



Klorotoksin Peptit Yapısına Dayalı Matriks Metalloproteinaz-2 İnhibitörlerinin Geliştirilmesi

Program Kodu: 1001

Proje No: 214Z083

**Proje Yürütücüsü:
Y.Doç. Dr. Salih Özçubukçu**

Araştırmacı(lar):
Doç. Dr. Can Özen

Bursiyer(ler):
Seçkin Kesici
Aliye Ezgi Güleç
Tuğçe Yılmaz
Selin Gerekçi
Muzaffer Gökçe

ARALIK 2017
ANKARA



ÖNSÖZ

214Z083 nolu kod ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiş olan bu projede 36 amino asitten oluşan ve bir akrep venom peptidi olan klorotoksinin katı hal peptid sentez yöntemi ile sentezi ve ardından katlanması gerçekleştirilmiştir. Kontrol peptidi olarak kullanılan bu doğal peptidin belli başlı amino asitleri (Lys-15, Lys-23 ve Lys-27), ön çalışma olarak yapılan “*docking*” hesaplamaları ile belirlenmiş ve kimyasal olarak modifiye edilmiştir. Bu modifiye peptid türevlerinin MMP-2 enziminin aktivitesini doğal klorotoksinde daha iyi bir şekilde azaltması hedeflenmesine rağmen, tam tersi bir etki göstererek MMP-2 enziminin aktivitesini bazı pozisyonlar için arttırdığı, bazılarının için ise değiştirmedeği bulunmuştur. Bu durum, yapılan modifikasyonların klorotoksinin üç boyutlu katlanmasındaki küçük değişiklikler nedeni ile klorotoksin-MMP-2 etkileşimini oldukça fazla bir şekilde etkileyip, bağlanma bölgesinde değişiklik yaparak gerçekleştiği düşünülmektedir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar	v
ŞEKİLLER	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Matriks Metalloproteinazların Yapısı, Sınıflandırılması ve Çeşitleri	4
2.2. Matriks Metalloproteinaz-2	6
2.3. Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri	8
2.4. Klorotoksin	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM	13
3.1. Docking Ön Çalışmaları	13
3.2. Kimyasal Peptit Sentezi için Genel Bilgiler ve Prosedürler	13
3.2.1. Peptitlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması	15
3.2.2. Doğal kimyasal bağlanma yöntemi ile klorotoksin sentezi	16
3.2.3. Mikrodalga destekli peptit sentezi	17
3.2.4. Mtt korulu grubun kırılması	18
3.2.5. Lizin modifikasyonu	18
3.2.6. Histidin modifikasyonu	19
3.2.7. Klorotoksinin ve türevlerinin katlanması	19
3.3. Peptit Sentezleri	19
3.3.1. Klorotoksin Sentezi	19
3.3.2. Katlanmış Klorotoksin Sentezi	20
3.3.3. Lizin modifikasyonu için model peptit sentezi	20
3.3.4. Glisin ile modifikasyonu yapılmış model peptit sentezi	21
3.3.5. Sistein ile modifikasyonu yapılmış model peptit sentezi	21
3.3.6. Metiyonin ile modifikasyonu yapılmış model peptit sentezi	22
3.3.7. Lys-15 pozisyonu Mtt ile korulu olarak sentezlenen Klorotoksin	22
3.3.8. Lys-15 pozisyonu glisin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi	23
3.3.9. Lys-15 pozisyonu glisin ile modifiye edilmiş klorotoksinin Katlanması	23
3.3.10. Lys-15 pozisyonu metiyonin modifiye edilmiş klorotoksin Sentezi	24
3.3.11. Lys-15 pozisyonu metiyonin ile modifiye edilmiş klorotoksinin katlanması	24
3.3.12. Lys-15 pozisyonu sistein modifiye edilmiş klorotoksin sentezi	25
3.3.13. Lys-23 pozisyonu sistein modifiye edilmiş klorotoksin sentezi	25
3.3.14. Lys-23 pozisyonu metiyonin modifiye edilmiş klorotoksin Sentezi	25
3.3.15. Lys-23 pozisyonu metiyonin ile modifiye edilmiş klorotoksinin katlanması	26
3.3.16. Lys-23 pozisyonu glisin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi	26
3.3.17. Lys-23 pozisyonu glisin ile modifiye edilmiş klorotoksinin Katlanması	27
3.3.18. Lys-27 pozisyonu sistein modifiye edilmiş klorotoksin sentezi	27
3.3.19. Lys-27 pozisyonu metiyonin modifiye edilmiş klorotoksin Sentezi	27
3.3.20. Lys-27 pozisyonu metiyonin ile modifiye edilmiş	



klorotoksinin katlanması	28
3.3.21. Lys-27 pozisyonu glisin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi	28
3.3.22. Lys-27 pozisyonu glisin ile modifiye edilmiş klorotoksinin Katlanması	29
3.3.23. İmidazole-1-sülfonil azit, HCl tuzu (İSA.HCl) sentezi	29
3.3.24. Fmoc-Dap-OH sentezi	30
3.3.25. Fmoc-Dap(N ₃)-OH sentezi	30
3.3.26. Azido klorotoksin türevi için model azido peptit sentezi.....	31
3.3.27. Model peptit üzerinde proparjil alkol ile click tepkimesi	31
3.3.28. Model peptit üzerinde proparjil amin ile click tepkimesi	32
3.3.29. Azido klorotoksin sentezi	32
3.3.30. Matriks Metalloproteinaz-2`nin Klonlanma, Ekspresyon ve Saflaştırılması	32
3.3.31. MMP2 Aktivite Testi	33
3.3.32. İzotermal Titrasyon Kalorimetrisi	33
3.3.33. Yüzey Plazmon Rezonans	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. Kimyasal Peptit Modifikasyonu	37
4.1.1. Lizin Modifikasyonu	38
4.1.2. Klorotoksinin lizin modifikasyonlarının sentezi	43
4.1.3. Azido klorotoksin türevinin sentezlenmesi	46
4.2. Klorotoksin ve türevlerinin katlanması	49
4.3. MMP2 aktivite ölçümleri	50
4.4. MMP2 Enzimi ve Klorotoksin Türevleri Arasındaki Etkileşimlerin Termodinamik Karakterizasyonu	53
5. SONUÇ	55
6. KAYNAKLAR	57



TABLÖLAR

Tablo 2.1. Çeşitli hastalıklarda etkili olan MMP türleri (Sbardella vd.,2012).....5

Tablo 2.2. MMPlerin domain yapısı ve klasifikasyonu (Sbardella vd., 2012).....6

Şekil 1.1. Klorotoksin peptit yapısında kimyasal modifikasyonu yapılacak amino asitler ve tiyol modifikasyonu ile çinko koordinasyon stratejisi.	1
Şekil 2.1. Üstte (a) MMPlerin genel modüler yapısı, altta (b) ise jelatinazların modüler yapısı gösterilmektedir (Benjamin vd., 2012).....	4
Şekil 2.2. Hidroksamat inhibitörünün enzim aktif bölge Zn^{2+} iyonu ile etkileşimleri (Verma 2012).....	8
Şekil 2.3. Klorotoksinin üç boyutlu yapısı (PDB: 1CHL) ve amino asit dizilimi....	11
Şekil 3.1. BioLuminate moleküler yerleştirme (docking) yazılımı kullanılarak tahmin edilen CLTX-MMP2 kompleksinin yapısı.....	13
Şekil 3.2. Katı faz peptit sentez döngüsü.....	14
Şekil 3.3. Klorotoksinin Doğal Kimyasal Bağlama yöntemi ile sentezi.....	16
Şekil 3.4. CLTX'nin 21 amino asitlik kısmının kütle spektrumu.....	16
Şekil 3.5. CLTX'in 15 amino asitlik kısmının Dbz'siz halinin kütle spektrumu.....	17
Şekil 4.1. CLTX'nin sentezinin ardından elde edilen ham peptit kromatogramı (210 nm).	35
Şekil 4.2. Saf CLTX'nin ters faz HPLC kromatogramı (210 nm) ve kütle spektrumu.	36
Şekil 4.3. A. Katlanmış CLTX'nin kütle spektrumu. B. $[M+2]^{2+}$ nın büyütülmüş hali.	37
Şekil 4.4. Lizinlerin farklı karbon zincirlerine sahip bir şekilde tiyollenmesi için projede kullanılması önerilen reaktantlar.	38
Şekil 4.5. Ala-Arg-Lys-Cys-Asp peptidinin LC kromatogramı ve kütle spektrumu.	39
Şekil 4.6. İki adet merkaptopropiyonik asit takılmış 5'li peptidin kütle spektrumu.	40
Şekil 4.7. Sadece bir adet merkaptopropiyonik asit takılmış 5'li peptidin kütle spektrumu.	41
Şekil 4.8. Lizinlerin farklı karbon zincirlerine sahip şekilde uzatılması için kullanılan amino asitler.	42
Şekil 4.9. Sırasıyla glisin, sistein ve metiyonin takılmış model peptit kütle spektrumları.	43
Şekil 4.10. Lys-15 pozisyonu Mtt koruma gruplu sentezlenen CLTX'nin kütle spektrumu.	44
Şekil 4.11. Glisin (A), Metiyonin (B) ve sistein (C) ile fonksiyonlandırılmış CLTX'nin kütle spektrumları.	45
Şekil 4.12. Lys-23 pozisyonu glisin (A), metiyonin (B) ve sistein (C) ile fonksiyonlandırılmış CLTX'nin kütle spektrumları.	46
Şekil 4.13. Lys-27 pozisyonu glisin (A), metiyonin (B) ve sistein (C) ile fonksiyonlandırılmış CLTX'nin kütle spektrumları.	47
Şekil 4.14. Azitli model peptidin HRMS spektrumu.	47
Şekil 4.15. Proparjil Alkol (A) ve proparjil amin (B) ile elde edilen click ürünlerinin HRMS spektrumları.	48
Şekil 4.16. Azido klorotoksinin HRMS spektrumu (A) ve FTIR spektrumu (B)....	48
Şekil 4.17. Azido klorotoksinin click tepkimesi sonrası FTIR spektrumu.	48
Şekil 4.18. Lys-15 pozisyonu sırası ile glisin ve metiyonin ile modifiye edilmiş klorotoksin türevlerinin HRMS sonuçları.	50
Şekil 4.19. CLTX'in MMP2 Aktivite İnhibisyon Grafiği.	51



Şekil 4.20. Klorotoksin ve türevlerinin MMP2 aktivite grafiği.	52
Şekil 4.21. Klorotoksin (1CHL), GaTx1 ve Bs-Tx7 peptitlerinin üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması (Ali 2016).	53
Şekil 4.22 (A) CLTX peptidinin MMP2 enzimine titrasyonu sonucu elde edilen termogram (B) Titrasyon termogramının entegrasyonu sonucu elde edilen bağlanma grafiği.	54

Matriks Metalloproteinazlar (MMPler) ekstraselüler matriksin yapılandırılmasında görev alan bir metalloproteaz enzim grubudur. MMP ailesinin jelatinaz sınıfı bir üyesi olan Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) pankreas, cilt, prostat, mesane, göğüs, kolon, akciğer ve yumurtalık kanserlerinde önemli artış ve aktivite göstermesi nedeniyle kanser ve otoimmün bazı hastalıkların tedavisine yönelik önemli bir ilaç hedefidir.

Günümüze kadar gerçekleştirilen MMP-2 inhibitörü keşif ve geliştirme çalışmaları seçicilik (spesifisite) problemi nedeniyle özellikle diğer enzim inhibitörü ilaç geliştirme çalışmalarıyla kıyaslandığında başarılı olamamıştır. Bu çalışmalar temel olarak enzimin aktif bölgesinde yer alan çinko metaline koordine olan küçük organik moleküllerin sentezine veya sentetik peptit moleküllerine dayanmaktadır. Organik molekül inhibitörleri küçük moleküller olmaları nedeniyle yapısal benzerlik gösteren MMP enzimlerini ayırım yapmadan inhibe ederek düşük seçicilik göstermektedirler. Ancak sentetik peptitler ise daha spesifik olmalarına karşın küçük organik moleküller kadar etkin inhibisyon sergilememektedirler.

Bu projenin amacı, kanser gibi temel hastalıkların tedavisinde önemli bir moleküler hedef olan MMP-2 enzimine spesifik, klorotoksin peptit yapısına dayalı, yüksek etkinlikte ve seçicilikte özgün bir inhibitör geliştirmektir.

Geliştirilmeye çalışılan inhibitör, 36 amino asitten oluşan (4 kDa) ve akrep zehrinden izole edilmiş seçici bir MMP-2 inhibitörü olan klorotoksin (CLTX) peptidinin yapısına dayanmaktadır. Proje stratejisi, ön çalışmalarımız sonucu CLTX yapısında belirlediğimiz dört kritik pozisyonda (H10, K15, K23 ve K27) farklı karbon zinciri eklemeleriyle toplam 20 adet tiyol ve azido alanin modifikasyonu gerçekleştirerek MMP-2 yapısındaki çinko elementine koordinasyon sağlama prensibine dayanmaktadır.

Proje süresinde lizin modifikasyonlarda sentezlerdeki sıkıntılardan dolayı strateji değiştirmeye gidilmesi gerekmiştir. Bu nedenle her bir lizinden 3 farklı modifikasyon sentezlenmiş ancak bunlardan da ikişer tanesinin katlanması başarı ile gerçekleşmiştir. Histidin modifikasyonu model peptitte başarılı olunmasına rağmen esas peptitte click tepkimesinin başarısızlığı nedeniyle gerçekleştirilememiştir. Elde edilen CLTX türevlerinin MMP-2 aktiviteleri ölçülmüş ancak beklenen aksine inhibe etmek yerine aktive ettiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: kanser, matriks metalloproteinaz, klorotoksin, peptit inhibitör, rasyonel ilaç tasarımı, yapısal biyoloji, protein-protein etkileşimleri



ABSTRACT

Matrix metalloproteases (MMPs) are an enzyme class that functions in the remodeling of extracellular matrix. Matrix metalloprotease-2 (MMP-2) is a member of gelatinase class of MMP family and it is an important drug target that is used in the treatment of cancer and autoimmune diseases since it has high activity in the cancer of skin, prostate, bladder, breast, lung, and ovary.

Compared to inhibitor design efforts for other enzymes, MMP inhibitor discovery and development studies are considered to be not successful due to the specificity problem. Previous studies are generally based on the zinc metal coordination chemistry of small organic molecules or synthetic peptide molecules. Organic molecules are not selective and inhibit various structurally similar members of MMP family since they can enter the active site and coordinate to zinc easily. Synthetic peptides, on the other hand, are more target-specific but lack the inhibition potency of organic molecules.

Objective of this project was to develop a novel, chlorotoxin (CTLX) peptide structure-based, selective and highly potent inhibitor that targets MMP-2 which is an important molecular component in cancer therapy.

Inhibitor design is based on the peptide CLTX which is a selective MMP-2 inhibitor with 36 amino acids (4 kDa) originally isolated from the scorpion venom. According to our preliminary work, the strategy for inhibitor design in this project is based on the coordination of four critical positions (H10, K15, K23 ve K27) on CLTX to zinc ion in MMP-2 active site via 20 thiol and azido alanine modifications with different carbon chain lengths. Based on the different positions of the targeted amino acids which includes protein interaction loop regions, at least one of them is expected to be near the active site for zinc coordination.

Due to synthetic problems in the modifications of lysine residues, an alternative modification is developed and three different modified CLTX were synthesized for each lysine residue and two out of three of these derivatives were successfully folded. Histidine modification could not be achieved since the click reaction was failed in the CLTX although it was successful in the model peptides. Activities of the folded peptides were tested and surprisingly an increase in the MMP-2 activity was observed instead of decrease.

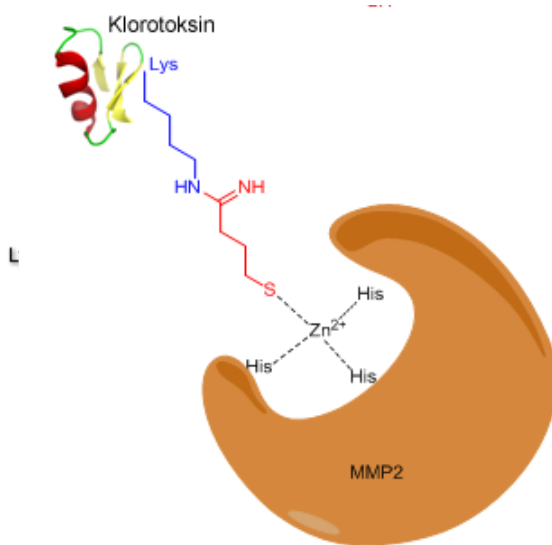
Keywords: cancer, matrix metalloproteinase, chlorotoxin, peptide inhibitor, rational drug design, structural biology, protein-protein interactions

GİRİŞ

Matriks Metalloproteinazlar (MMPler), yapılarında çinko kofaktörü bulunduran ve ekstraselüler matriksin parçalanması ve yeniden oluşumunda görev alarak doku gelişimi ve biçimlenmesinde önemli rolü olan bir proteaz enzim grubudur. Sağlıklı bir bireyde sıkı kontrol altında olan MMP aktivitesinin kontrolden çıkması artrit ve kanser gibi hastalıkların oluşumuna veya ilerlemesine yol açmaktadır. MMP'lerin özellikle tümör oluşumu, doku invazyonu, anjiyogenez ve tümör metastazlarındaki rolü çok detaylı bir şekilde çalışılmıştır.

72 kDa'lık bir protein olan Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2), jelatinaz sınıfı bir MMP'dir ve pankreas, cilt, prostat, mesane, göğüs, kolon, akciğer ve yumurtalık kanserlerinde önemli miktarlarda aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde MMP aktivitesini kontrol altına almak amacıyla MMP inhibitörlerinin (MMPI) geliştirilmesi üzerine önemli sayıda çalışma bulunmaktadır. Bugüne kadar keşfedilen ve geliştirilen inhibitörlerin ortak problemi, seçicilik (spesifisite) olarak ön plana çıkmıştır. MMP protein ailesi yapısal açıdan benzerlik gösteren birçok enzimden oluştuğundan sadece hastalık durumuyla ilgili, hedeflenmiş MMP'nin inhibisyonu büyük önem taşımaktadır. Özellikle küçük organik moleküllerde ortaya çıkan bu seçicilik problemi birçok MMPI'nin klinik aşamalarda başarısız olmasına yol açmıştır.

Bu projede, otoimmün ve kanser gibi hastalıkların terapisinde önemli bir moleküler hedef olan MMP-2 enzimine spesifik, klorotoksin peptit yapısına dayalı, yüksek etkinlikte ve seçicilikte özgün bir inhibitör geliştirmek hedeflenmiştir.



Şekil 1.1. Klorotoksin peptit yapısında kimyasal modifikasyonu yapılacak amino asitler ve tiyol modifikasyonu ile çinko koordinasyon stratejisi.

Sahip olduğu inhibitör sistein düğümü yapısal motifi sayesinde yüksek stablitiye sahip klorotoksin (CLTX), 36 amino asitten oluşan ve seçici olarak MMP-2'yi hedefleyen ve inhibe eden akrep zehiri kökenli bir peptittir. Projedeki stratejimiz, CLTX yapısında belirlenen dört pozisyonda (H10, K15, K23 ve K27) tiyol ve azido alanin modifikasyonları gerçekleştirerek MMP-2 yapısında yer alan çinko elementine koordinasyon sağlamaktır (**Şekil 1.1**). Hedeflenen rezidülerin peptitlerin moleküler etkileşimlerinde rol aldığı bilinen ilmik (loop) de dahil olmak üzere farklı kısımlarında yer alması, içlerinden en azından birinin enzimin aktif bölgesine yakın olma ve çinko koordinasyonu kurma ihtimalini güçlendirmektedir. Bu metal koordinasyonu yoluyla CLTX'in MMP-2 üzerindeki inhibisyon etkisinin (K_i) artırılması amaçlanmıştır.

1. LİTERATÜR ÖZETİ

Matriks metalloproteinazlar (MMPIler), çinko bağımlı proteinaz enzimlerinin bir grubunu oluşturmaktadır. Ekstraselüler matriksin (ESM) parçalanması ve yeniden oluşumunda görev yaparak doku gelişimi ve biçimlenmesini sağlarlar. Bu şekilde, embriyonik gelişim, üreme, doku ve kemik oluşumu, organogenez gibi pek çok fizyolojik süreçte rol almaktadırlar (Barrett vd. 2004; Egeblad vd. 2002; Kobayashi vd. 1999; Zask vd.1996).

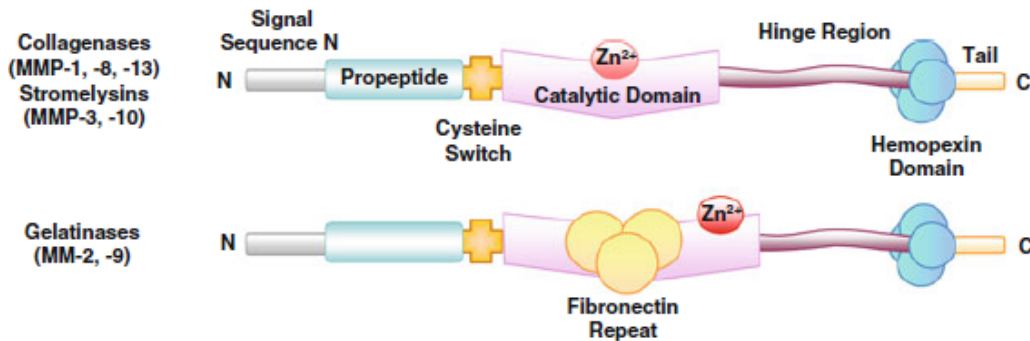
Ancak MMPIler, artrit ve kanser gibi hastalıklarda kontrolden çıkarak inflamasyon ve kanser hücrelerinin invazyonu gibi patolojik durumlarda dokuların yeniden oluşumunda görev yapmakta ve tümör oluşumu, doku invazyonu, anjiyogenez ve tümör metastazlarına yol açmaktadırlar (Barrett, 2004; Egeblad, 2002; Zask, 1996; Nelson, 2000). MMPIlerin, bazal membranlar ve ESM'yi parçalamaları nedeniyle kanser hücrelerinin invazyonu, metastazı ve kanser gelişiminde etkili oldukları bilinmekte ve MMP ekspresyonunun artışı, metastaz belirtisi olarak görülmektedir (Kobayashi vd. 1999; Bafetti vd. 1998; Matrisian vd.1986; Vu vd.1998). Ancak MMPIlerin proteolitik aktivitesi, aynı zamanda ESM içerisinde bulunan üreme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerin de serbest kalmasına yol açmaktadır. Ayrıca MMPIler çeşitli hücre yüzey proteinlerini de ayrıştırabilmektedirler. Böylece MMPIler, hücre gelişimi, sağkalımı, invazyonu, inflamasyon ve anjiyogenezini kontrol eden sinyal yollarını da düzenlemektedirler (McQuibban vd. 2000; Opdenakker vd. 2001; Schönbeck vd. 1998; Van den Steen vd. 2000; Roy vd. 2009; Hatfield vd. 2010; Kessenbrock vd. 2010; Klein vd., 2011; Cauwe vd. 2007; Rodriguez vd. 2010; Van den Steen vd. 2000, 2003; McQuibban 2000, 2002). MMPIlerin ESM'leri parçalayabilme özelliği, inflamatuvar tepki sırasında lökositlerin bazal membran gibi doku bariyerlerini aşmalarına da hizmet etmekte, bu şekilde MMPIler inflamatuvar hücreler için efektör moleküller olarak da görev yapmaktadır (Pruijt 1999; Kollet 2006; Parks 2004). MMPIler akut ve kronik inflamatuvar ve iskemik süreçlerin başlaması ve gelişiminde önem taşımakta olup, akut ve kronik inflamasyonda, otoimmün hastalıklarda, vasküler hastalıklarda ve inflamasyon sonrası rejeneratif dönemde tetikleyici ve ayarlayıcı fonksiyonlara sahiptir. Böylece MMPIler inflamatuvar tepkiler içeren endotoksin şok, miyokard enfarktüs, felç, multipl skleroz, romatoid artrit, damar tıkanıklığı ve otoimmün hastalıklar gibi rahatsızlıklara etki edebilmektedir (Folgueras vd. 2004; Hirose vd. 1992; Opdenakker vd. 2003; Jialiang vd. 2007). Tablo 2.1'de çeşitli MMPIlerin hangi rahatsızlıklarda etkili olduğu gösterilmektedir.

2.1. Matriks Metalloproteinazların Yapısı, Sınıflandırılması ve Çeşitleri

MMPLerin yapıları, yüksek çözünürlüklü X-ray kristallografi ve nükleer manyetik rezonans yöntemleri ile çalışılmıştır. MMPLerin primer yapıları farklı olmasına rağmen bu enzimler benzer ana yapıya ve domain düzenlemelerine sahiptirler (Şekil 2.1). MMPLer çok domainli olup, katalitik bölgelerinde 3 histidin rezidüsü tarafından koordine edilen bir Zn^{2+} iyonu bulundurmaktadırlar (Babine vd.,1997; Maskos 2005). Tüm MMPLerin katalitik bölgelerinde, korunan genel bir sekans motifi, His-Glu-X-Gly-His-X-X-Gly-X-X-His, bulunmaktadır (Bode vd. 1999). MMPLerin domain organizasyonu aşağıdaki unsurlardan oluşmaktadır (Kessenbrock vd. 2010; Klein vd. 2011; Sbardella vd. 2012):

- Pro-enzim sekresyonunda görev yapan hidrofobik pre-peptit
- N terminalinden katalitik domaine kadar uzanan, 80 rezidüden oluşan otoinhibitör pro-domain
- Yüksek korunumlu Zn^{2+} iyonu bağlama bölgesini içeren katalitik domain
- Esnek bir menteşe (hinge) bölgesiyle katalitik domaine bağlanan ve substratların tanınması ve konumlanmasında görev yapan hemopeksin benzeri C terminali domaini

MMPLer hücreler tarafından latent pro-formda salgılanırlar. Bu formda amino terminalinde yer alan pro-domainde bulunan bir sistein sülfidril grubu, Zn^{2+} iyonu ile koordine halde olup aktif siteyi bloke etmektedir. Pro-peptidin proteolizis ile aktif bölgeden uzaklaştırılmasıyla enzim aktive olur. Sistein anahtarı (switch) olarak adlandırılan bu aktivasyon işlemi, tüm MMPLerde görülen karakteristik bir özelliktir (Skiles vd. 2001; Van Wart vd.1990; Kleifeld 2000).



Şekil 2.1. Üstte (a) MMPLerin genel modüler yapısı, altta (b) ise jelatinazların modüler yapısı gösterilmektedir (Benjamin vd. 2012).

Tablo 2.1. Çeşitli hastalıklarda etkili olan MMP türleri (Sbardella vd. 2012).

