



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Ras Proteinlerini Hedefleyen İlaçların Gelişimindeki
Güncel Durumun İncelenmesi ve Sanal Tarama ile Yeni
İnhibitör Adaylarının Belirlenmesi**

Yüksek Lisans Tezi
Bilgen Sayım Gülerler

Haziran 2023



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Ras Proteinlerini Hedefleyen İlaçların Gelişimindeki
Güncel Durumun İncelenmesi ve Sanal Tarama ile Yeni
İnhibitör Adaylarının Belirlenmesi**

Yüksek Lisans Tezi

Bilgen Sayım Gülerler

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

Haziran 2023

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Bilgen Sayım Gülerler tarafından hazırlanan "Ras Proteinlerini Hedefleyen İlaçların Gelişimindeki Güncel Durumun İncelenmesi ve Sanal Tarama ile Yeni İnhibitör Adaylarının Belirlenmesi" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Doç. Dr. Günseli Bayram Akçapınar
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Semran İpek
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 20/06/2023

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun Apa yazım ve kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

Etik İlkelerine Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Bilgen Sayım Gülerler

ÖZET

Ras Proteinlerini Hedefleyen İlaçların Gelişimindeki Güncel Durumun İncelenmesi ve Sanal Tarama ile Yeni İnhibitör Adaylarının Belirlenmesi

Sayım Gülerler, Bilgen

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

Haziran 2023

Ras proteininin yüzeyinde ilaçların bağlanabileceği bir bölge bulunamaması nedeniyle, RAS "tedavi edilemez" olarak kabul ediliyordu. Son yıllarda artan çalışma ve teknolojilerle KRAS'ı hedefleyen ve yapısındaki anahtar I ve anahtar II bölgelerinin arasına bağlanan küçük inhibitörlerin keşfiyle aday ilaçların sayısı artmaktadır. Bu nedenle yeni aday inhibitör yapılarının araştırılarak desteklenmesi ve geliştirilmesi oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada deneysel olarak belirlenmiş tüm KRAS yapıları (doğal, farklı mutantlar, inhibitör bağlı vb.) ele alınarak inhibitör ve doğal etkileşim partnerlerinin bağlanma bölgeleri ortaya konmuştur. Daha sonra G12D KRAS'ı hedefleyebilecek potansiyel kovalent bağlı olmayan inhibitörler sanal tarama ile keşfedilmiştir. Hedef KRAS yapısını sanal taramaya hazırlamak için en uygun yapı moleküler simülasyona tabi tutularak en uygun konformasyonu seçilmiş ve elde edilen inhibitör veri seti Lipinski kurallarına göre elenerek hedef G12D KRAS inhibitör yapıları (ve negatif/pozitif kontroller) arasında moleküler kenetlenme çalışmaları yaparak sanal tarama gerçekleştirilmiştir. Sonuçların yapısal analizi gerçekleştirilerek G12D mutasyonunun sebep olduğu pankreas (PDAC), kolorektal (CRC) ve akciğer (LUAD) karsinomu tedavisinde etkili olabilecek, pozitif kontrol inhibitörleri MRTX-1133, TH-Z827 ve TH-Z835 ile de desteklenen en iyi skorlu ZINC000008758797 kodlu molekül en uygun terapötik aday olarak önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: KRAS, G12D, sanal tarama, moleküler kenetlenme, moleküler dinamik simülasyonları

ABSTRACT

Investigation of the Current Status of Drugs Targeting RAS Proteins and Identification of new Inhibitor Candidates by Virtual Screening

Sayım Gülerler, Bilgen

Master's Thesis, Department of Bioengineering

Supervisor: Assist. Prof. Saliha Ece Acuner Zorluuysal

June 2023

RAS was considered "incurable" due to the lack of a site on the surface of the Ras protein to which drugs can bind. With the advancements in technology, the discovery of small inhibitors that target the switch I and switch II domains of KRAS has led to a significant increase in the number of potential drug candidates in recent years. For this reason, it is very important to research, support and generated new candidate inhibitor structures. In this study, all available experimentally determined KRAS structures (wild type, different mutants, inhibitor-bound, etc.) were studied and the binding sites of the inhibitor and natural interaction partners were revealed. Later, potential non-covalently bound inhibitors that could target G12D KRAS were discovered by virtual screening. In order to prepare the target KRAS structure for virtual screening, the most suitable structure was suffered to molecular simulation and the almost appropriate conformation was chosed, and the obtained inhibitor dataset was eliminated according to Lipinski rules and virtual screening conduct by molecular docking studies between the target G12D KRAS inhibitor structures (and negative/positive controls). By performing the structural analysis of the results, the best-scoring ZINC000008758797 molecule, which can be effective in the treatment of pancreatic (PDAC), colorectal (CRC) and lung (LUAD) carcinoma caused by the G12D mutation, was proposed as the most suitable therapeutic candidate and the results were supported by positive control inhibitor (MRTX-1133, TH-Z827 and TH-Z835) results.

Keywords: KRAS, G12D, virtual screening, molecular docking, molecular dynamics simulations

TEŞEKKÜR

Öncelikle iki dersini alma şansı bulup anlayışına, güler yüzüne, sevecenliğine hayran kaldığım, sonrasında danışman öğrencisi olma isteğimi kabul eden ve zorlu çalışma şartlarımda bana anlayışını esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece ACUNER ZORLUYSAL a, birlikte çalıştığım proje arkadaşlarım Ecem BULUT ve Amina AZOUZ' a, manevi olarak beni her daim destekleyen bu süreçte motivasyon kaynağım sevgili eşim Mehmet Ali GÜLERLER' e ve ailem Fatma SAYIM ve Celal SAYIM, Büşra SEMİZ, Kübra UÇAK, Hasan SAYIM' a, yüksek lisans grup arkadaşım Onur İŞÇİL' e, tecrübeleri ile yanımda olan canım arkadaşım Derya Şengün'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM I	3
LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
1.1 Ras Proteinlerinin Yapısı	3
1.1.1 KRAS Mutasyonları Hastalıkları	5
1.1.2. G12D Mutasyonu ve Güncel İlaç Durumu.....	9
1.2 Sanal Tarama ile İnhibitör Keşfi	12
1.2.1 Moleküler Kenetlenme ve Sanal Tarama.....	12
1.2.2 Hedef Molekül Hazırlığı için Moleküler Dinamik Simulasyon	13
1.2.3 İnhibitör Seti Hazırlama.....	14
MATERYAL VE METOT	16
2.1 KRAS inhibitörleri için güncel bilgilerin eldesi.....	16
2.2 Sanal Tarama.....	16
2.2.1 Moleküler Dinamik Simülasyon ile hedef hazırlığı.....	16
2.2.2 İnhibitör hazırlığı.....	17
2.2.3 Moleküler Kenetlenme.....	19
BÖLÜM III	20
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
BULGULAR	20
3.1 KRAS Mutantları için güncel bilgiler.....	20
3.2 Sanal Tarama.....	27
3.2.1. Hedef KRAS yapısı.....	27
3.2.2 İnhibitör seti	27

3.2.3 Moleküler Kenetlenme.....	29
BÖLÜM IV.....	35
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	35
EKLER	37
KAYNAKÇA.....	39
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMALAR

RAS: Rat Sarkoma Virüsü

KRAS: Kirsten Sıçan Sarkomu Virüs onkogeni

NRAS: Nöroblastom RAS Onkogen

HRAS: Harvey RAS Onkogen

GTP: Guanozin Trifosfat

GDP: Guanozin Difosfat

PDB: Protein Veri Bankası

SHP2: Src Homoloji Bölgesi Alanı İçeren Fosfataz 2

STK19: Serin/Treonin-Protein Kinaz 19

LUAD: Akciğer Kanseri

PDAC: Pankreatik Kanser

CRC: Kolorektal Kanser

MD: Moleküler Dinamik Simulasyonları

SiC: Silicon carbide

HTVS: yüksek verimli sanal tarama

HTS: yüksek verimli tarama

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 G12D inaktif (GDP bağlı) ve aktif (GNP/GCP) yapılar	21
Tablo 2 KRAS G12D mutasyonuna ait yapısında GDP bulunduran ve inhibitör bağlı yapıların residue adı, numarası ve bağlı olduğu bölge	22
Tablo 3 KRAS G12D mutasyonuna ait yapısında GNP (analog GTP) bulunduran ve inhibitör bağlı yapıların residue adı, numarası ve bağlı olduğu bölge.....	24
Tablo 4 KRAS G12D mutasyonuna ait yapısında GCP (analog GTP) bulunduran ve inhibitör bağlı yapıların residue adı, numarası ve bağlı olduğu bölge.....	26
Tablo 5 Kenetlenme Sonuçları.....	30
Tablo 6 EK-1 KRAS-G12D İçin Literatürde Bulunan PDB yapıların detayları.....	37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Ras mutasyonlarının meydana getirdiği nükleotit değişim mekanizması	3
Şekil 2 RAS izoformu (KRAS, NRAS ve HRAS) mutasyonlarının tümör tipleri arasında dağılımı ve her bir tümör tipinde izoforma göre RAS mutasyonunun sıklığı	4
Şekil 3 İnsan kanserinde KRAS mutasyonlarının (a) türleri ve (b) oranı	6
Şekil 4 KRAS yapısındaki işlevsel bölgeler (a) KRAS G alanı (b) KRAS 5 alfa ve 6 beta sarmalı yapısı	7
Şekil 5 RAS yapısının 2B ve 3B gösterimi	8
Şekil 6 KRAS a) G12C Kovalent ve b) G12D Non-kovalent Mutant 12.residue Yan Zincirleri Karşılaştırmalı Görselleri	10
Şekil 7 MRTX inhibitörünün 2D ve 3D yapıları.....	11
Şekil 8 Yeni KRAS G12D inhibitörlerinin kimyasal yapıları.....	11
Şekil 9 Sanal Tarama yöntemi iş akışı	12
Şekil 10 Sanal Tarama KNIME İş Akışı Şeması	18
Şekil 11 KRASG12D Mutasyonuna Ait Yapısında GDP Bulunduran ve İnhibitör Bağlı Yapılar. 21	
Şekil 12 KRASG12D Mutasyonuna Ait Yapısında GNP (GTP analogu) Bulunduran ve İnhibitör Bağlı Yapılar	23
Şekil 13 KRAS G12D Mutasyonuna Ait Yapısında GCP (GTP analogu) Bulunduran ve İnhibitör Bağlı Yapılar	25
Şekil 14 Sanal Kütüphaneden İnhibitör Setinden Moleküler Kenetlenme Aşaması için Elde Edilen Moleküllerin Desicion Tree Gösterimi	28
Şekil 15 ZINC000008758797 molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi.....	31
Şekil 16 MRTX-1133 molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi	31
Şekil 17 THZ-827 molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi.....	32
Şekil 18 THZ-835 molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi.....	32
Şekil 19 DMSO molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi	33

GİRİŞ

Günümüzde kanser, en sık rastlanan ve ölümcül hastalıkların başında gelmektedir, hastalığın moleküler mekanizmaların irdelenmesi, etkili terapötik yöntemlerin geliştirilmesi için büyük öneme sahiptir (Dede vd. 2023). RAS (KRAS; K-Ras4A ve K-Ras4B, NRAS ve HRAS) insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan gen ailesidir. İnsan kanserlerinin yüzde 30'unda mutasyona uğradıkları tespit edilmiştir ve kanser tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar için hedeflenen proto-onkogenler arasındadır (Cox A, vd. 2014). 40 yılı aşkın bir süredir süren araştırmalar sonucu Ras ‘tedavi edilemez’ olarak adlandırılıyordu ancak son yıllardaki Ras-inhibitör araştırmalarındaki laboratuvar ve klinik gelişmelerle çeşitli yeni yaklaşımlar ortaya çıktı (Zhu vd. 2022). Ras proteinlerinin kanser gelişimindeki önemi, kanseri tedavi etmek için Ras sinyal yollarını engellemeye odaklanan çabalarla, onları ilaç geliştirme için birincil hedef haline getirdi (Moore vd. 2020).

Ras süper ailesi, hücre dışı sinyallere yanıt olarak çeşitli hücresel işlevler için moleküler açma/kapama anahtarı olarak işlev gören küçük guanozin trifosforaz enzimlerinden (GTPaz) oluşur (Wennerberg vd. 2005). Ras proteinleri, aktif bir GTP ye bağlantılı olan durum ile işlevsel olmayan bir GDP ye bağlantılı olmayan durum arasında döngü yaparak aşağı akış sinyal yollarını düzenleyen moleküler anahtarlar olarak işlev görür. Ras proteinleri hücresel olarak hayati önem taşıyan biyokimyasal roller üstlenir; hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması, bölünmesi, hayatta kalması nihayetinde programlı hücre ölümü gibi çok sayıda hücresel sinyal Ras kontrolündedir (Parker ve Mattos 2018). Aktive edildiklerinde, gen ekspresyonunda, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde ve hücre davranışında değişikliklere yol açan bir aşağı akış efektörleri dizisini uyarırlar (Simanshu vd. 2017). Ras sinyalinin karmaşık doğası ve zararlı yan etkilere neden olmadan bu proteinleri inhibe etmenin zorluğu nedeniyle, Ras-hedefli tedavilerin geliştirilmesi zor olmuştur (Liu vd. 2019).

Tüm RAS mutasyonlarının %85'i KRAS geninde meydana gelir. KRAS mutasyonlarına bağlı kansinomların başında pankreas (%90), kolorektal (%25-40), ve akciğer (%15-25) bulunur (Ostrem ve Shokat 2022). KRAS'ın çeşitli mutant formları üç ana kategoriye ayrılmıştır: G12 (kodon 12'de mutasyon), G13 (kodon 13'te mutasyon) ve Q61 (kodon 61'de mutasyon) (Uprety ve Adjei 2020).

Bu tez çalışmasında, güncel KRAS proteinlerinin PDB yapıları listelendi, başarılı ilaçlar ayrıntılı olarak mutasyon tiplerine, inhibitör ve doğal partner gibi içeriklere ayrılıp kategorize edildi. Seçilen KRAS G12D mutasyonu için sonrasında sanal tarama ile inhibitör hazırlığı gerçekleştirildi. Moleküllerin bağlanma afinitelerini tahmin edebilmek için moleküler kenetlenme gerçekleştirildi. Yapılan kenetlenme sonuçlarının yapısal analizi gerçekleştirilerek KRAS G12D mutasyonunun neden olduğu başta pankreas kanseri olmak üzere diğer tümör tiplerinin tedavisinde etkili olabilecek yeni terapötikler önerilmiştir; başta MRTX-1133, TH-Z827 ve TH-Z835 inhibitörleri G12D için kovalent olmayan, güçlü ve seçici inhibitör ilaç adaylarıdır. Son olarak çalışmamızda moleküler dinamik simülasyon çalışması yapıldı. Böylece molekülümüzün anlık görüntüsüne ulaşarak proteinimizin dinamiğinin daha iyi anlaşılması sağlandı.

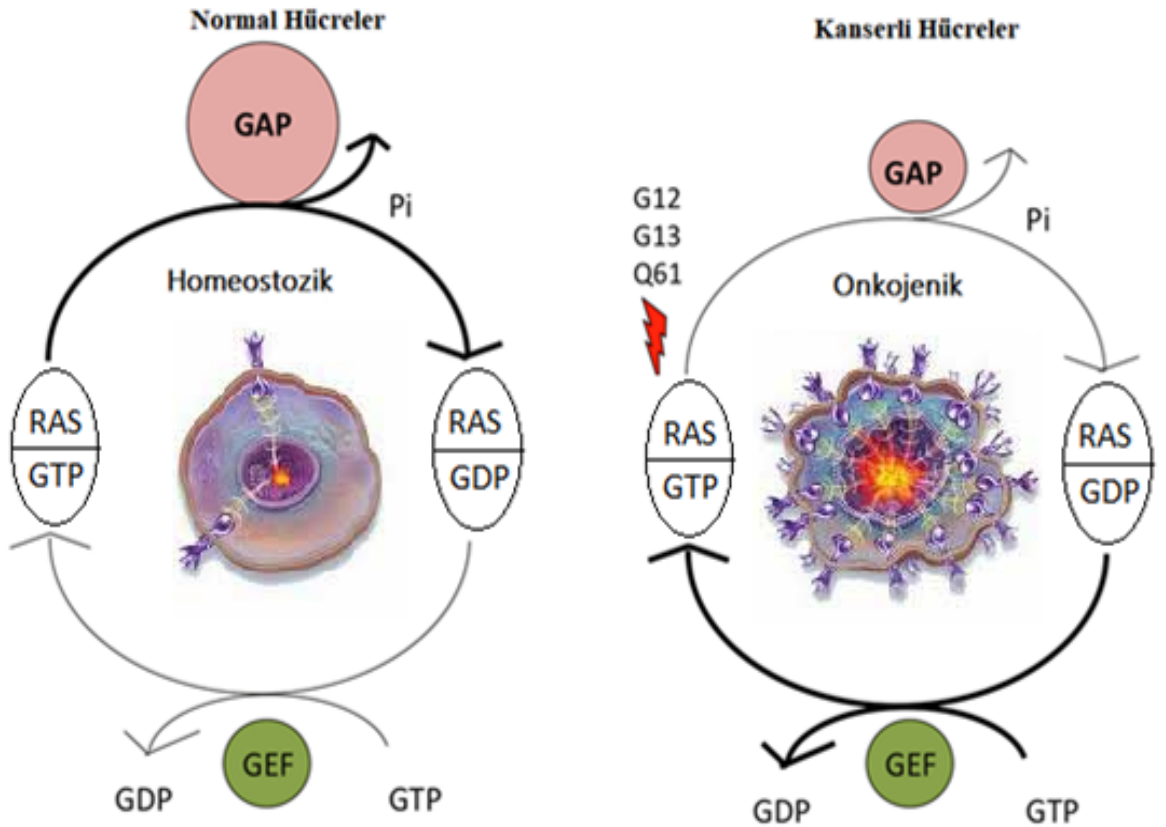
Giriş bölümünde, tezin amaçları ve bu amaçları gerçekleştirmek için kullanılacak yöntemler tanıtılacaktır. Takip eden bölüm olan birinci bölüm'de, RAS proteinlerinin yapısı, KRAS G12D mutasyonu için mevcut ilaç inhibitörleri, tezde kullanılan sanal tarama ve moleküler dinamik simülasyonları yöntemleri ve moleküler kenetlenme yaklaşımları hakkında detaylı bir literatür özeti sunulacaktır. İkinci bölüm'de, tezde kullanılan materyal ve metotlar tanıtılacaktır. Bu bölümde, kullanılan veri setleri, analiz yöntemleri, hesaplama araçları ve diğer deneysel prosedürler hakkında bilgi verilecektir. Üçüncü Bölüm olan sonuçlar ve tartışma kısmında, analiz sonuçları sunulacak ve bu sonuçların biyolojik açıdan anlamları tartışılacaktır. Bu bölümde tezde elde edilen bulgular ayrıntılı bir şekilde sunulacak ve ilgili literatürle karşılaştırılacaktır. Son olarak, sonuçlar bölümünde tez sonuçlandırılacak, temel bulgular özetlenecek ve gelecekte yapılması önerilen deneysel çalışmalar için önerilerde bulunulacaktır. Tartışma ve Öneriler bölümünde tezin genel değerlendirmesi yapılacak ve ileri çalışmalara yönelik çalışmalara yön verilecektir.

