



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**HİPERİNSÜLİNEMİ ETKİSİYLE POSTTRANSLASYONEL
MODİFİKASYONA UĞRAYAN ENZİMLERİN DİNAMİĞİNİN
İNCELENMESİ VE İNHİBİTÖR MOLEKÜLLERİN ARAŞTIRILARAK İN
VİTRO ORTAMDA TEST EDİLMESİ**

HANİFE PEKEL

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. MUSTAFA GÜZEL

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üye. ÖZGE ŞENSOY

İSTANBUL-2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Hanife PEKEL
Tez Başlığı : Hiperinsülinemi Etkisiyle Posttranslasyonel Modifikasyona
Uğrayan Enzimlerin Dinamiğinin İncelenmesi ve İnhibitör
Moleküllerin Araştırılarak İn Vitro Ortamda Test Edilmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 29.07.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Prof.Dr. Mustafa GÜZEL

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç.Dr. Sultan Sibel ERDEM

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Canan ATILGAN

Sabancı Üniversitesi

Prof. Dr. Serdar DURDAĞI

Bahçeşehir Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

Tez Sahibinin
Adı ve Soyadı
İmza

Hanife Pekel

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek yol gösteren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Mustafa Güzel'e ve Dr. Öğr. Üye. Özge Şensoy'a teşekkür ederim.

İn vitro deneylerin yürütülmesinde desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a ve hücrelerini bizimle paylaşan sevgili Bengü Aktaş'a teşekkür ederim. Deneylerin yürütülmesi sırasında deneyimlerini titizlikle aktaran ve yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Merve Birgün Özçolak Aslan'a teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte vaktimizin çoğunu beraber geçirdiğimiz, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili arkadaşlarım Metehan İlter'e ve Tuğçe İnan'a teşekkür ederim.

Son olarak, bütün hayatım boyunca eğitimime en büyük katkıyı ve desteği veren annem başta olmak üzere bütün aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
1-ÖZET	1
2-ABSTRACT	2
3-GİRİŞ VE AMAÇ	3
4-GENEL BİLGİLER	5
4.1. Alzheimer Hastalığı	5
4.1.1. Amiloid Hipotezi	5
4.2. Alzheimer Hastalığı ve Hiperinsülinemi	7
4.2.1. Beyinde İnsülin Reseptör Sinyalizasyonu	8
4.2.2. Alzheimer Hastalığında İnsülinin Moleküler Rolü	9
4.2.2.1. <i>Ras/MAPK Yolağı</i>	9
4.2.2.2. <i>PI3K/Akt Yolağı</i>	10
4.2.2.3. <i>İnsülin Degrade Edici Enzim</i>	11
4.2.3. Protein Prenilasyonu ve Alzheimer Hastalığındaki Rolü	12
4.2.3.1. <i>Farnesiltransferaz ve Geraniltransferaz-I Enzim α-altbirim Fosforilasyonu</i>	15
4.3. Preniltransferaz Enzimlerinin Yapısal Özellikleri	18
4.3.1. Farnesiltransferaz Enzimi	18
5-MATERYAL VE METOD	21
5.1. Homoloji Modelleme ve Sistemlerin Hazırlanması	21

5.2. Moleküler Dinamik Simülasyon.....	21
5.3. Kök Ortalama Kare Sapma (RMSD).....	22
5.4. Heterodimer Arayüzey Analizleri	22
5.5. Olasılık Dağılım Grafikleri.....	22
5.6. Dinamik Çapraz Korelasyon Analizi (DCCM)	23
5.7. Temel Bileşenler Analizi (PCA)	23
5.8. Hidrojen Bağlarının Hesaplanması.....	23
5.9. Hücre Kültürü.....	24
5.10. MTT Sitotoksosite Testi	24
5.11. İmmunositokimya Testi.....	25
6-BULGULAR.....	27
6.1. Fosforilasyonun Yapısal Stabilite Üzerine Etkisi.....	27
6.2. FTaz α - ve β -altbirimleri Arasındaki Etkileşimin İncelenmesi	28
6.3. Fosforilasyonun FTaz Bağlanma Kavitesinde Yol Açtığı Düzenlemeler	31
6.4. FTaz Konformasyonel Alanı Üzerine Fosforilasyonun Etkisi	40
6.5. FTaz Enzimi Üzerinde Olası Allosterik Bölgenin Araştırılması	43
6.6. Farmakofor Dizaynı ve Sanal Tarama Çalışmaları	44
6.7. Seçilen Ligandların Değerlendirilmesi	45
6.8. İnsülin ve Lonafarnib Molekülleri İçin Uygun Konsantrasyonların Belirlenmesi	60
6.9. İmmunositokimya Sonuçları	61
7-TARTIŞMA.....	66
8-SONUÇ	71
9-KAYNAKLAR	72
10-ÖZGEÇMİŞ	89

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Aβ	Amiloid beta
AH	Alzheimer hastalığı
AICD	APP intraselüler domain
Akt(PKB)	Protein kinaz B
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid prekürsör protein
DCCM	Dinamik çapraz korelasyon analizi
FPP	Farnesil pirofosfat
FTaz	Farnesiltransferaz
GEF	Guanin nükleotid değişim faktörü
GGTaz-I	Geranilgeraniltransferaz-I
GGTaz-II	Geranilgeranil transferaz-II
GROMACS	GRoningen MACHine for Chemical Simulations
GSK3	Glikojen sentaz kinaz 3
IGF-1	İnsülin büyüme faktörü-1
IDE	İnsülin degrade edici enzim
IR	İnsülin reseptörü
IRS	İnsülin reseptör substratı
MAPK	Mitojen aktif protein kinaz
NMDA	N-metil-D-aspartat
PCA	Temel bileşenler analizi
PDB	Protein data bankası
PIP2	Fosfotidilinozitol 4,5 bifosfat
PIP3	Fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfat
PI3K	Fosfotidilinozitol 3 kinaz
PTB	Fosfotirozin-bağlayıcı domain
PTM	Posttranslasyonel modifikasyon
RMSD	Kök ortalama kara sapma
sAPPα	Solübl N-terminal APP fragmanı α
sAPPβ	Solübl N-terminal APP fragmanı β

SASA	Solvent erişilebilir yüzey alanı
SH2	Src homoloji 2 domain
VMD	Visual Molecular Dynamics



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 6.3.1. FTaz enzimi ve FPP substrat arasındaki hidrojen bağı kapasitesi.....	38
Tablo 6.4.1. Birinci ve ikinci temel bileşenlerin toplam değerleri.....	41
Tablo 6.6.1. Sanal tarama sonuçları.....	45
Tablo 6.7.1. Ligandların proteine bağlı kalma süreleri.....	46



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1.1. Amiloid kaskad şematik gösterimi.....	6
Şekil 4.2.3.1. CaaX protein prenilasyonu şematik gösterimi.....	13
Şekil 4.2.3.2. Mevalonat-izoprenoid-kolesterol yolağı.....	14
Şekil 4.2.3.1.1. İnsülin etkisiyle FTaz aktivite artışı ve Ras/MAPK yolağının uyarılması.....	17
Şekil 4.3.1.1. FTaz enzimatik reaksiyon şeması.....	20
Şekil 6.1.1. FTaz α -altbirimine ait RMSD olasılık dağılım grafikleri.....	27
Şekil 6.1.2. FTaz β -altbirimine ait RMSD olasılık dağılım grafikleri.....	28
Şekil 6.2.1. FTaz arayüzey alanlarının sistemler arasında karşılaştırılması.....	29
Şekil 6.2.2. FTaz β -altbirime ait dinamik çapraz korelasyonların karşılaştırılması...30	
Şekil 6.2.3. FTaz enzimine ait hot spot rezidülerinin incelenmesi.....	31
Şekil 6.3.1. FTaz Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafenin binary ve product sistemlerinde değerlendirilmesi.....	32
Şekil 6.3.2. Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafenin zamana göre grafiği.....	33
Şekil 6.3.3. FTaz Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafenin apo ve ternary sistemlerinde değerlendirilmesi.....	35
Şekil 6.3.4. FTaz enziminin binary ve product sistemlerinde Zn ²⁺ iyon koordinasyonunun incelenmesi.....	36
Şekil 6.3.5. FTaz enziminin apo ve ternary sistemlerinde Zn ²⁺ iyon koordinasyonunun incelenmesi.....	37
Şekil 6.3.6. Fosforsuz binary sistemde FPP substrat konformasyonunun incelenmesi.....	39
Şekil 6.3.7. FTaz enzim kavitesi içerisinde CaaX peptidin incelenmesi.....	40
Şekil 6.4.1. FTaz α - ve β -altbirimin dominant kolektif hareketin incelenmesi.....	42

Şekil 6.5.1. Fosforlu FTaz enzimi üzerinde olası allosterik bağlanma bölgesinin gösterimi.....	43
Şekil 6.6.1. Fosforlu FTaz enzimi üzerinde olası allosterik bağlanma bölgesinin farmakofor dizaynı.....	44
Şekil 6.7.1. Berotralstat ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	47
Şekil 6.7.2. Ticagrelor ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	48
Şekil 6.7.3. Vilazodone ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	49
Şekil 6.7.4. Lercanidipine ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	50
Şekil 6.7.5. Lomitapide ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	51
Şekil 6.7.6. Olaparib ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	52
Şekil 6.7.7. Lonafarnib ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	53
Şekil 6.7.8. Rosiglitazone ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	54
Şekil 6.7.9. Donepezil ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	55
Şekil 6.7.10. Raltitrexed ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi.....	56
Şekil 6.7.11. Ligandların FTaz heterodimerik arayüzey alanına etkisi.....	57
Şekil 6.7.12. Ligandların hot spot rezidü frekansına etkisi.....	58
Şekil 6.7.13. Ligandların Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafeye etkisi.....	59
Şekil 6.8.1. İnsülin molekülünün hücre canlılığı üzerine etkisi.....	60
Şekil 6.8.2. Lonafarnib molekülünün hücre canlılığı üzerine etkisi.....	61
Şekil 6.9.1. İnsülin(-), lonafarnib(-) SH-SY5Y hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri.....	62
Şekil 6.9.2. İnsülin(-), lonafarnib(+) SH-SY5Y hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri.....	63
Şekil 6.9.3. İnsülin(+), lonafarnib(-) SH-SY5Y hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri.....	64

Şekil 6.9.4. İnsülin(+), lonafarnib(+) SH-SY5Y hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri.....65



1-ÖZET

HİPERİNSÜLİNEMİ ETKİSİYLE POSTTRANSLASYONEL MODİFİKASYONA UĞRAYAN ENZİMLERİN DİNAMİĞİNİN İNCELENMESİ VE İNHİBİTÖR MOLEKÜLLERİN ARAŞTIRILARAK İN VİTRO ORTAMDA TEST EDİLMESİ

Farnesiltransferaz (FTaz) enzimi C-terminalinde CaaX motifi taşıyan proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonundan sorumludur. Hiperinsülinemi koşulunda FTaz'ın Ser60 α ve Ser62 α rezidüleri fosforilasyona uğrayarak enzimatik aktivite artmaktadır. Bu tez çalışmasında, moleküler dinamik (MD) simülasyonlar yardımıyla fosforilasyonun enzimatik reaksiyon aşamalarında protein dinamiğine ve yapısal özelliklerine olan etkisi araştırılmıştır. Bunun için, apo (FTaz), binary (FTaz+farnesil pirofosfat (FPP) substrat), ternary (FTaz+FPP substrat+CaaX peptit) and product (FTaz+farnesillenmiş CaaX peptit) sistemlerinin fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) simülasyonları yapılmıştır. Fosforilasyonun FPP substrat/CaaX peptit, katalitik Zn²⁺/koordine eden rezidüler arasında ve dimer arayüzeyinde neden olduğu konformasyonel değişimler gösterilmiştir. İlaveten, fosforlu FTaz enziminde küçük yapıli moleküllerin yerleşebildiği olası bir allosterik bölge tanımlanmış ve MD simülasyonlar yardımıyla moleküllerin etkisi araştırılmıştır. Olası allosterik bölgede stabil olarak bağlanabilen ligandların, fosforilasyonun yol açtığı değişiklikleri tersi yönde değiştirebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmamızla Ftaz'ın katalizlediği enzimatik reaksiyon basamaklarında fosforilasyonun etkisi ilk defa araştırılmıştır. Ayrıca, fosforilasyonun protein üzerinde fosforsuz halinde görünmeyen alternatif bir bağlanma bölgesi sağladığı gösterilmiştir. Bu perspektiften bakıldığında, hastalık durumlarında ortaya çıkan FTaz fosforilasyonu enzimin spesifik olarak hedeflenmesinin yolunu açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Farnesiltransferaz, Hiperinsülinemi, Moleküler dinamik, Posttranslasyonel modifikasyon

2-ABSTRACT

INVESTIGATION OF DYNAMICS OF ENZYMES WHICH UNDERGO HYPERINSULINEMIA-MEDIATED PHOSPHORYLATION AND DISCOVERY OF INHIBITOR MOLECULES THAT INACTIVATES THESE ENZYMES

Farnesyltransferase (FTase) enzyme is responsible for posttranslational modification of the CaaX motif found at the C-termini of proteins. The enzymatic activity of FTase has been shown to increase as a result of phosphorylation of Ser60 α and Ser62 α residues under hyperinsulinemia. In this thesis study, we set out to investigate the impact of phosphorylation on dynamics and structural properties of the enzymatic steps by means of molecular dynamics simulations. To do so, we performed simulations using both nonphosphorylated (NP) and phosphorylated (P) states of apo (FTase), binary (FTase+farnesyl pyrophosphate (FPP) substrate), ternary (FTase+FPP substrate+CaaX peptide) and product (FTase+farnesylated CaaX peptide) and showed that phosphorylation impacted conformational preferences of FPP substrate/CaaX peptide, catalytic Zn²⁺/coordinating residues as well as the dimer interface. Last but not least, we also identified a possible allosteric pocket on the phosphorylated FTase that can accommodate small molecules. We further targeted that site and investigated impact of molecules by means of molecular dynamics simulations. We could obtain a couple of ligands that could stably bind to the site and revert back the abovementioned rearrangements that emerge upon phosphorylation. To the best of our knowledge, this is the first study that systematically investigates the impact of phosphorylation on the enzymatic steps catalyzed by FTase. Moreover, it also shows that phosphorylation possibly provides alternative binding sites on the protein, which are otherwise not accessible under physiological conditions. From that perspective, the study paves the way for targeting a specific state of the protein that appear under disease conditions.

Key Words: Alzheimer disease, Farnesyltransferase, Hyperinsulinemia, Molecular dynamics, Posttranslational modification

3-GİRİŞ VE AMAÇ

Proteinlere farklı kimyasal gruplar bağlayarak yapılarını değiştiren posttranslasyonel modifikasyonlar (PTM), biyolojik süreçlerin regülasyonunda önemli roller oynamaktadır. Ancak, anormal düzeyde görülen posttranslasyonel modifikasyonlar birçok hastalığın patofizyolojisine de katkı sağlamaktadır (1,2). Diğer yandan, PTM sayesinde proteomun genişlemesi yeni ilaç arayışlarında hedeflenebilecek, farklı biyolojik fonksiyonlara sahip olan, potansiyel yapıların çeşitliliğini artırmaktadır. Bu sayede PTM ile modifikasyona uğramış olan proteinlerin hedeflenmesi ilacın seçiciliğini artırarak ideal bir ilaçtan beklendiği şekilde zararlı yan etkilerin azaltılmasına ve ilacın güvenliğinin artırılmasına imkan tanımaktadır (3).

Preniltransferaz enzimleri, hücrelerde CaaX motifi taşıyan proteinlerin farnesil veya geranilgeranil lipid grupları ile bağlanarak membrana tutunmasını ve böylece aktivitesini sağlamaktadır. Prenilasyondan sorumlu olan Farnesiltransferaz (FTaz) ve Geranilgeraniltransferaz-I (GGTaz-I) enzimlerinin inhibitörleri uzun yıllardır kanser terapilerinde araştırılan moleküller olmuştur (4). Önemli olarak, son yıllarda özellikle Alzheimer hastalığında FTaz enzim miktarının arttığı ispatlanmıştır. Artan enzim aktivitesi, farnesillenmiş HRas protein miktarını artırmakta ve hücre membranına tutunmasını sağlamaktadır. Bu şekilde aktive olan HRas proteini inen sinyal yolağında ERK proteinini aktive ederek AH gelişmesine önemli bir katkı sağlamaktadır (5). Diğer yandan, yapılan birçok çalışmada hiperinsülinemi durumunda AH gelişme riskinin arttığı gösterilmiştir. Önemli olarak, insülin FTaz/GGTaz-I enzimlerinin α -altbiriminde Ser60 α ve Ser62 α rezidülerinin fosforilasyonuna neden olarak enzim aktivitesini artırmaktadır (6).

Bu tez çalışmasında, FTaz α -altbirim fosforilasyonun, enzimatik reaksiyonun farklı aşamalarında protein dinamiği üzerine olan etkileri araştırılarak, aktivite artışından sorumlu olabilecek yapısal ve dinamik değişikliklerin tespit edilmesi ve protein yüzeyinde yeni bir bağlanma kavitesi araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, farklı endikasyonlarda onay almış ilaç moleküllerinin yeniden hedefleme çalışmalarıyla araştırılan yeni bölgenin hedeflenebilir olduğunu göstermek amaçlanmıştır. Şimdiye kadar, proteinin substrat bağlanma kavitesini hedeflediği bilinen moleküllerin ciddi toksik tesirleri bulunmaktadır. Bu nedenle fosforlu FTaz

enzimi üzerinde yeni bir bağlanma bölgesinin bulunması, enzimi selektif bir şekilde inhibe edebilecek, daha potent ve yan etki profili daha güvenli moleküllerin araştırılmasına imkan tanıyacaktır. Elde edilen bulgular ışığında geliştirilen yeni terapötik yaklaşımın, hiperinsülinemi nedeniyle protein prenilasyonunun anormal düzeyde görüldüğü hastalıkların tedavisinde olumlu katkıları olması beklenmektedir.



4-GENEL BİLGİLER

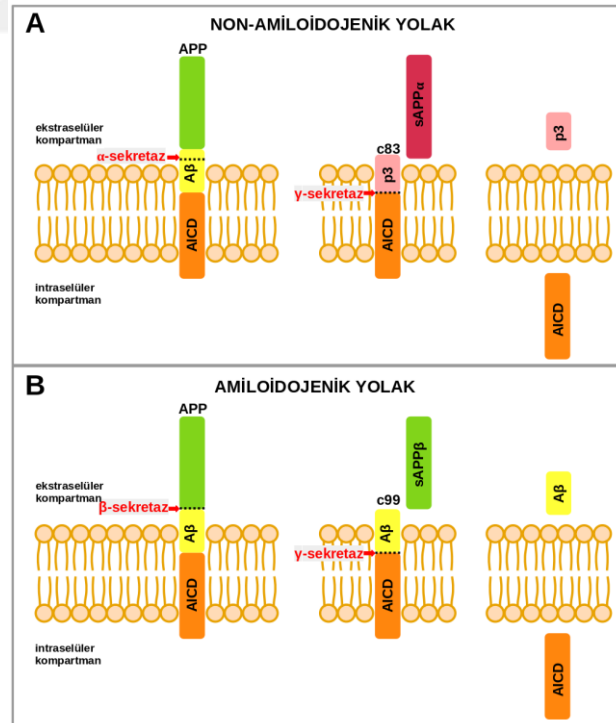
4.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, bilişsel fonksiyonların zamanla kaybolduğu ve ilerleyici hafıza kaybının görüldüğü nörodejeneratif bir hastalıktır. Dünya üzerinde yaşlı nüfusun %4-8'ini etkileyen AH, demansların en sık görülen şeklidir (7). Yaşla ilerleyen bu nörodejeneratif hastalıkta amiloid beta (A β) plakları, nörofibriler yumaklar ve kolinerjik iletimin yetersizliği hastalığın patofizyolojisinde rol alan temel etmenler olarak göz önüne çıkmaktadır. Güncel olarak asetilkolinesteraz inhibitörleri (rivastigmin, donepezil, galantamin) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör agonisti memantin ile ancak semptomatik tedavi yapılabilmektedir. Maalesef, hastalığın altında yatan nedenleri ortadan kaldırarak kesin çözüm üretecek bir tedavi bulunmamaktadır (8). AH, ailesel ve sporadik vakalar olmak üzere iki şekilde görülmektedir. Ailesel AH'da amiloid prekürsör protein (APP), presenilin 1 ve presenilin 2 proteinlerini kodlayan genlerde mutasyonlar görülmektedir. Sporadik vakalarda ise hastaların yaklaşık olarak %25'inde bir lipid transport proteini olan apolipoprotein E (ApoE) geninin e4 aleli taşıdığı görülmüştür. ApoE'nin A β seviyesini hangi mekanizma ile arttırdığı tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca, ileri yaşlarda olmak AH için önemli bir risk teşkil etmekle birlikte, hipertansiyon, metabolik sendrom, dislipidemi ve diyabet gibi faktörlerin bulunması da AH gelişmesine katkı sağlamaktadır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar neticesinde hastalığın altında yatan nedenleri anlamak için farklı hipotezler de geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları şöyledir: dendritik hipotez, mitokondriyal kaskad hipotezi, metabolik hipotez, oksidatif stres, nöroinflamasyon (9).

4.1.1. Amiloid Hipotezi

Amiloid hipotezine göre, beyin parenkimasında nörotoksik A β birikmesi AH patojenezinde önemli bir yer tutmaktadır. A β peptit birikimi, sinaps kaybına, nörodejenerasyona ve nöronal aktivitede değişikliklere yol açmaktadır. Bunun sonucunda da nöral devreler bozularak bilişsel gerilemeye neden olmaktadır. A β peptitler, tip I integral membran glikoproteini olan amiloid prekürsör protein'den (APP) üretilmektedir. APP, amilodojenik ve non-amilodojenik olmak üzere 2 farklı

yolakta proteolitik olarak yıkılmaktadır (Şekil 4.1.1.1). Non-amiloidojenik yolda APP, α -sekretaz enzimiyle solübl N-terminal APP fragmanı α (sAPP α) ve C-terminal fragmanı C83'e parçalanır. Daha sonra, C83 fragmanı, γ -sekretaz tarafından parçalanarak ekstraselüler p3 peptidi ve APP intraselüler domain (AICD) oluşturmaktadır. Amiloidojenik yolda ise, APP ilk olarak β -sekretaz tarafından parçalanarak solübl N-terminal APP fragmanı β (sAPP β) ve C-terminal fragmanı C99 üretilir. Peşinden, C99 fragmanının γ -sekretaz yıkılmasıyla A β peptitleri ve AICD oluşmaktadır. Oluşan A β peptitlerin çoğu 40 a.a. uzunluğundaki A β 40 ve yaklaşık %10 kadarı ise A β 42 varyantıdır. A β 42, ilaveten sahip olduğu iki hidrofobik a.a. rezidüsü sayesinde katlanarak agrege olmaya daha yatkındır. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda total A β miktarından ziyade, A β 42/A β 40 oranlarının AH'daki bilişsel gerilemeyle arasında daha iyi bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (10-13). Amiloid hipotezi, A β birikimi ve AH'nın diğer belirtileri arasında direkt bir bağlantı olduğunu öne sürmektedir. Buna göre, A β üretimini azaltacak veya klerensini artıracak bir tedavi yaklaşımı ile tau patolojisi, inflamasyon, sinaptik disfonksiyon, nöronal hücre kaybı ve demans gibi AH belirtileri de iyileştirilebilir (14).



Şekil 4.1.1.1. Amiloid kaskad şematik gösterimi. Canter ve ark. 2016 çalışmasından uyarlanmıştır (10).

4.2. Alzheimer Hastalığı ve Hiperinsülinemi

Genellikle, tip 2 diyabet tanısı almadan önce, uzun yıllar boyunca hiperglisemi eşlik etmeksizin görülen kronik hiperinsülinemi, hücrelerin insüline aşırı maruziyetine yol açmaktadır. Bütün hücreler gibi nöronlar da bu durumdan olumsuz etkilenmektedir (15). AH'nın erken dönemlerinde insülin etkisiyle hipokampus gibi beyin bölgelerinin fonksiyonları bozulmaktadır (16). Tip 2 diyabet'in, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı riskini artırdığı ve özellikle insülin tedavisi gören hastaların demansla ilişkili olduğu epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (17,18). Ayrıca, tip 2 diyabet hastaları, diyabetik olmayanlara göre iki kat daha fazla AH geliştirme riskine sahiptir (18).

Alzheimer tipi demansta görülen hafıza kayıplarının, insülin seviyesindeki bazal değişiklikler ile yakından ilişkili olduğu saptanmış ve hastaların çoğunda demansın erken dönemlerinde belirgin düzeyde hiperinsülinemi görülmüştür (19,20). Alzheimer hastalarında artan açlık plazma insülin seviyesi, hem periferde hem de beyindeki etkileriyle hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır (21). Orta derecede bir hiperinsülinemi beyindeki ve periferdeki inflamasyon belirteçlerini ve A β 42 seviyesini artırarak AH için risk oluşturabilmektedir (22). Ayrıca, sağlıklı bireylerde insülin infüzyonu sonucu, serebrospinal sıvıda insülin ve A β 42 seviyeleri artmaktadır (23). Periferal olarak enjekte edilen insülinin nöronal insülin reseptörlerini uyararak tau protein fosforilasyonuna yol açması, tip 2 diyabet ve nörodejenerasyon arasında yakın bir ilişki olduğu fikrini desteklemektedir (24). Sporadik Alzheimer hastalarının postmortem beyin korteks dokusu incelendiğinde, insülin reseptör miktarı artarken tirozin kinaz aktivitesinin azalması, bu hastalarda insülin reseptör upregülasyonunun dengeleyici bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (25).

4.2.1. Beyinde İnsülin Reseptör Sinyalizasyonu

İnsülin reseptörü (IR), olfaktor bulb, serebral korteks, hipotalamus, hipokampus ve serebellumda daha fazla olmak üzere bütün beyin dokularında yaygın olarak ve özellikle nöronal ve glial hücrelerde bulunmaktadır (26,27). Beyindeki insülin ve insülin reseptörleri, glukoz metabolizmasının ve nöronal büyümenin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (25).

İnsülin reseptörü, plazma membranının dış kısmında lokalize olmuş 2 adet α -altbirim ve 2 adet transmembranal β -altbirimden oluşan heterotetramerik bir reseptördür. İnsülin reseptörünün α -altbirimine insülin bağlanması sonucu β -altbirimin intrinsik tirozin kinaz aktivitesi tetiklenmekte ve sitoplazmik kısmındaki 3 tirozin rezidüsü otofosforilasyona uğrayarak reseptör tamamen aktif hale gelmektedir (28,29). β -altbirimin fosforlanan tirozin rezidüleri, Src homology 2 domain (SH2) ve fosfotirozin-bağlayıcı domain (PTB) içeren proteinleri tanıyarak indüklemektedir. İnsülin reseptör substratı (IRS)-1/-2 ve Shc, insülin reseptörleriyle etkileşerek insülin reseptörünün inen sinyal yolağında rol aldığı bilinen scaffold proteinleridir (30,31). İnsülin reseptörüne insülin ve onu takip eden IRS bağlanması sonucu, temel olarak fosfotidilinozitol 3 kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt) ve Ras/mitojen aktif protein kinaz (MAPK) kaskadları aktive edilmektedir (32). IRS proteinleri, aynı zamanda insülin büyüme faktörü-I (IGF-1) reseptörü kendi ligandı IGF-1 ile bağlandığında da aktive olarak insülin ve IGF-1 sinyal kaskadları arasındaki iletişimi sağlamaktadır. İnsülin ve IGF-1 merkezi sinir sistemindeki etkileriyle, enerji homeostazı, nöronal sağkalım, öğrenme ve hafıza gibi fonksiyonlarda düzenleyici rol almaktadır. Bu iki protein, diğer büyüme faktörlerinin yokluğunda nörit büyümesi, migrasyon, protein sentezi, nöronal iskelet proteinlerinin ekspresyonu ve yeni sinapsların oluşturulmasında görev almaktadır (33-35). İnsülin, A β anabolizması ve katabolizması arasındaki dengeyi modüle ederek beyindeki APP metabolizmasını düzenlemektedir (36).

4.2.2. Alzheimer Hastalığında İnsülinin Moleküler Rolü

4.2.2.1. Ras/MAPK Yolağı

İnsülin ve IGF-1 reseptörleri tarafından aktive edilerek fosforlanan IRS proteinleri, downstream yolaktaki SH2 domaini içeren proteinlerle etkileşerek hücre büyümesinde ve metabolik fonksiyonlarda rol almaktadır (37). IRS proteinlerinin aktivasyonu, PI3K/Akt yolağındaki etkilerinden bağımsız olarak Grb2/SOS/Ras/MAPK yolağını aktive etmektedir. Fosforlanan IRS-1'in Grb2 adaptör proteinin SH2 domainine bağlanmasıyla, bir guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) olan SOS aktive olarak membran bağlı formdaki inaktif Ras'ı (Ras-GDP) aktif haline (Ras-GTP) dönüştürmektedir (38,39). GTP bağlı aktif Ras proteinini CRAF ile etkileşerek, MEK ve ERK1/2 aktivasyonuna yol açmaktadır (40). ERK1/2 aracılı sinyaller belleğin kuvvetlendirilmesi gibi uzun süreli nöronal plastisitede görev almaktadır (41). Aynı zamanda ERK aktivasyonu, solübl APP miktarını artırırken A β birikimini engelleyerek APP prosesini ve sekresyonunu regüle etmektedir. Ancak bunun aksi yönde etkilere de sahip olması bu sinyal yolağını daha karmaşık hale getirmektedir. Ras/ERK yolağının aktivasyonu APP mRNA miktarını artırmaktadır. Böylece, APP'nin aşırı ekspresyonu ERK yolağını aktive ederek nöronal hücrelerin hücre siklusuna yeniden girmesini sağlamakta ve hücre kaybına yol açabilmektedir (42). Alzheimer hastalarının beyinde artan ERK1/2 aktivasyonu, hastalığın patofizyolojisinde önemli bir yer tutan tau proteinin hiperfosforilasyonuna yol açmaktadır (43). İlâveten, ERK1/2'nin aşırı aktivasyonu, antiapoptotik sinyal molekülü Akt'yi baskılayarak apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (44).