System	Disease	MMP
Cardiovascular	Aortic aneurysm	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-7 MMP-8 MMP-9 MMP-12 MMP-13 MMP-14
	Atherosclerosis	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-8 MMP-9 MMP-10 MMP-11 MMP-12 MMP-13 MMP-14
	Myocardial infarction	MMP-2 MMP-3 MMP-7 MMP-9 MMP-13 MMP-14
	Left ventricular hypertrophy	MMP-1 MMP-7 MMP-13 MMP-14
	Stroke	MMP-2 MMP-3 MMP-9 MMP-12 MMP-13 MMP-14
Nervous	Alzheimer	MMP-1 MMP-2 MMP-9 MMP-24
	Blood-brain barrier (BBB) disruption	MMP-2 MMP-7 MMP-9 MMP-14
	Brain injury	MMP-7 MMP-13
	Encephalomyelitis	MMP-8 MMP-9 MMP-12 MMP-25
	HIV-dementia	MMP-7
	Intracerebral hemorrhage (ICH)	MMP-12
	Meningitis	MMP-8 MMP-12
	Multiple sclerosis	MMP-2 MMP-7 MMP-9 MMP-12 MMP-19 MMP-25
	Parkinson	MMP-3
	Spinal chord injury	MMP-12
Vascular dementia	MMP-1	
Joint and muscular	Dupuytren	MMP-7
	Inflammatory myopathies	MMP-7
	Medial collateral ligament (MCL) injury	MMP-12
	Osteoarthritis (OA)	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-7 MMP-8 MMP-9 MMP-13 MMP-14 MMP-16 MMP-17
	Polymyositis	MMP-9
Rheumatoid arthritis (RA)	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-8 MMP-9 MMP-12 MMP-13 MMP-14 MMP-19	
Respiratory	Acute respiratory distress syndrome (ARDS)	MMP-3
	Asthma	MMP-1 MMP-8 MMP-9 MMP-12 MMP-25
	Emphysema/chronic obstructive pulmonary (COP)	MMP-1 MMP-8 MMP-9 MMP-12 MMP-14 MMP-25
	Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)	MMP-1 MMP-7 MMP-12
Lung fibrosis	MMP-1 MMP-7 MMP-8 MMP-12	
Digestive	Liver fibrosis	MMP-1 MMP-8 MMP-12 MMP-13 MMP-15
	Liver cirrhosis	MMP-8 MMP-9 MMP
Infectious diseases	<i>Helicobacter pylori</i>	MMP-1
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MMP-1 MMP-7
	<i>Schistosoma mansoni</i>	MMP-12
Autoimmune diseases	Autoimmune inner ear	MMP-9
	Bullous pemphigoid	MMP-9
	C-protein induced myocarditis	MMP-9
	Lupus erythematosus	MMP-2 MMP-9
	Sjögren Syndrome	MMP-9
Other diseases	Diabetic nephropathy	MMP-24
	Endometriosis	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-7 MMP-13 MMP-24
	Periodontal inflammation	MMP-2 MMP-8 MMP-9 MMP-13 MMP-25
Wound healing	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-8 MMP-9 MMP-10 MMP-11 MMP-13 MMP-14 MMP-28	

Şimdiye kadar en az 24 çeşit MMP bulunmuş olup (Tablo 2.2), bu enzimler, substrat spesifitesi ve yapısal organizasyona göre 5 farklı grupta sınıflandırılmaktadırlar (Gioia vd. 2002; Hirose vd. 1993; Murphy vd. 1992; Steffensen vd. 1995; Nagase vd. 1999; Marchenko vd. 2001; Wilson vd. 1996; Sabeh vd. 2009):

- Kolajenazlar: Hemopeksin benzeri domain yoluyla substratı tanıyarak tercihen fibriller kollajeni kesen MMP-1, MMP-8 ve MMP-13 gibi enzimler.

- Jelatinazlar: ESM'nin yapısındaki çeşitli kollajenleri parçalayabilen MMP-2 ve MMP-9 gibi enzimler. Katalitik domainlerinde bulunan kollajen bağlanma domaini, jelatinazların karakteristik özelliklerinden biridir. Kollajen bağlanma domaininde bulunan 3 fibronektin II benzeri tekrar, fibriler kollajen I için bir bağlanma bölgesi olarak davranmaktadır.
- Stromelisinler: Kollajen IV'ü hidrolize edebilen ancak fibriler kollajeni kesemeyen MMP-3, MMP-10 ve MMP-11 gibi enzimler.
- Matrilisinler: Hemopeksin benzeri domaini olmayan, kollajen IV'ü parçalayabilen ancak kollajen I'i kesemeyen MMP-7 ve MMP-26 gibi enzimler.
- Membran tip I MMPLeri (MT-MMPLer): C terminalinde, sitoplazmik bir kuyruk ile tamamlanan fazladan bir domain taşıyan MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 ve MMP-25 gibi enzimler.

Tablo 2.2. MMPLerin domain yapısı ve klasifikasyonu (Sbardella vd. 2012).

MMP group	MMP subgroup	MMP	Alternative name
Simple hemopexin-containing MMPs	Collagenases	MMP-1	Interstitial collagenase
		MMP-8	Neutrophil collagenase
		MMP-13	Collagenase-3
	Stromelysines	MMP-3	Stromelysin-1 (transin-1)
		MMP-10	Stromelysin-2
	Other MMPs	MMP-12	Macrophage metalloelastase
		MMP-19	RASI-1
		MMP-20	Enamelysin
		MMP-27	None
Gelatin-binding MMPs	Gelatinases	MMP-2	Gelatinase-A
		MMP-9	Gelatinase-B
Furin-activated secreted MMPs		MMP-11	Stromelysin-3
		MMP-28	Epilysin
Vitronectin-like insert MMPs		MMP-21	None
Minimal domain MMPs	Matrilysins	MMP-7	Matrilysin-1 (Pump-1)
		MMP-26	Matrilysin-2 (endometase)
Type I-transmembrane MMPs	MTs-MMPs	MT1-MMP	MMP-14
		MT2-MMP	MMP-15
		MT3-MMP	MMP-16
		MT5-MMP	MMP-24
GPI-linked MMPs	MTs-MMPs	MT4-MMP	MMP-17
		MT6-MMP	MMP-25 (leucolysin)
Type II-transmembrane MMPs	MTs-MMPs	MMP-23A	Femalysin
		MMP-23B	None

2.2. Matriks Metalloproteinaz-2

Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ile birlikte MMPLerin jelatinaz sınıfını oluşturmaktadır. Jelatinazlar, denatüre kollajen olan jelatine karşı afinitelerine göre tanımlanmakta olup, yapılarında bulunan



kollajen bağlanma domaini (KBD) ile diğer MMPIlerden ayrılmaktadırlar. Üç fibronektin tip II tekrarından oluşan KBD, katalitik domainde bulunan bir düğümde yer alarak domainin hemen yanında ayrı bir katlanan domain oluşturur. Fibronektin tip II domaini, yüksek oranda aromatik rezidü içeren ve asidik yan zincirleri olmayan sentetik peptitleri tercih eden MMP-2'ye özel bir yapıdır. Jelatinaz A olarak da adlandırılan MMP-2, pro-enzim olarak 72 kDa, aktif enzim olarak ise 62 kDa'dur (Bjorklund vd. 2005; Rao 2005; Briknarova vd. 1999; Trexler vd. 2003).

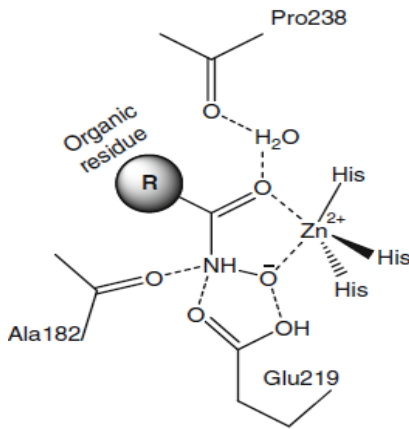
MMP-2'nin domain yapısının (Şekil 2.1b), diğer MMPIlerle paylaştığı bir pro-peptit, yüksek korunumlu bir N terminali katalitik domain, C terminalinde bulunan hemopeksin benzeri bir domain ve jelatinazlara özel KBD'den oluşmaktadır. (Nagase vd. 1999)

Jelatinazlar, KBD aracılığıyla substratları tanımakta ve kollajenöz substrat, elastin, yağ asitleri ve trombospondinlere bağlanmaktadır. Bu nedenle, katalitik domainin yanında bulunan kesme bölgesine doğru konumlandırılabilmesinin, KBD'nin substratlardaki spesifik bağlanma bölgelerini tanınması sayesinde olduğu düşünülmektedir (Gioia vd. 2007; Monaco vd. 2006 Patterson vd. 2001; Murphy vd. 1994; Xu vd. 2007). Hemopeksin benzeri domain, MMP-2'de, diğer MMPIlerin tersine substratın tanınmasında çok küçük bir role sahip olup esas görevi, substratların kısmi çözülmesini sağlayarak engellenen kesme bölgelerine erişimi sağlamaktır (Monaco vd. 2006; Bode vd. 1995; Gioia vd. 2009).

MMP-2, çoğunlukla fibroblastlar, endotel ve epitel hücreleri olmak üzere tüm insan dokularında konstitüf olarak eksprese edilmekte olup MMP-2 aktivitesi, homeostatik fonksiyonlarla bağlantılı bulunmuştur (Van den Steen vd. 2002). Sitokinler, üreme faktörleri, reseptörler ve bağlanma faktörleri gibi substratlar üzerinde etkili olması nedeniyle MMP-2 enzim aktivitesi, pek çok fizyopatolojik süreçle ve neoplastik, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklarla ilintilidir (Sbardella vd. 2012). MMP-2, kollajen ve elastin gibi ESM komponentlerini parçalamakta ve böylece tümör hücre gelişimi, anjiyogenez ve metastaz gibi süreçlerde etkili olmaktadır (Van vd. 2006; Bjorklund vd. 2005; Vihinen vd. 2005; Tu vd. 2008). Pankreas, cilt, prostat, mesane, göğüs, kolon, akciğer ve yumurtalık kanserlerinde MMP-2'lerin önemli miktarlarda bulunduğu, çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Fisher vd. 2009; Ala-aho vd. 2005; Quan vd. 2009; Swarnakar vd. 2012).

2.3. Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri

Matriks metalloproteinaz inhibitörleri (MMPiler) doğal ve sentetik (veya ekzojen) olarak iki kategoriye ayrılmaktadırlar. Doğal MMPilerden en çok çalışılmış olanı, endojenöz metalloproteinaz doku inhibitörleridir (TIMPIler). Doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler MMPileri belli bir dereceye kadar inhibe etse de TIMPIlere göre çok az spesifik ve potent etki göstermektedir. TIMPIlerin dört çeşidi bulunmaktadır, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4. TIMPIler, MMPilerin katalitik bölgelerine MMP substratlarıyla benzer şekilde bağlanarak inhibisyona yol açarlar ve çoğunlukla özel bir MMPye yönelik spesifite göstermeyip metalloproteinazları geniş bir spektrumda inhibe ederler. Ayrıca MT-MMPilere afiniteleri düşük kalmaktadır (Jialiang vd. 2007; Sbardella vd. 2012; Benjamin vd. 2012; Rao 2005; Swarnakar vd., 2012; Vargova vd., 2012). Sentetik (ekzojen) MMPiler geleneksel olarak, yapılarına Zn^{2+} bağlanma grupları (ZBGler) eklenmesi yoluyla dizayn edilmektedir. Bu şekilde MMPilerin substrat kesme bölgelerinin peptit yapıları taklit edilerek peptidomimetik inhibitörler oluşturulmaktadır (Rao 2005). MMPilerde bulunan ZBGler, enzimdeki Zn^{2+} iyonuna bağlanmış su molekülüyle yer değiştirerek enzimi inaktive etmektedir (Şekil 2.2). Ayrıca ZBGlerde bulunan yan zincirler, inhibitörü aktif bölgeye kitleyerek substrata bağlanan bölgelere yönlendirmektedirler (Benjamin vd. 2012; Bjorklund vd. 2005; Verma 2012). MMPiler, ZBGlerine göre 4 sınıfa ayrılmaktadır; hidroksamatlar, karboksilatlar, tiyoller ve fosfonik asitler (Jialiang vd. 2007; Benjamin vd. 2012; Vargova vd. 2012). İlk jenerasyon olarak düşünülebilecek bu MMPilerin çoğu, geniş spektrumlu etki göstermekte olup belli bir MMPye veya MMP grubuna spesifik değildir ancak bazıları belli MMPlere yönelerek selektif hareket etmektedir (Benjamin vd. 2012; Rao 2005; Vargova, vd. 2012).



Şekil 2.2. Hidroksamat inhibitörünün enzimin aktif bölge Zn^{2+} iyonu ile etkileşimleri (Verma 2012).



Hidroksamatların ZBGlerindeki heteroatomlar ile tüm MMPIlerin aktif bölgelerinde bulunan korunumlu komşu amino asit rezidüleri arasında oluşan hidrojen bağlantıları, bu grubu efektif ve potent bir inhibitör yapmakta ve tercih edilmesine yol açmaktadır (Benjamin 2012; Vargova vd. 2012). Hidroksamatların heteroatomları ile enzimin aktif bölgesi arasında önemli herhangi bir olumsuz bağlantı olmaksızın birkaç tane kuvvetli interaksiyon oluşturulması, bu grubu diğer ZBGlerden ayırarak en tercih edilen sentetik MMPI yapmaktadır. Ancak bu durum, hidroksamatı aynı zamanda riskli bir inhibitör yapmaktadır çünkü grubun geometrisindeki en küçük değişiklik önemli bağlanma kaybına yol açma potansiyeline sahiptir (Ra 2005). Çoğu hidroksamat inhibitör spesifik etki göstermemekte, MMP dışındaki Zn^{2+} temelli enzimlere de bağlanmaktadır. Hidroksamatların spesifitesi, karboksilat, tiyol ve fosfor inhibitörlere göre daha azdır (Ra 2005). Ayrıca bu inhibitörlerin kas ve iskelet sistemi üzerine istenmeyen yan etkileri bulunmaktadır ve oral yolla biyoyararlanımları zayıf kalmaktadır (Jialiang vd. 2007; Benjamin vd. 2012; Rao 2005). Hidroksamatlardan sonra en iyi ikinci potansi, reverse hidroksamatlar ve ardından karboksilatlar ve tiyoller ile elde edilmiştir (Ra 2005).

Hidroksamat inhibitörlerin potansisinin karboksilat inhibitörlerden daha fazla olmasının sebebinin asiditedeki farklılıklar olduğu düşünülmektedir. Çünkü karboksilat inhibitörler MMPIlere asidik pH değerlerinde daha sıkı bağlanmaktayken, hidroksamat inhibitörlerin bağlanımı pH değerinden bağımsız gerçekleşmektedir. Karboksilat, efektifliği daha düşük bir ZBG olmasına rağmen yine de etkili bir MMPI olduğu bulunmuştur ve bazıları tedavi açısından umut verici görülmektedir (Jialiang vd. 2007). Karboksilat, tiyol ve fosfor grupları, MMPIlerin aktif bölgesine her iki taraftan da bağlanabilmelerinden dolayı daha selektif inhibitörler olarak etki gösterme potansiyeline sahiptirler. Öte yandan hidroksamatlar, enzimin sadece primer tarafına bağlanabilmeleri dolayısıyla kısıtlanmaktadır (Rao 2005).

İlk jenerasyon MMPIler olarak düşünülebilecek peptidomimetik sentetik inhibitörlerle (örneğin batimastat ve marimastat) gerçekleştirilen klinik çalışmalar başarısız olmuş, yukarıda belirtildiği gibi istenmeyen ciddi yan etkilere yol açmışlardır. Bu inhibitörler ayırım yapmaksızın Zn^{2+} iyonuna sıkıca şelatlanan gruplar üzerinden çalıştıkları için diğer enzimleri de etkileyerek vücut için gerekli hücre fonksiyonlarını da inhibe etmişlerdir (Rao 2005). Bu nedenle spesifite ve biyoyararlanımı arttırmak için yeni bir yaklaşıma ihtiyaç duyulmasıyla, MMP aktif



bölgesinin üç boyutlu konformasyonu üzerinden etki gösteren nonpeptidik ikinci jenerasyon MMP'ler ortaya çıkmıştır (Jialiang vd. 2007; Rao 2005; Bauvois 2012). Bu MMP'ler yüksek spesifiteye sahip olup, ilk prototipi, SB-3CT'dir. Jelatinazlara karşı yüksek selektifliğe sahip olan SB-3CT'de bulunan thiiran grubu, enzimin aktif bölge Zn^{+2} iyonuna koordine olarak konformasyonel bir değişime ve aktif bölgedeki glutamatıyla kovalent bağlantıya yol açar. Bu inhibitörler, intihar (suicidal) inhibitörleri olarak da adlandırılmaktadır (Jialiang vd. 2007).

Substrat protein dizilimine ve faj gösterim metoduna dayalı peptit yapısındaki MMP-2 inhibitörleri 30 nM - 200 μ M arası IC50 dağılımı göstermiş fakat enzime olan zayıf afiniteleri ve stabilite problemleri nedeniyle başarılı olamamışlardır (Ndinguri vd. 2012)

Konnektif dokunun parçalanmasını inhibe eden tetrasiklin antibiyotikleri de ikinci jenerasyon nonpeptidik MMP'lerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Tetrasiklinlerin ve antibiyotik aktivitesi yok edilmiş, kimyasal olarak modifiye edilen tetrasiklinlerin (CMT'ler) MMP'lere bağlanmaları, enzimin normal konformasyonunu bozmakta ve böylece enzim inaktive olmaktadır. Ayrıca CMT'ler, MMP'lerin gen ekspresyonunu da azaltmaktadırlar (Jialiang vd. 2007; Rao 2005; Bauvois 2012). CMT'lerin uzun süreli sistemik uygulaması, gastrointestinal yan etkilere veya toksisiteye yol açmamakta ve uzun süreli yüksek plazma konsantrasyonları elde edilebilmektedir. Öte yandan tetrasiklinler ve CMT'ler kan-beyin ve kan-retina bariyerlerini de aşabilmektedir (Jialiang vd. 2007). Ancak şimdiye kadar, bu MMP'lerle, ilerlemiş kanser hastalarında gerçekleştirilen tüm klinik denemeler başarısız olmuştur (Faz II denemelerine geçmiş olan metastat hariç) (Bauvois 2012). Bir diğer ikinci jenerasyon inhibitör, prinomastat, yalnızca birkaç MMP'ye karşı spesifite gösterebilmekte olup, kanser gelişimini inhibe edebilecek yeterlilikte bir selektiviteye sahip olmayabileceği düşünülmektedir (Rao 2005).

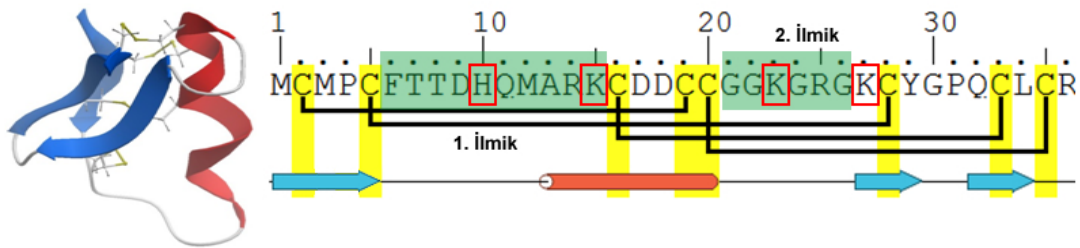
Şu anda laboratuvar fazında veya klinik deneme fazında olan birkaç MMP' bulunmasına rağmen henüz bu ilaçların pazara sunulması söz konusu değildir (Gupta vd. 2014). MMP'leri spesifik olarak inhibe edebilme yetisine sahip, potansisi artırılmış ve düşük toksisiteye sahip yeni jenerasyon MMP'lere ihtiyaç duyulmaktadır. Stabilize edilmiş peptitler ya da peptidomimetik inhibitörlerin bazı önemli avantajları bulunmaktadır. Peptit parçalanma ürünlerinin iyi tolere edilmesi ve peptitlerin biyolojik topolojiyi çok iyi taklit edebilmeleri, bu inhibitörleri çok etkili yapmaktadır. Ancak çok az sayıda mevcut olan peptidik veya peptidomimetik

MMP'ler, geniş spektrumlu etki göstermektedir. Araştırmalar, spesifik MMP'lere karşı yüksek selektiflik gösteren MMP'lerin geliştirilmesi yönüne kaymaktadır. Enzimin aktif bölgesine karşı yüksek spesifiteye sahip MMP'lerin dizayn edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. Klorotoksin

Klorotoksin, 36 amino asitten oluşan (4 kDa) akrep zehri kaynaklı bir nörotoksin peptittir (Wang vd. 2013, Lippens vd. 1995; DeBin vd.1993) (Şekil 2.3). Zehir kökenli diğer birçok peptitte olduğu gibi CLTX de disülfid köprüleri yoluyla oluşturulan ve "İnhibitör Sistein Düğümü" (Inhibitory Cysteine Knot-ICK) adı verilen protein yapısını sergiler. Bu yapısal motif, moleküle sağladığı yüksek stabilite ve dirence bağlı olarak, peptit yapısına dayalı ilaç tasarımı ve geliştirilmesi açısından büyük bir potansiyel taşımaktadır. CLTX'in spesifik olarak beyin kanseri hücrelerini hedeflediği ve hücre migrasyonunu durdurduğu *in vitro* ve *in vivo* deneylerle gösterilmiştir (Deshane vd. 2003, Mrugala vd., 2012; Yin vd. 2007; Lyons vd. 2002). Matriks Metaloproteinaz-2, Anneksin A2 ve Glioma-spesifik klor kanalı, CLTX'in moleküler hedefleri arasında yer almaktadır.

Klorotoksin, spesifik olarak MMP-2'ye bağlanarak enzimin katalitik aktivitesini inhibe etmekte, öte yandan MMP-2'ye benzerlik gösteren MMP-1, MMP-3 ve MMP-9 gibi metalloproteinazlar ile etkileşime girmemektedir. Hücre seviyesinde yapılan çalışmalarda, peptidin 300 nM konsantrasyonda hücre yüzeyi jelatinaz aktivitesini tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir. CLTX'in glioma hücrelerinin matrijel invazyonunu yaklaşık 200 nM IC50 değerinde inhibe ettiği de gösterilmiştir (Deshane vd. 2003; Maertens vd. 2000; Rouzaire-Dubois vd. 2000, Soroceanu vd., 1999). Peptidin MMP-2 inhibisyon sabiti (Ki) enzim kinetiği deneyleri ile henüz belirlenmemiştir. Ayrıca enzimin üzerinde bağlandığı bölge hakkında da bir bilgi yoktur.



Şekil 2.3. Klorotoksinin üç boyutlu yapısı (PDB: 1CHL) ve amino asit dizilimi. "İnhibitör Sistein Düğümü" (Inhibitory Cysteine Knot) yapısal motifini oluşturan disülfid köprüleri sarı renk ile işaretlenmiştir. Alfa heliks ikincil yapısı öncesi ve



sonrasında konumlanan 1. ve 2. ilmik bölgeleri (yeşil) CLTX türü peptitlerin interaksiyon bölgeleri olarak bilinmektedir. Modifiye edilecek amino asitler kırmızı kutucuklar içine alınmıştır.

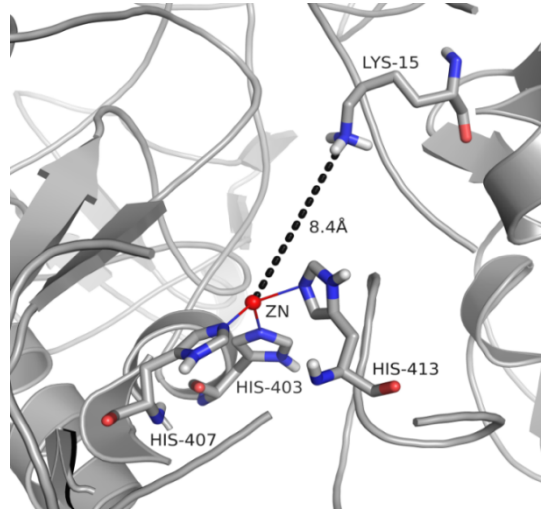
Glioblastoma'ya karşı seçiciliği dikkat çeken CLTX'in, floresan boyalar, MRI kontrast ajanları, kanser ilaçları, nanoparçacıklar ve lipozomlara bağlanmasıyla başarılı tümör hedefleme, görüntüleme, gen taşıma ve susturma çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Fu vd. 2012; Stroud vd. 2011; Xiang vd. 2011, 2012; Kievit vd. 2010; Mok vd. 2010; Veiseh vd. 2005). Sentetik bir CLTX versiyonu olan TM601, faz II klinik aşamasında bulunmaktadır (Hockaday vd. 2004).

Literatürde, seçici bir MMP-2 inhibitörü olan CLTX yapısına dayalı bir inhibitör geliştirme çalışması bulunmayışı bu projeyi hazırlamamızdaki temel motivasyonlardan birisini oluşturmuştur. Klorotoksinin kimyasal modifikasyonu üzerine bulduğumuz en yakın çalışma, peptidin floresan boyalara konjügasyonunu optimize ederek daha etkin bir görüntüleme probu geliştirmek amacıyla Lys15 ve Lys23 amino asitlerinin alanin veya arjinin olarak değiştirilmesi ve Lys27 üzerinden floresan bir molekülün kovalent olarak bağlanmasıdır (Akcan vd. 2011). Çalışmada bu kimyasal modifikasyonların peptidin hücre hedeflemesi üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı sonucuna varılmış ve tek tip boya konjügasyonu içeren CLTX işaretleyiciler geliştirilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Docking Ön Çalışmaları

Klorotoksinin MMP-2' ye bağlanma bölgesini tahmin etmek ve çinko atomuna yakın amino asit pozisyonlarını belirlemek için "Shrödinger Biologics Suite" programının BioLuminate modülü kullanılarak moleküler yerleştirme (rigid-body docking) simülasyonları gerçekleştirilmiştir. MMP-2'nin aktif formunun üç boyutlu yapısı henüz belirlenmediğinden, inaktif form olan Pro-MMP2 yapısından (PDB: 1CK7) pro-domain'i kesilmiş ve enerji minimizasyonu yapılmıştır. Klorotoksin yapısı olarak, 1CHL PDB kodlu NMR yapısı kullanılmıştır. BioLuminate yazılımı 30 adet muhtemel kompleks yapısı oluşturmuş, bunlardan ilk 10 tanesi seçilmiştir. Yüksek skorlu yapıların önemli bölümü, CLTX'in MMP-2'nin aktif bölgesine bağlandığını göstermektedir. Ayrıca CLTX'in Lys15 rezidüsünün MMP-2 çinko atomuna koordinasyon yapabilecek pozisyonda olduğu da görülmüştür (Şekil 3.1).