BÖLÜM I

LİTERATÜR ÖZETİ

1.1 Ras Proteinlerinin Yapısı

RAS hücre zarının hemen altında yukarı sinyal akış yollarından aldığı iletiyi alt akış yollarına ileten bir anahtar görevi gören küçük bir proteindir (Zeitoni vd.2016). Onkogenik olarak mutasyona uğramış RAS proteinleri GAP'tan bağımsız hale gelerek, aktif GTP'ye bağlı durumdan dinlenme GDP'ye bağlı duruma "kapalı" geçemez ve bu nedenle "açık" konfigürasyonda birikir, guanin değişim döngüsünü bozar, böylece tümör hücresi büyümesiyle sonuçlanan aşağı akış sinyal yollarını aktive eder (Moore vd. 2020).

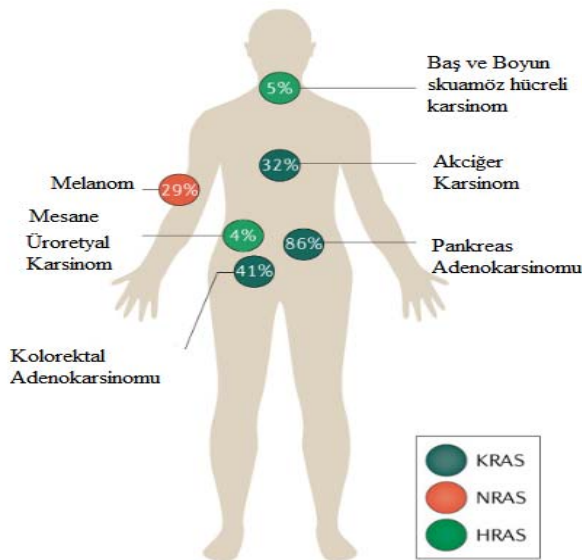


Şekil 1 Ras mutasyonlarının meydana getirdiği nükleotit değişim mekanizması (Zeitoni vd.2016)

RAS proteinlerinin yüzeyinde ilaç bağlayıcı ceplerin bulunmaması nedeniyle eskiden RAS proteinlerinin doğrudan hedeflenmesinin imkansız olduğu düşünülüyordu. (Downward 2015). Bununla birlikte, çeşitli hedefleme stratejilerini belirlemek için büyük çaba sarf edilmektedir;

- (i)Yukarı akış moleküllerini hedefleme (PDE δ , SHP2, ve STK19),
- (ii)RAS proteinlerini doğrudan hedefleme (kimyasal bileşik veya antikor ile),
- (iii)Aşağı akış efektörlerini hedefleme (RAF, MEK, ERK, PI3K),
- (iv)RAS ifadesinin RNA etkileşimi ile,
- (v)RAS mutasyonu ile ilişkili farklı metabolik süreçleri hedefleme (mikropinositoz ve otofaji)
- (vi)sentetik ölümcül etkileşenlerin taranması (Chen vd. 2021).

RAS mutasyonlarının izoformu (KRAS, NRAS veya HRAS), kodonu ve sıklığı doku tipine göre değişir (Haigis vd. 2008). Akciğer karsinomu LUAD, pankreatik karsinom PDAC ve kolorektal karsinomu CRC' nin büyük bir yüzdesi, ağırlıklı olarak bu tümör tiplerinde kodon 12'de meydana gelen KRAS mutasyonları tarafından yönlendirilir (Tsai vd. 2015). Buna karşılık, melanomların %29'u NRAS' da ki mutasyonlar tarafından yönlendirilir ve KRAS' tan farklı olarak bu mutasyonlar kodon 61'de meydana gelir (Burd vd. 2015). HRAS mutasyonları, KRAS veya NRAS' daki mutasyonlardan daha az sıklıkla meydana gelir, ancak baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (HNSCC) ve mesane kanserlerinin bir alt kümesi, HRAS mutasyonları tarafından yönlendirilir ve bu mutasyonlar, kodon 12 veya 61'de meydana gelir (McGrath vd. 1983).



Şekil 2 RAS izoformu (KRAS, NRAS ve HRAS) mutasyonlarının tümör tipleri arasında dağılımı ve her bir tümör tipinde izoforma göre RAS mutasyonunun sıklığı (Moore vd.2020)

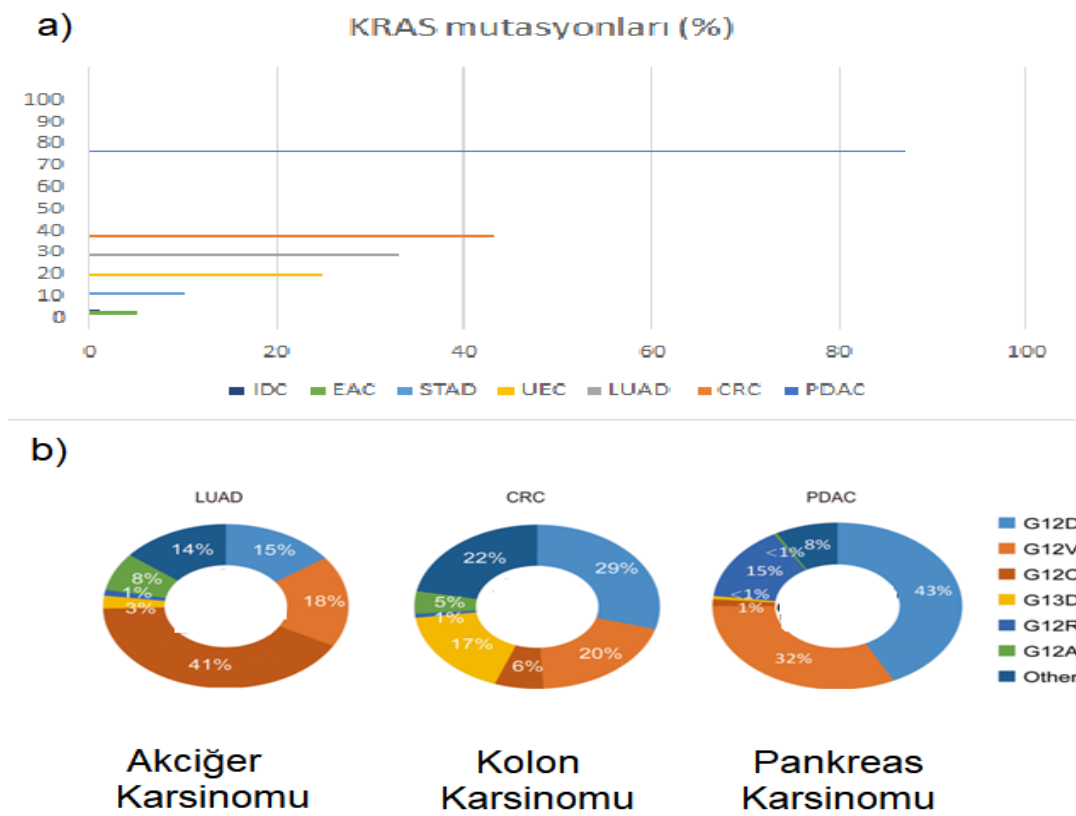
1.1.1 KRAS Mutasyonları Hastalıkları

1982'de Geoffrey Cooper'ın laboratuvarında çalışan iki doktora sonrası araştırmacı Chang ve Der, Kristen Rat Sarcoma Virus ü keşfettiler; kemirgen sarkom virüsü genleri. İnsan KRAS geni, bu iki onkogenin homologudur (Jančík vd. 2010). K-RAS, hücre dışı sinyallere hücrel yanıtı kontrol etmek için hücre içi anahtarlar olarak işlev gören, zarla ilişkili monomerik GTPazlar ailesine aittir (Haigis 2017). Büyüme faktörü stimülasyonuna yanıt olarak K-RAS, guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) tarafından stimüle edilen GTP'ye bağlanarak aktive edilir (Rabara vd. 2019). GTP'ye bağlı K-RAS, aşağı akış sinyalini tetikleyerek efektörlerle etkileşime izin veren yapısal bir konformasyon varsayar (Shui vd.2022). KRAS'ın 12. kodondaki yanlış anlamli mutasyonu, GTPaz aktivitesini zayıflatarak proteini anormal bir şekilde aşırı uyarılabilir bir duruma aktive eder, bu da GTP'ye bağlı aktive edilmiş KRAS'ın birikmesine ve aşağı akış sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur (Bery vd. 2019).

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki CRC vakalarının %45'i ve Çin'deki CRC vakalarının %49'u; ABD'de pankreas duktal adenokarsinomunun (PDAC) %90'ı ve Çin'de %89' u; ve ABD'de akciğer adenokarsinomlarının %35'i (LUAD, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin bir alt tipi) ve Çin'de yaklaşık %13'ü (ABD verileri için Şekil 3) (Wu vd. 2022). KRAS, KRAS geninin seçici olarak eklenmesiyle üretilen KRAS4A ve KRAS4B olmak üzere iki izomere sahiptir (Cao vd. 2020). G12 veya G13'ün genetik değişimi, arginin residue sı hidroliz geçiş durumunun stabilitesini yok eder. KRAS mutasyonlarının dağılımı, farklı insan kanserlerinde değişiklik gösterir; LUAD' ın %41'inde KRAS (G12C) mutasyonu bulunurken, Şekil 3'de gösterildiği gibi KRAS (G12D) ve KRAS (G12V), CRC ve PDAC'de en yaygın iki alleldir (Erlanson ve Webster 2021). Özellikle, G12R gibi diğer KRAS alelleri PDAC'de sınırlıdır. Aslında, tümör tipi KRAS mutasyonları tarafından yönlendirilse de, kodonları ve mutasyonların sıklığı doku tipine göre değişir (Thein, Biter, ve Hong 2021).

KRAS inhibitörlerinin bazen GDP (guanozin difosfat) bağlı halini, bazen de GTP (guanozin trifosfat) bağlı halini hedeflemesinin nedeni, KRAS proteininin aktivasyon mekanizmasından kaynaklanmaktadır. GDP bağlı halini hedefleyen inhibitörler, KRAS 'in inaktif formunu stabilize ederek KRAS' in aktif hale geçmesini önler. Böylece, aşırı hücrel sinyallemeyle ilgili kanser hücre büyümesi ve bölünmesi engellenir (Boudhraa vd. 2020). Diğer yandan, GTP bağlı halini hedefleyen inhibitörler ise KRAS 'in aktif formunu stabilize ederek KRAS 'in sürekli olarak aktif olmasını engeller. Bu da aşırı hücrel sinyallemeyle ilgili kanser hücrelerinin anormal büyümesini kontrol altına almayı hedefler (Donaldson ve Klausner 1994). KRAS inhibitörleri

hem GDP bağılı halini hedefleyerek KRAS 'in inaktif halini stabilize etmeyi hem de GTP bağılı halini hedefleyerek KRAS' in aktif halini kontrol etmeyi amaçlar. Bu şekilde, KRAS proteininin hem aktif hem de inaktif hallerindeki dengesizlikleri düzelterek kanser hücrelerinin kontrolünü sağlamayı hedefler (Taylor 2007). Bu tez kapsamında GDP bağılı inaktif G12D ve aktif GCP ve GNP (analog GTP) bağılı aktif KRAS yapıları incelenmiştir.

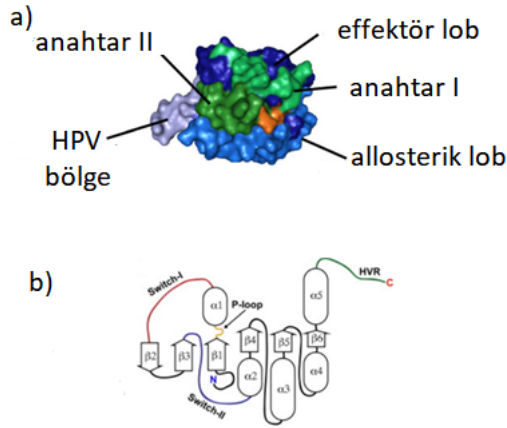


Şekil 3 İnsan kanserinde KRAS mutasyonlarının (a) türleri ve (b) oranı (Zhu vd.2022)

Tanımlanan ilk onkogenlerden biri olmasına rağmen, KRAS proteininin klinik olarak yararlı inhibitörlerini belirlemek için 30 yıllık çaba başarısız olmuştur (Holderfield 2018). KRAS'ın iki özelliği, bir ilaç hedefi olarak izlenebilirliğini güçleştirir:

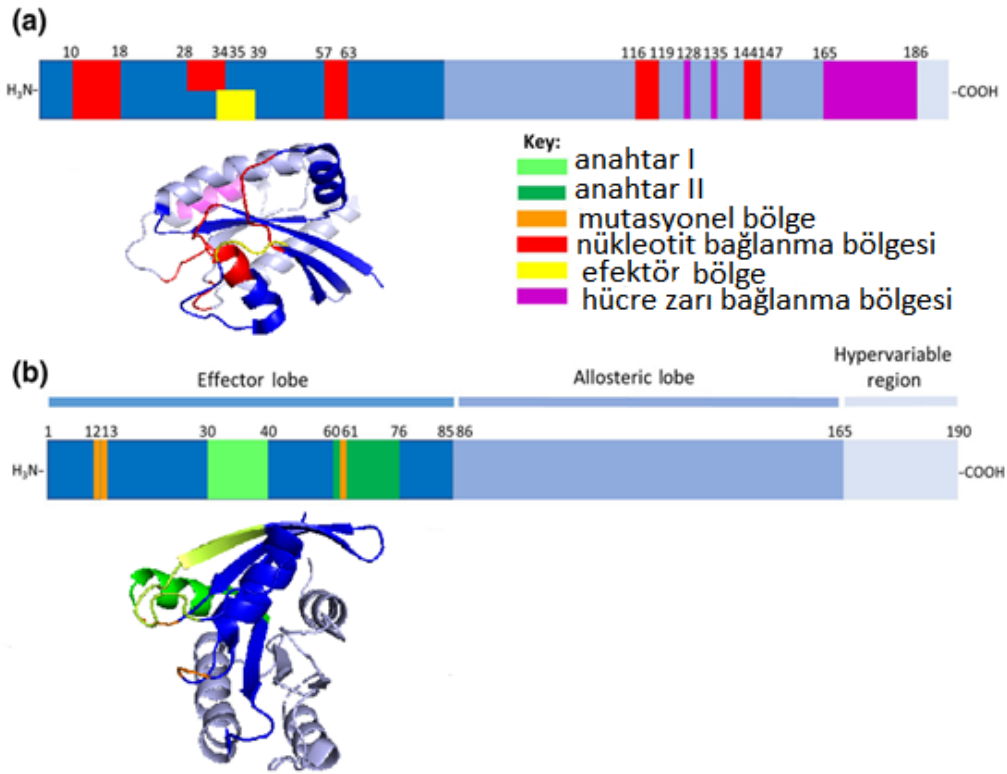
(1) KRAS, GDP ve GTP'ye pikomolar afinite ile bağlanır, nükleotid rekabetçi inhibitörler geliştirme çabalarını ciddi şekilde engeller

(2) KRAS proteini, diğer derin yüzey hidrofobiklerinden yoksundur. Cepler, yüksek afiniteli allosterik inhibitörleri belirleme çabalarını engeller (Cox vd.2015). İlaç geliştirme çabaları başarısızlıklarıyla gölgelenen ve KRAS'ın doğrudan hedef alınmasına yönelik azalan ilgi ile bir dönemi kapatan; yeni, gelişen teknolojiler ve stratejilerle beraber hedefin yeniden canlanmasına tanık oluyoruz (Papke ve Der. 2017).



Şekil 4 KRAS yapısındaki işlevsel bölgeler (a) KRAS G alanı (b) KRAS 5 alfa ve 6 beta sarmalı yapısı (Pantsar 2020).

KRAS 'ın 1-166 residue larında (Şekil4a) oluşan G alanı, GTPaz proteinlerinin biyolojik işlevselliğinin temelini oluşturur (Pantsar 2020). Bu alan, protein çekirdeğini oluşturan ve beş alfa sarmalıyla çevrili altı beta sarmalını kapsar (Şekil4b) (Wittinghofer ve Vetter 2011). Tüm 4a ve 4b deki seçili yapısal bölgeler aşağıdaki renk şemasıyla vurgulanmıştır: P-döngüsü (residue 10–14), turuncu; anahtar-I (residue 30–40), kırmızı; anahtar-II (residue 58–72), mavi; HVR (residue 167–188), yeşil. G alanına ek olarak KRAS, RAS'ı zara tutturmada çok önemli bir rol oynayan hiper değişken bölge (HVR) olarak adlandırılan esnek bir C-terminal yapısal elemanına sahiptir (Hancock, vd 1990). KRAS'ın diğer önemli işlevsel öğeleri, anahtar-I ve anahtar-II olarak adlandırılan anahtar bölgeleridir (Abraham vd. 2010). Bu anahtarlar, efektör proteinlerin yanı sıra RAS düzenleyicileri (GAP'ler ve GEF'ler) için bağlanma arayüzünü oluşturur (Muratçıoğlu ve Acuner 2019). Anahtar-I için residue 30-40'ın, anahtar-II için residue 58-76'nin ve P-döngüsü için residue 10-14 tür (Wittinghofer ve Vetter 2011).



