olan “maya hücrelerinin uygulama konsantrasyonunun belirlenmesi” işlemi için ilk olarak maya test suşu YPAD besiyerinde Şekil 43’teki gibi canlandırılmıştır. Ardından maya hücreleri 15 mL hacmindeki SC-Leu-S besiyerinde 30 °C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızı koşullarında 1 gece boyunca çoğaltılarak bir çalışma kültürü oluşturulmuştur. İnkübasyon süresinin sonunda çalışma kültürünün yoğunluğu Thoma lamı kullanılarak belirlenmiş ve kültürün son konsantrasyonu SC-Leu-S besiyeriyle  $2 \times 10^7$  hücre/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Deney gruplarının hazırlanmasında 15 mL hacimli steril deney tüplerinin içine test maddelerinin 0,015-245,76 µM konsantrasyon aralığındaki sekiz farklı dozu eklenmiş ve son hacim SC-Leu besiyeri kullanılarak 4500 µL’ye tamamlanmıştır. Negatif kontrollerin hazırlanmasında deney tüpüne test maddesinin yerine aynı miktarda DMSO ilave edilmiştir. Pozitif kontrollerin hazırlanmasında ise mutajen, teratojen ve muhtemel karsinojen etkileri olduğu bilinen EMS bileşiği kullanılmıştır (Wood *et al.* 2010). Bu amaçla EMS’nin 100 µg/mL konsantrasyona sahip bir çözeltisi hazırlanmış ve pozitif kontrol olarak işaretli deney tüpüne bu çözeltiden eklenmiştir (Kirpnick *et al.* 2005). Son olarak hazırlanan tüm karışımların üzerine 500 µL dilüsyonu yapılmış maya kültüründen ilave edilmiştir. Tablo 17’de pozitif kontrol, negatif kontrol ve deney gruplarının hazırlanmasında kullanılan bileşen miktarları detaylı olarak ifade edilmiştir.



**Şekil 43.** Mutant *S. cerevisiae* RS112 suşunun YPAD besiyeri plağında 30 °C’de 3 günlük inkübasyon süresinin ardından canlandırılması

**Tablo 17.** Maya DEL Mutajenite Deneyinde Pozitif Kontrol, Negatif Kontrol ve Deney Gruplarının Hazırlanması

| Pozitif Kontrol Grubu               | Negatif Kontrol Grubu               | Deney Grubu                         |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 4400 µL SC-Leu-S besiyeri           | 4400 µL SC-Leu-S besiyeri           | 4400 µL SC-Leu-S besiyeri           |
| 100 µL 100 µg/mL EMS                | 100 µL DMSO                         | 100 µL test materyali solüsyonu     |
| 500 µL dilüe edilmiş maya solüsyonu | 500 µL dilüe edilmiş maya solüsyonu | 500 µL dilüe edilmiş maya solüsyonu |

Pozitif kontrol, negatif kontrol ve deney gruplarını içeren bu yeni kültürler 30 °C’de 150 rpm çalkalama hızında 16-18 saat boyunca gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kültürler 3200 x *g*’de 3 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüş ve ardından süpernatant uzaklaştırılarak 5 mL steril distile su içinde yeniden süspanse edilmiştir. Maya hücrelerinin yüzeylerinin iyice yıkanması amacıyla bu işlem en az üç kez tekrarlanmış olup son adımda kültürler 5 mL steril distile su içinde süspanse bir halde bırakılmıştır.

Süspanse haldeki kültürlerin yoğunluğu Thoma lamı kullanılarak belirlenmiştir. Ardından maya süspanسیونlarından 100 µL’lik hacimler alınarak, içerisinde 900 µL steril deiyonize su bulunan mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Bu şekilde kültürler 10<sup>-4</sup> yoğunluğuna kadar seyreltilmiştir. % Canlılık ve kromozom içi rekombinasyon oranlarının tespitinde mutant maya kültürleri için uygun dilüsyon miktarları sırasıyla 10<sup>-4</sup> ve 10<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Kromozomlar arası parça değişimi oranının tayininde ise kültürlerle herhangi bir dilüsyon işlemi uygulanmamıştır.

% Canlılık ve kromozom içi rekombinasyon oranlarının belirlenmesi amacıyla seyreltilmiş kültürlerden 100 µL’lik hacimler alınarak sırasıyla SCF ve SC-His besiyeri plaklarına steril Drigalski özeleri vasıtasıyla yayma ekimler yapılmıştır. Bununla birlikte

kromozomlar arası parça değişimi oranının tayininde dilüe edilmemiş kültürlerden alınan 100 µL'lik hacimler yayma ekim yöntemiyle SC-Ade besiyeri plaklarına inoküle edilmiştir. Hazırlanan yeni kültürler 30 °C'de 3 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda SCF, SC-His ve SC-Ade besiyerlerinde gözlenen koloni sayıları sırasıyla kültürlerin canlılık oranlarının, DEL rekombinasyon frekansının ve gen konversiyon frekansının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Kültürlerin canlılık oranlarının hesaplanması için inkübasyon sonrasında SCF besiyerinde gözlenen koloni sayısı, inokülasyon öncesinde Thoma lamıyla yapılan sayımda hesaplanan değere bölünmüştür. DEL rekombinasyon frekansının hesaplanması ise SC-His besiyerinde gözlenen koloni sayısının SCF besiyerinde gözlenen koloni sayısına bölünmesiyle yapılmıştır. Benzer şekilde, gen konversiyon frekansı da, SC-Ade besiyerinde gözlenen koloni sayısının SCF besiyerinde gözlenen koloni sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

#### **Maya DEL testi sonuçlarının değerlendirilmesi**

Mutajenite deneylerinden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amacıyla Mortelmans ve Zeiger tarafından ileri sürülen “standard plate incorporation” yöntemi kullanılmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000). Böylece her bir test maddesi için mutajenite deneylerinden elde edilen koloni sayım sonuçlarıyla aynı deneylerin negatif kontrol gruplarından alınan sonuçların kıyaslanması sonucunda % mutasyon oranları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar negatif kontrolle kıyaslandığı zaman doza bağlı olarak en az 2 kat artışın görüldüğü test maddesi dozları mutajenik olarak kabul edilmiştir (Evandri *et al.* 2005; Santos *et al.* 2008; Gulluce *et al.* 2010).

Sonuçlar ortalama  $\pm$  s.d. olarak ifade edilmiş olup birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama ve standart sapması çift plaklar/dozlar kullanılarak verilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farkları belirlemek için tek yönlü ANOVA ve post-hoc Tukey HSD testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık seviyesi  $P < 0,05$  olarak ayarlanmıştır (Gulluce *et al.* 2012).

## ARAŞTIRMA BULGULARI

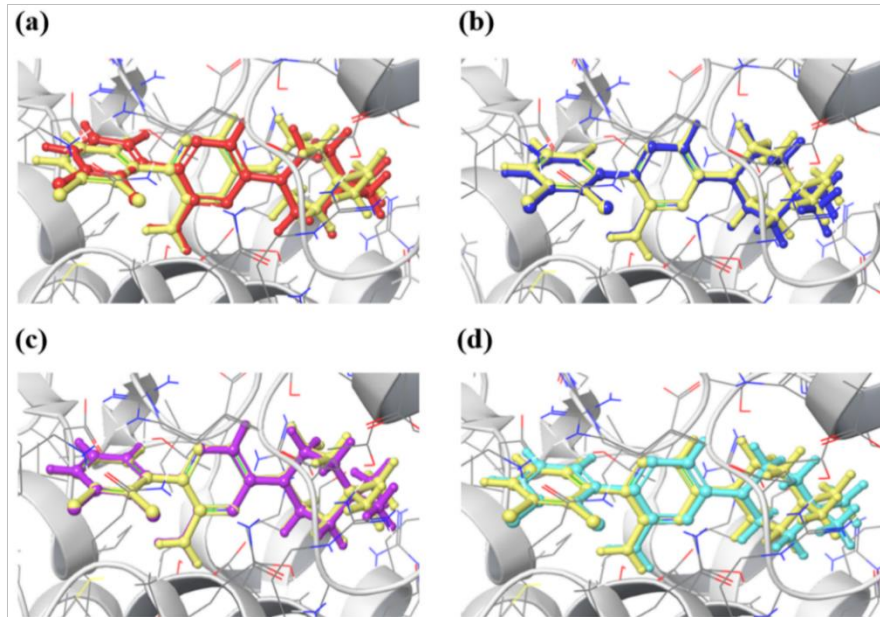
### Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Çalışmaları

#### Moleküler docking protokolünün validasyonu

Validasyon çalışması, SBVS çalışmalarında kullanılan hiyerarşik Glide docking protokolünün güvenilirliğini kontrol etmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, SHP-2 proteininin allosterik bölgesine önceden yerleştirilmiş olan SHP099 molekülünün biyoaktif konformasyonu kullanılmıştır. Bu molekülün biyoaktif konformasyonu ve sırayla Glide docking adımlarının uygulanmasından üretilen bağlanma pozları arasındaki fark RMSD hesaplamalarıyla ölçülmüştür (Tablo 18). Tablo 18'e bakıldığında, SHP-2'nin allosterik cebinde SHP099'a ait doğal bağlanma pozu ve Glide yeniden kenetlenme pozları arasındaki 3D süperpozisyonun neredeyse mükemmel şekilde olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 44) (Daoui *et al.* 2021).

**Tablo 18.** Ko-kristalize Ligant SHP099'un Doğal Bağlanma Pozu ve Glide Yeniden Kenetlenme Pozları Arasında Hesaplanan RMSD Değerleri (Reseptör: 5EHR)

| Kullanılan Glide Docking Yaklaşımı | HTVS | SP   | XP   | IFD  |
|------------------------------------|------|------|------|------|
| RMSD (Å)                           | 1,40 | 1,47 | 1,87 | 1,84 |



**Şekil 1.** SHP099'un farklı Glide docking yaklaşımlarından elde edilen yeniden kenetlenme pozlarının karşılaştırılması. (a) Glide/HTVS (doğal poz: sarı, yeniden kenetlenme pozu: kırmızı), (b) Glide/SP (doğal poz: sarı, yeniden kenetlenme pozu: mavi), (c) Glide/XP (doğal poz: sarı, yeniden kenetlenme pozu: mor), (d) Glide/Prime IFD (doğal poz: sarı, yeniden kenetlenme pozu: turkuaz)

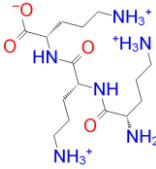
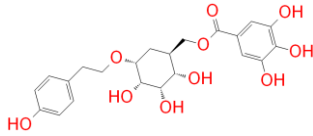
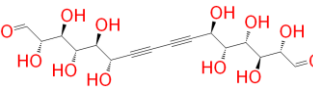
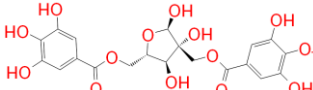
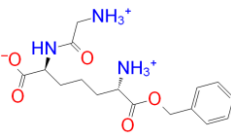
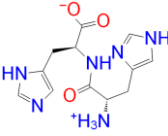
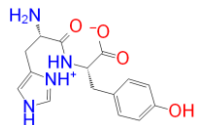
## Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları

SBVS çalışmaları için öncelikle NCI molekül veritabanında bulunan farklı kimyasal yapılara ve fonksiyonel gruplara sahip 265,242 adet bileşik kullanılarak bir sanal molekül kütüphanesi oluşturulmuştur. İçlerinden molekül ağırlığı 900 Da'nın üzerinde olanlar elenmiştir. Geriye kalan moleküllerin 3D yapıları, stereokimyasal ve tautomerik yapı farklılıkları göz önünde bulundurularak LigPrep modülüyle hazırlanmış ve bu sayede 297,830 adet ligant elde edilmiştir. Bu ligantların her birinin SHP-2 proteininin allosterik bağlanma bölgesine karşı afinitesi Schrödinger'deki Glide modülünde yer alan "ST iş akışı" protokolüyle ölçülmüştür (Friesner *et al.* 2004). Bu protokolde bulunan farklı moleküler docking yaklaşımlarında PDB kodu: 5EHR olan insan SHP-2<sup>WT</sup> X-ray yapısı kullanılmıştır. Böylece SBVS uygulamalarında 297,830 adet ligant SHP-2 enziminin allosterik bölgesine sırasıyla Glide/HTVS, Glide/SP, Glide/XP ve Glide/Prime IFD docking yaklaşımları kullanılarak kenetlenmiştir. Glide/HTVS, Glide/SP ve Glide/XP docking algoritmalarıyla en yüksek Glide docking skoruna sahip olduğu belirlenen moleküllerin sırasıyla %20, %20 ve %2'si ST çıktısı olarak alınmıştır. Glide/Prime IFD metodunda ise Glide/XP modülünden elde edilen 238 adet ligantın birinci ve ikinci sıradaki IFD docking pozları detaylı olarak incelenmiş ve daha sonra bu ligantların, SHP-2'nin allosterik bölgesindeki kritik amino asit rezidüleriyle kurdukları intermoleküler etkileşimler dikkate alınarak bir sonraki aşamada ligant yapısına dayalı olarak gerçekleştirilecek MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> analizleri için "28 adet hit molekül" seçilmiştir. Tablo 19'da seçilen bu moleküllerin NCI veritabanı kodları, 2D yapıları ve bir dizi Glide filtreleme yaklaşımından elde edilen docking skorları listelenmiştir. Tablo 19 incelendiğinde 28 adet hit liganta ait docking skorlarının Glide/HTVS, Glide/SP, Glide/XP ve Glide/Prime IFD protokolleri için sırasıyla -5,71 ila -8,83 kkal/mol, -6,93 ila -9,51 kkal/mol, -8,01 ila -12,29 kkal/mol ve -7,55 ila -17,39 kkal/mol değerleri arasında değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Ayrıca içlerinden 23 adet molekülün (yaklaşık %80'inin) Glide/Prime IFD docking skorunun, SHP099'unkine kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 19).

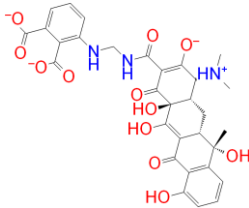
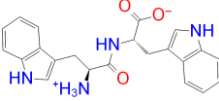
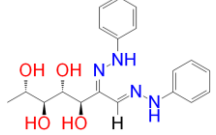
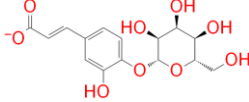
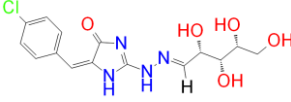
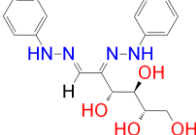
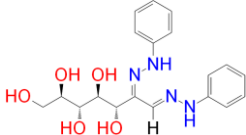
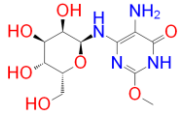
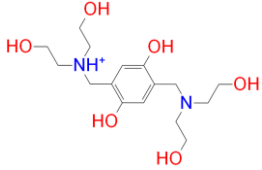
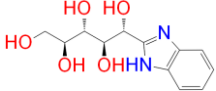
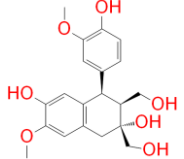
Ek olarak, moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları birbirinden farklı molekül yapılarına sahip 28 adet hit ligantın SHP-2'nin allosterik cebindeki çeşitli amino asit rezidüleriyle hidrojen bağ etkileşimi, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, katyon- $\pi$  ve  $\pi$ -istifleme etkileşimleri gibi moleküller arası bağlar oluşturabildiğini açıkça ortaya koymuştur (Tablo 20 ve Şekil 45). Tablo 20'den bu ligantların genel olarak Arg111, Phe113, Thr218, Thr219, Glu249, Glu250 ve Thr253 rezidüleriyle hidrojen bağ etkileşimi kurdukları görülmektedir. Bununla birlikte NSC152075, NSC203814, NSC685982, NSC43890, NSC523374, NSC374121, NSC524592, NSC115492, NSC108116, NSC201462, NSC284693

ve NSC94498 kodlu hit ligantların Arg111, Glu232, Glu249, Glu250 ve Lys492 rezidülerinden en az biriyle tuz köprüsü oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 20). Ayrıca içlerinden 17 hit ligant ile Phe113, Leu125, Leu233, Leu254 ve prolin-491 (Pro491) arasında hidrofobik etkileşimlere rastlanmıştır (Tablo 20). İlaveten NSC203814, NSC43890, NSC201462 ve NSC94498'in His114 ile birer adet; NSC77009, NSC374121, NSC524592 ve NSC201462'nin Arg111 ile birer adet; NSC121358'in Arg229 ile bir adet ve NSC116284'ün Arg229 ile iki adet katyon- $\pi$  etkileşimine sahip olduğu anlaşılmıştır (Tablo 20). NSC203814, NSC523374 ve NSC36404'ün ise His114 ile birer adet ve NSC201462'nin His114 ile iki adet  $\pi$ - $\pi$  etkileşimi kurduğu tespit edilmiştir (Tablo 20 ve Şekil 45).

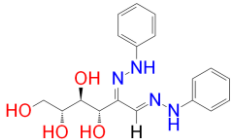
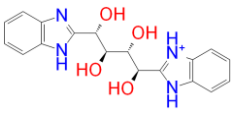
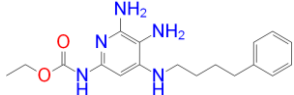
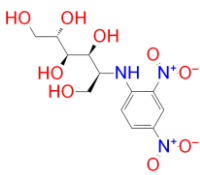
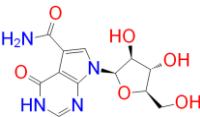
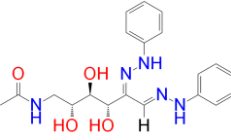
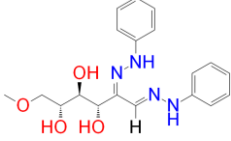
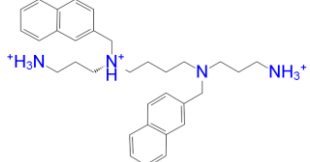
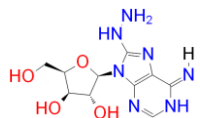
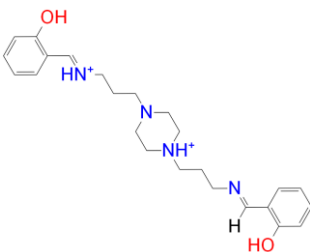
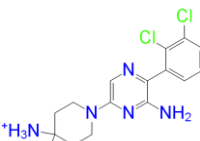
**Tablo 19.** Glide/Prime IFD Metoduyla SHP-2'nin Allosterik Cebindeki Kritik Amino Asit Rezidüleriyle Birinci veya İkinci Pozda Etkileştiği Belirlenen 28 Adet Hit Ligant ve SHP099'un 2D Temsilleri ve Glide Docking Sonuçları

| No. | Ligantın Veritabanı Kodu | 2D Moleküler Yapısı                                                                 | Glide Docking Skoru (kkal/mol) |       |        |                              |
|-----|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------|--------|------------------------------|
|     |                          |                                                                                     | HTVS                           | SP    | XP     | Glide/Prime IFD <sup>a</sup> |
| 1   | NSC152075                |   | -6,33                          | -7,22 | -10,92 | -17,39                       |
| 2   | NSC741644                |  | -5,96                          | -7,94 | -8,35  | -13,32                       |
| 3   | NSC331781                |  | -6,08                          | -7,08 | -12,29 | -13,11                       |
| 4   | NSC77009                 |  | -6,82                          | -7,24 | -10,44 | -12,89                       |
| 5   | NSC203814                |  | -6,21                          | -7,91 | -8,13  | -12,64                       |
| 6   | NSC523374                |  | -7,86                          | -7,60 | -8,47  | -12,31                       |
| 7   | NSC374121                |  | -7,15                          | -6,93 | -8,53  | -12,30                       |

**Table 19.** (devam)

|    |           |                                                                                     |       |       |        |        |
|----|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|--------|--------|
| 8  | NSC43890  |    | -6,40 | -7,67 | -8,67  | -11,79 |
| 9  | NSC524592 |    | -6,99 | -7,70 | -8,47  | -11,72 |
| 10 | NSC1962   |    | -7,07 | -7,81 | -8,25  | -11,67 |
| 11 | NSC115492 |    | -5,80 | -7,08 | -8,94  | -11,25 |
| 12 | NSC685284 |    | -6,70 | -7,22 | -8,31  | -11,16 |
| 13 | NSC121358 |   | -6,51 | -7,90 | -8,02  | -10,84 |
| 14 | NSC51254  |  | -7,18 | -8,26 | -10,93 | -10,70 |
| 15 | NSC624646 |  | -7,41 | -7,66 | -8,48  | -10,51 |
| 16 | NSC43000  |  | -7,10 | -7,40 | -8,63  | -10,48 |
| 17 | NSC56088  |  | -6,01 | -7,28 | -8,90  | -10,42 |
| 18 | NSC36404  |  | -6,98 | -6,96 | -8,02  | -10,25 |

**Tablo 19.** (devam)

|    |           |                                                                                     |       |       |       |        |
|----|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| 19 | NSC121361 |    | -6,88 | -7,20 | -8,90 | -10,11 |
| 20 | NSC201462 |    | -8,83 | -9,26 | -9,52 | -10,09 |
| 21 | NSC284693 |    | -6,27 | -7,48 | -8,66 | -10,00 |
| 22 | NSC108116 |    | -6,87 | -7,57 | -8,33 | -9,94  |
| 23 | NSC116284 |    | -7,98 | -8,10 | -8,02 | -9,74  |
| 24 | NSC170258 |   | -6,37 | -8,06 | -8,07 | -9,24  |
| 25 | NSC403483 |  | -5,71 | -7,70 | -8,48 | -9,21  |
| 26 | NSC685982 |  | -5,74 | -9,51 | -8,01 | -8,69  |
| 27 | NSC95945  |  | -6,39 | -8,17 | -8,02 | -8,02  |
| 28 | NSC94498  |  | -7,72 | -7,28 | -8,28 | -7,55  |
| -  | SHP099    |  | -8,03 | -8,89 | -6,80 | -9,59  |

<sup>a</sup>Tablodaki ligantların sıralaması, Glide/Prime IFD metoduyla hesaplanan docking skorlarının en yüksekten en düşüğe doğru olacak şekilde sıralanarak yerleştirilmesinden oluşturulmuştur.

**Tablo 20.** Moleküler Docking Çalışmalarının Son Aşamasında Glide/Prime IFD Metoduyla Seçilen 28 Hit Bileşik ve SHP099 İçin SHP-2'nin Allosterik Bağlanma Cebinde Tespit Edilen Protein-Ligant Etkileşimleri (Reseptör: 5EHR) (Turuncu Renkli Olanlar: Hit Bileşik ve SHP099 İçin Ortak Olan Etkileşimler, Mavi Renkli Olanlar: Hit Bileşik ve SHP099 İçin Farklı Olan Etkileşimler)

| No. | Ligantın Veritabanı Kodu | Hidrojen Bağ Etkileşimi (Liganta En Fazla 3 Å Mesafede Oluşan)             | Hidrojen Bağı Uzunluğu (Å)                               | Elektrostatik Etkileşimler (Tuz Köprüsü) | Tuz Köprüsünde Atomlar Arası Etkileşim Mesafesi (Å) | Hidrofobik Etkileşimler | Katyon- $\pi$ Etkileşimi | $\pi$ - $\pi$ Etkileşimi |
|-----|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1   | NSC152075                | Thr108<br>Arg111 (2 adet)<br>Phe113<br>Thr218<br>Thr219<br>Glu249 (2 adet) | 1,93<br>1,80, 2,10<br>2,00<br>2,27<br>2,34<br>1,80, 1,82 | Arg111<br>Glu249 (2 adet)<br>Glu250      | 2,91<br>2,82, 4,83<br>4,87                          | Phe113                  | -                        | -                        |
| 2   | NSC77009                 | Phe113 (2 adet)<br>His114<br>Arg229<br>Glu249<br>Glu250<br>Gln257          | 1,98, 2,10<br>2,07<br>2,49<br>1,66<br>1,88<br>2,18       | -                                        | -                                                   | -                       | Arg111                   | -                        |
| 3   | NSC741644                | Glu110<br>Arg111<br>Phe113<br>Glu232<br>Glu250<br>Pro491<br>Gln495         | 2,33<br>2,01<br>1,87<br>1,82<br>1,61<br>1,68<br>1,88     | -                                        | -                                                   | -                       | -                        | -                        |

Tablo 20. (devam)

|   |           |                 |            |                    |            |        |        |        |
|---|-----------|-----------------|------------|--------------------|------------|--------|--------|--------|
| 4 | NSC331781 | Arg111          | 2,00       | -                  | -          | Leu254 | -      | -      |
|   |           | Phe113 (2 adet) | 1,73, 2,08 |                    |            |        |        |        |
|   |           | Thr218 (2 adet) | 1,68, 2,31 |                    |            |        |        |        |
|   |           | Thr219          | 2,16       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Glu249          | 1,67       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Glu250          | 1,87       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Thr253          | 1,96       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Pro491          | 2,53       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Lys492          | 2,36       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Gln495          | 1,99       |                    |            |        |        |        |
| 5 | NSC203814 | Arg111          | 1,62       | Glu232             | 4,67       | Leu125 | His114 | His114 |
|   |           | Phe113          | 2,28       | Glu249             | 2,73       |        |        |        |
|   |           | Thr218 (2 adet) | 1,97, 2,10 | Glu250             | 2,81       |        |        |        |
|   |           | Glu249          | 1,71       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Glu250          | 1,80       |                    |            |        |        |        |
| 6 | NSC685982 | Glu110          | 2,60       | Glu249             | 2,77       | Leu125 | -      | -      |
|   |           | Phe113          | 1,73       | Glu250             | 4,99       |        |        |        |
|   |           | Glu249          | 1,75       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Glu250          | 2,26       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Thr253          | 2,55       |                    |            |        |        |        |
| 7 | NSC43890  | Arg111          | 1,68       | Arg111<br>(2 adet) | 2,68, 3,03 | -      | His114 | -      |
|   |           | Phe113          | 1,87       |                    |            |        |        |        |
|   |           | Glu250          | 2,38       | Lys492<br>(2 adet) | 4,49, 4,85 |        |        |        |
|   |           | Lys492          | 2,31       |                    |            |        |        |        |

**Tablo 20.** (devam)

|    |           |                 |                  |        |      |        |                    |        |
|----|-----------|-----------------|------------------|--------|------|--------|--------------------|--------|
| 8  | NSC523374 | Arg111 (3 adet) | 2,11, 2,14, 2,18 | Glu249 | 4,02 | Leu254 | -                  | His114 |
|    |           | Phe113          | 2,05             | Lys492 | 4,46 |        |                    |        |
|    |           | Thr218          | 2,09             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Thr219          | 2,41             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Glu250          | 2,20             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Lys492          | 2,19             |        |      |        |                    |        |
| 9  | NSC374121 | Glu110          | 2,20             | Glu249 | 2,78 | -      | Arg111             | -      |
|    |           | Arg111          | 2,19             | Glu250 | 5,00 |        |                    |        |
|    |           | Phe113          | 2,04             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Thr218          | 2,04             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Glu249          | 1,78             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Glu250          | 1,87             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Thr253          | 1,91             |        |      |        |                    |        |
| 10 | NSC116284 | Arg111 (3 adet) | 1,98, 2,06, 2,62 | -      | -    | -      | Arg229<br>(2 adet) | -      |
|    |           | Phe113          | 1,83             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Leu216          | 1,77             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Thr218          | 1,95             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Glu249          | 1,65             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Glu250          | 2,39             |        |      |        |                    |        |
| 11 | NSC524592 | Arg111 (2 adet) | 1,82, 2,02       | Arg111 | 2,90 | Leu254 | Arg111             | -      |
|    |           | Phe113          | 2,46             | Glu249 | 4,94 |        |                    |        |
|    |           | Thr218          | 1,65             |        |      |        |                    |        |
|    |           | Glu250          | 1,73             |        |      |        |                    |        |

Tablo 20. (devam)

|    |           |                 |                  |        |      |        |   |   |
|----|-----------|-----------------|------------------|--------|------|--------|---|---|
| 12 | NSC1962   | Glu110          | 1,89             | -      | -    | Pro491 | - | - |
|    |           | Arg111 (2 adet) | 1,84, 2,44       |        |      |        |   |   |
|    |           | Phe113          | 1,94             |        |      |        |   |   |
|    |           | Glu249          | 1,61             |        |      |        |   |   |
|    |           | Glu250          | 1,93             |        |      |        |   |   |
| 13 | NSC51254  | Arg111          | 2,47             | -      | -    | Leu233 | - | - |
|    |           | Phe113          | 1,77             |        |      | Pro491 |   |   |
|    |           | Thr218          | 1,90             |        |      |        |   |   |
|    |           | Glu249 (2 adet) | 1,80, 1,85       |        |      |        |   |   |
|    |           | Glu250          | 2,06             |        |      |        |   |   |
| 14 | NSC43000  | Arg111 (3 adet) | 2,26, 2,60, 2,73 | -      | -    | -      | - | - |
|    |           | Phe113          | 2,24             |        |      |        |   |   |
|    |           | His114          | 1,98             |        |      |        |   |   |
|    |           | Asn217          | 2,80             |        |      |        |   |   |
|    |           | Thr218 (2 adet) | 1,92, 2,23       |        |      |        |   |   |
|    |           | Thr219          | 1,91             |        |      |        |   |   |
|    |           | Glu250          | 2,10             |        |      |        |   |   |
|    |           | Lys260          | 2,31             |        |      |        |   |   |
| 15 | NSC115492 | Thr108          | 1,69             | Lys492 | 2,77 | -      | - | - |
|    |           | Arg111          | 1,79             |        |      |        |   |   |
|    |           | Phe113          | 2,03             |        |      |        |   |   |
|    |           | Glu250          | 2,03             |        |      |        |   |   |
|    |           | Lys492          | 1,82             |        |      |        |   |   |

**Tablo 20.** (devam)

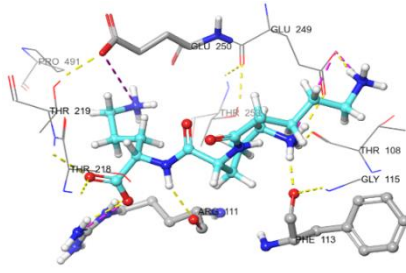
|    |           |                 |                  |   |   |        |        |   |
|----|-----------|-----------------|------------------|---|---|--------|--------|---|
| 16 | NSC685284 | Arg111          | 1,93             | - | - | -      | -      | - |
|    |           | Phe113 (3 adet) | 1,61, 1,82, 2,02 |   |   |        |        |   |
|    |           | His114          | 2,36             |   |   |        |        |   |
|    |           | Glu250          | 2,17             |   |   |        |        |   |
|    |           | Thr253          | 1,97             |   |   |        |        |   |
| 17 | NSC121358 | Arg111          | 2,25             | - | - | Leu254 | Arg229 | - |
|    |           | Phe113          | 1,95             |   |   |        |        |   |
|    |           | Thr218          | 2,10             |   |   |        |        |   |
|    |           | Glu250          | 2,27             |   |   |        |        |   |
| 18 | NSC624646 | Arg111 (3 adet) | 1,98, 2,05, 2,26 | - | - | -      | -      | - |
|    |           | Phe113          | 1,86             |   |   |        |        |   |
|    |           | Leu216          | 2,27             |   |   |        |        |   |
|    |           | Thr218          | 1,84             |   |   |        |        |   |
|    |           | Glu249 (2 adet) | 1,96, 2,02       |   |   |        |        |   |
|    |           | Glu250          | 1,69             |   |   |        |        |   |
|    |           | Lys492          | 2,26             |   |   |        |        |   |
| 19 | NSC121361 | Thr108          | 1,90             | - | - | Leu254 | -      | - |
|    |           | Arg111          | 1,96             |   |   | Pro491 |        |   |
|    |           | Phe113          | 2,59             |   |   |        |        |   |
|    |           | Thr218          | 1,90             |   |   |        |        |   |
|    |           | Thr219          | 2,30             |   |   |        |        |   |
|    |           | Glu250          | 1,99             |   |   |        |        |   |
|    |           | Thr253          | 2,11             |   |   |        |        |   |
| 20 | NSC56088  | Arg111 (3 adet) | 1,81, 2,01, 2,16 | - | - | Phe113 | -      | - |
|    |           | Phe113          | 1,65             |   |   |        |        |   |
|    |           | Thr218          | 1,81             |   |   |        |        |   |

**Tablo 20.** (devam)

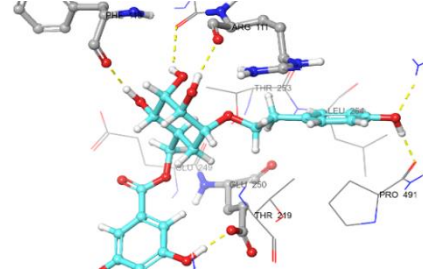
|    |           |                 |            |        |      |        |        |                    |
|----|-----------|-----------------|------------|--------|------|--------|--------|--------------------|
| 21 | NSC108116 | Glu110          | 1,87       | Arg111 | 4,99 | Leu254 | -      | -                  |
|    |           | Phe113          | 1,85       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Thr218          | 1,99       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Glu250          | 1,59       |        |      |        |        |                    |
| 22 | NSC201462 | Arg111          | 2,79       | Glu249 | 2,75 | -      | Arg111 | His114<br>(2 adet) |
|    |           | Phe113          | 1,78       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Thr219          | 1,88       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Glu249          | 1,74       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Glu250          | 1,79       |        |      |        |        |                    |
| 23 | NSC95945  | Arg111 (2 adet) | 1,91, 1,91 | -      | -    | Pro491 | -      | -                  |
|    |           | Phe113          | 1,82       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Leu216          | 1,92       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Thr218          | 2,21       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Glu250          | 2,06       |        |      |        |        |                    |
| 24 | NSC403483 | Arg111          | 1,68       | -      | -    | Leu254 | -      | -                  |
|    |           | Phe113          | 1,89       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Thr219          | 1,89       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Glu250          | 2,18       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Thr253          | 2,11       |        |      |        |        |                    |
| 25 | NSC284693 | Arg111 (2 adet) | 2,00, 2,04 | Glu249 | 3,63 | -      | -      | -                  |
|    |           | Phe113 (2 adet) | 1,83, 2,11 |        |      |        |        |                    |
|    |           | Glu249          | 1,71       |        |      |        |        |                    |
|    |           | Glu250          | 2,01       |        |      |        |        |                    |

Tablo 20. (devam)

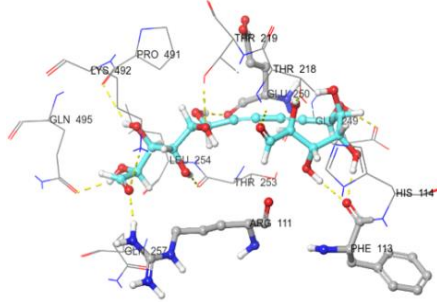
|    |           |                 |            |        |      |        |        |        |
|----|-----------|-----------------|------------|--------|------|--------|--------|--------|
| 26 | NSC170258 | Thr108          | 2,33       | -      | -    | Leu254 | -      | -      |
|    |           | Arg111          | 1,99       |        |      | Pro491 |        |        |
|    |           | Phe113          | 2,02       |        |      |        |        |        |
|    |           | Thr218          | 2,31       |        |      |        |        |        |
|    |           | Glu250          | 2,15       |        |      |        |        |        |
|    |           | Thr253          | 1,67       |        |      |        |        |        |
| 27 | NSC36404  | Glu110          | 1,94       | -      | -    | Leu233 | -      | His114 |
|    |           | Arg111          | 1,90       |        |      |        |        |        |
|    |           | Phe113          | 1,75       |        |      |        |        |        |
|    |           | Gly115          | 2,12       |        |      |        |        |        |
|    |           | Glu250          | 1,84       |        |      |        |        |        |
|    |           | Thr253          | 2,03       |        |      |        |        |        |
| 28 | NSC94498  | Arg111          | 2,00       | Glu249 | 4,14 | Leu254 | His114 | -      |
|    |           | Phe113          | 2,18       |        |      |        |        |        |
|    |           | Glu249 (2 adet) | 1,62, 2,19 |        |      |        |        |        |
|    |           | Glu250          | 1,83       |        |      |        |        |        |
| -  | SHP099    | Thr108          | 2,49       | Glu249 | 2,66 | -      | Arg111 | -      |
|    |           | Arg111          | 2,24       |        |      |        | His114 |        |
|    |           | Phe113          | 2,16       |        |      |        |        |        |
|    |           | Glu249          | 1,63       |        |      |        |        |        |
|    |           | Glu250          | 1,95       |        |      |        |        |        |



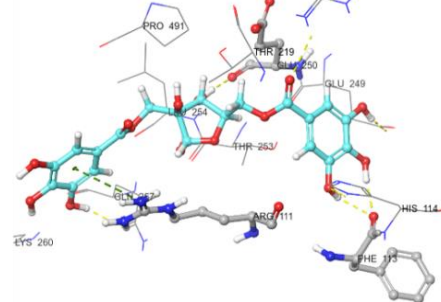
**NSC152075**



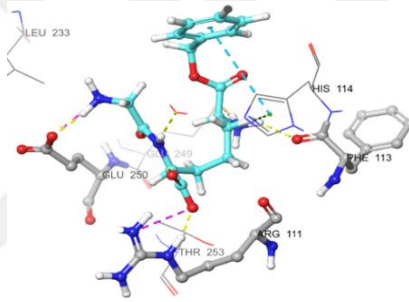
**NSC741644**



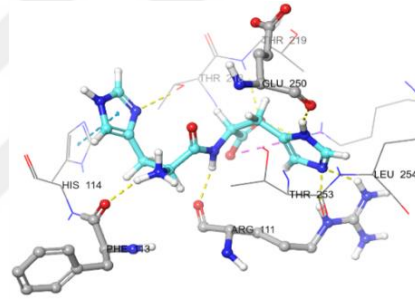
**NSC331781**



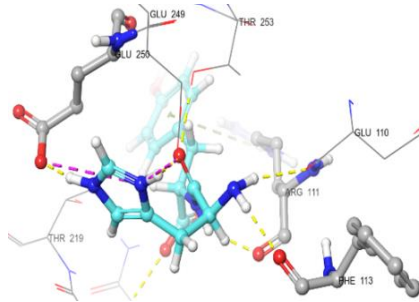
**NSC77009**



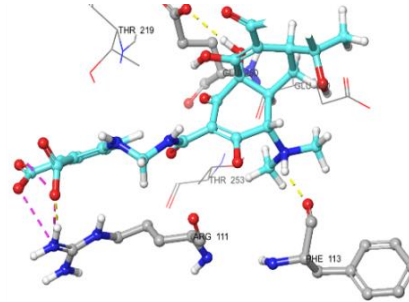
**NSC203814**



**NSC523374**

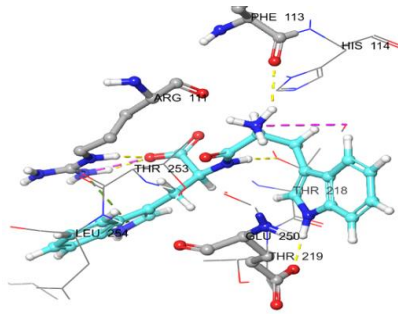


**NSC374121**

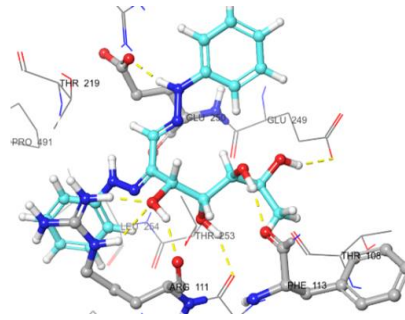


**NSC43890**

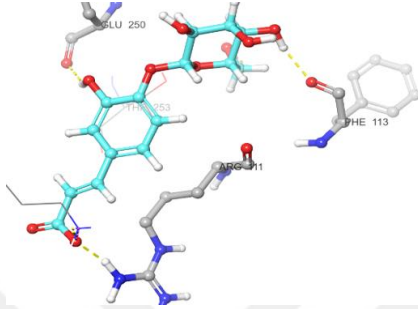
**Şekil 45.** Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları sonucunda tasarlanmış olan 28 adet hit bileşik için SHP-2'nin (5EHR.pdb) allosterik bölgesinde gözlemlenen protein-ligant etkileşimlerine ait 3D diyagramlar (Tüm ligantlar çubuk modeller olarak turkuaz renkte gösterilmiştir. Hidrojen bağları sarı, elektrostatik etkileşimler mor, katyon- $\pi$  ve  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri ise sırasıyla yeşil ve mor kesikli çizgilerle ifade edilmiştir.) (devam)



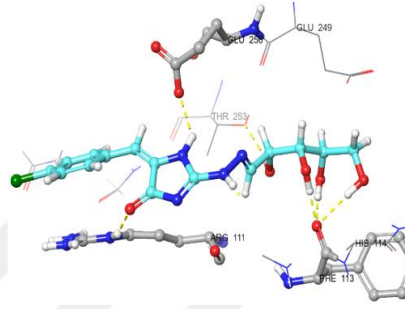
**NSC524592**



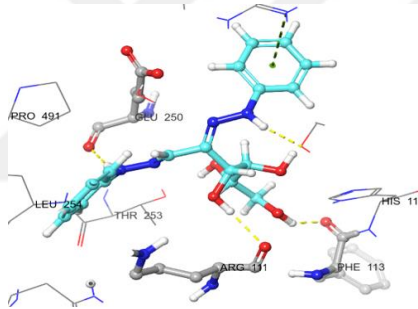
**NSC1962**



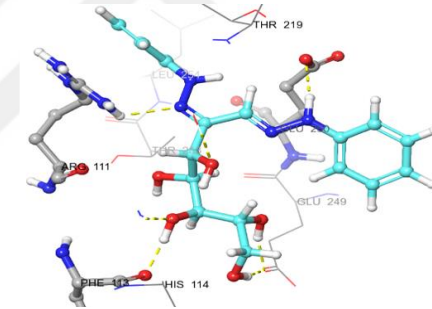
**NSC115492**



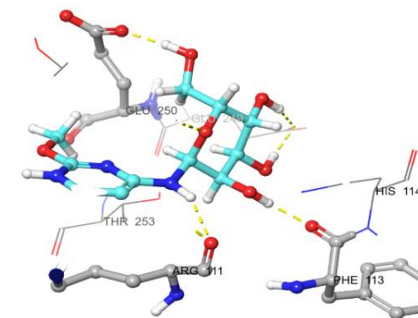
**NSC685284**



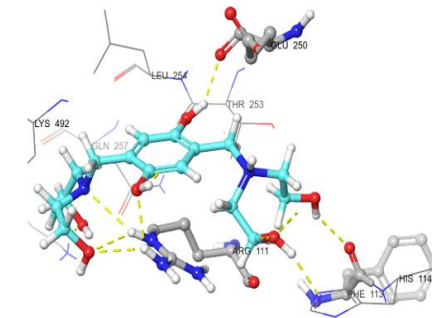
**NSC121358**



**NSC51254**

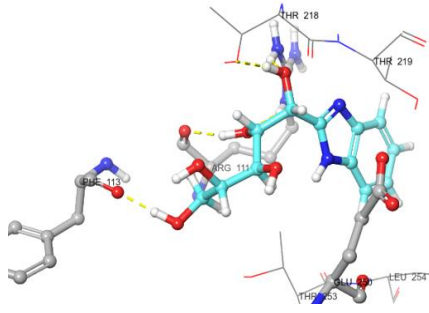


**NSC624646**

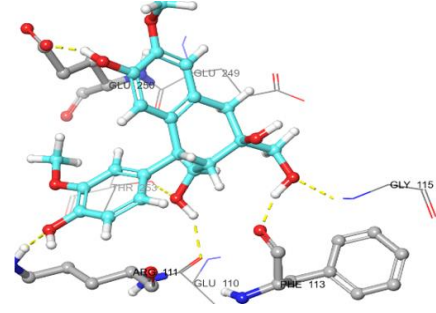


**NSC43000**

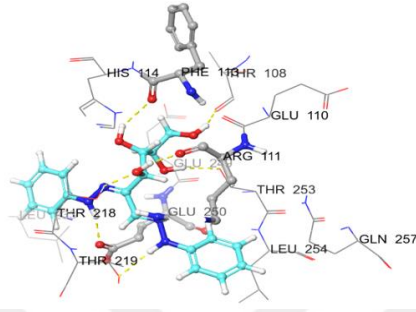
**Şekil 45.** Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları sonucunda tasarlanmış olan 28 adet hit bileşik için SHP-2'nin (5EHR.pdb) allosterik bölgesinde gözlemlenen protein-ligant etkileşimlerine ait 3D diyagramlar (Tüm ligantlar çubuk modeller olarak turkuaz renkte gösterilmiştir. Hidrojen bağları sarı, elektrostatik etkileşimler mor, katyon- $\pi$  ve  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri ise sırasıyla yeşil ve mor kesikli çizgilerle ifade edilmiştir.) (devam)



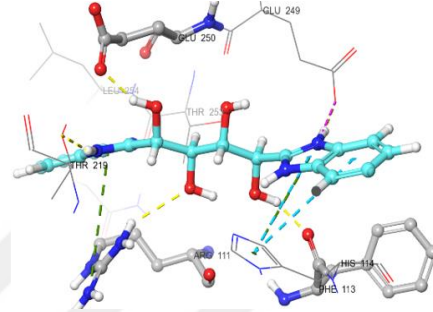
**NSC56088**



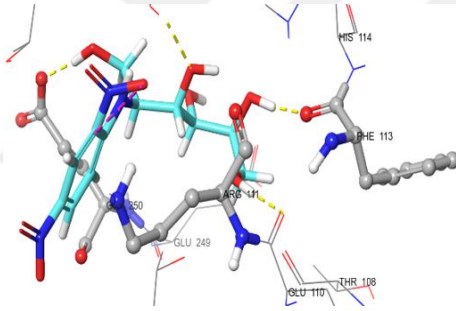
**NSC36404**



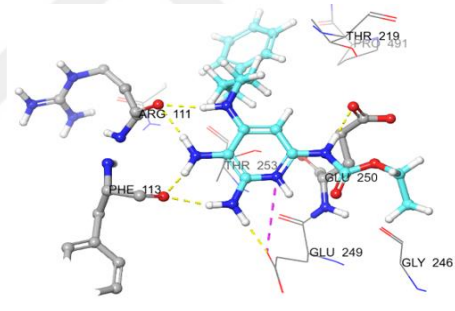
**NSC121361**



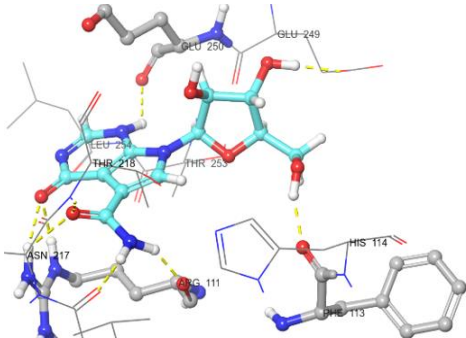
**NSC201462**



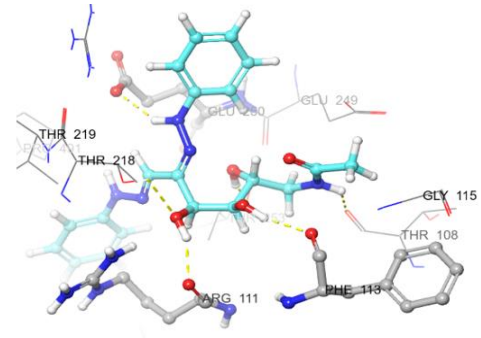
**NSC284693**



**NSC108116**

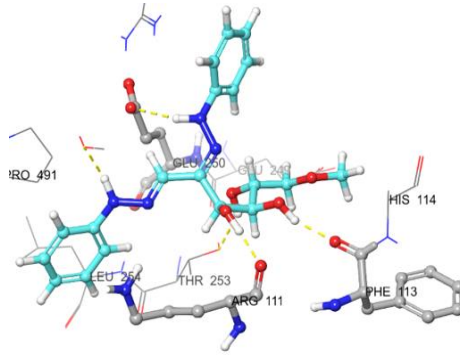


**NSC116284**

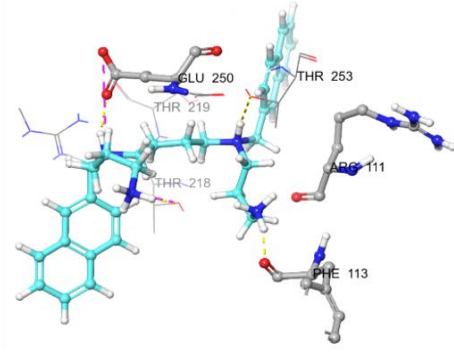


**NSC170258**

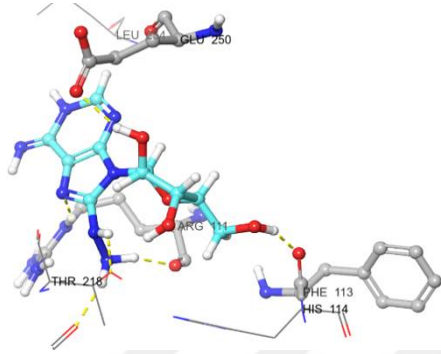
**Şekil 45.** Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları sonucunda tasarlanmış olan 28 adet hit bileşik için SHP-2'nin (5EHR.pdb) allosterik bölgesinde gözlemlenen protein-ligant etkileşimlerine ait 3D diyagramlar (Tüm ligantlar çubuk modeller olarak turkuaz renkte gösterilmiştir. Hidrojen bağları sarı, elektrostatik etkileşimler mor, katyon- $\pi$  ve  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri ise sırasıyla yeşil ve mor kesikli çizgilerle ifade edilmiştir.) (devam)



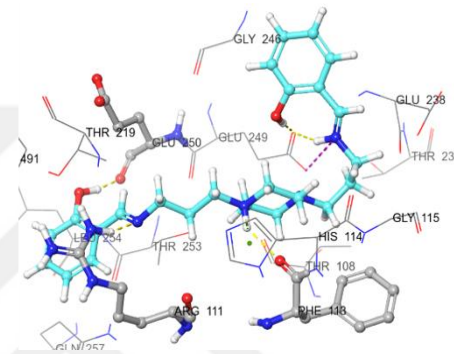
**NSC403483**



**NSC685982**



**NSC94498**

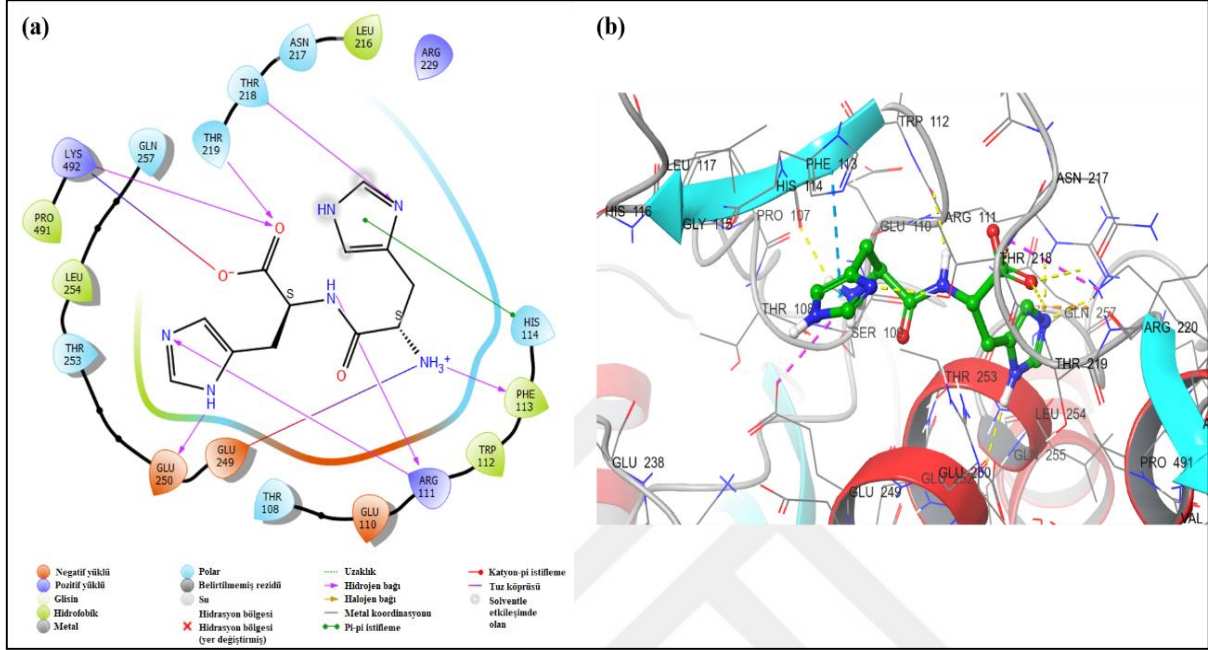


**NSC95945**

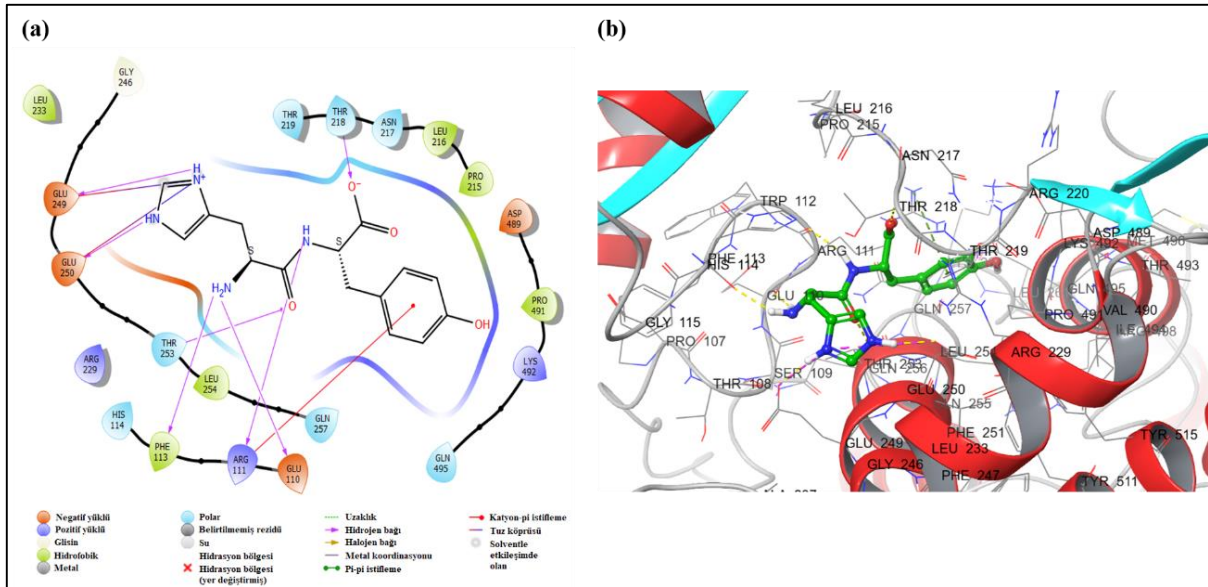
**Şekil 45.** Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları sonucunda tasarlanmış olan 28 adet hit bileşik için SHP-2'nin (5EHR.pdb) allosterik bölgesinde gözlemlenen protein-ligant etkileşimlerine ait 3D diyagramlar (Tüm ligantlar çubuk modeller olarak turkuaz renkte gösterilmiştir. Hidrojen bağları sarı, elektrostatik etkileşimler mor, katyon- $\pi$  ve  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri ise sırasıyla yeşil ve mor kesikli çizgilerle ifade edilmiştir.)