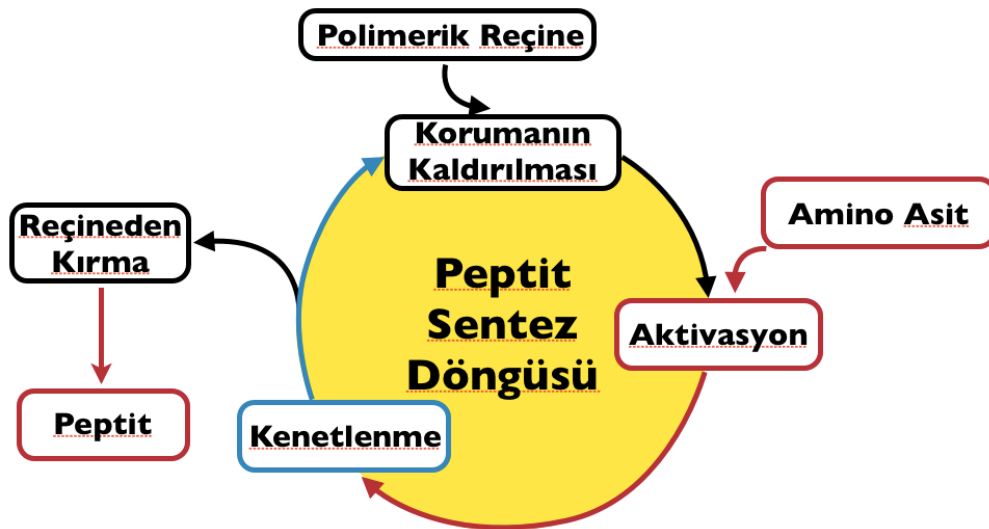


Şekil 3.1. BioLuminate moleküler yerleştirme (docking) yazılımı kullanılarak tahmin edilen CLTX-MMP2 kompleksinin yapısı. Klorotoksinin Lys15 rezidüsü, enzimin üç histidin halkası tarafından çevrilen çinko iyonuna koordinasyon yapabilecek bir pozisyonda yer almaktadır.

3.2. Kimyasal Peptit Sentezi için Genel Bilgiler ve Prosedürler

Peptit sentezi için katı faz peptit sentezi yöntemi kullanılacaktır. Prof. Dr. Robert B. Merrifield tarafından geliştirilen bu metot, güvenilir ve verimli bir yöntemdir (Merrifield vd. 1963, Merrifield vd. 1995, Kent vd. 2009). Katı faz peptit sentezi,

polimerik reçineye bağlı amino asitin serbest amin grubunun sırasıyla amino asitlerle reaksiyonu sonucunda gerçekleşir. Sentez bittiğinde reçine ve koruyucu gruplar kırılır ve ters faz HPLC ile saflaştırılması gerçekleştirilir. Katı faz peptit sentezi, iki farklı stratejiyle yapılabilir. Bu yöntemler, amino asitin amin grubunun Fmoc veya Boc gruplarıyla korunuyor olmasına göre değişmektedir. Fmoc kimyası, Boc kimyasına göre daha güvenlidir çünkü Boc kimyasında koruyucu grupları kırmak için saf HF kullanmak gerekmektedir. Bunun için de özel ekipmanlara ihtiyaç duyulur. Tüm dünyada da Fmoc yöntemi daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat, Boc kimyasının da Fmoc kimyası üzerinde bazı avantajları vardır. Örneğin, Boc kimyası kullanılarak peptit sentezi dört kat daha hızlı olmaktadır. Ayrıca Fmoc kimyasında 20'nin üzerinde amino asit kullanılarak sentezlenen peptitler, Boc kimyasında olduğu kadar saf değildir. Ancak gelişen teknoloji ile, mikrodalga yöntem ile peptit sentezleyen cihazlar oldukça kullanışlı hale gelmiştir. Peptit sentezleyicilerde de ancak Fmoc yöntemi ile peptit sentezi yapılabilmektedir. Zira Boc yönteminde her bir basamakta koruyucu grupların kırılmasında kullanılan TFA, oldukça koroziftir ve bu cihazlar için uygun değildir. Bu projede sentezlenmesi planlanan CLTX'in halkalı türevleri literatürde hem Boc hem de Fmoc yöntemi ile yapılmıştır (Akcan vd. 2013). Peptit sentezleyici kullanılarak yapılan peptit sentezleri ise Fmoc yönteminden kırk kat kadar, Boc yönteminden de üç kat kadar daha hızlıdır. Örneğin, peptit sentezleyici kullanılarak her bir amino asitin takılması sadece 5-7 dakika sürerken bu, Fmoc için 45-60 dakika, Boc yöntemi için ise 15 dakikadır. Bu nedenle bu projede, uygulamadaki pratikliği ve Peptit Sentezleyici cihazlardaki uyumu nedeni ile Fmoc yöntemi kullanılmıştır. Sentezlenen peptitlerin saflığı ters faz HPLC, karakterizasyonu da LC-MS cihazıyla yapılmıştır.



Şekil 3.2. Katı faz peptit sentez döngüsü.

Genel Peptit Sentez Prosedürü: 0,1 mmol peptit sentezinde kenetlenme tepkimelerinin katı fazda gerçekleşmesini sağlayacak polimerik reçine üzerindeki Fmoc koruma grubu öncelikle 10 mL %20 piperidin (DMF içerisinde) çözeltisi içerisinde 10 dakika bekletilir. Bu işlem iki kere gerçekleştirilir. Peptit reaktörünün içerisindeki piperidin çözeltisi vakum yardımıyla uzaklaştırılıp, reçine ~100 mL DMF ile yıkanır. Bu işlemin ardından kenetlenmesi istenilen amino asitten 5,5 kat (0,55 mmol) 20 mL'lik bir cam kap içerisine tartılarak 0,5 mM HBTU (DMF içerisinde) kenetlenme ajanı içerisinde çözülür. Ardından 200 µL diisopropil etil amin (DIEA) çözelti üzerine eklenerek 30 saniye boyunca aktive edilir. Daha sonra pastör pipet yardımıyla peptit sentezi reaktörü içerisindeki polimerik reçine üzerine eklenir. 40 dakika boyunca kenetlenme tepkimesi gerçekleşir ve daha sonra DMF ile yıkanarak reçine temizlenir. Bir sonraki amino asit kenetlenmesi için reçineye son takılan amino asitin amin grubuna bağlı Fmoc koruması yukarıda bahsedildiği şekilde uzaklaştırılır ve ikinci kenetlenme tepkimesi gerçekleştirilir. Sentezlenen yapay amino asitler için 3 kat kullanılarak 3 saat boyunca kenetlenme tepkimesi gerçekleştirilir. Bu işlemler ardarda gerçekleştirilip istenilen peptit zinciri sentezlendikten sonra reçine DCM ile yıkanıp kurutulur. Sonra %95 TFA, %2,5 triisopropil silan (TIPS) ve %2,5 milli-Q su karışımı reçine üzerine eklenir ve 1 saat boyunca bekletilir. Sıvı kısımda toplanan peptit vakum altında derişik hale getirilip soğuk dietil eter ile çöktürülür.

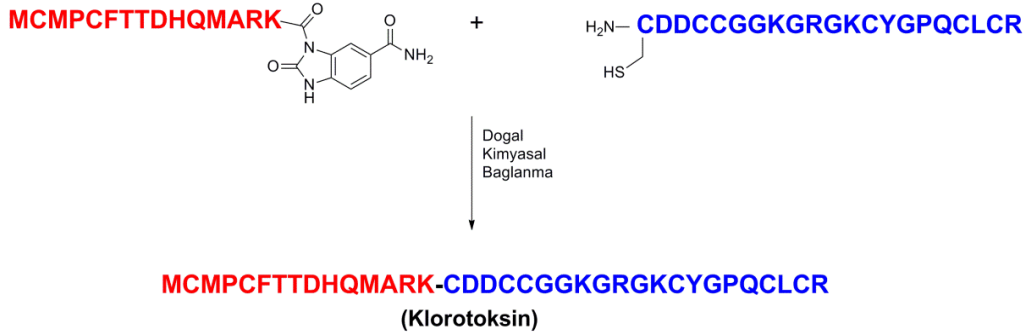
Peptit sentezinde, amino asitler teker teker ilave edildiği ve hangi amino asitlerin bulunduğu bilindiği için, peptit karakterizasyonunda, LC-MS ölçümlerinde peptitin farklı yüklerdeki moleküler iyon pikinin gözlemlenmesi, o peptitin doğru sentezlendiğinin göstergesidir ve peptit ile ilgili yapılan tüm çalışmalarda da yapılan karakterizasyon yöntemi budur. Ters faz HPLC yöntemi ile de saflığı belirlenebilmektedir. LC-MS'in kromatografi kısmında ayrılan piklerin, ayrı ayrı kütle değerleri ölçülebilmekte ve böylece hangi pikin hangi kütleyle sahip olduğu anlaşılabilen ve bu sayede hangi pikin izole edilmesi gerektiği görülmektedir.

3.2.1. Peptitlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması

Peptitlerin karakterizasyonu ve saflığı ise ters faz HPLC (Dionex Ultimate 3000) ve LC-MS (Agilent 1200/6210) cihazları ile ölçülmüştür. Akışkan fazda %0,1 TFA içeren H₂O ve %0,08 TFA içeren CH₃CN kullanılarak, ters faz C-18 (Hypersil Gold, 150 x 4.6 mm, 3 µm) ve C-8 (Hypersil Gold, 150 x 2.1 mm, 5 µm) kolonlar ile 40

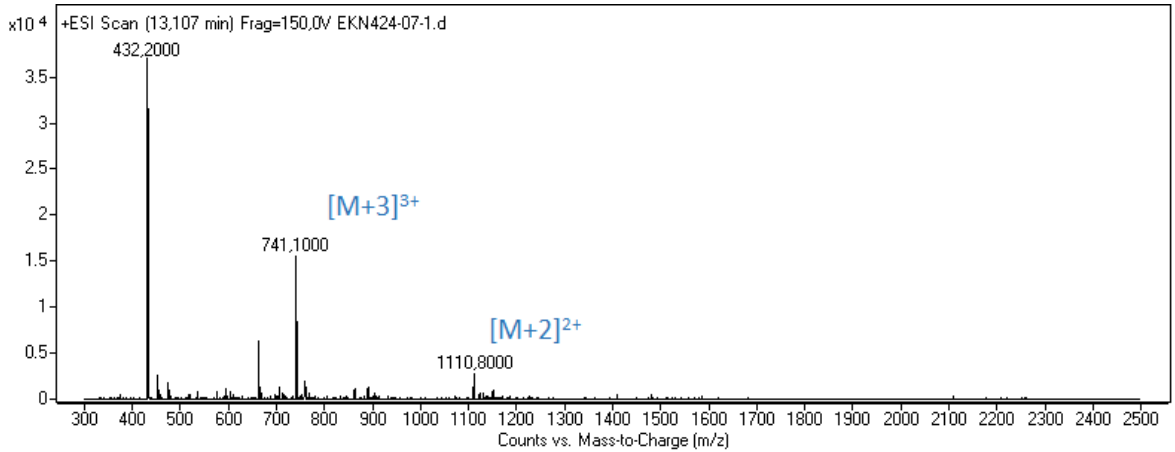
°C'de 210, 280 ve 330 nm'deki absorpsan değerleri takip edilerek ölçülmüştür. Her peptit analizinde kullanılan eğimli akış yöntemi peptitlerin kromatogramlarının altında belirtilmiştir. Kütle ölçümleri ise TOF yöntemi ile ölçüm yapan bir LC-MS cihazında (Agilent 1200/6210) alınmıştır. Saflaştırma işlemlerinde ise C-18 yarı-preperatif HPLC kolonu (Hypersil Gold, 250 x 10 mm, 5 µm) kullanılmıştır.

3.2.2. Doğal kimyasal bağlama yöntemi ile klorotoksin sentezi



Şekil 3.3. Klorotoksinin Doğal Kimyasal Bağlama yöntemi ile sentezi.

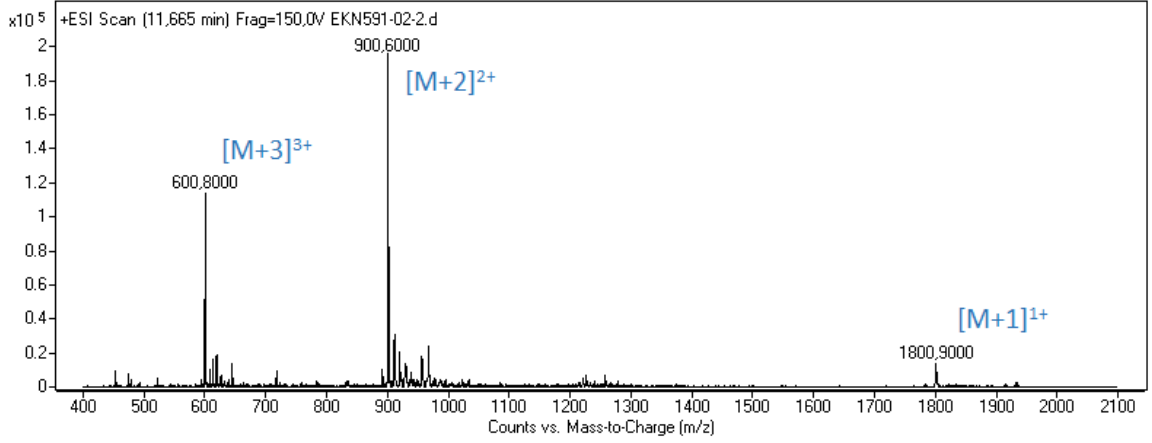
Bu amaçla 21 amino asitli ve N-ucunda Cys amino asiti içeren **CDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR** peptidi Fmoc kimyasına dayalı katı faz peptit sentezi yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir ve LC-MS ile karakterize edilmiştir.



Şekil 3.4. CLTX'nin 21 amino asitlik kısmının kütle spektrumu. Beklenen kütle = 2219,8. Ölçülen = $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 1110,8$ ve $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = 741,1$.

CLTX'nin 15 amino asitlik diğer kısmının C-ucunda Dbz grubu (Diamino benzamit) takılı olarak sentezlenmesi de (**MCMPCFITDHHQMARK-Dbz**) literatürdeki yöntemler takip edilerek sentezlenmeye çalışılmıştır. Ancak yapılan 3 denemede

de peptitin C-ucundaki Dbz grubunun kopmuş hali elde edilmiştir. Dbz'li peptit başarılı bir şekilde sentezlenememiştir.



Şekil 3.5. CLTX'in 15 amino asitlik kısmının Dbz'siz halinin kütle spektrumu. Beklenen kütle = 1959. Ölçülen kütle = 1800,9. Aradaki fark Dbz'nin kopmuş haline denk gelmektedir.

Bu aşamada alternatif yöntemden vazgeçilip proje önerisinde olduğu gibi mikrodalga cihazı ile CLTX'in tek defada sentezlenmesine karar verilmiştir.

3.2.3. Mikrodalga destekli peptit sentezi

Proje bütçesinden alınan CEM marka peptit sentez cihazı ile CLTX'in bir defada 36 amino asitinin birden sentezi Rink-amit polimerik reçinesi üzerinde 0,05 mmol miktarda sentezi yapılmıştır. Genel prosedür şu şekildedir:

Rink amit reçinesi (96 mg, 0.05 mmol) mikrodalga peptit sentez reaktörü içerisine tartılıp DMF ile iki kere yıkandıktan sonra 20-30 dakika 10 mL DMF içerisinde şişmek üzere bırakılmıştır. Ardından 10 mL %5'lik piperazin ve 0.1 M HOBt'nin DMF çözeltisi reaktöre eklenmiştir ve mikrodalga 20 W ve 75 °C'ye ayarlanarak 1 dakika boyunca N₂ gazı altında Fmoc kırma tepkimesi gerçekleşmiştir. Aynı işlen ikinci kez bu defa 3 dakika olacak şekilde tekrarlanmıştır. DMF ile defalarca yıkandıktan sonra kenetlenme tepkimesine geçilmiştir. Bunun için de ayrı bir kaba Fmoc korulu amino asit türevi (5,5 eşdeğer, 0,275 mmol) ve HOBt (5,0 eşdeğer, 0,250 mmol) tartılıp üzerine 2,0 mL 0,3 M diizopropiletilamin (DIEA) eklenmiştir. Oluşan bu tepkime karışımı en fazla bir dakika karıştırıldıktan sonra peptit sentez reaktörüne ilave edilip mikrodalga cihazı 20 W ve 75 °C'ye ayarlanıp 5 dakika boyunca N₂ gazı altında tepkime gerçekleşmesi sağlanmıştır. Sistein ve histidin



amino asitleri hariç tüm amino asitlerin ilavesinde bu prosedür kullanılmıştır. Sistein ve histidin mikrodalga koşullarında yüksek sıcaklıkta rasemikleştiği gösterildiği için bunların ilavesinde sıcaklık 50 °C'ye düşürülmüştür. Kenetlenme tepkimelerinin ardından sentez reaktörü defalarca DMF ile yıkanmış ve Kaiser testi ile de tepkimenin tamamen gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir.

Tüm amino asitlerin ilavesinden sonra, oluşan peptitin polimerik reçine üzerinden kırılması ve tüm koruma gruplarının kaldırılması için %92,5 TFA, %2,5 Triisopropilsilan, %2,5 su ve %2,5 DTT içeren çözelti ile muamele edilip ham peptid eterde çöktürülüp izole edilmiştir. Tüm HPLC ölçüm ve saflaştırma işlemleri analitik ve prep boyutundaki C-8 ve C-18 kolonları ve H₂O (%0,1 TFA): CH₃CN (0,08% TFA) akışkan faz ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Mtt korulu grubun kırılması

Klorotoksin modifikasyonları için istenen lizin pozisyonları Mtt grubu ile korunarak sentezlenip, bu grubun reçine üzerinden seçici bir şekilde uzaklaştırılıp, gereken modifikasyonlar yapılmıştır. Seçici uzaklaştırma için şu genel prosedür uygulanmıştır:

Reçine 20 dakika boyunca DCM içerisinde şişirildikten sonra %1,8 (hacimce) TFA/DCM çözeltisi (1 g reçine başına 10 mL olacak şekilde) ilave edilip oda sıcaklığında 3 dakika tepkimeye girmesi beklenmiştir. Ardından oluşan sarı çözelti süzülerek alınıp aynı işlem dokuz kere daha tekrarlanmıştır. Dokuzuncunun ardından reçine DCM ile sarı renk tamamen kaybolana dek yıkanmıştır. Ardından son olarak reçine DMF ile yıkanarak modifikasyon tepkimesi için hazır hale getirilmiştir.

3.2.5. Lizin modifikasyonu

Mtt grubunun seçici olarak kırılmasının ardından reçine üzerinde serbest amin grubu içeren lizin grubuna aşağıdaki genel prosedürle ilgili modifikasyonlar yapılmıştır:

Modifikasyon olarak eklenecek olan amino asit (3,5 eşdeğer) ve HBTU (3,0 eşdeğer) bir kaba tartılıp üzerine 0,3 M DIEA içeren DMF ilave edilerek çözülür ve aktivasyon tepkimesi gerçekleştirilir. En fazla bir dakika sonra bu karışım Mtt'si kırılmış peptid reçine üzerine ilave edilir. Tepkimeye girmeleri için 2-3 saat boyunca 15 dakikada bir cam çubuk ile karıştırmak suretiyle bekletilir. Kaiser testinden

negatif sonuç verene kadar beklenilir. Tepkimenin tamamlanmasının ardından önce DMF, ardından DCM ile yıkanıp kurutulur.

3.2.6. Histidin modifikasyonu

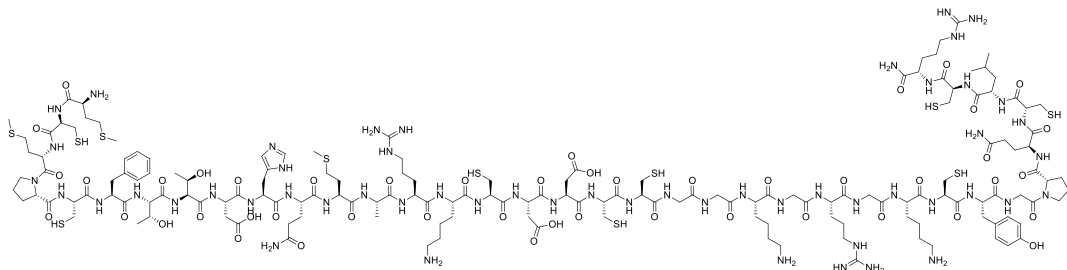
Histidin modifikasyonu için sentezlenen model peptitler ve azido klorotoksin türevi bakır(I) katalizörlüğünde aşağıdaki prosedüre göre click tepkimesine sokulmuştur: Azido amino asit içeren peptit sentezi tamamlanıp hala reçine üzerindeyken 10 mL DMF ile 30 dakika boyunca şişirilip, üzerine 5 eşdeğer alkin türevi, 5 eşdeğer CuI ve 5 eşdeğer sodyum askorbat konarak DMF içinde %20 (hacimce) piperidin içeren çözelti ile son derişimler 60 mM olacak şekilde karıştırılmıştır. Tepkime FTIR ile 2200 cm^{-1} 'deki karakteristi azit piki üzerinden takip edilmiştir.

3.2.7. Klorotoksinin ve türevlerinin katlanması

Sentez ve ardından ters faz HPLC ile CLTX'nin saf olarak elde edilmesinin ardından indirgenmiş halde bulunan CLTX Howl'un Peptide Synthesis and Applications kitabında anlatılan yöntem ile aşağıdaki şekilde katlanmıştır. CLTX, derişimi 0,1 mg/mL ve 0,1 M Tris.HCl içerecek şekilde suda çözülmüş ve bu çözeltide 10 mM GSH, 1,0 mM GSSG ve 1,0 mM EDTA olacak şekilde glutatyon, glutatyon disülfür (yükseltgenmiş glutatyon) ve EDTA eklenmiştir. Çözeltinin pH değeri NH_4OH kullanılarak 7,7-8,7 olacak şekilde ayarlanmış ve 72 saat yavaş hızda karıştırılarak süreç boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır. Katlanma süreci, prosedür başlangıcının itibaren analitik HPLC (RP-C18 kolon) ile kontrol edilmiştir. 72 saatin sonunda çözeltinin içinde bulunan Tris.HCl ve glutatyonlardan kurtulmak için diyaliz yöntemi uygulanmıştır.

3.3. Peptit Sentezleri

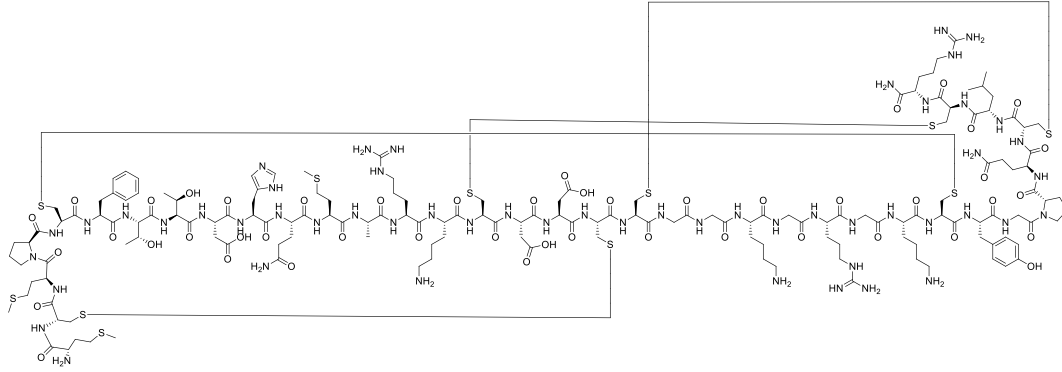
3.3.1. Klorotoksin Sentezi



Mikrodalga peptit sentezi kullanılarak klorotoksin sentezi genel prosedürle sentezlenmiştir. Elde edilen ham klorotoksinin ters faz HPLC kromatogramı alınmıştır.

HRMS $C_{158}H_{257}N_{53}O_{47}S_{11}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1334.5504, Ölçülen 1334.5496.

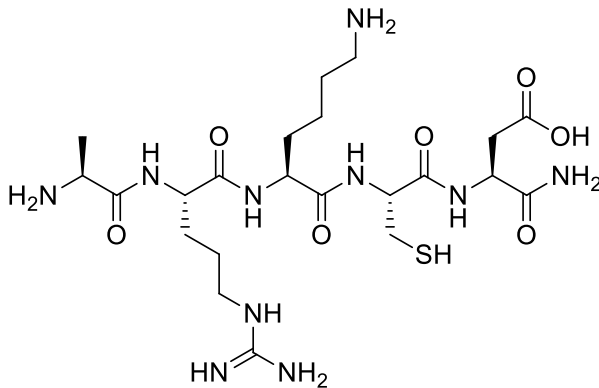
3.3.2. Katlanmış Klorotoksin Sentezi



Genel katlama prosedürü kullanılarak saflaştırılmış klorotoksinin katlanması gerçekleştirilmiştir. Yapılan diyaliz ile ortamdaki küçük molekül ve iyonların uzaklaştırılmasının ardından tekrar ters faz HPLC ile saflaştırılıp HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{158}H_{249}N_{53}O_{47}S_{11}$ $[M+2H]^{2+}$: Hesaplanan 1997.2904, Ölçülen 1997.2913.

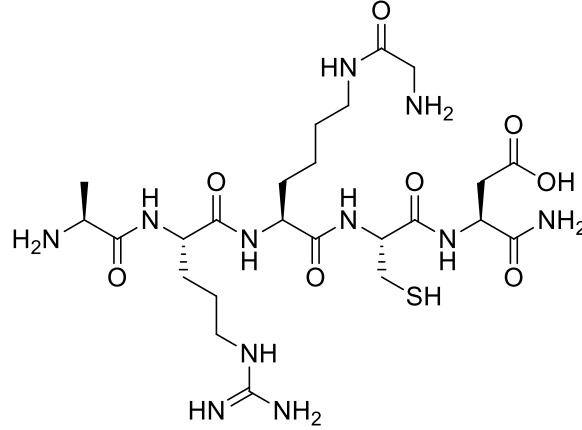
3.3.3. Lizin modifikasyonu için model peptit sentezi



Genel peptit sentez yöntemi ile sentezlenmiştir. Model peptit olduğu için saflaştırılmayıp sadece HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{22}H_{42}N_{10}O_7S$ $[M+H]^+$: Hesaplanan 591.3032, Ölçülen 591.3129.

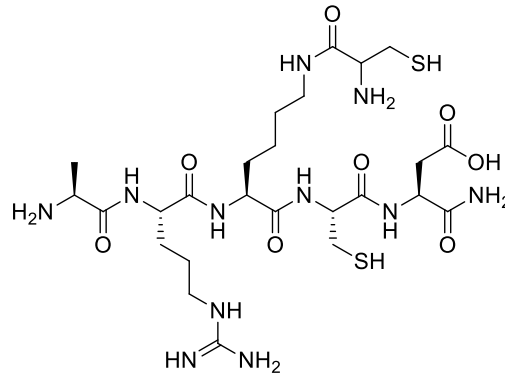
3.3.4. Glisin ile modifikasyonu yapılmış model peptit sentezi



Genel Lizin modifikasyon prosedürüne göre Fmoc-Gly-OH ile tepkimeye sokularak sentezlenmiştir. Model peptit olduğu için saflaştırılmayıp ham hali HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS C₂₄H₄₅N₁₁O₈S [M+H]⁺: Hesaplanan 648.3247, Ölçülen 648.3260.