Aktive olan insülin reseptörüne bağlanan diğer bir protein Shc proteini de IRS-1'e benzer şekilde fosforilasyona uğrayarak adaptör protein Grb-2 ile bağlanmaktadır. Bunun sonucunda yine Ras/MAPK mitojenik sinyal yolağı uyarılmaktadır (44). İnsülin, hem Shc hem de IRS1 aracılığıyla Ras aktivasyonuna yol açıyor olsa da insülin reseptörünün Shc ile etkileşmesi daha baskın olarak gerçekleşmektedir (45). Shc ve IRS proteinleri downstream yolağında Grb2 proteini ile etkileşerek, mitojenik ve metabolik sinyal yollarını uyarmaktadır. Hücrede limitli olan Grb2 miktarı nedeniyle, Shc ve IRS proteinleri IR/IGFR ile bağlanmak için kompetisyona girmesi, hangi yolağın aktive olacağını etkileyebilir (46). Nöronal

Shc/MAPK yolağı, nöronal hücre ve sinapsların büyümesi, devamlılığı ve onarılmasını sağlayarak hipokampal sinaptik plastisiteyi modüle etmektedir. Ancak, nörodejenerasyonda önemli rolleri olan APP ve presenilin 1 proteinleri, Grb2 ile etkileşerek Shc/Ras/MAPK sinyal yolağını aktive etmekte ve böylece amiloid birikimine ve postmitotik nöronların ölümüne yol açabilmektedir (47,48).

Nöroinflamasyon, tau fosforilasyonu ve sinaptik plastisite gibi hücrenel süreçlerde rol alan MAPK sinyalizasyonu, A β plak ve nörofibriler yumak oluşumuna katkı sağlamaktadır. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında Alzheimer hastalarının beyinde MAPK aktivitesinin arttığı ve postmortem beyin dokularında MAPK immunoreaktivitesinin daha fazla olduğu saptanmıştır (49,50). Ayrıca, beyin hipokampal ve kortikal nöronlarında MAPK'ın A β plak birikimi ve nörofibriler yumak oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (51,52). İnsülin direnci ve hiperinsülinemi MAPK sinyal yolağını aktive etmek ve β -sekretaz ekspresyonunu artırmak suretiyle A β 40 ve A β 42 peptitlerin anormal derecede birikerek nöritik plak oluşmasına yol açmaktadır. Bununla beraber, insülin direnci α -sekretaz'ı baskılayarak non-amiloidojenik yolağı bloke etmektedir (53).

4.2.2.2. PI3K/Akt Yolağı

İnsülin reseptörü uyarılması sonucu aktive olan IRS1 ve IRS2'nin stimüle ettiği sinyal yolaklarından birisi de insülinin metabolik etkilerinden sorumlu olan PI3K yolağıdır. Aktive olan PI3K, membran fosfolipidi olan PIP2'yi (fosfotidilinozitol 4,5 bifosfat), PIP3'e (fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfat) dönüştürmekte ve Akt'yi aktive etmektedir. Böylece aktive olan Akt, α ve β olmak üzere iki altbirimden oluşan glikojen sentaz kinaz 3'ü (GSK3) fosforlayarak inhibe etmektedir (54).

A β üretiminde Ras/ERK yolağı kadar PI3K/Akt yolağı sayesinde GSK3'ün aktivasyonu da rol almaktadır. GSK3 aktivasyon artışı, APP'nin sitozolik 668. threonine rezidüsünden fosforlanmasını artırarak amiloidojenik yolaktaki β -sekretaz tarafından proteolizini sağlamaktadır (55,56). Diyabet ve Alzheimer hastalarında insülin/PI3K/Akt sinyalinin ciddi düzeyde yetersiz olduğu gösterilmiştir. İnsülin reseptör sinyalizasyonunun bozulması, PI3K/Akt yolağı aracılığıyla GSK3

üzerindeki inhibisyonun zayıflamasına yol açmaktadır. Bu sayede aktivitesi artan GSK3'ün GSK3 α altbirimi APP γ -sekretaz'ı aktive ederek A β oluşumunu, GSK3 β altbirimi ise tau fosforilasyonunu tetiklemektedir (57–59). Merkezi sinir sisteminde GSK3 β 'nin aşırı ekspresyonu tau hiperfosforilasyonunu artırırken bilişsel fonksiyonların kaybına yol açmaktadır. Aksine, GSK3 β 'nin inhibisyonu sonucu, A β üretiminin ve hiperfosforile tau proteine bağlı nörodejenerasyonun azaldığı *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir (60). İlâveten GSK3, Ras/ERK aktivasyonuna benzer şekilde APP üzerinden yürüyen bir mekanizma ile hücrelerin yeniden hücre siklusuna girmesini sağlayarak nörodejenerasyona yol açmaktadır (61). Ayrıca, insülin sinyalindeki bozulma sonucu PI3K aktivitesinin azalması Alzheimer hastalarının beyinde insülin degrade edici enzimin (IDE) azalmasına da yol açmaktadır (62).

4.2.2.3. İnsülin Degrade Edici Enzim

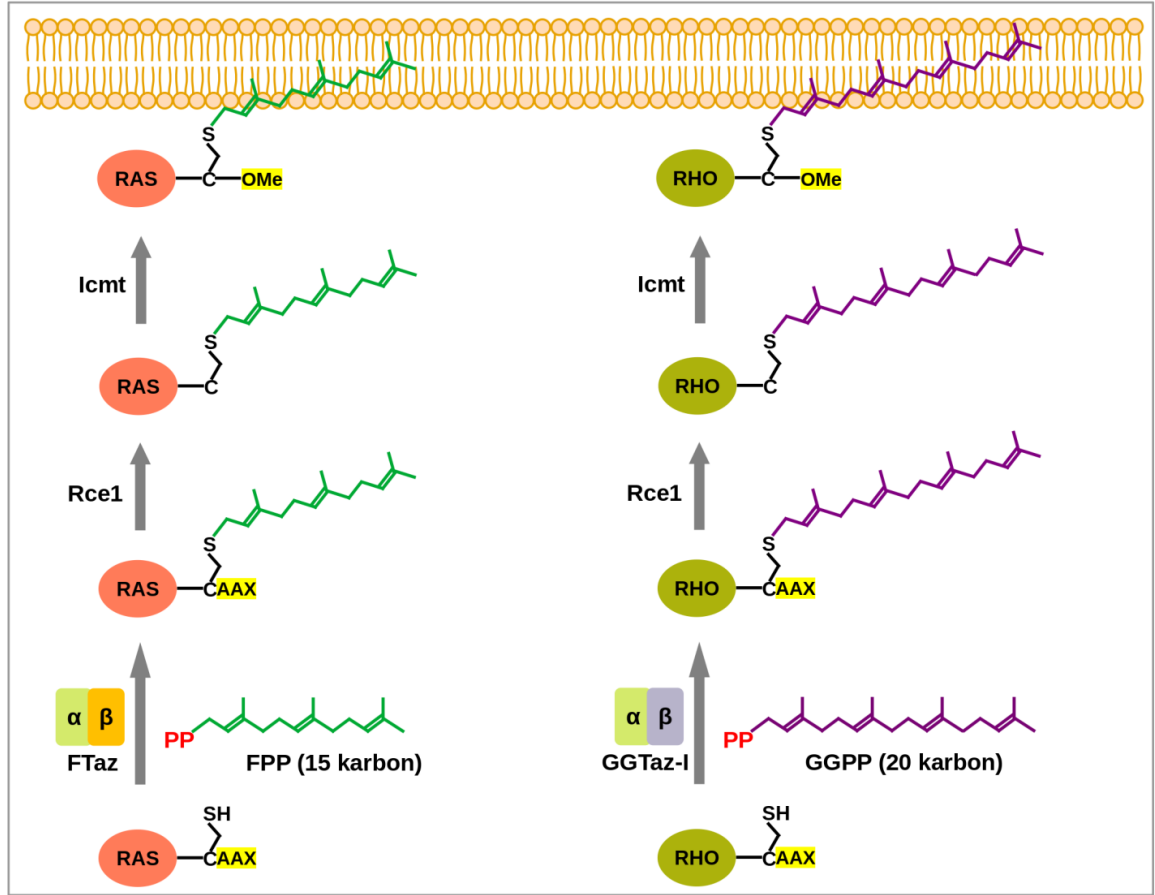
İnsülin degrade edici enzim, endozom, peroksizom, mitokondri ve hücre yüzeyi gibi hücresel kısımlarda bulunan sitozolik bir enzimdir. Hücrede insülin, atriyal natriüretik peptit ve glukagon gibi belirli hormonların yıkımında rol alan IDE, aynı zamanda A β 'nin degradasyonunda da rol alarak ekstraselüler A β seviyesini düzenlemektedir (63–65). A β 'nin IDE tarafından degrade edilebildiği *in vivo* olarak ispatlanmış ve bu enzimin hipofonksiyonunun AH, diyabet ve hiperinsülineminin temelinde yatan etmenlerden biri olabileceği öne sürülmüştür (66). Alzheimer hastalarının beyinde IDE'nin A β degrade edici aktivitesi azalmaktadır (67). Kan-beyin bariyerini geçerek periferden beyne ulaşan insülin, A β ile yarışmaya girerek IDE'nin A β 'yi degrade etmesini engellemekte ve hücrelerde A β plak oluşumunu artırmaktadır. Buna bağlı olarak insülin direnci neticesinde merkezi sinir sisteminde insülin seviyesinin artması, A β plakların birikmesine yol açtığı için AH patofizyolojisinde önemli bir yere sahiptir (66,68). İlâveten, IDE'nin aşırı ekspresyonu APP double transgenik farelerin beyinde A β seviyesini azaltmakta ve A β plak oluşumu tamamen engellenmektedir (69).

4.2.3. Protein Prenilasyonu ve Alzheimer Hastalığındaki Rolü

Proteinler, canlılık ile ilgili temel faaliyetlerin yürütülmesinde görev almakla birlikte, fenotiplerinde görülen değişimler sebebiyle de aynı zamanda birçok farklı hastalığın patojenezinde de rol oynamaktadır. Posttranslasyonel modifikasyonlar sonucunda amino asit yan zincirine ya da C- veya N- terminaline fonksiyonel grupların kovalent bağlanmasıyla proteinlerin aktivitesi değişmektedir (1,2). Birçok farklı yapıdaki kimyasal grup proteinlere bağlanabilmektedir. Bunlar fosforilasyon ve asetilasyonda olduğu gibi küçük yapıları gruplar olabileceği gibi karbohidrat zincirleri, lipid grupları, hatta ubikuitin gibi küçük yapıları proteinler de olabilmektedir. PTM birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde görev alırken, anormal düzeyde görülen PTM birçok hastalığın oluşmasıyla ve gelişmesiyle ilintilidir (3).

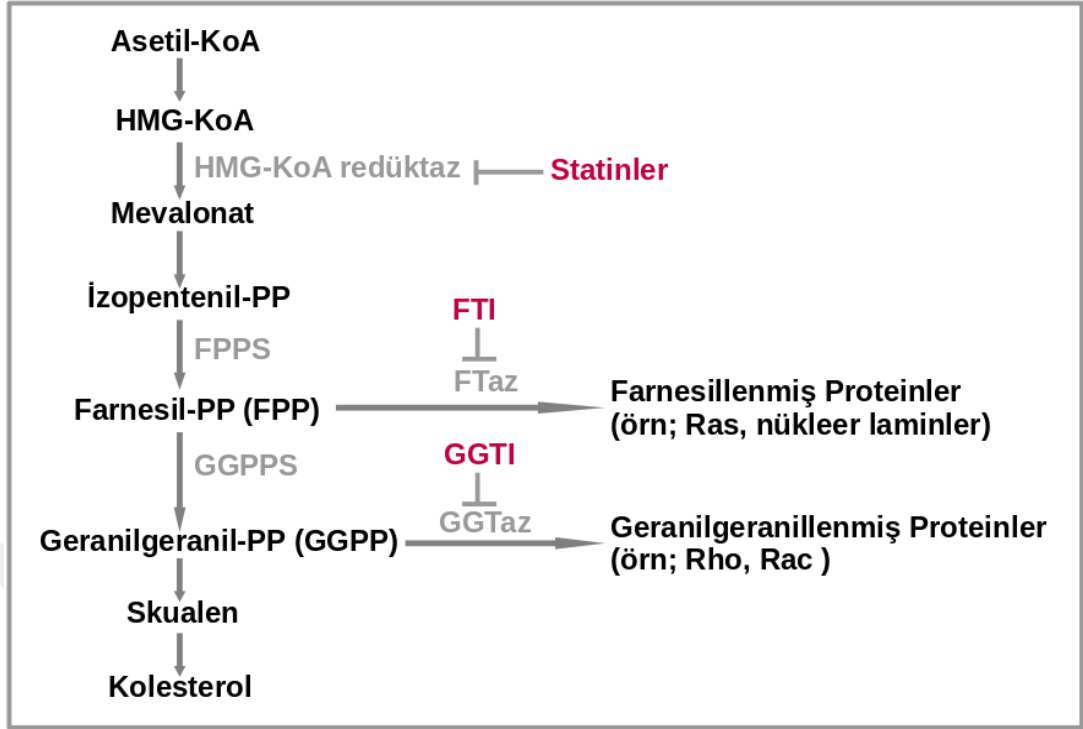
Protein prenilasyonu, hücre içinde protein-protein etkileşimlerinin ve membran-bağlantılı protein trafiğinin düzenlenmesinde rol oynayan temel PTM'lerden birisidir. Bu modifikasyon, proteinlerin karboksi terminalindeki veya onun yakınındaki sistein rezidülerine izoprenoid lipidlerin eklenmesiyle gerçekleşmektedir (70,71) ve prenilasyona uğrayan çoğu protein C-terminalinde CaaX motifi (C; sistein, a; alifatik amino asit, X; herhangi bir amino asit) taşımaktadır. CaaX proteinlerinin membrana tutunması için geçirdiği bir dizi enzimatik reaksiyonun ilki prenilasyondur. C-terminal sistein rezidüsü prenillenen protein, sırasıyla Rce1 ve Ictm enzimleriyle katalizlenen reaksiyonlar sayesinde önce C-terminalindeki tripeptit (-aaX) proteolize ve daha sonra prenilenmiş sistein rezidüsü metilasyona uğramaktadır (Şekil 4.2.3.1). Prenilasyondan sorumlu olan Farnesil transferaz (FTaz), Geranilgeranil transferaz-I (GGTaz-I) ve Geranilgeranil transferaz-II (GGTaz-II) enzimleri sayesinde, 15 karbonlu farnesil veya 20 karbonlu geranilgeranil gruplarının bağlanması sonucu daha hidrofobik hale gelen proteinlerin hücre membranları ile etkileşimi artmaktadır (72). CaaX protein substratın C-terminalinde bulunan X rezidüsünün tipik olarak metiyonin, daha az sıklıkla da serin, glutamin ya da alanin olduğu durumlarda, FTaz enzimi tarafından seçiciliği artmaktadır. GGTaz-I enzimi ise X pozisyonunda lösin amino asitini taşıyan proteinler için seçicilik göstermektedir (73,74). Memeli hücrelerinde FTaz enziminin hedeflediği yapılardan bazıları; Ras proteinleri (HRAS, KRAS ve NRAS), nükleer laminler (prelamin A ve lamin B), görsel sinyal iletiminde yer alan birkaç protein ve

bazı protein kinaz ve fosfatazlarıdır. GGTaz-I enzimi ise RAS-ilişkili GTPaz'ları (RAS ve RHO-RAC protein ailelerinin üyeleri) ve bazı regülatör proteinleri prenilasyonunda sorumludur. Prenilasyondan sorumlu olan bu enzimler, etkiledikleri proteinler ve onların hücresel yollarındaki anormallilerle ilişkili olması nedeniyle birçok kanser ve nörodejeneratif hastalıkla bağlantılıdır (72,75–77).



Şekil 4.2.3.1. CaaX protein prenilasyonu şematik gösterimi. Jeong ve ark. 2018 çalışmasından uyarlanmıştır (78).

Protein prenilasyonunda kullanılan izoprenoidler mevalonat yolağında üretilmektedir (Şekil 4.2.3.2). Dolayısıyla mevalonat yolağının hız sınırlayıcı basamağı olan HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe eden statin grubu ilaçlar, dolaylı olarak izoprenoidlerin üretilmesini ve buna bağlı olarak da protein prenilasyonunu engellemektedir (79).



Şekil 4.2.3.2. Mevalonat-izoprenoid-kolesterol yolağı. Hottman ve ark. 2014 çalışmasından uyarlanmıştır (79).

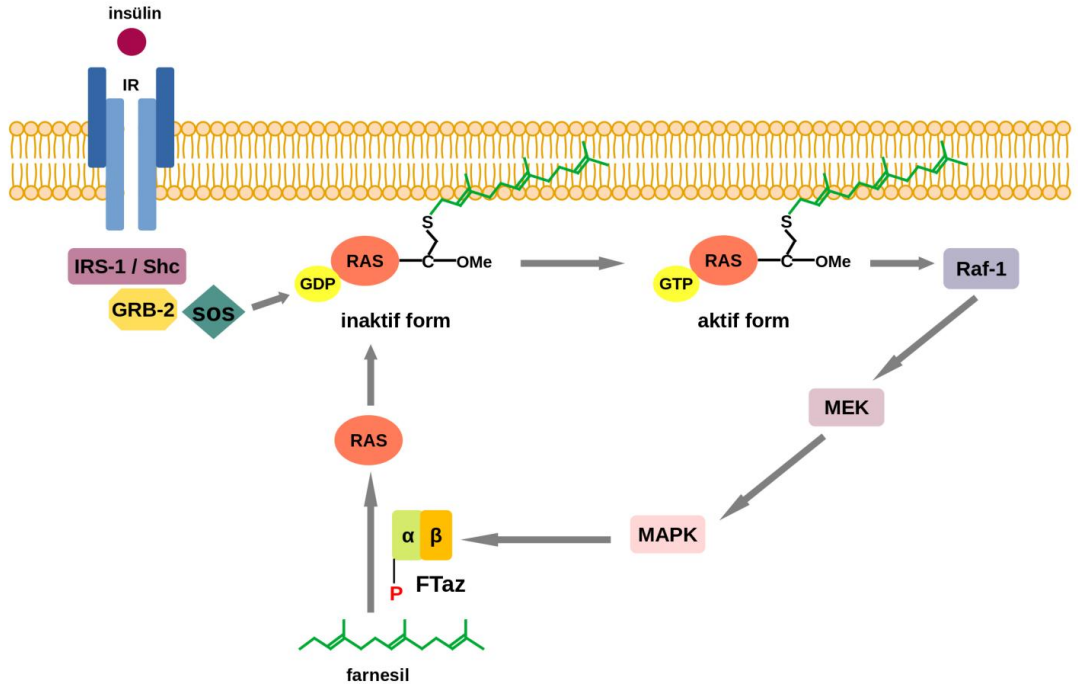
Statinlerle isoprenoid biyosentezinin inhibe edilmesiyle, A β degradasyonunda rol alan IDE'nin sekresyonu uyarılmaktadır (80,81). Statinler, eksozomla ilişkili bir yol sayesinde IDE salınımını artırmaktadır. İnflamasyon, hücre farklılaşması ve proliferasyon gibi süreçlerde rol alan eksozomların salım mekanizmasının düzenlenmesinde Rab, Ras, Rho, ROCK gibi prenilasyona uğrayan proteinler görev yapmaktadır. Statinler, bu proteinlerin prenilasyonunu dolaylı olarak inhibe ederek eksozom sekresyonunu ve A β klerensini artırmaktadır. Prenilasyondan sorumlu olan FTaz ve GGTaz-I enzimlerinin inhibisyonu incelendiğinde, FTaz inhibitörü ile mikroglialarda IDE sekresyonu uyarılırken GGTaz-I inhibitörünün IDE sekresyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır (81,82). APPS1 transgenik farelerde FTaz haplodeficiency etkisiyle FTaz enzim miktarı azaltıldığında, farelerde IDE'nin kararlı hal (steady state) seviyesi ve A β degradasyonu artmıştır. Ancak transgenik farelerde GGTaz-I haplodeficiency'nin IDE üzerinde bir etkisi olmamıştır. Takiben yapılan

çalışmalarda, GGTaz-I haplodeficiency sinaptik ve kognitif fonksiyonları ciddi bir şekilde zayıflatırken, FTaz haplodeficiency fizyolojik koşullar altında herhangi bir advers etkiye yol açmamıştır. Bu nedenle FTaz enzimini hedeflemek GGTaz-I'ı hedeflemekten daha güvenli bir terapötik yaklaşımdır (83). Güncel olarak, Alzheimer hastalarının postmortem beyin dokularında, FTaz enzim miktarının ve farnesillenmiş HRas protein miktarının arttığı gösterilmiştir. Farnesillenmiş halde membrana tutunarak aktive olan HRas proteini inen yolak proteinlerinden ERK'in aktivasyonunu sağlamaktadır. Yine aynı çalışmada, Alzheimer modeli APP/PS1 farelerinde ön beyin nöronlarında FTaz delesyonu yapılarak amiloid peptit üretimi baskılanış ve hafıza kaybı iyileşmiştir (5).

4.2.3.1. Farnesiltransferaz ve Geranilgeraniltransferaz-I Enzim α -altbirim Fosforilasyonu

FTaz ve GGTaz-I, β -altbirimleri birbirinden farklı ve α -altbirimleri özdeş olan heterodimerik yapıdaki enzimlerdir (84,85). Farnesiltransferaz enziminin α -altbirim fosforilasyonu ile ilgili birçoek *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmıştır. Bir fosfoprotein olarak çalışan α -altbirimin, β -altbirim stabilizasyonunda ve enzimatik katalizde önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir (86,87). Bir çalışmada adiposit hücrelerinin insülin ile stimülasyonunun FTaz α -altbirim fosforilasyonu ile sonuçlandığı ancak β -altbiriminde bu etkinin oluşmadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, bu fosforilasyonun FTaz enzim aktivitesini artırarak farnesillenmiş Ras protein miktarını ve membran lokalizasyonunu artırdığı gösterilmiştir (88). İnsülin stimülasyonun etkisini araştıran bir başka çalışma ise hem adiposit hem de 3T3-L1 fibroblast hücreleri ile yapılmıştır. İnsülin, hücre içerisinde IRS-1 ve Shc'nin fosforilasyonu ve guanin nükleotid değişim faktörü olan Sos'un aktivasyonu yoluyla, Ras proteinlerini aktive etmekte ve fosforilasyon kaskadını başlatarak MAPK aktivasyonuna neden olmaktadır. MAPK ise FTaz'ı fosforlayarak enzim aktivitesinde ve farnesillenmiş Ras miktarında artışa neden olmaktadır. Böylece membrana tutunan farnesillenmiş Ras proteini, büyüme faktörleri aracılığıyla GTP yüklenerek aktive olmaktadır. Bu çalışmayla, FTaz aktivitesinin artışı ve Ras/MAPK yolağının uyarılması arasındaki ilişkinin bir pozitif feedback mekanizmasına (şekil 4.2.3.1.1) dayandığı ortaya çıkarılmıştır (89). İlaveten, insülin stimülasyonu 3T3-L1 fibroblast

hücrelerinde FTaz α - ve β -altbirimlerine ait mRNA miktarını artırırken, enzimin transkripsiyon hızını artırmamaktadır. Bununla birlikte, insülin FTaz α - ve β -altbirimlerine ait mRNA yarı ömrünü uzatarak enzim stabilitesini artırmakta ancak her iki altbirimin protein miktarında artışa neden olmamaktadır. Dolayısıyla, insülin, FTaz mRNA stabilitesini artırmaktadır ancak enzimatik aktivitedeki değişiklik sadece posttranslasyonel seviyede görülen fosforilasyon olayına bağlıdır (90). İnsülin stimülasyonunun FTaz aktivitesi üzerine etkisini araştıran birçok *in vitro* çalışmayı destekler nitelikte, hiperinsülinemik ratların aort, iskelet kası ve karaciğer dokularında farnesillenmiş Ras protein miktarının arttığı da bilinmektedir (91). Bu çalışmaları takiben, insülin ile uyarılan MAPK aktivasyonunun yol açtığı fosforilasyonun FTaz α -altbirimine ait hangi amino asit rezidülerini etkilediğini açığa kavuşturmak için bazı serin rezidülerini mutasyona uğratarak VSMC hücrelerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, dominant negatif α -(S60A)(S62A) FTaz enzimini eksprese eden VSMC hücrelerinde, FTaz fosforilasyonunun, bazal FTaz aktivitesinin ve farnesillenmiş Ras protein miktarının azaldığını ispatlamışlardır. İlaveten, dominant negatif enzim ekspresyonu sayesinde, hücrelerde insülin ile uyarılmış olan DNA sentezinin de azaldığını göstermişlerdir. Dolayısıyla insülinin bahsedilen etkileri Ser60 α ve Ser62 α rezidülerinin fosforilasyonuna bağlıdır (6).



Şekil 4.2.3.1.1. İnsülin etkisiyle FTaz aktivite artışı ve Ras/MAPK yolağının uyarılması. Goalstone ve ark. 1997 çalışmasından uyarlanmıştır (89).

Hiperinsülinemi koşullarına bağlı olarak hücre içerisinde protein prenilasyonunda görülen değişimler aynı zamanda GGTaz-I enzim aktivitesi ile de ilişkilidir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin insülin ile stimülasyonu, FTaz enzimi ile aynı α -altbirimine sahip olan GGTaz-I enziminin de fosforilasyonuna ve katalitik aktivitesinde artışa yol açmaktadır. Böylece kanser hücrelerinde geranilgeranillenmiş RhoA protein miktarı ve buna bağlı proliferatif yanıt da artmaktadır (92). Ayrıca, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde dominant negatif FTaz/GGTaz-I α -altbirim ekspresyonu, insülinin yol açtığı Ras farnesilasyonunu ve RhoA geranilgeranilasyonunu azaltmaktadır. İlaveten, bu inhibisyon insülinin DNA sentezi ve hücre proliferasyonuna olan etkilerini de bloke etmektedir (93). Meme kanseri hücrelerinde insülinin mitojenik etkileri Shc hiperfosforilasyonuna bağlı olarak Ras/MAPK yolağının aktivasyonuna bağlıdır. Dominant negatif FTaz/GGTaz-I α -altbirim ekspresyonunun bu etkileri göz önüne alınırsa, α -altbirim fosforilasyonunun kanser tedavisine yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında ümit verici bir hedef olarak düşünülmesi kaçınılmazdır (94). Bütün bunlara ilaveten, FTaz/GGTaz-I α -altbirim fosforilasyonu Ras/MAPK yolağını etkileyerek 3T3-L1 pre-adiposit hücrelerinin

adiposit hücrelerine farklılaşmasında rol almaktadır. Diğer yandan, dominant negatif FTaz/GGTaz-I α -altbirim ekspresyonu sayesinde adiposit farklılaşması inhibe edilebilmektedir. Adipoz doku gelişimindeki aberasyonun tip 2 diyabet, obezite ve immün yetersizliklerle ilişkili olması nedeniyle, FTaz/GGTaz-I α -altbirim fosforilasyonun hedeflenmesi bahsedilen hastalıkların tedavisinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir (95).

4.3. Preniltransferaz Enzimlerinin Yapısal Özellikleri

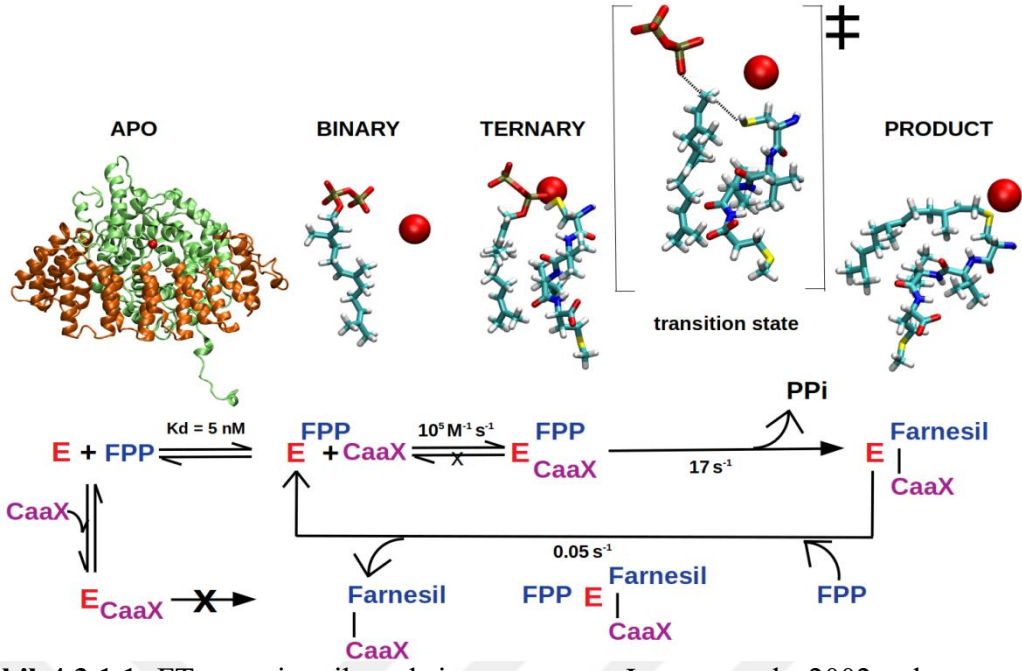
FTaz ve GGTaz-I enzimleri α - ve β - olmak üzere iki altbirimden oluşan heterodimerik enzimlerdir ve α -altbirim bu iki enzimde korunmuştur (84). İlâveten, FTaz ve GGTaz-I arasındaki yaklaşık %30 sekans özdeşliği bulunmaktadır, ancak buna rağmen enzimin sentral bölgelerinde homoloji benzerliği relatif olarak daha fazladır. Bu iki enzim sırasıyla 14 ve 13 adet α -heliksin oluşturduğu β -altbirim ve onların etrafında yarım ay şeklinde konumlanan 12 adet α -heliksin oluşturduğu α - α barrel şeklinde katlanmış α -altbirimden oluşmaktadır. Proteinin bu şekilde katlanması sonucu FTaz ve GGTaz-I enzimleri barrel'in merkezinde kalan huni şeklinde ve çok sayıda aromatik rezidü içeren hidrofobik bir kavite oluşturmaktadır. Proteinlerin N-terminal domaini ise düzensiz bir yapıdadır ve katalitik aktiviteye direkt etkisi bulunmamaktadır (4).

4.3.1. Farnesiltransferaz Enzimi

Farnesiltransferaz enziminin α - ve β -altbirimleri, yaklaşık 3300 Å² solvent-erişebilir yüzey alanını gömen geniş bir arayüz oluşturmaktadır. Diğer oligomerik proteinlerin aksine FTaz arayüzünde hidrojen bağı sayısı normalin iki katıdır. İlâveten, oligomerik proteinlerde arayüzün %65'i nonpolar atomlardan oluşurken, heterodimerik FTaz enziminin arayüzünün %54'ünü nonpolar rezidüleri, %29'unu polar atomlar ve %17'sini yüklü gruplar oluşturmaktadır (74). FTaz enzim yapısında her bir heterodimer bir adet Zn⁺² iyonu içermektedir ve katalitik aktiviteden sorumlu olan Zn⁺² iyonu FPP substratın değil, fakat peptid substratın enzime bağlanmasını artırmaktadır (73). FTaz β -altbiriminin iç kısmında, barrel'in tepe ve arayüze yakın olan kısmında bulunan katalitik Zn⁺² iyonu Asp297 β , Cys299 β ve His362 β rezidülerinin yan zincirleri tarafından koordine edilmektedir. Proteinin α - α barrel'in

merkezinde huni şeklinde derin bir yapı oluşturan β -altbirim yüksek oranda korunmuş olan 10 adet aromatik rezidü içermektedir (84). Bu aromatik rezidülerin oluşturduğu hidrofobik kavitede FPP substratına ait 15 karbon atomlu izoprenoid kısmı uzanırken, FPP'nin difosfat kısmı kavitenin dışa açılan kısmında pozitif yüklü rezidüler (Lys164 α , Arg291 β , His248 β , Lys294 β ve Tyr300 β) ile etkileşmektedir. FPP substratın yerleştiği bu kavitenin uzunluğu FTaz ve GGTaz-I enzimlerinde sırasıyla 15 ve 20 karbon atomluk izoprenoidin yerleşebileceği uzunluktur. Hidrofobik kavitenin derinliğinin bu iki enzim arasında kullanılan izoprenoid ligandın uzunluğuna uyumlu olması "moleküler cetvel" hipotezi olarak bilinmektedir (73,84).

