

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**YAĞ ASİDİ METABOLİZMASINDA GÖREVLİ PROTEİNLERİN FOXO3A
İLE ETKİLEŞİMİNİN İN SİLİCO YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlke SARAĞ

1700004156

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

HAZİRAN 2025

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**YAĞ ASİDİ METABOLİZMASINDA GÖREVLİ PROTEİNLERİN FOXO3A
İLE ETKİLEŞİMİNİN İN SİLİCO YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlke SARAK

1700004156

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Kübra TELLİ

: Dr. Öğr. Üyesi Aşlı KUTLU

HAZİRAN 2025

ÖNSÖZ

Tüm hayatım boyunca sevgi ve sabırla her zaman yanımda olan, benden bir an için bile maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Aygöl ALTINÖZ'e, babam Ercan SARAK'a, dedem Yavuz ALTINÖZ'e, anneannem Ayşegül ALTINÖZ'e ve tüm aileme sonsuz ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki yüksek lisans eğitimimin son senesinde tez konusunun seçilmesinde, araştırılmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına ışık tutan, saygı ve sevgi duyduğum tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bana çok şey katan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Zeynep Narçın PALAVAN-ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN, Sayın Prof. Dr. Çimen ATAK, Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a, Sayın Prof. Dr. Özge ÇELİK, Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKANYERLİKAYA, Sayın Yard. Doç. Atok OLGUN, Sayın Dr. Alp AYAN, Sayın Araş. Gör. Burcu AYHAN, Sayın Prof. Dr. Seyhan ALTUN, Sayın Araş. Gör. Sinan MERİÇ ve Sayın Araş. Gör. Özge RENCÜZOĞULLARI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitim sürecinde, birçok konuda bana her zaman destek olan çok değerli ve canım arkadaşlarım Filiz Nur PAHİL'a, ve Ebrar KARAKAYA'ya tek tek teşekkür ederim.

Haziran, 2025

İlke SARAK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ	1
1.1. GİRİŞ.....	1
1.2. AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 FOXO Protein Ailesi	4
2.1.1 FOXO İzoformlarının Yapısı.....	6
2.1.2 FOXO İzoformlarının Düzenlenmesi.....	9
2.1.2.1. İnsülin ve Diğer Büyüme Faktörleri Varlığında FOXO Düzenlenmesi.....	10
2.1.2.2. Stres Koşullarında FOXO Düzenlenmesi	10
2.1.2.3. Düşük Enerji Koşullarında FOXO Düzenlenmesi.....	11
2.1.2.4. Metilasyon ve Diğer PTM'ler ile FOXO Düzenlenmesi	11
2.1.2.5. Partner Proteinlerle Etkileşimler Aracılığı ile FOXO Düzenlenmesi	12
2.1.2.6. Post-transkripsiyonel Düzeyde FOXO Düzenlenmesi	12
2.1.2.7. Oto-düzenleyici Mekanizmalarla FOXO Düzenlenmesi	12
2.1.3 FOXO3A	14
2.1.4. FOXO3A' nın Yapısı	15

2.1.5 FOXO3A' nın Düzenlenmesi	17
2.1.5.1. Fosforilasyon.....	17
2.1.5.2. Asetilasyon	18
2.1.5.3. Ubikitinasyon.....	19
2.1.5.4. Diğer Modifikasyonlar	19
2.1.6 FOXO3A İfadesi	20
2.1.6.1 Normal Dokularda FOXO3A Ekspresyonu.....	21
2.1.6.2 Hücre Tipi Düzeyinde FOXO3A Ekspresyonu.....	23
2.1.6.3 Kanser Dokularında FOXO3A Ekspresyonu	23
2.1.6.4 Subsellüler Lokalizasyon Bilgileri	25
2.2. Yağ Asidi Metabolizması	25
2.2.1.Yağ Asidi Sentezi (Lipogenez)	26
2.2.1.1. Asetil-CoA'nın Sitoplazmaya Taşınması	27
2.2.1.2. Malonil-CoA Oluşumu.....	27
2.2.1.3. Zincir Uzaması	27
2.2.2. Yağ Asitlerinin Mitokondrilerdeki β -Oksidasyonu.....	28
2.3. Yağ Asidi Metabolizması ve Kanser	31
2.3.1 Kanser Hücrelerinde FA'ların De Novo Sentezi.....	33
2.3.2 Kanser Hücrelerinde Yağ Asitlerinin Uzaması.....	34
2.3.3 Kanser Hücrelerinde Yağ asitlerinin Alımı ve Taşınması	35
2.3.4 Membran yapısı ve akışkanlığı.....	36
2.3.5 Yağ Asidi metabolizması Aracılı Kanser Tedavileri	40
3.METOT	42
3.1 FOXO3A Proteininin Klinik Olarak Önemli Varyantlarının İn Silico Analizi.....	42
3.1.1 FOXO3A SNP'lerinin Taranması	42
3.1.2 FOXO3AWT ve FOXO3AMT Protein Yapılarının Oluşturulması ve Karşılaştırılması.....	43

3.1.3 CUPSAT ile Mutasyonların Protein Stabilitesi Ölçümü.....	44
3.1.4 Moleküler Dinamik Simülasyon	44
3.2. FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Protein Dizilerinin ve 3D Yapılarının Alınması.....	44
3.3. Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Belirlenmesi	45
3.4. FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin 3D Protein Yapılarının Doğrulanması ve Kalite Analizi	47
3.5.Bağlanma Arayüzü Analizi.....	47
3.6. HDOCK ve HawkDock ile FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerinin Moleküler Yerleştirilmesi	48
3.7. Bölge – Spesifik Mutagenез	49
3.8.Evrimsel Korunma Analizi.....	49
3.9. Moleküler Dinamik Simülasyon.....	50
3.10. İçsel Bozukluk Analizi.....	50
3.10.1. Amino asit Başına Rezidü Bozukluğu Tahmini	50
3.10.2. Bozukluğa Dayalı İşlevselliğin Değerlendirilmesi.....	51
4.SONUÇLAR	52
4.1 FOXO3A’ nın Dizisi ve SNP’lerinin Alınması.....	52
4.2 FOXO3A SNP’lerinin Taranması.....	52
4.3 FOXO3AWT ve FOXO3AMT Protein Yapılarının Oluşturulması ve Karşılaştırılması	53
4.4 CUPSAT ile Mutasyonların Protein Stabilitesi Ölçümü	54
4.5 FOXO3AWT ve FOXO3AMT Protein Yapılarının Moleküler Dinamik Simülasyonu	55
4.6. FOXO3A ve Yağ Asidi Metabolizmasına Katılan Proteinlerin Dizi ve Üç Boyutlu Yapılarının Alınması	59
4.7. ColabFold Aracılığıyla FOXO3A’ nın Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Belirlenmesi.....	62

4.8 FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin 3D Protein Yapılarının Doğrulanması ve Kalite Analizi	65
4.9. Bağlanma Arayüzü Analizi.....	84
4.10. HDOCK ile FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Moleküler Yerleştirmesi	114
4.11. HawkDock ile FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Moleküler Yerleştirmesi	115
4.12. Bölge – Spesifik Mutagenез	116
4.13. Klinik Açıdan Önemli Varyantların FOXO3A ve Potansiyel Partnerlerin Etkileşimi Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi.....	120
4.14. Evrimsel Korunma Analizi.....	122
4.15. Moleküler Dinamik Simülasyon.....	123
4.16. İçsel Bozukluk Analizi.....	126
4.16.1. Amino Asit Başına Rezidü Bozukluğu Tahmini	126
4.16.2. Bozuklukla İlgili İşlevselliğin Değerlendirilmesi	130
5.TARTIŞMA	135
KAYNAKLAR	143
EKLER.....	168

KISALTMALAR

AAKG1:	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1
ACACA:	Acetyl-CoA carboxylase 1
ACACB:	Acetyl-CoA carboxylase 2
ACADL:	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
ACADM:	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
ACADS:	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
ACADSB:	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
ACADVL:	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
ACAT1:	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
ACLY:	ATP-citrate synthase
ACOT1:	Acyl-coenzyme A thioesterase 1
ACOT2:	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial
ACOT4:	Peroxisomal succinyl-coenzyme A thioesterase
ACOX1:	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
ACSA:	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic
ACSF3:	Malonate--CoA ligase ACSF3, mitochondrial
ACSL1:	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1
ADH1A:	Alcohol dehydrogenase 1A
ADIPO:	Adiponectin
ALDH2:	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
CP2U1:	Cytochrome P450 2U1
DHB12:	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase
DHB8:	(3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
ECHA:	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial
ECHB:	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial
ECHM:	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial
ECHP:	Peroxisomal bifunctional enzyme

ELOVL2:	Very long chain fatty acid elongase 2
FABP4:	Fatty acid-binding protein, adipocyte
FABP7:	Fatty acid-binding protein, brain
FASN:	Fatty acid synthase
FOXO3A:	Forkhead box protein O3
HACD2:	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2
HADH:	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial
LPIN1:	Phosphatidate phosphatase LPIN1
MCAT:	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein
MECR:	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial
OXSM:	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial
PPARG:	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPT1:	Palmitoyl-protein thioesterase 1
SAST:	S-acyl fatty acid synthase thioesterase, medium chain
TECR:	Very-long-chain enoyl-CoA reductase

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. FOXO İzofomları (Link, 2019; Santos et al., 2023).....	5
Tablo 2. FOXO izofomları ve post-translasyonel modifikasyonları. (Santos et al., 2023)	13
Tablo 3. FOXO3A Post Translasyonel Modifikasyonları. (F. Wang et al., 2015a)....	20
Tablo 4. Yağ asidi metabolik enzimlerinin kanserdeki rolleri (A. Du et al., 2023). .	38
Tablo 5. Yağ asitleri ve yağ asidi metabolizmasına dayalı bazı kanser tedavi yaklaşımları.	40
Tablo 6. FOXO3A proteini üzerindeki yüksek riskli SNP'lerin yapısal konumları ve patojenite skorları.....	53
Tablo 7. FOXO3A ve KEGG Pathway veri tabanından seçilen proteinlere ait UNIPROT ve AlphaFold veri tabanı erişim numaraları ve adları.....	59
Tablo 8. FOXO3A ve potansiyel erişim partnerlerinin ColabFold aracılığıyla oluşturulan modellerinin ipTM ve PLDDT skorları.	63
Tablo 9.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin ERRAT ve PROCHECK sonuçları.	66
Tablo 10.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin hizalama sonuçları.	69
Tablo 11.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri PPARG arasındaki potansiyel hidrojen bağları.	85
Tablo 12.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri ACADV arasındaki hidrojen bağları.....	87
Tablo 13.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri ACSL-1 arasındaki hidrojen bağları.....	89
Tablo 14.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri ECHB arasındaki hidrojen bağları.....	91
Tablo 15.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri MEER arasındaki hidrojen bağları.....	93
Tablo 16.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri PPT-1 arasındaki hidrojen bağları.....	95
Tablo 17. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri ACSL-1 arasındaki hidrojen bağları.....	97

Tablo 18. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri ACADV arasındaki hidrojen bağları.....	102
Tablo 19. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri ECHB arasındaki hidrojen bağları.....	104
Tablo 20. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri MEER arasındaki hidrojen bağları.....	106
Tablo 21. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri PPARG arasındaki hidrojen bağları.....	109
Tablo 22. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri PPT-1 arasındaki hidrojen bağları.....	112
Tablo 23. FOXO3A proteini ile potansiyel etkileşim partnerleri arasında HDOCK sunucusu kullanılarak gerçekleştirilen moleküler yerleştirme analizine ait en iyi modellerin sonuçları.....	115
Tablo 24.FOXO3A proteini ile potansiyel etkileşim partnerleri arasında HawkDock sunucusu kullanılarak gerçekleştirilen moleküler yerleştirme analizine ait en iyi modellerin sonuçları.....	116
Tablo 25. BeatMusic aracı kullanılarak gerçekleştirilen bölge spesifik mutagenез analizine ait sonuçlar.....	117
Tablo 26. FOXO3A proteini ile potansiyel etkileşim partnerleri arasında oluşturulan komplekslerde klinik açıdan önemli varyantların bağlanma enerjisine etkisi.	121

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. FOXO varyantlarını kodlayan proteinin intron-ekson yapıları.....	6
Şekil 2. FOXO dizi hizalamaları ve yapıları.....	9
Şekil 3. İnsan FOXO3A'nın yapısı.....	16
Şekil 4. Normal insan dokularında FOXO3A mRNA ekspresyon düzeyleri (HPA konsensus RNA-seq verilerine göre).	22
Şekil 5. FOXO3 proteininin insan dokularındaki ekspresyon düzeyleri.	23
Şekil 6. FOXO3 geninin farklı kanser türlerindeki RNA düzeyleri (TPM cinsinden).	24
Şekil 7. Biyoloji, tıp ve biyoteknolojide yağ asidi biyosentetik mekanizmaları ve yağ asidi sentazlarının oynadığı temel roller (Günenc et al., 2022b).	26
Şekil 8. Lipogenez yolu (Park & Chalfant, 2021).....	28
Şekil 9. Sitrat mekiği, yağ asidi sentezi için asetil-CoA'nın mitokondri matriksinden sitozole taşınmasını sağlar (Yanamadala, 2024).	29
Şekil 10. Yağ asitlerinin β -oksidasyon sarmalı (Park & Chalfant, 2018).	31
Şekil 11. Lipid araştırmalarında önemli keşifler.	32
Şekil 12. Kanser hücrelerinde yağ asidi (FA) metabolizması.	33
Şekil 13. Yağ asitleri (FA'lar) membran yapısını ve onkojenik sinyal yollarını düzenler.	37
Şekil 14. ColabFold çalışma prensibi (Mirdita et al., 2022).	46
Şekil 15. HDCK sunucusunun prosedürü.	48
Şekil 16. FOXO3A geninde tespit edilen varyantların sınıflarına göre dağılımı.....	52
Şekil 17. 2K86 yapısı üzerinde yer alan yüksek riskli SNP'lerin konumları.	54
Şekil 18. FOXO3A wild-type (WT) ve mutant proteinlerinin 10 ns'lik moleküler dinamik simülasyonu boyunca kök ortalama karesel sapma (RMSD) değerlerinin karşılaştırılması.	55
Şekil 19. FOXO3A wild-type (WT) ve mutant (N208Y, R211W, R249L) proteinlerinin RMSF (Root Mean Square Fluctuation) değerlerinin amino asit pozisyonlarına göre karşılaştırılması.....	56
Şekil 20. FOXO3A wild-type (WT) ve mutant (N208Y, R211W, R249L) proteinlerinin 10 ns boyunca hesaplanan gyration yarıçapı (Rg) değerlerinin karşılaştırılması.	58
Şekil 21. FOXO3A' nın yağ asidi metabolizmasında görevli potansiyel etkileşim partnerlerinin tanımlanması.	65

Şekil 22. FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin PROCHECK sunucusundan elde edilen Ramachandran grafikleri.....	68
Şekil 23. TM-align algoritması kullanılarak ACADV AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.....	70
Şekil 24. TM-align algoritması kullanılarak FOXO3A AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.....	72
Şekil 25. TM-align algoritması kullanılarak MECR AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.....	73
Şekil 26. TM-align algoritması kullanılarak PPARG AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.....	74
Şekil 27. TM-align algoritması kullanılarak PPT-1 AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.....	75
Şekil 28. 18. TM-align algoritması kullanılarak ECHB AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.....	76
Şekil 29. AlphaFold tarafından tahmin edilen FOXO3A proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.	77
Şekil 30. AlphaFold tarafından tahmin edilen ACSL-1 proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.	78
Şekil 31. AlphaFold tarafından tahmin edilen ECHB proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.	79
Şekil 32. AlphaFold tarafından tahmin edilen MECR proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.	80
Şekil 33. AlphaFold tarafından tahmin edilen PPT-1 proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.	81
Şekil 34. AlphaFold tarafından tahmin edilen PPARG proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.	82
Şekil 35. AlphaFold tarafından tahmin edilen ACADV proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.	83
Şekil 36. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve PPARG kompleksi. FOXO3A deep pink, PPARG salmon.	86
Şekil 37. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve ACADV kompleksi. FOXO3A deep pink, ACADV orange.....	87
Şekil 38. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve ACSL-1 kompleksi. FOXO3A deep pink, ACSL-1 turquoise.	89

Şekil 39. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve ECHB kompleksi. FOXO3A deep pink, ECHB gray.....	91
Şekil 40. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve MECR kompleksi. FOXO3A deep pink, MECR lime.	92
Şekil 41. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve PPT-1 kompleksi. FOXO3A deep pink, PPT-1 medium blue.	94
Şekil 42. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile ACSL1 arasındaki kompleks yapıları.....	100
Şekil 43. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile ACADV arasındaki kompleks yapıları.....	101
Şekil 44. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile ECHB arasındaki kompleks yapıları.....	103
Şekil 45. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile MECR arasındaki kompleks yapıları.....	105
Şekil 46. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile PPARG arasındaki kompleks yapıları.....	108
Şekil 47. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile PPT-1 arasındaki kompleks yapıları.....	111
Şekil 48. ConSurf FOXO3A evrimsel korunma analizi.....	122
Şekil 49. FOXO3A, ACSL-1 ve kompleks yapısı için rezidü bazında RMSF analizi.	123
Şekil 50. Radius of gyration (Rg) değerlerinin 10 ns'lik simülasyon boyunca zamanla değişimi.....	124
Şekil 51. FOXO3A ve ACSL-1 arasında kurulan hidrojen bağlarının zamanla değişimi.....	125
Şekil 52. Proteinlerin içsel bozukluğa yatkınlığının değerlendirilmesi.	128
Şekil 53. D2P2 platformu çıktısı, FOXO3A için fonksiyonel bozukluk profili.	130
Şekil 54. D2P2 platformu çıktısı, ACSL-1 için fonksiyonel bozukluk profili.....	131
Şekil 55. D2P2 platformu çıktısı, PPT1 için fonksiyonel bozukluk profili.	132
Şekil 56. D2P2 platformu çıktısı, MECR için fonksiyonel bozukluk profili.....	133
Şekil 57. D2P2 platformu çıktısı, ACADV için fonksiyonel bozukluk profili.	134
Şekil 58. D2P2 platformu çıktısı, ECHB için fonksiyonel bozukluk profili.	135
Şekil 59. D2P2 platformu çıktısı, PPARG için fonksiyonel bozukluk profili.....	136

ÖZET

Yağ asidi metabolizması yağ asidi sentezi (lipogenez), mitokondride gerçekleşen beta-oksidasyon ve endoplazmik retikulumda gerçekleşen omega-oksidasyon gibi temel süreçleri içermektedir. Bu metabolik yollar, özellikle kanser hücrelerinde yeniden programlanarak hücrelerin enerji ihtiyacını karşılamada ve hayatta kalmada avantaj sağlamaktadır. Forkhead box ailesi proteinleri (Forkhead box, class O, FoxO) proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, stres koşullarında direnç gibi hücresel süreçlerde rol alarak diyabet, kanser, vasküler hastalıklar ve hiperglisemi gibi yaşam süresinin düzenlenmesinin önemli olduğu birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedirler. FOXO ailesi üyelerinden FOXO3A (Forkhead box O3a), birçok hastalıkta geniş çapta çalışılan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre siklusunun devamlılığında, proliferasyon, apoptoz, metastaz ve anjiyogenez gibi farklı metabolik süreçlerde görevli birçok genin aktivitesinden ya da inhibisyonundan sorumlu bir regülatör olarak görev almaktadır. FOXO3A tümör baskılayıcı özelliğe sahip bir transkripsiyon faktörü olarak hücre içerisinde doğrudan ya da dolaylı şekilde çeşitli sinyal yollarının regülasyonunda rol oynamaktadır. Bu bağlamda, FOXO3A'nın kanserde yağ asidi metabolizmasında hangi proteinler ile etkileşimde olduğunun belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında, kanser hücrelerinde enerji metabolizması açısından hayati öneme sahip olan yağ asidi metabolizması ile çok yönlü bir transkripsiyon faktörü olan FOXO3A arasındaki potansiyel etkileşimlerin in silico analizler ile belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç kapsamında, hücre kaderinin belirlenmesinde önemli roller üstlenen tümör baskılayıcı FOXO3A'nın yapısal ve fonksiyonel özellikleri, transkripsiyonel aktiviteleri, post-translasyonel modifikasyonlar ile nasıl düzenlendiği ve hücredeki alt hücresel lokalizasyonunun nasıl kontrol edildiği literatür verileri kullanılarak açıklanmıştır. Ardından, FOXO3A'nın, yağ asidi metabolizmasında görev alan proteinlerle olası fiziksel veya fonksiyonel etkileşimleri in silico analizler aracılığıyla tahmin edilmiştir.

Bu doğrultuda, çalışmada ilk olarak FOXO3A genindeki varyantların yapısal ve işlevsel etkileri detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Öncelikle, Ensembl VEP, CADD ve REVEL gibi biyoinformatik araçlar kullanılarak varyantların patojenite potansiyelleri değerlendirilmiş, ardından Varsome üzerinden bu varyantların klinik sınıflandırmaları ve evrimsel korunum skorları yorumlanmıştır. Analizler sonucunda

yüksek riskli olduğu öngörülen bazı varyantlar seçilerek bu varyantların FOXO3A proteininin üç boyutlu yapısı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapısal modelleme ve moleküler dinamik simülasyonları aracılığıyla, mutasyonların protein stabilitesi, içsel bozukluk bölgeleri ve potansiyel etkileşim yüzeyleri üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. FOXO3A ve yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili proteinlerin dizileri ve üç boyutlu yapıları veri tabanlarından elde edilmiştir. Ardından ColabFold aracı kullanılarak FOXO3A'nın potansiyel etkileşim partnerleri belirlenmiştir. Belirlenen proteinlerin üç boyutlu yapıları çeşitli kalite kontrol analizleri ile doğrulanmış ve yapıların güvenilirliği değerlendirilmiştir. HDCOK ve Hawkdock moleküler yerleştirme platformu kullanılarak FOXO3A ile aday proteinler arasında olası bağlanma senaryoları modellenmiştir. Bu bağlanmaların detaylandırılması amacıyla bağlanma arayüzü analizleri Chimera X ile gerçekleştirilmiş, evrimsel korunmuşlukları Consurf veri tabanında araştırılmış ve Beat Music sunucusu aracılığıyla bölgeye özgü yaratılan mutagenез ile kritik amino asit kalıntıları belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlarda yağ asidi metabolizmasında görevli olan ACSL1 proteinin FOXO3A proteini ile yüksek bağlanma ara yüzü skoruna sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen FOXO3A-ACSL1 kompleksinin dinamik davranışlarını değerlendirmek amacıyla GROMACS ile moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiş, bağlanma kararlılığı ve etkileşim yüzeyleri zaman içinde analiz edilmiştir. Ayrıca, intrinsik olarak düzensiz bölgelerin tespiti için rezidü bazlı bozukluk tahmin algoritmaları ve fonksiyonel bozukluk ilişkili analizler kullanılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular ile FOXO3A'nın yağ asidi metabolizmasında görevli potansiyel etkileşim partnerleri belirlenmektedir. Aynı zamanda, FOXO3A'nın metabolizma-bağımlı kanser türlerinde potansiyel bir biyobelirteç veya terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Bu yönüyle çalışma, metabolik yeniden programlanmanın kontrolünde FOXO3A gibi transkripsiyon faktörlerinin merkezi rollerini vurgulayarak hem kanser tedavisinde yeni potansiyel hedefler sunmaktadır.

ABSTRACT

Fatty acid metabolism includes fundamental processes such as fatty acid synthesis (lipogenesis), beta-oxidation occurring in the mitochondria, and omega-oxidation occurring in the endoplasmic reticulum. These metabolic pathways are especially reprogrammed in cancer cells, providing an advantage in meeting the energy needs of the cells and in survival. Forkhead box proteins (Forkhead box, class O, FoxO) play roles in cellular processes such as proliferation, apoptosis, differentiation, and resistance under stress conditions and are associated with many diseases in which the regulation of lifespan is important, such as diabetes, cancer, vascular diseases, and hyperglycemia. Among the members of the FOXO family, FOXO3A (Forkhead box O3a) is a transcription factor widely studied in many diseases. It acts as a regulator responsible for the activation or inhibition of many genes involved in various metabolic processes such as cell cycle progression, proliferation, apoptosis, metastasis, and angiogenesis. As a tumor suppressor transcription factor, FOXO3A plays a role in the regulation of various signaling pathways either directly or indirectly within the cell. In this context, identifying which proteins FOXO3A interacts with in fatty acid metabolism in cancer is of great importance.

In this thesis study, it is aimed to determine the potential interactions between fatty acid metabolism, which is of vital importance in terms of energy metabolism in cancer cells, and the multifunctional transcription factor FOXO3A through in silico analyses. For this purpose, the structural and functional properties of the tumor suppressor FOXO3A, which plays important roles in determining cell fate, its transcriptional activities, how it is regulated by post-translational modifications, and how its subcellular localization is controlled were explained using literature data. Then, the possible physical or functional interactions of FOXO3A with proteins involved in fatty acid metabolism were predicted through in silico analyses.

In this direction, firstly, the structural and functional effects of the variants in the FOXO3A gene were analyzed in detail. First, the pathogenicity potentials of the variants were evaluated using bioinformatics tools such as Ensembl VEP, CADD, and REVEL, and then the clinical classifications and evolutionary conservation scores of these variants were interpreted via Varsome. As a result of the analyses, some variants (e.g., R249L) predicted to be of high risk were selected, and the effects of these

variants on the three-dimensional structure of the FOXO3A protein were examined. Through structural modeling and molecular dynamics simulations (RMSD, RMSF, Rg), the effects of mutations on protein stability, intrinsically disordered regions, and potential interaction surfaces were comparatively evaluated. The sequences and three-dimensional structures of FOXO3A and proteins associated with fatty acid metabolism were obtained from databases. Then, potential interaction partners of FOXO3A were identified using the ColabFold tool. The three-dimensional structures of the identified proteins were validated with various quality control analyses, and the reliability of the structures was evaluated. Possible binding scenarios between FOXO3A and candidate proteins were modeled using the HDOCK and HawkDock molecular complex modeling platforms. In order to detail these bindings, binding interface analyses were carried out with Chimera X, their evolutionary conservation was investigated in the Consurf database, and critical amino acid residues were identified through region-specific mutagenesis created with the Beat Music server.

In the obtained results, it was determined that the ACSL1 protein, which is involved in fatty acid metabolism, had a high binding interface score with the FOXO3A protein. In order to evaluate the dynamic behaviors of the obtained FOXO3A-ACSL1 complex, molecular dynamics simulations were performed with GROMACS, and binding stability and interaction surfaces were analyzed over time. In addition, residue-based disorder prediction algorithms and functional disorder-related analyses were used to detect intrinsically disordered regions.

With the findings obtained from this study, potential interaction partners of FOXO3A involved in fatty acid metabolism are identified. At the same time, it is revealed that FOXO3A can be considered a potential biomarker or therapeutic target in metabolism-dependent cancer types. In this respect, the study emphasizes the central roles of transcription factors such as FOXO3A in the control of metabolic reprogramming and offers new potential targets in cancer treatment.

1.GİRİŞ

1.1. GİRİŞ

FOXO3A, hücrel stres yanıtının, yaşlanmanın ve uzun ömürlülüğün düzenlenmesinde merkezi rol oynayan, forkhead box (FOX) ailesinin O sınıfına ait bir transkripsiyon faktörüdür. FOXO3A, oksidatif stres, DNA hasarı, besin yetersizliği ve kalori kısıtlaması gibi çevresel ve içsel sinyallere yanıt olarak aktif hale gelir (Fasano et al., 2019a). Bu sayede hücre döngüsünü durdurma, DNA onarımı, otofaji, reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifikasyonu ve apoptoz gibi temel süreçleri düzenler (Fasano et al., 2019b; Shiota et al., 2010; F. Wang et al., 2008, 2015a). FOXO3A'nın aktivitesi, başta fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon ve ubiquitinasyon olmak üzere çeşitli post-translasyonel modifikasyonlarla (PTM'lerle) kontrol edilir. Bu modifikasyonlar, FOXO3A'nın sitoplazmadan nükleus ya da mitokondriye taşınarak aktif hale gelmesini sağlar. Aktif FOXO3A, hedef genlerin transkripsiyonunu başlatarak homeostazı korumaktadır (Fasano et al., 2019a). FOXO3A'nın aktivitesinde meydana gelen dejeneratif hastalıklar (Y. Zhao & Liu, 2021), erken yaşlanma (Y. Zhao & Liu, 2021) ve kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir. FOXO3A, kanserde tümör baskılayıcı bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynamaktadır. Hücrel stres yanıtı, hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz, DNA onarımı ve antioksidan savunma gibi birçok yaşamsal süreci düzenler. Ancak kanser hücrelerinde FOXO3A'nın aktivitesi sıklıkla değişkenlik göstermektedir. FOXO3A'nın meme (H. Liu et al., 2020), kolon (Y. Yu et al., 2018), mesane (D.-S. Yu et al., 2017) ve lösemi (Kornblau et al., 2010) gibi farklı kanser türlerinde ekspresyonundaki veya aktivitesindeki değişim, kötü prognoz ya da tedavi direnciyle ilişkilendirilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle FOXO3A hem prognostik bir biyobelirteç hem terapötik molekül olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Kanser hücreleri, artan enerji ve yapı taşı ihtiyacını karşılayabilmek için yağ asidi metabolizmasını yeniden düzenler. Bu yeniden programlama hem hücre zarının yapımı hem de sinyal iletimi ve enerji üretimi için gereklidir (Koundouros & Poulogiannis, 2020). Aynı zamanda, FOXO3A lipid

metabolizmasının kontrolünde kritik bir transkripsiyon faktörüdür ve özellikle karaciğer, kolon ve bağışıklık hücrelerinde yağ asidi sentezi ve lipid birikimi üzerinde belirleyici etkiler gösterir. Obezite üzerine yapılan bir çalışmada artmış FOXO3A ve otofaji seviyesi, FOXO3A'nın baskılanmasıyla hem yağ hücrelerinde lipid birikimini hem de makrofajlarda inflamasyon ve adipokin salımını azaltmıştır (X. Zhang et al., 2021). Bu da FOXO3A'nın otofaji aracılığıyla yağ hücresi işlevleri ve inflamasyonu kontrol ettiğini düşündürmektedir. Fare kolonunda FOXO3 eksikliği, lipid metabolizmasının bozulmasına ve sonuç olarak kolonik epitel hücreleri ile infiltrasyona uğramış bağışıklık hücrelerinde hücre içi lipid damlacıklarının birikimine neden olmaktadır (Snarski et al., 2024). Özetle, FOXO3A, lipid metabolizmasının fizyolojik sınırlar içinde tutulmasında koruyucu bir rol oynar ve işlev kaybı durumlarında çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir.

Yağ asidi metabolizması, kanser hücrelerinin büyüme, hayatta kalma ve metastaz yeteneklerini destekleyen temel bir biyolojik süreçtir. Aynı zamanda FOXO3A, hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, stres yanıtı ve metabolik denge gibi çok sayıda yaşamsal işlevde görev alan, iyi tanımlanmış bir tümör baskılayıcı transkripsiyon faktörüdür. Güncel çalışmalar, FOXO3A'nın doğrudan veya dolaylı olarak lipid metabolizmasının çeşitli basamaklarını (örneğin de novo lipogenez, yağ asidi oksidasyonu ve lipid birikimi) düzenleyebildiğini göstermektedir. Bu nedenle FOXO3A'nın kanserle ilişkili olarak yağ asidi metabolizması üzerindeki etkilerinin araştırılması, hem yağ asidi metabolizması üzerindeki rolünü anlamak hem de FOXO3A'yı hedef alan tedavi stratejileri geliştirmek açısından büyük önem taşımaktadır.

1.2. AMAÇ

FOXO3A, yağ asidi metabolizmasında görevli proteinlerle yapısal etkileşim kurarak, bu proteinlerin aktivitesi ve yağ asidi metabolizması üzerinde etki göstermektedir.

Bu doğrultuda amaçlar FOXO3A' nın klinik açıdan önemli varyantlarını karakterize etmek, bu varyantların FOXO3A protein yapısı üzerine etkilerini değerlendirmek, FOXO3A ve yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili proteinlerin amino asit dizilerini ve üç boyutlu yapısal modellerini elde etmek, potansiyel kompleksler oluşturarak FOXO3A ve hedef proteinler arasındaki potansiyel etkileşim bölgelerini tahmin etmek, oluşturulan komplekslerin yapısal uygunluğunu ve bağlanma arayüzlerini değerlendirmek, bağlanma bölgesinde oluşturulan mutasyonların bağlanma enerjisine etkisini değerlendirmek ve bağlanma dinamiklerini analiz etmek, incelenen klinik açıdan önemli varyantların etkileşimler üzerindeki etkilerini analiz etmek, içsel bozukluk bölgelerinin bu etkileşimlere etkisini analiz etmek ve FOXO3A' nın evrimsel olarak korunmuş bölgelerinin işlevselliğini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 FOXO Protein Ailesi

FOXO proteinleri, forkhead box family (FOX) protein süper ailesinin bir alt ailesidir. İlk önce *Drosophila melanogaster*'de tanımlanan FOX proteinleri, mayadan omurgalılara kadar hemen hemen tüm ökaryotlarda bulunabilir, ancak bitkilerde bulunmamaktadır (Lam et al., 2013). FOX süper ailesi, insanlardaki en büyük transkripsiyon faktörü ailelerinden biridir. Yaklaşık 100 amino asitlik, forkhead box alanı olarak adlandırılan, oldukça korunmuş bir DNA bağlama alanı içeren 19 dokuya özgü transkripsiyon faktörü alt ailesinden oluşur. Özellikle forkhead box alanının dışındaki bölgelerdeki dizi benzerliklerine dayanarak, alt aileler FOXA'dan FOXR'ye kadar sınıflandırılmıştır ve şu anda insanlarda en az 41 gen tanımlanmıştır (Myatt & Lam, 2007). FOX protein ailesinin üyeleri, göz gelişiminde rol oynadığı gösterilen FOXE3, FOXP2'deki mutasyonların konuşma ve dil bozukluklarına neden olabilmesi, FOXA1'deki mutasyonların çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiş olması ve FOXM1'in kanser tedavisinde umut vadeden bir hedef olarak ortaya çıkması dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynar (Blixt et al., 2000; Borhani & Gartel, 2020; Farhan et al., 2020; Vargha-Khadem et al., 2005). FOXO alt ailesinin proteinleri metazoanlarda evrimsel olarak iyi korunmuştur. *Hydra vulgaris*, *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster* organizmalarında da insana benzer şekilde sırasıyla FOXO, daf-16 ve dFOXO genlerini ifade etmektedirler. (Tissenbaum, 2018). FOXO alt ailesi dört üyeden oluşur: FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6. FOXO ailesi üyeleri, DAF-16 bağlanma elemanı (DBE) olan 5'-GTAAACAA-3' ve insülin yanıt elemanı (IRE) olan 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3' dizilerini forkhead box domainleri aracılığıyla tanıyabilir (Psenakova et al., 2019). FOXO3'ün, *C.elegans*' ta bulunan FOXO/daf-16 proteininin işlevini kısmen yerine getirebilmesi, bu iki proteinin ortolog olduğunu ve evrimsel olarak benzer işlevler taşıdığı anlamına gelmektedir (Lee et al., 2001).

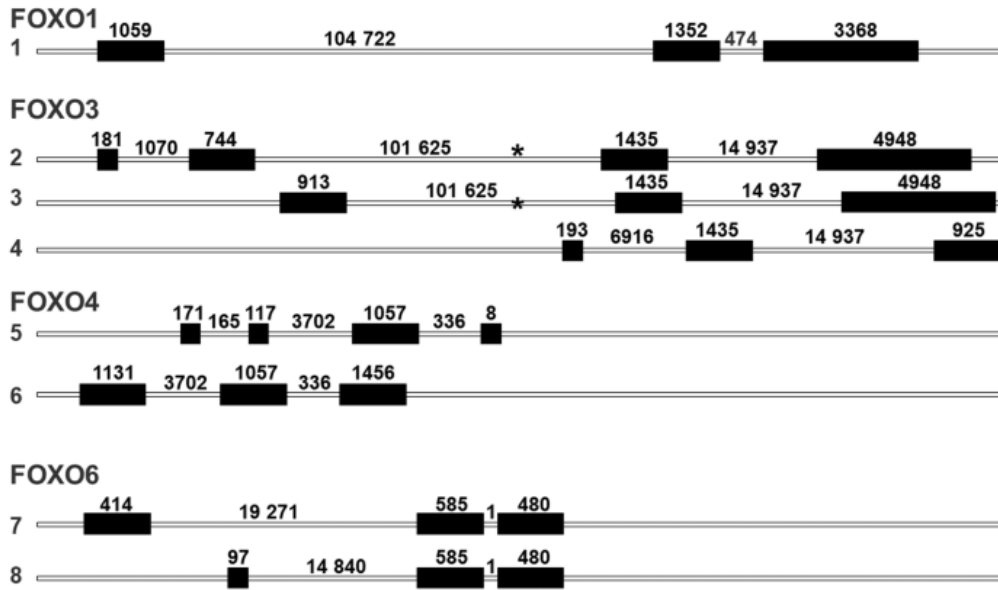
İzoformlar, tek bir gen tarafından üretilen farklı proteinlere veya farklı genlerden üretilen benzer proteinlere verilen addır. Tek bir gen, alternatif promotörler veya alternatif ekleme yoluyla farklı proteinler oluşturabilir. Aksine, tek bir orijinal genin duplikasyonu ile ortaya çıkan paralog genler, benzer proteinler üretebilir (Santos et al.,

2023). *C. elegans*'taki ve *Drosophila*'daki FOXO genleri olan daf-16 ve dFOXO,' dan çeşitli izoformlar oluşurken, memelilerdeki FOXO paralogları FOXO1, 3, 4 ve 6 gibi benzer proteinler üretir. FOXO2, FOXO3'ün eşanlamlısı olup FOXO5, balıklardaki FOXO3 ortologudur. İnsanlardaki FOXO izoformları her iki mekanizma yoluyla da üretilmektedir. Paralog FOXO genleri, FOXO1, 3, 4 ve 6 FOXO izoformlarını kodlar ve bu genlerin her biri bu proteinlerin varyantlarını oluşturabilir. İnsan FOXO proteinleri, farklı insan kromozomlarında bulunan dört farklı gen ve bir psödogen tarafından kodlanır. Bu FOXO paralog genleri, FOXO ailesi proteinlerinin işlevlerinin çeşitliliğinden sorumludur. Omurgalılarda erken dönemde iki büyük FOXO gen kopyasının meydana geldiği öne sürülmüştür. İlk duplikasyon, FOXO3/6 ve FOXO1/4'e evrimleşen iki soyun ve ikinci duplikasyon FOXO6, FOXO3, FOXO1 ve FOXO4' ün ortaya çıkmasını sağlamıştır (M. Wang et al., 2009). FOXO3, *C.elegans* daf-16 ve *Drosophila*'nın dFOXO'sunun en yakın ortoloğudur (M. Wang et al., 2009). FOXO6, birçok yapısal anlamda değişikliğe sahip FOXO ailesinin en uzak ve en hızlı evrimleşen üyesidir. Ek olarak, FOXO6 diğer izoformlarda bulunun birkaç düzenleyici mekanizmadan yoksundur. FOXO1, 3 ve 4 sırasıyla FKHR, FKHL1 ve AFX olarak adlandırılmış ve FOXO3, varsayılan psödogen FOXO3b'nin varlığı nedeniyle FOXO3A olarak adlandırılmıştır, FOXO3b lokusunun sitozolde sürekli olarak yerleşmiş, DNA bağlama aktivitesi olmayan bir protein kodladığı gösterilmiştir (Santo & Paik, 2018).

Tablo 1. FOXO İzofomları (Link, 2019; Santos et al., 2023).

Gen	Ekson	Kromozom	Varyant Sayısı	Amino Asit Sayısı	Moleküler Ağırlık (kDa)	Lokalizasyon
FOXO1	3	13	4	655	70	Nukleus/Sitozol
FOXO3	4	6	3	673	72	Nukleus/Sitozol
FOXO3b	3	17	4	873	290	Sitozol
FOXO4	3	X	4	505	54	Nukleus/Sitozol
FOXO6	3	1	7	492	61	Nukleus

Farklı insan FOXO genleri farklı FOXO varyantlarını oluşturmaktadır. FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6 sırasıyla insan kromozomları 13, 6, X ve 1'de yer almaktadır. FOXO1, toplamda 140 kb'lık 3 ekzondan oluşur. FOXO3, 4 ekzon ve 3 intron içerir, yalnızca 1,4 kb ve 4,9 kb'lık en büyük ekzonlar 2 ve 3 proteini kodlar (Şekil 1). FOXO4, 3 ekzondan oluşurken, FOXO6'nın genomik yapısı henüz bilinmemektedir. Fakat fare FOXO6, 18 kb uzunluğunda bir intronla bölünen iki olası ekzon içermektedir (Jacobs et al., 2003). İnsan FOXO3b kromozom 17'de yer alır ve FOXO3'ün 2-4 ekzonlarını içerir. Tablo 1, FOXO paralog türevi izoformların özelliklerini özetlemektedir.



Şekil 1. FOXO varyantlarını kodlayan proteinin intron-ekson yapısı.

- (1) ENST00000379561.6 (FOXO1-201); (2) ENST00000343882.10 (FOXO3-201);
(3) ENST00000406360.2 (FOXO3-202); (4) ENST00000540898.1 (FOXO3-203);
(5) ENST00000341558.3 (FOXO4-201); (6) ENST00000374259.8 (FOXO4-202);
(7) ENST00000641094.2 (FOXO6-202); (8) ENST00000686812.1 (FOXO6-203).

Yıldız işaretleri, FOXO3'teki rs2802292 polimorfizminin konumunu göstermektedir.

Siyah dikdörtgenlerin üzerindeki sayılar, karşılık gelen eksonların boyutunu (bp) ve

beyaz çubukların üzerindeki sayılar, karşılık gelen intronların boyutunu (bp)

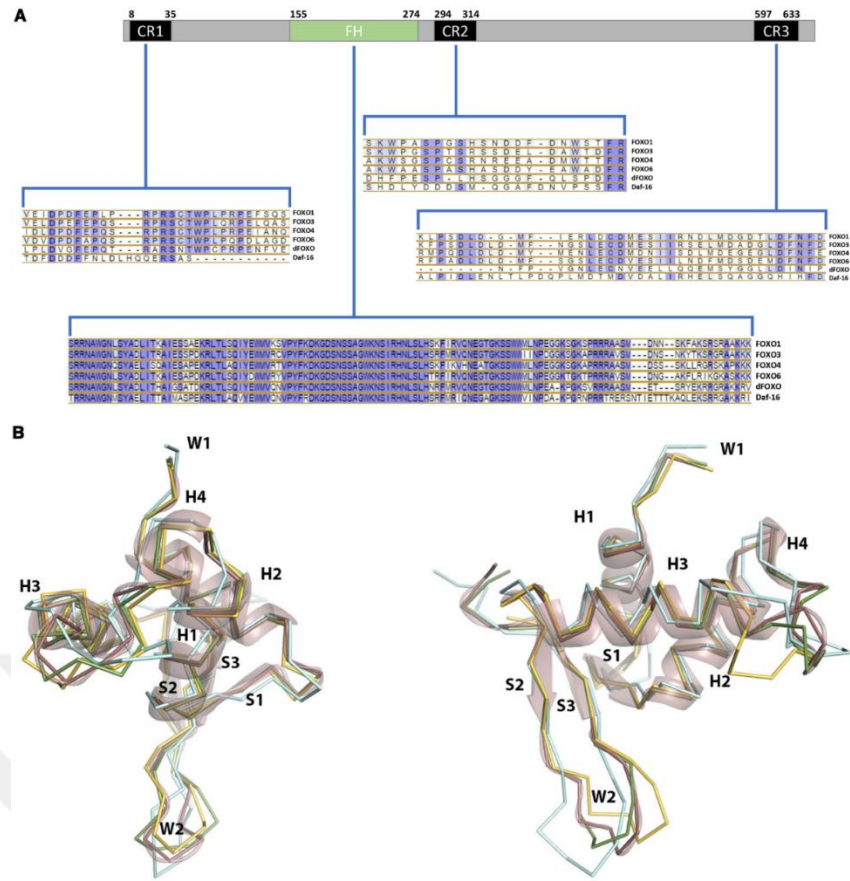
göstermektedir (Santos et al., 2023).

2.1.1 FOXO İzoformlarının Yapısı

FOXO proteinleri, kanatlı-heliks (winged-helix) tipinde bir DNA bağlanma (DBD) domainine sahiptir. Bu domaini, yapılandırılmamış, esnek ve nükleer export dizilerini

(NES'ler) ve bir transaktivasyon domainini (TAD) içeren bir “kuyruk” izler. Forkhead ya da “kanatlı heliks” DNA bağlanma domaini (WHD), FOX protein ailesinin ayırt edici bir özelliğidir (Gajiwala & Burley, 2000). Protein-DNA tanıma motiflerinden olan heliks-dönüş-heliks (HTH) DNA bağlanma domainlerinin bir parçasıdır (ARAVIND et al., 2005). WHD domainleri, diğer HTH benzeri domainlerden ayıran birkaç belirgin yapısal özelliğe sahiptir: HTH motifinin tanıma heliksini çevreleyen iki halka (kanat) ve H2 ile H3 heliksleri arasında daha uzun bir bağlayıcı dizi bulunur (Gajiwala & Burley, 2000). Şekil 2’de, FOXO1 WHD’nin temel yapısal özellikleri gösterilmektedir. Kısa bir N-terminal dizinin ardından, H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 (S: tabaka, H: heliks, W: kanat) sıralamasındaki ikincil yapı elemanlarının katlanmasıyla 3D bir yapı oluşturur. Bu yapı, merkezde yer alan tanıma heliksi H3’ün, H2 ve H3 heliksleriyle yaptığı etkileşimlerle desteklenir. FOXO alt ailesinde, H2-H3 bağlayıcı dizisi genellikle kısmen düzensiz bir α -heliks ya da pek yaygın olmayan bir ikincil yapı olan 3_{10} -heliks konformasyonu alır. Bu durum, H4 heliksi aracılığıyla DNA tanınmasında özgül olmayan etkileşimler yoluyla rol oynayabilir (F. Wang et al., 2008). FOXO alt ailesine özgü bir diğer ayırt edici özellik ise GDSNS dizisine sahip 5 rezidüel bir segmenttir ve bu dizi kısmen H4 heliksiyle örtüşmektedir. Bu segment heliks 3 ve 4 arasında bağlayıcı bir dizi oluşturur ve bu bölgenin oldukça esnek olduğu gösterilmiştir (F. Wang et al., 2008). Esnek olmasına rağmen, W1 halkası W2 halkasından çok daha kararlı bir konformasyona sahiptir. W2 halkası genellikle yapısal deneylerde net olarak gösterilememiş tamamen düzensiz bir konformasyona sahiptir. W1 ve W2 halkaları FOXO-DNA etkileşimlerinin izoform-spesifik şekilde stabilize edilmesine katkıda bulunmaktadır ve W2’nin FOXO1-DNA bağlanması için gerekli olduğu gösterilmiştir. FOXO izoformlarının DNA bağlanma bölgeleri (DBD) arasında yüksek düzeyde dizi benzerliği olmasına rağmen, yapısal ve dinamik farklılıklar gözlenmiştir. Bu farkların, DNA’ya bağlanma özgüllüğünü etkileyebileceği düşünülmektedir. Örneğin, FOXO1 DBD daha kompakt, FOXO4 DBD ise daha geniş bir yapı sergiler. Bu farklar, H1-H3 heliksleri arası hidrofobik çekirdek bölgelerindeki küçük yapı değişikliklerine bağlıdır. Bu farklılıklar, küçük dizi farklılıklarının sonucu gibi görünmekte olup yalnızca DNA bağlanmasını değil, aynı zamanda p53 gibi diğer bağlanma ortaklarıyla etkileşimleri de etkileyebilmektedir. DBD’de görülen yüksek dizi korunumunun aksine ve CR1, CR2 ve CR3 (Şekil 2) olarak adlandırılan üç kısa korunmuş bölge dışında FOXO’ların geri kalan dizileri oldukça farklı olup dizi benzerliği %20’ lere kadar inmektedir. İçeriklerinin %70’inden fazlası düzensiz

formda olan FOXO'lar, içsel olarak düzensiz proteinler (IDP'ler) sınıfına girer (Brent et al., 2008; F. Wang et al., 2015b). Bu, hücrel sinyal iletimi ve kontrolünde önemli düzenleyici roller üstlenen proteinler arasında yaygın bir özelliktir (Gsponer et al., 2008). Ayrıca, TAD domainleri tamamen IDR bölgesi içinde yer alır; bu durum çok sayıda ko-aktivatörle etkileşim kurmalarını sağlar. Diğer IDP'lerde olduğu gibi, FOXO'nun düzensiz bölgeleri özgün partnerlere bağlandıklarında düzenli konformasyonlar kazanabilir. FOXO3'ün CR2C ve CR3 bölgelerinden oluşan bir füzyon peptidinin, CREB-bağlayıcı protein (CBP) ile bağlandığında helikal bir konformasyon aldığı gösterilmiştir, oysa bu bölgeler bağlanmamış durumda muhtemelen düzensizdir (F. Wang et al., 2012). Deneysel NMR yapıları, CR2C-CR3'nin CBP'ye bağlanmasında iki farklı mod olduğunu göstermiştir: Bu modlardan birinde CR2C, diğerinde ise CR3 yapı kazanmaktadır. FOXO3'te, DBD ile CR3 arasındaki bölgenin esnekliği, p53 ile etkileşim açısından kritik öneme sahiptir. FOXO3'ün hem DBD hem de CR3 aracılığıyla p53'ü "kavradığı" belirlenmiştir (F. Wang et al., 2008). Bu bölgedeki dizi değişkenliği, FOXO izoformları arasında p53'e olan bağlanma affinitesinde farklılıklara yol açabilir. FOXO4 izoformunda, CR3 bölgesinin DNA bağlanma bölgesi (DBD) ile etkileşerek kendi aktivitesini baskıladığı bir oto-inhibisyon mekanizması tanımlanmıştır ve bu bağlanma sırasında CR3'ün alfa-heliks konformasyonu kazandığı gösterilmiştir (Bourgeois et al., 2021). FOXO6'da, CR2 bölgesine ait nükleer export sinyalinin eksikliği, FOXO6'nın sitoplazmaya taşınmasını engelleyebilir (Bourgeois et al., 2021) ve bu durum, onu en farklı izoform yapan özelliklerden biridir. FOXO'ların düzensiz bölgeleri, çeşitli bağlanma tiplerine olanak sağlayarak bağlanma partnerlerinin çeşitliliğini artırabilir. Ayrıca, FOXO'ların düzensiz bölgelerindeki farklı post-translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler), bağlanma ortaklarına karşı olan affinitelerini düzenleyebilir. Bu durum, "FOXO kodu" olarak tanımlanmıştır (Calnan & Brunet, 2008).



Şekil 2. FOXO dizi hizalamaları ve yapıları.

A) FOXO dizi hizalamaları ve korunmuş CR1, CR2, CR3 ve Forkhead DNA bağlanma domaini. B) FOXO1 (PDB 3c06, pembe), FOXO3 (PDB 2uzk, camgöbeği), FOXO4 (PDB 3l2c, sarı) ve FOXO6 (AlphaFold 2 modeli, yeşil) yapılarının hizalanması (Santos et al., 2023).

2.1.2 FOXO İzoformlarının Düzenlenmesi

FOXO proteinlerinin aktivitesi büyüme faktörlerine bağlı PI3K/AKT yolu ve hücrel stres sinyalleme ile düzenlenmektedir. FOXO'lar esas olarak, fosforilasyon, asetilasyon, mono- ve poliubikitinasyon, metilasyon, glikozilasyon ve nitrozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarla (PTM'ler) düzenlenir. Tablo 2, her FOXO izoformu için PTM profilini göstermektedir. Bu PTM'ler, FOXO'nun konformasyonunu değiştirerek belirli protein partnerlerine bağlanmasını sağlayan motiflerin oluşmasına yol açabilir ve bu şekilde FOXO proteinlerinin aktivitesini aktive edebilir veya baskılayabilir.

2.1.2.1. İnsülin ve Diğer Büyüme Faktörleri Varlığında FOXO Düzenlenmesi

İnsülin ve birçok diğer büyüme faktörünün varlığında, kanonik düzenleyici AKT, nükleusta bulunan FOXO proteinlerini üç korunan RxRxxS/T motifinde fosforile eder. RxRxxS/T, protein dizilerinde sık görülen ve kinazlar tarafından tanınan bir konsensüs fosforilasyon motifidir. Bu motif, özellikle AKT (Protein Kinase B) gibi kinazlar tarafından tanınır ve hedef proteinleri fosforile etmek için kullanılır. Burada R arjinin, x herhangi bir amino asit, S/T serin veya treonin anlamına gelmektedir. AKT, FOXO1'i Thr24, Ser256 ve Ser319'da, FOXO3'ü Thr32, Ser253 ve Ser315'te, FOXO4'ü ise Thr28, Ser193 ve Ser258'de fosforile eder. Bu kovalent modifikasyonlar, şaperon protein 14-3-3 için bir bağlanma yeri oluşturarak, CRM1 aracılı FOXO proteinlerinin nükleus dışına taşınmasını sağlar (Ferreira et al., 2020) ve böylece FOXO' nun hedef genleri düzenlemesini engeller. JNK, MST1 ve AMPK gibi stres yanıtına dahil olan bazı kinazların FOXO proteinlerinin aktivitesini artırabildiği bilinmektedir (Brown & Webb, 2018). FOXO6, yalnızca iki korunan AKT fosforilasyon bölgesine sahiptir (Thr26 ve Ser184) ve C-terminaldeki korunan motiften yoksundur. Ayrıca, CK1 ve DYRK1A gibi kinazlara özgü fosforilasyon bölgeleri de FOXO6'da bulunmaz. AKT tarafından fosforilense bile, FOXO6'nın aktivitesi baskılanır fakat nükleustan dışarı taşınmaz (van der Heide et al., 2005). Büyüme faktörleri, FOXO' ları yalnızca post-translasyonel olarak değil, aynı zamanda transkripsiyon düzeyinde de düzenleyebilir. Örneğin, büyüme faktörlerinin yokluğu FOXO1, FOXO3 ve FOXO4'ün mRNA düzeylerini azaltabilir (Essagher et al., 2009). Uyarıların şiddetine bağlı olarak FOXO1, FOXO3 ve FOXO4 geçici olarak sitoplazmada tutulabilir ve yeni protein sentezine ihtiyaç duyulmadan tekrar aktif hale gelebilir veya uzun süreli insülin sinyali durumunda ubiquitinlenip proteozomla yıkılabilir (Calnan & Brunet, 2008).

2.1.2.2. Stres Koşullarında FOXO Düzenlenmesi

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması, besin yoksunluğu veya DNA hasarı gibi durumlar FOXO' ları aktive ederek hücresel homeostazı yeniden sağlamalarını tetikler (Calnan & Brunet, 2008). Farklı uyarılar, FOXO'larda farklı PTM'ler oluşturarak, FOXO'nun nükleer seviyesini ve transkripsiyonel aktivitesini düzenlemektedir. FOXO1 ve FOXO3'ün nükleer taşınım dinamikleri uyarana bağlıdır (Lasick et al., 2023). Örneğin H₂O₂ ile oksidatif stres, doz bağımlı “ya hep ya hiç” tepkisiyle hücre ölümüne, serum yoksunluğu FOXO proteinlerinin nükleusa daha zayıf ve aralıklı sinyallerle taşınmasına ve bu durum da genellikle hücre döngüsünün durmasına sebep olmaktadır. Sistein amino asiti protein yapısını ve işlevini geri dönüşümlü olarak

değiştirerek redoks sinyallemede önemli bir rol oynar. FOXO1 7, FOXO3 ve FOXO4 5, FOXO6 ise yalnızca 4 sistein içerir. Bu sisteinlerin yalnızca ikisi tüm FOXO izoformlarında ortaktır. CDK4 kinazı ve transkripsiyon aktivatörü p300, bu ortak sisteinlere bağlanabilirken, izoform-spesifik sisteinler farklı proteinlerle etkileşime girer. FOXO3 ve FOXO4'ün redoks sinyallemesiyle izoform-spesifik olarak düzenlenir. FOXO3, importin-7 (IPO7) ve importin-8 (IPO8) ile disülfid bağına dayalı heterodimer oluşturarak, ROS aracılı nükleer taşınımını sağlar (Putker et al., 2015). Buna karşılık, FOXO4'ün transportin-1 (TNPO1) ile disülfid bağına dayalı etkileşimi, FOXO4'ün nükleus içine taşınması ve aktivasyonu için gereklidir (Putker et al., 2013).

2.1.2.3. Düşük Enerji Koşullarında FOXO Düzenlenmesi

Düşük enerji düzeylerinde, AMPK, FOXO3'ü 6 farklı bölgede (T179, S399, S413, S555, S588 ve S626) fosforile ederek aktivitesini artırabilir. Ser413 çevresindeki motif yalnızca FOXO3 ve FOXO4'te bulunurken, Ser588 motifini ise yalnızca FOXO3 ve FOXO1 paylaşır. AMPK diğer FOXO izoformlarını da fosforileyebilse de, bu bölgeler tamamen korunmamıştır. Bu nedenle, FOXO3 AMPK'nın birincil hedefi gibi görünmektedir (Greer et al., 2007).

2.1.2.4. Metilasyon ve Diğer PTM'ler ile FOXO Düzenlenmesi

FOXO proteinlerinin aktivitesi, arginin ve lizin yan zincirlerine metil grubu eklenmesiyle de düzenlenebilir. Protein arginin metiltransferaz 1 (PRMT1), FOXO1'i Arg248 ve Arg250'de metilleyerek aktivasyonuna sebep olur. PRMT1, FOXO3 ile etkileşime girse dahi onu metilleyemez fakat PRMT1 yokluğunda, PRMT6 FOXO3'ü Arg188 ve Arg249'da metilleyerek aktive eder. Aksine PRMT6, FOXO1 ile etkileşime geçse dahi metilasyon gerçekleştiremez. FOXO3'teki üç potansiyel metilasyon bölgesinden yalnızca biri FOXO1'de korunmaktadır ve bu da, argininlerin farklı PRMT'ler tarafından seçici olarak modifiye edilmesini açıklayabilir (Choi et al., 2019). FOXO izoformları arasında iki adet yüksek oranda korunmuş asetillenmiş lizin bölgesi bulunur; bir tanesi daha az korunmuşken geri kalan bölgeler izoform-spesifiktir ve bu durumun izoform-spesifik düzenlenmeye katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, korunmuş bölgeler farklı enzimler tarafından düzenlenebilir. FOXO1'deki korunan Lys273, G9a tarafından metillenirken, FOXO3'teki Lys270/271, Set9 tarafından metillenir (Choi et al., 2019).

2.1.2.5. Partner Proteinlerle Etkileşimler Aracılığı ile FOXO Düzenlenmesi

FOXO'ların transkripsiyonel aktivitesi büyük ölçüde bağlanma ortaklarıyla etkileşimlerine bağlıdır. Bu ortak düzenleme, FOXO'nun DNA'ya doğrudan bağlanmasından bağımsız olarak, transkripsiyonel sinerji, kofaktörlerin toplanması, proteolitik yıkım, transkripsiyon faktörü sekestrasyonu veya düzenleyici kofaktörlerin yer değiştirmesi yoluyla meydana gelebilir. Bu etkileşimler hem bağlanma partnerlerinin mevcudiyetine hem de izoform farklılıklarına bağlı olabilir. Her FOXO izoformu, Forkhead DNA bağlanma domeninin C-terminalinde yer alan LxxLL motifine sahip olsa da, bu motifin çevresindeki bölgeler farklılık gösterir. Bu motif, *Drosophila melanogaster*'deki dFOXO ve *C. elegans*'taki daf-16'da bulunmamaktadır. İnsan FOXO izoformlarındaki LxxLL motifinin nükleer hormon reseptörleriyle etkileşimde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu motifin izoforma özgü farkları, FOXO'ların çeşitli nükleer hormon reseptörleriyle seçici etkileşimlerini belirleyebilir (van der Vos & Coffey, 2008).

2.1.2.6. Post-transkripsiyonel Düzeyde FOXO Düzenlenmesi

FOXO aktivitesi aynı zamanda post-transkripsiyonel düzeyde de düzenlenebilir. miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'-UTR bölgelerine bağlanarak RNA yıkımını tetikleyebilir ya da translasyonu baskılayabilir ve birçok insan hastalıklarında bu işlev düzensizdir (Dwivedi et al., 2019). FOXO izoformları arasındaki DBD dışı bölgelerde dizi benzerliği düşük olduğundan, bu izoformları düzenleyen miRNA'lar arasında çok az örtüşme bulunmaktadır. Yalnızca hsa-miR-146a-5p dört FOXO izoformunu hedefler. Dahası, hücresel bağlama bağlı olarak, aynı farklı işlevsel sonuçlara yol açabilir. Örnek olarak miR-27a, FOXO3'ü hedef alarak, glioblastoma hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu teşvik edebilir (Ge et al., 2013) veya travmatik beyin hasarından sonra nöronal otofajiyi baskılayabilir (Sun et al., 2017). Post-transkripsiyonel düzenleme aynı zamanda RNA bağlayıcı proteinler aracılığıyla da meydana gelebilir. FOXO1 RNA'da, HuR (Human antigen R) bağlayıcı bölgeler 3'-UTR ve intronik bölgelerde bulunurken, FOXO3'te bu bölgeler intronik bölgelerle sınırlıdır. HuR, RNA işlenmesinde, düzenlenmesinde ve stabilitesinde rol oynar. Hücresel stres üzerine, HuR, FOXO1 mRNA'yı stabilize ederek protein seviyesini arttırmaktadır (Urbánek & Klotz, 2017).

2.1.2.7. Oto-düzenleyici Mekanizmalarla FOXO Düzenlenmesi

FOXO faktörleri kendi ifadelerini kontrol edebilir. FOXO1 kendi ifadesini indükleyebilirken, FOXO3, FOXO1 ve FOXO4'ün mRNA seviyelerini

arttırabilmektedir. FOXO1 promotörü, bu pozitif geri bildirim döngüsünde yer alan korunmuş bir FOXO bağlanma bölgesi içerirken, FOXO4'te böyle bir korunmuş bağlanma bölgesi yoktur. Hem FOXO1 hem de FOXO3, kanonik inhibitörleri olan AKT' ı mTORC1 inhibisyonu ve mTORC2 aktivasyonu yoluyla indükleyerek hücrel enerji homeostazının korunmasına katkıda bulunabilir (Chen et al., 2010; X. Zhang et al., 2014).

Tablo 2. FOXO izoformları ve post-translasyonel modifikasyonları. (Santos et al., 2023)

Protein Adı	FOXO1	FOXO3	FOXO4	FOXO6
Akt1	T24, S256, S319	T32, S253, S315	T32, S197, S262	T26, S184
AKT2		T32, S253, S315	T32, S197	
AKT3		T32, S253, S315		
AMPKA1	S22, T649	T179, S399, S413, S555, S588, S626		
AMPKA2		T179, S399, S413, S555, S588, S626		
CDK1	S249			
CDK2	S249, S298			
CDK4	S249			
CDK5	S249			
CK1A	S322, S325	S318, S321	S265, S268	
DYRK1A	S329	S330		
ERK1		S12, S294, S344, S425		
ERK2	S246, S413, S418, S429, S470, T478, T560	S12, S294, S344, S425		
IKKA		S644		
IKKB		S644		
IKKE		S644		

JNK1		S574	T227, S230, T451, T455	
JNK2			T451, T455	
MST1	S212, S218, S234, S235	T179, S209, S215, S231, S232, S243		
NLK	S329			
P38A	S416, S432, S470, T478, T560	S7, S12, S294, S344, S425		
Pim1	T24, S256, S319	T32, S253		
PKACA	S153, S276			
SGK1		T32, S253, S315		
SGK2		T32, S253		
SGK3		S315		
PPP2CA		T32, S253		
PRMT1	R251, R253			
p300	K245, K248, K262, K265		K186, K189, K407	
HDAC1			K186, K189, K407	
SIRT1		K242, K259, K290, K569	K189	
SIRT2	K245, K248, K262, K265	K259, K290, K569		
SIRT5		K271, K290		
SIRT7		K242, K259, K290, K569		

2.1.3 FOXO3A

FOXO3A bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmaktadır ve FOXO3A, anormal şekilde aktive olmuş AKT tarafından FOXO3A'nın inhibisyonu lösemi, karaciğer, meme ve prostat kanserlerinde rol oynamaktadır (Y. Liu et al., 2018). Farelerde somatik FOXO genlerinin silinmesi, timik lenfoma ve hemanjiyoma sıklığında artış

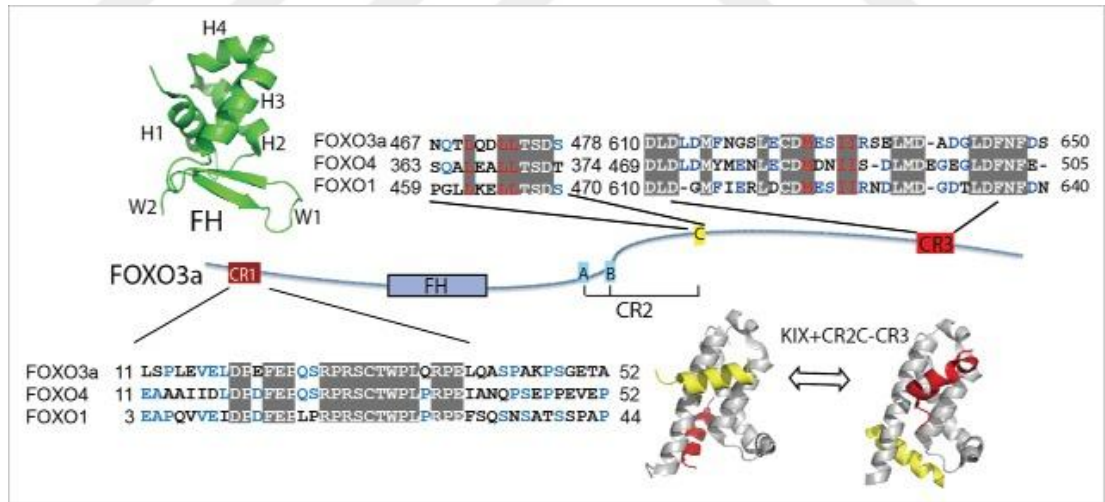
ile kanser eğilimli fenotiplere yol açmıştır (Paik et al., 2007). FOXO3A; apoptoz, hücre döngüsünün durdurulması, hücre farklılaşması ve stres direnci gibi süreçlerde görevli genlerin (örneğin Bim, PUMA, cyclin G2 vb.) ekspresyonunu düzenler (M. Li et al., 2006; You et al., 2006). FOXO3A aktivitesi, IKK β , ERK ve PI3K/AKT gibi çeşitli onkojenik sinyal yolları tarafından olumsuz yönde düzenlenir. Öte yandan, bazı kolon kanseri hücrelerinde FOXO3A, sisplatin ilaç direncinin gelişiminde rol oynar (Fernández de Mattos et al., 2008). Ayrıca, kronik miyelojenik lösemi (KML)'de aktive FOXO3A, lösemi başlatıcı hücreleri Imatinib tedavisine karşı korur; bu durum, muhtemelen FOXO3A'nın stres direnci fonksiyonuyla ilgilidir (Naka et al., 2010). Dahası, FOXO3A farklı uyarıcılara karşı çeşitli rollere sahiptir ve bu proteinin düzensizliği, birçok hastalığın gelişimi ile ilişkilidir. İn vitro ve in vivo fonksiyonel çalışmalara ek olarak, biyokimyasal ve yapısal karakterizasyondan elde edilen yapısal bilgiler, FOXO3A, iyi tanımlanmış 3D konformasyonlardan yoksun olan ancak geçici olarak birden fazla konformasyon sergileyebilen içsel olarak düzensiz bölgeler (IDR'ler) açısından oldukça zengindir. FOXO3A dizisinin yaklaşık %75'inin IDR içerdiği tahmin edilmekte olup, içsel olarak düzensiz bir protein (IDP) olarak kabul edilir (F. Wang et al., 2008).