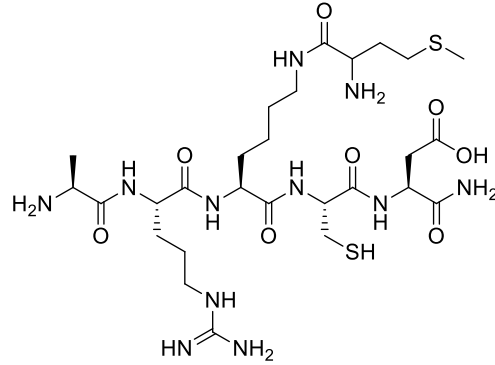
3.3.5. Sistein ile modifikasyonu yapılmış model peptit sentezi



Genel Lizin modifikasyon prosedürüne göre Fmoc-Cys(Trt)-OH ile tepkimeye sokularak sentezlenmiştir. Model peptit olduğu için saflaştırılmayıp ham hali HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS C₂₅H₄₇N₁₁O₈S₂ [M+H]⁺: Hesaplanan 694.3124, Ölçülen 694.3117.

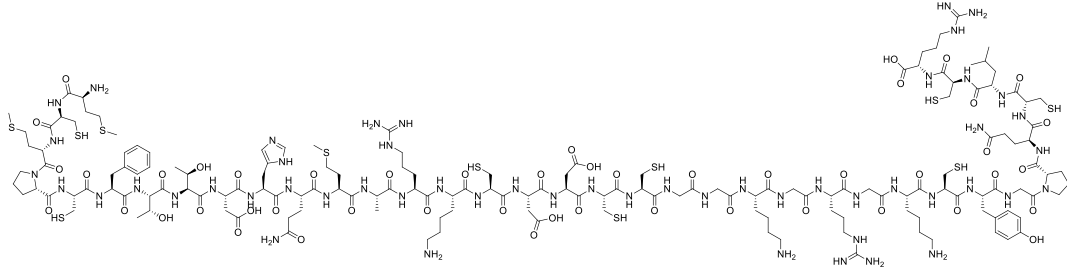
3.3.6. Metiyonin ile modifikasyonu yapılmış model peptit sentezi



Genel Lizin modifikasyon prosedürüne göre Fmoc-Lys(Boc)-OH ile tepkimeye sokularak sentezlenmiştir. Model peptit olduğu için saflaştırılmayıp ham hali HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS C₂₇H₅₁N₁₁O₈S₂ [M+H]⁺: Hesaplanan 722.3437, Ölçülen 722.3464.

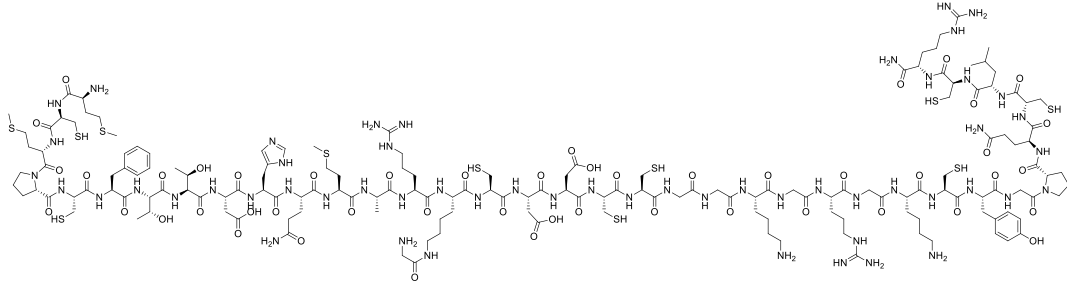
3.3.7. Lys-15 pozisyonu Mtt ile korulu olarak sentezlenen klorotoksin



Genel peptit sentez prosedürü kullanılarak sadece Lys-15'in koruma grubu olarak Mtt kullanılarak sentezlenmiştir. Reçineden kırma ve koruma gruplarının uzaklaştırılmasının ardından doğal klorotoksin elde edilmiştir. Mtt grubunun senteze etkisinin olmadığını göstermek amacı ile küçük bir miktarda reçine kırılarak sadece HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS C₁₅₈H₂₅₇N₅₃O₄₇S₁₁ [M+3H]³⁺: Hesaplanan 1334.5504, Ölçülen 1334.5476.

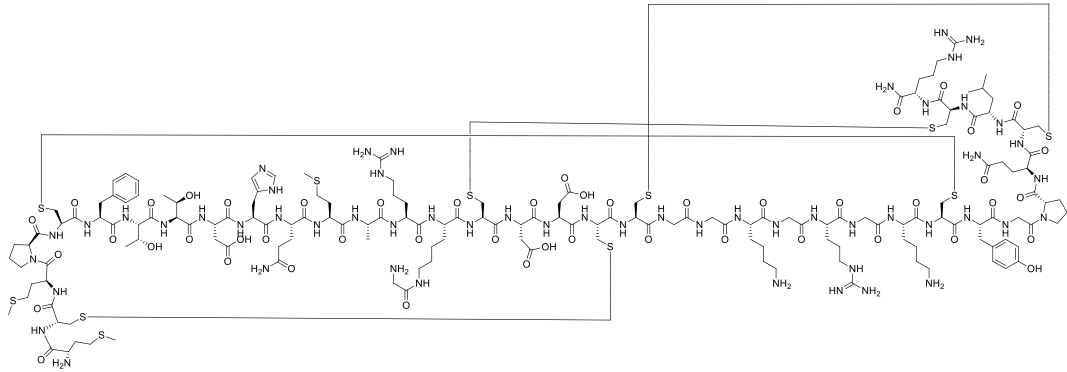
3.3.8. Lys-15 pozisyonu glisin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel Lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{160}H_{260}N_{54}O_{48}S_{11}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1354.6146, Ölçülen 1354.5535.

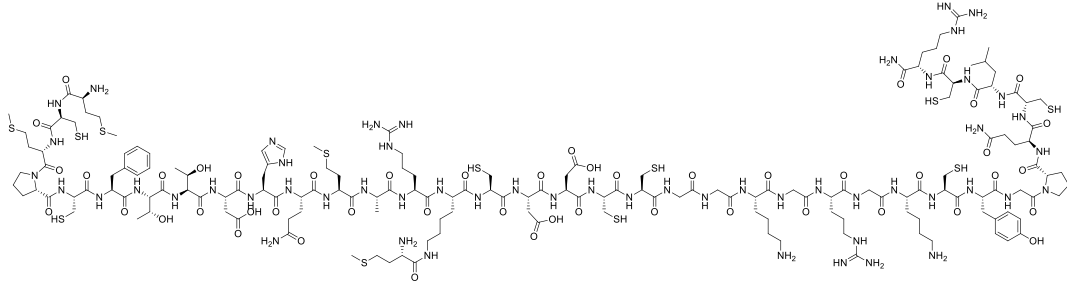
3.3.9. Lys-15 pozisyonu glisin ile modifiye edilmiş klorotoksinin katlanması



Genel katlama prosedürü kullanılarak saflaştırılmış glisin modifiye klorotoksin katlanmıştır. Diyaliz ile tuzların ve küçük molekülleri uzaklaştırılmasının ardından ters faz HPLC ile saflaştırılıp HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{160}H_{252}N_{54}O_{48}S_{11}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1351.9280, Ölçülen 1351.8551.

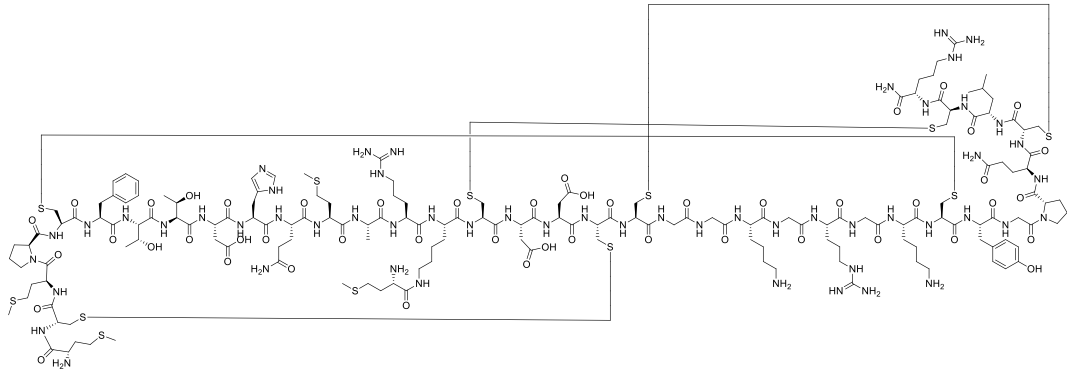
3.3.10. Lys-15 pozisyonu metiyonin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel Lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{163}H_{266}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1378.8980, Ölçülen 1378.8820.

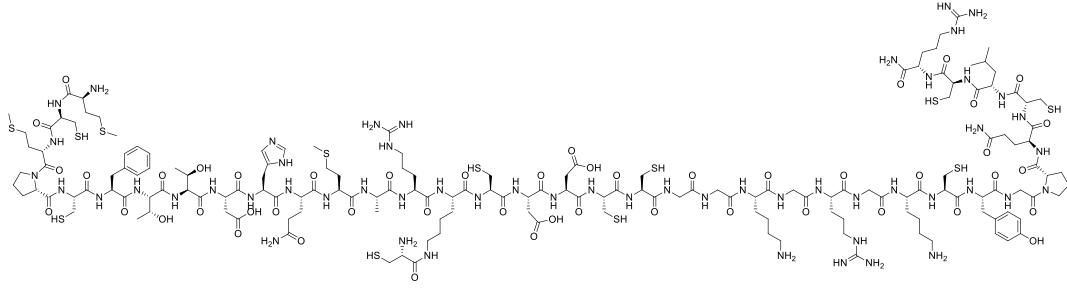
3.3.11. Lys-15 pozisyonu metiyonin ile modifiye edilmiş klorotoksinin katlanması



Genel katlama prosedürü kullanılarak saflaştırılmış glisin modifiye klorotoksin katlanmıştır. Diyaliz ile tuzların ve küçük molekülleri uzaklaştırılmasının ardından ters faz HPLC ile saflaştırılıp HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{163}H_{258}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+4H]^{4+}$: Hesaplanan 1032.1610, Ölçülen 1032.1438.

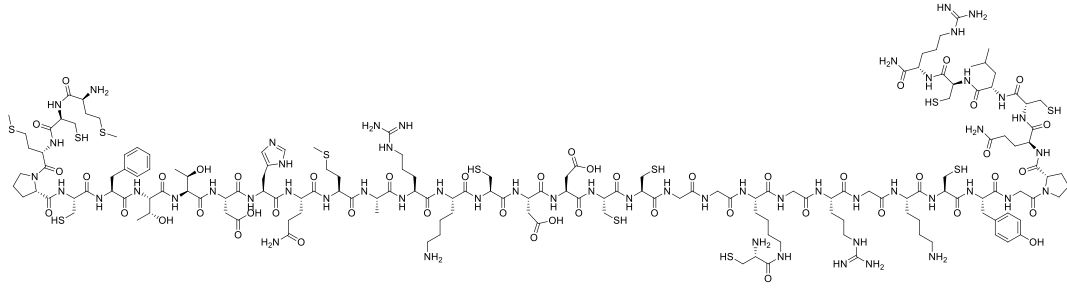
3.3.12. Lys-15 pozisyonu sistein modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{161}H_{262}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1368.8868, Ölçülen 1368.8823.

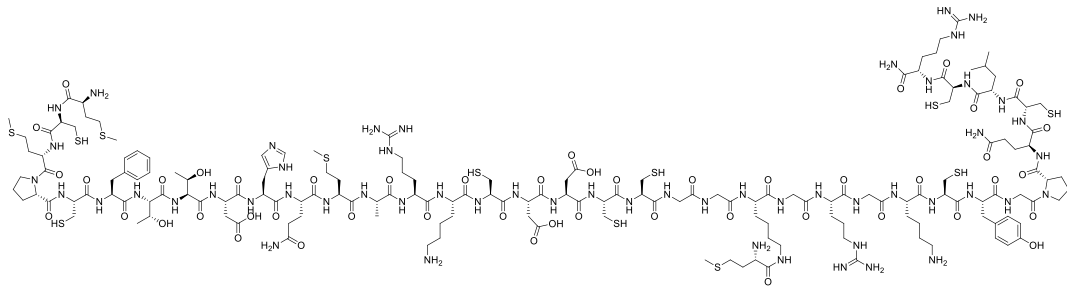
3.3.13. Lys-23 pozisyonu sistein modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{161}H_{262}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1368.8868, Ölçülen 1368.9327.

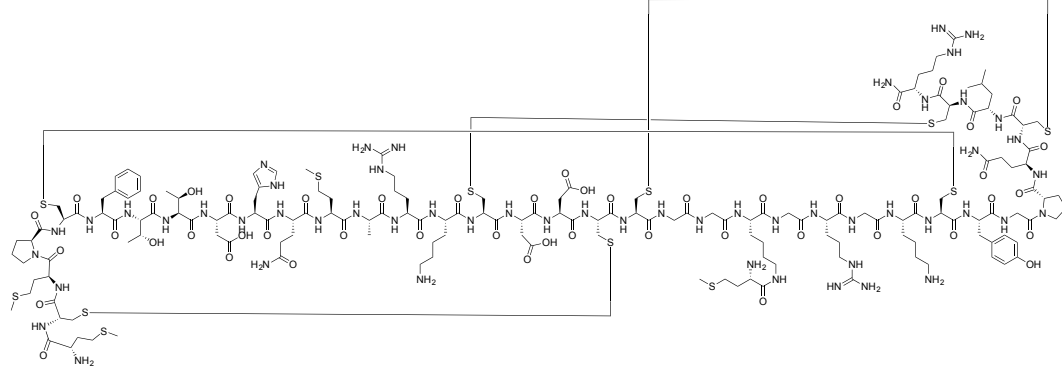
3.3.14. Lys-23 pozisyonu metiyonin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{163}H_{266}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1379.3313, Ölçülen 1379.2715.

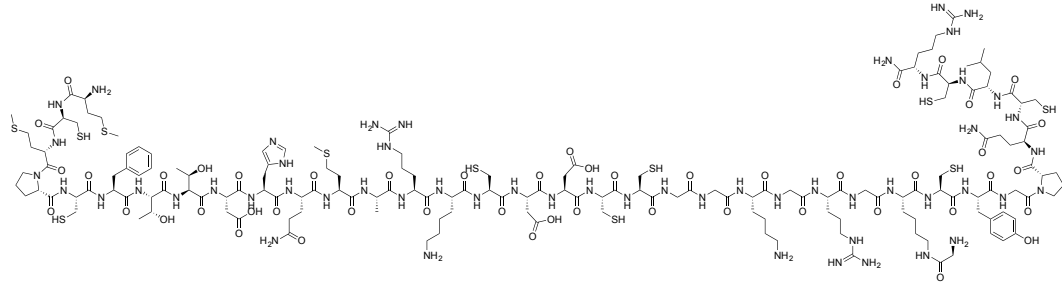
3.3.15. Lys-23 pozisyonu metiyonin ile modifiye edilmiş klorotoksinin katlanması



Genel katlama prosedürü kullanılarak saflaştırılmış metiyonin modifiye klorotoksin katlanmıştır. Diyaliz ile tuzların ve küçük molekülleri uzaklaştırılmasının ardından ters faz HPLC ile saflaştırılıp HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{163}H_{258}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+4H]^{4+}$: Hesaplanan 1032.1610, Ölçülen 1032.1522

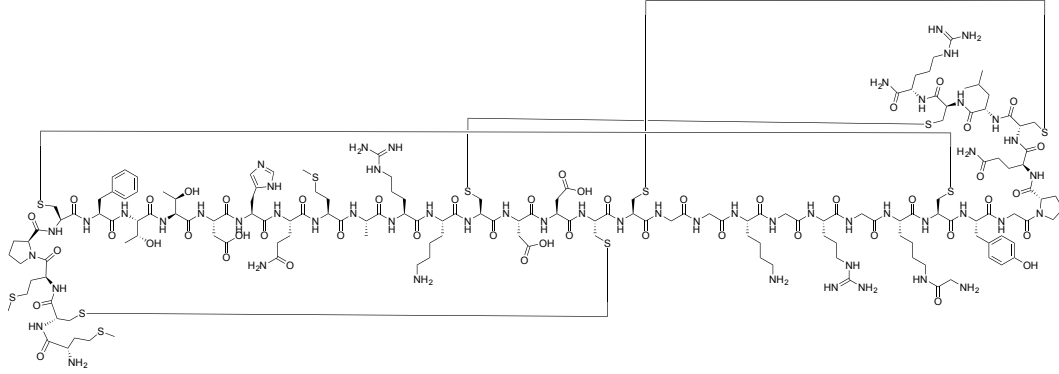
3.3.16. Lys-23 pozisyonu glisin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel Lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{160}H_{260}N_{54}O_{48}S_{11}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1354.5575, Ölçülen 1354.5485.

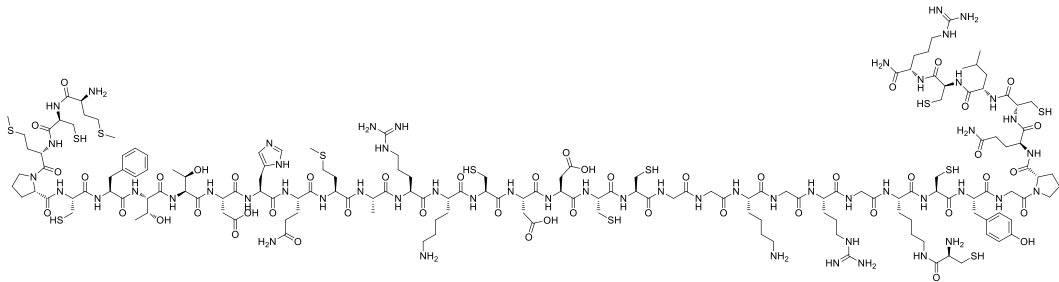
3.3.17. Lys-23 pozisyonu glisin ile modifiye edilmiş klorotoksinin katlanması



Genel katlama prosedürü kullanılarak saflaştırılmış glisin modifiye klorotoksin katlanmıştır. Diyaliz ile tuzların ve küçük molekülleri uzaklaştırılmasının ardından ters faz HPLC ile saflaştırılıp HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{160}H_{252}N_{54}O_{48}S_{11}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1351.9280, Ölçülen 1351.9317.

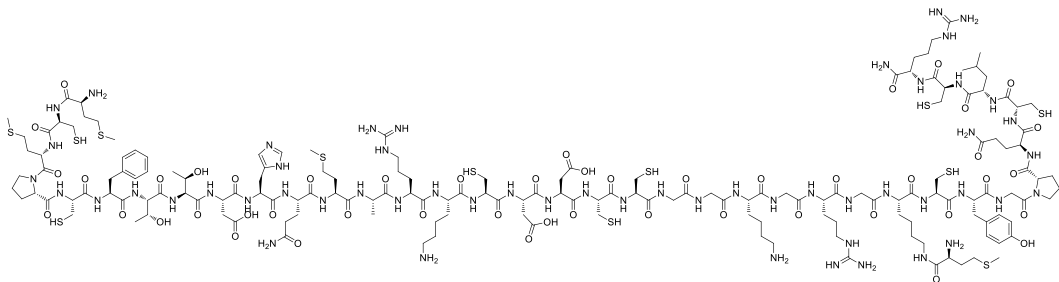
3.3.18. Lys-27 pozisyonu sistein modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{161}H_{262}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1368.8868, Ölçülen 1368.9327.

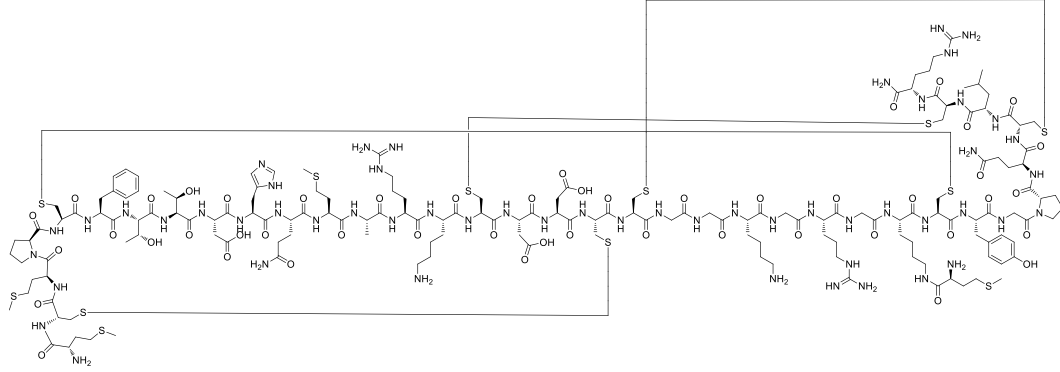
3.3.19. Lys-27 pozisyonu metiyonin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{163}H_{266}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1378.2305, Ölçülen 1378.2374.

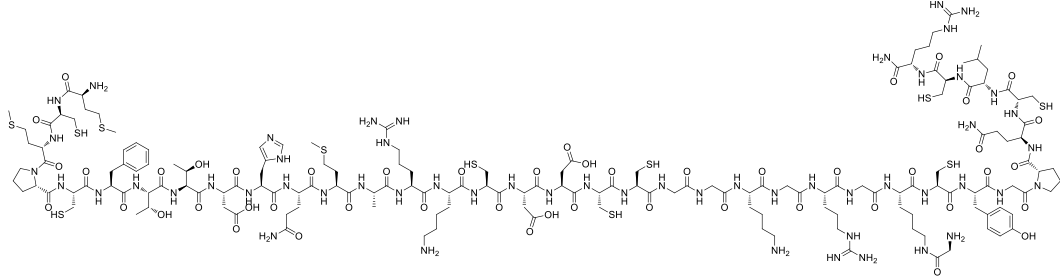
3.3.20. Lys-27 pozisyonu metiyonin ile modifiye edilmiş klorotoksinin katlanması



Genel katlama prosedürü kullanılarak saflaştırılmış metiyonin modifiye klorotoksin katlanmıştır. Diyaliz ile tuzların ve küçük molekülleri uzaklaştırılmasının ardından ters faz HPLC ile saflaştırılıp HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{163}H_{258}N_{54}O_{48}S_{12}$ $[M+4H]^{4+}$: Hesaplanan 1032.1610, Ölçülen 1032.1771.

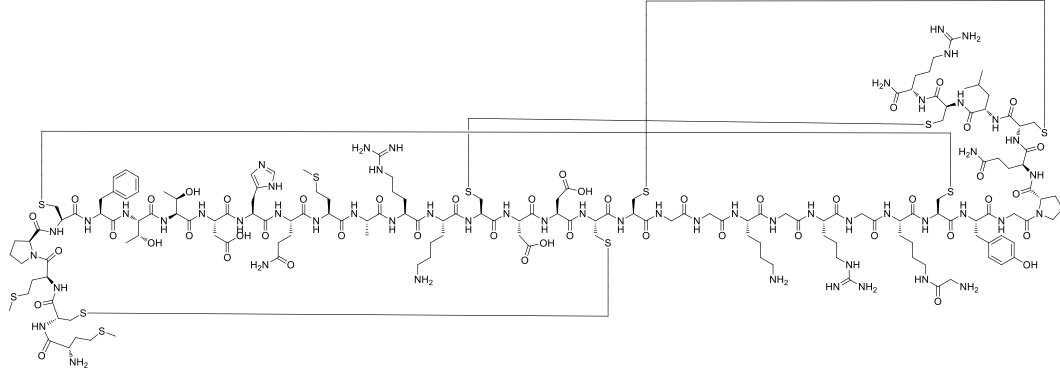
3.3.21. Lys-27 pozisyonu glisin modifiye edilmiş klorotoksin sentezi



Genel Lizin modifikasyon prosedürü kullanılarak sentezlenmiştir. Ham peptit ters faz HPLC ile saflaştırılıp ardından HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{160}H_{260}N_{54}O_{48}S_{11}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1354.5575, Ölçülen 1354.5110.

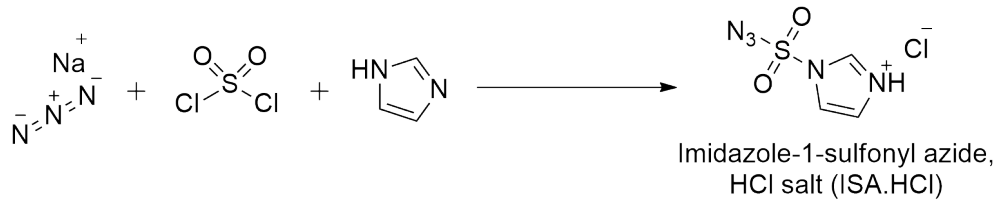
3.3.22. Lys-27 pozisyonu glisin ile modifiye edilmiş klorotoksinin katlanması



Genel katlama prosedürü kullanılarak saflaştırılmış glisin modifiye klorotoksin katlanmıştır. Diyaliz ile tuzların ve küçük molekülleri uzaklaştırılmasının ardından ters faz HPLC ile saflaştırılıp HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{160}H_{252}N_{54}O_{48}S_{11}$ $[M+3H]^{3+}$: Hesaplanan 1351.9280, Ölçülen 1351.8911.

3.3.23. İmidazole-1-sülfonil azit, HCl tuzu (İSA.HCl) sentezi

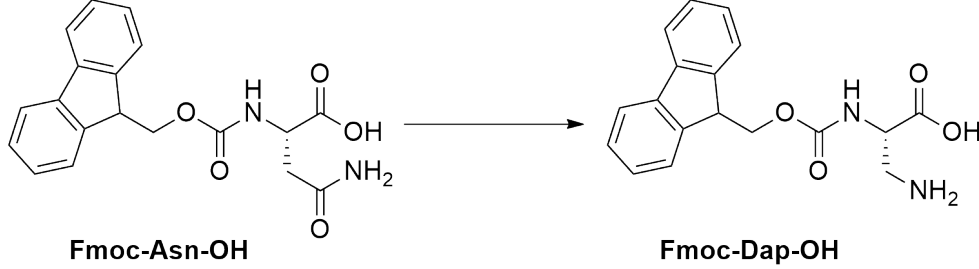


Literatürdeki prosedüre göre (Goddard vd, 2007), 50 mL asetonitril 3Å moleküler elek ile gece boyu kurutuldu. Sülfürlü klorür (4.00 mL, 50.0 mmol) 0 °C'deki 50 mL asetonitril içindeki sodyum azit (3.20 g, 50.0 mmol) çözeltisine damla damla eklenmiştir ve oda sıcaklığında gece boyu karıştırılmıştır. Ardından, 0 °C'deki bu karışıma imidazol (6.80 g, 0.10 mol) yavaşça eklenip, 4 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. 4 saatin ardından, oluşan bu karışım 100 mL etil asetatla seyreltilmiştir ve 100 mL distile su ve sulu sodyum bikarbonat çözeltisiyle ikişer kez yıkanmıştır. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulup filtre edilmiştir. Ardından çözücünün uçurulması ile imidazole-1-sülfonil azit sarı renkli bir yağimsı sıvı olarak elde edilmiştir.