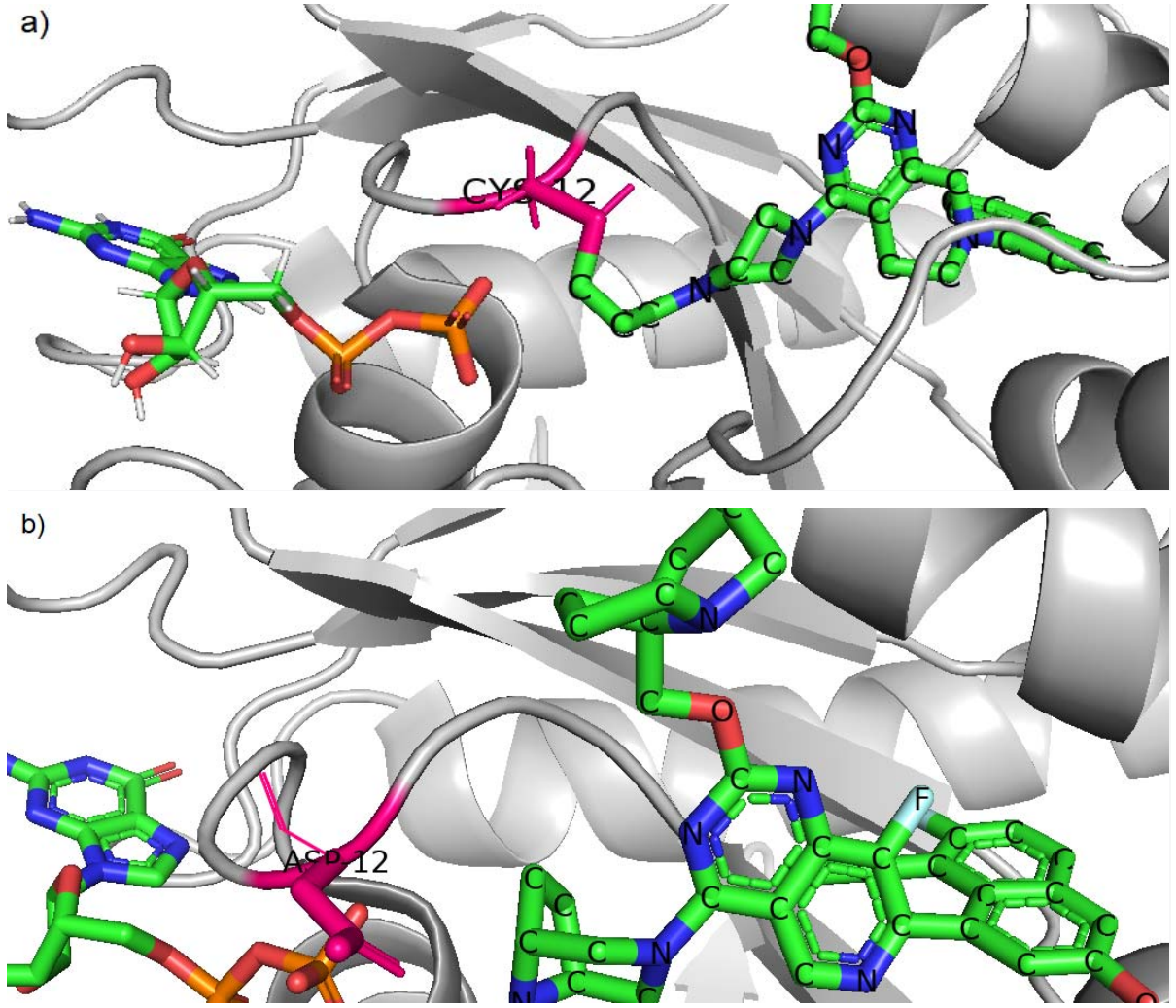
Şekil 5 RAS yapısının 2B ve 3B gösterimi (a) Fizyolojik bağlanma alanları. (b) Belirtilen mutasyonel sıcak noktalar G12, G13 ve Q61 ile önemli yapısal alanlar (anahtar bölgeleri ve loblar, PDB: 4DST).

Ras'taki çoğu onkogenik mutasyon, HRAS, KRAS ve NRAS arasında korunan bir bölgede bulunan G12, G13 ve Q61 residue larında meydana gelir (Şekil 5a). (Maurer vd. 2012) Bunlar, ilk 85 amino asidi içeren ve farklı RAS izoformları arasında tam sekans özdeşliği olan bir bölge olan efektör lob içinde meydana gelir. Anahtar etkileşim bölgelerinin çoğu, nükleotit ve efektör etkileşim bölgelerinin yanı sıra efektör etkileşimlerine aracılık eden geçiş bölgeleri dahil olmak üzere efektör lob içinde meydana gelir (Şekil 5b) (Taveras vd. 1997). Sonraki 80 amino asitte (allosterik lob) %90 benzerlik vardır. Önemli sekans farklılıkları, proteinin aşırı değişken bölge olarak bilinen C terminal ucunda meydana gelir (Schubbert, Shannon, ve Bollag 2007). Bu, çeviri sonrası modifikasyonların meydana geldiği ve zar hedefleme dizilerinin bulunduğu bölgedir. Ras'ın doğrudan farmakolojik hedeflemesine yönelik ilk girişimler, farnesilasyon da dahil olmak üzere bu translasyon sonrası modifikasyonların inhibe edilmesi etrafında toplanmıştır. Bununla birlikte, daha yeni girişimler, daha sonra tartışılacağı gibi, efektör lobu ve bunun içindeki yapıları daha iyi terapötik hedefler olarak kabul etmiştir (Milburn vd. 1990).

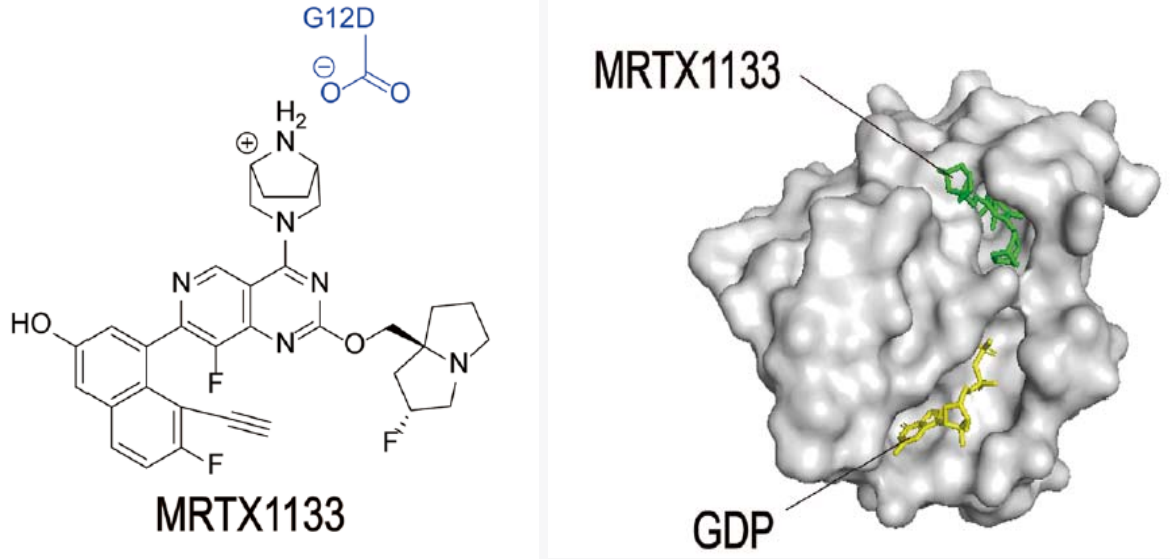
1.1.2. G12D Mutasyonu ve Güncel İlaç Durumu

İndüklenen anahtar II cebini işgal eden geri dönüşümsüz KRASG12C inhibitörlerinin tanımlanması ve müteakip klinik başarısı çok önemli bir buluş olmuştur (Fell vd. 2020). Bununla birlikte, bunların inhibe edici aktivitesi, mutant Cys12 ile kararlı bir kovalent bağ oluşturan reaktif bir savaş başlığına dayanır (Lanman vd.2020). Tersine, KRAS mutant tümörleri arasında en yaygın mutasyon (%33) olan KRASG12D, son denemelerde kanıtlandığı gibi anahtar II cebine bitişik bir reaktif residue dan yoksundur ve bu nedenle seçici inhibitörlerin tanımlanmasına yönelik yeni bir yaklaşım gerektirir (Wang vd. 2021).

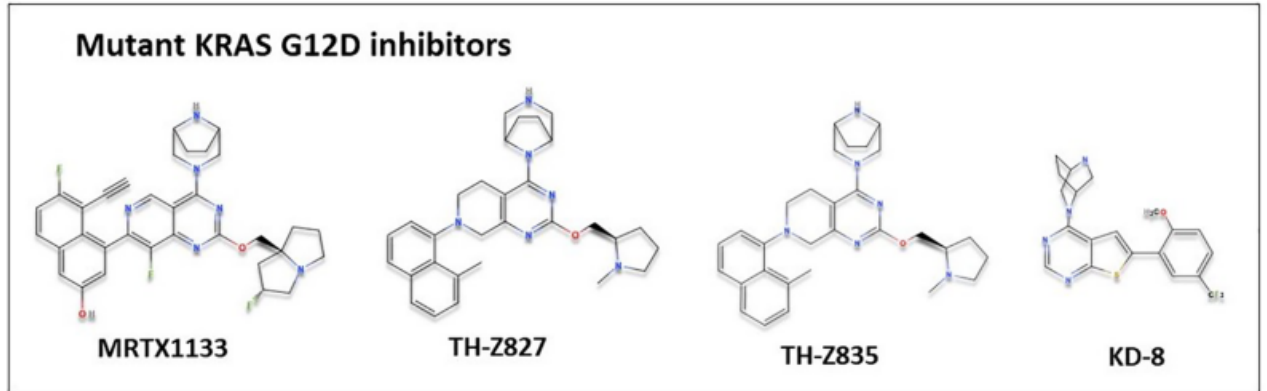
En yaygın onkogenik KRAS mutasyonu olan KRASG12D, solid tümörlerin tedavisi için ümit verici bir hedeftir (Upadhyaya vd. 2015). Bununla birlikte, KRASG12C ile karşılaştırıldığında, KRASG12D'nin seçici inhibisyonu, inhibitörlerin KRASG12D'yi mutant KRAS proteini ile kovalent etkileşimlere olan ihtiyacı ortadan kaldırmak için yeterince yüksek afinite ile bağlama gerekliliği nedeniyle önemli bir zorluk teşkil eder (Sogabe vd. 2017). Burada, kapsamlı bir yapı tabanlı aktivite iyileştirmesiyle keşfedilen ve bir KRASG12D mutant fare tümör modelinde etkili olduğu gösterilen ilk kovalent olmayan, güçlü ve seçici KRASG12D inhibitörü MRTX1133 dir (Sakamoto, Masutani, ve Hirokawa 2020) (Şekil 7 ve 8).



Şekil 6 KRAS a) G12C Kovalent ve b) G12D Non-kovalent Mutant 12.residue Yan Zincirleri Karşılaştırmalı Görselleri



Şekil 7 MRTX inhibitörünün 2D ve 3D yapıları (Wang vd.2021) (PDB 7RPZ)



Şekil 8 Yeni KRAS G12D inhibitörlerinin kimyasal yapıları (Bannoura vd 2022)

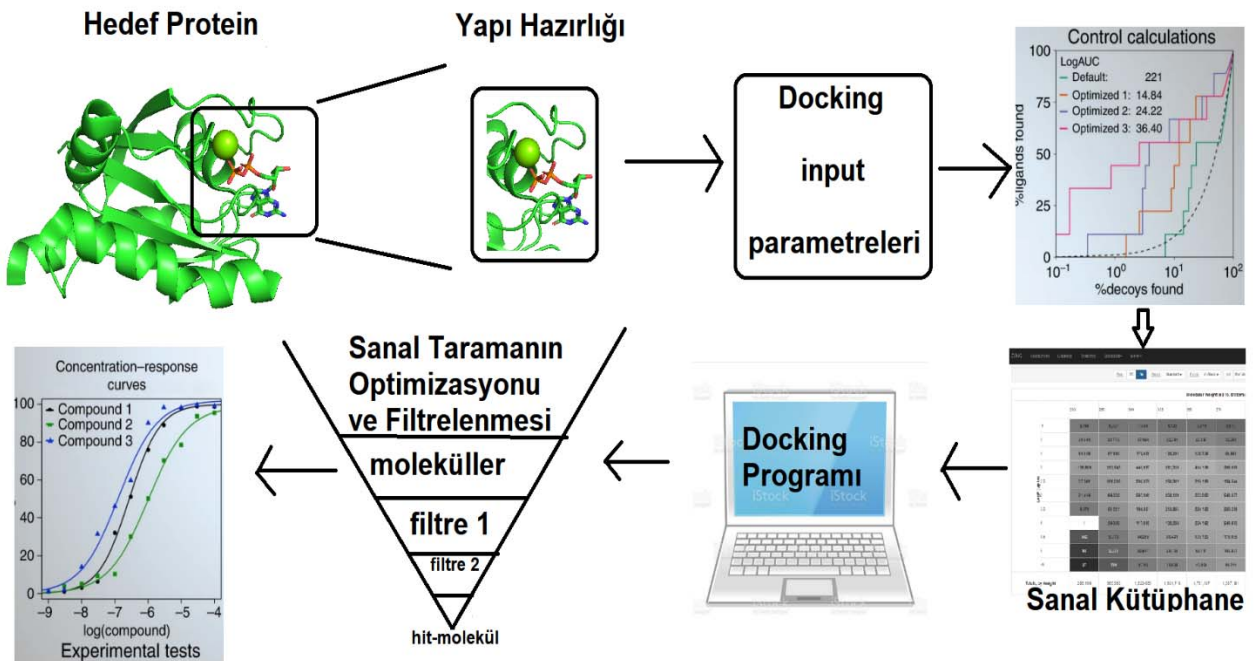
Yeni KRAS inhibitörleri, MRTX1133, TH-Z827, THZ835 ve KD-8 (Bannoura, vd. 2022) (Şekil 8), mutant KRAS G12D'ye spesifik ve kovalent olmayan bir şekilde bağlanarak mutasyona uğramış hücrelerde proliferasyonu inhibe eder (Karnoub ve Weinberg 2008). Bu ajanlar şu anda prelinik geliştirme aşamasındadır ve daha fazla klinik geliştirmeyle ilgili ayrıntılar şu anda bilinmemektedir (Castellano vd. 2013).

1.2 Sanal Tarama ile İnhibitör Keşfi

1.2.1 Moleküler Kenetlenme ve Sanal Tarama

Moleküler kenetlenme teknikleri, bir ligandın bir makromoleküler ortağa en iyi uyan bağlanma modunu tahmin etmeyi amaçlar (burada sadece proteinler dikkate alınır (Huang ve Zou, 2010). Proteinin ligand bağlama bölgesi içinde olası konformasyonların, bir dizi pozlarının üretilmesiyle oluşur. (Ripphausen vd. 2011; Zhu vd. 2013). Bu nedenle deneysel olarak çözülmüş bir yapı veya hesaplama teknikleriyle üretilen bir veridir (Salmaso, 2018).

Sanal tarama, son yıllarda ilaç keşif sürecinin ayrılmaz bir parçası haline geldi (Stahl vd. 2006). Sanal bir ekranın ana amacı, benzersiz bir farmakolojik profil sağlayan yeni kimyasal yapıya sahip isabetler bulmaktır (Muegge ve Oloff 2006). Virtual Screening VS teknolojilerinin kullanımı, doğal ürünlerden biyoaktif moleküllerin tanımlanmasına da yardımcı olmuştur (Rollinger, 2006).



Şekil 9 Sanal Tarama yöntemi iş akışı (Bender vd. 2022)

Biyofiziksel analizler kullanarak kimyasal kitaplıkların taranması, kimyasal biyoloji ve ilaç keşfi için yeni kemo tipleri keşfetmek için uzun süredir baskın yaklaşım olmuştur (Bender vd. 2021). Sanal tarama hazırlığında iki önemli unsura dikkat edilmelidir, bunlardan biri belirlenmiş yapı ve veri tabanı seçimidir (Grygorenko vd. 2020). Önce hedef yapı, kenetlenme için uygun hale getirilmeli ve hedef bağlanma bölgesi kontrol hesaplamaları ile optimize edilmelidir (Trott ve Olson 2010). Son olarak, bir sanal ekranın gerçek başarısı, kenetlenme isabetlerinin deneysel olarak doğrulanması olduğundan, ilk in vitro sonuçları doğrulamak için bir dizi kontrol deneyi de öneriyoruz (Bandyopadhyay vd. 2020).

1.2.2 Hedef Molekül Hazırlığı için Moleküler Dinamik Simulasyon

Moleküler Dinamik Simulasyon (MDS) yöntemi, biyolojik moleküllerin özellikleri ve işlevlerini incelemek için verimli ve kullanışlı bir analitik araçtır (Yan vd. 2023). MDS, klasik mekanik kavramını atomik ve moleküler sistemlere uygulama yöntemidir (Thompson vd. 2022). Klasik mekaniğe göre sistemin toplam enerjisi, atomların konumu, bağlanma modu, potansiyel fonksiyonu ve atomların hızından hesaplanır (Zhai vd.2016). Daha sonra atomun kuvvet alanındaki potansiyel enerji gradyanı toplam enerjiden hesaplanır (Huang vd. 1995). Bir atoma etki eden kuvvetler, atomun konumundaki potansiyel gradyanın negatif değerine eşittir (Van Der Spoel vd. 2005). Atomun hareketinin davranışı, kuvvet alanındaki her bir atom üzerindeki kuvvetler hesaplandıktan sonra Newton'un ikinci yasasına göre uyarlayabilir (Pronk vd. 2013; Abraham vd. 2015).

Deneysel yapının enerji minimizasyonu ve MDS uygulanması ilaca bağlanma potansiyeli olan uygun konformasyonların yakalanması adına önemli bir adımdır (Sinehbaghizadeh vd. 2023). PDB'den alınan deneysel yapı bu amaçla MDS ile incelenerek ara yapılar seçilir (Xu vd. 2019). Sanal tarama yapılmak üzere seçilen hedef molekülün en uygun yapısının seçilmesi ve hazırlığı için moleküler dinamik simulasyon (MDS) aşağıdaki adımları içerebilir:

- Başlangıç Yapısının Hazırlanması: MDS için kullanılacak başlangıç yapısı, molekülün 3D koordinatlarından oluşur (Waldron, Lauricella ve English 2016).
- Atomistik Modelleme: Hedef molekülünün atomik seviyedeki etkileşimlerini tanımlamak için kuvvet alanı parametreleri belirlenir. Kuvvet alanı, molekülün kimyasal bağları, bağ açıları, dönme açıları, elektrik yükleri ve diğer etkileşimler gibi

faktörleri içerir, moleküldeki atomların enerjisini ve hareketini hesaplamak için kullanılır (Duay vd. 2023).

- Simülasyon Parametrelerinin Belirlenmesi: MDS için gerekli olan simülasyon parametreleri belirlenir. Bu parametreler arasında sıcaklık, basınç, süre ve integrasyon adımları gibi faktörler bulunur, bu parametreler optimize edilmelidir (Adedeji vd. 2022).
- Simülasyonun Yürütülmesi: Belirlenen parametrelerle moleküler dinamik simülasyonu yürütmek için uygun bir yazılım kullanılır. Simülasyon boyunca, molekülün atomları arasındaki etkileşimler ve hareketleri zamanla izlenir (Barredo ve Balanay 2023). Simülasyon süresi, molekülün dinamik davranışını anlamak ve hedeflenen özelliklerini incelemek için yeterli olmalıdır (Kohnke, Kutzner ve Grubmuller 2021).
- Sonuçların Analizi: Simülasyon sonucunda elde edilen veriler analiz edilir. Bu analizler arasında molekülün enerji profili, konformasyonel değişimler, protein-ligand etkileşimleri, stabilite ölçütleri ve diğer özelliklerin incelenmesi yer alır (Sinehbaghizadeh vd. 2023). Bu analizler, hedef molekülünün yapısını ve fonksiyonunu daha iyi anlamak için önemlidir (Barredo ve Balanay 2023).

En sık tercih edilen MD simülasyon programları GROMACS ve NAMD programlarıdır (Van Der Spoel vd. 2005). Bu tez çalışmasında da kullanılan GROMACS, Hamilton mekaniği, Langevin ve Brown dinamikleri gibi stokastik dinamikler (SD) ve enerji minimizasyonu (EM) sağlayan biyomoleküllerin dinamik simülasyonu için kullanılan açık kaynak bir programdır (Abraham vd. 2015).

1.2.3 İnhibitör Seti Hazırlama

Sanal taramayı kolaylaştırmak için ek bir önemli adım, ilgili proteinin optimizasyonunu ve entegrasyon için hedefe bağlandığı bilinen uygun ligandların seçimini içerir. Ligandların seçimi, amaçlanan hedeflere bağlı olmalıdır (Daina ve Zoete 2019). Ligandlar, protein-ligand komplekslerinin PDB veri tabanından ve ayrıca ZINC ve/veya PubChem gibi çeşitli ligand depolarını barındıran veri tabanlarından ekstraksiyonu yoluyla elde edilebilir. Ek olarak, ChemsSketch aracı kullanılarak modellenenbilirler (Gaulton vd. 2012). ZINC, biyolojik hedefleri için kimyasal madde arayan araştırmacılar için bir araştırma aracıdır. Tanıtılan moleküllerin özgüllüğünü sağlamak için, seçimi daraltmak amacıyla genellikle filtreler kullanılır (Irwin vd. 2012). Filtreler, net yük, moleküler ağırlık, polar yüzey alanı, çözünürlük, benzerlik eşikleri,

farmakoforlar gibi çeşitli kriterlerin yanı sıra absorpsiyon, dağılım ve toksikolojik özellikleri kapsayabilir (Ghosh vd. 2006). Yaygın olarak kullanılan ligand filtreleme yaklaşımları arasında Lipinski (Kural 5) testi öne çıkmaktadır. Lipinski testi, moleküler ağırlık <500 , LogP (Lipoflite) < 5 , hidrojenik bağ alıcılığı <10 ve hidrojenik bağ vericisi <5 gibi parametreleri kullanarak kitaplık filtrelemeye izin verir (Chen vd. 2016). Araştırma konusu için Lipinski kuralına göre filtrelenen moleküllerin özgüllüğünü artırmak ve kütüphane tarama sürecini hızlandırmak için alternatif bir strateji, moleküler parmak izi tekniklerinin uygulanmasını içerir (Salentin vd. 2014). Moleküler parmak izleri, küçük moleküllerin özelliklerini kodlar ve bit dizisi karşılaştırmalarını kullanarak benzerliklerinin hesaplamalı değerlendirmesini sağlar (Sastry vd. 2013). Benzer yapılara sahip moleküller genellikle benzer biyolojik aktiviteler sergiler. Moleküler parmak izi yöntemleri kullanılarak, aynı hedefe karşı benzer biyolojik aktivite gösterme olasılığı daha yüksek olan ek bileşiklerin tanımlanması mümkün hale gelir (Cereto-Massagué vd. 2015). Bu yaklaşım, Open Babel, RDKit veya KNIME gibi yazılım araçları kullanılarak yürütülebilir. Open Babel, moleküllerin farklı dosya formatları arasında dönüştürülmesi, moleküler mesafelerin veya benzerliklerin hesaplanması ve enerji minimizasyonu dahil olmak üzere bir dizi kemi informatik görevi gerçekleştirme yeteneğine sahip çok yönlü bir programdır (O'Boyle vd. 2011). RDKit, kimyasal verilerin okunmasını ve yazılmasını, moleküler ağırlık ve polar yüzey alanı gibi kimyasal özelliklerin ölçülmesini, kimyasalların farklı izomerlerinin üretilmesini ve daha fazlasını kolaylaştırır (Muegge vd.2016). Hesaplamalı kimya için tasarlanmış açık kaynaklı bir yazılım paketidir. KNIME, kimyasal verilerin analizi için birden çok yazılım aracını entegre eden; veri alma, işleme, yazma ve analiz gibi çeşitli işlevleri kapsayan açık kaynaklı bir platformdur. İçerdiği araç setine RDKit paketleri, OpenBabel, LigandScout ve Pharmacelera dahildir (Berthold vd. 2008).

KRAS, kanser için iyi belgelenmiş bir terapötik hedeftir, yaşamı tehdit eden çeşitli malignitelerde yaygın olarak görülür (Hakeem 2023). İlaç keşfi ve klinik öncesi araştırmalarda, virtual screening zaman, maliyet ve kaynak gereksinimlerini önemli ölçüde azaltmak için potansiyel olarak etkili bir araçtır (Liu vd.2021). Taramanın birincil amacı, en umut verici biyolojik aktiviteye sahip yeni isabetleri belirlemek için kimyasal bileşik veri tabanlarını araştırmaktır (Fathima vd. 2018). Hazırlanan ZINC20 kütüphanesini KRAS aktif sitesine karşı taramak için kullandık. Bunu takiben, daha düşük bağlanma enerjisi değerlerine dayalı olarak en kararlı kompleksi belirlemek için kapsamlı bir etkileşim analizi ve görsel inceleme gerçekleştirdik.

BÖLÜM II

MATERYAL VE METOT

2.1 KRAS inhibitörleri için güncel bilgilerin eldesi

Güncel KRAS proteinlerine ait yapı verileri, UniProt veri tabanından elde edildi. Çalışmamızda UniProt uygulamasında insan KRAS proteinleri filtrelendi, öncelikle klinik faz araştırmaları başarıyla tamamlanmış ilaçlar incelendi. Bu ilaçlarla ilgili bilgiler toplandı ve yapı olarak 223 adet PDB kodu içeren yapılarımızı içeren bir Microsoft Office Excel dosyası oluşturuldu. Excel dosyasının formatı şu şekildedir: Her yapının PDB kodu, deneysel yöntemi, çözünürlük değeri, zincir bilgileri, pozisyonları, ligand isimleri ve kimlikleri, ilgili makalenin linkleri yer almaktadır. Ayrıca, yapının mutant veya mutant olmayan olup olmadığına ve eğer mutasyon içeriyorsa mutasyon adına göre ayrımlar yapıldı. Doğal partner veya inhibitör içerip içermediğine bağlı olarak yapılar kategorilere ayrıldı. Dosyanın içerdiği veriler farklı Excel sayfalarında kodonlarda mutasyon bulunan yapılar ve sadece GDP veya GTP ile türevleri bulunan PDB yapılarına göre ayrıldı. Sonuç olarak, KRAS G12A, G12C, G12D, G12V, G13D ve diğer mutasyonları barındıran yapılar için ayrı excel sayfaları ve tablolar oluşturuldu. Bu tablolarda PDB kodu, içerdikleri nükleotid türü, doğal partner ve inhibitör bilgileri (varsa) yer almaktadır.

2.2 Sanal Tarama

2.2.1 Moleküler Dinamik Simülasyon ile hedef hazırlığı

Kenetlenme çalışmalarını gerçekleştirmek için kullanılacak reseptörün doğal (fizyolojik koşullardaki) yapısını elde etmek için 7RPZ kodlu PDB yapısı GROMACS üzerinden MD simülasyona tabi tutuldu. İlk olarak 7RPZ PDB koduna sahip yapıdan su molekülleri ve MRTX-1133 inhibitörü çıkarıldı. CHARMM36 kuvvet alanı seçildi ve 7RPZ_processed.gro, topol.top, posre.itp dosyaları elde edildi. Proteinin yerleştirileceği kutu için kübik kutu tercih edildi ve kutu solvatlandı. Sonrasın proteini yüksüz duruma getirmek için iyonlar eklendi. Enerji

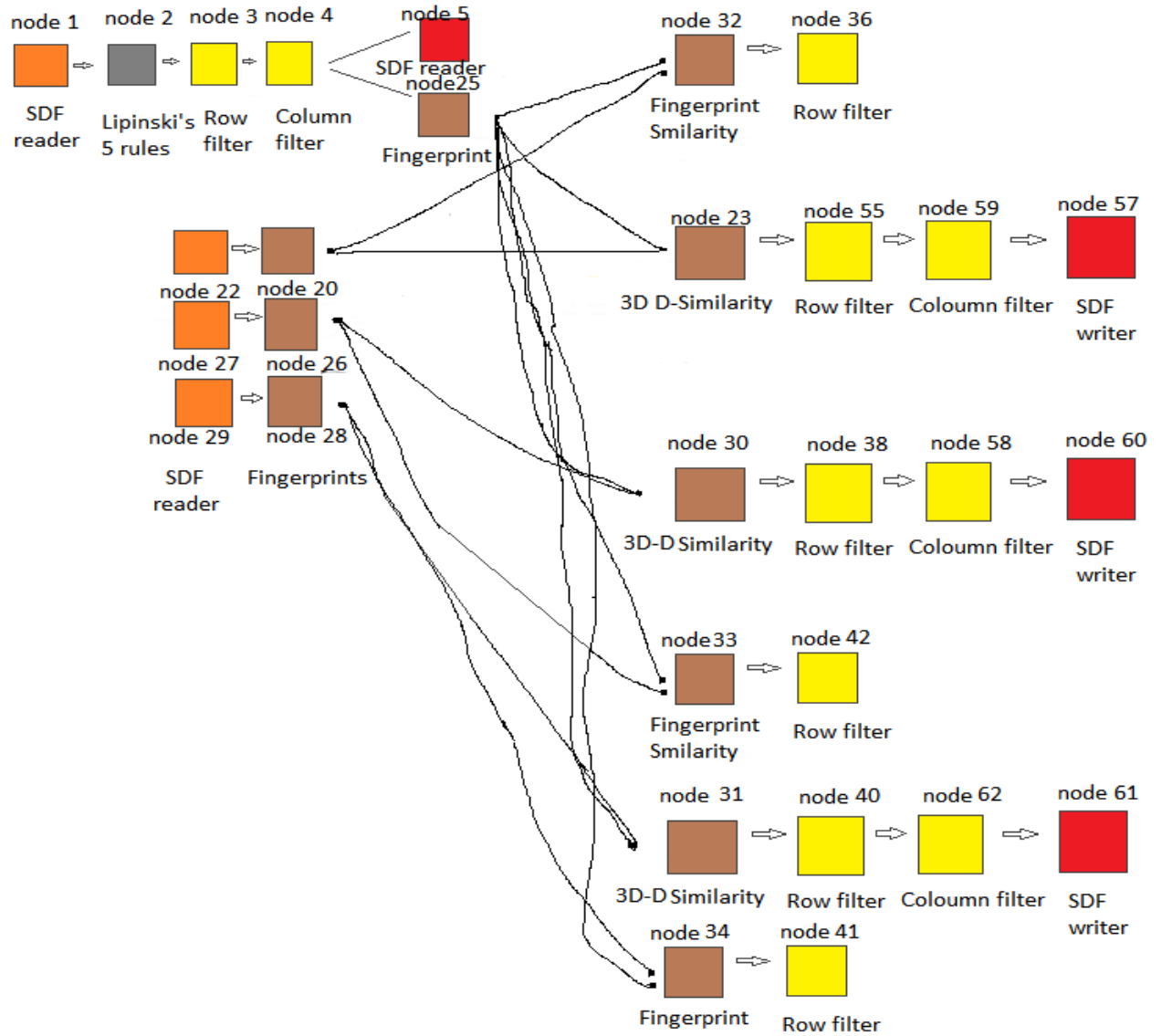
minimizasyonu da gerçekleştirildikten sonra sıcaklık ve basınç dengelemesi yapıldı. MD süreci için 200 ns'lik simülasyon süresi belirlendi. Bu süreç için md.mdp dosyasında adım boyutu (dt) 0.002 (2 fs) olarak, toplam adım (nsteps) ise 100000000 (200000 ps, 200 ns olarak) olarak belirlendi ve simülasyon gerçekleştirildi.

Simülasyon sonucunda kenetlenme yapılacak yapıyı elde etmek için yörünge ve gro dosyaları kullanılarak (md_0_1_noPBC.xtc ve md_0_1.gro) 125'inci nano saniyeden yapı koordinatları alındı ve pdb dosya formatında kaydedildi. Bu işlem için GROMACS'ın kendi içerisinde yer alan "gmx trjconv" fonksiyonu kullanıldı. Son olarak elde edilen pdb yapısı pdbqt formatına dönüştürüldü.

2.2.2 İnhibitör hazırlığı

Çeşitli hedef proteinlerinin ve kenetlenme programlarının çalışmalarını içeren kapsamlı bir araştırma yapıldı ve bu çalışmalar kapsamında günümüze kadar K-Ras hedefli sanal tarama çalışmaları incelendi. İnceleme sonrası kenetlenecek olan moleküller için ZINC20 veri tabanının kullanılmasına karar verildi. ZINC20 veri tabanının Tranches bölümünde filtreleme için; 3 boyutlu, Reactivity kısmında Standart, Purchasability kısmında In-Stock, pH kısmında Reference, Charge kısmında -2 (L), -1 (M), 0 (N), +1 (O), +2 (P) seçenekleri seçildi. Moleküller sdf formatında ve wget metoduyla indirildi. İndirilen dosyanın içerisinde bulunan .gz uzantılı dosyalar ayıklandı. Elde edilen sdf dosyaları tek bir sdf dosyasında obabel -i sdf -o sdf -O toplu.sdf kodu kullanılarak birleştirildi. Moleküller arasında eleme ve filtreleme yapılması için KNIME programı tercih edildi. KNIME programında toplu sdf dosyası önce SDF Reader aracına yüklendi. Daha sonrasında SDF Reader aracı Lipinski Rule of Five aracına bağlandı ve moleküllere Lipinski kuralı uygulandı. Row Filter aracı ile Lipinski sonuçlarının bulunduğu satırlar filtrelendi ve 0-5 değerleri arasında değer alabilen moleküller arasından 0 yani Lipinski'nin 5 kuralına da uygun olan moleküller seçildi. Column Filter düğümü kullanılarak Lipinski değerlerinin bulunduğu kolon çıkarıldı ve molekül bilgilerinin bulunduğu kolon elde edildi. Lipinski kuralı ile elenen moleküller SDF Writer düğümü ile birlikte sdf formatında dışarı aktarıldı. Kurala uyan moleküller Fingerprint düğümüne aktarıldı. Default (bit vektör) seçeneği ile moleküllerin parmak izleri çıkartıldı. Bu moleküller 3 boyutlu benzerlik arayışı için 3D-D Similarity düğümü ile parmak izi karşılaştırmasına tabi tutuldu. Bu karşılaştırma sürecinde 2 ayrı setten gelen veriler kullanıldı. Bu verilerden ilki Lipinski kuralı uygulanan veri seti iken diğer veri setimiz ise pozitif kontrol olarak belirlenen MRTX-1133, TH-Z827 ve TH-

Z835 moleküllerinin parmak izi verileriydi. Pozitif kontrolde kullanılan moleküllerin parmak izi verileri içinde aynı şekilde SDF Reader düğümünde başlayıp Fingerprint düğümüne giden akış kullanıldı. 3D-D Similarity düğümünden elde edilen veriler daha sonrasında Row Filter düğümü ile birlikte TH-Z827 ve TH-Z835 moleküllerinde 0.9, MRTX-1133 molekülü için 0.85 olarak belirlenen eşik değerine göre filtrelendi. Filtrelenen moleküller sonrasında Row Filter ve Column Filter düğümlerine aktararak, moleküllerin bilgilerinin bulunduğu kolonlar SDF Writer düğümü kullanılarak sdf formatında elde edildi.



Şekil 10 Sanal Tarama KNIME İş Akışı Şeması

KNIME programında gerçekleştirilen işlemler Şekil 10'da bulunmaktadır. Moleküllerin bulunduğu sdf dosyası Open Babel ile obabel ligands/*.sdf -O ligands_converted.pdbqt komutu kullanılarak pdbqt formatına dönüştürüldü.

2.2.3 Moleküler Kenetlenme

Kenetlenme işlemi için AutoDock Vina yazılımı tercih edildi. MD simülasyon sonunda elde edilen reseptörün bağlanma bölgesini belirlemek için Chimera programında kutu hazırlığı gerçekleştirildi. Hazırlık sonucunda x merkezi = 38.9205, y merkezi = 27.5783, z merkezi = 28.1771 ve x büyüklük = 29.4285, y büyüklük = 23.5747, z büyüklük = 21.1543 olarak belirlendi. AutoDock Vina programıyla molekül kütüphanesindeki ligandların hedef proteine kenetlenmesi için herkese açık bir komut dosyası kullanıldı. Dosyanın içeriği şu şekildedir;

```
vina=/usr/bin/vina
if (( $# != 5 )); then
    echo "Usage: ./dock.sh vina.conf receptor.pdbqt lig_pdbqt_folder
out_folder log_folder"
exit 1
fi
conf=$1 # vina configuration file
rec=$2 # receptor file
pdbqt_folder=$3 # folder containing all ligands
out_folder=$4 # folder for docking results
log_folder=$5 # docking for docking logs
for lig in `ls $pdbqt_folder/*.pdbqt`
do
    echo "docking"$f"..."
    ligname=`basename $ lig cut -d. -f1
out=$out_folder/$ligname ".out"
log=$log_folder/$ligname ".log"
$vina--cogfig $conf--receptor$rec--ligand$lig--out$out--log$log
done
```

Burada receptor.pdbqt dosyası MD simülasyonu sonucunda elde edilen ve kenetlenme için hazırlanmış hedef proteindir. ligs_pdbqt_folder dosyasında ise kontrol molekülleri ile beraber sanal tarama sonucu elde edilen toplam 122 molekül bulunmaktadır. vina.conf dosyası konfigürasyon dosyası olup bu dosyaya hazırlanan kutunun bilgileri girildi ve bağlanma taraması kapsama değeri 8, enerji aralığı -3 ve pozlama sayısı 9 olarak belirlendi. Sanal tarama aşaması sonucunda belirlenen moleküller ve kontrol molekülleri ile oluşturulan ligand kütüphanesine kenetlenme işlemi uygulandı ve her bir ligand için out ve log dosyaları elde edildi.

BÖLÜM III

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

BULGULAR

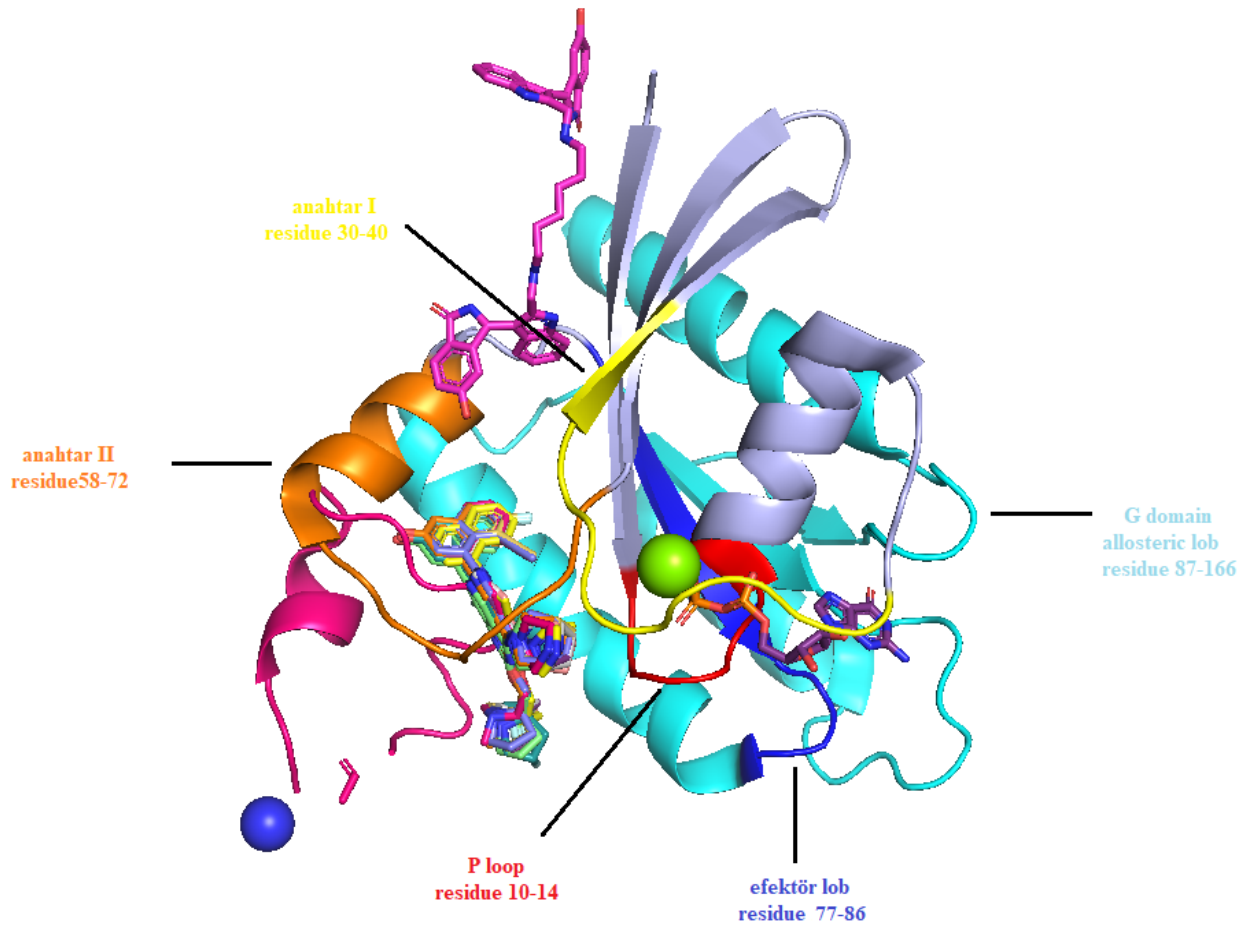
3.1 KRAS Mutantları için güncel bilgiler

Literatür taraması sonucunda, toplamda 224 adet KRAS yapısı bulunmuştur, bunlardan 223 tanesi PDB formatında, 1 tanesi ise AlphaFold yapısıdır. GDP nükleotidi sadece içeren yapılar 43 adetken, GTP ve analogları sadece içeren yapılar ise 37 adettir. KRASG12A mutasyonuna sahip olan yapılardan 5 adet mevcuttur, KRASG12C mutasyonuna sahip olan yapılardan ise 52 adet bulunmaktadır (Tablo 1). Ayrıca, KRASG12D mutasyonuna sahip 37 yapı, KRASG12V mutasyonuna sahip 13 yapı, KRASG13D mutasyonuna sahip 5 yapı ve diğer mutasyonları içeren toplamda 37 yapı mevcuttur.

Bu tez çalışması kapsamında sadece G12D mutasyonuna ait yapılar incelenmiştir. Bu yapılar arasında hem GDP hem inhibitör bulunduran yapılar 13 adettir (Şekil 10). Yapısında hem GTP ve analogları hem inhibitörleri bulunduran yapılar 8 adettir (Şekil 11 ve Şekil 12). Bağlanma bölgeleri residue ları Anahtar I için Asp30–Tyr40 (Asparajin L-Tyrosine) ve anahtar II için Thr58–Met72 (Treonin ve Metionin) dir.

Tablo1 G12D inaktif (GDP bağı) ve aktif (GNP/GCP) bağı yapılar

Mutasyon Türü	Nükleotit	Bağı Yapı	PDB Kodu
G12D	GDP	İnhibitör	5XCO,6ZL5,7ACQ,7EW9,7EWA,7EWB,7RPZ,7RT1,7RT2,7RT3,7RT4,7RT5,7T47
	GTP Analogları	İnhibitör	5UFQ,6WGN,5OCG,7ROV,6GJ5,6GJ7,6GJ8,7ACA



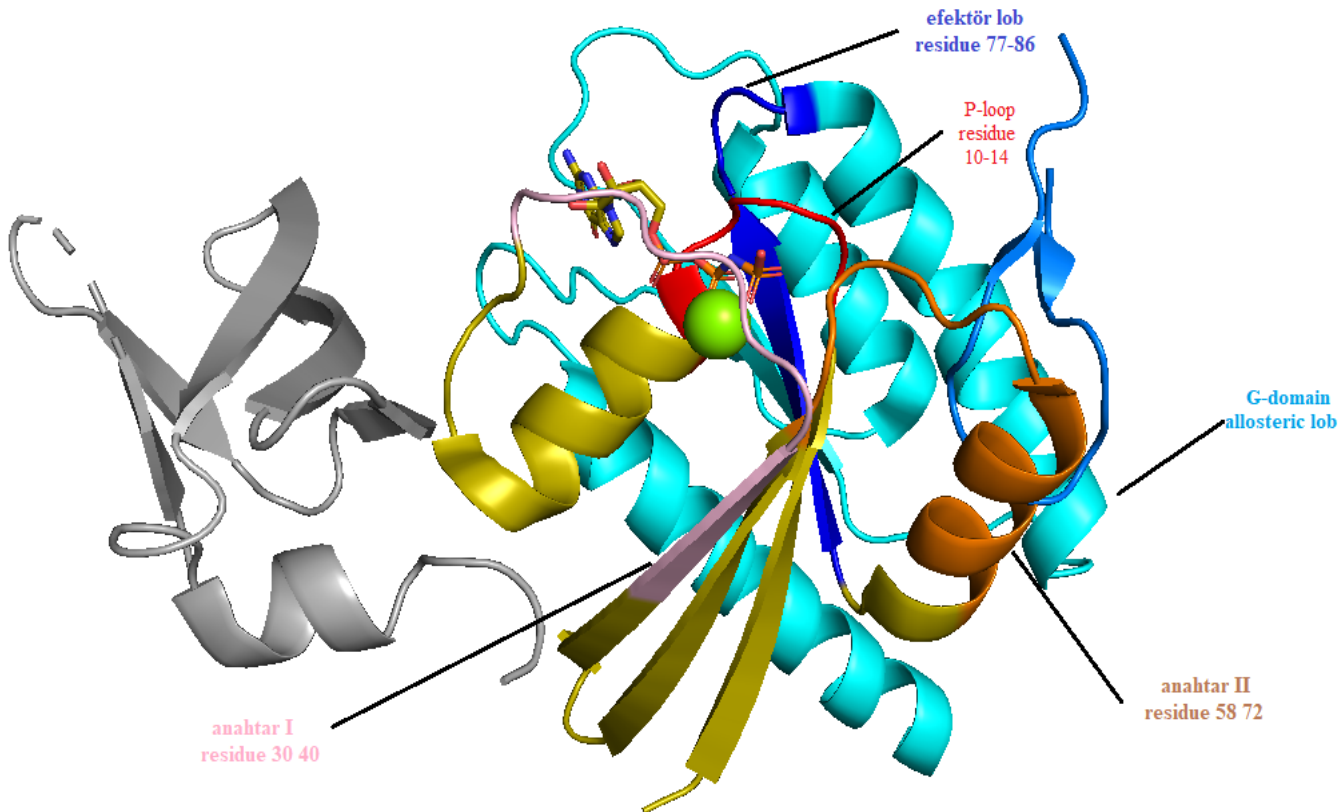
Şekil 11 KRASG12D Mutasyonuna Ait Yapısında GDP Bulunduran ve İnhibitör Bağı Yapılar. KRAS yapısı, GDP nükleotidi ve magnezyum iyonu (mavi ve yeşil küreler) 7T47 PDB koduna sahip yapıya aittir. KRAS'a bağı yapılar inhibitörler (5XCO, 6ZL5, 7ACQ, 7EW9, 7EWA, 7EWB, 7RPZ, 7RT1, 7RT2, 7RT3, 7RT4, 7RT5, 7T47). Şekilde bağlanma bölgeleri sırasıyla **P-loob**, **anahtar I**, **anahtar II**, **efektör lop**, **allestorik lob** renklendirilerek

gösterilmiştir. KRAS G12D GDP bağlı yapı inhibitörlerinin hedef bölge bilgileri Tablo 2 de belirtilmiştir. Gözlemlerimiz sonucu küçük ligantlar genellikle p-loob, anahtar I ve allosterik bölgelerine bağlı olduğunu görebiliyoruz. Ortak ve en çok bulunan residuoların G13, G15, D30 ve N116 olduğu gözlemlenmektedir. KRAS genindeki Glisin 13 ve 15 residüsü, Aspartik asidi D 30 ve Asparagin'i N116 KRAS proteininin aktivasyon sürecinde önemli bir role sahiptir. KRAS proteininin normal işlevi, hücre sinyal iletiminde yer almak ve hücre büyümesi ile bölünmesini düzenlemektir. Aktive olmayan (GDP bağlı) KRAS proteininin, hücresel sinyal iletiminde önemli bir noktada kalmasını sağlar. Aktivasyon, GDP'nin yerine GTP'nin bağlanmasıyla gerçekleşir ve bu durumda KRAS proteininin hücresel sinyal iletiminde aktif bir rol oynaması sağlanır.

Tablo 2 KRAS G12D mutasyonuna ait yapısında GDP bulunduran ve inhibitör bağlı yapıların residue adı, numarası ve bağlı olduğu bölge

Ligand PDB ID	KRAS GDP bağlı inhibitörlerin residue adı, numarası ve bağlı olduğu bölge				
	P-loob	anahtar I	anahtar II	efektör lob	allosterik lob
5XCO	G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	V 29 D 30 T 35	-	-	N 116 K 117 D 119 A 146
6ZL5	G 15 K 16 S 17 A 18	D 30	-	-	N 116 D 119 A 146
5OCG	G 15 K 16 S 17 A 18	D 30	-	-	N 116 D 119
7EW9	D 12	-	-	-	H 95
7EWA	G 15 K 16 S 17 A 18	V 29 D 30	-	-	N 116 D 119 A 146
7EWB	G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	V 29 D 30	-	-	N 116 K 117 D 119 A 146 K 147
7RPZ	G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	D 30	-	-	N 116 D 119 A 146

7RT1	G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	D 30	-	-	N 116 D 119 A 146 K 147
7RT2	V 14 G 15 K 16 S 17 A 18	V 29 D 30	-	-	N 116 D 119 A 146
7RT3	G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	V 29	-	-	N 116 D 119 A 146
7RT4	G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	D 30	-	-	N 116 K 117 D 119 A 146 K 147
7RT5	G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	-	-	-	N 116 D 119 A 146

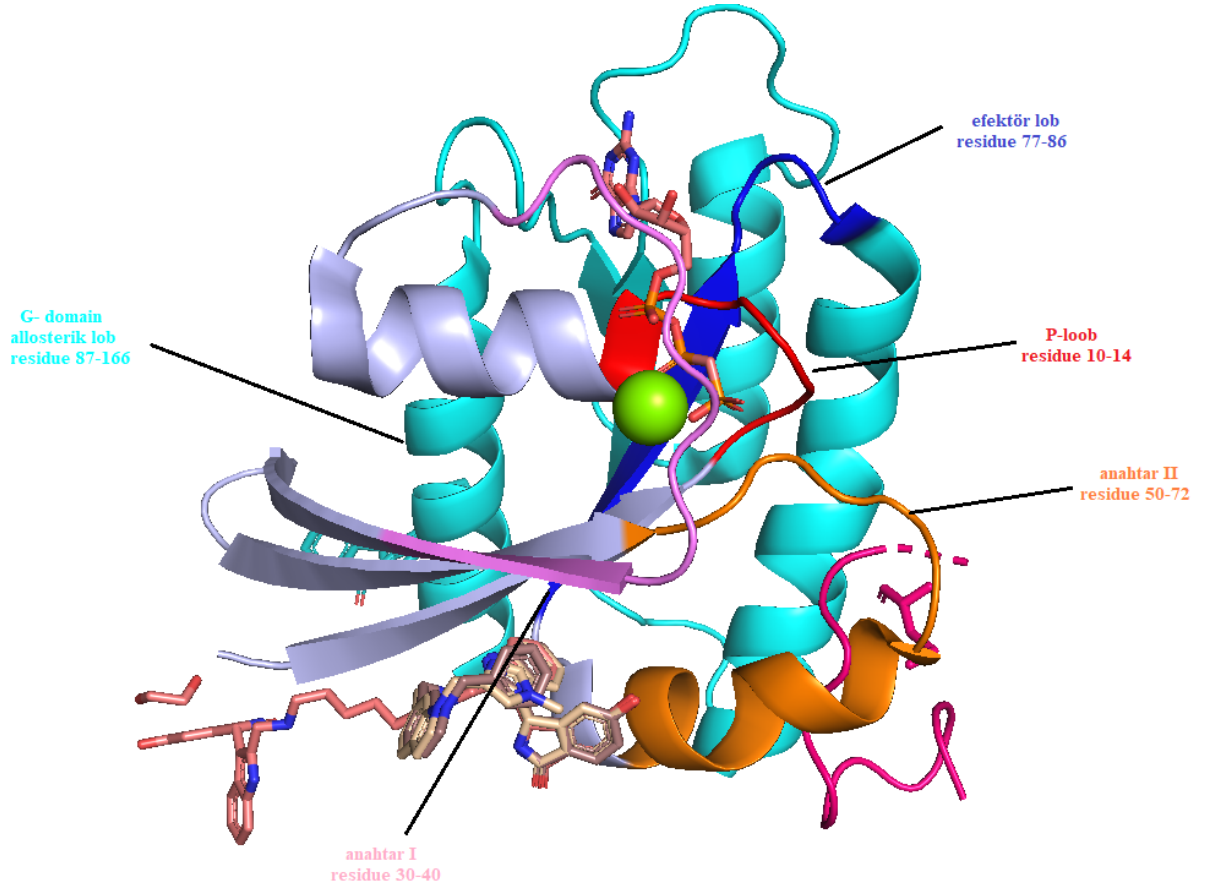


Şekil 12 KRASG12D Mutasyonuna Ait Yapısında GNP (GTP analogu) Bulunduran ve İnhibitör Bağlı Yapılar. KRAS yapısı, GNP nükleotidi ve yeşil küre magnezyum iyonu 5OCG

PDB koduna sahip yapıya aittir. Kras'a bağlı yapılar inhibitörler (5UFQ, 6WGN, 5OCG) dir. Şekilde bağlanma bölgeleri sırasıyla **P-loob**, **anahtar I**, **anahtar II**, **efektör lob**, **allestorik lob** renklendirilerek gösterilmiştir. Kras G12D GNP bağlı yapı inhibitörlerinin hedef bölge bilgileri Tablo 3 de belirtilmiştir.

Tablo 3 KRAS G12D mutasyonuna ait yapısında GNP (analog GTP) bulunduran ve inhibitör bağlı yapıların residue adı, numarası ve bağlı olduğu bölge

Ligand PDB ID	KRAS GNP (analog GTP) bağlı inhibitörlerin residue adı, numarası ve bağlı olduğu bölge				
	P-loob	anahtar I	anahtar II	efektör lob	allosterik lob
5UFQ	D 12				N 116
	G 15				K 117
	K 16	V 29	G 60	-	D 119
	S 17	T 35			A 146
	A 18				
6WGN	G 13				N 116
	G 15				
	K 16	V 29	T 32	-	D 119
	S 17	D 30			A 146
	A 18				
5OCG	V 14				
	G 15	V 29			N 116
	K 16	D 30	G 60	-	D 119
	S 17	T 35			A 146
	A 18				



Şekil 13 KRAS G12D Mutasyonuna Ait Yapısında GCP (GTP analoğu) Bulunduran ve İnhibitör Bağlı Yapılar. KRAS yapısı, GCP nükleotidi ve yeşil küreli magnezyum iyonu 7ACA PDB koduna sahip yapıya aittir. Kras'a bağlı yapılar inhibitörler (7ROV, 6GJ5, 6GJ7, 6GJ8, 7ACA) dir. Şekilde bağlanma bölgeleri sırasıyla **P-loob**, **anahtar I**, **anahtar II**, **efektör lob**, **allestorik lob** renklendirilerek gösterilmiştir. Kras G12D GCP bağlı yapı inhibitörlerinin hedef bölge bilgileri Tablo 4 de belirtilmiştir.

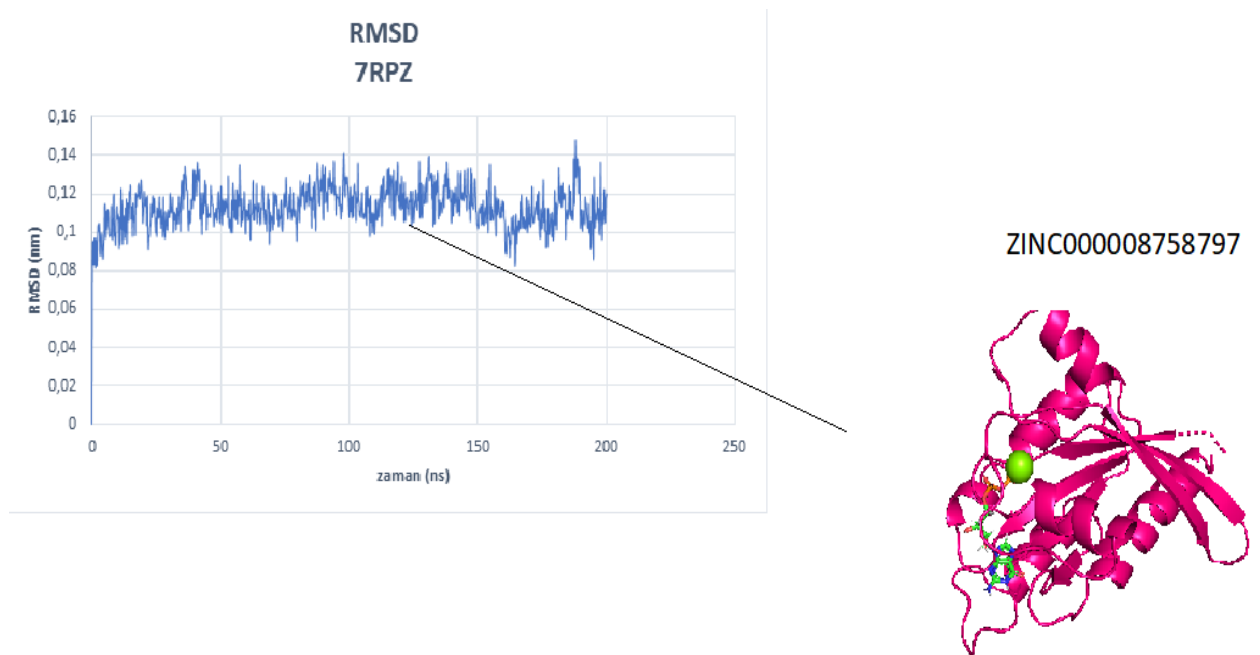
Tablo 4 KRAS G12D mutasyonuna ait yapısında GCP (analog GTP) bulunduran ve inhibitör bağı yapıların residue adı, numarası ve bağı olduğu bölge

Ligand PDB ID	KRAS GCP (analog GTP) bağı inhibitörlerin residue adı, numarası ve bağı olduğu bölge				
	P-loob	anahtar I	anahtar II	efektör lob	allosterik lob
7ROV	D 12 G 15 K 16 S 17 A 18	-	-	-	N 116 K 117 D 119 A 146 K 147
6GJ5	D 12 G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	V 29 D 30 T 35	G 60	-	N 116 D 119 A 146
6GJ7	A 12 G 13 G 15 K 16 S 17 A 18	V 29 D 30 T 35	G 60	-	N 116 D 119 A 146
6GJ8	A 12	G 37 S 39	-	-	-
7ACA	G 15 K 16 S 17 A 18	V 29 D 30 T 35	G 60	-	N 116 D 119 A 146

3.2 Sanal Tarama

3.2.1. Hedef KRAS yapısı

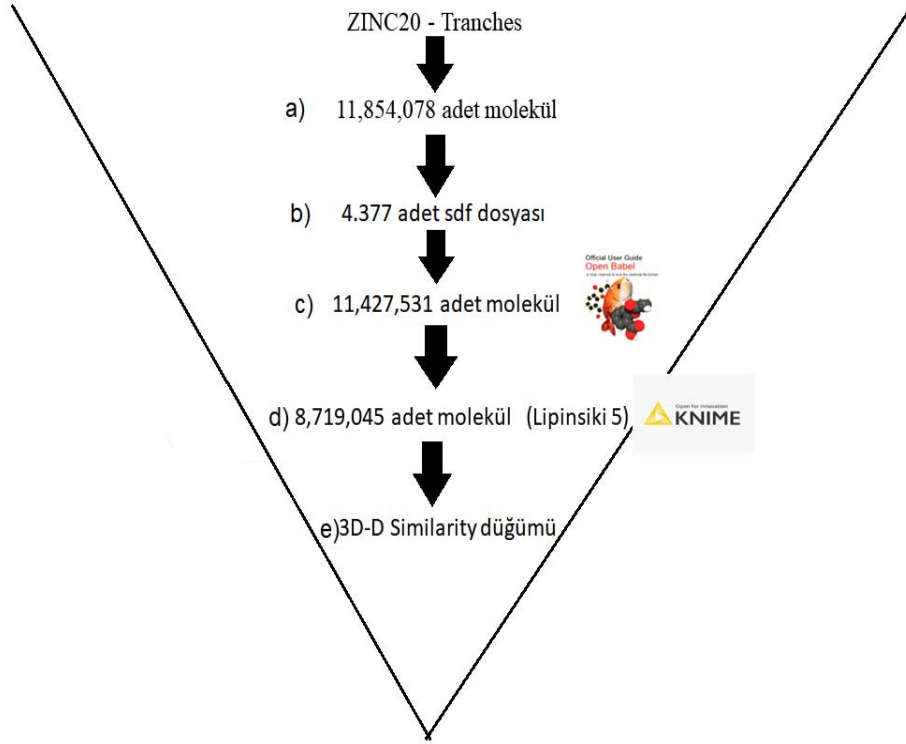
Moleküler dinamikler simülasyon, ligand-KRAS'ın stabilitesini değerlendirmek için kullanılmıştır. Yapılan 200 ns uzunluğundaki MDS RMSD sonucuna göre 125. ns'deki dengelenmiş yapı seçilmiştir.



3.2.2 İnhibitör seti

ZINC20 veri tabanında Tranches kısmında yapılan filtreleme sonucunda 11,854,078 protomer indirildi. Dosyalar ayıklandıktan sonra 4.377 sdf dosyası ve bu sdf dosyalarının içerisinde de farklı sayılarda moleküller elde edildi. Hepsi Open Babel programı ile tek bir sdf dosyasında birleştirildikten sonra 11,427,531 molekül elde edildi. KNIME programında moleküller Lipinski'nin 5 kuralına tabi tutulduktan sonra ise toplamda 8,719,045 molekül elde edildi. Bu moleküller, pozitif kontrol molekülleriyle beraber 3D-D Similarity düğümüne tabi tutulduktan sonra; TH-Z827

molekölü ile 27, TH-Z835 molekölü ile 16 ve MRTX-1133 molekölü ile 75 adet moleköl elde edildi. Sanal tarama aşaması sonunda 118 moleköl, pozitif kontrol (3) MRTX-1133, TH-Z835, TH-Z827 ve negatif kontrol (1) DMSO molekülleri ile beraber toplamda 122 moleköl kenetlenme aşaması için elde edildi.



Toplam 112 moleköl eldesi

Şekil 14 Sanal Kütüphaneden İnhibitör Setinden Moleküler Kenetlenme Aşaması için Elde Edilen Moleküllerin Desicion Tree Gösterimi a) ZINC20 veri tabanında filtreleme sonucunda dosyalar indirildi. b) Dosyalar ayıklandıktan sonra sdf dosyası ve bu sdf dosyalarının içerisinde de farklı sayılarda moleküller elde edildi. c) Hepsi Open Babel programı ile tek bir sdf dosyasında birleştirildi. d) KNIME programında moleküller Lipinski'nin 5 kuralına tabi tutularak moleküller elendi. e) Bu moleküller, pozitif kontrol molekülleriyle beraber 3D-D Similarity düğümüne tabi tutularak, Sanal tarama aşaması sonunda 122 moleköl kenetlenme aşaması için elde edildi.

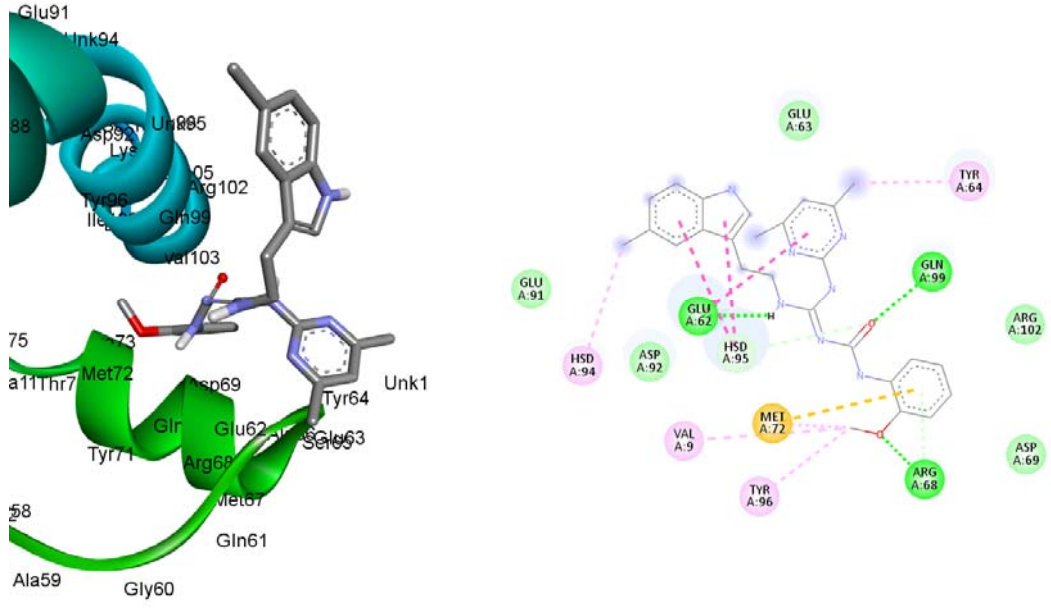
3.2.3 Moleküler Kenetlenme

AutoDock Vina ile 122 molekülün kenetlenmesi sonucunda pozitif kontrol olan MRTX-1133, TH-Z835 ve TH-Z827 inhibitörlerinin sırasıyla kenetlenme skorları -7.0, -6.4 ve -7.1 kcal/mol olarak hesaplandı. Negatif kontrol olan DMSO molekülünün ise kenetlenme skoru -2.3 olarak hesaplandı. En iyi skoru veren molekül -8.4 skorla ZINC000008758797 koduna sahip moleküldür ve onu -8.0 ile -7.0 arasında skorlara sahip 11 tane molekül izlemektedir (Tablo 5). 11 tane molekülün bağlanma enerjisi -7.0 ve üzerinde hesaplandı. En iyi bağlanma aktivitesi gösteren molekül ZINC000008758797 kodlu moleküldür. Pozitif kontrollerin bağlanma enerjileri; MRTX-1133, TH-Z835 ve TH-Z827 sırasıyla -7.0, -6.4 ve -7.1 olarak hesaplandı. Negatif kontrol olan DMSO molekülünün bağlanma enerjisi ise -2.3 olarak hesaplandı. Bu inhibitörlerin bağlandığı bölgeler Şekil 15,16,17,18 ve 19 da gösterilmiştir.

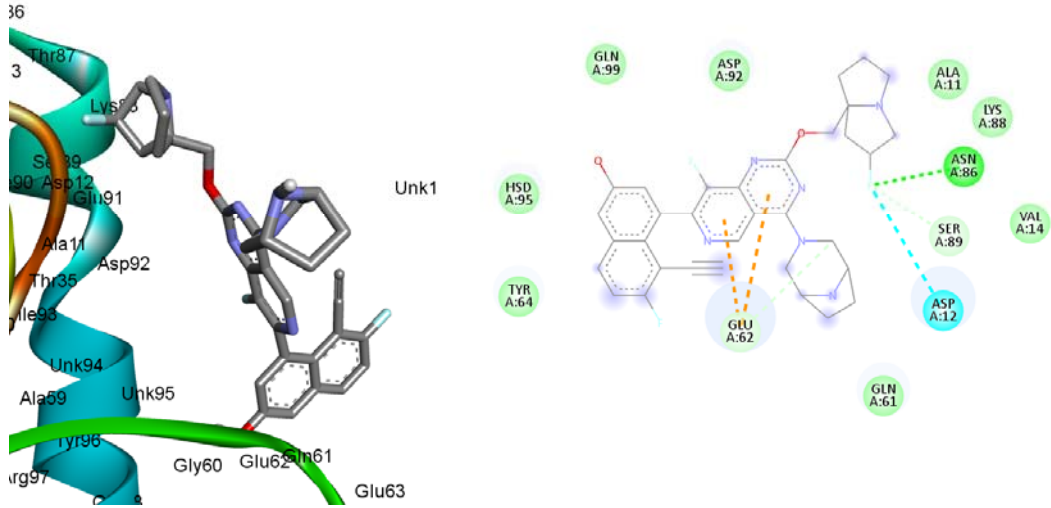
Bu çalışmada, KRAS G12D mutasyonunu hedef alan bir inhibitör keşfedildi ve inhibitörün aktif bölgeye mutasyonlu yapıya spesifik olarak bağlanabilmesi için mutasyonlu yapıdaki spesifik yapısal değişiklikler hedeflendi. Yapımızı birde wild type durumundayken aynı pozitif MRTX-1133, TH-Z827 ve TH-Z835 ve negatif DMSO molekülleri ile moleküler kenetlenmeye tabi tutuldu. Wild type kenetlenme sonucunda 11 molekülde daha düşük bağlanma enerjisi ile bağlandığı gözlemlendi. Karşılaştırmalara bakılınca ZINC000033255156 ve ZINC000008583329 kodlu molekülün wild type bağlanma enerjisinin kötü bir skorla bağlandığı gözlemlendi. Bu ilaçların, inhibitörün mutant yapıda daha spesifik bir bağlanma gösterdiğini ve wild type yapıya bağlanma eğiliminde olmadığını ortaya koydu. Bu iki aday molekül diğer moleküllere göre daha seçici bir yapıda olduğunu görebiliyoruz.

Tablo 5 Yapı Kenetlenme Sonuçları (+ ve – kontrol molekülleri)

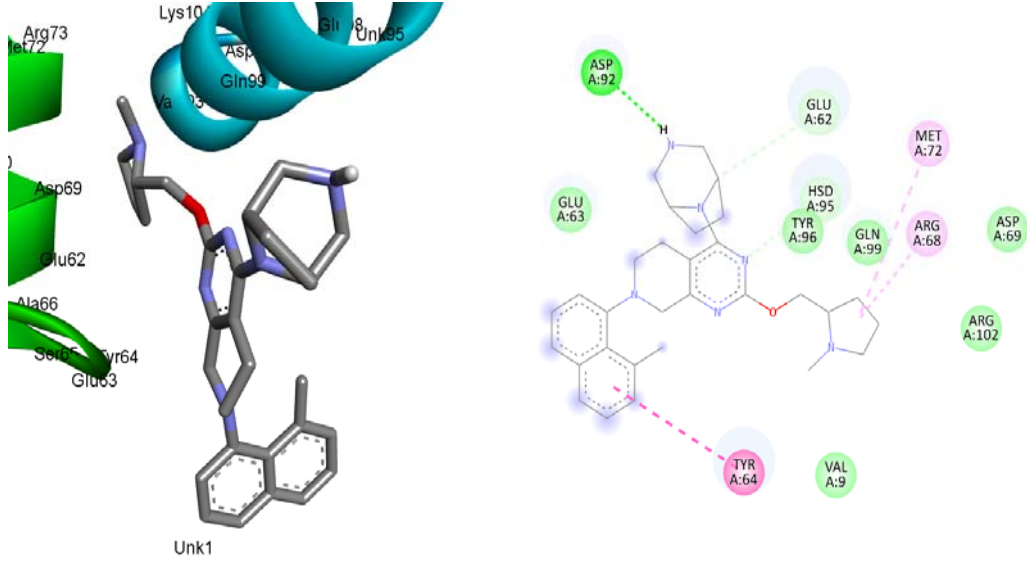
	Mutant Yapı Kenetlenme Sonuçları	Wild-Type Yapı Kenetlenme Sonuçları
Molekül	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
ZINC000008758797	-8.4	-7.1
ZINC000015978598	-7.5	-7.2
ZINC000033255156	-7.5	-5.9
ZINC000002661800	-7.5	-6.2
ZINC000008964674	-7.4	-7.4
ZINC000014748320	-7.3	-7.1
ZINC000036055096	-7.3	-6.8
ZINC000023382313	-7.2	-6.8
ZINC000008583329	-7.0	-5.8
ZINC000002716560	-7.0	-6.7
ZINC000036055093	-7.0	-6.7
MRTX-1133 (+)	-7.0	-7.6
TH-Z835 (+)	-6.4	-7.0
TH-Z827 (+)	-7.1	-6.9
DMSO (-)	-2.3	-2.1



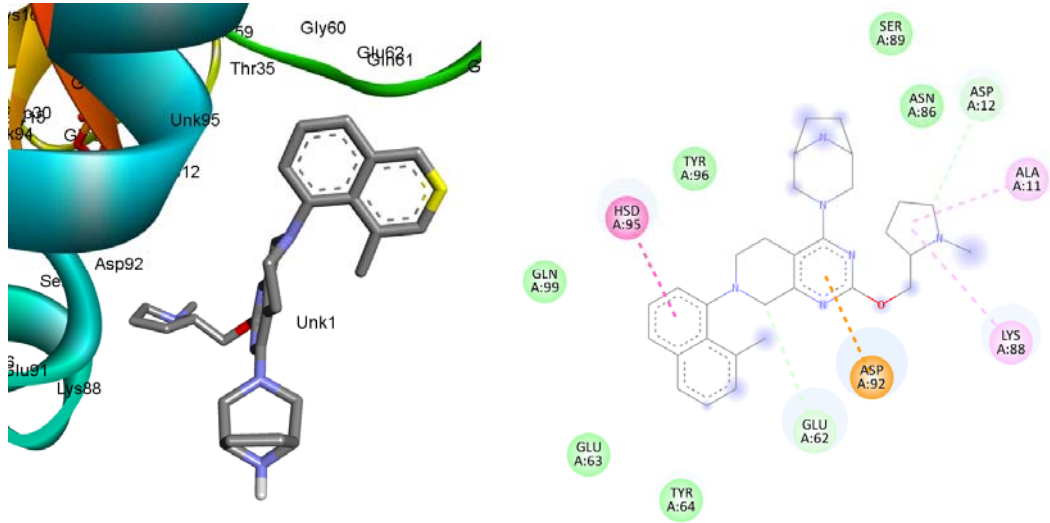
Şekil 15 ZINC000008758797 molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi
Kenetlenme sonrası elde edilen 11 molekül içerisinde en iyi skorlu -8.4 olan inhibitörün KRAS ile birleşiminin 3D ve 2D boyutlu diyagramı



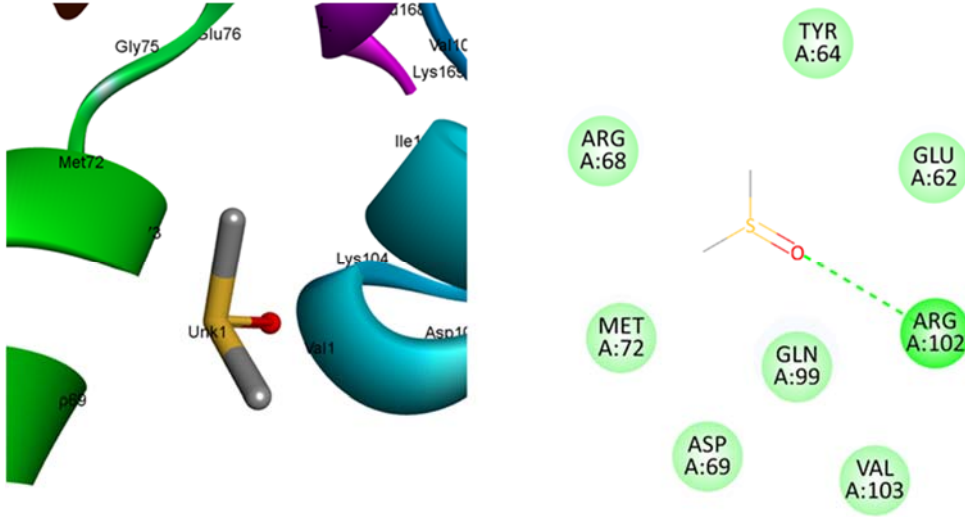
Şekil 16 MRTX-1133 molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi pozitif
kontrollerde kullanılan literatürdeki en iyi skorlu G12D inhibitörü MRTX-1133'in KRAS ile birleşiminin 3D ve 2D lu diyagramı



Şekil 17 THZ-827 molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi pozitif kontrollerde kullanılan literatürdeki iyi skorlu G12D inhibitörü THZ-827'nin KRAS ile birleşiminin 3D ve 2D lu diyagramı



Şekil 18 THZ-835 molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi pozitif kontrollerde kullanılan literatürdeki iyi skorlu G12D inhibitörü THZ-835'in KRAS ile birleşiminin 3D ve 2D lu diyagramı



Şekil 19 DMSO molekülünün KRAS ile bağlanma bölgesi negatif kontrollerde kullanılan literatürdeki kötü skorlu G12D inhibitörü DMSO’nun KRAS ile birleşiminin 3D ve 2D lu diyagramı

Kenetlenme sonuçlarına göre, MRTX-1133 inhibitörü-7.0, TH-Z835 inhibitörü-6.4 ve TH-Z827 inhibitörü-7.1 kenetlenme skorlarına sahiptir. Toplamda 118 molekül üzerinde yapılan kenetlenme çalışmasında, pozitif kontrol molekülleriyle aynı veya daha iyi bağlanma enerjisine sahip olan 11 molekül tespit edildi. En iyi bağlanma skoru, ZINC000008758797 kodlu ilaç adayı molekülünde-8.4 olarak belirlendi. Molekülün K-Ras bağlanma bölgesiyle gerçekleştirdiği 2 boyutlu etkileşim analizinde, Glutamik asit, Tirozin, Glutamin, Metiyonin, Valin ve Arjinin amino asitleriyle etkileşim gözlemlendi (Şekil 15). ZINC000008758797 molekülünün pozitif kontrollerle karşılaştırıldığında daha çok H bağı yaptığı gözlemlenmiştir; bu da moleküler kenetlenme sonucu pozitif kontrollerden daha yüksek skorlu çıkan ZINC000008758797 molekülünün güvenilirliğini bir kez daha göstermiştir. MRTX-1133 inhibitörünün K-Ras bağlanma bölgesiyle gerçekleştirdiği etkileşim analizine bakıldığında ise Asparajin, Aspartik Asit ve Glutamik Asit amino asitlerinin bulunduğu görüldü (Şekil 16). TH-Z827 molekülünde Histidin, Tirozin, Aspartik Asit, Glutamik Asit, Metiyonin ve Arjinin amino asitleriyle etkileşim gözlemlendi (Şekil 17).

TH-Z835 inhibitöründe ise Histidin, Aspartik Asit, Glutamik Asit, Lizin ve Alanin amino asitleri gözlemlendi (Şekil 18). Negatif kontrollerde kullandığımız DMSO molekülün yalnızca Arginin amino asitiyle etkileşime girildiği görüldü. ZINC000008758797 molekülünün etkileşime girdiği amino asitlerde, MRTX-1133 inhibitöründe Glutamik Asit, TH-Z827 inhibitöründe Histidin, Tirozin, Metiyonin ve Arjinin, TH-Z835 inhibitöründe ise Histidin ve Glutamik Asit amino asitleri, pozitif kontrol molekülünde de bulunan amino asitlerdir. Dört molekülün de ortak noktası, Glutamik Asit GLU 62 ile etkileşime girmesidir. GLU 62 nin KRAS için önemi; Glutamik asit residue ları, diğer amino asitlerle birlikte KRAS'ta nükleotit bağlayıcı cebin oluşumuna katkıda bulunur. Bu cep, GTP veya GDP moleküllerinin bağlanmasından ve koordine edilmesinden sorumludur. Glutamik asit residue ları, KRAS ile nükleotit arasındaki etkileşimi stabilize etmeye yardımcı olarak verimli nükleotit değişimini ve GTP hidrolizini destekler. Glutamik asit, KRAS'ın yapısal bütünlüğü, nükleotid bağlanması, GTPaz aktivitesi ve sinyal verme işlevi için önemlidir.

BÖLÜM IV

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Uzun yıllardır ölümcül hastalıkların başında gelen kansere karşı tedavi geliştirebilmek adına kanserde en sık mutasyona uğrayan proteinlerden biri olan RAS proteinleri için bu mutant yapıları hedefleyen inhibitör keşif ve tasarlama çalışmaları büyük önem arz etmektedir. RAS proteinleri arasında en çok mutasyona uğrayan ve tümöre neden olan KRAS için inhibitörlerin keşfi, aday inhibitörlerin çalışmaları ve onaylanan terapötiklerin piyasaya sunulması önemli bir yer tutmaktadır. Bu tez çalışmasında literatürde bulunan güncel inhibitörler tarandı ve KRAS proteinine ait yapı bilgileri toplandı. Bu bilgiler kendi içlerinde mutasyon türlerine, nükleotit bilgilerine, yapıya bağlı olan moleküllere göre kategorize edildi. GDP bağlı inaktif G12D KRAS proteinin moleküler dinamik simülasyonu gerçekleştirilerek hedef yapının sanal tarama için en uygun konformasyonu seçildi. İndirilen molekül kütüphanesi Lipinski'nin 5 kuralına tabi tutuldu ve 5 kurala da uyan moleküllerin parmak izleri hesaplandı. KRAS G12D mutasyonu için önerilen başarılı kovalent bağlanmayan inhibitörlerin, mevcut klinik öncesi gelişim aşamasında olan MRTX-1133, TH-Z827 ve TH-Z835 molekülleri ile pozitif kontrolleri sağlanarak üç boyutlu benzerlik taraması yapıldı. Çalışmanın sonucunda pozitif kontrol moleküllerinden daha iyi bir bağlanma enerjisi skoruyla umut verici bir molekül olan ZINC000008758797 molekülü keşfedildi. Bu çalışmanın devamında; ZINC000008758797 molekülünün KRAS'a bağlanması incelenip klinik bulgularla geliştirilip terapötik olarak sunulması önerilmektedir.

Bu çalışmada ayrıca KRAS G12D non-kovalent bağlı yapıya sanal tarama ile moleküler kenetlenme uygularken hem wild type hemde mutant yapıyı karşılaştırılması yapıldı. Bu karşılaştırma, potansiyel ilaçların mutant yapıya özgü bir bağlanma sağlayıp sağlamadığını veya wild type yapıya da bağlanma eğiliminde olduğunu anlamak için gerçekleştirildi. Wild type ve mutant yapılar arasındaki karşılaştırma, inhibitörün mutant yapıda daha spesifik bir bağlanma gösterdiğini ve wild type yapıya bağlanma eğiliminde olmadığını ortaya koydu. Analiz sonuçları, inhibitörün mutant yapıda daha stabil ve spesifik bir bağlanma gösterdiğini kanıtladı.

Elde edilen sonuçlar, hedeflenen tedavi stratejisinin KRAS G12D mutasyonlu kanserli hücreler üzerinde etkili olabileceğini öngörmektedir.

Molekölü fonksiyonel gruplarına göre incelediğimizde; moleküler ismi 1-[N'-[2-(5-kloro-1H-indol-3-il)etil]-N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-karbamimidoyl]-3-(2-metoksifenil) üre olup bir üre türevidir. Üre ve türevleri çoklu kararlı hidrojen bağları oluşturma yetenekleri sebebiyle ilaç geliştirme ve tıbbi kimyada merkezi bir role sahiptir. Çok çeşitli tıbbi uygulamalarda özellikle, antikanser, antibakteriyel, anti-HIV, antidiyabetik ajanlar ve diğer tıbbi bileşiklerin geliştirilmesinde ilaç gücünü ve seçiciliğini modüle etmek ve ilaç özelliklerini iyileştirmek için bir üre işlevselliği dahil edilir. Ras proteininin MAPK yolunda bulunan RAF için geliştirilmiş olan Sorafenib ilacına baktığımızda üre türevi bir protein kinaz inhibitörüdür. Sonuç olarak, K-RasG12D mutasyonu için kovalent olmayan aday bir inhibitör arayışında ZINC000008758797 molekölü gelecek çalışmalar için umut vadetmektedir.

EKLER

EK-1 KRAS-G12D İçin Literatürde Bulunan PDB yapıların detayları

		Doğal Partner/İnhibitör		
PDB ID	NÜKLEOTİT	SENTETİK PEPTİT	İNHİBİTÖR (DOĞAL MOLEKÜL)	İNHİBİTÖR
4DSN	GCP		EDO	-
4DSO	GCP		BEN, GOL	-
4EPR	GDP		-	-
5OCG	GNP		PEG, GOL	9R5
5UFQ	GNP	R11.1.6	-	-
5US4	GDP		GOL	-
5USJ	GNP		-	-
5XCO	GDP	KRpep-2d	EDO	-
6GJ5	GCP		-	F0N
6GJ6	GCP		EZZ	-
6GJ7	GCP		-	F0B
6GJ8	GCP		-	F0K
6GOF	GNP		-	-
6QUU	GCP		-	-
6QUV	GCP		JJN	-
6QUW	GCP		JJQ	-
6QUX	GCP		JJN, EDO	-
6WGN	GNP	KD2	-	-
6WS4	GDP		TCE	-
6ZL5	GDP		-	F0K
6ZLI	GCP		QME	-
7ACA	GCP		EDO	R6W
7ACF	GCP		-	R6W
7ACH	GCP		-	R6W
7ACQ	GDP		-	R6W
7EW9	GDP		-	05C
7EWA	GDP		-	05F
7EWB	GDP		-	05I
7EYX	GDP		-	-
7F0W	GDP		-	-
7ROV	GCP	MP-9903	-	-
7RPZ	GDP		-	6IC
7RSC	GSP		-	17F
7RSE	GSP		-	17F

7RT1	GDP		-	7L8
7RT2	GDP		EDO, GOL	7NL
7RT3	GDP		-	7NZ
7RT4	GDP		GOL	7IZ
7RT5	GDP		-	7OE
7T47	GDP		GOL, ACT	6IC

KAYNAKÇA

- Abraham, Mark James, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, ve Erik Lindahl. (2015). “GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers”. *SoftwareX* 1: 19-25 <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Abraham, Sherwin J., Ismaeel Muhamed, Ryan Nolet, Fung Yeung, ve Vadim Gaponenko. (2010). “Expression, purification, and characterization of soluble K-Ras4B for structural analysis”. *Protein expression and purification* 73 (2): 125-31. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.05.015>
- Adedeji, Eunice O., Gbolahan O. Oduselu, Olubanke O. Ogunlana, Segun Fatumo, Rainer Koenig, ve Ezekiel Adebisi. (2022). “Anopheles gambiae Trehalase Inhibitors for Malaria Vector Control: A Molecular Docking and Molecular Dynamics Study”. *Insects* 13 (11): 1070. <https://doi.org/10.3390/insects13111070>
- Anderson A.C. (2003). “The Process of Structure-Based Drug Design”. *Chem. Biol.* 2003; 10:787–797. doi: 10.1016/j.chembiol.2003.09.002
- Bandyopadhyay, Debashree, Akshay Bhatnagar, Shobhit Jain, ve Prabhav Pratyaksh. (2020). “Selective stabilization of aspartic acid protonation state within a given protein conformation occurs via specific ‘molecular association’”. *The Journal of Physical Chemistry B* 124 (26): 5350-61. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c02629>
- Bannoura, Sahar F., Husain Yar Khan, ve Asfar S. Azmi. (2022). “KRAS G12D targeted therapies for pancreatic cancer: Has the fortress been conquered?” *Frontiers in Oncology* 12: 1013902-1013902. DOI: 10.3389/fonc.2022.1013902
- Barredo, Prechiel A., ve Mannix P. Balanay. (2023). “Recent Advances in Molecular Dynamics Simulations of Tau Fibrils and Oligomers”. *Membranes* 13 (3): 277. <https://doi.org/10.3390/membranes13030277>
- Bender, Brian J, Stefan Gahbauer, Andreas Luttmann, Jiankun Lyu, Chase M. Webb, Reed M. Stein, Elissa A. Fink, Trent E. Balus, Jens Carlsson, John J. Irwin & Brian K. Shoichet. (2021).” A practical guide to large-scale docking”. *Nature Protocols* 16, 4799–4832

Berthold, Michael R., Nicolas Cebron, Fabian Dill, Thomas R. Gabriel, Tobias Kötter, Thorsten Meinl, Peter Ohl, Kilian Thiel, ve Bernd Wiswedel. (2009). “KNIME-the Konstanz information miner: version 2.0 and beyond”. *AcM SIGKDD explorations Newsletter* 11 (1): 26-31. <https://doi.org/10.1145/1656274.1656280>

Bery, Nicolas, Sandrine Legg, Judit Debreczeni, Jason Breed, Kevin Embrey, Christopher Stubbs, Paulina Kolasinska-Zwierz, Nathalie Barrett, Rose Marwood, ve Jo Watson. (2019). “KRAS-specific inhibition using a DARPin binding to a site in the allosteric lobe”. *Nature Communications* 10 (1): 2607. doi: 10.1038/s41467-019-10419-2

Burd, Christin E., Wenjin Liu, Minh V. Huynh, Meriam A. Waqas, James E. Gillahan, Kelly S. Clark, Kailing Fu, Brit L. Martin, William R. Jeck, ve George P. Souroullas. (2014). “Mutation-specific RAS oncogenicity explains NRAS codon 61 selection in melanoma”. *Cancer discovery* 4 (12): 1418-29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0729>

Boudhraa, Zied, Euridice Carmona, Diane Provencher, ve Anne-Marie Mes-Masson. (2020). “Ran GTPase: a key player in tumor progression and metastasis”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 345. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00345>

Cao, Jingyu, Jing Hu, Siqin Liu, Funda Meric-Bernstam, Reham Abdel-Wahab, Junjie Xu, Qiang Li, Maolin Yan, Yujie Feng, ve Jianzhen Lin. (2020). “Intrahepatic cholangiocarcinoma: genomic heterogeneity between eastern and western patients”. *JCO Precision Oncology* 4: 557-69. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>

Castellano, Esther, Clare Sheridan, May Zaw Thin, Emma Nye, Bradley Spencer-Dene, Markus E. Diefenbacher, Christopher Moore, Madhu S. Kumar, Miguel M. Murillo, ve Eva Grönroos. (2013). “Requirement for interaction of PI3-kinase p110 α with RAS in lung tumor maintenance”. *Cancer cell* 24 (5): 617-30. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.012>

Cereto-Massagué, Adrià, María José Ojeda, Cristina Valls, Miquel Mulero, Santiago Garcia-Vallvé, ve Gerard Pujadas. (2015). “Molecular fingerprint similarity search in virtual screening”. *Methods* 71: 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.08.00>

Chen, Kun, Yalei Zhang, Ling Qian ve Peng Wang. (2021). “Emerging strategies to target RAS signaling in human cancer therapy”. *J Hematol Oncol* 14:116 <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01127>

Chen, Deliang, Numan Oezguen, Petri Urvil, Colin Ferguson, Sara M. Dann, ve Tor C. Savidge. (2016). “Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing”. *Science advances* 2 (3): e1501240. DOI: 10.1126/sciadv.1501240

Cox, Adrienne D., Stephen W. Fesik, Alec C. Kimmelman, Ji Luo, ve Channing J. Der. (2015). “Drugging the undruggable Ras: mission possible?” *Nat Rev Drug Discov.*; 13(11): 828–851. doi:10.1038/nrd4389.

Daina, Antoine, ve Vincent Zoete. (2019). “Application of the Swiss Drug Design online resources in virtual screening”. *International journal of molecular sciences* 20 (18): 4612 <https://doi.org/10.3390/ijms20184612>.

Dede, Zeynep, Kader TUMER, Tuğçe Kan, Burcu Yücel. (2023). “Current Advances and Future Prospects in Cancer Immunotherapeutics” *Medeni Med J* 2023; 38:88-94 doi: 10.4274/MMJ.galenos.2023.29599

Donaldson, Julie G., ve Richard D. Klausner. (1994). “ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure”. *Current opinion in cell biology* 6 (4): 527-32. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90072-8)

Downward, Julian. (2015) .“RAS Synthetic Lethal Screens Revisited: Still Seeking the Elusive Prize?”. *Clin Cancer Res* 21 (8): 1802–1809. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2180>

Duay, Searle S., Rianne Casey Y. Yap, Arturo L. Gaitano III, June Alexis A. Santos, ve Stephani Joy Y. Macalino. (2023). “Roles of Virtual Screening and Molecular Dynamics Simulations in Discovering and Understanding Antimalarial Drugs”. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (11): 9289. <https://doi.org/10.3390/ijms24119289>.

Erlanson, Daniel A., ve Kevin R. Webster. (2021). “Targeting mutant KRAS”. *Current Opinion in Chemical Biology* 62: 101-8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.02.010>

Fathima, A. Jainul, G. Murugaboopathi, ve P. Selvam. (2018). “Pharmacophore mapping of ligand based virtual screening, molecular docking and molecular dynamic simulation studies for finding potent NS2B/NS3 protease inhibitors as potential anti-dengue drug compounds”. *Current Bioinformatics* 13 (6): 606-16. <https://doi.org/10.2174/1574893613666180118105659>

Gaulton, Anna, Louisa J. Bellis, A. Patricia Bento, Jon Chambers, Mark Davies, Anne Hersey, Yvonne Light, Shaun McGlinchey, David Michalovich, ve Bissan Al-Lazikani. (2012). “ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery”. *Nucleic acids research* 40 (D1): D1100-1107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr777>

Ghosh, Sutapa, Aihua Nie, Jing An, ve Ziwei Huang. (2006). “Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery”. *Current opinion in chemical biology* 10 (3): 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.002>

Grygorenko, Oleksandr O., Dmytro S. Radchenko, Igor Dziuba, Alexander Chuprina, Kateryna E. Gubina, ve Yuri S. Moroz. (2020). “Generating multibillion chemical space of readily accessible screening compounds”. *Iscience* 23 (11): 101681. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101681>

Haigis, Kevin M., Krystle R. Kendall, Yufang Wang, Ann Cheung, Marcia C. Haigis, Jonathan N. Glickman, Michiko Niwa-Kawakita, Alejandro Sweet-Cordero, Judith Sebolt-Leopold, ve Kevin M. Shannon. (2008). “Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon”. *Nature genetics* 40 (5): 600-608.

Haigis, Kevin M. (2017). “KRAS alleles: the devil is in the detail”. *Trends in cancer* 3 (10): 686-97. doi: 10.1016/j.trecan.2017.08.006

Hancock, John F., Hugh Paterson, ve Christopher J. Marshall. (1990). “A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane”. *Cell* 63 (1): 133-39. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90294](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90294)

Hakeem, Israa J. (2023). “Molecular docking analysis of KRAS inhibitors for cancer management”. *Bioinformation* 19 (4): 411-16. DOI: 10.6026/97320630019411

Holderfield, Matthew. (2018). “Efforts to develop KRAS inhibitors”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (7): a031864. doi: 10.1101/cshperspect.a031864

Huang, S.-Y., and Zou, X. (2010). “Advances and challenges in protein-ligand docking”. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 3016–3034. doi: 10.3390/ijms11083016

Huang, Hanchen, Nasr M. Ghoniem, Jimmy K. Wong, ve M. Baskes. (1995). “Molecular dynamics determination of defect energetics in beta-SiC using three representative empirical potentials”. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering* 3 (5): 615.

Irwin, John J., Teague Sterling, Michael M. Mysinger, Erin S. Bolstad, ve Ryan G. Coleman. (2012). “ZINC: a free tool to discover chemistry for biology”. *Journal of chemical information and modeling* 52 (7): 1757-68. <https://doi.org/10.1021/ci3001277>

Jančík, Sylwia, Jiří Drábek, Danuta Radzioch, ve Marián Hajdúch. (2010). “Clinical relevance of KRAS in human cancers”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/150960>

Joseph-Mccarthy D., Baber J.C., Feyfant E., Thompson D.C., Humblet C. (2007). “Lead optimization via high-throughput molecular docking.” *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2007; 10:264–274.

Karnoub, Antoine E., ve Robert A. Weinberg. (2008). “Ras oncogenes: split personalities”. *Nature reviews Molecular cell biology* 9 (7): 517-31.

Kohnke, Bartosz, Carsten Kutzner, ve Helmut Grubmuller. (2021). “A GPU-Accelerated Fast Multipole Method for Gromacs. Performance and Accuracy”. *Biophysical Journal* 120 (3): 177 a. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00744>

Lanman, B. A.; Allen, J. R.; Allen, J. G.; Amegadzie, A. K.; Ashton, K. S.; Booker, S. K.; Chen, J. J.; Chen, N.; Frohn, M. J.; Goodman, G.; Kopecky, D. J.; Liu, L.; Lopez, P.; Low, J. D.; Ma, V.; Minatti, A. E.; Nguyen, T. T.; Nishimura, N.; Pickrell, A. J.; Reed, A. B.; Shin, Y.; Siegmund, A. C.; Tamayo, N. A.; Tegley, C. M.; Walton, M. C.; Wang, H.-L.; Wurz, R. P.; Xue, M.; Yang, K. C.; Achanta, P.; Bartberger, M. D.; Canon, J.; Hollis, L. S.; McCarter, J. D.; Mohr, C.; Rex, K.; Saiki, A. Y.; San Miguel, T.; Volak, L. P.; Wang, K. H.; Whittington, D. A.; Zech, S. G.; Lipford, J. R.; Cee, V.

J. Discovery of a Covalent Inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors. (2020). *J. Med. Chem.*, 63 (1), 52–65. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01180>

Liu, Pingyu, Yijun Wang, Xin Li. (2019). “Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy”. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 9(5):871-879 <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.002>

Madhavi Sastry, G., Matvey Adzhigirey, Tyler Day, Ramakrishna Annabhimoju, ve Woody Sherman. (2013). “Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments”. *Journal of computer-aided molecular design* 27: 221-34. DOI: 10.1007/s10822-013-9644-8

Maurer, Till, Lindsay S. Garrenton, Angela Oh, Keith Pitts, Daniel J. Anderson, Nicholas J. Skelton, Benjamin P. Fauber, Borlan Pan, Shiva Malek, ve David Stokoe. (2012). “Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (14): 5299-5304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116510109>

McGrath, John P., Daniel J. Capon, Douglas H. Smith, Ellson Y. Chen, Peter H. Seeburg, David V. Goeddel, ve Arthur D. Levinson. (1983). “Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene”. *Nature* 304 (5926): 501-6. doi: 10.1038/304501a0

Milburn, Michael V., Liang Tong, Abraham M. DeVos, Axel Brünger, Ziro Yamaizumi, Susumu Nishimura, ve Sung-Hou Kim. (1990). “Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins”. *Science* 247 (4945): 939-45. DOI: 10.1126/science.2406906

Moore, Amanda R., Scott C. Rosenberg, Frank McCormick ve Shiva Malek. (2020). “RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged?”. *Nat Rev Drug Discov.*; 19(8): 533–552. doi:10.1038/s41573-020-0068-6.

Muegge, Ingo, ve Prasenjit Mukherjee. (2016). “An overview of molecular fingerprint similarity search in virtual screening”. *Expert opinion on drug discovery* 11 (2): 137-48. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1117070>

Muegge, Ingo, ve Scott Oloff. (2006). “Advances in virtual screening”. *Drug discovery today: technologies* 3 (4): 405-11. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2006.12.002>

Muratçioğlu, Serena, ve Saliha Ece Acuner Özbabacan.(2019). “Elucidating Structural Details of Ras-Effector Interactions”. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences* 31 (1): 90-99. <https://doi.org/10.7240/jeps.528662>

O’Boyle, Noel M., Michael Banck, Craig A. James, Chris Morley, Tim Vandermeersch, ve Geoffrey R. Hutchison. (2011). “Open Babel: An open chemical toolbox”. *Journal of cheminformatics* 3 (1): 1-14.

Ostrem, Jonathan M.L., ve Kevan M. Shokat. (2022). “Targeting KRAS G12C with Covalent Inhibitors”. *Annual Review of Cancer Biology* Vol. 6:49-64 <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-041621-012549>

Pantsar, Tatu. (2020). “The current understanding of KRAS protein structure and dynamics”. *Computational and structural biotechnology journal* 18: 189-98. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.004>

Parker, Jillian A. and Carla Mattos. (2018). “The K-Ras, N-Ras, and H-Ras Isoforms: Unique Conformational Preferences and Implications for Targeting Oncogenic Mutants”. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 8 (8): a031427. doi: 10.1101/cshperspect.a031427

Papke, Bjoern, ve Channing J. Der. (2017). “Drugging RAS: Know the enemy”. *Science* 355 (6330): 1158-63. doi: 10.1126/science.aam7622

Pronk, Sander, Szilárd Páll, Roland Schulz, Per Larsson, Pär Bjelkmar, Rossen Apostolov, Michael R. Shirts. (2013). “GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit”. *Bioinformatics* 29 (7): 845-54. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>.

Rabara, Dana, Timothy H. Tran, Srisathyanarayanan Dharmaiah, Robert M. Stephens, Frank McCormick, Dharendra K. Simanshu, ve Matthew Holderfield. (2019). “KRAS G13D sensitivity to neurofibromin-mediated GTP hydrolysis”. *National Academy of Sciences* 116 (44): 22122-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908353116>

Ripphausen P., Nisius B., Bajorath J. State-of-the-art in ligand-based virtual screening. (2011). *Drug Discov. Today*.2011; 16:372–376.

Rollinger, J. M., T. Langer, ve H. Stuppner. (2006). “Strategies for efficient lead structure discovery from natural products”. *Current medicinal chemistry* 13 (13): 1491-1507. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986706777442075>

Sakamoto, Kotaro, Teruaki Masutani, ve Takatsugu Hirokawa. (2020). “Generation of KS-58 as the first K-Ras (G12D)-inhibitory peptide presenting anti-cancer activity in vivo”. *Scientific reports* 10 (1): 1-16.

Salentin, Sebastian, V. Joachim Haupt, Simone Daminelli, ve Michael Schroeder. (2014). “Polypharmacology rescored: Protein–ligand interaction profiles for remote binding site similarity assessment”. *Progress in biophysics and molecular biology* 116 (2-3): 174-86. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.05.006>

Salmaso, V., Sturlese, M., Cuzzolin, A., and Moro, S. (2018). “Combining self- and cross-docking as benchmark tools: the performance of DockBench in the D3R grand challenge 2”. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 32, 251–264. doi: 10.1007/s10822-017-0051-4

Schubbert, Suzanne, Kevin Shannon, ve Gideon Bollag. (2007). “Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer”. *Nature Reviews Cancer* 7 (4): 295-308.

Shoichet B.K. (2004). “Virtual screening of chemical libraries”. *Nature*. 2004; 432:862–865. doi: 10.1038/nature03197

Simanshu, K. Dhirendra, Dwight V. Nissley ve Frank McCormick. (2017). “RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease”. 170 (1): 17-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>

Sogabe, Satoshi, Yusuke Kamada, Masanori Miwa, Ayumu Niida, Tomoya Sameshima, Masahiro Kamaura, Kazuko Yonemori, Shigekazu Sasaki, Jun-ichi Sakamoto, ve Kotaro Sakamoto. (2017). “Crystal structure of a human K-Ras G12D mutant in complex with GDP and the cyclic inhibitory peptide KRpep-2d”. *ACS medicinal chemistry letters* 8 (7): 732-36. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00128>

Stahl, Martin, Wolfgang Guba, ve Manfred Kansy. (2006). "Integrating molecular design resources within modern drug discovery research: the Roche experience". *Drug discovery today* 11 (7-8): 326-33. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.02.008>

Sinehbaghizadeh, Saeid, Agus Saptoro, Sepideh Amjad-Iranagh, Parisa Naeiji, Angnes Ngieng Tze Tiong, ve Amir H. Mohammadi. (2023). "A comprehensive review on molecular dynamics simulation studies of phenomena and characteristics associated with clathrate hydrates". *Fuel* 338: 127201. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127201>

Taveras, A. G., S. W. Remiszewski, R. J. Doll, D. Cesarz, E. C. Huang, P. Kirschmeier, B. N. Pramanik, M. E. Snow, Y.-S. Wang, ve J. D. Del Rosario. (1997). "Ras oncoprotein inhibitors: the discovery of potent, ras nucleotide exchange inhibitors and the structural determination of a drug-protein complex". *Bioorganic & medicinal chemistry* 5 (1): 125-33. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(96\)00202-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(96)00202-7)

Taylor, Gregory A. (2007). "IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens". *Cellular microbiology* 9 (5): 1099-1107. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00916>.

Thein, Kyaw Z., Amadeo B. Biter, ve David S. Hong. (2021). "Therapeutics targeting mutant KRAS". *Annual review of medicine* 72: 349-64. h

Trott, Oleg, ve Arthur J. Olson. (2010). "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading". *Journal of computational chemistry* 31 (2): 455-61. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080819-033145>

Thompson, A.P.; Aktulga, H.M.; Berger, R.; Bolintineanu, D.S.; Brown, W.M.; Crozier, P.S.; Veld, P.J.I.; Kohlmeyer, A.; Moore, S.G.; Nguyen, T.D.; et al.(2022). "LAMMPS—A flexible simulation tool for particle-based materials modeling at the atomic, meso, and continuum scales. *Comput. Phys. Commun.*" 2022, 271, 108171 <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2021.108171>

Tsai, Frederick D., Mathew S. Lopes, Mo Zhou, Helen Court, Odis Ponce, James J. Fiordalisi, Jessica J. Gierut, Adrienne D. Cox, Kevin M. Haigis, ve Mark R. Philips. (2015). "K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid

membrane-targeting motif". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (3): 779-84. doi: 10.1073/pnas.1412811112

Upadhyaya, Dr. Punit Dr. Ziqing Qian, Dr. Nicholas G. Selner, Sarah R. Clippinger, Prof. Dr. Zhengrong Wu, Dr. Roger Briesewitz, Prof. Dr. Dehua Pei ".(2015). Inhibition of Ras Signaling by Blocking Ras–Effector Interactions with Cyclic Peptides". *Angewandte Chemie* 54 (26)7602-7606
<https://doi.org/10.1002/anie.201502763>

Uprety, Dipesh, ve Alex A. Adjei. (2020). “KRAS: From undruggable to a druggable Cancer Target”. *Cancer treatment reviews* 89: 102070.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102070>

Van Der Spoel, David, Erik Lindahl, Berk Hess, Gerrit Groenhof, Alan E. Mark, ve Herman JC Berendsen. (2005). “GROMACS: fast, flexible, and free”. *Journal of computational chemistry* 26 (16): 1701-18. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>

Waldron, Conor J., Marco Lauricella, ve Niall J. English. (2016). “Structural and dynamical properties of methane clathrate hydrates from molecular dynamics: Comparison of atomistic and more coarse-grained potential models”. *Fluid Phase Equilibria* 413: 235-41. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.12.030>

Wang, H., V. J. Cee, A. T. Parsons, ve M. Beaver. (2021). “Pyridopyrimidine Derivatives Useful as KRAS G12C”. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12 Sep 2021, 12(10):1512-1513 doi : 10.1021/acsmedchemlett.1c00441

Wennerberg, Krister, Kent L. Rossman, Channing J. Der. (2005). “The Ras superfamily at a glance”. *J Cell Sci* (2005) 118 (5): 843–846.
<https://doi.org/10.1242/jcs.01660>.

Wittinghofer, Alfred, ve Ingrid R. Vetter. (2011). “Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif”. *Annual review of biochemistry* 80: 943-71.

Wu, Liqun, Herui Yao, Hui Chen, Aodi Wang, Kun Guo, Wenli Gou, Yanfei Yu, Xiang Li, Ming Yao, ve Shaohua Yuan. (2022). “Landscape of somatic alterations in large-scale solid tumors from an Asian population”. *Nature communications* 13 (1): 4264. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31780-9>

Xu, Tingting, Xuemei Lang, Shuanshi Fan, Yanhong Wang, ve Jianbiao Chen. (2019). “The effect of electric fields in methane hydrate growth and dissociation: A molecular dynamics simulation”. *Computational and Theoretical Chemistry* 1149: 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2018.12.018>

Yan, Zefan, Rongzheng Liu, Bing Liu, Youlin Shao, ve Malin Liu. (2023). “Molecular Dynamics Simulation Studies of Properties, Preparation, and Performance of Silicon Carbide Materials: A Review”. *Energies* 16 (3): 1176. <https://doi.org/10.3390/en16031176>

Zeitouni, Daniel, Yuliya Pylayeva-Gupta, Channing J. Der, ve Kirsten L. Bryant. (2016). “KRAS mutant pancreatic cancer: no lone path to an effective treatment”. *Cancers* 8 (4): 45. doi: 10.3390/cancers8040045

Zhai, F.R.; Shan, K.; Xie, Z.P.; Sun, J.L.; Yi, Z.Z.(2016). "Preparation and Mechanical Properties of SiC/BN Multiphase Ceramics via Spark Plasma Sintering". *J. Chin. Ceram. Soc.*, 44, 866–871 doi:10.14062/j.issn. 0454-5648.2016.06.14

Zhu, Chunxiao , Xiaoqing Guan, Xinuo Zhang, Xin Luan, Zhengbo Song , Xiangdong Cheng, Weidong Zhang ve Jiang-Jiang Qin.(2022). “ Targeting KRAS mutant cancers: from druggable therapy to drug resistance”. *Molecular Cancer* 21:159 <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01629-2>

Zhu T., Cao S., Su P.C., Patel R., Shah D., Chokshi H.B., Szukala R., Johnson M.E., Hevener K.E. (2013). “Hit identification and optimization in virtual screening: practical recommendations based on a critical literature analysis”. *J. Med. Chem.* 2013; 56:6560–6572. doi: 10.1021/jm301916b