Bu çalışmada final hit moleküllerin seçilimi için (i) moleküler docking çalışmalarında Glide/Prime IFD docking skorunun SHP099'unkinden daha yüksek olması, (ii) moleküler docking etkileşim analizlerinde SHP-2 ile kurduğu intermoleküler etkileşimlerin SHP099'unkine benzer olması ve aynı zamanda benzer etkileşimlerin yanı sıra farklı birtakım etkileşimlere de sahip olması, (iii) MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> platformunda yapılan *in silico* analizlerde ilaç benzerlik özelliklerinin uygun bulunması, potansiyel kanser terapötik aktivitesinin mevcut olması ve toksik etkisinin/etkilerinin hiç bulunmaması ya da nispeten az bulunması, (iv) MD simülasyonları sonucunda SHP-2'nin allosterik bağlanma bölgesinde stabil olarak kalabildiğinin tespit edilmesi, (v) MM/PBSA hesaplamalarının ardından SHP-2 enzime bağlanma enerjisinin negatif değerde olması, (vi) satın alınabilirlik beklentisini karşılaması ve (vii) doğal ürün olması olmak üzere altı adet strateji göz önünde bulundurulmuştur. Buna göre NSC523374, NSC374121 ve NSC524592 kodlu ligantlar *in vitro* koşullarda biyoaktiviteleri araştırılmak üzere “final hit ligantlar” olarak belirlenmiştir.

Şekil 46a, 47a, 48a ve 49a’da sırasıyla NSC523374, NSC374121, NSC524592 ve SHP099 için Glide/Prime IFD metoduyla oluşturulan 2D protein-ligant etkileşimleri görülmektedir. Bununla birlikte NSC523374, NSC374121, NSC524592 ve SHP099 için SHP-2’nin allosterik bölgesindeki olası bağlanma modları sırasıyla Şekil 46b, 47b, 48b ve 49b’den gözlemlenebilmektedir.



**Şekil 46.** SHP-2’nin allosterik bölgesine bağlı olan NSC523374’ün yapısı. (a) SHP-2 (PDB kodu: 5EHR) ve NSC523374 kodlu ligant arasındaki 2D etkileşim diyagramı, (b) Glide/Prime IFD docking yaklaşımıyla SHP-2’nin allosterik cebinde NSC523374 için önerilen 3D bağlanma konformasyonu



**Şekil 47.** SHP-2’nin allosterik bölgesine bağlı olan NSC374121’in yapısı. (a) SHP-2 (PDB kodu: 5EHR) ve NSC374121 kodlu ligant arasındaki 2D etkileşim diyagramı, (b) Glide/Prime IFD docking yaklaşımıyla SHP-2’nin allosterik cebinde NSC374121 için önerilen 3D bağlanma konformasyonu



ise Arg111 (1,82, 2,02 Å), Phe113 (2,46 Å) ve Glu250 (1,73 Å) kalıntılarıyla hidrojen bağ etkileşimleri, Glu249 (4,94 Å) ile tuz köprüsü etkileşimi ve Arg111 ile katyon- $\pi$  etkileşimi (Tablo 20 ve Şekil 45, 48a) kurduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar NSC523374, NSC374121 ve NSC524592'nin SHP099 ile sırasıyla dört, altı ve beş adet ortak etkileşime sahip olduğunu göstermektedir.

Öte yandan SHP-2'nin allosterik bölgesinde, SHP099'dan farklı olarak, NSC523374'ün Thr218 (2,09 Å), Thr219 (2,41 Å) ve Lys492 (2,19 Å) kalıntılarıyla hidrojen bağ etkileşimleri, Lys492 (4,46 Å) ile tuz köprüsü etkileşimi, Leu254 ile hidrofobik etkileşimler ve His114 ile  $\pi$ -istifleme etkileşimleri (Tablo 20 ve Şekil 45, 46a); NSC374121'ün Glu110 (2,20 Å), Thr218 (2,04 Å) ve Thr253 (1,91 Å) hidrojen bağ etkileşimleri ve Glu250 (5,00 Å) ile tuz köprüsü etkileşimi (Tablo 20 ve Şekil 45, 47a); NSC524592'nin Thr218 (1,65 Å) ile hidrojen bağ etkileşimi, Arg111 (2,90 Å) ile tuz köprüsü ve katyon- $\pi$  etkileşimleri (Tablo 20 ve Şekil 45, 48a) meydana getirdiği saptanmıştır. Böylece NSC523374, NSC374121 ve NSC524592'nin SHP-2'ye bağlanmasında SHP099'a kıyasla sırasıyla altı, dört ve üç farklı etkileşim gözlemlenmiştir.

### **MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> uygulamaları**

Glide ile moleküler kenetlenme çalışmaları sonucunda SHP-2 proteinine bağlanma potansiyeli yüksek bulunan 28 adet hit bileşikle ligant temelli ilaç tasarım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Analizlerde MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> isimli internet sunucusundan faydalanılmış ve bileşiklerin olası kanser terapötik aktivite değerlerinin yanı sıra toksisite profilleri tahmin edilerek ve ilaç olma özellikleri hesaplanarak çalışılan bileşik kümesinin daraltılması amaçlanmıştır.

İlk olarak ikili QSAR modelleri sayesinde kanser terapötik aktivitesinin taranmasına olanak sağlayan bir yaklaşım kullanılarak 28 hit ligant için potansiyel kanser terapötik aktivite değerleri tahmin edilmiştir. Bunun sonucunda NSC77009, NSC741644, NSC203814, NSC43000, NSC115492 ve NSC284693 kodlu hit ligantların tahmini hesaplanan kanser terapötik aktivite değerinin 0,5'in altında olduğu belirlenmiştir (veriler gösterilmemiştir). Bir sonraki aşamada, geriye kalan 22 adet hit ligant olası toksik etkilerinin tanımlanması amacıyla toksisite tarama çalışmalarına yönlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 21'de sunulmuştur. Buna göre 6 adet hit molekülün (NSC152075, NSC94498, NSC523374, NSC374121, NSC524592 ve NSC685284) toksik etkilerinin diğerlerine nazaran daha az olabileceği tespit edilmiştir (Tablo 21). Ayrıca MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> analizlerinde bu 6 hit molekül ve SHP099'a ait hesaplanan ilaç olma özellikleri Tablo 22'deki gibidir.

## MD simülasyonları

MD simülasyon çalışmalarında protein-ligant komplekslerinin zamana bağlı değişikliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla SHP-2'ye karşı güçlü bir bağlanma afinitesine sahip olan ve kanser için potansiyel terapötik aday özelliği gösteren NSC152075, NSC94498, NSC523374, NSC374121, NSC524592 ve NSC685284 kodlu hit ligantlar 50 ns uzunluğundaki MD simülasyonlarına tabii tutulmuştur. GROMACS paket programıyla gerçekleştirilen simülasyon çalışmalarında, ligant bağlı (holo) ve ligant içermeyen (apo) SHP-2 proteinindeki yapısal farklılıklar ve dinamik hareketler incelenmiştir.

Bu 6 hit liganta ait en iyi IFD pozları MD simülasyonları için başlangıç noktası olarak kullanılmıştır. Proteinin (ve varsa ligantların) hareketlerinin zamana göre nicel olarak analizi için simülasyon trajektorileri elde edildikten sonra bu elemanlar sistemden izole edilmiştir. Trajektori üzerinde yapılan ilk analiz protein omurgasının alfa karbon ( $C\alpha$ ) atomlarının başlangıç koordinatlarına göre RMSD hesaplamalarıdır. RMSD, iki statik yapı arasındaki uzamsal fark olarak tanımlanmakta ve Eşitlik 17'de ifade edilen matematiksel formülle hesaplanmaktadır.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i^X - r_i^Y)^2} \quad (\text{Eşitlik 17})$$

Eşitlik 17'de  $N$  atom sayısını,  $i$  mevcut atomu,  $r^X$  hedef yapıyı ve  $r^Y$  ise referans yapıyı belirtmektedir. RMSD hesaplamaları her bir simülasyonun önceden tanımlanmış başlangıç noktasıyla sonraki tüm görüntüleri arasında gerçekleştirilmiştir. Toplam sapmayı en aza indirmek için hesaplamalardan önce hedef ve referans yapılar hizalanmıştır (Knapp *et al.* 2011). Elde edilen RMSD grafikleri SHP-2 enziminin hem apo hem de holo formlarındaki hareketini daha net bir şekilde anlamak amacıyla Şekil 50'de bulunan tek bir grafik üzerinde gösterilmiştir. Bu grafikteki değerler nm cinsinden hesaplanmıştır ve atom tiplerine bağlı olarak proteindeki  $C\alpha$  atomlarının göreceli hareketini ifade etmektedir.

**Tablo 21.** 22 Adet Hit Ligant ve SHP099 İçin MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> Platformunda Üretilen Tahmini Kanser Terapötik Aktivite ve Toksisite Değerleri Tablosu (Yeşil Renkli Olanlar: Nontoksik/Kanser Terapötik Aktivite Potansiyeli Var, Kırmızı Renkli Olanlar: Toksik/Kanser Terapötik Aktivite Potansiyeli Yok)

| Ligantın Veritabanı Kodu                        | NSC152075     | NSC331781    | NSC685982     | NSC43890      | NSC523374    | NSC374121     | NSC116284    | NSC524592     |
|-------------------------------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| Tahmini Kanser Terapötik Aktivite Değeri (TP)   | 0,80 (72,64)  | 0,83 (46,00) | 0,77 (70,67)  | 0,77 (56,80)  | 0,85 (50,00) | 0,60 (59,83)  | 0,77 (60,13) | 0,71 (62,44)  |
| Toksik Etki Türü                                |               |              |               |               |              |               |              |               |
| Akciğer Toksisitesi (TP)                        | 0,12 (54,12)  | 0,38 (40,40) | 0,41 (44,76)  | 0,07 (44,94)  | 0,11 (60,80) | 0,06 (72,96)  | 0,24 (55,48) | 0,05 (62,44)  |
| AMES Toksisitesi (TP)                           | 0,28 (56,25)  | 0,67 (36,78) | 0,37 (77,61)  | 0,19 (42,92)  | 0,29 (41,14) | 0,33 (46,67)  | 0,56 (49,54) | 0,21 (46,23)  |
| Anemi (TP)                                      | 0,47 (66,33)  | 0,51 (37,29) | 0,51 (58,89)  | 0,54 (74,53)  | 0,38 (52,38) | 0,24 (50,67)  | 0,19 (50,00) | 0,33 (46,05)  |
| Böbreklerde Kilo Kazancı (TP)                   | 0,37 (59,14)  | 0,78 (36,28) | 0,29 (56,79)  | 0,13 (83,33)  | 0,36 (43,56) | 0,18 (47,06)  | 0,59 (51,25) | 0,13 (70,98)  |
| Böbrek Nekrozu (TP)                             | 0,41 (56,20)  | 0,90 (31,01) | 0,06 (41,82)  | 0,22 (42,35)  | 0,56 (43,21) | 0,19 (46,34)  | 0,41 (55,48) | 0,13 (55,42)  |
| Deri Hassasiyeti, EC3 (TP)                      | 26,30 (46,15) | 5,39 (32,43) | 24,10 (31,65) | 17,31 (25,33) | 9,07 (25,24) | 15,22 (35,78) | 9,83 (27,98) | 31,89 (54,40) |
| Dişi Farelerde Karsinojenite (TP)               | 0,21 (81,25)  | 0,42 (35,23) | 0,20 (60,82)  | 0,02 (55,85)  | 0,36 (60,80) | 0,27 (72,96)  | 0,33 (55,30) | 0,15 (76,77)  |
| Dişi Sıçanlarda Karsinojenite (TP)              | 0,18 (81,25)  | 0,57 (35,23) | 0,34 (60,82)  | 0,04 (44,97)  | 0,36 (60,80) | 0,07 (72,96)  | 0,18 (57,93) | 0,06 (76,77)  |
| Erkek Farelerde Karsinojenite (TP)              | 0,30 (81,25)  | 0,50 (34,38) | 0,24 (60,82)  | 0,03 (55,85)  | 0,44 (60,80) | 0,26 (72,96)  | 0,22 (54,31) | 0,23 (76,77)  |
| Erkek Sıçanlarda Karsinojenite (TP)             | 0,38 (72,64)  | 0,51 (35,23) | 0,39 (58,56)  | 0,03 (44,97)  | 0,46 (60,80) | 0,12 (72,96)  | 0,23 (57,93) | 0,04 (76,77)  |
| Epididim Toksisitesi (TP)                       | 0,29 (53,73)  | 0,60 (35,23) | 0,17 (60,82)  | 0,45 (55,81)  | 0,24 (51,57) | 0,21 (57,58)  | 0,24 (50,93) | 0,14 (62,80)  |
| Genotoksisite (TP)                              | 0,52 (64,04)  | 0,56 (34,38) | 0,46 (63,38)  | 0,14 (43,93)  | 0,56 (60,80) | 0,36 (72,96)  | 0,40 (55,30) | 0,30 (76,77)  |
| Hepatotoksisite (TP)                            | 0,32 (84,62)  | 0,36 (48,00) | 0,14 (70,67)  | 0,31 (83,33)  | 0,35 (64,29) | 0,20 (76,68)  | 0,31 (55,48) | 0,15 (70,98)  |
| Karaciğerde Kilo Kazancı (TP)                   | 0,56 (46,55)  | 1,00 (40,70) | 0,57 (50,45)  | 0,15 (81,28)  | 0,56 (48,44) | 0,39 (57,71)  | 0,37 (48,33) | 0,45 (55,27)  |
| Karaciğer Kolestazı (TP)                        | 0,25 (66,33)  | 0,65 (28,75) | 0,53 (50,00)  | 0,25 (78,20)  | 0,19 (50,30) | 0,22 (54,29)  | 0,53 (48,33) | 0,16 (55,42)  |
| Karaciğer Nekrozu (TP)                          | 0,53 (47,55)  | 0,98 (31,01) | 0,71 (52,38)  | 0,28 (42,92)  | 0,60 (36,49) | 0,48 (47,90)  | 0,82 (55,92) | 0,66 (54,10)  |
| Karaciğerde Lipid Birikimi (TP)                 | 0,30 (40,00)  | 0,64 (40,70) | 0,61 (56,79)  | 0,51 (83,33)  | 0,31 (56,95) | 0,35 (61,64)  | 0,48 (55,48) | 0,38 (70,98)  |
| Kardiyotoksisite (TP)                           | 0,18 (56,20)  | 0,89 (28,57) | 0,71 (41,35)  | 0,13 (40,42)  | 0,14 (40,43) | 0,15 (36,07)  | 0,92 (55,48) | 0,13 (47,45)  |
| Karsinojenite (TP)                              | 0,46 (81,25)  | 0,65 (35,23) | 0,24 (77,61)  | 0,05 (55,85)  | 0,58 (60,80) | 0,23 (72,96)  | 0,26 (57,93) | 0,12 (81,36)  |
| MRTD (TP)                                       | 0,99 (78,35)  | 1,04 (35,71) | 0,18 (56,79)  | 0,26 (83,33)  | 1,22 (65,67) | 0,20 (53,50)  | 1,07 (55,48) | 0,14 (54,40)  |
| Nazal Patoloji (TP)                             | 0,19 (65,18)  | 0,37 (26,89) | 0,63 (60,82)  | 0,52 (44,31)  | 0,06 (64,13) | 0,08 (55,07)  | 0,64 (35,37) | 0,05 (48,86)  |
| Nefron Hasarı (TP)                              | 0,34 (56,20)  | 0,93 (34,65) | 0,18 (44,76)  | 0,18 (81,28)  | 0,28 (55,42) | 0,28 (61,99)  | 0,40 (55,19) | 0,26 (55,66)  |
| Nefrotoksisite (TP)                             | 0,48 (69,70)  | 0,79 (36,28) | 0,06 (56,12)  | 0,42 (83,33)  | 0,43 (55,42) | 0,18 (61,99)  | 0,36 (60,66) | 0,27 (59,66)  |
| Nörotoksisite (TP)                              | 0,46 (44,74)  | 0,46 (26,27) | 0,34 (44,35)  | 0,03 (42,59)  | 0,57 (56,95) | 0,26 (59,74)  | 0,28 (51,47) | 0,16 (68,78)  |
| Sitotoksisite Modeli, -logGI <sub>50</sub> (TP) | 4,33 (65,43)  | 4,48 (48,68) | 5,00 (57,14)  | 6,52 (75,36)  | 4,39 (61,15) | 4,78 (54,46)  | 5,75 (75,16) | 4,72 (62,78)  |
| Testis Toksisitesi (TP)                         | 0,32 (65,18)  | 0,43 (35,23) | 0,23 (60,82)  | 0,22 (55,81)  | 0,35 (64,13) | 0,18 (57,58)  | 0,23 (50,93) | 0,19 (62,80)  |

**Tablo 21.** (devamı)

| Ligantın Veritabanı Kodu                        | NSC1962      | NSC51254      | NSC685284     | NSC121358     | NSC624646    | NSC121361     | NSC56088     | NSC108116    |
|-------------------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| Tahmini Kanser Terapötik Aktivite Değeri (TP)   | 0,89 (28,34) | 0,72 (26,40)  | 0,58 (32,26)  | 0,72 (25,89)  | 0,82 (45,05) | 0,72 (25,89)  | 0,89 (28,34) | 0,82 (47,78) |
| Toksik Etki Türü                                |              |               |               |               |              |               |              |              |
| Akciğer Toksisitesi (TP)                        | 0,24 (45,95) | 0,32 (26,02)  | 0,17 (39,08)  | 0,33 (26,23)  | 0,23 (39,37) | 0,33 (26,23)  | 0,24 (45,95) | 0,37 (31,85) |
| AMES Toksisitesi (TP)                           | 0,45 (40,58) | 0,61 (26,02)  | 0,40 (25,80)  | 0,62 (26,23)  | 0,81 (35,32) | 0,62 (26,23)  | 0,45 (40,58) | 0,85 (66,94) |
| Anemi (TP)                                      | 0,50 (30,06) | 0,40 (25,43)  | 0,27 (26,01)  | 0,38 (24,86)  | 0,11 (49,00) | 0,38 (24,86)  | 0,50 (30,06) | 0,59 (40,32) |
| Böbreklerde Kilo Kazancı (TP)                   | 0,69 (33,12) | 0,35 (23,84)  | 0,29 (27,81)  | 0,33 (23,26)  | 0,64 (42,49) | 0,33 (23,26)  | 0,69 (33,12) | 0,73 (46,06) |
| Böbrek Nekrozu (TP)                             | 0,93 (33,12) | 0,60 (26,02)  | 0,26 (26,80)  | 0,56 (26,23)  | 0,83 (42,49) | 0,56 (26,23)  | 0,93 (33,12) | 0,91 (42,86) |
| Deri Hassasiyeti, EC3 (TP)                      | 5,92 (20,11) | 26,75 (22,22) | 27,52 (24,30) | 26,75 (22,37) | 8,48 (41,82) | 26,75 (22,37) | 5,92 (20,11) | 6,20 (66,94) |
| Dişi Farelerde Karsinojenite (TP)               | 0,53 (31,16) | 0,49 (25,00)  | 0,28 (28,21)  | 0,48 (25,24)  | 0,44 (39,25) | 0,48 (25,24)  | 0,53 (31,16) | 0,68 (51,19) |
| Dişi Sıçanlarda Karsinojenite (TP)              | 0,54 (30,77) | 0,41 (23,87)  | 0,34 (28,21)  | 0,41 (24,03)  | 0,36 (39,54) | 0,41 (24,03)  | 0,54 (30,77) | 0,79 (42,86) |
| Erkek Farelerde Karsinojenite (TP)              | 0,74 (31,16) | 0,57 (25,00)  | 0,28 (28,21)  | 0,60 (25,24)  | 0,56 (38,34) | 0,60 (25,24)  | 0,74 (31,16) | 0,65 (59,12) |
| Erkek Sıçanlarda Karsinojenite (TP)             | 0,67 (30,77) | 0,46 (23,87)  | 0,20 (28,21)  | 0,50 (24,03)  | 0,40 (39,54) | 0,50 (24,03)  | 0,67 (30,77) | 0,63 (37,41) |
| Epididim Toksisitesi (TP)                       | 0,48 (33,12) | 0,49 (29,32)  | 0,21 (39,08)  | 0,51 (29,43)  | 0,31 (35,02) | 0,51 (29,43)  | 0,48 (33,12) | 0,56 (40,32) |
| Genotoksisite (TP)                              | 0,85 (39,68) | 0,50 (22,94)  | 0,44 (28,21)  | 0,47 (22,70)  | 0,61 (39,25) | 0,47 (22,70)  | 0,85 (39,68) | 0,69 (39,01) |
| Hepatotoksisite (TP)                            | 0,49 (33,12) | 0,35 (26,02)  | 0,32 (32,34)  | 0,34 (26,23)  | 0,50 (39,88) | 0,34 (26,23)  | 0,49 (33,12) | 0,51 (45,16) |
| Karaciğerde Kilo Kazancı (TP)                   | 0,83 (33,12) | 0,51 (25,00)  | 0,34 (27,81)  | 0,51 (24,31)  | 0,92 (39,08) | 0,51 (24,31)  | 0,83 (33,12) | 0,96 (39,86) |
| Karaciğer Kolestazı (TP)                        | 0,54 (33,12) | 0,64 (23,87)  | 0,52 (27,72)  | 0,64 (24,03)  | 0,62 (39,08) | 0,64 (24,03)  | 0,54 (33,12) | 0,66 (33,57) |
| Karaciğer Nekrozu (TP)                          | 0,81 (33,12) | 0,42 (31,72)  | 0,44 (31,63)  | 0,42 (31,89)  | 0,88 (42,55) | 0,42 (31,89)  | 0,81 (33,12) | 0,83 (37,02) |
| Karaciğerde Lipid Birikimi (TP)                 | 0,42 (27,39) | 0,44 (22,95)  | 0,33 (32,34)  | 0,46 (22,40)  | 0,32 (39,25) | 0,46 (22,40)  | 0,42 (27,39) | 0,45 (31,21) |
| Kardiyotoksisite (TP)                           | 0,81 (33,12) | 0,88 (23,49)  | 0,31 (31,63)  | 0,88 (23,65)  | 0,85 (42,49) | 0,88 (23,65)  | 0,81 (33,12) | 0,81 (31,87) |
| Karsinojenite (TP)                              | 0,85 (32,46) | 0,66 (25,86)  | 0,24 (28,21)  | 0,64 (26,01)  | 0,65 (39,54) | 0,64 (26,01)  | 0,85 (32,46) | 0,89 (59,12) |
| MRTD (TP)                                       | 0,92 (37,22) | 0,68 (29,63)  | 0,55 (28,10)  | 0,68 (29,01)  | 1,19 (42,49) | 0,68 (29,01)  | 0,92 (37,22) | 1,16 (39,36) |
| Nazal Patoloji (TP)                             | 0,21 (35,92) | 0,20 (23,49)  | 0,09 (25,78)  | 0,18 (23,65)  | 0,44 (26,89) | 0,18 (23,65)  | 0,21 (35,92) | 0,24 (37,59) |
| Nefron Hasarı (TP)                              | 0,77 (33,12) | 0,63 (26,02)  | 0,30 (32,20)  | 0,60 (26,23)  | 0,69 (39,08) | 0,60 (26,23)  | 0,77 (33,12) | 0,78 (58,94) |
| Nefrotoksisite (TP)                             | 0,57 (44,44) | 0,45 (26,02)  | 0,17 (32,20)  | 0,45 (26,23)  | 0,59 (39,08) | 0,45 (26,23)  | 0,57 (44,44) | 0,61 (58,94) |
| Nörotoksisite (TP)                              | 0,61 (26,44) | 0,52 (22,54)  | 0,30 (26,67)  | 0,54 (22,67)  | 0,35 (42,49) | 0,54 (22,67)  | 0,61 (26,44) | 0,70 (37,59) |
| Sitotoksisite Modeli, -logGI <sub>50</sub> (TP) | 4,85 (63,24) | 4,80 (26,21)  | 4,66 (31,30)  | 4,80 (26,13)  | 4,99 (50,52) | 4,80 (26,13)  | 4,85 (63,24) | 4,79 (37,64) |
| Testis Toksisitesi (TP)                         | 0,42 (35,92) | 0,45 (29,32)  | 0,32 (39,08)  | 0,39 (29,43)  | 0,45 (35,02) | 0,39 (29,43)  | 0,42 (35,92) | 0,55 (40,32) |

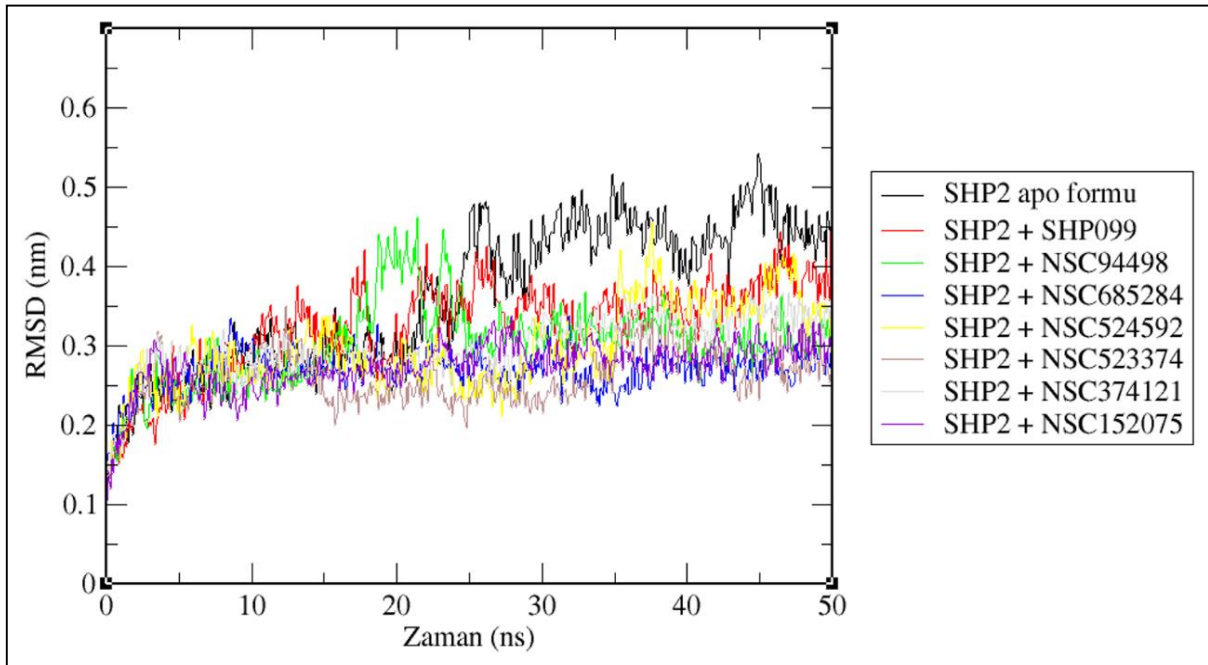
**Tablo 21.** (devamı)

| Ligantın Veritabanı Kodu                        | NSC201462    | NSC95945     | NSC403483     | NSC170258     | NSC36404      | NSC94498      | SHP099        |
|-------------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Tahmini Kanser Terapötik Aktivite Değeri (TP)   | 0,86 (27,94) | 0,88 (68,09) | 0,56 (29,80)  | 0,59 (35,51)  | 0,57 (75,36)  | 0,59 (39,42)  | 0,46 (54,25)  |
| Toksik Etki Türü                                |              |              |               |               |               |               |               |
| Akciğer Toksisitesi (TP)                        | 0,18 (45,27) | 0,23 (70,04) | 0,27 (26,32)  | 0,12 (32,37)  | 0,53 (44,95)  | 0,15 (33,70)  | 0,10 (41,86)  |
| AMES Toksisitesi (TP)                           | 0,53 (40,88) | 0,72 (45,73) | 0,61 (29,45)  | 0,49 (30,35)  | 0,74 (48,91)  | 0,32 (36,11)  | 0,41 (38,54)  |
| Anemi (TP)                                      | 0,49 (30,32) | 0,05 (58,86) | 0,11 (27,12)  | 0,48 (30,35)  | 0,31 (51,97)  | 0,28 (33,99)  | 0,33 (45,16)  |
| Böbreklerde Kilo Kazancı (TP)                   | 0,58 (32,48) | 0,69 (58,84) | 0,33 (23,66)  | 0,28 (31,25)  | 0,57 (40,79)  | 0,09 (37,35)  | 0,02 (36,02)  |
| Böbrek Nekrozu (TP)                             | 0,85 (32,48) | 0,69 (63,38) | 0,56 (25,38)  | 0,20 (29,08)  | 0,80 (54,71)  | 0,16 (36,24)  | 0,04 (42,27)  |
| Deri Hassasiyeti, EC3 (TP)                      | 7,74 (19,58) | 7,35 (26,77) | 28,72 (21,88) | 32,83 (22,73) | 12,16 (50,39) | 29,01 (35,34) | 15,91 (29,67) |
| Dişi Farelerde Karsinojenite (TP)               | 0,50 (31,39) | 0,14 (70,04) | 0,46 (23,66)  | 0,44 (32,37)  | 0,57 (66,89)  | 0,18 (38,21)  | 0,20 (52,51)  |
| Dişi Sıçanlarda Karsinojenite (TP)              | 0,61 (30,97) | 0,29 (70,04) | 0,41 (23,85)  | 0,39 (32,37)  | 0,47 (66,89)  | 0,05 (38,21)  | 0,12 (52,51)  |
| Erkek Farelerde Karsinojenite (TP)              | 0,70 (31,39) | 0,75 (65,91) | 0,56 (25,31)  | 0,51 (32,37)  | 0,65 (66,89)  | 0,18 (37,62)  | 0,28 (36,06)  |
| Erkek Sıçanlarda Karsinojenite (TP)             | 0,42 (30,97) | 0,48 (52,84) | 0,48 (23,85)  | 0,35 (32,37)  | 0,65 (66,89)  | 0,03 (38,21)  | 0,30 (52,51)  |
| Epididim Toksisitesi (TP)                       | 0,54 (32,48) | 0,33 (45,42) | 0,50 (28,47)  | 0,34 (33,65)  | 0,73 (60,14)  | 0,15 (39,69)  | 0,11 (41,86)  |
| Genotoksisite (TP)                              | 0,47 (40,00) | 0,40 (70,04) | 0,46 (23,30)  | 0,41 (32,37)  | 0,46 (58,94)  | 0,28 (38,21)  | 0,52 (52,51)  |
| Hepatotoksisite (TP)                            | 0,46 (32,48) | 0,44 (70,59) | 0,33 (26,39)  | 0,30 (34,03)  | 0,65 (66,89)  | 0,16 (39,42)  | 0,17 (42,27)  |
| Karaciğerde Kilo Kazancı (TP)                   | 0,84 (32,48) | 0,58 (40,53) | 0,41 (26,32)  | 0,02 (31,46)  | 0,96 (58,38)  | 0,46 (33,72)  | 0,27 (33,96)  |
| Karaciğer Kolestazı (TP)                        | 0,46 (32,48) | 0,51 (40,53) | 0,67 (23,46)  | 0,24 (28,95)  | 0,65 (66,89)  | 0,41 (32,24)  | 0,42 (36,10)  |
| Karaciğer Nekrozu (TP)                          | 0,79 (32,48) | 0,72 (70,04) | 0,40 (30,41)  | 0,12 (33,66)  | 0,98 (53,12)  | 0,63 (33,99)  | 0,23 (37,39)  |
| Karaciğerde Lipid Birikimi (TP)                 | 0,38 (27,50) | 0,34 (70,04) | 0,38 (25,81)  | 0,23 (34,03)  | 0,57 (67,14)  | 0,29 (34,71)  | 0,39 (31,94)  |
| Kardiyotoksisite (TP)                           | 0,74 (32,48) | 0,96 (57,79) | 0,71 (26,32)  | 0,12 (28,44)  | 0,94 (53,12)  | 0,47 (33,61)  | 0,55 (35,48)  |
| Karsinojenite (TP)                              | 0,68 (32,60) | 0,47 (70,04) | 0,56 (26,32)  | 0,38 (32,37)  | 0,66 (66,89)  | 0,09 (38,21)  | 0,19 (42,27)  |
| MRTD (TP)                                       | 0,81 (37,39) | 0,47 (70,04) | 0,65 (27,49)  | 0,61 (34,67)  | 0,41 (66,89)  | 0,06 (39,17)  | 0,10 (54,00)  |
| Nazal Patoloji (TP)                             | 0,22 (36,10) | 0,46 (29,82) | 0,25 (26,32)  | 0,21 (33,65)  | 0,34 (46,21)  | 0,31 (39,69)  | 0,08 (43,19)  |
| Nefron Hasarı (TP)                              | 0,76 (32,48) | 0,67 (68,09) | 0,64 (27,03)  | 0,13 (34,03)  | 0,85 (61,69)  | 0,35 (34,83)  | 0,10 (51,96)  |
| Nefrotoksisite (TP)                             | 0,57 (44,71) | 0,58 (68,09) | 0,46 (27,03)  | 0,31 (31,74)  | 0,52 (61,69)  | 0,20 (37,50)  | 0,11 (51,96)  |
| Nörotoksisite (TP)                              | 0,69 (26,57) | 0,50 (58,84) | 0,56 (23,53)  | 0,26 (29,62)  | 0,33 (61,69)  | 0,09 (37,50)  | 0,32 (33,45)  |
| Sitotoksisite Modeli, -logGI <sub>50</sub> (TP) | 4,74 (63,70) | 4,61 (65,22) | 5,33 (29,57)  | 4,99 (29,56)  | 5,91 (56,28)  | 5,15 (38,74)  | 5,12 (40,00)  |
| Testis Toksisitesi (TP)                         | 0,38 (36,10) | 0,50 (45,42) | 0,39 (28,47)  | 0,37 (33,65)  | 0,38 (75,36)  | 0,24 (39,69)  | 0,08 (43,19)  |

0-1 arasında değerlere sahip olan ve eğitim setinde yer alan tüm moleküller için hesaplanan maksimum Tanimoto katsayısını ifade eden bu değerler tabloda parantez içinde verilmiştir.

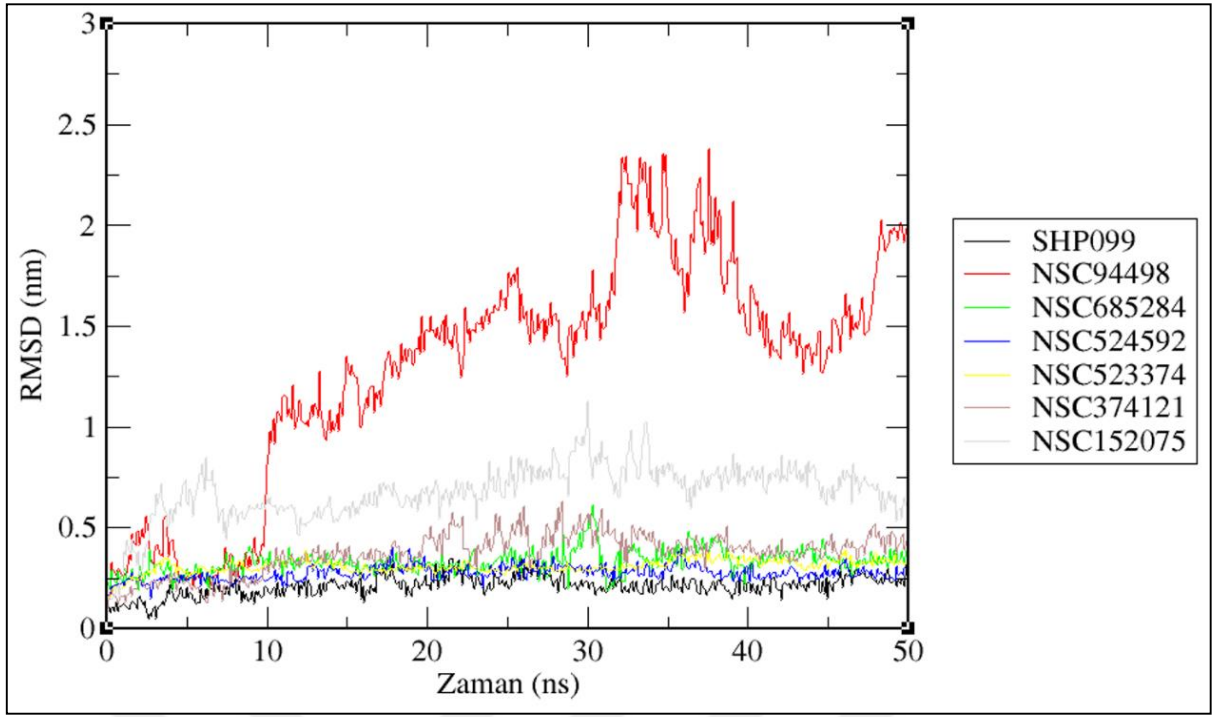
**Tablo 22.** MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> Analizleri Sonucunda Belirlenen 6 Adet Hit Ligant ve SHP099’un İlaç Olma Özelliklerinin İncelenmesi

| Ligantın Veritabanı Kodu | Molekül Formülü                                                 | Molekül Ağırlığı (g/mol) | Lipinski’nin Beş Kuralı’na Uygunluk | Dönebilen Bağ Sayısı | HBA Sayısı | HBD Sayısı |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|----------------------|------------|------------|
| NSC152075                | C <sub>15</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>   | 362,47                   | Uygun                               | 16                   | 7          | 3          |
| NSC94498                 | C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | 410,56                   | Uygun                               | 10                   | 2          | 4          |
| NSC523374                | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>   | 292,29                   | Uygun                               | 8                    | 4          | 6          |
| NSC374121                | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>   | 318,33                   | Uygun                               | 8                    | 6          | 6          |
| NSC524592                | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>   | 390,44                   | Uygun                               | 8                    | 4          | 8          |
| NSC685284                | C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> | 368,77                   | Uygun                               | 7                    | 6          | 6          |
| SHP099                   | C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub>  | 353,27                   | Uygun                               | 2                    | 1          | 5          |

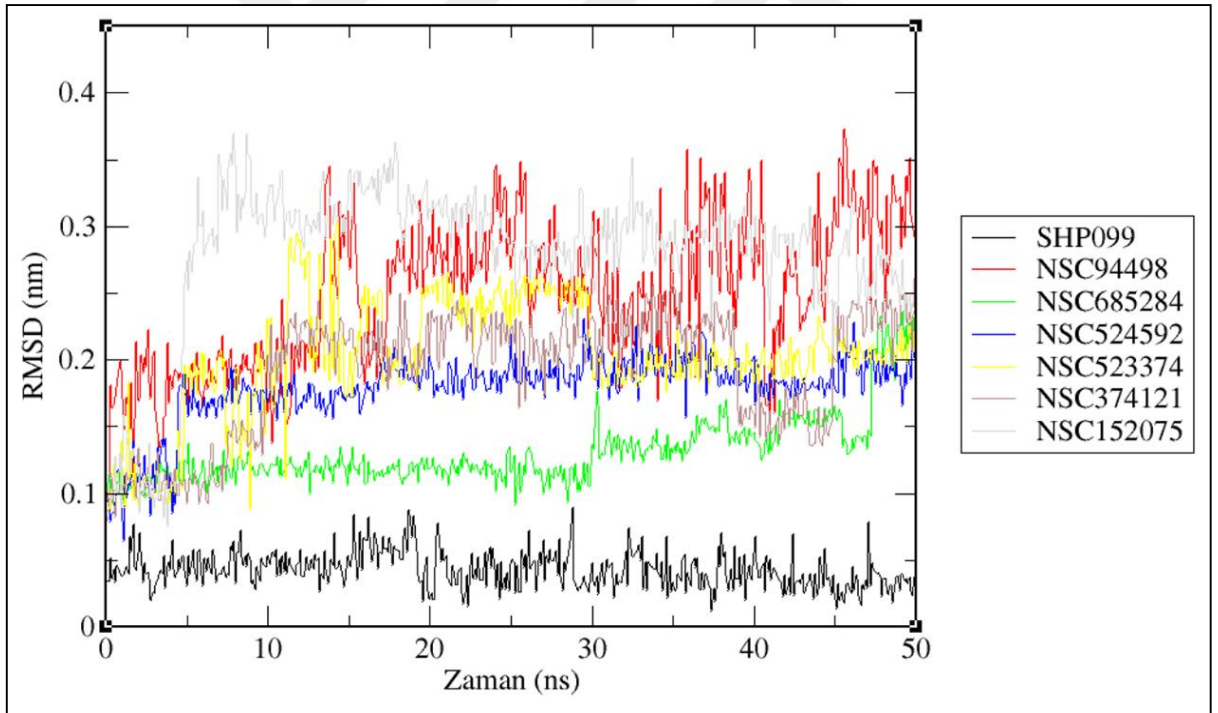


**Şekil 50.** Apo ve holo formlarda SHP-2 proteininin A zincirindeki Cα atomlarına ait RMSD değerleri

Ligant moleküllerinin proteine ve proteinin bağlanma cebine göre ne ölçüde stabil kalabildiğini ölçmek için ligant RMSD değerleri iki farklı yaklaşımla hesaplanmıştır. Lig-fit-prot yaklaşımında öncelikle referans yapılar SHP-2’nin A zincirinin omurga atomları üzerine hizalanmış ve ardından her bir liganta ait ağır atomların RMSD değerleri belirlenmiştir. İkinci yaklaşım olan “lig-fit-lig” yaklaşımında ise referans yapılar ilgili ligantların başlangıç konformasyonuna hizalandıktan sonra her bir ligantın ağır atomlarının RMSD’leri ölçülmüştür (Sayın 2019). Bu değerlerin zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle sırasıyla Şekil 51 ve 52’de verilen “lig-fit-prot” ve “lig-fit-lig” grafikleri oluşturulmuştur.



**Şekil 51.** 50 ns’lik simülasyonlar süresince SHP099 ve hit ligantlar için çizilen “lig-fit-prot” grafiklerinin tek bir grafik penceresinde gösterilmesi



**Şekil 52.** 50 ns’lik simülasyonlar süresince SHP099 ve hit ligantlar için çizilen “lig-fit-lig” grafiklerinin tek bir grafik penceresinde gösterilmesi

Tablo 23’te SHP-2 proteininin A zincirinde bulunan C $\alpha$  atomlarının, ayrıca ligantın allosterik bağlanma bölgesindeki translasyonel (lig-fit-prot) ve rotasyonel (lig-fit-lig) hareketlerini temsil eden ligant RMSD değerlerinin ortalaması ve standart sapması ifade edilmiştir (Himmetoğlu 2020).

**Tablo 23.** 50 ns Simülasyon Süresi Boyunca Apo ve Holo Formlardaki SHP-2'nin A Zincirindeki Cα Atomlarının ve Ayrıca Holo Formlarda Ligantların Ortalama RMSD Değerleri (nm Cinsinden)

| Sistem Bileşeni      | Protein RMSD Değeri<br>(Ortalama ± s.d.) | Ligant RMSD Değeri<br>(Ortalama ± s.d.) |             |
|----------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|
|                      |                                          | Lig-fit-prot                            | Lig-fit-lig |
| Apo SHP-2 Proteinini | 0,24 ± 0,09                              | -                                       | -           |
| NSC94498             | 0,18 ± 0,05                              | 1,00 ± 0,56                             | 0,14 ± 0,05 |
| NSC685284            | 0,15 ± 0,03                              | 0,21 ± 0,06                             | 0,12 ± 0,03 |
| NSC524592            | 0,16 ± 0,05                              | 0,15 ± 0,04                             | 0,10 ± 0,03 |
| NSC523374            | 0,13 ± 0,04                              | 0,16 ± 0,04                             | 0,11 ± 0,04 |
| NSC374121            | 0,16 ± 0,04                              | 0,22 ± 0,10                             | 0,12 ± 0,05 |
| NSC152075            | 0,14 ± 0,03                              | 0,32 ± 0,14                             | 0,11 ± 0,06 |
| SHP099               | 0,21 ± 0,06                              | 0,13 ± 0,05                             | 0,02 ± 0,01 |

MD simülasyonları sonrasında protein ve ligantlara ait RMSD değerlerinin hesaplanması çalışmalarında, 50 ns'lik simülasyon süresince, NSC94498 kodlu ligant haricindeki diğer 5 hit molekülün SHP-2'nin allosterik bağlanma bölgesinde stabil bir konumda olduğu belirlenmiştir (Şekil 51 ve Tablo 23).

SHP-2 proteininin A zincirinin yapısal esnekliğini belirlemek üzere yapılan kök ortalama kare dalgalanma (root-mean-square fluctuation; RMSF) hesaplamalarına yalnızca Cα atomları dahil edilmiş olup tüm hesaplamalarda Eşitlik 18 kullanılmıştır.

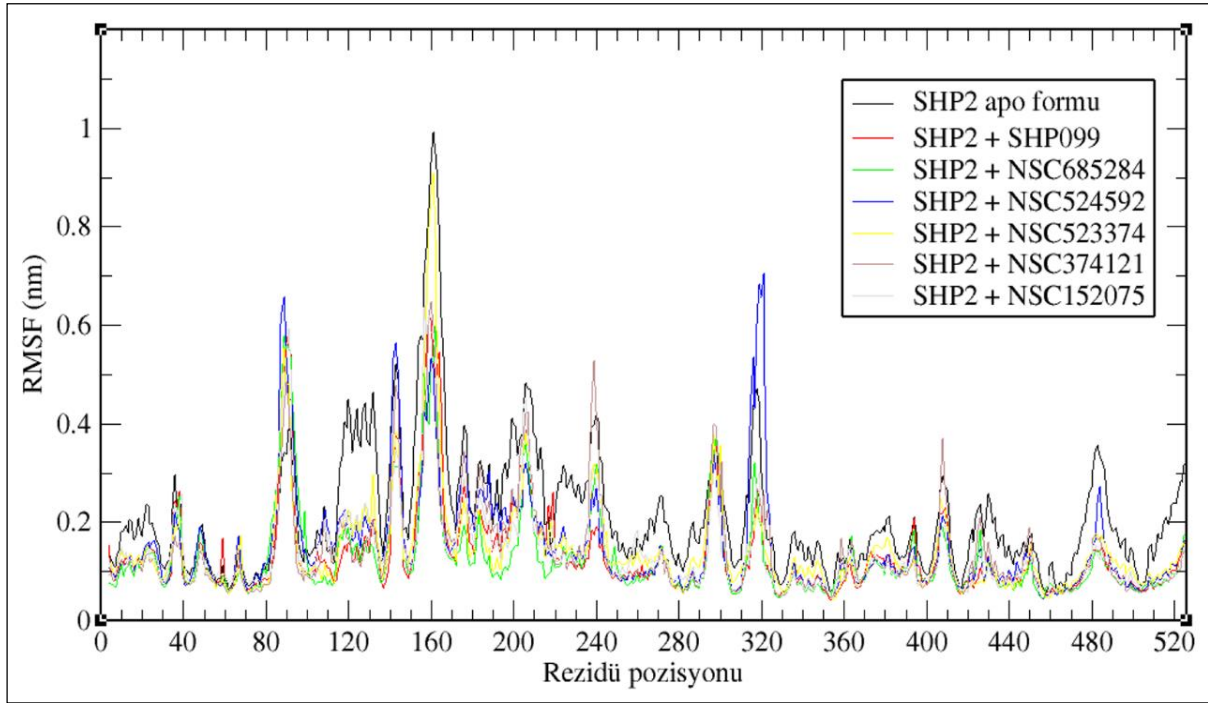
$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{j=1}^t |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2} \quad (\text{Eşitlik 18})$$

Eşitlik 18'de  $t$ , ortalama alma işleminin yapıldığı süreyi ve  $r_i^{ref}$  ise  $i$  atomunun referans konumunu ifade etmektedir (Kumar *et al.* 2020). Böylece SHP-2'nin apo ve holo formlarında A zincirindeki Cα atomları için rezidü başına RMSF değerleri Tablo 24'te verildiği gibi ayrı ayrı hesaplanmış ve bu değerler kullanılarak hem SHP-2 proteini hem de C-SH2 domaini için iki ayrı RMSF analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 53).

Literatürde daha önce belirtildiği gibi N-SH2 domainine ait D'E (Tyr66-Glu76) döngüsü, SHP-2 proteini otoinhibe olmuş kapalı bir konformasyonda iken B'C (Glu258-Lys266), pTyr (Asn277-Pro284), WPD (Arg421-aspartik asit-431 (Asp431)), P (His458-Arg465) ve Q (valin-497 (Val497)-metiyonin-504 (Met504)) döngüleriyle etkileşime girerek PTF domaininin aktif bölgesine derinlemesine nüfuz etmektedir (Zhou *et al.* 2021). Bu sebeple MD simülasyonları süresince bu bölgelerin dalgalanmaları da araştırılmış ve sonuçlar ortalama RMSF değerleri olarak Tablo 25'te özetlenmiştir.

**Tablo 24.** 50 ns Simülasyon Süresi Boyunca SHP-2'nin A Zincirine ve A Zincirindeki C-SH2 Domaininde Bulunan Amino Asit Kalıntılarına Ait C $\alpha$  Atomları İçin Hesaplanan Ortalama RMSF Değerleri (nm Cinsinden)

| Sistem Bileşeni    | Protein RMSF Değeri<br>(Ortalama $\pm$ s.d.) | C-SH2 Domaini RMSF Değeri<br>(Ortalama $\pm$ s.d.) |
|--------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Apo SHP-2 Proteini | 0,23 $\pm$ 0,13                              | 0,37 $\pm$ 0,18                                    |
| NSC685284          | 0,12 $\pm$ 0,09                              | 0,18 $\pm$ 0,11                                    |
| NSC524592          | 0,14 $\pm$ 0,11                              | 0,24 $\pm$ 0,10                                    |
| NSC523374          | 0,14 $\pm$ 0,10                              | 0,23 $\pm$ 0,16                                    |
| NSC374121          | 0,12 $\pm$ 0,09                              | 0,23 $\pm$ 0,11                                    |
| NSC152075          | 0,14 $\pm$ 0,09                              | 0,23 $\pm$ 0,12                                    |
| SHP099             | 0,15 $\pm$ 0,09                              | 0,22 $\pm$ 0,12                                    |



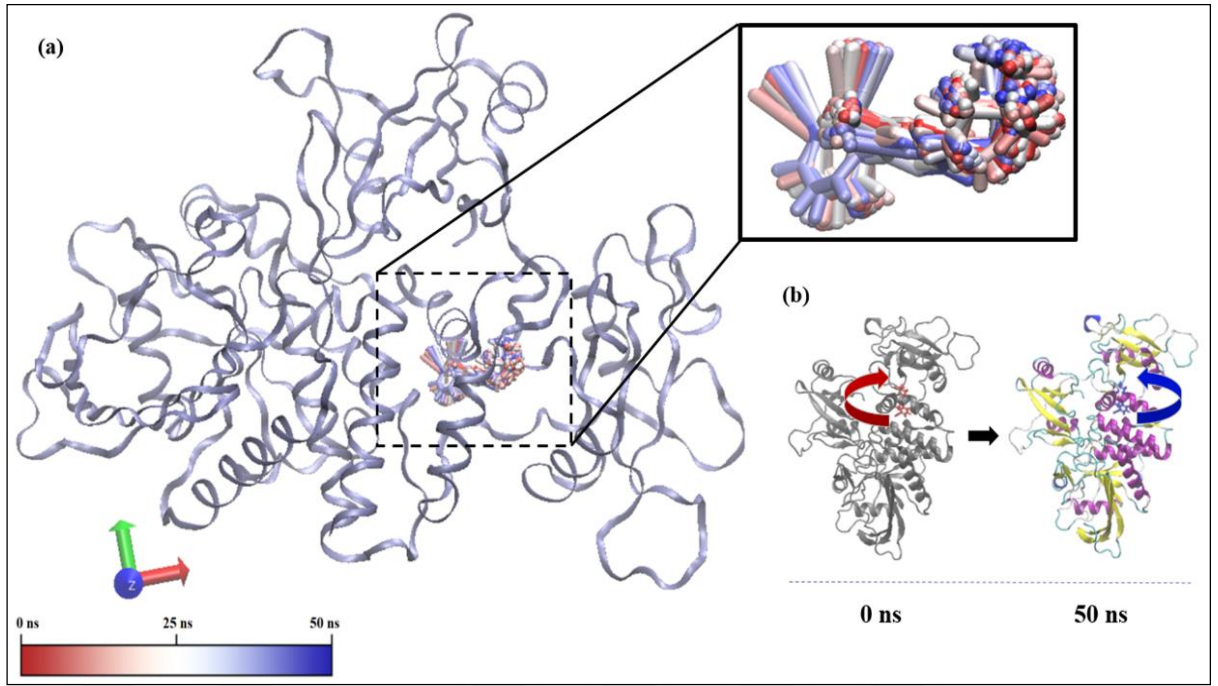
**Şekil 53.** 50 ns'lik MD simülasyonları süresince apo formdaki, ayrıca farklı hit molekülleri ve SHP099 ile kompleks halindeki SHP-2 proteininin kristal yapısının C $\alpha$ -RMSF analizi

MD simülasyon çalışmaları esnasında protein ve ligant moleküllerinin konformasyonel değişiklikleri de izlenmiştir (Kantarcıoğlu 2017). SHP-2 proteiniyle kompleks oluşturan SHP099, NSC685284, NSC524592, NSC523374, NSC374121 ve NSC152075 moleküllerinin 50 ns'lik simülasyonlar süresince allosterik ligant bağlanma bölgesindeki hareketleri karşılık gelen renklerde ( $t=0$  ns için kırmızı ve  $t=50$  ns için mavi) sırasıyla Şekil 54, 55, 56, 57, 58 ve 59'da verilmiştir. Ayrıca bu şekillerin her birinde, simülasyon trajektorilerinde ligant bağlı SHP-2 kompleksleri için ilk (0 ns) ve son (50 ns) görüntülerde mevcut olan protein sekonder yapılarının konformasyonel değişimleriyle ilgili olarak meydana gelen ligant geometrileri gösterilmiştir.

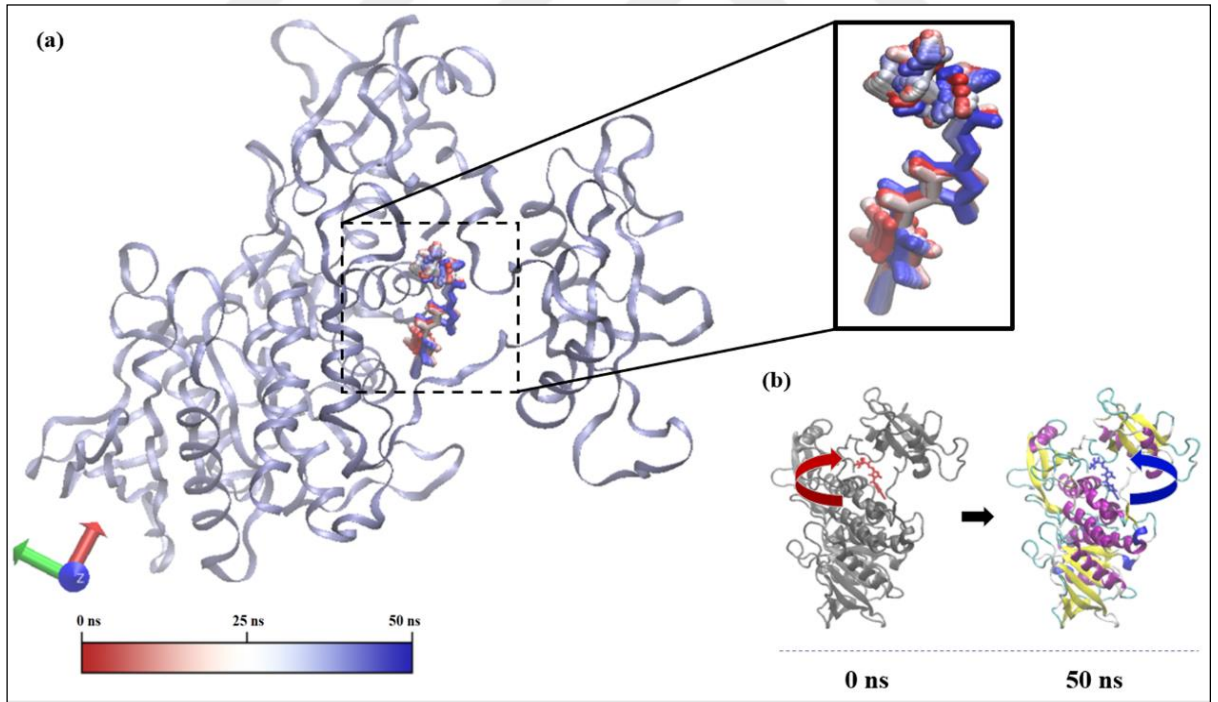
**Tablo 25.** Apo ve Holo Formlarda Farklı SHP-2 Sistemlerine Ait Altı Bölgenin C $\alpha$  Atomları İçin Hesaplanan Ortalama RMSF Değerleri (nm Cinsinden)

| Sistem Bölgesi | Apo SHP-2<br>Formu <sup>a</sup> | SHP2-<br>NSC685284 <sup>a</sup> | SHP2-<br>NSC524592 <sup>a</sup> | SHP2-<br>NSC523374 <sup>a</sup> | SHP2-<br>NSC374121 <sup>a</sup> | SHP2-<br>NSC152075 <sup>a</sup> | SHP2- SHP099 <sup>a</sup> |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| D'E Döngüsü    | 0,09 $\pm$ 0,02                 | 0,08 $\pm$ 0,02                 | 0,07 $\pm$ 0,03                 | 0,08 $\pm$ 0,04                 | 0,08 $\pm$ 0,03                 | 0,06 $\pm$ 0,01                 | 0,08 $\pm$ 0,02           |
| B'C Döngüsü    | 0,16 $\pm$ 0,03                 | 0,09 $\pm$ 0,01                 | 0,09 $\pm$ 0,01                 | 0,12 $\pm$ 0,01                 | 0,09 $\pm$ 0,01                 | 0,14 $\pm$ 0,02                 | 0,09 $\pm$ 0,01           |
| pTyr Döngüsü   | 0,12 $\pm$ 0,01                 | 0,07 $\pm$ 0,01                 | 0,08 $\pm$ 0,01                 | 0,07 $\pm$ 0,01                 | 0,07 $\pm$ 0,01                 | 0,09 $\pm$ 0,01                 | 0,07 $\pm$ 0,01           |
| WPD Döngüsü    | 0,21 $\pm$ 0,03                 | 0,11 $\pm$ 0,03                 | 0,11 $\pm$ 0,02                 | 0,09 $\pm$ 0,02                 | 0,12 $\pm$ 0,03                 | 0,10 $\pm$ 0,02                 | 0,09 $\pm$ 0,02           |
| P Döngüsü      | 0,08 $\pm$ 0,02                 | 0,07 $\pm$ 0,01                 | 0,06 $\pm$ 0,01                 | 0,06 $\pm$ 0,02                 | 0,06 $\pm$ 0,01                 | 0,07 $\pm$ 0,02                 | 0,06 $\pm$ 0,01           |
| Q Döngüsü      | 0,11 $\pm$ 0,03                 | 0,06 $\pm$ 0,01                 | 0,07 $\pm$ 0,01                 | 0,09 $\pm$ 0,01                 | 0,06 $\pm$ 0,01                 | 0,08 $\pm$ 0,01                 | 0,07 $\pm$ 0,01           |

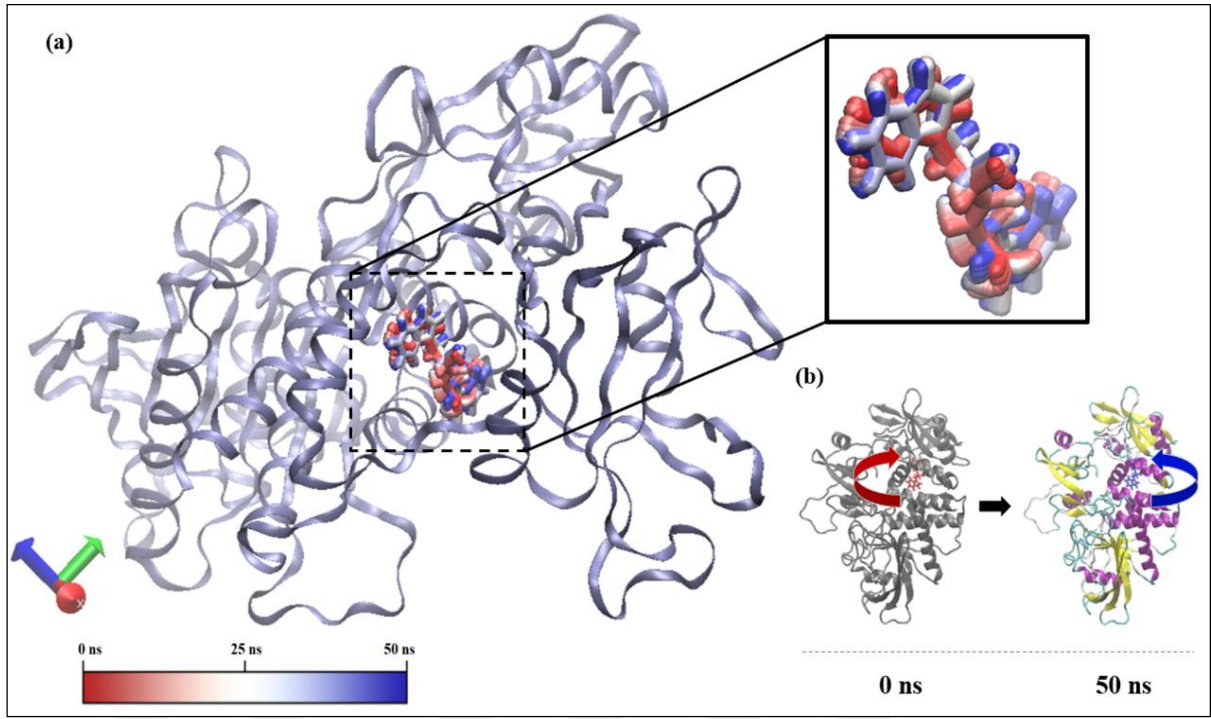
<sup>a</sup>Veriler ortalama RMSF  $\pm$  s.d. olarak ifade edilmiştir.



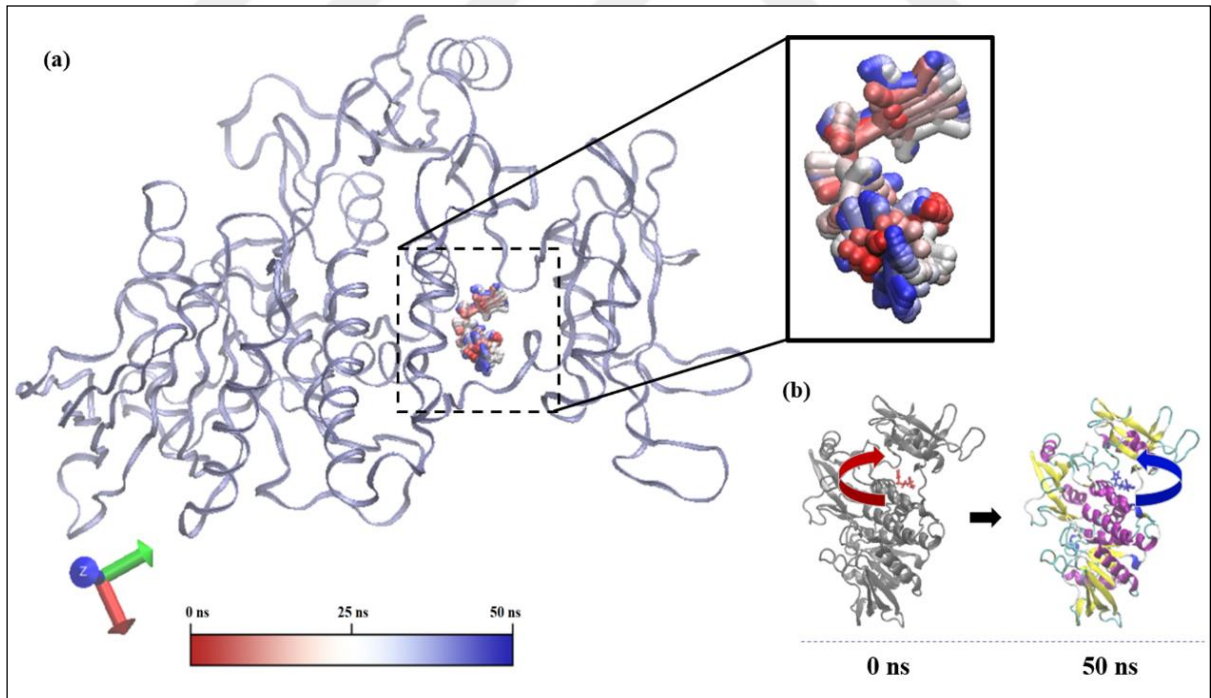
**Şekil 54.** 50 ns'lik simülasyon süresince SHP099 için elde edilen MD simülasyon sonuçları. (a) SHP-2'nin allosterik bölgesine bağlanan SHP099'un konformasyonel değişimleri, (b) Simülasyondan sonra SHP2-SHP099 kompleksinin ilk (0 ns) ve son (50 ns) görüntülerinin yapısal olarak hizalanması ve allosterik bölgedeki anlık SHP099 konformasyonlarının incelenmesi



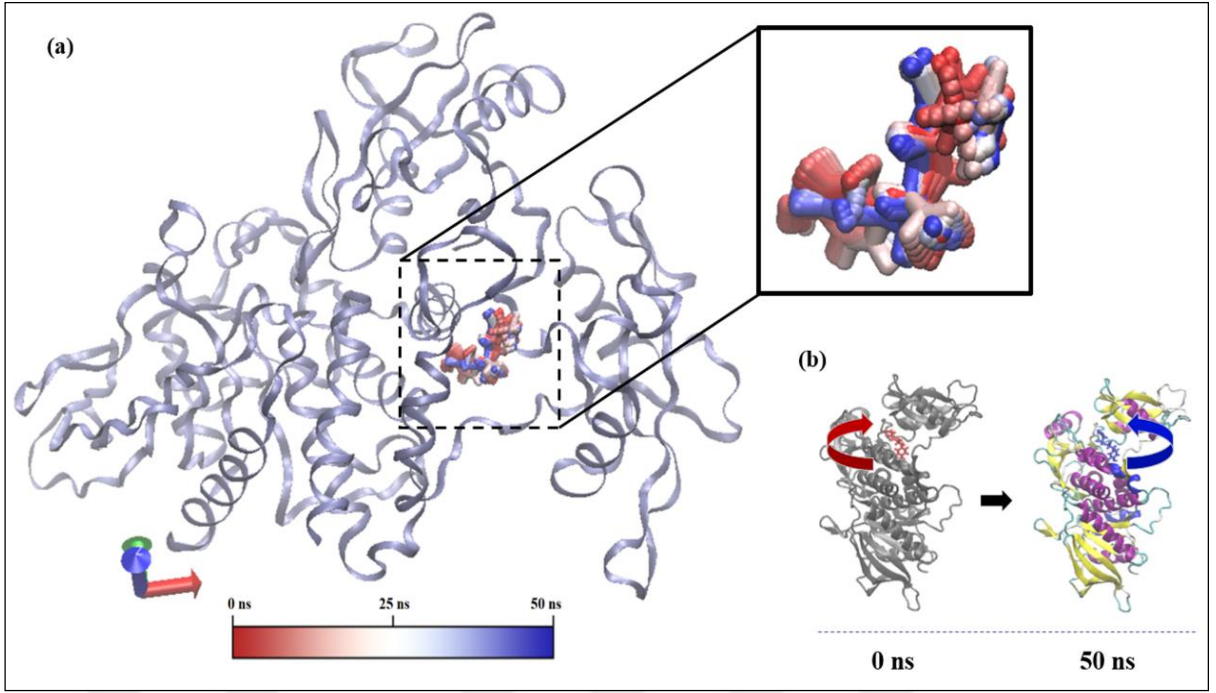
**Şekil 55.** 50 ns'lik simülasyon süresince NSC685284 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. (a) SHP-2'nin allosterik bölgesine bağlanan NSC685284'ün konformasyonel değişimleri, (b) Simülasyondan sonra SHP2-NSC685284 kompleksinin ilk (0 ns) ve son (50 ns) görüntülerinin yapısal olarak hizalanması ve allosterik bölgedeki anlık NSC685284 konformasyonlarının incelenmesi



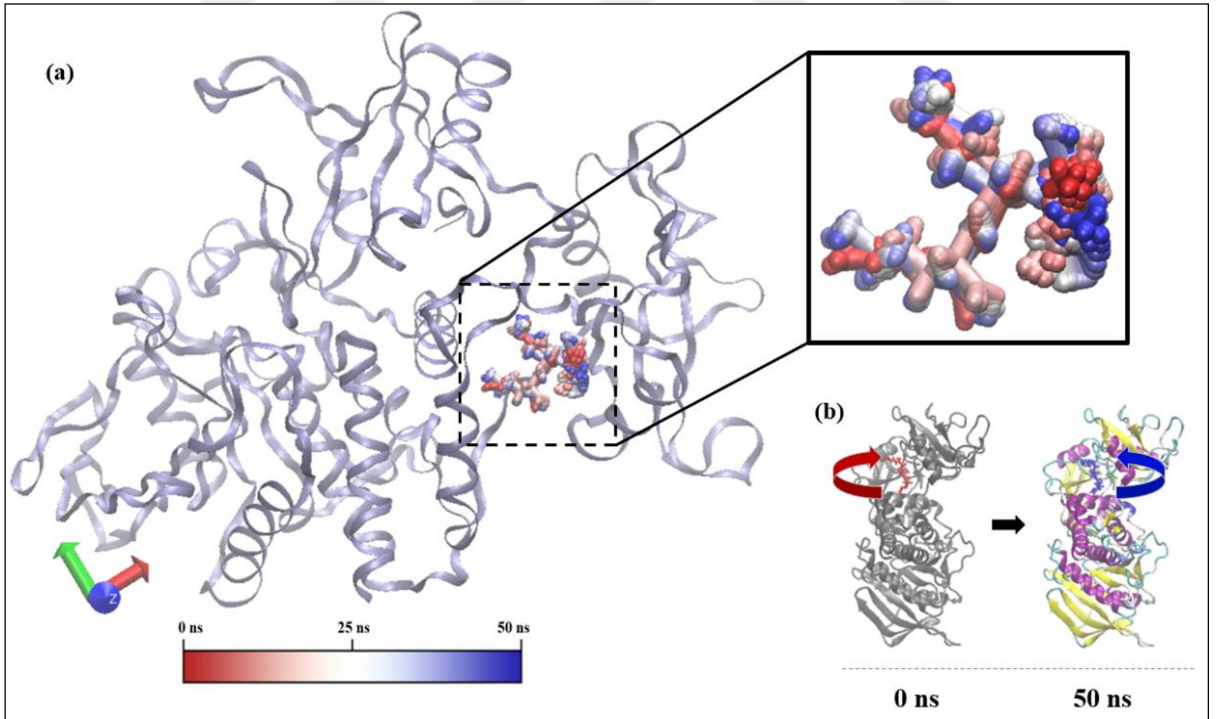
**Şekil 56.** 50 ns'lik simülasyon süresince NSC524592 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. (a) SHP-2'nin allosterik bölgesine bağlanan NSC524592'nin konformasyonel değişimleri, (b) Simülasyondan sonra SHP2-NSC524592 kompleksinin ilk (0 ns) ve son (50 ns) görüntülerinin yapısal olarak hizalanması ve allosterik bölgedeki anlık NSC524592 konformasyonlarının incelenmesi



**Şekil 57.** 50 ns'lik simülasyon süresince NSC523374 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. (a) SHP-2'nin allosterik bölgesine bağlanan NSC523374'nin konformasyonel değişimleri, (b) Simülasyondan sonra SHP2-NSC523374 kompleksinin ilk (0 ns) ve son (50 ns) görüntülerinin yapısal olarak hizalanması ve allosterik bölgedeki anlık NSC523374 konformasyonlarının incelenmesi



**Şekil 58.** 50 ns'lik simülasyon süresince NSC374121 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. (a) SHP-2'nin allosterik bölgesine bağlanan NSC374121'in konformasyonel değişimleri, (b) Simülasyondan sonra SHP2-NSC374121 kompleksinin ilk (0 ns) ve son (50 ns) görüntülerinin yapısal olarak hizalanması ve allosterik bölgedeki anlık NSC374121 konformasyonlarının incelenmesi



**Şekil 59.** 50 ns'lik simülasyon süresince NSC152075 kodlu ligant için elde edilen MD simülasyon sonuçları. (a) SHP-2'nin allosterik bölgesine bağlanan NSC152075'in konformasyonel değişimleri, (b) Simülasyondan sonra SHP2-NSC152075 kompleksinin ilk (0 ns) ve son (50 ns) görüntülerinin yapısal olarak hizalanması ve allosterik bölgedeki anlık NSC152075 konformasyonlarının incelenmesi

## MM/PBSA hesaplamaları

Glide/Prime IFD moleküler docking yaklaşımıyla üretilen protein-ligant komplekslerinin bağlanma afinitelerinin daha doğru bir şekilde tahmin edilmesi ve komplekslerin bağlanma serbest enerjilerinin hesaplanmasında MM/PBSA metodu kullanılmıştır (Poli *et al.* 2020). Bu amaç doğrultusunda holo formdaki SHP-2'nin MD simülasyonları esnasında üretim aşamasında oluşturulan son 25 ns'lik kısım VMD paket programı yardımıyla her 0,1 ns'de bir elde edilen ardışık görüntülere bölünmüş ve bu görüntüler *g\_mmpbsa* aracıyla analiz edilmiştir. Tablo 26'da SHP-2 ve 5 adet hit ligantın yanı sıra SHP099 için daha önce Glide/Prime IFD metoduyla oluşturulan protein-ligant komplekslerinin MM/PBSA hesaplamalarından tayin edilen ortalama bağlanma serbest enerjisi ( $\Delta G_{bağ.}$ ) değerleri verilmiştir. Bu tabloda parantez içinde yer alan rakamlar s.d. değerlerini temsil etmektedir.

**Tablo 26.** SHP2-Ligant Kompleksleri İçin MD Simülasyonlarından Hesaplanan Ortalama MM/PBSA Bağlanma Serbest Enerjileri

| Ligantın Veritabanı Kodu | $\Delta E_{vdw}^a$ (kJ/mol) | $\Delta E_{ele.}^b$ (kJ/mol) | $\Delta G_{polar}^c$ (kJ/mol) | $\Delta G_{nonpol.}^d$ (kJ/mol) | $\Delta G_{bağ.}^e$ (kJ/mol) |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| NSC152075                | -38,1 (21,5)                | -1275,6 (100,9)              | 1112,4 (129,2)                | -16,3 (1,9)                     | -217,6 (81,5)                |
| NSC374121                | -113,4 (15,6)               | -79,1 (43,4)                 | 196,0 (61,9)                  | -15,5 (1,7)                     | -12,0 (29,9)                 |
| NSC523374                | -101,8 (12,7)               | -463,2 (38,4)                | 457,3 (42,8)                  | -16,0 (1,0)                     | -123,8 (26,5)                |
| NSC524592                | -144,0 (15,2)               | -327,8 (38,4)                | 487,8 (37,3)                  | -19,6 (0,9)                     | -3,7 (20,8)                  |
| NSC685284                | -147,4 (19,3)               | -67,35 (42,7)                | 340,4 (57,2)                  | -18,9 (1,3)                     | +106,8 (32,2)                |
| SHP099                   | -163,3 (12,8)               | -455,1 (34,4)                | 521,2 (27,7)                  | -18,6 (0,7)                     | -116,0 (21,5)                |

<sup>a</sup> $\Delta E_{vdw}$ : Van der Waals, <sup>b</sup> $\Delta E_{ele.}$ : Elektrostatik, <sup>c</sup> $\Delta G_{polar}$ : Polar solvasyon, <sup>d</sup> $\Delta G_{nonpol.}$ : Nonpolar, <sup>e</sup> $\Delta G_{bağ.}$ : MM/PBSA bağlanma serbest enerjisi

Bir protein-ligant kompleksinin meydana gelebilmesi için gerekli olan bağlanma olayında hesaplanan  $\Delta G_{bağ.}$  değerinin negatif olması gerekmektedir (Bronowska 2011). Tablo 26'da verilen  $\Delta G_{bağ.}$  değerleri daha yakından incelendiğinde NSC685284 kodlu hit ligant için MM/PBSA yöntemiyle hesaplanan  $\Delta G_{bağ.}$  değerinin (+106,8  $\pm$  32,2 kJ/mol) pozitif olduğu görülmektedir. Bu sebeple bu ligant molekülü ilerleyen aşamalarda gerçekleştirilecek *in vitro* deneysel çalışmalardan elimine edilmiştir. Sonuçta geriye kalan 4 adet hit bileşiğin  $\Delta G_{bağ.}$  değerlerinin (-3,7 ila 217,6 kJ/mol) negatif olduğu ve içlerinden NSC152075 (-217,6  $\pm$  81,5 kJ/mol) ve NSC523374 (-123,8  $\pm$  26,5 kJ/mol) kodlu ligantların MM/PBSA bağlanma enerjisi açısından en iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

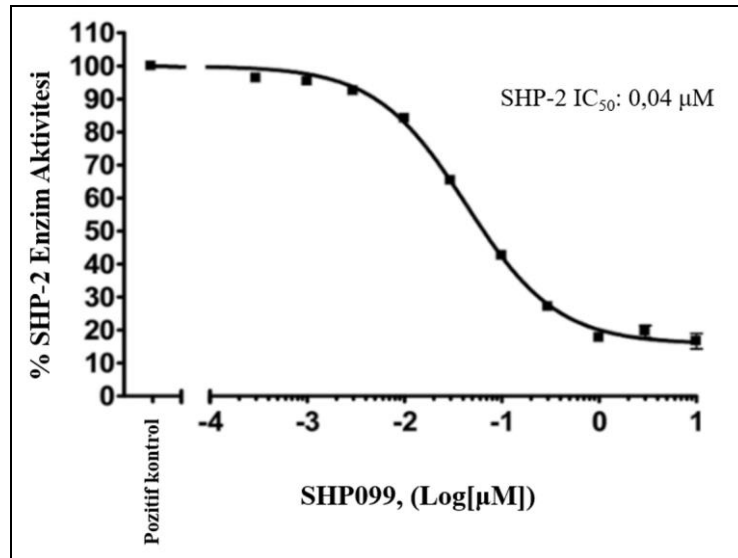
## ***İn Vitro* Biyoaktivite Araştırmaları**

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen *in silico* analizler sonucunda, MD simülasyonlarında NSC94498'in proteinin bağlanma bölgesinden ayrıldığına anlaşılmıştır, MM/PBSA hesaplamalarında NSC685284'ün bağlanma enerjisinin pozitif işaretli olduğunun tespit edilmesi ve NSC152075'in satın alınabilir durumda olmaması nedeniyle, SHP-2 enzimini inhibe edebilecek aday bileşikler NSC374121 (H-His-Tyr-OH), NSC523374 (H-His-His-OH) ve NSC524592 (H-Trp-Trp-OH) olarak belirlenmiştir. Bu bileşikler ve çalışmalar esnasında referans olarak kullanılan SHP099 molekülü satın alınmıştır.

### **SHP-2 enzim inhibisyonu testi**

#### ***Çalışmada kullanılan ölçüm kitinin performansının değerlendirilmesi***

Bu deneyde kullanılan florometrik SHP-2 enzim kitinin ölçümlerinin doğruluğu, bu kiti üreten BPS Bioscience® firmasının bilinen bir allosterik SHP-2 inhibitörü olan SHP099 için tayin ettiği SHP-2 IC<sub>50</sub> değerinin; mevcut çalışma kapsamındaki enzim aktivite tayini deneylerinde SHP099'a yönelik hesaplanan SHP-2 IC<sub>50</sub> değeriyle kıyaslanması yoluyla değerlendirilmiştir. Üretici firma tarafından SHP099'a ait SHP-2 IC<sub>50</sub> değeri 0,04 µM olarak bildirilmiştir (Şekil 60). Benzer şekilde bu çalışmada da SHP099'un SHP-2 IC<sub>50</sub> değeri 0,047 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 61A ve Tablo 27).



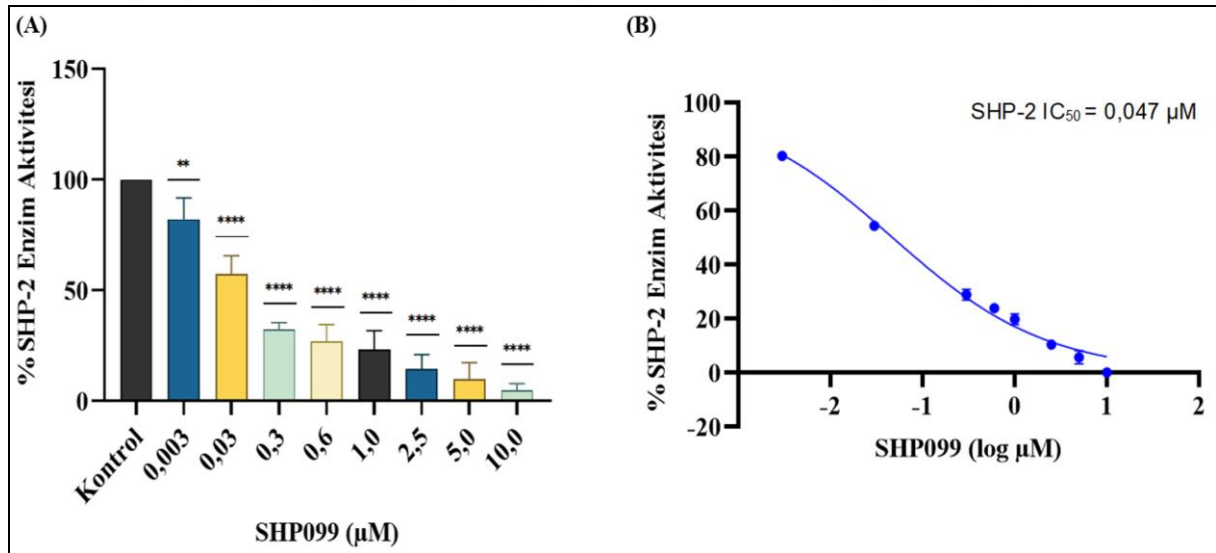
**Şekil 60.** SHP099 için 0,0001-10,0 µM konsantrasyon aralığında BPS Bioscience® tarafından üretilen 79330 no.lu test kiti kullanılarak ölçülen % cinsinden SHP-2<sup>WT</sup> enzim aktivitesi değerleriyle çizilen doz-yanıt eğrisi

### **SHP-2 inhibitör aktivitelerinin tayini**

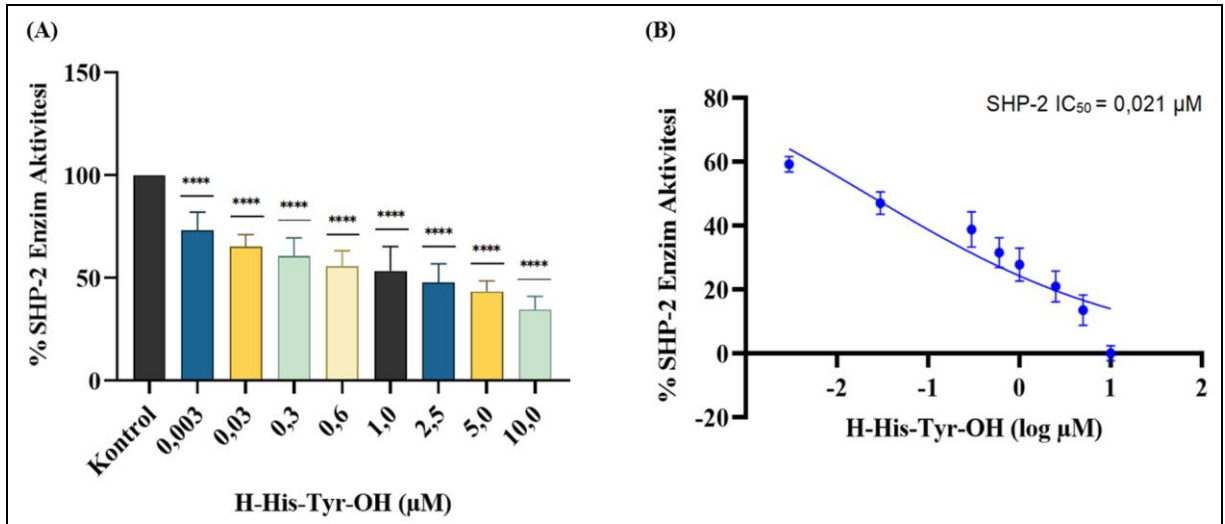
Bileşiklerin *in vitro* koşullarda aktivitelerinin tayininde insan SHP-2 enziminin inhibisyonunun florometrik olarak ölçülebildiği bir kit kullanılmıştır. Böylece H-His-Tyr-OH,

H-His-His-OH ve H-Trp-Trp-OH'nin SHP-2 inhibisyon aktiviteleri 0,003, 0,03, 0,3, 0,6, 1,0, 2,5, 5,0 ve 10,0  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda araştırılmış ve allosterik bir SHP-2 inhibitörü olan SHP099 ile karşılaştırılmıştır.

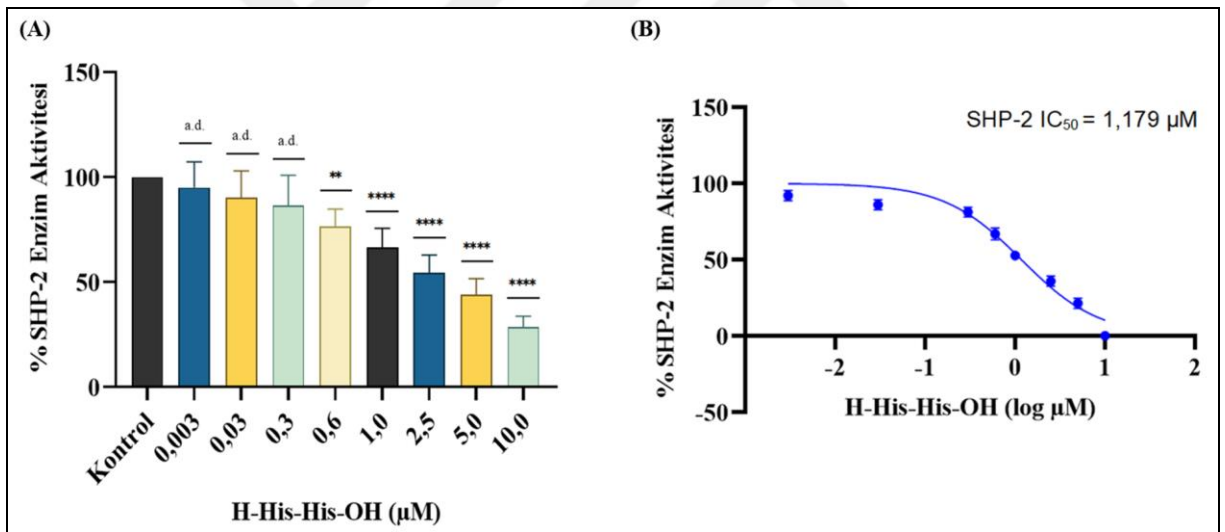
Test edilen dozlarda her bir inhibitör aday ve SHP099'a ait Fİ değerleri bir floresan mikroparka okuyucusuyla ölçülmüş olup bu değerlerden hareketle bileşiklerin SHP-2 inhibisyon aktiviteleri % olarak EK 1'deki gibi hesaplanmıştır. Ardından SHP099 (Şekil 61A), H-His-Tyr-OH (Şekil 62A), H-His-His-OH (Şekil 63A) ve H-Trp-Trp-OH (Şekil 64A) için "konsantrasyona karşı % SHP-2 enzim aktivitesi" grafikleri çizilmiştir. Şekil 61A, 62A, 63A ve 64A'dan tüm maddelerin, pozitif kontrolle bir kıyaslama yapıldığında, % SHP-2 enzim aktivitesi değerlerinde doza bağlı anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (\*\* $P \leq 0,01$  ve \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ). Bir sonraki aşamada uygulama dozlarının logaritmik değerlerinin x eksenine ve hesaplanan % SHP-2 enzim aktivitesi değerlerinin ise y eksenine yerleştirilmesiyle SHP099, H-His-Tyr-OH, H-His-His-OH ve H-Trp-Trp-OH için sırasıyla Şekil 61B, Şekil 62B, Şekil 63B ve Şekil 64B'de verilen doz-yanıt eğrileri oluşturulmuştur. Bu eğrilerden her bir bileşiğin SHP-2  $\text{IC}_{50}$  değeri Tablo 27'deki hesaplanmıştır. Tablo 27 incelendiğinde SHP-2'nin aktivitesini H-His-Tyr-OH (SHP-2  $\text{IC}_{50}$ : 0,021  $\mu\text{M}$ )'nin mikromolar altı konsantrasyonda, H-His-His-OH (SHP-2  $\text{IC}_{50}$ : 1,179  $\mu\text{M}$ ) ve H-Trp-Trp-OH (SHP-2  $\text{IC}_{50}$ : 1,329  $\mu\text{M}$ )'nin ise düşük mikromolar konsantrasyonlarda inhibe ettikleri görülmektedir.



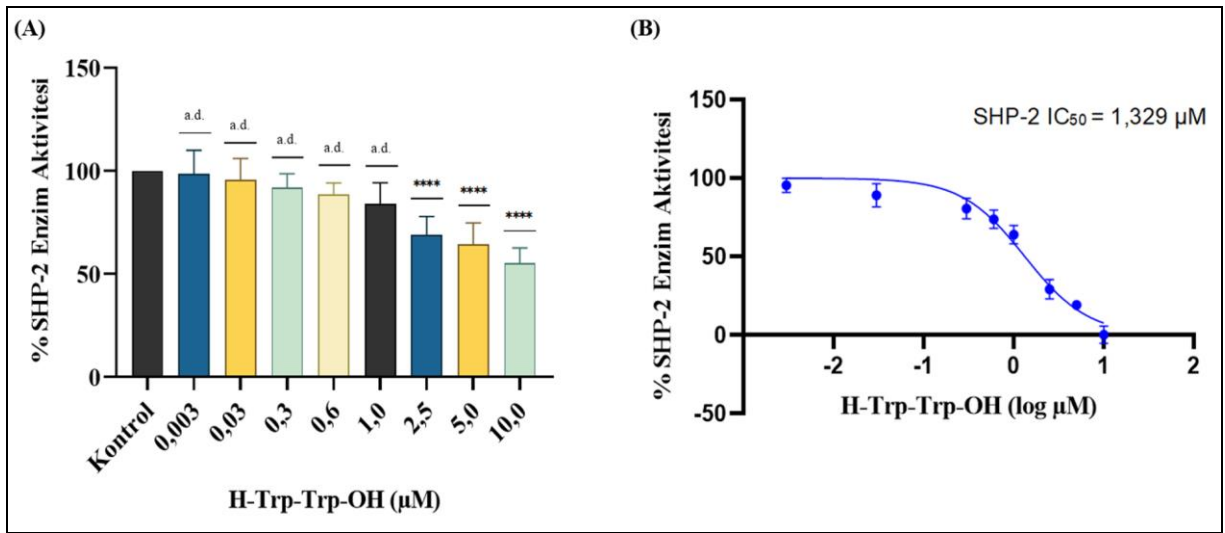
**Şekil 61.** SHP099 için *in vitro* enzim inhibisyon testi sonuçları. (A) 0,003-10,0  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında SHP099'un SHP-2'nin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. Ortamda SHP099 içermeyen enzim solüsyonu "kontrol olarak" kullanılmıştır. Her çubuk, iki kopya halindeki üç bağımsız deneyin ortalama ve s.d. değerlerini ifade etmektedir. Veriler arasındaki istatistiksel anlamlılık, ANOVA ile Tukey testinin kombine edildiği bir yaklaşımla değerlendirilmiştir (kontrole kıyasla \*\* $P \leq 0,01$  ve \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ). (B) 0,003-10,0  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında SHP099 için çizilen doz-yanıt eğrisi



**Şekil 62.** H-His-Tyr-OH için *in vitro* enzim inhibisyon testi sonuçları. (A) 0,003-10,0 µM konsantrasyon aralığında H-His-Tyr-OH'nin SHP-2'nin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. Ortamda H-His-Tyr-OH içermeyen enzim solüsyonu "kontrol olarak" kullanılmıştır. Her çubuk, iki kopya halindeki üç bağımsız deneyin ortalama ve s.d. değerlerini ifade etmektedir. Veriler arasındaki istatistiksel anlamlılık, ANOVA ile Tukey testinin kombine edildiği bir yaklaşımla değerlendirilmiştir (kontrole kıyasla \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ). (B) 0,003-10,0 µM konsantrasyon aralığında H-His-Tyr-OH için çizilen doz-yanıt eğrisi



**Şekil 63.** H-His-His-OH için *in vitro* enzim inhibisyon testi sonuçları. (A) 0,003-10,0 µM konsantrasyon aralığında H-His-His-OH SHP-2'nin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. Ortamda H-His-His-OH içermeyen enzim solüsyonu "kontrol olarak" kullanılmıştır. Her çubuk, iki kopya halindeki üç bağımsız deneyin ortalama ve s.d. değerlerini ifade etmektedir. Veriler arasındaki istatistiksel anlamlılık, ANOVA ile Tukey testinin kombine edildiği bir yaklaşımla değerlendirilmiştir (kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı değil (a.d.) $p > 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$  ve \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ). (B) 0,003-10,0 µM konsantrasyon aralığında H-His-His-OH için çizilen doz-yanıt eğrisi



**Şekil 64.** H-Trp-Trp-OH için *in vitro* enzim inhibisyon testi sonuçları. (A) 0,003-10,0 µM konsantrasyon aralığında H-Trp-Trp-OH SHP-2'nin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. Ortamda H-Trp-Trp-OH içermeyen enzim solüsyonu "kontrol olarak" kullanılmıştır. Her çubuk, iki kopya halindeki üç bağımsız deneyin ortalama ve s.d. değerlerini ifade etmektedir. Veriler arasındaki istatistiksel anlamlılık, ANOVA ile Tukey testinin kombine edildiği bir yaklaşımla değerlendirilmiştir (kontrole kıyasla <sup>a.d.</sup>P > 0,05 ve \*\*\*\*P ≤ 0,0001). (B) 0,003-10,0 µM konsantrasyon aralığında H-Trp-Trp-OH için çizilen doz-yanıt eğrisi

**Tablo 27.** SHP-2 Enzim Aktivitesi Ölçüm Deneylerinde Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitör Adayları ve SHP099 İçin Tayin Edilen SHP-2 IC<sub>50</sub> Değerleri

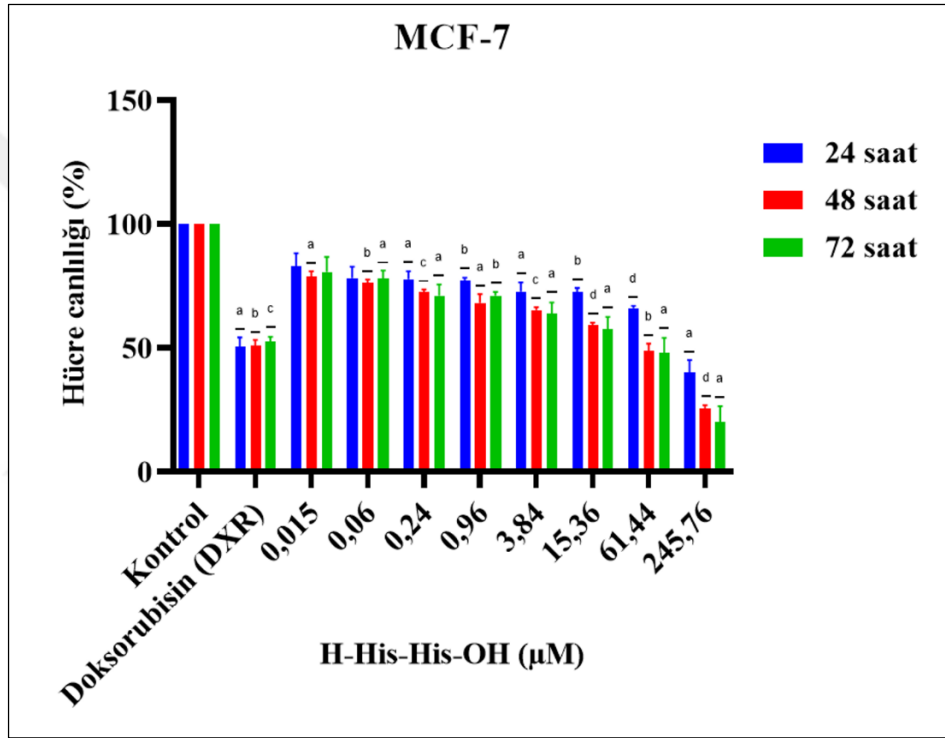
| Test Maddesi | SHP-2 IC <sub>50</sub> (µM) |
|--------------|-----------------------------|
| SHP099       | 0,047                       |
| H-His-Tyr-OH | 0,021                       |
| H-His-His-OH | 1,179                       |
| H-Trp-Trp-OH | 1,329                       |

#### MTT testi vasıtasıyla seçici antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi

*In vitro* enzim inhibisyonu deneyinde H-His-His-OH, H-His-Tyr-OH ve H-Trp-Trp-OH bileşiklerinin SHP-2 inhibisyon aktivitesinin olduğunun gösterilmesi üzerine bu bileşiklerle hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin sitotoksik ve antiproliferatif etkileri MCF-7 ve MCF10A hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde kolorimetrik bir analiz yöntemi olan MTT ile araştırılmıştır (Obeidat 2017; Al-Tamimi 2019). Her test maddesi için sekiz farklı konsantrasyon (0,015-0,06-0,24-0,96-3,84-15,36-61,44-245,76 µM) seçilmiştir. İnkübasyon sürelerinin bitiminde 570 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik analizler sonucunda MCF-7 ve MCF10A hücrelerinin canlılık oranları belirlenmiştir. Ardından bu değerler kullanılarak, bileşiklere ait hücrelerin %50'sini inhibe eden IC<sub>50</sub> dozlar GraphPad Prism 9 yazılımıyla hesaplanmıştır.

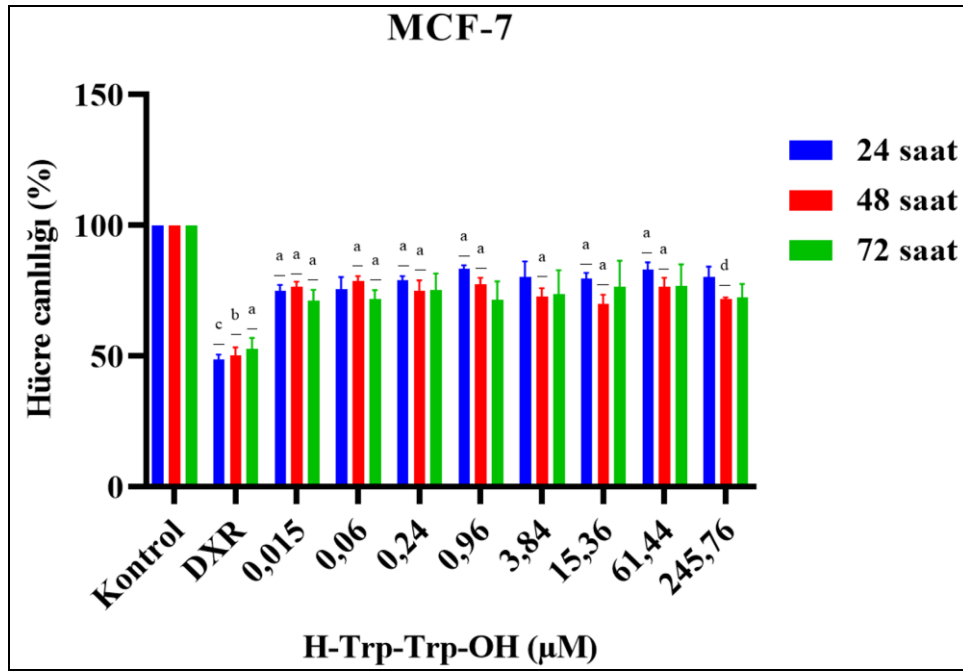
İlk test bileşiği olan H-His-His-OH ile muamele edilen MCF-7 hücre hattı için 24 saatlik inkübasyonun sonunda 0,24 µM ve üzerindeki dozlarında anlamlı sitotoksik etki gözlenirken

(<sup>a</sup>P≤ 0,05 <sup>b</sup>P≤ 0,01 <sup>d</sup>P≤ 0,0001, EK 2 ve Şekil 65), 48 saatin sonunda tüm uygulama dozlarında hücre canlılıklarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenmiştir (<sup>a</sup>P≤ 0,05 <sup>b</sup>P≤ 0,01 <sup>c</sup>P≤ 0,001 <sup>d</sup>P≤ 0,0001, EK 3 ve Şekil 65). 72 saatlik muamelede ise H-His-His-OH'nin 0,06 µM dozundan itibaren negatif kontrole göre anlamlı sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca H-His-His-OH için 0,96 µM'dan itibaren hücre canlılık değerleri doza bağlı bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (<sup>a</sup>P≤ 0,05 <sup>b</sup>P≤ 0,01, EK 4 ve Şekil 65). Sonuçlar değerlendirildiğinde, 72. saatte en yüksek dozlar olan 15,36, 61,44 ve 245,76 µM H-His-His-OH konsantrasyonlarında hücre canlılık oranlarının sırasıyla %57,6, %47,8 ve %20,1'e kadar düştüğü tespit edilmiştir (EK 4).



**Şekil 65.** 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-His-His-OH muamelesini takiben MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. Kontrol çubuğu herhangi bir işlem görmemiş hücre grubunu temsil etmektedir. Her muamele işlemi canlılığı hesaplamak için kontrole normalleştirilmiştir. Anlamlılık seviyesi <sup>a</sup>P≤ 0,05, <sup>b</sup>P≤ 0,01, <sup>c</sup>P≤ 0,001 ve <sup>d</sup>P≤ 0,0001 olarak verilmiştir.

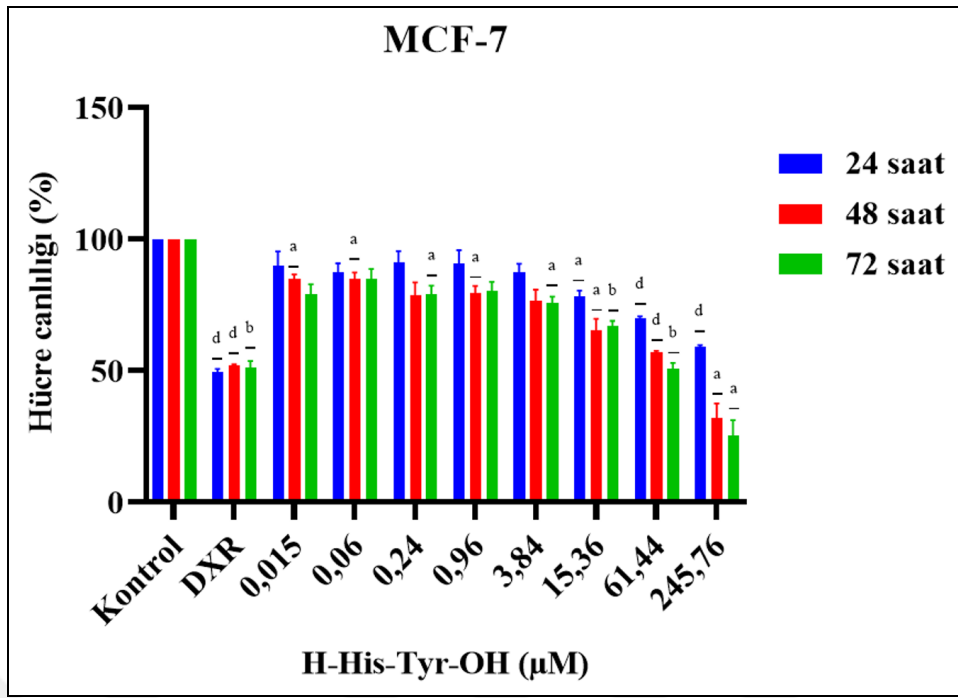
İkinci test bileşiği olan H-Trp-Trp-OH için 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonrasında elde edilen MTT sonuçlarına göre, bu bileşiğin MCF-7 hücre hattında sitotoksik aktivite gösterdiği ancak deney gruplarının hiçbirinde canlılık oranının %70'in altına düşmediği tespit edilmiştir (<sup>a</sup>P≤ 0,05 <sup>d</sup>P≤ 0,0001) (EK 5, 6, 7 ve Şekil 66). Şekil 66'daki veriler incelendiğinde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde H-Trp-Trp-OH'nin hücre canlılığını sırasıyla %74,8 ile %83,4 ve %70,1 ile %78,6'ya düşürdüğü görülmektedir. Ayrıca 72 saatlik inkübasyon süresi için MCF-7 hücrelerinin canlılık oranının %71,2 ile %76,8 arasında olduğu tespit edilmiştir (EK 7 ve Şekil 66).



**Şekil 66.** 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-Trp-Trp-OH muamelesini takiben MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. Kontrol çubuğu herhangi bir işlem görmemiş hücre grubunu temsil etmektedir. Her muamele işlemi canlılığı hesaplamak için kontrolle normalleştirilmiştir. Anlamlılık seviyesi <sup>a</sup>P≤ 0,05, <sup>b</sup>P≤ 0,01, <sup>c</sup>P≤ 0,001 ve <sup>d</sup>P≤ 0,0001 olarak verilmiştir.

Üçüncü test bileşiği olan H-His-Tyr-OH'nin MCF-7 hücre hattı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonrasında 15,36 µM ve üzeri dozlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak kontrole kıyasla anlamlı bir azalma bulunmuştur (<sup>a</sup>P≤0,05 <sup>b</sup>P≤ 0,01 <sup>d</sup>P≤ 0,0001, EK 8, 9, 10 ve Şekil 67). Ayrıca doza bağımlı olarak MCF-7 hücrelerinin canlılığındaki azalma 24 saatte 0,96-245,76 µM aralığında lineerlik göstermekte iken (EK 8 ve Şekil 67); 48. saatin sonunda H-His-Tyr-OH'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisi daha fazla olmuş ve özellikle 245,76 µM konsantrasyonda sitotoksitede önemli derecede artış (%68,1 inhibisyon) saptanmıştır (<sup>a</sup>P≤ 0,05) (EK 9 ve Şekil 67). 245,76 µM H-His-Tyr-OH uygulamasından 72 saat sonra ise hücre canlılığı %25,4'e kadar düşmüştür (EK 10 ve Şekil 67).

Beklendiği üzere bu çalışmada seçilen yeni allosterik SHP-2 inhibitörleri MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermiş olup (Şekil 65, 66 ve 67) bu bileşiklerin ilgili hücre hattındaki sitotoksitesine ait IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 28'de belirtilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra H-His-His-OH, H-His-Tyr-OH ve H-Trp-Trp-OH için sırasıyla MCF-7 IC<sub>50</sub> değerleri 3,10 µM, ≥ 245,76 µM ve ≥ 245,76 µM olarak elde edilmiştir. 48. saat için bu değerler sırasıyla 1,83 µM, 6,13 µM ve ≥ 245,76 µM olarak hesaplanmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise MCF-7 IC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 2,98 µM, 7,79 µM ve ≥ 245,76 µM olduğu belirlenmiştir.



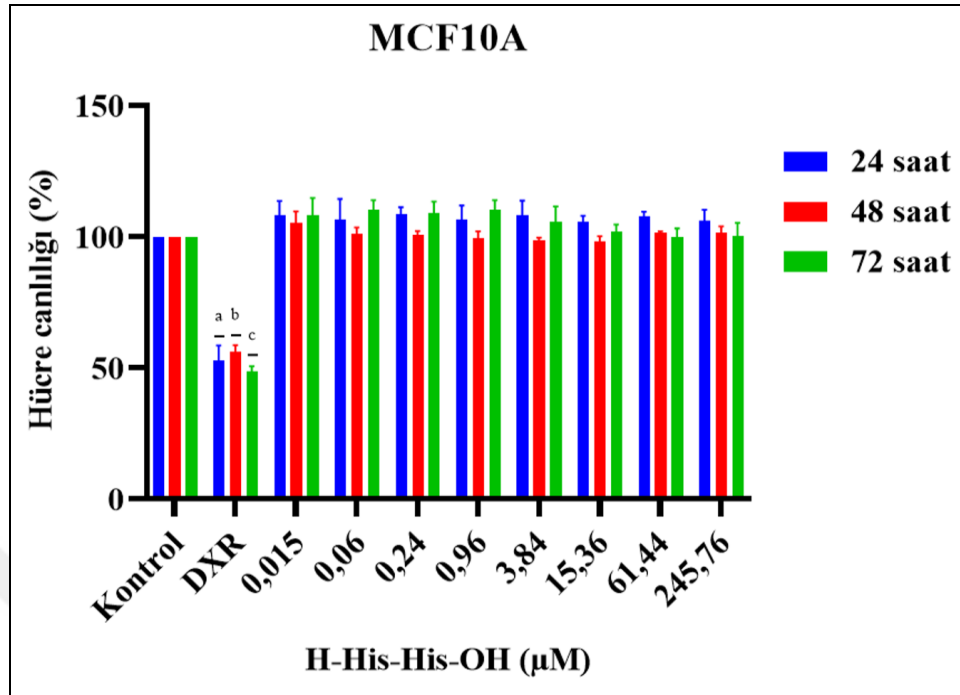
**Şekil 67.** 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 µM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-His-Tyr-OH muamelesini takiben MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. Kontrol çubuğu herhangi bir işlem görmemiş hücre grubunu temsil etmektedir. Her muamele işlemi canlılığı hesaplamak için kontrolle normalleştirilmiştir. Anlamlılık seviyesi <sup>a</sup>P ≤ 0,05, <sup>b</sup>P ≤ 0,01 ve <sup>d</sup>P ≤ 0,0001 olarak verilmiştir.

**Tablo 28.** Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitörleriyle Muamele Edilen MCF-7 Hücrelerinin 24, 48 ve 72 Saatlik İnkübasyon Periyodunda IC<sub>50</sub> Değerleri

| H-His-His-OH (µM) |         |         | H-His-Tyr-OH (µM) |         |         | H-Trp-Trp-OH (µM) |         |         |
|-------------------|---------|---------|-------------------|---------|---------|-------------------|---------|---------|
| 24 saat           | 48 saat | 72 saat | 24 saat           | 48 saat | 72 saat | 24 saat           | 48 saat | 72 saat |
| 3,10              | 1,83    | 2,98    | ≥245,76           | 6,13    | 7,79    | ≥245,76           | ≥245,76 | ≥245,76 |

H-His-His-OH, H-Trp-Trp-OH ve H-His-Tyr-OH'nin MCF10A insan sağlıklı meme epitel hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarının MTT sonuçları sırasıyla Şekil 68, 69 ve 70'te özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 saat inkübasyon süresinde 0,015-245,76 µM konsantrasyonlarda uygulanan yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerinin hücre canlılığı üzerine anlamlı bir etkisi olmamıştır ( $P > 0,05$ ) (EK 11, 14, 17). 48 saat uygulamasında H-His-His-OH (EK 12) ve H-Trp-Trp-OH (EK 15)'nin 0,015-245,76 µM aralığındaki uygulama dozları MCF10A hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki göstermemiştir ( $P > 0,05$ ). Bununla birlikte aynı dozlarda H-His-Tyr-OH (EK 18) ile muamele edilen MCF10A hücrelerinin canlılığında 0,24 µM'dan itibaren doza bağlı bir azalma meydana gelmiş olup son dört dozda anlamlı farklar görülmüştür (<sup>a</sup>P ≤ 0,05 ve <sup>d</sup>P ≤ 0,0001). 72 saat uygulamasında ise H-His-His-OH (EK 13) ve H-Trp-Trp-OH (EK 16)'ye ait uygulama dozları MCF10A hücrelerinin canlılığını en fazla sırasıyla %99,9 ve %95,5'e düşürebilmiştir. Ayrıca H-His-Tyr-OH (EK 19)'nin 72. saatte 0,24 µM ve üzerindeki dozlarında hücre canlılığında doza bağlı olarak bir

azalma tespit edilmiş ve bu bulgunun maksimum uygulama konsantrasyonları olan 61,44 ve 245,76  $\mu\text{M}$  için anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (<sup>a</sup>P $\leq$  0,05 ve <sup>d</sup>P $\leq$  0,0001).