Buz banyosunun içindeki 20 mL kuru etanole yavaşça asetil klorür (5.7 mL, 80 mmol) karıştırılarak eklenmiştir. Oluşan çözelti 0 °C'ye soğutulmuş imidazole-1-sülfonil azit üzerine damla damla eklenmiştir. Elde edilen süspansiyon filtre edilip, 100 mL soğuk etil asetat ile üç kez yıkanmıştır. imidazol-1-sülfonil azit, HCl tuzu (İSA.HCl) %56 (5.9 g) verimle izole edilmiştir.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) 7.70 (1H, dd, $J = 0.8, 1.7$ Hz), 8.10 (1H, dd, $J = 1.4, 1.7$ Hz), 9.55 (1H, dd, $J = 0.8, 1.4$ Hz)

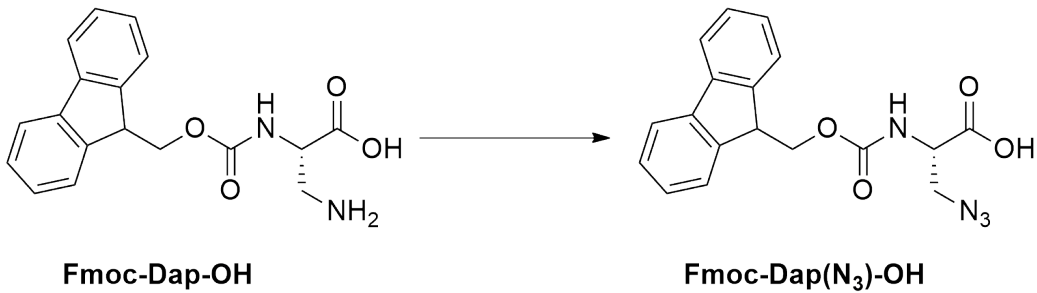
3.3.24. Fmoc-Dap-OH sentezi



Literatürdeki prosedüre göre (Lau vd, 2011), Fmoc-Asn-OH (5.55 g, 15.6 mmol) iki fazlı asetonitril, etil asetat ve distile su (24 mL, 24 mL, 12 mL) çözeltisine eklenmiştir. Ardından, oluşan süspansiyona diasetoksiyodobenzen (6.10 g, 18.8 mmol) güçlü bir karıştırma ile eklenmiştir ve gece boyu bu şekilde karıştırılmıştır. Buz banyosunda soğutulan karışım filtre edilip 50 mL soğuk etil asetat ile yıkanmıştır. Ardından elde edilen katı 70 °C'deki izopropil alkol içerisinde çözülüp yenidenkristallendirme yöntemiyle Fmoc-Dap-OH %57 (2.9 g) verimle beyaz katı olarak izole edilmiştir.

^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) 7.80 (2H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.70 (2H, d, $J = 5.5$ Hz), 7.40 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.30 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 6.80 (1H, d, $J = 4.6$ Hz), 4.40–4.20 (3H, m), 3.70–3.85 (1H, m), 3.00 (1H, dd, $J = 10.6, 4.1$ Hz), 2.80 (1H, t, $J = 10.5$ Hz).

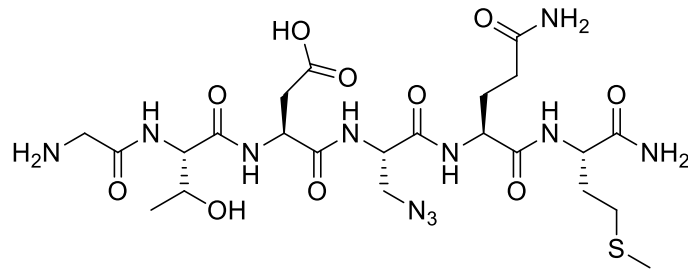
3.3.25. Fmoc-Dap(N_3)-OH sentezi



Literatürdeki prosedüre göre (Picha vd, 2017), Fmoc-Dap-OH (2.02 g, 6.22 mmol) iki fazlı metanol, diklorometan ve distile su (60 mL, 50 mL, 30 mL) çözeltisinde çözülmüştür. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10.0 mg, 0.040 mmol) ve İSA.HCl (4.04 g, 19.2 mmol) oluşan iki fazlı çözeltiye eklenip, pH sodium karbonat çözeltisi ile dikkatlice 9'a ayarlanıp güçlü bir karıştırma ile gece boyu bırakılmıştır. Ardından 60 mL

diklorometan karışımına eklenerek sulu faz izole edilmiştir. Organik faz 100 mL doymuş sodium bikarbonat çözeltisi ile iki kez ekstrakt edilmiştir. Bütün sulu fazlar birleştirilerek 100 mL dietil eter ile iki kez yıkanmıştır. pH konsantre HCl kullanılarak 2'ye ayarlanıp, 100 mL dietil eter ile iki kez ekstrakt edilmiştir. İzole edilen organik faz $MgSO_4$ ile kurutulup, çözücü uçurulmuştur. Fmoc-Dap(N_3)-OH son olarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve %77 (1.7 g) verimle bej katı olarak elde edilmiştir. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.75 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.60 (2H, d, $J = 6.2$ Hz), 7.45 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.30 (2H, tt, $J = 7.5, 1.1$ Hz), 5.70 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 4.60–4.75 (1H, m), 4.50–4.35 (2H, m), 4.20 (1H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.70–3.85 (2H, m).

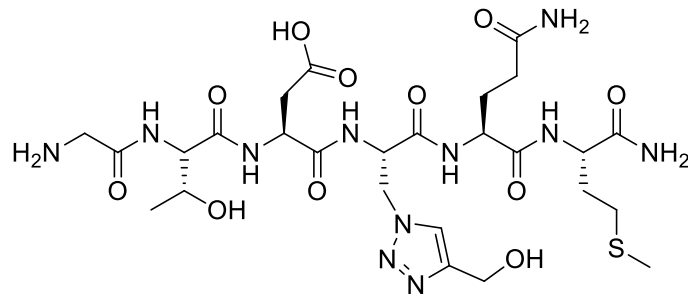
3.3.26. Azido klorotoksin türevi için model azido peptit sentezi



Mikrodalga peptit sentezi prosedürü kullanılarak mikrodalga uygulamadan oda sıcaklığında sentezlenmiştir ve kenetlenme tepkimeleri 30 dakika, Fmoc kırma tepkimesi ise 3+10 dakika sürelerde yapılmıştır.

HRMS $C_{23}H_{39}N_{11}O_{10}S$ $[M+H]^+$: Hesaplanan 622.2675, Ölçülen 622.2700.

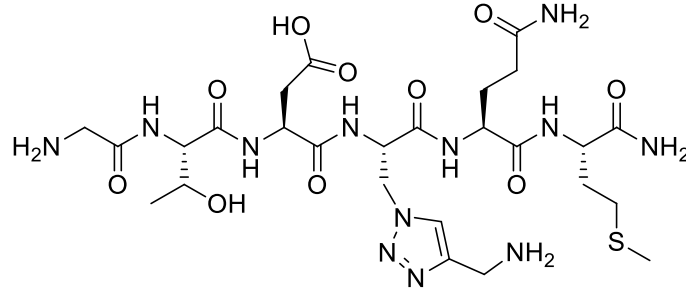
3.3.27. Model peptit üzerinde proparjil alkol ile click tepkimesi



Katı fazda click tepkimesinin genel prosedürü kullanılarak proparjil alkol ile sentezlenmiştir. Ham peptit HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{26}H_{43}N_{11}O_{11}S$ $[M+H]^+$: Hesaplanan 718.2937, Ölçülen 718.2996.

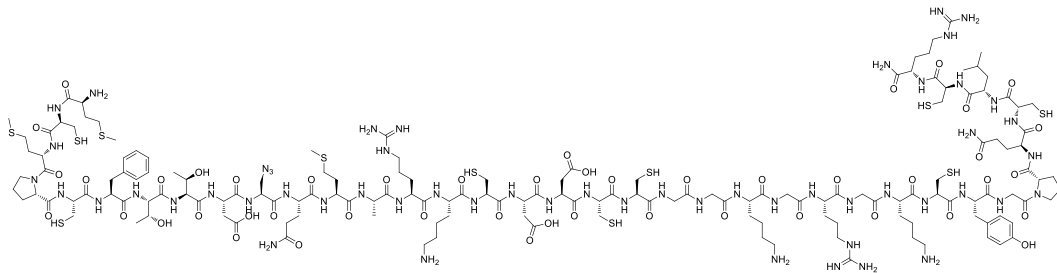
3.3.28. Model peptit üzerinde proparjil amin ile click tepkimesi



Katı fazda click tepkimesinin genel prosedürü kullanılarak proparjil amin ile sentezlenmiştir. Ham peptit HRMS ile karakterize edilmiştir.

HRMS $C_{26}H_{44}N_{12}O_{10}S$ $[M+H]^+$: Hesaplanan 717.3097, Ölçülen 717.3148.

3.3.29. Azido klorotoksin sentezi



Doğal klorotoksinin histidin-10 yerine Fmoc-azidoalanin kullanılarak, mikrodalga peptit sentezi prosedürü ile mikrodalga uygulamadan oda sıcaklığında sentezlenmiştir ve kenetlenme tepkimeleri 30 dakika, Fmoc kırma tepkimesi ise 3+10 dakika sürelerde yapılmıştır. Kaiser testi ile pozitif veren kenetlenme tepkimeleri sonrasında sentez tekrarlanmıştır.

HRMS $C_{155}H_{254}N_{54}O_{47}S_{11}$ $[M+H]^+$: Hesaplanan 3976,62 Ölçülen 3976,63

3.3.30. Matris Metalloproteinaz-2'nin Klonlanma, Ekspresyon ve Saflaştırılması

MMP-2 cDNA'sını içeren pGela pBSSK- plazmidinden pET5a vektörüne alt klonlaması detayları Goncalves ve ark. [1] tarafından verildiği şekilde yapılmıştır. Prosedürdeki tek fark saflaştırma amacıyla enzimin N-terminal ucuna bir HisTag (6xHis) yerleştirilmesi olmuştur. MMP vektörünün E. coli DH5 alpha suşuna transformasyonu CaCl₂ metoduyla gerçekleştirilmiştir. Plazmid propagasyonu ardından plazmid purifikasyonu yapılmış ve saflaştırılan plazmid uygun



restriksiyon enzimleriyle kesilerek yerleştirilen genin önce boyutu, ardından da ODTÜ Merkez Laboratuvar Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi'nden alınan sekanslama hizmetiyle DNA dizilimi teyid edilmiştir.

Protein ekspresyon çalışmalarına propagasyon suşu olan *E. coli* DH5 alpha'dan izole edilen pET5a-MMP2 vektörünün bir ekspresyon suşu olan *E. coli* BL21 DE3'e transformasyonu ile başlanmıştır. Amfisilin ve kloramfenikol antibiyotikleri içeren agar besi ortamında seçilimi yapılan transforme olmuş kolonilerin 10 litre LB (Luria Broth) besi ortamında sıvı kültürü yapılmış ve 600 nm'de optik yoğunluğu 0.5'e ulaşan kültürler 100 μ M IPTG kullanılarak indüklenmiştir. İndükleme sonrası 18 saat 18 C'de inkübasyonu yapılan kültürlerden santrifüj sonrası bakteri hücreleri toplanmıştır. Toplanan hücreler yıkama sonrası proteaz inhibitörleri içeren Tris tampon solüsyon içerisinde Fransız basınç odası (French Press) kullanılarak parçalanmıştır. Yüksek hızlı santrifüj yoluyla hücre parçaları çöktürülmüş ve elde edilen lizat HisTrap afinite kolonlarına yüklenerek 0-500 mM imidazol gradyanı kullanılarak saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Diyalizasyon ve liyofilizasyon aşamaları sonrası kullanıma hazır hale getirilen protein -20 C'de saklanmıştır. Protein üretim verimi 0.04 mg/L kültür olarak hesaplanmıştır.

3.3.31. MMP2 Aktivite Testi

Aktivite testleri için Anaspec marka SensoLyte MMP2 Activity Assay kiti kullanılmıştır. SensoLyte kiti bir ucunda susturucu (quencher) diğer ucunda floresan işaretleyici taşıyan bir MMP2 substratı peptidin enzimatik reaksiyonla kesilmesi sonucu ortaya çıkan floresan sinyalin tespitine dayanmaktadır. Çalışmalar 24 C de 10-100 ng/mL MMP2 enzim konantrasyonunda, inhibitör (CLTX ve türevleri) yokluğu (0 μ M) ve varlığında (1 ve 10 μ M) gerçekleştirilmiştir.

3.3.32. İzotermal Titrasyon Kalorimetrisi

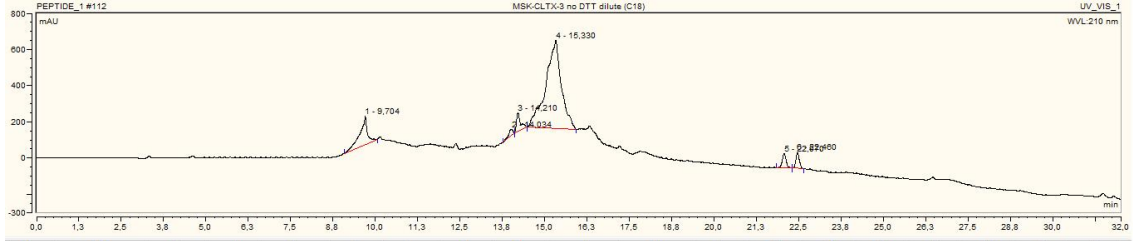
ITK deneyleri, iki farklı sıcaklıkta (25 ve 37 C), 1 μ M CLTX peptidinin 10 μ M MMP2 enzimine, aralarında 3 dakika fark olan toplam 29 adet enjeksiyonla titrasyon edildiği deneysel parametreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tampon solüsyon olarak 20 mM HEPES ve 50 mM NaCl (pH 7.5) kullanılmıştır.

3.3.33. Yüzey Plazmon Rezonans

Yüzey Plazmon Rezonans (YPR) deneyleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Mükemmeliyet Merkezi (BIOMATEN) bünyesinde yer alan BioNavis 210A model YPR cihazında gerçekleştirilmiştir. Altın yüzey üzerine CMD (karboksimetil dekstran) kaplanmış YPR çipleri üzerine EDC/NHS kimyası kullanılarak MMP2 enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligand immobilizasyonun ardından yüzeyde serbest halde kalan karboksil gruplarının bloke edilmesi amacıyla etanolamin kullanılmıştır. Sensör yüzeyinin bloke edilmesinin ardından farklı konsantrasyonlarda analit (klorotoksin ve türevleri) solüsyonları enjekte edilmiş ve her enjeksiyon sonrası yüzey yıkanıp (NaCl / NaOH) bir sonraki analit enjeksiyonu için hazırlanmıştır.

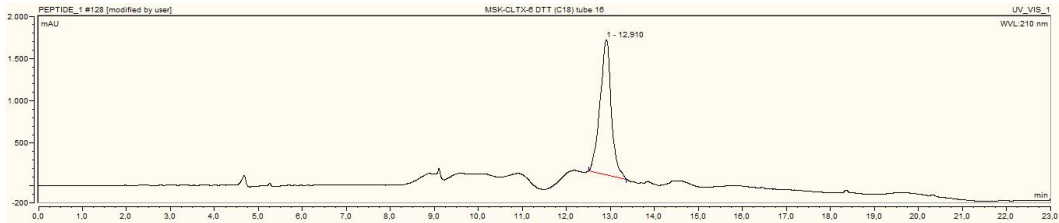
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

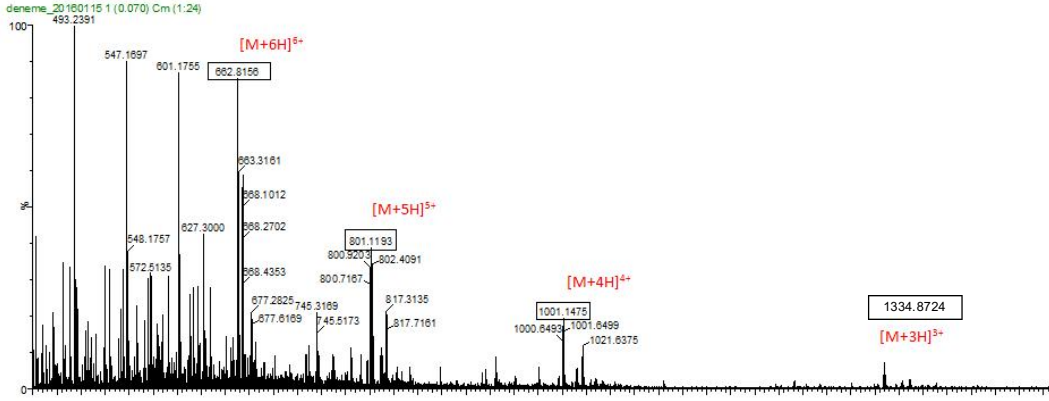
Klorotoksin modifikasyonlarından önce doğal klorotoksinin sentezlenip katlanması, hem sentezin hem de katlanma prosedürünün çalışıp çalışmadığını görmek, hem de aktivitelerini ölçerken referans maddesi olması açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle genel mikrodalga sentez prosedürü ile klorotoksin sentezlenmiştir ve ham halinin ters faz HPLC kromatogramı Şekil 4.1’de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. CLTX'nin sentezinin ardından elde edilen ham peptit kromatogramı (210 nm).

Ham haline yapılan HRMS ölçümleri sonucu klorotoksinin kütlelerine denk gelen piklerin görülmesinden sonra yarı preparatif ters faz C18 HPLC kolonu (2,5 x 100 mm) kullanılarak ham peptit saflaştırılmış ve cihazdan toplanan fraksiyonlar analitik C18 HPLC kolonları ile test edilmiştir. Buradan elde edilen fraksiyonlara yapılan LC-MS analizleri sonucu CLTX peptiti içeren saf fraksiyonlar (>%90) toplanarak liyofilizatöre konularak katı beyaz toz olarak elde edilmiştir. Saf fraksiyonların HPLC kromatogramı ile kolonsuz LC-MS analizi aşağıdaki gibi elde edilmiştir (Şekil 4.2).





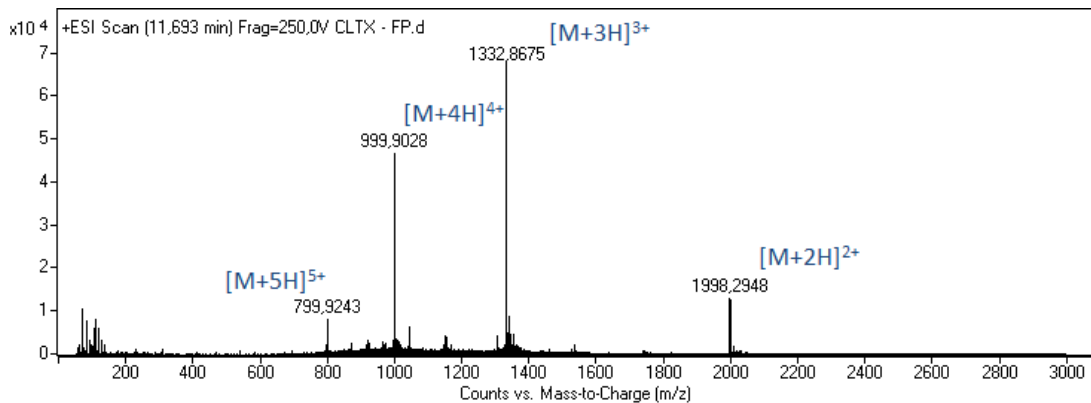
Şekil 4.2. Saf CLTX'nin ters faz HPLC kromatogramı (210 nm) ve kütle spektrumu.

Öncelikle HPLC spektrumunda 12,9 dakikada gelen pikin CLTX'e ait olduğu kütle spektrumu ile doğrulanmıştır. CLTX'nin beklenen tek yüklü moleküler iyon piki 4000,6'dir. Ancak bu kadar büyük kütleler cihazlarda görülmemekte ve bu nedenle +2, +3 gibi farklı yüklere sahip moleküler iyon piklerinin görülmesi oldukça yaygındır. Buradaki ölçümde de CLTX'nin +3, +4, +5 ve +6 yüklere sahip moleküler iyon pikleri açıkça görülmektedir.

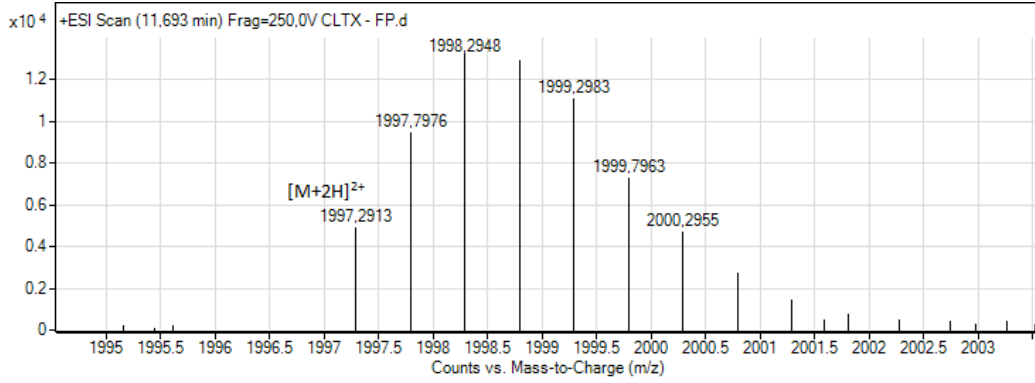
HPLC kromatogramındaki 8-12 dakikalar arasındaki dalgalanmalar ise laboratuvarımızdaki o günlerde kurtulamadığımız HPLC cihazından kaynaklı sabit kontaminasyonlardır.

Bunun ardından literatürdeki katlanma prosedürü ile klorotoksinin aktif hale getirilmiştir ve diyaliz ile iyonların ve küçük moleküllerin uzaklaştırılmasının ardından ters faz HPLC ile tekrar saflaştırılmıştır.

A



B



Şekil 4.3. A. Katlanmış CLTX'nin kütle spektrumu. **B.** $[M+2]^{2+}$ 'nin büyütülmüş hali.

Kütle spektrumlarında da görüldüğü gibi katlanmış CLTX'nin molekül iyon piki 3992,57 bulunmuştur ki beklenen değer de 3992,56'dir. Katlanmamış CLTX ile katlanmış CLTX arasında 4 tane –SH grubunun –S-S- oluşturmasından kaynaklı 8 tane hidrojen atomu farkı vardır ve bu fark HRMS sonucu net olarak görülmektedir.

Burada bir açıklama yapmalıyız ki + molekül iyon piki görünmeyip +2, +3 gibi çok yüklü iyon piklerinin görüldüğü HRMS datalarında, tek izotop üzerinden kütle hesaplanması sonucu elde edilen değer ile ölçümdeki en yüksek şiddete sahip değil de Gauss eğrisi şeklinde görülen kütle değerlerinden en küçüğüne göre alınması durumunda karşılaştırmak mümkün olmaktadır (Şekil 4.3.B.). Yani tek izotop kütle değeri, ortalama kütlede her zaman küçük çıkmaktadır. Küçük moleküllerde moleküler iyon piklerinin kütle değerlerinin dağılımına baktığımızda en şiddetli gelen pik zaten en küçük değer yani tek izotop üzerinden hesaplanan değer çıktığı için böyle bir durumla karşılaşmamaktadır. Bu büyük moleküllerde +2 ve üstü yüklerde Gauss eğrisi şeklinde bir dağılım çıktığından bir kafa karışıklığına sebep olmaktadır.

4.1. Kimyasal Peptit Modifikasyonu

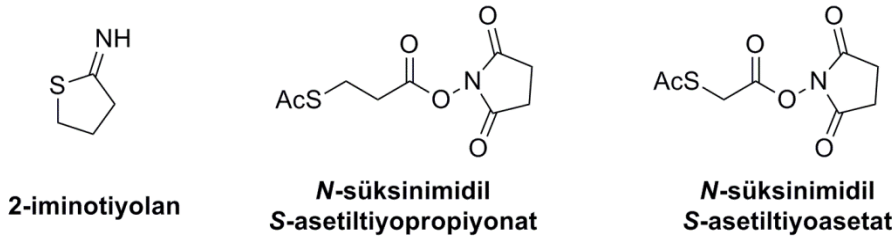
Peptitlerin kimyasal modifikasyonları için uygulanan en genel yöntem, sistein amino asiti üzerindeki tiyol fonksiyonel grubunun görece fazla reaktivitesinden faydalanıp seçici olarak tepkimeye sokulmasıdır. Bu yöntem sayesinde, diğer aktif gruplara dokunmadan sisteinlerin modifikasyonu mümkündür. Ancak CLTX'de bulunan 8 sistein de disülfür bağı ile bağlandığından dolayı bu strateji, CLTX için mümkün değildir.

Sisteinden sonra en kolay modifikasyon yapılan amino asit de birincil amin grubu içeren lizindir. Klorotoksin üzerinde toplam 3 tane lizin vardır. Bu lizinler, EDC/NHS kenetlenme tepkimeleri ile diğer amino asitlere dokunmadan seçici olarak modifiye edilebilmektedir (Akcan vd., 2011).

4.1.1. Lizin Modifikasyonu

Klorotoksin üzerinde bulunan lizin amino asitlerinin, yan grubunun modifikasyonu ile Zn^{2+} ya iyi bağlanan bir ligant haline getirilmesi kararlaştırılmıştır. Bu ligantın da tercihen tiyol türevi olması, sülfür atomunun Zn^{2+} ya karşı olan istemiği nedeniyle tercih edilmiştir. Ancak CLTX üzerinde 3 adet lizin grubunun olmasından dolayı, bunların seçici olarak teker teker tiyollenebilmesi için kimyasal peptit sentezi sırasında tiyollenecek olan lizinlerin farklı bir koruyucu grup ile korunmuş halleri kullanılıp, peptit sentezi ve tiyollemenin ardından bu koruma grubunun kaldırılması gerekmektedir. Bunun için de Fmoc ve tBoc koruma gruplarına ortogonal olan, yani asidik ve bazik ortamda kırılmayan ama hidrojenleme ile kırılabilen Cbz koruma grubunun kullanılması kararlaştırılmıştır.

Proje önerisinde Lizin üzerinde takılması hedeflenen 3 farklı grup vardı. Bunlar Şekil 3.9'de verilmiştir.



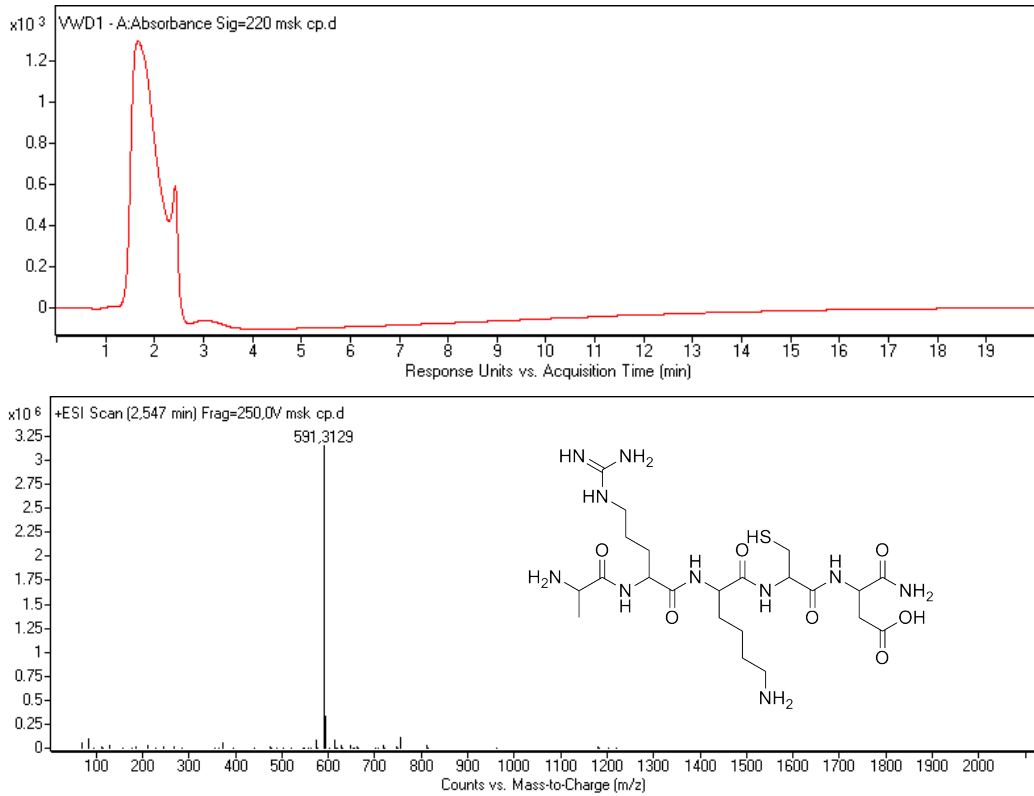
Şekil 4.4. Lizinlerin farklı karbon zincirlerine sahip bir şekilde tiyollenmesi için projede kullanılması önerilen reaktantlar.

