

ÖZET

Yağ asidi metabolizması yağ asidi sentezi (lipogenez), mitokondride gerçekleşen beta-oksidadasyon ve endoplazmik retikulumda gerçekleşen omega-oksidadasyon 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.