2.1.4. FOXO3A'nın Yapısı

FOXO3A proteini, FOX ailesine ait tüm proteinlerde olduğu gibi yaklaşık 100 amino asit uzunluğunda, DNA bağlayıcı forkhead (FH) domainine sahip ve 673 amino asitlik bir proteindir. Bu domain, “winged-helix” (kanatlı heliks) adı verilen bir yapıyı oluşturur ve FOXO3A'nın N-terminal bölgesinde yer alır (Ward et al., 2004). FH, DNA'ya bağlayıcı domainidir ve üç α -heliks (H1–H3), üç β -zincirli antiparalel bir yaprak ve iki büyük düzensiz döngüden (kanatlar: W1 ve W2) oluşur (Clark et al., 1993). FOXO alt ailesine özgü olan ve diğer FOX proteinlerinden farklılaşmasını sağlayan en belirgin yapısal özellik, bu bölgede yer alan “GDSNS” adlı 5 amino asitlik bölgedir. Ayrıca bu domain, 5'-(G/C/A)(T/C/A)AAA(T/C)A-3' dizisine sahip özgül DNA motiflerini tanır; bu diziler "Forkhead response element (FRE)" olarak adlandırılır (Pierrou et al., 1994). Yapısal çalışmalar, heliks H3'ün DNA'nın majör oluşuna dik bir şekilde yerleşerek bağlandığını ve Wing 1'in DNA'nın fosfat omurgasıyla temas ettiğini göstermiştir (Tsai et al., 2007). FH domaininin DNA'ya bağlanması sırasında genel yapısında belirgin bir değişiklik gözlenmez.

FOXO3A'nın geri kalan kısmı, birincil dizi analizine göre büyük oranda intrinsik olarak düzensiz bölgelerden (IDR) oluşur. Ancak bu düzensiz yapı içinde, FOXO alt ailesi üyeleri arasında korunan üç bölge (CR1, CR2 ve CR3) bulunur ve bu bölgelerin transaktivasyon domenlerini (TAD) oluşturduğu düşünülmektedir (F. Wang et al., 2012). FOXO3A'daki IDR'ler içerisinde yer alan korunan CR1-CR3 bölgeleri çözeltide yapısızdır; ancak dairesel dikroizm (CD) spektroskopisiyle elde edilen verilere göre helikal yapılar oluşturma eğilimindedirler (F. Wang et al., 2012). CR1 prolin açısından zengin bir bölge iken, CR2 üç kısa parçaya (CR2A, B ve C) ayrılır. CR2C ve CR3 bölgeleri, $\Phi\text{xx}\Phi\Phi$ motiflerini içerir ve bu bölgelerin TAD oldukları belirlenmiştir (F. Wang et al., 2012).

FOXO3A'nın genel yapısı, rijit bir “baş” (FH domaini) ve ardından gelen esnek bir “kuyruk” şeklinde tanımlanabilir (Şekil 3). FH domainine ek olarak, protein boyunca uzanan N-terminaldeki esnek bölgenin de DNA bağlanmasına katkı sağladığı bazı biyokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir, ancak bu bölge çoğu kristal yapıda bulunmamaktadır (Boura et al., 2007). Genel olarak, FOXO3A proteini, DNA ile etkileşim kurarken hem sabit hem de esnek yapısal özellikleri bir arada taşıyan çok yönlü bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir.



Şekil 3. İnsan FOXO3A'nın yapısı.

FOXO3A'nın domain mimarisi, iyi katlanmış bir Forkhead (FH) DNA bağlayıcı domaini ile birlikte CR1, CR2C ve CR3 olmak üzere 3 korunaklı bölge içerir. CR1, CR2C ve CR3 bölgelerinin dizi hizalamaları, korunmuş amino asitler gri kutularla vurgulanarak gösterilmiştir. FH domainine ait çözelti yapısı (PDB: 2K86) üstte yer almaktadır ve ikincil yapı elemanları etiketlenmiştir. CBP'nin KIX domainine

bağlanmış CR2C ve CR3'ün iki farklı yapısal durumu (PDB: 2LQI ve 2LQH) altta gösterilmiştir; burada CR2C sarı, CR3 ise kırmızı renkte gösterilmiştir.

2.1.5 FOXO3A' nın Düzenlenmesi

FOXO3A, hücre kaderinin belirlenmesinde merkezi bir rol oynar ve zıt hücreyel sonuçlara neden olabilmektedir. Büyüme faktörleri, metabolik stres ve oksidatif stres gibi çeşitli hücre içi uyarılardan sinyal alır ve bu sinyalleri, protein-protein etkileşimlerini ve gen ekspresyonunu modüle edecek yanıtlara dönüştürür. Bu süreçler, fosforilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon gibi geri dönüşümlü post-translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) tarafından düzenlenir. Bu modifikasyonlar FOXO3A'nın kararlılığı, hücre içi konumu, DNA'ya bağlanma kapasitesi ve transaktivasyon yeteneği üzerinde etkiler gösterebilir.

FOXO3A'nın intrinsik olarak düzensiz bölgeleri (IDR), PTM bölgeleri açısından oldukça zengindir. Belirgin bir yapısı olan domainlere kıyasla, IDR'lerin esnekliği ve konformasyonel değişkenliği PTM enzimleri için daha kolay erişilebilirlik sağlar; bu nedenle modifikasyonlar sıklıkla IDR'lerde gerçekleşir. Yaklaşık 500 amino asitlik FOXO3A IDR'si çok sayıda PTM bölgesi içerir ve tek bir FOXO3A molekülü aynı anda birçok bölgeden modifiye olabilir. Bu PTM kombinasyonlarının FOXO proteinleri için kritik olması nedeniyle bu durum, histon proteinlerinde gözlenen "histon kodu"na benzer şekilde "FOXO kodu" olarak adlandırılmıştır (Calnan & Brunet, 2008).

2.1.5.1. Fosforilasyon

FOXO3A genellikle Akt kinazı tarafından gerçekleştirilen fosforilasyon yoluyla düzenlenir ve bu modifikasyonlar özellikle hücre içi konum üzerinde etkilidir. PI3K yolunun aktivasyonu, insülin, IGF, EGF ve eritropoietin gibi birçok uyarı ile başlatılabilir. Bu sinyaller Akt'ı aktive eder (Arden, 2006); Akt, FOXO3A'nın IDR'sindeki üç korunan bölgeyi (T32, S253, S315) fosforile ederek onu inaktive eder. Fosforile edilen T32 ve S253, 14-3-3 proteinleri için bağlanma bölgeleri oluşturur; bu da FOXO3A'nın nükleus dışına taşınmasını sağlar ve transaktivasyon işlevini engeller (Brunet et al., 1999). S253 fosforilasyonu ve 14-3-3 bağlanması, DNA bağlanmasını da engelleyerek transkripsiyonel aktiviteyi azaltır. PI3K yolunun diğer bir hedefi olan SGK (Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase)'da benzer bölgeleri fosforile etmektedir. SGK, T32 ve S315 üzerinde etkiliyken, Akt S253'ü daha etkin fosforiler (Brunet et al., 2001). S315'in fosforilasyonu, FOXO3A'nın Casein Kinase 1 (CK1)

tarafından daha ileri fosforilasyona hazır hale gelmesini sağlar. Bu fosforilasyon sitoplazmik tutulumun hızlanmasına neden olur (Rena, 2002). DYRK1A kinazı da FOXO3A'yı fosforile ederek sitoplazmik translokasyona katkıda bulunur (WOODS et al., 2001). Bu fosforilasyona bağlı sitoplazmik taşınım, FOXO3A IDR'lerinde bulunan nükleer export dizisine (NES) RanGTPaz ve CRM1'in bağlanmasıyla gerçekleşmektedir (van der HEIDE et al., 2004). Aksine, bazı fosforilasyonlar nükleusa taşınmayı teşvik edebilir. Örneğin FOXO4'ün JNK tarafından fosforilasyonu nükleusa taşınımını sağlar (Essers et al., 2005). Bu özgül fosforilasyon bölgeleri FOXO3A'da korunmuş olmasa da, JNK'nın FOXO3A'yı fosforilasyondan bağımsız biçimde nükleusa taşıdığı da gösterilmiştir (Clavel et al., 2010). MST1 tarafından yapılan fosforilasyon ise 14-3-3 proteininin bağlanmasını engelleyerek FOXO3A'nın nükleusa geri dönmesini sağlar (Lehtinen et al., 2006). AMPK fosforilasyonu, DNA bağlanmasını veya konumunu değiştirmeden transkripsiyonel aktiviteyi artırabilir (Greer et al., 2007). Erk ve Ikk β tarafından yapılan fosforilasyon ise FOXO3A'nın yıkımını tetikler (J.-Y. Yang et al., 2008). Fosforilasyon geri dönüşümlü bir süreçtir. PP2A fosfatazı FOXO3A'nın fosfatlarını kaldırabilir (Singh et al., 2010). Ayrıca sisplatin gibi bazı anti-kanser ilaçları, FOXO3A'nın defosforilasyonunu indükler (Shiota et al., 2010).

2.1.5.2. Asetilasyon

FOXO3A'nın transkripsiyonel işlevi, asetilasyon ile de düzenlenir. CBP ve p300 gibi transkripsiyonel ko-aktivator proteinler, histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesine sahiptir ve FOXO3A dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörünü asetilleyebilir (Fukuoka et al., 2003; Gu & Roeder, 1997). CBP/p300 tarafından FOXO3A'nın asetillenmesi, DNA'ya bağlanmasını azaltarak negatif geri besleme mekanizması oluşturur (Shiota et al., 2010; van der Heide & Smidt, 2005). EPO (eritropoietin) veya SCF (Stem cell factor) kaynaklı T32 fosforilasyonu ise asetilasyonu engeller. Asetilasyon bölgeleri FH domainine yakın konumlardadır. Bu bölgelerdeki lizinin asetillenmesi, DNA'ya bağlanma yeteneğini azaltarak transkripsiyonel aktiviteyi düşürür (Matsuzaki et al., 2005; Tsai et al., 2007). Ancak bazı çalışmalar, FOXO3A asetilasyonunun bazı gen gruplarının transkripsiyonunu artırabileceğini göstermiştir (Brunet et al., 2004). Fosforilasyon gibi asetilasyon da geri dönüşümlü bir süreçtir. Histon deasetilazlar (HDAC)'lar, Sirt1 ve Sirt2 gibi deasetilazlar, asetil gruplarını uzaklaştırabilir (Salminen et al., 2013). Sirt1, FOXO3A'nın CR2C bölgesindeki LXXLL motifi üzerinden bağlanır (Nakae, 2006). Deasetilasyonun etkisi hücre tipine

ve gen grubuna bağılı olarak transkripsiyonu artırabilir ya da azaltabilir (van der HEIDE et al., 2004). Genel olarak, FOXO3A asetilasyonunun hücre hayatta kalımını desteklediğı düşünülürken, SIRT1 aracılığıyla deasetilasyonun otofajiyi teşvik ettiğı gösterilmiştir (Hariharan et al., 2010). Bu nedenle FOXO3A, CBP/p300 ve Sirt1 arasındaki etkileşim, FOXO3A'nın işlevini IDR bölgeleri üzerinden hassas biçimde düzenlemektedir.

2.1.5.3. Ubikitinasyon

FOXO3A'nın yıkımı ubiquitinasyon ile doğrudan kontrol edilir. IKK β ve RAS-ERK yolları, FOXO3A'nın MDM2 aracılığıyla poli-ubikitinlenmesini ve proteozomla yıkımını teşvik eder (J.-Y. Yang et al., 2008). MDM2, FOXO3A ile hem in vitro hem in vivo olarak etkileşime girmektedir. Bu etkileşimde FH domaini gereklidir fakat ubiquitin bağlanma yerleri henüz netleştirilmemiştir. Ayrıca, Sirt1 veya Sirt2 tarafından FOXO3A'nın deasetilasyonu, Skp2 aracılığıyla ubiquitinlenmesini ve proteozomal yıkımını teşvik etmektedir (Fu et al., 2009). Mono-ubikitinasyon, poli-ubikitinasyondan farklı olarak geri döndürülebilir bir süreçtir. Mono-ubikitinasyonun uzaklaştırılması (deubikitinasyon) ise herpesvirüs ile ilişkili ubiquitin-spesifik proteaz (HAUSP) tarafından gerçekleştirilir ve bu mekanizma stres yanıtları için önemlidir (van der Horst et al., 2006).

2.1.5.4. Diğer Modifikasyonlar

FOXO3A ayrıca metilasyon ve glikozilasyon (özellikle O-GlcNAc) gibi post-translasyonel modifikasyonlara da uğrar (Housley et al., 2008). Örneğin, K271'in Set9 tarafından metilasyonu FOXO3A'nın stabilitesini azaltırken, transkripsiyonel aktivitesini hafifçe arttırmaktadır. FOXO1'in O-GlcNAc ile modifiye olduğu gösterilmiştir ve bu modifikasyonun glukoneogenez ve antioksidan genlerin aktivasyonunu artırdığı düşünülmektedir. FOXO1 ayrıca poli(ADP-ribosil)asyon geçirebilir ancak bunun FOXO3A için geçerli olup olmadığı net değildir (Sakamaki et al., 2009). FOXO3A'nın birçok PTM'i birbiriyle etkileşime girer ve birlikte çalışabileceğı gibi rekabet de edebilir. Bu nedenle "FOXO kodunun" çözülmesi, FOXO3A'nın fonksiyonel mekanizmalarının daha iyi anlaşılması açısından kritik öneme sahiptir (Calnan & Brunet, 2008). Tablo 3' te FOXO3A'nın uğradığı post translasyonel modifikasyonlar özetlenmiştir.

Tablo 3. FOXO3A Post Translasyonel Modifikasyonları. (F. Wang et al., 2015a)

Modifikasyon Enzimi	Modifikasyon Bölgesi	Modifikasyon Tipi	Etki
Akt/PKB	T32, S253, S315	Fosforilasyon	Translokasyon
AMPK	T179, S399, S413, S555, S588, S626	Fosforilasyon	Transkripsiyon
CK1	S317, S320	Fosforilasyon	Translokasyon
DYRK	S324	Fosforilasyon	Translokasyon
ERK	S294, S344, S425	Fosforilasyon	Degradasyon
Erythropoietin	T32	Fosforilasyon	Transkripsiyon
IKK β	S644	Fosforilasyon	Degradasyon
MST1	S207, S213, S299, S230	Fosforilasyon	Translokasyon
SCF	T32	Fosforilasyon	Transkripsiyon
SGK	T32, S319	Fosforilasyon	Translokasyon
CBP/p300	K242, K245, K259	Asetilasyon	Transkripsiyon
PCAF	K290, K271, K569	Asetilasyon	Transkripsiyon
Sirt1	K242, K245, K262	Deasetilasyon	Transkripsiyon
MDM2	Bilinmiyor	Ubikitinasyon	Degradasyon
Set9	K271	Metilasyon	Transkripsiyon
O-GlcNAc	Bilinmiyor	O-GlcNAc	Transkripsiyon

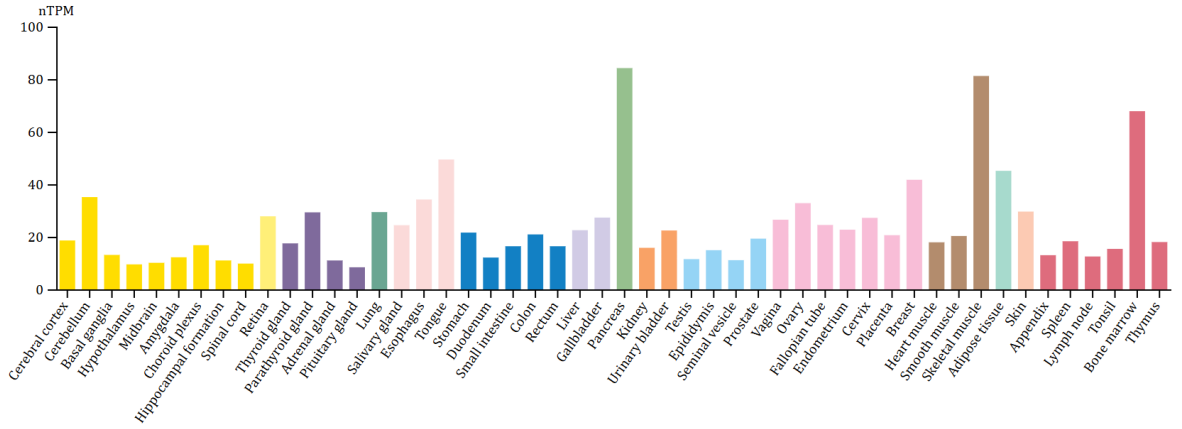
2.1.6 FOXO3A İfadesi

FOXO3 geninin Ensembl kimliği *ENSG00000118689 (version 109)*' dur. AF6q21, FKHRL1, FOXO2 ve FOXO3A gibi çeşitli isimlerle de bilinir. FOXO3A, kanser ile ilişkili genler, hastalıkla ilişkili genler ve transkripsiyon faktörleri sınıflarına dâhil edilmiştir. Proteinin varlığı deneysel olarak doğrulanmış olup Human Protein Atlas (HPA) veritabanında “protein düzeyinde kanıt” statüsündedir. Ensembl ve HPA

verilerine göre FOXO3A geninin řu ana kadar 3 adet protein kodlayan transkripti (izoformu) tanımlanmıştır. Bu izoformlar, aynı genden türemekle birlikte ufak farklılıklar içeren protein ürünleri kodlar. Bu transkriptler FOXO3-201, FOXO3-202 ve FOXO3-203 olarak adlandırılmakla birlikte Ensembl kimlikleri sırasıyla ENST00000343882.10, ENST00000406360.2 ve ENST00000540898.1 dir. FOXO3-201 ve FOXO3-202 673 aminoasit içermektedir fakat baz çifti sayısı farklıdır. FOXO3-201' nin baz çifti 7308, FOXO3-202' nin 7296' dir. FOXO3-203 ise 453 aminoasitten oluşur, baz çifti sayısı 2553' dür ve Forkhead domain bölgesini bulundurmaz. HPA, mevcut antikörlerin çoğunlukla tüm izoformları bir arada tanıdığını belirtmektedir. Dolayısıyla yukarıda anlatılan ekspresyon ve lokalizasyon verileri, FOXO3A proteininin toplamını temsil eder ve izoformlar arasında belirgin bir dokuya özel dağılım rapor edilmemiştir. Ancak ileri araştırmalarda farklı FOXO3A izoformlarının spesifik işlev veya lokalizasyon farklılıkları olabileceğı göz ardı edilmemelidir.

2.1.6.1 Normal Dokularda FOXO3A Ekspresyonu

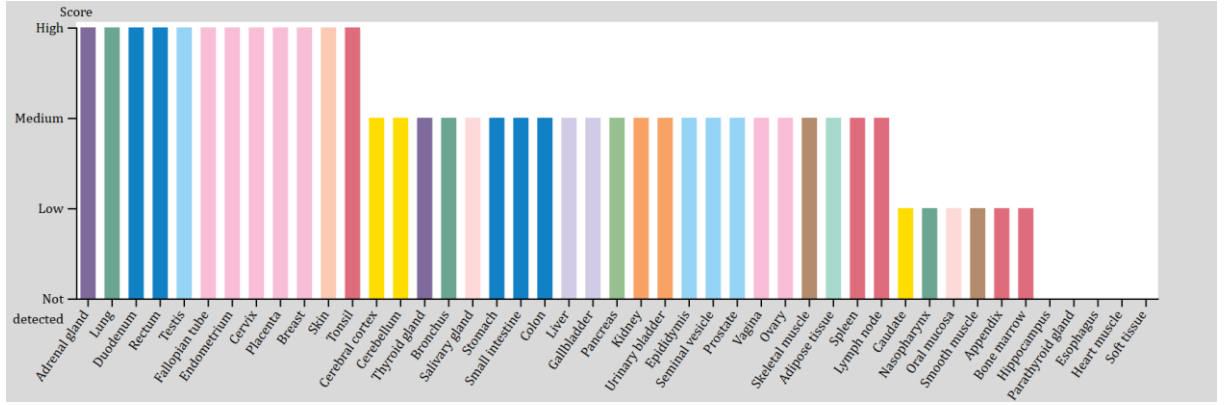
HPA RNA verilerine göre FOXO3A geni düşük doku spesifitesine sahiptir; yani belirli bir dokuya özgü olmayıp çoğı dokuda benzer düzeylerde ifade edilir. FOXO3A mRNA'sı insan vücudundaki tüm ana dokularda tespit edilmiştir. Bununla birlikte, ekspresyon seviyeleri dokular arasında küçük farklılıklar gösterebilir. Örneğın, pankreas, iskelet kası ve kemik iliğı dokularında FOXO3A mRNA miktarı nispeten yüksektir (sırasıyla yaklaşık 84,2, 81,2 ve 67,8 nTPM). Benzer şekilde dil, yağ dokusu ve meme gibi dokular da göreceli yüksek FOXO3A ifadesine sahiptir (dilde 49,4, memede 41,7 nTPM). Buna karşın, karaciğer, timus, dalak gibi dokularda ekspresyon düzeyi bu dokulara göre daha ortalama seviyelerdedir; ancak genel olarak genin transkript düzeyinde her dokuda ifade edildiğı Şekil 4' te görölmektedir. FOXO3A proteininin izoformları da dahil olmak üzere hücre içindeki miktarının bu şekilde yaygın dağılım göstermesi, onun birçok hücre tipi ve dokuda temel biyolojik işlevleri olduğı anlamına gelebilir.



Şekil 4. Normal insan dokularında FOXO3A mRNA ekspresyon düzeyleri (HPA konsensus RNA-seq verilerine göre).

Grafikte, FOXO3A geninin en yüksek düzeyde ifade edildiği bazı dokular gösterilmiştir. Dikey eksen normalleştirilmiş transkript miktarını (nTPM) ifade etmektedir. Pankreas, iskelet kası, kemik iliği ve dil gibi dokular FOXO3A'nın en fazla ifade edildiği normal dokulardandır.

HPA protein atlası verilerine göre, FOXO3A proteini normal dokularda çoğunlukla nükleusta bulunmaktadır. İmmünohistokimyasal boyama verileri, birçok normal hücrede FOXO3A proteininin orta ile güçlü derecede nükleer pozitiflik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu da proteinin nükleusta bol bulunduğunu ve aktif olduğunu göstermektedir. Karaciğer hepatositleri ile merkezi sinir sistemindeki birçok nöron/glia hücresinde ise FOXO3A boyanmasının zayıf ya da hiç olmadığı bildirilmiştir. Örneğin HPA birincil veri setinde, karaciğer dokusunda FOXO3A proteini düşük düzeyde saptanmış, beyin korteksinde ise nöronların bir kısmında zayıf nükleus boyanması izlenmiştir. Genel olarak, normal doku protein verileri FOXO3A'nın vücut genelinde yaygın ancak nükleusa lokalize bir ifade modeli sergilediğini göstermektedir.



Şekil 5. FOXO3 proteininin insan dokularındaki ekspresyon düzeyleri.

The Human Protein Atlas veri tabanından alınan bu görsel, FOXO3 proteininin çeşitli insan dokularında protein düzeyinde gösterdiği ifade (ekspresyon) derecelerini göstermektedir. İfade düzeyleri "Not detected", "Low", "Medium" ve "High" olarak kategorilerine göre ayrılmıştır.

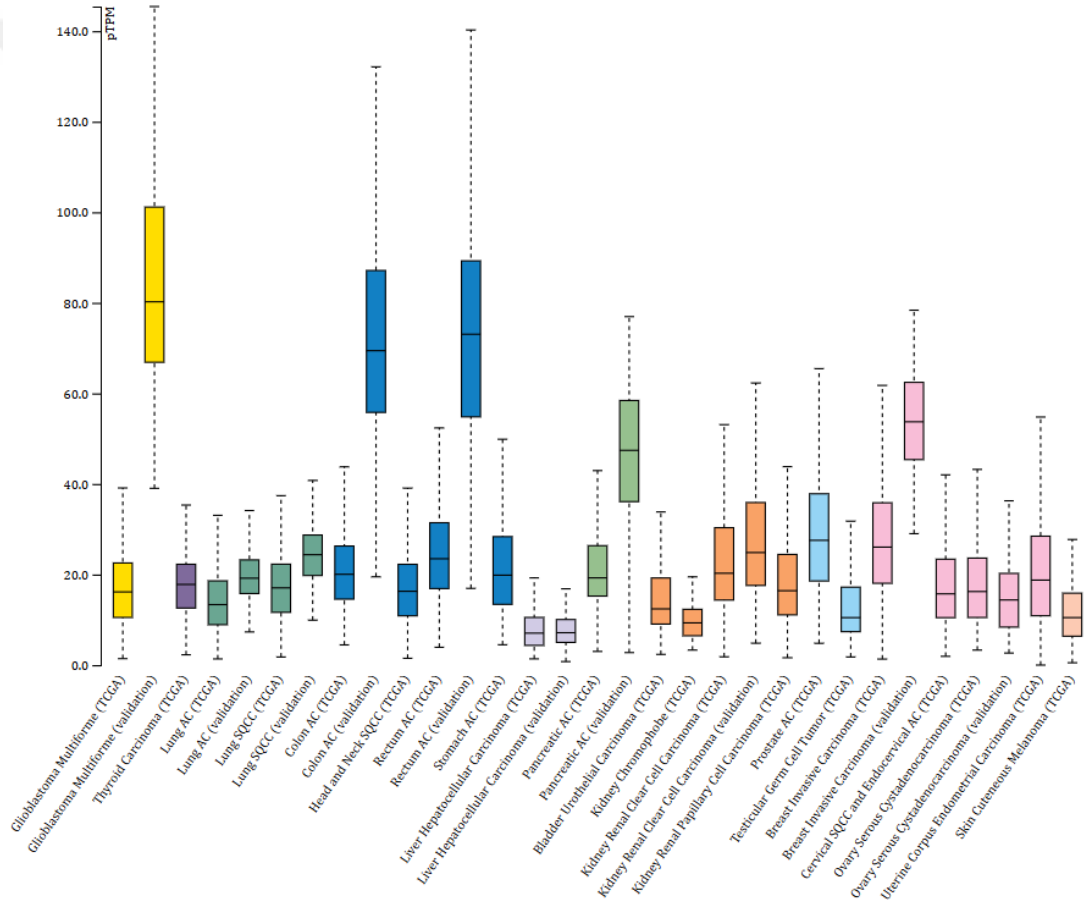
2.1.6.2 Hücre Tipi Düzeyinde FOXO3A Ekspresyonu

HPA'nın tek hücre tipi RNA sekans analizine göre FOXO3A, belirli bazı hücre gruplarında diğerlerine kıyasla daha yüksek düzeyde ifade edilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi hücreleri içinde monositler, FOXO3A geninin belirgin biçimde yüksek ekspresyon gösterdiği bir hücre tipi olarak tanımlanmıştır. Monositlerde FOXO3A mRNA seviyesi, birçok diğer hücre tipine göre oldukça yüksektir; HPA tek hücre verilerinde monositlerin 285,1 nTPM ile en yüksek FOXO3A transkript seviyesine sahip olduğu gösterilmektedir. Bu bulgu, FOXO3A'nın özellikle monositlerin fonksiyonlarında önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, hücre düzeyindeki sınıflandırmada FOXO3A'nın çoğu hücre tipinde düşük spesifikite olduğu, yani yaygın biçimde ifade edildiği belirtilmiştir. Örnek olarak epitel, bağ doku ve diğer ana hücre gruplarının birçoğunda FOXO3A'nın temel düzeyde ekspresyonu mevcuttur. Bu sonuçlar, FOXO3A'nın belirli özelleşmiş hücrelerden ziyade genel hücresel işlevlerde rol alan bir protein olduğunu göstermektedir.

2.1.6.3 Kanser Dokularında FOXO3A Ekspresyonu

HPA Patoloji Atlası verileri, FOXO3A geninin kanserlerde de yaygın biçimde ifade edildiğini göstermektedir. Kanser türleri arasındaki RNA analizi, FOXO3A'nın düşük kanser-spesifitesi olduğunu göstermektedir. FOXO3A'nın transkript düzeyi belirli bir kanser tipinde aşırı yüksek veya düşük değildir, incelenen tüm kanser tiplerinde benzer düzeylerde mevcuttur. HPA'nın TCGA verilerine dayalı pan-kanser RNA incelemesinde FOXO3A, "Detected in all" (tüm kanserlerde tespit edildi) kategorisine

girmektedir. HPA immünohistokimya verilerine göre FOXO3A proteini, kanser örneklerinin büyük çoğunluğunda orta ile güçlü derecede nükleer boyanma göstermektedir. Spesifik olarak, HPA’da 20 farklı kanser türünden alınan tümör kesitleri incelendiğinde, hemen hepsinde FOXO3A tümör nükleuslarında belirgin pozitiflik göstermiştir. Örneğin HPA, genel boyanma paternini temsilen kolorektal kanser, meme kanseri, prostat kanseri ve akciğer kanseri dokularına ait örnekleri sunmuştur; bu tümör örneklerinin hepsinde FOXO3A proteini kanser hücre çekirdeklerinde yoğun şekilde izlenmiştir. Bu da FOXO3A’nın farklı doku kaynaklı tümörlerde ortak bir ifade modeli olduğunu, çoğunlukla nükleer lokalizasyonda aktif bulunduğunu göstermektedir. HPA veritabanında “Most cancer tissues showed moderate to strong nuclear positivity” şeklinde özetlenmiştir.



Şekil 6. FOXO3 geninin farklı kanser türlerindeki RNA düzeyleri (TPM cinsinden).

Görsel, The Human Protein Atlas veritabanından alınan TCGA (The Cancer Genome Atlas) datasetine dayanmaktadır.

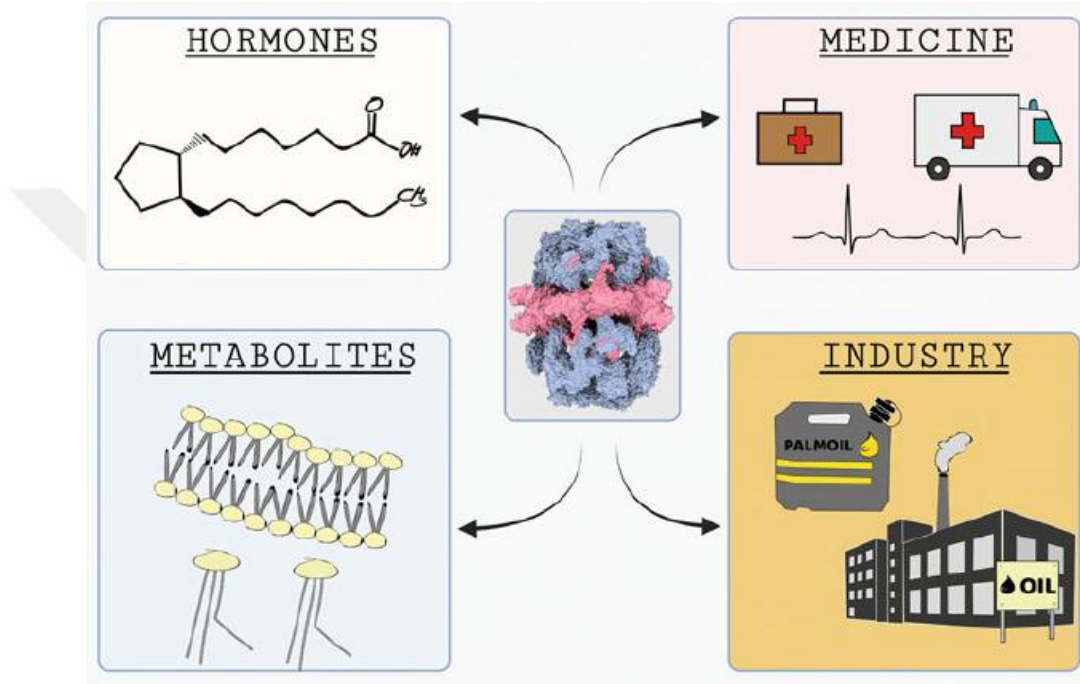
2.1.6.4 Subsellüler Lokalizasyon Bilgileri

FOXO3A proteininin hücre içindeki yerleşimi, HPA Hücre Atlası verileriyle ayrıntılı olarak incelenmiştir. Hem deneysel immüno Floresans görüntülemeler hem de biyoinformatik tahminler, FOXO3A'nın başlıca nükleusta lokalize olduğunu göstermektedir. HPA, FOXO3A için “genel nükleer ekspresyon” tanımlaması yapmıştır. Bu, proteinin değişik hücre hatlarında ve dokularda nükleus bölgesinde tespit edildiği anlamına gelir. HPA ayrıca FOXO3A'nın hiçbir izoformunun salgı proteinleri kategorisinde yer almadığını, hücre dışına salgılanmadığını ve hücre içinde kaldığını bildirmektedir.

2.2. Yağ Asidi Metabolizması

Canlı hücreler metabolik işlevlerini yerine getirebilmek ve homeostaziyi korumak için sürekli enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu enerji fotosentetik olmayan organizmaların çoğu için proteinler, karbonhidratlar ve yağlar gibi çeşitli gıda kaynaklarının oksidasyonundan elde edilir. Bu makromolekülleri oluşturan alt birimler asetil-CoA'ya parçalanarak sitrik asit döngüsü ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon süreçlerinde enerji elde etmek için kullanılırlar. Sonuçta hücrelere kimyasal enerji sağlayan ATP üretilmiş olur (Park & Chalfant, 2018). Yağ asitleri (FA'lar), düz zincirli FA'lar, ikame edilmiş FA'lar (metil grupları dışındaki ikamelere sahip yağ asitleri), dallı zincirli FA'lar ve halka içeren yağ asitleri dahil olmak üzere çeşitlilik gösteren bir lipid alt grubudur. FA'lar, fosfolipidler, sfingolipidler ve trigliseridler de dahil olmak üzere çeşitli lipid türlerinin temel yapı taşlarıdır ve bir karboksilik asit grubu ile çeşitli karbon uzunluklarına ve doymamışlık derecelerine sahip bir hidrokarbon zincirinden oluşur (Park & Chalfant, 2018). Diaçilgliseridler (DAG'ler) ve triaçilgliseridler (TAG'ler) de dahil olmak üzere daha karmaşık lipid türlerini sentezlemek için çeşitli metabolik yollara yönlendirilebilirler veya fosfatidik asit (PA), fosfatidiletanolamin (PE) ve fosfatidilserin (PS) gibi fosfolipidlere dönüştürülebilirler. Bu moleküller, enerji depolanması, su geçirmezliğin sağlanması (örneğin, kuşların tüylerini temizleme bezlerindeki yağ asitleri), hücre zarı yapısının oluşturulması, proteinlerin modifikasyonu (lipoproteinler aracılığıyla) ve reaktif oksijen türlerinin yok edilmesi (tokoferoller gibi) gibi çok çeşitli işlevlere sahiptir (Yoon et al., 2021). Yağ asitleri, vücudun başlıca enerji deposu olan mono-, di- ve triaçilgliserol moleküllerinin yapı taşları olarak kullanılabilir. Yağ asitleri, çeşitli uzunluklarda negatif yüklü doğrusal hidrokarbon zincirleridir ve fizyolojik pH seviyelerinde, tamamen deprotonlanmış karboksil uç grubu negatif yük taşır. Ayrıca yağ asitleri verimli enerji depolarıdır, gram

başına karbonhidratlardan iki kat daha fazla enerji sağlayabilirler. Birçok memeli grubu, enerjilerini dokularında yağ asitleri formunda depolayabilir. Ayrıca, yağ asitleri, enerji, sağlık ve endüstri gibi birçok alanda da kullanılmaktadır. Yağ asidi biyosentez mekanizmalarını kullanarak ve modifiye ederek sıvı yakıtların yerini alabilecek alternatif, yenilenebilir enerji kaynaklarını tanımlamak için aktif bir arayış söz konusudur. Bu arayış yalnızca yakıtlarla sınırlı değildir; aynı zamanda yağ asidi türevli bileşikler olan oleokimyasalların üretimi için de geçerlidir (Günenc et al., 2022a). Yağ asitlerinin biyoloji, tıp ve biyoteknolojideki temel işlevleri Şekil 7’de özetlenmiştir.



Şekil 7. Biyoloji, tıp ve biyoteknolojide yağ asidi biyosentetik mekanizmaları ve yağ asidi sentazlarının oynadığı temel roller (Günenc et al., 2022b).

2.2.1. Yağ Asidi Sentezi (Lipogenezi)

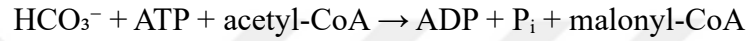
Yağ asidi sentezi, yağ asitlerini sentezleyen metabolik bir yoldur. Lipojenik koşullar altında, hücredeki fazla glikoz ilk önce sitoplazmada glikoliz yoluyla pirüvata dönüştürülür. Pirüvat mitokondriye girer asetil-CoA'ya dönüştürülür ve sitrat olarak mitokondriden sitoplazmaya taşınır. ATP sitrat liyaz (ACL) daha sonra sitratı asetil-CoA'ya yeniden dönüştürür (Ojha et al., 2014). Yağ asitlerinin sentezi temelde üç adımda gerçekleşir. Bunlar; Asetil-CoA'nın, mitokondrinin matrisinden sitoplazmaya taşınması, asetil-CoA'nın karboksilasyonu ile oluşan 3 karbonlu bir bileşik olan malonil CoA'nın oluşumu ve zincir uzaması (Şekil 8).

2.2.1.1. Asetil-CoA'nın Sitoplazmaya Taşınması

Tüm yağ asidi sentezi sitoplazmada gerçekleşir. Asetil-CoA, mitokondriyal matrsten bir sitrat molekülü olarak dışarı atılır. Daha sonra, sitoplazmada, asetil-CoA ve oksaloasetata geri ayrılır. Oksaloasetat kısmı, sitrik asit döngüsüne katılmak için mitokondriyal matrise geri taşınır veya glukoneogenez için kullanılır. Sitoplazmaya girdiğinde, asetil-CoA, asetil-CoA-karboksilaz enzimi tarafından malonil-CoA'ya karboksilatlanır (Şekil 8).

2.2.1.2. Malonil-CoA Oluşumu

Lipogenez yolunda malonil-coA oluşumu, asetil-CoA karboksilaz tarafından gerçekleştirilir. Sitoplazmaya giren asetil-CoA bu enzim aracılığıyla malonil-CoA'ya dönüşür.

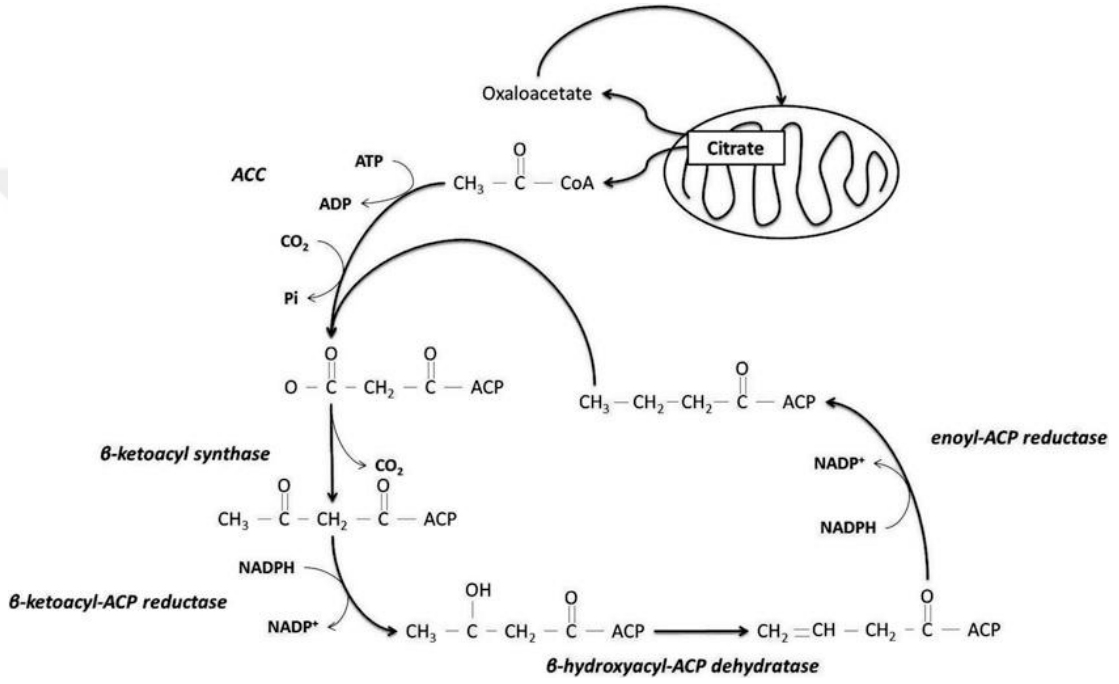
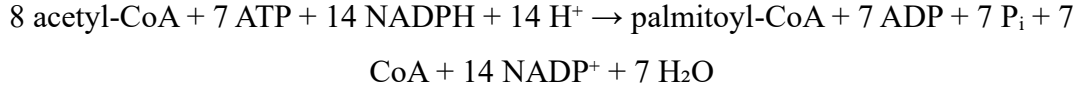


Memelilerde, asetil-CoA karboksilaz, lipogenezin bir ürünü olan palmitoil-CoA tarafından negatif, sitrat (substrat) tarafından pozitif, olarak düzenlenir. Enzim ayrıca fosforilasyon yoluyla da düzenlenebilir. Aktif olduğunda, asetil-CoA karboksilaz uzun filamentli multimerlere dönüşür. Bu multimerler ayrıştığında ve monomerler oluşturduğunda, karboksilaz inaktif durumuna geri döner (Şekil 8). Ayrıca bu enzim insülin varlığında, asetil-CoA karboksilaz defosforile edilir ve bu durum enzimi aktive ederek yağ asidi sentezini artırır. Buna karşılık, glukagon, asetil-CoA karboksilazın fosforilasyonunu uyarak yağ asidi sentezini inhibe eder (Yanamadala, 2024).

2.2.1.3. Zincir Uzaması

Yağ asidi sentaz (FASN) asetil-CoA, malonil-CoA ve NADPH'den yağ asitlerinin oluşumunu katalize eden ve lipid biyosentezinde merkezi bir rol oynayan çok işlevli bir enzim sistemidir (Mullen & Yet, 2015). Zincir uzamasının ilk iki adımında, malonil-CoA ve açıl-CoA, FASN (Fatty Acid Synthase) enzimindeki malonil/asetil-CoA ACP transaçilaz aktivitesi yoluyla enzimin açıl taşıyıcı proteine (ACP) aktarılır. ACP alt birimine kovalent olarak bağlandıktan sonra, aktive edilmiş substrat, FASN enzimi aracılığıyla katalizlenir. Bir asetil-ACP molekülü ve bir malonil-ACP molekülü, β -ketoaçıl sentaz enzim aktivitesiyle asetoasetil-CoA'yı oluşturmak için kullanılır. Bu kondenzasyon reaksiyonu sisteme bir karbondioksit molekülü verir. Beta pozisyonundaki keton grubu daha sonra β -ketoasil ACP redüktaz tarafından bir alkole indirgenir. Bu reaksiyonda bir NADPH molekülü kullanır. Dehidratasyon ile β -hidroksiasil-ACP dehidrataz enzimi aracılığıyla bir trans karbon çift bağı oluşturur. Bu

reaksiyon sisteme bir su molekülü üretir. Enoyl-ACP redüktaz enzimi trans bağı NADPH molekülü kullanarak indirger. Böylece tamamen doymuş hidrokarbon birimi olan 4 karbonlu bütiril-CoA oluşur. Yağ asidi 16 karbon atomu uzunluğunda olduğunda, yağ asidi sentazının tiyoesteraz alanı, yağ asidini fosfopanteteine bağlayan tiyoesterin hidrolizini katalize eder (Şekil 8). Asetil-CoA ünitelerinden bir palmitoil-CoA molekülü oluşturma net reaksiyonu ve enerji tüketimi aşağıdaki gibidir:



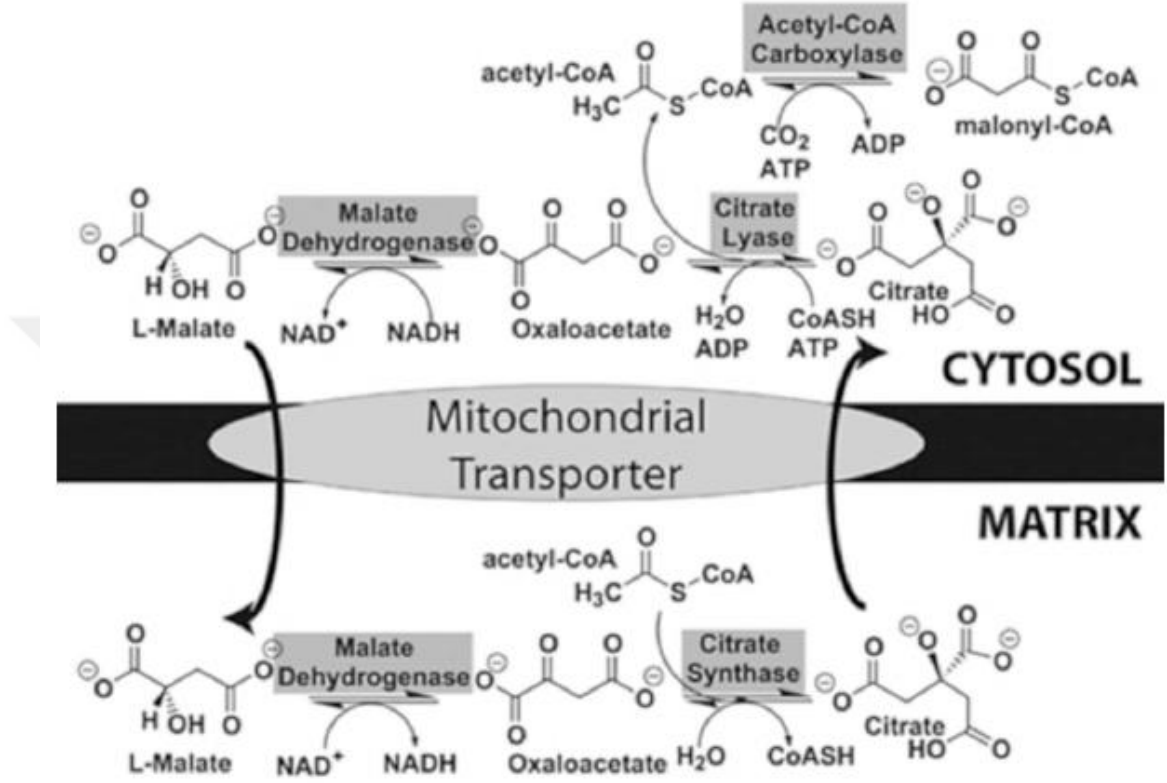
Şekil 8. Lipogenez yolu (Park & Chalfant, 2021)

2.2.2. Yağ Asitlerinin Mitokondrilerdeki β-Oksidasyonu

Yağ asitlerinin β-oksidasyonu mitokondrilerde veya peroksisomlarda meydana gelebilmektedir. Lipogenez ve β-oksidasyon süreçleri benzerdir, ancak farklı enzimler görev almaktadır. Peroksisomal β-oksidasyon enzimleri, özellikle uzun zincirli yağ asitleri (14 karbon ve üzeri) için, mitokondriyal β-oksidasyon enzimleri ise daha çok orta zincirli yağ asitleri (C4–C12) için özelleşmiştir. Yağ asitlerinin mitokondrilerdeki beta-oksidasyonu temelde iki aşamada gerçekleşir:

1. Sitolde yağ asitlerinin aktivasyonu ve mitokondrilere taşınması
3. Mitokondriyal matriste meydana gelen β-oksidasyon

Yağ asidi oksidasyonu mitokondriyal matriste gerçekleşirken, tüm de novo yağ asidi sentez reaksiyonları sitozolde gerçekleşir. Yağ asidi oksidasyonu ve sentezinin bu fiziksel ayrımı, her iki işlemin de doku ihtiyaçlarına göre bağımsız olarak kontrol edilmesini sağlar (Park & Chalfant, 2021).



Şekil 9. Sitrat mekiği, yağ asidi sentezi için asetil-CoA'nın mitokondri matriksinden sitozole taşınmasını sağlar (Yanamadala, 2024).

2.2.2.1. Yağ Asitlerinin Aktivasyonu ve Mitokondrilere Taşınması

Yağ asitlerinin yıkıma uğrayabilmesi için önce koenzim A ile aktive edilmeleri gerekir; bu işlem sonucunda bir yağ asil-KoA tioesteri oluşur. Bu molekül daha sonra karnitin ile reaksiyona girerek asilkarnitin oluşturur ve bu da oksidasyona uğramak üzere iç mitokondriyal zar boyunca taşınır. Kısa ve orta zincirli yağ asitleri, mitokondride doğrudan aktive edilebilir. Ancak uzun zincirli yağ asitleri, mitokondri zarını taşıyıcı olmadan geçemez. Bu nedenle, bu yağ asitleri mitokondri iç zarının dış yaprağında bulunan karnitin transferaz I enzimi tarafından asilkarnitin türevlerine dönüştürülür (Şekil 9). Bu türevler, bir translokaz enzimi aracılığıyla zardan taşınır ve ardından matriks tarafında yer alan karnitin transferaz II tarafından tekrar yağ asil grubunun

koenzim A'ya bağlanmasıyla orijinal yağ asil-KoA yapısına dönüştürülür. Aktivasyon adımının ardından, doymuş yağ asitlerinin β -oksidasyonu, dört adımlı döngüsel bir süreçle ilerler. Bu süreç, adımların tekrar etmesinden dolayı genellikle bir "spiral" olarak tanımlanır. β -oksidasyon her döngüde yağ asidinden iki karbon uzaklaştırır. Bu reaksiyonlar mitokondride gerçekleşir ve enerji üretimi için elektron taşıma zinciriyle yakından ilişkilidir. Beta-oksidasyonun ürünleri arasında FADH₂, NADH, H⁺ ve daha sonra sitrik asit döngüsünden geçen asetil-CoA bulunur. Beta-oksidasyon net reaksiyonu ve enerji tüketimi aşağıdaki gibidir.



2.2.2.2. Beta-Oksidasyon

β -oksidasyon spiralindeki her döngü bir molar eşdeğer NADH, FADH₂ asetil-CoA üretir. Her turun son ürünü olan Asetil-CoA daha sonra sitrik asit döngüsüne girer ve burada üç molar eşdeğer NADH, bir molar eşdeğer FADH₂ ve bir molar eşdeğer ATP'nin eş zamanlı üretimiyle CO₂'ye oksitlenir. β -oksidasyon, yağ asil-KoA molekülünün β -karbonunda (yani 2. karbon) gerçekleşen oksidasyonla, her seferinde 2 karbonluk birimlerin uzaklaştırılması yoluyla ilerler. Bu süreç dört temel adımdan oluşan döngüsel bir reaksiyon serisidir ve her döngüde yağ asidi zinciri iki karbon kısalır (Şekil 10). Temelde dört adımda meydana gelir:

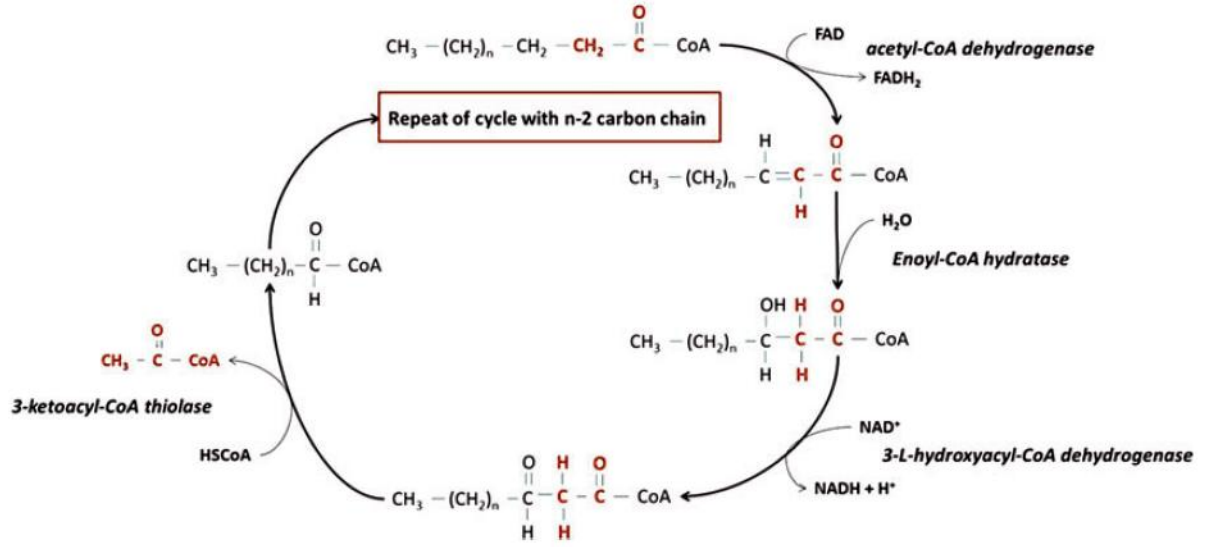
Oksidasyon (Dehidrojenasyon): Dehidrojenasyon, bir trans çift bağı oluşturmak için iki ve üç numaralı karbonlarda meydana gelir. Eş zamanlı olarak, FAD elektronlarını elektron taşıma zincirine aktaran FADH₂'ye dönüştürülür.

Hidrasyon: Dehidrojenasyondan sonra bir hidrasyon reaksiyonu meydana gelir. Birinci adımda oluşan alken, beta-karbonda bir alkol oluşturur. Bu reaksiyon, karbonların molekülü ikiye ikiye terk etmesinin nedenidir.

Oksidasyon: Bu reaksiyon, ikinci adımda oluşan alkolün beta-karbon üzerinde bir keton oluşturmak üzere oksidasyonuna yol açar. Bu noktada, NAD⁺ ayrıca elektron taşıma zincirine doğrudan bağlanan NADH + H⁺'ya dönüştürülür.

Ayrışma: Betaoksidasyon sarmalındaki son adım, asetil-CoA'nın orijinal yağ asidi zincirinden ayrılmasıdır. Aynı zamanda, yeni bir koenzim A molekülü, b-karbon karbonil grubuna yeni bir tiyoester bağı yapar. Yağ asidi molekülü tamamen sindirilene kadar dört adım tekrarlanır. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu, çift bağla karşılaşıldığı durumlar hariç, esasen doymuş yağlar için olanla aynıdır. Böyle bir

durumda, bağ belirli bir enoil-CoA izomeraz tarafından izomerleştirilir ve oksidasyon hızla devam eder.

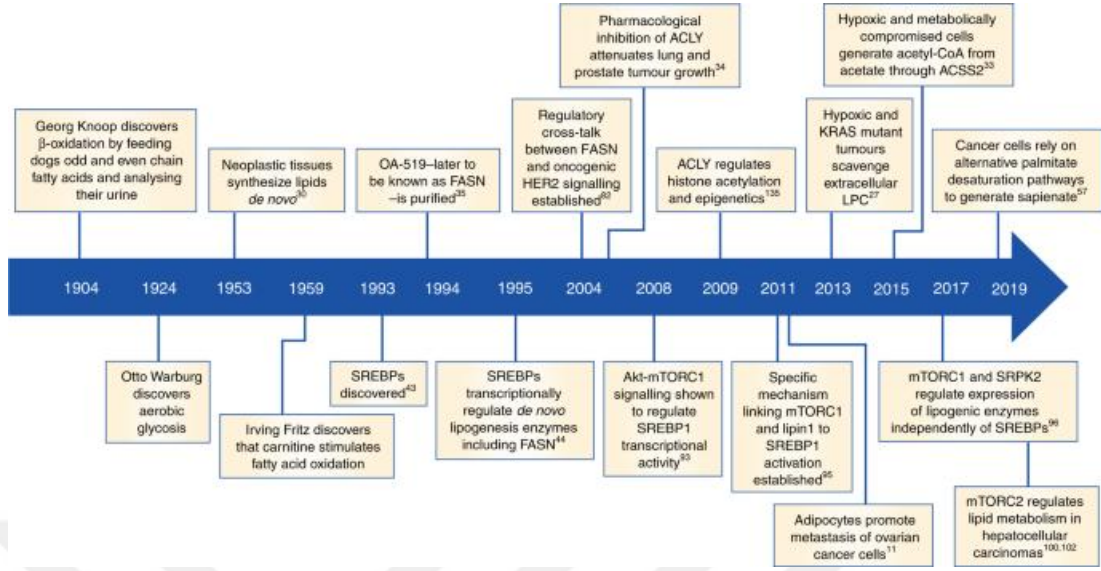


Şekil 10. Yağ asitlerinin β-oksidasyon sarmalı (Park & Chalfant, 2018).

2.3. Yağ Asidi Metabolizması ve Kanser

Kanser, dünya çapında en önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Kanser geliştikçe tümör mikroçevresinin (TME) değişmesi ile düşük besin ve oksijen koşullarında hayatta kalmak için kanser hücreleri metabolizmalarını değiştirerek uyum sağlamaktadır (Lin et al., 2017). 1920'lerde Otto Warburg'un kanser hücrelerinin aerobik koşullar altında bile glikozu laktata dönüştürmeyi tercih ettiğini bulmuştur. Bu keşif ardından glikoz, amino asitler ve lipidler gibi makromoleküllerin metabolizmasının kanserde önemli rol oynadığına ait çalışmalar önem kazanmıştır (Lebelo et al., 2019; Vander Heiden et al., 2009). Yağ asitleri, birçok lipid türünün ana bileşenidir ve FA metabolizması, kanserin gelişimi ve ilerlemesiyle yakından ilişkilidir. Pek çok çalışmada, yağ asitlerinin sentezinin, kanser gelişimi sırasında önemli olduğunu gösterilmiştir (Şekil 11) (Braig, 2018; Corn et al., 2020). Bununla birlikte, yağ asitlerinin alınması ve taşınması da kanserin seyrini etkilemektedir (Casals et al., 2016; Rupert & Kolonin, 2022). Ayrıca, yağ asidi metabolizmasında görevli temel enzimlerin ekspresyon seviyeleri kanserde sıklıkla değişmekte ve bu enzimler yaygın olarak biyobelirteç (biomarker) ve terapötik hedefler olarak kullanılmaktadır (Rupert & Kolonin, 2022). Yağ asitleri aynı zamanda hücre zarlarının da önemli bileşenleridir. Zar lipidlerinin yeniden düzenlenmesi yoluyla yağ asitleri, zar akışkanlığı ve sertliğini etkileyebilir. Zarın yapısal özelliklerindeki bu değişikliğin,

kanser hücrelerinin invazyonu ve metastazı ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Martin-Perez et al., 2022).



Şekil 11. Lipid araştırmalarında önemli keşifler.

Kanserde düzensiz yağ asidi metabolizmasının önemini gösteren öncü çalışmalar.

FASN, fatty acid synthase; SREBPs, sterol regulatory element-binding protein;

ACLY, ATP–citrate lyase; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1;

mTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2. (Koundouros & Poulogiannis, 2020).

Normal hücrelerden farklı olarak, kanser hücrelerinde çoğalma için hızla enerji harcanır ve zar materyalleri elde etmek amacıyla metabolik yeniden programlama meydana gelir. Kanser hücrelerinin çoğalması ve metastazı sırasında, amino asitlere ve glikoza olan talebin artmasına ek olarak, kanser hücrelerinde FA'ların metabolik yeniden programlanması da aktive edilir (DeBerardinis & Thompson, 2012) (Şekil 12). Bu metabolik yeniden programlama, hem içsel (intrinsik) hem de dışsal (ekstrinsik) faktörlerden etkilenmektedir. Dışsal faktörlerin başında tümör mikroçevresi (TME) gelir. Mikroçevre, kanser hücreleri üzerinde hipoksi, dış ortamın asidikleşmesi ve hücre-hücre etkileşimleri gibi birçok dış stres oluşturabilir. Araştırmacılar, katı tümörlerdeki asidik mikroçevrenin, mitokondriyal ve histon asetilasyonundaki değişiklikler yoluyla kanser hücrelerinde FA metabolizmasının yeniden programlanmasını yönlendirdiğini göstermiştir (Menard et al., 2016). Ayrıca bazı kanser dışı hücreler, sitokinler, ekstrasellüler veziküller (EV'ler) ve hatta doğrudan yağ asitleri gibi maddeleri salgılayarak, kanser hücrelerinde yağ asidi

metabolizmasının yeniden programlanmasını aktive edebilir. Örneğin, adipoz doku hücrelerinden türeyen lipidler, meme kanseri hücrelerine taşınabilir ve bu hücrelerdeki yağ asidi taşınımını artırarak, meme kanseri ilerlemesine katkı sağlayabilir (D. Yang et al., 2018).

Şekil 12. Kanser hücrelerinde yağ asidi (FA) metabolizması.

2.3.1 Kanser Hücrelerinde FA'ların De Novo Sentezi

karboksilaz (ACC) ve FA sentaz (FASN) enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla palmitik asit (PA)'a dönüştürülür. Bu aşamalarda, ACLY sitoplazmada sitratı ayırarak asetil-CoA üretir; bu molekül, ACC tarafından malonil-CoA'ya çevrilir. Ardından, malonil-CoA FASN tarafından uzatılarak doymuş 16 karbonlu yağ asidi olan PA elde edilir.

FA de novo sentezinin ilk basamağındaki hız kısıtlayıcı enzim olan ACLY'nin ifade seviyesi kolon kanserinde artmaktadır (Wen et al., 2019). Ayrıca, ACLY, CTNNB1 (β -katenin 1'i kodlayan gen) transkripsiyonel aktivitesini artırarak kolon kanseri hücrelerinin göç ve invazyon yeteneğini artırır (Butler et al., 2021). ACLY aynı zamanda hepatoselüler karsinom (HCC) hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolu aracılığıyla kök hücre benzeri özellikleri, hareketliliği ve invazyonu düzenlemektedir (Han et al., 2021). Benzer şekilde, ACC1 prostat kanseri hücrelerinde anormal şekilde ifade edilir (Butler et al., 2021). Yapılan çalışmalar, ACC'nin inhibisyonunun küçük hücre dışı akciğer kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını azalttığını ve apoptozu teşvik ettiğini göstermektedir (C. Wang et al., 2021).

FA sentezinin temel enzimi olan FASN, meme kanseri dokularında yüksek düzeyde ifade edilir ve bu nedenle potansiyel bir biyobelirteç olarak görülmektedir. Ayrıca, FASN'in Wnt-1/ β -katenin yolunu aktive ederek epitel-mezenkimal geçişi (EMT) teşvik ettiği gösterilmiştir (Esslimani-Sahla et al., 2007; J.-Q. Li et al., 2014). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, FASN'in c-Src/AKT/FAK sinyal yolunu aktive ederek serviks kanseri hücrelerinin göçünü ve invazyonunu artırabildiğini de ortaya koymuştur (Q. Du et al., 2022). Ayrıca, FASN'in susturulması, kolorektal kanser hücrelerinde anjiyogenezi teşvik eden faktörlerin salgılanmasını azaltmakta ve damar oluşumunu baskılamaktadır (Zaytseva et al., 2014). Sonuç olarak, FA de novo sentezi, kanser hücrelerinin hızlı çoğalması için gereken enerjiyi karşılamada önemli bir rol oynar ve bu süreç, tümör büyümesi süreci boyunca anormal şekilde aktive olur.

2.3.2 Kanser Hücrelerinde Yağ Asitlerinin Uzaması

FA de novo sentezine ek olarak, FA doymamışlaştırma ve zincir uzatma süreçlerinin anormal şekilde aktive olması kanser hücrelerinde yaygın bir özelliktir. FA'lar, karbon zinciri uzunluğu ve doymamışlık derecesine göre üç sınıfa ayrılır: doymuş FA (SFA), tekli doymamış FA (MUFA) ve çoklu doymamış FA (PUFA). FA, 16 karbon atomuna kadar uzatıldığında ACSL enzimi tarafından FA-CoA formuna dönüştürülür. Bu molekül daha sonra SCD ve FADS tarafından çift bağ eklenerek doymamış hale

getirilir. Ayrıca, ELOVL enzimi yardımıyla zinciri uzatılarak daha uzun doymamış FA'lar (UFA) elde edilir. SCD, FA'yı MUFA'ya çevirir ve bu da tümör mikroçevresinde lipid kullanımını artırır. Pek çok çalışmada, SCD'nin ifade düzeyinin birçok katı tümörde belirgin şekilde arttığı ve bu durumun tümör destekleyici bir rolü işaret ettiği belirtilmiştir (Kubota & Espenshade, 2022). İnsanlarda SCD1 ve SCD5 olmak üzere iki alt tür bulunur. SCD1 tüm dokularda yaygın olarak ifade edilir (Kikuchi & Tsukamoto, 2020). NF- κ B, SCD1 ile pozitif geri besleme döngüsü kurarak over kanseri hücrelerinde kök hücre özelliklerini artırabilir (Q. Du et al., 2022). Yapılan bir çalışmada, SCD1'in hem kanser hücrelerinde hem de bağışıklık hücrelerinde ifade edilmesinin bağışıklık direnci yarattığı ve SCD inhibitörlerinin CD8+ T hücreleri üretimini artırarak kolon ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri büyümesini engellediği gösterilmiştir (Katoh et al., 2022). FADS, FA'yı PUFA'ya dönüştürür. FADS1, meme ve pankreas kanserlerinde yüksek ifade düzeyine sahiptir ve (Xu et al., 2018; X. Yang et al., 2016, 2017) Susturulması hem tümör oluşumunu azaltmakta hem de kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırmaktadır.

Uzun zincirli FA'ların uzaması, ELOVL ailesi enzimleri tarafından gerçekleştirilir. ELOVL1, 3 ve 6 FA ve MUFA'ları; ELOVL2 ve 4 PUFA'ları; ELOVL5 MUFA ve PUFA'ları; ELOVL7 ise SFA ve PUFA'ları uzatır. Bazı çalışmalar, ELOVL ekspresyonunun kanser gelişimiyle bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur (Butler et al., 2020). ELOVL2'nin ifade seviyesi, renal hücreli karsinom hastalarının tümör dokularında artmıştır (Tanaka et al., 2021). Ancak prostat kanseri hastalarında yüksek ELOVL2 ekspresyonu, daha iyi prognozla ilişkilendirilmiştir (Hu et al., 2022). Özetle, desatüraz ve elongaz enzimleri, farklı uzunlukta FA'ların oluşumunu sağlar. FA de novo sentezi hücrenin ana FA kaynağı olsa da, bu enzimlerin susturulması da anlamlı antitümör etkiler göstermektedir.