CLTX modifikasyonlarının tepkimelerini elde etmesi uzun ve zahmetli bir süreç sonrasındaki katlanmış CLTX üzerinde yapmak yerine, onun küçük bir modeli üzerinde bu tepkimeleri optimize edip, yöntemlerini oturtuktan sonra gerçek katlanmış CLTX üzerinde yapılmasına karar verilmiştir. Bu sayede uzun işlemler sonucu elde edilen CLTX'in boş yere optimizasyonlarda harcanmasının önüne geçilmiştir.

Ayrıca bu kısa peptitlerin özellikle mikrodalga altındaki sentezlerinin verimleri oldukça yüksek olmakta ve HPLC analizine ve saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmadan doğrudan LC-MS ile analiz etmek mümkün olmuştur.

Bu amaçla, CLTX'in üzerinde modifikasyon yapılacak Lys15'in etrafındaki amino asitleri içeren 5 amino asitten oluşan **Ala-Arg-Lys-Cys-Asp** peptidi sentezlenmiştir. Ancak sentezi yaparken Lys amino asitinin koruması Mtt olarak seçilmiştir. Proje önerisinde de anlatılan seçici olarak sadece bu koruma grubunun kaldırılması ve peptidin hala reçine üzerindeyken modifikasyon yapılması mümkün hale gelmiştir.

Rink amit reçine kullanılarak Mtt koruma gruplu Lys ile bu 5li peptit sentezlenmiştir. Reçine üzerinden kırmadan sadece 5-10 mg'ını alıp reçine üzerinden kırıp LC-MS ile analiz edilip peptidin sentezinin yapıldığı doğrulanmıştır (Şekil 4.5).



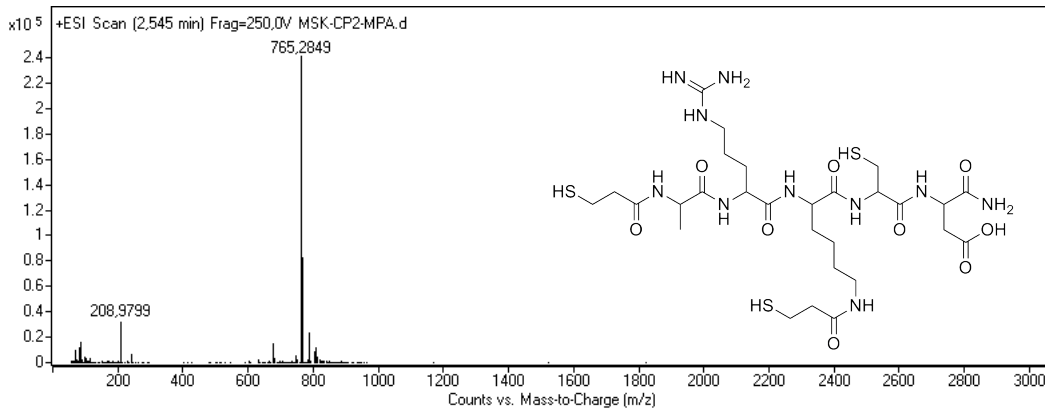
Şekil 4.5. Ala-Arg-Lys-Cys-Asp peptidinin LC kromatogramı ve kütle spektrumu. Beklenen kütle = 590,31. Ölçülen $[M-H]^+$ = 591,31.

Sentezin başarılı olduğunun görülmesinin ardından reçine üzerindeki peptidin sadece Lys üzerindeki Mtt koruma grubu oda sıcaklığında, dokuz kez, üçer

dakika süreyle, 0,85 mL hacimce %1.8'lik TFA/DCM çözeltisiyle muamele edilerek uzaklaştırılmıştır [4].

Lys'in amin grubunun açığa çıktığı ise peptit sentezi sırasında da sık sık kullanılan Kaiser testi ile serbest NH₂ grubunun görsel olarak ninhidrin ile görülmesinin sağlanması ile doğrulanmıştır. Bunun ardından peptit modifikasyonlarında kullanılacak olan iminotiyolan ve NHS esteri ile korunmuş merkaptopropiyonik asitin disülfürü ile reçine üzerinde ayrı ayrı tepkimeye sokulmuştur. Tepkime serbest NH₂ grubunun Kaiser testi ile kaybolması görülene kadar sürdürülmüştür. Merkaptopropiyonik asitin için bu süre 14 saat olmuştur. Ancak iminotiyolan yapılan uzun tepkime sürelerine rağmen Kaiser testinde serbest amino grubunun olduğunu göstermiştir. Serbest amin gruplarının iminotiyolan ile tepkimesi sonucu oluşan fonksiyonel grubun Kaiser testinde yalancı pozitif sonuç vermesi ihtimaline karşılık tepkime 36 saat sonrasında sonlandırılmış ve reçinesinden kırılan peptit LC-MS ile analiz edilmiştir. Ancak, iminotiyolanın gerçekten de tepkimeye girmediği gözlemlenmiştir. Merkaptopropiyonik asit ile yapılan sentezde ise peptite iki tane merkaptopropiyonik asitin takıldığı kütle spektrumundan görülmüştür (Figür 7).

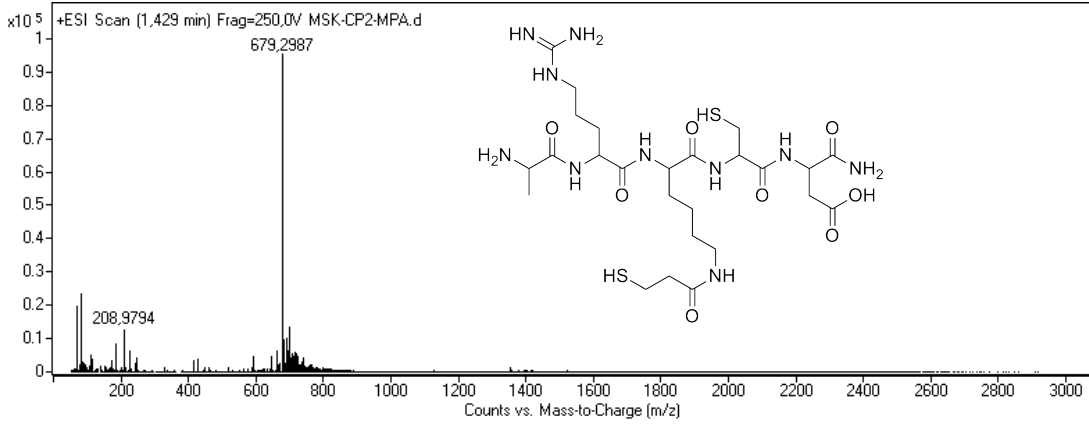
Bu durumun disülfür ile birbirine bağlı iki tane merkaptopropiyonik asit NHS esteri kullanılmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Zira, tepkime ortamında reçine üzerinde sadece bir tanesi ile tepkimeye girmesinin ardından, peptitin reçineden kırılması esnasında ortaya çıkan serbest N ucunun da NHS ile tepkimeye girerek merkaptopropiyonik ile amit yapmış olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.6. İki adet merkaptopropiyonik asit takılmış 5'li peptitin kütle spektrumu. Beklenen kütle = 764,3. Ölçülen [M-H]⁺ = 765,3.

Bunu engellemek için reçine üzerinde yapılan tepkimenin ardından tepkime karışımının DTT (Ditiyotreitol) ile muamelesi sonucu S-S bağının kırılması ve

yıkınmasının ardından ikinci bir NHS esterli merkaptopropiyonik asitin ortamdaki uzaklaşması sağlanmıştır ve reçineden peptidin kırılmasının ardından sadece bir tane merkaptopropiyonik asitin takıldığı peptit elde edilmiştir ve kütle spektrumu ile doğrulanmıştır (Figür 8).

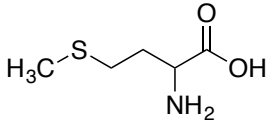


Şekil 4.7. Sadece bir adet merkaptopropiyonik asit takılmış 5'li peptidin kütle spektrumu. Beklenen kütle = 678,3. Ölçülen $[M-H]^+$ = 679,3.

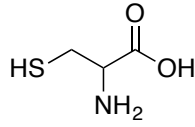
Sonuç olarak model peptit üzerine merkaptopropiyonik asitin takılması başarılı olurken, iminotiyolan tepkime süresinin uzatılmasına rağmen peptite takılamamıştır.

Ancak yapılan model peptit çalışmalarından sonra klorotoksin üzerinde NHS esteri ile korunmuş merkaptopropiyonik asitin disülfürün tepkimesi sonucu, DTT kullanılmasına rağmen yine iki tane merkaptopropiyonik asit ürün olduğu HRMS ile görülmüştür. Ham üründe bir tane merkaptopropiyonik asit takılmış çok az miktarda bulunmuştur ancak bu iki ürünü birbirinden ayrılması mümkün olmamıştır. Farklı eşdeğer miktarlarda denenmesine rağmen bu durum maalesef değişmemiştir.

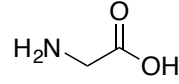
Bu nedenle hızlı bir şekilde B planı düşünüldü ve bu reaktantların sırası ile 4, 3 ve 2 karbon uzatmasından yola çıkarak benzer işlevi yapacak ve çok daha kolay bir şekilde takılacak aşağıdaki moleküller düşünülmüştür (Şekil 4.).



Metiyonin



Sistein

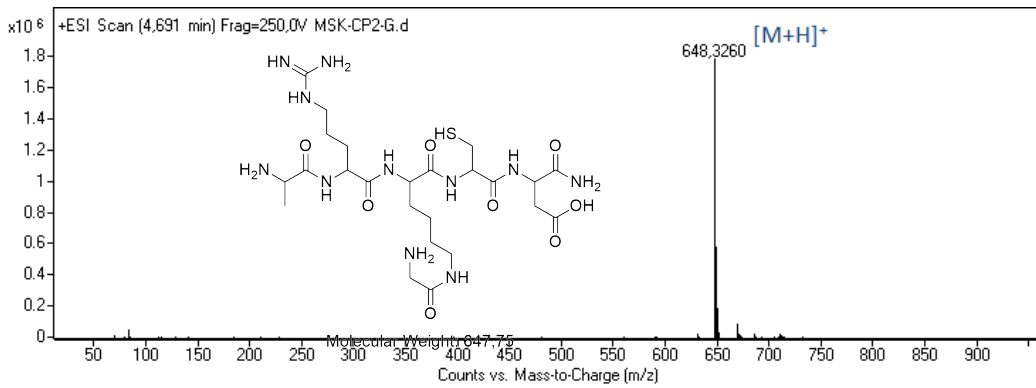


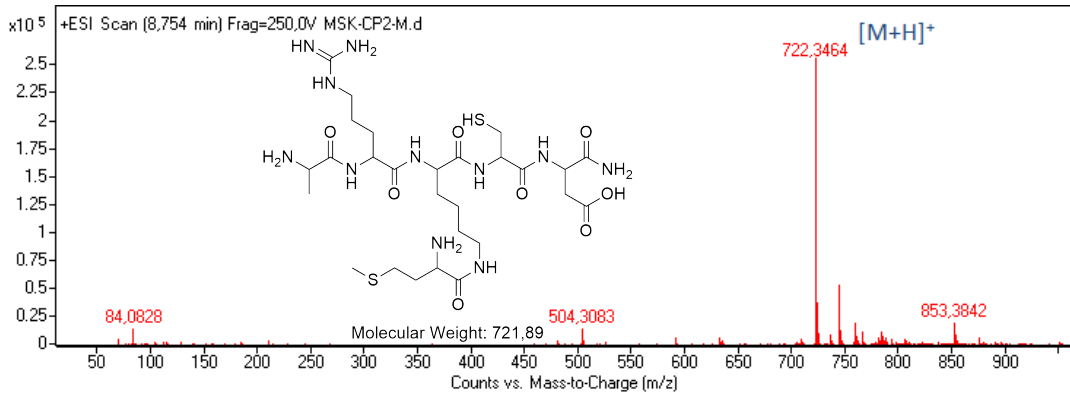
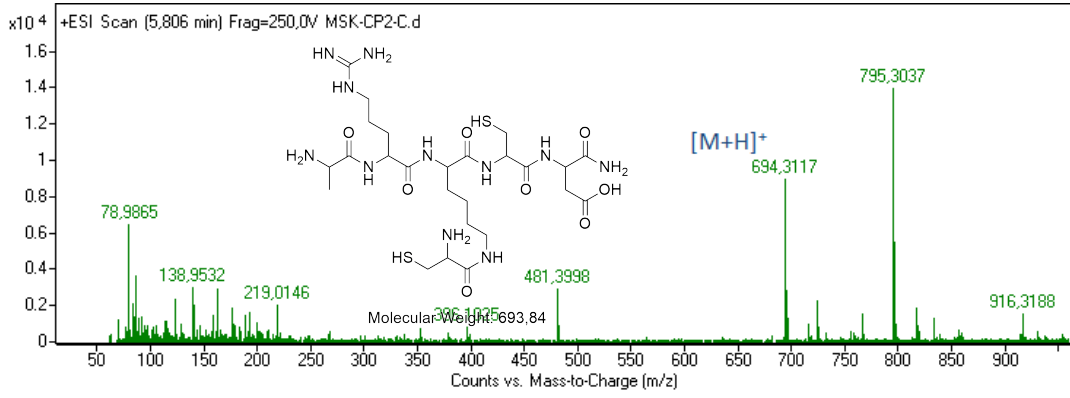
Glisin

Şekil 4.8. Lizinlerin farklı karbon zincirlerine sahip şekilde uzatılması için kullanılan amino asitler.

Bu moleküller hem zaten laboratuvarımızda bulunan amino asitler hem de takılması için kullanılan peptit bağı zaten peptit sentezinde de kullanılan reaktantlar kullanılarak da yapılabilecek bir bağıdır. Sadece glisin takılması durumunda uçta bulunan atom sülfür yerine azot olarak kalacaktır. Bu da kabul edilebilir bir değişikliktir, azot atomunun da metal koordinasyonundaki etkinliği düşünüldüğünde.

Model peptitler üzerinde öncelikli olmak üzere bu gruplar istenilen lizinelere peptit sentezi sonrası reçine üzerinden peptitleri kırmadan sadece Lizin üzerindeki koruma grubu olan Mtt'nin seçici olarak kırılması ve ardından serbest kalan amin grubu üzerine bu grupların aynı birer amino asit takar gibi HBTU ve DIEA ortamında başarı ile takılmıştır. Aşağıdaki şekil 4.9'da bu moleküllerin kütle analizleri gösterilmektedir.

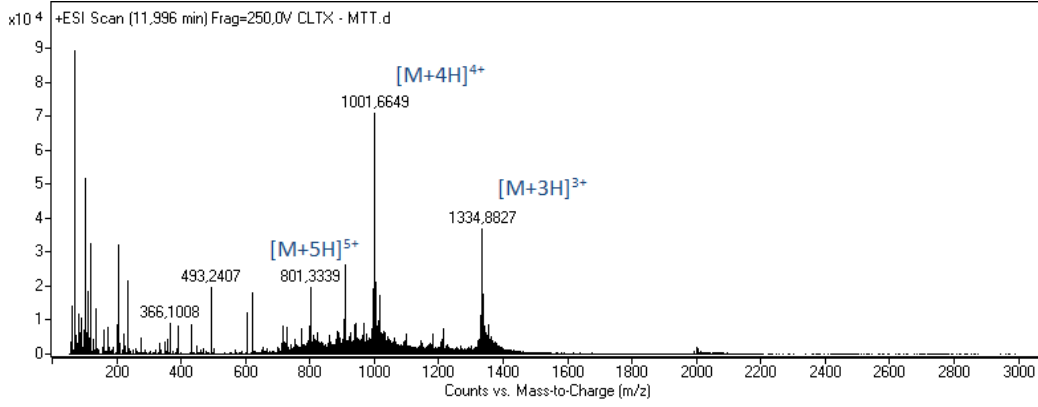




Şekil 4.9. Sırasıyla glisin, sistein ve metiyonin takılmış model peptit kütle spektrumları.

4.1.2. Klorotoksinin lizin modifikasyonlarının sentezi

Model peptit üzerine başarı ile takılmalarının ardından esas peptit CLTX, 15. Pozisyonu Mtt ile korulu Lizin olarak sentezlenmiştir. Sentezinin ardından reçine üzerinden alınan küçük bir numune alınıp TFA ile kırılmasının ardından yapılan kütle analizi ile sentezin başarı ile gerçekleştirildiği anlaşılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Lys-15 pozisyonu Mtt koruma grublu sentezlenen CLTX'nin kütle spektrumu.

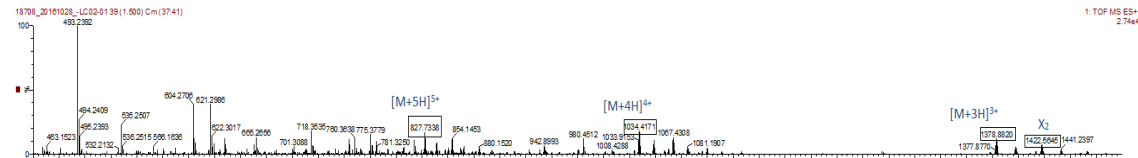
Bunun ardından elde edilen reçine üzerindeki peptit üçe bölünerek, her birinin üzerindeki Mtt koruma grubu seçici olarak DCM içerisinde %1,8 TFA ile kırılmış ve Kaiser testi ile de serbest amin grubu doğrulandıktan sonra şekil 3'te verilen amino asitler (Glisin, metiyonin ve sistein) HBTU ve DIEA peptit bağı yapma yöntemi ile takılmıştır. Ardından yapılan Kaiser testi ile de serbest amin grubunun kalmadığı gözlemlenmiştir.

Bunun ardından peptitler reçineden tamamen kırılıp, liyofilizatör aracılığı ile kurutulduktan sonra ham hallerinin HPLC ve kütle analizleri yapılmıştır ve Şekil 4.11'deki sonuçlar elde edilmiştir.

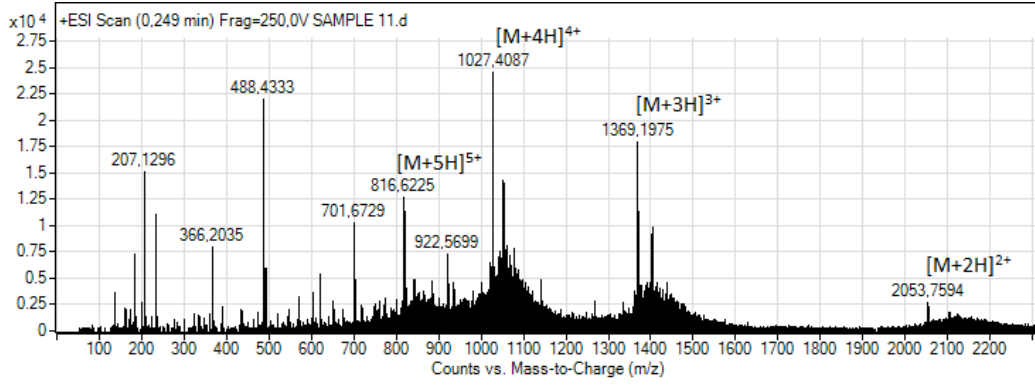
A



B



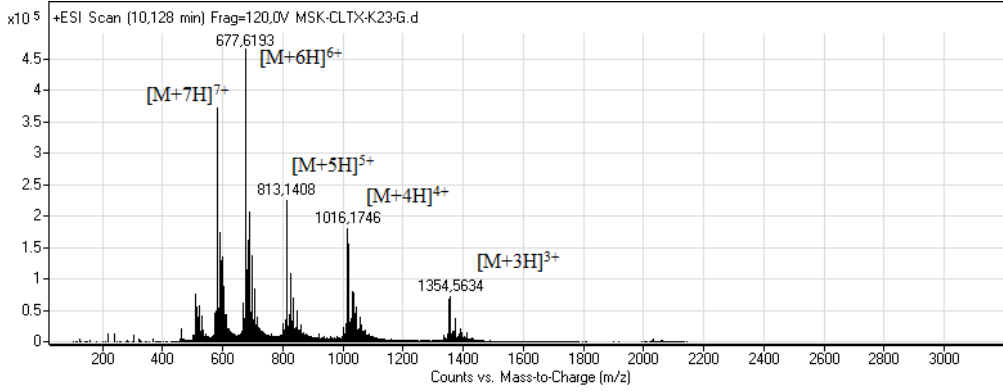
C



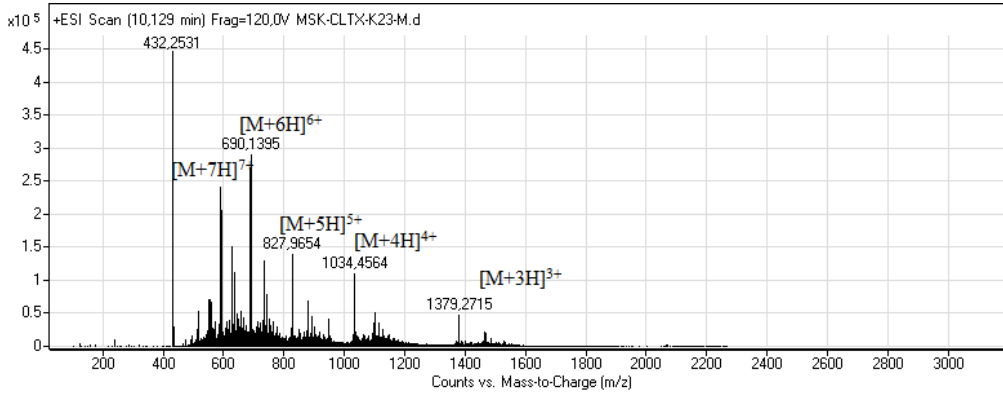
Şekil 4.11. Glisin (A), Metiyonin (B) ve sistein (C) ile fonksiyonlandırılmış CLTX'nin kütle spektrumları. A'da $[M+3H]^{3+}$ olarak işaretlenmiş 1354,5535 değeri 4060,82 olan glisin takılı CLTX'nin kütle değerini vermektedir. Benzer şekilde B'de $[M+3H]^{3+}$ olarak işaretlenmiş 1378,8820 değeri, 4133,67 olan metiyonin takılı CLTX kütle değerinin vermektedir. C'de ise 1369,1975 değeri $[M+3H]^{3+}$ olarak sistein takılı klorotoksinin kütle değerini vermektedir.

Lys-23 ve Lys-27 için de aynı şekilde benzer şekilde tekrar edilerek glisin, metiyonin ve sistein modifiye klorotoksin türevleri elde edilmiştir.

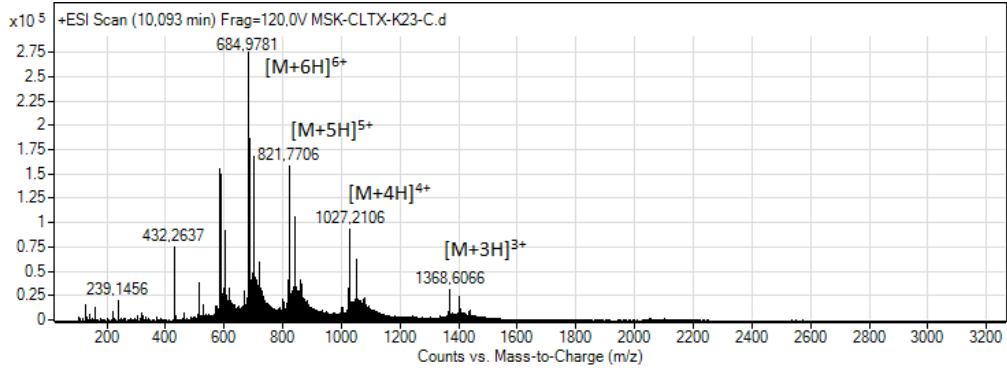
A



B

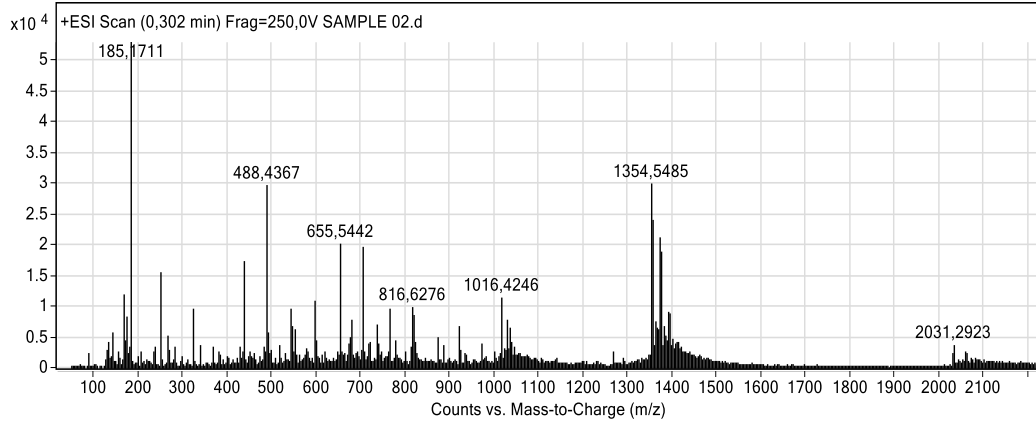


C

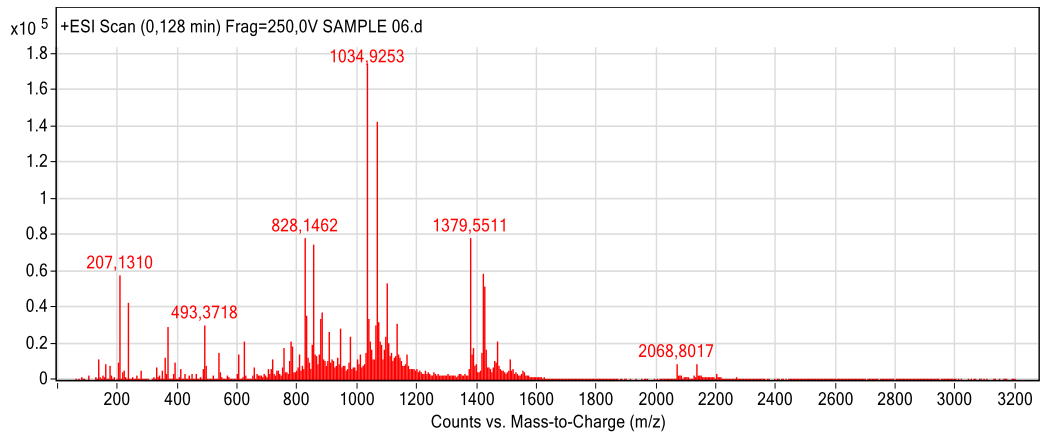


Şekil 4.12. Lys-23 pozisyonu glisin (A), metiyonin (B) ve sistein (C) ile fonksiyonlandırılmış CLTX'nin kütle spektrumları.