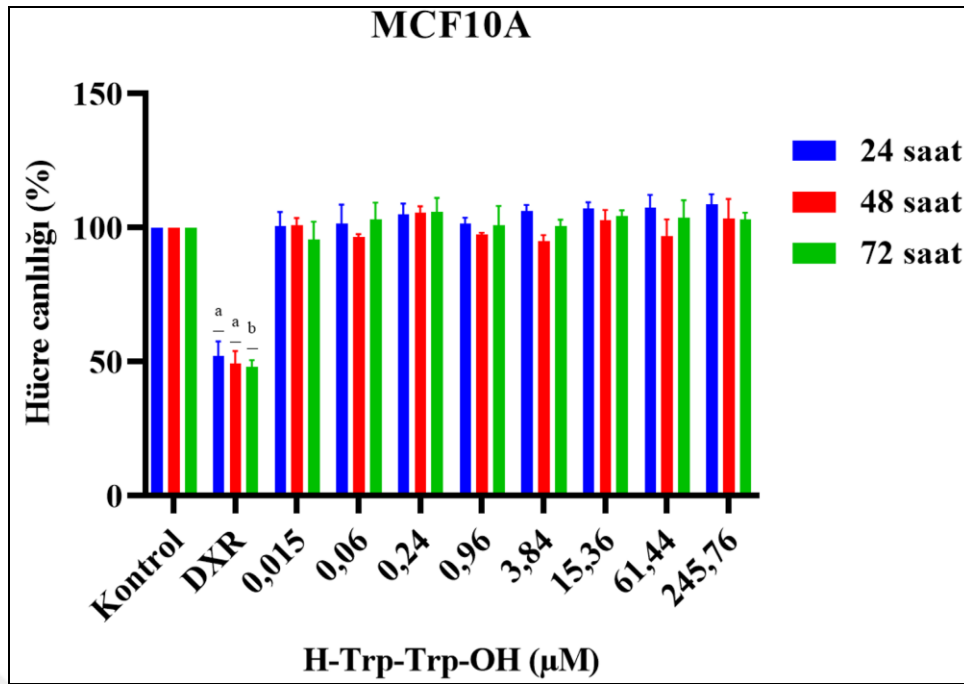


**Şekil 68.** 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76  $\mu\text{M}$  aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-His-His-OH muamelesini takiben MCF10A hücrelerinin canlılık yüzdeleri. Kontrol çubuğu herhangi bir işlem görmemiş hücre grubunu temsil etmektedir. Her muamele işlemi canlılığı hesaplamak için kontrolle normalleştirilmiştir. Anlamlılık seviyesi <sup>a</sup>P $\leq$  0,05, <sup>b</sup>P $\leq$  0,01 ve <sup>c</sup>P $\leq$  0,001 olarak verilmiştir.

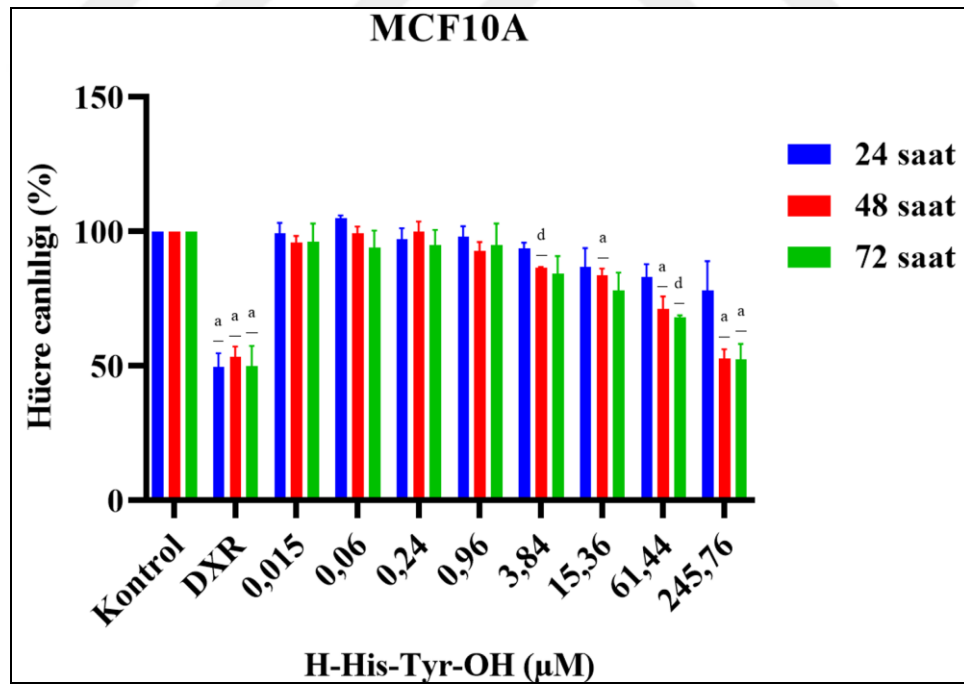
MCF10A hücre hattında yeni allosterik SHP-2 inhibitörleri için hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 29'da ifade edilmiştir. Buna göre H-His-His-OH ve H-Trp-Trp-OH'nin IC<sub>50</sub> değerleri 24, 48 ve 72 saat için  $\geq$  245,76  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. H-His-Tyr-OH ise 24 saatte  $\geq$  245,76  $\mu\text{M}$  IC<sub>50</sub> değerine sahipken, 48. ve 72. saatler için bu bileşiğin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 22,64  $\mu\text{M}$  ve 14,19  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 2.** Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitörlerinin Uygulandığı MCF10A Hücre Hattında MTT Canlılık Testi Sonuçlarına Göre IC<sub>50</sub> Değerleri

| H-His-His-OH ( $\mu\text{M}$ ) |               |               | H-His-Tyr-OH ( $\mu\text{M}$ ) |         |         | H-Trp-Trp-OH ( $\mu\text{M}$ ) |               |               |
|--------------------------------|---------------|---------------|--------------------------------|---------|---------|--------------------------------|---------------|---------------|
| 24 saat                        | 48 saat       | 72 saat       | 24 saat                        | 48 saat | 72 saat | 24 saat                        | 48 saat       | 72 saat       |
| $\geq$ 245,76                  | $\geq$ 245,76 | $\geq$ 245,76 | $\geq$ 245,76                  | 22,64   | 14,19   | $\geq$ 245,76                  | $\geq$ 245,76 | $\geq$ 245,76 |



**Şekil 69.** 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 μM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-Trp-Trp-OH muamelesini takiben MCF10A hücrelerinin canlılık yüzdeleri. Kontrol çubuğu herhangi bir işlem görmemiş hücre grubunu temsil etmektedir. Her muamele işlemi canlılığı hesaplamak için kontrolle normalleştirilmiştir. Anlamlılık seviyesi <sup>a</sup>P ≤ 0,05 ve <sup>b</sup>P ≤ 0,01 olarak verilmiştir.



**Şekil 70.** 24, 48 ve 72. saat boyunca 0,015-245,76 μM aralığında bulunan sekiz farklı dozda H-His-Tyr-OH muamelesini takiben MCF10A hücrelerinin canlılık yüzdeleri. Kontrol çubuğu herhangi bir işlem görmemiş hücre grubunu temsil etmektedir. Her muamele işlemi canlılığı hesaplamak için kontrolle normalleştirilmiştir. Anlamlılık seviyesi <sup>a</sup>P ≤ 0,05 ve <sup>d</sup>P ≤ 0,0001 olarak verilmiştir.

MTT testi sonucunda kanser (MCF-7) hücre hattına karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlenen bileşiklerin tümör selektivitesi sağlıklı (MCF10A) hücre hattına karşı araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 30’da sunulmuştur. Buna göre H-His-His-OH için 24., 48. ve 72. saatlerde MCF10A dizisine karşı belirgin bir seçicilik (yaklaşık olarak 75 kat veya daha fazla) gözlenmiştir. H-His-Tyr-OH’nin ise MCF-7 hücrelerine karşı yalnızca 48. saat inkübasyon süresinde 3,7 kat daha fazla seçiciliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

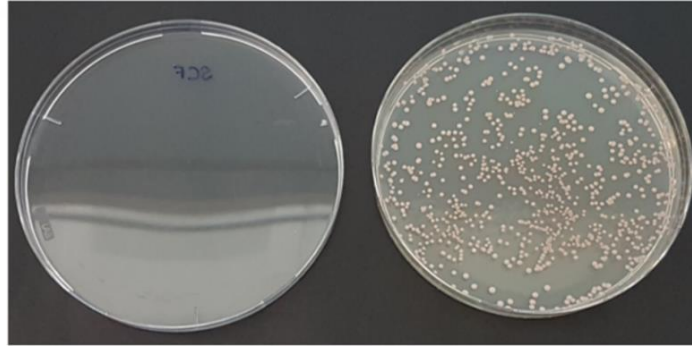
**Tablo 30.** Yeni Allosterik SHP-2 İnhibitörlerinin MCF-7 Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi İçin Hesaplanan SI Değerleri

| Bileşik İsmi | 24 saat     | 48 saat      | 72 saat     |
|--------------|-------------|--------------|-------------|
| H-His-His-OH | $\geq 79,3$ | $\geq 134,3$ | $\geq 82,5$ |
| H-His-Tyr-OH | -           | 3,7          | 1,8         |
| H-Trp-Trp-OH | -           | -            | -           |

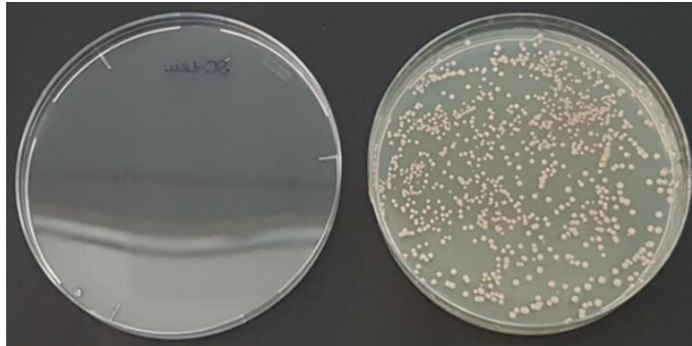
### Maya DEL test sistemi ile genotoksik özelliklerin tayini

#### Lösin gereksinimi

Çalışmada kullanılan mutant *S. cerevisiae* RS112 suşunun hem SCF (Şekil 71) hem de SC-Leu-K (Şekil 72) besiyeri içeren plaklarda üremesi sonucunda bu suşun leu<sup>+</sup> karakteri yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir.



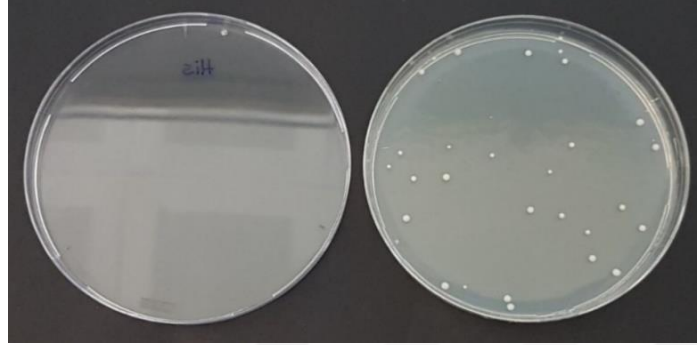
**Şekil 71.** *S. cerevisiae* RS112 suşunda üreme için lösin gereksinimini gösteren SCF besiyeri içeren bir plak örneği



**Şekil 72.** *S. cerevisiae* RS112 suşunda üreme için lösin gereksinimini gösteren SC-Leu-K besiyeri içeren bir plak örneği

### **Histidin gereksinimi**

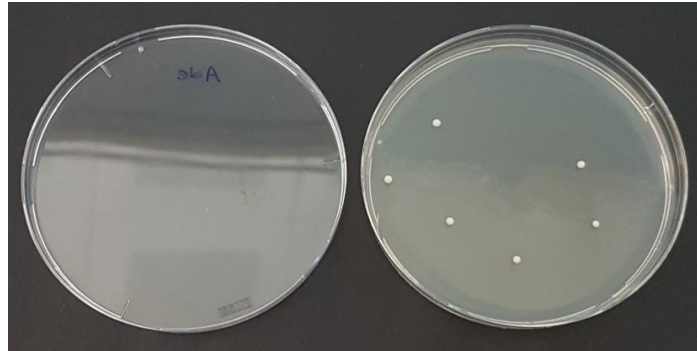
Mutant *S. cerevisiae* RS112 suşu, Şekil 71’de gösterildiği üzere, SCF besiyeri plaklarında üremiş ancak SC-His besiyeri içeren petrilerde üreme gözlenmemiştir (Şekil 73). Böylece bu suşun his<sup>-</sup> karakteri yönünden oksotrof olduğu kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır.



**Şekil 73.** *S. cerevisiae* RS112 suşunda üreme için histidin gereksinimini gösteren SC-His besiyeri içeren bir plak örneği

### **Adenin gereksinimi**

Çalışmamızda kullandığımız *S. cerevisiae* RS112 suşu, Şekil 71’de gösterildiği üzere, SCF besiyeri plaklarında üremiş olup SC-Ade besiyeri içeren petrilerde ürememiştir (Şekil 74). Böylece bu suşun ade<sup>-</sup> karakteri yönünden oksotrof olduğu kontrol edilerek doğrulama yapılmıştır.



**Şekil 74.** *S. cerevisiae* RS112 suşunda üreme için adenin gereksinimini gösteren SC-Ade besiyeri içeren bir plak örneği

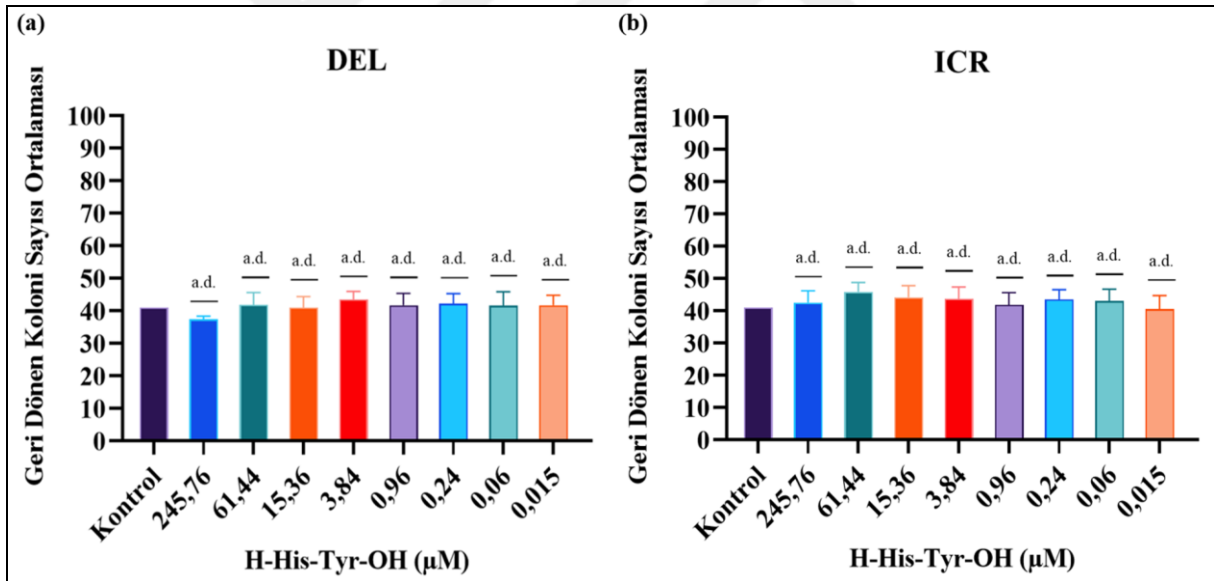
### **Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi**

Bu çalışmada pozitif mutajen olarak kullanılan EMS’nin *S. cerevisiae* RS112 suşu için toksik olmayan dozu 100 µg/petri olarak belirlenmiştir (Sezen *et al.* 2019). Ayrıca yeni allosterik SHP-2 inhibitörleri ve SHP099’un uygulama konsantrasyonlarının seçilmesinde bu maddeler için *in vitro* SHP-2 enzim inhibisyonu deneyinde tayin edilen SHP-2 IC<sub>50</sub> değerleri

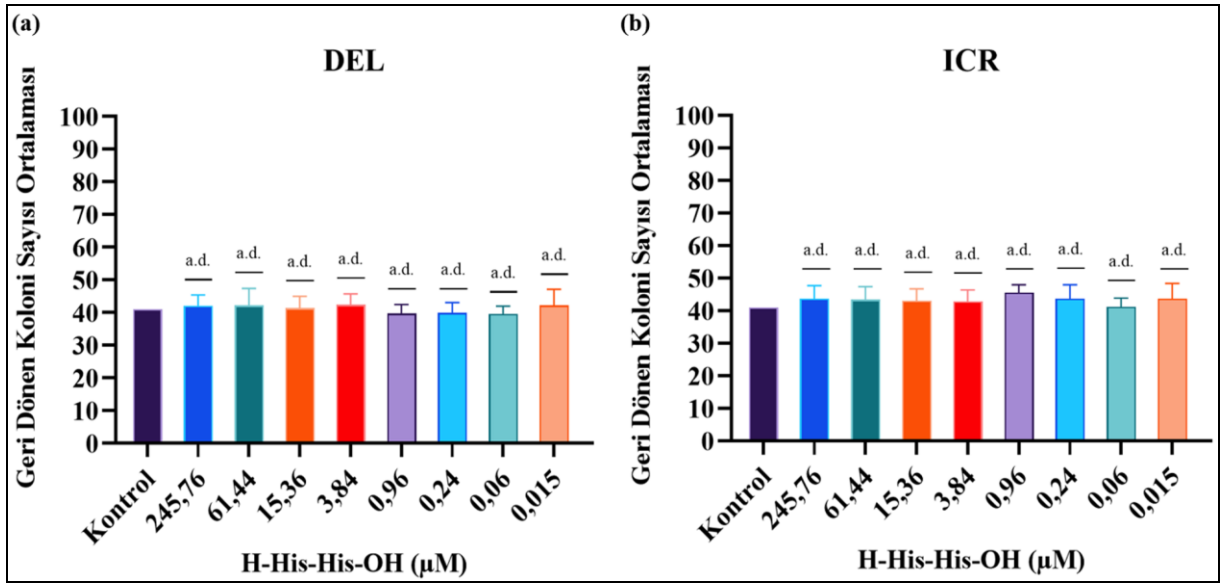
dikkate alınmıştır. Böylece test bileşikleri için sitotoksik etkilerin gözlenmediği üst konsantrasyon sınır değeri petri kabı başına 245,76  $\mu$ M olarak tayin edilmiştir.

### Yeni SHP-2 allosterik inhibitörleri ve SHP099'un mutajenik özellikleri

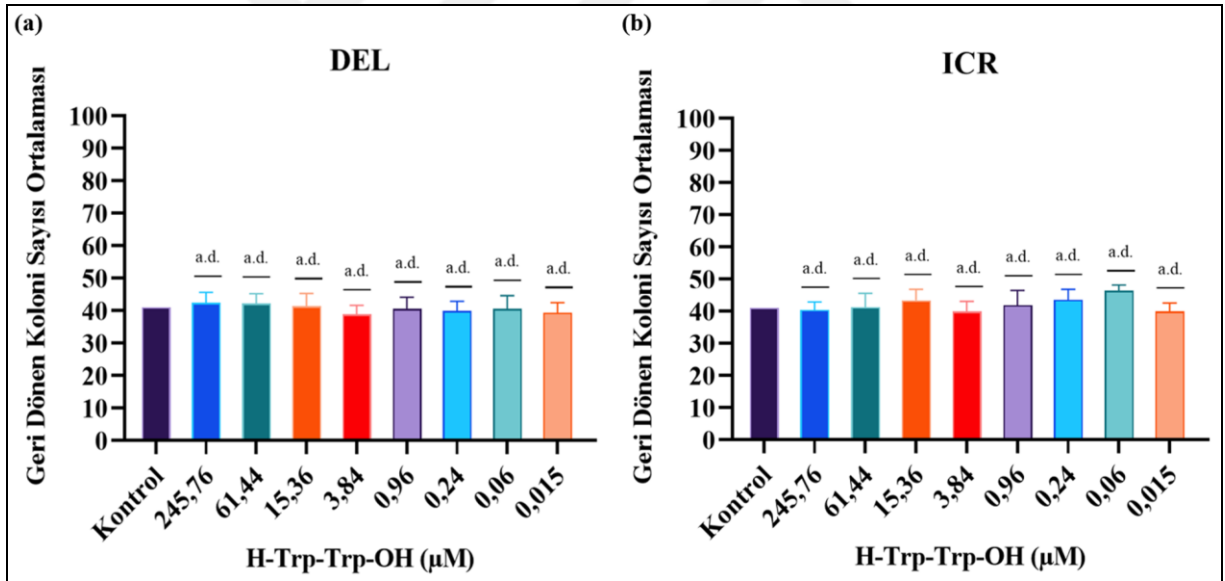
Çalışmada mutant *S. cerevisiae* RS112 suşu kullanılarak yapılan mutajenite deneylerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarına ilaveten test gruplarından elde edilen sonuçların ortalaması EK 20'de verilmiştir. EK 20'ye göre yeni allosterik SHP-2 inhibitörleri ve SHP099 bileşiği *S. cerevisiae* RS112 suşu üzerinde intrakromozomal dönüşüm (DEL) açısından %0,91 ila %1,07 ve interkromozomal dönüşüm (intrachromosomal homologous recombination; ICR) açısından ise %0,94 ila %1,11 arasında mutajenik etkinlikler göstermiştir. Buradan hareketle test bileşiklerinin 0,015-245,76  $\mu$ M doz aralığında uygulanan hiçbir konsantrasyonunun herhangi bir mutajenik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 75, 76, 77 ve 78). Ayrıca bileşiklerin SC-His ve SC-Ade besiyerlerine ekilen mutant maya suşunda sırasıyla %5,48 ve %4,54 oranında mutasyona neden olan EMS'den oldukça düşük bir mutajenite potansiyeline sahip oldukları bulunmuştur (EK 20).



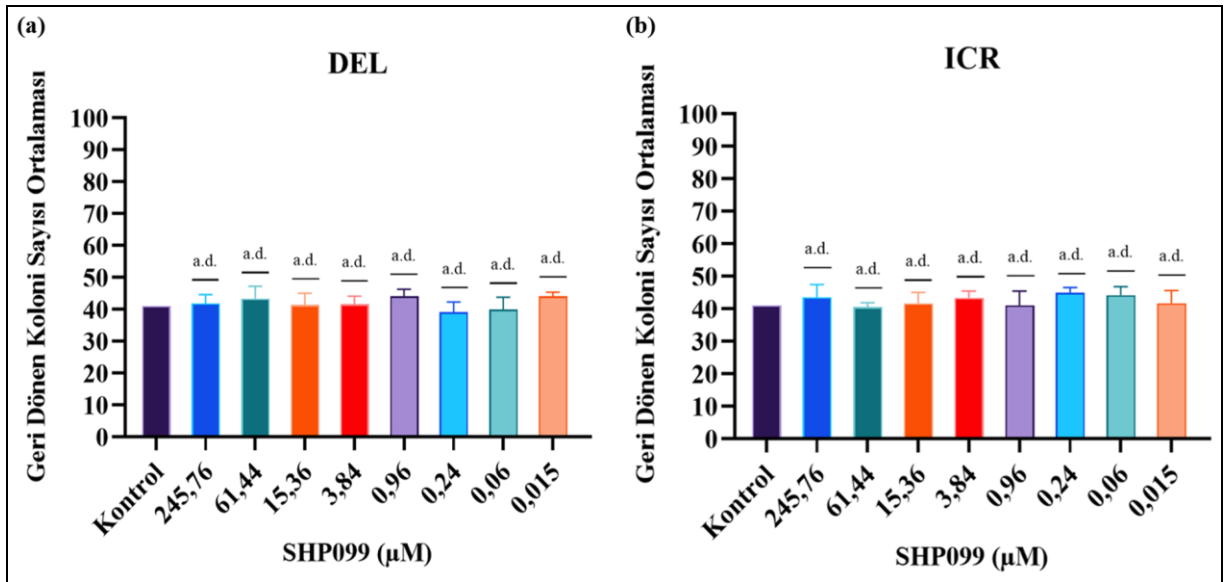
**Şekil 75.** 0,015-245,76  $\mu$ M doz aralığında H-His-Tyr-OH'nin negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *S. cerevisiae* RS112 suşunda (a) DEL ve (b) ICR tipi mutasyonlar meydana getirme sıklığı. Her çubuk iki kopya halinde gerçekleştirilen birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama  $\pm$  s.d.'sini ifade etmektedir. Veriler arasındaki istatistiksel anlamlılığın belirlenebilmesi için tek yönlü ANOVA ve Tukey testleri kullanılmıştır (kontrolle göre  $a.d. P > 0,05$ ).



**Şekil 76.** 0,015-245,76 µM doz aralığında H-His-His-OH'nin negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *S. cerevisiae* RS112 suşunda (a) DEL ve (b) ICR tipi mutasyonlar meydana getirme sıklığı. Her çubuk iki kopya halinde gerçekleştirilen birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama  $\pm$  s.d.'sini ifade etmektedir. Veriler arasındaki istatistiksel anlamlılığın belirlenebilmesi için tek yönlü ANOVA ve Tukey testleri kullanılmıştır (kontrolle göre  $a.d.P > 0,05$ ).



**Şekil 77.** 0,015-245,76 µM doz aralığında H-Trp-Trp-OH'nin negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *S. cerevisiae* RS112 suşunda (a) DEL ve (b) ICR tipi mutasyonlar meydana getirme sıklığı. Her çubuk iki kopya halinde gerçekleştirilen birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama  $\pm$  s.d.'sini ifade etmektedir. Veriler arasındaki istatistiksel anlamlılığın belirlenebilmesi için tek yönlü ANOVA ve Tukey testleri kullanılmıştır (kontrolle göre  $a.d.P > 0,05$ ).



**Şekil 78.** 0,015-245,76 µM doz aralığında SHP099'un negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *S. cerevisiae* RS112 suşunda (a) DEL ve (b) ICR tipi mutasyonlar meydana getirme sıklığı. Her çubuk iki kopya halinde gerçekleştirilen birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama  $\pm$  s.d.'sini ifade etmektedir. Veriler arasındaki istatistiksel anlamlılığın belirlenebilmesi için tek yönlü ANOVA ve Tukey testleri kullanılmıştır (kontrolle göre  $a.d. P > 0,05$ ).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan doktora tez çalışmasında çeşitli *in silico* teknikler kullanılarak seçilimi yapılan 3 adet yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayının SHP-2 enzim inhibitörü aktiviteleri, MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerindeki seçici sitotoksik-antiproliferatif etkileri ve genotoksik özellikleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu moleküller doğal ürünler olup her biri dipeptit yapısındadır.

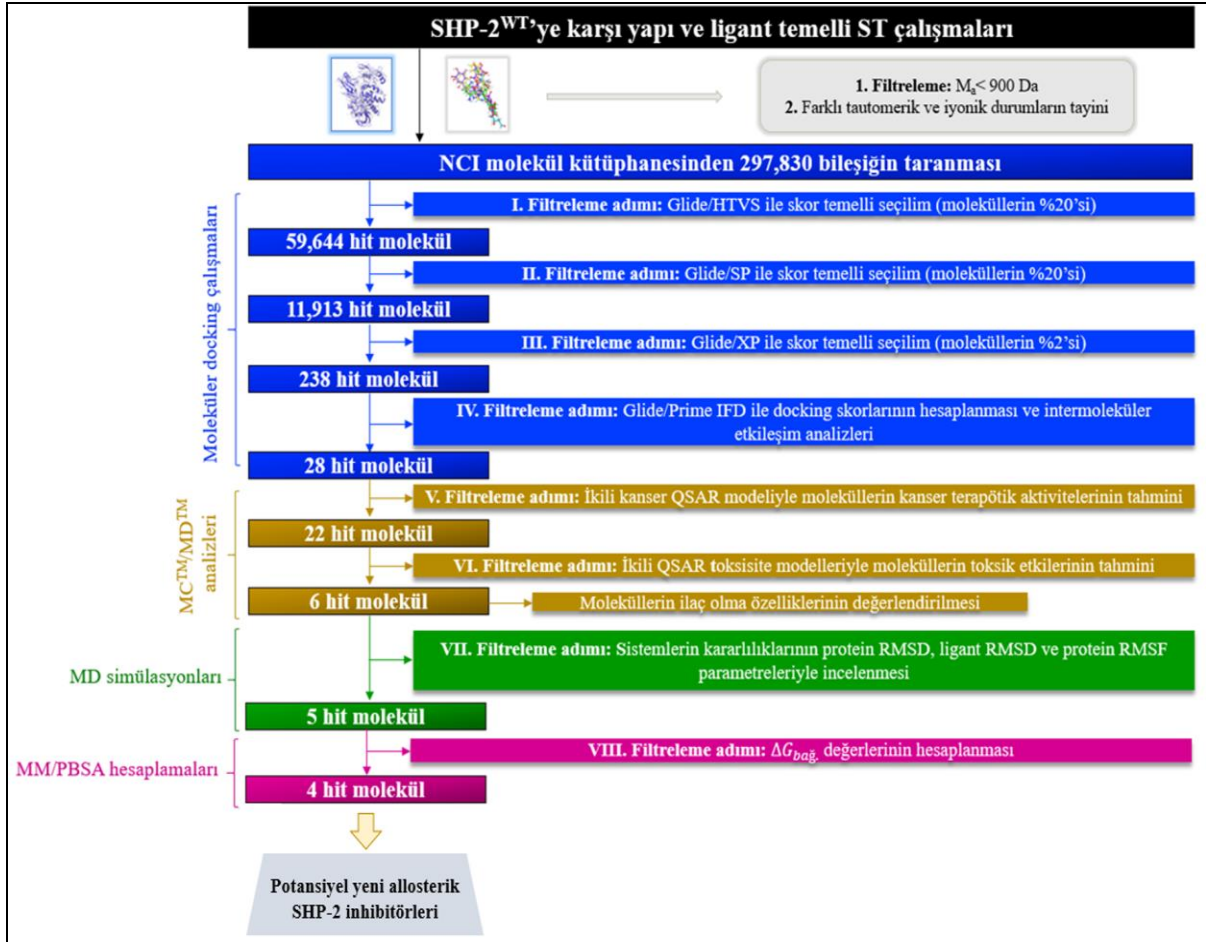
Araştırmanın amacı doğrultusunda ilk aşamada moleküler docking tabanlı SBVS yöntemleri ve MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> analizlerinin sıralı kombinasyonunu içeren hesaplamalı bir metodoloji vasıtasıyla “yeni allosterik SHP-2 inhibitörü” özelliğinde 3 adet molekül tanımlanmıştır. Ardından çalışmamızda bu moleküllerin her birinin güçlü birer allosterik SHP-2 inhibitörü oldukları literatürde ilk kez rapor edilmiştir. Ayrıca bu bileşiklerden iki tanesinin MCF-7 kanser hücre hattına karşı seçici sitotoksik-antiproliferatif etki gösterdiği ilk kez belirlenmiş ve bu moleküllerin genotoksik aktiviteye sahip olmadığı da literatüre ilk defa sunulmuştur.

### Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Çalışmaları

Genel olarak yeni bir ilacın ilk geliştirme aşamalarında yer alan deneysel çalışmalar para, zaman ve insan gücü açısından yüksek maliyetler gerektirmektedir. Buna karşılık bu süreçte büyük çaplı molekül kütüphanelerinin zaman ve maliyet etkili bir şekilde taranmasına olanak sağlayan ST gibi hesaplamalı ilaç tasarım tekniklerinin kullanımı, ilaç geliştirmenin klinik öncesi aşamaları için gereken süreyi ve maliyeti büyük oranda azaltabilmektedir (Gebregabzhier 2017).

Halihazırdaki yapı ve ligant temelli moleküler modelleme yöntemleri, ilaç keşif sürecindeki ST çalışmalarında potansiyel ilaç adayları olarak yeni bileşiklerin tanımlanması amacıyla geçmişten günümüze kadar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda bir biyolojik sistemle ilgili olası tüm bilgiler hesaba katıldığından dolayı ligant ve yapı temelli yöntemlerin bir arada kullanılmasının oldukça etkili olabileceği varsayılmaktadır. Sıralı, paralel ve hibrit olmak üzere yapı ve ligant temelli yöntemlerin kombinasyonunda kullanılabilecek üç ana yaklaşım mevcuttur (Drwal and Griffith 2013). Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen *in silico* analizlerde “sıralı kombinasyon” yaklaşımı kullanılmıştır. Böylece *in vitro* testler için elde edilecek hit bileşiklerin sayısı belirli bir sayıya azaltılınca dek çeşitli yapı ve ligant temelli yöntemler Şekil 79’da gösterilen ST boru hattı içerisinde uygulanmıştır. Bununla

birlikte son yıllarda yapı ve ligant temelli yaklaşımların sıralı kombinasyonu ile yeni hit bileşiklerin elde edildiği birkaç başarılı uygulama rapor edilmiştir (Dawood *et al.* 2018; Alamri and Alamri 2019; Khan *et al.* 2019).

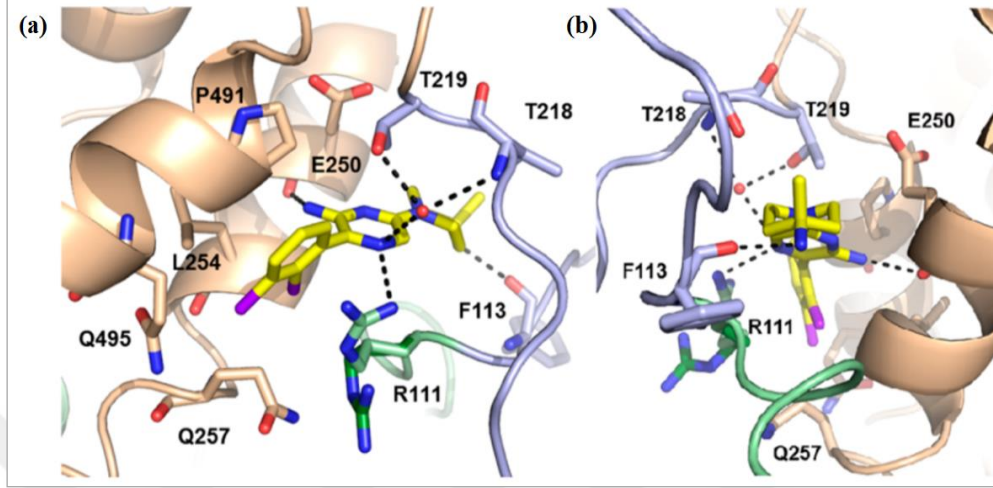


**Şekil 79.** Bu tez kapsamında SHP-2'nin yeni potansiyel allosterik inhibitörlerinin keşfedilmesine yönelik yapı ve ligant temelli hesaplamalı tekniklerin kombine edildiği çalışmalarda kullanılan iş akış diyagramı

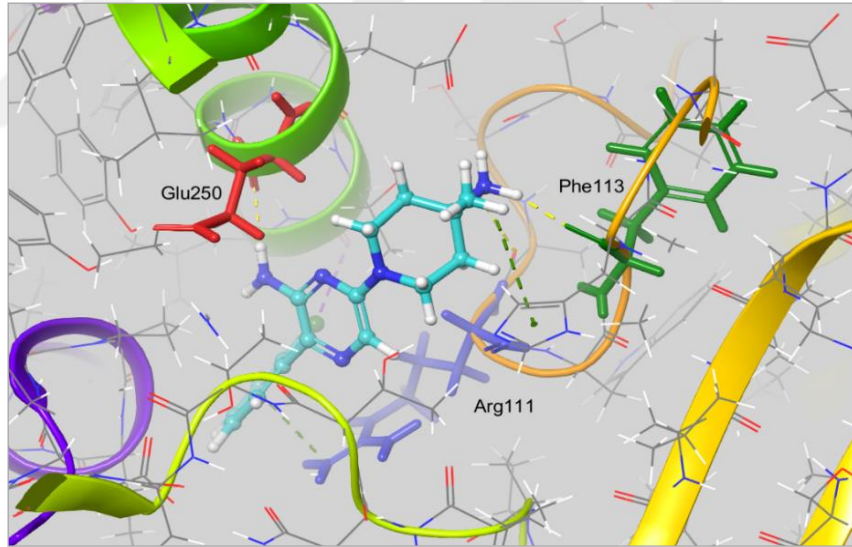
### Protein üzerindeki allosterik bağlanma bölgesinin değerlendirilmesi

Allosterik SHP-2 inhibitörü olan SHP099 (PDB kodu: 5EHR) ile kompleks halindeki SHP-2<sup>WT</sup>'nin allosterik bölgesine ait kristal yapısı PDB'den indirilmiştir. Daha önce literatürde bu proteinin allosterik cebinde bulunan bağlanmadan sorumlu kritik amino asit rezidülerinin Arg111, Phe113 ve Glu250 olduğu bildirilmiştir (Şekil 80) (Garcia Fortanet *et al.* 2016; Tong *et al.* 2021). Benzer şekilde, bu çalışmada moleküler docking tabanlı SBVS uygulamaları için kullanılan SHP2-SHP099 kompleksine ait başlangıç kristal yapısındaki SHP099'un doğal bağlanma pozunda; bu kritik amino asit rezidülerinin her biriyle önemli intermoleküler etkileşimlerin var olduğu tespit edilmiştir (Şekil 81). Buna göre 2-aminopirazin halkasının amino (-NH<sub>2</sub>) grubu Glu250; 4-amino-4-metil-1-piperidin halkasındaki -NH<sub>2</sub> grubu ise Phe113 ve Arg111 ile birer adet hidrojen bağ etkileşimi yapmaktadır. Ayrıca Şekil 81'den SHP099'un

2,3-diklorofenil halkasıyla proteinin Arg111 kalıntısı arasında bir katyon- $\pi$  etkileşimi olduğu görülmektedir (Garcia Fortanet *et al.* 2016). Bu bulgular hem *in silico* hem de *in vitro* çalışmalar sırasında referans olarak kullanılan SHP099 bileşiğinin SHP-2 proteininin allosterik bölgesinde bulunan kritik amino asit rezidüleriyle etkileştiğini açıkça ortaya koymaktadır.



**Şekil 80.** SHP099 ve SHP-2<sup>WT</sup> enziminin X-ışını kristal yapısı, rezolüsyon: 1,7 Å (PDB kodu: 5EHR). (a) SHP099 ve Arg111'in kurduğu katyon- $\pi$  etkileşimi, (b) SHP099'un 4-aminopiperidin halkasının Phe113 kalıntısıyla etkileşimi (Garcia Fortanet *et al.* 2016)



**Şekil 81.** SHP-2<sup>WT</sup>'nin allosterik bağlanma cebinde bulunan SHP099'un doğal bağlanma pozunu ve bu bölgedeki kritik amino asit rezidüleriyle kurduğu önemli etkileşimleri göstermektedir. (sarı ve yeşil kesikli çizgiler sırasıyla hidrojen bağ ve katyon- $\pi$  etkileşimlerini göstermektedir.)

### Moleküler docking protokolünün validasyonu

Literatürde bugüne dek moleküler docking çalışmalarında kullanılan programların ve skorlama fonksiyonlarının doğrulanması amacıyla bir dizi yöntem bildirilmiştir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan metotlardan biri “poz seçimi”dir. Poz seçimi yönteminde tipik bir ko-kristal yapısından bilinen doğal konformasyona ve oryantasyona sahip olan bir bileşik, docking programları vasıtasıyla hedefin bağlanma bölgesine yeniden kenetlenmektedir. Bu işlem

sonucunda, ligantın doğal konformasyonu ve yeniden kenetlenme pozu için genellikle 2,0 Å RMSD değerinin altında pozlar üretebilen docking programlarında kullanılan algoritmalar başarılı olarak addedilmektedir (Hevener *et al.* 2009; Cerqueira *et al.* 2015).

Buna göre ko-kristal yapısında bulunan SHP099'un doğal bağlanma konformasyonu ve farklı Glide docking metodolojileri tarafından üretilen yeniden kenetlenme pozları arasında hesaplanan RMSD değerleri Tablo 18'den incelendiğinde, tüm docking pozlarında ligantın ağır atomlarının RMSD değerlerinin 2,0 Å'den daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca SHP099'a ait Glide/HTVS, Glide/SP, Glide/XP ve Glide/Prime IFD yeniden kenetlenme pozlarının her biri, SHP099'un ko-kristal yapısındaki doğal bağlanma pozuyla iyi bir uyum içerisindedir (Şekil 44). Elde edilen bu sonuçlar, mevcut çalışmada kullanılan hiyerarşik Glide docking protokolünün doğruluğunu ve bu protokolün SHP-2'nin allosterik bölgesiyle NCI veritabanındaki ligantlar arasında oluşturulan intermoleküler etkileşimleri değerlendirmede güvenle kullanılabileceğini göstermektedir (Abu Khalaf *et al.* 2015; Antony and Vijayan 2015).

### **Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmaları**

Günümüzde moleküler docking tekniği çeşitli kimyasal veritabanlarının SBVS çalışmalarına entegrasyonu ile belirli bir hedefe yönelik umut vadeden bileşiklerin tanımlanmasında ideal bir protokol haline gelmiştir. Bununla birlikte ilgili teknik hesaplamalı olarak daha ucuz ve nispeten güvenilir olması nedeniyle farmasötik araştırmalar yapan gruplar tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yousuf *et al.* 2017; Bhowmick *et al.* 2021; Mukherjee *et al.* 2022).

Moleküler docking tabanlı SBVS çalışmalarımızda ligantların bağlanma konformasyonlarının tahmin edilmesinde doğruluk oranı ileri yönde artan bir biçimde farklı algoritmalara dayanan teknikler kullanılmıştır. Bu yaklaşımların her birinden çıktı olarak elde edilen moleküllerin değişiklik göstermesinin nedeni kullanılan algoritmaların, skorlama fonksiyonlarının ve ligantların örneklendirme yöntemlerinin farklılığından kaynaklanmaktadır (Salmas *et al.* 2016; Elekofehinti *et al.* 2021).

Çalışmamızda hedef biyomolekül olarak SHP-2 düşünüldüğünde, 265,242 adet bileşik içeren NCI veritabanındaki kimyasal kütüphanesinin sanal olarak taranması amacıyla sırasıyla Glide/HTVS, Glide/SP, Glide/XP ve Glide/Prime IFD metodolojilerini içeren dört seviyeli bir moleküler docking çalışması yürütülmüştür (Şekil 38). Bununla birlikte allosterik SHP-2 inhibitörü olabilecek yeni hit bileşiklerin tanımlanmasında son aşamada Glide/Prime IFD algoritmasıyla hesaplanan docking skorları (Tablo 19) ve öngörülen protein-ligant etkileşimleri (Şekil 45) esas alınmıştır (Chintha *et al.* 2020; Allegra *et al.* 2021; Elekofehinti *et al.* 2021).

Bunun nedeni olarak, Glide/Prime IFD metodolojisinin  $\Delta G$  hesaplamalarına bir proteinin bağlanma bölgesindeki amino asitlerin yanı sıra ligantların konformasyonel değişikliklerini de dahil ederek; ilgili ligant bağlanma pozlarını daha doğru olarak tahmin edebilme kapasitesine sahip olması gösterilebilir (Sayın 2019; Miller *et al.* 2021).

Moleküler docking çalışmalarında kullanılan hiyerarşik Glide docking prosedürünün son basamağında hit ligantlar olarak belirlenen 28 adet molekülün Glide/HTVS, Glide/SP, Glide/XP ve Glide/Prime IFD metotlarıyla hesaplanan docking skorları sırasıyla -5,71 ila -8,83 kkal/mol, -6,93 ila -9,51 kkal/mol, -8,01 ila -12,29 kkal/mol ve -7,55 ila -17,39 kkal/mol aralıklarında yer almaktadır (Tablo 19). Tablo 19'daki verilerden Glide/Prime IFD metoduyla, kenetleme işlemi esnasında sadece ligant yapılarının esnek tutulduğu algoritmalar olan Glide/HTVS, Glide/SP ve Glide/XP metotlarına kıyasla bağlanma serbest enerjisi açısından daha negatif değerlere ulaşıldığı anlaşılmaktadır. Bu durum docking tekniğiyle ST'de hit ligantların bağlanma modlarının doğru bir şekilde öngörülmesinde protein yapısının esnek olarak ele alınmasının önemine vurgu yapmaktadır (Lexa and Carlson 2012; Medina-Franco *et al.* 2014).

Çalışmada Glide/Prime IFD docking skoruna dayalı olarak tasarlanan 238 adet molekül arasından SHP-2'nin allosterik bölgesinde yer alan intermoleküler etkileşimler dikkate alınarak, anahtar etkileşimleri birinci veya ikinci docking pozlarında gösteren 28 adet hit molekül seçilmiştir. Seçilen bu ligantların Glide/Prime IFD metoduyla elde edilen moleküler docking skorları Tablo 19'da verilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarla çeşitli hit ligantlar için elde edilen daha düşük docking skorlarının, bu ligantların biyolojik bir hedefe bağlanmasında kararlılıklarının daha yüksek olmasına yol açtığı bildirilmiştir (Fatriansyah *et al.* 2022a, 2022b; Kouassi *et al.* 2022). Böylece çalışmada seçilen 28 hit ligant arasından ilk 23 tanesinin IFD docking skorunun (-9,74 ila -17,39 kkal/mol) SHP099'unkinden (-9,59 kkal/mol) daha yüksek olduğunun belirlenmesiyle, bu moleküllerin SHP-2 enzimine karşı SHP099'dan daha iyi bir bağlanma afinitesi gösterebileceği açıkça ortaya konulmuştur (Nisha *et al.* 2016; Veerasamy and Karunakaran 2022).

28 adet hit liganta ait bağlanma modlarını daha detaylı araştırmak için SHP-2 proteini ve bu ligantlar arasındaki etkileşimler 3D diyagramlar olarak Şekil 45'teki gibi oluşturulmuş ve bu diyagramların her birinde gözlemlenen protein-ligant etkileşimleri Tablo 20'de verilmiştir. Tablo 20 ve Şekil 45'ten, 28 hit ligantın, genel olarak hidrojen bağ etkileşimleri, tuz köprüleri, hidrofobik etkileşimler, katyon- $\pi$  ve  $\pi$ -istifleme etkileşimleri yoluyla SHP-2'nin allosterik bölgesine iyi bir şekilde yerleştiği anlaşılmaktadır. Bu tip etkileşimler günümüzde güçlü allosterik SHP-2 inhibitörleri oldukları bilinen Phe-Asp (Kostrzewa *et al.* 2018), 2-(4-

(aminometil)piperidin-1-il)-5-(2,3-diklorofenil)piridin-3-il)metanol (Liu *et al.* 2020b), 3,4,6-trihidroksi-5-okso-5*H*-benzo[7]anulen (Kim *et al.* 2020), IACS-13909 (Sun *et al.* 2020) ve RMC-4550 (Wang *et al.* 2020c) için de bildirilmiştir.

Literatürde daha önce Garcia Fortanet *et al.* (2016) ve Song *et al.* (2021b) tarafından rapor edildiği üzere güçlü bir allosterik SHP-2 inhibitörü olan SHP099'un SHP-2 proteiniyle birlikte oluşturduğu kristal yapısında (PDB kodu: 5EHR) Arg111, Phe113 ve Glu250 ile anahtar hidrojen bağlarının yanı sıra Arg111 ile katyon- $\pi$  etkileşimi mevcuttur. Bununla birlikte Jin *et al.* (2018) yaptıkları çalışmalarında, SHP099'un SHP-2'nin allosterik bölgesine kenetlenmesinin Thr108, Glu110, Glu249, Thr253, Leu254 ve Gln495 gibi amino asit kalıntılarıyla yüklü etkileşimler; His114, Thr218, Thr219, Gln257, Pro491 ve Lys492 kalıntılarıyla ise hidrofobik etkileşimler ve van der Waals etkileşimleri meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Tablo 20 ve Şekil 45'teki 3D protein-ligant etkileşim diyagramlarından; 28 adet hit ligantın SHP-2'ye bağlanmasında allosterik bölgede kurulan anahtar hidrojen bağ etkileşimlerinin, SHP099'un sahip olduğu bu türden etkileşimlerle uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca 9 adet hit ligant, SHP099'a benzer şekilde, Glu249 ile tuz köprüsü etkileşimi göstermiştir. Ek olarak SHP099'un diklorofenil halkasının Arg111 ile oluşturduğu bir adet katyon- $\pi$  etkileşimini NSC77009, NSC374121, NSC524592 ve NSC201462 kodlu hit ligantlarda sırasıyla 3,4,5-trihidroksibenzoat, 4-hidroksifenil, 1*H*-indol-3-il ve 1*H*-1,3-benzodiazol-2-il halkalarının sağladığı belirlenmiştir. SHP099 ile benzer etkileşimlerin yanı sıra 28 adet hit ligantın her birinin Glu110, His114, Gly115, Leu216, Asn217, Thr218, Thr219, Arg229, Glu232, Thr253, Gln257, Lys260, Pro491, Lys492 ve Gln495 rezidülerinden en az biriyle SHP099'dan farklı olarak hidrojen bağ etkileşimleri yaptığı tespit edilmiştir. İlave, bu ligantların birçoğu Phe113, Leu125, Leu233, Leu254 ve Pro491 ile hidrofobik etkileşimler meydana getirmiştir (Tablo 20 ve Şekil 45) (Wu *et al.* 2019; Mitra and Ayyannan 2021). Böylece çalışmamızda moleküler etkileşim analizi sonuçları, 28 adet hit ligantın, literatürle uyumlu şekilde SHP-2 proteiniyle kararlı etkileşimler oluşturabileceğini ve böylece her birinin SHP099'da olduğu gibi en az mikromolar düzeyde bir inhibisyon aktivitesine sahip olabileceğini ortaya koymuştur (Jin *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020b; Wang *et al.* 2020c; Wu *et al.* 2021).

Tablo 19'da 28 hit ligant için verilen 2D formüllerden, bu ligantların yapısında genellikle hidroksil (-OH), amino (-NH ya da -NH<sub>2</sub>), aminyum (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ve/veya karboksil (-COO<sup>-</sup>) fonksiyonel gruplarının bulunduğu belirlenmiştir. SHP-2'nin allosterik bölgesinde yer alan amino asit rezidülerinin polar yüksüz, pozitif yüklü ve hidrofobik yan zincirlere sahip oldukları Wu *et al.* (2019) tarafından bildirilmiştir. Mevcut çalışmada seçilen hit ligantların her

birinin SHP-2'nin allosterik bölge rezidüleriyle ağırlıklı olarak hidrojen bağ etkileşimleri ve/veya tuz köprüleri yoluyla iyi bir şekilde etkileşim sağladığı görülmektedir (Tablo 20 ve Şekil 45) (Jin *et al.* 2018; Vazhappilly *et al.* 2019). Bunun sebebi olarak söz konusu hit ligantlar ve SHP-2'nin yapısında bulunan polar ve/veya net bir yüke sahip fonksiyonel grupların hidrojen bağ etkileşimleri ve iyonik etkileşimler gibi nispeten güçlü non-kovalent bağların oluşumuna katılmaları görülebilir (Klebe 2013).

Şekil 45'te gözlemlenen intermoleküler etkileşimler daha spesifik olarak ele alındığında, sarı kesikli çizgilerle ifade edilen hidrojen bağ etkileşimlerinin birçoğunun ligantlardaki -OH, -NH, -NH<sub>2</sub> ve -COO<sup>-</sup> grupları ve SHP-2'nin allosterik cebindeki amino asit rezidülerinin polar yüksüz (örneğin; Gln ve Thr) ve pozitif yüklü (örneğin; Arg ve Lys) yan zincirlerindeki çeşitli fonksiyonel gruplar arasında meydana geldiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu etkileşimlerin protein omurgasındaki karbonil (-C=O) ve amino gruplarından ileri geldiği belirlenmiştir (Kim and Friesner 1997). İlave olarak 12 adet hit molekülde gözlemlenen tuz köprüsü etkileşimleri, bu ligantların -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ve -COO<sup>-</sup> gruplarına karşılık gelen pozitif yüklü ve polar yüksüz allosterik bölge rezidülerinin nötral pH'da zıt pozitif veya negatif elektron yükü taşıyan grupları arasında meydana gelmiştir (Şekil 45) (Kurczab *et al.* 2018). Bununla birlikte bazı moleküllerin  $\pi$ -istifleme etkileşimlerinin allosterik bölgedeki amino asit rezidüleri ve ligantların komşu aromatik gruplarının (örneğin; fenil-imidazol, imidazol-imidazol veya indol-histidin)  $\pi$ -elektron bulutları arasındaki çekici kuvvetten kaynaklandığı anlaşılmıştır (Şekil 45) (Rahman *et al.* 2015). Bunun yanında bazı moleküllerde rastlanan katyon- $\pi$  etkileşimlerine histidinin aromatik yan zinciriyle etkileşime giren pozitif yüklü ligantlar (veya tersi bir durumda ligantların indol, fenil ya da 4-okso-3H-pirol[2,3-d]pirimidin gibi aromatik gruplarıyla etkileşen pozitif yüklü allosterik bölge rezidüleri) neden olmaktadır (Şekil 45) (Kumar *et al.* 2018).

Genel olarak protein-ligant etkileşim çalışmaları, biyolojik düzenleme mekanizmalarını anlamak açısından büyük bir önem arz etmekte ve yeni ilaçların tasarımı için teorik bir temel sağlamaktadır (Li *et al.* 2019). Mevcut araştırma kapsamında yapılan çalışmalarla moleküler docking tabanlı ST'nin son adımında seçilen 28 adet hit ligantın, SHP-2'nin allosterik bölgesindeki amino asit rezidüleriyle farklı türde non-kovalent etkileşimler oluşturarak spesifik protein-ligant kompleksleri meydana getirebilecekleri belirlenmiştir. Buradan hareketle her bir molekülün onkogenik bir enzim olan SHP-2'nin fonksiyonlarını inhibe etme ve ayrıca terapötik aday olma potansiyellerinin daha farklı *in silico* tekniklerle spesifik olarak araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Du *et al.* 2016; Afriza *et al.* 2018).

Bu tezde gerçekleştirilen moleküler docking tabanlı SBVS çalışmalarında hit ligantlar olarak belirlenen 28 adet molekülün sayısı, tezin “Bulgular” başlığında yer alan “Moleküler docking tabanlı SVBS çalışmaları” alt başlığında bahsi geçen kriterlere göre yapılan değerlendirmeler sonucunda 3 adet final hit bileşiğe (NSC523374, NSC374121 ve NSC524592) indirgenmiştir. Bir diğer deyişle, bu moleküllerin her birinin “yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları” olarak “en yüksek potansiyele” sahip olabilecekleri çeşitli *in silico* teknikler sayesinde öngörülmüştür. Aşağıda yer alan paragraflarda bu 3 final hit bileşik için Glide/Prime IFD docking sonuçları ve SHP-2’nin allosterik bölgesinde tespit edilen protein-ligant etkileşimleri kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar SHP099’a ait sonuçlarla kıyaslanarak, 3 final hit molekülün SHP-2’nin inhibisyonunda rol oynayabilecek özgün nitelikleri ortaya konulmuştur.

Moleküler docking sonuçlarına göre seçilen 3 final hit bileşik için en yaygın amino asit kalıntılarının Arg111, Phe113, Thr218, Glu249 ve Glu250 olduğu belirlenmiş ve bu önemli amino asit kalıntılarının SHP-2’nin allosterik olarak inhibe edilmesinde final hit bileşiklerin, SHP099’da olduğu gibi, güçlü inhibisyon potansiyellerinden sorumlu olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bunun yanı sıra final hit bileşiklerin docking skorlarının (bağlanma afinitelerinin), SHP099’un docking skorundan (bağlanma afinitesinden) daha yüksek olmasının allosterik bölgede tespit edilen Glu110, His114, Thr253, Leu254 ve/veya Lys492 kalıntılarıyla oluşturulan hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ya da  $\pi$ -istifleme etkileşimlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Garcia Fortanet *et al.* 2016; Parsonidis *et al.* 2019; Wu *et al.* 2020; Kwon *et al.* 2021).

De Freitas and Schapira (2017), rezolüsyonu  $\leq 2,5$  Å olan 11,016 adet protein-ligant kompleksinin 3D kristal yapısını PDB’den elde ettikten sonra ilgili protein ve ligant yapıları arasında kurulan intermoleküler etkileşimleri incelemişlerdir. Bunun sonucunda hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağ etkileşimleri ve  $\pi$ -istiflemelerinin protein-ligant etkileşimlerinde bulunan en yaygın türler olduğunu tespit etmişlerdir. Bu üç etkileşimi ise zayıf hidrojen bağ etkileşimlerinin, tuz köprülerinin, amid istiflemelerinin ve katyon- $\pi$  etkileşimlerinin takip ettiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda 3 adet final hit ligant için elde edilen moleküler etkileşim analizi bulguları literatürle uyumlu olup her bir ligantın SHP-2 proteiniyle stabil kompleksler oluşturmada hidrojen bağları, tuz köprüleri, hidrofobik etkileşimler, katyon- $\pi$  ve  $\pi$ -istifleme etkileşimlerinin etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 20 ve Şekil 46a, 47a ve 48a).

Ayrıca De Freitas and Schapira (2017) tarafından N-H---O, N-H---N ve O-H---O hidrojen bağlarının oluşumuna katılan ağır atomların yaklaşık 3,0 Å’lük benzer ortalama mesafelerle birbirinden ayrıldığı bildirilmiştir. Buna göre NSC523374, NSC374121 ve

NSC524592'nin SHP-2'nin allosterik bölgesinde oluşturduğu hidrojen bağlarındaki mesafeler (1,65-2,46 Å) (Tablo 20) ve atom düzenlerinin (Şekil 46a, 47a ve 48a) intermoleküler hidrojen bağlarının oluşumu için uygun olduğu anlaşılmıştır.

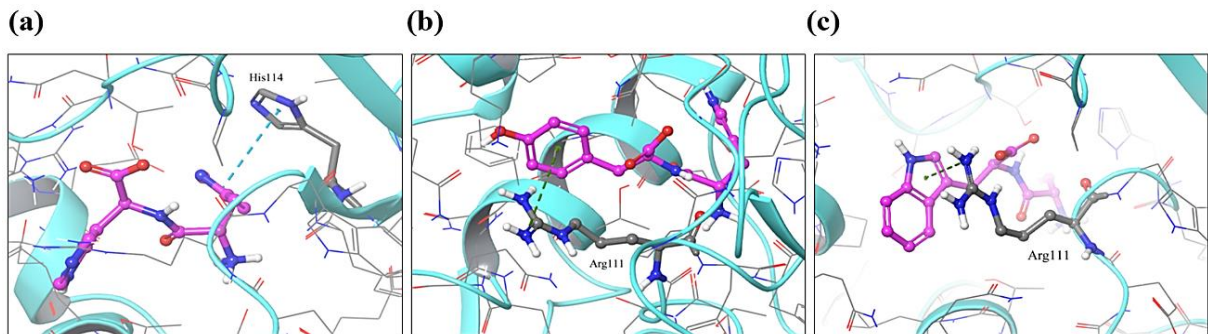
Tuz köprüsü etkileşimleri bir hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimi bir arada barındıran, iyonlaşmış durumdaki iki molekül arasında görülen kovalent olmayan etkileşimlerdir. Protein-ligant komplekslerinde oluşan bir tuz köprüsünde proton, yan zincirdeki bir karboksilik asit grubundan ligantın amin grubuna (veya yan zincirdeki bir amin grubundan ligantın karboksilik asit grubuna) göç edebilmektedir. Bununla birlikte proteine bağlanacak olan ligant molekülünün iyonize formda olması gerekmektedir. Son 20 yılda kuvvetlendirilmiş (yük destekli) hidrojen bağları hem teorik hem de deneysel yöntemler kullanılarak sıklıkla incelenmiş ve bu tip etkileşimlerin proteinin konformasyonel stabilitesine olan katkısına yönelik de çok sayıda çalışma yapılmıştır (Bankiewicz *et al.* 2012; Kurczab *et al.* 2018). Mevcut çalışmada 3 hit ligantın SHP-2'nin allosterik cebinde hidrojen bağ etkileşimlerinin yanı sıra Arg111, Glu249, Glu250 ve/veya Lys492 rezidüleriyle tuz köprüleri oluşturduğu tespit edilmiştir. İlaveten bu bileşiklerin büyük oranda hidrojen bağları ve tuz köprüsü etkileşimleri sayesinde SHP-2 ile stabil kompleksler oluşturabildiği saptanmıştır (Tablo 20 ve Şekil 46a, 47a ve 48a). Bu durumun seçilen final hit ligantların IFD docking skorlarının, SHP099'ununkinden daha yüksek olmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Fu *et al.* 2018). Literatürde Garcia Fortanet *et al.* (2016) ve Liu *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmalarda SHP099'un güçlü düzeydeki SHP-2 inhibisyon aktivitesinin ortaya çıkmasında hidrojen bağ ağlarının çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Böylece çalışmadaki final hit ligantlar için de SHP-2 enziminin allosterik cebinde spesifik hidrojen bağ ağlarının gözlemlenmesiyle (Şekil 46a, 47a ve 48a), bu moleküllerin SHP-2'nin aktivitesini inhibe etmede yüksek bir potansiyele sahip olabilecekleri sonucuna varılmıştır.

Günümüzde hidrofobik etkileşimlerin moleküler tanımda termodinamik açıdan önemli bir itici güç olduğu düşünülmektedir. Protein-ligant bağlanma afinitelerini hesaplamaya yönelik birçok ampirik skorlama fonksiyonu halihazırda geliştirilmiş olup bu tip fonksiyonlarda en büyük katkının protein ve ligant arasındaki hidrofobik temastan ileri geldiği belirlenmiştir. Protein boşluğundaki su moleküllerinin boşluğu kaplayan protein gruplarını tamamlayacak şekilde bir ligantla yer değiştirmesi, su moleküllerinin uygun olmayan bir ortamdan çözeltiye salınımını sağlamaktadır. Hidrofobik bölge ve bu bölgeyle ilişkili hidrojen bağlarıyla karakterize edilen bir proteine ait aktif bölgenin solvasyonu atipik entropik ve entalpik hidrasyon penaltılarını indüklemektedir. Sonuçta bu penaltılar birbirinden bağımsız solvasyona uğramış ligant ve proteine kıyasla bir protein-ligant kompleksini stabilize etmekte ve böylece

söz konusu ligantların bağlanma afiniteleri artmaktadır (Young *et al.* 2007). Çalışmamızda NSC523374 ve NSC524592 kodlu final hit ligantlarla Leu254 arasında meydana gelen hidrofobik etkileşimlerin (Tablo 20 ve Şekil 46a, 47a ve 48a), oluşan protein-ligant komplekslerinin  $\Delta G$  değerlerini düşürmeye ve bağlanma cebinde bulunan ligantların stabilitesini artırmaya yönelik katkılar sağlayabileceği yorumunda bulunulmuştur (Bronowska 2011; Liu *et al.* 2019).

Bahsedilen bu etkileşimlerin dışında, 3 final hit ligantın Glide/Prime IFD docking pozlarında His114 ile görülen  $\pi$ -istifleme veya Arg111 ile görülen katyon- $\pi$  etkileşimlerinin ilgili protein-ligant komplekslerinin stabilizasyonunda önemli olduğu varsayılmaktadır (Tablo 20 ve Şekil 82) (Brylinski 2018; Tayubi and Sethumadhavan 2010). Literatürde SHP-2'nin allosterik bölgesinde SHP099 için bazı  $\pi$ -istifleme etkileşimleri rapor edilmiştir (Garcia Fortanet *et al.* 2016). Benzer şekilde çalışma bulgularımızda seçilen final hit moleküllerin SHP-2 ile bu türden etkileşimlere sahip olduğunun belirlenmesi, bu moleküllerin SHP-2'yi güçlü bir şekilde inhibe etme potansiyelinin varlığını işaret etmektedir.

Seçilen final hit ligantlar dipeptit yapısında olup her birinde azot atomu içeren heterosiklik aromatik bir halka sistemi (NSC523374 ve NSC374121 için 3- konumundaki 1*H*-imidazol-5-il ve NSC524592 için 3- konumundaki 1*H*-indol-3-il), aromatik mono- veya bisiklik bir halka sistemine (NSC523374 için 3- konumundaki 1*H*-imidazol-5-il, NSC374121 için 3- konumundaki 4-hidroksifenil ve NSC524592 için 3- konumundaki 1*H*-indol-3-il) bir amid (peptit) bağı aracılığıyla bağlanmaktadır (Tablo 19). Böylece bu tezde yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları olarak önerilen 3 final hit bileşik, allosterik SHP-2 inhibitörü özelliği taşıyan moleküller için yeni bir bağlanma modu literatüre kazandırılmıştır.



**Şekil 2.** Üç adet final hit ligant (mor renk) için üretilen Glide/Prime IFD pozlarında katyon- $\pi$  (kesikli yeşil çizgi ile ifade edilen) ve  $\pi$ - $\pi$  (kesikli mavi çizgi ile ifade edilen) etkileşimlerinin 3D modeller üzerinde gösterimi. (a) NSC523374, (b) NSC374121 ve (c) NSC524592

Garcia Fortanet *et al.* (2016) tarafından SHP099'un SHP-2'yle oluşturduğu X-ışını kristal yapısında bu ligantın bazik amin grubunun Phe113'ün omurga karboniliyle hidrojen bağı etkileşimi yaptığı, pirazin çekirdeğinin anilin-Glu250 arasındaki hidrojen bağına koruduğu ve

Arg111 ile yeni bir hidrojen bağı meydana getirdiği bildirilmiştir. Bu yeni hidrojen bağı etkileşiminin diklorofenil motifiyle katyon- $\pi$  etkileşimi için Arg111'i önceden organize ettiği belirlenmiştir. Buna göre Arg111'in pirazin yoluyla hidrojen bağının önceden düzenlenmesinin etkileşimleri optimal hale getirdiği rapor edilmiştir. Çalışmamızda NSC523374'ün 1*H*-imidazol halkasındaki =N- gruplarının Arg111'in yan zincirindeki hidrojen atomları ve Thr218'in -COOH grubundaki hidrojen atomuyla hidrojen bağı etkileşimi meydana getirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 1*H*-imidazolün -NH grubunun Glu250'nin omurga karboniliyle hidrojen bağı yaptığı belirlenmiştir. Böylece Arg111 ile mevcut olan hidrojen bağının 1*H*-imidazol ve Glu250 arasındaki hidrojen bağı etkileşiminin korunmasında önemli olduğu sonucuna varılmıştır. İlave olarak Phe113'ün omurga karbonili ve NSC523374'ün serbest aminyum (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) grubu arasında gözlemlenen hidrojen bağının literatüre uyumlu olduğu belirlenmiştir (Şekil 46a, 46b) (Garcia Fortanet *et al.* 2016).

Şekil 49b'den SHP099'un diklorofenil halkasının Arg111 ile katyon- $\pi$  etkileşimi oluşturduğu gözlemlenmektedir. Bununla birlikte NSC374121, Arg111 ile 4-hidroksifenil halkası üzerinden katyon- $\pi$  etkileşimi oluşturmaktadır. Ayrıca NSC374121'in 1*H*-imidazol halkasındaki -NH- ve =NH<sup>+</sup> gruplarının Glu250 ile sırasıyla hidrojen bağı ve tuz köprüsü etkileşimleri kurmasının; yüklü veya yüksüz amino gruplarının SHP-2'ye ligant bağlanmasında önemli olabileceğini işaret etmektedir. NSC374121 ile Arg111 arasında meydana gelen hidrojen bağı ise ligantın peptit bağını oluşturan -NH- grubu ve amino asit kalıntısının omurga karbonilinden ileri gelmektedir. NSC374121'in serbest -NH<sub>2</sub> grubunun Phe113'ün omurga karboniliyle kurduğu hidrojen bağı etkileşimi de literatürde SHP099 için bildirilen etkileşime benzerlik göstermektedir (Şekil 47a, 47b) (Garcia Fortanet *et al.* 2016).

SHP099 (Şekil 49b) ve NSC374121 (Şekil 47b)'e benzer şekilde NSC524592'nin bir 1*H*-indol halkası Arg111 ile katyon- $\pi$  etkileşimine sahiptir. Ayrıca bir diğer 1*H*-indol halkasının -NH- grubu, Glu250'nin -COOH grubundaki yüklü oksijen atomuyla hidrojen bağı etkileşimi yapmaktadır. İlaveten ligantın -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> grubunda bulunan hidrojen atomunun Phe113'ün omurga karboniliyle hidrojen bağına sahip olması; SHP099'da olduğu gibi amino gruplarının Phe113 ile omurga karbonili üzerinden etkileşebileceğini ortaya koymaktadır (Şekil 48a, 48b) (Garcia Fortanet *et al.* 2016).

Yapılan 2D ve 3D protein-ligant etkileşimleri sonucunda final hit moleküllerin, SHP099'a benzer şekilde, yapılarındaki yüklü veya yüksüz amino grupları sayesinde anahtar kalıntılar olan Arg111, Phe113 ve Glu250 ile hidrojen bağları aracılığıyla etkileşebildikleri ve kurdukları spesifik hidrojen bağı ağlarıyla SHP-2'nin allosterik inhibisyonunda güçlü bir potansiyele sahip olabilecekleri düşünülmüştür (Garcia Fortanet *et al.* 2016; Liu *et al.* 2019).

## MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> uygulamaları

NCI veritabanından elde edilen 297,830 adet küçük molekülün sayısı, moleküler docking tabanlı SBVS çalışmalarıyla 28 adet hit moleküle indirgenmiştir. Önerilen bu hit ligantlar, IFD docking skorları ve ligant etkileşim haritalarının değerlendirilmesinden sonra SHP-2 proteini için güçlü aday inhibitörler olarak tanımlanmıştır. Bu noktada seçilen hit ligantların ilaç olma özellikleri, potansiyel kanser terapötik aktiviteleri ve toksisite profillerinin incelenmesi terapötik bir aday olmaları yolunda büyük önem arz etmektedir (Aydin *et al.* 2020; Sahin *et al.* 2021). Bu amaçla çalışmamızdaki hit moleküllerin ilaç olma özellikleri, kanser terapötik aktiviteleri ve ayrıca nörotoksisite, nefrotoksisite ve sitotoksisite gibi 26 farklı toksisite özelliği MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> platformunda topoloji temelli ikili QSAR modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> araçları tarafından oluşturulan QSAR modelleri kütüphanesinin, istatistiksel tahminlere dayalı olarak, bazı ilaç parametreleriyle ilgili yararlı ve güvenilir bilgiler sağladığı bilinmektedir (Aydin *et al.* 2020; Comert Onder *et al.* 2020). Bu çalışmada kanser terapötik aktivitesinin tahmini için hassasiyet, spesifiklik, doğruluk ve MCC parametreleri temel alınarak bu parametrelerin en yüksek değerlere sahip olduğu ikili QSAR modeli kullanılmıştır (Myshkin *et al.* 2012). Kullanılan modelde hassasiyet, spesifiklik, doğruluk ve MCC parametreleri, eğitim seti için sırasıyla 0,95, 0,92, 0,93 ve 0,87 ve test seti için sırasıyla 0,89, 0,83, 0,86 ve 0,72 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte modelin eğitim setinde 886 adet onaylanmış ilaç ve test setinde ise 167 adet molekül bulunmaktadır (Oktay 2020; Tutumlu *et al.* 2020). Ayrıca modelde kullanılan kesme değeri 0,5'tir. Buna göre  $\geq 0,5$  aralığında olan değerler, test edilen herhangi bir molekülün antikanser etkili olabileceğine işaret etmektedir (Sahin *et al.* 2021). Çalışmamızda 28 adet hit molekülden 22 tanesinin kanser terapötik aktivite değerinin 0,5'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 21). Buradan hareketle bu 22 ligantın her birinin potansiyel bir antikanser ajan özelliğinde olduğu sonucuna varılmış ve dolayısıyla sitotoksite testlerinde pozitif sonuç verebilecekleri öngörülmüştür (Aydin *et al.* 2020; Tutumlu *et al.* 2020).

SHP099 bileşiği, literatürde güçlü, selektif ve oral biyoyararlanıma sahip olan bir allosterik SHP-2 inhibitörü olarak bilinmektedir. Bunun yanında SHP099'un fare tümör ksenograft modellerinde SHP-2'nin aktivitesini başarılı bir şekilde inhibe ettiği kanıtlanmış olup aynı zamanda bu bileşiğin kanser tedavisinde yeni bir strateji sağlayabileceği rapor edilmiştir (Chen *et al.* 2016). Bu çalışmada hem *in silico* hem de *in vitro* analizler kapsamında referans olarak kullanılan SHP099'un MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> platformunda kanser terapötik aktivite değeri 0,46 olarak tahmin edilmiştir. Bu değer bu platformda yapılan antikanser aktivite

tahminleri için literatürde kullanılan kesme değeriyle uyum göstermektedir (Aydin *et al.* 2020; Sahin *et al.* 2021).

İlaç keşif ve geliştirme süreçlerinde bileşiklerin yıpranma oranını azaltmak amacıyla toksik özelliklerinin tahmin edilmesine yarayan *in silico* araçların kullanımı günümüzde giderek yaygınlaşmaktadır. Bu çalışmaların esas amacı, preklinik deneyler için advers ilaç reaksiyonlarının başarıyla öngörülmesi ve bu sayede ilaç geliştirme maliyetlerinin önemli ölçüde azaltılmasıdır (Muster *et al.* 2008). Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda tahmini kanser terapötik aktivite değeri 0,5'in üzerinde olduğu belirlenen 22 hit ligant için hesaplamalı olarak çeşitli toksisite analizleri gerçekleştirilmiştir (Sayın 2019; Zengin Kurt *et al.* 2019; Is *et al.* 2020). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, NSC152075, NSC94498, NSC523374, NSC374121, NSC524592 ve NSC685284 haricindeki 16 adet hit molekülün genel olarak Ames toksisitesi, böbrekler ve karaciğerde kilo kazancı, böbrek ve karaciğer nekrozu, deri hassasiyeti, erkek farelerde karsinojenite, karaciğer kolestazı, kardiyotoksisite, karsinojenite, nefron hasarı, nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi toksik etkilere sahip olabilecekleri belirlenmiştir (Tablo 21). Böylece moleküler docking çalışmalarında hit moleküller olarak önerilen bu ligantların toksisite profilinde büyük olasılıkla bir artış görüleceği tahmininde bulunulmuştur (Oktay 2020).

Öte yandan toksisite profili nispeten olumlu bulunan 6 hit ligant ve SHP099 arasından;

- NSC152075'in dört modelde (deri hassasiyeti, genotoksisite, karaciğerde kilo kazancı ve karaciğer nekrozu),
- NSC523374'ün altı modelde (böbrek nekrozu, genotoksisite, karaciğerde kilo kazancı, karaciğer nekrozu, karsinojenite ve nörotoksisite),
- NSC374121'in iki modelde (deri hassasiyeti ve MRTD açısından toksisite riski),
- NSC524592'nin üç modelde (deri hassasiyeti, karaciğer nekrozu ve MRTD açısından toksisite riski),
- NSC685284'ün iki modelde (deri hassasiyeti ve karaciğer kolestazı)
- NSC94498'in üç modelde (deri hassasiyeti, karaciğer nekrozu ve MRTD açısından toksisite riski),
- SHP099'un üç modelde (deri hassasiyeti, genotoksisite ve kardiyotoksisite)

toksisite gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 21). Toksisite profili sonuçları Tablo 21'den detaylı olarak incelendiğinde, NSC152075'in dört sonucundan üçünün, NSC523374'ün altı sonucundan beşinin, NSC685284'ün üç sonucundan birinin ve SHP099'un üç sonucundan ikisinin eşik değere (0,5) yakın olduğu görülmektedir (Kuskucu *et al.* 2020; Kanan *et al.* 2021). Ayrıca NSC523374 haricindeki diğer 5 hit ligantın, SHP099'a benzer şekilde, zayıf veya orta

derecede deri hassasiyeti oluşturma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır. NSC94498, NSC374121 ve NSC524592 ise, SHP099'un aksine, MRTD açısından yüksek toksisite riski barındırmaktadır. Bununla birlikte NSC152075, NSC94498 ve NSC524592'nin karaciğer nekrozu modelinde 0,6'nın üzerinde değerler verdiği saptanmıştır. Bu toksisite risk değerlendirmesinin sonuçları, genel olarak, 6 adet hit bileşiğin, doz limit deneyleriyle optimize edilebilen birkaç parametre (Robinson *et al.* 2000; Doak *et al.* 2008; Gertz 2011; Parasuraman 2011; Suzuki *et al.* 2014; Bruno *et al.* 2016; Llorach-Pares *et al.* 2017; Ricart 2017; Santos *et al.* 2020) dışında, toksik etkilerinin sınır değerlerin altında olduğunu göstermektedir. Bu sonuçların, ileride bu bileşiklere yönelik gerçekleştirilebilecek *in vivo* hayvan deneyleri için uygun doz aralıklarının belirlenmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (Alam and Khan 2018).

Antikanser etkili molekülleri diğer ilaç moleküllerinden ayıran özelliklerden biri, terapötik dozlarda yan etkilerinin sıklığı ve şiddetidir. Bununla birlikte piyasada mevcut antikanser ilaçlar için rapor edilen yaygın toksisite türleri arasında hematolojik toksisite, gastrointestinal sistem toksisitesi, hepatotoksisite, kardiyotoksisite, nörotoksisite, pulmoner toksisite, gonadal toksisite, idrar yolu toksisitesi ve cilt/saç folikülü toksisitesi yer almaktadır (Remesh *et al.* 2012). Çalışmamızda seçilen 6 adet hit ligantın bu toksisite türlerinin birçoğuna sahip olmadığı görülmektedir (Tablo 21). Bu durum ilgili moleküllerin yan etki profillerinin düşük olmasına katkı sağlamakta ve her birinin birçok kanser türü için terapötik adaylar olarak nitelendirilebileceğini ifade etmektedir (Aydin *et al.* 2020; Sahin *et al.* 2021).

Cilde tekrarlı temaslar sonucunda alerjik kontakt dermatiti indükleyebilen maddelere cilt hassaslaştırıcıları adı verilmektedir. Cilt hassasiyetinin indüklenmesini önlemek amacıyla hassaslaştırıcı etkene maruz kalma en aza indirilmelidir. Bu nedenle, cilt hassaslaştırıcı özelliğe sahip olan moleküllerin tespit ve tahmin edilmesi, ilaç endüstrisinde güvenli ve etkili küçük molekül ilaçlarının geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır (Wilm *et al.* 2021). Günümüzde *in silico* yaklaşımlar, tahmine dayalı kurallar veya modeller üretilmesinde cilt hassaslaştırıcı olan ve olmayan bileşiklerin yapısal özelliklerini analiz etme kabiliyetleri sayesinde hayvan deneylerine çekici bir alternatif oluşturmaktadır. Böylece ticari satın alınabilen binlerce kimyasalın toksisite riskleri uygun maliyetli bir şekilde değerlendirilebilmektedir (Ouyang *et al.* 2014).

Küçük organik moleküllerin, derideki makromoleküller (proteinler veya diğerleri) ile reaksiyona girerek bir immünojenik kompleks oluşturma yoluyla duyarlılaşmaya neden olduğu varsayılmaktadır. Ek olarak şu anda daha yaygın olarak kabul gören bir mekanizma, elektrofilik alerjenler ve deri proteinlerindeki (genellikle yan zincirler) amino asitlerin nükleofilik kısımları

arasında bir kovalent bağ oluşumunu içermektedir. Bugüne dek yapılan SAR çalışmalarında halojenli aromatikler, benzaldehitler, dienler, oksimler, aldehitler ve epoksitlerin cilt hassaslaştırma potansiyelinin bulunduğu belirlenmiş olup ayrıca bu çalışmalarda anilin/aromatik amin ve/veya fenol türevlerinin cilt hassaslaştırıcı kimyasalları sıklıkla bulunduran iki büyük sınıf olduğu rapor edilmiştir (Ouyang *et al.* 2014). Buna göre çalışmamızda hit moleküller için tespit edilen zayıf veya orta derecedeki cilt hassaslaştırıcı potansiyellerin (Tablo 21), literatürle uyumlu olarak, NSC374121’de fenol/1*H*-imidazol (aromatik amin), NSC524592’de 1*H*-indol (aromatik amin), NSC685284’te 4-klorofenil (halojenli aromatik)/1*H*-imidazol, NSC94498’de fenol ve SHP099’da ise 2,3-diklorofenil (halojenli aromatik)/pirazin (aromatik amin) gruplarından (Tablo 19) kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

MRTD değeri, bir ilacın etkinliğinin artmadığı ve yan etkilerinin faydalı etkilerinden daha ağır basmaya başladığı üst sınırı tahmin etmek amacıyla kullanılmaktadır (Liu *et al.* 2016). Düşük MRTD değerine sahip kimyasallar, yüksek toksisiteli bileşikler olarak sınıflandırılmakta iken yüksek MTRD değerine sahip kimyasallar ise düşük toksisiteli bileşikler olarak sınıflandırılmaktadır (Matthews *et al.* 2014). Bu çalışmada MTRD ile ilgili olarak elde edilen toksisite sonuçları NSC374121, NSC524592 ve NSC94498’in düşük bir MTRD değerine sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 21); ki bu durum ilgili moleküllerin ilaç olarak kullanıldıkları takdirde daha düşük dozlarının uygulanması anlamına gelmektedir (Llorach-Pares *et al.* 2017).

Tablo 22’de olası kanser terapötik aktivitesine sahip ve toksisite profili nispeten düşük bulunan 6 hit ligantın ilaç olma özellikleri verilmiştir. Literatürde Lipinski’nin beş kuralına uyumluluğu olmayan bileşiklerin zayıf çözünürlük ve/veya zayıf hücre geçirgenliği gibi özelliklerden dolayı oral biyoyararlanımlarının düşük olabileceği bildirilmiştir (Benet *et al.* 2016). Mevcut çalışmada 6 adet hit ligantın ilaç benzerliğinin değerlendirilmesinde Lipinski’nin kuralları kullanılmış ve Tablo 22’deki sonuçlar bu hit ligantların, SHP099’da olduğu gibi, bu kurallara uyumluluk gösterdiğini ortaya koymuştur. Böylece bu moleküller için oral biyoyararlanım sorunu olmayacağı öngörüsünde bulunulmuştur (Onguéné *et al.* 2014). Ayrıca bu ligantlar arasından NSC152075’in 16 adet dönebilen bağa sahip olduğu Tablo 22’den görülmektedir. Bu durum ilgili molekülün yüksek derecede esnek olduğunu ifade etmekle birlikte Veber tarafından belirlenen “ilaç moleküllerinde maksimum 10 adet dönebilen bağ olması gerektiği” ilkesine de ters düşmektedir (Veber *et al.* 2002; De Brito 2011). Öte yandan bir bileşiğin oral aktivite ve biyoyararlanım yönünden zayıf olma olasılığının, iki ya da daha fazla özelliğin ihlali durumunda ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Dashti *et al.* 2012). Buradan hareketle NSC152075’in ilaç olma özelliklerinin korunduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> analizlerinin sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, seçilen 6 hit ligantın kanser terapötik aktivite potansiyelinin mevcut olduğu, toksisite profillerinin nispeten olumlu olduğu ve ilaç olma özelliklerinin uygun bulunduğu tespit edilmiştir. Böylece bu moleküllerin her birinin, SHP099'a benzer şekilde, hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde antikanser etki bakımından pozitif sonuçlar verebileceği öngörüsünde bulunulmuştur (Lu *et al.* 2020).

### MD simülasyonları

MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> analizlerinden çıktı olarak alınan 6 hit ligant (NSC152075, NSC94498, NSC523374, NSC374121, NSC524592 ve NSC685284), antikanser ilaç olma potansiyelleri ve SHP-2'ye karşı güçlü bağlanma afiniteleri nedeniyle MD simülasyonları için seçilmiştir. Holo ve apo SHP-2'nin yapısal durumları ve dinamik davranış özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla, GROMACS yazılım paketi kullanılarak, 50 ns'lik MD simülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Sayın 2019). Bu sayede SHP-2'nin allosterik bölgesine Glide/Prime IFD docking metoduyla yerleştirilen ligantların zamana bağlı stabilite ve kararlı ilaç-reseptör komplekslerinin oluşumunun incelenmesi mümkün olmuştur. MD simülasyon çalışmalarının sonuçları proteine ait Cα atomlarının RMSD grafikleri, bağlanma bölgesindeki ligantların RMSD grafikleri ve proteinin Cα atomlarının RMSF grafikleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Bhowmick *et al.* 2021).

MD simülasyonlarında RMSD değeri Cα, omurga ve yan zincir atomları gibi proteine özgü seçilen bir atomun belirli bir zaman görüntüsünün, bir referans zaman görüntüsüne göre yer değiştirmesiyle oluşan ortalama mesafeyi ölçmek için kullanılmaktadır. Böylece elde edilen RMSD sonuçlarından simülasyonların dengeye ulaşp ulaşmadıkları belirlenebilmektedir. Bir referans protein yapısı içinde 0,1-0,3 nm arasındaki dalgalanmalar, proteinin konformasyonel değişiminin büyük olmadığını ve sistemin stabil olduğunu göstermektedir (Opo *et al.* 2021). Buna göre çalışmamızdaki 6 hit ligantın her biri için Glide/Prime IFD metoduyla oluşturulan protein-ligant komplekslerinin analizinde kullanılan SHP-2'ye ait Cα atomları kabul edilebilir dalgalanmalar göstermiştir (< 0,3 nm) (Şekil 50 ve Tablo 23). Bunun yanında SHP099'un SHP-2 ile oluşturduğu kompleks yapısında Cα atomlarının RMSD değerinin 0,21 ± 0,06 nm olarak tespit edilmesi üzerine stabil bir SHP2-SHP099 kompleksinin meydana geldiği kanıtlanmıştır (Şekil 50 ve Tablo 23). Bu bulgulardan hareketle, 6 hit ligant ve SHP099'un SHP-2'nin allosterik cebine bağlanmasının; bu protein üzerinde önemli düzeyde bir konformasyonel değişiklik meydana getirmediği belirlenmiştir. Ayrıca bu hit moleküllerin her birinin, SHP099'a benzer şekilde, SHP-2 proteinini otoinhibe olmuş bir konformasyonda stabilize ederek bu enzimin katalitik aktivitesini engelleyebileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar,

ligant bağlanmasıyla SHP-2'nin stabilitesinde artış tespit eden literatür sonuçlarıyla da uyumludur (Wu *et al.* 2019; Wang *et al.* 2020c).

Wu *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, bir 1*H*-benzo[d]imidazol-2(3*H*)-on türevi olan LY6 hit ligantının SHP-2 ile etkileşimini tanımlamak amacıyla 10 ns'lik MD simülasyonları gerçekleştirilmiş olup ardından ilgili protein-ligant komplekslerinin stabilitesini ve güvenilirliğini değerlendirmede RMSD değerleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda SHP2-LY6 kompleksinin apo sistemden daha kararlı olduğu belirlenmiştir. Böylece SHP-2'nin hareket kabiliyetinin ve dolayısıyla aktivitesinin LY66 ile bağlanması sonucunda azaldığı tespit edilmiştir. Bu duruma gerekçe olarak SHP-2'nin aktivasyonu için otoinhibe olmuş konformasyondan açık konformasyona geçmesi gerektiği; bunun da protein yapısında birtakım konformasyonel değişiklikleri gerektirdiği gösterilmiştir.

Wang *et al.* (2020c) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise RMC-4550 ve SHP099 ligantlarının SHP-2 proteininin stabilitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla 150 ns'lik MD simülasyon çalışmaları yapılmış ve simülasyonlar boyunca omurga atomlarının başlangıç yapısına göre RMSD değerleri hesaplanmıştır. Bunun sonucunda, apo SHP-2 proteininin daha büyük bir RMSD değerine sahip olduğu ve dolayısıyla daha büyük ölçüde yapısal değişikliğe uğradığı tespit edilmiştir. Öte yandan SHP099 veya RMC-4550 ile bağlanan SHP-2'nin simülasyon sırasında nispeten sabit bir konformasyonda kaldığı gözlemlenmiştir. Dahası SHP-2<sup>RMC-4550</sup> kompleksinin RMSD değerinin en düşük olduğunun belirlenmesiyle; RMC-4550'nin, SHP-2'nin kapalı konformasyonunun stabilizasyonunda SHP099'dan daha büyük bir avantaj sağlayabileceği ileri sürülmüştür. Benzer şekilde bu çalışmada SHP-2'nin Cα atomları için elde edilen RMSD değerleri Tablo 23'ten incelendiğinde, 6 adet hit ligantın, SHP-2'nin otoinhibe olmuş konformasyonunu stabilize etmede SHP099'dan daha yüksek bir potansiyele sahip oldukları anlaşılmaktadır (Şekil 50). Ayrıca içlerinden NSC523374 kodlu hit ligantın, protein stabilizasyonu açısından en başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Şekil 50 ve Tablo 23).

Çalışma kapsamında SHP-2 proteininin RMSD değerleriyle birlikte ligantların RMSD değerleri de incelenmiştir. Bu amaçla “lig-fit-prot” RMSD değerlerinin hesaplanmasında bir protein-ligant kompleksinin başlangıç yapısı, proteinin Cα atomları üzerinde referans durumu olarak hizalanmıştır. Böylece simülasyonlar süresince bu RMSD değerleri, ligantların ağır atomlarının bağlanma cebindeki translasyonel hareketine göre belirlenmiştir (Sahin *et al.* 2020). Buna göre 6 hit molekül ve SHP099 için hesaplanan “lig-fit-prot” RMSD değerleri Tablo 23'ten incelendiğinde, bu bileşiklerin birçoğu için SHP-2'nin allosterik cebinde gerçekleşen bağlanma olayları sırasında yüksek bozulmalar gözlenmemiştir (Şekil 51). Bununla birlikte

NSC94498 haricindeki diğer hit ligantlar ve SHP099'un "lig-fit-prot" RMSD değerlerinin (0,13-0,32 nm) çok düşük olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan NSC94498'in "lig-fit-prot" RMSD değeri  $1,0 \pm 0,56$  nm olarak hesaplanmış ve bu hit ligantın simülasyon süresince bağlanma bölgesinden ayrıldığına tespit edilmesi üzerine SHP-2'nin allosterik cebinde yapısal olarak stabil olmadığı kanaatine varılmıştır. Hit ligantlar için hesaplanan RMSD değerlerinde bu şekilde önemli ölçüde yüksek bir değerin varlığı, ilgili ligant yapısının docking pozundaki ilk konumundan uzaklaşarak bağlanma bölgesinden difüze olduğunu ifade etmektedir (Harini *et al.* 2021; Prajapati *et al.* 2021).

Lig-fit-lig RMSD değerleri, ligant atomlarının internal varyasyonlarının doğrudan bir ölçüsü olup ligantların dönme hareketini belirtmektedir. Bu değerlerin hesaplanmasında bir ligantın ağır atomları ilk konformasyonlarına göre hizalanmaktadır (Arumugam *et al.* 2021). Böylece çalışmamızda 6 hit molekül ve SHP099 için hesaplanan "lig-fit-lig" RMSD değerleri Tablo 23'ten incelendiğinde, tüm moleküller için bu değerlerin 0,3 nm'den (0,02-0,14 nm) az olduğu görülmektedir (Şekil 52). Bu sonuçlar, SHP099 dahil olmak üzere tüm hit bileşiklerin, simülasyon süresince dönme hareketlerini önemli ölçüde değiştirmediğini ve çok rijit bir davranış sergilediklerini ortaya koymaktadır (Sahin *et al.* 2020).

Öte yandan SHP099'un "lig-fit-lig" RMSD değerinin 6 hit liganta kıyasla daha düşük olması (Tablo 23), bu molekülün bağlanma pozisyonundaki değişikliklerin daha az olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Elde edilen bu bulgu, SHP099'un Glide/Prime IFD docking pozundaki stabilitesinin, hit ligantların Glide/Prime IFD docking pozlarındaki stabilitesinden nispeten daha yüksek olduğu anlamı taşımaktadır (Fu *et al.* 2020). Sonuçta, çalışmada seçilen hit ligantlara yönelik gerçekleştirilen "lig-fit-prot" ve "lig-fit-lig" RMSD hesaplamalarıyla bu moleküllerin her birinin Glide/Prime IFD docking pozlarının valide edilmesi sağlanmıştır.

RMSF değeri, belirli amino asit kalıntılarının ortalama konumları etrafındaki hareketliliğini yansıtmaktadır ve biyolojik sistemlerin stabilitesinin incelenmesinde yararlı yöntemlerden biridir (Liu *et al.* 2014). Literatürde RMSF değerinin dalgalanması ne kadar büyük olursa, proteine ait amino asit rezidülerinin de o denli kararsız oldukları bulgulanmıştır (Zhou *et al.* 2021).

Mevcut çalışmada seçilen hit moleküller, SHP099 gibi, SHP-2 proteininin C-SH2 ve PTF domainlerine aynı anda bağlanmak üzere tasarlanmıştır (Garcia Fortanet *et al.* 2016). Daha önce Qiu *et al.* (2014) ve Wang *et al.* (2021a) tarafından SHP-2'nin otoinhibe olmuş konformasyonundaki en esnek bölgenin C-SH2 domainini oluşturan Trp112-Leu216 rezidülerinden meydana geldiği bildirilmiştir. Böylece Tablo 24'te yer alan sonuçlar değerlendirildiğinde, 5 hit molekül (NSC152075, NSC523374, NSC374121, NSC524592 ve

NSC685284) ve SHP099'un SHP-2'ye bağlanmasıyla tüm sistemlerin kararlı hale geldiği ve bu sayede hem SHP-2'nin dalgalanma büyüklüğünün hem de C-SH2 domaininin esnekliğinin azaldığı sonucuna ulaşılmaktadır (Wu *et al.* 2019). Bu durum Şekil 53'teki grafikler üzerinde görselleştirilmiş olup bu grafiklerin yorumlanmasıyla ligant bağlı proteinde Trp112-Leu216 rezidülerinin RMSF dalgalanmalarının, apo proteinde aynı aralıkta bulunan rezidülerin RMSF dalgalanmalarına kıyasla çok daha düşük değerlerde olduğu ortaya çıkmaktadır.

Tablo 25'e göre SHP-2'nin ligant bağlı formlarında D'E, B'C, pTyr, WPD, P ve Q döngülerine ait ortalama RMSF değerleri sırasıyla 0,06-0,08 nm, 0,09-0,14 nm, 0,07-0,09 nm, 0,09-0,12 nm, 0,06-0,07 nm ve 0,06-0,09 nm aralıklarında bulunmaktadır. Buna karşılık apo formunda ise bu değerlerin D'E, B'C, pTyr, WPD, P ve Q döngüleri için sırasıyla  $0,09 \pm 0,02$  nm,  $0,16 \pm 0,03$  nm,  $0,12 \pm 0,01$  nm,  $0,21 \pm 0,03$  nm,  $0,08 \pm 0,02$  nm ve  $0,11 \pm 0,03$  nm olduğu tespit edilmiştir. Alınan bu sonuçlar, 5 hit ligant ve SHP099'un, SHP-2 proteinindeki D'E, B'C, pTyr, WPD, P ve Q döngülerinin stabilitesini geliştirdiğini göstermektedir. Aynı zamanda bu moleküllerin N-SH2 ve PTF domainleri arasındaki etkileşimlerin stabilitesini kolaylaştırarak SHP-2'ye bağlanmalarının ardından söz konusu bölgelerin rijiditesini artırdıklarını ifade etmektedir (Wang *et al.* 2020c). Bununla birlikte Ma *et al.* (2020) tarafından bir ligantın SHP-2'ye bağlanmasının allosterik bölgedeki rezidüleri stabil hale getirdiği ve ayrıca katalitik bölgedeki P ve Q döngülerinin dalgalanmalarını azalttığı rapor edilmiştir. Tablo 25'teki apo ve holo protein yapılarına ait çalışma bulgularımız karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların bu literatür bilgisiyle uyumlu olduğu görülmüştür. Öte yandan SHP2-SHP099 sistemi için bu altı bölgenin ortalama RMSF değerlerinin, SHP-2'nin 5 hit ligantla oluşturduğu komplekslerde bu bölgelere yönelik hesaplanan ortalama RMSF değerlerine neredeyse eşit olduğu belirlenmiştir (Tablo 25). Buradan hareketle çalışmada seçilen 5 hit ligantın, SHP-2'ye ait D'E döngü bölgesinin PTF aktif bölgesine nüfuz etmesi üzerindeki etkisinin SHP099'a benzer düzeyde güçlü olduğu anlaşılmış ve böylece bu moleküllerin SHP-2'nin otoinhibe olmuş konformasyonunun muhafaza edilmesi için güçlü etkilerinin olabileceği düşünülmüştür (Farrokhzadeh *et al.* 2019; Zhou *et al.* 2021).

İlaveten, 50 ns simülasyonlar boyunca hit ligantlara yönelik elde edilen farklı konformasyonların hizalanması ve bu konformasyonların belirli bir zaman ölçeğinde kırmızıdan maviye giden bir renk skalası kullanılarak görsel hale getirilmesiyle Şekil 54, 55, 56, 57, 58 ve 59'da sırasıyla SHP099, NSC685284, NSC524592, NSC523374, NSC374121 ve NSC152075 için oluşturulan grafiklerden, söz konusu ligantların MD simülasyonu süresince SHP-2'nin allosterik bağlanma cebinde stabil olarak kalabildiği kanıtlanmıştır.

## MM/PBSA hesaplamaları

Bağlanma serbest enerjisi ( $\Delta G_{bağ.}$ ), bağlı olmayan tüm etkileşimlerin toplamıdır. Çalışmada 5 hit ligant ve SHP099'un SHP-2 proteiniyle oluşturdukları komplekslerin  $\Delta G_{bağ.}$  değerleri, MM/PBSA yöntemi kullanılarak son 25 ns simülasyon süresince hesaplanmıştır. Buna göre elde edilen değerler, ligant ve amino asit rezidüleri arasındaki etkileşime bağlı olarak negatif işaretli olmalıdır. Ayrıca bu değerler ne kadar küçükse, söz konusu protein-ligant etkileşimleri o denli güçlüdür (Nayeem *et al.* 2022). Tablo 26'da hit ligantlar ve SHP099 için tahmini olarak hesaplanan  $\Delta G_{bağ.}$  değerleri ve bu değerlerin oluşumunda katkısı olan dört farklı enerji terimi (van der Waals etkileşim enerjisi, elektrostatik enerji, polar ve nonpolar çözünme serbest enerjileri) listelenmiştir. Bu tablodan SHP-2 ile kompleks halindeki SHP099, NSC152075, NSC523374, NSC374121, NSC524592 ve NSC685284'ün  $\Delta G_{bağ.}$  değerlerinin sırasıyla  $-116,0 \pm 21,5$ ,  $-217,6 \pm 81,5$ ,  $-123,8 \pm 26,5$ ,  $-12,0 \pm 29,9$ ,  $-3,7 \pm 20,8$ ,  $+106,8 \pm 32,2$  kJ/mol olarak bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, NSC152075 ve NSC523374'ün referans inhibitör SHP099 ile karşılaştırıldığında SHP-2'ye karşı güçlü bir bağlanma afinitesine sahip olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca bu hit ligantların, SHP-2'nin otoinhibe olmuş konformasyonunun korunmasında hem SHP099 hem de diğer iki hit liganta göre daha başarılı sonuçlar alındığını göstermektedir (Zhou *et al.* 2021; Kumbhar *et al.* 2022). Öte yandan NSC685284 için pozitif işaretli bir  $\Delta G_{bağ.}$  değerinin elde edilmesinin (Tablo 26), toplam elektrostatik ve polar katkıların kaybindan kaynaklabileceği düşünülmektedir (Timuçin 2021).

Çalışmamızda bağlanma serbest enerjisi bileşenlerinin karşılaştırılması, farklı bileşenlerin  $\Delta G_{bağ.}$  değerlerine göreli katkılarının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Liu *et al.* 2019; Kushwaha *et al.* 2021; Kumbhar *et al.* 2022). Tablo 26'ya göre, 5 hit ligant ve SHP099'un SHP-2'ye bağlanmasında elektrostatik etkileşimler ( $\Delta E_{ele.}$ ), van der Waals etkileşimleri ( $\Delta E_{vdW}$ ) ve nonpolar çözünme enerjileri ( $\Delta G_{nonpol.}$ ), toplam bağlanma enerjilerinin negatif yönde artmasına neden olmuştur. Aksine polar çözünme enerjisi ( $\Delta G_{polar}$ ) ise toplam bağlanma enerjilerinin pozitif yönde artmasına katkı sağlamıştır (Tablo 26). Böylece oluşturulan tüm sistemlerin stabilitesinde elektrostatik etkileşimlerin yanı sıra van der Waals ve nonpolar çözünme enerjilerinin etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Wu *et al.* 2021).

Tablo 26'daki veriler daha yakından incelendiğinde, NSC152075 haricindeki diğer hit ligantlar ve SHP099'un toplam bağlanma enerjisine yapılan negatif katkının büyük oranda  $\Delta G_{nonpol.}$  bileşeninden sağlandığı tespit edilmiştir. Bu durum  $\Delta E_{vdW}$  ve  $\Delta G_{nonpol.}$  enerjilerinin, söz konusu bileşiklerin SHP-2'ye bağlanmasına olumlu yönde katkıda bulunduğu anlamı taşımaktadır (Kumbhar *et al.* 2022). Bununla birlikte NSC152075 için hesaplanan  $\Delta G_{bağ.}$

değerine en fazla  $\Delta E_{ele}$ . bileşeninin katkı yaptığı belirlenmiştir (Tablo 26). Böylece SHP2-NSC152075 kompleksinin oluşmasında elektrostatik etkileşimlerin etkisinin baskın olduğu yorumunda bulunulmuştur (Jin *et al.* 2018). Bunun sebebinin NSC152075'in yapısında bulunan birden fazla yüklü grubun varlığından kaynaklabileceği düşünülmektedir (Wang and Wang 2019).

Çalışmada MM/PBSA hesaplamalarında hit ligantlar ve SHP099 için hesaplanan  $\Delta G_{polar}$  enerjilerinin pozitif işaretli olması (Tablo 26), bu bileşenin ligantların SHP-2'ye bağlamasına karşı olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Singh 2014). Wang *et al.* (2021c) tarafından yapılan bir çalışmada, bu durumun SHP-2'nin allosterik bağlanma cebinin büyük hacimli olması ve böylece ligantların bu bölgede büyük oranda çözücüye maruz kalmasından kaynaklandığı bildirilmiştir.

Jin *et al.* (2018), SHP-2'ye bağlı kanserlerin tedavisinde inhibitör etkili olabilecek 7 adet bileşiği çeşitli ST yöntemleriyle ilk kez keşfettikten sonra bu hit bileşiklerin bağlanma afinitelerini değerlendirmek ve mekanizmalarını daha iyi anlamak üzere MD simülasyon çalışmaları ve MM/PBSA hesaplamaları gerçekleştirmişlerdir. Bunun sonucunda SHP2-Bileşik 1 kompleksinin SHP2-SHP099 kompleksinden daha yüksek  $\Delta G_{bağ}$ . değerine ve dolayısıyla daha yüksek kararlılığa sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca Bileşik 1 ve SHP099'un SHP-2'yle oluşturduğu komplekslerin stabilizasyonunda  $\Delta G_{nonpol.}$ ,  $\Delta E_{vdW}$  ve  $\Delta E_{vdW}$  enerji bileşenlerinin toplam bağlanma enerjisine çekici (attractive) bir şekilde katkıda bulunduğunu;  $\Delta G_{polar}$  bileşenininse ise itici (repulsive) bir şekilde katkı sağladığını rapor etmişlerdir. İlave olarak,  $\Delta G_{bağ}$ . değerlerine negatif yönde artış sağlayan katkının, her iki kompleks yapısı için de büyük oranda elektrostatik etkileşimlerden kaynaklandığı sonucuna varmışlardır.

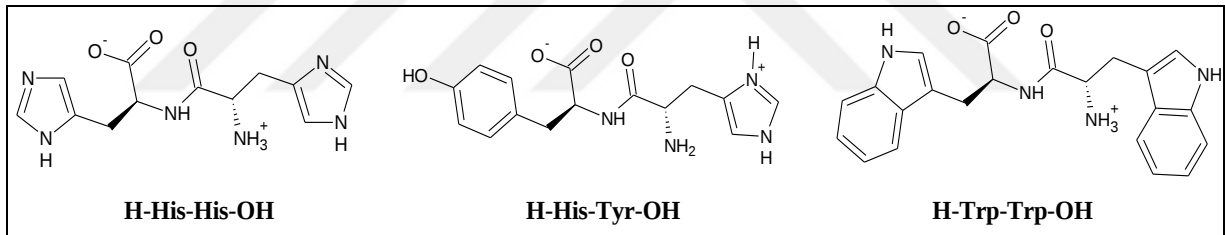
Liu *et al.* (2019) tarafından ise çeşitli *in silico* teknikler kullanarak yeni allosterik SHP-2 inhibitör adayları olarak tasarlanan *N*-(2-nitrofenil)-2-(4-okso-6,7,8,9-tetrahidro-4*H*-siklohepta[4,5]tiyeno[2,3-*d*]pirimidin-3(5*H*)-il)asetamid bileşiği (Bil#1) ve allosterik bir inhibitör olduğu bilinen SHP836 molekülü MD simülasyonlarına tabi tutulmuş ve ardından MM-PBSA yöntemiyle her bir sistemin  $\Delta G_{bağ}$ . değeri hesaplanmıştır. Buna göre çalışmada SHP2-Bil#1 kompleksinin (-1603,62 kJ/mol), SHP2-SHP836'dan (-256,94 kJ/mol) daha fazla negatif bağlanma serbest enerjisi gösterdiği ve bu durumun SHP2-Bil#1 kompleksinin daha kararlı olmasına yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca bu sistemlerin toplam etkileşim enerjisine  $\Delta E_{vdW}$ ,  $\Delta E_{ele}$ . ve  $\Delta G_{nonpol.}$  değerlerinin negatif katkısı olduğu ve sadece  $\Delta G_{polar}$ 'nin bu enerjiye pozitif katkı sağladığı anlaşılmıştır. Böylece elektrostatik etkileşimlerin, van der Waals ve polar olmayan çözünme enerjisiyle birlikte SHP2-Bil#1 ve SHP2-SHP836 komplekslerinin

stabilitesine katkıda bulunduğu yorumu yapılmıştır. Öte yandan bu sistemlerin  $\Delta G_{bağ}$  değerlerine negatif katkı için elektrostatik etkileşimlerin, van der Waals etkileşimleri ve polar olmayan serbest enerjiden daha büyük katkılar sunduğu rapor edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgular, literatürde MM/PBSA metoduyla SHP-2 sistemlerinin toplam bağlanma enerjilerinin hesaplandığı çalışma bulgularıyla uyum içerisindedir (Jin *et al.* 2018; Liu *et al.* 2019). Böylece hesaplanan  $\Delta G_{bağ}$  enerjilerinden yola çıkarak, 4 hit bileşiğin (NSC152075, NSC374121, NSC523374 ve NSC524592), SHP-2'nin potansiyel allosterik inhibitörleri olabileceği gösterilmiştir.

### ***In Vitro* Biyoaktivite Araştırmaları**

Bu tezde gerçekleştirilen *in vitro* biyoaktivite çalışmaları kapsamında, *in silico* ortamda antikanser ilaç adayları ve potansiyel allosterik SHP-2 inhibitörleri olarak tasarladığımız dipeptit yapısındaki NSC523374 (H-His-His-OH), NSC374121 (H-His-Tyr-OH) ve NSC524592 (H-Trp-Trp-OH) doğal bileşiklerinin (Şekil 83) sırasıyla SHP-2 inhibisyon aktiviteleri, MCF-7 hücre hattına karşı seçici sitotoksik-antiproliferatif etkileri ve genotoksik özellikleri araştırılmıştır.



**Şekil 83.** Çalışmada “final hit ligantlar” olarak tanımlanan ve biyolojik aktiviteleri ilk kez test edilen yeni allosterik SHP-2 inhibitör adaylarına ait molekül yapıları

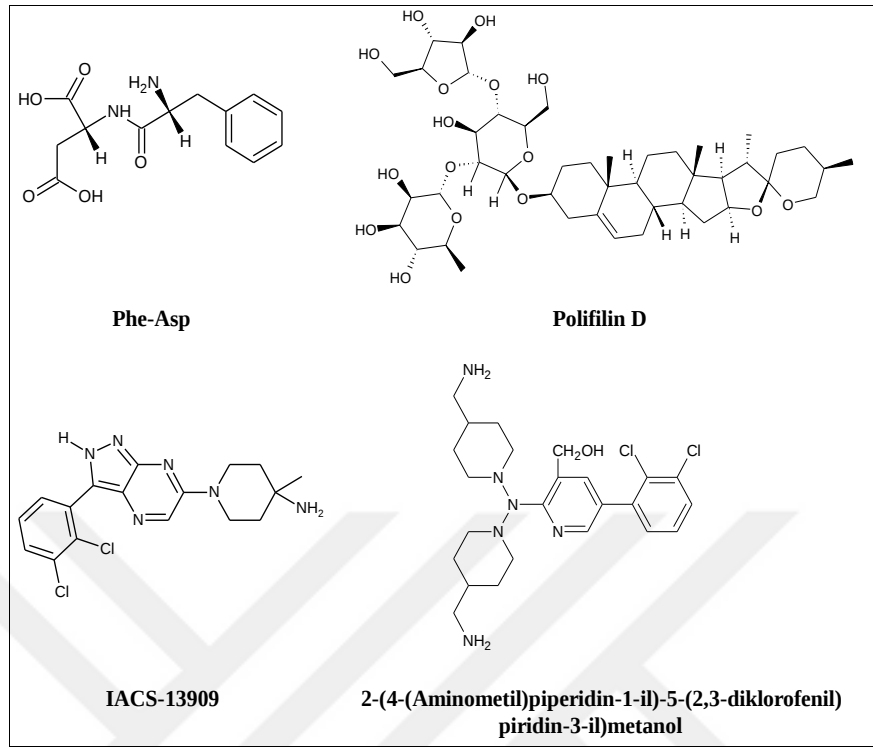
### **SHP-2 enzim inhibisyonu testi**

Bu deneyde homojen tam uzunluktaki SHP-2 enzimi ve esası florometrik ölçüme dayanan hazır bir test kiti kullanılarak yapılan *in silico* analizlerin doğrulanması amaçlanmıştır. Çalışmada SHP099 referans bileşiği için satın alınan kit vasıtasıyla tayin edilen 0,047  $\mu\text{M}$ 'lık SHP-2  $\text{IC}_{50}$  değeri (Şekil 61B ve Tablo 27), üretici firmanın bu bileşik için önceden belirlediği 0,04  $\mu\text{M}$ 'lık SHP-2  $\text{IC}_{50}$  değeriyle uyumludur (Şekil 60). Böylece kullanılan kitin, seçilen final hit bileşiklerin SHP-2 inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesinde uygun performansa sahip bir ölçüm aracı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Mevcut çalışmada dipeptit yapısındaki yeni allosterik SHP-2 inhibitör adaylarının 0,003-10,0  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında SHP-2 aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. Bunun sonucunda H-His-Tyr-OH (Şekil 62A), H-His-His-OH (Şekil 63A) ve H-Trp-Trp-OH (Şekil

64A)’nin SHP-2 enziminin aktivitesini doza bağı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı SHP-2 aktivitesi yüzde grafiklerinin çizilmesiyle H-His-Tyr-OH (Şekil 62B), H-His-His-OH (Şekil 63B) ve H-Trp-Trp-OH (Şekil 64B) için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,021 µM, 1,179 µM ve 1,329 µM olarak saptanmıştır (Tablo 27). Ayrıca her bir molekül için elde edilen doz-yanıt eğrisinin sigmoidal bir şekle sahip olması, allosterik tipte inhibisyon mekanizmasına işaret etmektedir (Sun *et al.* 2020; Kwon *et al.* 2021). Benzer şekilde, Kostrzewa *et al.* (2018) tarafından Phe-Asp (Şekil 84) dipeptidinin SHP-2 üzerine olan inhibisyon potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada, bu molekülün SHP-2’nin aktivitesini allosterik mekanizma üzerinden güçlü bir şekilde (SHP-2 IC<sub>50</sub>: 5,2 µM) inhibe ettiği belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, Kwon *et al.* (2021) tarafından Polifilin D (Şekil 84) isimli doğal molekülün SHP-2’nin allosterik inhibisyonuna yönelik elde edilen doz-yanıt eğrisinin IC<sub>50</sub> değeri 15,3 µM olan sigmoidal bir şekil sunduğunu bildirmişlerdir. Sun *et al.* (2020) ise IACS-13909 (Şekil 84) molekülünün fosfataz aktivitesini *in vitro* olarak inhibe etme potansiyelini belirledikleri çalışmalarında IACS-13909’un 15,7 nmol/L SHP-2 IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca bu güçlü inhibisyon özelliğinin mekanizmasını detaylı olarak araştırdıklarında, IACS-13909’un bazik amin gruplarının Glu110 ve Phe113’ün omurga atomları ve pirazol halkasında bulunan hidrojen atomunun ise Glu250’nin omurga karbonil grubuyla hidrojen bağı yaptığını tespit etmişlerdir. Ek olarak, IACS-13909’un diklorobenzen grubu ile Arg111 yan zinciri arasında katyon-π etkileşiminin varlığını rapor etmişlerdir. Yine Liu *et al.* (2020b) tarafından gerçekleştirilen benzer bir başka çalışmada, 2-(4-(aminometil)piperidin-1-il)-5-(2,3-diklorofenil)piridin-3-il)metanol (Şekil 84) bileşiğinin *in vitro* ortamda SHP-2 inhibisyon aktivitesinin IC<sub>50</sub> değeri 1,36 µM olarak tayin edilmiştir. Bununla birlikte bileşik 18’in 2D etkileşim diyagramında, C-SH2 ve N-SH2 domainleri arasında bulunan Thr108, Glu110, Arg111 ve Phe113 rezidüleriyle hidrojen bağı etkileşimlerinin, Arg111 ile oluşturulan katyon-π etkileşiminin ve hidrofobik etkileşimlerin mevcut olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da literatüre uyumlu olarak dipeptit yapısındaki 3 adet doğal allosterik SHP-2 inhibitörü için en az mikromolar seviyede SHP-2 inhibisyon aktivitesi saptanmıştır. Hatta H-His-Tyr-OH’nin SHP-2’yi inhibe etmede SHP099’dan daha yüksek bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir (Garcia Fortanet *et al.* 2016). Literatürde diğer allosterik SHP-2 inhibitörleri için rapor edilen IC<sub>50</sub> değerlerinin bizim çalışmamızdan farklılık göstermesinin nedeninin her bir moleküldeki kimyasal ve yapısal tanımlayıcıların değişkenliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Armutlu *et al.* 2008). Son olarak, allosterik SHP-2 inhibitörlerinin etki mekanizmalarının belirlendiği çalışmalardan elde edilen intermoleküler etkileşim bulguları, bu çalışmadaki yeni SHP-2 inhibitörlerinin moleküler etkileşim analizi sonuçlarını da desteklemektedir. Bu sonuçlar, H-His-Tyr-OH, H-

His-His-OH ve H-Trp-Trp-OH'nin ilaç geliştirme çalışmalarında lider bileşikler olarak iyi birer başlangıç noktası teşkil edebileceğini göstermektedir (Jansen *et al.* 2013).



**Şekil 84.** Literatürde bilinen güçlü allosterik SHP-2 inhibitörlerinden bazılarının kimyasal yapıları

#### MTT testi vasıtasıyla seçici antiproliferatif ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi

Son yıllarda SHP-2'nin onkogenezdaki büyük önemi ve alaka düzeyinin daha iyi anlaşılmasıyla; SHP-2 enziminin işlevini engellemek suretiyle, bu enzim tarafından sağlanan ana kontrol mekanizmasını düzenleyen yeni antikanser ilaçların tasarımı, keşfi ve geliştirilmesi alanlarının popülaritesi önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca doğal veya sentetik kaynaklar kullanılarak çeşitli kimyasal yapı iskeletlerine sahip çok sayıda küçük moleküllü SHP-2 inhibitörü geliştirilmiştir (Liu *et al.* 2021a). Şimdiye dek, SHP-2 inhibitörleriyle, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, özofagus kanseri, kolorektal kanser, glial hücre tümörleri ve metastatik solid tümörler de dahil olmak üzere farklı türde karsinomlar için 20 adet klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte çeşitli araştırma grupları tarafından SHP-2'nin katalitik ve allosterik bölgelerine yönelik inhibitör özelliğinde birçok molekül geliştirilmiştir. Katalitik bölgenin inhibisyonunun PTF bölgesinin ve aktif ara ürünün polar yapısından dolayı zorlayıcı olduğu bilinmektedir. Öte yandan, allosterik inhibitörlerin daha iyi bir etki profili sergiledikleri ve daha üstün farmakokinetik özelliklere sahip oldukları rapor edilmiştir (Shen *et al.* 2020; Wu *et al.* 2020; Mitra and Ayyannan 2021).

Allosterik SHP-2 inhibitörleri, kanser tedavisi için yüksek terapötik potansiyele sahip moleküllerin önemli bir parçasıdır (Chen *et al.* 2020b). Daha önce yapılan çalışmalarda SHP-2'nin bazı yeni küçük molekül inhibitörleri tanımlanmış olup bu moleküllerin anormal şekilde düzenlenmiş çeşitli RTK'lar (örneğin; ERBB2, FGFR2, EGFR ve ALK) tarafından yönlendirilen kanser hücrelerinde etkili olabileceği öne sürülmüştür (Wang *et al.* 2021a). Bununla birlikte literatürde ilk olarak rapor edilen allosterik SHP-2 inhibitörü SHP099 bileşiğidir ve bu bileşik sayesinde SHP-2'nin kanserdeki işlevi üzerine günümüzde daha fazla mekanizma odaklı çalışma yapılması mümkün hale gelmiştir. Nian *et al.* (2021) tarafından yayınlanan bir derleme makalesinde, SHP099'un KYSE-520 ksenograft modellerinde p-ERK proteini için IC<sub>50</sub> değeri 0,25 µM olan antitümör aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Bu araştırmalar sonucunda SHP099 molekülü, kanser tedavisi için umut verici bir ilaç adayı olarak ortaya çıkmıştır (Garcia Fortanet *et al.* 2016; Wang *et al.* 2020d).

SHP099'un dışında, özellikle son 5 yılda, antikanser özelliğe sahip farklı kimyasal yapı iskeleti taşıyan birçok yeni allosterik SHP-2 inhibitörü keşfedilmiştir. Bunlar arasında başlıca MCF-7'ye karşı antiproliferatif etki gösterdiği saptanan dipeptit yapısındaki Phe-Asp (Kostrzewa *et al.* 2018), Ras-GTP'ye bağlı onkojenik BRAF, NF1 kaybı veya nükleotid döngülü onkojenik Ras taşıyan insan kanser modellerinde antiproliferatif etkiye sahip olan RMC-4550 (Nichols *et al.* 2018), MDA-MB-231 insan meme adenokarsinom hücrelerinin proliferasyonunu 0,1 µM konsantrasyonda %56,79 oranında azalttığı belirlenen metil (6-amino-5-(2,3-diklorofenil)pirazin-2-il)prolinprolinat (Parsonidis *et al.* 2019), MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif ve antimigratif aktiviteye sahip olduğu rapor edilen 5-aminosalisilat-4-tiyazolidinon türevleri olan HH-3 ve HH-13 (Vazhappilly *et al.* 2019), KRAS mutasyonunun yönlendirdiği insan kolorektal kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemenin yanı sıra KRAS güdümlü LS180 ve HCT116 ksenograft modellerine karşı iyi bir antitümör etki potansiyeline sahip olan PCC0208023 (Chen *et al.* 2020b), MDA-MB-468 insan meme kanseri hücreleri üzerinde iyi bir antiproliferatif etki (IC<sub>50</sub>: 4,6 µM) gösterdiği saptanan 4,6-trihidroksi-5-okso-5H-benzo[7]annulen (Kim *et al.* 2020), Ba/F<sub>3</sub> fare B lenfosit hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmede yüksek bir aktivite (IC<sub>50</sub>: 2,35 µM) potansiyeli olan 2-(4-(aminometil)piperidin-1-il)-5-(2,3-diklorofenil)piridin-3-il)metanol (Liu *et al.* 2020b) bileşikler yer almaktadır. Verilen bu güncel örneklerden anlaşılacağı üzere, allosterik SHP-2 inhibitörü özelliğindeki moleküller antikanser ilaç geliştirme çalışmaları için umut vadetmektedir. Böylece mevcut tez çalışması kapsamında yeni allosterik SHP-2 inhibitörü oldukları belirlenen dipeptit yapısındaki 3 adet doğal molekül için seçici sitotoksik ve antiproliferatif aktivite araştırmalarının yapılması uygun görülmüştür.

Geçmişten günümüze dek gerçekleştirilen birçok çalışmada SHP-2 enziminin meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir (Zhou and Agazie 2008; Li *et al.* 2014; Matalkah *et al.* 2016). Ayrıca Muenst *et al.* (2013) tarafından SHP-2 aşırı ekspresyonunun, luminal A/HER2- moleküler alt tipine sahip meme kanseri hastalarında prognozu kötü yönde etkilediği ve genel sağkalımı azalttığı belirtilmiştir. Literatüre göre, MCF-7 hücreleri ER ve PR bakımından pozitif olup luminal A moleküler alt tipine sahiptir (Comşa *et al.* 2015). Türkiye’de meme tümörlerinin moleküler alt tip analizine bakıldığında, %57,7’sinin luminal A, %20,6’sının luminal B, %9,6’sının HER-2 tipi ve %12,1’inin üçlü negatif olduğu bulgusuna ulaşılmaktadır (Özmen *et al.* 2019). Buradan hareketle çalışmamızda *in vitro* meme kanseri modeli olarak MCF-7 hücre hattı kullanılmış olup yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerinin seçici sitotoksik-antiproliferatif etkileri MCF10A sağlıklı meme epitel hücrelerine karşı belirlenmiştir.

Çalışmada test bileşiklerinin kültüre alınmış hücreler üzerindeki antiproliferatif etkinliklerinin ve dolayısıyla hücre hatlarının canlılık oranlarının değerlendirilmesinde günümüzde standart bir protokol haline gelen MTT yöntemi kullanılmıştır (Kocaçalışkan 2018; Rai *et al.* 2018; Cheremnykh *et al.* 2019). Bu testin uygulamaları esnasında MCF-7 ve MCF10A hücre hatları çeşitli konsantrasyonlarda (0,015, 0,06, 0,24, 0,96, 3,84, 15,36, 61,44 ve 245,76  $\mu$ M) hazırlanan test maddeleriyle muamele edilmiş ve hazırlanan plakaların her biri 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş hava koşullarında 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübe edilmiştir (Larsson *et al.* 2020). Böylece çalışmada allosterik SHP-2 inhibitörü özelliği gösterdiği tespit edilen H-His-His-OH, H-Trp-Trp-OH ve H-His-Tyr-OH moleküllerinin MCF-7 hücre hattına karşı seçici sitotoksik ve antiproliferatif etkileri belirlenen zaman aralıklarında doza bağımlı bir şekilde test edilmiştir. Son aşamada bileşiklerin MCF-7 ve MCF10A hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe etmedeki etki güçleri IC<sub>50</sub> değerleri olarak ifade edilmiştir. Bu noktada 1 ila 10 arasındaki IC<sub>50</sub> değerlerinin “çok güçlü”, 11 ila 25 arasındaki IC<sub>50</sub> değerlerinin “güçlü”, 26 ila 50 arasındaki IC<sub>50</sub> değerlerinin “orta derecede”, 51 ila 100 arasındaki IC<sub>50</sub> değerlerinin “zayıf” sitotoksik aktiviteyi işaret ettiği ve 100’ün üzerinde olan IC<sub>50</sub> değerlerinin ise sitotoksik olmadığı kabul edilmiştir (El-Husseiny *et al.* 2020).

Elde edilen sonuçlara göre, H-His-His-OH, MCF-7 hücrelerinin canlılığını 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 3,10  $\mu$ M, 1,83  $\mu$ M ve 2,98  $\mu$ M’lık IC<sub>50</sub> değerleriyle inhibe ederek tüm zaman periyotlarında konsantrasyona bağlı olarak çok güçlü bir sitotoksik aktivite göstermiştir (Tablo 28). Ayrıca bu bileşiğin SHP-2 enzim aktivitesini etkili bir şekilde inhibe ettiği dozlarda hücre canlılığını da inhibe ettiği tespit edilmiştir. Aynı durum, H-His-His-OH kadar güçlü olmasa da, enzim aktivitesi deneylerinde SHP099’a kıyasla daha iyi bir inhibisyon profili (IC<sub>50</sub>

değerleri 24 saat için  $\geq 245,76 \mu\text{M}$ , 48 saat için  $6,13 \mu\text{M}$  ve 72 saat için  $7,79 \mu\text{M}$ ) sergileyen H-His-Tyr-OH için de gözlenmiştir (Tablo 28). Bununla birlikte H-His-Tyr-OH'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu zamana bağlı olarak inhibe etme potansiyeli, literatürde gallik asit ve epigallokateşin gallat bileşikleri için Hs578T insan meme kanseri hücrelerini inhibe etmede belirlenen inhibisyon profillerine benzerlik göstermektedir (Braicu *et al.* 2011). Yapılan bu çalışmada, Hs578T'ye karşı gallik asidin antiproliferatif etki gücü 24., 48. ve 72 saatler için sırasıyla  $211,1 \mu\text{M}$ ,  $40,14 \mu\text{M}$  ve  $31,76 \mu\text{M}$  ve epigallokateşin gallatın antiproliferatif etki gücü ise aynı zaman noktalarında sırasıyla  $131,6 \mu\text{M}$ ,  $15,8 \mu\text{M}$  ve  $17,75 \mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Böylece H-His-Tyr-OH için sitotoksik etkilerin 24 saatlik zaman periyodundan sonra ortaya çıkabildiği bulgusu desteklenmiştir. Ek olarak, çalışmamızda en düşük SHP-2 inhibisyon aktivitesine sahip olduğu belirlenen H-Trp-Trp-OH'nin, MCF-7 hücreleri üzerinde test edilen hiçbir dozda önemli bir sitotoksik etkisinin (hücre canlılığı  $> \%70$ ) bulunmadığı ( $\text{IC}_{50}$  değerleri 24., 48. ve 72. saat için  $\geq 245,76 \mu\text{M}$ ) saptanmıştır (Tablo 28) (Dahlan-Daud *et al.* 2020; Roszak *et al.* 2020).

Alınan bu sonuçlar, çalışmada yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerine yönelik MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> platformunda yapılan toksisite tahminlerinde hesaplanan pGI<sub>50</sub> değerleriyle uyum göstermektedir. Bu değer, bir bileşiğin MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe etme potansiyelini ifade etmektedir. Kullanılan modelde 6'dan 8'e kadar olan değerler toksik bir metabolite karşılık gelmektedir. Bu yüzden 6'dan küçük değerler tercih edilmektedir (Mollica *et al.* 2019). Tablo 21'e bakıldığında, H-His-His-OH, H-His-Tyr-OH ve H-Trp-Trp-OH için tahmin edilen pGI<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 4,39, 4,78 ve 4,72 olduğu görülmektedir. Tespit edilen bu değerlerin 6'dan küçük olması, dipeptit yapısındaki bu doğal moleküllerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesini destekler niteliktedir.

Çalışmada MCF-7'ye karşı çok güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenen H-His-His-OH ve H-His-Tyr-OH'nin MCF-7 hücreleriyle 72 saat süreyle inkübasyonunun, 48 saat süre ile inkübasyonundan nispeten daha yüksek  $\text{IC}_{50}$  değerleri verdiği tespit edilmiştir (Tablo 28). Daha önce Abu Bakar *et al.* (2019) tarafından Goniothalamine (0-30  $\mu\text{g/mL}$ ) bileşiğinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde MCF-7 için elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değerlerinin sırasıyla  $4,65 \mu\text{M}$ ,  $0,58 \mu\text{M}$  ve  $0,79 \mu\text{M}$  olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde, Gherman *et al.* (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, antikanser bir ilaç olan Oxaliplatin'in kolon kanseri (Colo320) hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi incelenmiş olup bu molekülün 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla  $14,45 \mu\text{g/mL}$ ,  $7,86 \mu\text{g/mL}$  ve  $8,36 \mu\text{g/mL}$ 'lik  $\text{IC}_{50}$  değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda her iki çalışmanın sonuçları da mevcut çalışma bulgularıyla uyum göstermektedir.

Öte yandan, hücresel ortamda SHP-2 inhibisyonunun varlığının sitotoksik etkiyi artırması beklenmektedir (Liu *et al.* 2020b; Kwon *et al.* 2021; Ghemrawi *et al.* 2022). Ancak çalışmamızda enzim aktivitesi deneylerinde en güçlü allosterik SHP-2 inhibitörü olduğu belirlenen H-His-Tyr-OH'nin, MCF-7 hücre hattı üzerinde H-His-His-OH'den daha düşük bir sitotoksik-antiproliferatif aktivite gösterdiği tayin edilmiştir. Bu durumun ortaya çıkmasında, Copeland (2005) tarafından belirtildiği üzere bu bileşiklerin farklı kimyasal yapılara ve dolayısıyla farklı hücre geçirgenlik özelliklerine sahip olmaları ve/veya hücrelerdeki çeşitli aktif taşıma mekanizmaları tarafından dışarıya atılmaları gibi faktörlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, enzimatik inhibisyon ve hücresel etki arasındaki korelasyon eksikliği, SHP-2 inhibisyonunun gözlenen hücresel etkilerin nedeni olmadığına dair bir kanıt olarak görülmemektedir.

Ayrıca çalışmada H-His-His-OH ve H-His-Tyr-OH için 24., 48. ve 72. saatlerde MCF-7 hücre hattına ait belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri, bilinen bir antikanser ilaç olan DXR'nin MCF-7'ye karşı aynı zaman periyotlarında elde edilen IC<sub>50</sub> değerleriyle kıyaslanmıştır. Bu noktada DXR bileşiğine ait MCF-7 IC<sub>50</sub> değerleri literatürden 24., 48 ve 72. saatler için sırasıyla 16,3 µM, 0,09 µM ve 0,01 µM olarak sağlanmış ve çalışmamızda MCF-7 hücre hattına karşı denenmiştir (Sharma *et al.* 2011; Jokar *et al.* 2015; Abd Razak *et al.* 2019; Georgiev *et al.* 2019). Buna göre, H-His-His-OH bileşiği, 24. saatte 3,10 µM IC<sub>50</sub> değeri ile DXR'den daha etkili bir antiproliferatif aktivite sonucu göstermiştir. Bu sonuç, Vazhappilly *et al.* (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada yeni allosterik SHP-2 inhibitörü olarak tanımlanan HH-3 bileşiğinin 48. saatte MCF-7 hücre hattına karşı DXR'den daha güçlü bir antiproliferatif aktiviteye sahip olmasına benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla, H-His-His-OH için MCF-7 hücre hattı üzerinde elde edilen bu bulgular, bu molekülün çok güçlü düzeydeki sitotoksik-antiproliferatif etkinliğini ortaya çıkartmakla birlikte gelecekteki daha ileri biyoaktivite çalışmalarının yapılmasına da teşvik edici olmuştur.

Sitotoksisite çalışmalarının sonuçlarına genel olarak bakıldığında, MCF-7 hücre hattına karşı aktif olan bileşiklerin imidazol halkası içerdiği gözlenmiştir. Nitekim H-His-His-OH bileşiğinde iki adet, H-His-Tyr-OH bileşiğinde ise bir adet imidazol halkası bulunmaktadır. İmidazol içeren bileşikler geçmişten günümüze etkili antikanser ajanlar olarak kullanılmıştır. Örneğin, çeşitli kanser türlerini tedavi etmek amacıyla Dakarbazin, Temozolomid, Zoledronik asit, Merkaptopürin, Nilotinib ve Tipifarnib gibi farklı yapıdaki imidazol türevi bileşikler klinikte halen kullanılmaktadır (Ali *et al.* 2017). Böylece mevcut çalışmada MCF-7'ye karşı çok güçlü sitotoksik etki gösterdiği saptanan dipeptit moleküllerinin yapısında bulunan imidazol grubunun bu moleküllerin sitotoksik aktivitesinden sorumlu olabileceği düşünülmekte

ve bu tip moleküllerdeki imidazol gruplarının sayısı arttıkça sitotoksik etkinliği de artabileceği öngörülmektedir (Verma *et al.* 2013).

Çalışmamızda yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerinin seçiciliği, sağlıklı meme epitel hücre hattı olan MCF10A hücrelerine karşı test edilmiştir. Ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattı olan MCF10A, tümörjenik olmayan kökeni nedeniyle selektivite analizinde kullanılmıştır (Peña-Morán *et al.* 2016). İdeal bir antikanser ajan, kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyebilme özelliğine sahip olmalı ancak sağlıklı hücrelere zarar vermemelidir (Tor *et al.* 2015). Bu noktada, MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik etki gösteren H-His-His-OH ve H-His-Tyr-OH'nin, MCF-7'ye kıyasla MCF10A hücrelerinin proliferasyonunu azaltmada daha az etkili olması kanser hücre hatları üzerinde spesifik bir etkisi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca H-His-His-OH ve H-His-Tyr-OH için 48 saatte sırasıyla  $\geq 134,3$  ve 3,7 olarak kaydedilen SI değerleri (Tablo 30), sitotoksitenin MCF-7 hücrelerine doğru seçildiğini göstermektedir (Abd Razak *et al.* 2019). Bu çalışmada tayin edilen IC<sub>50</sub> ve SI değerlerinden H-His-His-OH ve H-His-Tyr-OH'nin potansiyel antikanser ajanlar olarak umut verici bileşikler olduğu sonucuna varılmaktadır (Suma *et al.* 2019).

Doğal kaynaklı peptitlerin tümör hücrelerini seçme yetenekleri, sağlıklı hücreler ve tümör hücreleri arasındaki fizyolojik ve biyokimyasal farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Örneğin, tümör hücrelerinde bol miktarda fosfatidilserin ve heparan sülfat gibi anyonik maddelerin varlığı hücre zarındaki negatif yük miktarını artırabilmektedir. Bununla birlikte katyonik doğal sitotoksik peptitler, membran potansiyeli aracılı elektrostatik etkileşimler oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu nedenle “geleneksel” kemoterapötik ilaçlarla elde edilemeyen bir seçicilik sergilemektedir. Çalışmamızda selektif sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği belirlenen H-His-His-OH ve H-His-Tyr-OH moleküllerinde pozitif olarak yüklenebilen amino ( $-NH_3^+$  ve  $=NH^+$ ) gruplarının bulunmasının bu moleküllerin tümör hücresi seçiciliğine önemli oranda katkı sağlamış olabileceği öngörüsünde bulunmaktadır (Hoskin and Ramamoorthy 2018; Chiangjong *et al.* 2020; Luan *et al.* 2020).

### **Maya DEL test sistemi ile genotoksik özelliklerin tayini**

Günümüzde kombinatorial kimya, moleküler biyoloji, genomik ve otomasyondaki gelişmeler, amaçlanan farmakolojik hedefler ile reaksiyona girebilen çok sayıda bileşiğin tanımlanmasına yol açmıştır. Ancak bu bileşiklerin %40'ı, klinik geliştirme esnasında güvenlikle ilgili sorunlar nedeniyle başarısız olmuştur. Ayrıca ilaç adaylarının yaklaşık %12'sinin tek başına genetik toksikoloji sorunları nedeniyle genel yıpranması söz konusudur. Bu sebeple, hızlı ve ekonomik bir test sistemi kullanılarak ilaç adayı bileşiklerin erken aşamalarda genetik güvenliğinin tahmin edilmesi, ilaçların hastalara verilmesindeki

gecikmeleri önlemek ve ekonomik kayıpları azaltmak açısından oldukça önemlidir (Kirpnick *et al.* 2005).

Çalışmada test bileşiklerinin genotoksik özellikleri, maya DEL testiyle mutant *S. cerevisiae* RS112 test suşu kullanılarak tayin edilmiştir (Brennan and Schiestl 2004). Bu test için hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 0,015-245,76  $\mu$ M doz aralığı esas alınmış olup maddelerin bu aralıkta olan sekiz farklı uygulama konsantrasyonu denenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, yeni allosterik SHP-2 inhibitörleri ve SHP099'a ait test edilen tüm dozların maya hücrelerinin canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Kirpnick *et al.* 2005).

Genotoksisite sonuçları yakından incelendiğinde; H-His-Tyr-OH (Şekil 75), H-His-His-OH (Şekil 76), H-Trp-Trp-OH (Şekil 77) ve SHP099 (Şekil 78)'a ait uygulama dozlarının hiçbirinin kromozom içi DEL rekombinasyonu ve kromozomlar arası gen konversiyonu frekanslarında anlamlı bir artış meydana getirmediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, test maddelerinin mutagenез için alkilleyici bir ajan olmadığını ve mutant *S. cerevisiae* RS112 suşunda intrakromozomal veya interkromozomal dönüşümler açısından 245,76  $\mu$ M doza kadar güvenli kabul edilebileceklerini açıkça ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgulara test bileşiklerinin böyle bir artışa neden olmaması; günümüzde delesyon, rekombinasyon ve karsinogenez arasındaki sıkı ilişkinin iyi bilinmesinden ötürü oldukça önemlidir (Demir 2019). Ayrıca ileride ilaç olarak insan kullanımına sunulması planlanan kimyasal bir bileşiğin genotoksik etkinliğinin belirlenmesi, değerlendirme sürecinin bir parçası olarak, çeşitli ülkelerdeki düzenleyici otoriteler tarafından talep edilmektedir (Şen *et al.* 2018).

Sonuç olarak, günümüzde onkogenik fonksiyona sahip olduğu bilinen ve kanser alanında yapılan araştırmaların odak noktalarından biri olan SHP-2 enzimine karşı allosterik mekanizma üzerinden inhibitör etkisi gösteren yeni bileşikler keşfetmek amacıyla SBVS ve ligant temelli ilaç tasarım yöntemleri kullanılmıştır. NCI veritabanından elde edilen 265,242 bileşik, SHP-2'nin allosterik bölgesine SBVS teknikleri kullanılarak kenetlenmiştir. Bu noktada elde edilen hit ligantlar, docking skorları ve intermoleküler etkileşim bulguları temel alınarak seçilmiştir. Ardından MC<sup>TM</sup>/MD<sup>TM</sup> platformunda bu bileşiklerin "akılcı ilaç tasarımı" yaklaşımıyla potansiyel kanser terapötik aktiviteleri, olası toksisite riskleri ve ilaç olma özellikleri değerlendirilmiştir. Bu şekilde birtakım kriterlere göre filtrelenen ve sayıca azaltılan hit ligantlar, MD simülasyonlarına tabii tutulmuş ve oluşan protein-ligant komplekslerinin toplam bağlanma enerjileri MM/PBSA yöntemiyle hesaplanmıştır. Böylece *in silico* çalışmalar kapsamında dipeptit yapısında 3 adet doğal moleküle ulaşılmış ve bu moleküllerin *in vitro* biyoaktivitelerinin literatürde ilk kez belirlenmesi amacıyla çeşitli deneyler tasarlanmıştır.

Özetle SHP-2 enzim inhibisyon deney sonuçları bu çalışmada 3 adet yeni allosterik SHP-2 inhibitörü keşfedildiğini ortaya koymuştur. H-His-Tyr-OH (SHP-2 IC<sub>50</sub>: 0,021 µM), H-His-His-OH (SHP-2 IC<sub>50</sub>: 1,179 µM) ve H-Trp-Trp-OH (SHP-2 IC<sub>50</sub>: 1,329 µM) molekülleri ileri çalışmalar için lider bileşikler olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte literatüre allosterik SHP-2 inhibitörleri için yeni bir bağlanma modu önerilmiştir. Sitotoksikite çalışmalarından elde edilen sonuçlar H-His-His-OH (IC<sub>50</sub>: 1,83 µM ve SI ≥ 134,3) ve H-His-Tyr-OH (IC<sub>50</sub>: 6,13 µM ve SI: 3,7)'nin MCF-7 hücrelerine karşı çok güçlü ve seçici bir sitotoksik-antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Genotoksikite çalışmaları ise yeni allosterik SHP-2 inhibitörlerinin delesyon ve gen konversiyonu mekanizmaları üzerinden herhangi bir genotoksik aktiviteye sahip olmadığını kanıtlamıştır. Bu tez çalışmasında antikanser adayları ve yeni allosterik SHP-2 inhibitörleri olarak tanımlanan doğal bileşiklerle yapılacak *in vitro* ve/veya *in vivo* çalışmalarla SHP-2 aşırı ekspresyonu görülen kanser türlerinin tedavisine yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abd Razak, N., Abu, N., Ho, W.Y., Zamberi, N.R., Tan, S.W., Alitheen, N.B., Long, K. and Yeap, S.K., 2019. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Scientific Reports*, 9 (1), 1514. Doi: 10.1038/s41598-018-37796-w.
- Abdulahadi, N., 2021. Determination of Therapeutic Effects of Multifunctional Antibody and Peptide Micelle-Based Nanocarriers on Breast Cancer Cells. MS Thesis, Graduate School of Natural and Applied Sciences, İzmir.
- Abu Bakar, S.A., Ali, A.M. and Ahmad, N.H., 2019. Differential Antiproliferative Activity of Goniothalamin Against Selected Human Cancer Cell Lines. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 15, 66-73.
- Abu Khalaf, R., Jarekji, Z., Al-Qirim, T., Sabbah, D. and Shattat, G., 2015. Pharmacophore modeling and molecular docking studies of acridines as potential DPP-IV inhibitors. *Current Computer-Aided Drug Design*, 16 (3), 295-307. Doi: 10.2174/157340991566618121114743.
- Adilović, A., Mahmutović, L., Huseinbegović, E. and Suljagić, M., 2020. Characterization of solvents and optimization of stability and solubility of bioactive compounds used in lymphoma cell culture treatments. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*, 8 (4), 2553-2563. Doi: 10.21533/pen.v8i4.1746.
- Afriza, D., Suriyah, W.H. and Ichwan, S.J.A., 2018. *In silico* analysis of molecular interactions between the antiapoptotic protein survivin and dentatin, nordentatin, and quercetin. *Journal of Physics: Conference Series*, 1073 (3), 032001. Doi: 10.1088/1742-6596/1073/3/032001.
- Aksoydan, B., Kantarcioglu, I., Erol, I., Salmas, R.E. and Durdagi, S., 2018. Structure-based design of hERG-neutral antihypertensive oxazalone and imidazolone derivatives. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 103-117. Doi: 10.1016/j.jmgm.2017.10.011.
- Akyol, K., 2021. *İn Siliko* Modelleme Yaklaşımıyla Yeni ve Seçici Protein Tirozin Fosfataz 1B İnhibitörlerinin Araştırılması. Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alam, S. and Khan, F., 2018. Virtual screening, Docking, ADMET and System Pharmacology studies on Garcinia caged Xanthone derivatives for Anticancer activity. *Scientific Reports*, 8, 5524. Doi: 10.1038/s41598-018-23768-7.
- Alamri, M.A. and Alamri, M.A., 2019. Pharmacophore and docking-based sequential virtual screening for the identification of novel Sigma 1 receptor ligands. *Bioinformation*, 15 (8), 586-595. Doi: 10.6026/97320630015579.
- Ali, A., Abdellattif, M.H., Ali, A., AbuAli, O., Shahbaaz, M., Ahsan, M.J. and Hussien, M.A., 2021. Computational Approaches for the Design of Novel Anticancer Compounds Based on Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Derivatives as TRAP1 Inhibitor. *Molecules*, 26 (19), 5932. Doi: 10.3390/molecules26195932.
- Ali, I., Lone, M.N. and Aboul-Enein, H.Y., 2017. Imidazoles as potential anticancer agents. *MedChemComm*, 8 (9), 1742-1773. Doi: 10.1039/c7md00067g.

- Allegra, M., Tutone, M., Tesoriere, L., Attanzio, A., Culetta, G. and Almerico, A.M., 2021. Evaluation of the IKK $\beta$  Binding of Indicaxanthin by Induced-Fit Docking, Binding Pose Metadynamics, and Molecular Dynamics. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 701568. Doi: 10.3389/fphar.2021.701568.
- Al-Tamimi, S., 2019. Design and Targeting of Silver-Copper Nanoparticles for The Anti-Cancer Activity in Cancer Cells. MS Thesis, College of Health and Life Sciences, Doha.
- Angell, Y., Holford, M. and Moos, W.H., 2018. Building on Success: A Bright Future for Peptide Therapeutics. *Protein & Peptide Letters*, 25 (12), 1044-1050. Doi: 10.2174/0929866525666181114155542.
- Anonymous, 2021. MCF 10A (CRL-10317™). American Type Culture Collection (ATCC) website, <https://www.atcc.org/products/crl-10317> (16.10.2021).
- Anonymous, 2021. MCF7 (HTB-22™). American Type Culture Collection (ATCC) website, <https://www.atcc.org/products/htb-22> (16.10.2021).
- Anonymous, 2022. Binary QSAR models for prediction of therapeutic activity and toxic effects. Clarivate Analytics, [https://portal.genego.com/help2/MetaCore/wwhelp/wwhimpl/js/html/wwhelp.htm#href=MD\\_HELP.2.5.html](https://portal.genego.com/help2/MetaCore/wwhelp/wwhimpl/js/html/wwhelp.htm#href=MD_HELP.2.5.html) (10.08.2022).
- Antony, P. and Vijayan, R., 2015. Identification of Novel Aldose Reductase Inhibitors from Spices: A Molecular Docking and Simulation Study. *PLoS One*, 10 (9), e0138186. Doi: 10.1371/journal.pone.0138186.
- Aravinthan, A., Govarthanan, M., Selvam, K., Praburaman, L., Selvankumar, T., Balamurugan, R., Kamala-Kannan, S. and Kim, J-H., 2015. Sunroot mediated synthesis and characterization of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial and rat splenocyte cytotoxic effects. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1977-1983. Doi: 10.2147/IJN.S7910.
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G. and Lo Muzio L., 2017. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 40 (2), 271-280. Doi: 10.3892/ijmm.2017.3036.
- Arjmand, F., Afsan, Z. and Roisnel, T., 2018. Design, synthesis and characterization of novel chromone based-copper(II) antitumor agents with *N,N*-donor ligands: comparative DNA/RNA binding profile and cytotoxicity. *RSC Advances*, 8, 37375-37390. Doi: 10.1039/c8ra06722h.
- Ark, M., Özdemir, A., Şimay, Y.D. and İbişoğlu, B. 2017. Hücre Kültürü. Hücre Kültürü ve Temel Moleküler Biyoloji Protokolleri, Ed: M. Ark. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 6-11. ISBN: 978-605-9215-31-2.
- Armutlu, P., Ozdemir, M.E., Uney-Yuksektepe, F., Kavakli, H. and Turkay, M., 2008. Classification of drug molecules considering their IC<sub>50</sub> values using mixed-integer linear programming based hyper-boxes method. *BMC Bioinformatics*, 9, 411. Doi: 10.1186/1471-2105-9-411.
- Arumugam, G.S., Sen, A., Dash, S.S., Mitra, K., Doble, M., Rajaraman, G. and Gummadi, S.N., 2021. Arjunetin as a promising drug candidate against SARS-CoV-2: molecular dynamics simulation studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, online ahead of print, 1-22. Doi: 10.1080/07391102.2021.1970627.
- Aslantürk, Ö.S., 2017. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, Ed(ler): M.L. Larramendy and S. Soloneski. InTech, United Kingdom, 1-17. Doi: 10.5772/intechopen.71923. Doi: 10.5772/intechopen.69556.

- Atasanov, A.G., Zotchev, S.B., Dirsch, V.M., the International Natural Product Sciences Taskforce and Supuran, C.T., 2021. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20 (3), 200-216. Doi: 10.1038/s41573-020-00114-z.
- Ates, I. and Bilgin, T.T., 2021. The Investigation of the Success of Different Machine Learning Methods in Breast Cancer Diagnosis. *Konuralp Medical Journal*, 13 (2), 347-356. Doi: 10.18521/ktd.912462.
- Atıcı, E., 2007. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22 (4), 197-204.
- Aydin, G., Paksoy, M.N., Orhan, M.D., Avsar, T., Yurtsever, M. and Durdagi, S., 2020. Proposing novel MDM2 inhibitors: Combined physics-driven high-throughput virtual screening and in vitro studies. *Chemical Biology & Drug Design*, 96 (1), 684-700. Doi: 10.1111/cbdd.13694.
- Bácskay, I., Nemes, D., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vasvári, G., Fehér, P., Vecsernyés, M. and Ujhelyi, Z., 2017. Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development. *Cytotoxicity*, Ed: T.A. Çelik. InTech, United Kingdom, 131-146. Doi: 10.5772/intechopen.72539.
- Badisa, R.B., Mina, D.A., Latinwo, L.M. and Soliman, K.F.A., 2014. Selective Anticancer Activity of Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium on Non-small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Anticancer Research*, 34 (10), 5447-5452.
- Bae, D-G., Gho, Y-S., Yoon, W.H. and Chae, C-B., 2000. Arginine-rich Anti-vascular Endothelial Growth Factor Peptides Inhibit Tumor Growth and Metastasis by Blocking Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (18), 13588-13596. Doi: 10.1074/jbc.275.18.13588.
- Bagdanoff, J.T., Chen, Z., Acker, M., Chen, Y-N., Chan, H., Dore, M., Firestone, B., Fodor, M., Fortanet, J., Hentemann, M., Kato, M., Koenig, R., LaBonte, L.R., Liu, S., Mohseni, M., Ntaganda, R., Sarver, P., Smith, T., Sendzik, M., Stams, T., Spence, S., Towler, C., Wang, H., Wang, P., Williams, S.L. and LaMarche, M.J., 2019. Optimization of Fused Bicyclic Allosteric SHP2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62 (4), 1781-1792. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01725.
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V.K. and Kang, S.C., 2017. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12, 115-118. Doi: 10.3329/bjp.v12i2.30892.
- Balkan, A.A., 2020. *Peltigera* Cinsine Ait Liken ve Endolikenik Fungus Örneklerinin *Pseudomonas Aeruginosa* Üzerine Anti-Quorum Sensing ve Anti-Biyofilm Etkinliklerinin *İn Vitro* ve *İn Siliko* Yöntemlerle İncelenmesi. Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bankiewicz, B., Matczak, P. and Palusiak, M., 2012. Electron Density Characteristics in Bond Critical Point (QTAIM) versus Interaction Energy Components (SAPT): The Case of Charge-Assisted Hydrogen Bonding. *The Journal of Physical Chemistry A*, 116 (1), 452-459. Doi: 10.1021/jp210940b.
- Barabadi, H., Najafi, M., Samadian, H., Azarnezhad, A., Vahidi, H., Mahjoub, M.A., Koohiyan, M. and Ahmadi, A., 2019. A Systematic Review of the Genotoxicity and Antigenotoxicity of Biologically Synthesized Metallic Nanomaterials: Are Green Nanoparticles Safe Enough for Clinical Marketing?. *Medicina (Kaunas)*, 55 (8), 439. Doi:10.3390/medicina55080439.
- Barakat, K.H., Jordheim, L.P., Perez-Pineiro, R., Wishart, D., Dumontet, C. and Tuszynski, J.A., 2012. Virtual Screening and Biological Evaluation of Inhibitors Targeting the

- XPA-ERCC1 Interaction. PLoS One, 7 (12), e51329. Doi: 10.1371/journal.pone.0051329.
- Barford, D., 1995. Protein phosphatases. *Current Opinion in Structural Biology*, 5 (6), 728-734. Doi: 10.1016/0959-440x(95)80004-2.
- Barr, A.J., 2010. Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development. *Future Medicinal Chemistry*, 2 (10), 1563-1576. Doi: 10.4155/fmc.10.241.
- Basmadjian, C., Zhao, Q., Bentouhami, E., Djehal, A., Nebigil, C.G., Johnson, R.A., Serova, M., De Gramont, A., Faivre, S., Raymond, E. and Désaubry, L.G., 2014. Cancer wars: natural products strike back. *Frontiers in Chemistry*, 2, 20. Doi: 10.3389/fchem.2014.00020.
- Bayrak, Y. ve Yıldız, İ., 2014. “AutoDock” Yazılımının Kullanım Kılavuzu. Eczacılık Fakültesi, Ankara.
- Begum, J., Skamnaki, V.T., Moffatt, C., Bischler, N., Sarrou, J., Skaltsounis, A-L., Leonidas, D.D., Oikonomakos, N.G. and Hayes, J.M., 2015. An evaluation of indirubin analogues as phosphorylase kinase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 61, 231-242. Doi: 10.1016/j.jmgm.2015.07.010.
- Benet, L.Z., Hosey, C.M., Ursu, O. and Oprea, T.I., 2016. BDDCS, the Rule of 5 and Drugability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101, 89-98. Doi: 10.1016/j.addr.2016.05.007.
- Berdigaliyev, N. and Aljofan, M., 2020. An overview of drug discovery and development. *Future Medicinal Chemistry*, 12, 10, 939-947. Doi: 10.4155/fmc-2019-0307.
- Berendsen, H.J.C., Van der Spoel, D. and Van Drunen, R., 1995. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91, 43-56. Doi: 10.1016/0010-4655(95)00042-E.
- Berezov, A., Zhang, H-T., Greene, M.I. and Murali, R., 2001. Disabling ErbB Receptors with Rationally Designed Exocyclic Mimetics of Antibodies: Structure-Function Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (16), 2565-2574. Doi: 10.1021/jm000527m.
- Berrouet, C., Dorilas, N., Rejniak, K.A. and Tuncer, N., 2020. Comparison of drug inhibitory effects (IC<sub>50</sub>) in monolayer and spheroid cultures. *Bulletin of Mathematical Biology*, 82, 68. Doi: 10.1007/s11538-020-00746-7.
- Bessette, D.C., Tilch, E., Seidens, T., Quinn, M.C.J., Wiegman, A.P., Shi, W., Cocciardi, S., McCart-Reed, A., Saunus, J.M., Simpson, P.T., Grimmond, S.M., Lakhani, S.R., Khanna, K.K., Waddell, N., Al-Ejeh, F. and Chenevix-Trench, G., 2015. Using the MCF10A/MCF10CA1a Breast Cancer Progression Cell Line Model to Investigate the Effect of Active, Mutant Forms of EGFR in Breast Cancer Development and Treatment Using Gefitinib. PLoS One, 10, 5, e0125232. Doi: 10.1371/journal.pone.0125232.
- Bhowmick, S., Saha, A., Osman, S.M., Alasmay, F.A., Almutairi, T.M. and Islam, M.A., 2021. Structure-based identification of SARS-CoV-2 main protease inhibitors from anti-viral specific chemical libraries: an exhaustive computational screening approach. *Molecular Diversity*, 25, 1979-1997. Doi: 10.1007/s11030-021-10214-6.
- Bialy, L. and Waldman, H., 2005. Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases: Next-Generation Drugs?. *Angewandte Chemie International Edition England*, 44 (25), 3814-3839. Doi: 10.1002/anie.200461517.

- Bidwell III, G.L. and Raucher, D., 2009. Therapeutic peptides for cancer therapy. Part I - peptide inhibitors of signal transduction cascades. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6 (10), 1033-1047. Doi: 10.1517/17425240903143745.
- Bidwell III, G.L., Perkins, E., Hughes, J., Khan, M., James, J.R. and Raucher, D., 2013. Thermally Targeted Delivery of a c-Myc Inhibitory Polypeptide Inhibits Tumor Progression and Extends Survival in a Rat Glioma Model. *PLoS One*, 8 (1), e55104. Doi: 10.1371/journal.pone.0055104.
- Bisht, N. and Singh, B.K., 2018. Role of Computer Aided Drug Design In Drug Development and Drug Discovery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9 (4), 1405-1415. Doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(4).1405-15.
- Blagodatski, A., Klimenko, A., Jia, L. and Katanaev, V.L., 2020. Small Molecule Wnt Pathway Modulators from Natural Sources: History, State of the Art and Perspectives. *Cells*, 9 (3), 589. Doi: 10.3390/cells9030589.
- Bollu, L.R., Mazumdar, A., Savage, M.I. and Brown, P.H., 2017. Molecular Pathways: Targeting Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23 (9), 2136-2142. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0934.
- Botelho, F.D., Dos Santos, M.C., Gonçalves, A.S., Kuca, K., Valis, M., LaPlante, S.R., França, T.C.C. and De Almeida, C.J.F.D., 2020. Ligand-Based Virtual Screening, Molecular Docking, Molecular Dynamics, and MM-PBSA Calculations towards the Identification of Potential Novel Ricin Inhibitors. *Toxins (Basel)*, 12 (12), 746. Doi: 10.3390/toxins12120746.
- Bowers, K.J., Chow, E., Xu, H., Dror, R.O., Eastwood, M.P., Gregersen, B.A., Klepeis, J.L., Kolossvary, I., Moraes, M.A., Sacerdoti, F.D., Salmon, J.K., Shan, Y. and Shaw, D.E., 2006. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *SC'06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*, United States. Doi: 10.1109/SC.2006.54.
- Braicu, C., Pilecki, V., Balacescu, O., Irimie, A. and Neagoe, I.B., 2011. The Relationships Between Biological Activities and Structure of Flavan-3-Ols. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 9342-9353. Doi: 10.3390/ijms12129342.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A., 2018. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (6), 394-424. Doi: 10.3322/caac.21492.
- Brennan, R.J. and Schiestl, R.H., 1999. The aromatic amine carcinogens *o*-toluidine and *o*-anisidine induce free radicals and intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 430 (1), 37-45. Doi: 10.1016/s0027-5107(99)00118-9.
- Brennan, R.J. and Schiestl, R.H., 2004. Detecting Carcinogens With the Yeast DEL Assay. *Genetic Recombination: Reviews and Protocols*, Ed: A.S. Waldman. Humana Press, United States, 111-124. Doi: 10.1385/1-59259-761-0:111.
- Bronowska, A.K., 2011. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design. *Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases*, Ed: J.C. Moreno-Pirajan. InTech, United Kingdom, 1-48. Doi: 10.5772/19447.
- Brown, D.G. and Wobst, H.J., 2021. A Decade of FDA-Approved Drugs (2010-2019): Trends and Future Directions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64 (5), 2312-2338. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01516.

- Bruce, S.O., 2022. Secondary Metabolites - Trends and Reviews [Working Title]. Secondary Metabolites from Natural Products, Ed(ler): R. Vijayakumar and S.S.S. Raja. InTech, United Kingdom, 1-20. Doi: 10.5772/intechopen.102222.
- Bruder, M., Polo, G. and Trivella D.B.B., 2020. Natural allosteric modulators and their biological targets: molecular signatures and mechanisms. *Natural Product Reports*, 37 (4), 488-514. Doi: 10.1039/c9np00064j.
- Bruno, V., Grazia, A., Mariella, S. C., Giovanna, C., Leakos, M., Daniele, S., Giorgio, M. and Giuseppe, T., 2016. Drug-induced hepatotoxicity in cancer patients - implication for treatment. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15 (9), 1219-1238. Doi: 10.1080/14740338.2016.1194824.
- Bryant, K.G., Chae, Y.C., Martinez, R.L., Gordon, J.C., Elokely, K.M., Kossenkova, A.V., Grant, S., Childers, W.E., Abou-Gharbia, M. and Altieri, D.C., 2017. A Mitochondrial-targeted purine-based HSP90 antagonist for leukemia therapy. *Oncotarget*, 8 (68), 112184-112198. Doi: 10.18632/oncotarget.23097.
- Brylinski, M., 2018. Aromatic interactions at the ligand-protein interface: Implications for the development of docking scoring functions. *Chemical Biology & Drug Design*, 91 (2), 380-390. Doi:10.1111/cbdd.13084.
- Calixto, J.B., 2019. The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 91 (Suppl. 3), e20190105. Doi: 10.1590/0001-3765201920190105.
- Carr, G., Berrue, F., Klaiklay, S., Pelletier, I., Landry, M. and Kerr, R.G., 2014. Natural products with protein tyrosine phosphatase inhibitory activity. *Methods*, 65 (2), 229-238. Doi: 10.1016/j.ymeth.2013.09.007.
- Cerqueira, N.M.F.S.A., Gesto, D., Oliveira, E.F., Santos-Martins, D., Brás, N.F., Sousa, S.F., Fernandes, P.A. and Ramos, M.J., 2015. Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 582, 56-67. Doi: 10.1016/j.abb.2015.05.011.
- Chakladar, M., Nair, M.G., Prabhu, J.S., Sridhar, T.S., Kelkar, D., Kulkarni, M., Shashidhara, L.S., 2020. *PTPN11*/SHP2 negatively regulates growth in breast epithelial cells: implications on tumorigenesis. *BioRxiv*. Doi: 10.1101/2020.07.30.228445.
- Chan, R.J. and Feng, G-S., 2006. *PTPN11* is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. *Blood*, 109 (3), 862-867. Doi: 10.1182/blood-2006-07-028829.
- Chen, C., Xue, T., Fan, P., Meng, L., Wei, J. and Luo, D., 2018. Cytotoxic activity of Shp2 inhibitor fumosorinone in human cancer cells. *Oncology Letters*, 15 (6), 10055-10062. Doi: 10.3892/ol.2018.8593.
- Chen, L., Liu, S. and Tao, Y., 2020a. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5 (1), 90. Doi: 10.1038/s41392-020-0196-9.
- Chen, L., Sung, S-S., Yip, M.L.R., Lawrence, H.R., Ren, Y., Guida, W.C., Sebt, S.M., Lawrence, N.J. and Wu, J., 2006. Discovery of a Novel Shp2 Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor. *Molecular Pharmacology*, 70 (2), 562-570. Doi: 10.1124/mol.106.025536.
- Chen, X., Zou, F., Hu, Z., Du, G., Yu, P., Wang, W., Wang, H., Ye, L. and Tian, J., 2020b. PCC0208023, a potent SHP2 allosteric inhibitor, imparts an antitumor effect against KRAS mutant colorectal cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 398, 115019. Doi: 10.1016/j.taap.2020.115019.

- Chen, Y-N.P., LaMarche, M.J., Chan, H.M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., Acker, M.G., Antonakos, B., Chen, C.H-T., Chen, Z., Cooke, V.G., Dobson, J.R., Deng, Z., Fei, F., Firestone, B., Fodor, M., Fridrich, C., Gao, H., Grunenfelder, D, Hao, H-X., Jacob, J., Ho, S., Hsiao, K., Kang, Z.B., Karki, R., Kato, M., Larrow, J., La Bonte, L.R., Lenoir, F., Liu, G., Liu, S., Majumdar, D., Meyer, M.J., Palermo, M., Perez, L., Pu, M., Price, E., Quinn, C., Shakya, S., Shultz, M.D., Slisz, J., Venkatesan, K., Wang, P., Warmuth, M., Williams, S., Yang, G., Yuan, J., Zhang, J-H., Zhu, P., Ramsey, T., Keen, N.J., Sellers, W.R., Stams, T. and Fortin, P.D., 2016. Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature*, 535 (7610), 148-152. Doi: 10.1038/nature18621.
- Cheng, T., Li, Q., Zhou, Z., Wang, Y. and Bryant, S.H., 2012. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review. *The American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, 14 (1), 133-141. Doi: 10.1208/s12248-012-9322-0.
- Cheremnykh, K.P., Savelyev, V.A., Pokrovskii, M.A., Baev, D.S., Tolstikova, T.G., Pokrovskii, A.G. and Shults, E.E., 2019. Design, synthesis, cytotoxicity, and molecular modeling study of 2,4,6-trisubstituted pyrimidines with anthranilate ester moiety. *Medicinal Chemistry Research*, 28, 545-558. Doi: 10.1007/s00044-019-02314-8.
- Chiangjong, W., Chutipongtanate, S. and Hongeng, S., 2020. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). *International Journal of Oncology*, 57, 678-696. Doi: 10.3892/ijo.2020.5099.
- Chintha, C., Carlesso, A., Gorman, A.M., Samali, A. and Eriksson, L.A., 2020. Molecular modeling provides a structural basis for PERK inhibitor selectivity towards RIPK1. *RSC Advances*, 10 (1), 367-375. Doi: 10.1039/c9ra08047c.
- Chio, C.M., Lim, C.S. and Bishop, A.C., 2014. Targeting a Cryptic Allosteric Site for Selective Inhibition of the Oncogenic Protein Tyrosine Phosphatase Shp2. *Biochemistry*, 54 (2), 497-504. Doi: 10.1021/bi5013595.
- Choi, S-B., Yap, B.K., Choong, Y.S. and Wahab, H., 2019. Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, Ed(ler): S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai and C. Schönbach. Elsevier, Amsterdam, 652-665. Doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20154-4.
- Ciaravino, V., Kropko, M.L., Rothwell, C.E., Hovey, C.A. and Theiss, J.C., 1995. The genotoxicity profile of atorvastatin, a new drug in the treatment of hypercholesterolemia. *Mutation Research*, 343 (2-3), 95-107. Doi: 10.1016/0165-1218(95)90076-4.
- Clark, A.J., Tiwary, P., Borrelli, K., Feng, S., Miller, E.B., Abel, R., Friesner, R.A. and Berne, B.J., 2016. Prediction of Protein-Ligand Binding Poses via a Combination of Induced Fit Docking and Metadynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12 (6), 2990-2998. Doi: 10.1021/acs.jctc.6b00201.
- Clark, D.E., 2011. What has polar surface area ever done for drug discovery?. *Future Medicinal Chemistry*, 3 (4), 469-484. Doi: 10.4155/fmc.11.1.
- ClinicalTrials.gov. A Study to Investigate Safety and Tolerability of SH3809 Tablet in Patients With Advanced Solid Tumors, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04843033?term=SH3809&draw=2&rank=1> (19.02.2022).
- Comert Onder, F., Durdagi, S., Sahin, K., Ozpolat, B. and 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. Doi: 10.1021/acs.jcim.9b01083.

- Comşa, Ş., Cîmpean, A.M. and Raica, M., 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35 (6), 3147-3154.
- Conibear, A.C., Schmid, A., Kamalov, M., Becker, C.F.W. and Bello, C., 2020. Recent Advances in Peptide-Based Approaches for Cancer Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 27 (8), 1174-1205. Doi: 10.2174/0929867325666171123204851.
- Copeland, R.A., 2005. Lead Optimization and Structure-Activity Relationships for Reversible Inhibitors. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc., United States, 111-140.
- Cragg, G.M. and Newman, D.J., 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1830 (6), 3670-3695. Doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- Custer, L.L. and Sweder, K.S., 2008. The Role of Genetic Toxicology in Drug Discovery and Optimization. *Current Drug Metabolism*, 9 (9), 978-985. Doi: 10.2174/138920008786485191.
- Çetin, S., 2014. Kemoterapi Tedavisi Alan Kanser Hastalarında Bitkisel Ürünlerin Kullanımının Araştırılması ve Buna Bağlı Farkındalığın Artırılması. Y.Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çilesiz, Y., 2018. Meme Kanseri Hücrelerinde Letrozole'ün ve Quercetin'in Etkinliğinin Araştırılması. Y.Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Dadashpour, S. and Emami, S., 2018. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 9-29. Doi: 10.1016/j.ejmech.2018.02.065.
- Dahlan-Daud, C.K., Zain, Z.N., Tham, C.L., Yong, Y.K. and Hakim, M.N., 2020. Effects of 4 Thiopurine Compounds on Nitric Oxide Production and Cell Viability of HIG-82 Synoviocytes and RAW 264.7 Macrophages. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 13 (3), 1047-1062. Doi: 10.13005/bpj/1974.
- Dai, L., Tian, S., Zhang, J., Lu, M., Zhu, J. and Zhao, H., 2021. F1012-2 Induced ROS-Mediated DNA Damage Response through Activation of MAPK Pathway in Triple-Negative Breast Cancer. *BioMed Research International*, 2021, 6650045. Doi: 10.1155/2021/6650045.
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z. and Li, J., 2017. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8 (16), 3131-3141. Doi: 10.7150/jca.18457.
- Daoui, O., Elkhatabi, S., Chtita, S., Elkhlabi, R., Zgou, H. and Benjelloun, A.T., 2021. QSAR, molecular docking and ADMET properties in silico studies of novel 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[D]-thiazol-2-Yl derivatives derived from dimedone as potent anti-tumor agents through inhibition of C-Met receptor tyrosine kinase. *Heliyon*, 7 (7), e07463. Doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07463.
- Dashti, Y., Grkovic, T. and Quinn, R.J., 2012. Predicting natural product value, an exploration of anti-TB drug space. *Natural Product Reports*, 31 (8), 990-998. Doi: 10.1039/c4np00021h.
- Dawood, H.M., Ibrahim, R.S., Shawky, E., Hammada, H.M. and Metwally, A.M., 2018. Integrated *in silico-in vitro* strategy for screening of some traditional Egyptian plants for human aromatase inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 359-372. Doi: 10.1016/j.jep.2018.06.009.

- De Brito, M.A., 2011. Pharmacokinetic study with computational tools in the medicinal chemistry course. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, 47 (4), 797-805. Doi: 10.1590/S1984-82502011000400017.
- De Freitas, R.F. and Schapira, M., 2017. A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8 (10), 1970-1981. Doi: 10.1039/c7md00381a.
- De Matos, P., Alcántara, R., Dekker, A., Ennis, M., Hastings, J., Haug, K., Spiteri, I., Turner, S. and Steinbeck, C., 2010. Chemical Entities of Biological Interest: an update. *Nucleic Acids Research*, 38 (Database issue), D249-254. Doi: 10.1093/nar/gkp886.
- Demir, A.Y., 2019. Çinko Oksit (ZnO) Nanopartiküllerinin *Symphoricarpos Albus* Bitki Özütü Kullanılarak Yeşil Sentezi ve Biyouyumluluğunun Araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Do Nascimento, R.G. and Otoni, K.M., 2020. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?. *Mastology*, 30, e20200024. Doi: 10.29289/25945394202020200024.
- Doak, B.C., Over, B., Giordanetto, F. and Kihlberg, J., 2014. Oral Druggable Space beyond the Rule of 5: Insights from Drugs and Clinical Candidates. *Chemistry & Biology*, 21 (9), 1115-1142. Doi:10.1016/j.chembiol.2014.08.013.
- Dogra, R., Bhatia, R., Shankar, R., Bansal, P. and Rawal, R.K., 2018. Enasidenib: First Mutant IDH2 Inhibitor for the Treatment of Refractory and Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18 (14), 936-1951. Doi: 10.2174/1871520618666181025091128.
- Doğan, A.L. ve Güç, D., 2004. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42.
- Doğan, N., Kaçan, T. and Doğan, İ., 2020. Analysis of Trends in Cancer-related Mortality in Turkey. *Turkish Journal of Oncology*, 35 (1), 52-57. Doi: 10.5505/tjo.2019.2074.
- Dong, L., Han, D., Meng, X., Xu, M., Zheng, C. and Xia, Q., 2021. Activating Mutation of SHP2 Establishes a Tumorigenic Phenotype Through Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Mechanisms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 630712. Doi: 10.3389/fcell.2021.630712.
- Drwal, M.N. and Griffith, R., 2013. Combination of ligand- and structure-based methods in virtual screening. *Drug Discovery Today: Technologies*, 10 (3), e395-401. Doi: 10.1016/j.ddtec.2013.02.002.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y-L., Ai, S-M., Liang, J., Sang, P, Ji, X-L. and Liu, S-Q., 2016. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (2), 144. Doi: 10.3390/ijms17020144.
- Dunpall, R., Opoku, A.R. and Revaprasadu, N., 2016. Development and characterization of MCF7 mammary carcinoma xenografts in a non-immunocompromised rat model. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15 (10), 2085-2091. Doi: 10.4314/tjpr.v15i10.5.
- Dunphy, K., Dowling, P., Bazou, D. and O'Gorman, P., 2021. Current Methods of Post-Translational Modification Analysis and Their Applications in Blood Cancers. *Cancers (Basel)*, 13 (8), 1930. Doi: 10.3390/cancers13081930.
- Eastman, A., 2017. Improving anticancer drug development begins with cell culture: misinformation perpetrated by the misuse of cytotoxicity assays. *Oncotarget*, 8 (5), 8854-8866. Doi: 10.18632/oncotarget.12673.

- Ebhohimen, I.E., Edemhanria, L., Awojide, S., Onyijen, O.H. and Anywar, G., 2020. Advances in computer-aided drug discovery. *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*, Ed: C. Egbuna, S. Kumar, J. Ifemeje, S. Ezzat and S. Kaliyaperumal. Elsevier, United States, 25-37. Doi: 10.1016/B978-0-12-817890-4.00003-2.
- Ece, A., 2011. Computer Aided Drug Design Study of Cyclin Dependent Kinase 2 (Cdk2) Inhibitors. PhD Thesis, Institute of Graduate Studies in Science and Engineering, Ankara.
- Ediriweera, M.K., Tennekoon, K.H. and Samarakoon, S.R., 2018. In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. *Journal of Applied Toxicology*, 39 (1), 38-71. Doi: 10.1002/jat.3658.
- Eki, T., 2018. Yeast-based genotoxicity tests for assessing DNA alterations and DNA stress responses: a 40-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (6), 2493-2507. Doi: 10.1007/s00253-018-8783-1.
- Ekins, S., Bugrim, A., Brovold, L., Kirillov, E., Nikolsky, Y., Rakhmatulin, E., Sorokina, S., Ryabov, A., Serebryiskaya, T., Melnikov, A., Metz, J. and Nikolskaya, T., 2006. Algorithms for network analysis in systems-ADME/Tox using the MetaCore and MetaDrug platforms. *Xenobiotica*, 36 (10-11), 877-901. Doi: 10.1080/00498250600861660.
- Eldridge, M.D., Murray, C.W., Auton, T.R., Paolini, G.V. and Mee, R.P., 1997. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 11 (5), 425-445. Doi: 10.1023/a:1007996124545.
- Elekofehinti, O.O., Iwaloye, O., Josiah, S.S., Lawal, A.O., Akinjiyan, M.O. and Ariyo, E.O., 2021. Molecular docking studies, molecular dynamics and ADME/tox reveal therapeutic potentials of STOCK1N-69160 against papain-like protease of SARS-CoV-2. *Molecular Diversity*, 25 (3), 1761-1773. Doi: 10.1007/s11030-020-10151-w.
- El-Husseiny, W.M., El-Sayed, M.A-A., El-Azab, A.S., AlSaif, N.A., Alanazi, M.A and Abdel-Aziz, A.A-M., 2020. Synthesis, antitumor activity, and molecular docking study of 2-cyclopentyloxyanisole derivatives: mechanistic study of enzyme inhibition. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 1, 744-758. Doi: 10.1080/14756366.2020.1740695.
- EMA, 2012. EMA/CHMP/ICH/126642/2008. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use step 5, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use-step\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use-step_en.pdf) (14.08.2021).
- Erdogan Orhan, I., Senol Deniza, F.S., Salmas, R.E., Durdagi, S., Epifanoc, F., Genovesec, S. and Fiorito, S., 2019. Combined molecular modeling and cholinesterase inhibition studies on some natural and semisynthetic O-alkylcoumarin derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 84, 355-362. Doi: 10.1016/j.bioorg.2018.11.044.
- Eren, D. ve Yalçın, İ., 2020. Rasyonel İlaç Tasarımında Moleküler Mekanik ve Moleküler Dinamik Yöntemlerin Kullanılma Amacı. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44 (2), 334-355. Doi: 10.33483/jfpau.688351.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H. and Pedersen, L.G., 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103, 8577.

- Esteghlal, S., Mokhtari, M.J. and Beyzaei, Z., 2021. Quercetin Can Inhibit Angiogenesis via the Down Regulation of MALAT1 and MIAT LncRNAs in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *International Journal of Preventive Medicine*, 12, 59. Doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM\_103\_20.
- Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P. and Mazzanti, G., 2005. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*, 43 (9), 1381-1387. Doi: 10.1016/j.fct.2005.03.013.
- Faguet, G.B., 2015. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer*, 136 (9), 2022-2036. Doi: 10.1002/ijc.29134.
- Falah, R.R., Talib, W.H. and Shbailat, S.J., 2017. Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 9 (4), 235-252. Doi: 10.1177/1758834016687482.
- Farrokhzadeh, A., Akher, F.B. and Soliman, M.E.S., 2019. Probing the Dynamic Mechanism of Uncommon Allosteric Inhibitors Optimized to Enhance Drug Selectivity of SHP2 with Therapeutic Potential for Cancer Treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188 (1), 260-281. Doi: 10.1007/s12010-018-2914-0.
- Fassy, F., Dureuil, C., Lamberton, A., Mathieu, M., Michot, M., Ronan, B. and Pasquier, B., 2017. In Vitro Characterization of VPS34 Lipid Kinase Inhibition by Small Molecules. *Methods in Enzymology*, Ed(ler): J. Abelson, M. Simon, G. Verdine and A. Pyle. Academic Press, Sidney, 447-464. Doi: 10.1016/bs.mie.2016.09.070.
- Fatriansyah, J.F., Rizqillah, R.K. and Yandi, M.Y., 2022b. Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation of Fisetin, Galangin, Hesperetin, Hesperidin, Myricetin, and Naringenin against Polymerase of Dengue Virus. *Journal of Tropical Medicine*, 2022, 7254990. Doi: 10.1155/2022/7254990.
- Fatriansyah, J.F., Rizqillah, R.K., Yandi, M.Y., Fadilah and Sahlan, M., 2022a. Molecular docking and dynamics studies on propolis sulabiroin-A as a potential inhibitor of SARS-CoV-2. *Journal of King Saud University - Science*, 34 (1), 101707. Doi: 10.1016/j.jksus.2021.101707.
- Florento, L., Matias, R., Tũaño, E., Santiago, K., Dela Cruz, F. and Tuazon, A., 2012. Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using *In Vitro* Cell-Based Approach. *International Journal of Biomedical Science (IJBS)*, 8 (1), 76-80.
- Fodor, M., Price, E., Wang, P., Lu, H., Argintaru, A., Chen, Z., Glick, M., Hao, H-X., Kato, M., Koenig, R., LaRochelle, J.R., Liu, G., McNeill, E., Majumdar, D., Nishiguchi, G.A., Perez, L.B., Paris, G., Quinn, C.M., Ramsey, T., Sendzik, M., Shultz, M.D., Williams, S.L., Stams, T., Blacklow, S.C., Acker, M.G. and LaMarche, M.J., 2018. Dual Allosteric Inhibition of SHP2 Phosphatase. *ACS Chemical Biology*, 13 (3), 647-656. Doi: 10.1021/acscchembio.7b00980.
- Frankson, R., Yu, Z-H., Bai, Y., Li, Q., Zhang, R-Y. and Zhang, Z-Y., 2017. Therapeutic Targeting of Oncogenic Tyrosine Phosphatases. *Cancer Research*, 77 (21), 5701-5705. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1510.
- Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P. and Shenkin, P.S., 2004. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method

- and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (7), 1739-1749. Doi: 10.1021/jm0306430.
- Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C. and Mainz, D.T., 2006. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (21), 6177-6196. Doi: 10.1021/jm051256o.
- Fu, Y., Ye, T., Liu, Y-X., Wang, J. and Ye, F., 2020. Based on the Virtual Screening of Multiple Pharmacophores, Docking and Molecular Dynamics Simulation Approaches toward the Discovery of Novel HPPD Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (15), 5546. Doi: 10.3390/ijms21155546.
- Fu, Y., Zhao, J. and Chen, Z., 2018. Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2018, 3502514. Doi: 10.1155/2018/3502514.
- G. de la Torre, B. and Albericio, F., 2021. The Pharmaceutical Industry in 2018. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules*, 24 (4), 809. Doi: 10.3390/molecules24040809.
- Gagné-Sansfaçon, J., Coulombe, G., Langlois, M.J., Langlois, A., Paquet, M., Carrier, J., Feng, G-S., Qu, C-K. and Rivard, N., 2016. SHP-2 phosphatase contributes to KRAS-driven intestinal oncogenesis but prevents colitis-associated cancer development. *Oncotarget*, 7 (40), 65676-65695. Doi: 10.18632/oncotarget.11601.
- Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, N.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, M-L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnóczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Jäättelä, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, S.A., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J-C.W., Martin, S.J., Medema, J.P., Mehlen, P., Melino, G., Moll, U.M., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, D.W., Nicotera, P., Nuñez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini M., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, H-U., Steller, H., Tschopp, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Voutsden, K.H., Youle, R.J., Yuan, J., Zhivotovsky, B. and Kroemer, G., 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16 (8), 1093-1107. Doi: 10.1038/cdd.2009.44.
- Ganguly, A., Sharma, K. and Majumder, K., 2020. Peptides as biopolymers - past, present, and future. *Biopolymer-Based Formulations*, Ed(ler): K. Pal, I. Banerjee, P. Sarkar, D. Kim, W-P. Deng, N.K. Dubey and K. Majumder. Elsevier, Amsterdam, 87-104. Doi: 10.1016/C2018-0-01614-X.
- Garcia Fortanet, J., Chen, C.H-T., Chen, Y-N. P., Chen, Z., Deng, Z., Firestone, B., Fekkes, P., Fodor, M., Fortin, P.D., Fridrich, C., Grunenfelder, D., Ho, S., Kang, Z.B., Karki, R., Kato, M., Keen, N., LaBonte, L.R., Larrow, J., Lenoir, F., Liu, G., Liu, S., Lombardo, F., Majumdar, D., Meyer, M.J., Palermo, M., Perez, L., Pu, M., Ramsey, T., Sellers, W.R., Shultz, M.D., Stams, T., Towler, C., Wang, P., Williams, S.L., Zhang, J-H. and LaMarche, M.J., 2016. Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59 (17), 7773-7782. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00680.

- Gebregazabhier, R.A., 2017. In Silico Screening for GAT-3 Inhibitors. MS Thesis, Faculty of Health Sciences, Tromsø.
- Georgiev, K.D., Slavov, I.J. and Iliev, I.A., 2019. Synergistic Growth Inhibitory Effects of Lycium barbarum (Goji berry) Extract with Doxorubicin against Human Breast Cancer Cells. Journal of Pharmacy and Pharmacology Research, 3 (3), 051-058. Doi: 10.26502/jppr.0020.
- Gertz, M.A., 2011. Reducing neurotoxicity in the management of multiple myeloma. Leukemia & Lymphoma, 52 (11), 2043-2044. Doi: 10.3109/10428194.2011.602773.
- Ghemrawi, R., Khair, M., Hasan, S., Aldulaymi, R., AlNeyadi, S.S., Atatreh, N. and Ghattas, M.A., 2022. The Discovery of Potent SHP2 Inhibitors with Anti-Proliferative Activity in Breast Cancer Cell Lines. International Journal of Molecular Sciences, 23, 4468. Doi: 10.3390/ijms23084468.
- Gherman, C., Pileczki, V., Petric, R.C., Rapuntean, S., Gherman, S. and Neagoe, I.B., 2012. Molecular Mechanisms of Action and Prediction of Response to Oxaliplatin In Colorectal Cancer Cells. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 17 (1), 194-200.
- Gilbert, D.F. and Boutros, M., 2016. A Protocol for a High-Throughput Multiplex Cell Viability Assay. High-Throughput RNAi Screening, Ed(ler): D.O. Azorsa and S. Arora. Humana Press, New York, 75-84. Doi: 10.1007/978-1-4939-6337-9.
- Giorello, L., Clerico, L., Pescarolo, M.P., Vikhanskaya, F., Salmona, M., Colella, G., Bruno, S., Mancuso, T., Bagnasco, L., Russo, P. and Parodi, S., 1998. Inhibition of cancer cell growth and c-Myc transcriptional activity by a c-Myc helix 1-type peptide fused to an internalization sequence. Cancer Research, 58 (16), 3654-3659.
- GLOBOCAN, 2020. Population fact sheet in Turkey. International Agency for Research on Cancer, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf> (25.09.2021).
- Gnanadurai, R. and Fifer, H., 2020. *Mycoplasma genitalium*: A Review. Microbiology (Reading), 166 (1), 21-29. Doi: 10.1099/mic.0.000830.
- Golemis, E.A., Scheet, P., Beck, T.N., Scolnick, E.M., Hunter, D.J., Hawk, E. and Hopkins, N., 2018. Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. Genes & Development, 32 (13-14), 868-902. Doi: 10.1101/gad.314849.118.
- Grbović, F., Stanković, M.S., Ćurčić, M., Đorđević, N., Šeklić, D., Topuzović, M. and Marković, S., 2013. In Vitro Cytotoxic Activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 Cell Lines. Plants (Basel), 2 (3), 371-378. Doi: 10.3390/plants2030371.
- Grover, A.D., 1961. Penicillin-streptomycin-gelatine discs in the treatment of hypopyon ulcers. British Journal of Ophthalmology, 45 (1), 27-36. Doi: 10.1136/bjo.45.1.27.
- Grover, A.K., 2013. Use of Allosteric Targets in the Discovery of Safer Drugs. Medical Principles and Practice, 22 (5), 418-426. Doi: 10.1159/000350417.
- Gu, Y., Helenius, M., Väänänen, K., Bulanova, D., Saarela, J., Sokolenko, A., Martens, J., Imyanitov, E. and Kuznetsov, S., 2016. BRCA1-deficient breast cancer cell lines are resistant to MEK inhibitors and show distinct sensitivities to 6-thioguanine. Scientific Reports, 6, 28217. Doi: 10.1038/srep28217.
- Guedes, I.A., De Magalhães, C.S. and Dardenne, L.E., 2014. Receptor-ligand molecular docking. Biophysical Reviews, 6 (1), 75-87. Doi: 10.1007/s12551-013-0130-2.

- Guinebretière, J.M., Menet, E., Tardivon, A., Cherel, P. and Vanel D., 2005. Normal and pathological breast, the histological basis. *European Journal of Radiology*, 54 (1), 6-14. Doi: 10.1016/j.ejrad.2004.11.020.
- Gulluce, M., Agar, G., Baris, O., Karadayi, M., Orhan, F. and Sahin, F., 2010. Mutagenic and Antimutagenic Effects of Hexane Extract of some *Astragalus* Species Grown in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Phytotherapy Research*, 24 (7), 1014-1018. Doi: 10.1002/ptr.3059.
- Gulluce, M., Orhan, F., Adiguzel, A., Bal, T., Guvenalp, Z. and Dermirezer, L.O., 2012. Determination of antimutagenic properties of apigenin-7-*O*-rutinoside, a flavonoid isolated from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *longifolia* with yeast DEL assay. *Toxicology and Industrial Health*, 29 (6), 534-540. Doi: 10.1177/0748233712442732.
- Gunathilaka, T.L., Samarakoon, K., Ranasinghe, P. and Peiris, L.D.C., 2020. Antidiabetic Potential of Marine Brown Algae-a Mini Review. *Journal of Diabetes Research*, 2020, 1230218. Doi: 10.1155/2020/1230218.
- Guo, W. and Xu, Q., 2020. Phosphatase-independent functions of SHP2 and its regulation by small molecule compounds. *Journal of Pharmacological Sciences*, 144 (3), 139-146. Doi: 10.1016/j.jphs.2020.06.002.
- Guo, X., Seo, J-E., Li, X. and Mei, N., 2019. Genetic toxicity assessment using liver cell models: past, present, and future. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part B*, 23 (1), 27-50. Doi: 10.1080/10937404.2019.1692744.
- Guo, Y., Xu, Y., Dong, X. and Zhang, J., 2021. Cross the Undruggable Barrier, the Development of SHP2 Inhibitors: From Catalytic Site Inhibitors to Allosteric Inhibitors. *Medicinal Chemistry & Drug Discovery*, 6, 5504-5523. Doi: 10.1002/slct.202100186.
- Haggag, Y.A., Donia, A.A., Osman, M.A. and El-Gizawy, S.A., 2018. Peptides as Drug Candidates: Limitations and Recent Development Perspectives. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research (BJSTR)*, 8 (4), 6659-6662. Doi: 10.26717/BJSTR.2018.08.001694.
- Hale, A.J., Ter Steege, A. and Den Hertoga, J., 2017. Recent advances in understanding the role of protein-tyrosine phosphatases in development and disease. *Developmental Biology*, 428 (2), 283-292. Doi: 10.1016/j.ydbio.2017.03.023.
- Halgren, T.A., Murphy, R.B., Friesner, R.A., Beard, H.S., Frye, L.L., Pollard, W.T. and Banks, J.L., 2004. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (7), 1750-1759. Doi: 10.1021/jm030644s.
- Hamza, A., Weil, N-N. and Zhan, C-G., 2012. Ligand-Based Virtual Screening Approach Using a New Scoring Function. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52 (4), 963-974. Doi: 10.1021/ci200617d.
- Han, T., Xiang, D-M., Sun, W., Liu, N., Sun, H-L., Wen, W., Shen, W-F., Wang, R-Y., Chen, C., Wang, X., Cheng, Z., Li, H-Y., Wu, M-C., Cong, W-M., Feng, G-S., Ding, J. and Wang, H-Y., 2015. PTPN11/Shp2 overexpression enhances liver cancer progression and predicts poor prognosis of patients. *Journal of Hepatology*, 63 (3), 651-660. Doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.036.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100 (1), 57-70. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (5), 646-674. Doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. and Cardoso, F., 2019. Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5 (1), 66. Doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.
- Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J.Y., Wang, L., Lupyan, D., Dahlgren, M.K., Knight, J.L., Kaus, J.W., Cerutti, D.S., Krilov, G., Jorgensen, W.L., Abel, R. and Friesner, R.A., 2016. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12 (1), 281-296. Doi: 10.1021/acs.jctc.5b00864.
- Harini, K., Jayashree, S., Tiwari, V., Vishwanath, S., and Sowdhamin, R., 2021. Ligand Docking Methods to Recognize Allosteric Inhibitors for G-Protein-Coupled Receptors. *Bioinformatics and Biology Insights*, 15, 11779322211037769. Doi: 10.1177/11779322211037769.
- Hasselgren, C., Ahlberg, E., Akahori, Y., Amberg, A., Anger, L.T., Atienzar, F., Auerbach, S., Beilke, L., Bellion, P., Benigni, R., Bercu, J., Booth, E.D., Bower, D., Brigo, A., Cammerer, Z., Cronin, M.T.D., Crooks, I., Cross, K.P., Custer, L., Dobo, K., Doktorova, T., Faulkner, D., Ford, K.A., Fortin, M.C., Frericks, M., Gad-McDonald, S.E., Gellatly, N., Gerets, H., Gervais, V., Glowienke, S., Van Gompel, J., Harvey, J.S., Hillegass, J., Honma, M., Hsieh, J-H., Hsu, C-W., Barton-Maclaren, T.S., Johnson, C., Jolly, R., Jones, D., Kemper, R., Kenyon, M.O., Kruhlak, N.L., Kulkarni, S.A., Kümmerer, K., Leavitt, P., Masten, S., Miller, S., Moudgal, C., Muster, W., Paulino, A., Lo Piparo, E., Powley, M., Quigley, D.P., Reddy, V., Richarz, A-N., Schilter, B., Snyder, R.D., Stavitskaya, L., Stidl, R., Szabo, D.T., Teasdale, A., Tice, R.R., Trejo-Martin, A., Vuorinen, A., Wall, B.A., Watts, P., White, A.T., Wichard, J., Witt, K.L., Woolley, A., Woolley, D., Zwickl, C. and Myatt, G.J., 2019. Genetic toxicology *in silico* protocol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 107, 104403. Doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403.
- Hellmuth, K., Grosskopf, S., Lum, C.T., Würtele, M., Röder, N., Von Kries, J.P., Rosario, M., Rademann, J. and Birchmeier, W., 2008. Specific inhibitors of the protein tyrosine phosphatase Shp2 identified by high-throughput docking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS USA)*, 105 (20), 7275-7280. Doi: 10.1073/pnas.0710468105.
- Hendriks, W.J.A.J. and Pulido, R., 2013. Protein tyrosine phosphatase variants in human hereditary disorders and disease susceptibilities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1832 (10), 1673-1696. Doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.022.
- Hendriks, W.J.A.J., Elson, A., Harroch, S., Pulido, R., Stoker, A. and Den Hertog, J., 2012. Protein tyrosine phosphatases in health and disease. *FEBS Journal*, 280 (2), 708-730. Doi: 10.1111/febs.12000.
- Henninot, A., Collins, J.C. and Nus, J.M., 2018. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future?. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61 (4), 1382-1414. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00318.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.C.J. and Fraaije, J.G.E.M., 1997. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18 (12), 1463-1472.
- Hevener, K.E., Zhao, W., Ball, D.M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S.W. and Lee, R.E., 2009. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49 (2), 444-460. Doi: 10.1021/ci800293n.

- Hiebl, V., Ladurner, A., Latkolik, S. and Dirsch, V.M., 2018. Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR. *Biotechnology Advances*, 36 (6), 1657-1698. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.003.
- Himmetoğlu, A., 2020. Machine Learning Algorithms and Combined Multi-Scale Molecular Modeling Simulations Against NADPH Oxidase (NOX) Enzymes for Designing of Small Molecule Therapeutics. MS Thesis, Graduate School of Natural and Applied Sciences, İstanbul.
- Hoekstra, E., Peppelenbosch, M.P. and Fuhler, G.M., 2016. Meeting Report Europhosphatase 2015: Phosphatases as Drug Targets in Cancer. *Cancer Research*, 76 (2), 193-196. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2091.
- Holliday, D.L. and Speirs, V., 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13 (4), 215. Doi: 10.1186/bcr2889.
- Hollingsworth, S.A. and Dror, R.O., 2018. Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99 (6), 1129-1143. Doi:10.1016/j.neuron.2018.08.011.
- Hoskin, D.W. and Ramamoorthy, A., 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778 (2), 357-375. Doi: 10.1016/j.bbamem.2007.11.008.
- Hou, T., Wang, J., Li, Y. and Wang, W., 2011. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51 (1), 69-82. Doi: 10.1021/ci100275a.
- Hu, Z., Fang, H., Wang, X., Chen, D., Chen, Z. and Wang, S., 2014. Overexpression of SHP2 tyrosine phosphatase promotes the tumorigenesis of breast carcinoma. *Oncology Reports*, 32 (1), 205-212. Doi: 10.3892/or.2014.3201.
- Hu, Z., Li, J., Gao, Q., Wei, S. and Yang, B., 2017. SHP2 overexpression enhances the invasion and metastasis of ovarian cancer in vitro and in vivo. *OncoTargets and Therapy*, 10, 3881-3891. Doi: 10.2147/OTT.S138833.
- Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., De Groot, B.L., Grubmüller, H., MacKerell Jr, A.D., 2017. Charmm36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods*, 14 (1), 71-73. Doi: 10.1038/nmeth.4067.
- Huang, W-Q., Lin, Q., Zhuang, X., Cai, L-L., Ruan, R-S., Lu, Z-X. and Tzeng, C-M., 2014. Structure, Function, and Pathogenesis of SHP2 in Developmental Disorders and Tumorigenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 14 (6), 567-588.
- Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten K., 1996. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14 (1), 33-38. Doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- Hung, C-L. and Chen, C-C., 2014. Computational Approaches for Drug Discovery. *Drug Development Research*, 75, 412-418. Doi: 10.1002/ddr.21222.
- ICH, 2012. Guidance for Industry - S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/s2r1-genotoxicity-testing-and-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use> (18.08.2021).
- Ihlenfeldt, W-D., Voigt, J.H., Bienfait, B., Oellien, F. and Nicklaus, M.C., 2002. Enhanced CACTVS Browser of the Open NCI Database. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 42 (1), 46-57. Doi: 10.1021/ci010056s.

- Imbalzano, K.M., Tatarkova, I., Imbalzano, A.N. and Nickerson, J.A., 2009. Increasingly transformed MCF-10A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture. *Cancer Cell International*, 9, 7. Doi: 10.1186/1475-2867-9-7.
- Is, Y.S., Aksoydan, B., Senturk, M., Yurtsever, M. and Durdagi, S., 2020. Integrated Binary QSAR-Driven Virtual Screening and In Vitro Studies for Finding Novel hMAO-B-Selective Inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60 (8), 4047-4055. Doi: 10.1021/acs.jcim.0c00169.
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Zielińska, E. and Zieliński, D., 2020. Current Trends of Bioactive Peptides - New Sources and Therapeutic Effect. *Foods*, 9 (7), 846. Doi: 10.3390/foods9070846.
- Jansen, C., Wang, H., Kooistra, A.J., De Graaf, C., Orrling, K.M., Tenor, H., Seebeck, T., Bailey, D., De Esch, I.J.P., Ke, H. and Leurs, R., 2013. Discovery of Novel *Trypanosoma brucei* Phosphodiesterase B1 Inhibitors by Virtual Screening against the Unliganded TbrPDEB1 Crystal Structure. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56 (5), 2087-2096. Doi: 10.1021/jm3017877.
- Jean-Quartier, C., Jeanquartier, F., Jurisica, I. and Holzing, A., 2018. *In silico* cancer research towards 3R. *BMC Cancer*, 18, 408. Doi: 10.1186/s12885-018-4302-0.
- Jin, W-Y., Ma, Y., Li, W-Y., Li, H-L. and Wang, R.L., 2018. Scaffold-based novel SHP2 allosteric inhibitors design using Receptor-Ligand pharmacophore model, virtual screening and molecular dynamics. *Computational Biology and Chemistry*, 73, 179-188. Doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.02.004.
- Jin, X., Liu, M-Y., Zhang, D-F., Zhong, X., Du, K., Qian, P., Gao, H. and Wei, M-J., 2019. Natural products as a potential modulator of microglial polarization in neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 145, 104253. Doi: 10.1016/j.phrs.2019.104253.
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V.G. and Im, W., 2008. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29 (11), 1859-1865. Doi: 10.1002/jcc.20945.
- Jokar, F., Mahabadi, J.A., Salimian, M., Taherian, A., Hayat, S.M.G., Sahebkar, A. and Atlasi, M.A., 2019. Differential Expression of HSP90 $\beta$  in MDA-MB-231 and MCF-7 Cell Lines after Treatment with Doxorubicin. *Journal of Pharmacopuncture*, 22 (1), 28-34. Doi: 10.3831/KPI.2019.22.003.
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W. and Klein, M.L., 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79 (2), 926-935. Doi: 10.1063/1.445869.
- Kanan, D., Kanan, T., Dogan, B., Orhan, M.D., Avsar, T. and Durdagi, S., 2021. An Integrated in silico Approach and in vitro Study for the Discovery of Small-Molecule USP7 Inhibitors as Potential Cancer Therapies. *ChemMedChem*, 16 (3), 555-567. Doi: 10.1002/cmdc.20200067.
- Kanan, T., Kanan, D., Erol, I., Yazdi, S., Stein, M. and Durdagi, S., 2019. Targeting the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  complex via fragment-based E-Pharmacophore virtual screening and binary QSAR models. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 86, 264-277. Doi: 10.1016/j.jmgm.2018.09.014.
- Kanavos, P., 2006. The rising burden of cancer in the developing World. *Annals of Oncology* 17 (Suppl. 8), viii15-viii23. Doi: 10.1093/annonc/mdl983.

- Kantarcioğlu, I., 2017. Discovery of Novel At1 Inhibitors Using Computational Methods. MS Thesis, Graduate School of Natural and Applied Sciences, İstanbul.
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y-L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Pollack, J.R., 2009. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS One*, 4 (7), e6146. Doi: 10.1371/journal.pone.0006146.
- Katt, M.E., Placone, A.L., Wong, A.D., Xu, Z.S. and Searson, P.C., 2016. *In Vitro* Tumor Models: Advantages, Disadvantages, variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 12. Doi: 10.3389/fbioe.2016.00012.
- Kenar, S., 2008. Virtual Screening and Docking of Potential Protein Kinase B Inhibitors. MS Thesis, Institute of Natural and Applied Sciences, İstanbul.
- Keser Şahin, H.H., Aslan, O. and Şahin, M., 2020. Evaluation of cancer-related deaths in Turkey between 2009-2018: An epidemiological study. *Journal of Surgery and Medicine*, 4 (8), 674-677. Doi: 10.28982/josam.779292.
- Khan, S.U., Ahemad, N., Chuah, L-H., Naidu, R. and Htar, T.T., 2019. Sequential ligand- and structure-based virtual screening approach for the identification of potential G protein-coupled estrogen receptor-1 (GPER-1) modulators. *RSC Advances*, 9, 2525. Doi: 10.1039/c8ra09318k.
- Kim, B., Jo, S., Park, S.B., Chae, C.H., Lee, K., Koh, B. and Shin, I., 2020. Development and structure-activity relationship study of SHP2 inhibitor containing 3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5H-benzo[7]annulene. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30 (1), 126756. Doi: 10.1016/j.bmcl.2019.126756.
- Kim, E-K., Joung, H-J., Kim, Y-S., Hwang, J-W., Ahn, C-B., Jeon, Y-J., Moon, S-H., Song, B.C. and Park, P-J., 2012. Purification of a Novel Anticancer Peptide from Enzymatic Hydrolysate of *Mytilus coruscus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (10), 1381-1387. Doi: 10.4014/jmb.1207.07015.
- Kim, K. and Friesner, R.A., 1997. Hydrogen Bonding between Amino Acid Backbone and Side Chain Analogues: A High-Level ab Initio Study. *Journal of the American Chemical Society*, 119 (52), 12952-12961. Doi: 10.1021/ja971836d.
- Kim, M., Morales, L.D., Jang, I-S., Cho, Y-Y. and Kim, D.J., 2018. Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Regulators of STAT3 Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (9), 2708. Doi: 10.3390/ijms19092708.
- Kirpnick, Z., Homiski, M., Rubitski, E., Repnevskaya, M., Howlett, N., Aubrecht, J. and Schiestl, R.H., 2005. Yeast DEL assay detects clastogens. *Mutation Research*, 582 (1-2), 116-134. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.01.005.
- Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R. and Bajorath, J., 2004. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 (11), 935-949. Doi: 10.1038/nrd1549.
- Klebe, G., 2013. Protein-Ligand Interactions as the Basis for Drug Action. *Drug Design: Methodology, Concepts, and Mode-of-Action*, Ed: G. Klebe. Springer, Berlin, 61-88. Doi: 10.1007/978-3-642-17907-5\_4.
- Knapp, B., Frantal, S., Cibena, M., Schreiner, W. and Bauer, P., 2011. Is an Intuitive Convergence Definition of Molecular Dynamics Simulations Solely Based on the Root Mean Square Deviation Possible?. *Journal of Computational Biology*, 18 (8), 997-1005. Doi: 10.1089/cmb.2010.0237.

- Kocaçalışkan, İ., 2018. Doku ve Hücre Kültürü Teknikleri. Nobel Akademik Yayıncılık, 134-135, Ankara, Türkiye. ISBN: 978-605-320-618-7.
- Kocyigit, A., Koyuncu, I., Dikilitas, M., Bahadori, F. and Turkkan, B., 2016. Cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of naringenin-oxime relative to naringenin on normal and cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (10), 872-880. Doi: 10.1016/j.apjtb.2016.08.004.
- Koparde, A.A., Doijad, R.C. and Magdum, C.S., 2019. Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacognosy - Medicinal Plants*, Ed(ler): S. Perveen and A. Al-Taweel. InTech, United Kingdom, 1-19. Doi: 10.5772/intechopen.82860.
- Kosova, F. ve Arı, Z., 2008. Adipositokinler ve Meme Kanseri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22 (6), 377-384.
- Kostrzewa, T., Sahu, K.K., Gorska-Ponikowska, M., Tuszynski, J.A. and Kuban-Jankowska, A., 2018. Synthesis of Small Peptide Compounds, Molecular Docking, and Inhibitory Activity Evaluation Against Phosphatases PTP1B and SHP2. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 4139-4147. Doi: 10.2147/DDDT.S186614.
- Kouassi, K.A.R., Ganiyou, A., Didier, D.G.G., Benié, A. and Nahossé, Z., 2022. In Silico Docking of Rhodanine Derivatives and 3D-QSAR Study to Identify Potent Prostate Cancer Inhibitors. *Computational Chemistry*, 10, 19-52. Doi: 10.4236/cc.2022.102002.
- Köhn, M., 2020. Turn and Face the Strange: A New View on Phosphatases. *ACS Central Science*, 6 (4), 467-477. Doi: 10.1021/acscentsci.9b00909.
- Krojer, T., Fraser, J.S. and Von Delft, F., 2020. Discovery of allosteric binding sites by crystallographic fragment screening. *Current Opinion in Structural Biology*, 65, 209-216. Doi: 10.1016/j.sbi.2020.08.004.
- Kufareva, I., Katritch, V., Participants of GPCR Dock 2013, Stevens, R.C. and Abagyan, R., 2014. Advances in GPCR Modeling Evaluated by the GPCR Dock 2013 Assessment: Meeting New Challenges. *Structure*, 22 (8), 1120-1139. Doi: 10.1016/j.str.2014.06.012.
- Kumar, A. and Jha, A., 2017. Drug Development Strategies. *Anticandidal Agents*. Elsevier, Amsterdam, 63-71. Doi: 10.1016/B978-0-12-811311-0.00007-7.
- Kumar, K., Woo, S.M., Siu, T., Cortopassi, W.A., Duarte, F. and Paton, R.S., 2018. Cation- $\pi$  interactions in protein-ligand binding: theory and data-mining reveal different roles for lysine and arginine. *Chemical Science*, 9 (10), 2655-2665. Doi: 10.1039/c7sc04905f.
- Kumar, S., Seth, D. and Deshpand, P.A., 2020. Molecular dynamics simulations identify the regions of compromised thermostability in SazCA. *Proteins*, 89 (4), 375-388. Doi: 10.1002/prot.26022.
- Kumar, T.M. and Ramanathan, K., 2021. Probiotic Polysaccharides as Toll-Like Receptor 4 Modulators-An In Silico Strategy. *Advances in Probiotics: Microorganisms in Food and Health*. Ed(ler): D. Dhanasekaran and A. Sankaranarayanan. Academic Press, London, 121-133. Doi: 10.1016/B978-0-12-822909-5.00008-3.
- Kumar, V., Krishna, S. and Siddiqi, M.I., 2015. Virtual screening strategies: Recent advances in the identification and design of anti-cancer agents. *Methods*, 71, 64-70. Doi: 10.1016/j.ymeth.2014.08.010.
- Kumari, R., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium and Lynn, A., 2014. *g\_mmpbsa*-A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54 (7), 1951-1962. Doi: 10.1021/ci500020m.
- Kumbhar, N., Nimal, S., Barale, S., Kamble, S., Bavi, R., Sonawane, K. and Gacche, R., 2022. Identification of novel leads as potent inhibitors of HDAC3 using ligand-based

- pharmacophore modeling and MD simulation. *Scientific Reports*, 12 (1), 1712. Doi: 10.1038/s41598-022-05698-7.
- Kunnumakkara, A.B., Bordoloi, D., Sailo, B.L., Roy, N.K., Thakur, K.K., Banik, K., Shakibaei, M., Gupta, S.C. and Aggarwal, B.B., 2019. Cancer drug development: The missing links. *Experimental Biology and Medicine*, 244 (8), 663-689. Doi: 10.1177/1535370219839163.
- Kurczab, R., Śliwa, P., Rataj, K., Kafel, R. and Bojarski, A.J., 2018. Salt Bridge in Ligand-Protein Complexes-Systematic Theoretical and Statistical Investigations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58 (11), 2224-2238. Doi: 10.1021/acs.jcim.8b00266.
- Kushwaha, D., Singh, S.K. and Tiwari, V.K., 2020. Carbo-click in drug discovery and development: Opportunities and challenges. *Carbohydrates in Drug Discovery and Development*, Ed: V.K. Tiwari. Elsevier, Amsterdam, 403-450. Doi: 10.1016/B978-0-12-816675-8.00010-5.
- Kushwaha, P.P., Singh, A.K., Bansal, T., Yadav, A., Prajapati, K.S., Shuaib, M. and Kumar, S., 2021. Identification of Natural Inhibitors Against SARS-CoV-2 Drugable Targets Using Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation, and MM-PBSA Approach. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 730288. Doi: 10.3389/fcimb.2021.730288.
- Kuskucu, M., Akyildiz, V., Kulmány, Á, Ergün, Y., Zenci, S., Zupko, I., Durdagi, S., Zaka, M., Sahin, K., Orhan, H. and Topcu, Z., 2020. Structural modification of ellipticine derivatives with alkyl groups of varying length is influential on their effects on human DNA topoisomerase II: a combined experimental and computational study. *Medicinal Chemistry Research*, 29, 189-198. Doi: 10.1007/s00044-019-02472-9.
- Kwon, S.J., Ahn, D., Yang, H-M., Kang, H.J. and Chung, S.J., 2021. Polyphyllin D Shows Anticancer Effect through a Selective Inhibition of Src Homology Region 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2 (SHP2). *Molecules*, 26 (4), 848. Doi: 10.3390/molecules26040848.
- Lakshminarayana, S.B., Huat, T.B., Ho, P.C., Manjunatha, U.H., Dartois, V., Dick, T. and Rao, S.P.S., 2015. Comprehensive physicochemical, pharmacokinetic and activity profiling of anti-TB agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70 (3), 857-867. Doi: 10.1093/jac/dku457.
- Lamore, S.D., Kohnken, R.A., Peters, M.F. and Kolaja, K.L., 2020. Cardiovascular Toxicity Induced by Kinase Inhibitors: Mechanisms and Preclinical Approaches. *Chemical Reserach in Toxicology*, 33, 125-136. Doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00387.
- Lankatillake, C., Huynh, T. and Dias, D.A., 2019. Understanding glycaemic control and current approaches for screening antidiabetic natural products from evidence-based medicinal plants. *Plant Methods*, 15, 105. Doi: 10.1186/s13007-019-0487-8.
- LaRochelle, J.R., Fodor, M., Xu, X., Durzynska, I., Fan, L., Stams, T., Chan, H.M., LaMarche, M.J., Chopra, R., Wang, P., Fortin, P.D., Acker, M.G. and Blacklow, S.C., 2016. Structural and Functional Consequences of Three Cancer-Associated Mutations of the Oncogenic Phosphatase SHP2. *Biochemistry*, 55 (15), 2269-2277. Doi: 10.1021/acs.biochem.5b01287.
- Larsson, P., Engqvist, H., Biermann, J., Rönnerman, E.W., Forssell-Aronsson, E., Kovács, A., Karlsson, P., Helou, K. and Parris, T.Z., 2020. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Scientific Reports*, 10 (1), 5798. Doi: 10.1038/s41598-020-62848-5.

- Lau, J.L. and Dunn, M.K., 2018. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26 (10), 2700-2707. Doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.
- Lee, A.V., Oesterreich, S. and Davidson, N.E., 2015a. MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute (JENCI)*, 107 (7), djv073. Doi: 10.1093/jnci/djv073.
- Lee, H., Yi, J-S., Lawan, A., Min, K. and Bennett, A.M., 2015b. Mining the function of protein tyrosine phosphatases in health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 37, 66-72. Doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.021.
- Lee, L-T., Schally, A.V., Liebow, C., Lee, P-P., Lee, P-H. and Lee, M-T., 2008. Dephosphorylation of Cancer Protein by Tyrosine Phosphatases in Response to Analogs of Luteinizing Hormone-releasing Hormone and Somatostatin. *Anticancer Research*, 28 (5A), 2599-2605.
- Lexa, K.W and Carlson, H.A., 2012. Protein Flexibility in Docking and Surface Mapping. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 45 (3), 301-343. Doi: 10.1017/S0033583512000066.
- Li, J., Gu, Y., Zhang, W., Bao, C-Y., Li, C-R., Zhang, C-Y., Liu, T., Li, S., Huang, J-X., Xie, Z-G., Hua, S-C. and Wan, Y., 2019. Molecular Mechanism for Selective Cytotoxicity towards Cancer Cells of Diselenide-Containing Paclitaxel Nanoparticles. *International Journal of Biological Sciences*, 15 (8), 1755-1770. Doi: 10.7150/ijbs.34878.
- Li, J., Kang, Y., Wei, L., Liu, W., Tian, Y., Chen, B., Lin, X., Li, Y., Feng, G-S. and Lu, Z., 2014. Tyrosine Phosphatase Shp2 Mediates the Estrogen Biological Action in Breast Cancer via Interaction with the Estrogen Extranuclear Receptor. *PLoS One*, 9 (7), e102847. Doi: 10.1371/journal.pone.0102847.
- Li, L. and Dixon, J.E., 2000. Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Immunology*, 12, 75-84. Doi: 10.1006/rsmim.2000.0209.
- Li, Q., 2020. Virtual screening of small-molecule libraries. *Small Molecule Drug Discovery*, Ed(ler): A. Trabocchi and E. Lenci. Elsevier, United Kingdom, 103-125. Doi: 10.1016/B978-0-12-818349-6.00004-2.
- Li, S., Sun, X., Zhao, H., Tang, Y. and Lan, M., 2012. Discovery of novel EGFR tyrosine kinase inhibitors by structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22 (12), 4004-4009. Doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.092.
- Li, Y., Kim, D.J., Ma, W., Lubet, R.A., Bode, A.M. and Dong, Z., 2011. Discovery of Novel Checkpoint Kinase 1 Inhibitors by Virtual Screening Based on Multiple Crystal Structures. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51 (11), 2904-2914. Doi: 10.1021/ci200257b.
- Lim, S., Smith, K.R., Lim, S.T.S., Tian, R., Lu, J. and Tan, M., 2016. Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell & Bioscience*, 6 (25), 1-15. Doi: 10.1186/s13578-016-0089-3.
- Lin, A., Giuliano, C.J., Palladino, A., John, K.M., Abramowicz, C., Yuan, M.L., Sausville, E.L., Lukow, D.A., Liu, L., Chait, A., Galluzzo, Z.C., Tucker, C. and Sheltzer, J.M., 2019. Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. *Science Translational Medicine*, 11 (509), eaaw8412. Doi: 10.1126/scitranslmed.aaw8412.
- Lin, X., Li, X. and Lin, X., 2020. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. *Molecules*, 25 (6), 1375. Doi: 10.3390/molecules25061375.

- Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D.K. and Cournia, Z., 2014. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14, 1923-1938. Doi: 10.2174/1568026614666140929124445.
- Lipinski, C.A., 2004. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1 (4), 337-341. Doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007.
- Liu, J. and Nussinov, R., 2016. Allostery: An Overview of Its History, Concepts, Methods, and Applications. *PLoS Computational Biology*, 12 (6), e1004966. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1004966.
- Liu, M., Gao, S., Elhassan, R.M., Hou, X. and Fang, H., 2021a. Strategies to overcome drug resistance using SHP2 inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11 (12), 3908-3924. Doi: 10.1016/j.apsb.2021.03.037.
- Liu, M., Wang, L., Sun, X. and Zhao, X., 2014. Investigating the Impact of Asp181 Point Mutations on Interactions between PTP1B and Phosphotyrosine Substrate. *Scientific Reports*, 4, 5095. Doi: 10.1038/srep05095.
- Liu, Q., Qu, J., Zhao, M., Xu, Q. and Sun, Y., 2020a. Targeting SHP2 as a promising strategy for cancer immunotherapy. *Pharmacological Research*, 152, 104595. Doi: 10.1016/j.phrs.2019.104595.
- Liu, T., Oprea, T., Ursu, O., Hasselgren, C. and Altman, R.B., 2016. Estimation of Maximum Recommended Therapeutic Dose Using Predicted Promiscuity and Potency. *Clinical and Translational Science*, 9 (6), 311-320. Doi: 10.1111/cts.12422.
- Liu, W-S., Jin, W-Y., Zhou, L., Lu, X-H., Li, W-Y., Ma, Y. and Wang, R-L., 2019. Structure based design of selective SHP2 inhibitors by De novo design, synthesis and biological evaluation. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 33, 759-774. Doi: 10.1007/s10822-019-00213-z.
- Liu, W-S., Yang, B., Wang, R-R., Li, W-Y., Ma, Y-C., Zhou, L., Du, S., Ma, Y. and Wang, R-L., 2020b. Design, synthesis and biological evaluation of pyridine derivatives as selective SHP2 inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 100, 103875. Doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103875.
- Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Yang, M., Hong, F. and Yang, S., 2021c. Protein Phosphorylation in Cancer: Role of Nitric Oxide Signaling Pathway. *Biomolecules*, 11 (7), 1009. Doi: 10.3390/biom11071009.
- Liu, Y., Yang, X., Wang, Y., Yang, Y., Sun, D., Li, H. and Chen, L., 2021b. Targeting SHP2 as a therapeutic strategy for inflammatory diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 214, 113264. Doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113264.
- Liu, Z. and Zhang, Y., 2009. Molecular dynamics simulations and MM-PBSA calculations of the lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*). *Journal of Molecular Modeling*, 15 (12), 1501-1507. Doi: 10.1007/s00894-009-0502-5.
- Liu, Z., Delavan, B., Roberts, R. and Tong, W., 2017. Lessons Learned from Two Decades of Anticancer Drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38 (10), 852-872. Doi: 10.1016/j.tips.2017.06.005.
- Llorach-Pares, L., Nonell-Canals, A., Sanchez-Martinez, M. and Avila, C., 2017. Computer-Aided Drug Design Applied to Marine Drug Discovery: Meridianins as Alzheimer's Disease Therapeutic Agents. *Marine Drugs*, 15 (12), 366. Doi: 10.3390/md15120366.
- Lu, H., Liu, C., Huynh, H., Le, T.B.E., LaMarche, M.J., Mohseni, M., Engelman, J.A., Hammerman, P.S., Caponigro, G. and Hao, H-X., 2020. Resistance to allosteric SHP2

- inhibition in FGFR-driven cancers through rapid feedback activation of FGFR. *Oncotarget*, 11 (3), 265-281. Doi: 10.18632/oncotarget.27435.
- Lu, S., He, X., Ni, D. and Zhang, J., 2019a. Allosteric Modulator Discovery: From Serendipity to Structure-Based Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62 (14), 6405-6421. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01749.
- Lu, S., Qiu, Y., Ni, D., He, X., Pu, J. and Zhang, J., 2019b. Emergence of allosteric drug-resistance mutations: new challenges for allosteric drug discovery. *Drug Discovery Today*, 25 (1), 177-184. Doi: 10.1016/j.drudis.2019.10.006.
- Luan, X., Wu, Y., Shen, Y-W., Zhang, H., Zhou, Y-D., Chen, H-Z., Nagle, D.G. and Zhang, W-D., 2020. Cytotoxic and antitumor peptides as novel chemotherapeutics. *Natural Product Reports*, 38 (1), 7-17. Doi: 10.1039/d0np00019a.
- Luo, M., Fu, A., Wu, R., Wei, N., Song, K., Lim, S. and Luo, K.Q., 2022. High Expression of G6PD Increases Doxorubicin Resistance in Triple Negative Breast Cancer Cells by Maintaining GSH Level. *International Journal of Biological Sciences*, 18 (3), 1120-1133. Doi: 10.7150/ijbs.65555.
- Ma, Y-C., Yang, W-Y., Zhou, L., Wu, J-W., Li, W-Y., Du, S., Ma, Y. and Wang, R-L., 2020. Exploring the cause of the dual allosteric targeted inhibition attaching to allosteric sites enhancing SHP2 inhibition. *Molecular Diversity*, online ahead of print. Doi: 10.1007/s11030-021-10286-4.
- Macalino, S.J.Y., Gosu, V., Hong, S. and Choi, S., 2015. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research*, 38 (9), 1686-1701. Doi: 10.1007/s12272-015-0640-5.
- Makki, J., 2015. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 8, 23-31. Doi: 10.4137/CPath.S31563.
- Maltarollo, V.G., Kronenberger, T., Espinoza, G.Z., Oliveira, P.R. and Honorio, K.M., 2019. Advances with support vector machines for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14 (1), 23-33. Doi: 10.1080/17460441.2019.1549033.
- Manhart, L.E., Broad, J.M. and Golden, M.R., 2011. *Mycoplasma genitalium*: Should We Treat and How?. *Clinical Infectious Diseases*, 53 (Suppl. 3), S129-142. Doi: 10.1093/cid/cir702.
- Marqus, S., Pirogova, E. and Piva, T.J., 2017. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *Journal of Biomedical Science*, 24 (1), 21. Doi: 10.1186/s12929-017-0328-x.
- Marsh-Armstrong, B., Fajnzylber, J.M., Korntner, S., Plaman, B.A. and Bishop, A.C., 2018. The Allosteric Site on SHP2's Protein Tyrosine Phosphatase Domain is Targetable with Druglike Small Molecules. *ACS Omega*, 3 (11), 15763-15770. Doi: 10.1021/acsomega.8b02200.
- Martínez-Quintana, E. and Rodríguez-González, F., 2011. LEOPARD Syndrome Caused by Tyr279Cys Mutation in the *PTPN11* Gene. *Molecular Syndromology*, 2 (6), 251-253. Doi: 10.1159/000335995.
- Martínez-Torró, C., Torres-Puig, S., Monge, M., Sánchez-Alba, L., González-Martín, M., Marcos-Silva, M., Perálvarez-Marín, A., Canals, F., Querol, E., Piñol, J. and Pich, O.Q., 2020. Transcriptional response to metal starvation in the emerging pathogen *Mycoplasma genitalium* is mediated by Fur-dependent and -independent regulatory pathways. *Emerging Microbes & Infections*, 9 (1), 5-19. Doi: 10.1080/22221751.2019.1700762.

- Mataalkah, F., Martin, E., Zhao, H. and Agazie, Y.M., 2016. SHP2 acts both upstream and downstream of multiple receptor tyrosine kinases to promote basal-like and triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 18 (1), 2. Doi: 10.1186/s13058-015-0659-z.
- Mateev, E., Georgieva, M. and Zlatkov, A., 2022. Improved Molecular Docking of MAO-B Inhibitors with Glide. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13 (2), 159. Doi: 10.33263/BRIAC132.159.
- Matthews, E.J., Kruhlak, N.L., Benz, D. and Contrera, J.F., 2014. Assessment of the Health Effects of Chemicals in Humans: I. QSAR Estimation of the Maximum Recommended Therapeutic Dose (MRTD) and No Effect Level (NOEL) of Organic Chemicals Based on Clinical Trial Data. *Current Drug Discovery Technologies*, 1, 61-76. Doi: 10.2174/1570163043484789.
- McCauley, J., Zivanovic, A. and Skropeta, D., 2013. Bioassays for Anticancer Activities. *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery*, Ed(ler): U. Roessner and D.A. Dias. Humana Press, New Jersey, 191-205. Doi: 10.1007/978-1-62703-577-4.
- McDonald, I.R., 1972. *NpT*-ensemble Monte Carlo calculations for binary liquid mixtures. *Molecular Physics*, 23 (1), 41-58. Doi: 10.1080/00268977200100031.
- Medina-Franco, J.K., Méndez-Lucio, O. and Yoo, J., 2014. Rationalization of Activity Cliffs of a Sulfonamide Inhibitor of DNA Methyltransferases with Induced-Fit Docking. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (2), 3253-3261. Doi: 10.3390/ijms15023253.
- Meng, X.Y., Zhang, H.X., Mezei, M. and Cui, M., 2011. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7 (2), 146-157. Doi: 10.2174/157340911795677602.
- Miller, E.B., Murphy, R.B., Sindhikara, D., Borrelli, K.W., Grisewood, M.J., Ranalli, F., Dixon, S.L., Jerome, S., Boyles, N.A., Day, T., Ghanakota, P., Mondal, S., Rafi, S.B., Troast, D.M., Abel, R. and Friesner, R.A., 2021. Reliable and Accurate Solution to the Induced Fit Docking Problem for Protein-Ligand Binding. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17 (4), 2630-2639. Doi: 10.1021/acs.jctc.1c00136.
- Mitra, R. and Ayyannan, S.R., 2021. Small-Molecule Inhibitors of Shp2 Phosphatase as Potential Chemotherapeutic Agents for Glioblastoma: A Minireview. *ChemMedChem*, 16 (5), 777-787. Doi: 10.1002/cmdc.202000706.
- Mitra, S. and Dash, R., 2018. Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 8324696. Doi: 10.1155/2018/8324696.
- Mollica, A., Zengin, G., Durdagi, S., Salmas, R.E., Macedonio, G., Stefanucci, A., Dimmito, M.D. and Novellino, E., 2019. Combinatorial Peptide Library Screening for Discovery of Diverse  $\alpha$ -glucosidase Inhibitors Using Molecular Dynamics Simulations and Binary QSAR Models. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37 (3), 726-740. Doi: 10.1080/07391102.2018.1439403.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455 (1-2), 29-60. Doi: 10.1016/s0027-5107(00)00064-6.
- Muenst, S., Obermann, E.C., Gao, F., Oertli, D., Viehl, C.T., Weber, W.P., Fleming, T., Gillanders, W.E. and Soysal, S.D., 2013. Src homology phosphotyrosyl phosphatase-2 expression is an independent negative prognostic factor in human breast cancer. *Histopathology*, 63, 74-82. Doi: 10.1111/his.12140.

- Mukherjee, S., Abdalla, M., Yadav, M., Madhavi, M., Bhirdwaj, A., Khandelwal, R., Prajapati, L., Panicker, A., Chaudhary, A., Albrakati, A., Hussain, T., Nayarisseri, A. and Singh, S.K., 2022. Structure-Based Virtual Screening, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation of VEGF Inhibitors for the Clinical Treatment of Ovarian Cancer. *Journal of Molecular Modeling*, 28 (4), 100. Doi: 10.1007/s00894-022-05081-3.
- Murray, P.E., Godoy, C.G. and Godoy, F.G., 2007. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated?. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 12, E258-266.
- Mushtaq, S., Abbasi, B.H., Uzair, B. and Abbasi, R., 2018. Natural Products As Reservoirs of Novel Therapeutic Agents. *EXCLI Journal*, 17, 420-451. Doi: 10.17179/excli2018-1174.
- Muster, W., Breidenbach, A., Fischer, H., Kirchner, S., Müller, L. and Pähler, A., 2008. Computational toxicology in drug development. *Drug Discovery Today*, 13 (7-8), 303-310. Doi: 10.1016/j.drudis.2007.12.007.
- Mustyala, K.K., Malkhed, V., Chittireddy, V.R. and Vuruputuri, U., 2015. Virtual screening studies to identify novel inhibitors for Sigma F protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Mycobacteriology*, 4 (4), 330-336. Doi: 10.1016/j.ijmyco.2015.05.013.
- Myshkin, E., Brennan, R., Khasanova, T., Sitnik, T., Serebriyskaya, T., Litvinova, E., Guryanov, A., Nikolsky, Y., Nikolskaya, T. and Bureeva, S., 2012. Prediction of Organ Toxicity Endpoints by QSAR Modeling Based on Precise Chemical-Histopathology Annotations. *Chemical Biology & Drug Design*, 80, 406-416. Doi: 10.1111/j.1747-0285.2012.01411.x.
- Nagpal, I., Raj, I., Subbarao, N. and Gourinath, S., 2012. Virtual Screening, Identification and In Vitro Testing of Novel Inhibitors of O-Acetyl-L-Serine Sulfhydrylase of *Entamoeba histolytica*. *PLoS One*, 7 (2), e30305. Doi: 10.1371/journal.pone.0030305.
- Nayeem, S., Sohail, E.M., Ridhima, G. and Reddy, M.S., 2022. Target SARS-CoV-2: computation of binding energies with drugs of dexamethasone/umifenovir by molecular dynamics using OPLS-AA force field. *Research on Biomedical Engineering*, 38, 117-126. Doi: 10.1007/s42600-020-00119-y.
- Neves, B.J., Muratov, E., Machado, R.B., Andrade, C.H. and Cravo, P.V.L., 2016. Modern approaches to accelerate discovery of new anti-schistosomal drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11 (6), 557-567. Doi: 10.1080/17460441.2016.1178230.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83 (3), 770-803. Doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- Nguyen, H.T., Vu, T.-Y., Kumar, V., Hoang, V.N.H., My, P.T.N., Mandal, P.S. and Tatipamula, V.B., 2021. *N*-Aryl iminochromenes inhibit cyclooxygenase enzymes via  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions and present a novel class of anti-inflammatory drugs. *RSC Advances*, 1, 29385-29393. Doi: 10.1039/d1ra04407a.
- Nguyen, S.T., Nguyen, H.T.-L. and Truong, K.D., 2020. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomedical Research and Therapy*, 7 (7), 3855-3859. Doi: 10.15419/bmrat.v7i7.614.
- Nian, Q., Zeng, J., He, J., Chen, Y., Zhang, Z., Rodrigues-Lima, F., Zhao, L., Feng, X. and Shi, J., 2021. A small molecule inhibitor targeting SHP2 mutations for the lung carcinoma. *Nature Medicine*, 24 (4), 512-517. Doi: 10.1038/nm.4497.
- Nichols, R.J., Haderk, F., Stahlhut, C., Schulze, C.J., Hemmati, G., Wildes, D., Tzitzilonis, C., Mordec, K., Marquez, A., Romero, J., Hsieh, T., Zaman, A., Olivas, V., McCoach, C.,

- Blakely, C.M., Wang, Z., Kiss, G., Koltun, E.S., Gill, A.L., Singh, M.L., Goldsmith, M.A., Smith, J.A.M. and Bivona, T.G., 2018. RAS nucleotide cycling underlies the SHP2 phosphatase dependence of mutant BRAF-, NF1- and RAS-driven cancers. *Nature Cell Biology*, 20 (9), 1064-1073. Doi: 10.1038/s41556-018-0169-1.
- Nisha, C.M., Kumar, A., Nair, P., Gupta, N., Silakari, C., Tripathi, T. and Kumar, A., 2016. Molecular Docking and *In Silico* ADMET Study Reveals Acylguanidine 7a as a Potential Inhibitor of  $\beta$ -Secretase. *Advances in Bioinformatics*, 2016, 9258578. Doi: 10.1155/2016/9258578.
- Nolan, K.A., Dunstan, M.S., Caraher, M.C., Scott, K.A., Leys, D. and Stratford, I.J., 2012. *In Silico* Screening Reveals Structurally Diverse, Nanomolar Inhibitors of NQO2 That Are Functionally Active in Cells and Can Modulate NF- $\kappa$ B Signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11 (1), 194-203. Doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0543.
- Nosé, S., 1984. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics*, 81 (1), 511-519. Doi: 10.1063/1.447334.
- Nussinov, R. and Tsai, J-C., 2012. The Different Ways through Which Specificity Works in Orthosteric and Allosteric Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 18 (9), 1311-1316. Doi: 10.2174/138161212799436377.
- Nussinov, R. and Tsai, J-C., 2013. Allostery in Disease and in Drug Discovery. *Cell*, 153 (2), 293-305. Doi: 10.1016/j.cell.2013.03.034.
- Nwibo, D.D., Levi, C.A. and Nwibo, M.I., 2015. Small Molecule Drugs; Down but Not Out: A Future for Medical Research and Therapeutics. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 14 (1), 70-77. Doi: 10.9790/0853-14117077.
- Obeidat, M., 2017. Research Article Cytotoxicity of *n*-Butanol Extracts of *Streptomyces* Against Human Breast Cancer Cells. *International Journal of Pharmacology*, 13, 969-979. Doi: 10.3923/ijp.2017.969.979.
- OECD, 2015. Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines, <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Genetic%20Toxicology%20Guidance%20Document%20Aug%2031%202015.pdf> (25.09.2021).
- Oktay, L., 2020. Integrated Ligand- and Target-Driven-Based Virtual Screening Studies for the Identification of Novel Therapeutics Against Breast Cancer. MS Thesis, Graduate School of Natural and Applied Sciences, İstanbul.
- Onguéné, P.A., Ntie-Kang, F., Mbah, J.A., Lifongo, L.L., Ndom, J.C., Sippl, W. and Mbaze, L.M., 2014. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part III: an in silico evaluation of drug metabolism and pharmacokinetics profiling. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 4 (1), 6. Doi: 10.1186/s13588-014-0006-x.
- Opo, F.A.D.M., Rahman, M.M., Ahammad, F., Ahmed, I., Bhuiyan, M.A. and Asiri, A.M., 2021. Structure based pharmacophore modeling, virtual screening, molecular docking and ADMET approaches for identification of natural anti-cancer agents targeting XIAP protein. *Scientific Reports*, 11 (1), 4049. Doi: 10.1038/s41598-021-83626-x.
- Orhan, F., 2010. *Mentha Longifolia* L. Hudson Ssp. *Longifolia*'dan Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* ve Maya Delesyon Test Sistemleri İle Mutajen ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Otabe, A., Ohta, F., Takumi, A. and Lynch, B., 2019. Mutagenicity and genotoxicity studies of aspartame. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 103, 345-351. Doi: 10.1016/j.yrtph.2018.01.023.

- Ouyang, Q., Wang, L., Mu, Y. and Xie, X-Q., 2014. Modeling skin sensitization potential of mechanistically hard-to-be-classified aniline and phenol compounds with quantum mechanistic properties. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15, 76. Doi: 10.1186/2050-6511-15-76.
- Önder, G.Ö., 2019. Melatoninin MCF-7 ve MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Östman, A., Hellberg, C. and Böhmer, F.D., 2006. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 307-320. Doi: 10.1038/nrc1837.
- Özbüyükkaya, G., 2010. Prediction of Potential Inhibitors Against *Yersinia Yope* and *Salmonella* Sope By Virtual Screening and Docking. MS Thesis, The Institute for Graduate Studies in Sciences and Engineering, İstanbul.
- Özdoğan, M., 2021. Türkiye Kanseri İstatistikleri 2020, <https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/> (03.09.2021).
- Özmen, V., Özmen, T. and Doğru, V., 2019. Breast Cancer in Turkey; An Analysis of 20.000 Patients with Breast Cancer. *European Journal Of Breast Health*, 15 (3), 141-146. Doi: 10.5152/ejbh.2019.4890.
- Parasuraman, S., 2011. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2 (2), 74-79.
- Pardella, E., Pranzini, E., Leo, A., Taddei, M.L., Paoli, P. and Raugei, G., 2020. Oncogenic Tyrosine Phosphatases: Novel Therapeutic Targets for Melanoma Treatment. *Cancers (Basel)*, 12 (10), 2799. Doi: 10.3390/cancers12102799.
- Parry, J.M., Parry, E., Phrakonkham, P. and Corvi, R., 2010. Analysis of published data for top concentration considerations in mammalian cell genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 25 (6), 531-538. Doi: 10.1093/mutage/geq046.
- Parsonidis, P., Shaik, M., Serafeim, A.P., Vlachou, I., Daikopoulou, V. and Papasotiriou, I., 2019. Design, Synthesis, and In Vitro Activity of Pyrazine Compounds. *Molecules*, 24 (23), 4389. Doi:10.3390/molecules24234389.
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S. and Hoyer, D., 2016. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21 (2), 204-207. Doi: 10.1016/j.drudis.2015.01.009.
- Pehlivanoğlu, B., Aysal, A., Ekmekci, S., Şahin, Y., Toper, M.H., Gündoğdu, B., Erdoğan, İ.H. and Talu, C.K., 2019. Neoplastik Hastalıkların Moleküler Patolojik Mekanizmaları. *Güncel Patoloji Dergisi*, 2, 62-80. Doi: 10.5146/jcpath.2019.48.
- Peña-Morán, O.A., Villarreal, M.L., Álvarez-Berber, L.A., Meneses-Acosta, A. and Rodríguez-López, V., 2016. Cytotoxicity, Post-Treatment Recovery, and Selectivity Analysis of Naturally Occurring Podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*, 21 (8), 1013. Doi: 10.3390/molecules21081013.
- Pham, 2015. Introduction to Breast Cancer. *Breast Cancer Stem Cells & Therapy Resistance*. Springer, Switzerland, 1-4. Doi: 10.1007/978-3-319-22020-8.
- Poli, G., Granchi, C., Rizzolio, F. and Tuccinardi, T., 2020. Application of MM-PBSA Methods in Virtual Screening. *Molecules*, 25 (8), 1971. Doi: 10.3390/molecules25081971.
- Prajapati, J., Patel, R., Rao, P., Saraf, M., Rawal, R. and Goswami, D., 2021. Perceiving SARS-CoV2 Mpro and PLpro dual inhibitors from pool of recognized antiviral compounds of endophytic microbes: an in-silico simulation study. *Research Square*, Preprint (Version 1). Doi: 10.21203/rs.3.rs-829046/v1.

- Putlyaeva, L.V., Demin, D.E., Uvarova, A.N., Zinevich, L.S., Prokofjeva, M.M., Gazizova, G.R., Shagimardanova, E.I. and Schwartz, A.M., 2020. *PTPN11* Knockdown Prevents Changes in the Expression of Genes Controlling Cell Cycle, Chemotherapy Resistance, and Oncogene-Induced Senescence in Human Thyroid Cells Overexpressing BRAF V600E Oncogenic Protein. *Biochemistry (Moscow)*, 85 (1), 108-118. Doi: 10.1134/S0006297920010101.
- Qin, N., Sasaki, T., Li, W., Wang, J., Zhang, X., Li, D., Li, Z., Cheng, M., Hua, H. and Koike, K., 2018. Identification of flavonolignans from *Silybum marianum* seeds as allosteric protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33 (1), 1283-1291. Doi: 10.1080/14756366.2018.1497020.
- Qiu, W., Wang, X., Romanov, V., Hutchinson, A., Lin, A., Ruzanov, M., Battaile, K.P., Pai, E.F., Neel, B.G. and Chirgadze, N.Y., 2014. Structural insights into Noonan/LEOPARD syndrome-related mutants of protein-tyrosine phosphatase SHP2 (*PTPN11*). *BMC Structural Biology*, 14, 10. Doi: 10.1186/1472-6807-14-10.
- Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B.Y., Giuliano, A.E. and Cui, X., 2015. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLoS One*, 10 (7), e0131285. Doi: 10.1371/journal.pone.0131285.
- Rahman, M.M., Muhseen, Z.T., Junaid, M. and Zhang, H., 2015. The Aromatic Stacking Interactions Between Proteins and their Macromolecular Ligands. *Current Protein & Peptide Science*, 16 (6), 502-512. Doi: 10.2174/138920371606150702131516.
- Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D.K., Pandey, S., Kalra, N., Soni, R., Dwarakanath, B.S. and Bhatt, A.N., 2018. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports*, 8, 1531. Doi: 10.1038/s41598-018-19930-w.
- Ramachandran, R. and Piramanyagam, S., 2017. Pharmacophore modeling, atom based 3D-QSAR and Molecular docking approaches to screen C-X-C chemokine receptor type 4 antagonists as microbicides for human immunodeficiency virus-1. *Virusdisease*, 28 (3), 272-280. Doi: 10.1007/s13337-017-0397-1.
- Ramsay, R.R. and Tipton, K.F., 2017. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules*, 22 (7), 1192. Doi: 10.3390/molecules22071192.
- Ranganatha, R., Chakravarthy, S. and Sukumaran, S., 2016. High-throughput approaches for genotoxicity testing in drug development: recent advances. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55 (9), 679-688. Doi: 10.1002/em.21885.
- Rashidi, M., Seghatoleslam, A., Namavari, M., Amiri, A., Fahmidehkar, M.A., Ramezani, A., Eftekhari, E., Hosseini, A., Erfani, N. and Fakher, S., 2017. Selective Cytotoxicity and Apoptosis-Induction of *Cyrtopodion scabrum* Extract Against Digestive Cancer Cell Lines. *International Journal of Cancer Management*, 10 (5), e8633. Doi: 10.5812/ijcm.8633.
- Reddy Bollu, L., Mazumdar, A., Savage, M.I. and Brown, P.H., 2017. Molecular Pathways: Targeting Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23 (9), 2136-2142. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0934.
- Reddy, R.H., Kim, H., Cha, S., Lee, B. and Kim, Y.J., 2017. Structure-Based Virtual Screening of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors: Significance, Challenges, and Solutions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (5), 878-895. Doi: 10.4014/jmb.1701.01079.

- Rehman, M.T., AlAjmi, M.F., Hussain, A., Rather, G.M. and Khan, M.A., 2019. High-Throughput Virtual Screening, Molecular Dynamics Simulation, and Enzyme Kinetics Identified ZINC84525623 as a Potential Inhibitor of NDM-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 819-839. Doi: 10.3390/ijms20040819.
- Remesh, A., 2012. Toxicities of anticancer drugs and its management. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 1 (1), 2-12. Doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp000812.
- Ren, J., Yuan, X., Li, J., Lin, S., Yang, B., Chen, C., Zhao, J., Zheng, W., Liao, H., Yang, Z. and Qu, Z., 2019. Assessing the performance of the g\_mmpbsa tools to simulate the inhibition of oseltamivir to influenza virus neuraminidase by molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area methods. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 67 (1), 1-8. Doi: 10.1002/jccs.201900148.
- Ribeiro, J.R.V., 2014. COMPUTER-AIDED DRUG DESIGN Lead Discovery. Tese de Doutorado, Universidade do Porto Faculdade de Ciências, Portugal.
- Ricart, A.D., 2017. Drug-induced liver injury in Oncology. *Annals of Oncology*, 28 (8), P2013-2020. Doi: 10.1093/annonc/mdx158.
- Robinson, M.K., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., McNamee, P., White, I.R. and Basketter, D.A., 2000. The importance of exposure estimation in the assessment of skin sensitization. *Contact Dermatitis*, 42 (5), 251-259. Doi: 10.1034/j.1600-0536.2000.042005251.x.
- Rostkowski, M., Olsson, M.H.M., Søndergaard, C.R. and Jensen, J.H., 2011. Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA. *BMC Structural Biology*, 11, 6. Doi: 10.1186/1472-6807-11-6.
- Roszak, J., Smok-Pieniążek, A., Spryszyńska, S., Kowalczyk, K., Domeradzka-Gajda, K., Świercz, R., Grobelny, J., Tomaszewska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Celichowski, G., Cieślak, M., Puchowicz, D. and Stępnik, M., 2020. Cytotoxic effects in transformed and non-transformed human breast cell lines after exposure to silver nanoparticles in combination with selected aluminium compounds, parabens or phthalates. *Journal of Hazardous Materials*, 392, 122442. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122442.
- Rühle, V., 2008. Pressure coupling/barostats. *Journal Club Handout*, [https://www2.mpi-mainz.mpg.de/~andrienk/journal\\_club/barostats.pdf](https://www2.mpi-mainz.mpg.de/~andrienk/journal_club/barostats.pdf) (06.10.2021).
- Sahin, K., Orhan, M.D., Avsar, T. and Durdagi, S., 2021. Hybrid *In Silico* and TR-FRET-Guided Discovery of Novel BCL-2 Inhibitors. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 4 (3), 1111-1123. Doi: 10.1021/acsptsci.0c00210.
- Sahin, K., Zengin Kurt, B., Sonmez, F. and Durdagi, S., 2020. Novel AChE and BChE inhibitors using combined virtual screening, text mining and in vitro binding assays. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38 (11), 3342-3358. Doi: 10.1080/07391102.2019.1660218.
- Salahudeen, M.S. and Nishtala, P.S., 2017. An overview of pharmacodynamic modelling, ligand-binding approach and its application in clinical practice. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25, 165-175. Doi: 10.1016/j.jsps.2016.07.002.
- Salamoun, J.M. and Wipf, P., 2016. Allosteric Modulation of Phosphatase Activity May Redefine Therapeutic Value. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 7771-7772. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01210.
- Salmas, R.E., Senturk, M., Yurtsever, M. and Durdagi, S., 2016. Discovering novel carbonic anhydrase type IX (CA IX) inhibitors from seven million compounds using virtual screening and in vitro analysis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (3), 425-433. Doi: 10.3109/14756366.2015.1036049.

- Salmas, R.E., Unlu, A., Bektaş, M., Yurtsever, M., Mestanoglu, M. and Durdagi, S., 2017. Virtual screening of small molecules databases for discovery of novel PARP-1 inhibitors: combination of *in silico* and *in vitro* studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35 (9), 1899-1915. Doi: 10.1080/07391102.2016.1199328.
- Sancenon, V., Goh, W.H., Sundaram, A., Er, K.S., Johal, N., Mukhina, S., Carr, G. and Dhakshinamoorthy, S., 2015. Development, validation and quantitative assessment of an enzymatic assay suitable for small molecule screening and profiling: A case-study. *Biomolecular Detection and Quantification*, 4, 1-9. Doi: 10.1016/j.bdq.2015.03.001.
- Santos, F.V., Tubaldini, F.R., Cólus, I.M.S., Andréo, M.A., Bauab, T.M., Leite, C.Q.F., Vilegas, W. and Varanda, E.A., 2008. Mutagenicity of *Mouriri pusa* Gardner and *Mouriri elliptica* Martius. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (8), 2721-2727. Doi: 10.1016/j.fct.2008.04.028.
- Santos, M.L.C., De Brito, B.B., Da Silva, F.A.F., Dos Santos Botelho, A.C. and De Melo, F.F., 2020. Nephrotoxicity in cancer treatment: An overview. *World Journal of Clinical Oncology*, 11 (4), 190-204. Doi: 10.5306/wjco.v11.i4.190.
- Sarver, P., Acker, M., Bagdanoff, J.T., Chen, Z., Chen, Y-N., Chan, H., Firestone, B., Fodor, M., Fortanet, J., Hao, H., Hentemann, M., Kato, M., Koenig, R., LaBonte, L.R., Liu, G., Liu, S., Liu, C., McNeill, E., Mohseni, M., Sendzik, M., Stams, T., Spence, S., Tamez, V., Tichkule, R., Towler, C., Wang, H., Wang, P., Williams, S.L., Yu, B. and LaMarche, M.J., 2019. 6-Amino-3-methylpyrimidinones as Potent, Selective, and Orally Efficacious SHP2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62 (4), 1793-1802. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01726.
- Savale, S.K., 2018. Genotoxicity of Drugs: Introduction, Prediction and Evaluation. *Asian Journal of Biomaterial Research*, 4 (6), 1-29.
- Sayın, V.Ö., 2019. Structure-Based Drug Design Studies for the Discovery of Novel Carbonic Anhydrase IX-Selective Inhibitors. MS Thesis, Graduate School of Science Engineering and Technology, İstanbul.
- Scodeller, P. and Ascitutto, E.K., 2020. Targeting Tumors Using Peptides. *Molecules*, 25 (4), 808. Doi: 10.3390/molecules25040808.
- Seca, A.M.L. and Moujir, L., 2020. Natural Compounds: A Dynamic Field of Applications. *Applied Sciences*, 10 (11), 4025. Doi: 10.3390/app10114025.
- Sezen, S., İsaoglu, M., Güllüce, M., Karadayı, M., Karadayı, G., Hıdıroğlu İspirli, N. and Yıldırım, V., 2019. Genotoxicity Evaluation of the *Vitex agnus-castus* L. Essential Oil with the Yeast DEL Assay. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 10 (9), 14-17.
- Sharma, G.N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P. and Sharma, K.K., 2010. Various Types and Management of Breast Cancer: An Overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1 (2), 109-126.
- Sharma, R.I., Welch, A.E., Schweiger, L., Craib, S. and Smith, T.A.D., 2011. [<sup>18</sup>F]Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Incorporation by MCF-7 Breast Tumour Cells *In Vitro* Is Modulated by Treatment with Tamoxifen, Doxorubicin, and Docetaxel: Relationship to Chemotherapy-Induced Changes in ATP Content, Hexokinase Activity, and Glucose Transport. *International Journal of Molecular Imaging*, 2011, 874585. Doi:10.1155/2011/874585.
- Sheik Amamuddy, O., Veldman, W., Manyumwa, C., Khairallah, A., Agajanian, S., Oluyemi, O., Verkhivker, G.M. and Tastan Bishop, Ö., 2020. Integrated Computational

- Approaches and Tools for Allosteric Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (3), 847. Doi: 10.3390/ijms21030847.
- Shelley, J.C., Cholleti, A., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Timlin, M.R. and Uchimaya, M., 2007. Epik: a software program for  $pK_a$  prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21, 681-686. Doi: 10.1007/s10822-007-9133-z.
- Shen, D., Chen, W., Zhu, J., Wu, G., Shen, R., Xi, M. and Sun, H., 2020. Therapeutic potential of targeting SHP2 in human developmental disorders and cancers. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 190, 112117. Doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112117.
- Sibuh, Z.B., Taneja, P. and Khanna, S., 2020. Effects of substituents on anticancer activity of thiosemicarbazone against MCF-7 human breast cancer cell line. *bioRxiv*, 1-22. Doi: 10.1101/2020.02.19.955690.
- Sidat, P.S., Noolvi, M.N., More, U. and Jain, P., 2018. Anticancer therapy new Approach: An overview. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 9 (5), 1986-2007.
- Siddiquee, K., Zhang, S., Guida, W.C., Blaskovich, M.A., Greedy, B., Lawrence, H.R., Yip, M.L.R., Jove, R., McLaughlin, M.M., Lawrence, N.J., Sehti, S.M. and Turkson, J., 2007. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS USA)*, 104 (18), 7391-7396. Doi: 10.1073/pnas.0609757104.
- Singh, D.K., Sharma, S., Thakur, A., Kumar, S. and Singh, S., 2018. Pharmaceutical Analysis- Drug Purity Determination. *Encyclopedia of Analytical Science*, Ed(ler): P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole and M. Miro. Elsevier, Amsterdam, 1-12. Doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14551-2.
- Singh, R.K., Kumar, S., Tomar, M.S., Verma, P.K., Kumar, A., Kumar, S., Kumar, N., Singh, J.P. and Acharya, A., 2021. Putative role of natural products as Protein Kinase C modulator in different disease conditions. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, online ahead of print. Doi: 10.1007/s40199-021-00401-z.
- Singh, S.K., 2014. Shape and chemical feature based 3D- pharmacophore model generation, virtual screening and MESP studies to identify potential leads for antifungal azoles. UGC Major Research Project Final Report, Department of Bioinformatics, Karaikudi.
- Sinha, R., Schultz, N. and Sander, C., 2015. Comparing cancer cell lines and tumor samples by genomic profiles. *BioRxiv*, 028159. Doi: 10.1101/028159.
- Song, C-H., Yang, S.H., Park, E., Cho, S.H., Gong, E-Y., Khadka, D.B., Cho, W-J. and Lee, K., 2012. Structure-based Virtual Screening and Identification of a Novel Androgen Receptor Antagonist. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (36), 30769-30780. Doi: 10.1074/jbc.M112.379107.
- Song, Y., Wang, S., Zhao, M., Yang, X. and Yu, B., 2022. Strategies Targeting Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 for Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65 (4), 3066-3079. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c02008.
- Song, Y., Zhao, M., Wu, Y., Yu, B. and Liu, H-M., 2021a. A multifunctional cross-validation high-throughput screening protocol enabling the discovery of new SHP2 inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11 (3), 750-762. Doi: 10.1016/j.apsb.2020.10.021.
- Song, Z., Wang, M., Ge, Y., Chen, X-P., Xu, Z., Sun, Y. and Xiong, X-F., 2021b. Tyrosine phosphatase SHP2 inhibitors in tumor-targeted therapies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11 (1), 13e29. Doi: 10.1016/j.apsb.2020.07.010.

- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M., 1973. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5), 1409-1416. Doi: 10.1093/jnci/51.5.1409.
- Sperandio, O., Villoutreix, B.O. and Miteva, M.A., 2011. Structure-Based Virtual Screening. In *Silico Lead Discovery*, Ed: M.A. Miteva. Bentham Science Publishers, 20-46. Doi: 10.2174/97816080514271110101.
- Spring, K., Fournier, P., Lapointe, L., Chabot, C., Roussy, J., Pommey, S., Stagg, J. and Royal, I., 2015. The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes breast cancer cell invasion and metastasis. *Oncogene*, 34 (44), 5536-5547. Doi: 10.1038/onc.2015.9.
- Stebbing, J., Lit, L.C., Zhang, H., Darrington, R.S., Melaiu, O., Rudraraju, B. and Giamas, G., 2014. The regulatory roles of phosphatases in cancer. *Oncogene*, 33 (8), 939-953. Doi: 10.1038/onc.2013.80.
- Suma, A.A.T., Wahyuningsih, T.D., Mustofa, 2019. Synthesis, Cytotoxicity Evaluation and Molecular Docking Study of *N*-Phenylpyrazoline Derivatives. *Indonesian Journal of Chemistry*, 19 (4), 1081-1090. Doi: 10.22146/ijc.45777.
- Sun, J., Wei, Q., Zhou, Y., Wang, J., Liu, Q. and Xu, H., 2017. A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs. *BMC Systems Biology*, 11 (Suppl. 5), 87. Doi: 10.1186/s12918-017-0464-7.
- Sun, Y., Meyers, B.A., Czako, B., Leonard, P., Mseeh, F., Harris, A.L., Wu, Q., Johnson, S., Parker, C.A., Cross, J.B., Di Francesco, M.E., Bivona, B.J., Bristow, C.A., Burke, J.J., Carrillo, C.C., Carroll, C.L., Chang, Q., Feng, N., Gao, G., Gera, S., Giuliani, V., Huang, J.K., Jiang, Y., Kang, Z., Kovacs, J.J., Liu, C-Y., Lopez, A.M., Ma, X., Mandal, P.K., McAfoos, T., Miller, M.A., Mullinax, R.A., Peoples, M., Ramamoorthy, V., Seth, S., Spencer, N.D., Suzuki, E., Williams, C.C., Yu, S.S., Zuniga, A.M., Draetta, G.F., Marszalek, J.R., Heffernan, T.P., Kohl, N.E. and Jones, P., 2020. Allosteric SHP2 Inhibitor, IACS-13909, Overcomes EGFR-Dependent and EGFR-Independent Resistance Mechanisms toward Osimertinib. *Cancer Research*, 80 (21), 4840-4853. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1634.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71 (3), 209-249. Doi: 10.3322/caac.21660.
- Surabhi, S. and Singh, B.K., 2018. Computer Aided Drug Design: An Overview. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8 (5), 504-509. Doi: 10.22270/jddt.v8i5.1894.
- Suzuki, T., Yanagiba, Y., Suda, M. and Wang, R-S., 2014. Assessment of the Genotoxicity of 1,2-Dichloropropane and Dichloromethane after Individual and Co-exposure by Inhalation in Mice. *Journal of Occupational Health*, 56 (3), 205-214. Doi: 10.1539/joh.13-0236-oa.
- Swift, L.H. and Golsteyn, R.M., 2014. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (3), 3403-3431. Doi: 10.3390/ijms15033403.
- Sylvester, P.W., 2011. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols*, Ed: S.D. Satyanarayanajois. Humana Press, New York, 157-168. Doi: 10.1007/978-1-61779-012-6.

- Şen, S., Beceren, A. and Aksoy, H., 2018. Genotoksisite testlerinin yeni ilaç geliştirme sürecindeki önemi. *International Journal of Human Sciences*, 15 (3), 1634-1649. Doi: 10.14687/jhs.v15i3.5400.
- Şenol, H., Tulay, P., Ergören, M.Ç., Hanoğlu, A., Çalış, İ. and Moca, G., 2021. Cytotoxic Effects of Verbascoside on MCF-7 and MDA-MB-231. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 18 (5), 637-644. Doi: 10.4274/tjps.galenos.2021.36599.
- Tang, K., Zhao, M., Wu, Y-H., Wu, Q., Wang, S., Dong, Y., Yu, B., Song, Y. and Liu, H-M., 2022. Structure-based design, synthesis and biological evaluation of aminopyrazines as highly potent, selective, and cellularly active allosteric SHP2 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 230 114106. Doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114106.
- Tani, H., Kurita, S., Miyamoto, R., Ochiai, K., Tamura, K. and Bonkobara, M., 2020. Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18 (2), 161-168. Doi: 10.1111/vco.12524.
- Tatar, E., Şenkardeş, S., Erdin, H., Sellitepe, H.E., Küçükgülzel, Ş.G., Karaoğlu, Ş.A., Bozdeveci A., De Clercq, E., Pannecouque, C., Ben Hadda, T. and Küçükgülzel, İ., 2016. Synthesis, and prediction of molecular properties and antimicrobial activity of some acylhydrazones derived from *N*-(arylsulfonyl)methionine. *Turkish Journal of Chemistry*, 40, 510-534. Doi: 10.3906/kim-1509-21.
- Taylor-Robinson, D., 2002. *Mycoplasma genitalium* - an up-date. *International Journal of STD & AIDS*, 13 (3), 145-151. Doi: 10.1258/0956462021924776.
- Tayubi, I.A. and Sethumadhavan, R., 2010. Nature of Cation- $\pi$  Interactions and Their Role in Structural Stability of Immunoglobulin Proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 75 (7), 912-918. Doi: 10.1134/s000629791007014x.
- Terui, Y., Tomizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Mori, M., Itoh, T., Tanaka, M., Yamada, M., Shimamura, S., Ishizaka, Y., Ozawa, K. and Hatake, K., 1999. NH<sub>2</sub>-Terminal Pentapeptide of Endothelial Interleukin 8 Is Responsible for the Induction of Apoptosis in Leukemic Cells and Has an Antitumor Effect *in Vivo*. *Cancer Research*, 59 (22), 5651-5655.
- Thomford, N.E., Senthebane, D.A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A. and Dzobo, K., 2018. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (6), 1578. Doi: 10.3390/ijms19061578.
- Timuçin, A.C., 2021. Molecular Dynamics and MM-PBSA Studies for Deciphering Molecular Interactions of Valproic Acid with CYP2C9 Mutants F114L and I207T. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25 (1), 64-73. Doi: 10.19113/sdufenbed.801973.
- Tokur, O. ve Aksoy A., 2017. *İn Vitro* Sitotoksisite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 112-118.
- Tong, J-B., Luo, D., Zhang, X. and Bian, S., 2021. Design of novel SHP2 inhibitors using Topomer CoMFA, HQSAR analysis, and molecular docking. *Structural Chemistry*, 32, 1061-1076. Doi: 10.1007/s11224-020-01677-8.
- Tor, Y.S., Yazan, L.S., Foo, J.B., Wibowo, A., Ismail, N., Cheah, Y.K., Abdullah, R., Ismail, M., Ismail, I.S. and Yeap, S.K., 2015. Induction of Apoptosis in MCF-7 Cells via Oxidative Stress Generation, Mitochondria-Dependent and Caspase-Independent Pathway by Ethyl Acetate Extract of *Dillenia suffruticosa* and Its Chemical Profile. *PLoS ONE*, 10 (6), e0127441. Doi: 10.1371/journal.pone.0127441.

- Tugcu, F.T., Turhan, K., Karadayı, M. and Gulluce, M., 2018. Synthesis of 4-thiazolidinone derivatives and assessment of their toxicological properties. *Romanian Biotechnological Letters*, 23 (1), 13276-13286.
- Turkez, H., Arslan, M.E. and Ozdemir, O., 2017. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13 (10), 1089-1098. Doi: 10.1080/17425255.2017.1375097.
- Tutumlu, G., 2019. Identification of Novel Hit Molecules Against B-Cell Leukemia/Lymphoma-2 (BCL2). MS Thesis, Graduate School of Natural and Applied Sciences, İstanbul.
- Tutumlu, G., Dogan, B., Avsar, T., Didem Orhan, M., Calis, S. and Durdagi, S., 2020. Integrating Ligand and Target-Driven Based Virtual Screening Approaches With in vitro Human Cell Line Models and Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay to Identify Novel Hit Compounds Against BCL-2. *Frontiers in Chemistry*, 8, 167. Doi: 10.3389/fchem.2020.00167.
- Ugariogu, S.N., Duru, I.A. and Abah C.V., 2020. Natural Product Chemistry and Computer Aided Drug Design an Approach to Drug Discovery: A Review Article. *International Journal of Pharmacognosy & Chinese Medicine*, 4 (3), 000207. Doi: 10.23880/ipcm-16000207.
- Uluçam, G., 2017. 3-(2-Hidroksietil)-1-(3-aminopropil)-1H-imidazol-3-ium Bromid Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktiviteleri. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18 (1), 49-54. Doi: 10.23902/trkjinat.291076.
- Ülgen, O., 2012. Trombin İnhibitörlerinin Moleküler Modelleme Çalışmaları. Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ünver, Y., Ünlüer, D., Direkel, Ş. and Durdağı, S., 2020. Bis benzothiophene Schiff bases: synthesis and in silico-guided biological activity studies. *Turkish Journal of Chemistry*, 44 (4), 1164-1176. Doi: 10.3906/kim-2004-78.
- Van de Waterbeemd, H. and Gifford, E., 2003. Admet *In Silico* Modelling: Towards Prediction Paradise?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (3), 192-204. Doi: 10.1038/nrd1032.
- Van den Brand, A.D., Villevoys, J., Nijmeijer, S.M., Van den Berg, M. and Van Duursen, M.B.M., 2019. Anti-tumor properties of methoxylated analogues of resveratrol in malignant MCF-7 but not in non-tumorigenic MCF-10A mammary epithelial cell lines. *Toxicology*, 422, 35-43. Doi: 10.1016/j.tox.2019.04.009.
- Varela-Rial, A., Majewski, M. and De Fabritiis, G., 2021. Structure based virtual screening: Fast and slow. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, e1544. Doi: 10.1002/wcms.1544.
- Vazhappilly, C.G., Saleh, E., Ramadan, W., Menon, V., Al-Azawi, A.M., Tarazi, H. Abdu-Allah, H., El-Shorbagi, A.N. and El-Awady, R., 2018. Inhibition of SHP2 by new compounds induces differential effects on RAS/RAF/ERK and PI3K/AKT pathways in different cancer cell types. *Investigational New Drugs*, 37 (2), 252-261. Doi: 10.1007/s10637-018-0626-5.
- Veber, D.E., Johnson, S.R., Cheng, H-Y., Smith, B.R., Ward, K.W. and Kopple, K.D., 2002. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (12), 2615-2623. Doi: 10.1021/jm020017n.
- Veerasamy, R. and Karunakaran, R., 2022. Molecular docking unveils the potential of andrographolide derivatives against COVID-19: an in silico approach. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20 (1), 58. Doi: 10.1186/s43141-022-00339-y.

- Vembadi, A., Menachery, A. and Qasaimeh, M.A., 2019. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 147. Doi: 10.3389/fbioe.2019.00147.
- Venkatesan, A., Dhanabalan, A.K., Rajendran, S., Shanmugasundharam, S.G., Gunasekaran, K. and Dass, J.F.P., 2021. Structure-based pharmacophore modeling, virtual screening approaches to identifying the potent hepatitis C viral protease and polymerase novel inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*, online ahead of print. Doi: 10.1002/jcb.30298.
- Verma, A., Joshi, S. and Singh, D., 2013. Imidazole: Having Versatile Biological Activities. *Journal of Chemistry*, 2013, 1-12. Doi: 10.1155/2013/329412.
- Vu, L.A., Quyen, P.T.C. and Huong, N.T., 2015. In silico Drug Design: Prospective for Drug Lead Discovery. *International Journal of Engineering Science Invention*, 4 (10), 60-70.
- Wandjou, J.G.N., Mevi, S., Sagratini, G., Vittori, S., Dall'Acqua, S., Caprioli, G., Lupidi, G., Mombelli, G., Arpini, S., Allegrini, P., Les, F., López, V. and Maggi, F., 2020. Antioxidant and Enzyme Inhibitory Properties of the Polyphenolic-Rich Extract from an Ancient Apple Variety of Central Italy (Mela Rosa dei Monti Sibillini). *Plants (Basel)*, 9 (1), 9. Doi: 10.3390/plants9010009.
- Wang, F., Yang, W., Li, Z. and Zhou, B., 2021c. Studies on molecular mechanism between SHP2 and pyridine derivatives by 3D-QSAR, molecular docking and MD simulations. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25 (11), 101346. Doi: 10.1016/j.jscs.2021.101346.
- Wang, J., Li, S. and Li, H., 2019. Drug Design of "Undruggable" Targets. *Chinese Journal of Chemistry*, 37, 501-512. Doi: 10.1002/cjoc.201800552.
- Wang, J., Zhang, L., Pratilas, C.A. and Llosa, N.J., 2021a. SHP2 Inhibition as a Promising Anti-cancer Therapy: Function in Tumor Cell Signaling and Immune Modulation. *Journal of Cancer Immunology*, 3 (1), 18-29.
- Wang, L., Peng, L., Dong, B., Kong, L., Meng, L., Yan, L., Xie, Y. and Shou, C., 2006. Overexpression of phosphatase of regenerating liver-3 in breast cancer: association with a poor clinical outcome. *Annals of Oncology*, 17 (10), 1517-1522. Doi: 10.1093/annonc/mdl159.
- Wang, M., Lu, J., Wang, M., Yang, C-Y. and Wang, S., 2020a. Discovery of SHP2-D26 as a First, Potent, and Effective PROTAC Degradator of SHP2 Protein. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63 (14), 7510-7528. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00471.
- Wang, R-R., Liu, W-S., Zhou, L., Ma, Y. and Wang, R-L., 2020c. Probing the acting mode and advantages of RMC-4550 as an Src-homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP2) inhibitor at molecular level through molecular docking and molecular dynamics. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38 (5), 1525-1538. Doi: 10.1080/07391102.2019.1613266.
- Wang, S., Battigelli, A., Alkekhia, D., Fairman, A., Antoci, V., Yang, W., Moore, D. and Shukla, A., 2020d. Controlled delivery of a protein tyrosine phosphatase inhibitor, SHP099, using cyclodextrin-mediated host-guest interactions in polyelectrolyte multilayer films for cancer therapy. *RSC Advances*, 10, 20073-20082. Doi: 10.1039/D0RA03864D.
- Wang, W. and Wang, D., 2019. Extreme Fuzziness: Direct Interactions between Two IDPs. *Biomolecules*, 9 (3), 81. Doi: 10.3390/biom9030081.
- Wang, X-J., Chen, J-Y., Fu, L-Q. and Yan, M-J., 2020b. Recent advances in natural therapeutic approaches for the treatment of cancer. *Journal of Chemotherapy*, 32 (2), 53-65. Doi: 10.1080/1120009X.2019.1707417.

- Wang, Y., Cheetham, A.G., Angacian, G., Su, H., Xie, L. and Cui, H., 2017. Peptide-drug conjugates as effective prodrug strategies for targeted delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 110-111, 112-126. Doi: 10.1016/j.addr.2016.06.015.
- Wang, Y., Mohseni, M., Grauel, A., Diez, J.E., Guan, W., Liang, S., Choi, J.E., Pu, M., Chen, D., Laszewski, T., Schwartz, S., Gu, J., Mansur, L., Burks, T., Brodeur, L., Velazquez, R., Kovats, S., Pant, B., Buruzula, G., Deng, E., Chen, J.T., Sari-Sarraf, F., Dornelas, C., Varadarajan, M., Yu, H., Liu, C., Lim, J., Hao, H-X., Jiang, X., Malamas, A., LaMarche, M.J., Geyer, F.C., McLaughlin, M., Costa, C., Wagner, J., Ruddy, D., Jayaraman, P., Kirkpatrick, N.D., Zhang, P., Iartchouk, O., Aardalen, K., Cremasco, V., Dranoff, G., Engelman, J.A., Silver, S., Wang, H., Hastings, W.D. and Goldoni, S., 2021b. SHP2 blockade enhances anti-tumor immunity via tumor cell intrinsic and extrinsic mechanisms. *Scientific Reports*, 11 (1), 1399. Doi: 10.1038/s41598-021-80999-x.
- Wang, Z., Sun, H., Yao, X., Li, D., Xu, L., Li, Y., Tian, S. and Hou, T., 2016. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Physical Chemistry Chemical Physics (PCCP)*, 18 (18), 12964-12975. Doi: 10.1039/c6cp01555g.
- Welte, S., Baringhaus, K-H., Schmider, W., Müller, G., Petry, S. and Tennagels, N., 2005. 6,8-Difluoro-4-methylumbiliferyl phosphate: a Fluorogenic substrate for protein tyrosine phosphatases. *Analytical Biochemistry*, 338 (1), 32-38. Doi: 10.1016/j.ab.2004.11.047.
- Wilding, J.L. and Bodmer, W.F., 2014. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Research*, 74 (9), 2377-2384. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
- Wilm, A., De Lomana, M.G., Stork, C., Mathai, N., Hirte, S., Norinder, U., Kühnl, J. and Kirchmair, J., 2021. Predicting the Skin Sensitization Potential of Small Molecules with Machine Learning Models Trained on Biologically Meaningful Descriptors. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14 (8), 790. Doi: 10.3390/ph14080790.
- Wood, T., Stephenson, P. and Østergaard, L., 2010. Resources for Reverse Genetics Approaches in *Brassica* Species. *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*, Ed(ler): R. Schmidt and I. Bancroft. Springer, New York, 561-583. Doi: 10.1007/978-1-4419-7118-0.
- Wu, J., Li, W., Zheng, Z., Lu, X., Zhang, H., Ma, Y. and Wang, R., 2021. Design, synthesis, biological evaluation, common feature pharmacophore model and molecular dynamics simulation studies of ethyl 4-(phenoxymethyl)-2-phenylthiazole-5-carboxylate as Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP2) inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (4), 1174-1188. Doi: 10.1080/07391102.2020.1726817.
- Wu, J., Zhang, H., Zhao, G. and Wang, R., 2020. Allosteric Inhibitors of SHP2: An Updated Patent Review (2015-2020). *Current Medicinal Chemistry*, 27, 1-17. Doi: 10.2174/1568011817666200928114851.
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P. and Hannun, Y.A., 2018. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature Communications*, 9 (1), 3490. Doi: 10.1038/s41467-018-05467-z.
- Wu, X., Xu, G., Li, X., Xu, W., Li, Q., Liu, W., Kirby, K.A., Loh, M.L., Li, J., Sarafianos, S.G. and Qu, C-K., 2019. A small molecule inhibitor that stabilizes the autoinhibited conformation of the oncogenic tyrosine phosphatase SHP2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62 (3), 1125-1137. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00513.

- Xie, J., Si, X., Gu, S., Wang, M., Shen, J., Li, H., Shen, J., Li, D., Fang, Y., Liu, C. and Zhu, J., 2017. Allosteric Inhibitors of SHP2 with Therapeutic Potential for Cancer Treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (24), 10205-10219. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01520.
- Xu, T., Zhu, K., Beutrait, A., Vendome, J., Borrelli, K.W., Abel, R., Friesner, R.A. and Miller, E.B., 2022. Induced-Fit Docking Enables Accurate Free Energy Perturbation Calculations in Homology Models. *ChemRxiv*. Doi:10.26434/chemrxiv-2022-mq9n3.
- Ye, W., Liu, Y., Ren, Q., Liao, T., Chen, Y., Chen, D., Wang, S., Yao, L., Jia, Y., Zhao, C. and Zhou, Z., 2022. Design, synthesis and biological evaluation of novel triazoloquinazolinone and imidazoquinazolinone derivatives as allosteric inhibitors of SHP2 phosphatase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37, 1, 1495-1513. Doi: 10.1080/14756366.2022.2078968.
- Young, T., Abel, R., Kim, B., Berne, B.J. and Friesner, R.A., 2007. Motifs for molecular recognition exploiting hydrophobic enclosure in protein-ligand binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS USA)*, 104 (3), 808-813. Doi: 10.1073/pnas.0610202104.
- Yousuf, Z., Iman, K., Iftikhar, N. and Mirza, M.U., 2017. Structure-based virtual screening and molecular docking for the identification of potential multi-targeted inhibitors against breast cancer. *Breast Cancer - Targets and Therapy*, 9, 447-459. Doi: 10.2147/BCTT.S132074.
- Yuan, X., Bu, H., Zhou, J., Yang, C-Y. and Zhang, H., 2020b. Recent Advances of SHP2 Inhibitors in Cancer Therapy: Current Development and Clinical Application. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63 (20), 11368-11396. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00249.
- Yuan, Y., Fan, Y., Gao, Z., Sun, X., Zhang, H., Wang, Z., Cui, Y., Song, W., Wang, Z., Zhang, F. and Niu, R., 2020. SHP2 promotes proliferation of breast cancer cells through regulating Cyclin D1 stability via the PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathway. *Cancer Biology & Medicine*, 17 (3), 707-725. Doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0056.
- Zang, R., Li, D., Tang, I-C., Wang, J. and Yang, S-T., 2012. Cell-Based Assays in High-Throughput Screening for Drug Discovery. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 1, 31-51.
- Zargari, F., Lotfi, M., Shahraki, O., Nikfarjam, Z. and Shahraki, J., 2017. Flavonoids as potent allosteric inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36 (15), 4126-4142. Doi: 10.1080/07391102.2017.1409651.
- Zengin Kurt, B., Durdagi, S., Celebi, G., Salmas, R.E. and Sonmez, F., 2019. Synthesis, Anticholinesterase Activity and Molecular Modeling Studies of Novel Carvacrol Substituted Amide Derivatives. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38 (3), 841-859. Doi: 10.1080/07391102.2019.1590243.
- Zerbinati, N., Lotti, T., Monticelli, D., Rauso, R., González-Isaza, P., D'Este, E., Calligaro, A., Sommatis, S., Maccario, C., Mocchi, R., Lotti, J., Wollina, U., Tchernev, G. and França, K., 2018. *In Vitro* Evaluation of the Biosafety of Hyaluronic Acid PEG Cross-Linked with Micromolecules of Calcium Hydroxyapatite in Low Concentration. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences (OAMJMS)*, 6 (1), 15-19. Doi: 10.3889/oamjms.2018.044.
- Zhang, J., Zhang, F. and Niu, R., 2015. Functions of Shp2 in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19 (9), 2075-2083. Doi: 10.1111/jcmm.12618.

- Zhang, X., He, Y., Liu, S., Yu, Z., Jiang, Z-X., Yang, Z., Dong, Y., Nabinger, S.C., Wu, L., Gunawan, A.M., Wang, L., Chan, R.J. and Zhang, Z-Y., 2010. A salicylic acid-based small molecule inhibitor for the oncogenic Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP2). *Journal of Medicinal Chemistry*, 3 (6), 2482-2493. Doi: 10.1021/jm901645u.
- Zhang, Y., Li, H., Zhang, J., Zhao, C., Lu, S., Qiao, J. and Han, M., 2020. The combinatory effects of natural products and chemotherapy drugs and their mechanisms in breast cancer treatment. *Phytochemistry Reviews*, 19, 1179-1197. Doi:10.1007/s11101-019-09628-w.
- Zhang, Z-Y., 2001. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5 (4), 416-423. Doi: 10.1016/s1367-5931(00)00223-4.
- Zhao, B.T., Nguyen, D.H., Le, D.D., Choi, J.S., Min, B.S. and Woo, M.H., 2018. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from natural sources. *Archives of Pharmacal Research*, 41 (2), 130-161. Doi: 10.1007/s12272-017-0997-8.
- Zhao, Q., Bi, Y., Zhong, J., Li, X., Guo, J., Liu, Y-X., Pan, L-R., Tan, Y., Deng, Z-S. and Yu, X-J., 2020. 10,11-dehydrocurvularin exerts antitumor effect against human breast cancer by suppressing STAT3 activation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42 (5), 791-800. Doi: 10.1038/s41401-020-0499-y.
- Zhong, H., Tran, L.Y. and Stang, J.L., 2009. Induced-fit docking studies of the active and inactive states of protein tyrosine kinases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 28 (4), 336-346. Doi: 10.1016/j.jmgm.2009.08.012.
- Zhou, L., Feng, Y., Ma, Y-C., Zhang, Z., Wu, J-W., Du, S., Li, W-Y., Lu, X-H., Ma, Y. and Wang, R-L., 2021. Exploring the mechanism of the potent allosteric inhibitor compound2 on SHP2<sup>WT</sup> and SHP2<sup>F285S</sup> by molecular dynamics study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 103, 107807. Doi: 10.1016/j.jmgm.2020.107807.
- Zhou, X., Coad, J., Ducatman, B. and Agazie, Y.M., 2008. SHP2 is up-regulated in breast cancer cells and in infiltrating ductal carcinoma of the breast, implying its involvement in breast oncogenesis. *Histopathology*, 53, 389-402. Doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03103.x.
- Zhou, X-D. and Agazie, Y.M., 2008. Inhibition of SHP2 leads to mesenchymal to epithelial transition in breast cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 15, 988-996. Doi: 10.1038/cdd.2008.54.
- Zhu, T., Cao, S., Su, P-C., Patel, R., Shah, D., Chokshi, H.B., Szukala, R., Johnson, M.E. and Hevener, K.E., 2013. Hit Identification and Optimization in Virtual Screening: Practical Recommendations Based Upon a Critical Literature Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56 (17), 6560-6572. Doi: 10.1021/jm301916b.
- Zucco F., De Angelis, I. and Stamatii, A., 1998. Cellular Models for In Vitro Toxicity Testing. *Animal Cell Culture Techniques*, Ed: M. Clynes. Springer, Berlin, 395-422. Doi: 10.1007/978-3-642-80412-0.

## ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler                                                                           |                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Adı Soyadı:</b>                                                                         | Mine İSAOĞLU                                                                             |
| <b>Doğum Tarihi:</b>                                                                       |                                                                                          |
| <b>Doğum Yeri:</b>                                                                         |                                                                                          |
| <b>Uyruğu:</b>                                                                             |                                                                                          |
| <b>Adres:</b>                                                                              |                                                                                          |
| <b>Tel:</b>                                                                                |                                                                                          |
| <b>E-mail:</b>                                                                             |                                                                                          |
| Eğitim                                                                                     |                                                                                          |
| <b>Lise:</b>                                                                               | Çorlu Mimar Sinan Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (2008)                                    |
| <b>Lisans:</b>                                                                             | Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü (2013)                        |
| <b>Yüksek lisans:</b>                                                                      | İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı (2015) |
| <b>Doktora:</b>                                                                            | Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı                       |
| Yabancı Dil Bilgisi                                                                        |                                                                                          |
| <b>İngilizce:</b>                                                                          | Çok İyi                                                                                  |
| Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar                                                              |                                                                                          |
| Türkiye Kimya Derneği<br>Kimyagerler Derneği<br>Türk Farmasötik ve Medisinal Kimya Derneği |                                                                                          |