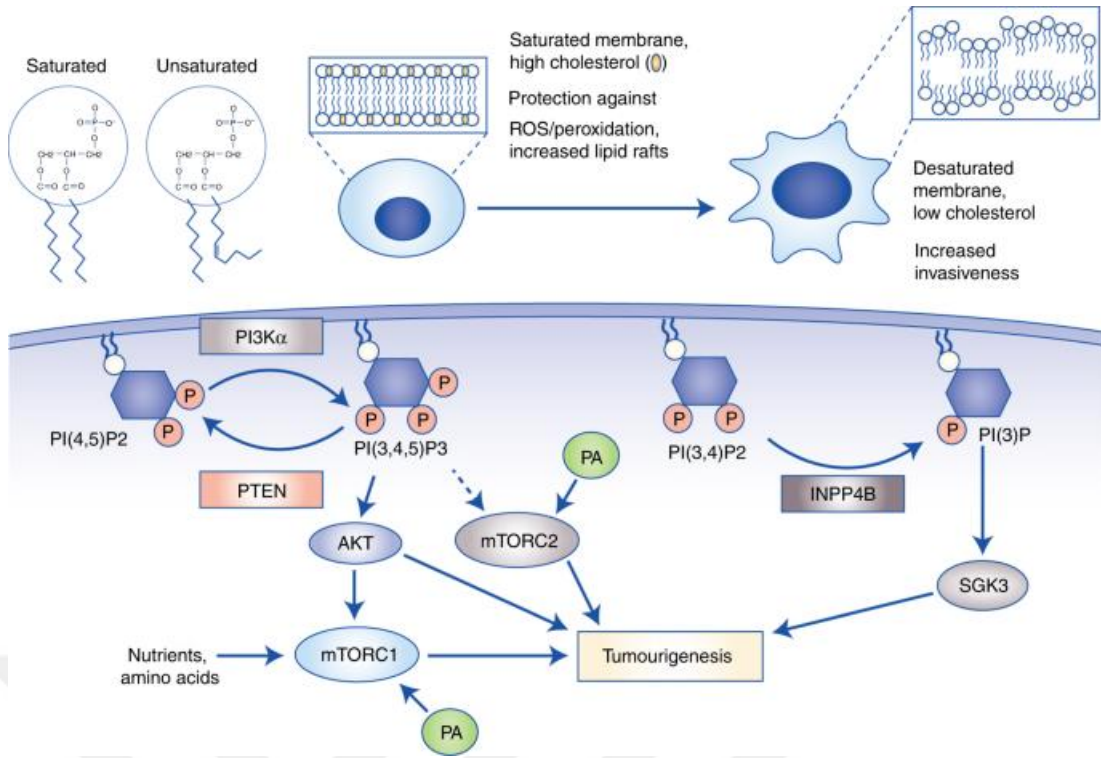
2.3.3 Kanser Hücrelerinde Yağ asitlerinin Alımı ve Taşınması

Kanser hücreleri ihtiyaç duydukları FA'ları esas olarak de novo sentez yoluyla elde eder. Ancak FA alımı ve hücre içi taşınımı da lipid kullanımını sürdürmek açısından önemlidir. Bu süreçte, FA taşıyıcı proteinler ve CD36 (FA translokaz) gibi transmembran proteinler rol alır. Ayrıca FA bağlayıcı proteinler (FABP'ler) serbest FA'ların hücre içi taşınmasını kolaylaştırır. HCC (hepatoselüler karsinom) hastalarında, FA taşınımı, komşu dokulara ve normal karaciğer hücrelerine kıyasla tümör dokularında belirgin şekilde artmıştır (D. Du et al., 2022). CD36'nın ifade

düzeyi, HCC hücrelerinde epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkilidir (Nath et al., 2015). Ağız kanseri hücrelerinde de CD36'nın yüksek ifadesi yüksek düzeyde FA taşıyarak metastazı teşvik etmektedir (Pascual et al., 2017). CD36 AKT/GSK-3 β / β -katenin sinyal yolunu aktive ederek mide kanseri metastazını destekleyebilir (Pan et al., 2019). Karnitin palmitoiltransferaz 1 (CPT1) enzimi, aktive olmuş FA-CoA'yı mitokondriye taşıyarak β -oksidasyonla enerji üretimini sağlar. Üç alt tipi vardır: CPT1A, CPT1B ve CPT1C. CPT1A, meme kanserinde yüksek düzeyde ifade edilir (Das et al., 2022). Sonuç olarak, FA alımı ve taşınımından sorumlu enzimlerin anormal ifadesi tümör gelişimiyle yakından ilişkilidir ve bu süreçler kanser tedavisinde potansiyel hedefler olabilir.

2.3.4 Membran yapısı ve akışkanlığı

FA'lar hücre zarının yapısını ve akışkanlığını korumak için gerekli yapı taşlarıdır. Kanser hücrelerinde lipogenez oranının artmasının avantajlarından biri, doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin sentezlenmesidir. Çünkü bu yağ asitleri, daha az çift bağ içerdiklerinden dolayı çoklu doymamış yağ asitlerine kıyasla daha karardır ve peroksidasyona karşı daha az hassastırlar (Şekil 13). Yüksek derecede zar doygunluğuna sahip kanser hücreleri, doksorubisin gibi kemoterapötik ajanlar tarafından indüklenen oksidatif strese daha az duyarlıdır, buna karşın lipid sentezinin, lipojenik enzimlerin siRNA veya bir ACC inhibitörü olan soraphen ile tedavi gibi yöntemlerle baskılanması sitotoksiteyi arttırmaktadır (Rysman et al., 2010a).



Şekil 13. Yağ asitleri (FA'lar) membran yapısını ve onkojenik sinyal yollarını düzenler.

Yağ asitleri (FA'lar), hücre zarının yapısını ve onkojenik sinyal yollarını düzenler. Zar akışkanlığı, kolesterol miktarı ve FA'lerin doymamışlık derecesine bağlıdır.

Kanser hücreleri artmış de novo lipogenez yoluyla doymuş fosfolipitler sentezleyerek zar sertliğini artırır ve oksidatif hasara karşı korunur. Buna karşılık, yüksek hareketli hücrelerde zar daha akışkandır; bu durum epitelden mezenkimal geçişi ve metastazı destekler. Ayrıca, FA'lar ve türevleri, özellikle fosfoinozitidler gibi, sinyal yollarında ikincil haberci olarak görev yapar. PI(3,4,5)P₃, AKT'yi aktive ederek mTORC1/2'yi aşırı aktive ederken, PI(3)P ise AKT'ten bağımsız olarak SGK3 üzerinden tümör oluşumunu destekler. Fosfatidik asit de doğrudan mTOR komplekslerini aktive edebilir (Koundouros & Poulogiannis, 2020).

Hücre içi kolesterol düzeyleri, zar yapısını değiştirerek hücre göçünü ve dolayısıyla metastatik yayılımı etkileyebilir. Kolesterolün membranlara dahil edilmesi genelde zar akışkanlığını azaltmaktadır ve dolayısıyla bir hücrenin şeklini değiştirme kapasitesini sınırlayarak metastazı engellemektedir. Bu süreç epitel mezenkimal geçiş (EMT) ve kan damarlarından intra-ekstravazasyon sırasında önemlidir (Şekil 13) (W. Zhao et al., 2016). EMT geçiren hücreler ATP bağlayıcı kaset taşıyıcısı ABCA1'in ifadesinin

artmasıyla kolesterolün dışarı akışı artmaktadır. ABCA1'i aşırı ifade eden insan tümörleri daha yüksek uzak metastaz oranlarına sahiptir (W. Zhao et al., 2016). FA metabolizmasıyla ilişkili enzimlerin kanserdeki değişimlerini ve etkileri Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Yağ asidi metabolik enzimlerinin kanserdeki rolleri (A. Du et al., 2023).

Enzim	Ekpresyon	Düzenleme Mekanizması	Fonksiyon	Kanser Tipi
ACLY	Artar	Wnt/ β -catenin Sinyal Yolu	Kök hücre oluşumu, migrasyonu ve invazyonunun düzenlenmesi	HCC
ACC1	Artar	NA	Proliferasyon artırma	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
ACC2	Azalır	NA	Proliferasyon inhibisyonu	Akciğer adenokarsinoma
FASN	Artar	Wnt/ β -catenin Sinyal Yolu	Epitel mezenkimal geçişi artırma	Meme kanseri
		c-Src/AKT/FAK Sinyal Yolu	Migrasyon ve invazyonu artırma	Servikal kanser
SCD1	Artar	NF- κ B	Kök hücre özelliklerinin düzenlenmesi	Yumurtalık kanseri

		NA	İmmün direnci artırma	Kolon kanseri, NSCLC
SCD5	Azalıır	NA	Epitel mezenkimal geçiş inhibisyonu	Meme kanseri
FADS1	Artar	NA	Proliferasyon artırma	Pankreas kanseri
FADS2	Artar	NA	Proliferasyon artırma	HCC, NSCLC
ELOVL2	Artar	NA	Proliferasyon artırma	RCC
	Azalıır	PI3K/Akt Sinyal Yolu	Proliferasyon inhibisyonu	Prostat kanseri
ELOVL5	Artar	NA	Proliferasyon artırma	Kolon Kanseri
ELOVL6	Artar	AKT	Proliferasyon artırma	HCC
ELOVL7	Artar	NA	Proliferasyon artırma	Prostat kanseri
CD36	Artar	AKT/GSK-3 β / β -catenin Sinyal Yolu	Metastaz artırma	Gastrik kanser
FABP1	Artar	VEGFR/Akt/mTOR Sinyal Yolu	Anjiyogenez artırma	HCC
FABP3	Artar	NA	Proliferasyon artırma	Özofagus skuamöz kanseri

FABP4	Azalıır	NA	Proliferasyon ve invazyon inhibisyonu	HCC
FABP5	Artar	CREB	Proliferasyon, migrasyon ve invazyon artırma	HCC
FABP7	Azalıır	NA	Proliferasyon artırma	Meme kanseri, ccRcc
CPT1A	Artar	NA	Proliferasyon artırma	Meme kanseri
CPT1C	Artar	NA	Proliferasyon artırma	HCC

2.3.5 Yağ Asidi metabolizması Aracılı Kanseri Tedavileri

Yağ asitlerinin (FA'lar) kanserdeki önemli rolü göz önüne alındığında, yağ asidi metabolizmasının hedeflenmesi kanser tedavisinde umut vadeden bir araştırma alanı haline gelmiştir. FA metabolik enzimleri potansiyel kanser karşıtı hedefler olarak umut vadetmektedir. Tablo 5’de FA metabolik enzimlerini hedef alan ilaçlarla birlikte, FA'lar ve FA metabolizmasına dayalı bazı kanser terapötik yaklaşımları özetlenmiştir.

Tablo 5. Yağ asitleri ve yağ asidi metabolizmasına dayalı bazı kanser tedavi yaklaşımları.

Hedef	Birleştirmek	Geliştirme aşaması	Kanser türü
FASN	Orlistat	Klinik öncesi	Melanom, prostat kanseri, yumurtalık kanseri
	Cerulein	Klinik öncesi	Kolon kanseri, meme kanseri

	C75	Klinik öncesi	Meme kanseri, böbrek kanseri
	TVB-2640	Aşama I (NCT02223247)	Kolon kanseri
ACC	Soraphen Bir	Klinik öncesi	Prostat kanseri, meme kanseri
	ND-646	Klinik öncesi	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
	ND-654	Klinik öncesi	HCC
CD36	ABT-510	Aşama I (NCT00586092)	Çoklu kanserler
FABP	SBFİ-102, SBFİ-103	Klinik öncesi	Prostat kanseri
CPT1	Etomoksir	Klinik öncesi	Prostat kanseri, meme kanseri
	Perheksilin	Klinik öncesi	Meme kanseri
	Ranolazin	Klinik öncesi	Prostat kanseri
COX2	Selekoksib	Aşama III (NCT01150045)	Kolon kanseri
		Aşama III (NCT02429427)	Meme kanseri
	Etorikoksib	Aşama II (NCT04565600)	Meme kanseri
	Meloksikam	Aşama III (NCT00152919)	Prostat kanseri
5- LOX	MK886	Klinik öncesi	Melanom
	Zilöton	Aşama II (NCT00070486)	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

FASN ve ACC inhibitörleri gibi FA sentezi blokerleri kanser hücresi çoğalmasını azaltabilir. FASN hedefli ilaçlar arasında orlistat, cerulenin ve C75 bulunmaktadır (Pulla & Begum Ahil, 2021). Bağırsak lipid alımını azaltan bir antiobezite ilacı olan

orlistatin, klinik öncesi modellerde büyük inhibitör etkiler sergilediği gösterilmiştir (Seguin et al., 2012). Benzer şekilde, başka bir FASN inhibitörü olan cerulenin, birden fazla kanser hücre hattında antiproliferatif etkilere sahiptir (Menendez & Lupu, 2017). Ek olarak, ilk sentetik anti-FASN molekülü olan C75, cerulenin'den daha kararlı bir kimyasal özelliğe sahiptir ve hem böbrek hem de meme kanserinde güçlü bir inhibitör olduğu gösterilmiştir (Horiguchi et al., 2008). ACC inhibisyonu da antitümör etkilere sahiptir. ACC inhibitörlerinden biri olan sorafen A'nın farklı kanserlerde FA sentezini zayıflattığı ve hücre çoğalmasını engellediği bulunmuştur (Beckers et al., 2007). Sorafen A, membran lipidlerinin doygunluk derecesini artırarak meme kanseri hücrelerinin metastatik potansiyelini azaltabilir (Rysman et al., 2010b). Ayrıca, sentetik anti-ACC molekülleri arasında, ND-600 serisi, ACC'nin FA sentez aktivitesini inhibe etmek üzere tasarlanmıştır; bunlardan ND-646 ve ND-654'ün kanser hücrelerinin çoğalmasını hafiflettiği kanıtlanmıştır (Lally et al., 2019; E.-Q. Li et al., 2019). SCD1 inhibisyonunun birden fazla kanserde (mesane kanseri ve melanom dahil) güçlü bir etkinlik gösterdiğini bulmuştur (Piao et al., 2019; Pisanu et al., 2018). FADS inhibitörünün klinik öncesi çalışmalarda kolon kanseri semptomlarını hafiflettiği de gösterilmiştir (Hansen-Petrik et al., 2002). Genel olarak, FA metabolik enzimlerini hedef alan ilaçlar tümör ilerlemesini yavaşlatabilmektedir.

3.METOT

3.1 FOXO3A Proteininin Klinik Olarak Önemli Varyantlarının İn Silico Analizi

Ensembl biyoinformatik uygulamaları ve veri kümeleri kaynağı FOXO3A geni üzerinde birden fazla konumda bulunabilen etkili SNP'leri belirlemek için kullanılmıştır. Ensembl (www.ensembl.org), insan sağlığı, tarım ve biyolojik çeşitlilikle ilişkili ökaryotik türlere odaklanarak, yaşam ağacındaki genomik verileri entegre eden açık bir platformdur. 2025 yılında temsil edilen türlerin sayısında önemli bir artış yaşanmış; >4800 ökaryotik ve >31.300 prokaryotik genom kullanıcıların kullanımına sunulmuştur (Dyer et al., 2025).. Ensembl' dan elde edilen SNP'lerin FOXO3A geni tarafından kodlanan FOXO3A amino asit zincirinin yapısı ve işlevselliği üzerindeki etkilerini incelemiştir.

3.1.1 FOXO3A SNP'lerinin Taranması

Klinik olarak önemli olduğu belirlenen SNP' lerin patojenitesi Ensembl VEP (Variant Effect Predictor) kullanılarak araştırılmıştır. Ensembl VEP, genetik varyantların biyolojik etkilerini değerlendirmek ve önceliklendirmek için geliştirilmiş bir araçtır.

Ensembl VEP, varyantların (örneğin SNP'ler, insersiyonlar, delesyonlar, kopya sayısı varyantları (CNV'ler) veya yapısal varyantlar) gen transkriptleri, protein dizileri ve düzenleyici bölgeler üzerindeki olası etkilerini CADD, SIFT, REVEL, MetaLR ve Mutation Assessor gibi araçlarla zararlı etkilerini tahmin etmektedir (McLaren et al., 2016).

3.1.2 FOXO3AWT ve FOXO3AMT Protein Yapılarının Oluşturulması ve Karşılaştırılması

Seçilen yüksek riskli SNP'ler NMR yöntemi ile deneysel olarak ortaya konmuş 2K86 PDB referans kodlu yapısı üzerinde SNP'lerin proteinler üzerinde önemli bir etkisi olup olmadığını belirlemek için ChimeraX aracılığı ile oluşturulmuştur. UCSF ChimeraX, UCSF Chimera'nın ardından geliştirilen yeni nesil etkileşimli bir görselleştirme programıdır ve RBVI (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics) tarafından sunulmuştur. ChimeraX kullanıcılarına, yüksek performans ve gelişmiş grafik özellikleri, sık kullanılan araçların iyileştirilmiş sürümleri, sanal gerçeklik ve medikal görüntüleme desteği, kullanıcı dostu arayüz ve bir uygulama mağazası gibi birçok yenilik sunmaktadır (Goddard et al., 2018; Meng et al., 2023; Pettersen et al., 2021).

Wild type FOXO3A ve mutasyonlu yapıların karşılaştırılması için TM-align algoritması kullanılmış, TM-skorları ve RMSD değerleri ölçülmüştür. TM-align algoritması <https://zhanggroup.org/TM-align/> web sunucusunda bulunan TM-align aracılığıyla hesaplandı. Şablon modelleme puanı veya TM puanı, iki protein yapısı arasındaki benzerliğin bir ölçüsüdür. TM puanı, RMSD ölçüsünden daha doğru bir tam uzunluktaki protein yapıları genel benzerliği ölçüsü olarak tasarlanmıştır. TM puanı, iki yapı arasındaki benzerliği (0,1] arasında değişebilen sayılarla ifade eder. Burada 1 iki yapı arasında mükemmel eşleşmeyi gösterir. 0,20'nin altındaki puanlar rastgele seçilmiş ilgisiz proteinlere karşılık gelirken, 0,5'ten yüksek puanlar, iki proteinin yaklaşık olarak aynı kıvrımı paylaştığını gösterir (Y. Zhang & Skolnick, 2004). TM-align, protein dizisinden bağımsız protein yapı karşılaştırmaları için geliştirilmiş bir algoritmadır. Eşdeğerliği bilinmeyen iki protein yapısı arasında, TM-align sezgisel dinamik programlama yinelemeleriyle, önce yapısal benzerliğe dayalı olarak rezidüden rezidüye optimize edilmiş bir hizalama oluşturur. TM-align, hizalamaya dayanarak iki protein yapısının üst üste bindirilmiş halini, RMSD değerini ve TM skorunu verir (Y. Zhang, 2005).

3.1.3 CUPSAT ile Mutasyonların Protein Stabilitesi Ölçümü

Klinik olarak önemli olduğu tespit edilen ve patojenitesi araştırılan seçilmiş SNP'lerin $\Delta\Delta G$ ve protein stabilitesi üzerine etkisinin tahmini için CUPSAT sunucusu kullanılmıştır. CUPSAT (Köln Üniversitesi Protein Stabilite Analiz Aracı), proteinlerdeki nokta mutasyonları (tek amino asit mutasyonları) üzerine stabilite değişikliklerini analiz etmek ve tahmin etmek için kullanılan bir araçtır. Bu araç, tahmin modelini oluşturmak için iri taneli atom potansiyellerini ve burulma açısı potansiyellerini kullanır. Ayrıca model, mutasyonları ve ortalama kuvvet potansiyellerini, mutasyon bölgesinin çözücü erişilebilirliği ve ikincil yapı özgüllüğünü kullanarak farklı yapısal bölgelere sınıflandırır (Parthiban et al., 2006).

3.1.4 Moleküler Dinamik Simülasyon

Wild type ve mutasyonlu FOXO3A protein yapılarının moleküler dinamik (MD) simülasyonları, GROMACS aracılığıyla 10 nanosaniyelik süre boyunca gerçekleştirildi. Proteinler, TIP3P su modeli kullanılarak kübik biçimli bir su kutusuna yerleştirildi. Simülasyonda AMBER99SB-ILDN kuvvet alanı uygulandı. Sistemin net yükü, karşı iyonlar eklenerek nötralize edildi. Tüm simülasyonlar, 300 Kelvin sıcaklık ve 1 atmosfer basınç altında, NPT (sabit parçacık sayısı, basınç ve sıcaklık) koşullarında yürütüldü. Simülasyon sonucunda proteinlerin RMSD (kök ortalama kare sapma), RMSF (kök ortalama kare dalgalanma) ve Rg (dönme yarıçapı) değerlendirildi (Abraham et al., 2015; Van Der Spoel et al., 2005).

3.2. FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Protein Dizilerinin ve 3D Yapılarının Alınması

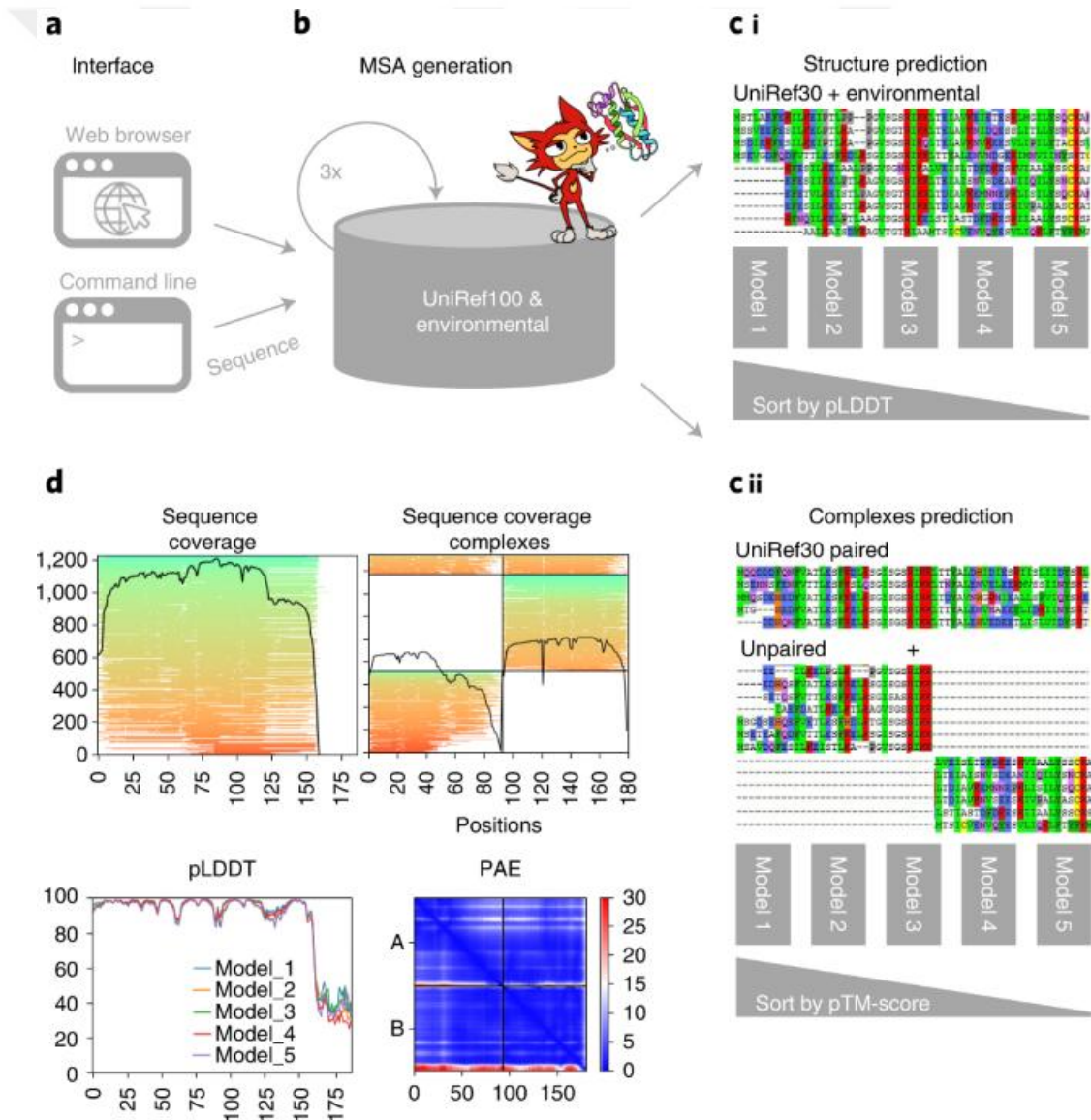
FOXO3A ile potansiyel etkileşimleri araştırmak için yağ asidi metabolizmasına katıldığı bilinen proteinler incelenmiştir. Yağ asidi metabolizmasında görev alan proteinler KEGG PATHWAY veri tabanı (KEGG PATHWAY Database; <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) aracılığıyla belirlenmiştir. KEGG, biyolojik sistemlerin temsili ve analizi için bir veritabanı kaynağıdır. Yol haritaları, hücrenin ve organizmanın moleküler etkileşim ve reaksiyon ağları açısından sistemik işlevlerini temsil eden KEGG'deki birincil veri kümesidir. KEGG Ortoloji (KO) sistemi, genleri ve proteinleri yol haritalarına ve diğer moleküler ağlara bağlamak için bir mekanizmadır (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa, 2019; Kanehisa et al., 2025). FOXO3A ve yağ asidi metabolizmasına katılan proteinler için FASTA formatlı aminoasit dizileri spesifik erişim numaraları kullanılarak Evrensel Protein Kaynağı (The Universal Protein Resource) (UniProt; <https://uniprot.org>) veri tabanından elde

edilmiş, her protein için varsayılan (kanonik) amino asit dizisi seçilmiştir (Ek Tablo 1.). UniProt veritabanı, protein dizisi ve işlevsel bilgi için önde gelen bir küresel veri kaynağı olarak hizmet vermektedir. Veri kaynağının moleküler biyolojinin temelini oluşturmada uzun süredir devam eden kritik rolü, UniProt'un Aralık 2022'de Küresel Temel Biyoveri Kaynağı statüsüne (<https://globalbiodata.org>) layık görülen ilk veritabanlarından biri olmasıyla fark edilmiştir (Bateman et al., 2025). FOXO3A ve yağ asidi metabolizmasına katılan potansiyel etkileşim adaylarının 3D protein yapıları, AlphaFold Protein Yapı Veri Tabanından (Protein Structure Database; <https://alphafold.ebi.ac.uk/>) alınmıştır (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024)

3.3. Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Belirlenmesi

Aralarındaki etkileşimi belirlemek amacıyla seçilen 42 yağ asidi metabolizmasında görevli proteinin ve FOXO3A'nın Uniprot'dan elde edilen FASTA formatlı dizileri, FOXO3A ile kompleksler oluşturacak biçimde varsayılan parametreler kullanılarak yapı tahmini için ColabFold'a girdi olarak verildi. Her potansiyel etkileşim için beş model oluşturuldu ve öngörülen arayüz şablonu modelleme (ipTM) puanlarına göre sıralandı. ColabFold proteinlerin 3D yapısını dizi bilgilerini kullanarak tahmin eden derin öğrenme temelli, komut satırı arayüzü sunan açık kaynaklı bir yazılımdır. DeepMind tarafından geliştirilen AlphaFold2'nin (AF2) güncel ve optimize edilmiş modelini temel almaktadır. Hem tekil proteinler hem de protein kompleksleri üzerinde çalışabilir. Şeffaflık ve tekrarlanabilirlik açısından açık kaynaklı bir yazılım olması, web tabanlı Google Colaboratory Notebook üzerinden kullanılabilmesinin getirdiği kullanım kolaylığı ve ücretsiz olması ColabFold'un tercih edilme sebeplerindendir. Sıralama eşleme için MMseq2 tabanlı, homoloji arama sunucu kullanılmaktadır. Bu da MSA'nın (çoklu dizi hizalaması) çok daha hızlı yapılabilmesini sağlamaktadır. Ek olarak homoloji taraması ColabFoldDB gibi protein veri tabanları ile çevrimiçi yapılmaktadır. Bu da kullanıcıların büyük protein veri tabanlarını bulundurmalarını gerektirmez. Alphafold'a yakın doğruluk oranında ve hızlı sonuçlar üretilmesini sağlar. ColabFold çalışma prensibi Şekil 14'de verilmiştir. Bu analizde kullanılan hesaplama donanımı, veri merkezleri ve yapay zeka uygulamaları için tasarlanmış yüksek performanslı bir GPU olan NVIDIA A100-SXM4-40GB grafik işlemcisidir. Bu grafik işlemcisi özellikle büyük proteinler için çok uygundur. Güven ölçütü olarak Tahmin edilen Yerel Mesafe Farkı Testi (Predicted Local Distance Difference Test- pLDDT), Tahmini Hizalanma Hatası (Predicted Aligned Error - PAE) ve Zincirler arası tahmini TM skoru (inter-chain predicted TM-score-ipTM) skorları kullanılmıştır.

pLDDT, tahmin edilen rezidü ile etkileşime giren komşu rezidü arasındaki mesafeyi referans yapı ile uyumlu olarak tahmin eder. Rezidü başına etkileşim güvenilirliği 0 ile 100 arasında bir ölçekte temsil edilir ve 100 yüksek doğruluğu gösterir. Tahmin edilen hizalanma hatası (PAE) puanı, referansa göre tahmin edilen etkileşimli rezidü arasındaki mesafe hatasını verir. PAE hata grafiği, referansla tahmin edilen etkileşim doğruluğunun 2D etkileşim görünümünü gösterir. Zincirler arası tahmini TM skoru (ipTM) puanı protein-protein kompleksini oluşturan alt birimlerin öngörülen göreceli konumlarının doğruluğunu ölçer. FOXO3A ve yağ asidi metabolizmasında görev alan potansiyel etkileşim adaylarının UniProt ve Alphafold veri tabanı spesifik erişim numaraları Tablo 6’da verilmiştir.



Şekil 14. ColabFold çalışma prensibi (Mirdita et al., 2022).

3.4. FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin 3D Protein Yapılarının Doğrulaması ve Kalite Analizi

İPTM skoru 0.5' in üzerinde olan her bir kompleksteki potansiyel etkileşim adayının 3D protein modeli için doğrulama ve kalite analizleri yapılmıştır. ColabFold tarafından üretilen modellerin her biri PDB' den alınan ilgili referans yapılarla karşılaştırıldı. ACSL-1 proteini için deneysel bir yapı bulunmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. RMSD ölçümleri ve TM skorları <https://zhanggroup.org/TM-align/> web sunucusunda bulunan TM-Align aracılığıyla hesaplandı.

Ek olarak kalite güvenilirlik tespit araçlarıyla analizler yapılmıştır. ERRAT, kristalografi ile belirlenen protein yapılarını doğrulamak için kullanılan bir biyoinformatik araçtır. Hata değerleri, kayan bir 9 rezidülik pencerenin konumuna göre grafik üzerinde gösterilir. Hata fonksiyonu, yapıdaki bağırsız atom-atom etkileşimlerinin istatistiklerine dayanır ve güvenilir, yüksek çözünürlüklü yapılardan oluşan bir veritabanı ile karşılaştırılarak hesaplanır (Colovos & Yeates, 1993).

PROCHECK, bir protein yapısının stereokimyasal kalitesini kontrol ederek, genel ve rezidü-rezidü geometrisini analiz eden bir dizi PostScript çizimi üretir. Ayrıca, proteinlerin yapı kalitesinin tahminini kontrol etmek için PROCHECK Ramachandran grafikleri kullanılmıştır (Laskowski et al., 1993, 2012).

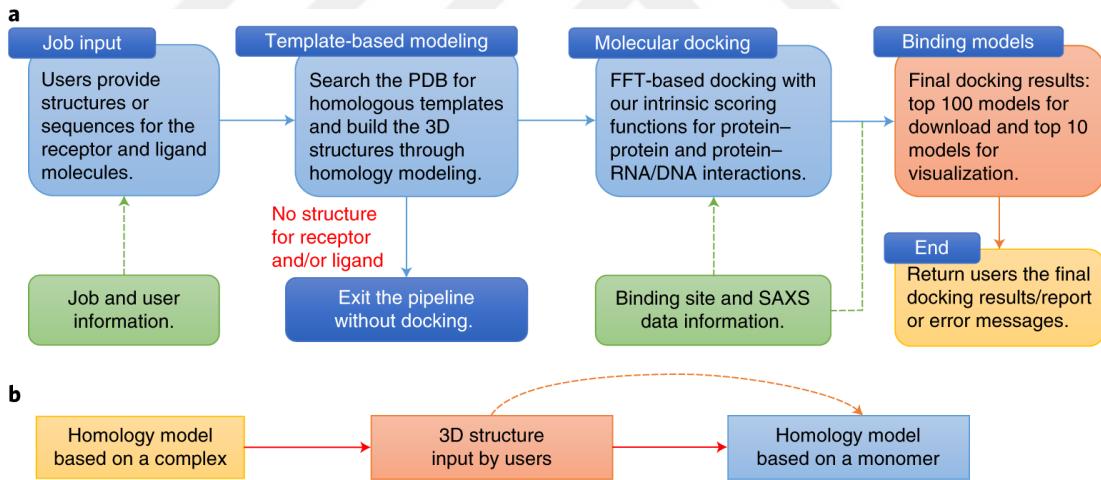
3.5. Bağlanma Arayüzü Analizi

İki proteinin potansiyel etkileşim yüzeylerini ve aralarındaki potansiyel hidrojen bağlarını analiz etmek amacıyla, öncelikle her iki proteine ait üç boyutlu yapılar ColabFold v1.5.2 (Mirdita et al., 2022) kullanılarak tahmin edildi. Modelleme işlemi sırasında AlphaFold2-Multimer algoritması tercih edilerek, proteinler arası kompleks formu elde edildi. Elde edilen model .pdb formatında indirildikten sonra UCSF ChimeraX (v1.6) yazılımına yüklendi. Hidrojen bağları tespiti için Tools → Structure Analysis → Hydrogen Bonds modülü kullanıldı. Analiz sırasında intermodel (model 1 ve model 2 arasındaki) ve intramodel (her bir modelin içindeki) bağlar ayrı ayrı değerlendirildi. Parametreler olarak bağ tanımı için distance tolerance: 0.4 Å ve angle tolerance: 20° değerleri seçildi; bu da varsayılan geometri dışında düşük enerjili, fizyolojik olarak anlamlı bağların da tespit edilmesine olanak sağladı. Sonuçlar, etkileşim arayüzü karakterizasyonu ve potansiyel bağlanma bölgelerinin değerlendirilmesinde kullanıldı (Goddard et al., 2018; Meng et al., 2023; Pettersen et al., 2021).

3.6. HDOCK ve HawkDock ile FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerinin Moleküler Yerleştirilmesi

Potansiyel etkileşim partneri olduğu düşünülen proteinlerle FOXO3 proteininin arasındaki ilişkiyi geleneksel docking araçlarından biri ile doğrulamak amacıyla HDOCK ve HawkDock ile protein çiftleri arasında moleküler yerleştirme yapılmıştır.

HDOCK sunucusu (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) protein-protein yerleştirme için homoloji arama, şablon tabanlı modelleme, yapı tahmini, makromoleküler yerleştirme, biyolojik bilgi birleştirme ve iş yönetiminin entegre bir paketini sunar. Reseptör ve ligand molekülleri (amino asit dizileri veya Protein Veri Bankası yapıları) için kullanıcı tarafından verilecek giriş bilgileriyle, sunucu, şablon tabanlı ve şablonsuz moleküler yerleştirmenin hibrit bir algoritması aracılığıyla otomatik olarak etkileşimlerini tahmin eder. HDOCK sunucusu, benzer moleküler yerleştirme sunucularından, amino asit dizilerini giriş olarak destekleyebilme yeteneği ve protein–protein bağlanma bölgesi hakkında deneysel bilgilerin ve küçük açılı X-ışını saçılım verilerinin yerleştirme ve sonrasındaki süreçlerde entegre edilebildiği hibrit bir yerleştirme stratejisi ile ayrılır (Şekil 15) (Yan et al., 2020).



Şekil 15. HDOCK sunucusunun prosedürü.

- a)** HDOCK sunucusu tarafından kullanılan iş akışı, dört aşamayı içerir: iş girişi, şablon tabanlı modelleme ve yapı tahmini, moleküler yerleştirme ve nihai sonuçların teslimi. Yeşil kutulardaki adımlar isteğe bağlıdır. **b)** HDOCK sunucusu tarafından yerleştirme için kullanılan 3D yapıların öncelik sırası, burada proteinin 'hibrit' ve 'şablonsuz' yerleştirme modlarındaki sıraları sırasıyla kırmızı dolu ve turuncu kesikli oklarla gösterilir (Yan et al., 2020).

HawkDock, protein-protein etkileşimlerinin üç boyutlu yapısını tahmin etmek ve analiz etmek amacıyla geliştirilmiş, bir web sunucusudur. HawkDock, ATTRACT rijit-gövde docking algoritması ile çok sayıda bağlanma pozisyonu üretmekte, ardından HawkRank isimli, MM/GBSA'ya benzer enerji terimleri içeren hızlı bir fiziksel skorlama fonksiyonu ile en olası bağlanma pozisyonlarını seçmektedir. En iyi modeller üzerinde ise MM/GBSA yöntemi uygulanarak bağlanma serbest enerjisi hesaplanmakta ve per-rezidü enerji ayrıştırması ile bağlanma arayüzündeki kritik kalıntılar belirlenmektedir (Weng et al., 2019).

3.7. Bölge – Spesifik Mutageniz

FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin oluşturduğu modeller, FOXO3A mutasyonlarının protein-protein etkileşimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için kullanıldı. Vahşi tip protein kompleksinin bağlanma serbest enerjisi ve mutasyon üzerine bağlanma serbest enerjisindeki değişim, BeAtMuSiC, tahmin aracı kullanılarak ölçüldü. BeAtMuSiC (<http://babylone.ulb.ac.be/beatmusic>), nokta mutasyonları tarafından indüklenen bağlanma serbest enerjisindeki değişikliklerin kaba taneli bir öngörücüsüdür. Bilinen protein yapılarından türetilen bir dizi istatistiksel potansiyele dayanır ve mutasyonun arayüzdeki etkileşimlerin gücü ve kompleksin genel kararlılığı üzerindeki etkisini birleştirir. BeAtMuSiC sunucusu, girdi olarak protein-protein kompleksinin yapısını gerektirir ve bir protein zincirindeki veya arayüzdeki tüm olası mutasyonları, mevcut en iyi metodolojilerle uyumlu tahmin performanslarıyla hızlı bir şekilde değerlendirme olanağı sağlar (Dehouck et al., 2013).

3.8.Evrimsel Korunma Analizi

ColabFold ile tahmin edilen FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin oluşturduğu komplekslerin, etkileşimli bölgelerinin işlevselliği açısından daha fazla değerlendirilebilmesi için söz konusu proteinlerin evrimsel olarak korunan bölgeleri ConSurf sunucusu ile değerlendirilmiştir. ConSurf web sunucusu, proteinlerin ve nükleik asitlerin evrimsel olarak korunmuş bölgelerini tahmin eder. Bir sorgu dizisi veya pdb/mmCIF formatlı bir sorgu yapısı verildiğinde ConSurf otomatik olarak çoklu dizi hizalaması (MSA) oluşturur. Olasılıksal evrimsel modeller kullanarak bir ağaç oluşturur ve homologlar arasındaki filogenetik ilişkileri göz önünde bulundurarak bölge başına evrimsel oran tahmin eder. Güvenilirlik ölçüsü olarak tahmini oranlar etrafında güven aralıkları atar. ConSurf daha sonra oranları evrimsel derecelere

kümeler ve bu dereceleri sorgu dizisine veya yapısına eşler. ConSurf her bir aminoasite bir korunmuşluk skoru atar ve bu skorları renklerle ifade eder. Koyu mor tonlar, 8 veya 9 skorunu alır ve yüksek düzeyde korunmuşluğu ifade eder. Orta renkleri yani açık pembe ve beyaz tonları 4 ile 6 arası skorları alır ve bu renkle ifade edilen bölgelerin orta düzeyde korunmuş olduğunu ifade eder. Yeşil ve açık mavi arasındaki tonlar 1 ile 3 arası skorlara sahiptir ve değişken, korunmamış bölgeleri ifade eder. Son olarak, söz konusu bir pozisyonla ilgili yeterli veri olmadığı durumlarda ConSurf o bölgeyi sarı renkle işaretler ve güvenilir bir evrimsel korunmuşluk skoru hesaplanamadığı anlamına gelir. Eşlenen dereceler sıklıkla sorgu yüzeyindeki evrimsel olarak korunan alanları gösterir ve bu alanlar genellikle makromolekül biyolojik olarak işlevsel bölgeleri olma eğilimindedir (Ashkenazy et al., 2010, 2016; Celniker et al., 2013; Yariv et al., 2023).

3.9. Moleküler Dinamik Simülasyon

ColabFold aracılığıyla oluşturulan ve HDOCK aracılığıyla etkileşimi doğrulanan modelin GROMACS aracılığıyla moleküler dinamik simülasyonu gerçekleştirildi. AMBER99SB-ILDN kuvvet alanı aracılığıyla protein komplekslerinin bağlanma kararlılığı değerlendirildi (Lindorff-Larsen et al., 2010). MD simülasyonu, üç aşamada gerçekleştirildi. Birincisi, sistem nötralizasyonu, ikincisi sistem enerjisinin en aza indirilmesi ve son olarak sistemin dengelenmesi. Sistem, 1,2 nanometrelik bir kübik kutuda TIP3 su modeli kullanılarak çözüldü. Enerji minimizasyonu için sistemi nötralize etmek üzere sodyum iyonu (Na^+) eklendi. Sistem dengelenmesi için Parçacıklar Ağ Ewald (PME) elektrostatik yaklaşımı kullanıldı 10 nanosaniyelik (ns) MD simülasyonları, sistemler 300 Kelvin (K) sabit sıcaklıkta dengeye getirildikten sonra gerçekleştirildi. Kök ortalama kare sapma (RMSD), dönme yarıçapı (R_g), H-bağı ve gibi temel metrikler ölçüldü. (Abraham et al., 2015; Van Der Spoel et al., 2005).

3.10. İşsel Bozukluk Analizi

3.10.1. Amino asit Başına Rezidü Bozukluğu Tahmini

FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin amino asit başına kalıntı bozukluğu tahmini PONDR VLS2 (Obradovic et al., 2005; Peng et al., 2006), PONDR VL3 (PENG et al., 2005), PONDR VLXT (Romero et al., 2001), PONDR® FIT (Xue et al., 2010) ve ayrıca IUPred-Long ve IUPred-Short' de (Mészáros et al., 2018) dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan bir dizi rezidü başına bozukluk öngörücüsü kullanılarak

amino asit bazında ölçüldü. Her öngörücünün sonuçlarını toplu olarak gösterebilmek için Hızlı İçsel Bozukluk Analizi Çevrimiçi (RIDAO) (Dayhoff & Uversky, 2022) adı verilen bir web uygulaması kullanıldı. Bu analizlerde 0 en düzenli ölçüm, 1 ise en düzensiz ölçümdür. Proteinlerin genel yüzde bozukluğunu oluşturmak için PONDR sunucusu kullanıldı. Burada, proteinleri yüksek derecede düzenli ($PPDR < \%10$), orta derecede düzensiz ($\%10 \leq PPDR < \%30$) ve yüksek derecede düzensiz ($PPDR \geq \%30$) olarak sınıflandırılır (Djulbegovic et al., 2023).

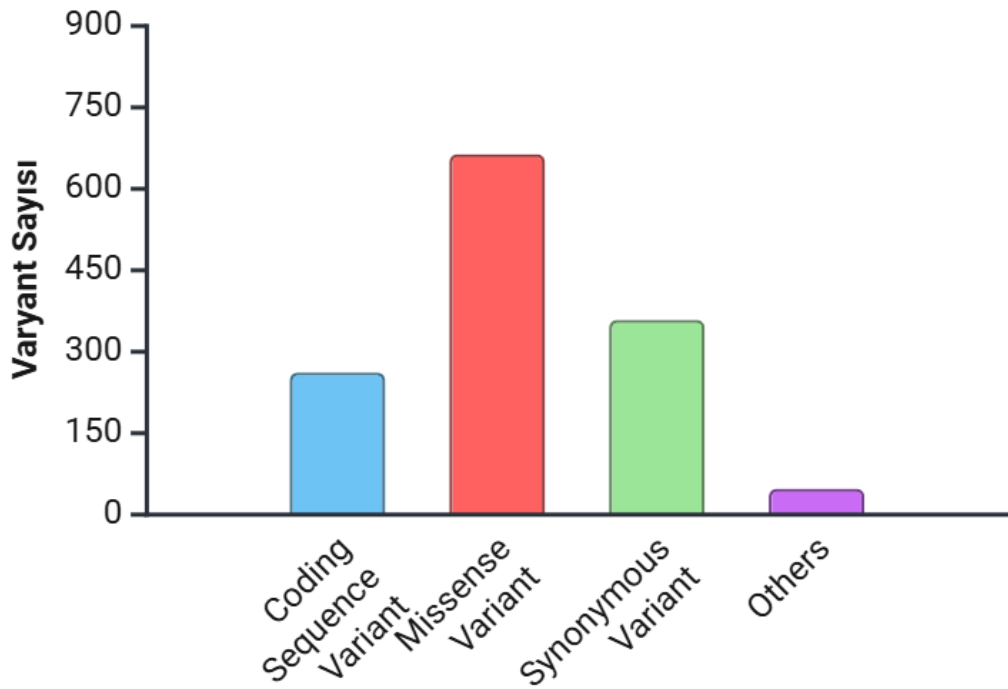
3.10.2. Bozukluğa Dayalı İşlevselliğin Değerlendirilmesi

Proteinlerin bozukluğa bağlı işlevselliği, Bozuk Protein Tahmini Veri Tabanı (D2P2) platformu (<http://d2p2.pro/>) ile değerlendirilmiştir (Oates et al., 2012). D2P2 platformu IUPred (Dosztanyi et al., 2005), PONDR VLXT (Romero et al., 2001), PONDR VSL2B (Obradovic et al., 2005; Peng et al., 2006), PrDOS (Ishida & Kinoshita, 2007), PV2 (Oates et al., 2012) ve ESpritz (Walsh et al., 2012) araçlarını entegre eder ve bu da bozukluk tahmininin birleştirilmiş bir görselleştirilmesine olanak tanır. D2P2 sunucusu aynı zamanda Proteinlerin Yapısal Sınıflandırmasını (SCOP) (Andreeva, 2004; Murzin, 1995) ve ilgilenilen diziler için SUPER FAMILY (de Lima Morais et al., 2011) öngörücüsünü de bünyesinde barındırır. D2P2 aynı zamanda ANCHOR algoritması (Mészáros et al., 2009) ile bozukluğa dayalı bağlanma bölgelerini de tahmin etmektedir. ANCHOR tarafından tanımlanan bu bölgeler, bağlanmamış formda düzensiz olan ve belirli ortaklarla etkileşime girdiğinde düzenli yapılara katlanması beklenen düzensizlik bazlı bağlanma bölgelerini temsil eder. Son olarak, D2P2 platformu ayrıca PhosphoSitePlus'ın çıkışlarını kullanarak olası translasyon sonrası (PTM'ler) değişiklikleri de tahmin eder.

4.SONUÇLAR

4.1 FOXO3A' nın Dizisi ve SNP'lerinin Alınması

Ensembl biyoinformatik uygulamaları ve veri kümeleri kaynağı, FOXO3A geni üzerinde birden fazla konumda bulunabilen etkili SNP'leri belirlemek için kullanılmıştır. SNP'lerin FOXO3A geni tarafından kodlanan FOXO3A amino asit zincirinin yapısı ve işlevselliği üzerindeki etkilerini incelemiştir. Tespit edilen varyantların türlerine göre dağılımı Şekil 16' te verilmiştir.



Şekil 16. FOXO3A geninde tespit edilen varyantların sınıflarına göre dağılımı.

4.2 FOXO3A SNP'lerinin Taranması

Ensembl VEP (Variant Effect Predictor), varyantların (örneğin SNP'ler, insersiyonlar, delesyonlar, kopya sayısı varyantları (CNV'ler) veya yapısal varyantlar) gen transkriptleri, protein dizileri ve düzenleyici bölgeler üzerindeki olası etkilerini tahmin etmektedir. CADD, SIFT, REVEL, MetaLR ve Mutation Assessor gibi araçla söz konusu SNP'lerin zararlı etkilerini tahmin etmektedir. Zararlı etki skorlarını belirlemek ve en patojenik SNP'leri tanımlamak amacıyla Ensembl' dan elde edilen

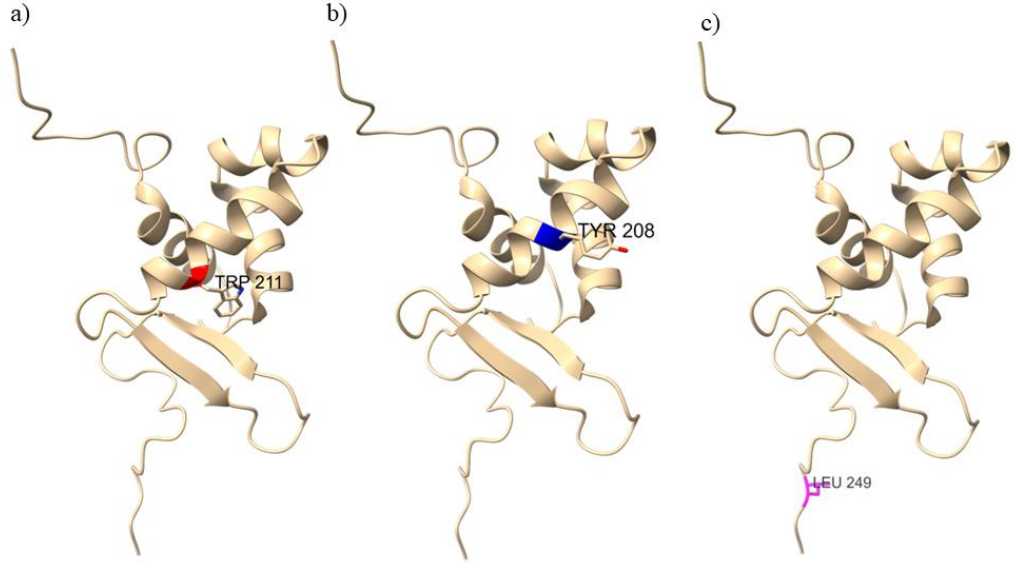
1326 SNP' den rs1179696676, rs1362988141 ve rs770039850 olmak üzere 3 adet missense varyant seçilmiştir. Skorları Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6. FOXO3A proteini üzerindeki yüksek riskli SNP'lerin yapısal konumları ve patojenite skorları.

Rezidü	Mutasyon	Varyant ID	Tip	SI FT	CADD	REVEL	MetaLR	Mutation Assessor
208	N,Y	rs1179696676	missense varyant	0	31	0.929	0.952	0.987
211	R,W	rs1362988141	missense varyant	0	33	0.946	0.974	0.988
249	R,L	rs770039850	missense varyant	0	31	0.938	0.932	0.935

4.3 FOXO3AWT ve FOXO3AMT Protein Yapılarının Oluşturulması ve Karşılaştırılması

Seçilen yüksek riskli SNP'ler 208, 211 ve 249. aminoasitlerdedir. Bu aminoasitler daha önce NMR yöntemi ile deneysel olarak ortaya konmuş 151-251 aminoasitler arasında olan 2K86 PDB referans kodlu yapıda bulunmaktadır. SNP' lerin proteinler üzerinde önemli bir etkisi olup olmadığını belirlemek için, 2K86 üzerinde ChimeraX aracılığı ile mutasyonlar oluşturulmuştur (Şekil 17). FOXO3A proteininin mutant modellerle yapısal karşılaştırmasını yapmak için TM-align sunucusu kullanılmıştır. N208Y, R211W, R249L mutasyonlarının TM-skorları sırasıyla 1, 1, 1 ve RMSD skorları sırasıyla 0, 0, 0' dır. Yapısal değişiklik gözlenmemiştir.



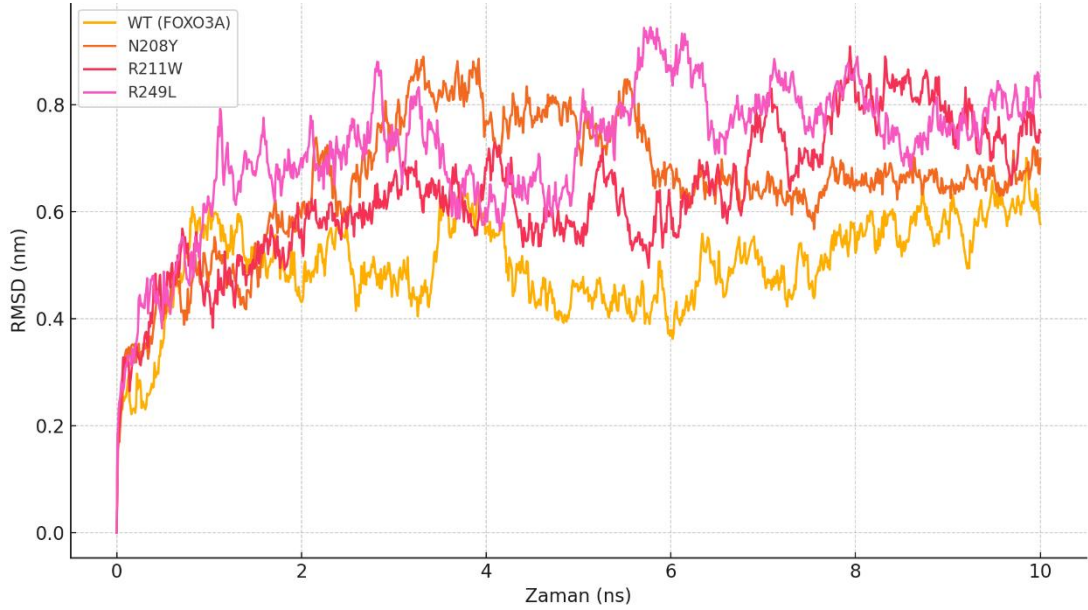
Şekil 17. 2K86 yapısı üzerinde yer alan yüksek riskli SNP'lerin konumları.

Görselde, insan FOXO3A proteininin 151-251 arası aminoasitlerini içeren NMR ile belirlenmiş yapısı (PDB: 2K86) gösterilmektedir. a) TRP211, b) TYR208 ve c) LEU249 kalıntıları, ChimeraX kullanılarak oluşturulan mutasyon modellerinde renkli olarak vurgulanmıştır.

4.4 CUPSAT ile Mutasyonların Protein Stabilitesi Ölçümü

Üç SNP, $\Delta\Delta G$ ve protein stabilitesi tahmini için CUPSAT sunucusuna gönderildi. 208. Pozisyondaki ASN' nin TYR' ye mutasyonu sonucunda 0,2 $\Delta\Delta G$ değeri ile proteinin stabilize olabileceği tahmin edilmektedir. 211. Pozisyondaki ARG'nin TRP' ye mutasyonu -0,38 $\Delta\Delta G$, R249L mutasyonu -1,46 $\Delta\Delta G$ skoru ile protein stabilizasyonunu azaltmıştır.

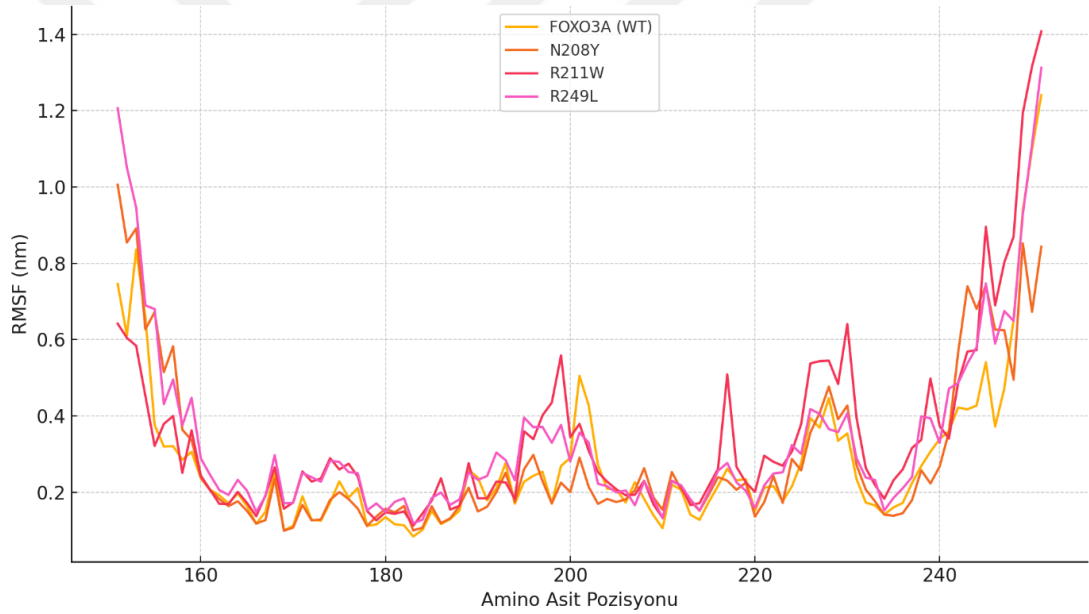
4.5 FOXO3AWT ve FOXO3AMT Protein Yapılarının Moleküler Dinamik Simülasyonu



Şekil 18. FOXO3A wild-type (WT) ve mutant proteinlerinin 10 ns’lik moleküler dinamik simülasyonu boyunca kök ortalama karesel sapma (RMSD) değerlerinin karşılaştırılması.

RMSD analizi, FOXO3A proteininin wild-type (WT) formu ile üç farklı patojenik mutant (N208Y, R211W, R249L) arasındaki yapısal kararlılığı karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. WT proteini simülasyon boyunca 0.4–0.6 nm arasında stabil bir RMSD profili sergilemiş konformasyonunu korumuştur. N208Y yaklaşık 0.6–0.75 nm aralığında RMSD puanlarına sahip olup, yapısal esnekliği vahşi tipe göre daha fazladır. R211W mutasyonu daha yüksek ve düzensiz RMSD değerleri (~0.65–0.8 nm) sergilemiştir. Bu da mutasyonun proteinin stabilitesini daha fazla etkilediğine işaret etmektedir. En belirgin fark ise R249L mutasyonunda gözlemlenmiştir. Bu mutant yaklaşık 0.75–0.9 nm aralığında en yüksek RMSD değerlerine sahiptir. Bu da yapıyı ciddi derecede bozduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, özellikle R249L varyantının FOXO3A proteininin dinamiklerini belirgin biçimde değiştirdiğini ve fonksiyonel etkiler yaratabileceğini göstermektedir. RMSD değerinin yüksek olması, proteinin doğal konformasyonundan uzaklaştığını ve yapısal bozulmaların meydana geldiğini gösterir. R249L mutasyonu en yüksek RMSD değerlerini (~0.75–0.9 nm) sergileyerek FOXO3A'nın yapısal bütünlüğünü en fazla bozan varyanttır. Bu durum, R249L'nin proteinin işlevsel bölgelerinde konformasyonel değişikliklere yol açarak

transkripsiyonel aktivitesini veya protein-protein etkileşimlerini bozabileceğini ve dolayısıyla yüksek patojenite potansiyeli taşıdığını göstermektedir. R211W mutasyonu da yüksek ve düzensiz RMSD profiline sahiptir. Bu mutasyonun, proteinin genel stabilitesini azaltarak hücresel fonksiyonları etkileyebileceği ve hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. N208Y mutasyonu ise vahşi tipe kıyasla daha az bir RMSD artışı göstermiştir. Bu da yapıyı orta düzeyde etkilediğini, ancak yine de potansiyel olarak patojenik olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, RMSD analizine göre özellikle R249L ve R211W mutasyonları, FOXO3A proteininin yapısal kararlılığını bozarak fonksiyon kaybına neden olabilecekleri için yüksek patojenite riski taşımaktadır. Bu bulgular, in silico patojenite skrolama araçlarından elde edilen verilerle de uyumlu bir şekilde bu varyantların hastalıkla ilişkili olabileceğini desteklemektedir (Şekil 18).



Şekil 19. FOXO3A wild-type (WT) ve mutant (N208Y, R211W, R249L) proteinlerinin RMSF (Root Mean Square Fluctuation) değerlerinin amino asit pozisyonlarına göre karşılaştırılması.

Şekil 19’ da, FOXO3A proteininin wild-type (WT) ve üç patojenik mutant formunun (N208Y, R211W, R249L) moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen RMSF (Root Mean Square Fluctuation) değerleri karşılaştırılmaktadır. RMSF, her bir amino asidin zaman içindeki ortalama pozisyonel sapmasını göstererek lokal esnekliği anlatan bir değerdir. WT yapısı genel olarak 0.2–0.6 nm aralığında düşük RMSF değerleriyle daha stabil bir profil sergilerken, özellikle R249L mutantında N-terminal

ve C-terminal bölgelerde belirgin artışlar (~1.0–1.4 nm) gözlemlenmektedir. Bu, proteinin uç bölgelerinde yüksek esneklik ve potansiyel konformasyonel bozulmalar olduğunu gösterir. Aynı şekilde, R211W ve N208Y mutantları da belirli bölgelerde (özellikle 200–220 aminoasit ve 240 aminoasit sonrası) WT'ye kıyasla daha yüksek RMSF değerleri göstermektedir. Özellikle 208 ve 211. pozisyonların çevresinde RMSF artışı, bu mutasyonların yapısal stabiliteyi bozduğuna işaret etmektedir. R249L mutasyonunda ise etkilenme sadece lokal değil, proteinin genel dinamik profiline yayılmıştır. Grafikte görüldüğü üzere, R249L mutasyonu, FOXO3A'nın C-terminal bölgesi, nükleer lokalizasyon sinyalleri ve transkripsiyonel düzenleyici motifleri içerebildiğinden, bu bölgede gözlenen hareketlilik artışı proteinin hücresel lokalizasyonunu ve hedef genlere bağlanma kabiliyetini doğrudan etkileyebilir. Bu da R249L mutasyonunun yüksek patojenite potansiyeli taşıdığını gösterir. R211W ve N208Y mutasyonları da bazı bölgelerde (özellikle 200–220 arası) RMSF değerlerini artırmıştır. Bu pozisyonlar, FOXO3A'nın Forkhead domainin merkezine yakın konumda bulunur. Bu bölgede oluşan esneklik artışı, DNA bağlanma kapasitesinde azalma, hedef gen ekspresyonunun bozulması ve dolayısıyla hücresel yanıtların sekteye uğraması gibi patojenik sonuçlara yol açabilir. Sonuç olarak, RMSF analizi; özellikle R249L mutasyonunun geniş yapısal bozulmaya ve fonksiyonel bölgelerde esneklik artışına yol açtığını, R211W ve N208Y mutasyonlarının ise lokal stabiliteyi bozarak fonksiyonel risk oluşturduğunu göstermektedir. Bu veriler, yapısal dinamizmin artmasının fonksiyon kaybı ile ilişkili olabileceğini ve bu mutasyonların potansiyel olarak hastalıkla ilişkili olabileceğini göstermektedir.



Şekil 20. FOXO3A wild-type (WT) ve mutant (N208Y, R211W, R249L) proteinlerinin 10 ns boyunca hesaplanan gyration yarıçapı (Rg) değerlerinin karşılaştırılması.

Grafikte FOXO3A proteininin wild-type (WT) formu ile üç farklı mutan (N208Y, R211W, R249L) için 10 ns boyunca hesaplanan gyration yarıçapı (Rg) değerleri karşılaştırılmaktadır. Rg, proteinin kompaktlık düzeyini gösteren bir parametredir; daha yüksek Rg değerleri, yapının daha gevşek, daha düşük Rg değerleri ise daha kompakt olduğunu ifade eder. FOXO3A WT yapısı boyunca Rg değeri yaklaşık 1.55–1.65 nm aralığında sabit seyrederek proteinin stabil ve kompakt bir konformasyon koruduğunu göstermektedir. N208Y mutasyonu, WT'ye benzer şekilde görece düşük ve sabit Rg değerleri (~1.5–1.6 nm) göstermektedir, bu da yapısal kompaktlığın fazla bozulmadığını ve bu mutasyonun proteinin katlanma durumunu ciddi şekilde etkilemediğini düşündürür. R211W mutan, zaman zaman 1.75 nm üzerine çıkan Rg dalgalanmalarıyla WT'ye kıyasla daha az kompakt bir yapı sergilemektedir. R249L mutasyonu, simülasyonun ilk yarısında oldukça yüksek Rg değerleri (~1.8 nm'ye kadar) göstererek proteinin önemli ölçüde açıldığını ve gevşediğini ortaya koymuştur. Zamanla bir miktar kompaktlaşsa da Rg değeri WT'ye göre genellikle daha yüksektir.

R249L mutanında görülen gevşeme, FOXO3A'nın nükleer lokalizasyonu, DNA'ya bağlanma yetisi ve diğer proteinlerle olan etkileşimleri gibi fonksiyonlarını bozabilir. Dolayısıyla, R249L mutasyonu Rg analizi açısından yüksek patojenite potansiyeline

sahiptir. Benzer şekilde, R211W mutasyonu da RMSF değerlerinde dalgalanmalar göstermiştir ve bu da yapısal bütünlükte dalgalanmalara ve potansiyel fonksiyonel bozukluklara işaret eder. Özellikle bu mutasyonun Forkhead DNA-bağlayıcı bölgesine yakın olması, yapısal gevşemenin fonksiyonel etkisini daha önemli hale getirmektedir. Buna karşılık, N208Y mutasyonu WT ile benzer Rg profili sergileyerek yapısal kompaktlık açısından daha az etkili bir değişim olduğunu göstermiştir (Şekil 19).

4.6. FOXO3A ve Yağ Asidi Metabolizmasına Katılan Proteinlerin Dizi ve Üç Boyutlu Yapılarının Alınması

Yağ asidi metabolizmasında görevli çeşitli proteinler ve bir tümör supressör olan FOXO3A'nın etkileşimini araştırmak için çalışmamız, yağ asidi metabolizmasında görevli olduğu bilinen çeşitli adaylar arasında FOXO3A ile etkileşime giren proteinleri tanımlamayı amaçlamaktadır. Bu proteinlere ait Uniprot ve AlphaFold veri tabanı spesifik erişim numaraları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. FOXO3A ve KEGG Pathway veri tabanından seçilen proteinlere ait UNIPROT ve AlphaFold veri tabanı erişim numaraları ve adları.

Sıra No.	Uniprot Erişim Numarası	AlphaFold Erişim Numarası	Protein Adı	Protein Adı
1	P54619	AF-P54619-F1-v4	AAKG1	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1
2	Q13085	AF-Q13085-F1-v4	ACACA	Acetyl-CoA carboxylase 1
3	O00763	AF-O00763-F1-v4	ACACB	Acetyl-CoA carboxylase 2
4	P28330	AF-P28330-F1-v4	ACADL	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
5	P11310	AF-P11310-F1-v4	ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
6	P16219	AF-P16219-F1-v4	ACADS	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial

7	P45954	AF-P16219-F1-v4	ACADSB	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
8	P49748	AF-P49748-F1-v4	ACADVL	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial[...]
9	P24752	AF-P24752-F1-v4	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
10	P53396	AF-P53396-F1-v4	ACLY	ATP-citrate synthase
11	Q86TX2	AF-Q86TX2-F1-v4	ACOT1	Acyl-coenzyme A thioesterase 1
12	P49753	AF-P49753-F1-v4	ACOT2	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial
13	Q8N9L9	AF-Q8N9L9-F1-v4	ACOT4	Peroxisomal succinyl-coenzyme A thioesterase
14	Q15067	AF-Q15067-F1-v4	ACOX1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
15	Q9NR19	AF-Q9NR19-F1-v4	ACSA	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic
16	Q4G176	AF-Q4G176-F1-v4	ACSF3	Malonate--CoA ligase ACSF3, mitochondrial
17	P33121	AF-P33121-F1-v4	ACSL1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1
18	P07327	AF-P07327-F1-v4	ADH1A	Alcohol dehydrogenase 1A
19	Q15848	AF-Q15848-F1-v4	ADIPO	Adiponectin
20	P05091	AF-P05091-F1-v4	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
21	Q7Z449	AF-Q7Z449-F1-v4	CP2U1	Cytochrome P450 2U1

22	Q53GQ0	AF-Q53GQ0-F1-v4	DHB12	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase
23	Q92506	AF-Q92506-F1-v4	DHB8	(3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
24	P40939	AF-P40939-F1-v4	ECHA, HADH, HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial
25	P55084	AF-P55084-F1-v4	ECHB, HADHB	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial
26	P30084	AF-P30084-F1-v4	ECHM, ECHS1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial
27	Q08426	AF-Q08426-F1-v4	ECHP, EHHADH	Peroxisomal bifunctional enzyme
28	Q9NXB9	AF-Q9NXB9-F1-v4	ELOVL2	Very long chain fatty acid elongase 2
29	P15090	AF-P15090-F1-v4	FABP4	Fatty acid-binding protein, adipocyte
30	O15540	AF-O15540-F1-v4	FABP7	Fatty acid-binding protein, brain
31	P49327	AF-P49327-F1-v4	FASN	Fatty acid synthase
32	O43524	AF-O43524-F1-v4	FOXO3A	Forkhead box protein O3
33	Q6Y1H2	AF-Q6Y1H2-F1-v4	HACD2	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2
34	Q16836	AF-Q16836-F1-v4	HCDH, HADH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial
35	Q14693	AF-Q14693-F1-v4	LPIN1	Phosphatidate phosphatase LPIN1
36	O43772	AF-O43772-F1-v4	MCAT	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein

37	Q9BV79	AF-Q9BV79-F1-v4	MECR	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial
38	Q9NWU1	AF-Q9NWU1-F1-v4	OXSM	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial
39	P37231	AF-P37231-F1-v4	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
40	P50897	AF-P50897-F1-v4	PPT1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
41	Q9NV23	AF-Q9NV23-F1-v4	SAST	S-acyl fatty acid synthase thioesterase, medium chain
42	Q9NZ01	AF-Q9NZ01-F1-v4	TECR	Very-long-chain enoyl-CoA reductase

4.7. ColabFold Aracılığıyla FOXO3A' nın Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Belirlenmesi

FOXO3A ve KEGG PATHWAY veri tabanından seçilen yağ asidi metabolizmasına katılan 42 proteininin FASTA formatlı dizileri (Ek Tablo 1) kullanılarak ColabFold aracılığıyla 42 adet protein kompleksi modellenmiştir. FOXO3A ve 42 yağ asidi metabolizması proteininin meydana getirdiği protein komplekslerinin pLDDT ve ipTM skorları Tablo 8'de belirtilmektedir.

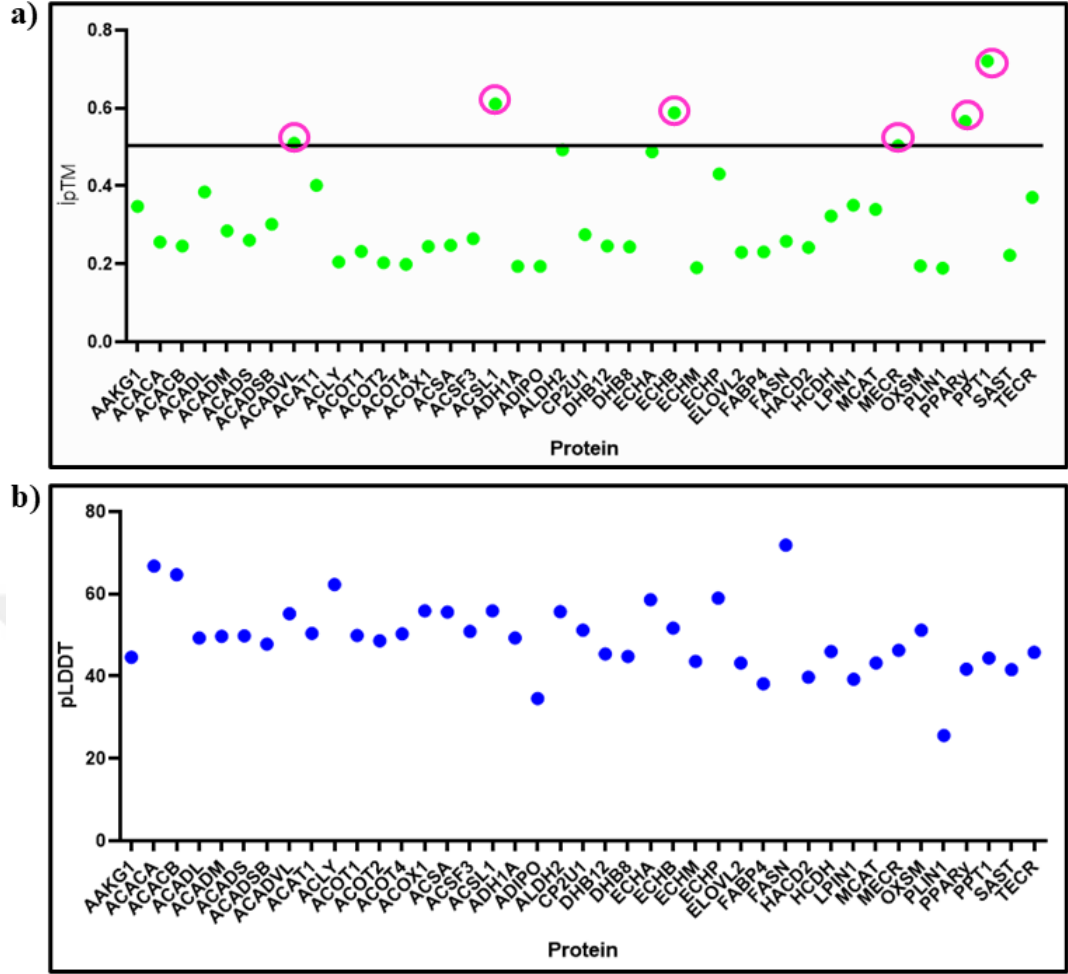
Oluşturulan modeller ipTM, pLDDT ve PAE metrikleri açısından değerlendirildi. Esasen AlphaFold Multimer algoritmasını kullanan ColabFold puanlaması, protein-protein etkileşimlerini hesaba katan ipTM puanına dayanmaktadır. Bu puanlama işlevinin AlphaFold 2'de kullanılan pTM ve pLDDT puanlarına göre daha avantajlı olduğu gösterilmiştir (Gao et al., 2022; Gomes et al., 2022). İpTM puanı, 0,8'den yüksek değerler güvenilir yüksek kaliteli tahminleri temsil ederken, 0,6'nın altındaki değerler muhtemelen başarısız bir tahmin olduğunu gösterir. 0,6 ile 0,8 arasındaki ipTM değerleri, tahminlerin doğru veya yanlış olabileceği gri bir alandır (Patankar et al., 2025). Büyük ölçekli protein protein etkileşimi taramalarında ipTM eşiği 0.3 gibi değerlere çekilebilir (Weeratunga et al., 2024). Fakat bu protein çiftleri ek değerlendirmeye tabi tutulmalıdır. Çünkü düzensiz bölgeler ve düşük pLDDT puanına sahip bölgeler, kompleksin yapısı doğru bir şekilde tahmin edilse bile ipTM puanını

olumsuz etkileyebilir. Çeşitli çalışmalarda ~0.5 iptm eşiğinin doğru bir bağlanma arayüzüne sahip olma olasılığını artırdığı gösterilmiştir (Banhos Danneskiold-Sams E et al., 2023; O'Reilly et al., 2023). Bu nedenle, bu çalışma için ipTM eşiği 0.5 olarak belirlenmiş ve bu eşiği geçen proteinler, potansiyel etkileşim partneri olarak seçilmiştir. FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinden altı protein MECD, PPT-1, ECHB, ACSL-1, ACADV ve PPARG ile oluşturulan modellerin ipTM puanları sırasıyla 0.503, 0.721, 0.588, 0.611, 0.51, 0.566 idi. Tersine, geri kalan protein komplekslerinin ipTM skorları çoğunlukla 0,3' ün altındaydı (Tablo 8 ve Şekil 21).

Tablo 8. FOXO3A ve potansiyel erişim partnerlerinin ColabFold aracılığıyla oluşturulan modellerinin ipTM ve PLDDT skorları.

Protein Adı	En iyi ipTM	En iyi PLLDT
AAKG1	0,348	44,6
ACACA	0,256	66,8
ACACB	0,246	64,7
ACADL	0,385	49,3
ACADM	0,285	49,7
ACADS	0,261	49,8
ACADSB	0,302	47,8
ACADVL	0,51	55,2
ACAT1, THIL	0,402	50,4
ACLY	0,205	62,3
ACOT1	0,232	49,9
ACOT2	0,203	48,6
ACOT4	0,199	50,3
ACOX1	0,245	55,9
ACSA	0,248	55,6
ACSF3	0,265	50,9
ACSL1	0,611	55,9
ADH1A	0,194	49,3
ADIPO	0,194	34,6
ALDH2	0,493	55,7

CP2U1	0,275	51,2
DHB12	0,246	45,4
DHB8	0,244	44,8
ECHA	0,488	58,6
ECHB	0,588	51,7
ECHM	0,19	43,6
ECHP	0,431	59
ELOVL2	0,23	43,2
FABP4	0,231	38,2
FASN	0,258	71,9
HACD2	0,242	39,8
HCDH	0,323	46
LPIN1	0,351	39,3
MCAT	0,34	43,2
MECR	0,503	46,3
OXSM	0,195	51,2
PLIN1	0,189	25,6
PPAR γ	0,566	41,7
PPT1	0,721	44,4
SAST	0,222	41,6
TECR	0,371	45,8



Şekil 21. FOXO3A'nın yağ asidi metabolizmasında görevli potansiyel etkileşim partnerlerinin tanımlanması.

A) İnsan FOXO3A ve 42 insan yağ asidi metabolizması proteini arasındaki ikili komplekslerin yapı tahmini için ipTM puanları. (B) Aynı kompleksler için pLDDT skorları.

4.8 FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin 3D Protein Yapılarının Doğrulaması ve Kalite Analizi

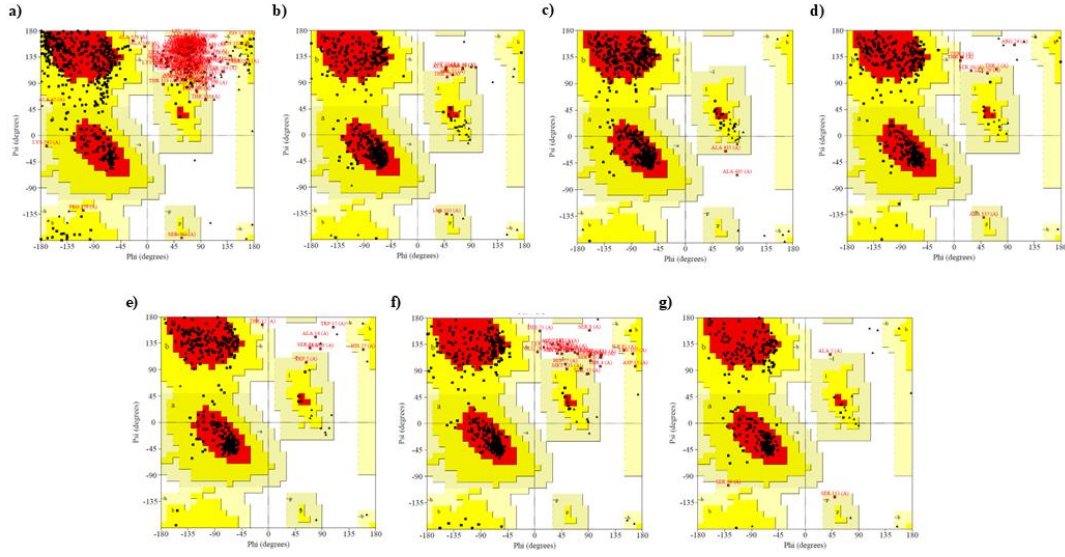
Proteinlerin güvenilirliğini ölçmek amacıyla ipTM skoru 0.5' in üzerinde olan her bir kompleksteki potansiyel etkileşim adayının 3D protein modeli için doğrulama ve kalite analizleri yapılmıştır. PROCHECK paketi, genel yapısal ve bireysel rezidü geometrisinin analizi yoluyla modellerin stereokimyasal kalitesinin hesaplanması için, ERRAT ise protein yapı modellerinin atomik düzeyde güvenilirliğini test etmek için kullanıldı. PROCHECK ve ERRAT puanları Tablo 9' da verilmiştir.

Tablo 9.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin ERRAT ve PROCHECK sonuçları.

Protein	ERRAT	PROCHECK			
	ERRAT Value (Overall Quality Factor)	Residues in Most Favored Regions	Residues in Additional Allowed Regions	Residues in Generously Allowed Regions	Residues in Disallowed Regions
ACADVL	98,4772	92.3%	6.5%	1.3%	0.0%
ACSL1	97,2263	93.7%	6.0%	0.2%	0.2%
ECHB	95,5711	87.6%	10.7%	0.7%	1.0%
FOXO3A	76,8595	49.4%	26.6%	7.3%	16.8%
MECR	96,8553	91.2%	6.6%	0.9%	1.3%
PPARG	97,7716	82.1%	12.0%	2.8%	3.1%
PPT1	92,4460	83.7%	15.2%	1.1%	0.0%

ERRAT ve PROCHECK ile yapılan analizle proteinlerin üç boyutlu yapılarının global kalitesini, geometrik açıdan güvenilirliğini ve daha ileri analizler için yapının kullanılabilirliğini ölçmek amaçlanmıştır. ACADVL için AlphaFold tarafından tahmin edilen üç boyutlu yapı modeli, hem ERRAT hem de Ramachandran değerlendirmelerinde oldukça yüksek puanlar almıştır. ERRAT puanı %98,47 olmakla beraber deneysel olarak elde edilmiş yüksek çözünürlüklü X-ray kristalografisi yapılarıyla karşılaştırılabilecek kadar iyi bir modele sahiptir. Ramachandran grafiğinde kalıntıların %92.3’ü “most favored” bölgede yer alırken, hiç disallowed kalıntı bulunmamaktadır. Bu da AlphaFold tarafından tahmin edilen modelin geometri açısından da oldukça güvenilir olduğunu göstermektedir. ACSL1’ nin tahmin edilen modeline bakıldığında yüksek kaliteli bir model olduğu görülmektedir. ERRAT, %97.23 ile iyi bir seviyededir. Ramachandran analizi, %93.7’sinin en uygun bölgelerde olduğunu gösterirken, sadece %0.2’lik kısmı disallowed bölgede yer alır. Bu sapma, genellikle esnek loop bölgelerinde veya düşük çözünürlükte tahmin edilen kısımlarda görülmektedir. ECHB modelinin ERRAT değeri %95.57 ile oldukça iyi seviyededir. Ancak Ramachandran analizi yapının geometrik doğruluğu hakkında dikkatli yaklaşılması gerektiğini göstermektedir. Rezidülerin sadece %87.6’sı en

uygun bölgede yer alırken, %1.0'lık kısmı disallowed bölgededir. Disallowed rezidü oranı genellikle %1'in altında olmalıdır, bu yüzden sınırda bir durum söz konusudur. MEER yapısı genel olarak oldukça iyi bir modele sahiptir. ERRAT değeri %96.85 ile yüksek bir kaliteyi işaret eder. Ramachandran analizi de kalıntıların %91.2'sinin en uygun konformasyonlarda olduğunu gösterir. Ancak %1.3'lük disallowed kalıntı oranı sınırın biraz üzerindedir. PPT1 modeli genel olarak kabul edilebilir niteliktedir. ERRAT değeri %92.45 ile güvenilir bir yapı sunduğunu gösterirken, Ramachandran analizi de %83.7 most favored ve %0.0 disallowed sonuçları ile göze çarpar. Her ne kadar most favored değeri biraz düşük olsa da, disallowed bölge bulunmaması önemli bir avantajdır. PPARG modelinin ERRAT değeri %97.77 ile oldukça yüksek, bu da atomik temaslarda ve genel stereokimya açısından iyi bir yapı olduğunu düşündürür. Ancak Ramachandran grafiği %82.1 most favored ve %3.1 disallowed değerleriyle önemli bir uyarı veriyor. Disallowed kalıntı oranı %1'in üzerindedir ve dikkatli olunmalıdır. FOXO3A modelinin kalite değerlendirmesi oldukça olumsuzdur. ERRAT değeri %76.86 gibi düşük bir seviyededir ve bu da yapının istatistiksel açıdan güvenilir olmadığını gösterir. Ramachandran analizi ise ciddi yapısal bozulmalara işaret eder: yalnızca %49.4'lük bir bölüm en uygun bölgede yer almakta, buna karşın %16.8'lik bir bölüm disallowed bölgede bulunmaktadır. Bu oran, modelin büyük kısmının fiziksel ve kimyasal olarak mümkün olmayan konformasyonlarda olduğunu gösterir (Tablo 9 ve Şekil 22).



Şekil 22. FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin PROCHECK sunucusundan elde edilen Ramachandran grafikleri.

a) FOXO3A b) ACADV c) ACSL-1 d) ECHB e) MECR f) PPARG e) PPT-1.

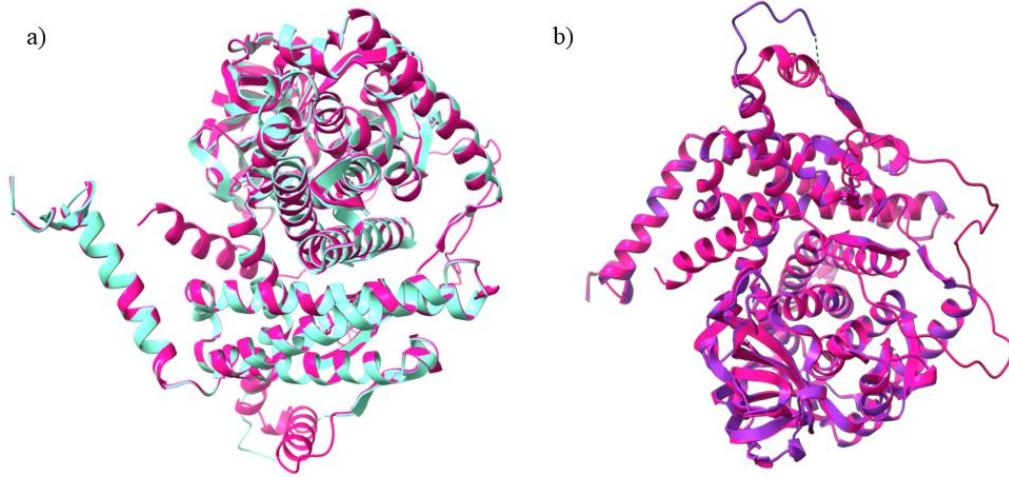
Ek doğrulama amacıyla, AlphaFold veri tabanından alınan 3D protein modellerinin deneysel olarak elde edilmiş modellere ne ölçüde yakın olduğunu tespit etmek için TM-Align algoritması aracılığıyla PDB’ den alınmış referans yapılarla hizalanarak RMSD değerleri ve TM skorları ölçüldü (Tablo 10). Tablo 10, FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin AlphaFold tarafından tahmin edilen modelleri ile deneysel olarak elde edilmiş PDB referans yapılarının TM-align algoritması kullanılarak yapılan hizalama sonuçlarını özetlemektedir. TM-align, iki protein yapısı arasındaki benzerliği, dizilimden bağımsız olarak üç boyutlu yapısal örtüşme üzerinden değerlendirir. Bu tabloda her bir protein için yapı çözümleme yöntemi (X-RAY, NMR, EM), çözünürlük, hizalanan bölge ve amino asit sayısı, RMSD değeri ve TM-score gibi kritik yapısal karşılaştırma metrikleri yer almaktadır. TM-score hem zincir-1’in hem de zincir-2’nin uzunluğuna göre normalize edilmiş şekilde verilmiştir. TM-score değeri [0–1] aralığında olup, 1 tam örtüşmeyi, 0 ise benzerliğin yokluğunu ifade eder. Genellikle TM-score > 0.5 aynı katlanma biçimini paylaşan yapılar olarak kabul edilirken, 0.2’nin altındaki skorlar rastgele benzerliğe işaret eder. PDB referans yapıları yapı çözümleme yöntemine ve çözünürlük değerlerine göre seçilmiştir.

Tablo 10.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin hizalama sonuçları.

Protein	PDB ID	Metot	Bölge	Hizalanan AA	RMSD	TM-Skoru (Zincir1)	TM-Skoru (Zincir2)
ACADV	2UXW	X-RAY	72-655	567	0,98	0.86074	0.99395
	7S7G	X-RAY	69-655	571	1,2	0.86375	0.99025
ACSL1	-	-	-	-	-	-	-
ECHB	5ZQZ	EM	1-474	420	1,31	0.86275	0.97101
	6DV2	X-RAY	34-474	428	1,04	0.88983	0.97536
FOXO3A	2K86	NMR	151-251	93	2,98	0.12695	0.67185
	2LQH	NMR	461-483	49	3,61	0.06434	0.35309
	2UZK	X-RAY	158-253	84	1,90	0.12035	0.75100
	6MNL	NMR	237-252	8	2,18	0.01127	0.15810
	7V9B	X-RAY	248-258	6	0,78	0.00885	0.31452
MECR	1ZSY	X-RAY	40-373	336	1,03	0.89156	0.95799
	7AYB	X-RAY	31-373	332	0,88	0.87948	0.96405
PPARG	2QM V	NMR	235-504	265	2,76	0.47622	0.84339
	3E00	X-RAY	102-505	362	1,08	0.70573	0.97763

	6ZL Y	X- RAY	223- 505	252	0,58	0.49654	0.99135
	8FK C	X- RAY	231- 505	244	2,18	0.45935	0.86957
	9F7 W	X- RAY	234- 505	270	1,15	0.52655	0.97383
PPT-1	3GR O	X- RAY	22- 306	277	0,63	0.89882	0.99241

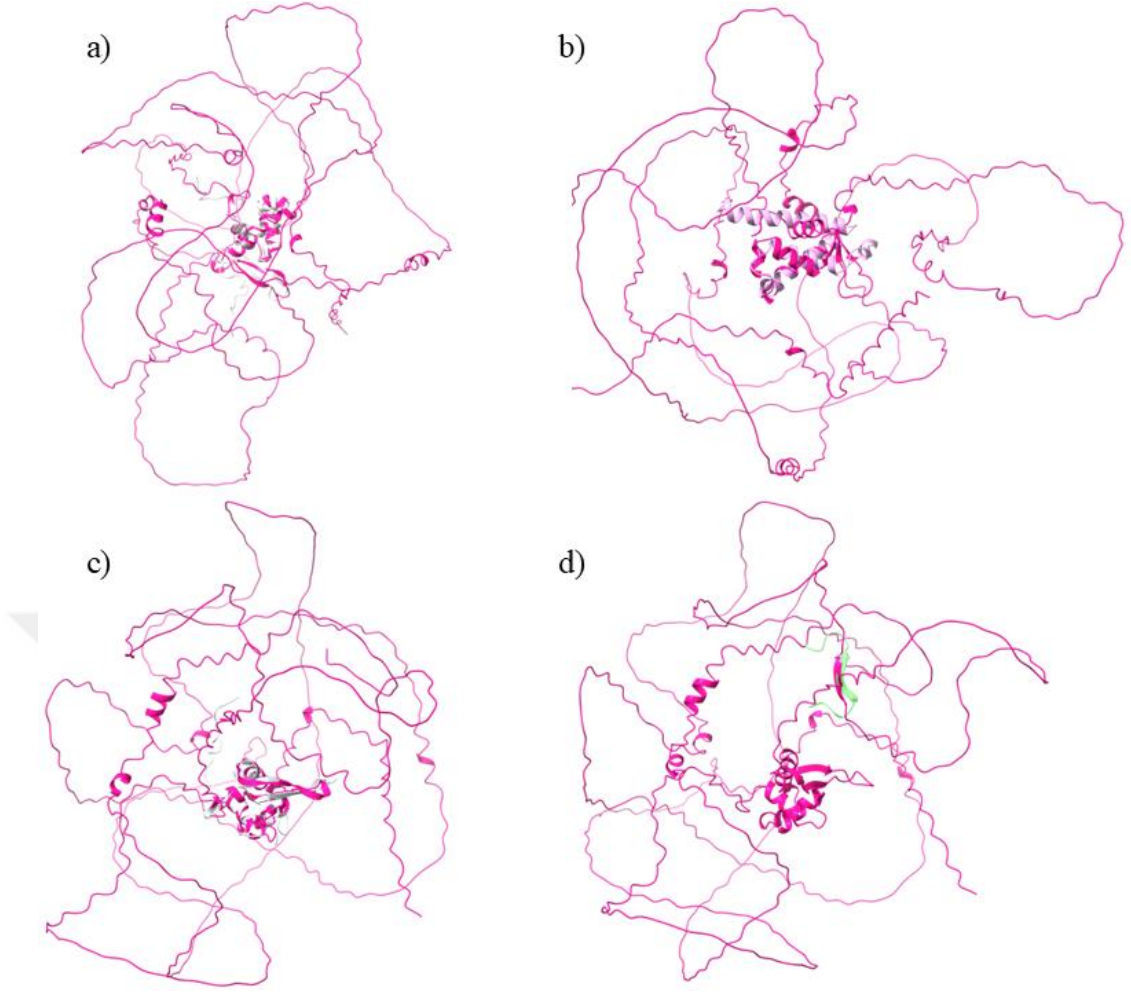
ACADV proteininde hem X-ışını kristalografisiyle elde edilmiş yüksek çözünürlüklü (1.34–1.45 Å) yapılar kullanılmış hem de oldukça uzun bir hizalama bölgesi (567–590 amino asit) elde edilmiştir. RMSD değerleri 0.98 ve 0.92 gibi düşük seviyelerde olup, TM-score değerleri 0.86074–0.86375 aralığındadır. Bu sonuçlar, AlphaFold modelinin referans yapıyla yüksek düzeyde benzerlik gösterdiğini ve başarılı bir şekilde katlanmayı tahmin ettiğini göstermektedir (Tablo 10 ve Şekil 23).



Şekil 23. TM-align algoritması kullanılarak ACADV AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.

a) 2UXW ve AF-P49748-F1-v4 hizalanması. AF-P49748-F1-v4 deep pink, 2UXW aquamarine. b) 7S7G ve AF-P49748-F1-v4 hizalanması. AF-P49748-F1-v4 deep pink, 7S7G dark orchid.

ACSL-1 proteininin deneysel olarak ortaya çıkarılmış bir yapısı olmadığından karşılaştırma yapılamadı. FOXO3A için tabloya baktığımızda, 2K86 yapısı ile anlamlı düzeyde bir benzerlik gözlemlenmiştir. Bu yapı, FOXO3A'nın 151–251 aralığındaki bölgesini, yani fonksiyonel ve yapı açısından korunmuş olan Forkhead (DNA bağlama) domainini kapsamaktadır. Bu hizalamada 93 amino asit örtüşmüş, RMSD değeri 2.98 olarak ölçülmüş ve TM-skoru Zincir 1'e göre 0.12695, Zincir 2'ye göre ise 0.67185 olarak hesaplanmıştır. Özellikle Zincir 2'ye göre normalize edilmiş TM-skoru 0.5'in üzerinde olduğu için bu bölge, yapısal olarak güvenilir ve iyi hizalanmış olarak değerlendirilebilir. Diğer referans yapılarla yapılan hizalamalar FOXO3A için daha düşük benzerlikler göstermektedir. Örneğin, 2LQH yapısıyla yapılan hizalamada sadece 49 amino asit örtüşmüş, RMSD 3.61 gibi yüksek bir değerde kalmış ve TM-skoru (Zincir 1'e göre) yalnızca 0.06434 olarak ölçülmüştür. Benzer şekilde, 2UZX, 6MNL ve 7V9B yapılarıyla yapılan hizalamalarda da TM-skorları genellikle 0.01–0.12 aralığında seyretmektedir. Bu değerler, AlphaFold modelinin bu bölgeler için deneysel yapılarla anlamlı bir benzerlik göstermediğini ortaya koyar. Özellikle 6MNL ve 7V9B hizalamalarında sadece 6-8 amino asit hizalanmış ve TM-skorları çok düşüktür; bu da bu bölgelerin ya yapısal olarak düzensiz olduğunu ya da çok kısa oldukları için TM-align algoritmasının güvenilir bir benzerlik skoru üretmediğini düşündürmektedir (Tablo 10 ve Şekil 24).

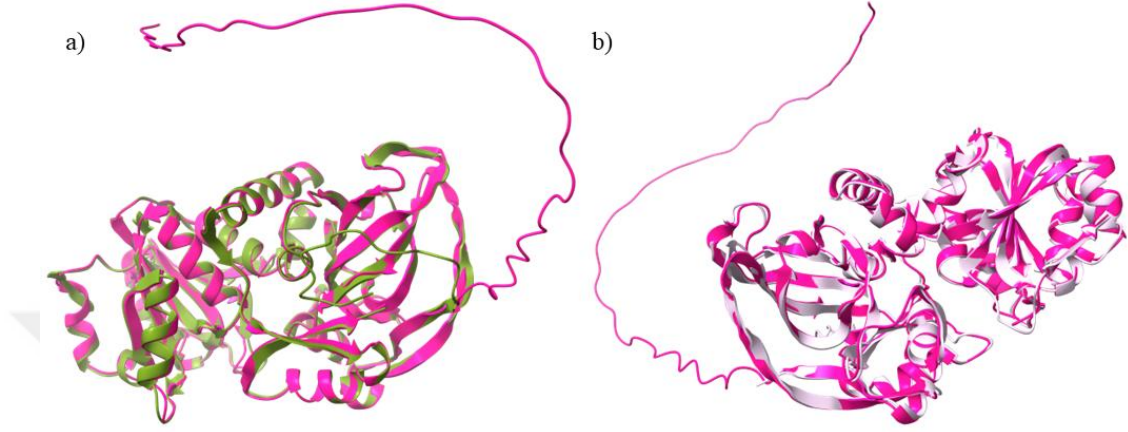


Şekil 24. TM-align algoritması kullanılarak FOXO3A AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.

a) 2K86 ve AF-O43524-F1-v4 hizalanması. AF-O43524-F1-v4 deep pink, 2K86 gainsboro. b) 2LQH ve AF-O43524-F1-v4 hizalanması. AF-O43524-F1-v4 deep pink, 2LQH plum. c) 2UKZ ve AF-O43524-F1-v4 hizalanması. AF-O43524-F1-v4 deep pink, 2UKZ light cyan. d) 6MNL ve AF-O43524-F1-v4 hizalanması. AF-O43524-F1-v4 deep pink, 6MNL pale green.

MECR proteini için yapılan TM-align hizalama analizleri, AlphaFold tarafından tahmin edilen yapının deneysel olarak elde edilen PDB yapılarıyla büyük ölçüde örtüştüğünü göstermektedir. 1ZSY ve 7AYB PDB yapıları ile yapılan hizalamalarda sırasıyla 336 ve 332 amino asit örtüşmüş, bu da oldukça uzun bir yapısal karşılaştırma yapıldığı anlamına gelmektedir. RMSD değerleri sırasıyla 1.03 Å ve 0.88 Å gibi düşük seviyelerde bulunmuştur. Bu, modellerin yüksek örtüşme gösterdiğini ve yapılar

arasında ciddi bir sapma olmadığını gösterir. TM-skoru, Zincir 1'e göre normalize edildiğinde 0.89156 ve 0.87948, Zincir 2'ye göre normalize edildiğinde ise 0.95799 ve 0.96405 gibi yüksek değerlere ulaşmıştır. TM-skoru'nun 0.5'in üzerinde olması yapısal benzerliğin anlamlı olduğunu ifade ederken, 0.8'in üzerinde olması çok yüksek düzeyde yapısal örtüşme anlamına gelir (Tablo 10 ve Şekil 25).

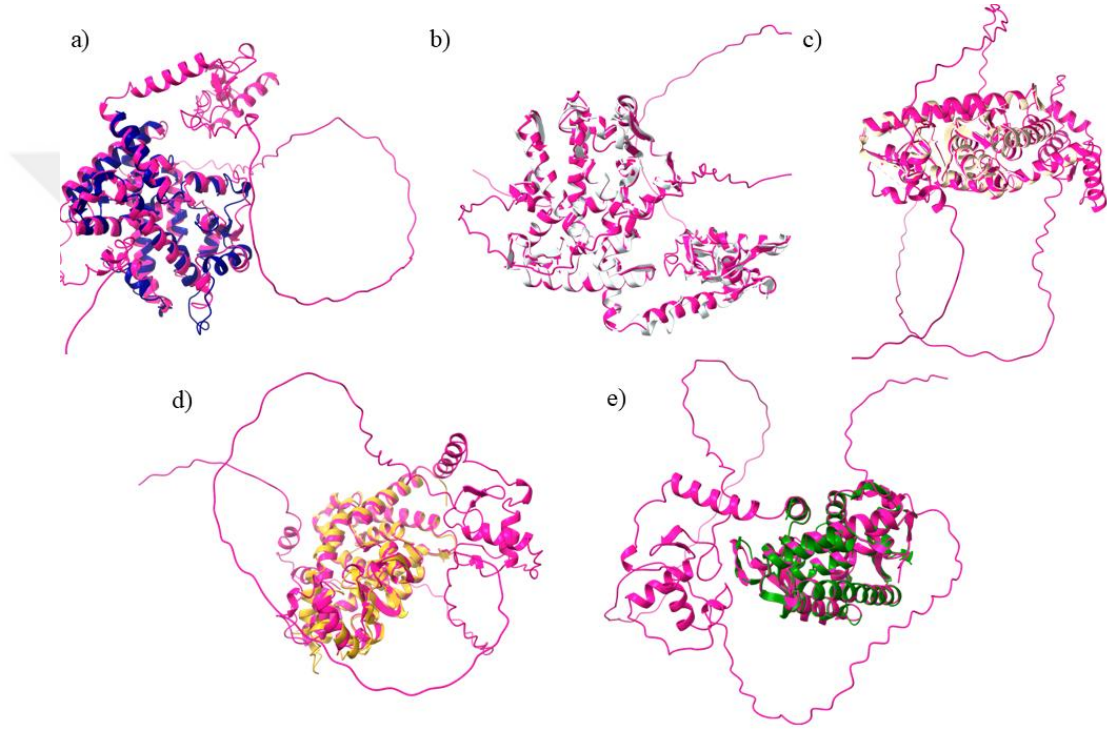


Şekil 25. TM-align algoritması kullanılarak MECR AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.

- a) 1ZSY ve AF-Q9BV79-F1-v4 hizalanması. AF-Q9BV79-F1-v4 deep pink, 1ZSY olive drab. b) 7AYB ve AF-Q9BV79-F1-v4 hizalanması. AF-Q9BV79-F1-v4 deep pink, 7AYB thistle.

PPARG proteini için yapılan TM-align analizinde, AlphaFold tahmin yapıları ile deneysel PDB yapıları arasında orta düzey olarak sınıflandırılabilir bir yapısal uyum gözlemlenmiştir. 2QMV NMR yapısı ile yapılan hizalamada, 265 amino asitlik bir bölge örtüşmüş ve TM-skoru Zincir 1'e göre 0.47622, Zincir 2'ye göre ise 0.84339 olarak hesaplanmıştır. Zincir 1'e göre normalize edilmiş skor 0.5'in altında olduğu için genel katlanma benzerliği sınırlıdır, ancak Zincir 2'ye göre skor oldukça yüksektir ve AlphaFold modelinin deneysel yapının büyük bir kısmını doğru tahmin ettiğini düşündürmektedir. Diğer kristal yapılarla yapılan hizalamalarda, 270 ila 362 arasında amino asit hizalanmıştır. 3E00 yapısı ile yapılan hizalamada TM-skoru 0.70573 (Zincir 1'e göre) ve 0.97763 (Zincir 2'ye göre) gibi yüksek değerlere ulaşmış, bu da oldukça güçlü bir yapısal benzerliğe işaret etmektedir. Benzer şekilde, 6ZLY, 8FKC ve 9F7W yapılarıyla yapılan hizalamalarda da Zincir 2'ye göre normalize edilmiş TM-skorları sırasıyla 0.99315, 0.86957 ve 0.97383 gibi yüksek değerler almıştır. Bu yapılarla

yapılan hizalamalarda RMSD 0.58–2.18 Å aralığında değişmekte olup, genellikle kabul edilebilir seviyelerdedir. Sonuç olarak, PPARG proteini için AlphaFold tahminleri deneysel kristal yapılarla oldukça iyi örtüşmektedir. Özellikle 3E00, 6ZLY ve 9F7W gibi yüksek çözünürlüklü yapılarla yapılan hizalamalar, AlphaFold’un PPARG yapısını başarılı bir şekilde modellediğini göstermektedir. NMR tabanlı 2QMV yapısıyla kıyaslandığında daha düşük skorlar gözlemlense de, kristalografik verilerle olan yüksek uyum, AlphaFold’un bu protein için güvenilir bir yapı modeli sunduğunu göstermektedir (Tablo 10 ve Şekil 26).

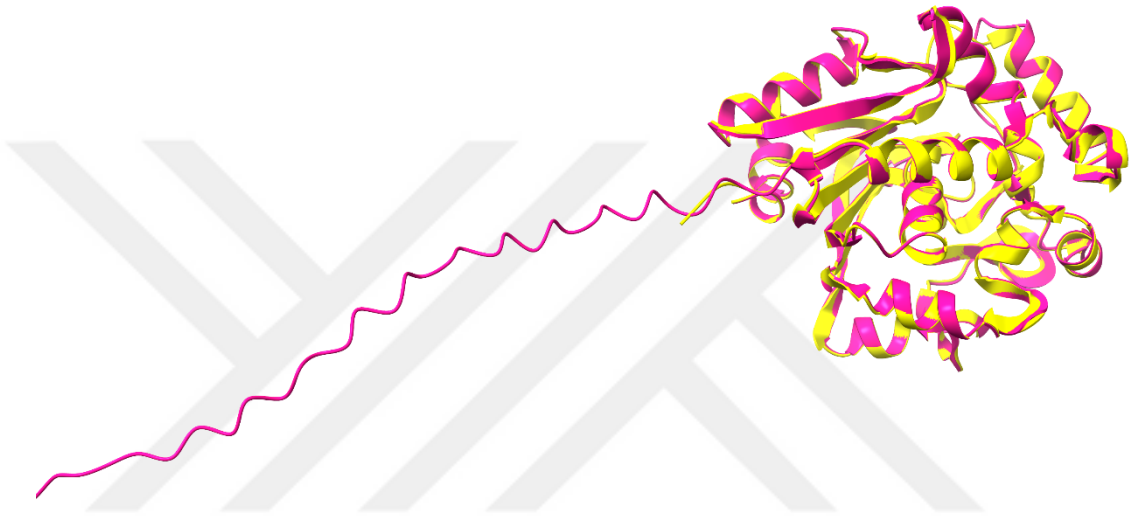


Şekil 26. TM-align algoritması kullanılarak PPARG AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.

a) 2QMY ve AF-P37231-F1-v4 hizalanması. AF-P37231-F1-v4 deep pink, 2QMY navy. b) 3E00 ve AF-P37231-F1-v4 hizalanması. AF-P37231-F1-v4 deep pink, 3E00 azure. c) 8FKC ve AF-P37231-F1-v4 hizalanması. AF-P37231-F1-v4 deep pink, 8FKC golden rod. d) 9F7W ve AF-P37231-F1-v4 hizalanması. AF-P37231-F1-v4 deep pink, 9F7W green.

PPT-1 proteini için TM-align ile yapılan yapısal hizalama analizinde, AlphaFold tarafından tahmin edilen modelin 3GRO PDB yapısı ile yüksek düzeyde uyumlu olduğu görülmektedir. 3GRO yapısı X-ışını kristalografisi ile 2.53 Å çözünürlükte elde

edilmiş olup, 22–306 arası amino asitleri kapsamaktadır. Bu yapı ile yapılan hizalamada 277 amino asit örtüşmüş, RMSD değeri 0.63 Å olarak belirlenmiştir. Bu oldukça düşük bir değer olup, iki yapının yüksek oranda örtüştüğünü gösterir. Ayrıca TM-skoru Zincir 1'in uzunluğuna göre normalize edildiğinde 0.89882, Zincir 2'ye göre normalize edildiğinde ise 0.99241 olarak hesaplanmıştır. Bu skorlar TM-align açısından oldukça yüksek olup, yapıların katlanma bakımından neredeyse tamamen aynı olduğunu göstermektedir (Tablo 10 ve Şekil 27).

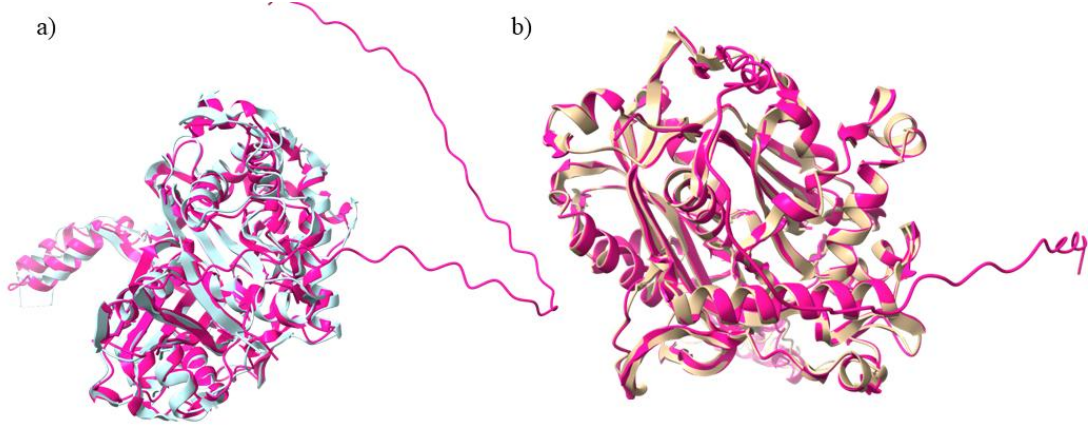


Şekil 27. TM-align algoritması kullanılarak PPT-1 AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.

3GRO ve AF-P50897-F1-v4 hizalanması. AF-P50897-F1-v4 deep pink, 3GRO yellow.

ECHB proteini için iki farklı deneysel yapı kullanılmıştır. 5ZQZ ile yapılan hizalamada 420 amino asitlik bir bölge örtüşmekte olup, RMSD değeri 1.31 Å olarak hesaplanmıştır. TM-skoru, Zincir 1'e göre 0.86275 ve Zincir 2'ye göre 0.97101'dir. 6DV2 yapısı ile yapılan hizalamada ise 428 amino asit örtüşmüş, RMSD değeri, 1.04 Å olarak ölçülmüştür. Bu hizalamada TM-skoru Zincir 1'e göre 0.88983, Zincir 2'ye göre 0.97536 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler AlphaFold'un ECHB proteini için oldukça başarılı bir yapı tahmini yaptığını göstermektedir. TM-skoru değerlerinin her iki durumda da 0.85'in üzerinde, Zincir 2'ye göre normalize edildiğinde ise 0.97

seviyelerinde olması, AlphaFold yapısının deneysel yapılarla büyük oranda örtüştüğünü ifade eder (Tablo 10 ve Şekil 28).

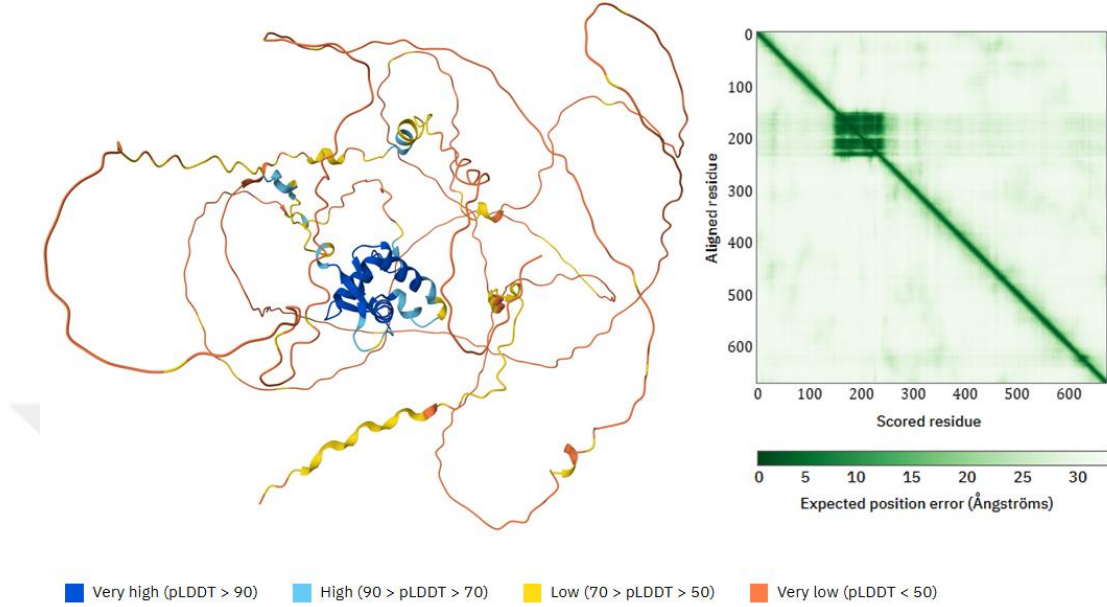


Şekil 28. 18. TM-align algoritması kullanılarak ECHB AlphaFold tahmin yapılarının deneysel PDB yapılarıyla hizalanması.

a) 5ZQZ ve AF-P55084-F1-v4 hizalanması. AF-P55084-F1-v4 deep pink, 5ZQZ powder blue. b) 6DV2 ve AF-P55084-F1-v4 hizalanması. AF-P55084-F1-v4 deep pink, 6DV2 tan.

AlphaFold'un çoğu proteini yüksek doğrulukla modellediği söylenebilir. Özellikle çözünürlük değeri yüksek olan kristal yapılarla karşılaştırıldığında, TM-score değerleri sıklıkla 0.8'in üzerindedir. RMSD değerlerinin 2 Å'nın altında olduğu örneklerde, yapısal eşleşmenin başarılı olduğu açıktır. Bununla birlikte, içsel olarak bozuk yapılar (örneğin FOXO3A gibi) söz konusu olduğunda, AlphaFold'un doğruluğu sınırlanabilmektedir. TM-skorunun iki farklı normalize haliyle verilmiş olması (zincir-1 ve zincir-2 uzunluklarına göre) karşılaştırmalı analizler yapılmasını sağlamıştır. Böylece ileri aşamalarda kullanılacak olan yapıların referans yapılarla

olan örtüşme kalitesini kantitatif olarak değerlendirilmiş ve yapıların güvenilirliği ölçülmüştür.



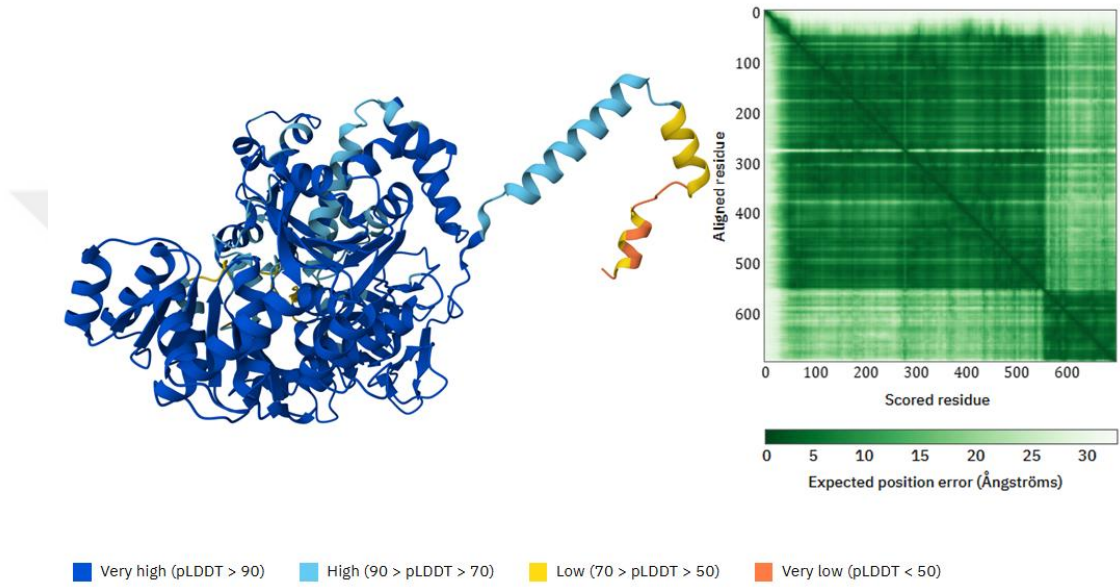
Şekil 29. AlphaFold tarafından tahmin edilen FOXO3A proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.

Sol tarafta 3D yapı modeli, sağda ise PAE matrisi yer almaktadır.

Şekil 29, AlphaFold tarafından tahmin edilen FOXO3A proteininin yapısal güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla üretilmiş iki temel analizi içermektedir: sol tarafta pLDDT skorlarıyla renklendirilmiş üç boyutlu model, sağ tarafta ise tahmini hizalama hatalarını gösteren PAE (Predicted Aligned Error) matrisi yer almaktadır. FOXO3A modelinde yalnızca merkezde bulunan sınırlı bir bölge (yaklaşık 150–250. rezidüler arası) yüksek yapısal güven skorları (pLDDT > 90, koyu mavi) ile temsil edilmektedir. Bu bölge büyük olasılıkla FOXO3A'nın işlevsel Forkhead DNA bağlanma domainidir. Yapının geri kalanı ise çoğunlukla turuncu ve sarı renklerle gösterilmiştir; bu da pLDDT skorlarının düşük olduğunu ve bu bölgelerde yapısal belirsizliklerin fazla olduğunu gösterir. Özellikle uç bölgeler ve geniş sarmal döngüler, intrinsik olarak düzensiz (IDR) kısımları olabilir.

PAE matrisi de bu durumu desteklemektedir. Matriste yalnızca yaklaşık 100–250. kalıntılar arasında yer alan yoğun koyu yeşil bölge, düşük hizalama hatasına işaret

etmekte ve bu bölge içi konumların yüksek güvenle tahmin edildiğini göstermektedir. Geri kalan bölgeler arasında yer alan açık yeşil ve beyaz tonlar, rezidüler arası konumsal ilişkinin belirsiz olduğunu ve yapı tahmininin bu alanlarda düşük güvenilirliğe sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, FOXO3A proteininin yalnızca Forkhead domaininin AlphaFold tarafından güvenilir bir şekilde tahmin edildiği, geri kalan yapının ise esnek, düzensiz ve yüksek oranda belirsiz bölgeler içerdiği anlaşılmaktadır.

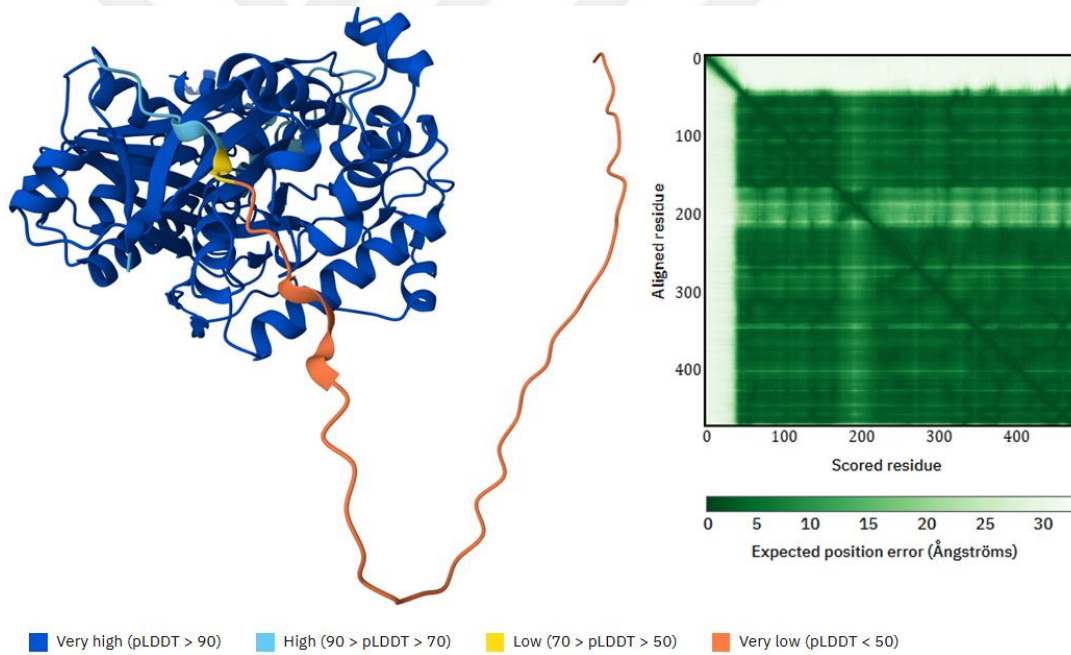


Şekil 30. AlphaFold tarafından tahmin edilen ACSL-1 proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.

Sol tarafta 3D yapı modeli, sağda ise PAE matrisi yer almaktadır.

Şekil 30, AlphaFold tarafından tahmin edilen ACSL1 proteinine ait yapısal modeli ve güven analizini göstermektedir. Görselin sol tarafında pLDDT skorlarına göre renklendirilmiş üç boyutlu protein modeli, sağ tarafında ise matrisi yer almaktadır. Bu analiz, modelin hem yerel güvenilirliğini (pLDDT) hem de kalıntılar arası yapısal uyum doğruluğunu (PAE) değerlendirme olanağı sağlar. Model yapısına bakıldığında, proteinin büyük bölümünün koyu mavi (pLDDT > 90) ile renklendirilmiş olduğu görülmektedir. Bu, AlphaFold'un bu bölgelerdeki tahminlerine çok yüksek güven duyduğunu göstermektedir. Özellikle protein çekirdeğini oluşturan helikal yapılar ve katlanmış alanlar tamamen güvenilir olarak modellenmiştir. C-terminal bölgesine doğru ilerledikçe renk, açık mavi (pLDDT 70–90) ve sarıya (pLDDT 50–70)

dönüşmektedir; son birkaç rezidü ise turuncu ($pLDDT < 50$) ile gösterilmiştir. Bu durum, proteinin bu uç kısmında esneklik, düzensizlik veya belirsizlik bulunduğunu, bölgenin içsel olarak bozuk olabileceğini göstermektedir. Sağdaki PAE matrisi, modelin genel güvenilirliğini destekler niteliktedir. Matriste baskın olarak koyu yeşil renkler hakimdir; bu, kalıntılar arası konumsal hata tahminlerinin düşük olduğunu gösterir. Diyagonal çizgi boyunca görülen yoğun koyu yeşil bant, yapı içi rezidülerin birbirine göre pozisyonlarının çok güvenilir olduğunu kanıtlar. Özellikle 0–300 rezidüleri arasında yer alan alanlar arası ilişkiler oldukça güvenilirdir. Ancak 300. rezidüden sonra, özellikle C-terminal bölgede, diyagonalın alt ve üst kısmında yeşil tonun açıldığı, yani tahmin edilen hizalama hatasının arttığı gözlenmektedir. Bu durum $pLDDT$ ile uyumlu olup, uç kısmın yapısal belirsizliğini doğrular. Genel olarak değerlendirildiğinde, ACSL1 AlphaFold modeli, oldukça yüksek doğrulukla tahmin edilmiş, büyük oranda kararlı ve globüler bir yapıya sahiptir.

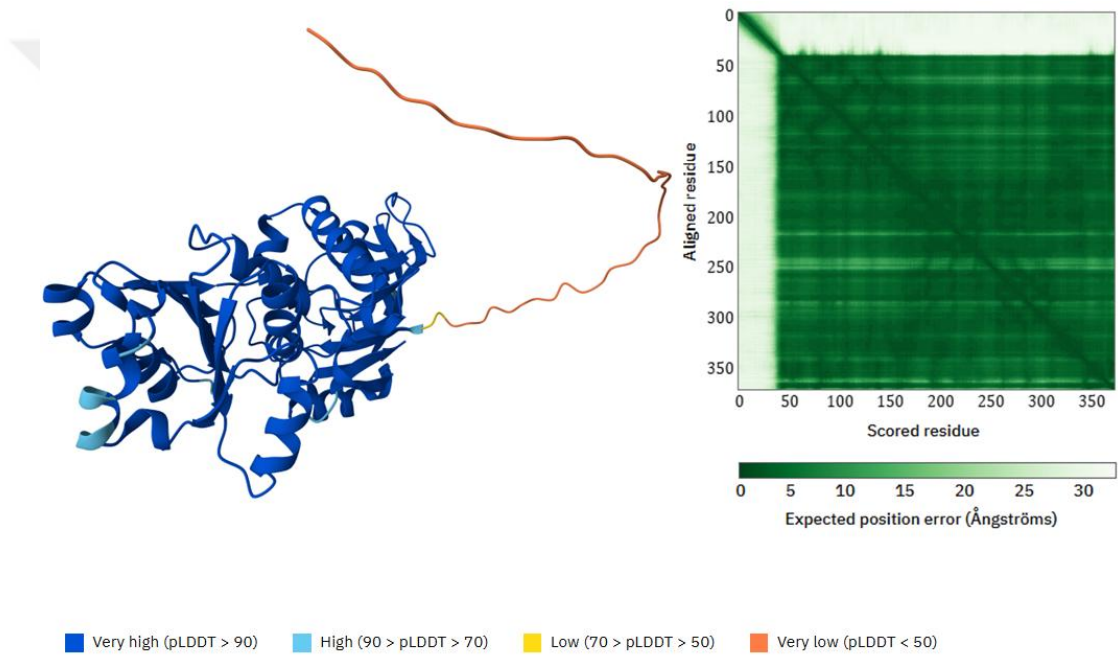


Şekil 31. AlphaFold tarafından tahmin edilen ECHB proteinine ait yapısal güven skorları ($pLDDT$) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.

Sol tarafta 3D yapı modeli, sağda ise PAE matrisi yer almaktadır.

Şekil 31’ da verilen modelin büyük kısmı koyu mavi renktedir ($pLDDT > 90$), bu da AlphaFold’un bu bölgeleri çok yüksek doğrulukla tahmin ettiğini gösterir. Bu yapı, protein çekirdeğini oluşturan globüler bölgedir ve katlanmış, sabit bir yapıya işaret

eder. Protein zincirinin geri kalan kısmı, özellikle modelin C-terminal ucuna uzanan segment, turuncu ($pLDDT < 50$) ile renklendirilmiştir; bu da AlphaFold'un bu bölgeyi modelleme konusundaki güveninin çok düşük olduğunu gösterir. Bu esnek bölge, büyük olasılıkla içsel olarak düzensiz bir bölgedir (IDR). Bazı ara bölgelerde sarı ve açık mavi tonlar da görülmektedir ($pLDDT 50-90$), bu da bu kısımların orta düzey güvenle tahmin edildiğini gösterir. Sağdaki PAE matrisi, yapının global doğruluğunu destekler niteliktedir. Matriste diyagonal boyunca yer alan koyu yeşil bölge, rezidülerin kendi içindeki konumlarının oldukça güvenilir olduğunu gösterir. Genel olarak, ECHB'nin AlphaFold tarafından yüksek güvenle tahmin edilen iyi tanımlı bir protein olduğu söylenebilir.

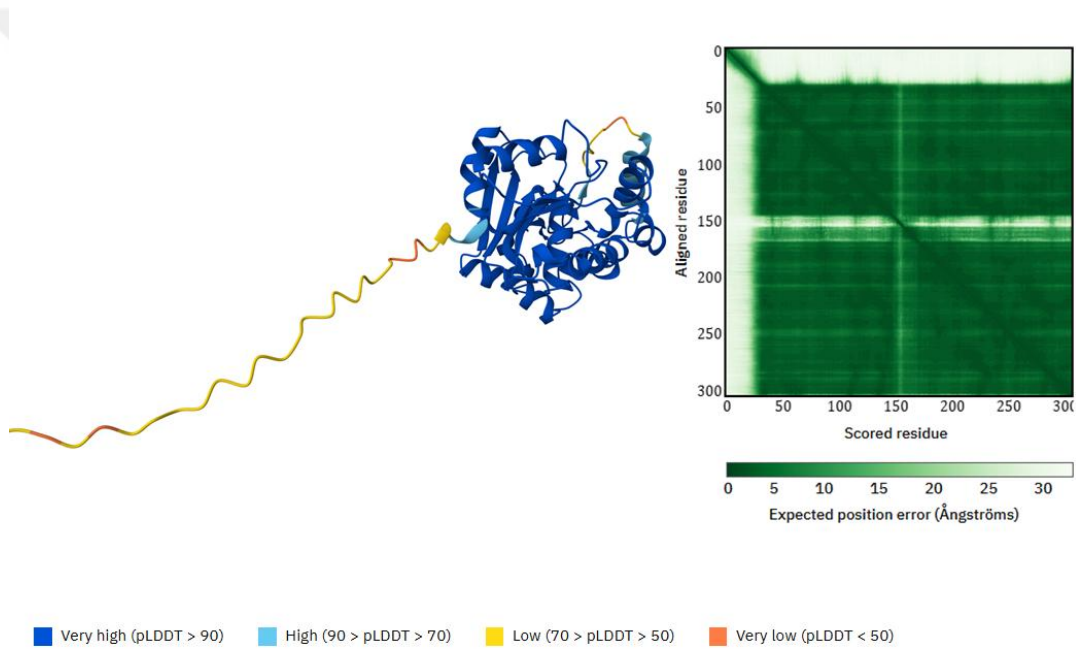


Şekil 32. AlphaFold tarafından tahmin edilen MECR proteinine ait yapısal güven skorları ($pLDDT$) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.

Sol tarafta 3D yapı modeli, sağda ise PAE matrisi yer almaktadır.

MECR proteininin modeli, büyük oranda koyu mavi ($pLDDT > 90$) renktedir; bu da AlphaFold'un bu bölgedeki yapısal tahminine çok yüksek güven duyduğunu gösterir. Yapının sadece uç kısımlarında, özellikle C-terminal ucunda, kısa bir segment turuncu renkte ($pLDDT < 50$) görülmektedir. Bu, düşük güvenilirlikte ve muhtemelen intrinsik olarak düzensiz (IDR) bir bölgedir. Ayrıca az sayıda açık mavi ($pLDDT 70-90$)

rezidüde mevcuttur, ancak bunlar da genel olarak kabul edilebilir düzeydedir. PAE matrisi genel olarak yoğun koyu yeşil renktedir. Bu, modelin neredeyse tüm rezidüler arasındaki pozisyonel ilişkileri düşük hata payıyla tahmin ettiğini gösterir. Diyagonal boyunca güçlü ve düzgün bir bant olması, modelin içsel tutarlılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Özellikle ilk 200 rezidü içinde hem diyagonal hem de karşılıklı hizalamalarda hata <5 Å seviyesindedir. Bu, pLDDT yüksek olan bölgelerle uyum içindedir. 200. rezidüden sonra, C-terminalde yer alan ve düşük pLDDT gösteren bölgelere karşılık gelen kısımlarda ise hata artmakta, yeşil tonlar açılmaktadır. Sonuç olarak, MECCR modeli AlphaFold tarafından oldukça başarılı bir şekilde tahmin edilmiştir ve yapısal analizler için yüksek derecede güvenilir bir temsildir (Şekil 32).



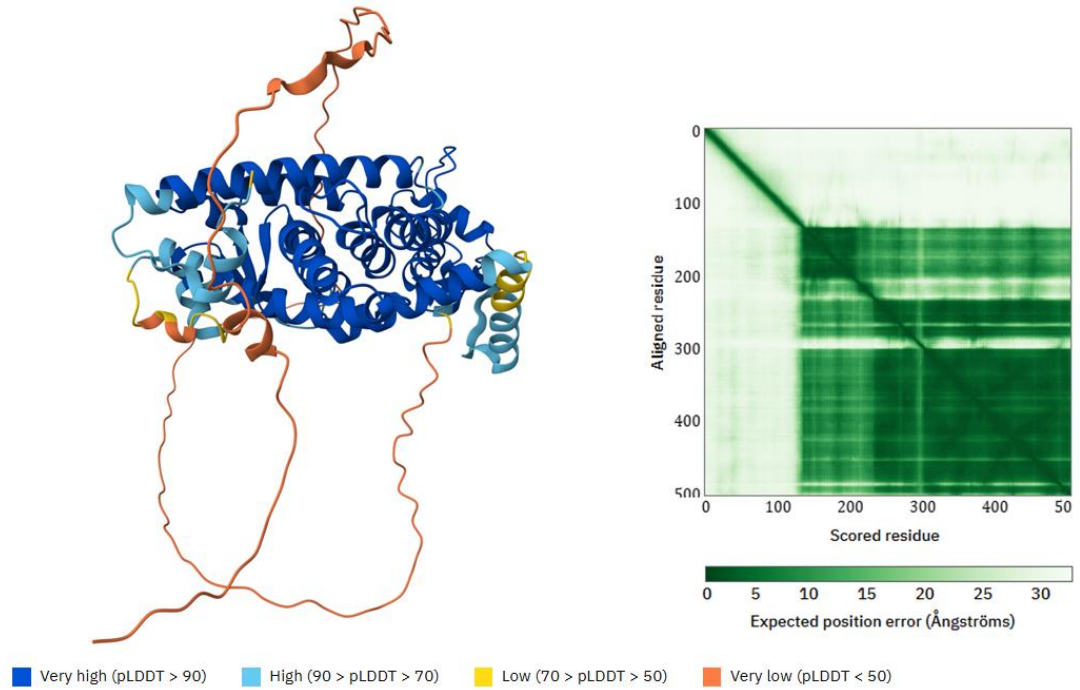
Şekil 33. AlphaFold tarafından tahmin edilen PPT-1 proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.

Sol tarafta 3D yapı modeli, sağda ise PAE matrisi yer almaktadır.

PPT-1' in büyük bölümü koyu mavi (pLDDT > 90) renkte olup, bu da AlphaFold'un bu bölgeleri yüksek doğrulukla tahmin ettiğini gösterir. Bu bölge, büyük olasılıkla PPT1'in enzimatik bölgesini ve işlevsel katlanmış yapısını oluşturur. Uç kısımlar, özellikle N-terminal ve C-terminal bölgeler boyunca uzanan zincirler, sarı (pLDDT

50–70) ve turuncu ($pLDDT < 50$) renklerle gösterilmiştir. Bu alanlar düşük model güvenilirliği taşır ve yapısal olarak düzensiz ve esnek olabilir. Yapının özellikle sol uzantısında uzun, belirgin bir içsel düzensiz bölge gözlemlenmektedir.

PAE matrisi genel olarak yoğun koyu yeşil renktedir ve bu, kalıntıların birbirine göre konumsal olarak güvenilir biçimde tahmin edildiğini göstermektedir. Diyagonal boyunca uzanan koyu bant, özellikle ilk 150–180 rezidünün hem kendi içinde hem de birbiriyle olan pozisyonlarının güvenilir olduğunu ifade eder. Fakat 150. kalıntıdan sonra diyagonalde açılmalar ve kontrast artışı gözlemlenmektedir. Bu da düşük $pLDDT$ 'ye sahip segmentlerle uyumludur ve modelin bu bölgelerdeki konumsal güveninin azaldığını işaret eder. Genel olarak, AlphaFold tarafından oluşturulan PPT1 modeli, proteinin çekirdek yapısı için güçlü ve güvenilir bir tahmin sunmakta, ancak esnek segmentlerin güvenilirliği düşüktür. (Şekil 33).

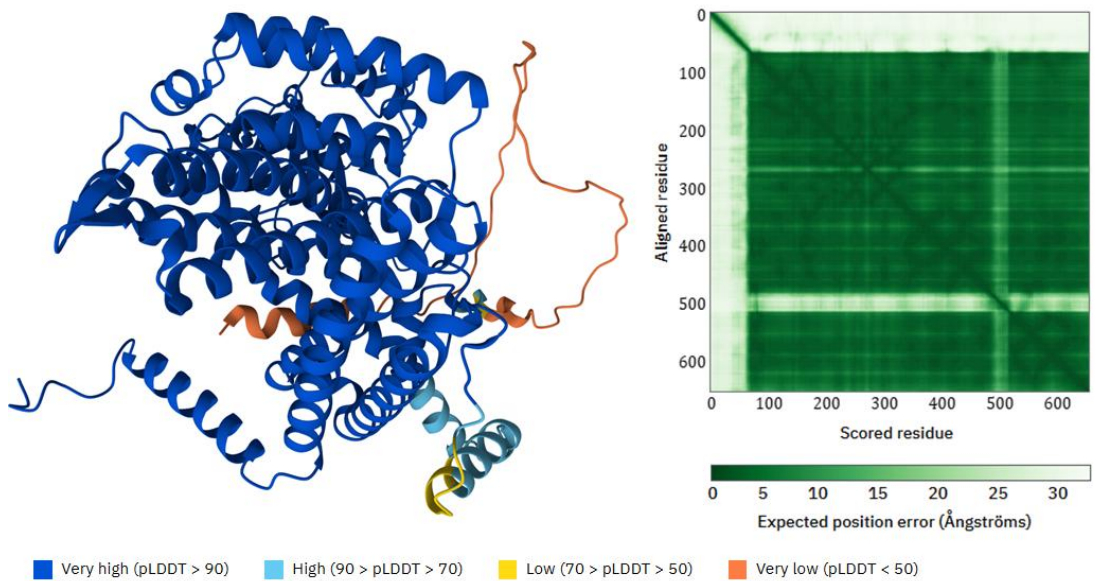


Şekil 34. AlphaFold tarafından tahmin edilen PPARG proteinine ait yapısal güven skorları ($pLDDT$) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.

Sol tarafta 3D yapı modeli, sağda ise PAE matrisi yer almaktadır.

PPARG protein modeli merkezde oldukça kompakt bir yapıya sahip olup, bu bölge büyük oranda koyu mavi renkle ($pLDDT > 90$) gösterilmiştir. Bu durum,

AlphaFold'un özellikle bu bölgede modelleme doğruluğunun çok yüksek olduğunu göstermektedir. Bu alan, muhtemelen PPARG'nın ligand bağlanma domaini veya DNA bağlanma domaini gibi fonksiyonel olarak kritik bölgelerinden biridir. Buna karşın, yapının her iki ucundan çıkan uzun, esnek zincir bölgeler turuncu (pLDDT < 50) renkle gösterilmiş ve modelin bu bölgelerdeki yapısal güveni çok düşüktür. Bu segmentler büyük ihtimalle içsel olarak düzensiz bölgelerdir. Ayrıca bazı bölgelerde açık mavi (pLDDT 70–90) ve sarı (pLDDT 50–70) tonlar görülmekte, bu da orta düzeyde yapısal güven anlamına gelir. PAE matrisi genel olarak koyu yeşil renk ağırlıklıdır, bu da çoğu rezidü arasındaki konumların düşük hata payıyla tahmin edildiğini gösterir. Özellikle 0–200. rezidüler arasında, diyagonal boyunca gözlenen yoğun koyu yeşil bant, bu bölgelerin yapısal olarak oldukça tutarlı olduğunu gösterir. Ancak 200. rezidüden sonra yer yer yeşil tonlar açılmaktadır. Bu durum, düşük pLDDT gösteren uçlardaki rezidüler arası konum belirsizliğinin arttığını ve modelin bu bölgelerdeki doğruluğunun düştüğünü gösterir (Şekil 34).



Şekil 35. AlphaFold tarafından tahmin edilen ACADV proteinine ait yapısal güven skorları (pLDDT) ve PAE (Predicted Aligned Error) matrisi.

Sol tarafta 3D yapı modeli, sağda ise PAE matrisi yer almaktadır.

Şekil 35' de ACADV modelinin büyük bölümü koyu mavi (pLDDT > 90) olduğu görülmektedir. Bu da AlphaFold'un bu bölgelerdeki tahminine çok yüksek güven duyduğunu belirtir. Bu bölge, ACADV'nin fonksiyonel alanlarını temsil eder. Protein

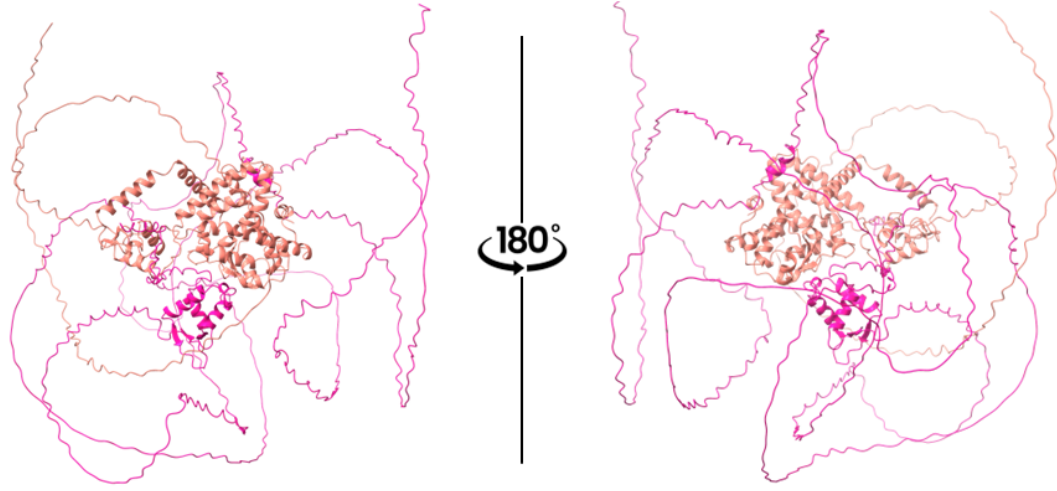
yapısında ayrıca birkaç küçük segmentte açık mavi (pLDDT 70–90) ve sarı (pLDDT 50–70) renkler bulunmakta olup bunlar orta düzey güvenilirlikte bölgeleri temsil eder. C-terminal bölgesinde yer alan belirgin bir turuncu segment (pLDDT < 50) bulunmaktadır. Bu düşük güvenilirlikli segmentin muhtemelen içsel olarak bozuk anlamına gelir. PAE matrisi büyük ölçüde koyu yeşil renktedir, bu da çoğu rezidü çifti arasındaki pozisyonel tahmin hatasının 5 Å altında olduğunu gösterir. Özellikle 0–500. rezidüler arasında yer alan diyagonal boyunca uzanan koyu bant, modelin büyük bölümünde yüksek güvenilirlik gösterdiğini ortaya koyar. Diyagonal dışında kalan bölgelerde daha açık yeşil tonlar görülse de bunlar genellikle içsel bozukluk bölgelerine karşılık gelen yerlerdir.

4.9. Bağlanma Arayüzü Analizi

Protein-protein etkileşimlerinin yapısal düzeyde karakterize edilmesi, sinyal iletimi, metabolik düzenleme ve transkripsiyonel kontrol gibi pek çok biyolojik sürecin anlaşılmasında önemli bir yer tutar. Transkripsiyon faktörü FOXO3A, hücre kaderiyle ilgili çeşitli yollarda görev almakta olup, metabolizma, apoptoz ve stres yanıtı gibi süreçleri düzenleyen birçok proteinle etkileşime girer. Bu doğrultuda, FOXO3A'nın PTT-1, ACADV, MECR, PPARG ve ACSL-1 gibi metabolizma ve hücre düzenleyici proteinlerle olası yapısal etkileşimleri ColabFold kullanılarak tam uzunlukta kompleksler şeklinde modellenmiştir. Elde edilen kompleks modellerin bağlanma arayüzlerinin yapısal olarak incelenmesi amacıyla UCSF ChimeraX yazılımı kullanılmıştır. Yapılar arası donör, akseptör ve hidrojen atomları belirlenmiş, hidrojen bağlarının uzunlukları ve geometrik doğrulukları değerlendirilmiştir. Bu analizler, bağlanma arayüzlerinin stabilitesi ve biyolojik geçerliliği açısından önemli yapısal bilgiler sağlamaktadır. Özellikle komplekslerdeki kritik rezidüler arasında oluşan hidrojen bağlarının sayısı, mesafesi ve doğrultusu, FOXO3A'nın potansiyel etkileşim partnerlerine karşı bağlanma davranışını ortaya koymaktadır.

Tablo 11.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri PPARG arasındaki potansiyel hidrojen bağları.

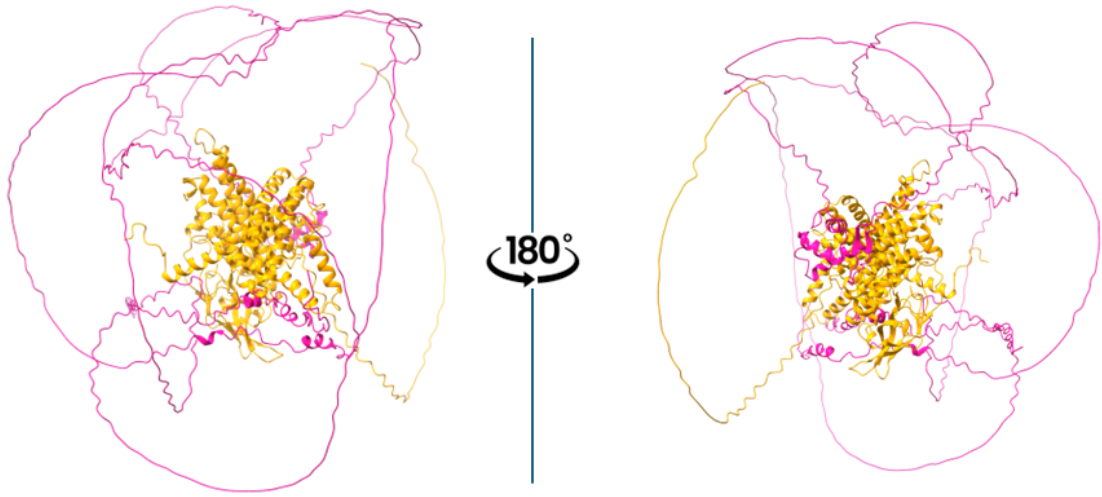
Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
A	ARG 27	NH1	B	GLY 158	O	HH12	3.377	2.511
A	ARG 29	NH1	B	ASP 174	OD2	HH12	1.820	0.999
A	SER 30	OG	B	ASN 188	O	HG	2.594	1.754
A	THR 32	N	B	ASN 188	O	H	3.280	2.352
A	SER 55	OG	B	MET 29	O	HG	3.434	2.605
A	LEU 470	N	B	GLU 499	OE2	H	3.061	2.093
B	LYS 189	NZ	A	PRO 34	O	HZ1	2.797	2.022
B	GLN 191	NE2	A	PRO 28	O	HE22	1.555	0.798
B	LYS 329	NZ	A	LEU 473	O	HZ1	2.052	1.212
B	ARG 378	N	A	ASP 196	OD2	H	2.063	1.224



Şekil 36. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve PPARG kompleksi.

FOXO3A deep pink, PPARG salmon.

FOXO3A–PPARG protein kompleksi için ChimeraX ile gerçekleştirilen H-bond analizi sonucunda, bağlanma arayüzünde toplam 10 adet potansiyel hidrojen bağı tanımlanmıştır. Bu bağlar, iki protein arasında hem N-terminal hem de C-terminal bölgeleri kapsayan geniş bir etkileşim yüzeyine işaret etmektedir. Özellikle A zincirindeki (FOXO3A) ARG 29–ASP 174 etkileşimi dikkat çekicidir; bu bağı D..A mesafesi yalnızca 1.820 Å, D-H..A mesafesi ise 0.999 Å olup çok iyi bir geometriye sahiptir. Bu tür kısa ve doğrusal H-bağları, genellikle yüksek özgüllükte ve güçlü elektrostatik katkılarla oluşur. Benzer şekilde, GLN 191 (PPARG) – PRO 28 (FOXO3A) arasında gözlenen 1.555 Å’lik H-bağı da son derece stabil bir etkileşimi göstermektedir. Çift yönlü etkileşimlerin varlığı da dikkat çekicidir: hem FOXO3A tarafından PPARG’ye hem de PPARG tarafından FOXO3A’ya yönelmiş H-bağları tespit edilmiştir. Bu, etkileşimin sadece yüzey temasına değil, karşılıklı elektrostatik uyuma dayandığını gösterir. LYS 189 ve LYS 329 gibi bazik rezidülerin karbonil oksijenlere yönelmiş olması, klasik tuz köprüsü/elektrostatik katkı potansiyelini de beraberinde getirmektedir. Ayrıca FOXO3A’nın C-terminaline yakın LEU 470 – GLU 499 arasında oluşan bağ, kompleksin daha distal bölgelerinde de etkileşimler olduğunu göstermektedir. Genel olarak mesafelerin çoğunluğunun <3.0 Å olması, bağların fiziksel olarak anlamlı ve geometri açısından iyi olduğunu göstermektedir (Tablo 11 ve Şekil 36).



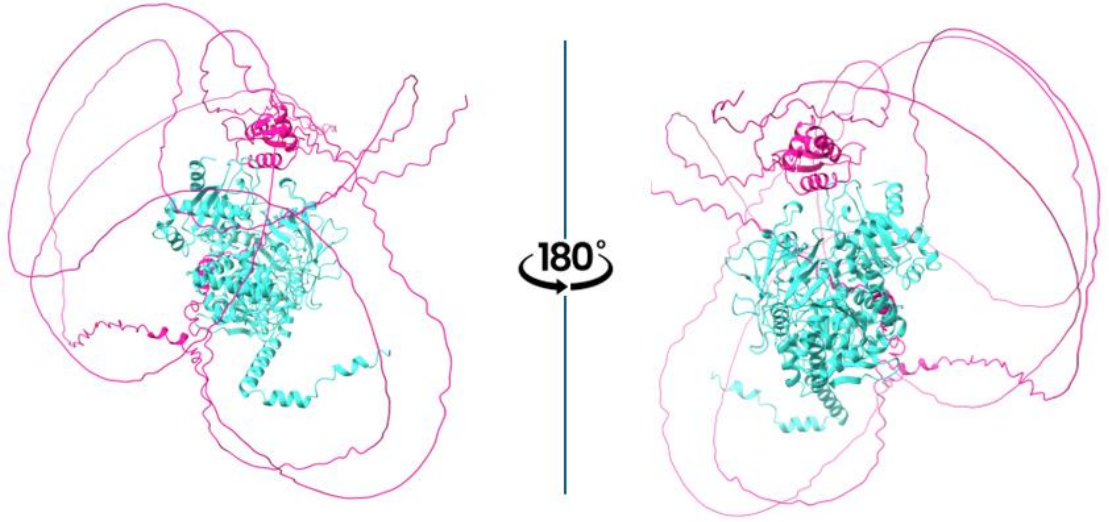
Şekil 37. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve ACADV kompleksi.
FOXO3A deep pink, ACADV orange.

Tablo 12.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri ACADV arasındaki hidrojen bağları.

Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
A	GLN 137	NE2	B	ALA 4	O	HE21	2.160	1.354
A	TYR 162	N	B	GLU 104	OE1	H	2.423	1.450
A	TYR 193	OH	B	GLU 97	OE1	HH	3.191	2.248
A	LYS 197	NZ	B	GLU 97	OE1	HZ1	2.497	1.643
A	ASN 208	ND2	B	VAL 153	O	HD22	1.907	1.055
A	ASN 213	ND2	B	GLU 104	OE2	HD22	2.296	1.415

A	LYS 245	NZ	B	ARG 111	O	HZ1	2.491	1.741
A	GLY 381	N	B	ASP 269	OD2	H	3.236	2.418
B	LYS 492	NZ	A	SER 644	O	HZ1	2.890	1.913
B	LYS 556	NZ	A	ASN 641	OD1	HZ1	2.620	1.696

FOXO3A ve ACADV proteinleri arasında oluşturulan tam uzunluklu ColabFold modeli, bağlanma arayüzünün yapısal özelliklerini incelemek amacıyla ChimeraX ile analiz edilmiş ve toplam 10 adet potansiyel hidrojen bağı tanımlanmıştır. Bu bağlar, etkileşim yüzeyinin hem yoğun hem de moleküler düzeyde çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Kompleksin başlangıç bölgesinde, GLN 137 (FOXO3A), ALA 4 (ACADV) oldukça kısa bir mesafede (2.16 Å) bağ yaparak modelin stabilitesine katkıda bulunmuştur. TYR 162 – GLU 104 etkileşimi 2.42 Å ile güçlü ve yönlü bir hidrojen bağı oluşturmuştur. LYS 197 – GLU 97 bağ mesafesi 2.49 Å ile oldukça uygun olup tuz köprüsüne benzer bir bağlanmaya işaret eder. Ayrıca, LYS 245 – ARG 111 ve GLY 381 – ASP 269 gibi etkileşimler yer alır. Kompleksin karşı zincirine ait bağlara bakıldığında, LYS 492 – SER 644 ve LYS 556 – ASN 641 etkileşimleri bulunur. Bu bağlar, ACADV'nin FOXO3A'ya doğru yönelmiş kutuplu rezidüer aracılığıyla karşılıklı bir etkileşim sağladığını gösterir. Toplamda değerlendirildiğinde, bu 10 hidrojen bağının çoğu 2.0–2.6 Å aralığında, yani güçlü ve yönlü bağlar sınıfına girmektedir. Aynı zamanda hem zincir A (FOXO3A) hem de zincir B (ACADV) bağlayıcı rol oynamaktadır, bu da etkileşimin çift taraflı ve spesifik olduğunu göstermektedir (Tablo 12 ve Şekil 37).



Şekil 38. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve ACSL-1 kompleksi.

FOXO3A deep pink, ACSL-1 turquoise.

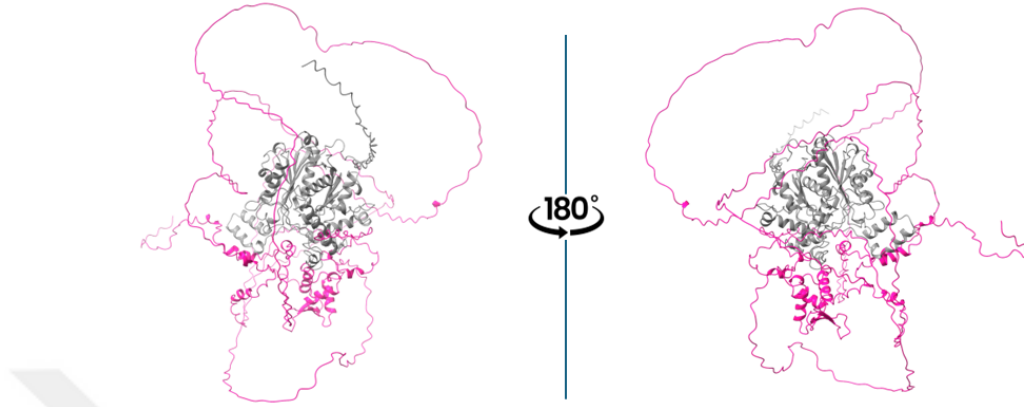
Tablo 13.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri ACSL-1 arasındaki hidrojen bağları.

Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
A	TYR 184	OH	B	ALA 563	O	HH	2.575	1.850
A	ARG 211	NH1	B	SER 592	O	HH12	3.386	2.736
A	ARG 211	NH2	B	SER 592	O	HH22	2.479	1.480
A	SER 626	OG	B	GLU 606	OE1	HG	3.470	2.592
A	ARG 629	NE	B	ARG 349	O	HE	3.679	2.724

A	THR 648	N	B	GLY 542	O	H	1.960	1.036
A	THR 648	OG1	B	GLY 542	O	HG1	2.696	1.941
B	TYR 178	OH	A	ASP 639	OD2	HH	2.973	2.045
B	SER 277	OG	A	ASP 639	OD2	HG	2.731	2.009
B	ARG 372	NE	A	GLU 631	OE1	HE	2.261	1.426
B	TYR 458	OH	A	SER 644	O	HH	2.368	1.622
B	LYS 561	NZ	A	LYS 207	O	HZ1	1.898	1.131
B	LYS 675	NZ	A	ASN 641	O	HZ1	2.597	1.657

FOXO3A ile ACSL1 arasında oluşturulan tam uzunlukta ColabFold modeli, yapısal bağlanma arayüzünü tanımlamak amacıyla ChimeraX ile hidrojen atomları eklenerek analiz edilmiş ve 13 adet hidrojen bağı tespit edilmiştir. Bu bağların geniş bir yüzeye yayıldığı ve çift yönlü etkileşim içerdiği gözlemlenmiştir, bu da kompleksin güçlü ve stabil bir yapıya sahip olabileceğini göstermektedir. İlk olarak, TYR 184 (FOXO3A) tarafından ALA 563 (ACSL1) yapılan bağ, 2.58 Å gibi ideal bir mesafe ile oldukça yönlü ve spesifik bir etkileşim sunmaktadır. Bu tür tirozin kökenli hidrojen bağları genellikle stabilizasyona katkı sağlar. İlk bağ nispeten uzun olsa da (3.38 Å), ikinci bağ 2.48 Å ile kararlıdır. SER 626 – GLU 606 ve ARG 629 – ARG 349 bağları ise arayüzün orta bölgelerindeki etkileşimlerdir. Kompleksin en kısa bağlarından biri, THR 648 – GLY 542 arasında yer alan 1.96 Å'lık bağıdır. Kompleksin karşı zincirine bakıldığında, TYR 178 – ASP 639, SER 277 – ASP 639 ve ARG 372 – GLU 631 gibi bağlar bulunmaktadır. C-terminal bölgelere yakın oluşan TYR 458 – SER 644, LYS

561 – LYS 207 ve LYS 675 – ASN 641 bağları, kompleksin yalnızca merkezi değil uç bölgelerinde de etkileşimler içerdiğini göstermektedir. Özellikle LYS 561 – LYS 207 bağı 1.89 Å ile analizdeki en kısa bağlardan biridir ve bu tür bağlar güçlü elektrostatik katkı sağlar (Tablo 13 ve Şekil 38).



Şekil 39. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve ECHB kompleksi. FOXO3A deep pink, ECHB gray.

Tablo 14.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri ECHB arasındaki hidrojen bağları.

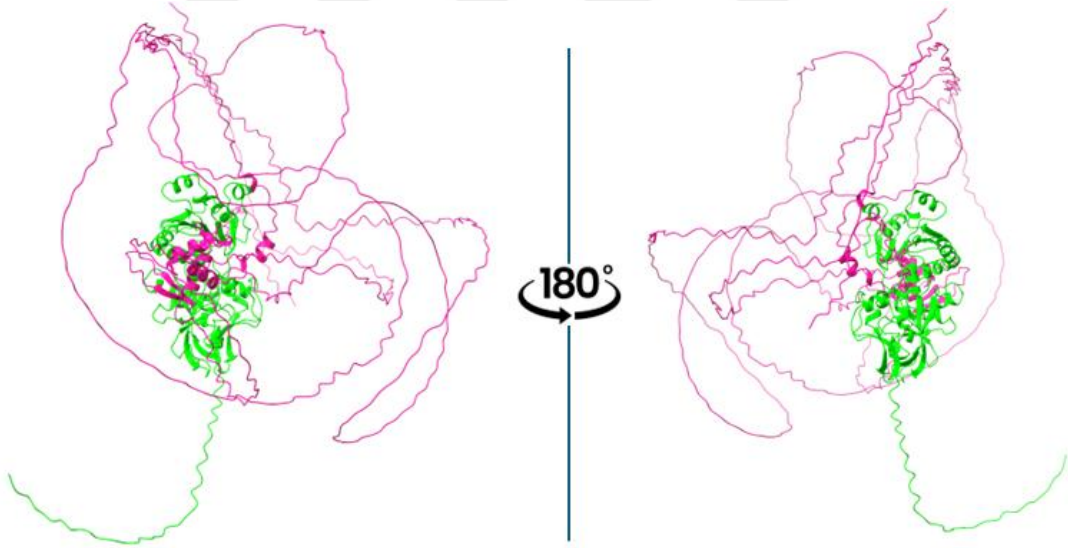
Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
A	GLN 25	N	B	ALA 233	O	H	2.715	1.785
B	SER 395	OG	A	PHE 22	O	HG	2.649	1.758
B	ASP 396	N	A	PRO 20	O	H	2.651	1.913
B	TRP 397	N	A	PRO 20	O	H	3.418	2.437

FOXO3A ve ECHB proteinleri arasında oluşturulan ColabFold temelli kompleksin

yapısal analizi sonucunda, bağlanma arayüzünde toplam 4 hidrojen bağı tespit edilmiştir. Bu bağlar, daha sınırlı sayıda olmalarına karşın, oldukça yönlü, kısa mesafeli ve spesifik rezidülerden oluşmuştur. İlk bağ, GLN 25 (FOXO3A) ALA 233 (ECHB) arasında oluşmuştur. 2.71 Å mesafesi ve 1.78 Å'lık D-H..A değeri, bu bağın hem yönlü hem de elektrostatik açıdan etkili olduğunu göstermektedir.

İkinci bağda, SER 395 (ECHB), PHE 22 (FOXO3A) ile etkileşime geçmektedir. 2.65 Å'lık mesafesi ile oldukça stabil bir H-bağıdır. Serin gibi küçük polar rezidülerin bu tür bağları, zayıf ama yönlü temasları temsil eder.

Üçüncü ve dördüncü bağlar ise PRO 20 (FOXO3A) ve ASP 396, TRP 397 (ECHB) tarafından oluşturulmuştur. Bu durum, PRO 20'nin arayüzde bağlanma açısından merkezî bir rol üstlendiğini göstermektedir. ASP 396 – PRO 20 bağı 2.65 Å, TRP 397 – PRO 20 bağı ise biraz daha uzun olup 3.42 Å mesafededir. Özellikle ikili bağlanma, bölgesel stabilite sağlar. TRP 397'nin biraz daha uzak mesafesi, bağın daha zayıf olabileceğini düşündürse de, yapısal uyuma katkıda bulunabilir (Tablo 14 ve Şekil 39).



Şekil 40. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve MECR kompleksi.

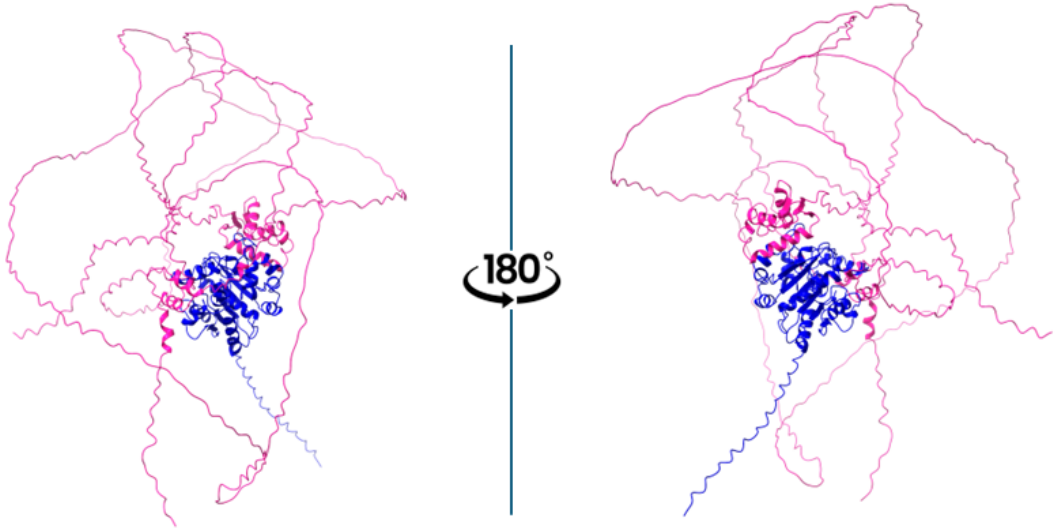
FOXO3A deep pink, MECR lime.

Tablo 15.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri MECR arasındaki hidrojen bağları.

Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
A	LYS 207	NZ	B	GLN 180	OE1	HZ1	3.209	2.345
A	ASP 639	N	B	ASN 167	OD1	H	3.176	2.277
A	ASN 641	ND2	B	ASN 193	O	HD21	3.484	2.545
B	GLN 180	NE2	A	LYS 197	O	HE22	3.063	2.403
B	GLN 180	NE2	A	GLY 198	O	HE22	3.092	2.224
B	GLY 195	N	A	ASP 639	O	H	2.601	1.691
B	LYS 252	NZ	A	SER 501	O	HZ3	3.505	2.510
B	TRP 311	NE1	A	ASP 636	OD1	HE1	2.020	1.039
B	SER 313	N	A	ASP 636	OD2	H	2.602	1.669
B	SER 313	OG	A	ASP 636	OD1	HG	2.981	2.285
B	SER 313	OG	A	ASP 636	OD2	HG	2.605	1.680

B	PHE 364	N	A	PHE 642	O	H	2.297	1.305
---	------------	---	---	---------	---	---	-------	-------

FOXO3A ile MECR arasında ColabFold ile modellenmiş olan protein-protein kompleksi, bağlanma arayüzü özelinde ChimeraX ile hidrojen atomları eklenerek analiz edildiğinde, toplamda 12 adet hidrojen bağı tespit edilmiştir. Bu bağlar, kompleksin hem çift yönlü hem de oldukça çeşitli bir etkileşim yüzeyine sahip olduğunu göstermektedir. FOXO3A tarafından MECR'ye yönelmiş bağlar, yapının bir ucundan diğerine uzanan arayüz temaslarını göstermektedir. Örneğin LYS 207 (FOXO3A) – GLN 180 (MECR) etkileşimi, klasik bir bazik-asidik temas olup 3.21 Å ile orta kuvvette bir bağıdır. Bunu izleyen ASP 639 – ASN 167 teması 3.17 Å mesafesiyle stabil bir yüzey bağı göstermektedir. ASN 641 – ASN 193 arasındaki daha uzun mesafeli bağ (3.48 Å) ise diğerlerine göre daha zayıf bir bağıdır. Kompleksin karşı yönünde, MECR'nin FOXO3A'ya yönelttiği bağlar, örneğin GLN 180, hem LYS 197 hem de GLY 198 ile H-bağı kurarak aynı bağlanma cebine katkıda bulunur. Bu bağlar, 3.063–3.092 Å uzunluklarındadır. GLY 195 – ASP 639 arasındaki 2.60 Å'lık kısa mesafeli bağ, bu bölgenin yüksek bağlanma özgülüğüne sahip olduğunu gösterebilir. TRP 311 – ASP 636 arasındaki bağ, 2.02 Å'lık bağ uzunluğu ile en güçlü bağlardan biridir. Aynı şekilde SER 313, ASP 636 ile üç ayrı noktadan etkileşim kurmaktadır. Buda lokal stabiliteyi oldukça arttırabilir (Şekil 40 ve Tablo 15).



Şekil 41. ColabFold tarafından oluşturulan FOXO3A ve PPT-1 kompleksi. FOXO3A deep pink, PPT-1 medium blue.

Tablo 16.FOXO3A ve potansiyel etkileşim partneri PPT-1 arasındaki hidrojen bağları.

Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
A	ASN 208	ND2	B	PHE 282	O	HD22	3.565	2.651
A	SER 209	OG	B	GLN 259	OE1	HG	2.910	2.200
A	LEU 378	N	B	LEU 290	O	H	3.049	2.046
B	ASN 47	ND2	A	ASP 380	O	HD22	3.358	2.584
B	ARG 248	NH1	A	GLY 158	O	HH12	2.916	2.181
B	ARG 248	NH2	A	GLY 158	O	HH22	2.878	2.131
B	LEU 292	N	A	MET 376	O	H	2.933	1.979
B	GLU 294	N	A	GLY 374	O	H	2.967	2.154

FOXO3A ile PPT-1 arasında oluşturulan ColabFold modeline ait hidrojen bağı analizi, bağlanma arayüzünde 8 adet hidrojen bağı bulunduğunu ortaya koymuştur. Bağlar hem FOXO3A'nın (zincir A) hem de PPT-1'in (zincir B) katkısıyla çift yönlü olacak şekilde dağılmıştır. ASN 208 (FOXO3A) - PHE 282 (PPT-1) 3.57 Å mesafeli H-bağı, biraz uzun olmasına rağmen, bağlanma yönelimi açısından anlamlı bir temas olabilir. Hemen ardından gelen SER 209 – GLN 259 etkileşimi, 2.91 Å ile daha güçlü ve yaygın

bir polar etkileşimdir. PPT-1 tarafındaki bağlara bakıldığında, ASN 47 – ASP 380 bağı polar kutuplar arasında kurulmuş olup 3.36 Å bağ uzunluğuna sahiptir. ARG 248 (PPT-1) GLY 158 (FOXO3A) ile iki ayrı H-bağı kurmaktadır ve bu bağlar 2.87–2.92 Å arasında değişmekte olup yönlü ve güçlüdür. Bu tür temaslar bağlanma arayüzü stabilitesi için önemli rol oynayabilir. Benzer şekilde, LEU 292 – MET 376 ve GLU 294 – GLY 374 bağlarının da mesafeleri ~2.93–2.96 Å aralığındadır. Özellikle bu iki bağın ardışık konumda bulunması, FOXO3A'nın C-terminaline yakın bölgede PPT-1 ile etkileştiğini anlamına gelebilir. Genel olarak FOXO3A–PPT kompleksinde hidrojen bağlarının sayısı orta düzeyde olup, yoğunluğu 2.8–3.0 Å mesafededir (Tablo 16 ve Şekil 41).

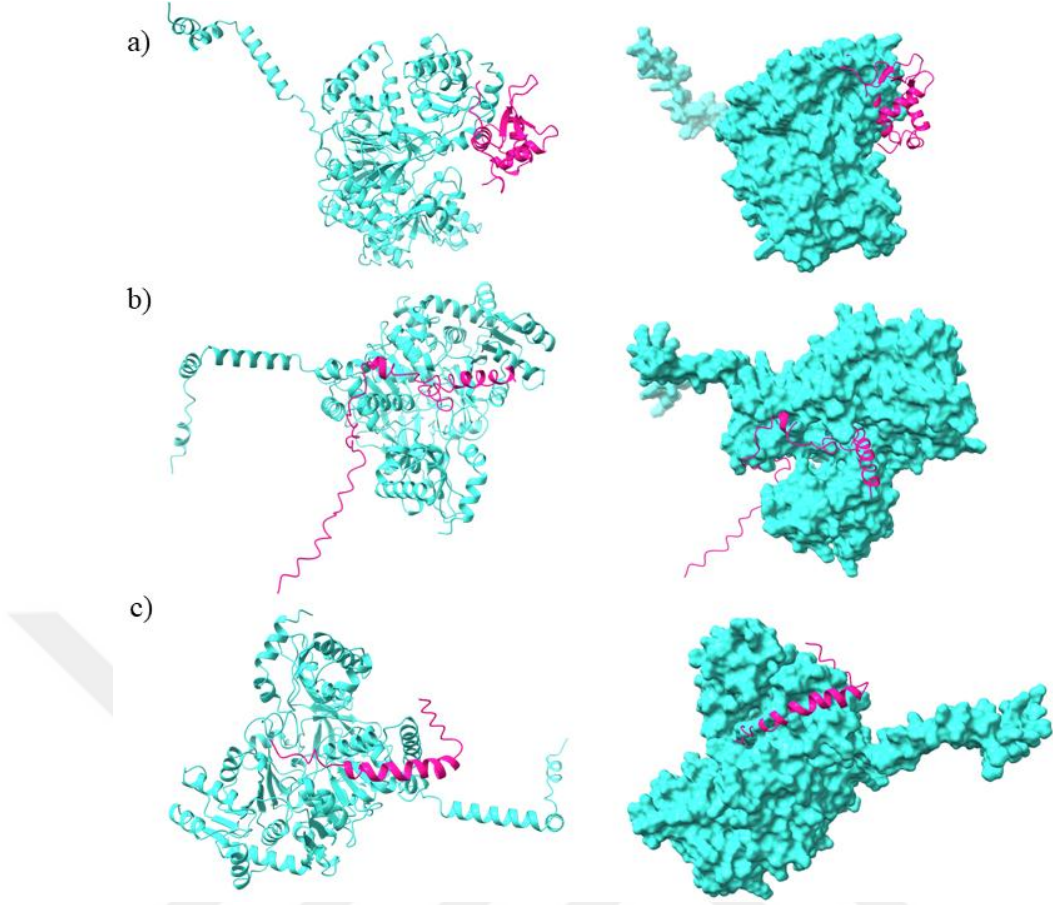
ColabFold ile elde edilen tam uzunluktaki protein kompleks modelleri, özellikle içsel olarak düzensiz bölgelerin (IDR) varlığı nedeniyle düşük pLDDT ve ipTM skorları, yüksek PAE değerleri gibi kalite ve güven metrikleriyle dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, bu modellerin yapısal güvenilirliği yalnızca yapay zeka tabanlı metriklerle değil, aynı zamanda klasik yapı doğrulama araçları olan ERRAT ve PROCHECK ile de değerlendirilmiştir. ERRAT sonuçları, bazı modellerde yapısal hatalar bulunduğunu göstermiş; PROCHECK analizleri ise Ramachandran grafiklerinde düşük oranda kalıntının "most favored" bölgelerde yer aldığını ortaya koymuştur. Tüm bu veriler, tam uzunluktaki modellerin biyolojik anlamlılığını ve güvenilirliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle, FOXO3A proteini için daha yüksek güvenilirlikte kompleks modeller oluşturmak amacıyla, protein yapısı fonksiyonel domainlerine ayrılarak yeniden modellenmiştir. FOXO3A'nın InterPro veritabanı temel alınarak belirlenen üç domaini (IPR001766 – Forkhead DNA-binding domain, IPR032067 – Forkhead-associated domain, IPR032068 – Forkhead-like domain) ayrı ayrı ele alınmış ve her biri için protein-protein kompleks modelleri yeniden oluşturulmuştur. Bu domain-temelli yaklaşım sayesinde, daha kararlı bağlanma arayüzleri ve yapısal olarak daha güvenilir modeller elde edilmesi hedeflenmiştir.

Tablo 17. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri ACSL-1 arasındaki hidrojen bağları.

Kompleks	Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
FOXO3A (155–251)_ACSL-1	A	SER 61	OG	B	ARG 682	O	HG	2.942	2.367
FOXO3A (155–251)_ACSL-1	A	ARG 68	N	B	GLU 591	OE2	H	3.385	2.509
FOXO3A (155–251)_ACSL-1	A	LYS 91	NZ	B	GLU 495	O	HZ1	3.020	2.208
FOXO3A (155–251)_ACSL-1	A	ARG 94	NE	B	PHE 560	O	HE	2.651	1.643
FOXO3A (155–251)_ACSL-1	A	ARG 94	NH2	B	PHE 560	O	HH21	3.423	2.713
FOXO3A (155–251)_ACSL-1	A	ARG 95	N	B	SER 592	O	H	2.549	1.614

FOXO3A (155– 251)_AC SL-1	A	AR G 95	NH 1	B	LEU 593	O	HH1 1	3.294	2.424
FOXO3A (155– 251)_AC SL-1	B	GLY 565	N	A	ARG 94	O	H	3.264	2.361
FOXO3A (433– 511)_AC SL-1	A	SER 57	OG	B	PHE 663	O	HG	3.185	2.248
FOXO3A (433– 511)_AC SL-1	A	SER 65	OG	B	ASP 666	OD1	HG	3.103	2.428
FOXO3A (433– 511)_AC SL-1	A	SER 65	OG	B	ASP 666	OD2	HG	2.221	1.292
FOXO3A (433– 511)_AC SL-1	B	GLN 155	NE2	A	GLN 63	O	HE2 2	3.544	2.805
FOXO3A (433– 511)_AC SL-1	B	AR G 372	NH 1	A	MET 53	O	HH1 2	1.774	0.999

FOXO3A (433– 511)_AC SL-1	B	AR G 387	NE	A	ALA 25	O	HE	1.970	1.173
FOXO3A (604– 644)_AC SL-1	B	AR G 372	NH 1	A	PHE 4	O	HH1 2	2.778	2.043
FOXO3A (604– 644)_AC SL-1	B	LYS 419	NZ	A	GLY 15	O	HZ1	2.840	1.958



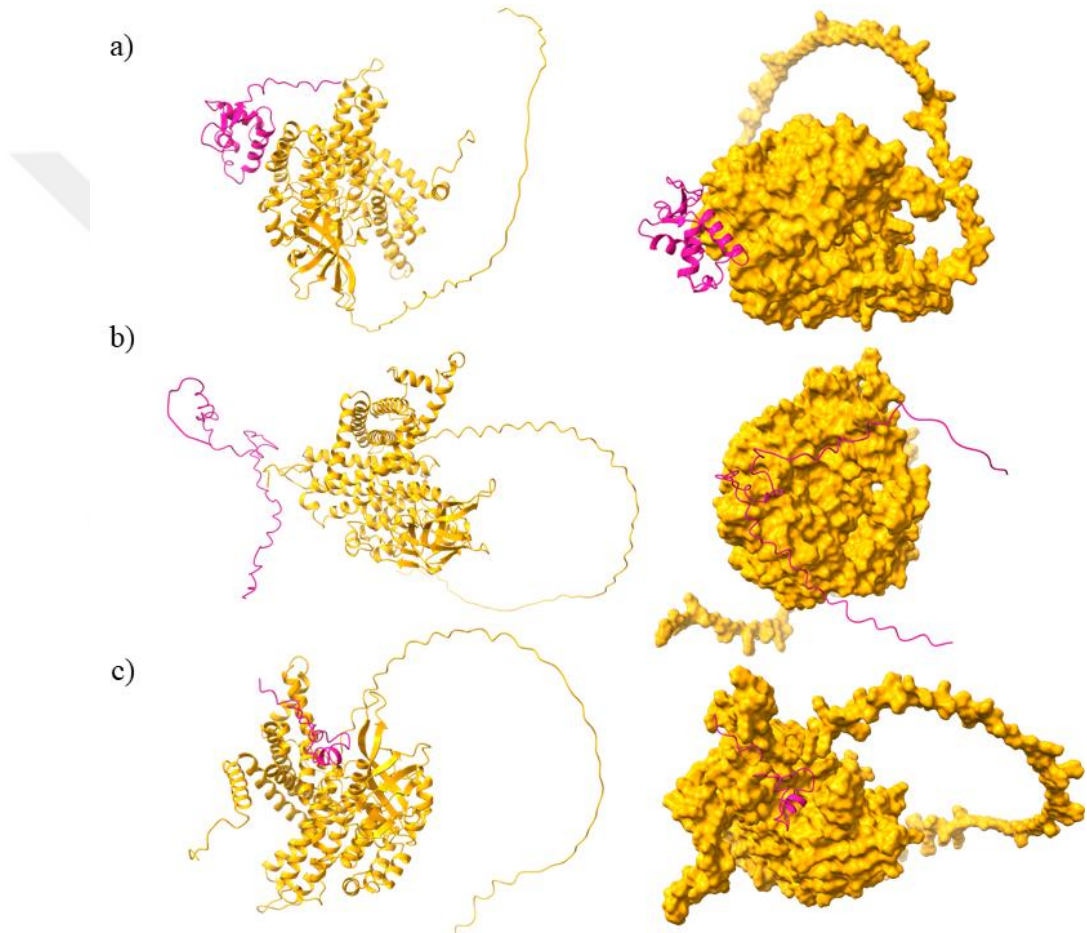
Şekil 42. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile ACSL1 arasındaki kompleks yapıları.

Şekilde, FOXO3A proteininin üç farklı bölgesinin (deep pink) ACSL1 proteini (turquoise) ile etkileşim modelleri gösterilmektedir. a) FOXO3A 155–251 bölgesi ile ACSL1 etkileşimi, b) FOXO3A 433–511 bölgesi ile ACSL1 etkileşimi, c) FOXO3A 604–644 bölgesi ile ACSL1 etkileşimi. Sol panelde şerit (ribbon) gösterimi, sağ panelde ise yüzey (surface) gösterimi.

Analiz edilen FOXO3A–ACSL-1 komplekslerinde, üç farklı FOXO3A domaini (155–251, 433–511 ve 604–644) kullanılarak oluşturulan yapılar üzerinden hidrojen bağı temelli bağlanma analizleri gerçekleştirilmiştir.

FOXO3A (155–251)_ACSL-1 kompleksinde toplam 8 hidrojen bağı tespit edilmiştir. Bu bağların çoğu kutuplu ve bazik kalıntılarla oluşturulmuştur. Özellikle ARG 94 ve PHE 560 çiftli bağlar kurarak bağlanma arayüzünün merkezinde yer almaktadır. ARG 95, farklı ACSL-1 kalıntılarıyla yaptığı çift bağlarla (SER 592 ve LEU 593) ek stabilize

sağlar. Ayrıca, ters yönden gelen GLY 565 – ARG 94 bağı, karşılıklı bağlanmanın olduğunu gösterir. FOXO3A (433–511)_ACSL-1 kompleksinde 6 hidrojen bağı tanımlanmıştır. Özellikle ARG 372 – MET 53 bağı 1.77 Å gibi çok kısa bir mesafeye sahiptir ve bu da onu analizdeki en güçlü bağlardan biri yapmaktadır. FOXO3A (604–644) ACSL-1 kompleksinde ise yalnızca 2 hidrojen bağı tespit edilmiştir. Bağlar, ACSL-1 tarafından başlatılan etkileşimler olup, FOXO3A tarafında PHE 4 ve GLY 15 hedeflenmiştir. Bağların sayıca azlığı, bu domainin ACSL-1 ile zayıf ve daha az özgül bağlanma sergilediğini düşündürmektedir (Tablo 17 ve Şekil 42).



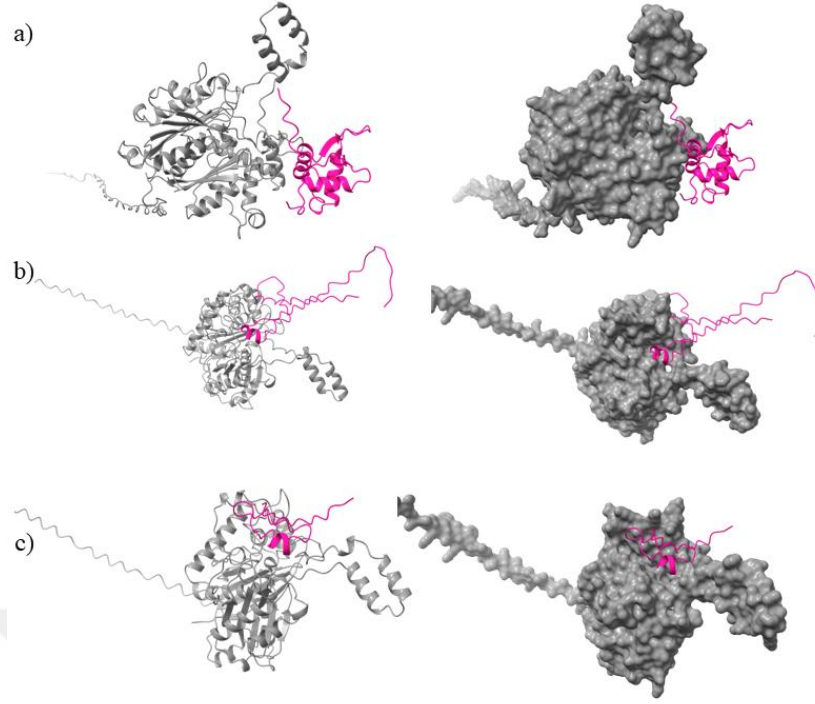
Şekil 43. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile ACADV arasındaki kompleks yapıları.

Şekilde, FOXO3A proteininin üç farklı bölgesinin (deep pink) ACADV proteini (orange) ile etkileşim modelleri gösterilmektedir. a) FOXO3A 155–251 bölgesi ile ACADV etkileşimi, b) FOXO3A 433–511 bölgesi ile ACADV etkileşimi, c) FOXO3A 604–644 bölgesi ile ACADV etkileşimi. Sol panelde şerit (ribbon) gösterimi, sağ panelde ise yüzey (surface) gösterimi.

Tablo 18. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri ACADV arasındaki hidrojen bağları.

Kompleks	Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesa fesi (Å)	D-H..A Mesa fesi (Å)
FOXO3A (604–644)_ACADV	B	LYS 482	NZ	A	GLY 34	O	HZ1	3.523	2.535
FOXO3A (604–644)_ACADV	B	SER 485	OG	A	SER 6	O	HG	1.981	1.383

Sadece FOXO3A'nın C-terminal bölgesini temsil eden 604–644 aralığı ile tam uzunlukta ACADV proteini arasında oluşturulan ColabFold modeli, bağlanma arayüzü bakımından oldukça sınırlı sayıda temas içermektedir. Gerçekleştirilen analiz sonucunda yalnızca 2 adet hidrojen bağı tespit edilmiştir. Bu durum, FOXO3A' nın ACADV ile bağlanma kapasitesinin düşük olabileceğine işaret etmektedir. İlk bağ, LYS 482 (ACADV) ve GLY 34 (FOXO3A) arasında olup, bağın mesafesi 3.52 Å ile oldukça uzun ve dolayısıyla zayıf sayılabilecek düzeydedir. İkinci bağ, SER 485 (ACADV) ve SER 6 (FOXO3A) arasındadır ve bu bağın mesafesi yalnızca 1.98 Å'dir. Bu değer analizdeki en kısa bağ uzunluğudur. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde, FOXO3A (604–644)_ACADV kompleksindeki H-bağı sayısının azlığı, bu domainin ACADV ile güçlü bir bağlanma bölgesi olmadığını düşündürmektedir (Tablo 18 ve Şekil 43).



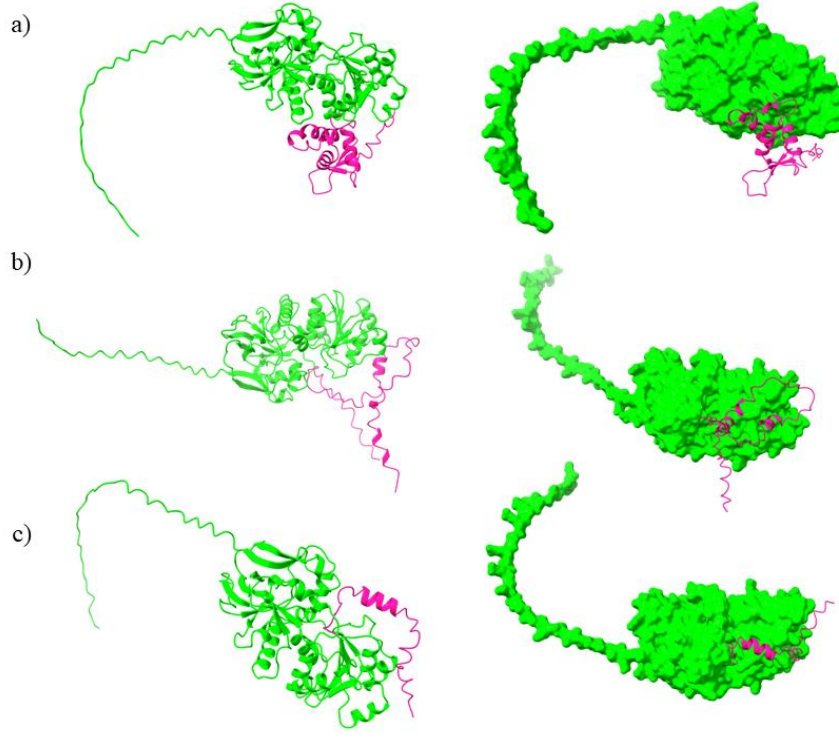
Şekil 44. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile ECHB arasındaki kompleks yapıları.

Şekilde, FOXO3A proteininin üç farklı bölgesinin (deep pink) ECHB proteini (gray) ile etkileşim modelleri gösterilmektedir. a) FOXO3A 155–251 bölgesi ile ECHB etkileşimi, b) FOXO3A 433–511 bölgesi ile ECHB etkileşimi, c) FOXO3A 604–644 bölgesi ile ECHB etkileşimi. Sol panelde şerit (ribbon) gösterimi, sağ panelde ise yüzey (surface) gösterimi.

Tablo 19. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri ECHB arasındaki hidrojen bağları.

Kompleks	Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
FOXO3A (433–511)_ECHB	B	ARG 229	NH 2	A	PRO 15	O	HH21	3.265	2.458
FOXO3A (433–511)_ECHB	B	LYS 348	NZ	A	ALA 25	O	HZ1	2.571	1.794
FOXO3A (604–644)_ECHB	B	LYS 293	NZ	A	ASP 40	OD2	HZ1	2.913	2.120

Yapılan analizlerde, FOXO3A'nın 433–511 ve 604–644 domainlerinin tam uzunlukta ECHB proteini ile oluşturduğu komplekslerde toplamda 3 hidrojen bağı tespit edilmiştir. Bu bağların sayıca sınırlı olması, etkileşimin sınırlı veya hiç olamayabileceğini düşündürmektedir. FOXO3A 433-511 ve ECHB kompleksi içerisinde 2 hidrojen bağı belirlenmiştir. İlk bağda, ARG 229 (ECHB) ve PRO 15 (FOXO3A) 3.26 Å uzunluğunda bir etkileşim kurmaktadır. Mesafe oldukça uzundur ve bu bağı güçsüz olduğuna işaret etmektedir. İkinci bağ olan LYS 348 – ALA 25 arasında kurulan 2.57 Å'lık bağ, ise daha güçlüdür. FOXO3A 604-644 ve ECHB kompleksinde yalnızca tek bir hidrojen bağı bulunmaktadır. LYS 293 (ECHB), ASP 40 (FOXO3A)'nın oluşturduğu bağ 2.91 Å gibi ortalama bir mesafededir (Tablo 19 ve Şekil 44).



Şekil 45. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile MECR arasındaki kompleks yapıları.

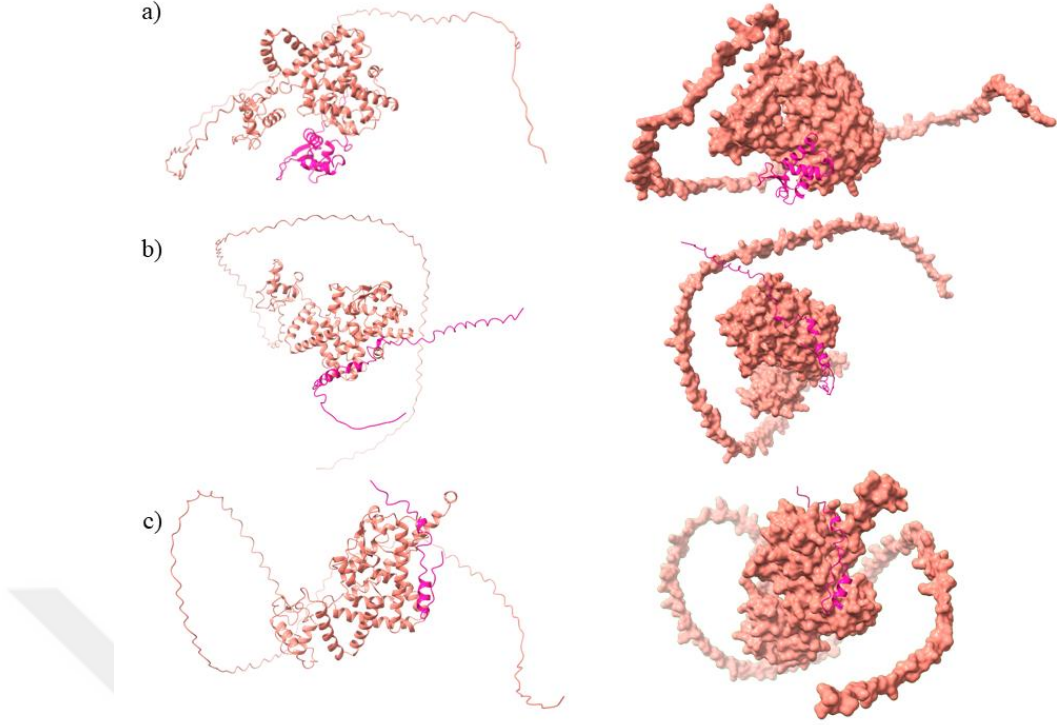
Şekilde, FOXO3A proteininin üç farklı bölgesinin (deep pink) MECR proteini (lime) ile etkileşim modelleri gösterilmektedir. a) FOXO3A 155–251 bölgesi ile MECR etkileşimi, b) FOXO3A 433–511 bölgesi ile MECR etkileşimi, c) FOXO3A 604–644 bölgesi ile MECR etkileşimi. Sol panelde şerit (ribbon) gösterimi, sağ panelde ise yüzey (surface) gösterimi.

Tablo 20. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri MECR arasındaki hidrojen bağları.

Kompleks	Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesafesi (Å)	D-H..A Mesafesi (Å)
FOXO3A (155–251)_MECR	A	ASN 1	N	B	SER 225	O	H3	3.192	2.557
FOXO3A (155–251)_MECR	B	GLY 208	N	A	HIS 58	NE2	H	3.154	2.214
FOXO3A (155–251)_MECR	B	LYS 229	NZ	A	ASN 5	O	HZ1	2.738	1.858
FOXO3A (433–511)_MECR	B	SER 296	OG	A	LEU 42	O	HG	3.159	2.297
FOXO3A (604–644)_MECR	B	LYS 267	NZ	A	ASN 14	OD1	HZ1	3.492	2.547
FOXO3A (604–	B	SER 298	OG	A	PRO 5	O	HG	2.737	1.903

644)_M ECR									
---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

FOXO3A'nın üç farklı domaini ile tam uzunluktaki MECR proteini arasında oluşturulan komplekslerde toplam 6 hidrojen bağı tespit edilmiştir. FOXO3A (155–251) MECR kompleksi 3 hidrojen bağı içermektedir. İlk bağda, ASN 1 (FOXO3A)-, SER 225 (MECR) 3.19 Å gibi kabul edilebilir bir mesafede bağ kurmuştur. Bu temas, FOXO3A'nın en N-terminal bölgesinin bağlanma sürecine dahil olduğunu gösterebilir. İkinci bağda, GLY 208 (MECR), HIS 58 (FOXO3A) arasında gerçekleşmektedir. Üçüncü bağ, LYS 229 (MECR) ASN 5 (FOXO3A) arasındadır ve 2.74 Å mesafesiyle kararlı ve etkili bir bağlanma temasını temsil eder. FOXO3A (433–511) MECR kompleksinde yalnızca 1 hidrojen bağı oluşmuştur. SER 296 (MECR) ve LEU 42 (FOXO3A) arasında olan bu bağ 3.16 Å'lık bir mesafeyle güçsüz bir bağı temsil etmektedir. Bağ sayısının azlığı ve mesafesi bu kompleksin güvenilirliğini sarsmaktadır. FOXO3A (604–644) MECR kompleksinde 2 hidrojen bağı yer almaktadır. İlk bağda, LYS 267 (MECR), ASN 14 (FOXO3A) 3.49 Å gibi biraz uzun ancak yönlü bir mesafeyle elektrostatik etkileşim göstermiştir. İkinci bağ ise SER 298 – PRO 5 arasında olup 2.74 Å ile kararlı bir temas örneği olabilir. Genel olarak değerlendirildiğinde, FOXO3A (155–251) MECR kompleksi, bağ sayısı ve karşılıklı temas bakımından en aktif domain olarak öne çıkmaktadır (Tablo 20 ve Şekil 45).



Şekil 46. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile PPARG arasındaki kompleks yapıları.

Şekilde, FOXO3A proteininin üç farklı bölgesinin (deep pink) PPARG proteini (salmon) ile etkileşim modelleri gösterilmektedir. a) FOXO3A 155–251 bölgesi ile PPARG etkileşimi, b) FOXO3A 433–511 bölgesi ile PPARG etkileşimi, c) FOXO3A 604–644 bölgesi ile PPARG etkileşimi. Sol panelde şerit (ribbon) gösterimi, sağ panelde ise yüzey (surface) gösterimi.

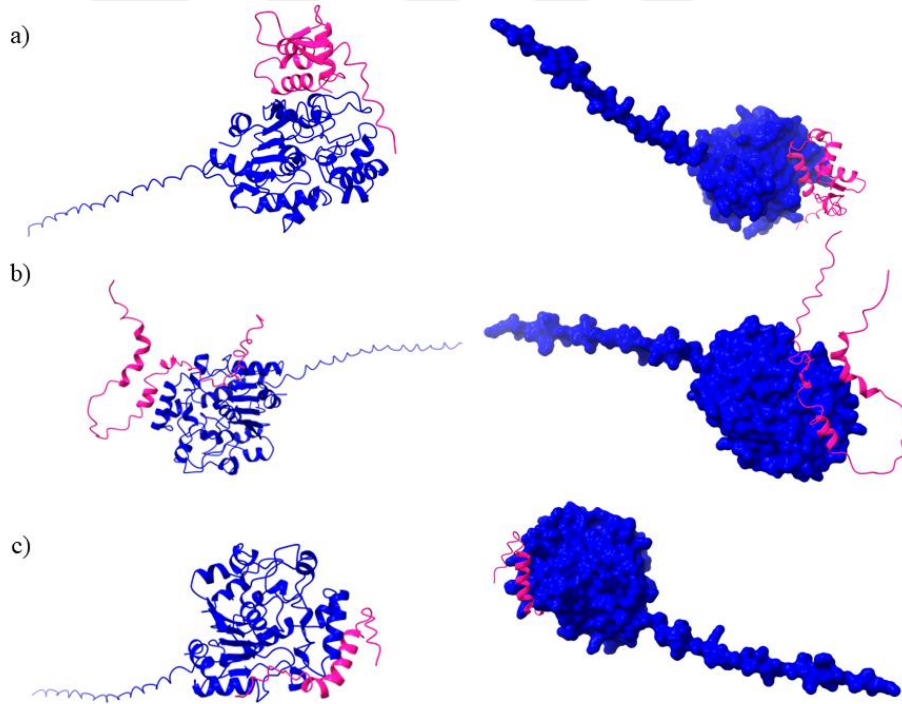
Tablo 21. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri PPARG arasındaki hidrojen bağları.

Kompleks	Donör Zincir	Donör Kalıntı	Donör Atom	Akseptör Zincir	Akseptör Kalıntı	Akseptör Atom	H Atomu	D..A Mesa fesi (Å)	D-H..A Mesa fesi (Å)
FOXO3A (155–251)_PPARG	A	TRP 3	N	B	GLU 379	OE2	H	3.055	2.214
FOXO3A (155–251)_PPARG	A	ARG 65	NH 1	B	TYR 278	OH	HH1 2	3.369	2.494
FOXO3A (155–251)_PPARG	A	ARG 65	NH 2	B	TYR 278	OH	HH2 2	3.383	2.514
FOXO3A (155–251)_PPARG	B	LYS 364	NZ	A	GLY 51	O	HZ1	2.121	1.410
FOXO3A (433–511)_PPARG	A	LEU 38	N	B	GLU 499	OE1	H	3.465	2.571
FOXO3A (433–	A	LEU 38	N	B	GLU 499	OE2	H	3.118	2.166

511)_PP ARG									
FOXO3 A (433– 511)_PP ARG	B	LYS 329	NZ	A	LEU 41	O	HZ3	3.536	2.689
FOXO3 A (433– 511)_PP ARG	B	LYS 329	NZ	A	ASP 45	OD2	HZ2	3.204	2.311
FOXO3 A (604– 644)_PP ARG	A	SER 16	OG	B	GLN 314	OE1	–	1.658	N/A
FOXO3 A (604– 644)_PP ARG	A	AR G 26	NH 2	B	ASN 340	OD1	–	3.401	N/A
FOXO3 A (604– 644)_PP ARG	B	LYS 329	NZ	A	GLU 28	O	–	1.867	N/A

FOXO3A (155–251)_PPARG kompleksinde 4 adet hidrojen bağı oluşturmıştır. Etkileşim, hem FOXO3A'nın N-terminaline yakın hem de orta bölgelerine yayılmıştır. Özellikle ARG 65'in TYR 278 ile yaptığı çiftli bağ önemli gözükmemektedir. Ayrıca, TRP 3 – GLU 379 bağı, uzun mesafeli ancak yönlü bir etkileşim olup bağlanma yüzeyinin kenarlarında sabitleyici görev görebilir. PPARG tarafından başlatılan LYS 364 (PPARG)'in GLY 51 (FOXO3A) ile yaptığı 2.12 Å'lık kısa mesafeli bağ, arayüzün

çift yönlü olduğunu göstermektedir. FOXO3A (433–511) PPARG kompleksinde 4 hidrojen bağı bulunmaktadır. LEU 38 (FOXO3A) aynı anda GLU 499 ile çiftli bağ kurmaktadır. Öte yandan, LYS 329 (PPARG)’in hem LEU 41 hem de ASP 45 ile bağ kurması, PPARG tarafının bağlayıcı rolünü gösterebilir. Bu bağlar 3.2–3.6 Å aralığında bağ mesafelerine sahiptir. FOXO3A (604–644) PPARG kompleksi 3 potansiyel H-bağı bulunmaktadır ancak bağların hidrojen atomları modellenmemiştir. Buna rağmen, mesafeler bağlanma için uygundur. Özellikle SER 16 – GLN 314 bağı 1.66 Å gibi çok kısa bir mesafede olup yüksek bağlanma potansiyeline sahiptir. ARG 26 – ASN 340 bağı ise 3.4 Å ile daha zayıf bir temas sunmaktadır. LYS 329 – GLU 28 bağı ise yine oldukça kısa mesafeli (1.87 Å) olup PPARG’nin aktif bağlayıcı pozisyonunda olduğunu göstermektedir. FOXO3A’nın hem (155–251) hem de (433–511) domainleri, PPARG ile eşit sayıda hidrojen bağı kurarak arayüzde etkin roller üstlenmektedir (Tablo 21 ve Şekil 46).



Şekil 47. ColabFold kullanılarak modellenen FOXO3A domainleri ile PPT-1 arasındaki kompleks yapıları.

Şekilde, FOXO3A proteininin üç farklı bölgesinin (deep pink) PPARG proteini (salmon) ile etkileşim modelleri gösterilmektedir. a) FOXO3A 155–251 bölgesi ile

PPARG etkileşimi, b) FOXO3A 433–511 bölgesi ile PPARG etkileşimi, c) FOXO3A 604–644 bölgesi ile PPARG etkileşimi. Sol panelde şerit (ribbon) gösterimi, sağ panelde ise yüzey (surface) gösterimi.

Tablo 22. FOXO3A' nın üç domaini ve potansiyel etkileşim partneri PPT-1 arasındaki hidrojen bağları.

Kompl eks	Don ör Zinc ir	Don ör Kalı ntı	Don ör Ato m	Aksep tör Zincir	Aksep tör Kalıntı	Aksep tör Atom	H Ato mu	D..A Mesaf esi (Å)	D- H..A Mesaf esi (Å)
FOXO 3A (155– 251)_P PT-1	A	ASN 1	N	B	GLU 260	O	H1	2.616	1.935
FOXO 3A (155– 251)_P PT-1	A	ALA 2	N	B	GLN 259	O	H	3.092	2.320
FOXO 3A (155– 251)_P PT-1	A	SER 7	N	B	GLU 254	OE1	H	2.556	1.718
FOXO 3A (433– 511)_P PT-1	A	SER 29	OG	B	GLU 81	OE1	HG	3.116	2.257

FOXO 3A (604– 644)_P PT-1	B	LYS 165	NZ	A	ASN 38	O	HZ1	3.484	2.649
FOXO 3A (604– 644)_P PT-1	B	ARG 179	NH1	A	GLU 28	O	HH1 1	2.750	1.765
FOXO 3A (604– 644)_P PT-1	B	GLN 291	NE2	A	SER 6	OG	HE2 1	3.112	2.244

FOXO3A (155–251) PPT-1 kompleksinde 3 hidrojen bağı bulunmaktadır. Özellikle ASN 1 – GLU 260 bağı, 2.62 Å gibi ideal bir mesafede bir bağ oluşturmuştur. Ardından gelen ALA 2 – GLN 259 bağı biraz daha uzun olsa da (3.09 Å) anlamlı bir etkileşim olabilir. SER 7 – GLU 254 arasındaki bağ ise 2.56 Å mesafesindedir. Bu bağlar, FOXO3A'nın N-terminal bölgesinin PPT-1 ile etkileşime geçtiğini gösterebilir. FOXO3A (433–511)_PPT-1 kompleksinde yalnızca tek bir hidrojen bağı vardır. SER 29 (FOXO3A) ve GLU 81 (PPT-1) arasında oluşan bu bağ 3.12 Å'lık bir mesafededir. Bağ sayısının azlığı, bu domainin PPT-1 ile sınırlı bir arayüzü olduğunu veya hiç olmadığını düşündürmektedir. FOXO3A (604–644) PPT-1 kompleksi 3 hidrojen bağı içermektedir ve bunların tamamı PPT-1 tarafından başlatılmıştır. Bunlar LYS 165 – ASN 38, ARG 179 – GLU 28, ve GLN 291 – SER arasındadır (Tablo 22 ve Şekil 47).

4.10. HDock ile FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Moleküler Yerleştirilmesi

FOXO3A ve ACSL-1 proteinleri arasında HDock sunucusu ile gerçekleştirilen moleküler yerleştirme (docking) analizine ait sonuçlar, enerjik ve yapısal açıdan anlamlı bağlanma modelleri ortaya koymaktadır. En iyi model yerleştirme skoru -337.98 gibi bir değerler oldukça düşüktür. bu, güçlü bir bağlanma afinitesi olduğunu göstermektedir. Aynı modelin güven skoru da 0.9772 olup, tahminin yüksek doğrulukla yapıldığını ifade etmektedir. İlk beş sıradaki modellerin yerleştirme skorları -300 civarında seyretmekte ve güven skorları 0.95'in üzerindedir, bu da modellerin genel olarak güvenilir olduğunu göstermektedir. FOXO3A ve ACADVL proteinleri arasında HDock sunucusu ile yapılan moleküler yerleştirme analizinde, elde edilen ilk 10 model arasında en yüksek bağlanma potansiyeline sahip yapı, -244.24'lük bir yerleştirme skoruna sahiptir ve bu, bağlanma enerjisinin oldukça düşük olduğunu, yani bağlanmanın güçlü olabileceğini gösterir. Güven skoru da 0.8682 ile oldukça yüksek olup modelin güvenilirliğini desteklemektedir. İlk beş modelin yerleştirme skorları birbirine oldukça yakındır (yaklaşık -244 ile -236 aralığında) ve güven skorları 0.85'in üzerinde seyretmektedir, bu da bu modellerin bağlanma açısından tutarlı ve güvenilir olduğunu göstermektedir. FOXO3A ve ECHB proteinleri arasındaki potansiyel etkileşim HDock sunucusu aracılığıyla incelendiğinde, elde edilen sonuçlar bağlanmanın güçlü olabileceğini göstermektedir. En düşük yerleştirme skoru -288.08 olup en yüksek güven skoru 0.9406'dır. İlk üç modelin yerleştirme skorları -277 ile -288 arasında değişmektedir ve güven skorları da 0.92'nin üzerindedir. FOXO3A ve MECR proteinleri arasında HDock kullanılarak yapılan moleküler yerleştirme analizinde, en iyi yerleştirme skoru 263.15 olup 0.9058 gibi yüksek bir güven skoruna sahiptir. FOXO3A ve PPARG proteinleri arasında gerçekleştirilen HDock yerleştirme analizinde elde edilen sonuçlar, bu iki protein arasında potansiyel olarak anlamlı bir etkileşim olabileceğini göstermektedir. En iyi modelin yerleştirme skoru -272.42 ve güven skoru 0.9204'tür. Bu durum, bu modelin hem bağlanma enerjisi hem de tahmin güvenilirliği açısından güçlü bir aday olduğunu göstermektedir. FOXO3A ve PPT-1 proteinleri arasında HDock sunucusu ile yapılan yerleştirme analizine bakıldığında iki protein arasında potansiyel olarak güçlü bir etkileşim olduğu görülmektedir. En iyi skorları elde eden model -263.96 gibi düşük bir yerleştirme skoru ile bağlanmanın güçlü olduğunu göstermekte, ayrıca 0.9071 gibi

yüksek bir güven skoru ile de bu bağlanma pozisyonunun güvenilirliğini kanıtlamaktadır. Tüm modellerin yerleştirme skorları -263 ile -228 arasında değişmekte olup, güven skorları da 0.82'nin üzerinde seyretmektedir. Her komplekse ait en iyi modellerin yerleştirme ve güven skorları Tablo 23' te özetlenmiştir.

Tablo 23. FOXO3A proteini ile potansiyel etkileşim partnerleri arasında HDOCK sunucusu kullanılarak gerçekleştirilen moleküler yerleştirme analizine ait en iyi modellerin sonuçları.

Protein Kompleksi	HDOCK Yerleştirme Skoru	Güven Skoru
FOXO3A-ACSL-1	-337.98	0.9772
FOXO3A-ACADV	-244.24	0.8682
FOXO3A_ECHB	-288.08	0.9406
FOXO3A_MECR	-263.15	0.9058
FOXO3A_PPARG	-272.42	0.9204
FOXO3A_PPT-1	-263.96	0.9071

4.11. HawkDock ile FOXO3A ve Potansiyel Etkileşim Partnerlerinin Moleküler Yerleştirilmesi

Tablo 24'te, FOXO3A proteininin potansiyel etkileşim partnerleriyle oluşturduğu komplekslerin HawkDock sunucusu kullanılarak gerçekleştirilen moleküler yerleştirme analizine ait en iyi modellerin enerji skorları sunulmuştur. En güçlü bağlanma skoru -5588.02 kcal/mol ile FOXO3A-PPARG kompleksinde gözlenmiştir. Bu sonuç, FOXO3A'nın PPARG ile oldukça güçlü bir etkileşim kurabileceğini ve bu etkileşimin biyolojik olarak oldukça anlamlı olabileceğini göstermektedir. Bilindiği üzere, PPARG, hücrel enerji metabolizmasının, lipogenez ve yağ asidi depolanmasının kritik bir düzenleyicisidir ve FOXO3A ile fonksiyonel etkileşimleri daha önce de raporlanmıştır. Bu kadar güçlü bir yerleştirme skoru, bu biyolojik ilişkiyi destekler niteliktedir. İkinci en güçlü bağlanma -5262.60 kcal/mol ile FOXO3A-ECHB (HADHB) kompleksinde elde edilmiştir. HADHB, mitokondride β -oksidasyonun son basamaklarında görev yapan önemli bir enzimdir. FOXO3A'nın HADHB ile bu derece güçlü bir bağlanma enerjisine sahip olması, onun mitokondriyal enerji metabolizmasıyla doğrudan ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. FOXO3A-

ACSL-1 kompleksi -5242.78 kcal/mol bağlanma skoru ile üçüncü sıradadır. Bu değer, HDOCK analizinde olduğu gibi HawkDock analizinde de FOXO3A'nın ACSL-1 ile güçlü bir etkileşim kurduğunu ortaya koymaktadır. ACSL-1, uzun zincirli yağ asitlerini CoA türevlerine dönüştürerek metabolizmaya kazandıran anahtar bir enzimdir. FOXO3A'nın bu proteinle kurduğu güçlü etkileşim, lipid metabolizmasında oynadığı düzenleyici rolü güçlendirmektedir. FOXO3A-ACADV kompleksi -5030.07 kcal/mol ile orta düzeyde bağlanma afinitesi göstermiştir. ACADV, mitokondrideki kısa zincirli yağ asitlerinin β -oksidasyonunda rol oynayan bir diğer enzimdir. Bu skor, FOXO3A'nın ACADV ile etkileşimini destekler ancak yukarıdaki kompleksler kadar güçlü değildir. FOXO3A-MECR ve FOXO3A-PPT-1 kompleksleri sırasıyla -4230.78 ve -4256.01 kcal/mol skorlarına sahiptir. Bu değerler görece daha düşük afiniteleri temsil etse de, negatif olmaları bu etkileşimlerin biyolojik olarak mümkün ve anlamlı olabileceğini gösterir. MECR, mitokondriyal yağ asidi biyosentezinde yer alırken; PPT-1 (palmitoyl-protein thioesterase-1), FOXO3A'nın potansiyel posttranslasyonel modifikasyonlarından biri olan palmitoilasyon süreciyle ilişkili olabilir.

Tablo 24.FOXO3A proteini ile potansiyel etkileşim partnerleri arasında HawkDock sunucusu kullanılarak gerçekleştirilen moleküler yerleştirme analizine ait en iyi modellerin sonuçları.

Protein Kompleksi	HawkDock Yerleştirme Skoru
FOXO3A-ACSL-1	-5242,78
FOXO3A-ACADV	-5030,07
FOXO3A_ECHB	-5262,60
FOXO3A_MECR	-4230,78
FOXO3A_PPARG	-5588,02
FOXO3A_PPT-1	-4256,01

4.12. Bölge – Spesifik Mutagenез

ColabFold ile elde edilen tam uzunluktaki FOXO3A-protein komplekslerinde yer alan ve Chimera X ile analiz edilen hidrojen bağlarının, yapısal ve fonksiyonel önemini değerlendirebilmek amacıyla, bu bölgelerde bulunan amino asitler hedeflenerek

BeatMusic aracıyla sistematik alanin mutagenezi uygulanmıştır. FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin etkileşimli olduğu düşünülen rezidülerinin ALA'ya mutasyonun kompleksin kararlılığı üzerindeki etkilerinin ve bağlanma enerjisindeki değişikliklerin ölçülmesi amaçlandı. Her bir kompleks için uygulanan mutasyon ve bağlanma enerjisindeki değişim Tablo 25' te verilmiştir.

Tablo 25. BeatMusic aracı kullanılarak gerçekleştirilen bölge spesifik mutagenез analize ait sonuçlar.

Protein Kompleksi	Zincir	Pozisyon	Mutasyon	$\Delta\Delta G_{Bind}$ (kcal/mol)	Bağlanma Afinitesi
FOXO3A_ACSL-1	A	184	Y $\rightarrow$ A	0,89	↓
	A	211	R $\rightarrow$ A	2,58	↓
	A	626	S $\rightarrow$ A	1,46	↓
	A	629	R $\rightarrow$ A	0,56	↓
	A	648	T $\rightarrow$ A	1,36	↓
	B	178	Y $\rightarrow$ A	1,70	↓
	B	277	S $\rightarrow$ A	-0,08	↑
	B	372	R $\rightarrow$ A	1,34	↓
	B	458	Y $\rightarrow$ A	1,99	↓
	B	561	K $\rightarrow$ A	1,57	↓
	B	675	K $\rightarrow$ A	1,22	↓
FOXO3A_PPARG	A	27	R $\rightarrow$ A	2,33	↓
	A	29	R $\rightarrow$ A	0,67	↓
	A	30	S $\rightarrow$ A	0,74	↓
	A	32	T $\rightarrow$ A	1,15	↓
	A	55	S $\rightarrow$ A	0,55	↓
	A	470	L $\rightarrow$ A	3,54	↓
	B	189	K $\rightarrow$ A	1,61	↓
	B	191	Q $\rightarrow$ A	1,41	↓
	B	329	K $\rightarrow$ A	1,76	↓

	B	378	$R \rightarrow A$	0,61	↓
FOXO3A PPT-1	A	208	$N \rightarrow A$	1,63	↓
	A	209	$S \rightarrow A$	0,40	↓
	A	378	$L \rightarrow A$	3,39	↓
	B	47	$N \rightarrow A$	1,11	↓
	B	248	$R \rightarrow A$	1,64	↓
	B	292	$L \rightarrow A$	1,99	↓
	B	294	$E \rightarrow A$	0,20	↓
FOXO3A_MECR	A	207	$K \rightarrow A$	0,35	↓
	A	639	$D \rightarrow A$	1,50	↓
	A	641	$N \rightarrow A$	1,86	↓
	B	180	$Q \rightarrow A$	1,74	↓
	B	195	$G \rightarrow A$	0,04	↓
	B	252	$K \rightarrow A$	0,41	↓
	B	311	$W \rightarrow A$	1,09	↓
	B	313	$S \rightarrow A$	0,45	↓
	B	364	$F \rightarrow A$	1,39	↓
FOXO3A_ACADV	A	137	$Q \rightarrow A$	0,11	↓
	A	162	$Y \rightarrow A$	1,73	↓
	A	193	$Y \rightarrow A$	1,47	↓
	A	197	$K \rightarrow A$	0,70	↓
	A	208	$N \rightarrow A$	1,39	↓
	A	213	$N \rightarrow A$	0,74	↓
	A	245	$K \rightarrow A$	1,23	↓
	A	381	$G \rightarrow A$	0,14	↓
	B	492	$K \rightarrow A$	1,95	↓
	B	556	$K \rightarrow A$	1,93	↓
FOXO3A_ECHB	A	25	$Q \rightarrow A$	0,76	↓
	B	395	$S \rightarrow A$	0,72	↓
	B	396	$D \rightarrow A$	0,77	↓
	B	397	$W \rightarrow A$	2,98	↓

FOXO3A ve ACSL-1 proteinleri arasındaki etkileşimi değerlendirmek amacıyla yapılan bölge spesifik mutagenез analizinde, bağlanma arayüzünde yer alan rezidülerin bağlanma serbest enerjisine ($\Delta\Delta G_{\text{bind}}$) etkileri BeatMusic aracıyla hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, mutasyonların büyük çoğunluğunun bağlanma afinitesini azalttığını göstermektedir. Özellikle zincir A'daki R211A mutasyonu $\Delta\Delta G$ değeri 2.58 kcal/mol ile en yüksek destabilizasyonu göstermekte, bu da bu kalıntının bağlanma açısından kritik rol oynadığını işaret etmektedir. Benzer şekilde S626A (1.46 kcal/mol), T648A (1.36 kcal/mol) ve Y184A (0.89 kcal/mol) gibi mutasyonlar da bağlanmayı zayıflatıcı etki göstermiştir. Zincir B'de de benzer şekilde, Y178A, S372A, Y458A ve K561A mutasyonları bağlanma afinitesini anlamlı şekilde düşürmüş, $\Delta\Delta G$ değerleri 1.34 ile 1.99 kcal/mol arasında değişmiştir. Bu durum, FOXO3A ile ACSL-1 arasındaki etkileşimde hem FOXO3A'ya ait (zincir A), hem de ACSL-1'e ait (zincir B) kalıntıların bağlanma stabilitesi için önemli olduğunu göstermektedir. İstisnai olarak, zincir B'deki S277A mutasyonu bağlanma afinitesini hafifçe artırmış ($\Delta\Delta G = -0.08$ kcal/mol) ve bu rezidünün bağlanmaya olumsuz etkisi olabileceğini düşündürmüştür. FOXO3A ve PPARG proteinleri arasındaki komplekse bakıldığında bağlanma arayüzündeki birçok kalıntının mutasyonu bağlanma afinitesini düşürmüştür. Özellikle zincir A'daki L470A mutasyonu 3.54 kcal/mol ile en yüksek destabilizasyonu göstermekte ve bu kalıntının bağlanma için kritik olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde R27A (2.33 kcal/mol), K329A (1.76 kcal/mol) ve R189A (1.61 kcal/mol) mutasyonları da belirgin destabilizasyon yaratmıştır. Tüm mutasyonlar bağlanma afinitesini azaltmış ($\Delta\Delta G > 0$), bu da bu kalıntıların FOXO3A–PPARG etkileşimi açısından önemli olduğunu ve arayüz kararlılığına katkı sağladığını göstermektedir. FOXO3A ve PPT-1 proteinleri arasındaki kompleksinde tüm mutasyonların bağlanma afinitesini azalttığı görülmüştür ($\Delta\Delta G > 0$). Özellikle zincir A'daki L378A mutasyonu 3.39 kcal/mol ile en yüksek destabilizasyonu göstermiştir. Ayrıca N208A, R248A ve L292A mutasyonları da bağlanmayı ciddi ölçüde zayıflatmıştır. FOXO3A ve MECR proteinleri arasındaki kompleks mutasyonların büyük çoğunluğunun bağlanma afinitesini azalttığı görülmüştür. Özellikle zincir A'daki N641A (1.86 kcal/mol) ve zincir B'deki Q180A (1.74 kcal/mol) mutasyonları en yüksek destabilizasyonu göstererek, bu kalıntıların bağlanma stabilitesi açısından kritik olduğunu ortaya koymuştur. Diğer taraftan, G195A mutasyonu (0.04 kcal/mol) bağlanma afinitesini neredeyse etkilememiştir. FOXO3A ve ACADVL (ACADV) proteinleri arasındaki kompleksinde mutasyonlar bağlanma afinitesini azaltıcı

(destabilize edici) etki göstermiştir. Özellikle zincir B'deki K492A ve K556A mutasyonları sırasıyla 1.95 ve 1.93 kcal/mol $\Delta\Delta G$ değerleriyle en yüksek destabilizasyonu göstermiştir. Zincir A'da ise Y162A, Y193A, N208A ve K197A gibi mutasyonlar da bağlanmayı zayıflatmış ve bağlanma arayüzündeki kritik rolleri desteklemiştir. FOXO3A - ECHB kompleksinde arayüzde yer alan tüm mutasyonlar bağlanma afinitesini azaltıcı etki göstermiştir ($\Delta\Delta G > 0$). Özellikle zincir B'deki W397A mutasyonu 2.98 kcal/mol ile en yüksek destabilizasyonu göstermekte ve bu rezidünün bağlanma açısından kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Q25A, S395A ve D396A mutasyonları da bağlanma afinitesinde anlamlı düşüşlere neden olmuştur ($\Delta\Delta G \approx 0.7-0.8$ kcal/mol). Genel olarak, FOXO3A-ACSL-1, FOXO3A-MECR, FOXO3A-PPARG, FOXO3A-ECHB ve FOXO3A-PPT-1 komplekslerinde ACSL-1 kompleksindeki S277A mutasyonu hariç olmak üzere birçok mutasyon 1 kcal/mol üzerinde $\Delta\Delta G$ değerlerine ulaşmış ve bağlanma afinitesi azalmıştır.

4.13. Klinik Açıdan Önemli Varyantların FOXO3A ve Potansiyel Partnerlerin Etkileşimi Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Ensembl VEP, CADD, REVEL, MetaLR ve Mutation Assessor gibi biyoinformatik araçlarla patojenitesi yüksek olduğu belirlenen üç missense varyantın (N208Y, R211W ve R249L) FOXO3A'nın potansiyel etkileşim partnerleriyle olan bağlanma afinitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, her kompleksin wild-type hali ColabFold aracılığıyla modellenmiştir. Ardından, BeatMusic platformu kullanılarak bu kompleksler üzerinde ilgili mutasyonlar uygulanmıştır.

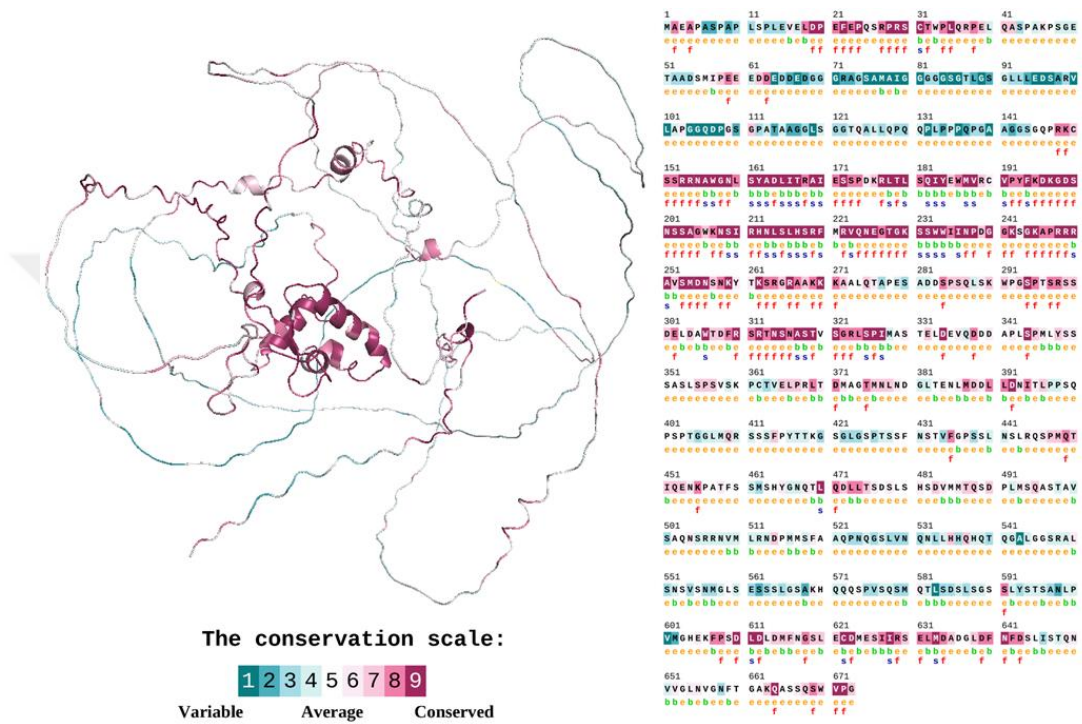
Tablo 26. FOXO3A proteini ile potansiyel etkileşim partnerleri arasında oluşturulan komplekslerde klinik açıdan önemli varyantların bağlanma enerjisine etkisi.

Kompleks	Pozisyon	Mutasyon	$\Delta\Delta G_{Bind}$ (kcal/mol)
FOXO3A_ACSL1	208	N $\rightarrow$ Y	0.09
	211	R $\rightarrow$ W	-0.33
	249	R $\rightarrow$ L	-0.06
FOXO3A_PPT-1	208	N $\rightarrow$ Y	0.58
	211	R $\rightarrow$ W	0.39
	249	R $\rightarrow$ L	-0.15
FOXO3A_PPARG	208	N $\rightarrow$ Y	0.11
	211	R $\rightarrow$ W	0.22
	249	R $\rightarrow$ L	-0.25
FOXO3A_ACADV	208	N $\rightarrow$ Y	0.07
	211	R $\rightarrow$ W	0.64
	249	R $\rightarrow$ L	-0.13
FOXO3A_ECHB	208	N $\rightarrow$ Y	0.09
	211	R $\rightarrow$ W	0.22
	249	R $\rightarrow$ L	-0.27
FOXO3A_MECR	208	N $\rightarrow$ Y	0.73
	211	R $\rightarrow$ W	0.16
	249	R $\rightarrow$ L	-0.24

N208Y mutasyonu çoğu komplekste pozitif $\Delta\Delta G$ değerleri üretmiş, özellikle PPT-1 (0.58 kcal/mol) ve MECD (0.73 kcal/mol) komplekslerinde etkileşimi zayıflatmış gözlemlenmiştir. R211W mutasyonu, bazı komplekslerde bağlanma enerjisini artırmış (örneğin ACSL1: -0.33 kcal/mol), bazı komplekslerde ise zayıflatıcı etki göstermiştir (örneğin ACADV: 0.64 kcal/mol, MECD: 0.16 kcal/mol). R249L mutasyonu ise çoğu komplekste negatif $\Delta\Delta G$ değerleri ile bağlanma afinitesini artırıcı etki göstermiştir. Örneğin, PPARG (-0.25 kcal/mol), PPT-1 (-0.15 kcal/mol) ve ACADV (-0.13 kcal/mol) komplekslerinde bağlanmanın daha da stabil hale geldiği görülmektedir. Tablo 26’ da, FOXO3A proteininin yüksek patojenite potansiyeline sahip üç missense varyantı (N208Y, R211W, R249L) altı farklı proteinle oluşturduğu kompleksler üzerinde değerlendirilmiştir. Pozitif $\Delta\Delta G$ değerleri bağlanma afinitesinin azaldığını, negatif değerler ise bağlanmanın güçlendiğini göstermektedir. Özellikle N208Y mutasyonu bazı komplekslerde belirgin destabilizasyon etkisi gösterirken, R249L

mutasyonu genel olarak bağlanma stabilitesini artırıcı yönde etkiler göstermiştir. R211W mutasyonunun bağlanma arayüzünde farklı proteinlere göre değişen roller oynayabileceğini ve mutasyonun etkisinin bağlanmaya özgü olabileceğini göstermektedir.

4.14. Evrimsel Korunma Analizi

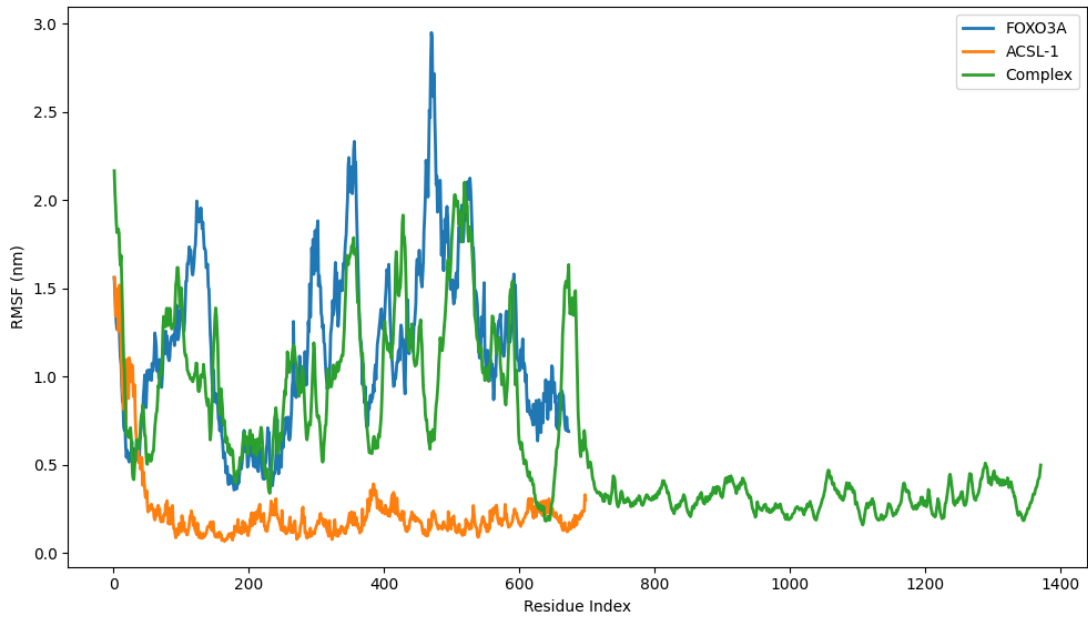


Şekil 48. ConSurf FOXO3A evrimsel korunma analizi.

ColabFold ile tahmin edilen FOXO3A ve potansiyel etkileşim partnerlerinin oluşturduğu komplekslerin, etkileşimli bölgelerinin işlevselliği açısından daha fazla değerlendirilebilmesi için FOXO3A'nın evrimsel olarak korunan bölgeleri ConSurf sunucusu ile değerlendirilmiştir. ConSurf sonuçlarına göre FOXO3A proteini, evrimsel olarak farklı derecelerde korunmuş birçok rezidü içermektedir. Renk skalasına göre 1 (değişken) ile 9 (yüksek derecede korunmuş) arasında puanlanan rezidüler, hem yapısal hem de fonksiyonel olarak değerlendirilebilir. Özellikle 150–250. pozisyonları arasında yer alan rezidülerin çoğu 8–9 seviyesinde yüksek korunmuşluk göstermekte ve büyük bir kısmı "f" (fonksiyonel, yani yüksek derecede korunmuş ve yüzeyde) olarak etiketlenmiştir. Bu, FOXO3A'nın bu bölgelerinin diğer proteinlerle veya DNA ile olası etkileşimleri açısından kritik olduğunu göstermektedir.

Ayrıca bazı rezidüler hem yüksek korunmuş hem de "s" etiketi taşımaktadır; bu da onların yapısal stabilite açısından önemli pozisyonlarda bulunduğunu gösterir. Özellikle 160–180 ve 250–300 arası bölgelerde bu tür yapısal rezidü yoğunluğu görülebilir. Bu alanlar, protein katlanması ve genel yapısal bütünlüğün korunması açısından önemli olabilir. C-terminal ve N-terminal bölgelerinde ise daha düşük korunma skorlarına sahip, esnek rezidüler gözlenmiştir. Bu bölgelerin fonksiyonel katkısı sınırlı olabilir veya içsel olarak düzensiz yapılar içerebilir (Şekil 48).

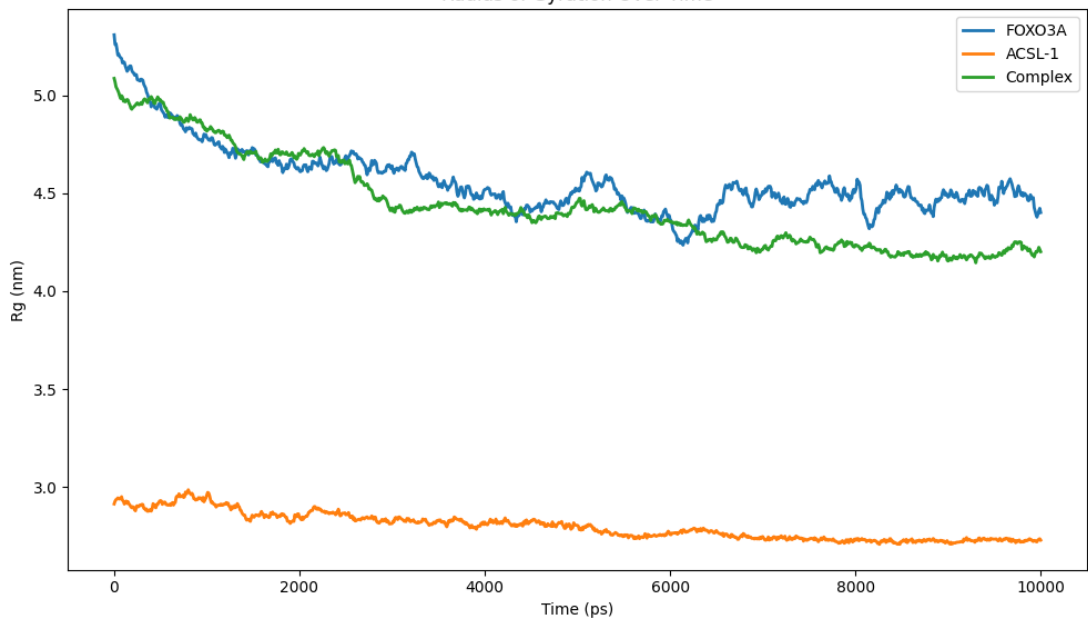
4.15. Moleküler Dinamik Simülasyon



Şekil 49. FOXO3A, ACSL-1 ve kompleks yapısı için rezidü bazında RMSF analizi.

RMSF (Root Mean Square Fluctuation), moleküler dinamik simülasyonlarında her bir amino asit rezidüsünün zaman içerisindeki ortalama konumsal sapmasını ifade etmektedir. Bu değer, proteinde hangi bölgelerin daha esnek veya daha stabil olduğunu anlamaya yarar. RMSF değeri yüksek olan bölgeler genellikle loop'lar, terminaller veya içsel olarak düzensiz bölgelerdir. Düşük RMSF değerleri ise alfa heliks ve beta tabaka gibi ikincil yapı elemanlarının bulunduğu daha kararlı bölgeleri temsil eder. Şekil 49' da verilen grafikte üç farklı RMSF eğrisi karşılaştırılmıştır. FOXO3A'nın serbest hali, 100–600 aminoasit arası bölgelerde yüksek RMSF değerlerine sahiptir. Bu da bu bölgenin esnek olduğunu ve protein yapısında düzensizlikler taşıdığını göstermektedir. FOXO3A'nın özellikle belirli bölgelerde yüksek esneklik sergilediği,

ancak forkhead DNA bağlanma domainine denk gelen 150.250 aminoasitler arasındaki bölgede RMSF değerlerinin belirgin şekilde düştüğü gözlemlenmektedir. ACSL-1, simülasyon boyunca genel olarak düşük RMSF değerleri göstermiştir. Yaklaşık 0.2–0.5 nm arasında değişen bu değerler, ACSL-1'in oldukça kararlı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Kompleksin RMSF grafiği incelendiğinde, FOXO3A'nın serbest haldeyken esnek olan bazı bölgelerinde (özellikle 200–600 arası) belirgin bir stabilizasyon olduğu görülmektedir. Bu durum, bağlanmanın FOXO3A'nın bazı bölgelerinde yapısal kararlılığı artırdığını düşündürmektedir. ACSL-1'in kompleks içindeki RMSF'si serbest haline göre hafif artış göstermektedir.



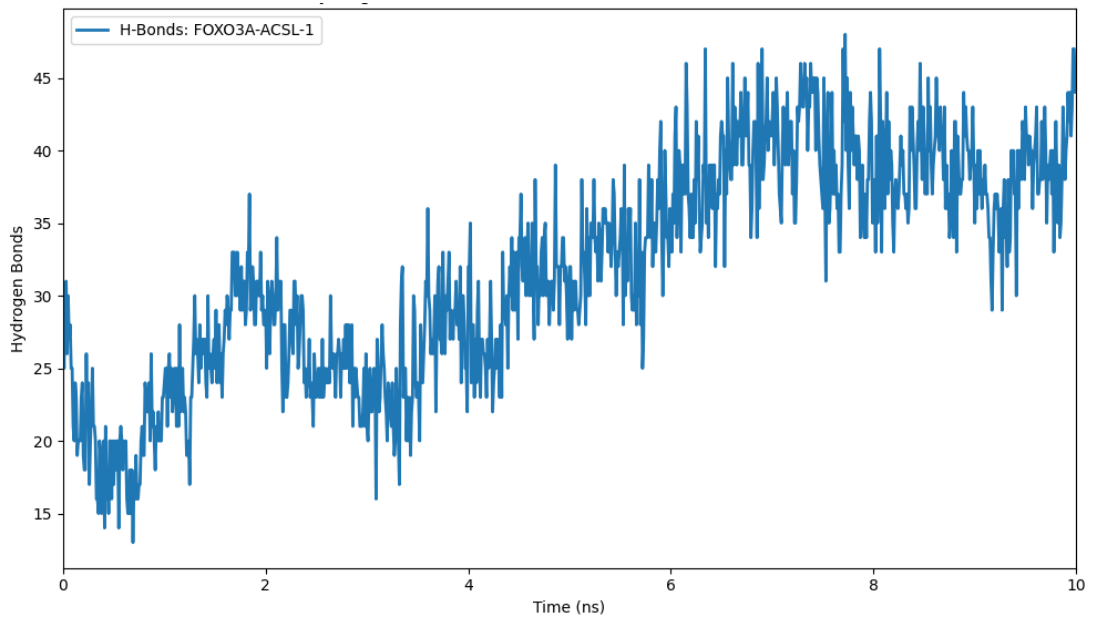
Şekil 50. Radius of gyration (Rg) değerlerinin 10 ns'lik simülasyon boyunca zamanla değişimi.

Gyrasyon yarıçapı (Radius of Gyration, Rg), bir molekülün tüm atomlarının kütle merkezine olan ortalama uzaklığını ifade eden yapısal bir parametredir. Rg değeri yüksekse molekül daha açık, düzensiz veya esnek bir yapıya, düşükse molekül daha kompakt, sıkı katlanmış ve kararlı bir yapıya sahiptir.

Şekil 50' de FOXO3A, ACSL-1 ve bu iki proteinin oluşturduğu kompleksin simülasyon süresi boyunca Rg değişimi gözlemlenmektedir. FOXO3A'nın başlangıçta yaklaşık 5.2 nm civarında olan Rg değeri zamanla 4.4–4.5 nm seviyelerine düşmüştür. Bu da yapının daha düzenli hale geldiğini düşündürmektedir. Bu düşüş, FOXO3A'nın

serbest haldeyken düzensiz bir yapıya sahip olduğunu, ancak 10 ns boyunca kısmen katlanarak daha düzenli bir yapıya sahip olduğunu düşündürmektedir. ACSL-1'in Rg değeri simülasyon boyunca yaklaşık 2.9 nm'den 2.8 nm'ye düşmüştür: Bu da ACSL-1'in başından itibaren düzenli bir yapıya sahip olduğunu ve 10 ns içinde de bu yapıyı koruduğu anlamına gelmektedir.

Kompleksin Rg değeri ise yaklaşık 5.0 nm'den başlayıp 4.3 nm'ye doğru düzenli bir azalma göstermektedir. Bu azalma, FOXO3A'nın ACSL-1 ile etkileşimi sonucunda daha düzenli hale göstermektedir.



Şekil 51. FOXO3A ve ACSL-1 arasında kurulan hidrojen bağlarının zamanla değişimi.

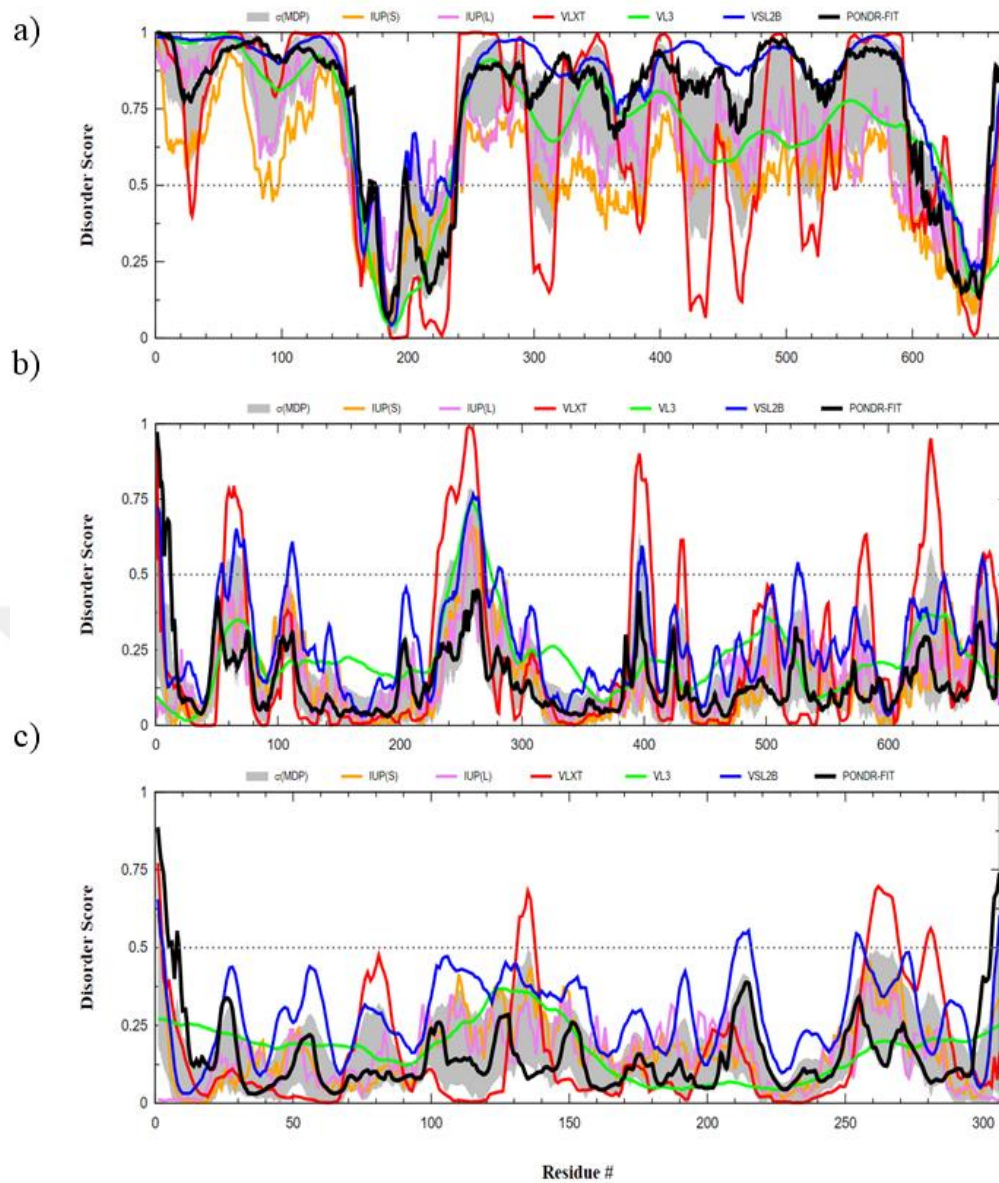
Şekil 51' deki grafikte FOXO3A–ACSL-1 kompleksinin 10 ns'lik moleküler dinamik simülasyonu boyunca hidrojen bağlarının sayısındaki değişim izlenmektedir. Simülasyonun başında bağ sayısının 20–25 civarında olduğu, kısa bir süre sonra 15 seviyelerine indiği, ardından ise zamanla düzenli bir artış gösterdiği görülmektedir. İlk andaki düşüşün, sistemin enerji minimizasyonu sonrası yeni ortamına uyum sağlaması ve bağlanma yüzeyinde yeniden düzenlenme süreci olduğu düşünülebilir. Zaman ilerledikçe hidrojen bağı sayısının artması, FOXO3A ile ACSL-1 arasındaki temas bölgelerinin ve etkileşim yüzeyinin arttığını göstermektedir. Özellikle 6 ns'den sonra bağ sayısının 35–45 aralığında olması kompleksin yapısal olarak oturduğunu ve kararlı bir bağlanma formuna geçtiğini düşündürmektedir. Bu yüksek bağ sayısı, elektrostatik

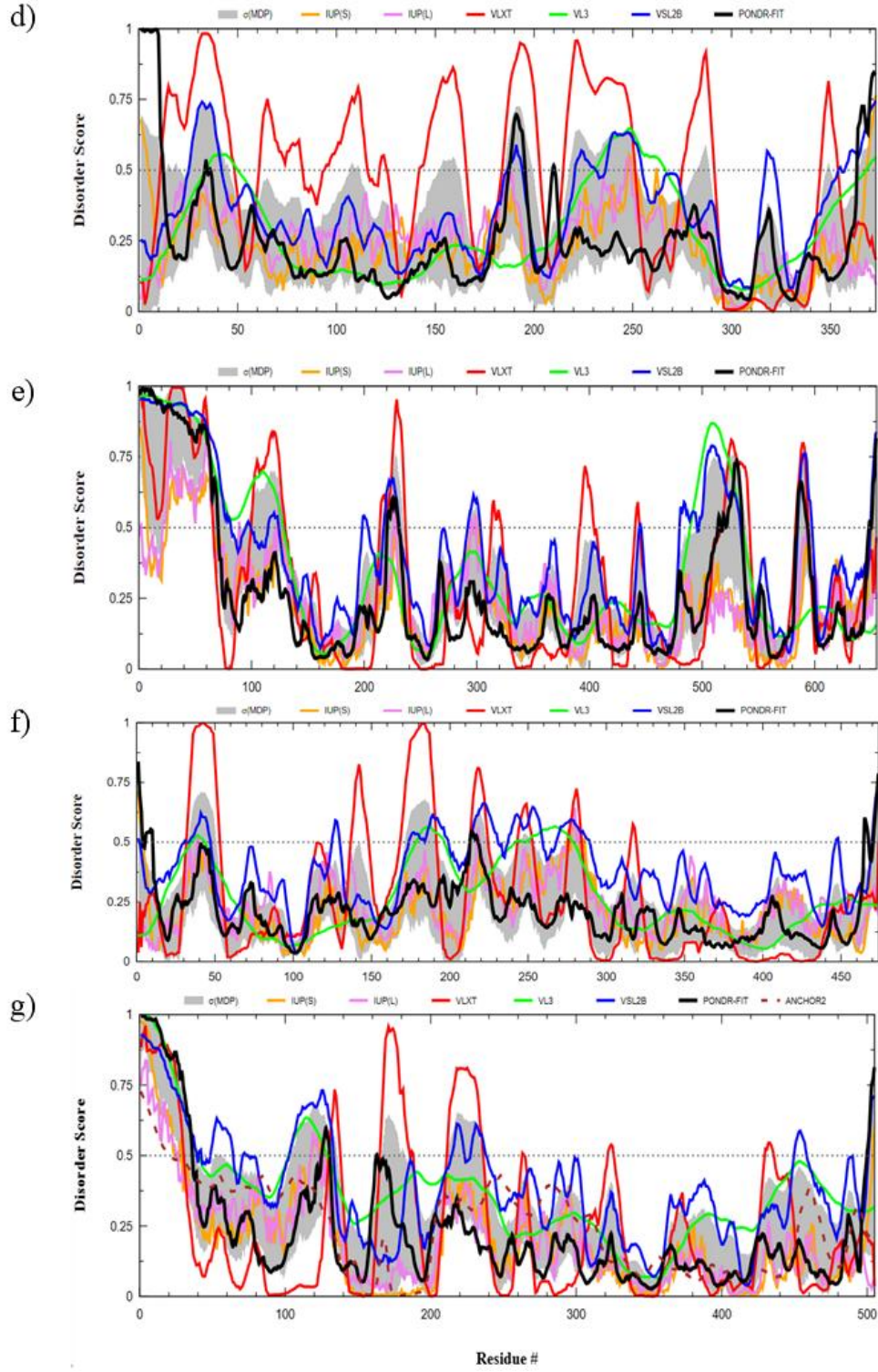
etkileşimlerin güçlü olduğu, kompleksin çözeltide termodinamik olarak avantajlı bir konformasyona ulaştığı ve bu durumun biyolojik ortamda da korunabileceği anlamına gelebilir. Sonuç olarak, FOXO3A–ACSL-1 kompleksinin zaman içinde giderek güçlenen ve kararlılık kazanan bir etkileşim ağı oluşturabileceği görülmektedir.

4.16. İçsel Bozukluk Analizi

4.16.1. Amino Asit Başına Rezidü Bozukluğu Tahmini

İçsel bozukluğu rezidü bazında ölçmek için RIDAO aracı kullanılmıştır. Proteinlerdeki her bir amino asidin bozukluk skorunu tahmin etmek için PONDR VLXT, PONDR VL3, PONDR VSL2B, PONDR FIT'in yanı sıra IUPred-Long ve IUPred-Short kullanıldı (Şekil 44). PONDR paketi, proteinlerin yüksek derecede düzenli ($PPDR < \%10$), orta derecede düzensiz ($\%10 \leq PPDR < \%30$) ve oldukça düzensiz ($PPDR \geq \%30$) olduğu kabul edilen, tahmin edilen düzensiz rezidülerin yüzdelere (PPDR puanları) dayalı olarak proteinlerin sınıflandırılmasını sağlar.





Şekil 52. Proteinlerin içsel bozukluğa yatkınlığının değerlendirilmesi.

Proteinlerin içsel bozukluğa yatkınlığının değerlendirilmesi. PONDR VLXT, PONDR VL3, PONDR VSL2, PONDR FIT, IUPred_long ve IUPred_short çıktılarını bir araya getiren RIDAO tarafından oluşturulan kalıntı başına içsel bozukluk profilleri. Proteinin ortalama bozukluk profili (MDP), öngörücülerin bozukluk

profillerinin ortalaması alınarak hesaplanır. Gri gölgeler MDP hata dağılımını temsil eder. 0,5'lik bozukluk skorundaki kesikli çizgi, düzen ile düzensizlik arasındaki eşiktir; burada 0,5'in üzerindeki rezidüler/bölgeler düzensizdir ve 0,5'in altındaki rezidüler/bölgeler düzenlidir. a)FOXO3A, b)ACSL-1 , c)PPT-1, d)MECR, e)ACADV , f)ECHB, g)PPARG .

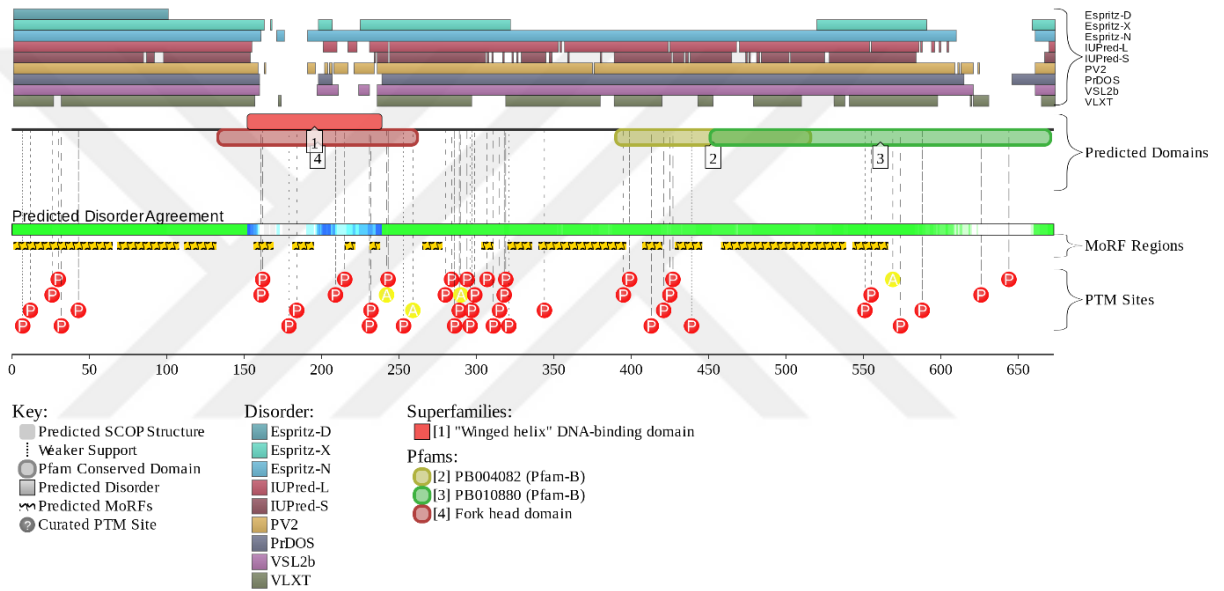
FOXO3A'nın PONDR® VLXT'ye göre genel içsel bozukluk yüzdesi 64,04, PONDR VL3'e göre %82, PONDR VSL2B'ye göre %85,88, PONDR-FIT' e göre %81.87, IUPred-Long'a göre %78,01, IUPred-Short'a göre %62,41' dir. Bu oranlar FOXO3A' nın yüksek derecede düzensiz bir protein olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır. ACSL-1' in genel içsel bozukluk yüzdesinin, PONDR VLXT'ye göre %17,19 (orta derecede içsel olarak düzensiz), PONDR VL3'e göre %4,58 (düzenli), PONDR VSL2B'ye göre %11,03 (orta derecede içsel olarak düzensiz), PONDR-FIT' e göre %2.29 yani (düzenli), IUPred-Long'a göre %1,15 (düzenli) ve IUPred-Short'a göre %2,72 oranında içsel olarak düzensiz tahmin edildi. PPT-1' in genel içsel bozukluk yüzdesi, PONDR VLXT'ye göre %7,84, PONDR VL3'e göre %0.00, ve PONDR VSL2B'ye göre %3,59, PONDR-FIT' e göre %3.59, IUPred-Long'a göre %0,00, IUPred-Short'a göre %0,65' tir. Bu da PPT-1' in düzenli bir protein olduğunu göstermektedir. MECD' nin genel bozukluk yüzdesi PONDR VLXT'ye göre %51,47 (yüksek derecede içsel olarak düzensiz), PONDR VL3'e göre % 15.55 (orta derece düzensiz), PONDR VSL2B' ye göre % 20.64 (orta derecede düzensiz), PONDR-FIT' e göre % 8.85 (düzenli), IUPred-Long'a göre % 1.07 (düzenli), IUPred-Short'a göre % 3.49 (düzenli)'dur. Genel olarak değerlendirildiğinde MECD proteinini orta derecede düzenli bir protein olarak tahmin edilmiştir. ACADV' nin PONDR VLXT'ye göre % 27.33, PONDR VL3'e göre % 26.41, PONDR VSL2B'ye göre % 30.53, PONDR-FIT' e göre % 17.56, , IUPred-Long'a göre % 8.85, IUPred-Short'a göre % 9.16 genel bozukluk yüzdesine sahiptir. Bozukluk yüzdeleri genel olarak değerlendirildiğinde, ACADV proteininin orta derece içsel bozukluğa sahip olduğu söylenebilir. ECHB' nin PONDR® VLXT'ye göre % 19.20 bozuk yani yüksek derecede bozuk, PONDR® VL3'e göre %13.71 bozuk yani yüksek derecede bozuk ve PONDR® VSL2B'ye göre % 24.47 bozuk yani yüksek düzeyde bozuk, PONDR-FIT' e göre % 4.43 yani yüksek düzeyde bozuk, IUPred-Long'a göre % 2.32 bozuk, IUPred-Short'a göre % 3.59 bozuk yani yüksek derecede düzensiz olduğu tahmin edildi. PPARG' nın PONDR® VLXT'ye

göre %19.21 bozuk yani yüksek derecede bozuk, PONDR VL3'e göre %12.28 bozuk yani yüksek derecede bozuk ve PONDR VSL2'ye göre % 24.95 bozuk yani yüksek düzeyde bozuk yani yüksek derecede düzensiz olduğu tahmin edildi (Şekil 52).

4.16.2. Bozuklukla İlgili İşlevselliğin Değerlendirilmesi

FOXO3A' daki içsel bozukluğun işlevselliğini değerlendirmek için D2P2 platformu kullanılmıştır. D2P2 platformu, her bir proteinin fonksiyonel içsel bozukluğunun ölçülmesine ve bunun translasyon sonrası modifikasyonlar (PTM'ler) ve bozukluğa dayalı bağlanma potansiyeli ile ilişkisinin değerlendirilmesine olanak tanır.

ENSP00000385824, ENSP00000339527

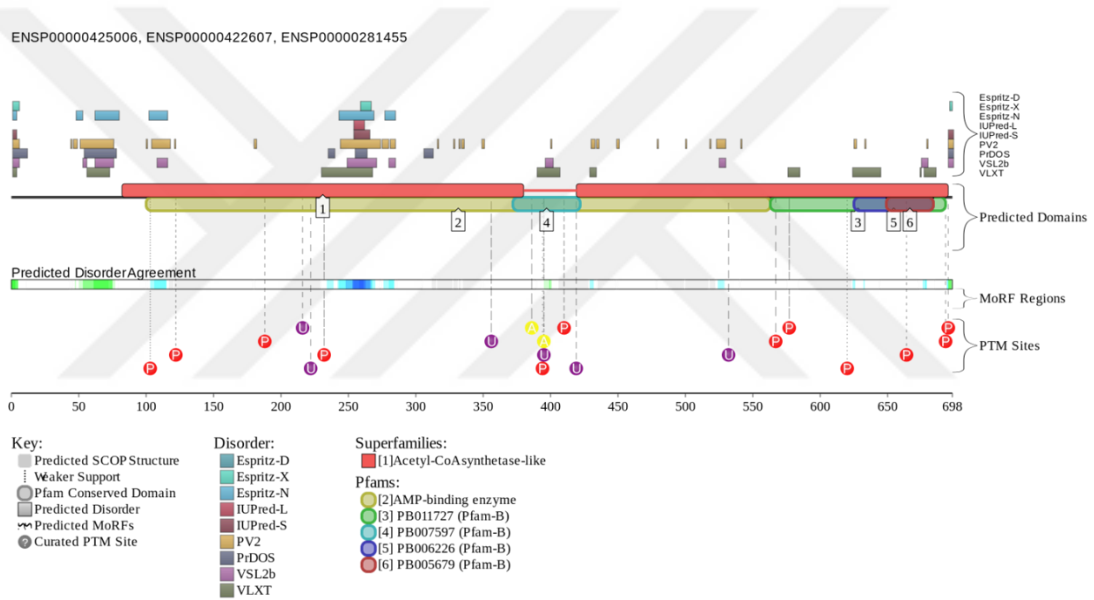


Şekil 53. D2P2 platformu çıktısı, FOXO3A için fonksiyonel bozukluk profili.

Şeklin solunda D2P2 platformunda kullanılan tahminciler için dört tanımlayıcı bulunmaktadır. Şeklin sağ üst köşesinde, çeşitli bozukluk belirleyicilerinin (yani, Espritz-D, Espritz-X, Espritz-N, IUPred-L, IUPred-S, PV2, PrDOS, VSL2b, VLXT) çıktıları gösterilmektedir; ikinci parantez tahmin edilen protein alanlarını gösterir, üçüncü parantez MoRF (Molecular recognition features) bölgelerini gösterir.

FOXO3A' nın D2P2 çıktısı (Şekil 53), protein boyunca tahmin edilen dağınık düzensizlik bölgelerinin mevcut olduğu dokuz bozukluğa dayalı öngörücü arasındaki göreceli uyumu göstermektedir. Rezidü başına dokuz bozukluk öngörücüsü arasında en fazla uyum "Winged helix" DNA-binding domain, Forkhead domain bölgesinde

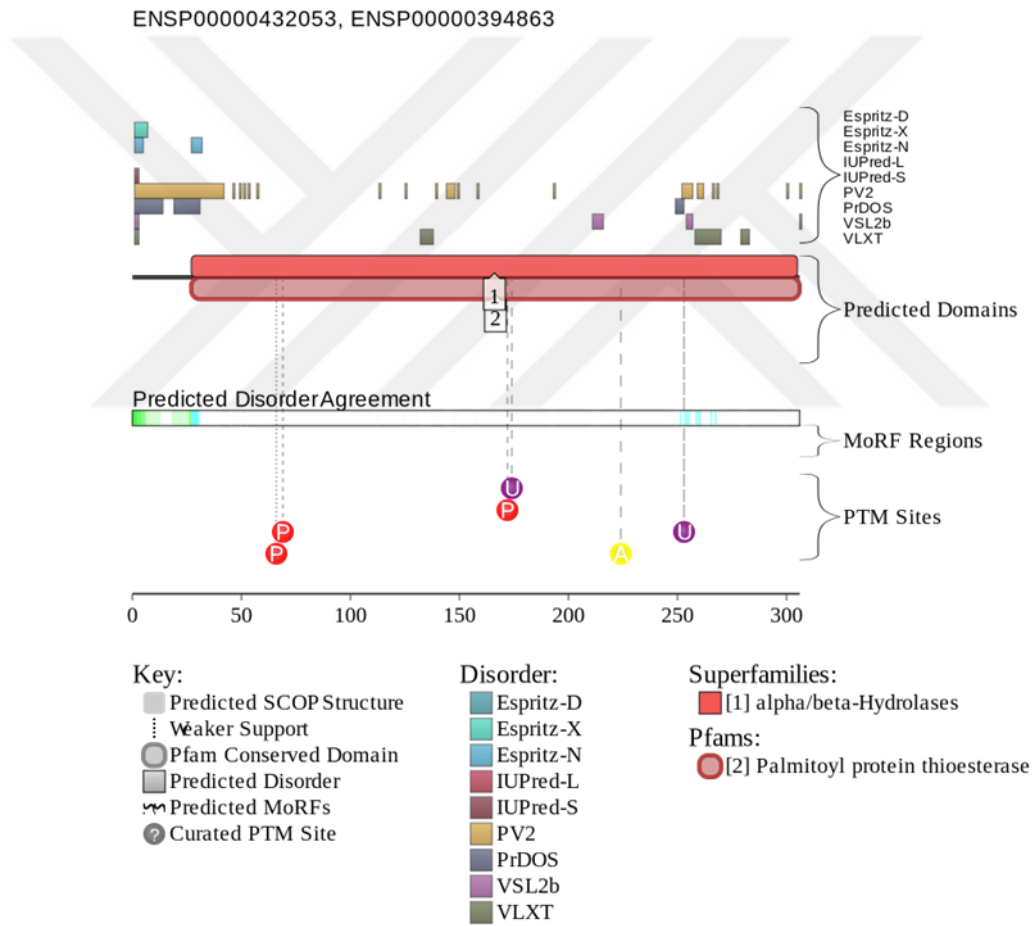
sağlanmıştır ve bu bölgeler sırasıyla 153-239 ve 134-262 aminoasit bölgesi arasındadır. FOXO3A, birkaç korunmuş fonksiyonel alan içerir. SUPERFAMILY veritabanında tanımlanan "Winged helix" DNA-binding domain (rezidü 153-239) ve Pfam sunucusu tarafından tanımlanan PB004082 (Pfam-B) (rezidü 391-516), PB010880 (Pfam-B) (rezidü 452-671) ve Fork head domain (rezidü 134-261) alanları vardır. FOXO3A proteininde, 1-164, 68-107, 111-131, 156-168, 181-194, 215-221, 231-237, 265-277, 303-310, 320-335, 340-396, 407-419, 428-445, 458-538, 543-565 aminoasitleri arasında farklı uzunluklarda 15 Molecular recognition features (MoRFs) bölgesi vardır. FOXO3A, 45 öngörülen translasyon sonrası modifikasyona (PTM), 4 asetilasyon bölgesine ve 41 fosforilasyon bölgesine sahiptir ve hiç ubiquitinasyon bölgesi bulundurmaz.



Şekil 54. D2P2 platformu çıktısı, ACSL-1 için fonksiyonel bozukluk profili.

ACSL1'in D2P2 çıktısına (Şekil 54) bakıldığında, FOXO3A'ya benzer şekilde protein dokuz bozukluğa dayalı öngörücü arasındaki göreceli uyum görülebilmektedir. Rezidü başına dokuz bozukluk öngörücüsü arasında en fazla uyum Acetyl-CoA synthetase-like ve AMP-binding enzyme bölgesinin belirli alanlarına denk gelmektedir. Acetyl-CoA synthetase-like SUPERFAMILY veritabanında tanımlanır ve 83-380 ve 420-695 aminoasitleri arasındadır. AMP-binding enzyme bölgesi pfam sunucusu tarafından tanımlanır ve 101-563 aminoasitleri arasındadır. ACSL1, başka korunmuş fonksiyonel alanlarda içerir. Bunlar Pfam sunucusu tarafından tanımlanan PB011727 (Pfam-B)

(rezidü 564-693), PB007597 (Pfam-B) (rezidü 373-422), PB006226 (Pfam-B) (rezidü 626-684) PB005679 (Pfam-B) (rezidü 650-684) alanlarıdır. Rezidü başına dokuz bozukluk öngörücüsü tarafından uyum içinde tahmin edilen düzensiz bölge Espritz-X' e göre 259-266, Espritz-N' e göre 243-268 ve 277-2284, IUPred-L' ye göre 254-261, IUPred-S' e göre 254-265, PV2' e göre 244-273, 275-279, 281-284, PrDOS' a göre 235-239 ve 255-263, VSL2b' ye göre 249-270 ve 280-284, VLXT' ye göre 230-267 aminoasitleri arasındadır. ACSL-1 hiçbir Molecular recognition features (MoRFs) bölgesi içermemektedir. ACSL1, 16 öngörülen translasyon sonrası modifikasyona (PTM), 2 asetilasyon bölgesine ve 8 fosforilasyon bölgesine sahiptir ve 6 ubiquitinasyon bölgesine sahiptir.

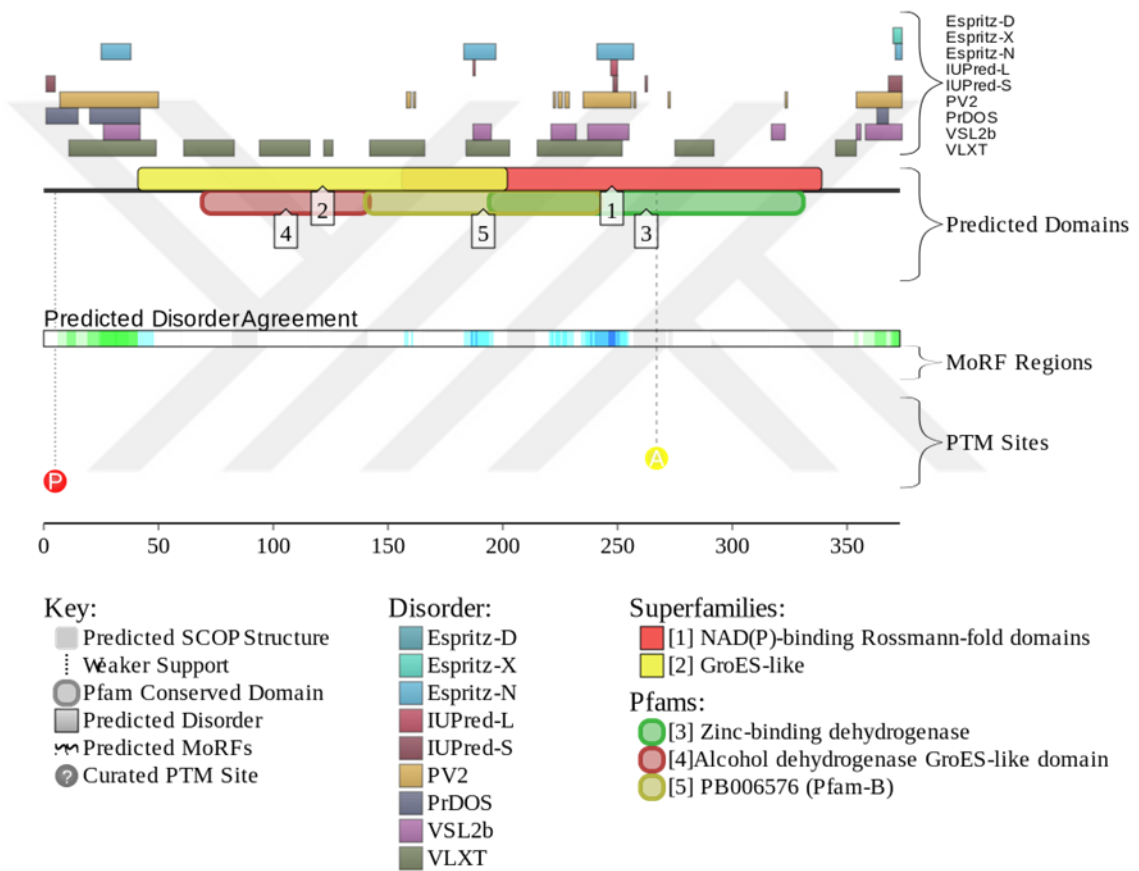


Şekil 55. D2P2 platformu çıktısı, PPT1 için fonksiyonel bozukluk profili.

PPT-1' in D2P2 çıktısına (Şekil 55), bakıldığında her ne kadar az düzensizlik bölgesi öngörülse de var olanlar arasında da bir uyum görülememektedir. Diğer proteinlerde olduğu gibi tahmincilerin %75'inin aynı öngöründe bulunduğu alanlar yoktur. Yani

üzerinde anlaşmaya varılan düzensiz bölgeler bulunamamıştır. PPT-1, birkaç korunmuş fonksiyonel alan içerir. SUPERFAMILY veritabanında tanımlanan alpha/beta-Hydrolases (rezidü 28 – 305) ve Pfam sunucusu tarafından tanımlanan Palmitoyl protein thioesterase (rezidü 28-306) alanları vardır. PPT-1, Molecular recognition features (MoRFs) bölgesi bulundurmaz. PPT-1, 6 öngörülen translayon sonrası modifikasyona (PTM), 1 asetilasyon bölgesine ve 3 fosforilasyon bölgesine sahiptir ve 2 ubiquitinasyon bölgesine sahiptir.

ENSP00000263702

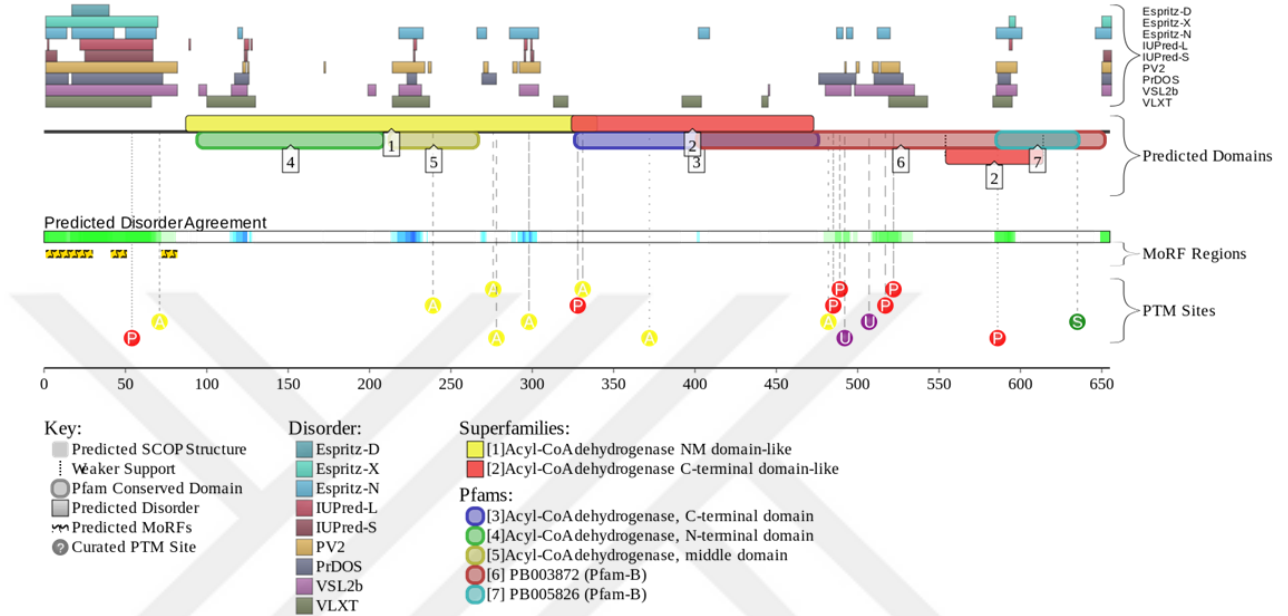


Şekil 56. D2P2 platformu çıktısı, MECR için fonksiyonel bozukluk profili.

MECR' in D2P2 çıktısına (Şekil 56) bakıldığında, PPT-1' de de olduğu gibi üzerinde anlaşmaya varılan düzensiz bölgeler bulunamamıştır. MECR, birkaç korunmuş fonksiyonel alan içerir. NAD(P)-binding Rossmann-fold domains (rezidü 157-339) ve GroES-like (rezidü 42-202) alanları SUPERFAMILY veritabanında tanımlanır. Zinc-binding dehydrogenase (rezidü 195-331), Alcohol dehydrogenase GroES-like domain (rezidü 70-142) ve PB006576 (Pfam-B) (rezidü 141-243) alanları Pfam sunucusu

tarafından tanımlanır. PPT-1, Molecular recognition features (MoRFs) bölgesi bulundurmaz. MECP, 2 öngörülen translasyon sonrası modifikasyona (PTM), 1 asetilasyon bölgesine ve 1 fosforilasyon bölgesine sahiptir. Ubikitinasyon bölgesi bulundurmaz.

ENSP00000349297

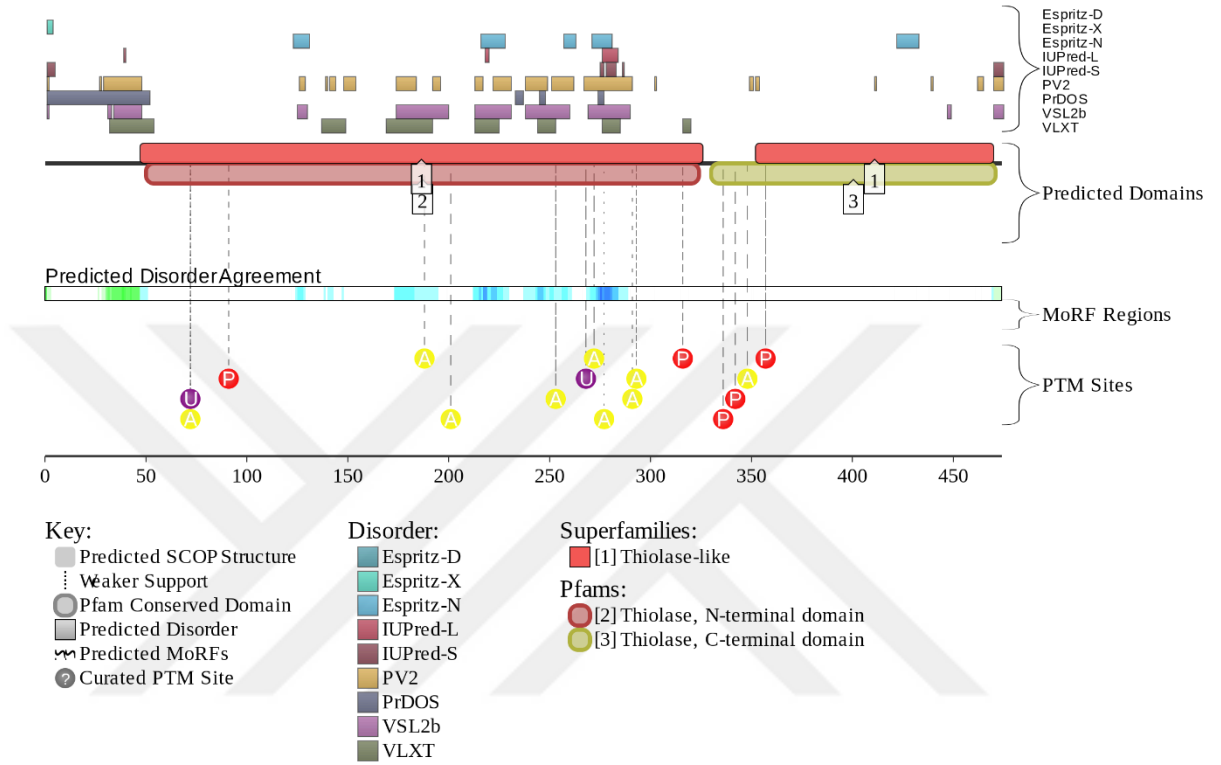


Şekil 57. D2P2 platformu çıktısı, ACADV için fonksiyonel bozukluk profili.

ACADV' nin D2P2 çıktısı (Şekil 57), protein boyunca tahmin edilen küçük dağınık düzensizlik bölgelerinin mevcuttur. Bu da dokuz bozukluğa dayalı öngörücü arasındaki göreceli uyumu göstermektedir. Dokuz rezidü başına bozukluk öngörücüsü arasında en fazla uyum hiçbir domaini kapsamayan C-terminal bölgesinde sağlanmıştır. ACADV, birkaç korunmuş fonksiyonel alan içerir. SUPERFAMILY veritabanında tanımlanan Acyl-CoA dehydrogenase NM domain-like (rezidü 88-340), Acyl-CoA dehydrogenase C-terminal domain-like (rezidü 325-473) ve Pfam sunucusu tarafından tanımlanan Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain (rezidü 327-476), Acyl-CoA dehydrogenase, N-terminal domain (rezidü 95-209), Acyl-CoA dehydrogenase, middle domain (rezidü 213-267), PB003872 (Pfam-B) (rezidü 402-652), PB005826 (Pfam-B) (rezidü 586-636) alanları vardır. ACADV, 1-29, 41-50, 72-81 aminoasitleri arasında farklı uzunluklarda 3 Molecular recognition features (MoRFs) bölgesi vardır. ACADV, 18 öngörülen translasyon sonrası modifikasyona

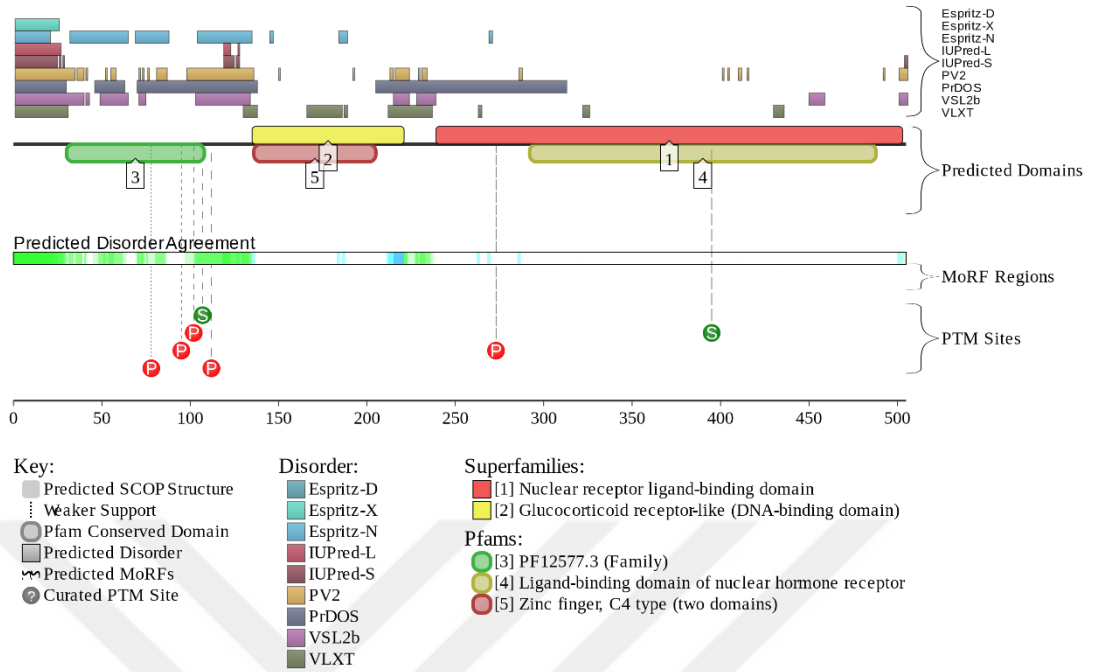
(PTM), 8 asetilasyon bölgesine ve 7 fosforilasyon bölgesine, 2 ubikitinasyon bölgesine, 1 sumolasyon bölgesine sahiptir.

ENSP00000325136



Şekil 58. D2P2 platformu çıktısı, ECHB için fonksiyonel bozukluk profili.

ECHB proteinin D2P2 çıktısına göre protein boyunca tahmin edilen küçük dağınık düzensizlik bölgelerinin mevcut olduğu Şekil 58’de görülmektedir. ECHB, birkaç korunmuş fonksiyonel alan içerir. SUPERFAMILY veritabanında tanımlanan Thiolase-like (rezidü 48-326 353-470) ve Pfam sunucusu tarafından tanımlanan Thiolase, N-terminal domain (rezidü 51-324), Thiolase, C-terminal domain (rezidü 331-471) alanları vardır. ECHB, Molecular recognition features (MoRFs) bölgesi bulundurmamaktadır. ECHB, 16 öngörülen translasyon sonrası modifikasyona (PTM), 9 asetilasyon bölgesine ve 5 fosforilasyon bölgesine ve 2 ubikitinasyon bölgesine sahiptir (Şekil 58).



Şekil 59. D2P2 platformu çıktısı, PPARG için fonksiyonel bozukluk profili.

PPARG' nın D2P2 çıktısı (Şekil 59), protein boyunca tahmin edilen dağınık düzensizlik bölgelerinin mevcut olduğu dokuz bozukluğa dayalı öngörücü tarafındanda tahmin edilmiştir. Rezidü başına bozukluk öngörücüsü arasında en fazla uyum hiçbir domaini kapsamayan bir bölge olan 1-39 aminoasitleri arasındadır. PPARG, birkaç korunmuş fonksiyonel alan içerir. SUPERFAMILY veritabanında tanımlanan Nuclear receptor ligand-binding domain (240-503), Glucocorticoid receptor-like (DNA-binding domain) (136-221) ve Pfam sunucusu tarafından tanımlanan PF12577.3 (31-108), Ligand-binding domain of nuclear hormone receptor (293-488) ve Zinc finger, C4 type (137-205) alanları vardır. PPARG proteininde, hiç MoRF bölgesi bulunmamaktadır. PPARG, 2 sumulasyon, 5 fosforilasyon olmak üzere 7 öngörülen translasyon sonrası modifikasyon bölgesine sahiptir.

5.TARTIŞMA

Bu çalışma, FOXO3A transkripsiyon faktörünün yağ asidi metabolizması ile olan potansiyel ilişkisini hem literatür bilgisi hem de biyoinformatik yöntemler aracılığıyla detaylı bir biçimde incelemektedir. Yağ asidi metabolizması, yalnızca hücresel enerji üretimi açısından değil, aynı zamanda membran biyogenezi, sinyal iletimi ve hücre iskeleti gibi birçok temel biyolojik süreçte rol oynamaktadır. Özellikle kanser hücrelerinde, lipid metabolizmasının yeniden programlanması, tümör gelişimini ve metastatik yayılımı destekleyen önemli bir adaptif yanıt mekanizmasıdır. Bu bağlamda FOXO3A'nın, lipogenezden beta-oksidasyona kadar uzanan bu kompleks metabolik yollar üzerindeki olası etkisi oldukça önemlidir. FOXO3A'nın işlevleri arasında hücre döngüsü kontrolü, oksidatif stres yanıtı ve apoptoz yer almaktadır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, FOXO3A'nın metabolik düzenleyici işlevlerinin de oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

FOXO3A geni üzerinde yer alan varyantların fonksiyonel etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla Ensembl VEP ve çeşitli in silico patojenite tahmin araçları (CADD, REVEL, MetaLR, Mutation Assessor) kullanılmıştır. Yapılan taramalar sonucunda, yüksek patojenite skoru gösteren ve FOXO3A protein sekansında aminoasit değişikliğine neden olan üç missense varyant (N208Y, R211W, R249L) belirlenmiştir. Bu varyantların hepsi, deneysel olarak NMR ile çözümlenmiş 2K86 PDB yapısının (151–251 arası amino asitleri kapsayan Forkhead DNA bağlayıcı bölge) içinde yer almaktadır. CUPSAT tahminlerine göre N208Y mutasyonu hafif stabilizan ($\Delta\Delta G = +0.2$ kcal/mol), R211W ve R249L mutasyonları ise sırasıyla -0.38 ve -1.46 $\Delta\Delta G$ değerleriyle destabilizan etki göstermiştir. Bu veriler, özellikle R249L mutasyonunun protein stabilitesini belirgin şekilde bozduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak proteinin 3D yapısı üzerinde Chimera X ile söz konusu mutasyonlar oluşturulmuştur ve yapısal karşılaştırma yapılmıştır. Moleküler dinamik simülasyonları ile yapılan RMSD, RMSF ve Rg analizleri ile bu mutasyonların yapısal ve dinamik etkileri incelenmiştir. RMSD analizine göre WT proteini 0.4–0.6 nm aralığında sabit seyreden düşük bir sapma profili sergilemiş, mutant formlar ise daha yüksek RMSD değerlerine ulaşarak konformasyonel değişikliklere işaret etmiştir. R249L mutasyonu yaklaşık 0.9 nm'ye kadar çıkan RMSD değeriyle en büyük yapısal sapmaya neden olan mutasyondur. Bu durum, proteinin genel yapısal bütünlüğünün bozulduğunu ve yüksek patojenite potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. R211W mutasyonu da düzensiz ve

yüksek RMSD profiliyle ikinci en büyük etkiyi göstermiştir. N208Y mutasyonu ise orta düzeyde bir RMSD artışıyla daha sınırlı bir etkide bulunmuştur. RMSF analizi, proteinin lokal esnekliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. WT proteinin düşük RMSF değerleri ile stabil bir yapı sergilediği gözlenirken, özellikle R249L mutasyonu C-terminal ve N-terminal bölgelerde 1.2–1.4 nm’ye varan esneklik artışları ile dikkat çekmiştir. Bu durum, FOXO3A’nın transkripsiyonel aktivitesi ve nükleer lokalizasyonu gibi işlevsel özellikleri açısından kritik olan bölgelerde ciddi hareketlilik artışı meydana geldiğini göstermektedir. R211W ve N208Y mutasyonları da, özellikle 200–220 arası ve 240 sonrası pozisyonlarda artan RMSF değerleri ile lokal yapısal bozulmalara yol açmıştır. Gyration yarıçapı (Rg) analizi sonuçları da bu bulgularla tutarlıdır. WT proteini 1.55–1.65 nm aralığında sabit bir Rg profili ile kompakt bir yapıyı korurken, R249L mutasyonu başta olmak üzere, mutant proteinlerde belirgin gevşeme gözlemlenmiştir. R249L mutasyonu simülasyonun ilk yarısında 1.8 nm’ye kadar ulaşan Rg değerleriyle, proteinin açıldığını ve kompaktlığını kaybettiğini göstermiştir. R211W mutanı da zaman zaman 1.75 nm’ye varan dalgalanmalar sergilemiş ve bu durumun özellikle Forkhead bölgesinde fonksiyonel bozulmalarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. N208Y mutanı ise genel olarak WT’ye benzer bir Rg profili göstermiştir. FOXO3A proteininin potansiyel patojenik varyantlarının biyolojik etkilerinin anlaşılması açısından, varyantların yer aldığı pozisyonların evrimsel korunmuşluk düzeylerinin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultuda, ConSurf sunucusu aracılığıyla gerçekleştirilen analizler, FOXO3A proteininin birçok bölgesinde yüksek derecede korunmuş amino asitler içerdiğini ortaya koymuştur. ConSurf analizi sonucunda elde edilen renklendirme skalasında 1 (değişken) ile 9 (yüksek derecede korunmuş) arasında puanlanan rezidüler, fonksiyonel ve yapısal önem açısından sınıflandırılmıştır. Bu ölçek doğrultusunda incelendiğinde, N208, R211 ve R249 pozisyonlarının tamamının yüksek korunum skoru (8–9) taşıdığı gözlemlenmiştir. Bu durum, bu üç pozisyondaki amino asitlerin proteinin biyolojik işlevi açısından kritik olabileceğini göstermektedir. Özellikle R211 pozisyonu, hem yüksek korunmuş hem de “F” (fonksiyonel) olarak işaretlenmiştir. Bu, söz konusu pozisyonun proteinin yüzeyinde yer aldığını ve olası protein–protein ya da protein–DNA etkileşimlerinde doğrudan rol oynayabileceğini düşündürmektedir. “F” kategorisindeki rezidüler, genellikle bağlanma bölgelerinde yer alır ve mutasyonları bu etkileşimlerin bozulmasına neden olabilir. Sonuç olarak, N208Y, R211W ve R249L varyantlarının tamamı, FOXO3A proteininin evrimsel

olarak korunmuş bölgelerinde yer almaktadır. Bu da bu pozisyonlardaki değişikliklerin yüksek olasılıkla işlevsel bozulmalara ve dolayısıyla hastalıklarla ilişkili patojenik etkilere yol açabileceğini göstermektedir. FOXO3A geninde yer alan R249L (Arg249Leu) varyantı, rs770039850 ID'sine sahip olup missense karakterdedir. Varsome verilerine göre bu varyantın phyloP100 korunum skoru **9.574** olup bu değer, ilgili pozisyonun evrimsel olarak oldukça korunmuş olduğunu göstermektedir. Bu, mutasyonun fonksiyonel veya yapısal öneme sahip bir bölgede gerçekleştiğine işaret eder. Ayrıca *in-silico* patojenite tahmin araçları bu varyant için farklı sonuçlar vermektedir. 2 araç patojenite yönünde sinyal verirken 1 araç ise destekleyici olarak benign yönde değerlendirme yapmıştır. Genotip-doku ekspresyonu verilerine göre FOXO3A geninin bu varyantı, özellikle cells cultured fibroblasts, muscle - skeletal, adipose - subcutaneous, adipose - visceral (omentum) ve heart - atrial appendage gibi metabolik açıdan önemli dokularda yüksek seviyede eksprese edilmektedir. FOXO3A geninde yer alan R211W (Arg211Trp) varyantı, rs1362988141 ID'si ile tanımlanmakta olup missense karakterdedir. Varsome verilerine göre bu varyantın phyloP100 korunum skoru 5.751 olup, bu değer ilgili pozisyonun orta-yüksek düzeyde evrimsel olarak korunmuş olduğunu göstermektedir. Bu durum, varyantın proteinin yapısal stabilitesi veya fonksiyonel bölgeleri açısından kritik bir konumda bulunabileceğini düşündürmektedir. Varsome, bu varyantı BP4 kriteri altında "Supporting (benign)" olarak sınıflandırmakta, bu da varyantın patojenitesine dair belirgin bir kanıt olmadığını ancak tamamen etkisiz de sayılmaması gerektiğini ortaya koymaktadır. Varyantın genetik veri tabanlarında (ClinVar, OMIM, ClinGen) henüz herhangi bir hastalıkla ilişkili raporu bulunmamaktadır. Genotip-doku ekspresyon verilerine göre FOXO3A, özellikle kültüre fibroblast hücreleri, iskelet kası, viseral ve subkutan yağ dokusu ile atriyal kalp dokusunda yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. FOXO3A'nın hücre döngüsü düzenleme, apoptoz ve metabolik denge üzerindeki rolleri göz önüne alındığında, bu varyantın ifade düzeyinin yüksek olduğu dokularda işlevsel sonuçlar doğurması muhtemeldir. Meme dokusunda ise FOXO3A'nın ifadesi orta düzeyde olup, bu varyantın meme hücrelerinde protein fonksiyonunu zayıflatması, FOXO3A'nın tümör baskılayıcı rolünü sekteye uğratarak meme kanseri biyolojisi açısından potansiyel bir risk faktörü haline gelebileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, FOXO3A'nın meme dokusunda biyolojik olarak aktif olduğunu, dolayısıyla bu gende meydana gelen varyantların (örneğin R211W veya R249L gibi) meme hücrelerinin fizyolojisini etkileyebilecek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

FOXO3A'nın tümör baskılayıcı rolü göz önüne alındığında, bu tür varyantlar proteinin transkripsiyonel aktivitesini, DNA bağlanma kapasitesini veya hedef genlerin düzenlenmesini bozarak meme dokusunda kanser gelişimine zemin hazırlayabilir.

Meme dokusundaki bu orta-yüksek düzeydeki ekspresyon, varyantların etkilerinin sadece moleküler düzeyde kalmayıp, dokusal düzeyde işlevsel sonuçlar doğurabileceğini düşündürmektedir. Özellikle FOXO3A aktivitesinin kaybı ya da zayıflaması, hücre döngüsünün durdurulamaması, apoptozun engellenmesi ve stres yanıtlarının bozulması gibi mekanizmalar üzerinden meme kanseri gelişimine katkı sağlayabilir. Sonuç olarak, FOXO3A'nın meme dokusunda ifade edilmesi, bu gende gözlenen varyantların meme kanseriyle ilişkilendirilmesinde biyolojik bir temel oluşturur. R211W gibi varyantlar, bu bağlamda fonksiyonel deneylerle test edilmeli ve klinik hasta verileriyle desteklenerek meme kanseri ile potansiyel ilişkileri ortaya çıkarılmalıdır. FOXO3A geninde yer alan N208Y (Asn208Tyr) varyantı, rs1179696676 ID'sine sahip olup missense bir mutasyondur. FOXO3A'nın DNA bağlama kapasitesi, transkripsiyonel aktivitesi veya partner proteinlerle etkileşimi üzerinde önemli değişimlere yol açabilir. Varsome verilerine göre bu varyantın phyloP100 skoru 8.947 olup, pozisyonun yüksek derecede evrimsel olarak korunduğunu göstermektedir. Söz konusu bölgenin doğal seleksiyonla korunduğunu ve muhtemelen işlevsel açıdan önemli olduğunu düşündürmektedir. Dört farklı tahmin aracından iki tanesi varyantın patojen olabileceğine dair sinyal vermiş, biri ise benign yönde değerlendirme yapmıştır. Bu durum, varyantın moleküler düzeyde etkili olabileceğini ancak henüz klinik olarak bir kanıt bulunmadığını göstermektedir. FOXO3A, başta meme dokusu olmak üzere birçok dokuda ifade edilen bir tümör baskılayıcı transkripsiyon faktörüdür. Varyantın bulunduğu 208. pozisyon, FOXO3A'nın fonksiyonel bölgeleri içinde yer almakta olup, özellikle transkripsiyonel düzenleme, hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz gibi kritik süreçlerde rol oynayabilir. Bu bağlamda, N208Y varyantı FOXO3A'nın tümör baskılayıcı işlevini zayıflatabilir; bu da hücrelerin kontrolsüz proliferasyonuna, apoptozdan kaçmasına ve dolayısıyla meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünün gelişimine katkı sağlayabilecek bir etki oluşturabilir. Sonuç olarak, söz konusu varyantların etkisi, FOXO3A'nın fonksiyonel aktivitesi ve özellikle meme kanseri patogenezi açısından deneysel çalışmalarla detaylandırılmalı, transkripsiyonel hedef gen ekspresyonu, protein-protein etkileşimi ve hücre bazlı fonksiyon testleri ile değerlendirilmelidir.

Bu çalışmada, tümör baskılayıcı bir transkripsiyon faktörü olan FOXO3A'nın yağ asidi metabolizmasında görevli proteinlerle potansiyel etkileşimlerini ortaya koymak amacıyla sistematik bir protein-protein etkileşim analizi gerçekleştirilmiştir. KEGG veritabanından seçilen 42 yağ asidi metabolizması proteini ile FOXO3A arasında ColabFold platformu kullanılarak oluşturulan kompleks modeller, ipTM, pLDDT ve PAE gibi AlphaFold tabanlı yapısal güvenilirlik metriklerine göre değerlendirilmiştir. ipTM puanının 0.5'in üzerinde olması, protein-protein arayüzlerinin anlamlı olabileceğini gösterdiğinden bu eşik, potansiyel etkileşim partnerlerinin belirlenmesinde temel ölçüt olarak kullanılmıştır. Bu kritere göre MECR, PPT-1, ECHB, ACSL-1, ACADV ve PPARG proteinleri FOXO3A'nın potansiyel etkileşim partnerleri olarak seçilmiştir.

Özellikle PPT-1 (ipTM: 0.721) ve ACSL-1 (ipTM: 0.611) gibi yüksek ipTM skoruna sahip proteinlerle FOXO3A arasında gözlemlenen etkileşimler, metabolik regülasyona doğrudan katkı sağlayabilecek biyolojik anlam taşımaktadır. FOXO3A'nın bilinen fonksiyonları arasında hücre döngüsünün düzenlenmesi, oksidatif stres yanıtı ve metabolik genlerin transkripsiyonel kontrolü yer almakta olup, bu bağlamda yağ asidi metabolizmasının kritik enzimleriyle kurduğu potansiyel etkileşimler önem arz edebilir. Yapısal kalite değerlendirmeleri, AlphaFold modellerinin güvenilirliğini olarak ortaya koymuş, özellikle ERRAT ve Ramachandran analizleri ile modellerin stereokimyasal doğruluğu araştırılmıştır. En yüksek kalite puanları ACADV (%98.47 ERRAT, %92.3 most favored), ACSL-1 (%97.23 ERRAT, %93.7 most favored) ve MECR (%96.85 ERRAT, %91.2 most favored) modellerine ait olup, bu proteinlerin FOXO3A ile oluşturduğu komplekslerin sadece ipTM bazlı değil, yapısal doğruluk açısından da güvenilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, FOXO3A modelinin düşük ERRAT (%76.86) ve Ramachandran (%49.4 most favored, %16.8 disallowed) skorları, proteinin büyük bölümünün düzensiz bölgeler içerdiğini ve bu nedenle yapısal modellemenin sınırlı bir doğrulukla yapıldığını göstermektedir. Bu bulgu, FOXO3A'nın intrinsik olarak bozuk yapısal bölgeler barındırdığı yönündeki literatürle de uyumludur. Model güvenilirliğini artırmak amacıyla, AlphaFold tahminleri deneysel PDB yapılarıyla TM-align algoritması üzerinden karşılaştırılmıştır. ACADV, MECR ve PPT-1 gibi proteinler, RMSD < 1.5 Å ve TM-score > 0.85 değerleriyle oldukça başarılı hizalamalar sergilemiştir. Bu da modellerin, deneysel kristal yapılar kadar güvenilir olduğunu göstermektedir. FOXO3A için yapılan hizalama ise, yalnızca

Forkhead domaini ile anlamlı örtüşme sağlamış (TM-score: 0.67185), geri kalan bölgelerde ise düşük benzerlik değerleri gözlenmiştir. Bu durum, FOXO3A'nın düzenli sayılabilecek tek bölgesinin DNA bağlanma domaini olduğunu, diğer kısımların ise büyük oranda intrinsik düzensizlik (IDR) içerdiğini desteklemektedir. pLDDT ve PAE skorları da bu yapısal belirsizlikleri doğrulamıştır. FOXO3A modelinde yalnızca 150–250. kalıntılar arasında yüksek pLDDT (>90) skorları gözlenirken, geri kalan kısımlar düşük güvenilirlikte renklendirilmiş (pLDDT < 70) ve PAE matrisinde yüksek hizalama hataları sergilemiştir. Diğer modellerin çoğunda pLDDT > 90 ve PAE < 5 Å gibi değerler elde edilmiştir. Bu durum, AlphaFold'un düzenli protein bölgeleri için yüksek doğruluk sağladığını ancak esnek bölgeler için sınırlı güvenilirlik sunduğunu göstermektedir.

Hidrojen bağları üzerinden yapılan bağlanma arayüzü analizleri, komplekslerin bağlanma stabilitesi konusunda önemli sonuçlar vermiştir. Özellikle FOXO3A–PPARG ve FOXO3A–ACSL-1 komplekslerinde tanımlanan çok sayıda ve kısa mesafeli hidrojen bağları, bu etkileşimlerin yüksek afiniteli ve yönlü bağlanma davranışı sergilediğini düşündürmektedir. FOXO3A'nın hem N-terminal hem de C-terminal bölgelerinde bağ yapabildiği gözlemlenmiş ve çift yönlü bağlanmalar bu etkileşimlerin karşılıklı elektrostatik uyuma dayandığını göstermiştir. Benzer şekilde, ACADV ve MECR ile olan komplekslerde de bağlanma arayüzünün moleküler düzeyde çeşitlilik ve stabilite içerdiği görülmüştür.

Tam uzunlukta modellerin düşük yapısal güvenilirlik gösterdiği durumlarda, FOXO3A fonksiyonel domainlerine bölünerek yeniden modellenmiş ve bu yaklaşım sayesinde daha kararlı ve anlamlı bağlanma arayüzleri ortaya konmuştur. Özellikle FOXO3A'nın 155–251 arası Forkhead domaini, hem yüksek pLDDT skorları hem de ConSurf analizlerinde yüksek evrimsel korunmuşluk göstermesiyle önem arz etmedir. Domain-temelli analizlerde de en fazla hidrojen bağının bu bölge üzerinden kurulduğu, PPARG, MECR ve PPT-1 gibi proteinlerle yapılan modellerde belirgin şekilde gözlemlenmiştir.

Moleküler yerleştirme analizleri de (HDOCK ve HawkDock), ColabFold sonuçları ile tutarlıdır. FOXO3A–PPARG, FOXO3A–ECHB ve FOXO3A–ACSL-1 kompleksleri hem en düşük bağlanma enerjilerini hem de en yüksek güven skorlarını göstermiştir. Özellikle HawkDock analizlerinde FOXO3A–PPARG kompleksinin -5588.02

kcal/mol gibi yüksek afiniteli bir bağlanma enerjisi sergilemesi, bu iki protein arasında fonksiyonel ve potansiyel biyolojik bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir.

Etkileşim arayüzünde yer alan kritik rezidülerin mutasyonunun etkileşimi nasıl etkilediği BeatMusic aracılığıyla alanin mutagenezi ile test edilmiştir. Birçok kompleks için belirli rezidülerin alanin ile değiştirilmesi $\Delta\Delta G$ değerlerinde anlamlı artışlara neden olmuş ve bu rezidülerin bağlanma stabilitesi için önemli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Ensembl VEP, CADD, REVEL ve diğer biyoinformatik araçlarla yüksek patojenite potansiyeline sahip olduğu öngörülen üç FOXO3A varyantı (N208Y, R211W, R249L) analiz edilerek, bu mutasyonların protein-protein bağlanma afiniteleri üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. N208Y varyantı, özellikle PPT-1 ve MECR komplekslerinde bağlanma enerjisini zayıflatıcı yönde etki göstermiştir. R211W mutasyonu bazı komplekslerde bağlanmayı artırmış, bazılarında azaltmış ve bağlama özel etkiler sergilemiştir. R249L mutasyonu ise genel olarak bağlanma afinitesini artırıcı etki göstermiştir. Bu bulgular, FOXO3A varyantlarının partner proteinlerle etkileşimlerini farklı biçimlerde etkileyebileceğini ve bazı varyantların bağlanma stabilitesini zayıflatmak suretiyle fonksiyon kaybına neden olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada ColabFold kullanılarak yapılan protein-protein etkileşim tahminleri, FOXO3A'nın ACSL1, MECR, ACADVL, PPT-1, ECHB, PPARG gibi yağ asidi aktivasyonu, taşınması ve yıkımında görevli proteinlerle doğrudan etkileşim kurma potansiyelini ortaya koymuştur. Bu veriler, FOXO3A'nın yalnızca gen ekspresyonunu düzenleyen bir faktör değil, aynı zamanda sitoplazmik düzeyde metabolik süreçlerle de fiziksel bağlanmalar yoluyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Moleküler yerleştirme analizleri ile yapılan yapısal modellemeler, FOXO3A ve yağ asidi metabolizması proteinleri arasında yüksek afiniteli bağlanmalar olduğunu göstermiştir. Komplekslerin bağlanma arayüzlerinde yer alan hidrojen bağları, tuz köprüleri ve hidrofobik etkileşimler, analiz edilmiştir. Özellikle evrimsel korunmuş bölgelerle gerçekleşen etkileşimler, anlam taşıyan spesifik ilişkiler olduğunu düşündürmektedir. Ek olarak, bölge-spesifik mutagenez yoluyla belirlenen önemli rezidüler, bu etkileşimleri daha da anlamlı kılmıştır. Yapılan moleküler dinamik simülasyon çalışması, FOXO3A ve ACSL-1 kompleksinin zaman içinde yapısal olarak stabil kaldığını ve aralarında H- bağlarının oluştuğunu ortaya koymuştur. RMSD, RMSF ve bağlanma yüzeyi analizi gibi analizler incelendiğinde, FOXO3A'nın bu

proteinlerle kompleksler oluşturabileceği görülmektedir. Özellikle FOXO3A'nın CR3 ve içsel olarak düzensiz bölgelerinin yüksek esneklik göstermesi, çeşitli partnerlerle bağlanma kapasitesini artıran önemli bir özelliktir. Bu düzensizlik, FOXO3A'nın farklı proteinlerle etkileşerek çeşitli görevler üstlenmesine olanak tanımaktadır. İçsel bozukluk analizleri de çalışmanın önemli çıktılarından biridir. FOXO3A'nın içsel olarak düzensiz bölgeleri, protein-protein etkileşimlerine esneklik kazandırmaktadır. Özellikle içsel olarak düzensiz domainlerin partner bağlandığında yapısal dönüşüm göstermesi, FOXO3A'nın konformasyonel olarak uyarılabilir olduğunu göstermektedir. Ek olarak FOXO3A'nın CBP/p300, p53, SIRT1 gibi proteinlerle etkileşimleri sırasında yapısal değişiklik gösterdiği önceki çalışmalarla da desteklenmektedir. Bu bağlamda, FOXO3A'nın yağ asidi metabolizması proteinleriyle bağlanarak düzenleyici işlev kazanabileceği varsayımı yapılabilir. Literatür verileriyle karşılaştırıldığında, bu çalışma FOXO3A'nın lipid metabolizmasıyla ilişkili olduğu yönündeki önceki bulgulara katkı sunmaktadır. Örneğin, FOXO3A'nın AMPK tarafından aktive edilmesi, lipogenez baskılanmasını ve yağ asidi oksidasyonunun artırılmasını destekleyebilir. Aynı şekilde, SIRT1 gibi enerji stresinde aktive olan düzenleyicilerle olan etkileşimleri, FOXO3A'nın hücrel metabolik adaptasyonlarda aktif rol oynadığını göstermektedir. Bu bağlamda, FOXO3A'nın yağ asidi metabolizmasını etkileyen genlerin ekspresyonunu hem doğrudan hem de dolaylı yollarla modüle ettiği düşünülebilir. FOXO3A'nın terapötik bir hedef veya prognostik biyobelirteç olarak değerlendirilmesini güçlendirmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler, FOXO3A'nın lipid metabolizmasında rol oynayabileceği ve özellikle kanser gibi patolojik koşullarda metabolik adaptasyon süreçlerinde önemli roller üstlenebileceğini göstermektedir. FOXO3A'nın yağ asidi metabolizması proteinleriyle olan yapısal ve işlevsel etkileşimleri, bu proteinin klasik transkripsiyon faktörü rolünün ötesinde bir düzenleyici olarak konumlandırılmasına olanak tanımaktadır. İleride yapılacak in vitro ve in vivo deneysel çalışmalar, bu etkileşimlerin biyolojik geçerliliğini ortaya koyarak, FOXO3A'nın metabolizma ve kanser biyolojisindeki yerini daha net biçimde aydınlatılabilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Andreeva, A. (2004). SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data. *Nucleic Acids Research*, 32(90001), 226D – 229. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh039>
- ARAVIND, L., ANANTHARAMAN, V., BALAJI, S., BABU, M., & IYER, L. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 231–262. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.008>
- Arden, K. C. (2006). Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Experimental Gerontology*, 41(8), 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.05.015>
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W344–W350. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW408>
- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2010). ConSurf 2010: Calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq399>
- Banhos Danneskiold-Sams E, N., Kavi, D., Jude, K. M., Nissen, S. B., Wat, L. W., Coassolo, L., Zhao, M., Asae Santana-Oikawa, G., Broido, B. B., Garcia, K. C., & Svensson, K. J. (2023). Rapid and accurate deorphanization of ligand-receptor pairs using AlphaFold. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.03.16.531341>
- Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Adesina, A., Ahmad, S., Bowler-Barnett, E. H., Bye-A-Jee, H., Carpentier, D., Denny, P., Fan, J., Garmiri, P., Gonzales, L. J. da C., Hussein, A., Ignatchenko, A., Insana, G.,

- Ishtiaq, R., Joshi, V., Jyothi, D., ... Zhang, J. (2025). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Beckers, A., Organe, S., Timmermans, L., Scheys, K., Peeters, A., Brusselmans, K., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2007). Chemical Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase Induces Growth Arrest and Cytotoxicity Selectively in Cancer Cells. *Cancer Research*, 67(17), 8180–8187. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0389>
- Blixt, A., Mahlapuu, M., Aitola, M., Pelto-Huikko, M., Enerbäck, S., & Carlsson, P. (2000). A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle. *Genes & Development*, 14(2), 245–254.
- Borhani, S., & Gartel, A. L. (2020). FOXM1: a potential therapeutic target in human solid cancers. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(3), 205–217. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1727888>
- Boura, E., Silhan, J., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V., & Obsil, T. (2007). Both the N-terminal Loop and Wing W2 of the Forkhead Domain of Transcription Factor Foxo4 Are Important for DNA Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8265–8275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605682200>
- Bourgeois, B., Gui, T., Hoogetboom, D., Hocking, H. G., Richter, G., Spreitzer, E., Viertler, M., Richter, K., Madl, T., & Burgering, B. M. T. (2021). Multiple regulatory intrinsically disordered motifs control FOXO4 transcription factor binding and function. *Cell Reports*, 36(4), 109446. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109446>
- Braig, S. (2018). Chemical genetics in tumor lipogenesis. *Biotechnology Advances*, 36(6), 1724–1729. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.007>
- Brent, M. M., Anand, R., & Marmorstein, R. (2008). Structural Basis for DNA Recognition by FoxO1 and Its Regulation by Posttranslational Modification. *Structure*, 16(9), 1407–1416. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.06.013>
- Brown, A. K., & Webb, A. E. (2018). *Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells* (pp. 165–192). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.006>

- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, 96(6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., & Greenberg, M. E. (2001). Protein Kinase SGK Mediates Survival Signals by Phosphorylating the Forkhead Transcription Factor FKHRL1 (FOXO3a). *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), 952–965. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.952-965.2001>
- Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H.-L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., & Greenberg, M. E. (2004). Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science*, 303(5666), 2011–2015. <https://doi.org/10.1126/science.1094637>
- Butler, L. M., Mah, C. Y., Machiels, J., Vincent, A. D., Irani, S., Mutuku, S. M., Spotbeen, X., Bagadi, M., Waltregny, D., Moldovan, M., Dehairs, J., Vanderhoydonc, F., Bloch, K., Das, R., Stahl, J., Kench, J. G., Gevaert, T., Derua, R., Waelkens, E., ... Swinnen, J. V. (2021). Lipidomic Profiling of Clinical Prostate Cancer Reveals Targetable Alterations in Membrane Lipid Composition. *Cancer Research*, 81(19), 4981–4993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3863>
- Butler, L. M., Perone, Y., Dehairs, J., Lupien, L. E., de Laat, V., Talebi, A., Loda, M., Kinlaw, W. B., & Swinnen, J. V. (2020). Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 245–293. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.013>
- Calnan, D. R., & Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene*, 27(16), 2276–2288. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.21>
- Casals, N., Zammit, V., Herrero, L., Fadó, R., Rodríguez-Rodríguez, R., & Serra, D. (2016). Carnitine palmitoyltransferase 1C: From cognition to cancer. *Progress in Lipid Research*, 61, 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.004>

- Celniker, G., Nimrod, G., Ashkenazy, H., Glaser, F., Martz, E., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2013). ConSurf: Using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function. In *Israel Journal of Chemistry* (Vol. 53, Issues 3–4, pp. 199–206). <https://doi.org/10.1002/ijch.201200096>
- Chen, C.-C., Jeon, S.-M., Bhaskar, P. T., Nogueira, V., Sundararajan, D., Tonic, I., Park, Y., & Hay, N. (2010). FoxOs Inhibit mTORC1 and Activate Akt by Inducing the Expression of Sestrin3 and Rictor. *Developmental Cell*, 18(4), 592–604. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.03.008>
- Choi, S., Jeong, H.-J., Kim, H., Choi, D., Cho, S.-C., Seong, J. K., Koo, S.-H., & Kang, J.-S. (2019). Skeletal muscle-specific *Prmt1* deletion causes muscle atrophy via deregulation of the PRMT6-FOXO3 axis. *Autophagy*, 15(6), 1069–1081. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1569931>
- Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., & Burley, S. K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364(6436), 412–420. <https://doi.org/10.1038/364412a0>
- Clavel, S., Siffroi-Fernandez, S., Coldefy, A. S., Boulukos, K., Pisani, D. F., & Dérijard, B. (2010). Regulation of the Intracellular Localization of Foxo3a by Stress-Activated Protein Kinase Signaling Pathways in Skeletal Muscle Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 30(2), 470–480. <https://doi.org/10.1128/MCB.00666-09>
- Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, 2(9), 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>
- Corn, K. C., Windham, M. A., & Rafat, M. (2020). Lipids in the tumor microenvironment: From cancer progression to treatment. *Progress in Lipid Research*, 80, 101055. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101055>
- Das, M., Giannoudis, A., & Sharma, V. (2022). The role of CPT1A as a biomarker of breast cancer progression: a bioinformatic approach. *Scientific Reports*, 12(1), 16441. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20585-x>
- Dayhoff, G. W., & Uversky, V. N. (2022). Rapid prediction and analysis of protein intrinsic disorder. *Protein Science*, 31(12). <https://doi.org/10.1002/pro.4496>

- de Lima Morais, D. A., Fang, H., Rackham, O. J. L., Wilson, D., Pethica, R., Chothia, C., & Gough, J. (2011). SUPERFAMILY 1.75 including a domain-centric gene ontology method. *Nucleic Acids Research*, 39(Database), D427–D434. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1130>
- DeBerardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2012). Cellular Metabolism and Disease: What Do Metabolic Outliers Teach Us? *Cell*, 148(6), 1132–1144. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.032>
- Dehouck, Y., Kwasigroch, J. M., Rooman, M., & Gilis, D. (2013). BeAtMuSiC: Prediction of changes in protein-protein binding affinity on mutations. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt450>
- Djulgovic, M., Taylor Gonzalez, D. J., Antonietti, M., Uversky, V. N., Shields, C. L., & Karp, C. L. (2023). Intrinsic disorder may drive the interaction of PROS1 and MERTK in uveal melanoma. *International Journal of Biological Macromolecules*, 250, 126027. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126027>
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., & Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, 21(16), 3433–3434. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti541>
- Du, A., Wang, Z., Huang, T., Xue, S., Jiang, C., Qiu, G., & Yuan, K. (2023). Fatty acids in cancer: Metabolic functions and potential treatment. *MedComm – Oncology*, 2(1). <https://doi.org/10.1002/mog2.25>
- Du, D., Liu, C., Qin, M., Zhang, X., Xi, T., Yuan, S., Hao, H., & Xiong, J. (2022). Metabolic dysregulation and emerging therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(2), 558–580. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.09.019>
- Du, Q., Liu, P., Zhang, C., Liu, T., Wang, W., Shang, C., Wu, J., Liao, Y., Chen, Y., Huang, J., Tan, H., Zhao, Y., Xia, M., Liu, J., & Yao, S. (2022). FASN promotes lymph node metastasis in cervical cancer via cholesterol reprogramming and lymphangiogenesis. *Cell Death & Disease*, 13(5), 488. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04926-2>

- Dwivedi, S., Purohit, P., & Sharma, P. (2019). MicroRNAs and Diseases: Promising Biomarkers for Diagnosis and Therapeutics. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 34(3), 243–245. <https://doi.org/10.1007/s12291-019-00844-x>
- Dyer, S. C., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barba, M., Barnes, I., Barrera-Enriquez, V. P., Becker, A., Bennett, R., Beracochea, M., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Campbell, L. I., Martinez, M. C., Charkhchi, M., ... Yates, A. D. (2025). Ensembl 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D948–D957. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1071>
- Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Coffey, P. J., & Demoulin, J.-B. (2009). The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10334–10342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808848200>
- Essers, M. A. G., de Vries-Smits, L. M. M., Barker, N., Polderman, P. E., Burgering, B. M. T., & Korswagen, H. C. (2005). Functional Interaction Between β -Catenin and FOXO in Oxidative Stress Signaling. *Science*, 308(5725), 1181–1184. <https://doi.org/10.1126/science.1109083>
- Esslimani-Sahla, M., Thezenas, S., Simony-Lafontaine, J., Kramar, A., Lavaill, R., Chalbos, D., & Rochefort, H. (2007). Increased expression of fatty acid synthase and progesterone receptor in early steps of human mammary carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 120(2), 224–229. <https://doi.org/10.1002/ijc.22202>
- Farhan, M., Silva, M., Xingan, X., Huang, Y., & Zheng, W. (2020). Role of FOXO Transcription Factors in Cancer Metabolism and Angiogenesis. *Cells*, 9(7), 1586. <https://doi.org/10.3390/cells9071586>
- Fasano, C., Disciglio, V., Bertora, S., Lepore Signorile, M., & Simone, C. (2019a). FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells*, 8(9), 1110. <https://doi.org/10.3390/cells8091110>
- Fasano, C., Disciglio, V., Bertora, S., Lepore Signorile, M., & Simone, C. (2019b). FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells*, 8(9), 1110. <https://doi.org/10.3390/cells8091110>

- Fernández de Mattos, S., Villalonga, P., Clardy, J., & Lam, E. W.-F. (2008). FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10), 3237–3246. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0398>
- Ferreira, B. I., Cautain, B., Grenho, I., & Link, W. (2020). Small Molecule Inhibitors of CRM1. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00625>
- Fu, W., Ma, Q., Chen, L., Li, P., Zhang, M., Ramamoorthy, S., Nawaz, Z., Shimojima, T., Wang, H., Yang, Y., Shen, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Nicosia, S. V., Zhang, Y., Pledger, J. W., Chen, J., & Bai, W. (2009). MDM2 Acts Downstream of p53 as an E3 Ligase to Promote FOXO Ubiquitination and Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(21), 13987–14000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M901758200>
- Fukuoka, M., Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Umemura, S., & Fukamizu, A. (2003). Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *International Journal of Molecular Medicine*, 12(4), 503–508.
- Gajiwala, K. S., & Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(1), 110–116. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00057-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00057-3)
- Gao, M., Nakajima An, D., Parks, J. M., & Skolnick, J. (2022). AF2Complex predicts direct physical interactions in multimeric proteins with deep learning. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29394-2>
- Ge, Y.-F., Sun, J., Jin, C.-J., Cao, B.-Q., Jiang, Z.-F., & Shao, J.-F. (2013). AntagomiR-27a Targets FOXO3a in Glioblastoma and Suppresses U87 Cell Growth in Vitro and in Vivo. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(2), 963–968. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.2.963>
- Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2018). UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Science*, 27(1), 14–25. <https://doi.org/10.1002/pro.3235>

- Gomes, P. S. F. C., Gomes, D. E. B., & Bernardi, R. C. (2022). Protein structure prediction in the era of AI: Challenges and limitations when applying to in silico force spectroscopy. *Frontiers in Bioinformatics*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.983306>
- Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., & Brunet, A. (2007). The Energy Sensor AMP-activated Protein Kinase Directly Regulates the Mammalian FOXO3 Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30107–30119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705325200>
- Gsponer, J., Futschik, M. E., Teichmann, S. A., & Babu, M. M. (2008). Tight Regulation of Unstructured Proteins: From Transcript Synthesis to Protein Degradation. *Science*, 322(5906), 1365–1368. <https://doi.org/10.1126/science.1163581>
- Gu, W., & Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*, 90(4), 595–606. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80521-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80521-8)
- Günenc, A. N., Graf, B., Stark, H., & Chari, A. (2022a). *Fatty Acid Synthase: Structure, Function, and Regulation* (pp. 1–33). https://doi.org/10.1007/978-3-031-00793-4_1
- Günenc, A. N., Graf, B., Stark, H., & Chari, A. (2022b). *Fatty Acid Synthase: Structure, Function, and Regulation* (pp. 1–33). https://doi.org/10.1007/978-3-031-00793-4_1
- Han, Q., Chen, C.-A., Yang, W., Liang, D., Lv, H.-W., Lv, G.-S., Zong, Q.-N., & Wang, H.-Y. (2021). ATP-citrate lyase regulates stemness and metastasis in hepatocellular carcinoma via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 20(3), 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2020.05.010>
- Hansen-Petrik, M. B., McEntee, M. F., Johnson, B. T., Obukowicz, M. G., Masferrer, J., Zweifel, B., Chiu, C.-H., & Whelan, J. (2002). Selective inhibition of Δ -6 desaturase impedes intestinal tumorigenesis. *Cancer Letters*, 175(2), 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00715-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00715-7)

- Hariharan, N., Maejima, Y., Nakae, J., Paik, J., DePinho, R. A., & Sadoshima, J. (2010). Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 107(12), 1470–1482. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227371>
- Horiguchi, A., Asano, T., Asano, T., Ito, K., Sumitomo, M., & Hayakawa, M. (2008). Pharmacological Inhibitor of Fatty Acid Synthase Suppresses Growth and Invasiveness of Renal Cancer Cells. *Journal of Urology*, 180(2), 729–736. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.03.186>
- Housley, M. P., Rodgers, J. T., Udeshi, N. D., Kelly, T. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Puigserver, P., & Hart, G. W. (2008). O-GlcNAc Regulates FoxO Activation in Response to Glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16283–16292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802240200>
- Hu, T., Zhang, H., Du, Y., Luo, S., Yang, X., Zhang, H., Feng, J., Chen, X., Tu, X., Wang, C., & Zhang, Y. (2022). ELOVL2 restrains cell proliferation, migration, and invasion of prostate cancer via regulation of the tumor suppressor INPP4B. *Cellular Signalling*, 96, 110373. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110373>
- Ishida, T., & Kinoshita, K. (2007). PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W460–W464. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm363>
- Jacobs, F. M. J., van der Heide, L. P., Wijchers, P. J. E. C., Burbach, J. P. H., Hoekman, M. F. M., & Smidt, M. P. (2003). FoxO6, a Novel Member of the FoxO Class of Transcription Factors with Distinct Shuttling Dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35959–35967. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302804200>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

- Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. In *Protein Science* (Vol. 28, Issue 11, pp. 1947–1951). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3715>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Matsuura, Y., & Ishiguro-Watanabe, M. (2025). KEGG: biological systems database as a model of the real world. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D672–D677. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae909>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 1). <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- Katoh, Y., Yaguchi, T., Kubo, A., Iwata, T., Morii, K., Kato, D., Ohta, S., Satomi, R., Yamamoto, Y., Oyamada, Y., Ouchi, K., Takahashi, S., Ishioka, C., Matoba, R., Suematsu, M., & Kawakami, Y. (2022). Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) enhances the antitumor T cell response through regulating β -catenin signaling in cancer cells and ER stress in T cells and synergizes with anti-PD-1 antibody. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 10(7), e004616. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004616>
- Kikuchi, K., & Tsukamoto, H. (2020). Stearoyl-CoA desaturase and tumorigenesis. *Chemico-Biological Interactions*, 316, 108917. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108917>
- Kornblau, S. M., Singh, N., Qiu, Y., Chen, W., Zhang, N., & Coombes, K. R. (2010). Highly phosphorylated FOXO3A is an adverse prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(6), 1865–1874. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2551>
- Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British Journal of Cancer*, 122(1), 4–22. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0650-z>
- Kubota, C. S., & Espenshade, P. J. (2022). Targeting Stearoyl-CoA Desaturase in Solid Tumors. *Cancer Research*, 82(9), 1682–1688. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-4044>

- Lally, J. S. V., Ghoshal, S., DePeralta, D. K., Moaven, O., Wei, L., Masia, R., Erstad, D. J., Fujiwara, N., Leong, V., Houde, V. P., Anagnostopoulos, A. E., Wang, A., Broadfield, L. A., Ford, R. J., Foster, R. A., Bates, J., Sun, H., Wang, T., Liu, H., ... Fuchs, B. C. (2019). Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase by Phosphorylation or the Inhibitor ND-654 Suppresses Lipogenesis and Hepatocellular Carcinoma. *Cell Metabolism*, 29(1), 174-182.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.020>
- Lam, E. W.-F., Brosens, J. J., Gomes, A. R., & Koo, C.-Y. (2013). Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nature Reviews Cancer*, 13(7), 482–495. <https://doi.org/10.1038/nrc3539>
- Lasick, K. A., Jose, E., Samayoa, A. M., Shanks, L., Pond, K. W., Thorne, C. A., & Paek, A. L. (2023). FOXO nuclear shuttling dynamics are stimulus-dependent and correspond with cell fate. *Molecular Biology of the Cell*, 34(3). <https://doi.org/10.1091/mbc.E22-05-0193>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., & Thornton, J. M. (2012). PROCHECK : *validation of protein-structure coordinates* (pp. 684–687). <https://doi.org/10.1107/97809553602060000882>
- Lebelo, M. T., Joubert, A. M., & Visagie, M. H. (2019). Warburg effect and its role in tumourigenesis. *Archives of Pharmacal Research*, 42(10), 833–847. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01185-2>
- Lee, R. Y. N., Hench, J., & Ruvkun, G. (2001). Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Current Biology*, 11(24), 1950–1957. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00595-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00595-4)
- Lehtinen, M. K., Yuan, Z., Boag, P. R., Yang, Y., Villén, J., Becker, E. B. E., DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T. K., & Bonni, A. (2006). A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress

- Responses and Extends Life Span. *Cell*, 125(5), 987–1001.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.046>
- Li, E.-Q., Zhao, W., Zhang, C., Qin, L.-Z., Liu, S.-J., Feng, Z.-Q., Wen, X., & Chen, C.-P. (2019). Synthesis and anti-cancer activity of ND-646 and its derivatives as acetyl-CoA carboxylase 1 inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 137, 105010. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105010>
- Li, J.-Q., Xue, H., Zhou, L., Dong, L.-H., Wei, D.-P., & Li, H. (2014). Mechanism of Fatty Acid Synthase in Drug Tolerance Related to Epithelial-mesenchymal Transition of Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(18), 7617–7623. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.18.7617>
- Li, M., Chiu, J.-F., Mossman, B. T., & Fukagawa, N. K. (2006). Down-regulation of Manganese-Superoxide Dismutase through Phosphorylation of FOXO3a by Akt in Explanted Vascular Smooth Muscle Cells from Old Rats. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40429–40439.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M606596200>
- Lin, L., Ding, Y., Wang, Y., Wang, Z., Yin, X., Yan, G., Zhang, L., Yang, P., & Shen, H. (2017). Functional lipidomics: Palmitic acid impairs hepatocellular carcinoma development by modulating membrane fluidity and glucose metabolism. *Hepatology*, 66(2), 432–448. <https://doi.org/10.1002/hep.29033>
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8), 1950–1958. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>
- Link, W. (2019). *Introduction to FOXO Biology* (pp. 1–9).
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8900-3_1
- Liu, H., Song, Y., Qiu, H., Liu, Y., Luo, K., Yi, Y., Jiang, G., Lu, M., Zhang, Z., Yin, J., Zeng, S., Chen, X., Deng, M., Jia, X., Gu, Y., Chen, D., Zheng, G., & He, Z. (2020). Downregulation of FOXO3a by DNMT1 promotes breast cancer stem cell properties and tumorigenesis. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 966–983.
<https://doi.org/10.1038/s41418-019-0389-3>

- Liu, Y., Ao, X., Ding, W., Ponnusamy, M., Wu, W., Hao, X., Yu, W., Wang, Y., Li, P., & Wang, J. (2018). Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Molecular Cancer*, 17(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0856-3>
- Martin-Perez, M., Urdiroz-Urricelqui, U., Bigas, C., & Benitah, S. A. (2022). The role of lipids in cancer progression and metastasis. *Cell Metabolism*, 34(11), 1675–1699. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.09.023>
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., & Fukamizu, A. (2005). Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), 11278–11283. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502738102>
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., Flicek, P., & Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
- Menard, J. A., Christianson, H. C., Kucharzewska, P., Bourseau-Guilmain, E., Svensson, K. J., Lindqvist, E., Chandran, V. I., Kjellén, L., Welinder, C., Bengzon, J., Johansson, M. C., & Belting, M. (2016). Metastasis Stimulation by Hypoxia and Acidosis-Induced Extracellular Lipid Uptake Is Mediated by Proteoglycan-Dependent Endocytosis. *Cancer Research*, 76(16), 4828–4840. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2831>
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2017). Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(11), 1001–1016. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1381087>
- Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2023). <scp>UCSF ChimeraX</scp> : Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, 32(11). <https://doi.org/10.1002/pro.4792>
- Mészáros, B., Erdős, G., & Dosztányi, Z. (2018). IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W329–W337. <https://doi.org/10.1093/nar/gky384>

- Mészáros, B., Simon, I., & Dosztányi, Z. (2009). Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins. *PLoS Computational Biology*, 5(5), e1000376. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000376>
- Mullen, G. E., & Yet, L. (2015). Progress in the development of fatty acid synthase inhibitors as anticancer targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(20), 4363–4369. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.08.087>
- Murzin, A. G. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*, 247(4), 536–540. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0159>
- Myatt, S. S., & Lam, E. W.-F. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 847–859. <https://doi.org/10.1038/nrc2223>
- Naka, K., Hoshii, T., Muraguchi, T., Tadokoro, Y., Ooshio, T., Kondo, Y., Nakao, S., Motoyama, N., & Hirao, A. (2010). TGF- β –FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 463(7281), 676–680. <https://doi.org/10.1038/nature08734>
- Nakae, J. (2006). The LXXLL motif of murine forkhead transcription factor FoxO1 mediates Sirt1-dependent transcriptional activity. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI25518>
- Nath, A., Li, I., Roberts, L. R., & Chan, C. (2015). Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports*, 5(1), 14752. <https://doi.org/10.1038/srep14752>
- Oates, M. E., Romero, P., Ishida, T., Ghalwash, M., Mizianty, M. J., Xue, B., Dosztányi, Z., Uversky, V. N., Obradovic, Z., Kurgan, L., Dunker, A. K., & Gough, J. (2012). D2P2: database of disordered protein predictions. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D508–D516. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1226>
- Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., & Dunker, A. K. (2005). Exploiting heterogeneous sequence properties improves prediction of protein disorder. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(S7), 176–182. <https://doi.org/10.1002/prot.20735>

- Ojha, S., Budge, H., & Symonds, M. E. (2014). Adipocytes in Normal Tissue Biology. In *Pathobiology of Human Disease* (pp. 2003–2013). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.04408-7>
- O'Reilly, F. J., Graziadei, A., Forbrig, C., Bremenkamp, R., Charles, K., Lenz, S., Elfmann, C., Fischer, L., Stülke, J., & Rappsilber, J. (2023). Protein complexes in cells by AI -assisted structural proteomics . *Molecular Systems Biology*, 19(4). <https://doi.org/10.15252/msb.202311544>
- Paik, J.-H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J. W., Carrasco, D. R., Jiang, S., Gilliland, D. G., Chin, L., Wong, W. H., Castrillon, D. H., & DePinho, R. A. (2007). FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell*, 128(2), 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.029>
- Pan, J., Fan, Z., Wang, Z., Dai, Q., Xiang, Z., Yuan, F., Yan, M., Zhu, Z., Liu, B., & Li, C. (2019). CD36 mediates palmitate acid-induced metastasis of gastric cancer via AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1049-7>
- Park, M. A., & Chalfant, C. (2018). Fatty Acid Metabolism. In *Molecular Life Sciences* (pp. 387–401). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1531-2_613
- Park, M. A., & Chalfant, C. (2021). Fatty Acid Metabolism. In *Molecular Life Sciences* (pp. 1–17). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6436-5_613-1
- Parthiban, V., Gromiha, M. M., & Schomburg, D. (2006). CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server), W239–W242. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl190>
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C. S.-O., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J. A., Bescós, C., Di Croce, L., & Benitah, S. A. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*, 541(7635), 41–45. <https://doi.org/10.1038/nature20791>

- Patankar, H. V., Rivera, L. F., Alzahrani, F. O., Wing, R. A., & Blilou, I. (2025). A Chromosome level assembly of pomegranate (*Punica granatum* L.) variety grown in arid environment. *Scientific Data*, 12(1), 73.
<https://doi.org/10.1038/s41597-024-04337-2>
- Peng, K., Radivojac, P., Vucetic, S., Dunker, A. K., & Obradovic, Z. (2006). Length-dependent prediction of protein intrinsic disorder. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 208. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-208>
- PENG, K., VUCETIC, S., RADIVOJAC, P., BROWN, C. J., DUNKER, A. K., & OBRADOVIC, Z. (2005). OPTIMIZING LONG INTRINSIC DISORDER PREDICTORS WITH PROTEIN EVOLUTIONARY INFORMATION. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 03(01), 35–60.
<https://doi.org/10.1142/S0219720005000886>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). <scp>UCSF ChimeraX</scp> : Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Piao, C., Cui, X., Zhan, B., Li, J., Li, Z., Li, Z., Liu, X., Bi, J., Zhang, Z., & Kong, C. (2019). Inhibition of stearyl CoA desaturase-1 activity suppresses tumour progression and improves prognosis in human bladder cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(3), 2064–2076.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14114>
- Pierrou, S., Hellqvist, M., Samuelsson, L., Enerbäck, S., & Carlsson, P. (1994). Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *The EMBO Journal*, 13(20), 5002–5012.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06827.x>
- Pisanu, M. E., Maugeri-Saccà, M., Fattore, L., Bruschini, S., De Vitis, C., Tabbì, E., Bellei, B., Migliano, E., Kovacs, D., Camera, E., Picardo, M., Jakopin, Z., Cippitelli, C., Bartolazzi, A., Raffa, S., Torrisi, M. R., Fulciniti, F., Ascierto, P. A., Ciliberto, G., & Mancini, R. (2018). Inhibition of Stearyl-CoA desaturase 1 reverts BRAF and MEK inhibition-induced selection of cancer stem cells in

- BRAF-mutated melanoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 318. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0989-7>
- Psenakova, K., Kohoutova, K., Obsilova, V., Ausserlechner, M., Veverka, V., & Obsil, T. (2019). Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics. *Cells*, 8(9), 966. <https://doi.org/10.3390/cells8090966>
- Pulla, L. S. S., & Begum Ahil, S. (2021). Review on target domains and natural compound-based inhibitors of fatty acid synthase for anticancer drug discovery. *Chemical Biology & Drug Design*, 98(5), 869–884. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13942>
- Putker, M., Madl, T., Vos, H. R., de Ruiter, H., Visscher, M., van den Berg, M. C. W., Kaplan, M., Korswagen, H. C., Boelens, R., Vermeulen, M., Burgering, B. M. T., & Dansen, T. B. (2013). Redox-Dependent Control of FOXO/DAF-16 by Transportin-1. *Molecular Cell*, 49(4), 730–742. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.014>
- Putker, M., Vos, H. R., van Dorenmalen, K., de Ruiter, H., Duran, A. G., Snel, B., Burgering, B. M. T., Vermeulen, M., & Dansen, T. B. (2015). Evolutionary Acquisition of Cysteines Determines FOXO Paralog-Specific Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(1), 15–28. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6056>
- Rena, G. (2002). Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *The EMBO Journal*, 21(9), 2263–2271. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2263>
- Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J., & Dunker, A. K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins*, 42(1), 38–48. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1<38::aid-prot50>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1<38::aid-prot50>3.0.co;2-3)
- Rupert, J. E., & Kolonin, M. G. (2022). Fatty acid translocase: a culprit of lipid metabolism dysfunction in disease. *Immunometabolism*, 4(3), e00001. <https://doi.org/10.1097/IN9.0000000000000001>
- Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Van Veldhoven, P. P., Waltregny, D., Daniëls, V. W., Machiels, J.,

- Vanderhoydonc, F., Smans, K., Waelkens, E., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2010a). *De novo* Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Research*, 70(20), 8117–8126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3871>
- Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Van Veldhoven, P. P., Waltregny, D., Daniëls, V. W., Machiels, J., Vanderhoydonc, F., Smans, K., Waelkens, E., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2010b). *De novo* Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Research*, 70(20), 8117–8126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3871>
- Sakamaki, J., Daitoku, H., Yoshimochi, K., Miwa, M., & Fukamizu, A. (2009). Regulation of FOXO1-mediated transcription and cell proliferation by PARP-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(3), 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.022>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2013). Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3834–3859. <https://doi.org/10.3390/ijms14023834>
- Santo, E. E., & Paik, J. (2018). A splice junction-targeted CRISPR approach (spJCRISPR) reveals human FOXO3B to be a protein-coding gene. *Gene*, 673, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.048>
- Santos, B. F., Grenho, I., Martel, P. J., Ferreira, B. I., & Link, W. (2023). FOXO family isoforms. *Cell Death & Disease*, 14(10), 702. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06177-1>
- Seguin, F., Carvalho, M. A., Bastos, D. C., Agostini, M., Zecchin, K. G., Alvarez-Flores, M. P., Chudzinski-Tavassi, A. M., Coletta, R. D., & Graner, E. (2012). The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *British Journal of Cancer*, 107(6), 977–987. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.355>
- Shiota, M., Yokomizo, A., Kashiwagi, E., Tada, Y., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Uchiumi, T., Seki, N., & Naito, S. (2010). Foxo3a expression and

- acetylation regulate cancer cell growth and sensitivity to cisplatin. *Cancer Science*, 101(5), 1177–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01503.x>
- Singh, A., Ye, M., Bucur, O., Zhu, S., Tanya Santos, M., Rabinovitz, I., Wei, W., Gao, D., Hahn, W. C., & Khosravi-Far, R. (2010). Protein Phosphatase 2A Reactivates FOXO3a through a Dynamic Interplay with 14-3-3 and AKT. *Molecular Biology of the Cell*, 21(6), 1140–1152. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-09-0795>
- Snarski, P., Ghimire, J., & Savkovic, S. D. (2024). FOXO3: at the crossroads of metabolic, inflammatory, and tumorigenic remodeling in the colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 326(3), G247–G251. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00201.2023>
- Sun, L., Zhao, M., Wang, Y., Liu, A., Lv, M., Li, Y., Yang, X., & Wu, Z. (2017). Neuroprotective effects of miR-27a against traumatic brain injury via suppressing FoxO3a-mediated neuronal autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 1141–1147. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.001>
- Tanaka, K., Kandori, S., Sakka, S., Nitta, S., Tanuma, K., Shiga, M., Nagumo, Y., Negoro, H., Kojima, T., Mathis, B., Shimazui, T., Watanabe, M., Sato, T.-A., Miyamoto, T., Matsuzaka, T., Shimano, H., & Nishiyama, H. (2021). ELOVL2 promotes cancer progression by inhibiting cell apoptosis in renal cell carcinoma. *Oncology Reports*, 47(2), 23. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8234>
- Tissenbaum, H. A. (2018). *DAF-16: FOXO in the Context of C. elegans* (pp. 1–21). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.11.007>
- Tsai, K.-L., Sun, Y.-J., Huang, C.-Y., Yang, J.-Y., Hung, M.-C., & Hsiao, C.-D. (2007). Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Research*, 35(20), 6984–6994. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm703>
- Urbánek, P., & Klotz, L. (2017). Posttranscriptional regulation of FOXO expression: microRNAs and beyond. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1514–1532. <https://doi.org/10.1111/bph.13471>

- van der HEIDE, L. P., HOEKMAN, M. F. M., & SMIDT, M. P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochemical Journal*, 380(2), 297–309.
<https://doi.org/10.1042/bj20040167>
- van der Heide, L. P., & Smidt, M. P. (2005). Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(2), 81–86.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.12.002>
- van der Horst, A., de Vries-Smits, A. M. M., Brenkman, A. B., van Triest, M. H., van den Broek, N., Colland, F., Maurice, M. M., & Burgering, B. M. T. (2006). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nature Cell Biology*, 8(10), 1064–1073.
<https://doi.org/10.1038/ncb1469>
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- van der Vos, K. E., & Coffey, P. J. (2008). FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene*, 27(16), 2289–2299. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.22>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- van der Heide, L. P., Jacobs, F. M. J., Burbach, J. P. H., Hoekman, M. F. M., & Smidt, M. P. (2005). FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr26 and Ser184, independent of nucleo-cytoplasmic shuttling. *Biochemical Journal*, 391(3), 623–629. <https://doi.org/10.1042/BJ20050525>
- Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., Tsenkov, M., Nair, S., Mirdita, M., Yeo, J., Kovalevskiy, O., Tunyasuvunakool, K., Laydon, A., Židek, A., Tomlinson, H., Hariharan, D., Abrahamson, J., Green, T., Jumper, J., ... Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D368–D375.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>

- Vargha-Khadem, F., Gadian, D. G., Copp, A., & Mishkin, M. (2005). FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 131–138. <https://doi.org/10.1038/nrn1605>
- Walsh, I., Martin, A. J. M., Di Domenico, T., & Tosatto, S. C. E. (2012). ESpritz: accurate and fast prediction of protein disorder. *Bioinformatics*, 28(4), 503–509. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr682>
- Wang, C., Meng, X., Zhou, Y., Yu, J., Li, Q., Liao, Z., Gu, Y., Han, J., Linghu, S., Jiao, Z., Wang, T., Zhang, C.-Y., & Chen, X. (2021). Long Noncoding RNA CTD-2245E15.3 Promotes Anabolic Enzymes ACC1 and PC to Support Non-Small Cell Lung Cancer Growth. *Cancer Research*, 81(13), 3509–3524. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3806>
- Wang, F., Marshall, C. B., & Ikura, M. (2015a). Forkhead followed by disordered tail: The intrinsically disordered regions of FOXO3a. *Intrinsically Disordered Proteins*, 3(1), e1056906. <https://doi.org/10.1080/21690707.2015.1056906>
- Wang, F., Marshall, C. B., & Ikura, M. (2015b). Forkhead followed by disordered tail: The intrinsically disordered regions of FOXO3a. *Intrinsically Disordered Proteins*, 3(1), e1056906. <https://doi.org/10.1080/21690707.2015.1056906>
- Wang, F., Marshall, C. B., Yamamoto, K., Li, G.-Y., Gasmi-Seabrook, G. M. C., Okada, H., Mak, T. W., & Ikura, M. (2012). Structures of KIX domain of CBP in complex with two FOXO3a transactivation domains reveal promiscuity and plasticity in coactivator recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6078–6083. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119073109>
- Wang, F., Marshall, C. B., Yamamoto, K., Li, G.-Y., Plevin, M. J., You, H., Mak, T. W., & Ikura, M. (2008). Biochemical and Structural Characterization of an Intramolecular Interaction in FOXO3a and Its Binding with p53. *Journal of Molecular Biology*, 384(3), 590–603. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.025>
- Wang, M., Zhang, X., Zhao, H., Wang, Q., & Pan, Y. (2009). FoxO gene family evolution in vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 222. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-222>
- Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., & Jones, D. T. (2004). Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the

Three Kingdoms of Life. *Journal of Molecular Biology*, 337(3), 635–645.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.002>

- Weeratunga, S., Gormal, R. S., Liu, M., Eldershaw, D., Livingstone, E. K., Malapaka, A., Wallis, T. P., Bademosi, A. T., Jiang, A., Healy, M. D., Meunier, F. A., & Collins, B. M. (2024). Interrogation and validation of the interactome of neuronal Munc18-interacting Mint proteins with AlphaFold2. *Journal of Biological Chemistry*, 300(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105541>
- Wen, J., Min, X., Shen, M., Hua, Q., Han, Y., Zhao, L., Liu, L., Huang, G., Liu, J., & Zhao, X. (2019). ACLY facilitates colon cancer cell metastasis by CTNNB1. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 401.
<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1391-9>
- Weng, G., Wang, E., Wang, Z., Liu, H., Zhu, F., Li, D., & Hou, T. (2019). HawkDock: a web server to predict and analyze the protein–protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W322–W330. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz397>
- WOODS, Y. L., RENA, G., MORRICE, N., BARTHEL, A., BECKER, W., GUO, S., UNTERMAN, T. G., & COHEN, P. (2001). The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochemical Journal*, 355(3), 597–607.
<https://doi.org/10.1042/bj3550597>
- Xu, Y., Yang, X., Wang, T., Yang, L., He, Y.-Y., Miskimins, K., & Qian, S. Y. (2018). Knockdown delta-5-desaturase in breast cancer cells that overexpress COX-2 results in inhibition of growth, migration and invasion via a dihomo- γ -linolenic acid peroxidation dependent mechanism. *BMC Cancer*, 18(1), 330.
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4250-8>
- Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., & Uversky, V. N. (2010). PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(4), 996–1010. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.011>

- Yan, Y., Tao, H., He, J., & Huang, S.-Y. (2020). The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nature Protocols*, 15(5), 1829–1852.
<https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x>
- Yanamadala, V. (2024). Lipid Metabolism. In *Essential Medical Biochemistry and Metabolic Disease* (pp. 35–90). Springer Nature Switzerland.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-59394-9_2
- Yang, D., Li, Y., Xing, L., Tan, Y., Sun, J., Zeng, B., Xiang, T., Tan, J., Ren, G., & Wang, Y. (2018). Utilization of adipocyte-derived lipids and enhanced intracellular trafficking of fatty acids contribute to breast cancer progression. *Cell Communication and Signaling*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0221-6>
- Yang, J.-Y., Zong, C. S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J.-Y., Lai, C.-C., Chang, C.-J., Huang, W.-C., Huang, H., Kuo, H.-P., Lee, D.-F., Li, L.-Y., Lien, H.-C., Cheng, X., Chang, K.-J., Hsiao, C.-D., Tsai, F.-J., ... Hung, M.-C. (2008). ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature Cell Biology*, 10(2), 138–148.
<https://doi.org/10.1038/ncb1676>
- Yang, X., Xu, Y., Brooks, A., Guo, B., Miskimins, K. W., & Qian, S. Y. (2016). Knockdown delta-5-desaturase promotes the formation of a novel free radical byproduct from COX-catalyzed ω -6 peroxidation to induce apoptosis and sensitize pancreatic cancer cells to chemotherapy drugs. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, 342–350.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.028>
- Yang, X., Xu, Y., Wang, T., Shu, D., Guo, P., Miskimins, K., & Qian, S. Y. (2017). Inhibition of cancer migration and invasion by knocking down delta-5-desaturase in COX-2 overexpressed cancer cells. *Redox Biology*, 11, 653–662.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.016>
- Yariv, B., Yariv, E., Kessel, A., Masrati, G., Chorin, A. Ben, Martz, E., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2023). Using evolutionary data to make sense of macromolecules with a “face-lifted” ConSurf. *Protein Science*, 32(3).
<https://doi.org/10.1002/pro.4582>

- Yoon, H., Shaw, J. L., Haigis, M. C., & Greka, A. (2021). Lipid metabolism in sickness and in health: Emerging regulators of lipotoxicity. *Molecular Cell*, 81(18), 3708–3730. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.027>
- You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., Villunger, A., & Mak, T. W. (2006). FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1657–1663. <https://doi.org/10.1084/jem.20060353>
- Yu, D.-S., Chen, Y.-T., Wu, C.-L., & Yu, C.-P. (2017). Expression of p-FOXO3/FOXO3 in bladder cancer and its correlation with clinicopathology and tumor recurrence. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(11), 11069–11074.
- Yu, Y., Peng, K., Li, H., Zhuang, R., Wang, Y., Li, W., Yu, S., Liang, L., Xu, X., & Liu, T. (2018). SP1 upregulated FoxO3a promotes tumor progression in colorectal cancer. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6323>
- Zaytseva, Y. Y., Elliott, V. A., Rychahou, P., Mustain, W. C., Kim, J. T., Valentino, J., Gao, T., O'Connor, K. L., Neltner, J. M., Lee, E. Y., Weiss, H. L., & Evers, B. M. (2014). Cancer cell-associated fatty acid synthase activates endothelial cells and promotes angiogenesis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 35(6), 1341–1351. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu042>
- Zhang, X., Campreciós, G., Rimmelé, P., Liang, R., Yalcin, S., Mungamuri, S. K., Barminko, J., D'Escamard, V., Baron, M. H., Brugnara, C., Papatsenko, D., Rivella, S., & Ghaffari, S. (2014). FOXO3-mTOR metabolic cooperation in the regulation of erythroid cell maturation and homeostasis. *American Journal of Hematology*, 89(10), 954–963. <https://doi.org/10.1002/ajh.23786>
- Zhang, X., Liu, Q., Zhang, X., Guo, K., Zhang, X., & Zhou, Z. (2021). FOXO3a regulates lipid accumulation and adipocyte inflammation in adipocytes through autophagy. *Inflammation Research*, 70(5), 591–603. <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01463-0>
- Zhang, Y. (2005). TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Research*, 33(7), 2302–2309. <https://doi.org/10.1093/nar/gki524>

- Zhang, Y., & Skolnick, J. (2004). Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57(4), 702–710. <https://doi.org/10.1002/prot.20264>
- Zhao, W., Prijic, S., Urban, B. C., Tisza, M. J., Zuo, Y., Li, L., Tan, Z., Chen, X., Mani, S. A., & Chang, J. T. (2016). Candidate Antimetastasis Drugs Suppress the Metastatic Capacity of Breast Cancer Cells by Reducing Membrane Fluidity. *Cancer Research*, 76(7), 2037–2049. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1970>
- Zhao, Y., & Liu, Y.-S. (2021). Longevity Factor FOXO3: A Key Regulator in Aging-Related Vascular Diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 778674. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.778674>

EKLER

Ek Tablo 1. Yağ asidi metabolizmasına katılan 42 proteininin Adları ve FASTA formatlı dizileri.

Sıra No.	Protein Adı	Protein Dizisi
1	AAKG1	METVISSDSSPAVENEHPQETPESNNSVYTSFMKSHRCYDLIPT SSKLVVFDTSLQVKKAFFALVTNGVRAAPLWDSKKQSFVGM TITDFINILHRYYSALVQIYELEEHKIETWREVYLQDSFKPLVC ISPNASLFDVSSLIRNKIHRLPVIDPESGNTLYILTHKRILKFLK LFITEFPKPEFMSKSLEELQIGTYANIAMVRTTTPVYVALGIFVQ HRVSALPVVDEKGRVVDIYSKFDVINLAAEKTYNLDVSVTK ALQHRSHYFEGVLKCYLHETLETIINRLVEAEVHRLVVVDEND VVKGIVSLSDILQALVLTGGEKKP
2	ACACA	MDEPSPLAQPLELNQHSRFIGSVSEDNSEDEISNLVKLDLLEEK EGSLSPASVGSDDLSDLGSSLDGLALHIRSSMSGHLHLVKQGR DRKKIDSQRDFTVASPAEFVTRFGGNKVIEKVLIANNGIAAVK CMRSIRRWSYEMFRNERAIRFVVMVTPEDLKANA EYIKMADH YVPVPGGPNNNNYANVELILDIAKRIPVQAVWAGWGHASENP KLPELLLKNGIAFMGPPSQAMWALGDKIASSIVAQTAGIPTLP WSGSGLRVDWQENDFSKRILNVPQELYEKG YVKD VDDGLQA AEEVGYPVMIKASEGGGGKGIRKVN NADDFPNLFRQVQAEVP GSPIFVMRLAKQSRHLEVQILADQYGN AISLFG RDCSVQRRHQ KIIIEAPATIATPAVFEHMEQCAVKLAKMVG YVSAGTVEYLYS QDGSFYFLELNPRLQVEHPCTEMVADVNL PAAQLQIAMGIPLY RIKDIRMMYGVSPWGDSPIDFEDSAHVPCPRGHVIAARITSEN DEGFKPSSGTVQELNFRSNKNVWGYFSVAAAGGLHEFADSQF GHCFSWGENREEAISNMVVALKELSIRGDFRTTVEYLIK LLETE SFQMNRIDTGWLDRLIAEKVQAERPDTMLGVVCGALHVADV LRNSVSNFLHSLERGQVLP AHTLLNTVDVELIYEGVKYVLKVT RQSPNSYVVMNGSCVEVDVHRLSDGGLLLSYDGSSYTTYMK EEVD RYRITIGNKTCVF EKENDPSVMRSPSAGKLIQYIVEDGGH

	VFAGQCYAEIEVMKMVMTLTAVESGCIHYVKRPGAALDPGC VLAKMQLDNPSKVQQAELHTGSLPRIQSTALRGEKLHRVFHY VLDNLVNVNMNGYCLPDPFFSSKVKDWVERLMKTLRDPSLPLL ELQDIMTSVSGRIPPNVEKSIKKEMAQYASNITSVLCQFPSQOI ANILDSHAATLNRKSEREVFFMNTQSIVQLVQRYRSGIRGHMK AVVMDLLRQYLRVETQFQNGHYDKCVFALREENKSDMNTVL NYIFSHAQVTKKNLLVTMLIDQLCGRDPTLTDELLNILTELTQL SKTTNAKVALRARQVLIASHLPSYELRHNQVESIFLSAIDMYG HQFCIENLQKLILSETSIFDVLPNFFYHSNQVVRMAALEVYVRR AYIAYELNSVQHRQLKDNTCVVEFQFMLPTSHPNRGNIPTLNR MSFSSNLNHYGMTHVASVSDVLLDNSFTPPCQRMGGMVSFRT FEDFVRIFDEVMGCFSDSPQSPTFPEAGHTSLYDEDKVPRDEP IHILNVAIKTDCDIEDDRLAAMFREFTQQNKATLVDHGIRRLTF LVAQKDFRKQVNYEVDRRFHREFPKFFTFRARDKFEEDRIYRH LEPALAFQLELNRMRNFDLTAIPCANHMKMHLYLGAAKVEVGT EVTDYRFFVRAIIRHSDLVTKEASFEYLQNEGERLLLEAMDELE VAFNNTNVRTDCNHIFLNFVPTVIMDPSKIEESVRSMVMRYGS RLWKLRLVLAELKINIRLTPTGKAIPIRLFLTNESGYLDISLYK EVTDSRTAQIMFQAYGDKQGPLHGMLINTPYVTKDLLQSKRF QAQSLGTTYIYDIPEMFRQSLIKLWESMSTQAFLPSPPLPSDML TYTELVLDDQGQLVHNMNRLPGGNEIGMVAWKMTFKSPEYPE GRDIIVIGNDITYRIGSFGPQEDLLFLRASELARAEGIPRIYVSAN SGARIGLAEEIRHMFHVAWVDPEDPYKGYRYLYLTPQDYKRV SALNSVHCEHVEDEGESRYKITDIIGKEEGIGPENLRGSGMIAG ESSLAYNEIITISLVTCAIGIGAYLVRLGQRTIQVENS HLITGA GALNKVLGREVYTSNNQLGGIQIMHNNGVTHCTVCDDFEGVF TVLHWLSYMPKSVHSSVPLLNSKDPIDRIIEFVPTKTPYDPRW MLAGRPHPTQKGQWLSGFFDYGSFSEIMQPWAQTVVVGRAR LGGIPVGVVAVETRTVELSIPADPANLDSEAKIIQQAGQVWFPD SAFKTYQAIKDFNREGLPLMVFANWRGFSGGMKDMYDQVLK FGAYIVDGLRECCQPVLVYIPPQAELRGGSWVIDSSINPRHM EMYADRESRGSVLEPEGTVEIKFRRKDLVKTMRRVDPVYIHL AERLGTPELSTAERKELENKLEREEFLPIYHQVAVQFADLHD
--	--

		TPGRMQEKGVISDILDWKTSRTFFYWRLRRLLEDLVKKKIHN ANPELTDGQIQAMLRRWFVEVEGTVKAYVWDNNKDLAEWL EKQLTEEDGVHSHVIEENIKCISRDYVLKQIRSLVQANPEVAMDS IIHMTQHISPTQRAEVIRILSTMDSPST
3	ACACB	MVLLLCLSLIFSLTFSWLKIWGKMTDSKPITKSKSEANLIPS QEPFPASDNSGETPQRNGEGHTLPKTPSQAEPASHKGPKDAGR RRNSLPPSHQKPPRNPLSSSDAAPSPELQANGTGTQGLEATDT NGLSSSARPQGQQAGSPSKEDKKQANIKRQLMTNFILGSFDDY SSDEDSVAGSSRESTRKGSRASLGALSLEAYLTTGEAETRVPT MRPSMSGHLHLVKRGREHKKLDLHRDFTVASPAEFVTRFGGDR VIEKVLIANNGIAAVKCMRSIRRAYEMFRNERAIRFVVMVTP EDLKANA EYIKMADHYVPVPGGPNNNNYANVELIVDIAKRIP VQAVWAGWGHASENPKLPELLCKNGVAFLGPPSEAMWALGD KIASTVVAQTLQVPTLPWSGSGLTVEWTEDDLQQGKRISVPED VYDKGCVKDVDEGLEAAERIGFPLMIKASEGGGGKGIRKAES AEDFPILFRQVQSEIPGSPIFLMKLAQHARHLEVQILADQYGNA VSLFGRDCSIQRRHQKIVEEAPATIAPLAIFEFMEQCAIRLAKTV GYVSAGTVEYLYSQDGSFHFLELNPRLQVEHPCTEMIADVNL AAQLQIAMGVPLHRLKDIRLLYGESPWGVTPISFETPSNPPLAR GHVIAARITSENPDEGFKPSSGTVQELNFRSSKNVWGYFSVAA TGGLHEFADSQFGHCFSWGENREEAISNMVVALKELSIRGDFR TTVEYLINLLETESFQNNIDITGWLDYLIAEKVQAEKPDIMLG VVCALNVADAMFRTCMTDFLHSLERGQVLPADSLNLVDV ELIYGGVKYILKVARQSLTMFVLIMNGCHIEIDAHRLNDGGLL LSYNGNSYTTYMKEEVDSYRITIGNKTCVFEEKENDPTVLRSPS AGKLTQYTVEDGGHVEAGSSYAEMEVMKMIMTLNVQERGRV KYIKRPGAVLEAGCVVARLELDDPSKVHPAEPFTGELPAQQTL PILGEKLHQVFHSLVLENLTNVMMSGFCLPEPVFSIKLKEWVQKL MMTLRHPSLPLLELQEIMTSVAGRIPAPVEKSVRRVMAQYASN ITSVLCQFPSQQIATILDCHAATLQRKADREFFINTQSIVQLVQ RYRSGIRGYMKTVVLDLLRRYL RVEHHFQQAHYDKCVINLRE QFKPDMSQVLDCIFSHAQVAKKNQLVIMLIDELCGPDPSLSDE LISILNELTQLSKSEHCKVALRARQILIASHLPSYELRHNQVESIF

		LSAIDMYGHQFCPENLKKLILSETTIFDVLPTFFYHANKVVCM ASLEVYVRRGYIAYELNSLQHRQLPDGTCVVEFQFMLPSSHPN RMTVPISITNPDLLRHSTELFMDSGFSPLCQRMGAMVAFRRFE DFTRNFDEVISCFANVPKDTPLFSEARTSLYSEDDCKSLREEPIH ILNVSQCADHLEDEALVPILRTFVQSKKNILVDYGLRRITFLIA QEKEFPKFFTFRARDEFAEDRIYRHLEPALAFQLELNRMRNFD LTAVPCANHKMHLYLGA AKVKEGVEVTDHRFFIRAIIRHSDLI TKEASFEYLQNEGERLLLEAMDELEVA FNNTSVRTDCNHIFLN FVPTVIMDPFKIEESVRYMVMRYGSRLWKLRVLQAEVKINIRQ TTTGSAVPIRLFITNESGY YLDISLYKEVTD SRS GNIMFHSFGNK QGPQH GMLINTPYVTKDLLQAKRFQAQTLGTTYIYDFPEMFR QALFKLWGSPDKYPKDILTYTELVLDSQGQLVEMNRLPGGNE VGMVAFKMRFKTQEYPEG RDVIVIGNDITFRIGSFGPGEDLLY LRASEMARAEGIPKIYVAANS GARIGMAEEIKHMFHVAWVDP EDPHKGF KYLYLTPQDYTRISSLNSVHCKHIEEGGESRYMITDII GKDDGLGVENLRGSGMIAGESSLAYEEIVTISLVT CRAIGIGAY LVRLGQRVIQVENS HIILTGASALNKVLGREVYTSNNQLGGVQ IMHYNGVSHITVPDDFEGVYTILEWLSYMPKDNHSPVPIITPTD PIDREIEFLPSRAPYDPRWMLAGRPHPTLKG TWQSGFFDHGSF KEIMAPWAQTVVTGRARLGGIPVG VIAVETR TVEVAVPADPA NLDSEAKIIQQAGQVWF PDSAYKTAQAVKDFNREKLPLMIFA NWRGFSGGMKDMYDQVLKFGAYIVDGLRQYKQPILYIPPYA ELRGGSWVVIDATINPLCIEMYADKESRGGVLEPEGTVEIKFRK KDLIKSMRRIDPAYKKLMEQLGEPDL SDKDRKDLEGR LKARE DLLLPIYHQVAVQFADFHDTPGRMLEKGVISDILEWKTARTFL YWRLRRL LLEDQVKQEILQASGELSHVHIQSMLRRWFVETEG AVKAYLWDNNQVVVQWLEQHWQAGDGPRSTIRENITYLKHD SVLKTIRGLVEENPEVA VDCVIYLSQHISPAERAQVVHLLSTM DSPAST
4	ACADL	MAARLLRGSLRVLGGHRAPRQLPAARCSHSGGEERLETPSAK KLTDIGIRRIFSPEHDIFRKSVRKFFQEEVIPHHSEWEKAGEVSR EVWEKAGKQGLLG VNIAEHLGGIGGDLYSAAIWWEQAYSNC SGPGFSIHSGIVMSYITNHGSEEQIKHFIPQMTAGKCIGAIAMTE

		PGAGSDLQGIKTNAKKDGSDWILNGSKVFISNGSLSDVVIVVA VTNHEAPSPAHGISLFLVENGMKGFIKGRKLHKMGLKAQDTA ELFFEDIRLPASALLGEENKGFYYIMKELPQERLLIADVAISASE FMFEETRNYVKQRKAFGKTV AHLQTVQHKL AELKTHICVTRA FVDNCLQLHEAKRLDSATACMAKYWASELQNSVAYDCVQLH GGWGYMWEYPIAKAYVDARVQPIYGGTNEIMKELIAREIVFD K
5	ACADM	MAAGFGRCCRVLRISRFHWRSQHTKANRQREPGLGFSFEFTE QQKEFQATARKFAREEIIPVAAEYDKTGEYPVPLIRRAWELGL MNTHIPENCGGLGLGTFDACLISEELAYGCTGVQTAIEGNSLG QMPHIIAGNDQQKKKYLGRMTEEPLMCAYCVTEPGAGSDVAG IKTKAEKKGDEYIINGQKMWITNGGKANWYFLLARSDPDPKA PANKAFTGFIVEADTPGIQIGRKELNMGQRCSDTRGIVFEDVK VPKENVLIGDGAGFKVAMGAFDKTRPVVAAGAVGLAQRALD EATKYALERKTFGKLLVEHQAISFMLAEMAMKVELARMSYQ RAAWEVDSGRRNTYYASIAKAFAGDIANQLATDAVQILGGNG FNTEYPVEKLMRDAKIYQIYEGTSQIQRLIVAREHIDKYKN
6	ACADS	MAAALLARASGPARRALCPRAWRQLHTIYQSVELPETHQMLL QTCRDFAEKELFPIAAQVDKEHLFPAAQVKKMGGLGLLAMD VPEELGGAGLDYLAYAIAMEEISRGCASTGVIMSVNNSLYLGPI LKFGSKEQKQAWVTPFTSGDKIGCFALSEPGNGSDAGAASTTA RAEGDSWVLNGTKAWITNAWEASAAVFASTDRALQNKGIS AFLVPMPTPGLTLGKKEDKL GIRGSSTANLIFEDCRIPKDSILGE PGMGFKIAMQTLDMGRIGIASQALGIAQTALDCAVNYAENRM AFGAPLTKLQVIQFKLADMALALESARLLTWRAAMLKDNKKP FIKEAAMAKLAASEAATAISHQAIQILGGMGYVTEMPAERHYR DARITEIYEGTSEIQRLVIAGHLLRSYRS
7	ACADSB	MEGLAVRLLRGSRLLRNFLTCLSSWKIPPHVSKSSQSEALLNI TNNGIHFAPLQTFDEEMMIKSSVKKFAQEIQIAPLVSTMDENS KMEKSVIQGLFQQGLMGIEVDPEYGGTGASFLSTVLVIEELAK VDASVAVFCEIQNTLINTLIRKHGTEEQKATYLPQLTTEKVGSF CLSEAGAGSDSFALKTRADKEGDYYVLNGSKMWISSAEHAGL FLVMANVDPTIGYKGITSFLVDRDTPGLHIGKPENKLGLRASST

		CPLTFENVKVPEANILGQIGHGYKYAIGSLNEGRIGIAAQMLGL AQGCFDYTIPYIKERIQFGKRLFDFQGLQHQAHVATQLEAAR LLTYNAARLLEAGKPFKEASMAKYYASEIAGQTTSKCIWGMG GVGYTKDYPVEKYFRDAKIGTIYEGASNIQLNTIAKHIDAEY
8	ACADV L	MQAARMAASLGRQLRLGGSSRLTALLGQPRPGPARRPYAG GAAQLALDKSDSHPSDALTRKKPAKAESKSFAVGMFKGQLTT DQVFPYPSVLNEEQTQFLKELVEPVSRFFEEVNDPAKNDALEM VEETTWQGLKELGAFLQVPSELGGVGLCNTQYARLVEIVGM HDLGVGITLGAHQSIGFKGILLFGTKAQKEKYLPKLASGETVA AFCLTEPSSGSDAASIRTSAPVSPCGKYYTLNGSKLWISNGGLA DIFTVFAKTPVTDPATGAVKEKITAFVVERGFGGITHGPPEKK MGIKASNTAEVFFDGVVRVPSENVLGEVGSFGKVAMHILNNGR FGMAAALAGTMRGIIAKAVDHATNRTQFGEKIHNFGLIQEKLA RMVMLQYVTESMAYMVSANMDQGATDFQIEAAISKIFGSEAA WKVTDECIQIMGGMGFMKEPGVERVLRDLRIFRIFEGTNDILR LFVALQGCMDKGKELSGLSALKNPFGNAGLLLGEAGKQLRR RAGLGSGLSLSGLVHPELSRSGELAVRALEQFATVVEAKLIKH KKGIVNEQFLLQRLADGAIDLYAMVVVLSRASRSLSEGHPTAQ HEKMLCDTWCIEAAARIREGMAALQSDPWQQELYRNFKSISK ALVERGGVVTSNPLGF
9	ACAT1	MAVLAALLRSGARSRSPLLRRLVQEIRYVERSYVSKPTLKEVV IVSATRTPIGSFLGSLSLLPATKLGSIAIQGAIEKAGIPKEEVKEA YMGNVLQGGEGQAPTRQAVLGAGLPSTPCTTINKVCASGMK AIMMASQSLMCGHQDVMVAGGMESMSNPYVMNRGSTPYG GVKLEDLIVKDGLTDVYNKIHMGSCAENTAKKLNIARNEQDA YAINSYTRSKAAWEAGKFGNEVIPVTVTVKGPDPVVKEDEE YKRVDFSKVPKLKTVFQKENGTVTAANASTLNDGAAALVLM TADAAKRLNVTPLARIVAFADA AVEPIDFPIAPVYAASMVLKD VGLKKEDIAMWEVNEAFSLVVLANIKMLEIDPQKVNINGGAV SLGHPIGMSGARIVGHLTHALKQGEYGLASICNGGGGASAMLI QKL
10	ACLY	MSAKAISEQTGKELLYKFICTTSAIQNRFKYARVTPD TDWARL LQDHPWLLSQNLVVKPDQLIKRRGKLGLVGVNLTLDGVKSW

		LKPRLGQEATVGKATGFLKNFLIEPFVPHSQAEEFYVCIYATRE GDYVLFHHEGGVDVGVDVDAKAQKLLVGVDEKLNPEDIKKHL LVHAPEDKKEILASFISGLNFYEDLYFTYLEINPLVVTKDGVY VLDLAAKV DATADYICKVKWGDIEFPPPGREAYPEEAYIADL DAKSGASLKL TLLNPKGRIWTMVAGGGASVVYSDTICDLGGV NELANYGEYSGAPSEQQTYDYAKTILSLMTREKHPDGKILIIGG SIANFTNVAATFKGIVRAIRDYQGGLKEHEVTIFVRRGGPNYQE GLRVMGEVGKTTGIPIHVFGTETHMTAIVGMALGHRPIPNQPP TAAHTANFLLNASGSTSTPAPSRTASFSESRADEVAPAKKAKP AMPQDSVPSRSLQGKSTTLFSRHTKAIVWGMQTRAVQGMLD FDYVCSRDEPSVAAMVYPFTGDHKQKFYWGHEILIPVFKNM ADAMRKHPEVDVLINFASLSAYDSTMETMNYAQIRTIAIIAE GIPEALTRKLIKKADQKGVTHGPATVGGIKPGCFKIGNTGGML DNILASKLYRPGSVAYVSRSGGMSNELNNIISRTTDGVYEGVAI GGDRYPGSTFMDHVLRYQDTPGVKMIVVLGEIGGTEEYKICR GIKEGRLTKPIVCWCIGTCATMFSSEVQFGHAGACANQASETA VAKNQALKEAGVFVPRSFDELGEIIQSVYEDLVANGVIVPAQE VPPPTVPMDISWARELGLIRKPASFMTSICDERGQELIYAGMPI TEVFKEEMGIGGVLLWFQKRLPKYSCQFIEMCLMVTADHG PAVSGAHNTIICARAGKDLVSSLTSGLLTIGDRFGGALDAAAK MFSKAFDSGIIPMEFVNKMKKEGKLIMGIGHRVKSINNPDMRV QILKDYVRQHFPATPLLDYALEVEKITTSSKKPNLILNVDGLIGV AFVDMLRNCGSFTREEADEYIDIGALNGIFVLGRSMGFIGHYL DQKRLKQGLYRHPWDDISYVLPEHMSM
11	ACOT1	MAATLILEPAGRCCWDEPVRIAVRGLAPEQPVTLRASLRDEKG ALFQAHARYRADTLGELDLERAPALGGSFAGLEPMGLLWALE PEKPLVRLVKRDVRTPLAVELEVLDGHD PDPGRLLCRVRHER YFLPPGVRREPVRAGRVRGTLFLPPEPGPFPGIVDMFGTGGGLL EYRASLLAGKGFAYMALAYNYEDLPKTMETLHLEYFEEAV NYLLSHPEVKGPVGVLGISKGGELCLSMASFLKGITAAVVIN GSVANVGGLTRYKGETLPPGVNRRNIKVT KDGYADIVDVLN SPLEGPDKSFIPIVERAESTFLFLVGQDDHNWKSEFYANEACK

		RLQAHGRRKPQIICYPETGHYIEPPYFPLCRASLHALVGSPHIIWG GEPRAHAMAQVDAWKQLQTFFHKHLGGHEGTIPSKV
12	ACOT2	MSNKLLSPHPSVVLRSSEFKMASSPAVLRASRLYQWSLKSSA QFLGSPQLRQVGQIIRVPARMAATLILEPAGRCCWDEPVRIAV RGLAPEQPVTLRASLRDEKGALFQAHARYRADTLGELDLERA PALGGSFAGLEPMGLLWALEPEKPLVRLVKRDVRTPLAVELE VLDGHDPDPGRLLCQTRHERYFLPPGVRREPVRVGRVRGTLFL PPEPGPFPGIVDMFGTGGGLLEYRASLLAGKGFVMAALAYYN YEDLPKTMETLHLEYFEEAMNYLLSHPEVKGPGVGLLGISKGG ELCLSMASFLKGITAAVINGSVANVGGTLHYKGETLPPVGVN RNRIKVTKDGYADIVDVLSNPLEGPDQKSIFPVERAESTFLFLV GQDDHNWKSEFYANEACKRLQAHGRRKPQIICYPETGHYIEPP YFPLCRASLHALVGSPHIIWGGEPRAHAMAQVDAWKQLQTFFH KHLGGHEGTIPSKV
13	ACOT4	MSATLILEPPGRCCWNEPVRIAVRGLAPEQVRVTLRASLRDEKG ALFRAHARYCADARGELDLERAPALGGSFAGLEPMGLLWALE PEKPFWRFLKRDVQIPFVVELEVLDGHDPEPGRLLCQAQHERH FLPPGVRQRQSVRAGRVRATLFLPPGPGPFPGIIFIGIGGLLEY RASLLAGHGFATLALAYYNFEDLPNNMDNISLEYFEEAVCYM LQHPQVKGPGIGLLGISLGADICLSMASFLKNVSATVSINGSGIS GNTAINYKHSSIPPLGYDLRRIKVAFSGLVDIRNALVGGYK NPSMPIEKAQGPILLIVGQDDHNWRSELYAQTVSERLQAHGK EKPQIICYPGTGHYIEPPYFPLCPASLHRLLNKHVIWGGEPRAH SKAQEDAWKQILAFFCKHLGGTQKTAVPKL
14	ACOX1	MNPDLRRERDSASFNPELLTHILDGSPEKTRRRREIENMILNDP DFQHEDLNFLTRSQRYEVAVRKSAIMVKKMREFGIADPDEIM WFKKLHLVNFVEPVGLNYSMFIPTLLNQGTTAQKEKWLLSSK GLQIIGTYAQTEMGHGTHLRGLETTATYDPETQEFILNSPTVTSI KWWPGGLGKTSNHAIVLAQLITKGKCYGLHAFIVPIREIGTHK PLPGITVGDIGPKFGYDEIDNGYLKMDNHRIPRENMLMKY AQ VKPDGTYVKPLSNKLTYGTMVFVRSFLVGEAARALSKACTIAI RYS AVRHQSEIKPGEPEPQILDFQTQQYKLFPLLATAYAFQFVG AYMKETYHRINEGIGQGDLSELPELHALTAGLKAFTSWTANT

		GIEACRMACGGHGYSHCSGLPNIYVNFTPSCTFEGENTVMML QTARFLMKSYDQVHSGKLVCGMVSYLNDLPSQRIQPQQVAV WPTMVDINSPELSTEAYKLRAARLVEIAAKNLQKEVIHRKSKE VAWNLTSDLVRASEAHCHYVVVKLFSEKLLKIQDKAIQAVL RSLCLLYSLYGISQNAGDFLQGSIMTEPQITQVNQRVKELLTLI RSDAVALVDAFDFQDVTLGSVLGRYDGNVYENLFEWAKNSP LNKAEVHESYKHLKSLQSKL
15	ACSA	MGLPEERVRSRSGSRGQEEAGAGGRARSWSPPPEVSRSAHVPS LQRYRELHRRSVEEPREFWGDIAKEFYWKTPCPGPFLRYNFDV TKGKIFIEWMKGATTNICYNVLDNRVHEKKLGDKVAFYWEG NEPGETTQITYHQLLVQVCQFSNVLKQGIQKGDRVAIYMPMI PELVVAMLACARIGALHSIVFAGFSSESLCERILDSSCSLLITTD AFYRGEKLVNLKELADEALQKCQEKGFPVRCCIVVKHLGRAE LGMGDSTSQSPPIKRSCPVDQISWNQGIDLWWHELMQEAGDE CEPEWCDAEDPLFILYTSGSTGKPKGVVHTVGGYMLYVATTF KYVFDFAEDVFWCTADIGWITGHSYVTYGPLANGATSVLFE GIPTYPDVNRLWSIVDKYKVTKFYTAPT AIRLLMKFGDEPVTK HSRASLQVLGTVGEPINPEAWLWYHRVVG AQRCPIVDTFWQT ETGGHMLTPLPGATPMKPGSATFPFFGVAPAILNESGEELEGE AEGYLVFKQPWPGIMRTVYGNHERFETTYFKKFPGYVVTGDG CQRDQDGYWITGRIDDMLNVSGHLLSTA EVESALVEHEAVA EAAVVGHPHPVKGECLYCFVTLCDGHTFSPKLTEELKKQIREK IGPIATPDYIQNAPGLPKTRSGKIMRRVLRKIAQNDHDLGDMST VADPSVISHLFSHRCLTIQ
16	ACSF3	MLPHVVLTFRRLGCALASCRLAPARHRGSGLLHTAPVARSDR SAPVFTRALAFGDRIALVDQHGRHTYRELYSRSLRLSQCICRLC GCVGGDLREERSFLCANDASYVVAQWASWMSGGVAVPLY RKHPAAQLEYVICDSQSSVVLASQEYLELLSPVVRKLGVPLLP LTPAIYTGAVEEPAEVPVPEQGWRNKGAMIIYTS GTTGRPKG V LSTHQNIRAVVTGLVHKWAWTKDDVILHVLPLHHVHGVVNA LLCPLWVGATCVMMPFEFSPQQVWEKFLSSETPRINVFMAVPTI YTKLMEYYDRHFTQPHAQDFLRAVCEEKIRLMVSGSAALPLP VLEKWKNITGHTLLERYGMTEIGMALSGPLTTAVRLPGSVGTP

		LPGVQVRIVSENPQREACSYTIHAEGDERGTKVTPGFEEKEGEL LVRGPSVFREYWNKPEETKSAFTLDGWFKTGDTVVFKDGQY WIRGRTSVDIIKTGGYKVSALVEVWHLAHP SITDVAVIGVPD MTWGQRVTA VVTLREGHSLSHRELKEWARNVLAPYAVPSEL VLVEEIPRNQMKGIDKKALIRHFHPS
17	ACSL1	MQAHELFRYFRMPPELVDFRQYVRTLPTNTLMGFGAFAALTTF WYATRPKPLKPPCDLSMQSVEVAGSGGARRSALLDSDEPLVY FYDDVTTLYEGFQRGIQVSNNGPCLGSRKPDQPYEWLSYKQV AELSECIGSALIQKGFKTAPDQFIGIFAQNRPEWVIEEQGCFAYS MVIVPLYDTLGNEAITIYVNKAELSLVFVDKPEKAKLLLEGVE NKLIPGLKIIVVM DAYGSELVERGQRCGVEVTSMKAMEDLGR ANRRKPKPPAPEDLAVICFTSGTTGNPKGAMVTHRNIVSDCSA FVKATENTVNPCPDDTLISFLPLAHMFERVVECVMLCHGAKIG FFQGDIRLLMDDLKVLQPTVFPVVPRLNRMFDRIFGQANTTL KRWLLDFASKRKEAELRSGIIRNNSLWDRLLIFHKVQSSLGGRV RLMVTGAAPVSATVLTFLRAALGCQFYEGYGQTECTAGCCLT MPGDWTAGHVGAPMPCNLIKLV DVEEMNYMAAEGEGEVCV KGPNVFQGYLKDPAKTAEALDKDGLHTGDIGKWLPNGTLKI IDRKKHIFKLAQGEYIAPEKIENIYMRSEPVAQVFVHGESLQAF LIAIVVPDVETLCSWAQKRGFEFSFEELCRNKDVKKAILED MV RLGKDSGLKPFEQVKGITLHPELFSIDNGLLTPTMKAKRPELRN YFRSQIDDLYSTIKV
18	ADH1A	MSTAGKVIKCKAAVLWELKKPFSIEEVEVAPPKAHEVRIKMV AVGICGTDDHVVS GMTMTPLPVILGHEAAGIVESVGEGVTTVK PGDKVIPLAIPQCGKCRICKNPESNYCLKNDVSNPQGTLQDGT SRFTCRRKPIHHFLGISTFSQYTVVDENAVAKIDAASPLEKVCLI GCGFSTGYGSAVNVAKVTPGSTCAVFGLGGVGLSAIMGCKAA GAARIIAVDINKDKFAKAKELGATECINPQDYKKPIQEV LKEM TDGGVDFSFEVIGRLDTMMASLLCCHEACGTSVIVGVPPDSQN LSMNPMLLLTGRTWK GAILGGFKSKECVPKLVADFM AKKFSL DALITHVLPFEKINEGFDLLHSGKSIRTILMF
19	ADIPO	MLLLGAVLLLLALPGHDQETTTQGPGVLLPLPKGACTGWMA GIPGHPGHNGAPGRDGRDGTGPGEKGEKGD PGLIGPKGDIGETG

		VPGAEGPRGFPGIQGRKGEPGEGAYVYRSAFSVGLETYVTIPN MPIRFTKIFYNQNNHYDGSTGKFHCNIPGLYYFAYHITVYMKD VKVSLFKKDKAMLFTYDQYQENNVQDQASGSVLLHLEVGDQV WLQVYGEGERNGLYADNDNDSTFTGFLLYHDTN
20	ALDH2	MLRAAARFGPRLGRRLLSAAATQAVPAPNQPEVFCNQIFINN EWHDAVSRKTFPTVNPSTGEVICQVAEGDKEDVDKAVKAAR AAFQLGSPWRRMDASHRGRLNLRLADLIERDRTYLAALETLD NGKPYVISYLVLDLDMVLKCLRYYAGWADKYHGKTIPIDGDF SYTRHEPVGVCGQIIPWNFPLLMQAWKLGPALATGNVVVMK VAEQTPLTALYVANLIKEAGFPFVVNIVPGFGPTAGAAIASHE DVDKVAFTGSTEIGRVIQVAAGSSNLKRVTLLEGGKSPNIIMSD ADMDWAVEQAHFALFFNQGCCAGSRTFVQEDIYDEFVERS VARAKSRVVGPNPFDKTEQGPQVDETQFKKILGYINTGKQEG AKLLCGGGIAADRGYFIQPTVFGDVQDGMTIAKEEIFGPVMQI LKFKTIEEVVGRANNSTYGLAAAVFTKDLKANYLSQALQAG TVWVNCYDVFGAQSPFGGYKMSGSGRELGEYGLQAYTEVKT VTVKVPQKNS
21	CP2U1	MSSPGPSQPPAEDPPWPAPRLRLPLGLRLDPSGGALLLCGLV ALLGWSWLRRRRARGIPPPTWPLVGNFGHVLLPPFLRRRS WLSSRTRAAGIDPSVIGPQVLLAHLARVYGSIFSFFIGHYLVVV LSDFHSVREALVQQAQEVFSDRPRVPLISIVTKEKGVVFAHYGP VWRQQRKFSSHSTLRHFGLGKLSLEPKIIEEFKYVKAEMQKHGE DPFCPFSIISNAVSNIICSLCFGQRFDYTNSEFKKMLGFMSRGLE ICLNSQVLLVNICPWLYYLPFGPFKELRQIEKDITSFLKKIHKDH QESLDRENPDQFIDMYLLHMEERKNNSNSSFDEEYLFYIIGDL FIAGTDTTNSLLWCLLYMSLNPVQEKVHEEIERVIGANRAP SLTDKAQMPYTEATIMEVQRLTVVVPPLAIPHMTSENTVLQGYT IPKGTLILPNLWSVHRDPAIWEKPEDFYPNRFLDDQGQLIKKET FIPFGIGKRVCMEQQLAKMELFLMFVSLMQSFALPEDSKKP LLTGRFGLTLAPHPFNITISRR
22	DHB12	MESALPAAGFLYWVGAGTVAYLALRISYSLFTALRVWVGNE AGVGPGLGEWAVVTGSTDGIGKSYAEELAKHGMKVVLISRSK DKLDQVSSEIKEKFKVETRTIAVDFASEDIYDKIKTGLAGLEIGI

		LVNNVGMSY EYPEYFLDVPDLDNVIKKMININILSVCKMTQLV LPGMVERSKGAILNISSGSGMLPVPLLTIIYSATKTFVDFFSQCL HEEYRSKGVFVQSVLPYFVATKLAKIRKPTLDKPSPETFVKSAI KTVGLQSR TNGYLIHALMGSIISNLPSWIY LKIVMNMNKSTRA HYLKKTKKN
23	DHB8	MASQLQNRLRSALALVTGAGSGIGRAVS VRLAGEGATVAACD LDRAAAQETVRLLGGPGSKEGPPRGNHAAFQADVSEARAARC LLEQVQACFSRPPSVVVSCAGITQDEFL LHMSEDDWDKVI AVN LKG TFLVTQAAAQALVSNGCRGSIINISSIVGKVGNVGQTNYA ASKAGVIGLTQTAARELGRHGIRCNSVLP GFIA TPMTQKV PQK VVDKITEMIPMGHLGDPEDVADVVAFLASEDSGYITGTSVEVT GGLFM
24	ECHA, HADH, HADHA	MVACRAIGILSRFSAFRILRSRGYICRNFTGSSALLTRTHINYGV KGDVAVVRINSPNSKVNTLSKELHSEFSEVMNEIWASDQIRSA VLISSKPGCFIAGADINMLAACKTLQEVTQLS QEAQRIVEKLEK STKPIVAAINGSC LGGGLEVAISCQYRIATKDRKT VLGTP EVLL GALPGAGGTQRLPKMVGVPAA LDMMLTGRSIRADRAKKMGL VDQLVEPLGPGLKPPEERTIEYLEEVAITFAKGLADKKISPKRD KGLVEKLTAYAMTIPFVRQQVYKKVEEKVRKQTKGLYPAPLK IIDVVKTGIEQGS DAGYLCESQKFGELVMTKESKALMGLYHG QVLCKKNKFGAPQKDVKHLAILGAGLMGAGIAQVSVDKGLK TILKDATLTALDRGQQQVFKGLNDKVKKKALTSFERDSIFS NL TGQLDYQGFEKADMVIEAVFEDLSLKH RVLKEVEAVIPDH CIF ASNTSALPISEIAAVSKRPEKVIGMHYFSPVDKMQLLEIITTEKT SKDTSASAVAVGLKQGKVII VVKDGP GFYTTRCLAPMMSEVIR ILQEGVDPKKLDSLTT SFGFPVGAATLVDEVGVDVAKHVAED LGKVFGERFGGGNPELLTQMVS KGFLGRKSGKG FYIYQEGVK RKDLNSDMDSILASLKLPPKSEVSSDEDIQFRLVTRFVNEAVM CLQEGILATPAEGDIGAVFGLGFPPCLGGPFRFVDLYGAQKIVD RLKKYEAAYGKQFTPCQLLADHANS PNKKFYQ
25	ECHB, HADHB	MTILTYPFKNLPTASKWALRFSIRPLSCSSQLRAAPAVQTKTKK TLAKPNIRNVVVVDGVRTPFLLSGTSYKDLMPHDLARAALTG LLHRTSVPKEVVDYIIFGTVIQEVKTSNVAREAA LGAGFSDKTP

		AHTVTMACISANQAMTTGVGLIASGQCDVIVAGGVELMSDVP IRHSRKMRLMLDLNKA KSMGQRLSLISKFRFNFLAPELPAVS EFSTSETMGHSADRLAAAFVSRLEQDEYALRSHSLAKKAQD EGLLSDVVPFKVPGKDTVTKDNGIRPSSLEQMAKLPKPAFIKPY GTVTAANSSFLTDGASAMLIMAEKALAMGYKPKAYLRDFM YVSQDPKDQLLLGPTYATPKVLEKAGLTMNDIDAFEFHEAFSG QILANFKAMDSDWFAENYMGRKTKVGLPPLEKFNNWGGSL LGHPFGATGCRLVMAAANRLRKEGGQYGLVAACAAGGQGH AMIVEAYPK
26	ECHM, ECHS1	MAALRVLLSCVRGPLRPPVRCPAWRPFASGANFEYIIAEKRGK NNTVGLIQLNRPKALNALCDGLIDELNQALKTFEEDPAVGAIV LTGGDKAFAAGADIKEMQNLSFQDCYSSKFLKHWDHLTQVK KPVIAAVNGYAFGGGCELAMMCDIYAGEKAQFAQPEILIGTIP GAGGTQRLTRAVGKSLAMEMVLTGDRISAQDAKQAGLVSKIC PVETLVEEAIQCAEKIASNSKIVVAMAKESVNAAFEMTLTEGS KLEKKLFYSTFATDDRKEGMTAFVEKRKANFKDQ
27	ECHP, EHHAD H	MAEYTRLHNALALIRLRNPPVNAISTTLLRDIKEGLQKAVIDHT IKAIVICGAEGKFSAGADIRGFSAPRTFGLTLGHVVDEIQRNEK PVVAAIQGMAFGGGLELALGCHYRIAHAEAQVGLPEVTLGGL PGARGTQLLPRLTGVPAAALDLITSGRRILADEALKLGILDKVVN SDPVEEAIQFAQRVSDQPLESRRLCNKPIQSLPNMDSIFSEALLK MRRQHPGCLAQEACVRAVQAAVQYPYEVGKKEEELFLYLLQ SGQARALQYAFFAERKANKWSTPSGASWKTASARPVSSVGV VGLGTMGRGIVISFARARIPVIAVDSKDNQLATANKMITSVLE KEASKMQQSGHPWSPKPRLTSSVKELGGVDLVIEAVFEEMS LKKQVFAELSAVCKPEAFLCTNTSALDVDEIASSTDRPHLVIGT HFFSPAHVMMKLEVIPSYSSPTTIATVMNLSKKIKKIGVVGN CFGFVGNRMLNPYYNQAYFLLEEGSKPEEVDQVLEEFGFKMG PFRVSDLAGLDVGWKSARKGQGLTGPTLLPGTPARKRGNRRYC PIPDVLCGLGRFGQKTGKGWYQYDKPLGRIHKPDPWLSKFLSR YRKTHHIEPRTISQDEILERCLYSLINEAFRILGEGIAASPEHIDV VYLHGYGWPRHKGGMFYASTVGLPTVLEKLQKYRQNPDP QLEPSDYLKKLASQGNPPLKEWQSLAGSPSSKL

28	ELOVL2	MEHLKAFDDEINAFLDNMFGPRDSRVRGWFMLDSYLPFFLT VMYLLSIWLGNKYMKNRPALSLRGILTLYNLGITLLSAYMLAE LILSTWEGGYNLQCQDLTSAGEADIRVAKVLWWYYFSKSVEF LDTIFFVLRKKTTSQITFLHVVYHHASMFNIWWCVLNWIPCGQSF FGPTLNSFIHILMYSYYGLSVFPSMHKYLWWKKYLTQAQLVQ FVLTITHTMSAVVKPCGFPFGCLIFQSSYMLTLVILFLNFYVQT YRKKPMKKDMQEPPAGKEVKNGFSKAYFTAANGVMNKKAQ
29	FABP4	MCDAFVGTWKLVSSENFDYMKKEVGVGFATRQVAGMAKPN MIISVNGDVITIKSESTFKNTEISFILGQEFDEVTADDRKVKSTIT LDGGVLVHVQKWDGKSTTIKRKREDDKLVVECVMKGVSTR VYERA
30	FABP7	MVEAFCATWKLNSQNFDEYMKALGVGFATRQVGNVTKPTV IISQEGDKVVIRTLSTFKNTEISFQLGEEFDETTADDRNCKSVVS LDGDKLVHIQKWDGKETNFVREIKDGKMVMTLTFGDVVAVR HYEKA
31	FASN	MEEVVIAGMSGKLPESENLQEFWDNLIGGVDMVTDDDRWWK AGLYGLPRRSGKLKDLSRFDASFFGVHPKQAHTMDPQLRLLL EVTYEAIVDGGINPDSLRTHTGVWVGVSGETSEALSRDPET LVGYSMVGCQRAMMANRLSFFDFRGPISALDTACSSSLMAL QNAYQAIHSGQCPAAIVGGINVLLKPNTSVQFLRLGMLSPEGT CKAFDTAGNGYCRSEGVVAVLLTKKSLARRVYATILNAGTNT DGFKEQGVTFPSGDIQEQLIRSLYQSAGVAPESFEYIEAHGTGT KVGDPQELNGITRALCATRQEPLIGSTKSNMGHPEPASGLAA LAKVLLSLEHGLWAPNLHFHSPNPEIPALLDGRQLQVVDQPLPV RGGNVGINSFGFGGSNVHIILRPNTQPPPAPAPHATLPRLLRAS GRTPEAVQKLLEQGLRHSQDLAFLSMLNDIAAVPATAMPFRG YAVLGGGERGGPEVQQVPAGERPLWFICSGMGTQWRGMGLSL MRLDRFRDSILRSDEAVKPFGLKVSQLLLSTDESTFDDIVHSFV SLTAIQIGLIDLLSCMGLRPDGIVGHSLGEVACGYADGCLSQEE AVLAAYWRGQCIKEAHLPPGAMAAVGLSWECKQRCPPGVV PACHNSKDTVITISGPQAPVFEFVEQLRKEGVFAKEVRTGGMAF HSYFMEAIAPPLLQELKKVIREPKPRSARWLSTSIPEAQWHSSL ARTSSAEYNVNNLVSPVLFQEALWHVPEHAVVLEIAPHALLQ

	AVLKRGLKPSCTIIPLMKKDHRDNLEFFLAGIGRLHLSGIDANP NALFPPVEFPAPRGTPPLISPLIKWDHSLAWDVPAAEDFPNGSGS PSAAIYNIDTSSESPDHYLVDHTLDGRVLFPATGYLSIVWKT RALGLGVEQLPVVFEDVVLHQATILPKTGTVSLEVRLLLEASRA FEVSENGNLVVSGKVYQWDDPDPRLFDHPESPTPNPTEPLFLA QAEVYKELRLRGYDYGPHFQGILEASLEGDSGRLLWKDNWVS FMDTMLQMSILGSAKHGLYLPTRVTAIHIDPATHRQKLYTLQD KAQVADVVSRLRVTVAGGVHISGLHTESAPRRQQEQQVPI LEKFCFTPHTTEEGCLSERAAALQEELQLCKGLVQALQTKVTQQG LKMVVPGLDGAQIPRDPSSQQLPRLLSAACRLQLNGNLQLELA QVLAQERPCLKPEDPLLSGLLDSPALKACLDTAVENMPSLKM VVEVLAGHGHLYSRIPGLLSPHPLLQLSYTATDRHPQALEAAQ AELQQHDVAQGGWDPADPAPSALGSADLLVCNCAVAALGDP ASALSNMVAALREGGFLLLHTLLRGHPLGDIVAFLTSTEPQYG QGILSQDAWESLFSRVSLRLVGLKKSFYGSTLFLCRRPTPDSP IFLPVDDTSFRWVESLKGILADESSRPVWLKAINCATSGVVG LVNCLRREPGGNRLRCVLLSNLSSTSHVPEVDPGSAELQKVLQ GDLVMNVYRDGAWGAFRHFLLEEDKPEEPTAHAFVSTLTRG DLSSIRWVCSSLRHAQPTCPGAQLCTVYYASLNFRDIMLATGK LSPDAIPGKWTSQDSLLGMEFSGRDASGKRVMGLVPAKGLAT SVLLSPDFLWDVPSNWTLEEAASVPVVYSTAYYALVVRGRVR PGETLLIHSGSGGVGQAAIAIALSLGCRVFTTVGSAEKRAYLQA RFPQLDSTSFANSRDTSFEQHVLWHTGGKGVDLVLSLAEEK LQASVRCLATHGRFLEIGKFDLSQNHPLGMAIFLKNVTFHGV LDAFFNESSADWREWALVQAGIRDGVVRPLKCTVFHGAQV EDAFRYMAQGKHIGKVVVQVLAEPEAVLKGAKPKLMSAISK TFCPAHKSYIIAGGLGGFGLELAQWLIQRGVQKLVLTSGIRT GYQAKQVRRWRRQGVQVQVSTSNISSELEGARGLIAEAAQLGP VGGVFNLAVVLRDGLLENQTPEFFQDVCKPKYSGTLNLDRT REACPELDYFVVFSSVSCGRGNAGQSNGFANSAMERICEKR RHEGLPGLAVQWGAIGDVGILVETMSTNDTIVSGTLPQRMASC LEVLDLFLNQPHMVLSSFVLAEKAAAYRDRDSQRDLVEAVAH ILGIRDLAAVNLDSSLADLGLDSLMSVEVRQTLERELNLVLSV
--	--

		REVRQLTLRKLQELSSKADEASELACPTPKEDGLAQQQTQLNL RSLLVNPEGPTLMRLNSVQSSERPLFLVHPIEGSTTVFHSLASR LSIPTYGLQCTRAAPLDSIHSLAAYYIDCIRQVQPEGPYRVAGY SYGACVAFEMCSQLQAQQSPAPTHNSLFLFDGSPTYVLAYTQS YRAKLTPGCEAEAETEAIACFFVQQFTDMEHNRVLEALLPLKGL EERVAAAVDLIIKSHQGLDRQELSFAARSFYYKLRAAEQYTPK AKYHGNVMLLRAKTGGAYGEDLGADYNLSQVCDGKVSVHVI EGDHRTLLEGSGLESIISIIHSSLAEPVSVREG
32	FOXO3A	MAEAPASPAPLSPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQASP AKPSGETAADSMIPEEEDDEDDEDGGGRAGSAMAIGGGGGSG TLGSGLLLEDSARVLAPGGQDPGSGPATAAGGLSGGTQALLQ PQQPLPPPQPGAAGGSGQPRKCSSRNAWGNLSYADLITRAIE SSPDKRLTLSQIYEWVRCVPYFKDKGDSNSSAGWKNSIRHN LSLHSRFRMVQNEGTGKSSWWIINPDGGKSGKAPRRRAVSMD NSNKYTKSRGRAAKKKAALQTAPESADDSPSQLSKWPGSPTS RSSDELDAWTDFRSRTNSNASTVSGRLSPIMASTELDEVQDDD APLSPMLYSSSASLSPSVSKPCTVELPRLTDMAGTMNLNDGLT ENLMDDLNDNITLPPSQPSPTGGLMQRSSSFYTTKGSGLGSPT SSFNSTVFGPSSLNSLRQSPMQTIQENKPATFSSMSHYGNQTLQ DLLTSDSLSHSDVMMMTQSDPLMSQASTAVSAQNSRRNVMLRN DPMMSFAAQPNQGSLVNQNLLHHQHQTQGALGGSRALNSNV SNMGLSESSLGSAKHQQQSPVSQSMQTLSDSLSGSSLYSTSA NLPVMGHEKFPSDLDLDMFNGLSLECDMESIIRSELMDADGLDF NFDSLISTQNVVGLNVGNFTGAKQASSQSWVPG
33	HACD2	MAAVAATAAAKGNNGGGGGRAGAGDASGTRKKKGPGPLATA YLVIYNVVMTAGWLVIAVGLVRAYLAKGSYHSLYYSIEKPLK FFQTGALLEILHCAIGIVPSSVVLTSFQVMSRVFLIWA VTHSVK EVQSEDSVLLFVIAWTITEIIRYSFYTFSLNHLPLYLIKWARYTL FIVLYPMGVSGELTIYAALPFVRQAGLYSISLPNKYNFSFDYY AFLILIMISYIPIFPQLYFHMIHQRRKILSHTEEHKKFE
34	HCDH, HADH	MAFVTRQFMRSVSSSSTASASAKKIIIVKHVTVIGGGLMGAGIA QVAAATGHTVVLVDQTEDILAKSKKGIEESLRKVAKKKFAEN LKAGDEFVEKTLSTIATSTDAASVVHSTDLVVEAIVENLKVKN

		ELFKRLDKFAAEHTIFASNTSSLQITSIANATTRQDRFAGLHFFN PVPVMKLVEVIKTPMTSQKTFESLVDFSKALGKHPVSCKDTPG FIVNRLLPYLMEDIAIRLYERGDASKEDIDTAMKLGAGYPMGPF ELLDYVGLDTTKFIVDGVHEMDAENPLHQSPSLNKLVAENK FGKKTGEGFYKYK
35	LPIN1	MNYVGQLAGQVFVTVKELYKGLNPATLSGCIDIIVIRQPNGNL QCSPFHVRFGKMGVLREREKVVDIEINGESVDLHMKLGDNGE AFFVQETDNDQEVIPMHLATSPILSEGASRMECQLKRGSVDRM RGLDPSTPAQVIAPSETPSSSSVVKRRRKRKRKSSQLDSLKRDD NMNTSEDEDMFPIEMSSDEAMELLESSRTLNDIPPFQDDIPEE NLSLAVIYPQASYPNSDREWSPTSPSGSRPSTPKSDSELVSKS TERTGQKNPEMLWLWGELPQAAKSSSPHKMKESSPLSSRKIC DKSHFQAIHSESSDTFSDQSPTLVGGALLDQNKPQTEMQFVNE EDLETLGAAAPLLPMIEELKPPSASVVQTANKTDSRKRDRKR SRHLGADGVYLDLTDMDPEVAALYFPKNGDPSGLAKHASD NGARSANQSPQSVGSSGVDSGVSTSDGLRDLPSIAISLCGGLS DHREITKDAFLEQAVSYQQFVDNPAIIDDPNLVVKIGSKYYNW TTAAPLLLAMQAFQKPLPKATVESIMRDKMPKKGGRWWFSW RGRNTTIKEESKPEQCLAGKAHSTGEQPPQLSLATRVKHESSES DEERAAAKPSNAGHLPLLPNVSYKKTLRLTSEQLKSLKLKNGP NDVVFSVTTQYQGTCTCEGTIYLWNWDDKVIISDIDGTITRSD TLGHILPTLGKDWTHQGIKLYHKVSQNGYKFLYCSARAIGM ADMTRGYLHWVNERGTVLPQGPLLLSPSSLFSAHREVIEKKP EKFKVQCLTDIKNLFFPNTEPFYAAFGRNPADVSYKQVGVSL NRIFTVNPKGELVQEHAKTNISSYVRLCEVVDHVFPLLKRSHSS DFPCSDTFSNFTFWREPLPPFENQDIHSASA
36	MCAT	MADQPKPISPLKNLLAGGFGGVCLVVFVGHPLDTPVKVRLQTQP PSLPGQPPMYSGTFDCFRKTLFREGITGLYRGMAAPIIGVTPMF AVCFFGFGGLGKKLQQKHPEDVLSYPQLFAAGMLSGVFTTGIM TPGERIKCLLQIQASSGESKYTGTLDCAKKLYQEFGIRGIYKGT VLTLMRDVPASGMYFMTYEWLKNIFTPEGKRVSELSAPRILVA GGIAGIFNWAVAIPPDVLKSRFQTAPPGKYPNGFRDVLRELIRD EGVTSLYKGFNAVMIIRAFPANAACFLGFEVAMKFLNWATPNL

37	MECR	MWVCSTLWRVRTPARQWRGLLPASGCHGPAASSYSASAEPARVRALVYGGHHGDPKVVVELKNLELAAVRGSDVRVKMLAAPI NPSDINMIQGNYGFLPELPAVGGNEGVAQVVAVGSNVTGLKP GDWVIPANAGLGTWRTEAVFSEEALIQVPSDIPLQSAATLGVN PCTAYRMLMDFEQLQPGDSVIQNASNSGVGQAVIQIAAALGL RTINVVRDRPDQKLSDRKSLGAEHVITEEELRRPEMKNFFKD MPQPRLALNCVGGKSSTELLRQLARGGTMVITYGGMAKQPVV ASVSLLIKDLKLRGFWLSQWKKDHSPDQFKELILTLCDLIRRG QLTAPACSQVPLQDYQSALEASMKPFISSKQILTM
38	OXSM	MSNCLQNFLKITSTRLLCSRLCQQLRSKRKFFGTVPISRLHRRV VITGIGLVTPLGVGTHLVWDRDIGGESGIVSLVGEEYKSIPCSV AAYVPRGSDEGQFNEQNFVSKSDIKSMSSPTIMAIGAAELAMK DSGWHPQSEADQVATGVAIGMGMIPLEVVSETALNFQTKGYN KVSPFFVPKILVNMAAGQVSIRYKLKGPNHAVSTACTTGAHA VGDSFRFIAHGDADVMVAGGTDSCISPLSLAGFSRARALSTNS DPKLACRPFHPKRDGFVMGEGA AVL VLEEYEHAVQRRARIYA EVLGYGLSGDAGHITAPDPEGEGALRCMAAALKDAGVQPEEI SYINAHATSTPLGDAAENKAIKHLFKDHAYALAVSSTKGATG HLLGAAGAVEAAFTTLACYQKLPPTLNLDCSEPEFDLNYVPL KAQEWKTEKRFIGLTNSFGFGGTNATLCIAGL
39	PPARG	MGETLGDSPIDPESDSFTDTLSANISQEMTMVDTEMPFWPTNF GISSVDLSVMEDHSHSFDIKPFTTVDFSSISTPHYEDIPFTRTDPV VADYKYDLKLQEYQSAIKVEPASPPYYSEKTQLYNKPHEEPSN SLMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRRTIRLKLIDR CDLNCRIHKKSRNKCQYCRFQKCLAVGMSHNAIRFGRMPQAE KEKLLAEISSDIDQLNPESADLRALAKHLYDSYIKSFPLTKAKA RAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKE VAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLLKY GVHEIYTMLASLMNKDGVLISEGQGFMTREFLKSRLKPFQDF MEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVILSGDRPGLLNKPIED IQDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQ LLQVIKKTETDMSLHPLLQEIYKDLY

40	PPT1	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGM GDSCCNPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFF LNVNSQVTTVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQ RCPSPPMINLISVGGQHQG VFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAG AYSKVVQERLVQAEYWHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINE SYKKNLMAKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKET IPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHLQLSEEW YAHIPFLG
41	SAST	MERGDQPKRTRNENIFNCLYKNPEATFKLICFPWMGGGSTHF AKWGQDTHDLLEVHSLRLPGRESRVEEPLendisQLVDEVVC ALQPVIQDKPFAFFGHSMGSYIAFRTALGLKENNQPEPLHLFLS SATPVHSKAWHRIPKDDELSEEQISHYLMFEGGTPKHFAEAKE FVKQCSPHIRADLNIVRSCTSNVPSKAVLSCDLTCFVGSEDIKD MEAWKDVTSGNAKIYQLPGGHFYLLDPANEKLIKNIYIICLEV SSISNF
42	TECR	MKHYEVEILDAKTREKLCFLDKVEPHATIAEIKNLFTKTHPQW YPARQSLRLDPKGKSLKDEDVLQKLPVGTTATLYFRDLGAQIS WTVFLTEYAGPLFIYLLFYFRVPFIYGHKYDFTSSRHTVVHL ACICHSFHYIKRLLETFLVHRFSHGTMPLRNIFKNCTYYWGFA AWMAYYINHPLYTPPTYGAQQVKLALAIFVICQLGNFSIHMAL RDLRPAGSKTRKIPYPTKNPFTWLFLLVSCPNTYEVGSWIGF AIMTQCLPVALFSLVGFTQMTIWAKGKHRSYLKEFRDYPPLR MPIIPFLL