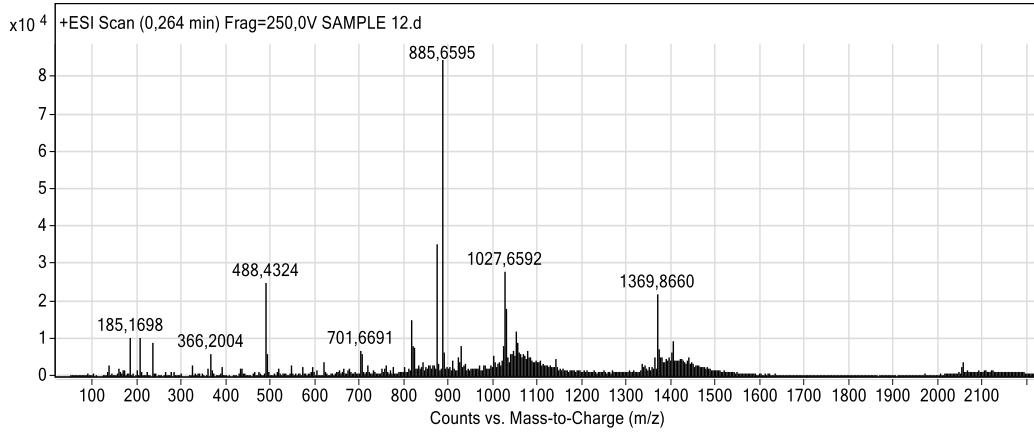
A



B



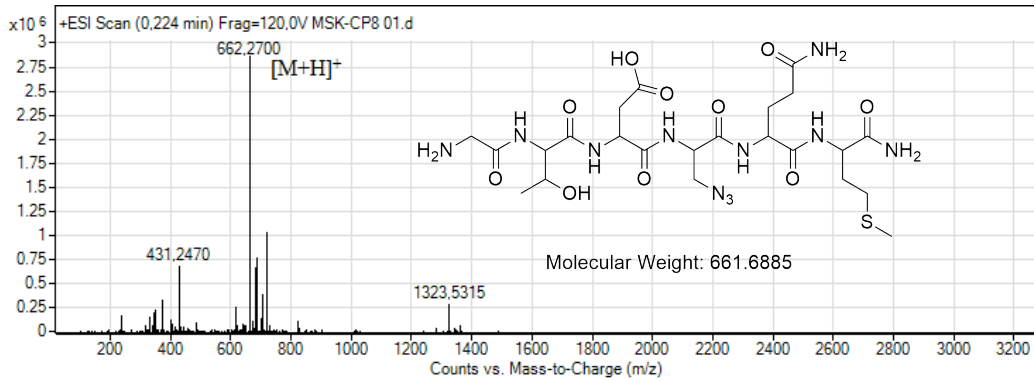
C



Şekil 4.13. Lys-27 pozisyonu glisin (A), metiyonin (B) ve sistein (C) ile fonksiyonlandırılmış CLTX'nin kütle spektrumları.

4.1.3. Azido klorotoksin türevinin sentezlenmesi

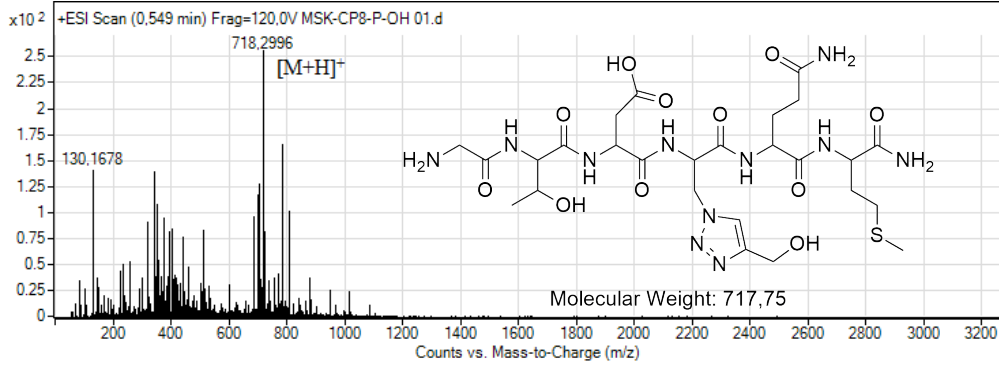
Azido klorotoksinin sentezinden önce hem azit türevi sentezinin hem de click tepkimesinin optimizasyonu için öncelikle bir model peptit sentezlenmiştir. Bunun için, GTDXaaQM dizilimi klorotoksinin His-10 pozisyonu etrafındaki dizilim olarak seçilmiştir. Xaa yerine Fmoc-azidoalanin kullanılarak yapılan sentezde mikrodalga kullanılması durumunda başarısız olduğu görülmüştür. Bunun üzerine sentez mikrodalgasız bir şekilde tekrar edilmiştir ve elde edilen ham peptitte yapılan HRMS analizi sonucu azitli peptidin sentezlendiği görülmüştür (Şekil 4.14)



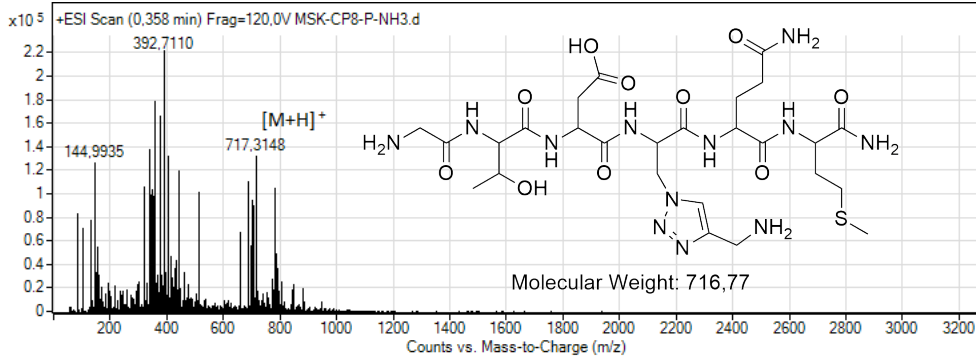
Şekil 4.14. Azitli model peptidin HRMS spektrumu.

Sentezin başarı ile gerçekleşmesinin ardından reçine üzerinde click tepkimesi gerçekleştirilmiştir ve sırası ile progarjil alkol ve proparjil amin ile bakır(I) katalizöründe tepkimeye sokularak triazol türevleri elde edilmiştir (Şekil 4.15).

A



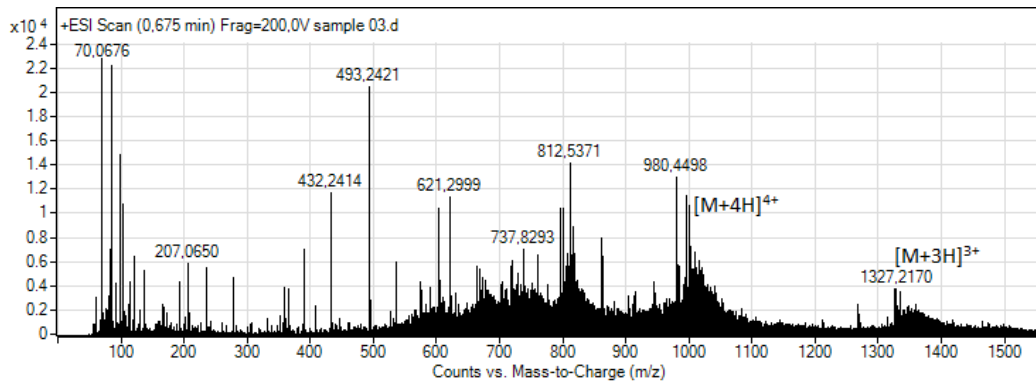
B



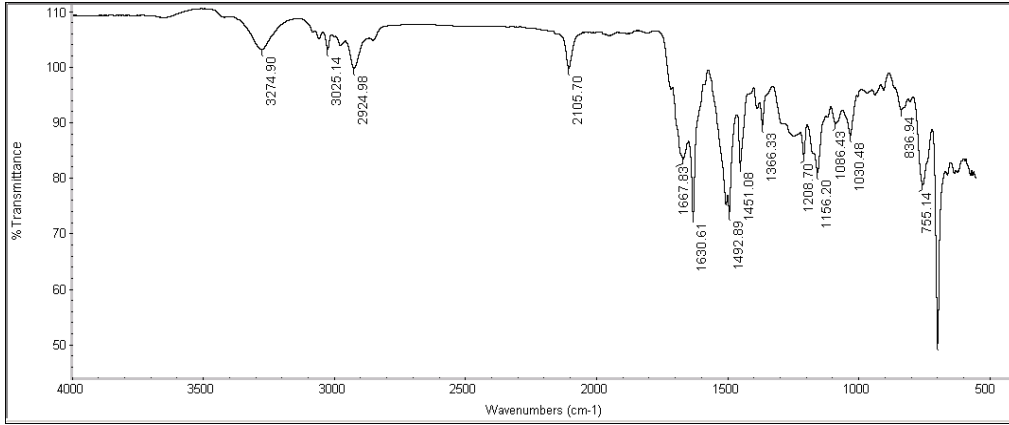
Şekil 4.15. Proparjil Alkol (A) ve proparjil amin (B) ile elde edilen click ürünlerinin HRMS spektrumları.

Model peptit üzerinde istenilen peptit elde edilmiştir ancak bir çok safsızlık içermektedir. Ham halinin HRMS analizi ile ürünün oluştuğu gözlemlendikten sonra klorotoksin üzerinde aynı yöntemle sentez gerçekleştirilmiştir. Bunun için mikrodalga kullanılmadan ve His-10 yerine Fmoc-azido alanin türevi ile yapılan sentez sonunda azitli klorotoksin türevi başarı ile sentezlenmiştir ve HRMS ile doğrulanmıştır. Ayrıca yapılan FTIR ölçümü ile de yapının içine azit fonksiyonunun girdiği gösterilmiştir (Şekil 4.16).

A

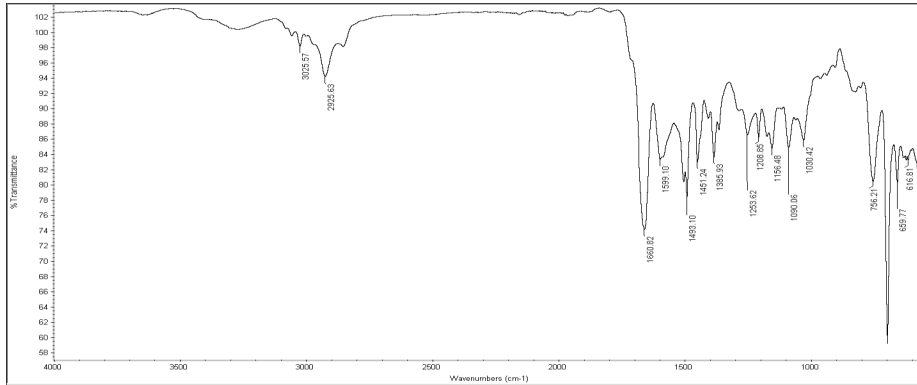


B



Şekil 4.16. Azido klorotoksinin HRMS spektrumu (A) ve FTIR spektrumu (B).

Elde edilen azido klorotoksin türevi reçine üzerinde ters faz HPLC ile saflaştırıldıktan sonra proparjil alkol ve proparjil amin ile bakır (I) katalizörlüğünde click tepkimesine sokulmuştur. Tepkimenin gerçekleşip gerçekleşmediği FTIR ile takip edilmiştir ve 24 saat sonrasında 2200 cm^{-1} civarındaki azit pikinin kaybolduğu görülmüştür (Şekil 4.17)



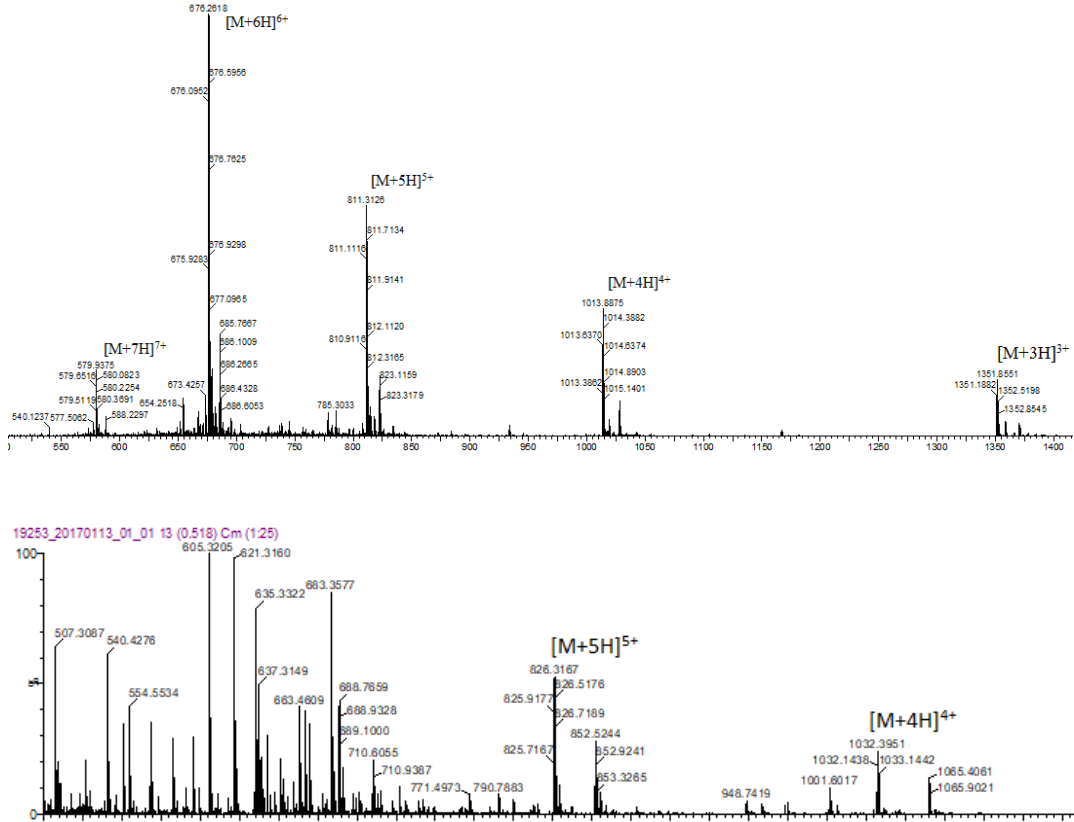
Şekil 4.17. Azido klorotoksinin click tepkimesi sonrası FTIR spektrumu.

Ancak peptidin reçineden kırılıp HRMS ile karakterizasyonu sonrasında istenilen triazol türevlerinin oluşmadığı görülmüştür. İstenilen kütle değeri gözlemlenememiştir. Bu durumda azit triazol oluşturup FTIR spektrumunda ortadan kaybolmasına rağmen, tepkime koşullarında peptidin parçalandığı düşünülmektedir zira elde edilen HRMS spektrumunda sadece molekül ağırlığı 1000'in altında peptit fraksiyonları görülmüştür. Model peptit ile yapılan click tepkimelerinde de oldukça fazla safsızlık oluşmaktaydı ve maalesef klorotoksin ile yapılması durumunda esas ürün hiç elde edilememiştir.

Bu durumda histidin modifikasyonunun sentezi başarısızlığa uğramıştır.

4.2. Klorotoksin ve türevlerinin katlanması

Elde edilen Lys-15 modifiye klorotoksin türevlerinin katlanma işlemleri doğal klorotoksinin katlanma prosedürü ile gerçekleştirilmiştir. Bunlardan glisin ve metiyonin içerenler başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Lys-15 pozisyonu sırası ile glisin ve metiyonin ile modifiye edilmiş klorotoksin türevlerinin HRMS sonuçları.

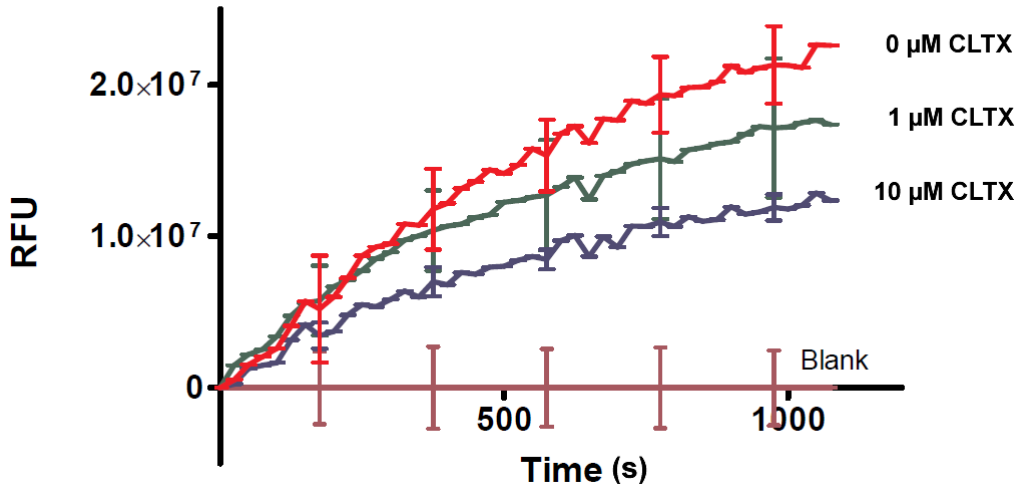
Katlanmamış halleri ile aralarındaki 8 hidrojen kütle farkı tüm disülfür bağlarının oluştuğunu göstermektedir.

Ancak sistein ile modifiye klorotoksin türevinin katlanması sonucu karmaşık bir kütle spektrumu veren bir peptit karışımı oluşmuştur. Bunun nedeni olarak sisteindeki serbest tiyol gruplarının katlanma prosedürü sırasındaki pH 7'de aktif olmasından dolayı klorotoksin içerisindeki bazı peptit bağlarını kırıp hidroliz olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Lys-23 ve Lys-27'nin sistein ile modifikasyonu türevinin katlanmasından karmaşık ürünler çıkmıştır. Buradan çıkan sonuçla

serbest tiyol grubu içeren bir modifikasyonun katlanmasının oldukça güç olduğu ortaya çıkmıştır.

4.3. MMP2 aktivite ölçümleri

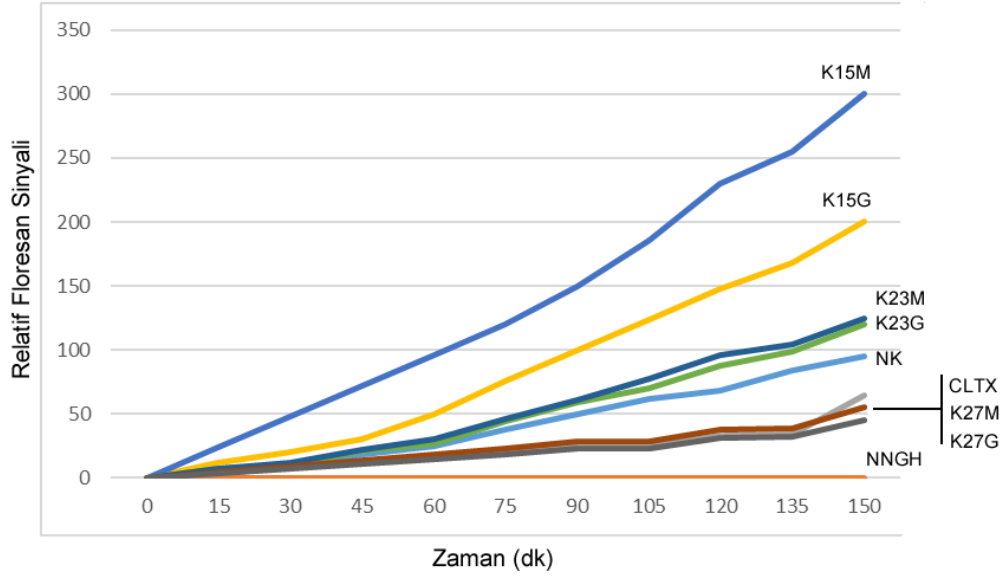
Bu katlanmış haldeki klorotoksin ve klorotoksinin Lys-15 üzerinden glisin ve metiyonin türevlerinin MMP2 aktivitesine ticari kit ile bakıldığında ortaya çıkan sonuçlar oldukça şaşırtıcıdır. Öncelikle doğal klorotoksin kullanılarak katlanma işlemi sonucunda aktif klorotoksin oluşturulup oluşturulmadığı doğrulanmıştır. SensoLyte kiti bir ucunda susturucu (quencher) diğer ucunda floresan işaretleyici taşıyan bir MMP2 substratı peptidin enzimatik reaksiyonla kesilmesi sonucu ortaya çıkan floresan sinyalin tespitine dayanmaktadır. 24 °C de 10-100 ng/mL MMP2 enzim derişiminde, inhibitör (CLTX) yokluğu (0 μ M) ve varlığında (1 ve 10 μ M) gerçekleştirilen deneylerde elde edilen kinetik eğriler Şekil 4.19'te verilmektedir. MMP2 enzimi ortamda CLTX bulunmuyorken maksimum aktiviteyi gösterirken, artan miktarda inhibitör eklenmesi enzim aktivitesini düşürmektedir.



Şekil 4.19. CLTX'in MMP2 Aktivite İnhibisyon Grafiği.

Bu aktivite ölçüm deneyleri göstermektedir ki sentezlenen klorotoksin gerçekten de doğru bir şekilde katlanmaktadır ve beklenen biyolojik aktiviteyi göstererek MMP2 enzimini inhibe etmektedir.

Ancak modifiye klorotoksin türevlerinin sonuçları oldukça şaşırtıcı olmuştur. Bu sonuçlar aşağıdaki şekil de özetlenmektedir (Şekil 4.20):

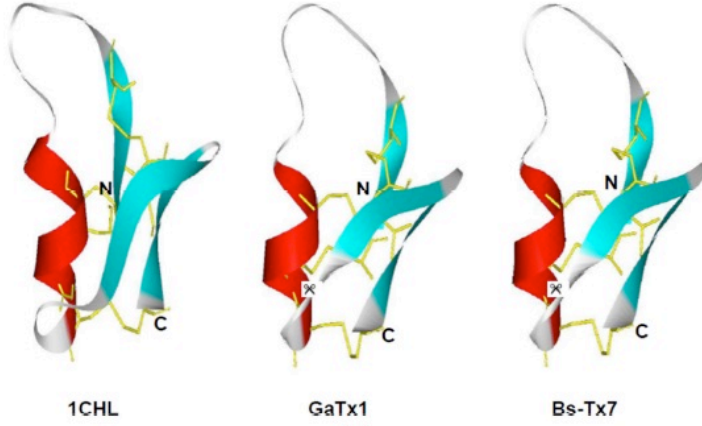


Şekil 4.20. Klorotoksin ve türevlerinin MMP2 aktivite grafiği.

Klorotoksinin MMP2 aktivitesini inhibe ettiği yine görülmekle birlikte Lys-15 pozisyonu glisin (K15G) ve metiyonin (K15M) ile modifiye edilmiş klorotoksinin MMP2 aktivitesini azaltmak yerine artırdığı görülmektedir.

Elde edilen bu sonucun ardından diğer lizin pozisyonlarının (Lys-23 ve Lys-27) modifikasyonları (K23G, K23M, K27G, K27M) sonucu elde edilen peptitlerin aktivite sonuçlarına bakıldığında da farklı bir durum ortaya çıkmamıştır. Lys-27'nin muhtemelen MMP2 ile etkileşime girmeyen bölgede kaldığı ve bu kısma yapılan modifikasyonlarda MMP-2 aktivitesinde belirgin bir değişiklik yapmadığı görülmektedir ve doğal klorotoksin ile benzer sonuçlar göstermektedir. Lys-23 üzerinden yapılan modifikasyonlar da Lys-15 kadar olmasa da MMP-2 aktivitesini az da olsa arttırmaktadır.

Bu beklenenin tam tersi olan aktiviteyi açıklamak için literatürdeki klorotoksin benzeri yeni peptit çalışmalarına baktığımızda, 2016 yılında yayımlanan bir makalede (Ali 2016), Klorotoksin ile benzer peptit sekansına sahip ve üç boyutlu katlanmış hali klorotoksin ile oldukça benzeyen Bs-Tx7 peptitinin MMP2 aktivitesini artırdığı gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Klorotoksin (1CHL), GaTx1 ve Bs-Tx7 peptitlerinin üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması (Ali 2016).

Literatürdeki bu çalışma ve bizim elde ettiğimiz beklenmedik sonuç göstermektedir ki, klorotoksinin üç boyutlu katlanma yapısındaki en ufak bir değişiklik bile aktivitesini oldukça çok etkileyebilmekte ve hatta inhibisyon yerine aktivasyon yapmasına neden olabilmektedir.

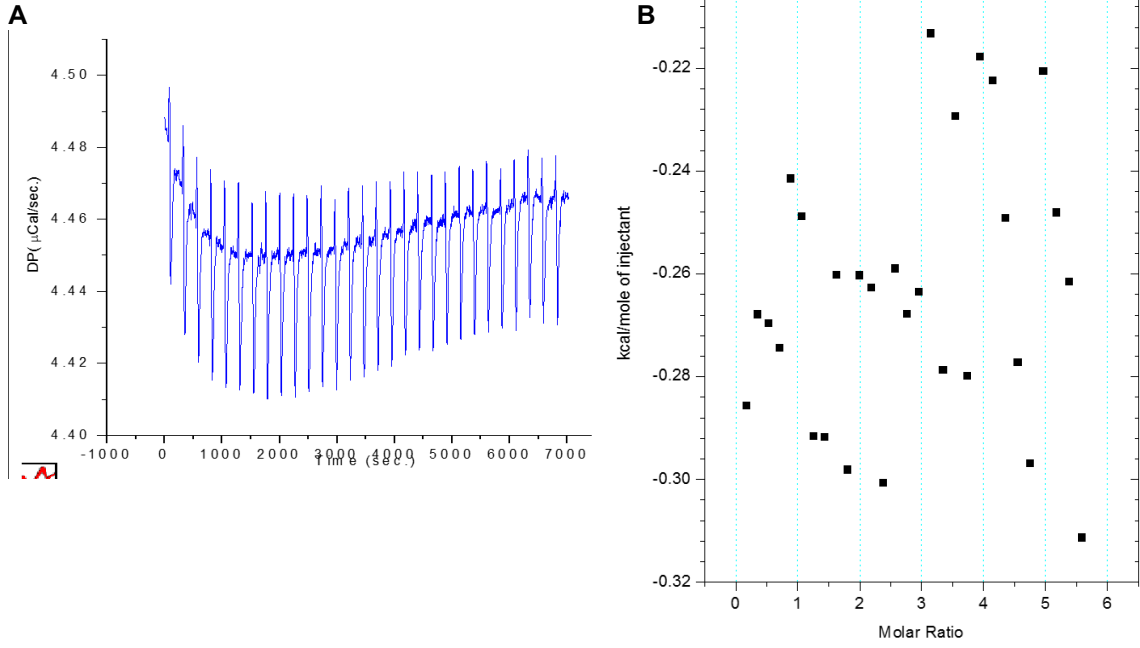
Bizim projeye başladıktan sonra çıkan bu makalede de görüldüğü gibi esasen klorotoksin üzerine yapılan modifikasyonlar her ne kadar ana katlanma için kritik olmayan aminoasitler üzerinde yapılmış olsalar da üç boyutlu yapısında neden oldukları ufak değişiklikler nedeni ile MMP2 enzimi ile farklı bir etkileşime girmekteler ve bu nedenle inhibisyon yerine aktivasyon görülmektedir.