Farnesilasyon, FTaz enziminin hidrofobik kavitesine ilk olarak FPP substratın bağlanmasıyla başlayan kinetik olarak sıralı bir şekilde ilerleyen bir enzimatik reaksiyondur. Daha sonra, CaaX protein substrat da kendi kavitesine bağlanmakta ve CaaX motifindeki katalitik sistein rezidüsünün sülfür atomu FPP substratın C1 atomuna yaklaşarak transition state'i oluşturmaktadır (96,97). Önemli olarak, prenilenmiş ürünün enzim kavitesinden salımı reaksiyonda hız sınırlayıcı basamaktır ve ikinci bir FPP substratın bağlanması ürün salımını kolaylaştırmaktadır (84,97,98). Bu çalışmada, enzimatik reaksiyon basamakları apo (FTaz), binary (FTaz+FPP substrat), ternary (FTaz+FPP substrat+CaaX peptit substrat) ve product (FTaz+farnesillenmiş CaaX peptit) olarak isimlendirilmiştir (Şekil 4.3.1.1).



Şekil 4.3.1.1. FTaz enzimatik reaksiyon şeması. Long ve ark. 2002 çalışmasından uyarlanmıştır (96).

5-MATERYAL VE METOD

5.1. Homoloji Modelleme ve Sistemlerin Hazırlanması

Farnesilasyonda enzimin farklı reaksiyon basamaklarını gösteren FTaz kompleks yapıları, insan FTaz'ı ile %97 sekans özdeşliği gösteren *Rattus norvegicus* organizmasına ait kristal yapılar kullanılarak modellenmiştir (74). Protein data bankasından (PDB) (99,100) elde edilen apo (PDB ID:1FT1) (74), binary (PDB ID:1FT2) (84), ternary (PDB ID:1D8D) (73), and product (PDB ID:1KZP) (96) kristal yapıları kullanılarak SWISS-MODEL (101) yardımıyla modellenmiştir. Bütün modellenen sistemler Schrödinger Maestro yazılımının ProteinPrep (102,103) aracı kullanılarak pH 7.0'de protone edilmiştir. Ser60 α ve Ser62 α rezidülerine fosfat gruplarının eklenmesi ve kovalent farnesil grubunun parametrizasyonu CHARMM-GUI Solution Builder (104–106) aracılığıyla yapılmıştır. Protein ve su moleküllerini modellemek için sırasıyla CHARMM36m (107) ve TIP3P (108) kullanılmıştır ve sistemler 0.15 M KCl ile nötralize edilmiştir (109).

5.2. Moleküler Dinamik Simülasyon

Fosforsuz ve fosforlu sistemler GRoningen Machine for Chemical Simulations (GROMACS) paketi kullanılarak simüle edilmiştir (110). Simülasyonlardan önce, sistemler ilk olarak steepest descent algoritması kullanılarak minimize edilmiştir. Daha sonra Nose-Hoover termostat (111,112) yardımıyla 303.15 K sıcaklıkta tutulan sistemler 125 ps boyunca NVT ensemble'da dengeye getirilmiştir. Moleküler dinamik (MD) simülasyonlar Nose-Hoover termostat ve Parrinello-Rahman barostat kullanarak NPT ensemble'da gerçekleştirilmiştir (113). Minimizasyon, equilibration ve production aşamalarında H-bağı constraint'i için LINCS algoritması kullanılmıştır (114). Ligand bağlı sistemlerde ligandların topoloji ve parametre dosyaları CHARMM-GUI Ligand Reader & Modeller kullanılarak üretilmiştir (115). Sonuç olarak, fosforsuz, fosforlu ve ligand bağlı FTaz sistemleri için total 48 μ s simülasyon yapılmıştır. Her biri 1 μ s uzunluğunda, ligandlar için üç replika ve diğer sistemler için en az iki replika olacak şekilde çalışılmıştır.

5.3. Kök Ortalama Kare Sapma (RMSD)

Proteininin α - ve β -altbirimlerinin stabilitesini fosforsuz ve fosforlu sistemlerde karşılaştırmak için RMSD değerleri hesaplanmıştır. Bunun için GROMACS paketinin ‘gmx rms’ modülü (110) kullanılarak ana zincir atomlarının RMSD değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{RMSD}(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (d_n(t) - d_n^{\text{ref}})^2}$$

Formülde, $d_n(t)$ t anındaki koordinatı ve d_n^{ref} referans yapının koordinatını göstermektedir.

5.4. Heterodimer Arayüzey Analizleri

FTaz heterodimer arayüzeyindeki kontakt sayısı, GROMACS paketinin ‘gmx mindist’ (110) modülü kullanılarak ve 3 Å mesafe içerisindeki uzaklıklar dikkate alınarak hesaplanmıştır. Ayrıca, her bir sistem için solvent erişilebilir yüzey alanı (SASA) ‘gmx sasa’ modülü (110) kullanılarak ölçülmüştür. Arayüzey alanı hesaplamalarında proteinin SASA değeri α - ve β -altbirimlerinin toplam alanından çıkarılarak ortalaması alınmıştır. Formül aşağıdaki gibidir;

$$\text{Arayüzey alanı} = \text{SASA}_{\alpha\text{-altbirim}} + \text{SASA}_{\beta\text{-altbirim}} - \text{SASA}_{\text{protein}}$$

Son olarak, arayüzeydeki değişiklikleri daha detaylı incelemek için heterodimer arayüzeyindeki hot spot rezidüler Hotpoint sunucusu (116) kullanılarak hesaplanmıştır. Hot spot rezidü frekansı, bir amino asidin yörüngeler (trajectory) boyunca hot spot olarak bulunma sıklığını ifade etmektedir. Hesaplamalar, yörüngelerden her 20 ns’de bir yapı alınarak yapılmıştır.

5.5. Olasılık Dağılım Grafikleri

Belirli iki atom arasındaki mesafenin hesaplanması GROMACS ‘gmx distance’ modülü (110) kullanılarak yapılmıştır ve zaman çizelgesinde elde edilen data olasılık dağılım grafikleri çizilerek gösterilmiştir. İki atom arasındaki mesafe ve RMSD sonuçları, minimum ve maksimum değerler aralığında 2 Å ile örneklenmiştir.

5.6. Dinamik Çapraz Korelasyon Analizi (DCCM)

İlk olarak, Ca atomları arasında dinamik çapraz korelasyonları hesaplamak için bio3d paketi (117) kullanılmıştır. Daha sonra, fosforsuz ve fosforlu sistemler arasında değişen korelatif hareketler incelenmiştir. Formül aşağıda verilmiştir;

$$DCC(i, j) = \frac{\langle \Delta r_i(t) \cdot \Delta r_j(t) \rangle_t}{\sqrt{\langle \|\Delta r_i(t)\|^2 \rangle_t} \sqrt{\langle \|\Delta r_j(t)\|^2 \rangle_t}}$$

t zamanında i ve j atomlarının koordinatları $r_i(t)$ ve $r_j(t)$. Formülde, $\langle . \rangle_t$, $\Delta r_i(t) = r_i(t) - \langle r_i(t) \rangle_t$ ve $\Delta r_j(t) = r_j(t) - \langle r_j(t) \rangle_t$ 'nin zaman grup ortalamasını açıklamaktadır.

5.7. Temel Bileşenler Analizi (PCA)

Fosforsuz ve fosforlu sistemlerin global hareketlerini incelemek için temel bileşenler analiz edilmiştir. Bunun için, ilk olarak her rezidünün Ca atomu yörüngeler boyunca ilk yapıya göre hizalanmıştır. Daha sonra, GROMACS paketinin 'gmx covar' ve 'gmx anaeig' modülleri (110) kullanılarak aşağıdaki formüle göre her sistemin eşdeğişirlik matrisi köşegenleştirilmiş özdeğer ve özvektörleri hesaplanmıştır.

$$C_{mn} = [M_{mn} \Delta r_m \Delta r_n]$$

C_{mn} eşdeğişirlik matrisini, $M_{mn} \Delta r_m \Delta r_n$ ise m ve n atomlarına ait koordinatların zamana göre ortalaması alınmış yapıya kıyasla pozisyonundaki değişimi ifade etmektedir.

$$C_v = \delta^2 v$$

Köşegenleştirilen eşdeğişirlik matrisinin özdeğerleri δ^2 , özvektörleri v ile gösterilmiştir. Son olarak, 'ProDy' Python paketi (118,119) kullanılarak her sistemin ilk özdeğerine göre α - ve β -altbirimleri 2D projeksiyonda gösterilmiştir.

5.8. Hidrojen Bağlarının Hesaplanması

FPP substrat difosfat grubunun protein ile yaptığı hidrojen bağı sayısı yörüngeler boyunca hesaplanarak her rezidü için %değer olarak verilmiştir. Bunun için Visual Molecular Dynamics (VMD) programının Hbond eklentisi kullanılmıştır (120).

5.9. Hücre Kültürü

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri %10 fetal sığır serum (FBS), 100 U/ml penisilin, 100 mg/ml streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle/Ham's) 37°C'de, % 5 CO₂'ye ayarlanmış inkübatörde kültür edilmiştir. Her iki günde bir besiyeri değişimi yapılmış ve hücreler %80-90 doluluğa geldiği zaman tripsin/EDTA ile kaldırılarak yeni kültür kaplarına aktararak çoğaltılmıştır.

Hemositometre ile yapılan hücre sayımı neticesinde, yeterli miktarda hücre elde edildikten sonra 96 kuyucuklu petri kaplarına, her deney grubu için 4'er örnek ve kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. İnsülin (Sigma-Aldrich, I9278), fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde çözülerek 1 mM'lık stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden uygun hacimlerde alınarak besiyeri ile 4 farklı konsantrasyona (50 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM) seyreltilmiş ve her bir kuyucuktaki total solüsyon hacmi 100 µl olacak şekilde hücrelere muamele edilmiştir. Farklı petri kaplarında 1, 2 ve 3 gün olmak üzere inkübe edilmiştir.

Lonafarnib (TargetMol, T6302) uygulanan deney setinde ise, hücreler 96 kuyucuklu petri kaplarına ekildikten sonra, insülinli ve insülinli besiyerlerinde 3 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra, her iki grup için de 4 farklı konsantrasyonda (0.5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM) lonafarnib ilaç molekülü ile muamele edilmiştir. Farklı petri kaplarında 1, 2 ve 3 gün olmak üzere inkübe edilmiştir. Lonafarnib stok çözeltisi, 1 mM konsantrasyonda olacak şekilde DMSO yardımıyla besiyerinde çözündürülmüştür. Stok çözeltisinden seyreltilerek hücreye uygulanan solüsyon ihmal edilebilir düzeyde (%0.1'den az) DMSO içermektedir.

İlaveten, hazırlanan insülin ve lonafarnib solüsyonları filtrelenerek kullanılmıştır. Her iki deney setinde de insülin ya da lonafarnib uygulamaksızın sadece besiyerinde inkübe edilen kuyucuklar kontrol gruplarını oluşturmaktadır. Sitotoksosite ve immunositokimya deneyleri için iki ayrı set olacak şekilde hücreler inkübe edilmiştir.

5.10. MTT Sitotoksosite Testi

Yukarıda anlatıldığı şekilde 96 kuyucuklu petri kaplarında inkübe edilen hücrelerin canlılığını ölçmek için 1., 2. ve 3. günlerde 3-(4, 5-dimetiltiyazoil-2-il)-2,

5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi yapılmıştır. Toz haldeki MTT'den 5 mg alınarak 1 ml PBS içerisinde çözündürülmüş ve 9 ml besiyeri eklenerek 0.5 mg/ml MTT solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan solüsyon filtrelenmiş ve ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile sarılı falkon içerisinde muhafaza edilmiştir.

96 kuyucuklu petri kaplarındaki örnekler iki kere PBS ile yıkandıktan sonra, her kuyucuğa 100 µl MTT solüsyonu eklenerek 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra MTT solüsyonu uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa asitlendirilmiş izopropanol çözeltisi eklenmiştir. 10 dk bekleme süresi içerisinde, pipetleme yapılarak formazon kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Bu işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Örneklerin 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri mikro-plate okuyucu (Bio-rad, iMark micro-plate reader) kullanılarak kaydedilmiştir. Elde edilen data GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak tek yönlü-ANOVA ve Dunnett post hoc testleriyle analiz edilmiştir.

5.11. İmmunositokimya Testi

96 kuyucuklu petri kaplarında inkübe edilen hücreler, 1., 2. ve 3. gün sonlarında fikse edilmiştir. Bunun için, kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak iki kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra, 4 gr paraformaldehit (PFA) tartılarak 80 ml PBS içerisinde 60°C'de karıştırılmış ve 1 M NaOH çözeltisinden 1 ml eklendikten sonra PBS ile 100 ml solüsyona tamamlanmıştır. Solüsyonun pH'sı derişik asetik asit çözeltisi yardımıyla fizyolojik pH'ya ayarlanmıştır. Hazırlanan ve +4°C'de muhafaza edilen %4'lük PFA solüsyonundan kuyucuklara eklenerek 15 dk oda sıcaklığında beklenerek hücrelerin fiksenmesi sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki PFA solüsyonu uzaklaştırılarak iki kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Son olarak kuyucuklara PBS eklenmiş ve bu şekilde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Her deney grubu için hücre boyaması yapılmıştır. Bunun için kuyucuklara bloklama solüsyonu (%3 BSA, %0.3 Sodyum azit, %0.3 Triton X, 0.3 M glisin) eklenerek 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra kuyucuklardan bu solüsyon uzaklaştırılıp HRas (Santa Cruz, sc-29) antikoru 1:50 oranında eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Ardından üç kez PBS ile yıkama yapılarak Alexa Flour 647 (Invitrogen, A32728) sekonder antikoru 1:400 oranında eklenerek 30 dk

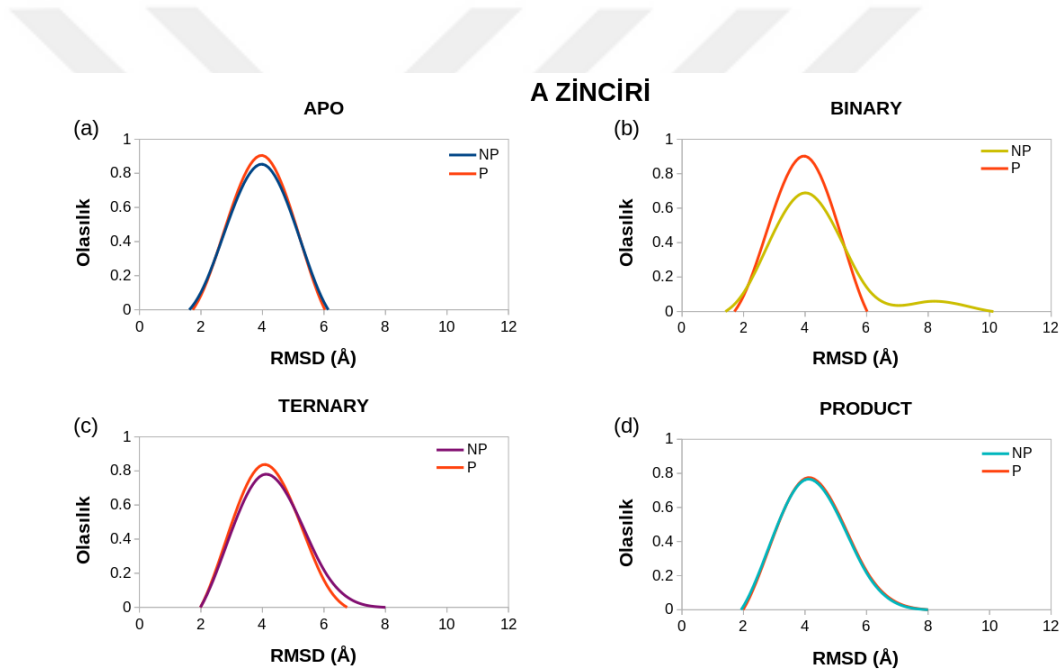
bekletilmiştir. Son olarak hücre çekirdeğini görüntülemek için Hoechst 33342 DNA boyası (Invitrogen, H3570) 1:1000 oranında ve hücre membranı için falloidin FITC (Invitrogen, F432) 1:40 oranında olacak şekilde PBS ile seyreltilerek 15 dk örneklere muamele edilmiştir. Daha sonra kuyucuklardaki solüsyon uzaklaştırılıp PBS eklenmiş ve spinning disk konfokal mikroskopunda 20x LD 0.4NA objektif ile görüntü alınmıştır.



6-BULGULAR

6.1. Fosforilasyonun Yapısal Stabilite Üzerine Etkisi

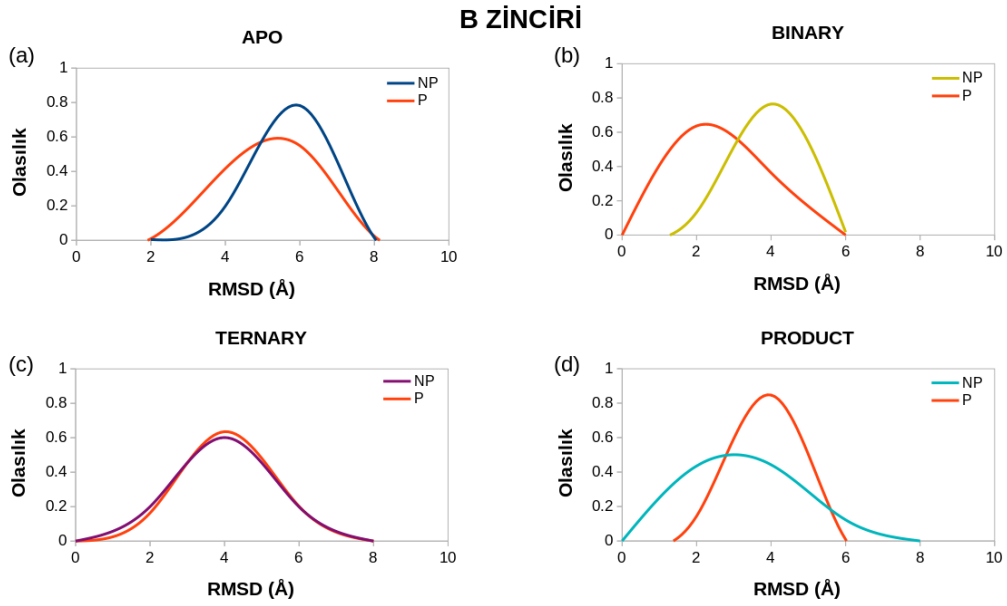
Deneyisel çalışmalardan bilindiği üzere, FTaz enzimatik aktivitesi sırasında FPP ve peptit substrat ağırlıklı olarak β -altbirim rezidüleri ile etkileşmektedir. α -altbirim ise β -altbirimin stabilitesini sağlamaktadır. Fosforilasyonun altbirimlerin stabilitesine etkilerini incelemek için, fosforlu ve fosforsuz sistemlere ait ana zincir RMSD değerleri hesaplanıp karşılaştırılmıştır. Enzimin α -altbirim ana zincir RMSD değerlerinin fosforlu ve fosforsuz sistemlerde benzer olmasıyla, α -altbirim stabilitesinin fosforilasyondan etkilenmediği gösterilmiştir (Şekil 6.1.1).



Şekil 6.1.1. FTaz α -altbirimine ait RMSD olasılık dağılımının fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) sistemler arasında karşılaştırılması; (a) apo, (b) binary, (c) ternary, ve (d) product.

Diğer yandan, β -altbirim stabilitesi fosforilasyondan etkilenmektedir ve enzimatik reaksiyonun her aşamasında bu etki farklı şekillerde ortaya çıkmaktadır. Fosforilasyon etkisiyle özellikle binary sistemde β -altbirim stabilitesi artarken product sisteminde azalmıştır. Bu durum, RMSD olasılık dağılım grafiklerindeki, binary ve product sistemler için sırasıyla, sola ve sağa doğru görülen kaymalardan

anlaşılmaktadır (Şekil 6.1.2.b ve d). İlginç bir şekilde, binary ve product sistemlere kıyasla çok belirgin olmasa da apo sisteme ait RMSD profilinde de az bir değişim olmuştur (Şekil 6.1.2.a). FTaz enziminin kavitede FPP ve peptit substratların bağlı olduğu ternary sistemde ise RMSD profilinde fosforilasyon etkisiyle herhangi bir değişiklik olmamıştır (Şekil 6.1.2.c).

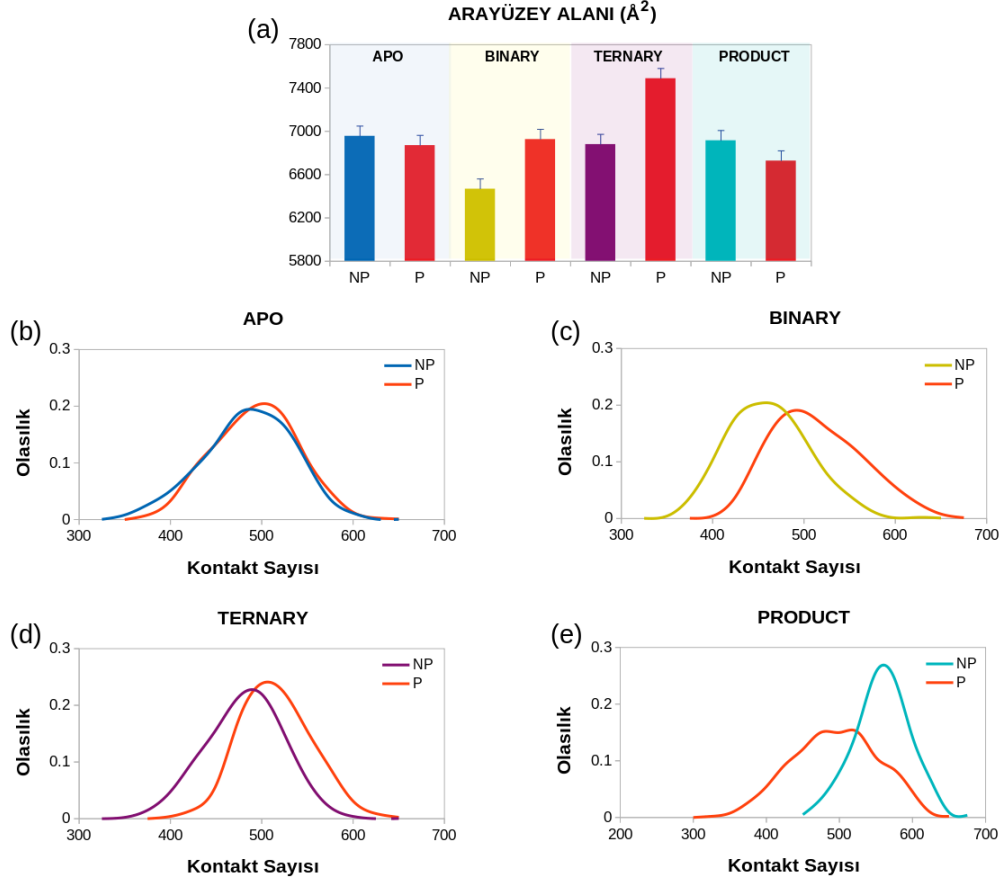


Şekil 6.1.2. FTaz β -altbirimine ait RMSD olasılık dağılımının fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) sistemler arasında karşılaştırılması; (a) apo, (b) binary, (c) ternary, ve (d) product.

6.2. FTaz α - ve β -altbirimleri Arasındaki Etkileşimin İncelenmesi

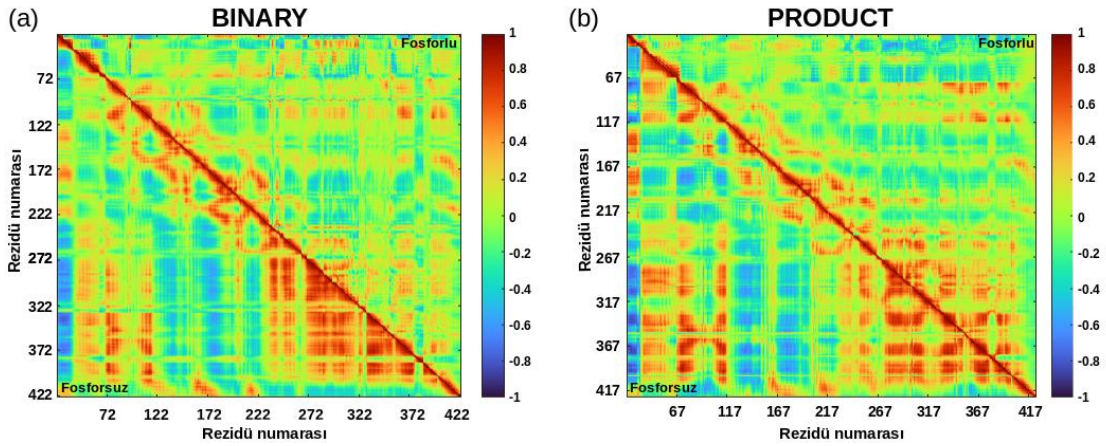
FTaz katalitik aktivitesinin α - ve β -altbirimleri arasındaki etkileşimin kuvvetiyle ilişkili olması nedeniyle, iki altbirim arasındaki kontakt sayısı ve arayüzey alanı hesaplanarak fosforilasyonun altbirimler arasındaki etkileşim profiline olan etkisi incelenmiştir. Enzimin α - ve β -altbirimlerinin oluşturduğu arayüzey alanı fosforilasyon etkisiyle binary ve ternary sistemlerde artarken, product sisteminde azalmaktadır (Şekil 6.2.1.a). Buna paralel olarak, fosforlu binary ve ternary sistemlerde iki altbirim arasındaki kontakt sayısında artış görülmektedir (Şekil 6.2.1.c ve d). İlginç bir şekilde, apo sistemde kontakt sayısında herhangi bir

değişiklik görülmemiştir (Şekil 6.2.1.b). Aynı zamanda, arayüzey alanında da diğer sistemlerde olduğu gibi belirgin bir değişiklik olmamıştır (Şekil 6.2.1.a).



Şekil 6.2.1. Arayüzey alanının karşılaştırılması (a) ve α - and β -altbirimlerin yaptığı kontakt sayısını gösteren olasılık dağılım grafiklerinin fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) sistemler arasında karşılaştırılması; (b) apo, (c) binary, (d) ternary, ve (e) product.

Bu sonuçlarla uyumlu olarak, fosforilasyon etkisiyle altbirimler arasındaki etkileşimin artması binary sistemde enzimin β -altbirimindeki rezidü korelasyonunu azaltmıştır (Şekil 6.2.2.a). Özellikle enzimin peptid bağlanma kavitesi civarında yerleşen 272-372 rezidüleri arasındaki korelasyon dramatik bir şekilde azalmıştır. Diğer yandan, iki altbirim arasındaki kontakt sayısının ve arayüzey alanının azalması nedeniyle, product sisteminin korelasyonunda fosforilasyonun belirgin bir etkisi olmamıştır (Şekil 6.2.2.b).

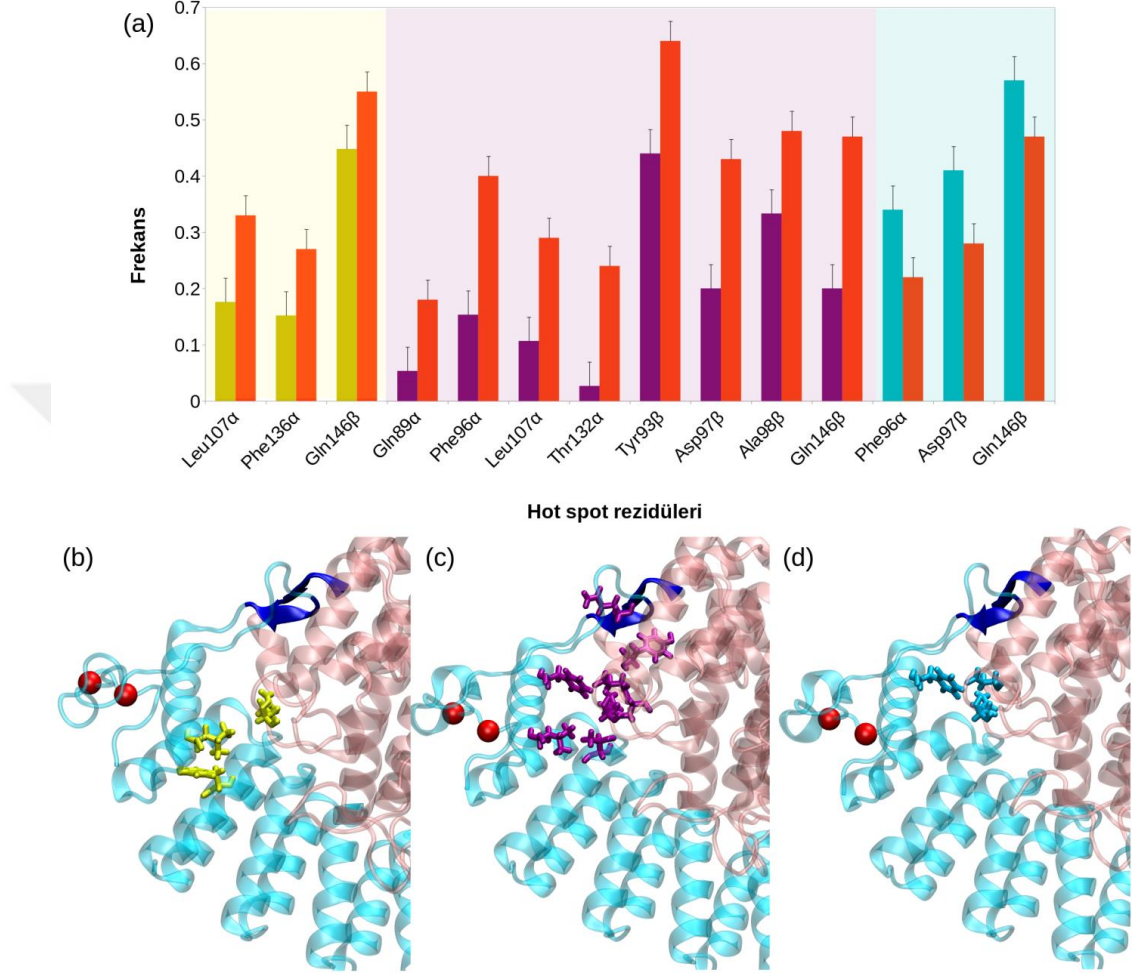


Şekil 6.2.2. FTaz β -altbirime ait dinamik çapraz korelasyonların fosforsuz (alttaki üçgen) ve fosforlu (üstteki üçgen) sistemler arasında karşılaştırılması; (a) binary ve (b) product.

FTaz altbirimleri arasındaki kontakt sayısında ve arayüzey alanında artış gözlemlenirken beraber, protein/protein etkileşimlerinde temel rol oynayan hot spot rezidülerinin dağılımının fosforilasyon etkisiyle nasıl modüle edildiği araştırılmıştır. Bu doğrultuda hot spot rezidülerin frekansı hesaplanarak fosforsuz ve fosforlu sistemler arasında karşılaştırılmıştır. Fosforilasyonun hot spot rezidü frekansına etkisi binary ve ternary sistemlerde artış, product sisteminde ise azalış şeklinde olmuştur (Şekil 6.2.3.a). Özellikle, binary sistemde Leu107 α , Phe136 α ve Gln146 β hot spot rezidülerinin sıklığı fosforilasyon etkisiyle artmıştır. Önemli olarak, peptit substrat bağlanma kavitesi civarındaki Gln89 α , Phe93 α , Tyr96 β , Asp97 β , Ala98 β hot spot rezidüleri daha yüksek frekans göstermiştir (Şekil 6.2.3.c). Dahası, Ala98 β rezidüsünün peptit substratın CaaX motifindeki X yerini tutan metiyonin ile kontakt kurduğu bilinmektedir (73). Bu hot spot rezidülerinin, α -altbirim (89 α -91 α) ve β -altbirim (87 β -89 β) rezidüleri arasında şekillenen arayüzeye (Şekil 6.2.3’de mavi ile renklendirilmiş beta sheet yapısı) yakın konumlanması dikkat çekmektedir. Önemli olarak, gösterilen beta sheet yapıları, FTaz’ın önemli arayüzlerinden birisini oluşturmaktadır (73).

Binary ve ternary sistemlerde görülen aksine, product sisteminde fosforilasyonun etkisiyle Phe96 α , Asp97 β ve Gln146 β hot spot rezidülerinin frekansları azalmıştır (Şekil 6.2.3.a). Bahsedilen rezidülerin farnesillenmiş peptit

ürüne yakın konumlanması nedeniyle, azalmış hot spot frekansının ürün salımına katkısı olabileceği düşünülmüştür.

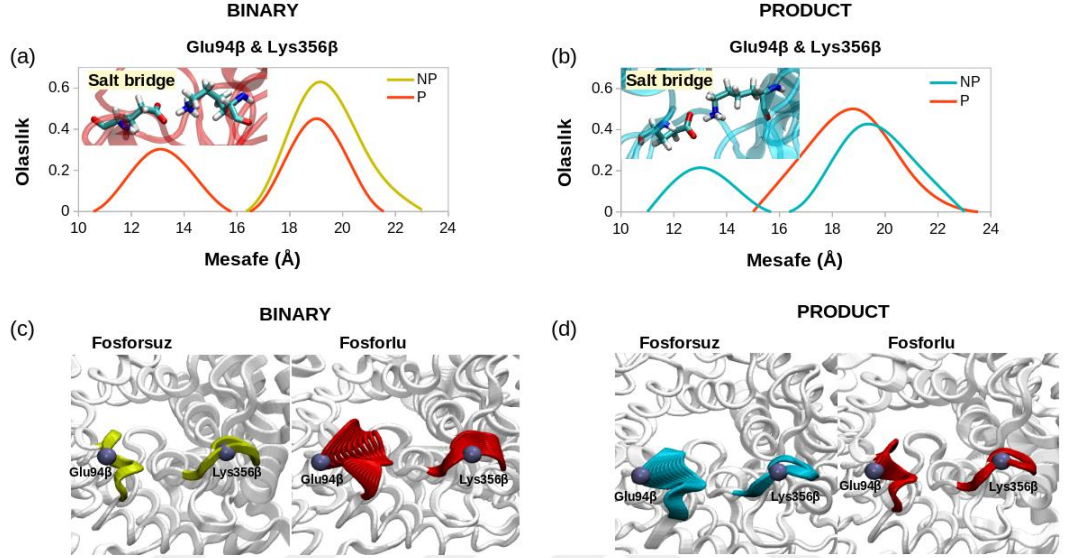


Şekil 6.2.3. (a) Hot spot rezidü frekansları fosforsuz binary (sarı), ternary (mor) ve product (koyu siyan) gösterilmiştir. Fosforlu sistemlere ait hot spot rezidülerinin frekansı kırmızı ile renklendirilmiştir. İlgili hot spot rezidüleri FTaz enziminin 3 boyutlu yapısı üzerinde gösterilmiştir (b) binary, (c) ternary ve (d) product sistemler. Fosforlanan rezidülerin C α atomları kırmızı renkli ve van der Waals ile gösterilmiştir. Beta yapraklar mavi renkli ve new cartoon ile gösterilmiştir.

6.3. Fosforilasyonun FTaz Bağlanma Kavitesinde Yol Açtığı Düzenlemeler

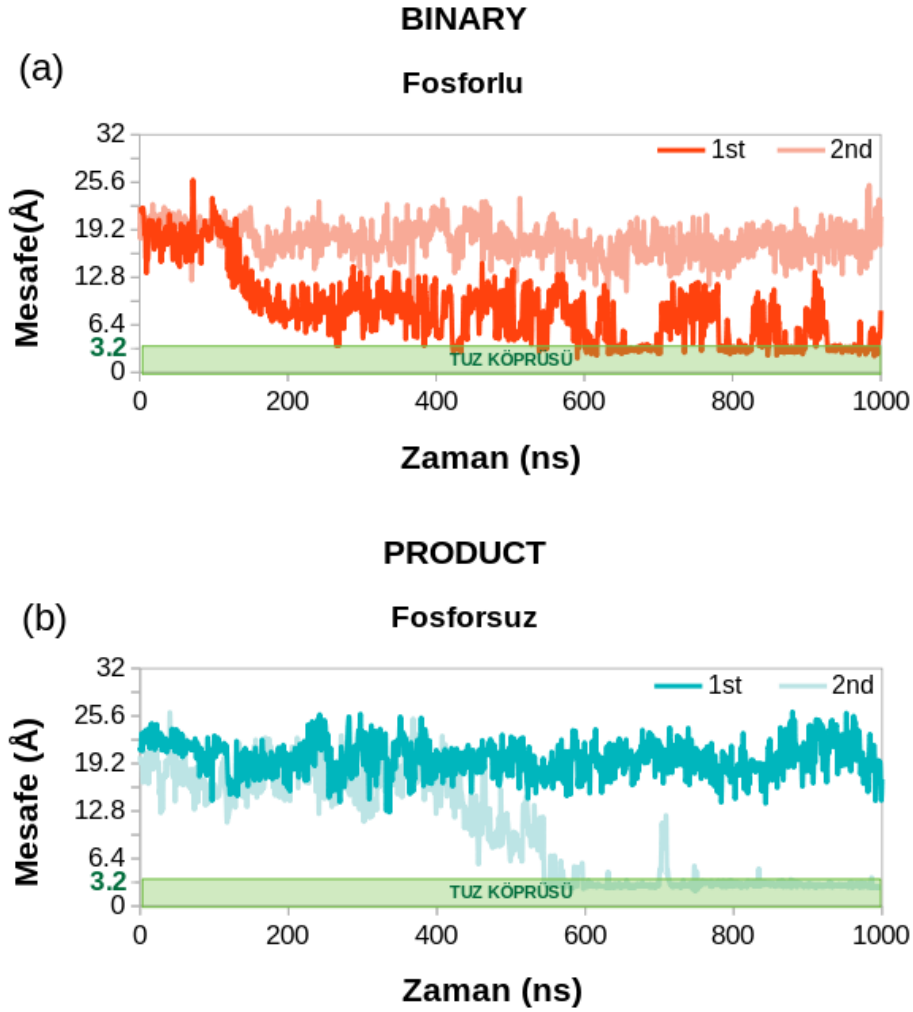
Fosforilasyonun FTaz enziminin katalitik hızını artırdığı deneysel çalışmalarla gösterildiği için, fosforsuz ve fosforlu sistemlerde peptit bağlanma rezidülerinin

yapısal ve dinamik özellikleri incelenerek karşılaştırılmıştır. Özellikle, peptit substrat ile bağ yaptığı bilinen Glu94 β (73) ve peptit bağlanma kavitesinin oluşumuna katılan 12 β -13 β loop'u üzerinde yerleşen Lys356 β rezidülerinin Ca atomları arasındaki mesafenin azaldığı binary sistemde görülmüştür (Şekil 6.3.1.a).



Şekil 6.3.1. FTaz Glu94 β ve Lys356 β rezidülerinin Ca atomları arasındaki mesafeye ait olasılık dağılım grafiklerinin fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) sistemleri arasında karşılaştırılması; (a) binary, (b) product. FTaz (90 β -96 β) ve (352 β -358 β) rezidülerinin oluşturduğu loop'ların global hareketinin gösterilmesi; (c) binary ve (d) product.

Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafenin kısalması, bu iki rezidünün asidik ve bazik yan zincirleri arasında tuz köprüsü kurulmasına imkan tanımaktadır (Şekil 6.3.2.a). Diğer yandan, fosforsuz FTaz enziminde Glu94 β , Lys356 β 'den daha uzakta konumlanmaktadır (Şekil 6.3.1.a).

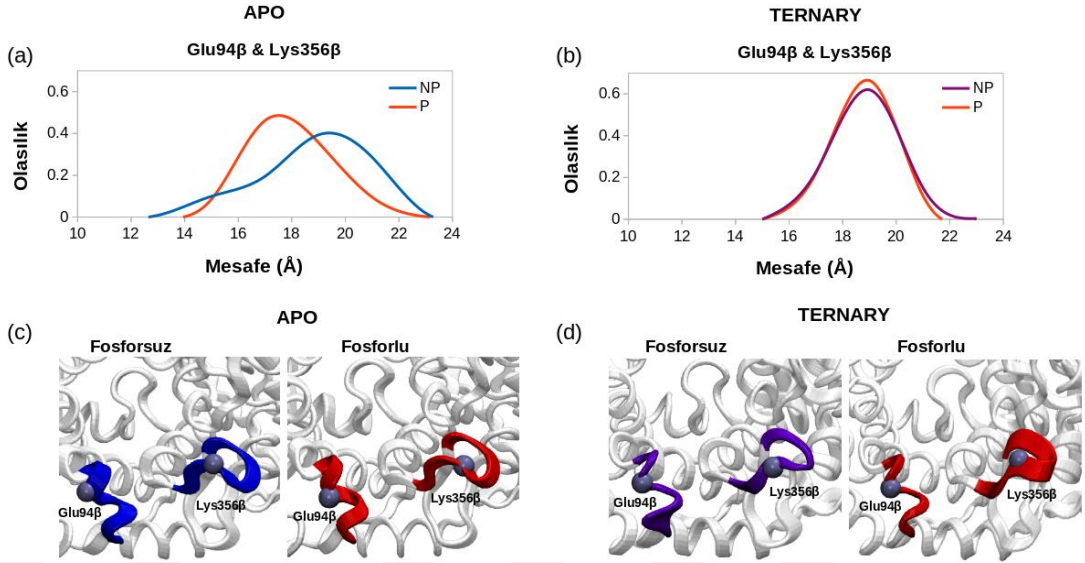


Şekil 6.3.2. Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafenin zamana göre grafiği; 3.2 Å altındaki mesafeler tuz köprüsü oluşumunu göstermektedir.

Binary sistemin aksine, fosforlu product sisteminde Glu94 β , Lys356 β 'den uzakta konumlanmaktadır (Şekil 6.3.1.b). İlginç bir şekilde, bu iki rezidünün Ca atomları arasındaki mesafenin olasılık dağılım grafikleri fosforsuz product sisteminde 2 tane maksimum değer göstermektedir ve aradaki mesafe daraldıkça birbirleriyle tuz köprüsü oluşturmaktadırlar (Şekil 6.3.2.b). Önemli olarak, ilk özvektöre göre yapılan temel bileşenler analizine göre, fosforsuz ve fosforlu FTaz'ın her ikisinde de Glu94 β ve 12 β -13 β loop'un global hareketlerindeki değişiklik, yukarıda bahsedilenler ile benzerlik göstermektedir (Şekil 6.3.1.a ve b). İlâveten, apo

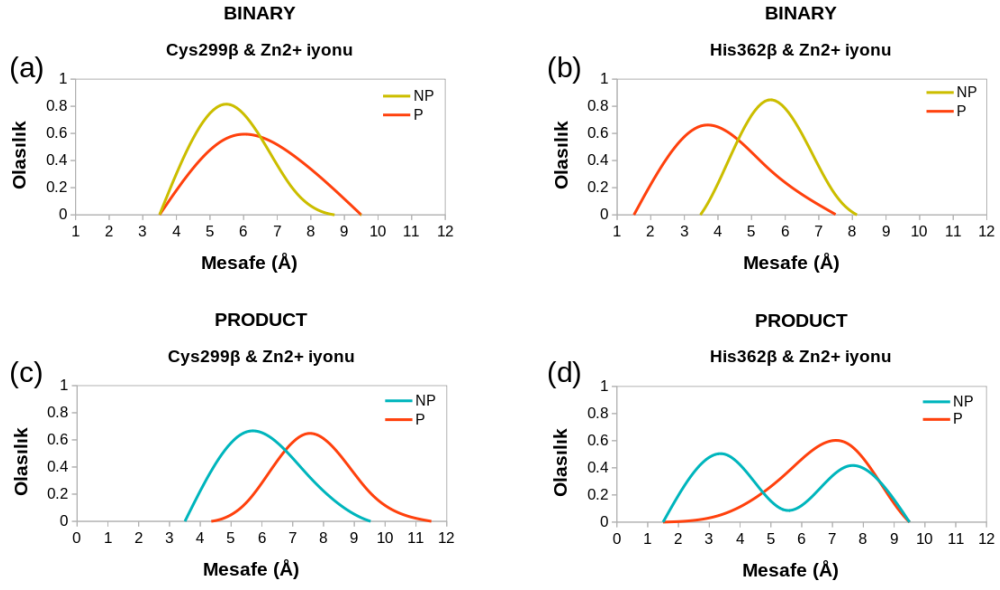
ve ternary sistemlerde Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasında ölçülen mesafede göze çarpan bir düzenleme olmamıştır (Şekil 6.3.3.a ve b).

Önemli olarak, Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafede görülen bimodal dağılımı (Şekil 6.3.1.b) açıklamak için fosforsuz product sistem için üçüncü replika simülasyon yapılmıştır. Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafenin dağılım grafiğinde sağda kalan pik 1. replika simülasyona aittir. Bununla birlikte, 2. replika simülasyonda 350 ns sonra iki rezidü arasındaki mesafe yaklaşarak simülasyon sonuna kadar bu şekilde kalmaktadır. Aynı sistemin 3. replika simülasyonunda iki rezidü arasındaki mesafe, 1. replikadaki ortalama değerden daha düşük olarak 17 Å civarındadır. Bununla birlikte fosforlu sistemde, daha düşük değerlerde bulunmamaktadır. Bundan başka, His362 β ve Zn²⁺ arasındaki mesafenin olasılık dağılım grafiğinde (Şekil 6.3.4.d), 1. replikada 130 ns sonra pik grafiğin sağına kayarak simülasyon sonuna kadar bu şekilde kalmaktadır. Oysa ki, 2. replikada dağılım simülasyon boyunca grafiğin sol tarafında bulunmaktadır. 3. replika simülasyonda ise daha küçük değerler almaktadır. Önemli olarak, fosforlu sistemde küçük mesafelerde bulunma eğiliminde değildir. 2. ve 3. replika simülasyonlarda Glu94 β /Lys356 β ve His362 β /Zn²⁺ ikililerinin daha küçük mesafelerde bulunması birbiri ile koordine olarak gerçekleşiyor olabilir.



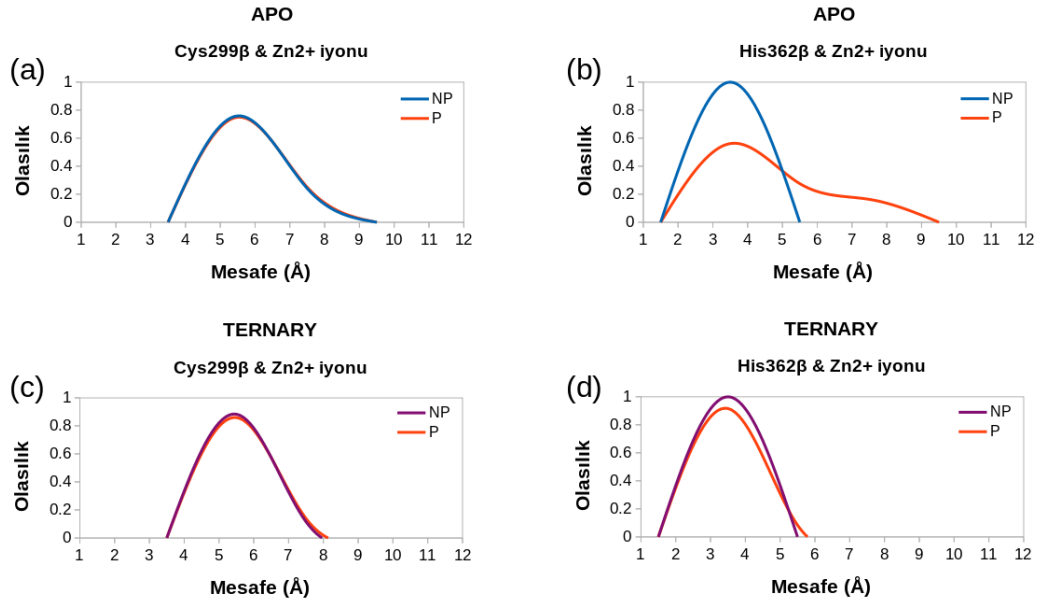
Şekil 6.3.3. FTaz Glu94β ve Lys356β rezidülerinin Cα atomları arasındaki mesafeye ait olasılık dağılım grafiklerinin fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) sistemleri arasında karşılaştırılması; (a) apo, (b) ternary. FTaz (90β-96β) ve (352β-358β) rezidülerinin oluşturduğu loop'ların global hareketinin gösterilmesi; (c) apo ve (d) ternary.

Ayrıca, fosforilasyonun katalitik Zn^{2+} iyonunu (74) koordine eden rezidülerin pozisyonunun belirlenmesinde nasıl etki ettiği araştırılmıştır. Bunun için, fosforsuz ve fosforlu sistemlerde Zn^{2+} iyonu ile Asp297β, Cys299β, and His362β rezidülerinin yan zincirleri arasındaki mesafe ölçülerek karşılaştırılmıştır. Binary ve product sistemlerde, Asp297β rezidüsünün koordinasyon paterninde değişiklik olmamıştır (data gösterilmemiştir). Diğer yandan, binary sistemde Zn^{2+} iyonunun His362β ile yaptığı koordinasyonun güçlendiği, aradaki mesafenin kısalmışından anlaşılmaktadır (Şekil 6.3.4.b). Cys299β rezidüsünün yaptığı koordinasyon ise nispeten zayıflamaktadır (Şekil 6.3.4.a). İlginç bir şekilde, fosforlu product sistemde bu iki rezidünün de koordinasyonu daha zayıf hale gelmektedir (Şekil 6.3.4.c ve d).



Şekil 6.3.4. Fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) sistemlerde Zn^{2+} iyon koordinasyonuna ait olasılık dağılım grafikleri. Cys299 β rezidüsünün SG atomu ve Zn^{2+} iyonu arasındaki mesafe (a) binary, (c) product; His362 β rezidüsünün NE2 atomu ve Zn^{2+} iyonu arasındaki mesafe (b) binary, (d) product.

Bunların yanı sıra, apo ve ternary sistemlerde His362 β rezidüsünün yaptığı koordinasyon hariç, diğerleri değişmemiştir. Fosforlu apo sistemde, His362 β yan zincir nitrojen atomu kısmen de olsa Zn^{2+} iyonundan uzaklaşmaktadır (Şekil 6.3.5.b).



Şekil 6.3.5. Fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) sistemlerde Zn^{2+} iyon koordinasyonuna ait olasılık dağılım grafikleri. Cys299 β rezidüsünün SG atomu ve Zn^{2+} iyonu arasındaki mesafe (a) apo, (c) ternary; His362 β rezidüsünün NE2 atomu ve Zn^{2+} iyonu arasındaki mesafe (b) apo, (d) ternary.

Zn^{2+} iyonunu koordine eden rezidülerin incelenmesinden başka, FPP substratın pirofosfat grubunda ait negatif yükleri stabilize eden rezidülerin H-bağı kapasiteleri araştırılmıştır (Tablo 6.3.1). Burada fosforilasyonun Lys164 α , Arg291 β ve Tyr300 β rezidülerinin hidrojen bağı kapasitesinde neden olduğu düzenlemelere değinilmiştir. Özellikle, ternary sistemde Lys164 α ve FPP substratın α -fosfat oksijenleri arasındaki H-bağı oluşumu fosforilasyon etkisiyle artmıştır. Önemli olarak, Lys164 α rezidüsünün FPP substratın α -fosfat oksijenlerini nötralize ederek katalitik reaksiyona yardımcı olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir (121,122). Dahası, ternary sistemde Tyr300 β ve FPP substratın α - ve β -fosfat oksijen atomları arasında da benzer bir modülasyon görülmüştür. Binary sistemde Tyr300 β ve FPP substratın α -fosfat oksijen atomu arasında H-bağı kapasitesinde de artış olmuştur. Önemli olarak, Tyr300 β rezidüsünün, α - ve β -fosfat oksijenleriyle yaptığı hidrojen bağı sayesinde enzimatik reaksiyon sırasında transition state'i stabilize ettiği bilinmektedir (123,124). Lys164 α ve Tyr300 β rezidülerine ilaveten, Arg291 β

rezidüsünün FPP substrata ait köprü, α - ve β -fosfat oksijen atomları arasındaki H-bağı oluşumunda da artış görülmüştür.

Tablo 6.3.1. FTaz enzimi ve FPP substrat arasındaki hidrojen bağı kapasitesi

FPP substrat köprü oksijen atomları

	Arg291β	Tyr300β	Lys164α
Binary (NP)	%6.73	---	---
Binary (P)	%20.24	---	---

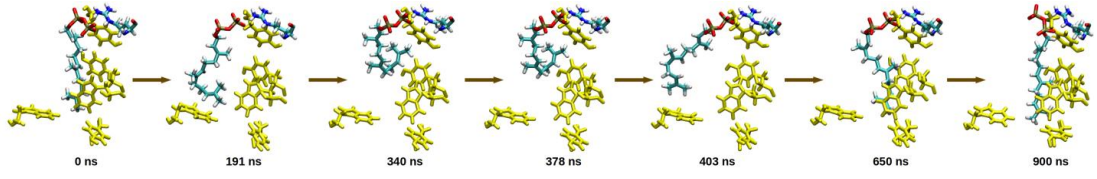
FPP substrat α -fosfat oksijen atomları

	Arg291β	Tyr300β	Lys164α
Binary (NP)	%55.70	%48.13	---
Binary (P)	%73.53	%64.06	---
Ternary (NP)	---	%44.98	%11.24
Ternary (P)	---	%49.08	%17.86

FPP substrat β -fosfat oksijen atomları

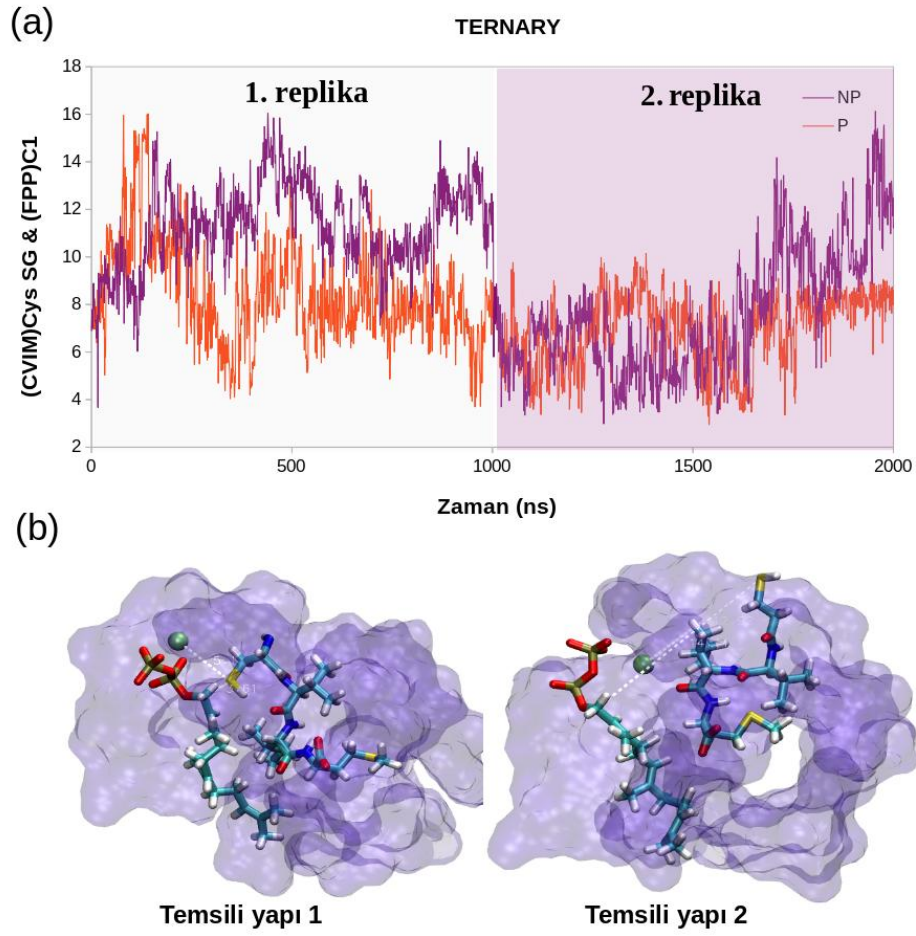
	Arg291β	Tyr300β	Lys164α
Binary (NP)	---	---	%51.51
Binary (P)	---	---	%54.74
Ternary (NP)	%20.56	%3.26	---
Ternary (P)	%64.19	%10.52	---

Sonuç olarak, Lys164 α , Arg291 β ve Tyr300 β rezidülerinin FPP substratın difosfat grubuyla yaptığı etkileşimler farnesil grubunu, FTaz enziminin korunmuş Trp303 β , Tyr251 β , Trp102 β , Tyr205 β ve Tyr200 α rezidüleri tarafından oluşturulan hidrofobik kavite içerisinde uzatılmış konformasyonda stabilize etmektedir (84). Diğer yandan, H-bağı kapasitesi daha düşük olduğunda, FPP substratın farnesil grubunun hidrofobik kavite içerisinde stabilize edilmesi güçleşmektedir. Bu durum, fosforsuz binary sistemde incelenen yörüngelerde görülmüştür (Şekil 6.3.6).



Şekil 6.3.6. Fosforsuz binary sisteme ait yörüngeden alınmış temsili FPP substrat konformasyonları. Korunmuş hidrofobik rezidüer (Trp303 β , Tyr251 β , Trp102 β , Tyr205 β ve Tyr200 α) sarı renkli licorice şeklinde gösterilmiştir.

Katalitik Zn²⁺ iyonu CaaX motifindeki sisteine ait tiyol grubunu aktive ederek FPP substratın C1 atomu üzerine nükleofilik atak gerçekleştirmesini sağlamaktadır (84). Dahası, FPP substrata ait birinci ve ikinci izopren gruplarının rotasyonu FPP'nin katalitik sistein rezidüsüne doğru yönelmesini ve bu sayede reaksiyonun devam etmesini sağlamaktadır (73). Fosforilasyonun FPP substratın enzim bağlanma kavitesinde yönelmesini etkilediği görüldükten sonra, peptit substratın FPP'ye göre oryantasyonu üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Bunun için peptit substrat sistein rezidüsünün yan zinciri ve FPP substratın C1 atomu arasındaki mesafe ölçülmüştür. Fosforilasyon bu iki atom arasındaki fiziksel etkileşimi fosforsuz ternary sisteme göre artırmıştır (Şekil 6.3.7.a). Dahası, fosforlu ternary sistemde görüldüğü üzere, CaaX peptit uzatılmış konformasyona adapte olduğunda bahsedilen atomlara arası mesafe daha kısalmaktadır (Şekil 6.3.7.b).



Şekil 6.3.7. (a) Fosforsuz (NP) ve fosforlu (P) ternary sistemlerin iki replikasında CVIM peptit substratın sistein rezidüsüne ait SG atomu ve FPP substratın C1 atomu arasındaki mesafenin zamana göre değişimi; (b) CVIM peptitin kavite içerisinde uzatılmış (Temsili yapı 1) ve katlanmış (Temsili yapı 2) formlarının gösterimi.

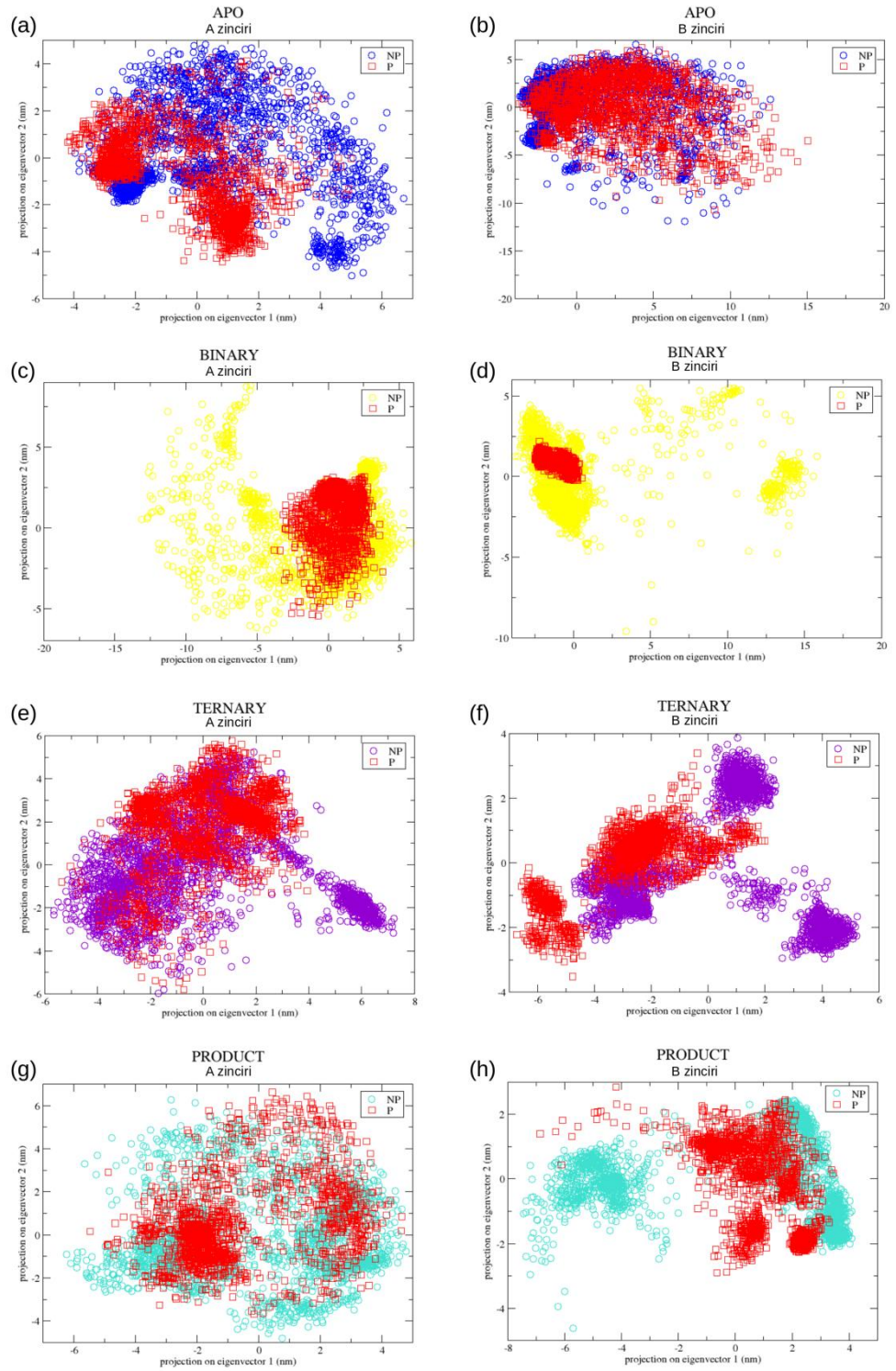
6.4. FTaz Konformasyonel Alanı Üzerine Fosforilasyonun Etkisi

Yukarda bahsedilen lokal düzenlemelerin haricinde, ayrıca fosforilasyonun dominant kolektif hareket üzerine etkisi de araştırılmıştır. Bunun için, total harekete katkısı Tablo 6.4.1’de verilen birinci ve ikinci özvektörlere göre her sistemin yörüngesini projekte eden dominant kolektif hareket incelenmiştir.

Tablo 6.4.1. Birinci ve ikinci temel bileşenlerin toplam değerleri

	α-altbirim	β-altbirim
Apo (NP)	%54.69	%58.42
Apo (P)	%63.22	%56.62
Binary (NP)	%60.97	%58
Binary (P)	%62.11	%61
Ternary (NP)	%51.91	%60.71
Ternary (P)	%52.2	%70.15
Product (NP)	%45.63	%74.55
Product (P)	%50.74	%52.68

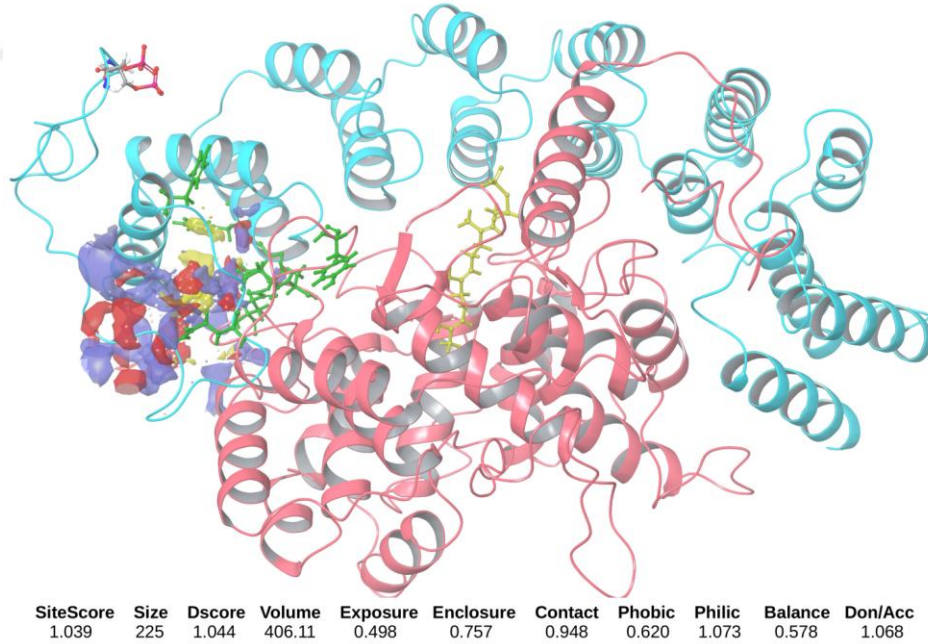
FTaz enziminin fosforilasyonu sonucu apo sistemde α -altbirim için konformasyonel alan azalırken, β -altbirim için aynı kalmaktadır (Şekil 6.4.1.a ve b). Diğer yandan, fosforilasyon etkisiyle binary sistemde FTaz α - ve β -altbirimlerinin her ikisinin de konformasyonel alan azalmıştır (Şekil 6.4.1.c ve d). Dahası, benzer modülasyon ternary ve product sistemlerinde de görülmüştür (Şekil 6.4.1.e-f & g-h).



Şekil 6.4.1. FTaz α -altbirimin 2 boyutlu projeksiyonu (a) apo, (c) binary, (e) ternary ve (g) product; FTaz β -altbirimin 2 boyutlu projeksiyonu (b) apo, (d) binary, (f) ternary ve (h) product.

6.5. FTaz Enzimi Üzerinde Olası Allosterik Bölgenin Araştırılması

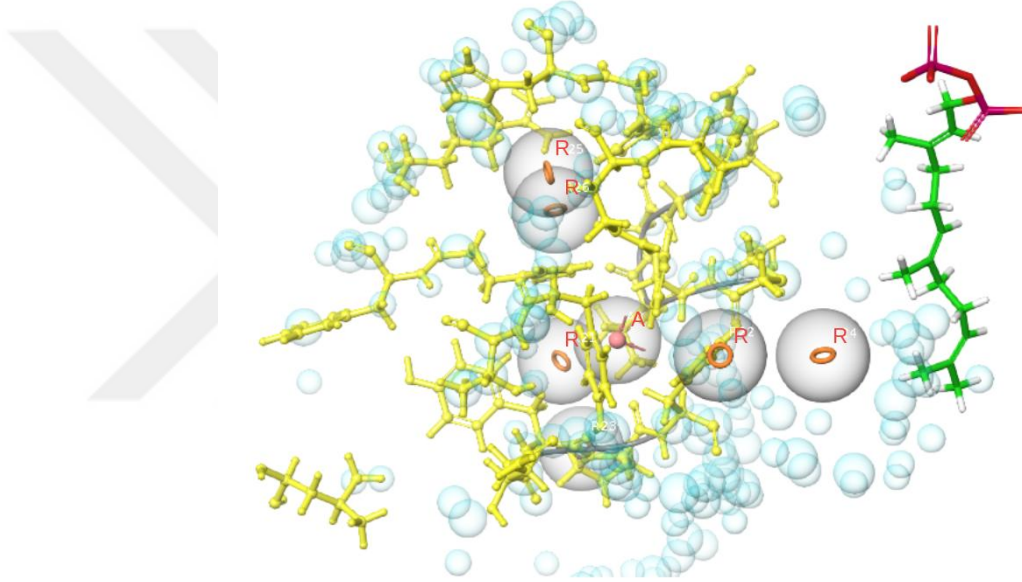
Yukarıda bahsedilen fosforilasyonun neden olduğu modülasyonlar doğrultusunda, enzimatik reaksiyon boyunca binary sistemi hedefleyerek FTaz enziminin fonksiyonunu düzenlemek etkin olabilir. Fosforlu binary sistemin küçük yapılu moleküller tarafından hedeflenebilir olup olmadığını araştırmak için, fosforsuz ve fosforlu binary sistemlere ait yörüngelerden bahsi geçen reaksiyon koordinatlarına göre (FPP konformasyonu, Zn^{2+} iyonunun His362 β rezidüsü tarafından koordinasyonu, Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafe) en olası konformasyondaki yapılar seçilerek proteinin yüzey özellikleri Schrödinger Sitemap aracı ile analiz edilmiştir. Sitemap analizine göre Dscore değeri 0.98'in ve Sitescore değeri Sitescore değeri 0.8'in üzerinde olan bölgeler ilaçlanabilir olarak değerlendirilmektedir (102,125,126). Önemli olarak, fosforlu binary sistemde yukarıda bahsi geçen hot spot rezidüleri civarında olası bir bağlanma kavitesi tespit edilmiştir (Şekil 6.5.1). Ancak fosforsuz sistemde böyle bir bağlanma kavitesi tanımlanmamıştır.



Şekil 6.5.1. Fosforlu FTaz enzimi üzerinde olası allosterik bağlanma bölgesinin gösterimi. α - ve β -altbirimler sırasıyla siyan ve pembe renkli ve new cartoon ile gösterilmiştir.

6.6. Farmakofor Dizaynı ve Sanal Tarama Çalışmaları

FTaz enziminin fosforlu binary sisteminden seçilen yapı kullanılarak yukarıda bahsedilen olası allosterik kaviteyi oluşturan rezidülerin geometrik ve kimyasal özelliklerine göre farmakofor dizaynı yapılmıştır. Bunun için, Schrödinger yazılımının ‘Develop Pharmacophore Hypothesis’ (127,128) modülü kullanılmış ve ‘receptor cavity’ modeline göre hipotez oluşturulmuştur (Şekil 6.6.1). Farmakofor hipotezinin oluşturulmasında kullanılan rezidü numaraları α -altbirim için 107,131-138, 166-178 ve β -altbirim için 135-137, 146-149, 194-196 şeklindedir.



Şekil 6.6.1. Fosforlu FTaz enzimi üzerinde olası allosterik bağlanma bölgesinin farmakofor dizaynı. R: aromatik halka, A: akseptör.

Drugbank databankasından (129–133) elde edilen FDA onaylı ilaçlar, oluşturulan farmakofor hipotezi üzerinde ‘Hypothesis Validation’ aracı (102,134,135) kullanılarak gruplandırılmıştır. Farmakofor grupları ile en az 4/7’ü eşleşen ilaç moleküllerin, Glide SP (102,136–138) doklama algoritması kullanılarak sanal tarama çalışması yapılmıştır. Ancak araştırılan kavitelere uygun ligand tespit edilememiştir. Bu nedenle, en az 3/7’ü eşleşen ilaç molekülleri ile sanal tarama çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen pozların gerek tahmini bağlanma enerjileri (gscore) gerek de geometrik ve kimyasal özellikleri değerlendirilerek en uygun pozlar seçilmiştir.

Önemli olarak, olası allosterik bağlanma bölgesinde araştırılan moleküllerin aynı zamanda, proteinin CaaX peptit bağlanma kavitesinde de sanal tarama çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak, FTaz enzimini fosforlu binary sistemde hedefleyebileceği düşünülen moleküller seçilerek tahmini bağlanma enerjileri verilmiştir (Tablo 6.6.1). Yeni araştırılan bağlanma kavitesinde yerleşen moleküllerin bağlanma yeri 'allosterik kavite', CaaX peptit bağlanma bölgesinde yerleşen moleküllerin bağlanma yeri ise 'ortosterik kavite' olarak belirtilmiştir.

Tablo 6.6.1. Sanal tarama sonuçları

	Bağlanma enerjisi (gscore)	Bağlanma yeri
Berotrastat	-7.72 kcal/mol	Allosterik kavite
Ticagrelor	-6.91 kcal/mol	Allosterik kavite
Vilazodone	-6.82 kcal/mol	Allosterik kavite
Lercanidipine	-6.5 kcal/mol	Allosterik kavite
Lomitapide	-6.1 kcal/mol	Allosterik kavite
Olaparib	-6.03 kcal/mol	Allosterik kavite
Lonafarnib	-4.74 kcal/mol	Allosterik kavite
Rosiglitazone	-6.33 kcal/mol	Ortosterik kavite
Donepezil	-6.24 kcal/mol	Ortosterik kavite
Raltitrexed	-5.68 kcal/mol	Ortosterik kavite

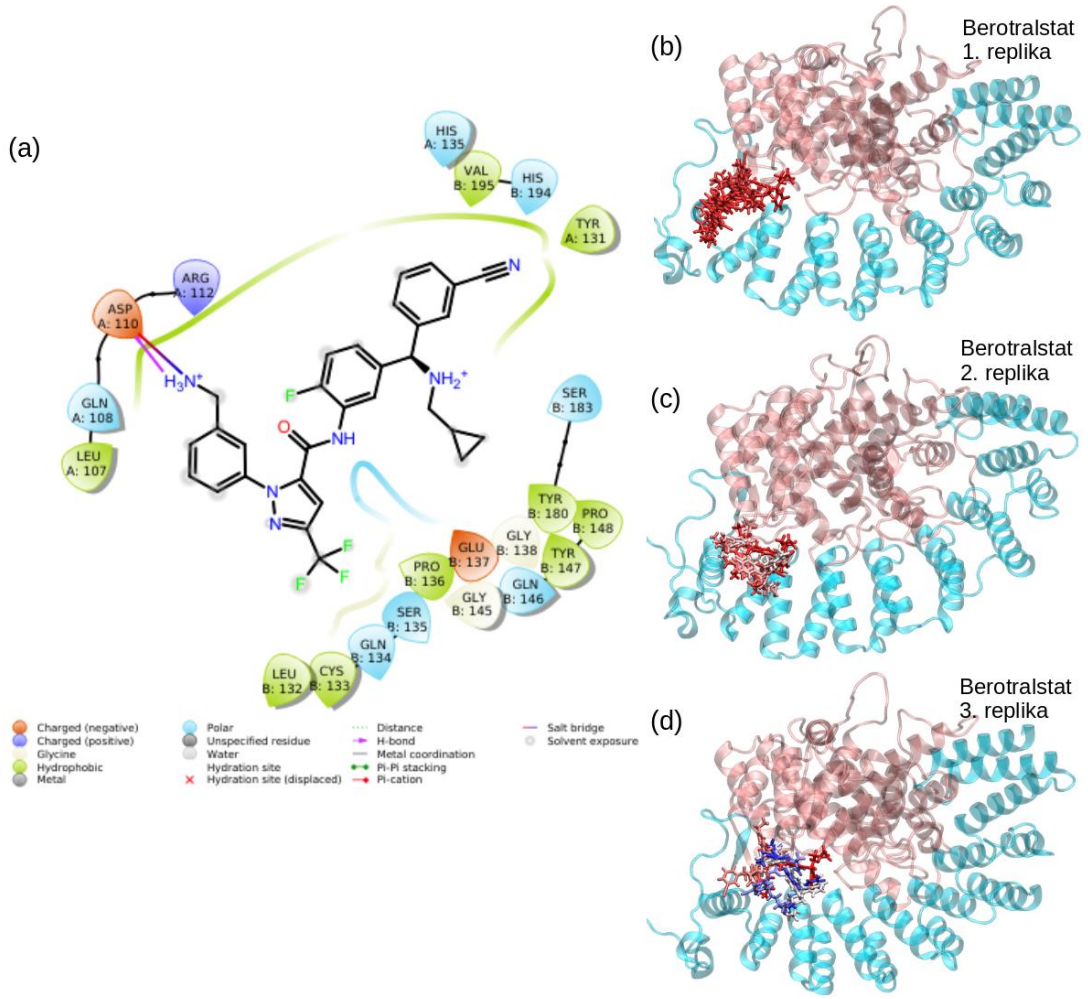
6.7. Seçilen Ligandların Değerlendirilmesi

Sanal tarama çalışması sonucunda FTaz enziminin ortosterik ya da allosterik kavitelerinde yerleşen ligandların bağlanma stabilitesini ölçmek amacıyla her bir ligand için 3 replika MD simülasyon yürütülmüştür. Her replika 1µs uzunluğunda olup, ligandların simülasyonlar boyunca proteine bağlı kalma süreleri verilmiştir (Tablo 6.7.1.).

Tablo 6.7.1. Ligandların proteine bağlı kalma süreleri

	1. replika	2. replika	3. replika
Berotrastat	65 ns	420 ns	1000 ns
Ticagrelor	1000 ns	1000 ns	1000 ns
Vilazodone	60 ns	510 ns	40 ns
Lercanidipine	50 ns	300 ns*	1000 ns*
Lomitapide	1000 ns	570 ns	350 ns
Olaparib	800 ns	---	700 ns
Lonafarnib	1000 ns	1000 ns	1000 ns
Rosiglitazone	1000 ns	1000 ns	1000 ns
Donepezil	50 ns	1000 ns	1000 ns
Raltitrexed	1000 ns	1000 ns	1000 ns

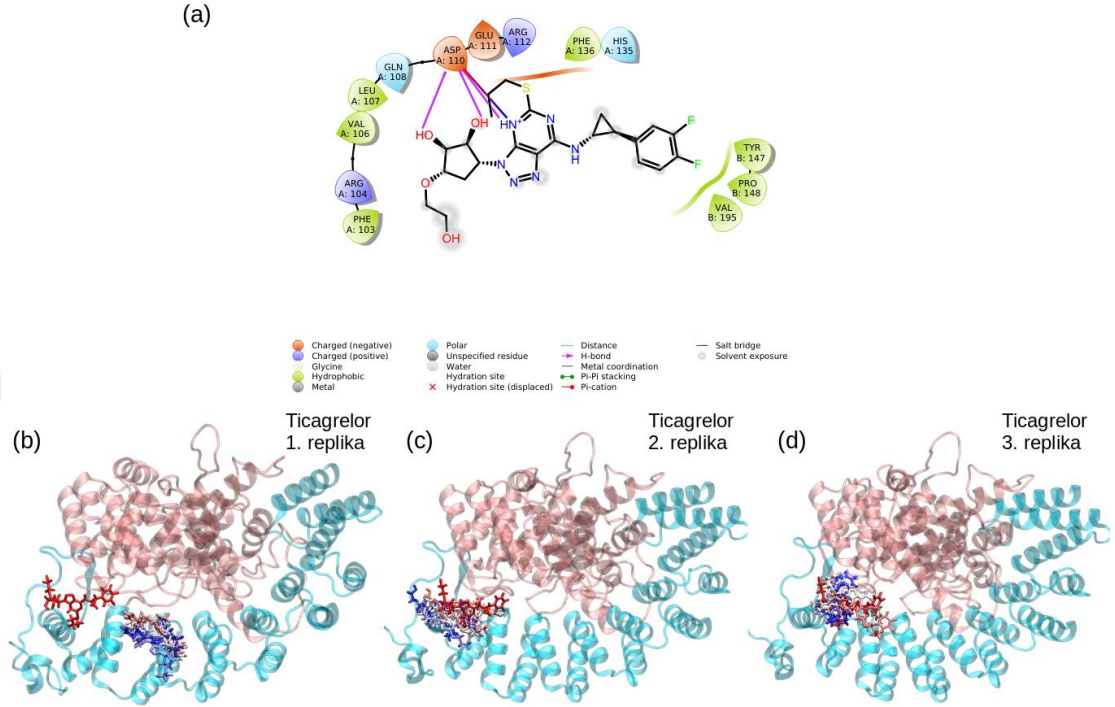
Berotrastat, nadir görülen bir hastalık olan herediter anjiyoödemde atakları önlemek için kullanılan 2020 yılında FDA'den onay almış bir selektif plazma kallikerin inhibitörüdür (139). Sanal tarama çalışmasında araştırılan allosterik kavitede, -7.72 kcal/mol değeri ile en düşük bağlanma enerjili pozisyon bu ligand sağlamıştır. Berotrastat'ın bağlanma kavitesinde protein rezidüleri ile yaptığı etkileşimler gösterilmiştir (Şekil 6.7.1.a). Bunun yanısıra, MD simülasyonlar boyunca proteine bağlı kaldığı süre içerisinde araştırılan allosterik kavite civarında bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 6.7.1.b,c,d).



Şekil 6.7.1. Berotralstat ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

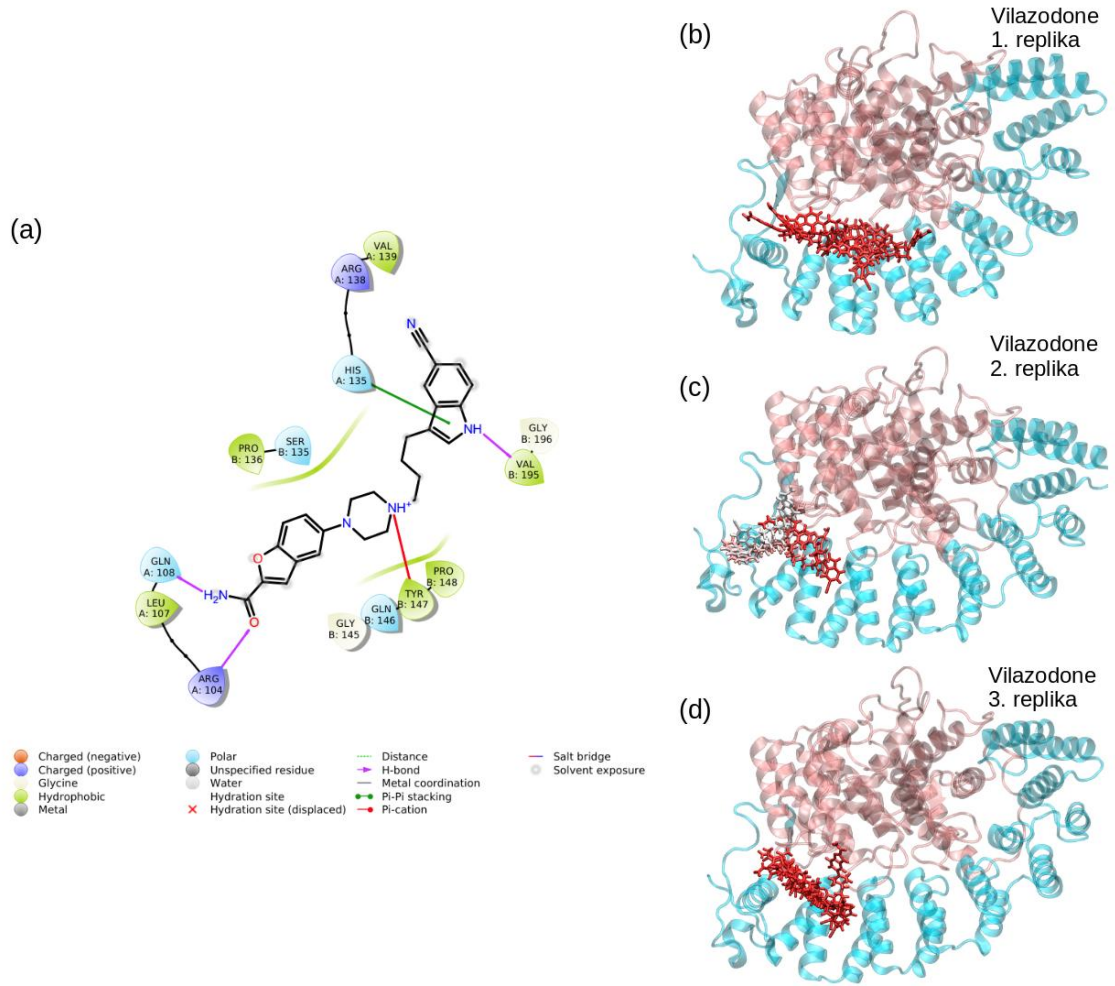
Ticagrelor miyokar infarktüsü (MI) geçiren veya akut koroner sendromu olan hastalarda MI, inme ve kardiyosküler ölümü engellemek amacıyla kullanılan P2Y12 platelet inhibitörüdür (140). Bu ligand, proteinin araştırılan allosterik kavitesindeki rezidüler ile yaptığı etkileşimler (Şekil 6.7.2.a) sayesinde, -6.91 kcal/mol bağlanma enerjili bir poz vermiştir. Önemli olarak, üç replika MD simülasyonun her birinde toplam 1 μ s boyunca proteine bağlı kalabilmiştir. Bunlardan 2. ve 3. replikalarda yörüngeler boyunca ilk bağlandığı yer civarında benzer konformasyonlarda bulunmuştur (Şekil 6.7.2.c ve d). İlginç bir şekilde, 1. replika simülasyonun başlangıcında bulunduğu yerden ayrılarak, yine ilk bağlandığı yerin yakınında

bulunan FTaz α -altbirim üzerindeki başka bir bölgeye yönlendirilmiş ve 1 μ s boyunca bu bölgede bağlı kalmıştır (Şekil 6.7.2.b).



Şekil 6.7.2. Ticagrelor ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

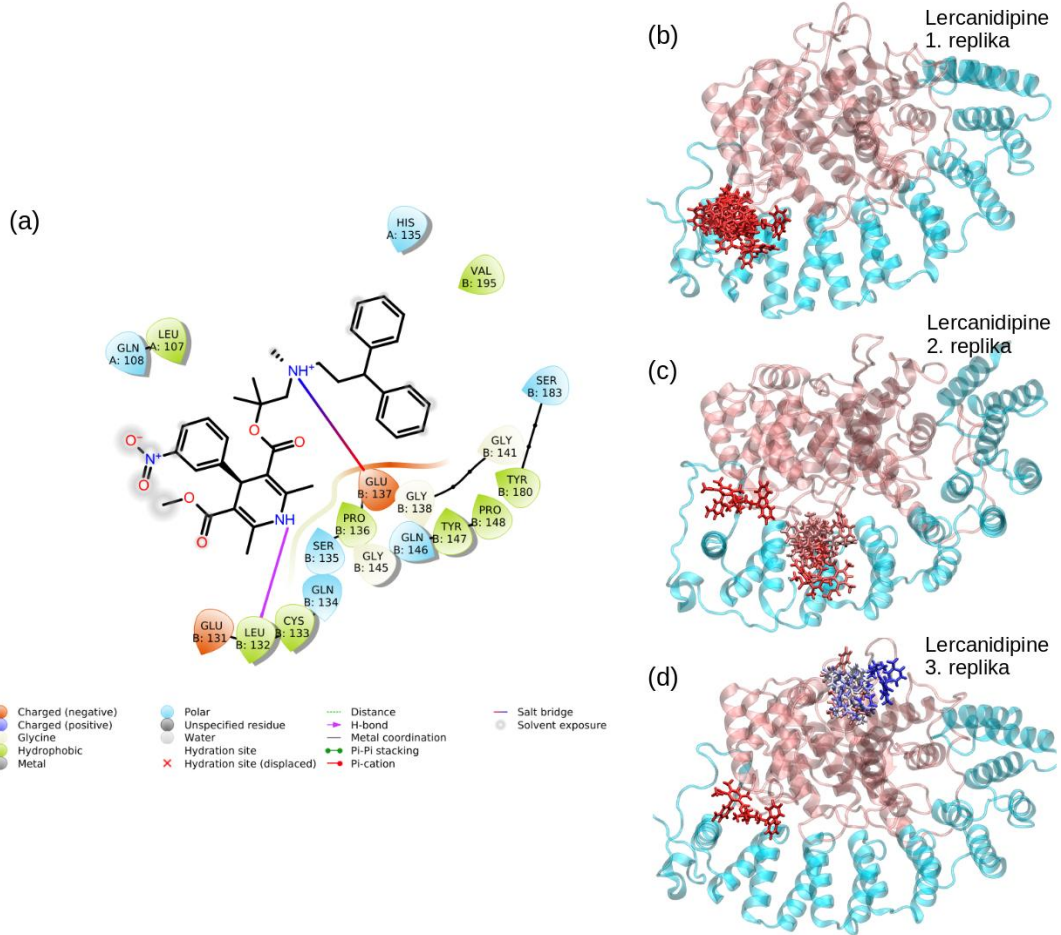
Vilazodone 5-HT_{1A} receptörünün parsiyel agonisti olarak çalışan, major depresyon tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (141). Bu ligand, 1. ve 3. replika simülasyonlarda, sırasıyla 60 ns ve 40 ns, proteine nispeten daha kısa süre bağlı kalmasına rağmen, her üç replikada da bağlı kaldığı süre boyunca araştırılan allosterik kavite civarında pozlanmıştır (Şekil 6.7.3.b, c ve d). Sanal taramadan elde edilen -6.82 kcal/mol enerjili poza ait protein etkileşimleri gösterilmiştir (Şekil 6.7.3.a).



Şekil 6.7.3. Vilazodone ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

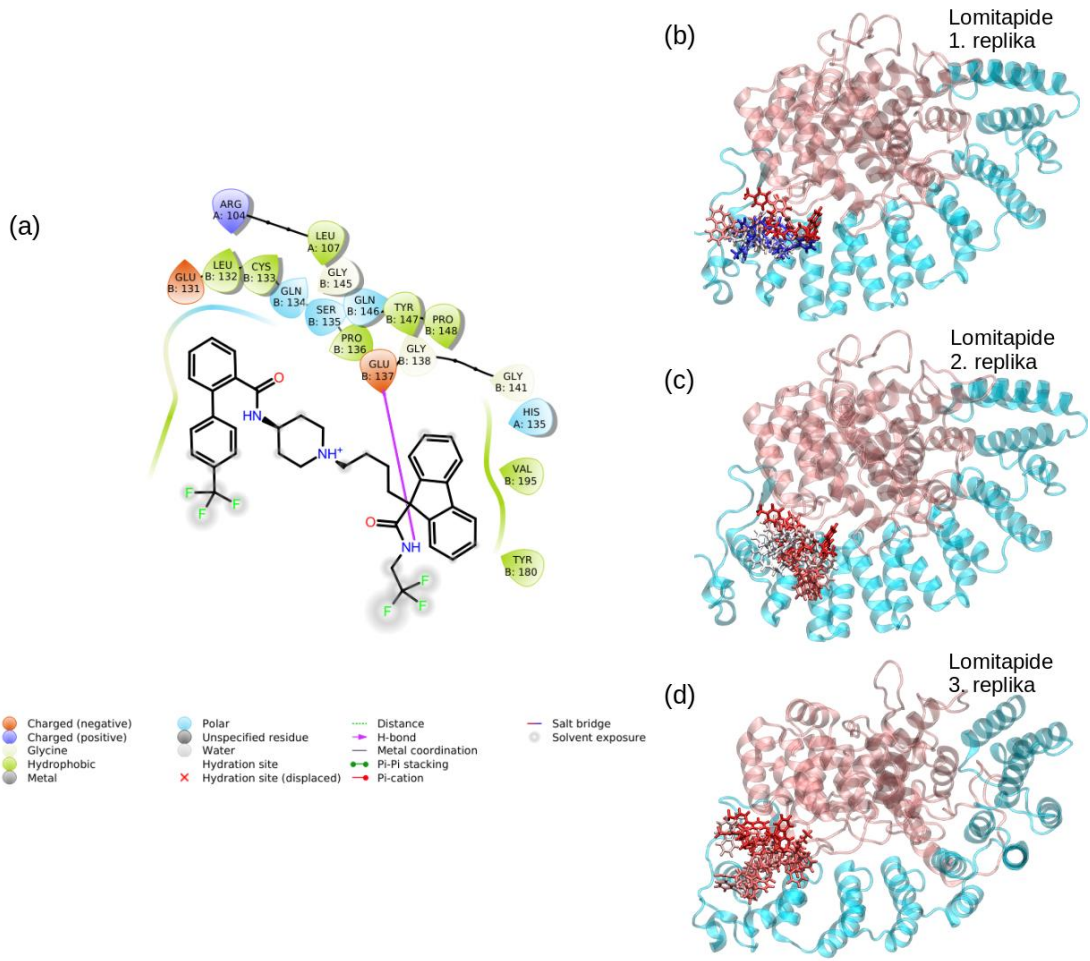
Lercanidipine, hipertansiyon tedavisinde kullanılan kalsiyum kanal blokörü bir ilaçtır (142). Sanal taramadan elde edilen -6.5 kcal/mol bağlanma enerjili pozun protein ile yaptığı etkileşimler gösterilmiştir (Şekil 6.7.4.a). Bu ligand, 1. replika simülasyonda sadece 50 ns kadar bağlı kaldıktan sonra proteinden kopmuştur (Şekil 6.7.4.b). 2. replika simülasyonda ise 20 ns sonra ilk bağlandığı yerden ayrılarak yine FTaz heterodimer arayüzeyinde başka bir bölgede tutunmuş ve toplamda 300 ns boyunca protein ile etkileşimini sürdürmüştür (Şekil 6.7.4.c). İlginç bir şekilde, 3. replika simülasyonda 75 ns kadar ilk bağlandığı bölge civarında bulunurken, daha sonra buradan ayrılmış ve FTaz β -altbirim üzerindeki belirli bir bölgede

konumlanarak toplamda 1 μ s boyunca protein ile etkileşime devam etmiştir (Şekil 6.7.4.d).



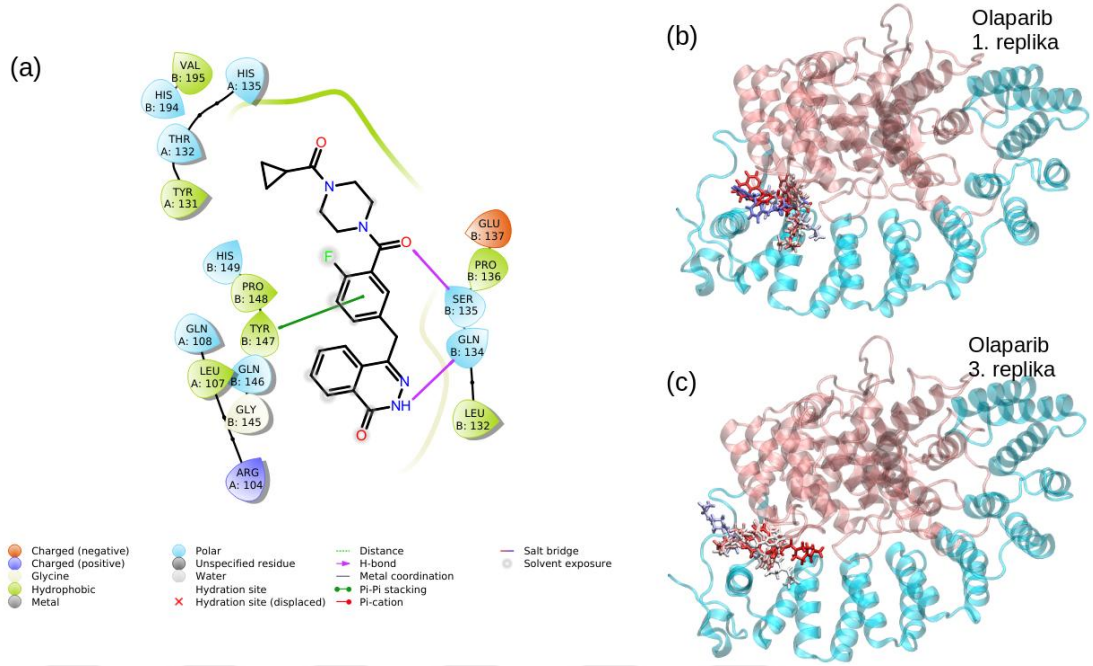
Şekil 6.7.4. Lercanidipine ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

Lomitapide, mikrozomal trigliserit transfer proteini inhibe ederek etki gösteren bir kolesterol düşürücü ajandır (143). Sanal taramadan elde edilen -6.1 kcal/mol bağlanma enerjili pozun protein ile yaptığı etkileşimler gösterilmiştir (Şekil 6.7.5.a). Bu ligand, 1. replika simülasyon boyunca kopmadan ilk bağlandığı bölge civarında bulunmaktadır (Şekil 6.7.5.b). 2. ve 3. replikada ise ilk bağlandığı bölge civarında sırasıyla 570 ns ve 350 ns süresince tutunduktan sonra proteinden ayrılmıştır (Şekil 6.7.5.c ve d).



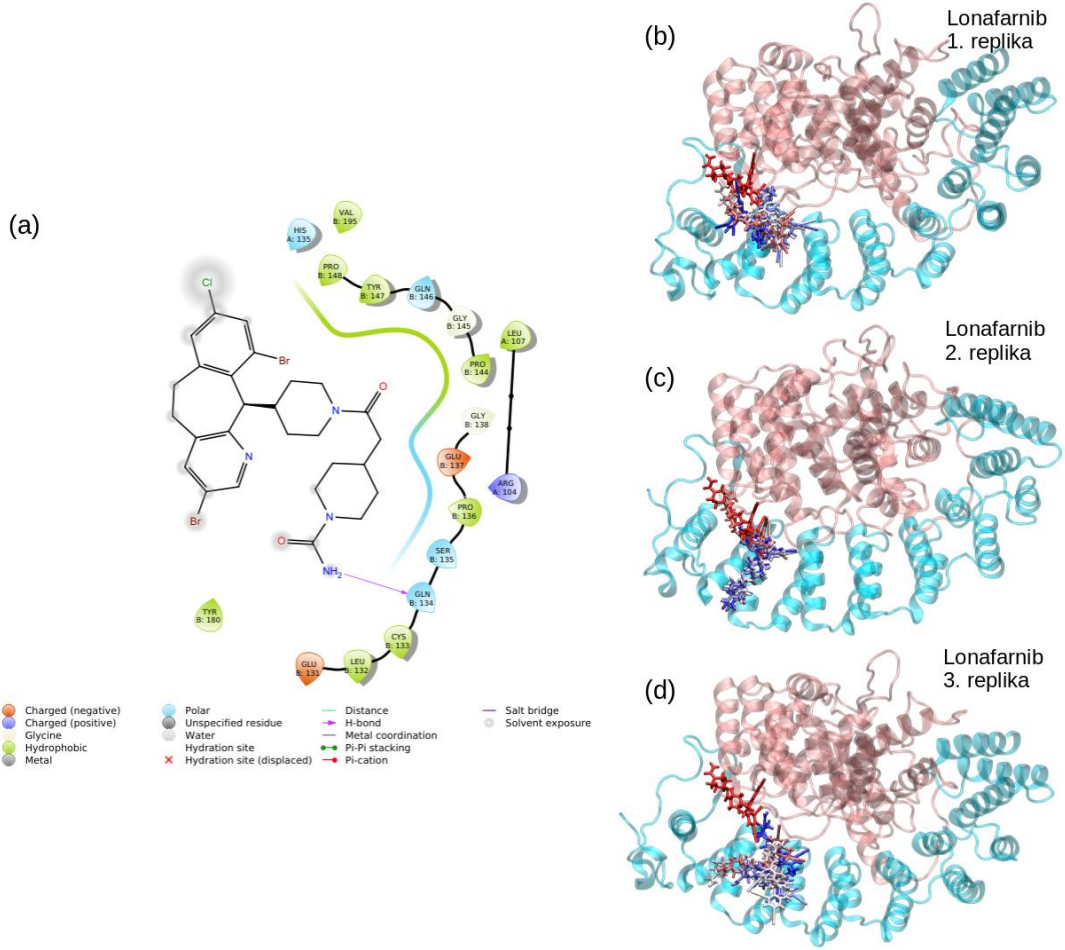
Şekil 6.7.5. Lomitapide ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

Olaparib, antikanser terapinin yeni bir sınıfı olan PARP enzim inhibitörlerinden birisidir (144). Bu molekülün, -6.03 kcal/mol bağlanma enerjili pozunun protein ile yapmış olduğu etkileşimler gösterilmiştir (Şekil 6.7.6.a). Bu ligand, 1. ve 3. replika simülasyonlarda, sırasıyla 800 ns ve 700 ns boyunca araştırılan allosterik kavite civarındaki rezdiüler ile etkileşimini sürdürdükten sonra proteinden ayrılmıştır. Diğer yandan, 2. replika simülasyonun başlangıç anında proteinden kopmuştur (Şekil 6.7.6.b ve c).



Şekil 6.7.6. Olaparib ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 3. replika.

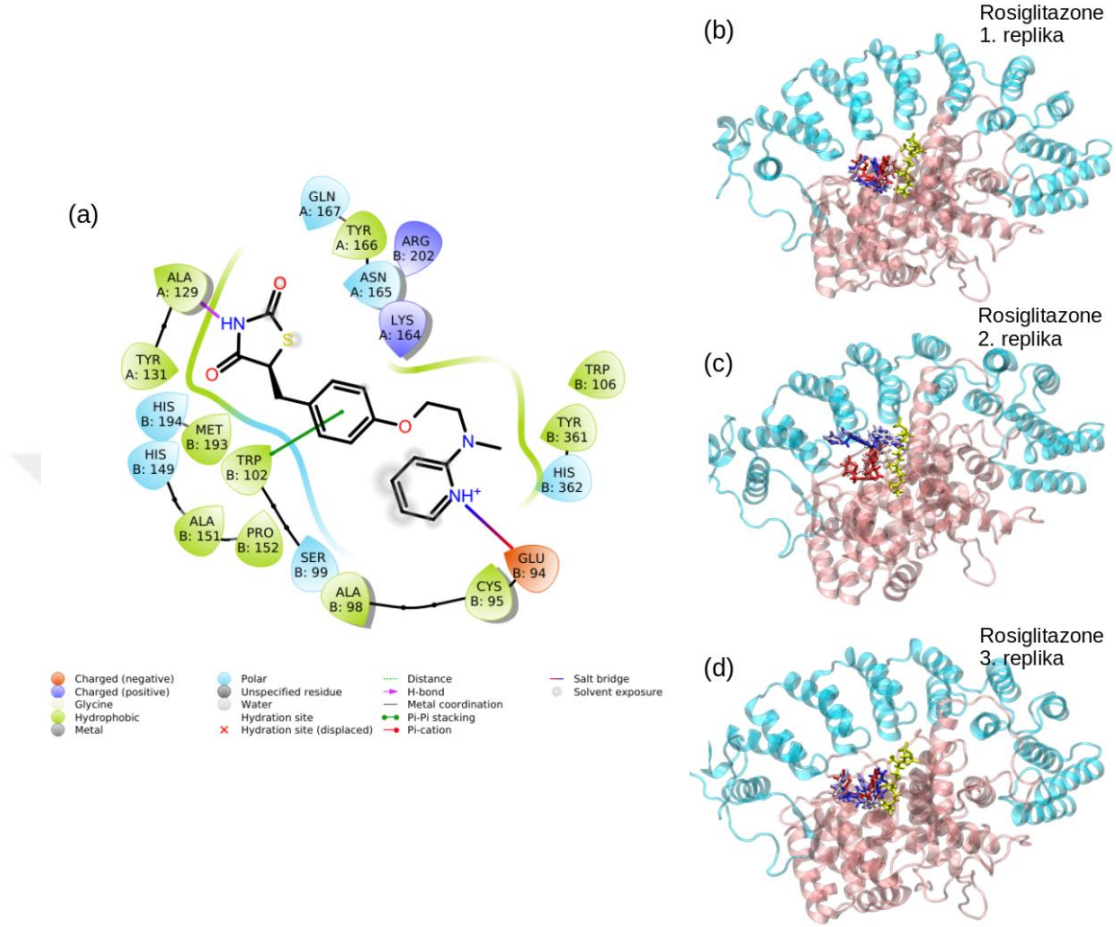
Lonafarnib, yakın zamanda progeria hastalığının tedavisi için FDA'den onay almış bir FTaz enzim inhibitörüdür (145). Bu molekülün, IC₅₀ değeri 1.9 nM olarak belirlenmiş ve ortosterik kavitede bağlandığı X-Ray kristalografisi ile gösterilmiştir (146). İlginç bir şekilde, sanal tarama çalışmalarında bu ligandın araştırılan allosterik bölgede konumlanabildiği gözlemlenmiştir ve protein ile olan etkileşimleri gösterilmiştir (Şekil 6.7.7.a). Her ne kadar proteine bağlanma enerjisi şimdiye kadar bahsedilen ligandlara nispetle daha yüksek olsa da, her bir replikada simülasyon boyunca kopmadan araştırılan allosterik bölge civarında konumlanması dikkat çekmektedir (Şekil 6.7.7.b, c ve d).



Şekil 6.7.7. Lonafarnib ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

Şimdiye dek, olası allosterik kaviteyi hedefleyen ligandlar incelenmesine rağmen, aynı zamanda FTaz enziminin fosforlu binary sisteminde CaaX peptit bağlanma kavitesini hedefleyebilecek birkaç ligand da araştırılmıştır. Bunlardan birisi olan rosiglitazone, S-izomeri antidiyabetik etkili olan tiyazolidindion sınıfına ait bir ilaçtır (147). İlginç bir şekilde, son zamanlarda bu ilacın ApoE4 alelini eksprese etmeyen Alzheimer hastalarında faydalı olabileceğine dair klinik araştırmalar güncel olarak devam etmektedir (148). CaaX peptit kavitesine -6.33 kcal/mol bağlanma enerjisi ile bağlanan bu ligandın, protein ile yaptığı etkileşimler gösterilmiştir (Şekil 6.7.8.a). Ayrıca, bu ligand her bir replika simülasyon boyunca kavitede kopmadan kalabilmiştir. İlginç bir şekilde, 1. ve 3. replikalarda başlangıç pozundan çok fazla uzaklaşmadan kaviteyi meşgul ederken (Şekil 6.7.8.b ve d), 2.

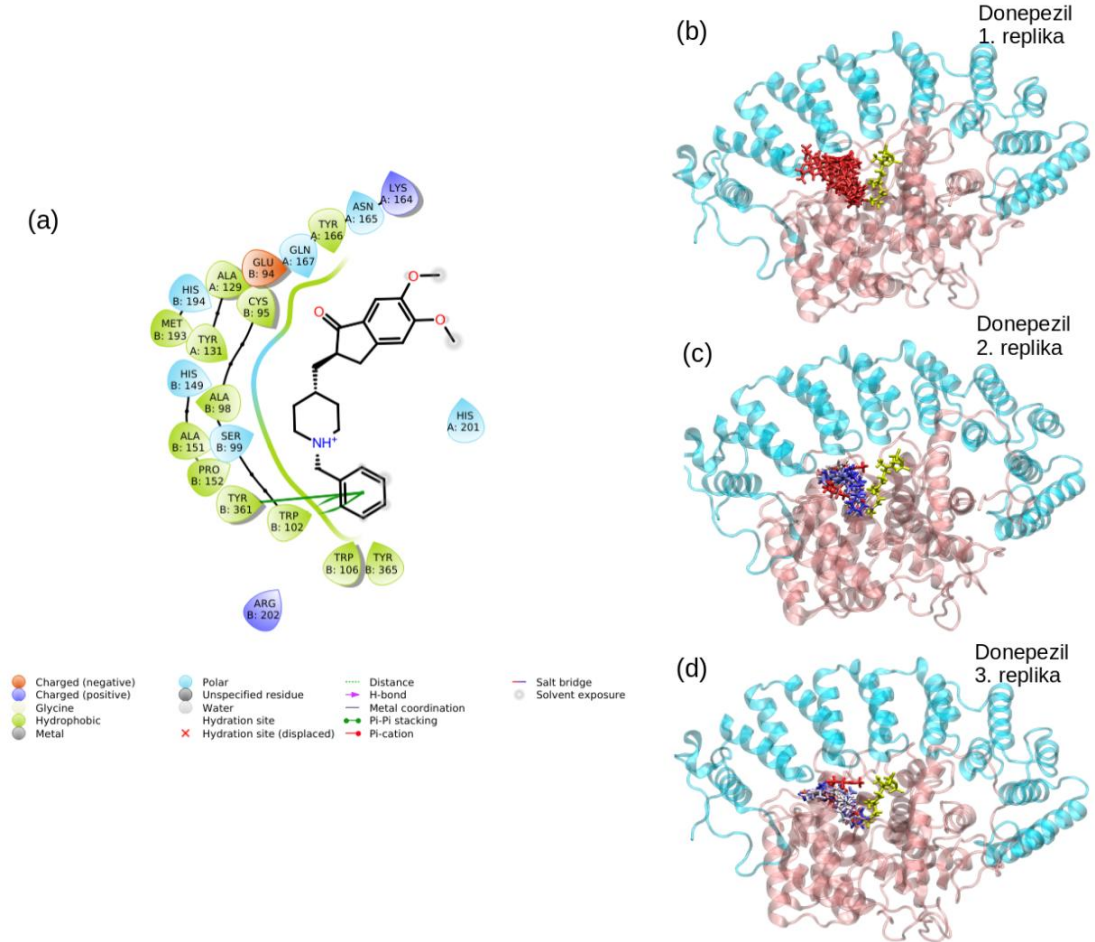
replikada CaaX peptit bağlanma kavitesinin üstünü örtecek bir şekilde yatay olarak konumlanmıştır (Şekil 6.7.8.c).



Şekil 6.7.8. Rosiglitazone ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

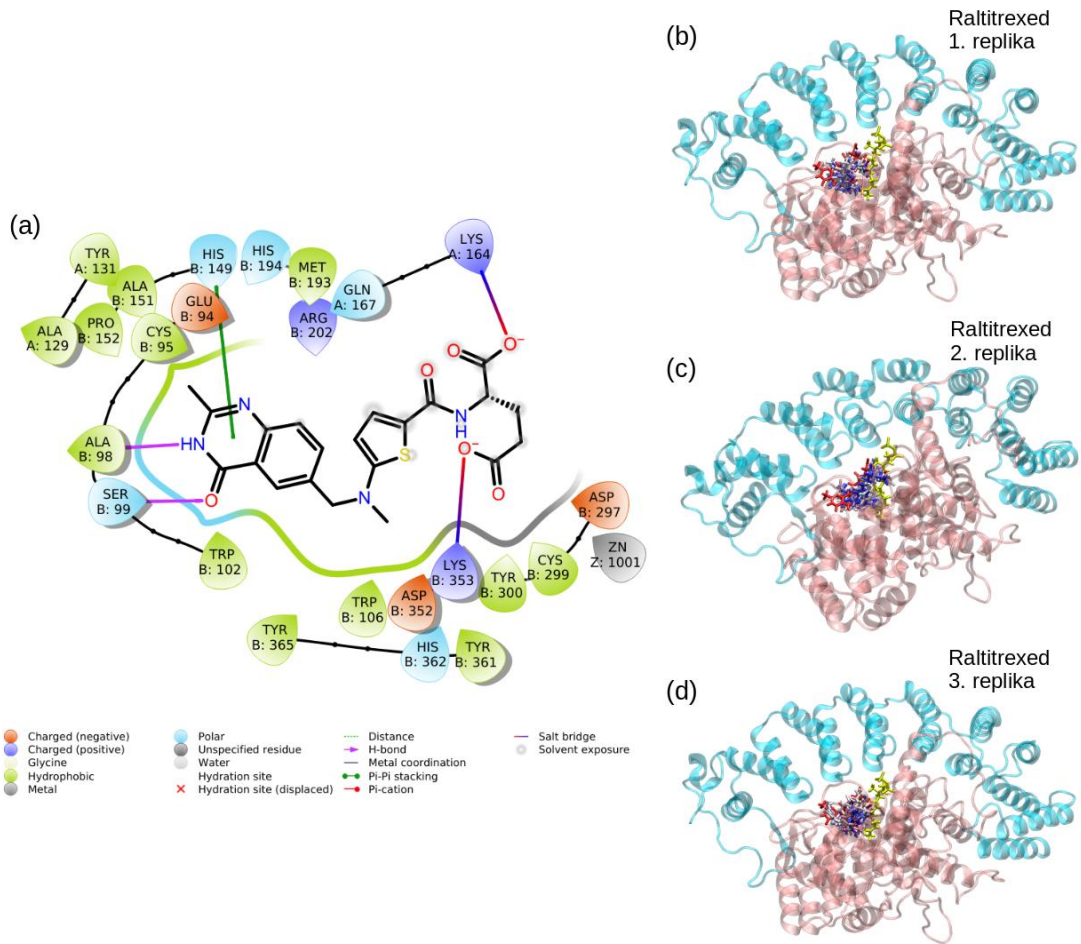
CaaX peptit bağlanma kavitesinde araştırılan bir diğer molekül donepezil, AH tedavisinde kullanılan asetilkolin esterase enzim inhibitörü bir ilaçtır (149). Bununla birlikte, son yıllarda donepezilin AH'da terapötik etkinlik sağlamanın ardında farklı moleküler mekanizmaların da çalışıyor olabileceği düşünülmektedir. Bu mekanizmalar NMDA reseptör downregülasyonu yoluyla glutamat indüklü eksitasyon aşırımı zayıflatması, AH biyomarkerlarından birisi olan amiloid proteinlerini regüle etmesi ve çeşitli inflamatuvar sinyal yollarını inhibe ederek nöroprotektif etki göstermesi şeklindedir (150–154). Bu ligandın -6.24 kcal/mol bağlanma enerjili pozunun CaaX peptit bağlanma kavitesindeki rezidülerle yaptığı etkileşimler

gösterilmiştir (Şekil 6.7.9.a). Donepezil, 2. ve 3. replika simülasyonlar boyunca etkileştiği kavitede stabil bir şekilde bağlı kalırken (Şekil 6.7.9.c ve d), 1. replikada 50 ns sonra kopmuştur (Şekil 6.7.9.b).



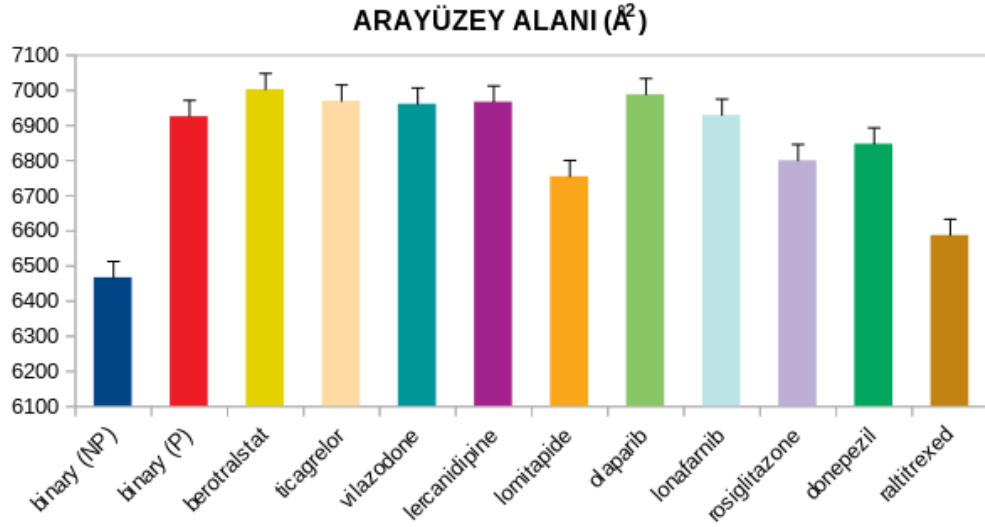
Şekil 6.7.9. Donepezil ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

Raltitrexed, timidilat sentaz inhibitörü olan antikanser etkili bir ilaç molekülüdür (155). Bu ligandın sanal tarama çalışmasından elde edilen pozu diğer ligandlara nispetle daha yüksek bağlanma enerjisine sahip olmasına rağmen, protein ile yaptığı kuvvetli etkileşimler sayesinde CaaX peptid bağlanma kavitesini üç replika simülasyon boyunca meşgul ettiği görülmüştür (Şekil 6.7.10). Son olarak, ortosterik kavitede bağlanan, rosiglitazone, donepezil ve raltitrexed ligandlarının FPP substratın farnesil grubu ile yaptığı hidrofobik ve difosfat grubu ile yaptığı elektrostatik etkileşimlerin bu ligandların kavitede bağlı kalmasında önemli bir katkısı olmuştur.



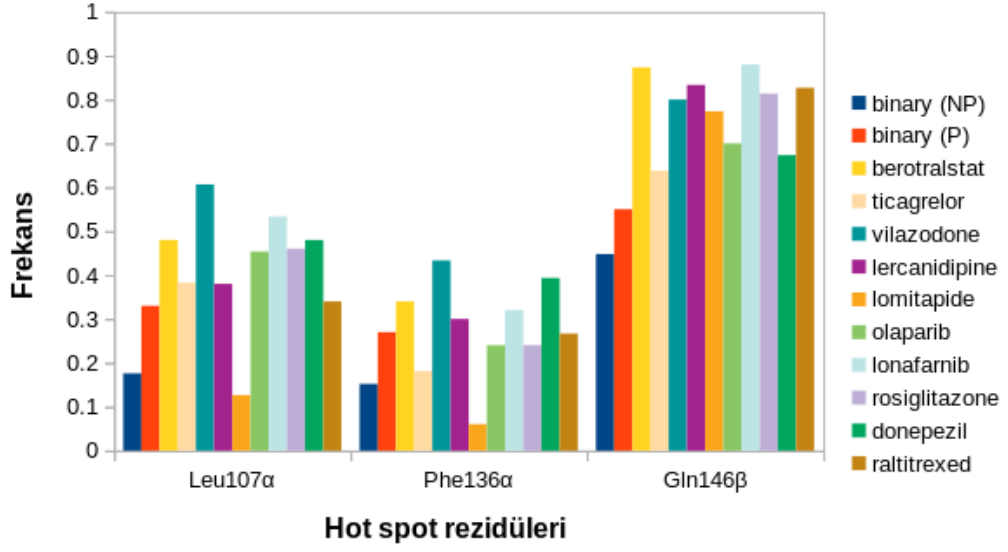
Şekil 6.7.10. Raltitrexed ligandının bağlanma kavitesinde incelenmesi. (a) Başlangıç pozunun ligand-protein etkileşimleri. Bağlı olduğu süre boyunca protein üzerinde konumlanması; (b) 1. replika, (c) 2. replika, (d) 3. replika.

Ligandların protein ile yaptığı etkileşimlerden başka, FTaz enziminin α - ve β -altbirimlerinin oluşturduğu arayüzey alanına etkileri de incelenmiştir (Şekil 6.7.11). Daha önce de belirtildiği gibi fosforilasyon sonucu, binary sistemde heterodimerik arayüzey alanı artmaktadır. Ligandlar tarafından hedeflenen protein yapısının fosforlu binary sisteme ait olduğu göz önüne alınırsa, olası allosterik kavitede araştırılan moleküllerden lomitapide, artmış olan arayüzey alanını belirgin düzeyde azaltmıştır. Diğer yandan, CaaX peptid bağlanma kavitesinde araştırılan ligandlardan raltitrexed, FTaz enziminin altbirimleri arasındaki arayüzeyi azaltmakta en başarılı olan moleküldür. Donepezil ve rosiglitazone ligandları da raltitrexed kadar olmasa da bu konuda başarılı olmuştur.



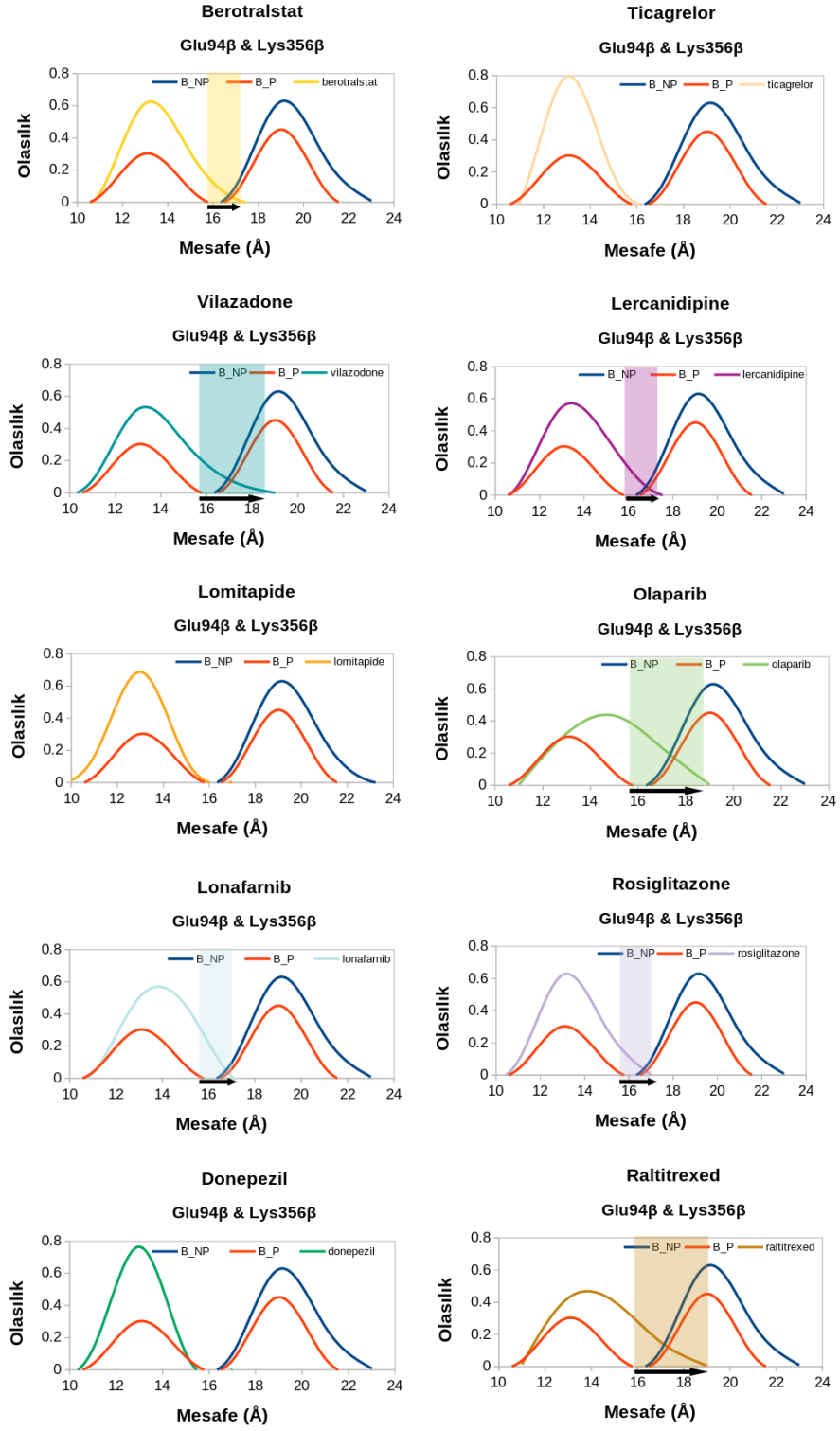
Şekil 6.7.11. Ligandların FTaz heterodimerik arayüzey alanına etkisi

Ligandların FTaz heterodimerik arayüzey alanındaki etkilerini incelerken ele alınan diğer bir özellik de hot spot rezidü frekansındaki değişimlerdir (Şekil 6.7.12). Belirtildiği gibi fosforilasyon ile binary sistemde, Leu107 α , Phe136 α ve Gln146 β hot spot rezidülerinin frekansında artış tespit edilmiştir. Berotralstat, vilazodone, lercanidipine, lonafarnib ve donepezil ligandları, bu hot spot rezidülerinin frekansındaki artışa engel olamamıştır. Ticagrelor, olaparib ve rosiglitazone ligandları Phe136 α hot spot rezidüsünün frekansını azaltırken, Leu107 α ve Gln146 β için bunu sağlayamamıştır. Diğer yandan, lomitapide Leu107 α ve Phe136 α hot spot rezidülerinin frekansında gözle görülür bir azalışa neden olmuştur, ancak Gln146 β hot spot rezidü frekansı artmıştır. Son olarak, raltitrexed ligandının, Leu107 α ve Phe136 α hot spot rezidülerinin frekansında belirgin bir etkisi olmazken, Gln146 β frekansını artırmıştır.



Şekil 6.7.12. Ligandların hot spot rezidü frekansına etkisi

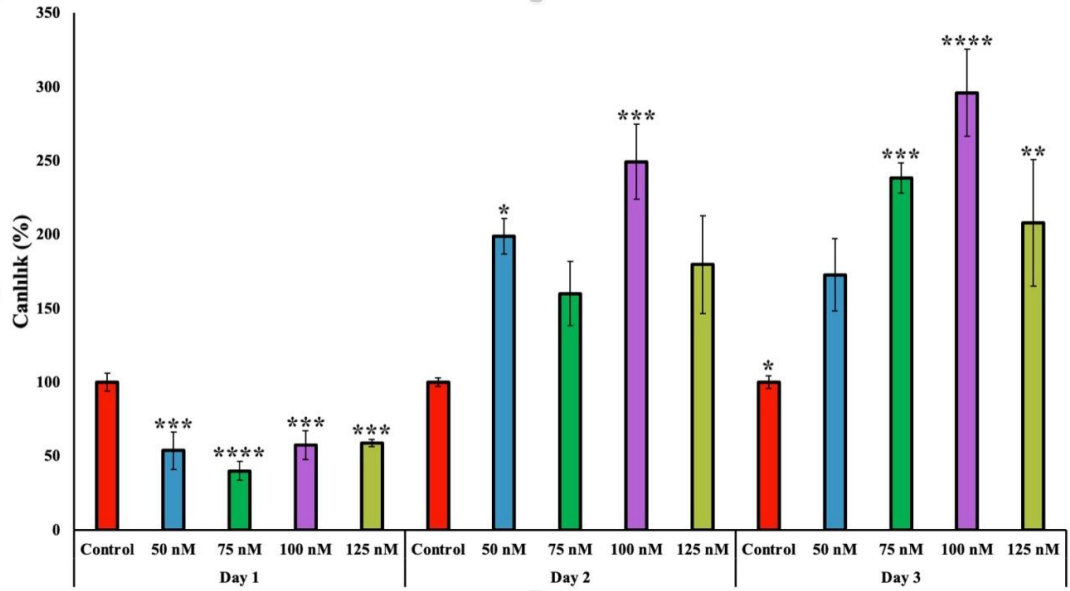
Fosforilasyonun Glu94β ve Lys356β rezidüleri arasındaki mesafeye olan etkilerine daha önceki bölümlerde değinilmiştir. Binary sistemde fosforilasyon etkisiyle bu rezidülerin birbirine yaklaşarak katalitik reaksiyonu hızlandırıcı etkisi olabileceği düşünülmüştür. Sanal tarama çalışmasında kullanılan protein yapısı, bu iki rezidü arasındaki mesafenin en yakın olduğu anı göstermektedir (grafiklerde kırmızı çizgi ile gösterilen piklerden ilki). Dolayısıyla, fosforlu binary sistemi hedefleyen ligandların bu iki rezidüyü birbirinden uzaklaştırabilme potansiyelini anlamak için olasılık dağılım grafikleri çizilmiştir (Şekil 6.7.13). Sonuç olarak, vilazodone, olaparib ve raltitrexed ligandları fosforlu sistemde yaklaşmış olan Glu94β ve Lys356β rezidülerini birbirinden belirgin düzeyde uzaklaştırmıştır. Ayrıca, bu ligandlar kadar belirgin olmasa da berotralstat, lercanidipine, lonafarnib ve rosiglitazone ligandlarının etkisiyle de bu mesafe nispeten daha yüksek değerleri göstermiştir.



Şekil 6.7.13. Ligandların Glu94 β ve Lys356 β rezidülerinin Ca atomları arasındaki mesafeye etkisi

6.8. İnsülin ve Lonafarnib Molekülleri İçin Uygun Konsantrasyonların Belirlenmesi

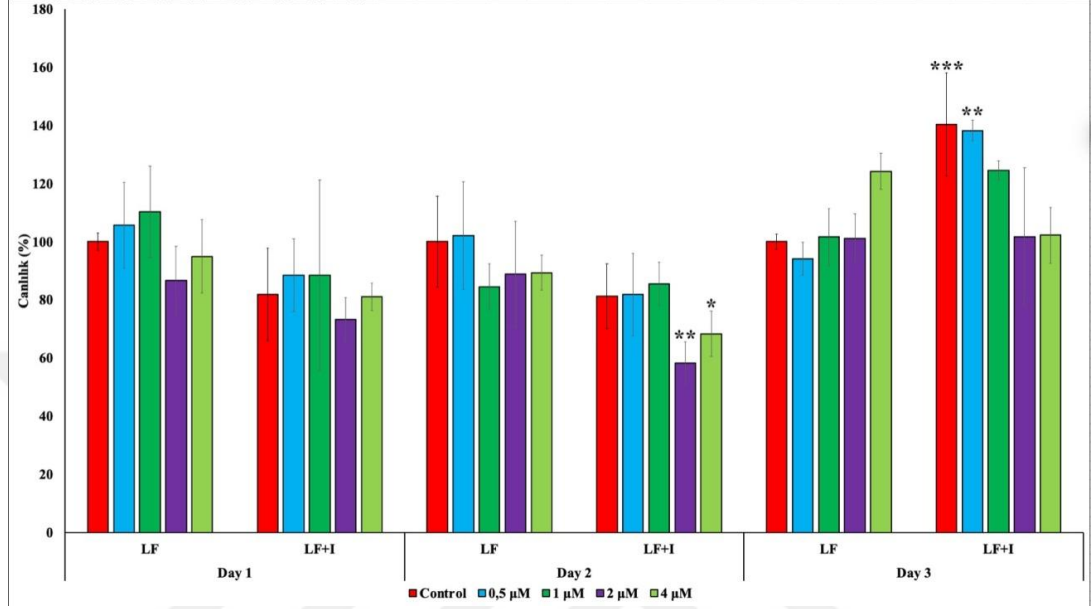
İlk olarak, SH-SY5Y hücrelerinde hiperinsülinemi modeli oluşturmak için uygun insülin konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 4 farklı konsantrasyonda insülin (50 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM) uygulanarak 1., 2. ve 3. günlerde hücre canlılık oranları MTT testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerlerine oranı (%) hücre canlılığı olarak ifade edilmiş ve kontrol grubunun hücre canlılık oranları %100 olduğu kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır. Farklı insülin konsantrasyonlarındaki deney gruplarının günlere göre hücre canlılık oranlarının ortalama değerleri gösterilmiştir (Şekil 6.8.1).



Şekil.6.8.1. İnsülin molekülünün hücre canlılığı üzerine etkisi (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ ve **** $p \leq 0.0001$).

Yapılan analiz sonucunda 100 nM'dan 125 nM'a geçerken canlılık seviyesinde düşüş görülmüş, bu sebeple uygun insülin konsantrasyonu 100 nM olarak belirlenmiştir. Ardından FTaz enzim inhibitörü olan lonafarnib molekülünün sitotoksik olmayan dozunu belirlemek için MTT analizi yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinin lonafarnib veya insülin eklenmemiş besi yerinde çoğaltılmış kontrol grubunun absorbans değerlerine oranı (%) hücre canlılığı olarak ifade edilmiş ve kontrol grubunun hücre canlılık oranlarının %100 olduğu kabul edilerek

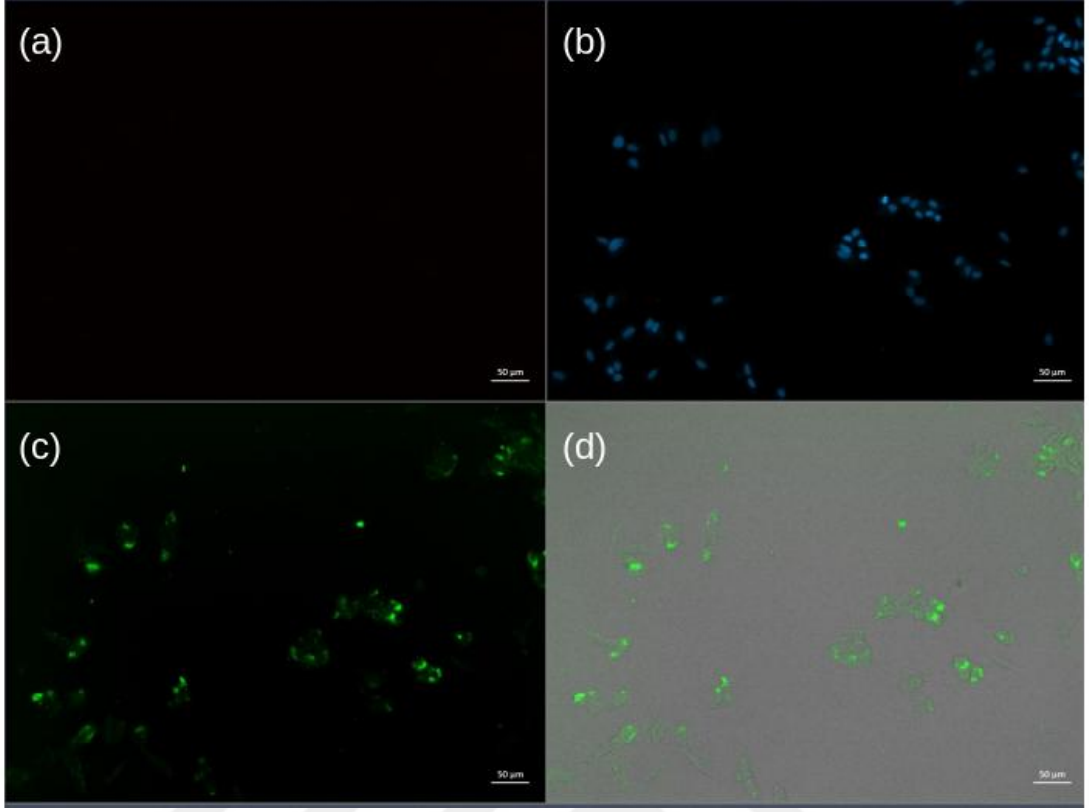
hesaplamalar yapılmıştır. Farklı lonafarnib konsantrasyonlarındaki deney gruplarının günlere göre hücre canlılık oranlarının ortalama değerleri gösterilmiştir (Şekil 6.8.2). Buna göre uygun lonafarnib konsantrasyonu 1 µM olarak belirlenmiştir.



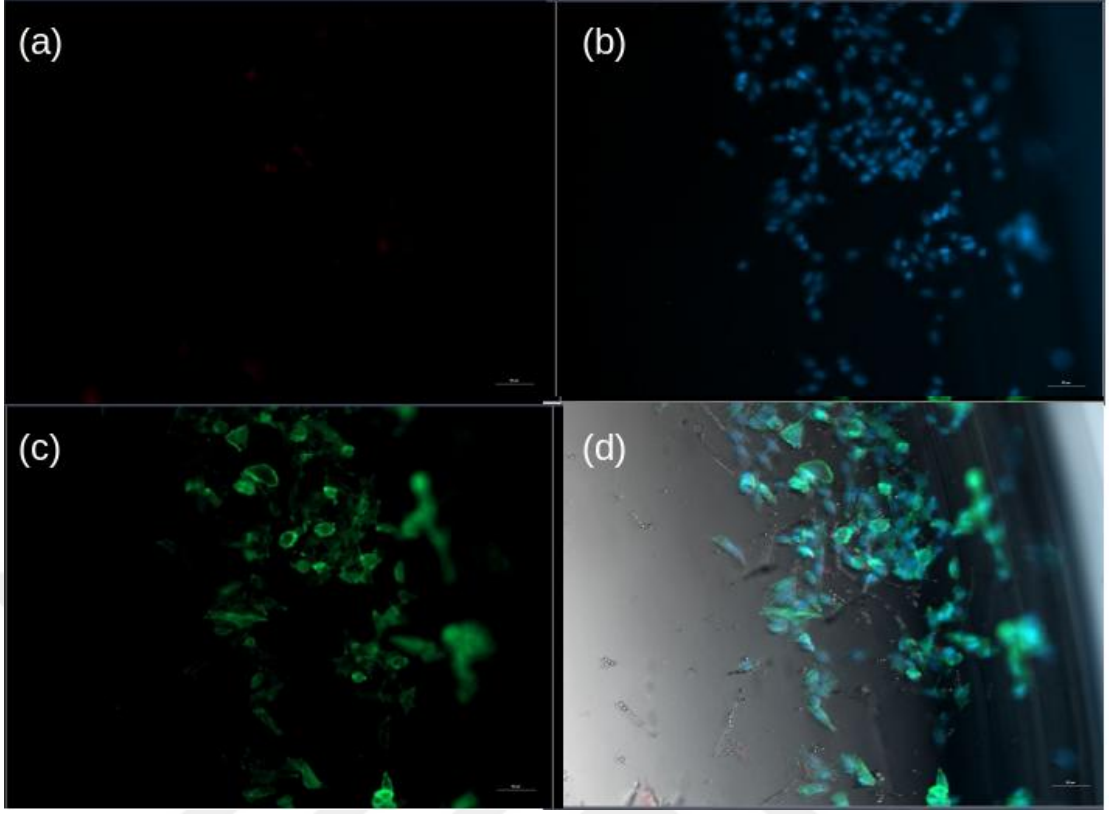
Şekil 6.8.2. Lonafarnib molekülünün hücre canlılığı üzerine etkisi (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ ve **** $p \leq 0.0001$).

6.9. İmmünohistokimya Sonuçları

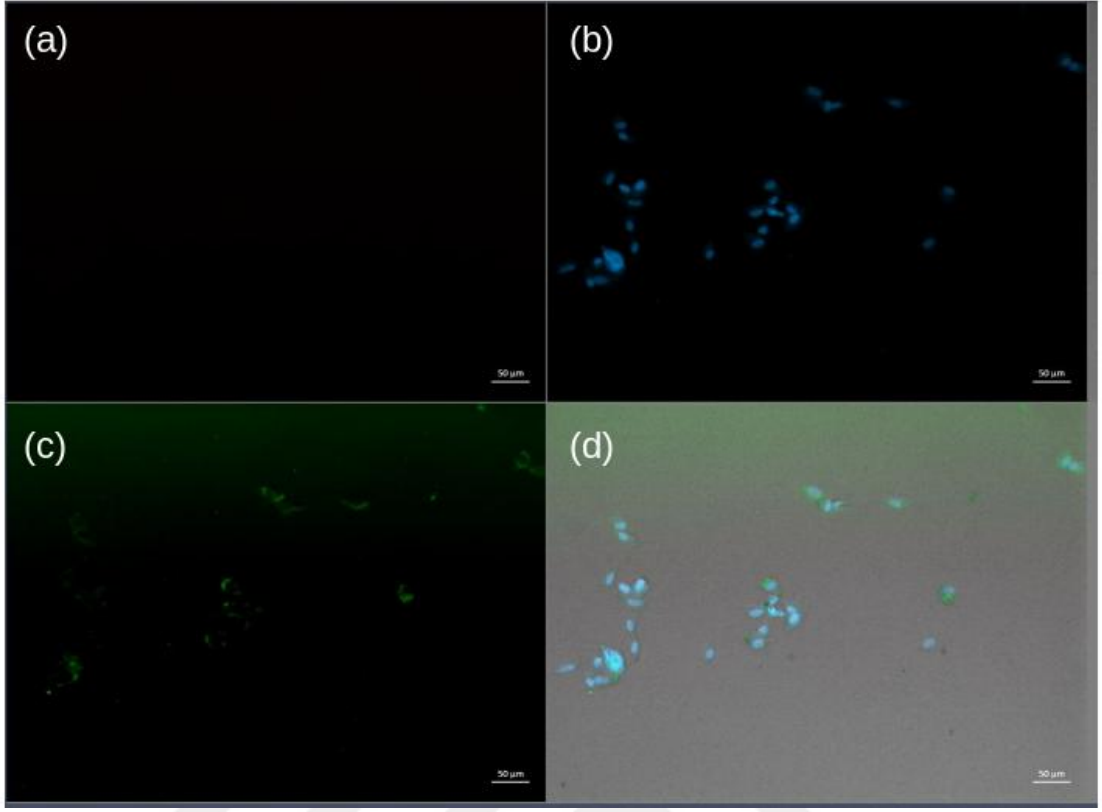
MTT sitotoksikite analizi sonucunda insülinli ve insülinli deney setlerinde lonafarnib ilaç molekülü ile muamele edilen ve edilmeyen deney gruplarında immünohistokimya boyama yapılmıştır. Hoechst DNA boyası ile boyanarak görüntülenen hücre çekirdekleri 405 nm dalga boyunda, falloidin FITC ile boyanan hücre membranı ise 488 nm dalga boyunda görüntülenmiştir. Ancak, HRas proteinini görüntülemek için kullanılan Alexa Flour 647'den herhangi bir floresan ışımaya alınamamıştır. Konfokal mikroskopu ile elde edilen görüntüler ayrı ayrı ve birleştirilmiş halde sunulmuştur. Hazırlanan şekillerin açıklama yazılarında insülin ya da lonafarnib için muamele edilmeyen anlamında (-) ve muamele edilen anlamında (+) işaretleri kullanılmıştır.



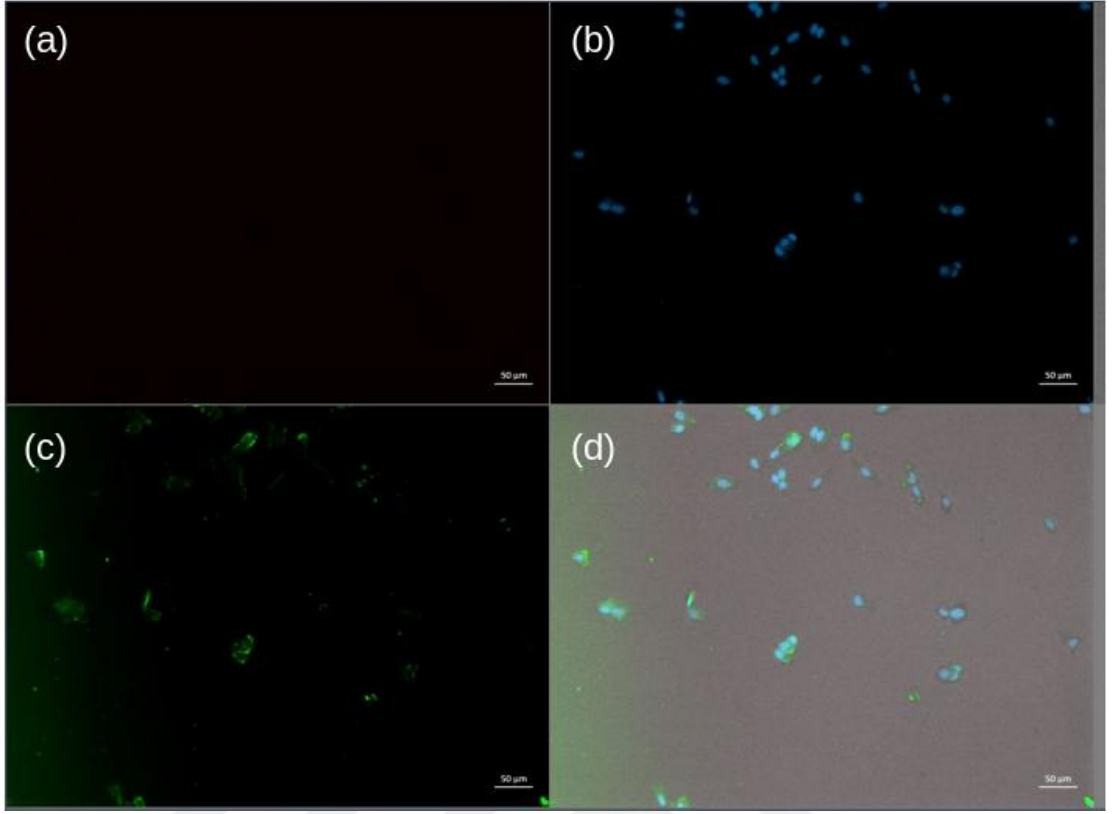
Şekil 6.9.1. İnsülin(-), Ionafarnib(-) SH-SY5Y hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri, bar uzunluğu 50 µm (a) HRas, (b) Hoechst, (c) Falloidin FITC ve (d) birleştirilmiş görüntü.



Şekil 6.9.2. İnsülin(-), lonafarnib(+) SH-SY5Y hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri, bar uzunluğu 50 µm (a) HRas, (b) Hoechst, (c) Falloidin FITC ve (d) birleştirilmiş görüntü.



Şekil 6.9.3. İnsülin(+), lonafarnib(-) SH-SY5Y hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri, bar uzunluğu 50 µm (a) HRas, (b) Hoechst, (c) Falloidin FITC ve (d) birleştirilmiş görüntü.



Şekil 6.9.4. İnsülin(+), lonafarnib(+) SH-SY5Y hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri, bar uzunluğu 50 µm (a) HRas, (b) Hoechst, (c) Falloidin FITC ve (d) birleştirilmiş görüntü.

7-TARTIŞMA

FTaz enziminin farklı reaksiyon aşamalarında fosforilasyonun etkilerini incelediğimiz bu çalışmamız, posttranslasyonel modifikasyonun enzim dinamiğine etkilerini sistematik bir şekilde ele alan ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır. Katalitik reaksiyon aşamalarını gösteren apo, binary, ternary ve product sistemlerine ait fosforsuz ve fosforlu yapıların MD simülasyonları yapılarak elde edilen bulgular ışığında tahmini bir allosterik bağlanma bölgesi tanımlanmıştır. Ayrıca, bugüne kadar FTaz tarafından katalize edilen enzimatik adımları araştıran bazı moleküler dinamik çalışmaları olmasına rağmen bunlar simülasyon süresi bakımından deneysel bulgular ile karşılaştırılamayacak kadar kısadır (156–158).

Binary sistemde fosforilasyon etkisiyle β -altbirim stabilitesinin artması FPP substratı ve katalitik açıdan önemli olan rezidüleri uygun oryantasyonda stabilize ederek katalizin hızlanmasına katkı sağlayabilir. Product sistemine ait β -altbirim stabilitesinin fosforilasyon etkisiyle azalması, aktif bölge rezidülerini daha esnek hale getirerek peptitle yaptığı etkileşimleri azaltmak suretiyle oluşan ürünün salınmasını hızlandırabilir.

Fosforilasyonun arayüzeye etkileri incelendiğinde, binary ve ternary sistemlerde FTaz enziminin altbirimleri arasındaki etkileşimin kuvvetlendiği görülmüştür. Sonuç olarak, deneysel çalışmalarda da gösterildiği gibi (91) iki altbirim arasında artan etkileşim katalitik aktivitenin artmasına katkı sağlayabilir. Dahası, fosforilasyon sonucunda product sisteminde iki altbirim arasındaki kontakt sayısının ve arayüzey alanının azalması, ürün salımını kolaylaştırabilir ve buna bağlı olarak da katalitik aktiviteyi hızlandırabilir. Bunların paralelinde, binary sistemde peptit bağlanma kavitesi civarında yerleşen 272-372 rezidülerinin arasındaki korelasyonun azalması, fosforilasyonun enzimin arayüzey alanını düzenlemesinden kaynaklanmış olabilir. Diğer yandan, binary ve ternary sistemlerde, peptit bağlanma bölgesi civarında oluşan arayüzeyde hot spot rezidülerin frekansında artış görülmesi, hatta bunlardan bir tanesi CaaX peptit ile direkt etkileşimde olduğu bilinen Ala98 β (73), dikkat çekmektedir. Bunun aksine, product sisteminde farnesillenmiş ürünün kaviteye yerleştiği bölge civarında hot spot frekansı azalan rezidüler fosforlu sistemde ürün salımını kolaylaştırabilir.

Fosforilasyon etkisiyle binary sistemde, peptit substrat ile etkileştiği bilinen Glu94 β (73) ile peptit bağlanma kavitesinin oluşumuna katılan 12 β -13 β loop'u üzerindeki Lys356 β rezidülerinin arasındaki mesafe daralarak iki rezidü arasında tuz köprüsü kurulmaktadır. FTaz aktif bölgesinin tepe kısmında peptit bağlanma bölgesinin iki tarafındaki loop'lar üzerinde yerleşen bu rezidülerin konumlanmasında görülen değişiklik peptit substratın kaviteye yerleşmesini kolaylaştırıyor olabilir. Bunun tersi yönünde, fosforilasyon product sisteminde, Glu94 β ve Lys356 β rezidülerinin yaklaşmasını ve tuz köprüsü kurulmasını engelleyici bir etki göstermesi yine ürün salımı ile alakalı olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, temel bileşenler analizi yapıldığında binary ve product sistemlerde görülen Glu94 β and 12 β -13 β loop'un global hareketindeki değişim paterninin de benzer olması bu kanıyı güçlendirmiştir.

Fosforilasyonun reaksiyonu hızlandırıcı etkilerinden birisi de FTaz enzimatik kavitesinde Zn²⁺ iyon koordinasyonunu binary sistemde güçlendirirken product sistemde zayıflatması olabilir. Ayrıca, enzimatik kavite içerisinde FPP substratın fosfat gruplarının proteine ait rezidüler tarafından stabilize edilmesi de reaksiyon için önem taşımaktadır. Özellikle, Lys164 α rezidüsünün FPP substrat α -fosfat oksijenlerini nötralize ederek katalize yardımcı olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir (121,122). Çalışmamızda ternary sistemde Lys164 α rezidüsünün FPP α -fosfat oksijenleri ile hidrojen bağı oluşturma kapasitesinde artış görülmesi fosforilasyonun bu yönüyle de reaksiyona yardımcı olabileceğini göstermektedir. Dahası, α - ve β -fosfat oksijenleriyle yaptığı hidrojen bağları sayesinde reaksiyonu transition state'inde stabilize eden Tyr300 β rezidüsünün (124,159), fosforlu binary ve ternary sistemlerde artan hidrojen bağı yapma kapasitesi de benzer bir etki oluşturmaktadır. Lys164 β ve Tyr300 β rezidülerine ilaveten, diğer bir korunmuş rezidü olan Arg291 β 'nin FPP fosfat oksijen atomlarıyla artan hidrojen bağı kapasitesi sayesinde de FPP substratın hidrofobik kavitede stabilize edilerek kataliz için gerekli olan uzatılmış pozda bulunmasına yardımcı olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, fosforilasyon FPP substratın optimum konformasyonda kalmasını sağlayarak reaksiyonu hızlandırıcı bir etki yapıyor olabilir.

Katalitik reaksiyon sırasında CaaX motifte yer alan sistein tiyol grubu katalitik Zn²⁺ iyonu sayesinde aktive olarak FPP substratın C1 atomu üzerine nükleofilik atak

gerçekleştirmektedir (160). Aynı zamanda, FPP substratın birinci ve ikinci izopren grupları rotasyona uğrayarak katalitik sistein rezidüsüne yaklaşmaktadır (73). Çalışmamızda fosforilasyonun, FPP substratın peptit substrata göre oryantasyonunu düzenleyerek ve CaaX peptitin uzatılmış konformasyona adaptasyonunu sağlayarak fosforlu ternary sistemde iki substrat arasındaki fiziksel etkileşimi artırdığı gözlemlenmiştir. İki substrat arasında artan bu etkileşimin reaksiyon hızının artmasında etkili olabileceği düşünülmüştür.

Lokal düzenlemelere ilaveten, çalışmamızda fosforilasyonun dominant kolektif harekete etkileri de araştırılmıştır. Özellikle, şimdiye değin bahsedilen iki altbirim arasındaki arayüzey alanının artması, Glu94 β 'nın Lys356 β 'ya doğru yönelmesi gibi modülasyonların, fosforilasyon etkisiyle proteinin her iki altbiriminde de sınırlanmış olan uzayda görülmesi önemlidir. Fosforilasyon etkisiyle FTaz'ın global hareketine olan etkisi büyük ihtimalle enzim fonksiyonuna katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızda, fosforilasyon etkisiyle proteinde görülen lokal ve global değişiklikler doğrultusunda olası bir allosterik bölge tanımlanarak, bu bölgenin ilaçla hedeflenebilir olduğu gösterilmiştir. Bunun için fosforlu binary sisteme ait yörüngelerden, fosforilasyonun protein dinamiğinde yol açtığı değişiklikleri yansıtan temsili bir yapı seçilerek olası allosterik bölgede tutunabilen ligandlar araştırılmıştır. Aynı zamanda proteinin bilinen substrat bağlanma bölgesinde tutunabilen ligandlar da araştırılmıştır. MD simülasyonlar yardımıyla ligandların, fosforilasyonunun yol açtığı değişiklikleri tersi yönünde etkileyip etkilemediği incelenmiştir.

Tahmini allosterik bölgede araştırılan ligandlardan, ticagrelor ve lonafarnib her üç replika simülasyon boyunca kopmadan proteine bağlı kalmasıyla dikkat çekmiştir. CaaX peptit bağlanma bölgesinde araştırılan ligandlardan rosiglitazone ve raltitrexed her bir replikada simülasyon boyunca stabil bir şekilde kaviteye bağlı kalabilmiştir. Bununla beraber bütün replikalarda simülasyon boyunca stabilite sağlayamamasına rağmen diğer ligandların protein dinamiğinde yol açtığı değişiklikler dikkat çekmektedir. Farklı olarak, lercanidipine ikinci ve üçüncü replikalarda simülasyonun başında tahmini allosterik bölgeden ayrılarak proteinin β -altbirimi üzerinde belirli bir bölgede tutunmaktadır. Lercanidipine molekülünün tutunduğu bu bölge de daha sonraki çalışmalarda irdelenebilir.

Fosforilasyon etkisiyle α - ve β - altbirimler arasında artmış olan arayüzey alanı, tahmini allosterik bölgede araştırılan lomitapide ligandı sayesinde belirgin ölçüde azaltılmıştır. Önemli olarak, bu ligand Leu107 α ve Phe136 α hot spot rezidülerinin frekansını da azaltmıştır. Bunun yanı sıra, ortosterik bölgede araştırılan ligandlardan raltitrexed arayüzey alanını azaltarak iki altbirim arasındaki etkileşimi azaltmada en başarılı olan ligand olmuştur. O kadar belirgin olmamakla beraber, rosiglitazone ve donepezil ligandları da arayüzey alanını azaltabilmiştir. Bahsedilen moleküller, fosforlu sistemden seçilen protein yapısında iki altbirimin etkileşimini azaltabilmesi açısından başarılı bulunmuştur.

Glu94 β ve Lys356 β rezidüleri arasındaki mesafe incelendiğinde, fosforilasyon ile birbirine yaklaşmış olan bu rezidülerin arasındaki mesafeyi en belirgin şekilde vilazadone, olaparib ve raltitrexed ligandları uzaklaştırabilmiştir. İlginç bir şekilde vilazadone, diğer ligandlara kıyasla MD simülasyonlarda daha kısa sürelerde proteine bağlı kalabilmesine rağmen bu etkiyi oluşturabilmiştir. Diğer ligandlardan, berotralstat, lercanidipine, lonafarnib ve rosiglitazone da Glu94 β ve Lys356 β arasındaki mesafeyi uzaklaştırmada nispeten başarılı olmuştur.

İlginç bir şekilde, çalışmamızda CaaX peptit bağlanma kavitesinde bağlandığı bilenen FTaz inhibitörü lonafarnib'in aynı zamanda tahmini allosterik bölgede tutunarak fosforlu sistemde reaksiyon hızını azaltabilecek dinamik ve yapısal değişiklikleri sağlaması dikkat çekmektedir. Ligandların protein dinamiği üzerine etkileri incelendiğinde her birinin farklı mekanizmalar ile fosforlu FTaz enzimini inhibe edebilme potansiyeli taşıdığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda, hiperinsülinemi koşulunda fosforilasyona uğrayarak aktivitesinde artış görülen FTaz enzimini inhibe edebilecek yeni potansiyel moleküllerin araştırmayı amaçlanmıştır. Bu nedenle, nörodejeneratif hastalık modeli oluşturmak için sıklıkla kullanılan SH-SY5Y hücre hattında hiperinsülinemi modeli oluşturmak üzere uygun insülin konsantrasyonu belirlenmiştir. Daha sonra, belirlenen konsantrasyonda insülin içeren/içermeyen besiyerinde inkübe edilen hücrelere FTaz inhibitörü lonafarnib muamele edilerek sitotoksik olmayan konsantrasyonu belirlenmiştir.

FTaz enziminin hiperinsülinemi koşulunda fosforilasyona uğraması sonucu aktivitesi artmaktadır (6). AH'da artan FTaz enzim miktarına bağlı olarak,

farnesillenerek hücre membranına tutunan HRas protein miktarındaki artış ve inen sinyal yolağında ERK protein aktivasyonu hastalığın patojenezindeki önemi bilinmektedir (5). Çalışmamızda, insulin ve Ionafarnib maruziyeti sonucunda SH-SY5Y hücrelerinde HRas proteininin değişen membran/sitozol oranlarını araştırmak için yapılan immunfloresan boyama neticesinde hücre çekirdeği ve membranı görüntülenebilmiştir. Ancak, HRas protein için kullanılan floresan boya görüntülenememiştir. Çalışılan materyalin plastik tabanlı petri olması nedeniyle ışığın çok kırılmasına bağlı olarak görüntü alınamamasına yol açmış olabilir. İlaveten, elde edilen görüntülerde hücre morfolojisinin bozulmuş olduğu ve hücrelerin büyük kısmının petri tabanından kalkmış olduğu dikkat çekmiştir. Petri tabanında kalan hücreleri kaplayan veziküler yapıların bulunması fiksasyon ile ilgili bir problem olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenlerden dolayı deneylerin cam tabanlı petri kaplarında tekrar edilmesi için çalışmalar devam etmektedir.

8-SONUÇ

Bu çalışmamızda, FTaz enzimi tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonlar üzerinde fosforilasyonun etkisini araştırmak için, fosforsuz ve fosforlu enzim sistemleri karşılaştırılarak atomistik seviyede mekanistik bir bakış sağlanmıştır. Fosforilasyon, enzimin α - ve β - altbirimleri arasındaki etkileşimi kuvvetlendirmiş ve proteinde bazı yapısal düzenlemelere neden olmuştur. Bunlar binary ve ternary sistemlerde i) FPP substrat konformasyonunun CaaX peptite göre düzenlenmesi, ii) enzimin aktif bölgesinde katalitik Zn^{2+} iyon koordinasyonunun modülasyonu sayesinde aktivitenin artırılmasına yol açabilecek değişikliklerdir. Diğer yandan, reaksiyon tamamlandıktan sonra ürün salımını kolaylaştıracak konformasyonel düzenlemeler görülmektedir. Elde ettiğimiz bulguların, literatürdeki yapısal ve biyokimyasal data ile uyumlu olması sebebiyle, fosforlu FTaz enzimi üzerinde tahmini allosterik bölgenin tanımlanması ümit vericidir. Son olarak, fosforilasyonun mekanistik etkilerini anlamak, belirli hastalık durumlarında enzimin spesifik olarak hedeflenmesini sağlayabilir.

9-KAYNAKLAR

- (1) Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44(45):7342–7372, 2005.
- (2) Aebersold R, Ağar JN, Amster BJ, Firinci MS, Bertozzi CR, Boja ES, et al. How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.* 14(3):206–214, 2018.
- (3) Yang A, Cho K, Park HS. Chemical biology approaches for studying posttranslational modifications. *RNA Biol.* 15(4–5): 427–440, 2018.
- (4) Shen M, Pan P, Li Y, Li D, Yu H, Hou T. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: Structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling. *Drug Discov. Today.* 20(2):267–276, 2015.
- (5) Jeong A, Cheng S, Zhong R, Bennett DA, Bergö MO, Li L. Protein farnesylation is upregulated in Alzheimer’s human brains and neuron-specific suppression of farnesyltransferase mitigates pathogenic processes in Alzheimer’s model mice. *Acta Neuropathol. Commun.* 9(1):1–24, 2021.
- (6) Solomon CS, Goalstone ML. Dominant negative farnesyltransferase α -subunit inhibits insulin mitogenic effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285(2):161–166, 2001.
- (7) Godyń J, Jończyk J, Panek D, Malawska B. Therapeutic strategies for Alzheimer’s disease in clinical trials. *Pharmacol. Reports.* 68(1):127–138, 2016.
- (8) Kulshreshtha A, Piplani P. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer’s disease. *Neurol. Sci.* 37(9):1403–1435, 2016.
- (9) Champion D, Pottier C, Nicolas G, Le Guennec K, Rovelet-Lecrux A. Alzheimer disease: Modeling an A β -centered biological network. *Mol. Psychiatry.* 21(7):861–871, 2016.

- (10) Canter RG, Penney J, Tsai LH. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature*. 539(7628):187–196, 2016.
- (11) Mohamed T, Shakeri A, Rao PPN. Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry, *Eur. J. Med. Chem.* 113:258–272, 2016.
- (12) Cho Y, Bae HG, Okun E, Arumugam TV, Jo DG. Physiology and pharmacology of amyloid precursor protein. *Pharmacol. Ther.* 235:108122, 2022.
- (13) Montoliu-Gaya L, Villegas S. Protein structures in Alzheimer's disease: The basis for rationale therapeutic design. *Arch. Biochem. Biophys.* 588:1–14, 2015.
- (14) Sala Frigerio C, De Strooper B. Alzheimer's Disease Mechanisms and Emerging Roads to Novel Therapeutics. *Annu. Rev. Neurosci.* 39:57–79, 2016.
- (15) Schafer M, Erdö SL. Development of glutamate neurotoxicity in cortical cultures: induction of vulnerability by insulin. 62(293–296), 1991.
- (16) Marfaing P, Penicaud L, Broer Y, Mraovitch S, Calando Y, Picon L. Effects of hyperinsulinemia on local cerebral insulin binding and glucose utilization in normoglycemic awake rats. *Neurosci. Lett.* 115(2–3):279–285, 1990.
- (17) Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kökmen E, O'Brien PC, et al. The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: A population-based cohort study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826:422–427, 1997.
- (18) Ott A, Stolk RP, Van Harskamp F, Pols HAP, Hofman A, Breteler MMB. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*. 53(9):1937–1942, 1999.
- (19) Craft S, Dagogo-Jack SE, Wiethop BV, Murphy C, Nevins ST, Fleischman S, et al. Effects of hyperglycemia on memory and hormone levels in dementia of the Alzheimer type: A longitudinal study. *Behav. Neurosci.* 107(6):926–940, 1993.

- (20) Craft S, Newcomer J, Kanne S, Dagogo-Jack S, Cryer P, Sheline Y, et al. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 17(1):123–130, 1996.
- (21) Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte D. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: Relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology.* 50(1):164–168, 1998.
- (22) Fishel MA, Watson GS, Montine TJ, Wang Q, Green PS, Kulstad JJ, et al. Hyperinsulinemia provokes synchronous increases in central inflammation and β -amyloid in normal adults. *Arch. Neurol.* 62(10):1539–1544, 2005.
- (23) Watson GS, Peskind ER, Asthana S, Purganan K, Wait C, Chapman D, et al. Insulin increases CSF A β 42 levels in normal older adults. *Neurology.* 60(12):1899–1903, 2003.
- (24) Freude S, Plum L, Schnitker J, Leiser U, Udelhoven M, Krone W, et al. Peripheral Hyperinsulinemia Promotes Tau Phosphorylation In Vivo. *Neurosci Lett.* 389(2):103–106, 2005.
- (25) Frölich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893:290–293, 1999.
- (26) Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 22(1):1–10, 1993.
- (27) Shemer J, Adamo M, Raizada MK, Heffez D, Zick Y, LeRoith D. Insulin and IGF-I stimulate phosphorylation of their respective receptors in intact neuronal and glial cells in primary culture. *J. Mol. Neurosci.* 1(3):137, 1989.
- (28) Häring HU. The insulin receptor: signalling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia.* 34(12):848–861, 1991.

- (29) Wilden PA, Kahn CR, Siddle K, White MF. Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J. Biol. Chem.* 267(23):16660–16668, 1992.
- (30) Taha C, Klip A. The insulin signaling pathway. *J. Membr. Biol.* 169(1):1–12, 1999.
- (31) White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia.* 40(2):2–17, 1997.
- (32) Sasaoka T, Kobayashi M. The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocr. J.* 47(4):373–381, 2000.
- (33) D’Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 13(3):227–255, 1996.
- (34) O’Kusky JR, Ye P, D’Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci.* 20(22):8435–8442, 2000.
- (35) Unger JW, Livingston JN, Moss AM. Insulin receptors in the central nervous system: Localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog. Neurobiol.* 36(5):343–362, 1991.
- (36) De La Monte SM. Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in alzheimers disease. *Drugs.* 72(1):49–66, 2012.
- (37) Giovannone B, Scaldaferri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, et al. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: Distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 16(6):434–441, 2000.
- (38) Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell.* 103(2):211-225, 2000.

- (39) Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: Supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* 47(1), 2011.
- (40) Freude S, Schilbach K, Schubert M. The Role of IGF-1 Receptor and Insulin Receptor Signaling for the Pathogenesis of Alzheimers Disease: From Model Organisms to Human Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 6(3):213–223, 2009.
- (41) Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76(1):1–10, 2001.
- (42) Racaniello M, Cardinale A, Mollinari C, D'Antuono M, De Chiara G, Tancredi V, et al. Phosphorylation Changes of CaMKII, ERK1/2, PKB/Akt Kinases and CREB Activation during Early Long-Term Potentiation at Schaffer Collateral-CA1 Mouse Hippocampal Synapses. *Neurochem. Res.* 35(2):239–246, 2010.
- (43) Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *NeuroSignals.* 11(5):270–281, 2002.
- (44) Zhuang S, Schnellmann RG. A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319(3):991–997, 2006.
- (45) Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, et al. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.* 70(1):93–104, 1992.
- (46) Ceresa BP, Pessin JE. Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Mol. Cell. Biochem.* 182(1–2):23–29, 1998.
- (47) Nizzari M, Venezia V, Repetto E, Caorsi V, Magrassi R, Gagliani MC, et al. Amyloid precursor protein and presenilin1 interact with the adaptor GRB2 and modulate ERK1,2 signaling. *J. Biol. Chem.* 282(18):13833–13844, 2007.
- (48) Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson, et al. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein

- ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 25(7):1826–1835, 2005.
- (49) Hensley K, Floyd RA, Zheng N, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, et al. p38 Kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* 72(5):2053–2058, 1999.
- (50) Nizzari M, Thellung S, Corsaro A, Villa V, Pagano A, Porcile C, et al. Neurodegeneration in Alzheimer disease: Role of amyloid precursor protein and presenilin 1 intracellular signaling. *J. Toxicol.* 2012, 2012.
- (51) Kelleher I, Garwood C, Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Kinase activities increase during the development of tauopathy in htau mice. *J. Neurochem.* 103(6):2256–2267, 2007.
- (52) Munoz L, Ammit AJ. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 58(3):561–568, 2010.
- (53) Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, et al. Stimulation of b-Amyloid Precursor Protein Trafficking by Insulin. *J Neurosci.* 21(8):2561–2570, 2001.
- (54) Withers DJ, White M. Perspective: The insulin signaling system - A common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology.* 141(6):1917–1921, 2000.
- (55) Aplin AE, Gibb GM, Jacobsen JS, Gallo JM, Anderton BH. In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3 β . *J. Neurochem.* 67(2):699–707, 1996.
- (56) Lee MS, Kao SC, Lemere CA, Xia W, Tseng HC, Zhou Y, et al. APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J. Cell Biol.* 163(1):83–95, 2003.
- (57) Zhao WQ, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1792(5):482–496, 2009.

- (58) Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(9):3100–3105, 2004.
- (59) Liu Y, Liu F, Grundke-iqbal I, Iqbal K, Gong C. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *The Journal of Pathology.* 225:54–62, 2011.
- (60) Yang Y, Song W. Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neuroscience.* 250:140–150, 2013.
- (61) Kirouac L, Rajic AJ, Cribbs DH, Padmanabhan J. Activation of Ras-ERK signaling and GSK-3 by amyloid precursor protein and amyloid beta facilitates neurodegeneration in Alzheimer's disease. *eNeuro.* 4(2), 2017.
- (62) Zhao L, Teter B, Morihara T, Lim GP, Ambegaokar SS, Ubeda OJ, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: Implications for Alzheimer's disease intervention. *J. Neurosci.* 24(49):11120–11126, 2004.
- (63) Vekrellis K, Ye Z, Qui WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, et al. Neurons regulate extracellular levels of amyloid β -protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J. Neurosci.* 20(5):1657–1665, 2000.
- (64) McDermott JR, Gibson AM. Degradation of Alzheimer's β -amyloid protein by human and rat brain peptidases: Involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem. Res.* 22(1):49–56, 1997.
- (65) Kurochkin IV, Goto S. Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 345(1):33–37, 1994.
- (66) Farris W, Mansuryan S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(7):4162–4167, 2003.

- (67) Pérez A, Morelli L, Cresto JC, Castaño EM. Degradation of soluble amyloid β -peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem. Res.* 25(2):247–255, 2000.
- (68) Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid β - protein by degradation. *J. Biol. Chem.* 273(49):32730–32738, 1998.
- (69) Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, et al. Enhanced proteolysis of β -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.* 40(6):1087–1093, 2003.
- (70) Lobell RB. Prenylation of Ras GTPase superfamily proteins and their function in immunobiology. *Adv. Immunol.* 68:145–189, 1998.
- (71) McTaggart SJ. Isoprenylated proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(3):255–267, 2006.
- (72) Wang M, Casey PJ. Protein prenylation: Unique fats make their mark on biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 17(2), 2016.
- (73) Long SB, Casey PJ, Beese LS. The basis for K-Ras4B binding specificity to protein farnesyltransferase revealed by 2 Å resolution ternary complex structures. *Structure.* 8(2):209–222, 2000.
- (74) Park HW. Crystal Structure of Protein Farnesyltransferase at 2.25 Angstrom Resolution. *Science.* 275(5307):1800–1805, 1997.
- (75) Gelb MH, Brunsweld L, Hrycyna CA, Michaelis S, Tamanoi F, Van Voorhis WS, et al. Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications. *Nat. Chem. Biol.* 2(10):518–528, 2006.
- (76) Taylor JS, Reid TS, Terry KL, Casey PJ, Beese LS. Structure of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *EMBO J.* 22(22):5963–5974, 2003.
- (77) Berndt N, Hamilton AD, Sebt SM. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 11(11):775–791, 2011.

- (78) Jeong A, Suazo KF, Wood WG, Distefano MD, Li L. Isoprenoids and protein prenylation: implications in the pathogenesis and therapeutic intervention of Alzheimer's disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53(3):279–310, 2018.
- (79) Hottman DA, Li L. Protein Prenylation and Synaptic Plasticity: Implications for Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 50(1):177–185, 2014.
- (80) Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron.* 32(2):177–180, 2001.
- (81) Tamboli IY, Barth E, Christian L, Siepmann M, Kumar S, Singh S, et al. Statins promote the degradation of extracellular amyloid β -peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J. Biol. Chem.* 285(48):37405–37414, 2010.
- (82) Glebov K, Walter J. Statins in unconventional secretion of insulin-degrading enzyme and degradation of the amyloid- β peptide. *Neurodegener. Dis.* 10(1–4):309–312, 2012.
- (83) Cheng S, Cao D, Hottman DA, Yuan LL, Bergo MO, Li L. Farnesyltransferase haplodeficiency reduces neuropathology and rescues cognitive function in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 288(50):35952–35960, 2013.
- (84) Long SB, Casey PJ, Beese LS. Cocrystal structure of protein farnesyltransferase complexed with a farnesyl diphosphate substrate. *Biochemistry.* 37(27):9612–9618, 1998.
- (85) Seabra MC, Reiss Y, Casey PJ, Brown MS, Goldstein JL. Protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase share a common α subunit. *Cell.* 65(3):429–434, 1991.
- (86) Kawabata M, Imamura T, Miyazono K, Engel ME, Moses HL. Interaction of the transforming growth factor- β type I receptor with farnesyl-protein transferase- α . *J. Biol. Chem.* 270(50):29628–29631, 1995.
- (87) Kumar A, Beresini MH, Dhawan P, Mehta KD. α -subunit of farnesyltransferase is phosphorylated in vivo: Effect of protein phosphatase-1

- on enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222(2):445–452, 1996.
- (88) Goalstone ML, Draznin B. Effect of insulin on farnesyltransferase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271(44):27585–27589, 1996.
- (89) Goalstone M, Carel K, Leitner JW, Draznin B. Insulin stimulates the phosphorylation and activity of farnesyltransferase via the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology.* 138(12):5119–5124, 1997.
- (90) Goalstone ML, Draznin B. Effect of insulin on farnesyltransferase gene transcription and mRNA stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254(1):243–247, 1999.
- (91) Goalstone ML, Wall K, Leitner JW, Kurowski T, Ruderman N, Pan SJ, et al. Increased amounts of farnesylated p21Ras in tissues of hyperinsulinaemic animals. *Diabetologia.* 42(3):310–316, 1999.
- (92) Chappell J, Golovchenko I, Wall K, Stjernholm R, Leitner JW, Goalstone M, et al. Potentiation of Rho-A-mediated lysophosphatidic acid activity by hyperinsulinemia. *J. Biol. Chem.* 275(41):31792–31797, 2000.
- (93) Solomon CS, Goalstone ML. Dominant negative α -subunit of FTase inhibits effects of insulin and IGF-1 in MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291(3):458–465, 2002.
- (94) Finlayson CA, Chappel J, Leitner JW, Goalstone ML, Garrity M, Nawaz S, et al. Enhanced insulin signaling via Shc in human breast cancer. *Metabolism.* 52(12):1606–1611, 2003.
- (95) Solomon CS, Leitner JW, Goalstone ML. Dominant negative α -subunit of farnesyl- and geranylgeranyl-transferase I inhibits insulin-induced differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. *Int. J. Obes.* 27(1):40–47, 2003.
- (96) Long SB, Casey PJ, Beese LS. Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution. *Nature.* 419(6907):645–650, 2002.

- (97) Furfine ES, Leban JJ, Landavazo A, Moomaw JF, Casey PJ. Protein Farnesyltransferase: Kinetics of Farnesyl Pyrophosphate Binding and Product Release. *Biochemistry*. 34(20):6857–6862, 1995.
- (98) Tschantz WR, Furfine ES, Casey PJ. Substrate binding is required for release of product from mammalian protein farnesyltransferase. *J. Biol. Chem.* 272(15):9989–9993, 1997.
- (99) Burley SK, Berman HM, Bhikadiya C, Bi C, Chen L, Costanzo LD, et al. RCSB Protein Data Bank: Biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Res.* 47(D1):D464–D474, 2019.
- (100) Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. *Nucleic acids research.* 28:235–242, 2000.
- (101) Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1):W296–W303, 2018.
- (102) Release, S. 4: Glide. Schrödinger, LLC, New York, NY 2018.
- (103) Sastry GM, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 27(3):221–234, 2013.
- (104) Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella LJ, Roux B, et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program B. *J. Comput. Chem.* 30(10):1545–1614, 2009.
- (105) Lee J, Cheng X, Jo S, MacKerell AD, Klauda JB, Im W, et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* 12(1):405–413, 2016.
- (106) Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. Software News and Updates CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. Wiley InterScience. 2008.

- (107) Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, et al. CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Methods.* 14(1):71–73, 2016.
- (108) Mark P, Nilsson L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. *J. Phys. Chem. A.*105(43):9954–9960, 2001.
- (109) Wu EL, Cheng X, Jo S, Rui H, Song KC, Dávila-Contreras EM, et al. CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations. *J Comput Chem.* 35(27):1997-2004, 2014.
- (110) Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Pall S, Smith JC, Hess B, et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 1–2:19–25, 2015.
- (111) Nosé S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J. Chem. Phys.* 81(1):511–519, 1984.
- (112) Hoover WG, Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical review A.* 31(1695), 1985.
- (113) Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52(12):7182–7190, 1981.
- (114) Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18(12):1463–1472, 1997.
- (115) Kim S, Lee J, Jo S, Brooks CL, Lee HS, Im W. CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *J. Comput. Chem.* 38(21):1879–1886, 2017.
- (116) Tuncbag N, Keskin O, Gursoy A. HotPoint: Hot spot prediction server for protein interfaces. *Nucleic Acids Res.* 38(2):402–406, 2010.
- (117) Grant BJ, Rodrigues APC, ElSawy KM, McCammon JA, Caves LSD. Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics.* 22(21):2695–2696, 2006.

- (118) Bakan A, Dutta A, Mao W, Liu Y, Chennubhotla C, Lezon TR, et al. Evol and ProDy for bridging protein sequence evolution and structural dynamics. *Bioinformatics*. 30(18):2681–2683, 2014.
- (119) Bakan A, Meireles LM, Bahar I. ProDy: Protein dynamics inferred from theory and experiments. *Bioinformatics*. 27(11):1575–1577, 2011.
- (120) Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual Molecular DynamicsSartorius products,” *J. Mol. Graph.* 14(1995):33–38, 1996.
- (121) Hightower KE, Casey PJ, Fierke CA. Farnesylation of nonpeptidic thiol compounds by protein farnesyltransferase. *Biochemistry*. 40(4):1002–1010, 2001.
- (122) Oliff A. Farnesyltransferase inhibitors: Targeting the molecular basis of cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, 1423(3), 1999.
- (123) Cui G, Merz K. Computational studies of the farnesyltransferase ternary complex part II: The conformational activation of farnesyldiphosphate. *Biochemistry*. 46:12375–12381, 2007.
- (124) Chakravorty DK, Merz KM. Role of substrate dynamics in protein prenylation reactions. *Acc. Chem. Res.* 48(2):439–448, 2015.
- (125) Halgren TA. Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability. *J. Chem. Inf. Model.* 49(2):377–389, 2009.
- (126) Halgren T, New method for fast and accurate binding-site identification and analysis. *Chem. Biol. Drug Des.* 69(2):146–148, 2007.
- (127) Salam NK, Nuti R, Sherman W. Novel method for generating structure-based pharmacophores using energetic analysis. *J. Chem. Inf. Model.* 49(10):2356–2368, 2009.
- (128) Loving K, Salam NK, Sherman W. Energetic analysis of fragment docking and application to structure-based pharmacophore hypothesis generation. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 23(8):541–554, 2009.

David S. Wishart*, Craig Knox, An Chi Guo, Dean Cheng, Savita Shrivastava, Dan Tzur, Bijaya Gautam and Murtaza Hassanali

- (129) Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, et al. DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* 36(1):901–906, 2008.
- (130) Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, et al. DrugBank 3.0: A comprehensive resource for ‘Omics’ research on drugs. *Nucleic Acids Res.* 39(1):1035–1041, 2011.
- (131) Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, et al. DrugBank 4.0: Shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res.* 42(D1):1091–1097, 2014.
- (132) Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 34:668–672, 2006.
- (133) Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 46(D1):D1074–D1082, 2018.
- [134] S. L. Dixon, A. M. Smondyrev, E. H. Knoll, S. N. Rao, D. E. Shaw, and R. A. Friesner, “PHASE: A new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results,” *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 20, no. 10–11, pp. 647–671, 2006.
- (135) Dixon SL, Smondyrev AM, Rao SN. PHASE: A novel approach to pharmacophore modeling and 3D database searching. *Chem. Biol. Drug Des.* 67(5):370–372, 2006.
- (136) Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* 47(7):1739–1749, 2004.
- (137) Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* 49(21):6177–6196, 2006.

- (138) Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* 47(7):1750–1759, 2004.
- (139) Schmaier AH. Plasma prekallikrein: Its role in hereditary angioedema and health and disease. *Front. Med.* 5:1–6, 2018.
- (140) Ohnishi S, Fukumura K, Kubota R, Wajima T. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of radiolabeled naldemedine in healthy subjects. *Xenobiotica*, 49(9):1044–1053, 2019.
- (141) Wang SM, Han C, Lee SJ, Patkar AA, Masand PS, Pae CU. A review of current evidence for vilazodone in major depressive disorder. *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.* 17(3):160–169, 2013.
- (142) Lin TH, Voon WC, Yen HW, Huang CH, Su HM, Lai WT, et al. Lercanidipine and losartan effects on blood pressure and fibrinolytic parameters. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 22(4):177–183, 2006.
- (143) Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, Kolansky DM, Wolffe ML, Sarkis A, et al. Inhibition of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Familial Hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 356(2):148–156, 2007.
- (144) Sachdev E, Tabatabai R, Roy V, Rimel BJ, Mita MM. PARP Inhibition in Cancer: An Update on Clinical Development. *Target. Oncol.* 14(6):657–679, 2019.
- (145) Cubria MB, Suarez S, Masoudi A, Oftadeh R, Kamalpathy P, DuBose A, et al. Evaluation of musculoskeletal phenotype of the G608G progeria mouse model with lonafarnib, pravastatin, and zoledronic acid as treatment groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117(22), 2020.
- (146) Strickland CL, Weber PC, Windsor WT, Wu Z, Le HV, Albanese MM, et al. Tricyclic farnesyl protein transferase inhibitors: Crystallographic and calorimetric studies of structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 42(12):2125–2135, 1999.

- (147) Parks DJ, Tomkinson NCO, Villeneuve MS, Blanchard SG, Willson TM. Differential activity of rosiglitazone enantiomers at PPAR γ . *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 8(24):3657–3658, 1998.
- (148) Iketani R, Ohno K, Kawasaki Y, Matsumoto K, Yamada H, Kishino S. Apolipoprotein E gene polymorphisms affect the efficacy of thiazolidinediones for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Biol. Pharm. Bull.* 41(7):1017–1023, 2018.
- (149) Winblad B, Ad S. Donepezil in Severe Alzheimer's Disease Treatment Options for Patients With Donepezil Treatment for Patients. 185–192, 2009.
- (150) Seltzer B. Donepezil : a review. *Expert Opin Drug Metab. Toxicol.* 1(3):527–536, 2005.
- (151) Murphy MP, Levine H. Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. *J. Alzheimer's Dis.* 19(1):311–323, 2010.
- (152) Shen H, Kihara T, Hongo H, Wu X, Kem WR, Shimohama S, et al. Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors and internalization of NMDA receptors. *Br. J. Pharmacol.* 161(1):127–139, 2010.
- (153) Srinivasan M, Lahiri DK. Significance of NF- κ B as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 19(4):471–487, 2015.
- (154) Hwang J, Hwang H, Lee HW, Suk K. Microglia signaling as a target of donepezil. *Neuropharmacology.* 58(7):1122–1129, 2010.
- (155) Wilson KS, Malfair Taylor SC. Drug Evaluation Raltitrexed: optimism and reality. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5(11):1447–1454, 2009.
- (156) Sousa SF, Coimbra JTS, Paramos D, Pinto R, Guimaraes RS, Teixeira V, et al. Molecular dynamics analysis of a series of 22 potential farnesyltransferase substrates containing a CaaX-motif. *J. Mol. Model.* 19(2):673–688, 2013.

- (157) Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Molecular dynamics simulations on the critical states of the farnesyltransferase enzyme. *Bioorganic Med. Chem.* 17(9):3369–3378, 2009.
- (158) Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Farnesyltransferase - New insights into the zinc-coordination sphere paradigm: Evidence for a carboxylate-shift mechanism. *Biophys. J.* 88(1):483–494, 2005.
- (159) Cui G, Merz KM. Computational studies of the farnesyltransferase ternary complex part II: The conformational activation of farnesyldiphosphate. *Biochemistry.* 46(43):12375–12381, 2007.
- (160) Huang CC, Casey PJ, Fierke CA. Evidence for a catalytic role of zinc in protein farnesyltransferase: Spectroscopy of Co^{2+} -farnesyltransferase indicates metal coordination of the substrate thiolate. *J. Biol. Chem.* 272(1):20–23, 1997.