Bu durum esasen, bu projenin amacı olan klorotoksinden daha iyi bir inhibitör elde etmeyi derinden etkilemektedir ve görülmektedir ki klorotoksin üzerinden modifikasyon yaparak bu amaca ulaşmak oldukça zor görünmektedir. Ancak yine de böylesi bir sonuç, klorotoksin-MMP2 etkileşimini incelemek adına da oldukça ilginçtir. Küçük değişiklikler ile klorotoksinin MMP2 üzerinde farklı bölgelere de bağlanmasının mümkün olduğunu göstermektedir.

4.4. MMP2 Enzimi ve Klorotoksin Türevleri Arasındaki Etkileşimlerin Termodinamik Karakterizasyonu

Klorotoksin ve türevlerinin MMP2 enzimiyle olan etkileşimlerinin termodinamik analizi amacıyla öncelikle izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITK) metodu kullanılmıştır. Moleküler etkileşimler sonucu ortaya çıkan (egzotermik) veya ortamdaki ısıyı alan (endotermik) ısının ölçülmesine dayanan ITK deneylerinde, ısı değişiminin cihaz hassasiyetinin altında olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde de

benzeri örnekleri bulunan bu tür etkileşimlerde kompleks oluşumu ağırlıklı olarak entropik açıdan (entropically-favored/driven binding interaction) sağlanmaktadır. Bu durumda ısı değişiminin ölçümü prensibine dayanan ITK metodu yerine alternatif bağlanma çalışmaları gerçekleştirmek gerekir. Grubumuz bu nedenle proje önerisinde de yer aldığı şekilde yüzey plazmon rezonans (YPR) deneyleri gerçekleştirmiştir.



Şekil 4.22 (A) CLTX peptidinin MMP2 enzimine titrasyonu sonucu elde edilen termogram **(B)** Titrasyon termogramının entegrasyonu sonucu elde edilen bağlanma grafiği.

Teknik detayları yöntem bölümünde verilen YPR deneylerinde öncelikle MMP2 enziminin karboksimetil dekstran kaplanmış altın çip yüzeyine EDC/NHS kimyası kullanılarak bağlanması gerçekleştirilmiştir. Ardından 0.1-10 μM derişim aralığında klorotoksin enjeksiyonu sağlanmış fakat YPR sinyalinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum enzim immobilizasyonu sırasında protein denatürasyonuna bağlı olabileceği gibi tipik bir YPR problemi olan enzim aktif bölgesinin analit bağlanmasına uygun olmayan bir şekilde kapanmış olmasına da dayanabilir. YPR çiplerinin çok yüksek fiyatta ve tek kullanımlık olması, YPR deneylerinin tekrar sayısını proje bütçesi kapsamında sınırlamıştır.

5. SONUÇLAR

Bu proje kapsamında başta planlamış olduğumuz 19 modifikasyondan 9 tanesinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunlar Lys-15, 23 ve 27 pozisyonlarının glisin, metiyonin ve sistein ile yapılan modifikasyonlarıdır. Bunların da 6 tanesi istenildiği gibi protein katlanması başarı ile tamamlanarak aktiviteleri belirlenmiştir.

Belirlenen bu aktiviteler de ilginç verilere ulaşılmıştır. Öncelikle Lys-27 pozisyonundaki modifikasyonların CLTX aktivitesine bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir ki bu da Lys-27'nin CLTX ile MMP2'nin etkileştiği bölgede olmadığı anlamına gelmektedir. Lys-15 ve Lys-23 modifikasyonları ise özellikle Lys-15 modifikasyonları MMP2 aktivitesini inhibe etmek yerine arttırmıştır. Bu da bu modifikasyonların ya CLTX'nin katlanmasını değiştirerek ya da MMP-2 ile etkileşime girdiği bölgeyi sterik ve elektronik olarak değiştirerek farklı bölgeden MMP2 ile etkileşime girdirmesi bu sebepten de farklı bir etkiye sebep olduğu düşünülmektedir. Bu oldukça çarpıcı bir sonuçtur ve CLTX-MMP2 etkileşimi ile ilgili oldukça faydalı bilgiler vermektedir. Bu sonuç her ne kadar proje kapsamında hedeflenen bir durum olmasa da aktivitesi özellikle birçok kanser tipinde son derece önem taşıyan MMP2 enziminin fonksiyonunun regülasyonu hakkında önemli bir ön veri sağlamaktadır. Belki de özellikle agresif tümörlerde, kanser invazyonunda kritik önem taşıyan MMP tipindeki enzimlerin aktiviteleri bazı peptitler tarafından artırılmaktadır. Bu hipoteze dayanarak MMP aktivitesini düzenleyen peptitlerin keşfine yönelik yeni projelerin başlatılma potansiyeli doğmaktadır. Tümör dokularında aktivasyon potansiyeline sahip bu tür yeni peptitlerin keşfedilmesi, invazyonu yavaşlatmak veya engellemek için peptit veya peptit-MMP interaksyonunu inhibe edecek terapötik ajanların keşfedilmesi veya tasarlanması yönünde yeni bir tedavi stratejisi de başlatabilecek bir adım olacaktır. Özellikle bu kısmın yer aldığı bir makale taslağı yazılmaya başlanmıştır ve bir peptit dergisine (Journal of Peptide Science gibi) gönderilmesi hedeflenmektedir.

Proje öneri halinde iken inhibisyon yerine aktivasyon göstereceği öngörülememiştir. Bu nedenle başarı ölçütlerinde ciddi bir kayıp yaşanmıştır. Geriye dönüp bakıldığında böylesi bir şey kestirilebilir miydi diye düşününce aslında bilimin tam da bunun için olduğu, ortaya atılan hipotezleri doğrulamak için deneyler yapıldığı ve bu deney sonuçlarına göre hipotezlerin düzenlendiği görülmektedir. Burada da kağıt üzerinde kendi belirlediğimiz başarı ölçütlerine göre



düşük bir başarı elde etmiş görünsek de CLTX-MMP2 etkileşimi ve CLTX modifikasyonlarının buna etkisi konusunda önemli bulgular elde etmiş olduk.

Bu projede elde edilen sonuçlar kısmen 27. ve 29. Ulusal Kimya Kongresinde ve 32. Amerikan Peptit Sempozyumunda poster olarak sunulmuştur. Özellikle MMP2 aktivitesinin artması sonuçları klorotoksin üzerine çalışan peptit camiası tarafından ilgi ile karşılanmıştır.

6. KAYNAKLAR

Akcan, M., Stroud, M. R., Hanse, S. J., Clark, R. J., Daly, N. L., Craik, D. J. ve Olson, J. M. 2011. "Chemical Re-engineering of Chlorotoxin Improves Bioconjugation Properties for Tumor Imaging and Targeted Therapy", *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 782–787.

Ala-aho, R. ve Kahari, V. 2005. "Collagenases in cancer", *Biochimie*, 87, 273–286.

Ali, S. A., Alam, M., Abbasi, A., Undheim, E. A., Fry, B. G., Kalbacher, H. ve Voelter, W. 2016. "Structure-activity relationship of chlorotoxin-like peptides" *Toxins*, 8, 36.

Babine, R. E. ve Bender, S. L. 1997. "Molecular recognition of protein–ligand complexes: applications to drug design" *Chemical Reviews*. 97, 1359–1472.

Bafetti, L.M., Young, T.N., Itoh, Y. ve Stack, M.S. 1998. "Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells", *Journal of Biological Chemistry*. 273, 143–149.

Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner J. F. 2004. *Handbook of Proteolytic Enzymes* (2. Baskı). London: Academic Press.

Bauvois B. 2012. "New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825, 29–36.

Benjamin MM., Khalil RA. Chapter7, "Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigative Tools in the Pathogenesis and Management of Vascular Disease. Matrix Metalloproteinase Inhibitors, Specificity of Binding and Structure-Activity Relationships", Springer : Gupta SP.

Bjorklund, M. ve Koivunen, E. 2005. "Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells", *Biochim. Biophys. Acta*, 1755, 37–69.



Bode, W. 1995. "A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain", *Structure*, 3, 527–530.

Bode, W. Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagasa, H. ve Maskos, K. 1999. "Structural properties of matrix metalloproteinases", *Cellular and Molecular Life Science*, 55, 639–652.

Briknarova, K., Grishaev, A., Banyai, L., Tordai, H., Patthy, L. ve Llinas, M. 1999. "The second type II module from human matrix metalloproteinase 2: structure, function and dynamics", *Structure* 7, 1235–1245.

Cauwe, B., Van den Steen, P.E. ve Opdenakker, G. 2007. "The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases", *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 113–185.

Conte, M. L., S., Chambery, A., Marra, A. ve Dondoni, A. 2010. "Photoinduced Addition of Glycosyl Thiols to Alkynyl Peptides: Use of Free-Radical Thiol–Yne Coupling for Post-Translational Double-Glycosylation of Peptides", *Journal of Organic Chemistry*, 75, 4644–4647.

Craik, D. J., Daly, N. L. ve Waine, C. 2001. "The cystine knot motif in toxins and implications for drug design", *Toxicon*, 39, 43-60.

Debin, J., Maggio, J. E. ve Strichartz, G. R. 1993. "Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion ", *Cell Physiology*, 33, 361-369.

Deshane, J., Garner, C. C. ve Sontheimer, H. 2003. "Chlorotoxin Inhibits Glioma Cell Invasion via Matrix Metalloproteinase-2", *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 4135-4144.

Du, J., Yuejun, F., Wang, J. ve Liang, A. 2013. "Adenovirus-mediated expression of BmK CT suppresses growth and invasion of rat C6 glioma cells", *Biotechnology Letters*, 35, 861-870.

Egeblad, M., Werb, Z. 2002. "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression" *Nature Review in Cancer*, 2, 161–174.

Fisher, G. J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Cho, M.K., He, T., Varani, J., Kang, S. ve Voorhee, J.J. 2009. "Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrixmetalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin", *American Journal of Pathology*, 74,101–114.

Folgueras, A. R., Pendás, A.M., Sánchez, L.M. ve López-Otín, C. 2004. "Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies", *International Journal of Development Biology*, 48, 411–424.

Fridman, R., Fuerst, T.R., Bird, R.E., Hoyhtya, M., Oelkuct, M., Kraus, S., Komarek, D., Liotta, L.A., Berman, M.L. ve Stetler-Stevenson, W.G. 1992. "Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions", *Journal of Biological Chemistry*, 267, 15398–15405.

Fua, Y., Yinai L. T. ve Lianga, A. 2007." Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas", *Neuroscience Letters*, 421, 62–67.

Gioia, M., Fasciglione, G.F., Marini, S., D'Alessio, S., De Sanctis, G., Diekmann, O., Pieper, M., Politi, V., Tschesche, H. ve Coletta, M. 2002. "Modulation of the catalytic activity of neutrophil collagenase MMP-8 on bovine collagen I. Role of the activation cleavage and of the hemopexin-like domain", *Journal of Biological Chemistry*, 277, 23123–23130.

Gioia, M., Monaco, S., Fasciglione, G.F., Coletti, A., Modesti, A., Marini, S. ve Coletta, M. 2007. "Characterization of the mechanisms by which gelatinase A, neutrophil collagenase, and membrane-type metalloproteinase MMP-14 recognize collagen I and enzymatically process the two alpha-chains", *Journal of Molecular Biology*, 368, 1101–1113.

Gioia, M., Monaco, S., Van Den Steen, P.E., Sbardella, D., Grasso, G., Marini, S., Overall, C.M., Opdenakker, G. ve Coletta, M. 2009. "The collagen binding domain of gelatinase A modulates degradation of collagen IV by gelatinase B", *Journal of Molecular Biology*, 386, 419–434.



Goddard-Borger, E. D. ve Stick, R. V. 2007. "An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride" *Organic Letters* 9, 3797-3800.

Gupta A., Kaur CD., Jangdey, M. ve Saraf S. 2014. "Matrix metalloproteinase enzymes and their naturally derived inhibitors: Novel targets in photocarcinoma therapy", *Ageing Research Reviews*, 13, 65–74

Gutte, B. 1995. "Solid phase peptide synthesis, *Peptides: Synthesis, Structures and Applications* (2). Swetzerland: Academic Press, 93-169.

Hatfield, K.J., Reikvam, H. ve Bruserud, O. 2010. "The crosstalk between the matrix metalloprotease system and the chemokine network in acute myeloid leukemia", *Current Medicinal Chemistry*, 17, 4448–4461.

Hermanson, G. T. 2008. *Bioconjugate Techniques* (2), San Diego: Academic Press

Hirose, T., Patterson, C., Pourmotabbed, T., Mainardi, C.L. ve Hasty, K.A. 1993. "Structure–function relationship of human neutrophil collagenase: identification of regions responsible for substrate specificity and general proteinase activity", *Proceedings of the National Academy of Sci. USA*, 90, 2569–2573.

Hirose, T., Riefe, R.A., Smith Jr., G.N., Stevens, R.M., Mainardi, C.L. ve Hasty, K.A. 1992. "Characterization of type V collagenase (gelatinase) in synovial fluid of patients with inflammatory arthritis", *J. Rheumatol.* 19, 593–599.

Hu J., Van den Steen PE., Sang QA. ve Opdenakker G. 2007. "Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases", *Nature Reviews, Drug Discovery.* 6, 480-498.

Kent, S. B. H. 2009." Total chemical synthesis of proteins", *Chemical. Society Reviews*, 38, 338-351.

Kessenbrock, K., Plaks, V. ve Werb, Z. 2010. "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment", *Cell*, 141, 52–67.



Kleifeld, O. 2000. "Structural characterization of the catalytic active site in the latent and active natural gelatinase B from human neutrophils", *Journal of Biological Chemistry*, 275, 34335–34343.

Klein, T., Bischoff, R. 2011. "Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases", *Amino Acids*, 41, 271–290.

Kobayashi, Y., Matsumoto, M., Kotani, M., Makino, T. 1999. "Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation", *J. Immunol*, 163, 5989–5993.

Koivunen, E., Arap, W., Valtane, H., Rainisalo, A., Medina, O. P., Heikkilä, P., Kantor, C., Gahmberg, C. G., Salo, T., Kontinen, Y. T., Sorsa, T. M., Ruoslahti, E. ve Pasqualini, R. 1999. "Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor", *Nature Biotechnology*, 17, 768 – 774.

Kollet, O. 2006. "Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells", *Nature Med.*, 12, 657–664.

Lau, Y. H. ve Spring, D. R. 2011. "Efficient synthesis of Fmoc-protected azido amino acids" *Synlett*, 1917-1919.

Lippens, G., Dhalluin, C. ve Wieruszeski, J. M. 1995. "Use of a water flip-back pulse in the homonuclear NOESY experiment", *Journal of Biomolecular NMR*, 5, 327-331.

Lo Conte, M. 2010. "Photoinduced Addition of Glycosyl Thiols to Alkynyl Peptides: Use of Free-Radical Thiol–Yne Coupling for Post-Translational Double-Glycosylation of Peptides" , *The Journal of Organic Chemistry*, 75, 4644-4647

Lyons, S., O'Neal J. ve Sontheimer, H. 2002. "Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin", *Glia*, 39, 162-173.

Maertens, C., Wei, L., Tytgat, J., Droogmans, G. ve Nilius, B. 2000. "Chlorotoxin does not inhibit volume-regulated, calcium-activated and cyclic AMP-activated chloride channels", *British Journal of Pharmacology*, 129, 791-801.



Marchenko, G. N., Ratnikov, B. I., Rozanov, D. V., Godzik, A., Deryugina, E. I. ve Strongin, A. Y. 2001. "Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin", *Biochemical Journal*, 356, 705–718.

Maskos, K. 2005. "Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors", *Biochimie* 87, 249–263.

Matrisian, L. M., Bowden, G. T., Krieg, P., Furstenberger, G., Briand, J.-P., Leroy, P., Breathnach, R., 1986. "The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9413–9417.

McQuibban, G. A. 2002. "Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*", *Blood*, 100, 1160–1167.

McQuibban, G. A., Gong, J. H., Tam, E. M., McCulloch, C. A., Clark-Lewis, I. ve Overall, C.M. 2000. "Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3", *Science*, 289, 1202–1206.

Merrifield, R. B. 1963. "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide", *Journal of the American Chemical Society*, 1963, 85, 2149-2154.

Monaco, S., Sparano, V., Gioia, M., Sbardella, D., Di Pierro, D., Marini, S., Coletta, M., 2006. "Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects neutrophil migration and it is modulated by extracatalytic domains", *Protein Science*, 15, 2805–2815.

Mrugala, M. M., Adair, J. E. ve Kiem, H.P. 2012. "Outside the box--novel therapeutic strategies for glioblastoma", *Cancer Journal*, 18, 51-58.

Murphy, G., Allan, J.A., Willenbrock, F., Cockett, M.I., O'Connell, J.P. ve Docherty, A.J.P. 1992. "The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity", *Journal of Biological Chemistry*, 267, 9612–9618.



Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M.I., Atkinson, S.J., Allan, J.A., Knight, C.G., Willenbrock, F., Docherty, A.J., 1994. "Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant" *Journal of Biological Chemistry*, 269, 6632–6636.

Nagase, H. ve Woessner Jr. J.F., 1999. "Matrix metalloproteinases", *Journal of Biological Chemistry*, 274, 21491–21494.

Ndinguri, M. W., Bhowmick, M. ve Tokmina-Roszyk, D. 2012. "Peptide-Based Selective Inhibitors of Matrix Metalloproteinase-Mediated Activities", *Molecules*, 17, 14230-14248.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML ve Matrisian LM. 2000. "Matrix metalloproteinases: -- clinical implications", *Journal of Clinical Oncology*, 18, 1135-49.

Opdenakker, G., van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., van Damme, J. 2001. "Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology", *Journal of Leukocyte Biology*, 69, 851–859.

Özen, C., Malek, J.M., Serpersu, E.H. (2006). "Dissection of aminoglycoside-enzyme interactions: a calorimetric and NMR study of neomycin B binding to the aminoglycoside phosphotransferase(3')-IIIa.", *Journal of the American Chemical Society*, 128(47), 15248-54

Özen, C., Serpersu, E.H. (2004). "Thermodynamics of aminoglycoside binding to aminoglycoside-3'-phosphotransferase IIIa studied by isothermal titration calorimetry", *Biochemistry*, 43(46), 14667-75.

Parks, W. C., Wilson, C. L., Lopez-Boado, Y. S. 2004. "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity", *Nature Reviews Immunology* 4, 617–629.

Patterson, M.L., Atkinson, S.J., Knäuper ve V., Murphy, G. 2001. "Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain", *FEBS Letters*, 503, 158–162.



Pícha, J., Buděšínský, M., Macháčková, K., Collinsová, M. ve Jiráček, J. 2017. "Optimized syntheses of Fmoc azido amino acids for the preparation of azidopeptides" *Journal of Peptide Science* 23, 202-214.

Pruijt, J. F. M. 1999. "Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9)", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 10863–10868.

Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J. ve Fisher, G.J. 2009. "Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging", *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14 (1), 20–24.

Rao GB. 2005. "Recent Developments in the Design of Specific Matrix Metalloproteinase Inhibitors aided by Structural and Computational Studies." *Current Pharmaceutical Design*, 2005, 11, 295-322.

Rjeibia I., Mabrouk K., Mosratia H., Berenguerc C., Mejdoubd H., Villarde C., Laffitte D., Bertinb D., Ouafikc L., Luis J., ElAyeba M. ve Srairi-Abid N. 2011. "Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom", *Peptides*, 32, 656–663

Rodriguez, D., Morrison, C.J. ve Overall, C.M. 2010. "Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803, 39–54.

Rouzair-Dubois, B., Milandri, J. B., Bostel, S. ve Dubois, J. M. 2000. "Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells", *Pflügers Archiv*, 440 (6), 881-888.

Roy R., Yang, J. ve Moses, M.A. 2009. "Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer", *Journal of Clinical Oncology*, 27, 5287–5297.

Sabeh, F., Li, X.Y., Saunders, T.L., Rowe, R.G. ve Weiss, S.J. 2009. "Secreted versus membrane-anchored collagenases: relative roles in fibroblast-dependent collagenolysis and invasion", *Journal of Biological Chemistry*, 284, 23001–23011.



Sbardella D., Fasciglione G.V., Gioia M., Ciaccio C., Tundo G.R., Marini S. ve Coletta M. 2012. "Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes", *Molecular Aspects of Medicine* 33, 119–208.

Schönbeck, U., Mach, F. ve Libby, P. 1998. "Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing", *J. Immunol.*, 161, 3340–3346.

Skiles, J.W., Gonnella, N.C. ve Jeng, A.Y. 2001. "The design, structure, and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors", *Curr. Med. Chem.*, 8, 425–474.

Soroceanu, L., Manning, T. J. Jr. ve Sontheimer, H. 1999. "Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers", *Journal of Neuroscience*, 19 (14), 5942-5954.

Steffensen, B., Wallon, U.M. ve Overall, C.M. 1995. "Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen", *J. Biol. Chem.*, 270, 11555–11566.

Swarnakar, S., Mishra A. ve Susri Ray Chaudhuri S.R. 2012. "The Gelatinases and Their Inhibitors: The Structure–Activity Relationships". *Matrix Metalloproteinase Inhibitors, Specificity of Binding and Structure-Activity Relationships*. Editör: Gupta, S.P. New York: Springer.

Trexler, M., Briknarov, K., Gehrman, M., Llinas, M. ve Patthy, L. 2003. "Peptide ligands for the fibronectin type II modules of matrix metalloproteinase 2 (MMP- 2)", *J. Biol. Chem.*, 278, 12241–12246.

Tu, G., Xu, W., Huang, H. ve Li, S. 2008. "Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors", *Curr. Med. Chem.*, 15 (14), 1388–1395.

Vala, C., Chrétie, F., Balentova, E., Lamandé-Langle, S. ve Chapleur, Y. 2011. "Neoglycopeptides through direct functionalization of cysteine", *Tetrahedron Letters*, 52(1),17-20.



TÜBİTAK

Van den Steen, P. E. 2003. "Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities", *Eur. J. Biochem.*, 270, 3739–3749.

Van den Steen, P. E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J. ve Opdenakker, G. 2000. "Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact", *Blood*, 96, 2673–2681.

Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A. ve Opdenakker, G. 2002. "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)", *Crit. Rev. Biochem., Mol. Biol.*, 37, 375–536.

Van den Steen, P.E., Proost, P., Wuyts, A., van Damme, J. ve Opdenakker, G. 2000. "Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact", *Blood*, 96, 2673–2681.

Van Wart, H. E. ve Birkedal-Hansen, H. 1990. "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family", *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87, 5578–5582.

Van, L.P. ve Libert, C., 2006. "Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. "Cytokine Growth Factor Review, 17 (4), 217–223.

Vargova, V., Pytliak, M. ve Mechirov, V. 2012. "Matrix Metalloproteinases". *Matrix Metalloproteinase Inhibitors, Specificity of Binding and Structure-Activity Relationships*. Editör: Gupta, S.P. New York: Springer.

Verma, R.P. 2012. "Hydroxamic Acids as Matrix Metalloproteinase Inhibitors". *Matrix Metalloproteinase Inhibitors, Specificity of Binding and Structure-Activity Relationships*. Editör: Gupta, S.P. New York: Springer.

Vihinen, P., Ala-aho, R. ve Kähäri, V.M. 2005. "Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer", *Curr. Cancer Drug Targets*, 5, 203–220.



Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M. ve Werb, Z. 1998. "MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes", *Cell*, 93, 411–422.

Wilson, C.L. ve Matrisian, L.M. 1996. "Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions", *Int. J. Biochem., Cell Biol.*, 28, 123–136.

Xu, X., Chen, Z., Wang, Y., Bonewald, L. ve Steffensen, B. 2007. "Inhibition of MMP-2 gelatinolysis by targeting exodomain–substrate interactions", *Biochem. J.*, 406, 147–155.

Zask A, Levin J.I, Killar L.M. ve Skonicki JS. 1996. "Inhibition of matrix metalloproteinases: structure based design", *Curr Pharm Design*, 2, 624-66.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. SALİH ÖZÇUBUKÇU
Proje No:	214Z083
Proje Başlığı:	Klorotoksin Peptit Yapısına Dayalı Matris Metalloproteinaz-2 İnhibitörlerinin Geliştirilmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	CAN ÖZEN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2015 - 01/11/2017
Onaylanan Bütçe:	554687.0
Harcanan Bütçe:	432436.4
Öz:	<p>Bu projenin amacı, kanser gibi temel hastalıkların tedavisinde önemli bir moleküler hedef olan MMP-2 enzimine spesifik, klorotoksin peptit yapısına dayalı, yüksek etkinlikte ve seçicilikte özgün bir inhibitör geliştirmektir.</p> <p>Geliştirilmeye çalışılan inhibitör, 36 amino asitten oluşan (4 kDa) ve akrep zehrinden izole edilmiş seçici bir MMP-2 inhibitörü olan klorotoksin (CLTX) peptidinin yapısına dayanmaktadır. Proje stratejisi, ön çalışmalarımız sonucu CLTX yapısında belirlediğimiz dört kritik pozisyonda (H10, K15, K23 ve K27) farklı karbon zinciri eklemeleriyle toplam 20 adet tiyol ve azido alanın modifikasyonu gerçekleştirilerek MMP-2 yapısındaki çinko elementine koordinasyon sağlama prensibine dayanmaktadır.</p> <p>Proje süresinde lizin modifikasyonlarda sentezlerdeki sıkıntılardan dolayı strateji değiştirmeye gidilmesi gerekmiştir. Bu nedenle her bir lizinden 3 farklı modifikasyon sentezlenmiş ancak bunlardan da ikiye katlanmasında başarı ile gerçekleştirilmiştir. Histidin modifikasyonu model peptitte başarılı olunmasına rağmen esas peptitte click tepkimesinin başarısızlığı nedeniyle gerçekleştirilememiştir. Elde edilen CLTX türevlerinin MMP-2 aktiviteleri ölçülmüş ancak beklenen aksine inhibe etmek yerine aktive ettiği görülmüştür.</p>
Anahtar Kelimeler:	kanser,matris metalloproteinaz,klorotoksin,peptit inhibitör,rasyonel ilaç tasarımı,yapısal biyoloji
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır