

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

BİYOİNFORMATİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROTEAZ İLE AKTİVE EDİLEN RESEPTÖR 1 (PAR1) ÜZERİNDEN ETKİLİ
ANTİKANSER BİLEŞİKLERİN MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMLERİ İLE
TASARIMLARI

Andry Nur Hidayat

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Esin Akı-Yalçın

Temmuz

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığıım, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Andry Nur Hidayat
İmzası

ONAY

Prof. Dr. Esin Akı-Yalçın danışmanlığında Andry Nur Hidayat tarafından hazırlanan bu çalışma 14/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Esin AKI-YALÇIN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Oya BOZDAĞ DÜNDAR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Erden BANOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Proteaz ile Aktive Edilen Reseptör-1 (PAR1) üzerinden Etkili Antikanser Bileşiklerin
Moleküler Modelleme Yöntemleri ile Tasarımları

Andry Nur Hidayat

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Esin Akı-Yalçın

Proteaz ile aktive edilen reseptör-1 (PAR1), başta Multipl Myelom olmak üzere çeşitli kanser türlerinde ve metastatik safhada umut verici bir hedef olarak saptanmıştır. PAR1'in çoğalma ve farklılaşma gibi çok sayıda hücre fenotipine neden olabileceği bulunmuştur. Kanserli hücrede PAR1 gen aşırı ekspresyonu ve β -katenin yüksek seviyeleri arasında güçlü bir bağ olduğu öne sürülmüştür. Çok merkezli retrospektif bir analizde antikoagülan amacıyla Heparin kullanan hastalarda Talidomidin anti-miyelom etkisinin arttığı 2015 yılında M. Bektaş ve ark. tarafından gösterilmiştir. Takiben Heparin'in etki mekanizmasında rol oynayan trombinin bağlandığı PAR1, Multipl Miyelom hasta hücrelerinde ve hücre dizilerinde saptanmış ve PAR1'e bağlanan daha önceden grubumuz tarafından sentezlenmiş bulunan benzoksazol ve benzamid türevlerinin PAR1'e bağlanmaları bu tez konusu olarak incelenmiştir. Bu moleküllerin önce Arkansas Üniversitesinde E.Tiang Laboratuvarında daha sonra Ankara üniversitesi Tıbbi Biyoloji ABD Laboratuvarlarında Sunguroğlu ve ark tarafından in vitro anti-miyelom etkileri duyarlı ve direnç geliştirilmiş hücre serilerinde gösterilmiştir. PAR1'e bağlanmalarına karşılık trombositler ve normal kemik iliği hücreleri üzerinde in vitro sitotoksikite oluşturmadıkları da saptanmıştır. Bu moleküller arasından IC₅₀ düzeyi en etkili olan iki molekül, XT5 ve XT2B daha sonra in silico ortamda DNA bağlanma, genotoksikite özellikleri açısından Multipl Miyeloma tedavisinde standart ilaçlar olan Talidomid ve Melfelan ile karşılaştırılmış ve sentezlenen moleküllerin standart ilaçlardan çok daha etkili bağlanma özelliği olduğu görülmüştür. Halen yayınlanmamış ön analizlerimiz bu daha önce hiç araştırılmamış benzoksazol ve benzamid derivesi olan ilaçların inflamasyon, apoptozis sinyal ileti yollarındaki birçok gen ifadesini de göstermiş bulunmaktadır.

Tüm bu bilgilerden yararlanarak, etki mekanizması aydınlatmak üzere, XT5 ve XT2B bileşiklerinin, bilinen PAR1 antagonistlerinin, bağlanma mekanizmaları ilaç tasarımı ve geliştirilmesinde kullanılan moleküler modelleme yöntemleri ile incelenmiştir. Bu amaçla Autodock Vina bilgisayar programı kullanılarak, bilinen PAR1 atagonistleri ile XT5 ve XT2B moleküllerinin karşılaştırmalı doking analizleri gerçekleştirilmiştir. Doking sonuçları, HYDE bağlanma değerlendirme ve Sinir Ağ (NN) puanlama fonksiyonu kullanılarak doğrulanmıştır.

2016, 100 Sayfa

Anahtar Kelimeler: antikanser, benzamid, benzoksazol, moleküler doking, PAR1 antagonisti

ABSTRACT

MSc Thesis

Design of Anticancer Active Compounds using Molecular Modelling on Protease Activated Receptor-1 (PAR1)

Andry Nur Hidayat

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Esin Akı-Yalçın, Ph.D.

Protease activated receptor-1 (PAR1), in various cancers and metastatic stages, especially in multiple myeloma disease has been identified as a promising target. PAR1 considered could lead to a numerous cell phenotypes specially proliferation and differentiation. Evidence suggested there is a strong link between PAR1 gene overexpression and high levels of β -catenin in cancer cells. Beksac and co-workers (2015) has been reported a multicenter retrospective analysis study that shown an increasing effect of anti-myeloma, talidomide in patients that also treated by anticoagulant heparin. The following mechanism of action of heparin that involved thrombin which bind to PAR1, was determined in multiple myeloma patient cells and cell lines. Also, some novel benzoxazole and benzamide derivatives that previously synthesized by our group which bind to PAR1 are investigated in this thesis study. According to an *in vitro* study, these compounds shown an anti-myeloma effects in a sensitive and enhanced resistant cell lines prior investigated by E. Tian's lab in Arkansas University and then by Sunguroglu and co-workers in biomedical lab in Ankara University. They also observed that there is not an *in vitro* cytotoxicity effect of these compounds against to PAR1 related to platelets and normal bone marrow cells. Related to their IC_{50} levels, among of these compounds, the most effective ones are XT5 and XT2B compounds which suggested has a DNA binding activities elucidated from *in silico* study. Also, the genotoxicity properties of this two compounds have been compared with known multiple myeloma standart drugs like thalidomide and melphalan, and this two synthesized compounds were found to be much more effective in their binding interaction than the standart drugs. Our unpublished preliminary analysis of this earlier uninvestigated benzoxazole and benzamide derivatives also has been demonstrated the numerous gene expression related to the drugs inflammation and apoptosis signalling pathways.

Using all those information, to elucidate its mechanism of action, the binding mechanisms of the XT5 and XT2B compounds and known PAR1 receptor antagonists were investigated by molecular modelling method that generally used in the drug design and development study. For this purpose, we used Autodock Vina program to performed a comparative docking study between known PAR1 antagonists and XT5 and XT2B compounds. In addition, the docking results, has been verified using HYDE binding assessment and Neural Network (NN) scoring function.

2016, 100 Pages

Keywords: anticancer, benzamide, benzoxazole, molecular docking, PAR1 antagonist

TEŞEKKÜR

Yeni ilaçların bulunmasında, yan etkilerinin ve toksik etkilerinin azaltılmasında, istenen farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerin belirlenmesinde bilgisayar destekli ilaç tasarım ve geliştirilmesi çalışmalarından (CADD) yararlanılmaktadır. Organizmanın yapısı ve ilaç molekülünün organizmadaki yolculuğunun karmaşıklığı göz önüne alındığında ve pek çok hastalığın nedenlerinin tam olarak açıklanamaması, ayrıca emek, zaman, yatırım maliyetlerinin çok fazla olması gibi nedenlerle rasyonel biçimde bilgisayar aracılığı ile ilaç tasarlama zorunluluğu doğmuştur. CADD, mevcut ilaçlara ve hastalıklara ait birikmiş bilgileri diğer sahalardaki disiplinlerarası verilerle kombine halde kullanarak ilaç geliştirme sürecini hızlandırmaktadır. Böylelikle; yeni terapötik etkili bileşiklerin tasarımı, sentez öncesi yeni biyoaktif moleküllerin etkisinin tahmin edilebilmesi mümkün olabilmektedir.

Türkiye'ye gelmeden önce bugünleri rüyamda bile görseydim inanmazdım. Benim elimden tutup buralara getiren, bilgilerini benden esirgemeyen, kendisinin ve çalışma grubunun sevgi dolu çemberine alan, bilimsel olarak günümüzün en ileri çalışmalarında beni kabul edip yer veren ve benimde bu tecrübeleri yaşamama izin veren, kelimelere dökemediğim dünyalar tatlısı, sevgili, saygılı Prof. Dr. Esin Akı hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın sırasında bana her zaman destek ve yardımlarını gördüğüm hocalarım Prof. Dr. İsmail Yalçın'a, ve bütün ESİS İlaç Araştırma-Geliştirme grubü üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, biyolojik etki çalışmalarını gerçekleştiren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesinden Sayın Prof. Dr. Meral Beksaç ve Sayın Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu ve ekibine teşekkür ederim.

Uzakta bile olsam her zaman yanımda yüreğimde hissettiğim, beni var eden ve bugünlere gelmeme sebep olan, en güzel ve kıymetli varlıklarım olan Annem (Nuraidah) ve Babam'a (Tryanto MS) ve canım kadeslerim Arif Rahman Hakim, Fatimah ve Permata Ramadhani'ye sonsuz teşekkür ederim. Özellikle, son zamanlarda dünyalar tatlısı destek ve ilham veren, hep yanımda bulunan sevgili eşim Fitriani Rajab'a teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELER	4
2.1. MULTİPL MİYELOMA GENEL BİLGİLERİ	4
2.2. PROTEAZ İLE AKTİVE EDİLEN RESEPTÖR-1 (PAR1)	6
2.2.1. PAR1 AKTİVASYON MEKANİZMASI	8
2.2.2. PAR1 ANTAGONİSTLERİ.....	9
2.3. BİLGİSAYAR DESTEKLİ İLAÇ TASARIMI (CADD)	11
2.4. MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMLERİ	14
2.4.1 HEDEFE DAYALI İLAÇ TASARIMI (SBDD)	18
2.4.2. LİGANT YAPIYA DAYALI İLAÇ TASARIMI (LBDD).....	35
2.5. BENZOKSAZOL BİLEŞİKLERİNİN BUGÜNE KADAR BULUNMUŞ ANTİKANSER ETKİ MEKANİZMALARI	41

3. GEREKCE VE AMAC	44
4. MATERYAL VE YÖNTEM	48
4.1. 3D PROTEİN VE LİGANT YAPILARININ ELDE EDİLMESİ.....	48
4.2. LİGANTLARIN FİZİKO-KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI	48
4.3. 3D PROTEİN VE LİGANT YAPILARINI HAZIRLANMASI	48
4.4. MOLEKÜLER DOKİNG UYGULANMASI VE ANALİZLERİ.....	50
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	52
5.1. LİGANTLARIN FİZİKO-KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI	52
5.2. MOLEKÜLER DOKİNG HESAPLANMASI	52
5.3. NN (<i>NEURAL NETWORK</i>) SKORLAMA FONKSİYONU HESAPLANMASI.....	59
5.4. SERBEST ENERJİLERİN HESAPLANMASI.....	59
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	60
6.1. TARTIŞMA.....	60
6.1.1. LİGANTLARIN FİZİKO-KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI	61
6.1.2. AUTODOCK VİNA İLE MOLEKÜLER DOKİNG HESAPLANMASI.....	61
6.1.3. MOLEKÜLER DOKİNG ANALİZLERİ: NNSCORE PUANLANMASI	64
6.1.4. MOLEKÜLER DOKİNG ANALİZLERİ: SERBEST ENERJİ HESAPLANMASI	65
6.2. SONUÇ	66
7. KAYNAKLAR	67
8. EKLER	84
9. ÖZGEÇMİŞ	85
10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PAR1'in yapısının şematik gösterimi (26).....	6
Şekil 2.2. PAR1 aktivasyon mekanizması (37).....	8
Şekil 2.3. Vorapaksar (6).....	9
Şekil 2.4. Atopaksar (7).....	11
Şekil 2.5. İlaç keşfinde kemoinformatik ve biyoinformatik arasındaki ilişkiler (57).....	14
Şekil 2.6. <i>In silico</i> rasyonel ilaç tasarım yöntemleri (63).....	16
Şekil 2.7. Moleküler modelleme yöntemleri kullanılarak geliştirilmiş ilaç molekülleri.....	17
Şekil 2.8. Hedefe dayalı ilaç tasarım (SBBD) yöntemleri (96).....	18
Şekil 2.9. Moleküler doking sürecinin özeti (96).....	19
Şekil 2.10. Denge şartları altında enzim ve inhibitörü bağlanması.....	20
Şekil 2.11. Konformasyonel arama yöntemleri (96).....	23
Şekil 2.12. Hedefe dayalı (SBVS) ve ligant yapılarına dayalı (LBVS) sanal tarama yaklaşımları (96).....	32
Şekil 2.13. Benzoksazol (a), Adenin (b) ve Guanin (c) genel formülleri.....	41
Şekil 2.14. XT2B ve XT5 bileşiklerin formülü.....	43
Şekil 4.1. İnsan PAR1 proteini ile vorapaksar bağlanma etkileşimleri.....	54
Şekil 4.2. Moleküler doking çalışmalarında oluşturulan bağlanma yöresi.....	51
Şekil 5.1. PAR1 için yapılan yinelenen moleküler doking sonucu.....	53
Şekil 5.2. Vorapaksar ile PAR1 arasında etkileşimler.....	54
Şekil 5.3. Atopaksar ile PAR1 arasında etkileşimler.....	55
Şekil 5.4. Artesunat ile PAR1 arasında etkileşimler.....	56
Şekil 5.5. XT2B ile PAR1 arasında etkileşimler.....	57
Şekil 5.6. XT5 ile PAR1 arasında etkileşimler.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Moleküler doking kategorileri.....	21
Çizelge 2.2. Konformasyonel arama algoritması örnekleri (96)	26
Çizelge 2.3. Yaygın olarak uygulanan puanlama fonksiyonları örnekleri (96).....	29
Çizelge 2.4. Sanal tarama yöntemlerinde kullanılan veritabanları (96)	33
Çizelge 2.5. SBVS yöntemlerindeki grafiksel ve doking sonucu görselleştirme yazılımları (96)	34
Çizelge 2.6. Yaygın olarak kullanılan moleküler tanımlayıcıların tahmin programları (96)	36
Çizelge 2.7. Farmakofor oluşturmak için kullanılan programlar (96).....	36
Çizelge 4.1. PAR1'e karşı yapılan moleküler doking ligantların yapısı	49
Çizelge 5.1. Ligantların ait fiziko-kimyasal özellikleri.....	52
Çizelge 5.2. Autodock Vina programı kullanılarak PAR1 için doking sonuçları	53
Çizelge 5.3. NN Score tarafından sağlanan K_d tahmini (ayrışma sabiti) ve yeniden doking skorum değerleri	59
Çizelge 5.3. HYDE programı kullanarak serbest enerji tahmini	59

SİMGELER DİZİNİ

2D	İki boyutlu
3D	Üç boyutlu
ABNR	Adopted-Basis Newton-Raphson
ADME	Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon
AlogP	Lipofilisite
CADD	Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
CHARMM	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics
CoMFA	Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizleri Yöntemi
CoMSIA	Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizleri Yöntemi
CNV	Kopya Sayısı Varyantları
CPK	Corey-Pauling-Koltun modeli
DNA	Deoksiribonükleik asit
HA	Hidrojen bağ akseptörü
HD	Hidrojen bağ verici
IC ₅₀	İnhibitör konsantrasyonu
EC ₅₀	Etkin konsantrasyonu
F2R	Pıhtılaşma Faktörü II
GPCR	G-proteinine bağlı reseptörler
LE	Ligant verimliliği
M Protein	Monoklonal Proteini
MM	Multipl Miyelom
MGUS	Anlamı Belirsiz Monoklonal Gamopati
MW	Moleküler ağırlığı
PAR	Proteaz ile Aktive Edilen Reseptör
PAR1	Proteaz ile Aktive Edilen Reseptör-1
PSA	Moleküler Polar Yüzey Alanı
RNA	Ribonükleik asit
ROTB	Dönebilen bağların sayısı
RMSD	Karesel Ortalama Değer Sapması
TM	Transmembran
QSAR	Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri

1. GİRİŞ

Kanser gelişmiş ülkelerde önde gelen ve gelişmekte olan ülkelerde ise ikinci sırada gelen ölüm nedenidir (1). Kanser tedavisinde, cerrahi rezeksiyon iyileştirici olmasına rağmen, nüks riski çok yüksektir. Kanser tedavisinde cerrahi rezeksiyonun yanı sıra, yüksek riskli hastalar için temel tedavi yöntemi, kemoterapötik ajanı tek başına ya da radyoterapi ile kombinasyon halinde, gerekli hallerde de kemoterapötik ilacı neoadjuvan olarak kullanmaktır. Tüm bu yöntemlere rağmen, yukarıdaki standart tedavi protokollerinin kullanımı hala yeteri kadar başarılı olamamaktadır. Bu nedenle de, kanser tedavisinde yeni kullanılabilecek etkin kemoterapötik maddelere gereksinim bulunmaktadır (2).

Multipl miyeloma kemik iliğinde bulunan plazma hücrelerinde oluşan bir kanser türüdür. Başlangıçta birçok kemoterapötik ajana duyarlı olsa da, multipl miyelomlu hastalarda sıklıkla, birden fazla ilaca direnç gelişmekte ve hastalık durumu tekrarlanabilmektedir (3). Gen kopya sayısı varyantları (CNV), özellikle zarda bulunan reseptör proteinlerini kodlayan genlerle ilgilidir ve hastalıkların teşhisinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmalarda elde edilen önemli bulgulardan biri genlerin amplifikasyon ve aşırı ekspresyonudur. Proteaz ile Aktive edilen Reseptör-1 (PAR1) genleri trombinin aracılığı ile aşırı eksprese olur ve multipl miyelom hastalığının patogeneze katkıda bulunur. Bu nedenle, PAR1 multipl miyelom hastalığında önemli bir terapötik hedef olmuştur. Kanser hücrelerini ve tedavisini belirlemede CNV kullanılması ile ilgili patent dahi alınmıştır (4).

Aynı zamanda, trombin reseptörleri olarak da bilinen Proteaz ile Aktive edilen Reseptörler, serin proteaz ile N-terminalin ayrılmasını sağlayarak, G-proteinin aktive olmasına neden olurlar. Bu nedenle PAR aynı zamanda G-proteinine bağlı reseptörler olarak da bilinir. Reseptörlerinin dört alt tipi (PAR1-4) bulunmaktadır. Pıhtılaşma faktörü II (F2R) olarak bilinen PAR1, bu reseptör ailesinin en karakterize üyesidir ve endojen serin proteaz trombin tarafından aktive edilir (5). Trombin-aracılı aktivasyon PAR1 platelet agregasyonuna neden olur. Son yıllarda PAR reseptörleri, özellikle PAR1 gerek kanserde, gerekse de kalp damar, kas-iskelet sistemi, gastrointestinal sistem, solunum ve merkezi sinir sistem bozukluklarında yeni terapötik maddelerin geliştirilmesi için önemli bir hedef haline gelmiştir (4).

PAR1'i inhibe etmek için yapılan çalışmalarda, trombini ya da PAR1'i doğrudan inhibe eden antagonist yapılar üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Klinik aşamaya ulaşmış en ileri antagonist yapıları Varopaksar (SCH 530348) ve Atopaksardır (E-5555).

Vorapaksar (SCH 530348) klinikte kullanılmakta olup, aspirin ve klopidogrel ile birlikte alındığı zaman beyinde kanama riskini arttırmaktadır (6). Atopaksar (E-5555) PAR1 inhibitörü ve faz 2 aşamasında denemeleri yapılmaktadır (7).

Kanser hastalıklarında mevcut ilaçların çoğunlukla toksik olmaları ve ilaç direnci gibi sorunlarla karşı karşıya gelmeleri nedeniyle, kanser hastalıkları için yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesi önem arz etmektedir. Araştırmalar, bazı heterosiklik çekirdek taşıyan yapıların oldukça güçlü antienflamatuvar (8), antimikrobiyel (9,10), antifungal (11), antiviral (12), antineoplastik (13), antitümör (14) aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir. Benzoksazol ve analogları üzerinde de değişik mekanizmalara dayalı antikanser etki çalışmaları süregelmektedir. Ayrıca, benzamid ve fenilasetamid türevleri üzerinde de benzer çalışmalar mevcuttur.

Bazı antitümör ilaçların DNA topoizomera I ve II'yi inhibe ettiklerinin tespit edilmesi ile birlikte bu enzimin inhibisyonu üzerine günümüzde artan sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında bir grup araştırmacı DNA-Topoizomera I ve II'ye karşı etkili yeni bazı heterosiklik yapıdaki bileşikler araştırma-geliştirme çalışmalarını yürütmektedir. 2004 ve 2007 yıllarında Akı-Yalçın, E. ve Yalçın, İ. ve grubu tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, sentezlenen orjinal bazı bileşiklerin DNA topoizomera I ve II enzimlerine karşı inhibitör etkinlikleri incelenmiş ve bu bileşiklerden bazılarının standart olarak kullanılan ilaçlardan daha etkili olduğu saptanmıştır.

Pınar ve ark (2004) yaptıkları çalışmada, 37 adet 2,5,6-trisüstitüe benzoksazol, benzimidazol, benzotiyazol ve oksazolo(4,5-*b*)piridin türevi bileşiğin, topoizomera II enzimi inhibisyonu etkilerini incelemişlerdir. Bu bileşikler içerisinde 2-fenoksimetilbenzotiyazol, 2-(2-metoksifenil)-6-nitro benzoksazol, 2-(feniltiyometil)-5-(metilkarboksilat)benzimidazol ve 6-metil-2-(2-nitrofenil)benzoksazol bileşiklerinin referans ilaç etopositten daha etkili olduğu saptanmıştır (15).

2005 yılında Yalçın ve ark tarafından yayımlanmış bir çalışmada, bazı benzazol ve benzoksazin türevlerinin L5718, insan MDR-1 geni içeren sıçan lenfoma hücre kültürleri

üzerinde apoptozun inhibisyonu ve indüksiyonu araştırılmış ve kayda değer sonuçlara ulaşılmıştır. Bu çalışmaya göre, 5-(*p*-nitrobenzamido)-2-benzilbenzoksazol, 6-metil-2-(*o*-klorofenil)benzoksazol ve 5-(*p*-nitrofenoksiasetamido)-2-fenilbenzoksazol bileşikleri sıçan lenfoma hücresinde apoptotik etkiyi artırmak suretiyle etki göstermiştir. Ayrıca ilk iki bileşik ile birlikte 5-(2-tienilkarboksamido)-2-fenilbenzoksazol bileşiği 12*H*-benzo(a)fenotiyazin bileşiğinin apoptotik etkisini artırmaya yardımcı olduğu ortaya konmuştur (16).

2006 yılında Aki-Sener ve ark tarafından yapılan başka bir çalışmada 2-(*p*-klorofenil)-5-süstitüefenilkarboksamido-benzoksazol yapılarının ilaçlara dirençli mide kanserinden türevlendirilmiş EPG85-257RNOV ve EPG85-257RDB alt türlerine, pankreas kanserinden türevlendirilmiş EPP85-181RNOV ve EPP85-181RDB alt türlerine, göğüs kanserinden türevlendirilmiş MCF-7/Adr alt tipine, fibrosarkomadan türevlendirilmiş D79/86RNOV alt tipine ve melanomadan türevlendirilmiş MeWoETO1 alt tipine karşı güçlü antineoplastik etki gösterdikleri saptanmıştır. Bu çalışmada özellikle 5-(2-tiyenil)karboksamido-2-fenilbenzoksazol bileşiği göğüs kanserinden türevlendirilmiş MDA-MB-231ROV alt tipine karşı en yüksek antineoplastik etkiyi gösterdiği bildirilmiştir (13).

2009 yılında ise 5-etilsülfonil-2-(*p*-nitrofenil)benzoksazol bileşiği ilaçlara dirençli tümör hücrelerinde ve bakterilerde süstitüe disiloksan bileşiklerinin apoptotik etkisini arttırıcı etkisi ile patent almıştır (17).

Ayrıca 2013 yılında Aliabadi ve ark. tarafından, 2-(4-florofenil)-*N*-fenilasetamid türevlerinin, özellikle PC3 (prostat karsinomu) hücre panelline karşı kuvvetli antikanser etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (18).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, danışmanım Prof. Dr. Esin Akı-Yalçın ve grubu tarafından sentezleri gerçekleştirilmiş olan bazı benzazol, benzamit-fenilasetamit türevlerinin PAR1'e karşı etkileri kemoinformatik ve biyoinformatik verilerden yararlanılarak ve *in silico* olarak Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD) yöntemleri kullanılarak antikanser etkileri incelenmiştir. Ayrıca, moleküler modelleme tekniklerinden moleküler doking kullanılarak daha etkili olabilecek yeni önder bileşiklerin rasyonel olarak tasarlanması ve önermeleri gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELER

2.1. MULTİPL MİYELOMA GENEL BİLGİLERİ

Multipl miyeloma (MM), plazma hücrelerinde meydana gelen bir kanser çeşitidir. Plazma hücreleri normal olarak antikorları salgılayan bir lökosit (beyaz kan) hücre türüdür. Ayrıca, bu hücreler, organizmanın bağışıklık sisteminde çok önemli rol oynamaktadır. Kanser halindeyken, birçok anormal plazma hücreleri, kemik iliğinde bir araya gelerek kümelenmektedir. Bu oluşturulan birikim, normal kan hücreleri ve normal antikorlara yer bırakmaz ve üretilmelerini engeller. Multipl miyeloma vakalarının çoğunda anormal antikor üretimini söz konusudur. Bu üretilen anormal antikor, paraprotein veya M proteini olarak bilinen ve faydalı bir işlevi olmayan tek bir antikor tipidir. Miyelomanın teşhisi ve izleminde sıklıkla bu paraproteinin ölçümünden yararlanılmaktadır. Ayrıca, miyeloma hücre grupları, kemiğin katı kısmının kemik iliğindeki diğer hücreler tarafından ortadan kaldırılmasına ve osteolitik lezyonların veya kemikte yumuşak noktaların oluşmasına neden olur (19).

Kemik iliği vücuttaki büyük kemiklerin içinde, merkezde bulunan dokudur. Kemik iliği plazma hücrelerini barındırmanın yanı sıra kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit ve trombositler) periyodik olarak yaşam boyu üretildiği merkezdir. Miyeloma'da plazma hücrelerinin DNA'sı hasarlanarak habis veya kanserli hale gelmelerine yol açmaktadır. Bu anormal plazma hücreleri miyeloma hücreleri olarak bilinmektedir. Birçok kanserin aksine, miyelom bir kitle veya tümör halinde bulunmaz. Bunun yerine, miyelom hücreleri kemik iliği içinde normal olarak bölünmeye ve çoğalmaya devam etmektedir. Miyelom, kemik iliğinin yetişkinlerde normal olarak aktif olduğu bölgeleri, yani omurga, kafatası, pelvis (leğen kemiği), göğüs kafesi, omuzlar ve kalçalar çevresindeki birçok alanda oluşur ve bu yüzden multiple miyelom olarak adlandırılır (20).

Multipl miyelom bulaşıcı bir hastalık değildir fakat araştırmalar belirli risk faktörlerinin kişilerde hastalık gelişme riskini artırdığını göstermektedir. Bu hastalık ileri yaşlarda görülmekte ve birçok kişide 65 yaşından sonra teşhis edilmektedir (21). Multipl miyelom riski Afrika kökenli Amerikalılarda en yüksek olup Asya kökenli Amerikalılarda en düşük seviyededir. ABD yapılan istatistiklere göre, erkeklerde hastalığın görülme olasılığı daha fazladır. Anlamı belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) semptomuna sahip olan kişilerde multipl miyelom gibi belirli kanserlerin gelişmesinde yüksek risk görülmektedir (22).

Multipl miyelom birden fazla semptomla neden olabilmektedir. En sık rastlanan semptom, miyelom hücrelerinin kemik iliğindeki ilerleyici kümelenmesi olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bu hastalık normal kemik iliği fonksiyonunu bozarak, sıklıkla aneminin (kan akımında eritrositin düşük düzeyde olması) ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra, monoklonal protein (M protein) denilen anormal bir proteinin kan dolaşımına salınması, normal immünoglobulin düzeylerinin azalması ve enfeksiyona yatkınlığın artması, normal immün sisteminin baskılanması, böbrek hastalığı oluşturulması, çevreleyen kemikte hasar ve hiperkalsemi (kan akımında kalsiyum yüksek düzeyde olması) oluşması gibi semptomlarla sık sık karşılaşmaktadır (23).

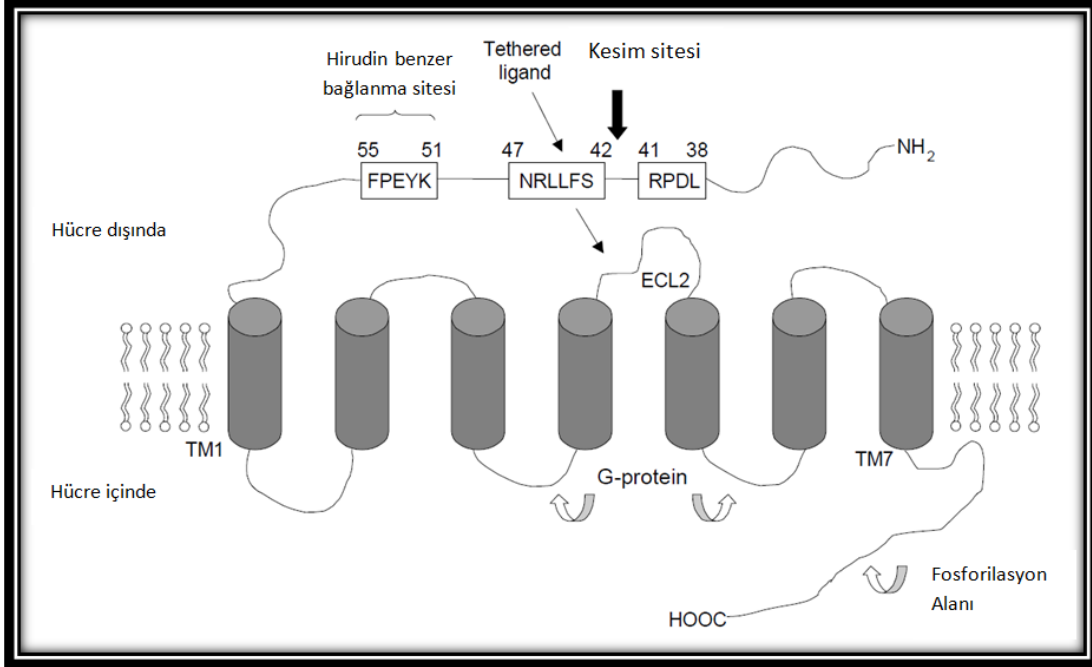
Multipl miyelom kan testleri, kemik iliği incelemesi, idrar protein elektroforezi ve sıklıkla görülen kemik tutulması için X-ışınları yöntemleri kullanılarak teşhis edilmektedir (24). Tedavide her ne kadar klinik revizyon elde edilse de, fakat miyelom tümör hücrelerinin tekrarı hala uzun süreli sağkalım için engel oluşturmaktadır. Kötü prognoz sık sık önemli sitogenetik anomaliler ve nüks aşamalarında artan ilaç direnci ile ilişkilidir (4).

Çoklu multipl miyelom hücreleri ile kemik iliği destek doku hücreleri arasında veya multipl miyelom hücreleri ile hücre dışı matris proteinleri arasında bulunan doğrudan etkileşimler için, hücredeki yüzeydeki reseptörler aracılık etmektedir. Bu yüzey reseptörleri, integrinler, kaderinler, selektinler, sindekanlar ve hücre yapışmasını sağlayan molekülleri immünoglobülin üst ailesi gibi multipl miyelom hücreleri ile etkileşmektedir. Bu etkileşimlerin her iki tip doğrudan, multipl miyelom hücrelerinin büyümesini, hayatta kalmasını, göçme kabiliyetini ve ilaç direncini artırmaktadır (4).

Multipl miyelom kök hücreleri, multipl miyelom hücrelerinin çok küçük bir alt kümesidir. Bu hücreler osteoblastik veya endotelial dokularında bulunmaktadır ve kendi kendini yenileyip farklılaşabilmektedirler. Miyelom kök hücreleri, CD138⁻ / CD20⁺ / CD27⁺ fenotip ile bulunan B hücrelerinin bir alt grubu olarak bilinmektedir. Bu hücrelere, çoğunluğu terminal olarak farklılaşmış miyelom hücreleri eşlik etmektedir. CD138⁺ / CD19⁻ miyeloma hücrelerinin büyük bir kısmını tüketerek, CD138⁻ / CD19⁺ hücrelerinin az sayıda kalmasına neden olur. Bu hücreler yüksek verimlilikle çoğalırlar, hem *in vitro*, hem de *in vivo* olarak güçlü bir CD138 ifadesi (CD138⁺⁺) ile yeni bir döl meydana getirirler. Buna karşı, terminal olarak farklılaşmış CD138⁺⁺ miyelom hücreleri yeniden büyüme için hiçbir klonal potansiyeli bulunmamaktadır. Bununla birlikte, tamamen farklılaşmış yeni nesil için miyelom kök hücrelerinin gelişim yolu hala bilinmemektedir;

daha ilginç olan, *in vitro* olarak miyelom hücre olgunlaşma mekanizması da açıklanamamıştır (25).

2.2. PROTEAZ İLE AKTİVE EDİLEN RESEPTÖR-1 (PAR1)



Şekil 2.1. PAR1'in yapısının şematik gösterimi (26)

G-proteinlerine kenetli reseptörler (GPCR) ailesi, sinyal moleküllerinin en büyük ve çeşitli işlevsel grubunu oluşturmaktadır. Bu reseptörler, biyolojik süreçlerin çoğunun düzenlenmesinde temel rol oynamakta ve kanser gibi hastalıklarda önemi büyüktür. GPCR'lerin, peptid, lipid ve iyonlar olarak bilinen agonistleri ile, çeşitli etkileşimleri bulunmaktadır. Proteazlar, GPCRs proteininin en dikkat çekici agonistleri olarak bilinmektedir (27).

Proteazlar, tümör hücre istilasını ve metastazını kolaylaştırırlar (28,29). PAR, GPCR reseptörleri olarak hücre fonksiyonlarını kontrol eden sinyal molekülleri olarak bilinmekte ve proteaz tarafından enzimatik proteoliz yolu ile aktive edilmektedir (30,31). Bu proteolitik bölünmeye, aktif bölgede serin ile serin proteaz enzimi aracılık etmektedir. Serin proteazlar, özellikle pıhtı oluşumu ve yara iyileşmesi için önemlidir. Trombin de en bilinen serin proteazlardan biridir.

PAR'ın, dört alt tipi (PAR1-4) mevcuttur ve bunlar keşif sırasıyla klonlanmış ve isimlendirilmiştir. Bunların hepsi aynı temel aktivasyon mekanizmasına sahiptir. Şöyle ki;

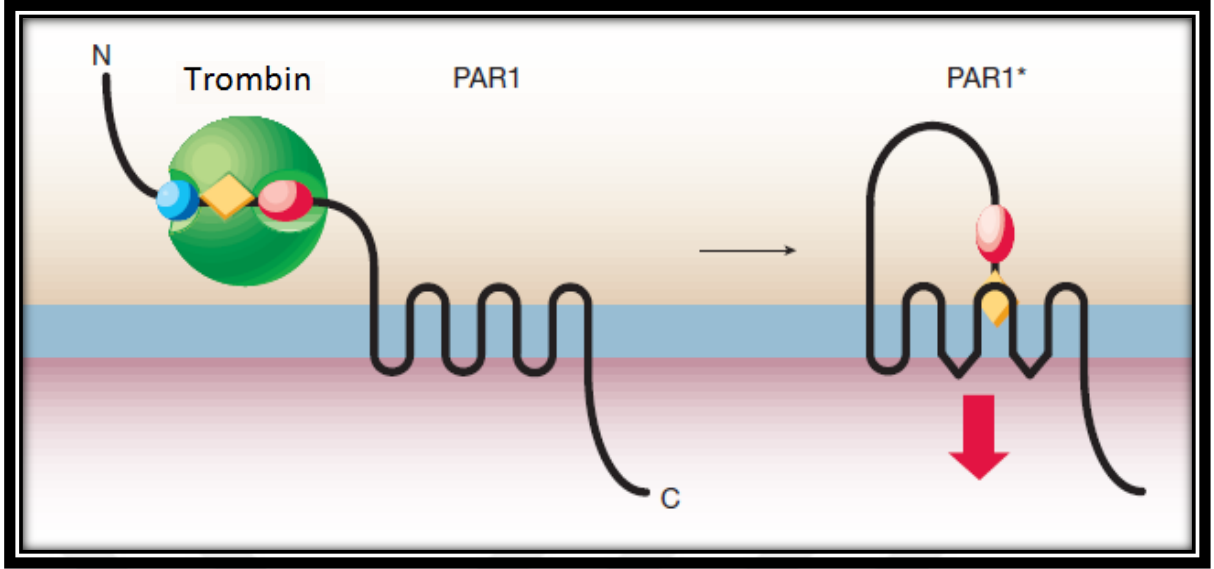
Proteazlar, PAR'ın hücre dışı bölümünün N-terminal ucunda belirli bir noktadan keser. Bunun sonucunda, *'tethered ligand'* veya bağlı bir ligant olarak yeni bir fonksiyona sahip olur ve reseptöre bağlanarak aktive eder. Bu nedenle PAR reseptörleri kendi ligantını taşıyan bir peptid yapılı reseptör olarak görülebilir. Erişkin memelilerde, PAR'ın dört alt tipinin de, doku hasarı, aktif pıhtılaşma, proteaz lokal üretimi ve hücrel tepkilerle (hemostaz, tromboz, enflamasyon ve doku onarımı gibi) bağlantılı olduğu görülmektedir (32). PAR reseptörleri ayrıca belirli kanserlerin ilerlemesinde de katkı sağlayabilir (33,34).

PAR ailesinde, pıhtılaşma faktörü II (F2R) olarak bilinen PAR1 (Şekil 2.1.), endojen serin proteaz trombin tarafından aktive edilmektedir. Trombin-aracılı aktivasyon PAR1 platelet agregasyonuna neden olur (35).

PAR1, *Xenopus oosit*lerde insan ve hamster trombinine yanıt veren hücrelerde, RNA ifade stratejisi kullanılarak iki ayrı laboratuvar tarafından klonlanmıştır. Klonlar, 7 hidrofobik etki alanları ile 425 kalıntılı bir protein üzerinden kodlanmış ve tipik bir GPCR proteini olduğu tespit edilmiştir (36,37).

PAR1 yedi transmembrandan oluşan, trombin tarafından primer olarak kesilen G-proteinine bağlı bir reseptördür. Reseptörün yeni N terminali, reseptörün proteolitik aktivitesinden sonra meydana gelir ve böylelikle intraselüler sinyal olayları başlar (38). PAR'ın trombin tarafından kesilmesi, LDPR⁴¹↓S⁴²FLLRN aminoasit dizisinden gerçekleştirilmektedir. LDPR tetrapeptidi ayrıldıktan sonra, SFLLRN dizisinden ekstrasellüler bölgeye bağlı kalarak reseptörü aktive eder ve sinyal iletim mekanizmasına yol açar. Mekanizmanın bu şekilde işlediğine dair değişik çalışmalar yayınlanmıştır. Bunlardan birinde, kesilme bölgesinde *site directed mutagenesis* ile oluşturulan mutasyonlar sayesinde, trombin kesimi görülmemiş ve sinyal iletiminin oluşmadığı gözlenmiştir (37). Diğer bir çalışmada, trombin kesim dizisi yerine, barsaklarda tripsinojeni tripsine çeviren bir enzim olan enterokinazın kesim dizisi mutasyonu sonucunda, trombin değil enterokinazı kestiği saptanmıştır (37). Üçüncü çalışmada da ligantın bağlanma alanını taklit eden sentetik peptidler kullanılarak (SFLLRN) PAR1'in aktive edilmesi gözlenmiştir (39).

2.2.1. PAR1 AKTİVASYON MEKANİZMASI



Şekil 2.2. PAR1 aktivasyon mekanizması (37)

Trombinin, proteaz enzimi ile etkileşmesinde, hem N-terminal, hem de C-terminal bölgesi kullanılmaktadır. Hirudin benzeri bağlama alanı, C terminal bölgesine denk gelmektedir. Trombin, reseptörün Arg 41 ve Ser 42 amino asit kalıntıları arasında bulunan peptid bağı kırarak kesmektedir. Bu durumdan dolayı, yeni N-terminali 'SFLLRN' amino asit dizileri olmaktadır ve bağlı bir ligant meydana gelmektedir. Bu ligant, PAR1 ile intramoleküler bir bağ oluşturmakta ve böylece transmembran sinyaline neden olmaktadır. Kısaca, PAR1 kendi ligantını taşıyan bir reseptördür ve reseptör bölünmeden sonra aktif hale geçmektedir (Şekil 2.2.) (40).

Burada SFLLRN peptidi, reseptörün aktive edilmesinde bir agonist olarak işlev görür. Genel olarak PAR agonistlerinin EC_{50} değeri 3-10 mM aralığında iken doğal olan agonist SFLLRN peptidinin EC_{50} değeri daha düşüktür ve yaklaşık 0,4 mM olarak bulunmuştur (5).

PAR1 kanser türlerini de içeren birçok hastalıkta umut verici bir hedef olarak tanımlanmıştır. Göğüs kanseri (41), kolon kanseri (42) ve prostat kanseri (43) gibi birçok kanser vakasında bu protein türünün giderek arttığı belirlenmiştir. PAR1 mekanizmasının kanser vakalarındaki rolünün tam olarak anlaşılmasına rağmen deneysel bulgular PAR1'in multipl miyelom (MM) durumunda (3) çoğalma ve başkalaşma yollarıyla birçok hücre fenotipini oluşturabildiğini göstermektedir. PAR1'in ifadesindeki artışın kötü huylu fenotiple ilişkili olduğu tespit edilmiş ve göğüs, kolon, böbrek kanserleri, pulmoner tümör

ve hepatosellüler karsinom gibi çeşitli kanser türlerindeki rolü kanıtlanmıştır (27). Yayılmacı ve metastatik tümörlerde PAR1 ifadesinin arttığı gözlenmiş ve ilginç bir şekilde ifade seviyelerinin kanserin yayılmacı karakterinin derecesiyle doğrudan ilişki olduğu görülmüştür (33,44).

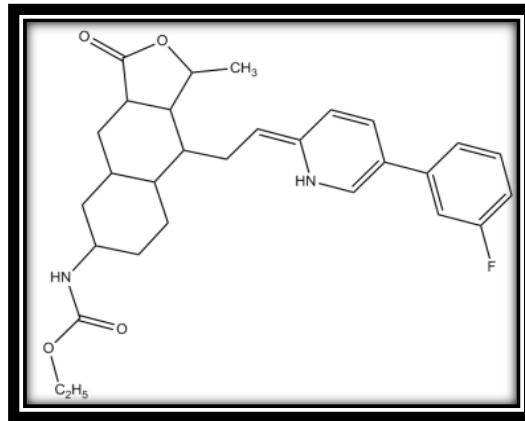
PAR1 geninin diğerlerine göre daha çok okunması ile yüksek seviyedeki β -katenin arasındaki güçlü ilişki, kanser vakalarında β -katenin sabitlemesinde bulunan PAR1–G α (13)–DVL kutbu üzerinde yapılan çalışma yoluyla ortaya konmuştur (45,46). B-katenin proteinin türeşimleri ve daha çok okunması ağırlıklı olarak hepatosellüler karsinom, kolorektal karsinom, akciğer kanseri, kötü huylu göğüs tümörleri ve yumurtalık ve endometriyal kanserler gibi kanser türleriyle ilişkilidir (47). Bu yüzden, aksi yöndeki görüşlerin çok az olmasıyla birlikte, PAR1 proteini birçok kanser türünün tedavisinde önemli bir tedavi hedefi olarak görülmektedir.

2.2.2. PAR1 ANTAGONİSTLERİ

Son yıllarda PAR'lardan özellikle PAR1, gerek kanserde, gerekse de kalp damar, kas-iskelet sistemi, gastrointestinal sistem, solunum ve merkezi sinir sistem bozukluklarında yeni terapötik maddelerin geliştirilmesi için çekici bir hedef haline gelmiştir (4).

PAR1'i inhibe etmek için yapılan çalışmalarda trombini ya da PAR1'i doğrudan inhibe eden antagonist yapılar üzerine araştırmalar yapılmaktadır ve bunlardan bir kısmı kliniğe kadar gelmiştir. Vorapaksar (SCH 530348) (6) bunlardan biri olup, Atopaksar (E-5555) Faz II çalışmalarındadır (7).

2.2.2.1 Vorapaksar



Şekil 2.3. Vorapaksar (6)

Vorapaksar (ticari ismi Zontivity, kodu SCH 530348), sentetik trisiklik 3-fenilpiridin yapısına sahip olan bir himbasin molekül analogudur, doğal bir ürün olarak ilaç geliştirme ve klinik deneylerde tuz kristalleri yaparak modifiye edilmiştir (Şekil 2.3). Vorapaksar oral olarak aktiftir, yüksek bir afiniteye sahiptir, potansiyel ve seçici bir PAR1 antagonistir, platelet aktivasyonuna neden olan trombini engeller, fakat fibrin oluşum esnasında herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Bundan dolayı, vorapaksar kan pıhtılaşmasında veya kanama süresinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Ayrıca, vorapaksar platelet aktivasyonuna neden olan diğer agonistler, ADP veya kolajen gibi veya PAR-4 peptid agonisti ile etkisi bulunmamaktadır, bu nedenden dolayı PAR1 inhibisyonun çok spesifik olduğunu bilinmektedir (6).

Vorapaksar, oral olarak alındıktan sonra vücutta hızla emilir (biyoyararlanım > % 90). PAR1'den ayrılması daha uzun sürdüğünden farmakodinamik etkileri de daha uzun sürmektedir. Dolayısı ile, vorapaksarın vücuttan atılması da çok yavaş olur, yarılanma ömrü yaklaşık 159-311 saattir. Vorapaksar, vücutta CYP3A4 enziminin oksidasyonu yolu ile yavaş olarak metabolize edilir. Bu nedenle vorapaksarla birlikte verilen, CYP3A4 modifiye edebilen, rifampin ve ketokonazol gibi ilaçlar, vorapaksarın etki süresini değiştirirler, ancak vorapaksarla birlikte verilen yemeklerin ilaca herhangi bir etkisi yoktur. Vorapaksar esas olarak dışkı yoluyla ve geri kalanı (<% 5) idrar ile vücuttan atılır (6).

Vorapaksar belirli dozlarda platelet agregasyonunu indükler, trombin reseptörünü aktive edici peptidi (TRAP) inhibe eder. Örneğin, 20 mg vorapaksar dozu ile, yaklaşık 2 saat, 50% den fazla hasta içerisinde >80% platelet agregasyonu inhibe edilmiştir. 40mg dozda uygulandığında, yaklaşık 70% hasta içerisinde, 1 saat içinde, platelet agregasyon inhibisyonu >80% olmuştur ve 2 saat içinde de inhibisyon %96' a yükselmiştir (6).

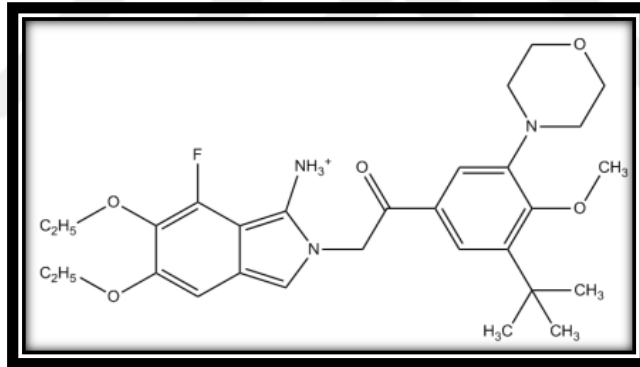
Vorapaksar, faz 2 klinik denemeleri sırasında güvenliği ve etkinliği açısından iyi sonuçlar göstermiştir. Böylece, faz 3 denemelerine alınmıştır. TRA-CER organizasyonu tarafından, klinik denemelerinde ACS hastalarına karşı vorapaksar etkinliği ve güvenliği değerlendirilmiştir. Bu deneme sonuçlarına göre çalışmanın asıl hedef ile ilgili hiçbir klinik yararı olmadığı bildirilmiş, ayrıca büyük kanama riskinde artış söz konusu olmuştur, özellikle felçli hastalar için beyin kanaması riskinde artış gözlenmiştir. Bu nedenle bu çalışmalar durdurulmuştur (48). Fakat, 2014 yılında Merck tarafından geliştirilen bu

molekül FDA tarafından kan pıhtıları oluşumunun önlenmesi için PAR1 antagonisti olarak onaylanmış ve piyasada Zontivity ticari adı altında satılmaya başlanmıştır (49).

2.2.2.2. Atopaksar

Atopaksar (Şekil 2.4), oral olarak aktif, potensiyel bir PAR1 antagonistir, vorapaksara göre aktivasyon süresi daha yavaş (3,5 saat) ve yarı ömrü daha azdır (23 saat). Vorapaksar gibi, vücutta atopaksar da CYP3A4 tarafından metabolize edilir ve dışkı yoluyla vücuttan atılır. Atopaksar, vorapaksar ile karşılaştırıldığında, platelet fonksiyonunun iyileşme süresi daha hızlıdır. Prelinik çalışmalarında, atopaksar hayvan modellerinde anti-trombotik etkiler göstermektedir. Ayrıca, atopaksar trombini, PAR1 aktive edilen peptidleri, inflamasyon mediatörü olan CD40 ligantlarını, IL-6 ve P-selektin gibi yapıları da inhibe edebilmektedir (7).

LANCELOT faz 2 klinik çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Atopaksarın, belirli bir dozu ile, karaciğer ve kalp fonksiyonlarında anormal artış gözlenmiştir. Böylece, atopaksarın klinik geliştirilmesi durdurulmuştur (50,51).



Şekil 2.4. Atopaksar (7)

2.3. BİLGİSAYAR DESTEKLİ İLAÇ TASARIMI (CADD)

Yeni ilaçların bulunmasında, yan etkilerinin ve toksik etkilerinin azaltılmasında, istenen farmokinetik ve farmakodinamik özelliklerin belirlenmesinde bilgisayar destekli ilaç tasarım ve geliştirilmesi çalışmalarından (CADD) yararlanılmaktadır. Organizmanın yapısı ve ilaç molekülünün organizmadaki yolculuğunun karmaşıklığı göz önüne alındığında ve pek çok hastalığın nedenlerinin tam olarak açıklanamaması, ayrıca emek, zaman, yatırım maliyetlerinin çok fazla olması gibi nedenlerle rasyonel biçimde bilgisayar aracılığı ile ilaç tasarlama zorunluluğu doğmuştur.

CADD, mevcut ilaçlara ve hastalıklara ait birikmiş bilgileri diğer sahalardaki disiplinlerarası verilerle kombine halde kullanarak ilaç geliştirme sürecini hızlandırmaktadır. Böylelikle; yeni terapötik etkili bileşiklerin tasarımı, sentez öncesi yeni biyo-aktif moleküllerin etkisinin tahmin edilebilmesi mümkün olabilmektedir. Bilgisayar teknolojisindeki gelişmeler yeni bir *in silico* biyoloji uygulama sınıfının gelişimine ön ayak olmuştur. Bu çalışmalarda en büyük hedef bir hastalığı moleküler seviyede modelleyerek, belirli bir hasta popülasyonunun tedavisine en uygun kimyasal bileşiğin bulunması, bu bileşiğin tüm bağlanma deneylerinin *in silico* olarak gerçekleştirilmesi ve de bileşiğin ADME (emilim, dağılım, metabolizma ve atılımı) özelliklerinin kesin olarak tahmin edilebilmesidir. İlaç keşfi ve geliştirilmesini *in silico* olarak başarmak ilaç keşif işlemini inanılmaz derecede hızlandıracak, emek, zaman kaybı ve masrafları engelleyecektir. Hastayı ve hastalığı moleküler düzeyde, mekanizma bazında anlayabilen kişiselleştirilmiş tıbbi giden yolu da sağlamlaştıracaktır.

CADD teknikleri ile biyoteknoloji alanında kemoinformatik ve biyoinformatik bilgiler sağlanmaktadır. Günümüzde ilaçların etkileştiği organizmadaki moleküler hedeflerin bir bölümü bilinmekle beraber, daha yapıları aydınlatılmamış bir çok moleküler hedef bulunmaktadır. Henüz yapıları aydınlatılmamış olan makromoleküllerin yapılarının yorumlanmasında CADD yöntemlerinden yararlanılarak biyoinformatik bilgiler oluşturulmaktadır. Bu çalışmalar arasında, başlıca farmakofor analizleri, yüksek verimli sanal tarama (HTS), doking sıralanabilir. Tez projesi kapsamında, proteomiks ve kemoinformatik alanlarında yapılan çalışmalar ile biyoteknoloji alanına yeni biyoinformatik veriler ile katkıda bulunulacak ve yeni etkili ilaç etken maddeleri önerilerek tedavide yeni ilaçların önerilmesi gerçekleştirilecektir (52)

Biyoteknoloji kapsamında proteomiks çalışmaları yakın zamanda önemli bir alanı oluşturmuştur. Hücredeki fonksiyonel moleküllerden olan proteinler ilaçların etki göstermesinde majör hedeflerdir. Proteomiks, protein yapısındaki hedeflerin ve hastalık sürecindeki biyokimyasal yolların tanımlanmasında büyük umutlar vaat etmektedir. Proteomiks, çok basamaklı ilaç geliştirme işleminde giderek önemi artan bir rol oynamaktadır. Bu işlem hedef tanımlanmasını, validasyonunu, önder bileşik seçimini, küçük moleküllerle tarama ve optimizasyonu ve de toksisite testlerini kapsamaktadır. Bunun ötesinde, bilgisayarlı proteomiks, kimyasal proteomiks, yapısal proteomiks ve topolojik proteomiks gibi alt disiplinler, özellikle bilgisayar destekli ilaç tasarımına

belirgin katkılar sunmaktadır. Akılcı ilaç tasarımında, ilk olarak patogeneizde hangi proteinlerin ilaç hedefi olabileceğinin bulunması esastır.

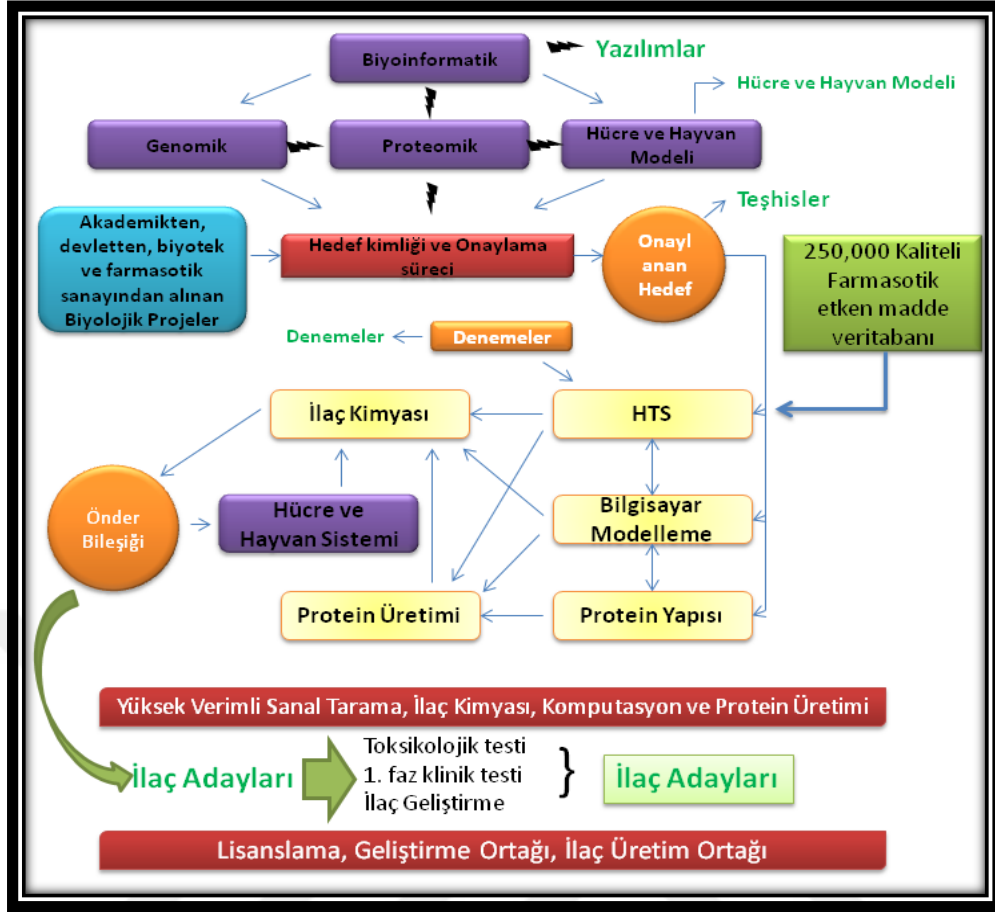
Biyoteknoloji kapsamında biyoinformatik alanında, ilaç keşfi sürecinde, özellikle yapısal biyoinformatik alanında, çok büyük katkı sağlanmaktadır. Bu alan, proteinler, RNA ve DNA gibi büyük makro moleküllerin üç boyutlu yapısının analiz ve bulunması ile ilgilidir. Hücre içinde, çoğunlukla ilaç/terapötik hedefleri protein yapıları (reseptörü) bulunmaktadır. Bu nedenle üç boyutlu proteinlerin yapıları, ilaç keşfi ve geliştirme sürecinde çok büyük rol oynamaktadır.

Biyoinformatik bilgilerin zenginleşmesi, biyolojik hedeflerin yorumlanabilmesi ile mümkün olur. Genom ve protein dizilimleri bize hastalıkların tedavisinde, yan etkileri ve toksik etkilerinden arındırılmış ilaçların bulunmasını sağlar (53).

Biyoinformatik alanı, bilgi edinilmesi, veritabanı geliştirimi, entegrasyon ve bağlantıların sağlanması, ve analiz olmak üzere dört ana iş bölümünü kapsar. Biyoinformatik aynı zamanda yeni ilaç hedefleri tahmin edebilmek için stratejileri ve algoritmaları sağlar ve ayrıca mevcut ilaç hedeflerinin bilgilerinin depolanması ve yönetilmesini temin eder. Ayrıca, potansiyel ilaç hedefleri keşfinden sonra, varsayılan bir hedef ve ilgili hastalık arasında güçlü bir ilişki kurma ihtiyacı oluşmaktadır. Bir hedef doğrulama olarak bilinen bu süreçte, biyoinformatik önemli bir rol oynamaktadır. İlaç hedefi doğrulama, klinik test ve onay aşamalarında, başarısızlık potansiyeli azaltmasında yardımcı olur (54-56).

Geliştirilmiş biyoinformatik teknikler ilaç keşif sürecini hızlandırabilmektedir. İlaç hedef tanımlama ve doğrulama (docking teknikleri gibi), deney geliştirme ve yüksek verimli sanal tarama (HTS) olmak üzere ve tüm yeni potansiyel kimyasal maddelerin belirlenmesi metotları, biyoinformatik teknikleri kapsamaktadır (56).

Genel olarak, ilaç keşfi sürecinde yararlanılan biyoinformatik teknikler aşağıdaki Şekil 2.5.'te verilmiştir.



Şekil 2.5. İlaç keşfinde kemoinformatik ve biyoinformatik arasındaki ilişkiler (57)

2.4. MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMLERİ

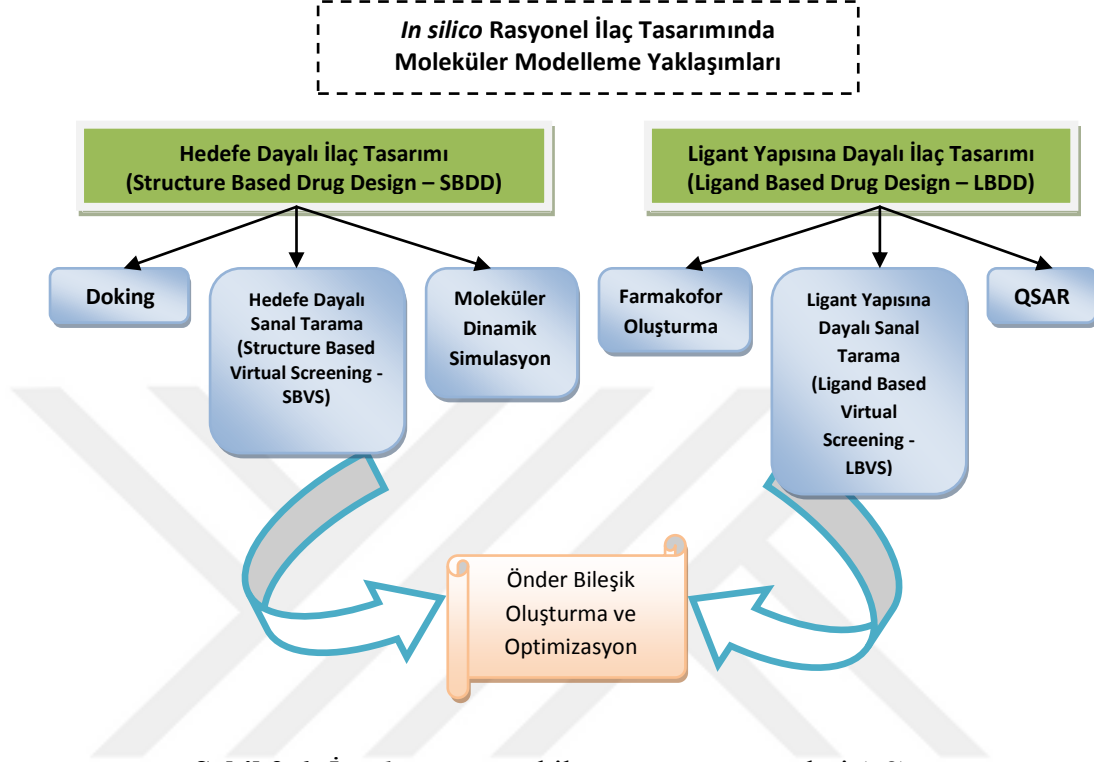
Moleküller modelleme dahil olmak üzere araştırmaya dayalı ilaç keşfi süreci giderek modern tıbbi kimya ve biyoteknoloji yöntemleri daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler modelleme, moleküllerin davranışlarını modellemek veya benzetmek için kullanılan tüm teorik yöntemleri ve hesaplamalı teknikleri kapsamaktadır. Moleküler modelleme tekniklerinin ortak özelliği moleküler sistemlerin atomik düzeyde açıklamasıdır. Bu yöntem, özellikle ilaç tasarım için önemli bir rol oynamaktadır (58).

Moleküler modelleme, ilaç tasarımı sürecinde tıbbi kimyagerler için değerli ve vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Bu yöntemler, moleküllerin üç boyutlu yapıların oluşturulmasını ve temsilini ayrıca fiziksel ve kimyasal özelliklerinin açıklamasını aydınlanabilmektedir. Teorik kimya yöntemlerine ve deneysel verilerine dayalı bilgisayarlı tekniklerden biri bu yaklaşımlar, moleküler ve biyolojik sistemin özelliklerinin belirlenmesi için bir takım yöntemleri içermektedir (58).

Moleküler modelleme yöntemleri yapı-aktivite ilişkilerin (SAR) çalışmaları için sık sık kullanılmaktadır (59). Aynı zamanda, hem ilacın farmakodinamik bilgileri (örneğin: etki gücü, afinite, etkinlik, selektivite) hem de farmakokinetik özelliklerinin (ADMET parametreler: emilim, dağılım, metabolizma, boşaltım ve toksisite) her ikisi de, bu yöntemlerin uygulanması ile araştırılmıştır (60). Moleküller modelleme gelişmeleri, X-ışınları kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) bilinen biomoleküler spektroskopi yöntemleri ile el ele ilerlemiştir. Böylece, moleküler ve yapısal biyoloji alanında çarpıcı bir ilerleme sağlanmaktadır. Bu teknikler sayesinde 100.000'den fazla üç boyutlu protein yapılarının çözünürlüğünü çözülmüştür, öylece makromoleküler olan ilaç hedefleri hakkında önemli bir yapısal bilgileri elde edilmiştir (61). Bu bilgileri depolamak, düzenlemek ve keşfetmek için kullanılan çabaları sayesinde sağlam ve gelişmiş bir hesaplama yöntemleri artan bir talep yaratmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, doğru bir şekilde entegrasyon olan *in silico* ve deneysel yöntemleri, ilaç keşfi sürecinde önemli bir faktör olan moleküler arası tanımların karmaşık yönlerini daha güncel bir anlayış sağlanmaktadır (62).

İlaç keşfi sürecinde özellikle *in silico* ilaç tasarımı kullanılan moleküler modelleme yöntemleri epeyce yaygın hale gelmiştir. Rasyonel olarak kullanılan bu yöntem daha kolay ve oldukça ucuz bir masraf ile ilaç tasarımı sağlayabilmektedir. Son yıllardaki bilgisayar yazılım ve algoritma gelişmeler bu teknikler için daha da pratik hale gelmiştir. *In silico* İlaç tasarımı rasyonel tabanlı yaklaşımlar iki yöntem ayrılmaktadır, yani hedefe-dayalı ilaç tasarım (Structure Based Drug Design - SBDD) ve ligant yapısına-dayalı ilaç tasarım (Ligand Based Drug Design - LBDD) (63) (Şekil 2.6). Hedefe-dayalı ilaç tasarım (SBDD) yöntemleri (yani, biyolojik hedefleri elde edilen üç boyutlu yapısal bilgileri kullanarak ilaç tasarımı) modern tıbbi kimya alanında önemli bir bileşendir. Moleküler (docking) yerleştirme, hedefe-dayalı sanal tarama (SBVS) ve moleküler dinamik (MD) en sık kullanılan SBDD stratejileri arasında yer almaktadır. Bu teknikler geniş bir uygulama alanında kullanılmaktadır, özellikle moleküler tanımlama analizi için, bağlanma enerjileri, moleküler arası etkileşimler ve yapısal değişiklikler gibi önemli analizleri temin etmektedirler (64). İlaç tasarımında, biyoaktif küçük moleküllü kütüphanelerinin kullanımı farklı bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kütüphanelerde benzersiz kimyasal çeşitlilik ve belirli bir hedef ile etkileyen ligantlar bulunmaktadır. Bu tür bilgiler ligant yapısına dayalı ilaç tasarım (LBDD) yöntemlerinde kullanılmaktadır (65). Ligant yapısına dayalı sanal tarama (LBVS), benzerlik arama, QSAR modelleme ve farmakofor oluşturma

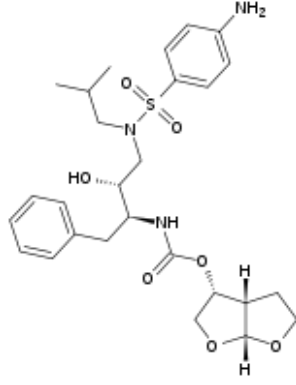
teknikleri, en çok kullanılan LBDD yöntemlerden bazılarıdır (66). SBDD ve LBDD yaklaşımları, hem sanayi, hem de akademik alanında ilaç keşif sürecinde değerli bir araç olarak uygulanmaktadır (67). Bu yaklaşımların entegrasyonu sayesinde birçok yapısal, kimyasal ve biyolojik verilerin incelenmesi başarılı bir şekilde gerçekleşmektedir. (68,69).



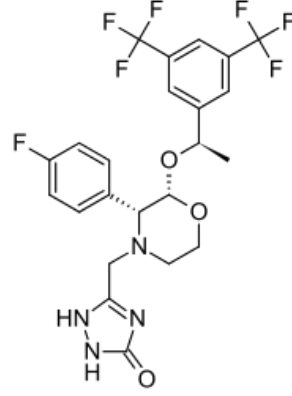
Şekil 2.6. *In silico* rasyonel ilaç tasarım yöntemleri (63)

İlaç olarak piyasaya çıkmadan önce, özellikle yirminci asırdan itibaren araştırmacılar tarafından binlerce yeni önder bileşik ortaya çıkarılmaktadır. Bu çalışmalar sırasında, kimyasal bileşiklerin yapıları ve hedeflenen biyolojik etkileri ile arasındaki bağlantıları tanımlamak için büyük emek sarf edilmektedir. Bu yeni yöntemler, yeni potansiyel etken maddelerin geliştirilmesinde, ulaşılmasında ve hangi etki mekanizması söz konusu olduğunu belirlemede günden güne daha da önemli bir rol oynamaktadırlar (70).

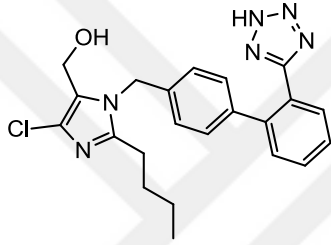
Günümüzde moleküler modelleme teknikleri hem SBDD hem de LBDD yöntemleri kullanılarak geliştirilmiş ilaç molekülleri bulunmaktadır. AIDS tedavisinde kullanılan Darunavir (Prezista®) (71), Nörökinin-1 reseptör antagonisti olarak kemoterapi sonrasında rastlanan bulantı ve kusmanın tedavisinde kullanılan Aprepitant (Emend®) (72), hipertansiyon tedavisinde bilinen Angiotensin II reseptör inhibitörü olarak kullanılan Losartan (Cosaar®) (73) ve diğer geliştiren ilaç Eprosartan (Teveten®) (74); bu moleküllere örnek olarak gösterilebilir.



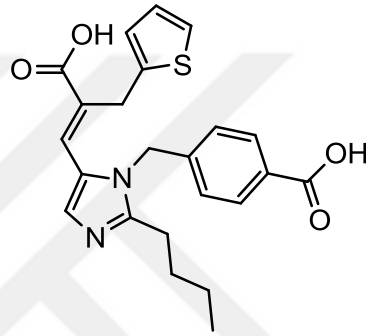
Darunavir (Prezista®)



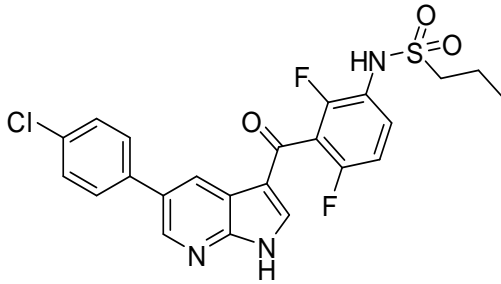
Aprepitant (Emend®)



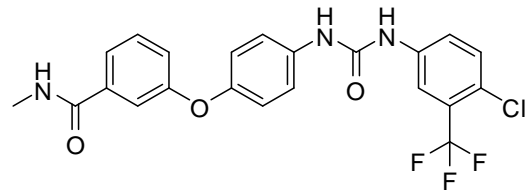
Losartan (Cosaar®)



Eprosartan (Teveten®)



Vemurafenib (Zelboraf®)

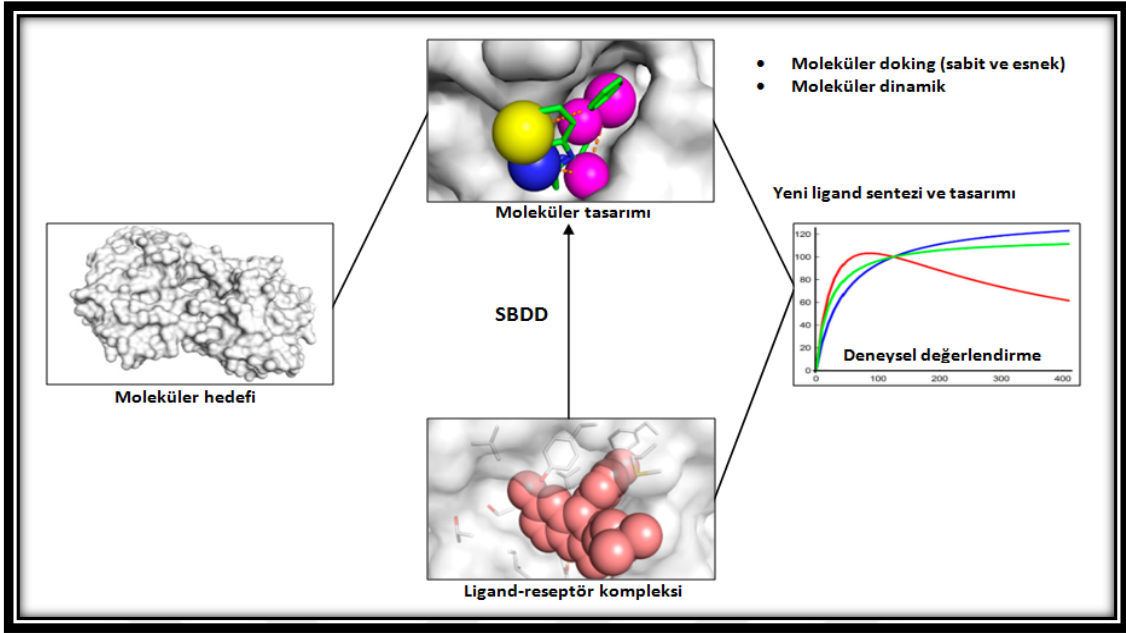


Sorafenib (Nexavar®)

Şekil 2.7. Moleküler modelleme yöntemleri kullanılarak geliştirilmiş ilaç molekülleri

5-HT reseptörleri nanomolar antagonisti Sorafenib(Nexavar®), hedefe dayalı ilaç tasarımı yöntemiyle keşfedilmiş bir ilaç molekülüdür (75). B-Raf enzim inhibitörü olan ve geç dönem melanoma tedavisinde kullanılan Vemurafenib (Zelboraf®), ligant yapısına (fragman) dayalı ilaç tasarımı yaklaşımı ile keşfedilmiş ilk ilaç molekülüdür (76) (Şekil 2.7.).

2.4.1 HEDEFE DAYALI İLAÇ TASARIMI (SBDD)



Şekil 2.8. Hedefe dayalı ilaç tasarım (SBDD) yöntemleri (96)

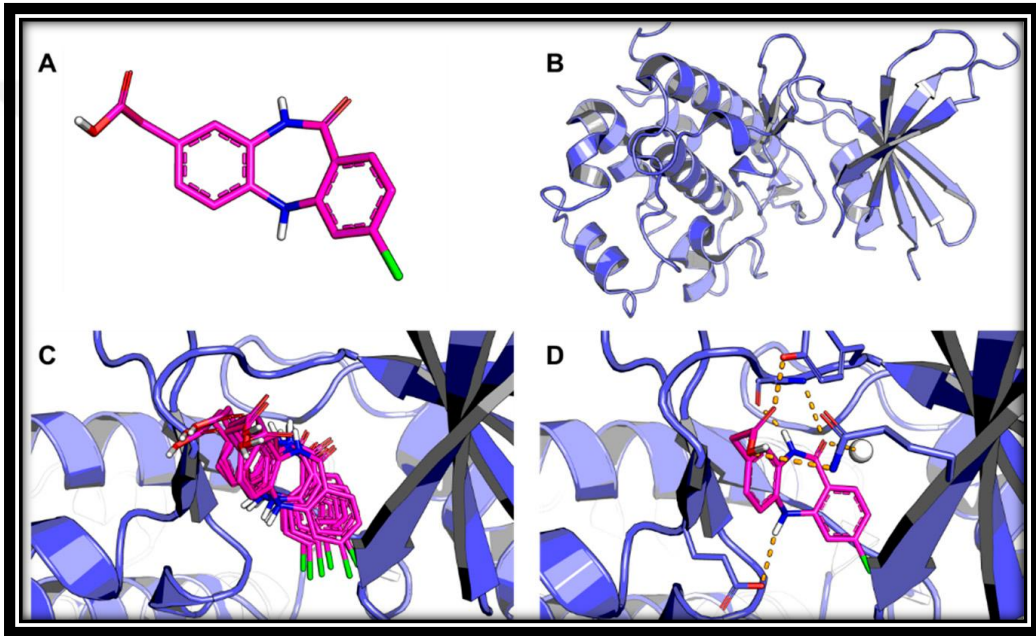
Küçük molekülü olan ligantların makromoleküller ile tanımlanması ve etkileşimi prensiplerinin anlaşılması ilaç araştırma ve geliştirmesi çalışmalarında (Ar-Ge) büyük önem taşımaktadır (77). SBDD yapısal verilerin sistematik olarak kullanımı anlamına gelir (örneğin: makromoleküler hedefleri veya reseptörler), genellikle deneysel veya hesaplamalı homoloji modelleme ile elde edilmiştir (78). Amacı, reseptöre yüksek bir bağlanma afinitesi elde etmek için belirli elektrostatik ve stereokimyasal özelliklere sahip ligantları ortaya çıkarmaktır. Üç boyutlu makromoleküler yapıların mevcudiyeti, cep, kavite ve yan-cepler varlığı dahil olmak üzere bağlanma bölgelerinin topolojisinin incelenmesiyle mümkün olmaktadır. Yük dağılımı gibi elektrostatik özellikleri de, ayrıca dikkatle incelenebilmektedir. Mevcut SBDD yöntemleri, hedef reseptörünün etkili bir modülasyonu için gerekli özellikleri içeren ligantların tasarlanmasına da sağlanmaktadır. Yüksek afiniteli ligantlar ile doğrulanmış bir ilaç hedefiyle selektif modülasyonu belirli hücrel süreçlere müdahale edilerek, istenilen farmakolojik ve terapötik etkilere yol açmaktadır (79).

SBDD yöntemleri aşamalı bilgi edinme şeklinde oluşan bir döngüdür (Şekil 2.8.). Bilinen bir hedef yapısından başlanarak, *in silico* çalışmalarla, potansiyel ligantların belirlenmesi için gerçekleştirilmektedir. Bu moleküler modelleme işlemini umut verici bileşiklerin sentezi izlemektedir (80). Daha sonra, bu potansiyel ligantların, afinite ve etkinliği gibi biyolojik özelliklerinin değerlendirme için, çeşitli deneysel platformlar

gerçekleştirilmektedir. Aktif bileşiklerin tanımlanması kaydıyla, ligant-reseptör kompleksinin üç boyutlu yapısı çözülebilir. Mevcut yapı moleküler tanıma sürecini destekleyen çeşitli moleküller özelliklerinin tespit edilmesini sağlamaktadır (81).

Oluşturulan ligant-reseptör kompleksi tespit edildikten sonra, biyolojik etkinlik verileri yapısal bilgilere ilişkilendirmeye çalışılmaktadır (82). Bu şekilde, SBDD metodu moleküller modifikasyonu yaparak yeni ligantların afinitesini geliştirmek için yeni adımlarla baştan başlamaktadır.

2.4.1.1. Moleküler Doking Yöntemi

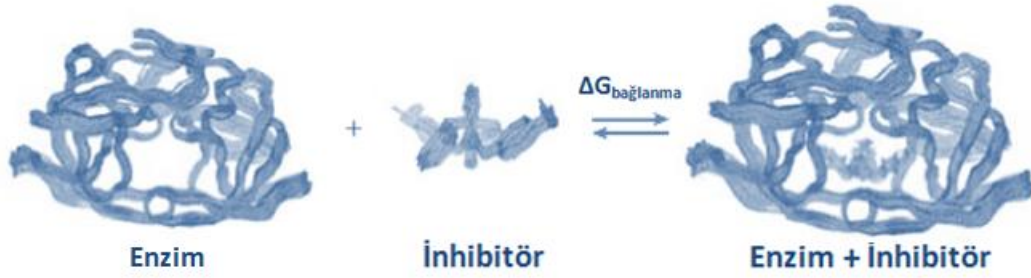


Şekil 2.9. Moleküler doking sürecinin özeti (96). (A) Ligant, (B) Reseptör, (C) Ligant reseptörün içine yerleştirilir, (D) En tercih edilen doking pozunu bağlanma profilini analiz edilmektedir

Moleküler doking, bağlanma bölgesinde küçük moleküllü olan liganların uygun bir şekilde hedefe yerleştirmesini doğru olarak tahmin edilebildiği için, SBDD yaklaşımlarında en sık kullanılan yöntemlerinden biridir (Şekil 2.9.) (83). 1980 yıllarında ilk algoritmaların geliştirilmesini ardından, moleküler doking yöntemleri önemli bir araştırma alanı olmuştur. Özellikle *in silico* ilaç tasarımında en faydalı yöntemlerden biridir ve bilgisayar tabanlı ilaç tasarımı programının birincil parçasını oluşturmaktadır (84) İlaç keşfi sürecinde yapılan doking çalışmalarında, ligant-reseptör arasında oluşan kompleksin bağlanma enerjisinin kantitatif olarak hesaplanabilmesinde dolayı bu tür çalışmaları gittikçe artan bir değer kazanmaktadır.

Moleküler modelleme alanında moleküler doking işlemi, iki molekül stabil bir kompleks şekline dönüşmek suretiyle birbirine bağlandığında bir molekülün öncelikli konformasyonunu bulan eden bir metottur (85). Tercih edilen konformasyona ait veriler, skorlama fonksiyonları kullanılarak iki molekül arasındaki bağlanma afinitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. Biyolojik olarak uygun olan protein, nükleik asit, karbonhidrat ve lipit gibi moleküllerin bağlanması sinyal transdüksiyonunda merkezi bir rol oynamaktadır. Ayrıca, etkileşen iki partnerin rölatif konformasyonu üretilen sinyalin tipini etkileyebilmektedir. Bu nedenle doking işlemi, üretilen sinyalin tipini ve gücünü tahmin etmek için de kullanılabilir.

Doking işlemi sıklıkla, küçük moleküllerin afinite ve aktivitelerini hesaplamak amacıyla ilaç etken maddesi adayları gibi küçük moleküllerin protein yapıları hedeflerine bağlanmaları sırasındaki konformasyonunu bulmak amacıyla kullanılır (86). Bundan dolayı, doking işlemi rasyonel ilaç tasarımında önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 2.10. Denge şartları altında enzim ve inhibitörü bağlanması

Moleküler doking çalışmaları, ilaçların rasyonel olarak tasarımında önemli bir yerde bulunmaktadır. Ayrıca bu tür çalışmalardan yararlanılarak, örneğin sitokrom P450 izoformları kullanılarak, ilaç metabolizması üzerine de çeşitli analizler yapılabilmektedir. Bir enzim ve inhibitör için moleküler doking, denge şartları altında kompleksin yapısının doğru tahmin etmeyi hedeflenmektedir (Şekil 2.10.).

Moleküler doking senaryoları genellikle aşağıdaki kategorilerden birine girmektedir: İlk olarak, kör doking (*blind docking*) olarak adlandırılan doking yönteminde proteinin veya reseptörün aktif yöresini bilinmemektedir. Bu tür doking yöntemi özellikle protein-protein etkileşimlerini incelemek için önemli bir yaklaşımdır. İkincisi, proteinin bağlanma yöresini X-ışın kristalografisi ve NMR çalışmalarından bilinmektedir, bu yöntem 'doğrudan doking yöntemi' (*direct docking*) denilmektedir. Bu durumda, ilginin odak noktası elde edilen ligantların konformasyonudur. Bilinen bağlanma yöresinde, bir kofaktör, bazı su molekülleri veya katalitik metal iyonları içeriyorsa doking hesaplama işlemine dahil

edilmesi unutulmamalıdır. Üçüncüsü, bugüne kadar doking yaklaşımlarının çoğunda ihmal edilen faktörler, totomerik veya iyonize durumlar, onun yanı sıra ligant aktif yöresinin pH, pKa veya sıcaklık gibi mikro ortamına etki eden diğer faktörlerin hesaba katılmasıyla oluşturulan sanal tarama yöntemi ile doking çalışmalarının gerçekleştirilebilmesidir. Ayrıca, bazı durumlarda proteinlerin hareket halindeyken bulunan konformasyonel değişiklikleri de dikkate alınmalıdır. Son olarak, bilinen protein ile inhibitör arasındaki kovalent bağlar mevcutsa gelişmiş doking yöntemleri tercih edilmelidir (87) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Moleküler doking kategorileri

Bilinmeyen 3D Yapıları	Homoloji Modelleme	Bilinen 3D Yapıları (NMR, X-ray)
<ul style="list-style-type: none"> • Kör Doking Yöntemi (Blind Docking) (Aktif yöresi bilinmemektedir) • Ligantlar bağlanma kavitesine doking yöntemi • Protein-protein doking yöntemi, • Ligant-Protein (model) doking (GPCR) yöntemi 		<ul style="list-style-type: none"> • Doğrudan Doking Yöntemi (Aktif yöresi bilinmektedir) • Kofaktörler, su molekülleri, metal iyonları, kovalent-bağlı ligant bulunur
pH, pKa iyonizasyon, tautomerik formlar, solvasyon, protein katlanması ve uyarılmış uyum sorunları		

Genel olarak, moleküler doking çalışmalarında en iyi bağlanma konformasyonu belirlenirken iki önemli adım takip edilmektedir: (i) Çeşitli potansiyel bağlanma modlarını temsil eden büyük bir konformasyonel alanda arama gerçekleştirilmesi ve (ii) tahmin edilen her bağlanma konformasyonu ile ilişkili bağlanma enerjisinin isabetli olarak tahmin edilmesidir (88). Moleküler doking programları döngüsel süreçte bu görevleri gerçekleştirir ve sonuçlanan ligant konformasyonları belirli bir puanlama fonksiyonları veya skorlama yöntemleri ile değerlendirilmektedir. Bu işlemler, sistemin ardışık olarak minimum enerji çözümüne ulaşmaya kadar devam etmektedir (89,90). Bir protein yüzeyinde bir ligantın olası bağlanma şeklinin sayısı neredeyse sonsuzdur. Bu yüzden arama algoritması hızlı ve etkili olmak zorundadır. Puanlama fonksiyonu doğru bağlanma konformasyonunu yeterince ayırt edebilmesi ligant-protein etkileşimlerinin termodinamiğini yakalaması gerekmektedir. Bugünlerde 30'ten fazla farklı doking programı kullanılabilir durumdadır. Doking programları, protein veya ligantın esnekliğini ele almalarına, örnekleme algoritmalarına ve skorlama fonksiyonlarına göre farklılıklar.

2.4.1.1.1. Konformasyonel Arama Yöntemleri

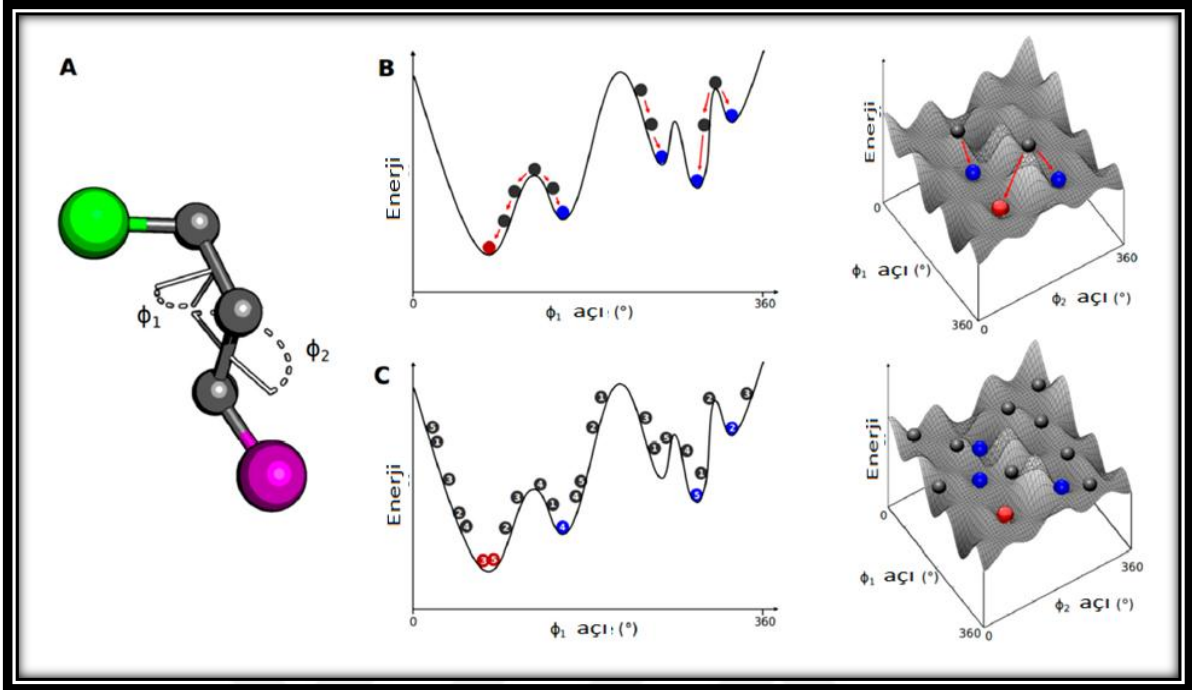
Konformasyonel arama algoritması, aktif yörede bulunan moleküllerin pozlama işlemini gerçekleştirmektedir (86). Bu işlem başlı başına zor bir süreçtir. Çünkü çok küçük organik moleküller bile, çok fazla sayıda konformasyonel serbestlik derecesi içerebilmektedir. Bu serbestlik derecelerinin örneklenmesi işlemi, reseptör yapısıyla en iyi şekilde eşleşen konformasyonu tanımlamak için yeterli bir doğruluk derecesiyle gerçekleştirilmeli ve tek bir doking işleminde binlerce bileşiğin değerlendirilmesine imkan verecek kadar hızlı olmalıdır. Arama metodlarından bazıları ligantı temel alarak hesaplamalar yaparken (*Treatment of Ligand Flexibility*) bazıları da hedef molekülü temel alarak hesaplamalar yapılmaktadır (*Treatment of Protein Flexibility*). Fakat genel olarak ligantı temel alan arama algoritmaları daha fazla kullanılmaktadır.

Konformasyonel arama aşamasında, ligantların yapısal parametreleri, örneğin burulma (dihedral), translasyon, oryantasyon ve özgürlük dönme derecesi gibi, aşamalı olarak değiştirilmektedir (Şekil 2.11A). Konformasyonel arama algoritmaları sistematik (inkremental araması), veya stokastik yöntemleri (Monte Carlo yöntemi, genetik algoritmalar), uygulayarak bu görevi gerçekleştirmektedir (90,91).

Sistematik arama yöntemleri yapısal parametreleri hafif varyasyonlarla teşvik edip, ligantların yapılarını adım adım değiştirilmektedir. Bu yöntemlerde algoritmalar, yapısal alanın enerji haritası kullanılarak incelenmiş ve çok sayıda arama ve değerlendirme yapıldıktan sonra büyük olasılıkla bağlanma moduna karşılık gelen minimum enerji çözümünü elde etmektedir (Şekil 2.11B). Bu yöntem, yapısal alanın keşfetmesi için etkili olmasına rağmen, global minimumdan ziyade yerel minimuma yakınsama oluşturabilmektedir. Bu dezavantaj, enerji haritasındaki farklı noktalarından (yani, farklı bir konformasyonundan) başlayarak aynı anda arama yaparak aşılabilir.

Stokastik yöntemlerde ise, konformasyonel arama gerçekleştirirken ligantların yapısal parametrelerini rastgele olarak değiştirilmektedir. Bunun için, kullanılan algoritma ile bir takım molekül konformasyonları oluşturulup, enerji haritası geniş bir şekilde doldurulmaktadır (Şekil 2.11C). Bu strateji, nihai çözümü yerel enerji minimuma yakalanmasını önlenmektedir ve global minimuma bulma olasılığını da artırmaktadır. Belirli bir algoritma kullanılarak enerji haritasına geniş bir kapsama teşvik olsa da, bu prosedür ile ilgili hesaplama maliyeti de önemli bir sınırlama oluşturmaktadır (92,93).

Sistemantik ve stokastik yöntemler, özel yaklaşımları ile kendi sorunları çözmek için yaygın olarak kullanılan moleküler doking programlarına dahil edilmektedir (94).



Şekil 2.11. Konformasyonel arama yöntemleri (96)

2.4.1.1.1. Sistemantik Arama Yöntemleri

Sistemantik arama algoritmaları bir molekülün içinde bütün serbestlik derecelerini keşfetmeye çalışmaktadır, ama sonuçta bu işlem kombinasyon patlamasına sebebiyet vermektedir (94). Bu nedenle, ligantlar genellikle aşamalı olarak aktif yörelerine yerleştirilmektedir. Aşamalı veya artımlı arama farklı şekillerde yapılabilir. Mesela aktif yöresinde çeşitli moleküler fragmentlerin yerleştirilmesi vasıtasıyla ve molekülleri kovalent bağlayarak (*de novo* ligant tasarım stratejisinde en popüler yöntemdir) gerçekleştirilebileceği gibi yerleştirilmiş ligantların katı (çekirdek fragment) ve esnek (yan zincir) parçalara bölünerek yapılması şeklinde de gerçekleştirilebilir. Sonraki aşamada katı çekirdekler tanımlandıktan sonra aktif yöre içine yerleştirilmektedir. Ardından esnek bölgeler artan (inkremental) bir şekilde eklenir. Örneğin bilinen doking programı DOCK 4.0, sterik tamamlayıcı olarak çekirdek fragmentini pozlar ve esnek yan zincirler sistemantik olarak her bağı farklı pozlarda denemektedir (94).

2.4.1.1.2. Stokastik Arama Yöntemleri

Rastgele arama algoritması (genellikle stokastik metot olarak ifade edilir) rastgele olarak ya ligantı ya da ligant popülasyonunu değiştirilmektedir. Yeni elde edilmiş bir ligant daha

önce tanımlanmış olabilirlik fonksiyonunun temeli üzerine geliştirilmektedir. Monte Carlo ve Genetik Algoritma iki popüler rastgele yöntem yaklaşımıdır. Bu yöntemler, AutoDock ve GOLD gibi bilinen moleküler doking programlarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

2.4.1.1.2.1. Monte Carlo Algoritması

Monte Carlo algoritması, aktif bölgede liganta ait tesadüfi konformasyon, translasyon, rotasyondan oluşan bir konfigürasyon oluşturmaktadır (86). Ardından oluşturulan bu ilk konfigürasyonu skorlar ve yeni bir konfigürasyon oluşturulup onun da skorlama işlemini gerçekleştirir. Bu skorlama işlemlerinden sonra son oluşturulan konfigürasyon daha iyi bir skora sahipse, algoritma bu konfigürasyonu seçer. Eğer son oluşturulan konfigürasyon daha düşük bir skora sahipse, Boltzman Temelli Olasılık Fonksiyonunu uygular. Eğer konfigürasyon testi geçerse, geçerli kabul edilmektedir. Ancak testi geçemezse reddedilmektedir. Algoritma tarafından gerçekleştirilen bu kabul etme reddetme işlemine Metropolis Kriteri denilmektedir. Sonra ise algoritma bu adımları istenilen konfigürasyon sayısına ulaşıncaya kadar tekrarlanmaktadır.

2.4.1.1.2.2. Genetik Algoritması (Genetic Algorithm)

Genetik algoritma, doğal genetik ve biyolojik evrim sürecini temel almaktadır (95). Moleküler doking alanında, bir ligant ve proteine ait yapılan belirli düzenlemeler, ligant ve proteine ait translasyon, oryantasyon ve konformasyon değerlerini tanımlayan bir dizi değer olarak ifade edilebilir. Düzenlemesi yapılan bu değerler ligantın durum değişkenleri, *State Variables*, olarak tanımlanabilir ve genetik algoritmada her durum değişkeni bir gene karşılık gelmektedir. Ligantın durumu genotipe, ligantın atomik koordinatları ise fenotipe karşılık gelmektedir. Moleküler dokingte, *fitness* terimi, proteinle etkileşen ligantın toplam etkileşim enerjisini ifade etmektedir ve bu terim enerji fonksiyonu kullanılarak değerlendirilmektedir. Bir *crossover* (çapraz) prosesi kullanılarak rastgele iki birey eşleştirilmektedir. Çapraz prosesi sayesinde yeni bireyler hem anneden hem de babadan gelen genleri almış olurlar. Ek olarak bazı yavrular, genlerin tesadüfi bir şekilde değiştirildiği rastgele bir mutasyona maruz bırakılmaktadırlar. Bu işlem sonucunda oluşan yavrulardan çevresine daha iyi uyum sağlayanlar çoğaltıp daha zayıf olanlar ise ölmektedirler.

Genetik algoritma, doğada canlılar arasında var olan biyolojik yarışma ve popülasyon dinamiklerini temel alan bilgisayarlı problem çözme yaklaşımlarından birisidir (86). Bu yaklaşımda moleküle ait olan model parametreleri bir kromozom üzerine kodlanır ve stokastik olarak değiştirilmektedir. Verilen bir probleme, mümkün çözümler sunan kromozomlar bir fitness fonksiyonu tarafından değerlendirilirler ve en iyi orta dereceli çözümlerle uyuşan kromozomlar *crossover* ve mutasyona maruz bırakılmaktadırlar. Bu sayede bir sonraki nesil oluşturulmuş olur. Doking uygulamalarında, genetik algoritmanın ürettiği çözümler, mümkün olan ligant konformasyonlarından oluşan bir gruptur.

2.4.1.1.1.2.3. Lamarckian Genetik Algoritması (LGA - Lamarckian Genetic Algorithm)

Bu arama algoritması, Genetik Algoritma (*Genetic Algorithm*), ve Lokal Arama Metodunun (*Local Search Method*) kombine edilmesiyle oluşturulmuş hibrid bir algoritmadır (95). Bu algoritmada, ligant bir kromozom olarak temsil edilmektedir. Kromozom ise liganın lokasyonunu (üç koordinat), oryantasyonunu (dört kuaternions) ve konformasyonunu (her bir torsiyon için bir değer) tanımlayan asıl değerli bir diziden oluşmaktadır. Simülasyon, tesadüfi bireylerden oluşan popülasyonun oluşturulması ile başlamaktadır. Ardından bunu, belirli sayıda tekrar eden üretim döngüsü izlemektedir. Her bir üretim döngüsü ise, haritalama ve *fitness* değerlendirilmesi, doğal seçim (seleksiyon), *crossover*, mutasyon ve elitist seçiminden oluşmaktadır. Gerçekleştirilen her üretim döngüsünü ise lokal tarama işlemi izlemektedir. Ardından, bu işlemler ile oluşan çözümler, enerji tabanlı bir skorlama fonksiyonu kullanılarak skorlanmaktadır.

Her yöntemlerin özelliklerini ne olursa olsun, makul bir zaman miktarında herhangi bir konformasyonel arama algoritması enerji haritasını geniş bir yelpazede keşfetmek mümkün olmalıdır. İdeal olarak, moleküler doking hesaplanması birkaç dakika içinde sonucuna varılmalıdır. Çizelge 2.2.'de konformasyonel arama yöntemlerine göre kategorize edilen yaygın olarak kullanılan moleküler doking algoritmaları bulunmaktadır.

Çizelge 2.2. Konformasyonel arama algoritması örnekleri (96)

<i>Sistemik Arama Yöntemi</i>	<i>Rastgele Arama Yöntemi</i>
eHiTS	AutoDock
FRED	AutoDock Vina
Surflex-Dock	Gold
DOCK	PRO_LEADS
GLIDE	EADock
EUDOC	ICM
FlexX	LigandFit
Hammerhead	Molegro Virtual Docker
Flog	CDocker
SLIDE	GlamDock
ADAM	PLANTS
	MolDock
	MOE_Dock

2.4.1.1.2. Skorlama Fonksiyonu (*Scoring Function*)

Moleküler doking programı, tahmin edilen ligant-reseptör komplekslerinin bağlanma enerjilerini değerlendirmek için skorlama fonksiyonu kullanmaktadır. Enerji değişikliği, ligant-reseptör yapılarının oluşumu nedeniyle, genelde bağlanma sabiti (K_d) ve Gibbs serbest enerjisi (ΔG_L) birimi ile kullanarak değerlendirilmektedir (97). İntermoleküller etkileşimleri, çözünme (solvasyon) ve entropik etkileri de dahil olmak üzere, ligant-reseptörü arasında bulunan bağlanma enerjisinin saptanması, önemli fizikokimyasal parametreler ile değerlendirerek gerçekleştirmektedir (98). Bu nedenle, ne kadar fazla sayıda fiziksel-kimyasal parametreler değerlendirilebilirse o kadar yüksek bir doğruluk skorlama fonksiyonuna sahip olabilmektedir. Ancak, fonksiyondaki değişken sayısı ile orantılı olarak hesaplama maliyetini artırıp, doking algoritması verimliliğini azaltabilmektedir.

Algoritmalar tarafından oluşturulan aday ligant konformasyonlarının değerlendirilmesi ve sıralanması çok önemli ve kritik bir aşamadır. Bağlanan konformasyonlar doğru tahmin edilmiş olsalar dahi, doğru olan ligant konformasyonu tanımlanamaz ve doğru poz yanlış olandan ayıramaz ise hesaplamalar en son aşamada başarısız olacaktır. Bu nedenle, güvenilir skorlama fonksiyonlarının dizaynı ve planlaması esas öneme sahiptir.

Özellikle büyük sayıda ligant kümeleri ile çalışırken, ideal olarak, verimli skorlama fonksiyonları doğruluk ve hız arasında bir denge sunmalıdır. Ligant ve reseptör etkileşiminin kantitatif modellemesi ve bağlanma affinitesinin hesaplanabilmesi için Serbest Enerji Simülasyon Teknikleri (*Free Energy Simulation Techniques*) geliştirilmiştir

(86). Ancak bu masraflı hesaplamalar, çok sayıda ligant-reseptör kompleksinin değerlendirilmesi için kullanışlı değildir ve her zaman doğru sonuç vermemektedir. Moleküler doking programları tarafından uygulanan skarlama fonksiyonları, modellenen komplekslerin değerlendirilmesi sırasında çeşitli sadeleştirmeler ve varsayımlar yapmaktadır ve entropik etki (entropic effects) gibi moleküler tanımlanma işleminde yer alan bazı fiziksel olayları hesaba katmamaktadır. Temel olarak, skarlama fonksiyonları; Kuvvet Alanı Dayalı Skarlama Fonksiyonu (Force Field Based Scoring Functions), Deneysel Skarlama Fonksiyonu (Empirical Scoring Functions), Bilgi Tabanlı Skarlama Fonksiyonu (Knowledge Based Scoring Functions) olarak üç ana sınıfa ayrılabilir (99).

Kuvvet alanı dayalı skarlama fonksiyonu, bağlanan (bağ gerilmesi, açi bükülme ve dihedral varyasyonu) ve bağlanmayan (elektrostatik ve Van der Waals etkileşimleri) koşulların katkılarının toplanmasıyla bağlanma enerjisinin hesaplanabilir. Bu tür skarlama fonksiyonu, fonksiyonun her süreli klasik mekaniğin denklemleri ile kullanarak *ab-initio* yöntemi uygulanmaktadır (100). Kuvvet alanına dayalı yöntemlerin en önemli dezavantajı, entropik katkıların yanlış tahmin edilebilmesidir. Bu eksiklik, entropik fenomenini açıklamak için makul bir fiziksel modelle sık sık karşılaşılmadığı için olmuştur. Ayrıca, hesaplamalarda çözücü açıkça dahil edilmediği için desolvasyon enerjilerinin tahmini de eksik kalmıştır (86).

Aktivite tahmininde kuvvet alanı, genellikle moleküler mekanikteki reseptör-ligant etkileşim enerjisi ve iç ligant enerjisinin (örneğin bağlanmada oluşturulan sterik gerginlik gibi) toplamı ile ölçülür. Kuvvet alanı, büyük ölçüde skarlamaı kolaylaştıran, iç protein enerjisi hesabını ihmal eden, tek bir protein konformasyonunu hesaba katar. Çeşitli kuvvet alanı aktivite tahminleri farklı kuvvet alanında parametre setlerine dayanmaktadır. Örneğin G-Score, Tripos kuvvet alanını ve Autodock, AMBER alanını kullanarak aktivite tahminleri yapar (94).

Ligant ve reseptör arasındaki etkileşimler çok sıklıkla van der Waals ve elektrostatik enerji kurallarının kullanımına göre tanımlanır. Elektrostatik terimi yük-yük etkileşiminin katkısını azaltan dielektrik fonksiyon bağımlı bir mesafe ve kolombik formülasyonu ile açıklanmaktadır. İnternal ligant enerjisinin fonksiyonel formu tipik olarak protein-ligant etkileşim enerjisine çok benzerdir ve ayrıca van der Waals ve elektrostatik katkıları içerir.

Ampirik veya deneysel tabanlı skorlama fonksiyonları bir başka tür değerlendirme yöntemidir. Fonksiyonların her bir koşulu, ligant-reseptör arasında oluşan kompleksin bir fiziksel olayı olarak tarif edilmektedir. Bu durum, hem hidrojen bağlanmalarını, iyonik ve apolar etkileşimleri, hem de desolvasyon ve entropik etkileri kapsamaktadır (101). Bu yöntemin geliştirilmesinde ilk adım olarak, çoklu lineer regresyon analizi gerçekleştirmek için bilinen bağlanma afiniteleri olan bir dizi protein-ligant kompleksleri, çalışma seti olarak kullanılmaktadır. Ardından, istatistiksel model tarafından üretilen ağırlık sabitleri, denklemlerin koşullarını ayarlanması için katsayı olarak kullanılmaktadır. Ampirik fonksiyonlarının dezavantajı, modeli geliştirmek için kullanılan verilerin doğruluğunun çok bağımlı olmasıdır (102). Fakat, kullanılan enerji koşulları basit olduğu için, kuvvet alanı dayalı skorlama yöntemlerinden, bu deneysel tabanlı skorlama fonksiyonu daha hızlı çalışmaktadır. Surfex ve FlexX gibi bilinen doking programları, bu tür skorlama fonksiyonunu yaygın olarak kullanmaktadır (103,104).

Deneysel aktivite tahmininde, bağlanma enerjileri ve konformasyon gibi çok parametrelili fonksiyonların toplanarak, yeniden üretilmesi Böhm tarafından önerilmiştir (105). Ampirik aktivite tahmininin tasarımı, bağlanma enerjilerinin tek tek ilintisiz terimlerin toplamı olarak yaklaşık ifade edilebileceği fikrine dayanmaktadır. Aktivitenin tahmini çeşitli terimlerin katsayıları, bağlanma enerjileri ve X-ışınları yapısal bilgiler kullanılarak oluşturulan regresyon analizinden elde edilir. Fonksiyonel formlar, kuvvet alanı moleküler mekanik koşullarının benzeri olmasına rağmen genel olarak kuvvet alanı aktivite tahmini metodundan daha basittir. Ampirik fonksiyonların iyi yönü, genellikle değerlendirmek için basit fakat kuvvet alanı fonksiyonlarına benzer yaklaşımlara dayanmasıdır. Bu yöntemlerin dezavantajı ise regresyon analizi ve uyumda moleküler veri setleri üzerine bağımlılığıdır. Bu skorlama genellikle çeşitli koşullarda farklı dengeleyici faktörleri oluşturur. Sonuç olarak farklı şekilde oluşturulmuş aktivite tahmini metodlarından kolaylıkla yeni bir skorlama sistemi oluşturulamaz.

Ligant-reseptör bağlanma enerjisini değerlendirmek için kullanılan üçüncü bir yaklaşım, bilgi tabanlı skorlama fonksiyonu bilinmektedir. Bu yöntem, oluşan ligant-reseptör kompleksinden elde edilen ikili enerji potansiyellerini kullanarak genel bir fonksiyonunu tahmin edilmesidir. Bu potansiyeller, iki farklı atomun yapısal veri kümesi içinde belirli bir mesafede bulunan sıklığını dikkate alarak inşa edilmektedir. Veri kümesindeki gözlenen etkileşimlerin farklı tipleri oluşma sıklıklarına göre sınıflandırılmıştır ve

ağırlıklandırılmıştır. Son puan, bireysel etkileşimlerinin toplamı olarak verilmektedir. Bilgi tabanlı skora fonksiyonu, bağlanma afinitelerinin tekrar üretilmesine (deneysel skora yöntemi) veya *ab initio* hesaplanmasına (kuvvet alanı skora yöntemi) dayanmadığı için, doğruluk ve hız arasında uygun bir denge sunmaktadır (86).

Bilgi tabanlı aktivite tahmini metodu bağlanma enerjilerinden ziyade deneysel yapıların yeniden üretimi üzerine tasarlanmıştır. Birçok atom tipinin etkileşimi, molekül ortamına bağlı olarak tanımlanmıştır. Ampirik yöntemlerle ortak olarak, bilgi tabanlı aktivite tahmini metodu, belirgin şekilde modellenmesi zor olan bağlanma enerjilerini yakalamaya çalışır. Bu tür fonksiyonların popüler uygulamaları *Potential of mean force* (PMF) ve *DrugScore* ikili potansiyellere çözücü erişilebilirliğini de hesaplar (94). SmoG protein-ligant etkileşimlerini değerlendirmek için atom çiftlerinin potansiyellerinden faydalanan bu sınıfa ait bir diğer aktivite tahmin metodudur (106).

Çizelge 2.3. Yaygın olarak uygulanan puanlama fonksiyonları örnekleri (96)

<i>Kuvvet Alanı Dayalı</i>	<i>Deneysel Dayalı</i>	<i>Bilgiye Dayalı</i>
DOCK	AutoDock	SmoG
AutoDock	GlideScore	DrugScore
GoldScore	ChemScore	PMF_Score
ICM	X_Score	MotifScore
LigandFit	F_Score	RF_Score
Molegro Virtual Docker	Fresno	PESD_SVM
SYBYL_G-Score	SCORE	PoseScore
SYBYL_D-Score	LUDI	
MedusaScore	SFCscore	
	HYDE	
	LigSCORE	
	PLP	

Her skora fonksiyonunun avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle, farklı skora yöntemlerinin eşzamanlı kullanımıyla konsensüs skora elde edilmeye çalışılmaktadır (107). Bu her bir yöntemlerinin avantajlarını birleştirebilmesi ve eksiklerini giderebilmesinden dolayı çok faydalı olabilir. Konsensüs skora fonksiyonlarının örnekleri şunlar gibidir; Multiscore, X-score, Gfscore, SCS, SeleX-CS ve CONSENSUS-DOCK (108) ve Çizelge 2.3.'de en sık kullanılan moleküler doking programlarında uygulanan çeşitli skora fonksiyonları mevcuttur.

Mevcut aktivite tahmini metodlarının kusurları göz önüne alındığında, son zamanlarda bu alanda konsensüs skora şemalarının oluşturulması eğilimi ortaya çıkmıştır (94,107).

Konsensüs skorlama, farklı skor bilgilerini derleyip hataları dengelemek suretiyle tek bir skor oluşturur ve doğru ligantların belirleme olasılığını artırır. Konsensüs skorlamaya örnek olarak GOLD, DOCK, ChemScore, PMF ve Flexx, aktivite tahminlerini birleştiren X-CSCORE uygulamaları verilebilir (109). Ancak, Konsensüs skorlamanın potansiyel değeri sınırlı olabilir, çünkü farklı aktivite tahmini metotları anlamlı bir korelasyona sahipse hesaplamaları dengelemek yerine, daha yanlış sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Çoğu doking programı başarılı bir şekilde hedeflerin bağlanma yöresinde ligant konformasyonlarını tahmin edebilmektedir. Ayrıca tahmin edilen ligant-reseptör kompleksi, bire bir kristalografik veriler ile teyit edilebilmektedir. Fakat çoğu programda, ligant-reseptör arasındaki mutlak etkileşim enerjilerini tatmin edici bir hesaplama yeterince yapılamamaktadır. Desolvasyon ve entropik etkileri gibi sorunlar, şu anki doking algoritmalarının aşılmasını gerektirmektedir (110,111).

Trott ve arkadaşları tarafından geliştirilen Autodock Vina günümüzün en modern ve en popüler doking uygulamalarından biridir. Autodock Vina arama metodu (Search method) olarak genetik algoritmalar, parçacık optimizasyonu, “simulated annealing” gibi stokastik genel optimizasyon yaklaşımları ve çeşitli lokal optimizasyon yaklaşımlarından oluşturulmuş tekrarlamalı yerel arama kapsamlı optimizasyon “Iterated Local Search global optimizer” algoritması kullanır (112). Autodock Vina’da ampirik ve bilgi tabanlı yaklaşımın kombinasyonundan oluşturulmuş aktivite tahmini metodu kullanılmaktadır. Bu yaklaşımda genel olarak formülasyon;

$$\Delta G_{\text{bağlama}} = \Delta G_{\text{gauss}} + \Delta G_{\text{itme}} + \Delta G_{\text{hbağ}} + \Delta G_{\text{hidrofobik}} + \Delta G_{\text{torsiyon}} \text{ şeklindedir (112).}$$

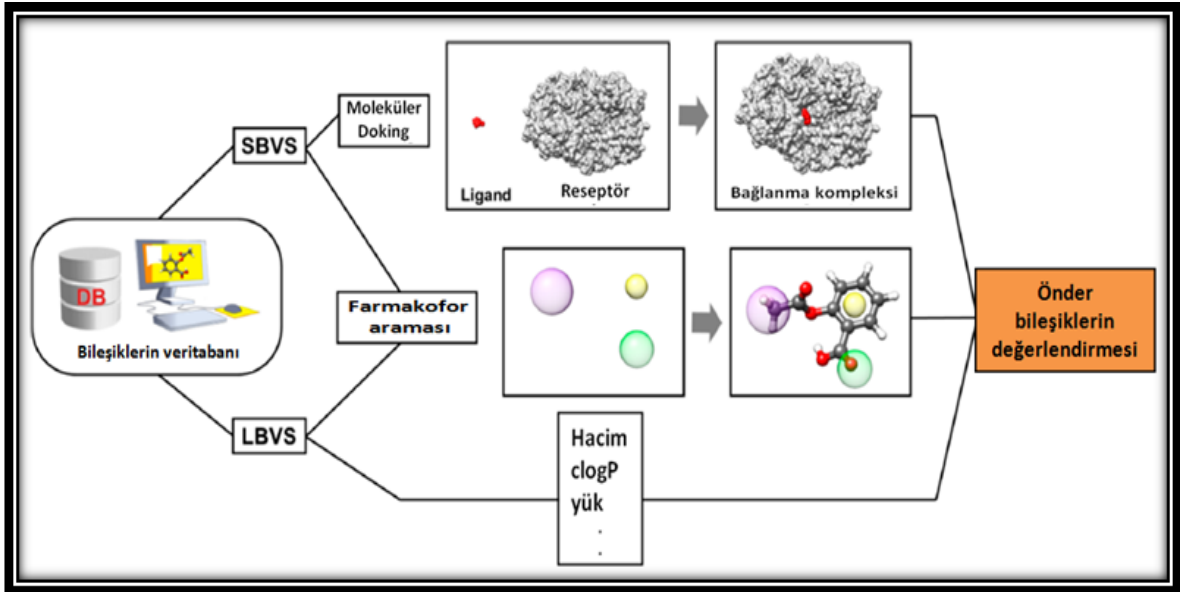
Afinite nicel olarak bağlanma serbest enerjisi ile ölçülebilmektedir. Bağlanma serbest enerjisi ölçümünde yukarıdaki yaklaşım gibi birçok yaklaşım geliştirilmiş ve geliştirilmektedir. Neredeyse tüm bu yaklaşımlar, hidrofobik etki, hidrojen bağı ve konformasyonel entropik etkileşimlerden kaynaklanan katkıların toplamını alarak ΔG 'yi doğrudan tahmin etmeye çalışırlar. Genellikle ilk iki katkı istikrarlı değerlere sahipken konformasyonel entropik etkileşimlerden kaynaklanan serbest enerji değişimleri değişkenlik gösterebilmektedir. ΔG yüksek değerlerde sapma gösterebilmektedir (113). Autodock Vina programı 2010 yılında literatürde yer aldığından beri 225’den fazla yayında kullanılmıştır ve kullanımı hızla artmaktadır. Autodock Vina programının tercih edilmesinin nedenleri diğer moleküler doking programlarına göre kolay kullanımı, hızlı

olması ve yüksek doğrulukta oryantasyon ve skorlama yeteneğine sahip olmasıdır. Ayrıca ücretsiz olarak temin edilebilmektedir. Doking uygulamalarında işlemi gerçekleştiren programın dışında ligant ve reseptörün işleme hazırlanması ve sanal gösterimi için yardımcı biyoinformatik araçlara ihtiyaç vardır (114).

Autodock Vina doking yazılımları için aynı enstitü tarafından *AutoDock Tools* (ADT) programı geliştirilmiştir (112,115). Program doking işlemi için kullanılacak reseptör ve ligantın işleme uygun hale getirilmesinde kullanılır. PDB (protein data bank dosya formatı) formatında protein data banktan (<http://pdb.org>) elde edilen reseptör verisi içinde solvent ve genellikle ligant bilgileri de yer alabilir. Doking işlemi öncesi bu solvent ve ligantların ve polar olmayan hidrojen atomlarının uzaklaştırılıp reseptörün saflaştırılması daha sonra gasteiger yükü ile yüklenip PDBQT (Autodock Vina için özelleştirilmiş dosya formatı) formatında kaydedilip doking işlemine hazır hale getirilmesi gerekmektedir (115). ADT aracının ara yüzü kullanışlıdır fakat daha hızlı, kullanışlı ve aynı zamanda PyMOL grafik programı (116) ile uyumlu, bir Autodock/Vina eklenti (117) gibi doking araçları geliştirilmiştir. Autodock/Vina PyMOL eklentisi, ADT aracının yaptıklarını uygulama sihirbazı şeklinde basamaklandırıp kolay ve hızlı bir şekilde doking işlemini yapmamızı sağlar. Eksik yanları arasında sanal gösterim araçlarının yetersiz olması az sayıda dosya türüne destek veriyor oluşu gösterilebilir. BIOVIA Discovery Studio (118) sanal gösterim ve ligant çizim olmak üzere doking hazırlanması için kullanılan en popüler araçlardan biridir.

2.4.1.2. Hedefe Dayalı Sanal Taraması (Structure Based Virtual Screening)

Sanal taraması, kimyasal veritabanlarından alınan umut verici bileşiklerin seçilmesi bir in siliko yöntemlerin uygulanmasıdır (119). Bu yaklaşımlar, deneysel biyolojik değerlendirme yöntemleri gibi, örneğin, Yüksek Verimli Taraması (HTS) gibi görev almaktadır (120). İlaç keşfi sürecinde, hesaplamalı ve biyolojik tarama için kullanılan büyük ve kimyasal çeşitliği sahip olan bileşiklerin kütüphanesinin kullanılmasını en yaygın yöntemlerinden biridir (121). Bu nedenle, sanal tarama yöntemleri giderek hızlı ve uygun maliyeti sahip olan bu yöntemleri, çeşitli bileşiklerin koleksiyonlarına değerlendirmek için daha faydalı görülmektedir. Temel olarak, sanal tarama yöntemleri iki sınıfa ayrılmaktadır : (i) hedefe dayalı sanal taraması (SBVS) ve (ii) ligant yapılarına dayalı sanal taraması (LBVS) (Şekil 2.12.) (122).



Şekil 2.12. Hedefe dayalı (SBVS) ve ligant yapılarına dayalı (LBVS) sanal tarama yaklaşımlar (96)

Hedefe dayalı sanal tarama yöntemlerinde, daha önceden veritabanlarından seçilen bileşikler hedef bağlanma yeri içine kilitlenmiştir (123). Bağlanma modu tahmininde ile birlikte, bu yöntemi aracılığıyla yerleştirilen moleküller bir sıralama sağlanmaktadır. Bu yapılan sıralama önder moleküller seçmek için tek kriter olarak kullanılabilir veya diğer değerlendirme yöntemleri ile kombine edilebilir. Daha sonra, seçilen bileşikler, deneysel araştırma altındaki moleküller hedef üzerindeki biyolojik aktivitesini belirlemek için değerlendirilir (124).

Genel olarak, SBVS yöntemi aşağıdaki adımdan oluşur : (i) moleküler hedefi hazırlanması; (ii) bileşik veritabanı seçimi; (iii) moleküler doking hesaplanması; ve (iv) doking sonrası analizi. Hedef ve bilinen ligantları ile ilgili mevcut bilgilerin titiz incelenmesi yanısıra, seçilen moleküler doking algoritmaları avantajları ve dezavantajları dikkatli analize edilmesini en uygun stratejileri ortaya koymaya gereklidir (125).

Genel itibarıyla belirli bir reseptörün çeşitli yapılarını mevcuttur. Eğer hedeflerin yapılarını apo ve holo formlarda mevcut ise, her ikisinde SBVS stratejisinde dikkatle alınmalıdır. Ligantlarla etkileşiminden ortaya çıkan konformasyonel değişiklikleri ve yapısal çözünürlükleri, en uygun yapılarının seçiminde dikkat gerektiren önemli ayrıntılardır (126,127). Sonraki, seçilen yapıları düzgün bir moleküler doking çalışmaları hazırlanması için çeşitli prosedürler geçirmektedir. Kısaca, hazırlık için düzenli olarak şu şekilde oluşur: hidrojen atomları eklenmesi, su molekülleri ortadan kaldırması (sadece etki göstermeyenler

için), doğru protonasyonunun ve bağlanma bölgesi kalıntılarının totomerizasyonu durumları belirtilmesi, ve en son kısmı yükleri hesaplanmasıdır (128).

Diğer önemli bir adım da küçük molekülü olan bileşik koleksiyonunu hazırlanması ilgilidir. Büyük veritabanlarıdaki içeren çok sayıda kimyasal tedarikçileri ve çeşitli kimyasal verileri yaygın olarak SBVS yöntemlerinde kullanılmaktadır (129). Genellikle, bu bileşik koleksiyonları daha önceden belirlenen kimyasal filtrelere göre bileşik alt kümelerini aramak ve seçmek için etkileşimli arayüzleri olarak faaliyet göstermektedir. Normalde, bileşiklerin veritabanı, SMILES, SMARTS ve InChI gibi çizgi işaretlemeler kullanarak depolanır ve daha sonra üç boyutlu moleküler yapıları dönüştürülmektedir. Orijinal dosya dönüştürme için stereokimya, kısmi yükleri ve iyonizasyon durumları doğru bir şekilde atama gerektirmektedir (130) Çizelge 2.4'te sanal taramasında kullanılan bilinen sanal veritabanlarının bazı örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.4. Sanal tarama yöntemlerinde kullanılan veritabanları (96)

<i>Veritabanlar</i>
Zinc
PubChem
ChemSpider
ChEMBL
NuBBE DB
ChemBank
eMolecules
DrugBank
Binding DB

Bir sonraki adımda, hazırlanan veritabanı hedef bağlanma bölgesine kilitlenmektedir. Konformasyonel arama algoritması her molekülün enerji haritasını incelenmektedir ve yüksek skorlu olan bileşikler, potansiyel ligantlar olarak seçilmektedir (128). Sanal taramasında bileşiklerinin yüzbinlerce (veya milyonlarca) kullandığı için post-doking analizi genellikle yapılmaktadır. Bu analizi, öncelikli bileşiklere karar vermek için gerçekleştirmiştir.

Çizelge 2.5. SBVS yöntemlerindeki grafiksel ve doking sonucu görselleştirme yazılımları (96)

<i>Yazılımlar</i>
UCSF Chimera
VMD
PyMOL
BALL
RasMol
Jmol
JSmol

Bu amaç için tahmin edilen ligant-reseptör komplekslerin görselleştirilmesi çok yararlı olmuştur (131). SBVS sonuçlarını görselleştirilmesi için kullanılan moleküler modelleme programların listesini Çizelge 2.5.'te verilmektedir.

2.4.1.3. Moleküler Dinamik

Moleküler doking'te hedef bağlanma bölgesinin esnekliği dikkate alınması gereken ama sıklıkla gözden kaçan önemli bir özelliktir. Enzimler ve reseptörler moleküler tanımlanma işlemi boyunca konformasyonel değişikliklere uğramışlardır (132). Bazı durumlarda ligant küçük bir hareketle meydana getirdiği konformasyon ile bağlanma bölgesine uyar. Bazen de, bazı proteinler sekonder ve tersiyer yapı elementlerini içeren belirgin konformasyonel değişiklikler ile bağlanırlar. Esneklik sorunu MD gibi tekniklerin kullanılmasıyla halledilebilir (133).

Genellikle ligant, reseptörün minimum enerjili birkaç uygun konformasyonunda stabilize olur (134). Böyle durumlarda MD simülasyonları bu ligant indüklü yapılara uygun alternatif konformasyonlar üretir. Ayrıca özel moleküler hedefler için uygun kristallografik yapı yokken, MD doking için uygun yapılar üretmek için uygulanabilir (135). Dolayısıyla, mevcut kristallografik veriye dayalı MD simülasyonları tarafından potansiyel konformasyonel durumlar örneklendirilir ve moleküler doking için uygun konformasyonlar seçilebilir (133). MD ek okarak, moleküler doking tarafından tavsiye edilen ligant-reseptör kompleksinin stabilitesini kontrol etmekte de kullanılmaktadır (136). MD ile oluşturulan ligant konformasyonunda belirli bir RMSD değerinden daha fazla sapma olduğunda, tahmin edilen ligant-reseptör kompleksleri anstabil olarak değerlendirilebilir (137).

Moleküler dinamik, incelenen sistemde her atomun konumunu ve hızını belirlemek için, Newton'un hareket eşitliklerini klasik mekanikte açıklandığı gibi uygular. Sonuç olarak, ligant-reseptör kompleksinin yörünge ve zamana bağlı gelişimi gözlenebilir (138).

Başlangıçta, gerçek sistemin basınç ve sıcaklığını yeniden üretmek amacıyla atomlara spesifik bir konfigürasyon verilir. Her partikül üzerine etkili kuvvetlerin hesaplanmasından, her atomun zamana bağlı hızı ve pozisyonunu belirlemek mümkündür. Belirli bir zaman aralığı için bu yörüngeler entegre olana kadar hesaplamalar tekrarlanır (133).

Sistem üzerine etkili kuvvetler, moleküler etkileşim potansiyelince belirlenir ki bu kuvvetler genellikle kuantum kimyasal veya deneysel verilerle parametrize edilir. Bu parametreler kümesi (kuvvet alanı) genel fonksiyona her bir etkileşimin etkisini belirler (135). Çeşitli mevcut kuvvet alanları arasında moleküler dinamik simülasyonlarda çok kullanılmasıyla AMBER (139), CHARMM (140), GROMOS (141) öne çıkar. MD kullanışlı oluşuna rağmen bazı sınırlamaları vardır. Bunlar arasında, büyük sistem simülasyonları için talep edilen yüksek masraflar vardır ki genelde incelenen ligant-reseptör kompleksleri, binlerce atom içermektedir. Reseptöre ait bazı konformasyonel değişiklikler, moleküler tanıma sırasında mevcut hesaplama kapasitesini aşan zamanlarda olur (134). Bu sınırlamalara rağmen, MD özellikle moleküler doking gibi bir başka moleküler modelleme yöntemiyle birlikte kullanıldığında SBDD'ye önemli katkılar sağlayabilir.

2.4.2. LİGANT YAPIYA DAYALI İLAÇ TASARIMI (LBDD)

2.4.2.1. Ligant Yapıya Dayalı Sanal Tarama (*Ligand Based Virtual Screening - LBVS*)

Ligant dayalı sanal tarama (LBVS) yöntemleri, aktif olduğu bilinen bileşiklerden elde edilen moleküler tanımlayıcıların keşfi ile dayanmaktadır (142,143). Genel olarak, bir takım bileşiğin serisi karşılıklı özellikleri daha önce tanımlanır ve sonra moleküler filtreler olarak uygulanmaktadır. Bu veritabanı filtreleme yöntemleri ayrıca deneysel değerlendirme için bileşenleri seçmesini ve kimyasal alanı azaltmak için ilerleyen tarama adımlarında araştırılmasını kullanılmaktadır.

Bazı serbestçe kullanabilen yazılım paketleri, veritabanı filtreleme için kullanılan moleküler tanımlayıcıları doğru bir şekilde tahmin edilmektedir. Bu programlar, biyolojik aktivitesi ile ilgili, çözünürlük, protonasyon durumu ve moleküler hacim gibi önemli özellikleri tahmin etmek için faydalı bulunmaktadır (144). Çizelge 2.6'da, ilgili moleküler özelliklerini tahmin etmek için kullanılan bazı kemoinformatik araçları örnek vermiştir.

LBVS yöntemi başka bir yaklaşımı, farmakofor modeli oluşturmak için bilinen ligantlardan elde edilen yapısal özelliklerinin kullanmasıdır (145). Bu ligant yapıya dayalı 3D farmakofor modelleri, biyolojik aktivite için uygun olduğu düşünülen yapısal özellikleri bir derleme oluşturulmaktadır. 3D farmakofor modeli oluşturmak için aşağıdaki tipik adımları içermektedir: (i) bileşik serisinin konformasyonel alanı keşfetmesi; (ii) karşılıklı özelliklerini belirlenmesi; (iii) belirlenen özelliklere göre molekülleri hizalanması; ve (iv) farmakofor modeli üretilmesi. Ele alınması gereken bir konu farmakofor modeli oluşturulması ile ilgili, daha çok moleküler hizalama aracı geliştirme yönünde söz konusudur (146). Çizelge 2.7.'de farmakofor oluşturmak için çeşitli ücretli ve ücretsiz (akademik) programlar bulunmaktadır.

Çizelge 2.6. Yaygın olarak kullanılan moleküler tanımlayıcıların tahmin programları (96)

<i>Programlar</i>
Molinspiration
OSIRIS Property Explorer
Molsoft
MoKa

Çizelge 2.7. Farmakofor oluşturmak için kullanılan programlar (96)

<i>Ücretli Programlar</i>	<i>Ücretsiz Programlar</i>
Hiphop	PharmaGist
HypoGen	ALADDIN
HypoRefine	RAPID
GASP	DANTE
DiscoTech	APOLLO
GALAHAD	CLEW
LigandScout	MPHIL
MOE	GAMMA
PHASE	SCAMPI
XED	Apex-3D
	LigBuilder

2.4.2.2. Üç Boyutlu Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (3D-QSAR)

2.4.2.2.1. Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizleri Yöntemi (Comparative Molecular Field Analysis) (CoMFA)

CoMFA yöntemi, 1988 yılında ortaya çıkışından bu yana 3D-QSAR çalışmaları içerisinde en kuvvetli araçlardan birisi olmuştur. CoMFA yöntemi temelde, gözlenen biyolojik özelliklerin, bir set ligant molekülünü çevreleyen non-kovalan alanların uygun sterik

(Lennard-Jones) ve elektrostatik (Coulomb) örneklemeyle anlaşılacağı ve korele edilebileceği varsayımına dayanmaktadır (147).

Benzer etki mekanizmasına sahip biyolojik etki gösteren bir seri moleküle uygulanmakta olan CoMFA yöntemi, 1988 yılında Cramer ve ark. tarafından geliştirilmiştir. CoMFA'nın avantajları, moleküllerin biyolojik etkilerini tahmin edebilmesi ve de sterik/elektrostatik özelliklerle biyolojik etkiler arasındaki ilişkileri kontür haritaları halinde temsil edebilmesidir. CoMFA kontür haritalarının kalitatif bilgileri sadece ligant-reseptör etkileşimleri hakkında değil, aynı zamanda reseptör topolojisi hakkında da önemli özellikleri ortaya koymaktadır. CoMFA'nın kapsamının genişletildiği Gelişmiş CoMFA'da H-bağı ve indikatör alanlar da kullanılarak kompleks QSAR analizleri kolayca yapılabilmektedir. CoMFA'dan farklı olarak CoMSIA, korelasyon için daha iyi sonuçlar üretmektedir. CoMFA ve CoMSIA metotları, yapılan çalışmalarda toksisite mekanizmalarına da açıklık getirmektedir. CoMFA Lennard-Jones ve Coulomb potansiyellerine göre sterik ve elektrostatik özellikleri hesaplarken, CoMSIA yöntemi ligant bağlanmasından sorumlu majör katkıları ele almak için beş farklı özelliği (sterik, elektrostatik, hidrofobik, ve hidrojen bağı donörü veya akseptörü) göz önünde bulundurmaktadır. CoMFA'dan farklı olarak, CoMSIA'da, CoMFA'nın orijinal versiyonunda kullanılan Lennard-Jones ve Coulomb potansiyellerinin fonksiyonel formlarından kaynaklanan hatalar söz konusu değildir. CoMSIA kontür haritalarına yorum getirmek, varyansın farklı alan tiplerine bölümlendirilmesine izin verildiği için daha kolaydır (148).

CoMFA yöntemi, üç boyutlu QSAR çalışmalarında yaygın kullanıma sahip bir metottur. Sübstituent parametrelerine dayalı olan geleneksel Hansch analizinden farklı olarak, CoMFA, bir seri molekülün biyolojik aktivitesini molekül etrafında geniş bir 3-D hacim tanımlayarak sterik ve elektrostatik alanlarıyla ilişkilendirmektedir. CoMFA sütunları (deskriptörleri), her bir molekül için uygun bir prob kullanılarak (genellikle yükü +1 olan bir sp³ karbon atomu) ayrı ayrı her bir ızgara noktasında hesaplanan sterik (Lennard-Jones) ve elektrostatik (Coulomb) potansiyellerden oluşmaktadır.

CoMFA, sadece standart sterik ve elektrostatik moleküler alanlara dayalı olduğu için, reseptör-ligant etkileşimlerini modellemek için tüm bağlanma kuvvetlerini uygun olarak temsil edemeyebilmektedir. CoMFA, ligant-reseptör etkileşmelerinin sadece entalpik bileşenini temsil etmektedir. Ek bir alan olarak sunulan yeni moleküler lipofilisite

potansiyelinin (MLP), CoMFA'nın tahmin gücünü belirgin bir şekilde artırdığı saptanmıştır. MLP, sterik ve elektrostatik alanlarla yeterli olarak tanımlanamayan hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimleri kodlamaktadır ve ayrıca bir entropi bileşeni içermektedir (149).

Boeckler ve ark., Dopamin D₃ reseptör agonist serisinin uzantısı olan 3-sübstitüe-7-aminotetrahidroindolizinler üzerinde yaptıkları çalışmalarda CoMFA ve CoMSIA analizlerinde yeni geliştirilen ve karşılaştırma seçimini kontrol eden bir program uygulaması (IRAS) kullanmışlardır. CoMFA/CoMSIA katkı haritalarından faydalanarak D₃ reseptörünün daha önceden oluşturulmuş homoloji modelini inaktif durumdan aktif duruma dönüştürmüşlerdir. Bu çalışmanın neticesinde, tamamen ligant yapısına dayalı metotlar olarak CoMFA ve CoMSIA'nın yapıya dayalı homoloji modellemesiyle olan kombinasyonunun QSAR verilerinin yorumlanabilirliğini ve aktive edilmiş GPCR bağlanma yöresi modellerinin oluşumuna olan katkısını artırdığı sonucuna varılmıştır (150).

Genel olarak, CoMFA uygulamalarında, modellerin istatistiksel tahmin yeteneği ve araştırılan ilaç-ligant etkileşiminin fizikokimyasal açıdan yorumlanabilirliği önemli iki husustur. Yapılan çalışmada şans korelasyonlarının olasılığını minimuma indirmek için 3D korelasyonları etkileyecek olan CoMFA parametreleri de incelenmiştir. Standart CoMFA sterik ve elektrostatik alanlarıyla paralel olarak, altta yatan en iyi aktivite ilişkilerini bulabilmek amacıyla hidrofobik alanlar da incelemeye alınmıştır. En iyi korelasyonlar, hidrofobisitenin araştırılan çoklu ilaç dirençliliğini dönüştürücü aktivitedeki rolünü gösteren bu alanlarla bulunmuştur. Modellerle gelen grafiksel sonuçların analizi, yaygın olarak tanımlanan kritik alanlara (polisiklik halka sistemi ve N-sübstitüe kısım) paralel olarak hidrofobisitenin moleküler profilinin bu ilaçların aktiviteleri için yapısal açıdan spesifik belirleyiciliğini ortaya çıkartmıştır. CoMFA modellerinde lipofilik alanların kullanıldığı araştırmaların sayısı az olmakla beraber, hidrofobisitenin şimdiye kadar gerçekten tam olarak anlaşamadığı düşünüldüğünden çoğu durumda bu alanların yorumlanması nispeten zor olmaktadır. İlaç-membran etkileşimlerinin çoklu ilaç dirençliliğinin geri dönüşümünde aracılık ettikleri varsayıldığı bu özel durumda hidrofobisitenin temel bir rol oynadığı düşünülmektedir (151).

2.4.2.2.2. Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizleri Yöntemi (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) (CoMSIA)

Gerhard Klebe ve araştırma grubu tarafından 1994 yılında geliştirilmiş olan CoMSIA yöntemi, ortak bir hizaya (*alignment*) getirilmiş olan ilaç moleküllerinin benzerlik indislerine dayalı olarak özellik alanlarının hesaplarının hesaplanması için alternatif bir yaklaşımdır. Farklı fizikokimyasal özelliklerin alanları Gaussian-tipi uzaklık bağılılığına göre kullandığından atomik pozisyonlarda sorun yaşanmamaktadır. Bu nedenle, cutoff limitlerinin keyfi tanımlamalarıyla ve alanın farklı eğimlerinden kaynaklanan eksikliklerle de karşılaşılmamaktadır. Alanlar CoMFA formalizmine benzer bir PLS analizi ile değerlendirilmektedir.

Klebe ve grubunun çalışmasında, kortikosteroid bağlayan globuline bağlanan ve termolizin inhibitörü olan iki steroid veri seti, geleneksel CoMFA yöntemi (Lennard-Jones ve Coulomb potansiyel alanları) ile ve de Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizi (CoMFA) yöntemi ile analiz edilmiştir. Karşılaştırmalı istatistiksel önem modelleri elde edilmiş ve farklı modeller için alan katkı haritaları üretilmiştir. CoMFA alanlarındaki kesişimler nedeniyle ve de moleküler yüzeye yakın potansiyellerin dikliği nedeniyle, CoMFA haritaları parçalı ve ayrık bağlanmıştır. Bu durum, yorum yapılmasını zorlaştırmaktadır. CoMSIA yaklaşımıyla elde edilen haritaların yorumlanması ise daha kolaydır. CoMFA haritaları, bölgeleri, varsayılan bir çevre ile etkileşimlerin beklendiği moleküllerden ayrı olarak gösterirken, CoMSIA haritaları aktivite için önemli bir fizikokimyasal özellik gerektiren ligant iskeletlerinin bulunduğu alandaki bölgeleri işaret etmektedir. Yapılan çalışmada özellikle yeni bileşiklerin tasarımı söz konusu olduğunda önemli olan özelliklerin izlenmesinde CoMSIA yönteminin yol göstericiliğinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (152).

CoMSIA yöntemi, CoMFA yönteminde kullanılan sterik (S) ve elektrostatik (E) alanlara ek olarak hidrofobik (H) ve hidrojen bağı donörü (D) ve akseptörü (A) tanımlayıcılarını da net bir şekilde gösterir. Xu ve ark., yaptıkları bir çalışmada, CoMFA ve CoMSIA metotlarının tahmin güçlerini 20 molekülük bir test setinden faydalanarak karşılaştırmışlardır. CoMFA ve CoMSIA metotlarının her ikisinin de iyi tahmin yetenekleri olduğu sonucuna varırken, PLS istatistiklerinin CoMSIA'nın daha iyi bir metot olduğuna işaret ettiğini de belirtmişlerdir (153).

2.4.2.3. Farmakofor Analizi

İlaç tasarımında sık karşılaşılan, terapötik olarak söz konusu reseptörün üç boyutlu yapısı bilinmediği durumlarda, moleküler modelleme çalışmalarıyla, ligatların yapıları iyice karakterize edilir ve bazen biyolojik etkide rol oynayan konformasyonları kesin bir biçimde ortaya çıkartılmaktadır. Reseptörün yapısı daha sonra bu tür ligantlardan ortaya çıkartılabilmekte veya ‘haritalanabilmektedir’; böylelikle mevcut yapı-etki ilişkilerini rasyonelize etmek ve yeni ilaç adaylarını tasarlamak için kullanabilmektedir. Ligantların biyolojik aktiviteleri için gerekli olan temel fonksiyonel grupların bağlı yönlendirmeleri farmakoforu tanımlamaktadır. Diğer bir ifadeyle farmakofor, belli bir biyolojik aktivite için gerekli olan yapısal elemanların uzaysal düzenlemesidir. Farmakofor ilk defa 1909 yılında Paul Erlich tarafından “bir ilacın biyolojik aktivitesinden sorumlu temel özellikleri taşıyan moleküler çerçeve” olarak tanımlanmıştır. IUPAC ise farmakoforu “bir farmakofor, spesifik bir biyolojik hedef ile onu tetiklemek üzere optimal supramoleküler etkileşimin gerçekleşmesi için gerekli olan sterik ve elektronik yapıların toplamıdır” olarak tanımlamaktadır.

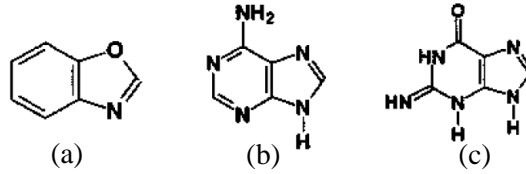
Modern bilişimsel kimyada farmakofor, aynı biyolojik etkiye sahip bir veya daha fazla molekülün temel özellikleri belirlemede kullanılır. Birçok kimyasal bileşiğin veritabanı birbirinden benzer uzaklıkta konumlanmış aynı özellikleri paylaşan daha fazla molekül aramak için kullanılabilir. Aynı protein hedefi için aynı farmakoforu paylaşan farklı ilaçlar benzer bağlanma modeline sahip olabilirler. Farklı ilaçlar aynı hedef için farklı bağlanma modeline sahiplerse bu aktif yörenin içinde farklı konumlara bağlanmalarından ya da aktif yörenin aynı konumunda farklı özellik setiyle etkileşime girmelerinden kaynaklanabilir. Tipik bir farmakofor modeli hidrofobik, aromatik, hidrojen bağ akseptörü (HBA), hidrojen bağ donörü (HBD) gibi temel özellikleri içerir. özellikler 3D boşlukta, reseptörü tamamlayan kimyasal özellikleri temsil eder ve biyolojik olarak aktif ligantları belirlemek için benzer özelliklere sahip değişik kimyasal gruplar ile çakışması gerekmektedir (154).

Oluşturulan model bağlanma veya inhibisyonu hakkında bilgi verebilir, daha çok sayıda aktif bileşiğin oluşturulması için bir temel oluşturabilir ve aynı farmakoforu içeren moleküllerin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Bir farmakofor, yapısal olarak farklı ligantların ortak bir reseptöre bağlanmasına açıklama getirmektedir (58).

2.5. BENZOKSAZOL BİLEŞİKLERİNİN BUGÜNE KADAR BULUNMUŞ ANTİKANSER ETKİ MEKANİZMALARI

Mevcut ilaçların çoğunlukla, toksisiteleri ve ilaç direnci gibi sorunları karşı karşıya geldiği için, kanser hastalıkları için yeni ilaç keşfi ve geliştirilmesi acilen gereklidir. Araştırmalar, heterosiklik çekirdek taşıyan yapıların oldukça güçlü antibakteriyal, antifungal, antiviral, antitumor aktiviteye sahip olan benzoksazol ve analogları ve bunların türevlerinin, antikanser sahip olacağına dair da beklenmektedir. Ayrıca diğer keşfedilen antibakteri, benzamid ve fenilasetamit türevleri olan da, antikanser etkisini da düşünülmektedir. Bu nedenle, son yıllarda bu türevler üzerindeki çalışmalar giderek artmaktadır.

Benzoksazol (a) halka sistemi, nükleik asidlerin yapısında yer alan pürin bazlarından adenin (b) ve guanin'in (c) halka eşdeğerleridir (Şekil 2.13.). Kemoterapötik aktivitenin etki mekanizmalarından biri de, nükleik asid sentezinin inhibisyonudur. Bu şekilde etki gösteren bileşikler DNA ile kompleks oluşturarak deoksiguanozin kalıntılarına bağlanırlar. DNA-ilaç kompleksleri DNA'ya bağımlı RNA polimerazı inhibe ederek, mRNA oluşumunu bloke ederler (155). Benzoksazol halka sistemi ve onun analogları ve türevleri halka sistemleri nükleik asidlerin yapısında yer alan heterosiklik bazların yapısal benzerleri oldukları için, kemoterapötik aktivitelerini bu yolla gösterebilecekleri düşünülmektedir.



Şekil 2.13. Benzoksazol (a), Adenin (b) ve Guanin (c) genel formülleri

Bazı antitümör ilaçların DNA topoizomeraz I ve II'yi inhibe ettiklerinin tespit edilmesi ile birlikte bu enzimin inhibisyonu üzerine günümüzde artan sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında Prof. Dr. Esin AKI-YALÇIN ve Prof. Dr. İsmail YALÇIN ve grubu DNA-Topoizomeraz enzimine karşı etkili yeni bazı heterosiklik yapıdaki bileşikleri araştırma-geliştirme çalışmalarını yürütmektedir. 2006-2014 yıllarında gerçekleştirdikleri bazı çalışmalar oldukça dikkat çekici bulunmuştur. Bu çalışmalarda, grup tarafından sentezleri gerçekleştirilmiş orjinal bazı bileşiklerin DNA topoizomeraz I ve II enzimlerine karşı inhibitör etkinlikleri incelenmiş ve sentezlenen bileşiklerden bazılarının standart olarak kullanılan ilaçlardan daha etkili olduğu saptanmıştır (13,156-159).

Pınar ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, 37 adet 2,5,6-trisübstitüe benzoksazol, benzimidazol, benzotiyazol ve oksazolo(4,5-*b*)piridin türevi bileşiğin, topoizomeraz II enzimi inhibisyonu etkilerini incelemişlerdir. Bu bileşikler içerisinde 2-fenoksimetilbenzotiyazol, 2-(2-metoksifenil)-6-nitro benzoksazol, 2-(feniltiyometil)-5-(metilkarboksilat)benzimidazol ve 6-metil-2-(2-nitrofenil)benzoksazol bileşiklerinin referans ilaç etopositten daha etkili olduğu saptanmıştır (15).

2005 Yılında Yalçın ve ark tarafından yayımlanmış bir çalışmada, bazı benzoksazol ve benzoksazin türevlerinin L5718, insan mdr-1 geni içeren sıçan lenfoma hücre kültürleri üzerinde apoptosizin inhibisyonu ve indüksiyonu araştırılmıştır. Kayda değer sonuçlara ulaşılmıştır. Bu çalışmaya göre, 5-(*p*-nitrobenzamido)-2-benzilbenzoksazol, 6-metil-2-(*o*-klorofenil)benzoksazol ve 5-(*p*-nitrofenoksiasetamido)-2-fenilbenzoksazol bileşikleri sıçan lenfoma hücresinde apoptotik etkiyi artırmak suretiyle etki göstermiştir. Ayrıca ilk iki bileşik ile birlikte 5-(2-tiyenilkarboksamido)-2-fenilbenzoksazol bileşiği 12H-benzo(*a*)fenotiyazin bileşiğinin apoptotik etkisini artırmaya yardımcı olduğu ortaya konmuştur (16).

2006 Yılında yapılan başka bir çalışmada 2-(*p*-klorofenil)-5-sübstitüe fenilkarboksamido-benzoksazol yapılarının ilaçlara dirençli mide kanserinden türevlendirilmiş EPG85-257RNOV and EPG85-257RDB alt türlerine, pankreas kanserinden türevlendirilmiş EPP85-181RNOV and EPP85-181RDB alt türlerine, göğüs kanserinden türevlendirilmiş MCF-7/Adr alt tipine, fibrosakomadan türevlendirilmiş D79/86RNOV alt tipine, ve melanomadan türevlendirilmiş MeWoETO1 alt tipine karşı güçlü antineoplastik etkili bulunmuşlardır. Bu çalışmada özellikle 5-(2-tiyenil)karboksamido-2-(fenil)benzoksazol bileşiği göğüs kanserinden türevlendirilmiş MDA-MB-231ROV alt tipine karşı en yüksek antineoplastik etki gösterdiği bildirilmiştir (13).

Diğer aktiveteye sahip olan bileşiklerin, 2007 yılında yine Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında bir grup araştırmacı, yeni bir dizi N-(2-hidroksi-4-(veya 5)-nitro/aminofenil) benzamid ve fenilasetamid oluşturulan antimikrobiyal ajanlar keşfedilmiştir. Bu bileşiklerin antikanser etkiye sahip olmaları da beklenmektedir (10).

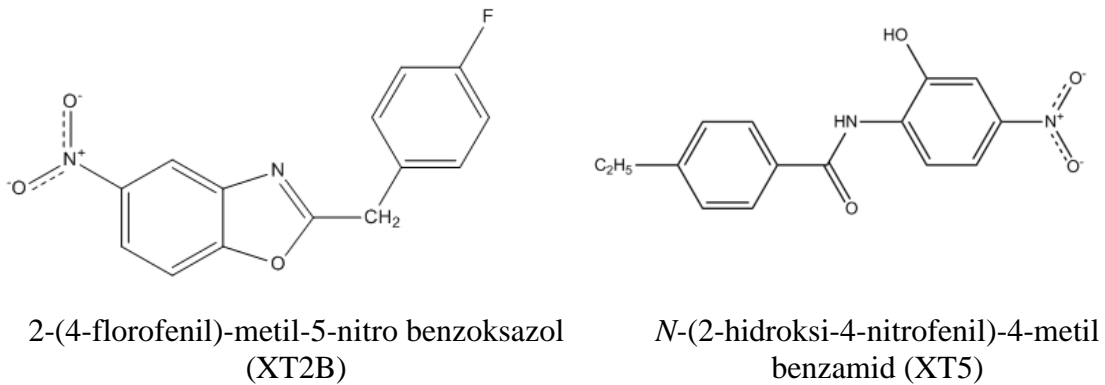
2009 yılında ise 5-etilsulfonil-2-(p-nitrofenil)benzoksazol bileşiği ilaçlara dirençli tümör hücrelerinde ve bakterilerde süstitüe disiloksan bileşiklerinin apoptotik aktivitesini artırıcı etki ile patent alınmıştır (17).

Ayrıca 2013 yılında Aliabadi ve ark. 2-(4-florofenil)-N-fenilasetamid türevlerinin özellikle PC3 (prostat karsinomu) hücre paneline karşı kuvvetli antikanser ajanlar olduklarını belirtmişlerdir (18).

2014 yılında El-hady ve Abubshait tarafından, bazı imidazolin ve benzoksazol türevleri, insan göğüs tümör hücreleri (MCF-7) ve insan hepatoselüler kanser hücreleri (HePG2) üzerine antikanser etkileri araştırılmış ve kayda değer sonuçlara ulaşılmıştır. Sentezlenen benzoksazol türevleri insan hepatoselüler kanser hücrelerine karşı bilinen ilaçlardan Vinblastin karşılaştırdığında etkili bulunmuştur (160).

2015 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Meral Beksaç ve grubu tarafından, 4 çeşit insan miyelom hücre hatlarında 11 molekülün (benzoksazol ve benzamid-fenilasetamid türevleri) ön tarama testleri yapılmış ve sonucunda XT2B ve XT5 (Şekil 2.14.) kodlu bileşiklerin, *in vitro* ortamda, hücre çoğalmasını inhibe etmek için umut verici bileşikler olduğu bulunmuştur. Bu bileşiklerin, PAR1 inhibitörü olarak antikanser etkiye sahip olacakları yorumlanmıştır (161).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, PAR1 için etkili bilinen moleküllerden antitromboz vorapaksar ve atopaksar, multipl myelom için bilinen ilaçlar, artesunate ve şekil 2.14'de formülleri verilen Prof. Dr. Esin AKI-YALÇIN ve grubu tarafından sentezlenmiş ve antikanser etkileri gözlenmiş moleküllerden hareketle, PAR1 ile etkileşme mekanizmaları moleküler doking yöntemi kullanılarak aydınlatılmıştır.



Şekil 2.14. XT2B ve XT5 bileşiklerinin formülü

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kanser gelişmiş ülkelerde önde gelen ve gelişmekte olan ülkelerde ise ikinci sırada gelen ölüm nedenidir (1). Standart tedavi protokollerinin kullanımı hala yeteri kadar başarılı olamamaktadır. Kanser hastalıklarında mevcut ilaçların çoğunlukla toksik olmaları ve ilaç direnci gibi sorunlarla karşı karşıya gelmeleri nedeniyle, kanser hastalıkları için yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle de, kanser tedavisinde yeni kullanılabilir etkin kemoterapötik maddelere gereksinim bulunmaktadır (2). Multipl miyeloma kemik iliğinde bulunan plazma hücrelerinde oluşan bir kanser türüdür. Başlangıçta birçok kemoterapötik ajana duyarlı olsa da, multipl miyelomlu hastalarda sıklıkla, birden fazla ilaca direnç gelişmekte ve hastalık durumu tekrarlanabilmektedir (3). Son yıllarda, PAR1, başta Multipl Myelom olmak üzere çeşitli kanser türlerinde ve metastatik safhada umut verici bir hedef olarak saptanmıştır. PAR reseptörleri, özellikle PAR1 gerek kanserde, gerekse de kalp damar, kas-iskelet sistemi, gastrointestinal sistem, solunum ve merkezi sinir sistem bozukluklarında yeni terapötik maddelerin geliştirilmesi için önemli bir hedef haline gelmiştir (4). PAR1'i inhibe etmek için yapılan çalışmalarda, trombini ya da PAR1'i doğrudan inhibe eden antagonist yapılar üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Klinik aşamaya ulaşmış en ileri antagonist yapıları Varopaksar (SCH 530348) ve Atopaksardır (E-5555). Vorapaksar (SCH 530348) klinikte kullanılmakta olup, aspirin ve klopidogrel ile birlikte alındığı zaman beyinde kanama riskini arttırmaktadır (6). Atopaksar (E-5555) PAR1 inhibitörü ve faz 2 aşamasında denemeleri yapılmakta iken belirli bir dozu ile, karaciğer ve kalp fonksiyonlarında anormal artış gözlenmesi klinik geliştirilmesini durdurmuştur (50,51).

Öte yandan, araştırmalar, bazı heterosiklik çekirdek taşıyan yapıların oldukça güçlü antienflamatuvar (8), antimikrobiyel (9,10), antifungal (11), antiviral (12), antineoplastik (13), antitümör (14) aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir. Benzoksazol ve analogları üzerinde de değişik mekanizmalara dayalı antikanser etki çalışmaları süregelmektedir. Ayrıca, benamid ve fenilasetamit türevleri üzerinde de benzer çalışmalar mevcuttur. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında bir grup araştırmacı DNA-Topoizomeraz enzimini inhibe etmek yolu ile, antikanser etki gösteren yeni bazı heterosiklik yapıdaki bileşiklerin araştırma-geliştirme çalışmalarını yürütmektedir. 2004 ve 2007 yıllarında Akı-Yalçın, E. ve Yalçın, İ. ve grubu tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, sentezlenen orjinal bazı bileşiklerin DNA topoizomeraz I ve II enzimlerine

karşı inhibitör etkinlikleri incelenmiş ve bu bileşiklerden bazılarının standart olarak kullanılan ilaçlardan daha etkili olduğu saptanmıştır. Aynı grup tarafından 2004’de yapılan bir çalışmada, 37 adet 2,5,6-trisüstitüe benzoksazol, benzimidazol, benzotiyazol ve oksazolo(4,5-*b*)piridin türevi bileşiğin, topoizomeraz II enzimi inhibisyonu etkileri incelenmiştir. Bu bileşikler içerisinde 2-fenoksümetilbenzotiyazol, 2-(2-metoksifenil)-6-nitro benzoksazol, 2-(feniltiyometil)-5-(metilkarboksilat)benzimidazol ve 6-metil-2-(2-nitrofenil)benzoksazol bileşiklerinin referans ilaç etopositten daha etkili bulunmuştur (15). 2005 yılında ise grup, yayımlanmış oldukları bir çalışmada, bazı benzazol ve benzoksazin türevlerinin L5718, insan MDR-1 geni içeren sıçan lenfoma hücre kültürleri üzerinde apoptozun inhibisyonu ve indüksiyonu araştırılmış ve kayda değer sonuçlara ulaşmışlardır. Bu çalışmaya göre, 5-(*p*-nitrobenzamido)-2-benzilbenzoksazol, 6-metil-2-(*o*-klorofenil)benzoksazol ve 5-(*p*-nitrofenoksiasetamido)-2-fenilbenzoksazol bileşikleri sıçan lenfoma hücresinde apoptotik etkiyi artırmak suretiyle etki göstermiştir. Ayrıca ilk iki bileşik ile birlikte 5-(2-tienilkarboksamido)-2-fenilbenzoksazol bileşiği 12*H*-benzo(a)fenotiyazin bileşiğinin apoptotik etkisini artırmaya yardımcı olduğu ortaya konulmuştur (16).

2006 yılında Akı-Yalçın ve ark tarafından yapılan başka bir çalışmada 2-(*p*-klorofenil)-5-süstitüefenilkarboksamido-benzoksazol yapılarının ilaçlara dirençli mide kanserinden türevlendirilmiş EPG85-257RNOV ve EPG85-257RDB alt türlerine, pankreas kanserinden türevlendirilmiş EPP85-181RNOV ve EPP85-181RDB alt türlerine, göğüs kanserinden türevlendirilmiş MCF-7/Adr alt tipine, fibrosarkomadan türevlendirilmiş D79/86RNOV alt tipine ve melanomadan türevlendirilmiş MeWoETO1 alt tipine karşı güçlü antineoplastik etki gösterdikleri saptanmıştır. Bu çalışmada özellikle 5-(2-tiyenil)karboksamido-2-fenilbenzoksazol bileşiği göğüs kanserinden türevlendirilmiş MDA-MB-231ROV alt tipine karşı en yüksek antineoplastik etkiyi gösterdiği bildirilmiştir (13). 2009 yılında ise 5-etilsülfonil-2-(*p*-nitrofenil)benzoksazol bileşiği ilaçlara dirençli tümör hücrelerinde ve bakterilerde süstitüe disiloksan bileşiklerinin apoptotik etkisini arttırıcı etkisi ile patent alınmıştır (17). Ayrıca 2013 yılında Aliabadi ve ark. tarafından, 2-(4-florofenil)-*N*-fenilasetamid türevlerinin, özellikle PC3 (prostat karsinomu) hücre paneline karşı kuvvetli antikanser etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (18).

Yeni ilaçların bulunmasında, yan etkilerinin ve toksik etkilerinin azaltılmasında, istenen farmokokinetik ve farmakodinamik özelliklerin belirlenmesinde bilgisayar destekli ilaç

tasarım ve geliştirilmesi çalışmalarından (CADD) yararlanılmaktadır. Organizmanın yapısı ve ilaç molekülünün organizmadaki yolculuğunun karmaşıklığı göz önüne alındığında ve pek çok hastalığın nedenlerinin tam olarak açıklanamaması, ayrıca emek, zaman, yatırım maliyetlerinin çok fazla olması gibi nedenlerle rasyonel biçimde bilgisayar aracılığı ile ilaç tasarlama zorunluluğu doğmuştur. CADD teknikleri ile biyoteknoloji alanında kemoinformatik ve biyoinformatik bilgiler sağlanmaktadır. Günümüzde ilaçların etkileştiği organizmadaki moleküler hedeflerin bir bölümü bilinmekle beraber, daha yapıları aydınlatılmamış bir çok moleküler hedef bulunmaktadır. Henüz yapıları aydınlatılmamış olan makromoleküllerin yapılarının yorumlanmasında CADD yöntemlerinden yararlanılarak biyoinformatik bilgiler oluşturulmaktadır. Bu çalışmalar arasında, başlıca farmakofor analizleri, yüksek verimli sanal tarama (HTS), doking sıralanabilir. Tez projesi kapsamında, proteomiks ve kemoinformatik alanlarında yapılan çalışmalar ile biyoteknoloji alanına yeni biyoinformatik veriler ile katkıda bulunulacak ve yeni etkili ilaç etken maddeleri önerilerek tedavide yeni ilaçların önerilmesi gerçekleştirilecektir (52). CADD, mevcut ilaçlara ve hastalıklara ait birikmiş bilgileri diğer sahalardaki disiplinlerarası verilerle kombine halde kullanarak ilaç geliştirme sürecini hızlandırmaktadır. CADD teknikleri ile biyoteknoloji alanında kemoinformatik ve biyoinformatik bilgiler sağlanmaktadır. Günümüzde ilaçların etkileştiği organizmadaki moleküler hedeflerin bir bölümü bilinmekle beraber, daha yapıları aydınlatılmamış bir çok moleküler hedef bulunmaktadır. Henüz yapıları aydınlatılmamış olan makromoleküllerin yapılarının yorumlanmasında CADD yöntemlerinden yararlanılarak biyoinformatik bilgiler oluşturulmaktadır. Bu çalışmalar arasında, başlıca farmakofor analizleri, yüksek verimli tarama (HTS), doking sıralanabilir. Tez projesi kapsamında, proteomiks ve kemoinformatik alanlarında yapılan çalışmalar ile biyoteknoloji alanına yeni biyoinformatik veriler ile katkıda bulunulacak ve yeni etkili ilaç etken maddeleri önerilerek tedavide yeni ilaçların önerilmesi gerçekleştirilecektir (52)

Biyoteknoloji kapsamında proteomiks çalışmaları yakın zamanda önemli bir alanı oluşturmuştur. Hücredeki fonksiyonel moleküllerden olan proteinler ilaçların etki göstermesinde majör hedeflerdir. Proteomiks, protein yapısındaki hedeflerin ve hastalık sürecindeki biyokimyasal yolların tanımlanmasında büyük umutlar vaat etmektedir. Proteomiks, çok basamaklı ilaç geliştirme işleminde giderek önemi artan bir rol oynamaktadır. Bu işlem hedef tanımlanmasını, validasyonunu, önder bileşik seçimini, küçük moleküllerle tarama ve optimizasyonu ve de toksisite testlerini kapsamaktadır.

Bunun ötesinde, bilgisayarlı proteomiks, kimyasal proteomiks, yapısal proteomiks ve topolojik proteomiks gibi alt disiplinler, özellikle bilgisayar destekli ilaç tasarımına belirgin katkılar sunmaktadır. Akılcı ilaç tasarımında, ilk olarak patogeneizde hangi proteinlerin ilaç hedefi olabileceğinin bulunması esastır.

Biyoteknoloji kapsamında biyoinformatik alanında, ilaç keşfi sürecinde, özellikle yapısal biyoinformatik alanında, çok büyük katkı sağlanmaktadır. Bu alan, proteinler, RNA ve DNA gibi büyük makro moleküllerin üç boyutlu yapısının analiz ve bulunması ile ilgilidir. Hücre içinde, çoğunlukla ilaç/terapötik hedefleri protein yapıları (reseptörü) bulunmaktadır. Bu nedenle üç boyutlu proteinlerin yapıları, ilaç keşfi ve geliştirme sürecinde çok büyük rol oynamaktadır.

Biyoinformatik bilgilerin zenginleşmesi, biyolojik hedeflerin yorumlanabilmesi ile mümkün olur. Genom ve protein dizilimleri bize hastalıkların tedavisinde, yan etkileri ve toksik etkilerinden arındırılmış ilaçların bulunmasını sağlar (53).

Bu tez çalışması, kemoinformatik ve biyoinformatik verilerden yararlanılarak ve *in silico* olarak Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD) yöntemleri kullanılarak PAR1'e karşı antikanser etki mekanizmasının detaylı analizi üzerine odaklanmıştır. Çalışmanın başlıca amacı Prof. Dr. Esin AKI-YALÇIN ve grubu tarafından daha önce sentezlenmiş, benzoksazol ve benzamid türevi bileşiklerden, değişik mekanizmalar ile antikanser etki gösterdikleri saptanmış XT5 ve XT2B'in, PAR1'e karşı inhibitör etkilerini açıklamaktır.

Bu çalışma kapsamında, moleküler modelleme tekniklerinden moleküler doking yöntemi ve bazı puanlama fonksiyonu (NNScore ve HYDE) kullanılarak PAR1 ile daha detaylı ve rasyonel olarak XT5 ve XT2B moleküllerinin etkileşim mekanizması aydınlatılmıştır. Böylece, Multipl Miyeloma ve genel kapsamda kanser tedavisinde daha etkin yeni antikanser ilaçların geliştirilmesine katkıda bulunulacak ve mortalite oranının azaltılmasına yardımcı olacak yeni önder bileşiklerin moleküler yapıları belirlenecektir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. 3D PROTEİN VE LİGANT YAPILARININ ELDE EDİLMESİ

Yüksek lisans tezi kapsamında, PAR1 protein üzerinde yapılan doking çalışması için ön çalışma olarak, insan PAR1 proteini ile referans ligant/inhibitör olarak vorapaksar kullanılmıştır. Protein yapısı olarak Protein Veri Bankası (PDB)'nden 2,2 Å çözünürlüğü 3VW7 kodlu kristal yapı elde edilmiştir (5). Sadece transmembrana denk gelen bölge incelenmiştir. Bazı su molekülleri ve ko-kristalize ligant olan vorapaksar çıkarıldıktan sonra doking analizleri için bu kristal yapı reseptör olarak hazırlanmıştır.

Yapılan analizlerde kullanılan benzoksazol türevleri (XT2B) ve benzamit türevlerini (XT5) kapsayan 3 boyutlu ligant yapıları, araştırma grubumuzdan elde edilmiştir. Ayrıca, karşılaştırmalı moleküler doking çalışmaları için ise Zinc (162) veritabanından alınan vorapaksar (6), atopaksar (7) ve artesunat (163) yapıları kullanılmıştır (Çizelge 4.1.).

4.2. LİGANTLARIN FİZİKO-KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI

Ligantların yapıları elde edildikten sonra, ilaç benzerlik etkilerini ve ligantlara ait fiziko-kimyasal özellikleri test etmek amacıyla, BIOVIA Discovery Studio 3.5'te bulunan Lipinski'nin 5 kuralını (164) ve Veber'in kurallarını (165) kapsayan Moleküler Özellikleri Hesaplama yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

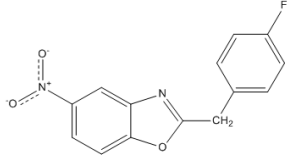
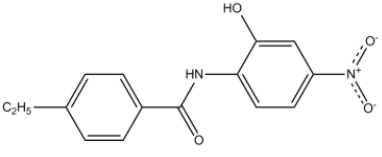
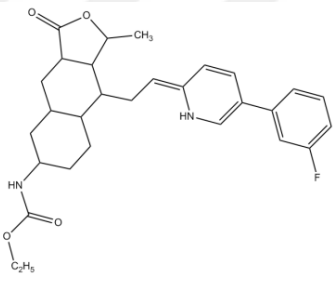
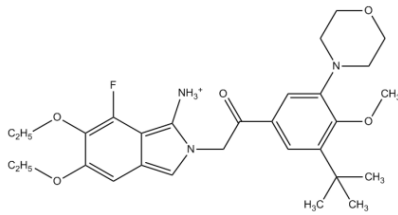
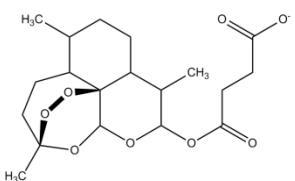
Lipinski'nin 5 kuralını ve Veber'in kurallarını kapsayan test edilen fiziko-kimyasal parametreleri, moleküler ağırlığı (MW), lipofilisite (AlogP), hidrojen akseptörü sayısı (HA), hidrojen vericinin sayısı (HD), dönebilen bağların sayısı (ROTB) olmak üzere, halka yapıların sayısı, aromatik halkaların sayısı ve moleküler polar yüzey alanı (PSA) gibi parametreleri içermektedir. Bütün doking yapılacak ligantlara bu kurallar uygulanmıştır.

4.3. 3D PROTEİN VE LİGANT YAPILARINI HAZIRLANMASI

Moleküler doking çalışmaları yapılmadan önce PAR1 proteini ve ligantlar doking koşullarına göre hazırlanmıştır. PAR1 proteininin kristal yapısı Biovia Discovery Studio 3.5 hazırlık yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (118). Protein, kullanılan yapıları kayıp hidrojen atomlarını ekleyerek ve bazı grupların bağların sıra atamalarını, yük durumlarını ve konumlarını düzelterek hazırlanmaktadır. Bu uygulama komşu gruplarla girilen yük-yük etkileşimlerini geliştirebilmek için gerçekleştirilmiştir. Protein hazırlama süresinin son

aşamasında ise, ABNR (*adopted-basis Newton-Raphason*) yöntemi ile CHARMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*) kuvvet alanının kullanılarak minimize edilmiştir.

Çizelge 4.1. PAR1'e karşı yapılan moleküler doking ligantların yapısı

No	Ligantlar	2D Yapıları
1	XT2B	 <p>2-(4-Florofenil)metil-5-nitrobenzoksazol</p>
2	XT5	 <p>N-(2-Hidroksi-4-nitrofenil)-4-etilbenzamid</p>
3	Vorapaksar	
4	Atopaksar	
5	Artesunat	

Moleküler doking yapılacak tüm ligantlar, 3D yapıları Zinc veritabanından elde edildikten sonra, Biovia Discovery Studio 3.5 programı kullanılarak, hidrojen atomları eklenip ABNR metodu ile minimize edilmiştir ve moleküler dinamik yöntemlerinden Heat and

Cool (700K-200K) ile moleküllerin düşük enerjili uygun konformasyonları elde edilmiş ve doking işlemi için hazır hale getirilmiştir (118).

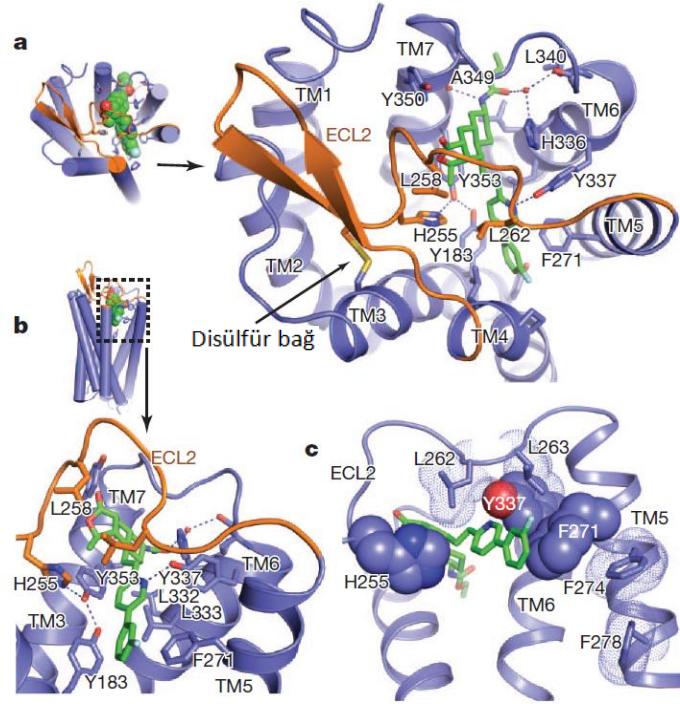
4.4. MOLEKÜLER DOKING UYGULANMASI VE ANALİZLERİ

Reseptör ve belirli ligantlar arasındaki etkileşim olasılığını ayırt edebilmek amacıyla moleküler doking yöntemi uygulanmıştır. Bu tez çalışmaları kapsamında, bütün moleküler doking hesaplamaları, Autodock Vina programı kullanarak gerçekleştirilmiştir. Bu hesaplamaları kolaylaştırmak için Autodock/Vina PyMOL eklentisi kullanılmıştır. Bu yardımcı program, ayrıca moleküler doking sürecinin gerçekleştirilebilmesi için bağlayıcı alanların tanımlanması, reseptör ve ligant hazırlanması, grid dosyalarının oluşturulması, doking programının kurulması ve doking işleminine ait bağlayıcı davranışı PyMOL görsel ortamı içerisinde doğrudan gösterebilmektedir. Bu program sayesinde sistematik olarak ve hızlı bir şekilde moleküler doking çalışmalarını gerçekleştirebilmektedir.

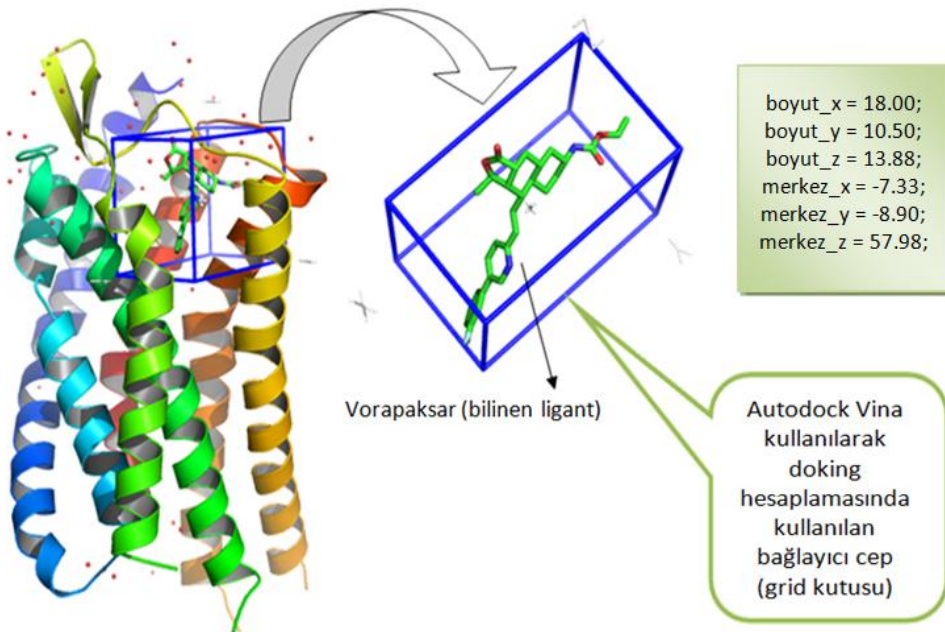
Zhang ve ark., tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada gösterilen PAR1 içindeki vorapaksar bağlanma yöreni Şekil 4.1.'de verilmiştir (5). Bu çalışmada gösterilen bağlanma yöreni ile doking sonucu vorapaksar bağlandığı yöre karşılaştırıldığında uygun bir sonuç elde edildiği görülmektedir.

Kristalografi verilerine göre PAR1 proteini ve vorapaksar ile arasında bulunan etkili olan TYR337, ALA349, LEU340, HIS255, LEU258, HIS336 gibi aminoasit rezidüleri ve bazı su molekülleri üzerine, doking bağlanma yöreni olarak ele alınmıştır (Şekil 4.2.).

Moleküler doking yaklaşımı kullanılarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki adımlar takip edilmiştir: (i) PAR1 ve vorapaksar ile moleküler doking çalışması, (ii) bilinen ligantlar ve test edilecek bileşiklerin (XT2B ve XT5 bileşikleri) PAR1 ile moleküler doking çalışmaları (iii) NN (*Neural Network*) skorlama fonksiyonu (166) ve HYDE programı (167) kullanılarak serbest enerji hesaplamaları. Tüm etkileşim sonuçları BIOVIA Discovery Studio görsel programı kullanılarak görüntülenmiştir (118).



Şekil 4.1. İnsan PAR1 proteini ile vorapaksar bağlanma etkileşimleri (5). **a, b**, Hücre-dışı yüzeyinden görünen (**a**) ve transmembran sarmal demeti tarafından görünen ligant bağlanma yöresi (**b**). ECL2 (*Extracelullar Loop 2*) bölgesi **a** ve **b** şeklinde turuncu renk olarak gösterilir. Bilinen ligant vorapaksar yeşil renk olarak gösterilir. Su molekülleri kırmızı küreler olarak gösterilir. Hidrojen bağları nokatlı çizgiler olarak görüntülenmiştir. **c**, ECL2 bölgesindeki, 2 amino asit rezidu, LEU262 ve LEU263 (noktalı yüzeyler olarak gösterilir), ve bu kalıntı karşı paketi olan diğer reziduler HİS255, PHE271 ve TRY337 gibi (Corey–Pauling–Koltun (CPK) temsili olarak gösterilir), insan PAR1 için vorapaksar seçiciliğine katkıda bulunabilir. Ayrıca, TM5 (transmembran 5) bölgesindeki bulunan PHE274 ve PHE278 reziduler (noktalı yüzeyler olarak gösterilir) dolaylı olarak vorapaksar bağlanmasını etkileyebilmektedir



Şekil 4.2. Moleküler doking çalışmalarında oluşturulan bağlanma yöresi

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. LİGANTLARIN FİZİKO-KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI

Biovia Discovery Studio 3.5 Moleküler Özellikleri Hesaplama Yöntemi kullanılarak yapılan Lipinski'nin 5 kuralına ve Veber'in kurallarına göre ilaç benzerlik etkileri ve ligantlara ait fiziko-kimyasal özelliklerin saptanmasının sonucu, Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Ligantların ait fiziko-kimyasal özellikleri

No	Ligantlar	A _{LogP}	MW	HA	HD	ROTB	Halka Sayısı	Aromatik Halka Sayısı	Moleküler PSA (Å ²)
1	Vorapaksar	4,273	494,598	5	2	6	5	1	76,66
2	Atopaksar	4,308	528,635	7	1	10	4	2	86,06
3	Artesunat	0,371	383,413	8	0	5	4	0	103,35
4	XT2B	3,311	273,239	3	1	3	3	3	70,40
5	XT5	3,105	287,291	4	3	4	2	2	93,69

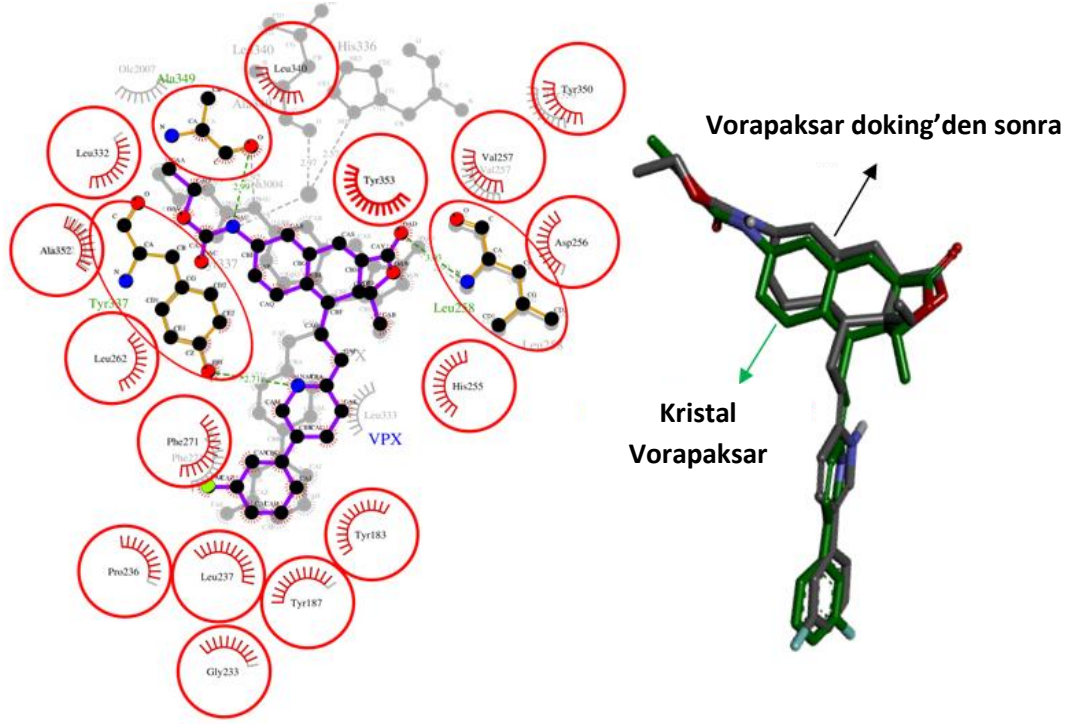
Not : MW = moleküler ağırlığı, HA = hidrojen akseptörü sayısı, HD = hidrojen vericinin sayısı, ROTB = dönebilen bağların sayısı, PSA = polar yüzey alanı.

5.2. MOLEKÜLER DOKİNG HESAPLANMASI

Autodock Vina programı ile kullanılarak yapılan yeniden doking çalışması sonucunda bulunan en uygun konformasyon PAR1 X-ray kristalografisiyle karşılaştırılmıştır. Protein ile ligant arasındaki Hidrojen bağları: TYR337, LEU258, ALA349 ve su molekülleri HOH3004 olmuştur. Diğer bağlanma etkileşim ise su molekülleri HOH3004 ile LEU340 ve HIS336 arasında olmuştur (Şekil 5.1.); ve en uygun konformasyonla X ışınları kristalografisi arasındaki farklılığı ifade eden RMSD değeri: 0,790 Å ve doking skoru -13,3 kkal/mol bulunarak literatüre uygun bir sonuç elde edilmiştir. Bu şekilde valide edilen Autodock Vina yöntemi kullanılarak diğer ligantların moleküler doking işlemi uygun bir sistemde saptanmıştır.

PAR1 proteini ile Autodock Vina programı kullanılarak yapılan moleküler doking çalışması sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Tüm bileşiklerin PAR1 proteini ile yapılmış

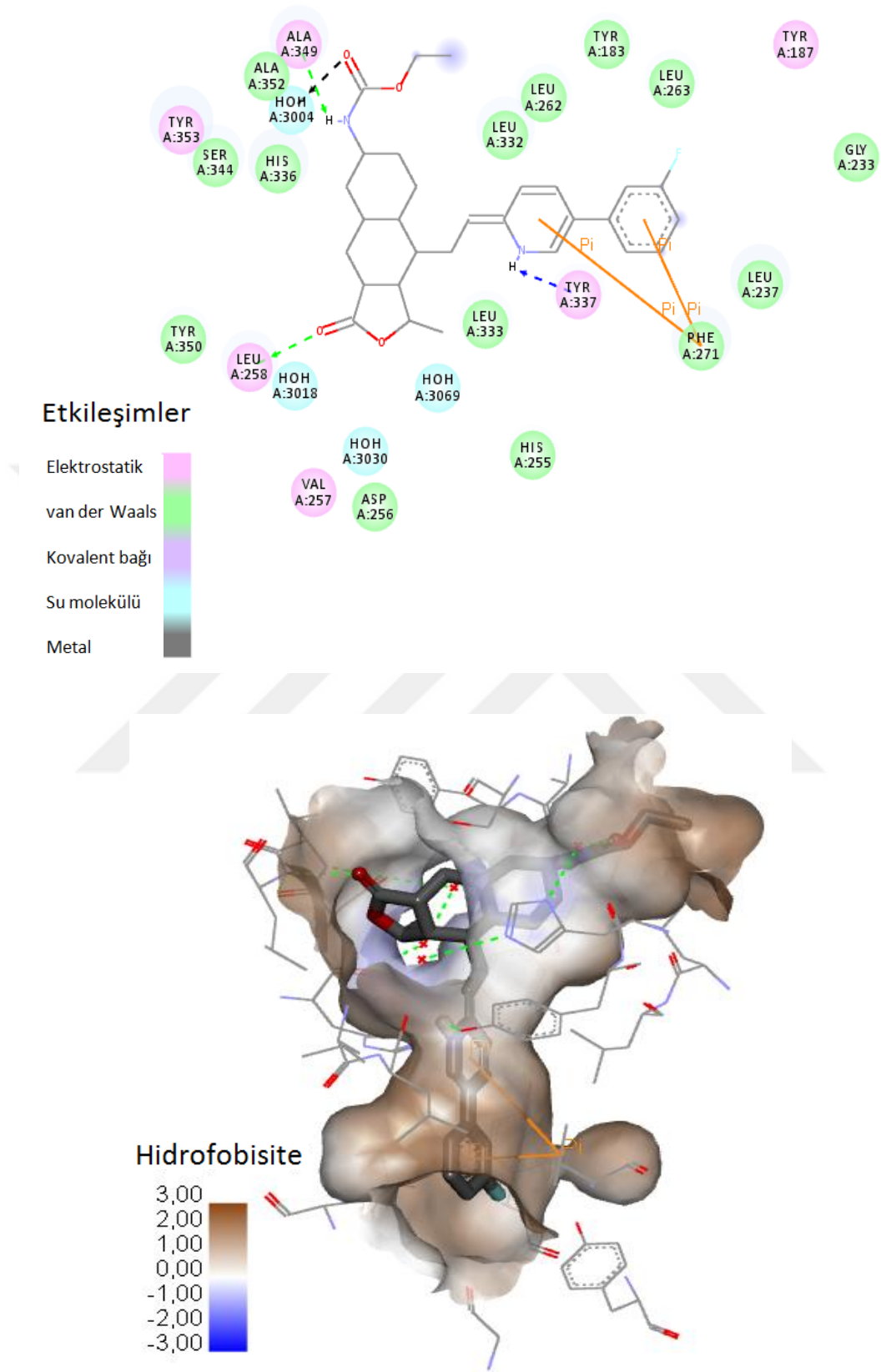
olan doking çalışmalarına ait fotoğraflar ve 2D diyagramlar sırasıyla Şekil 5.2. - Şekil 5.6 arasında verilmiştir.



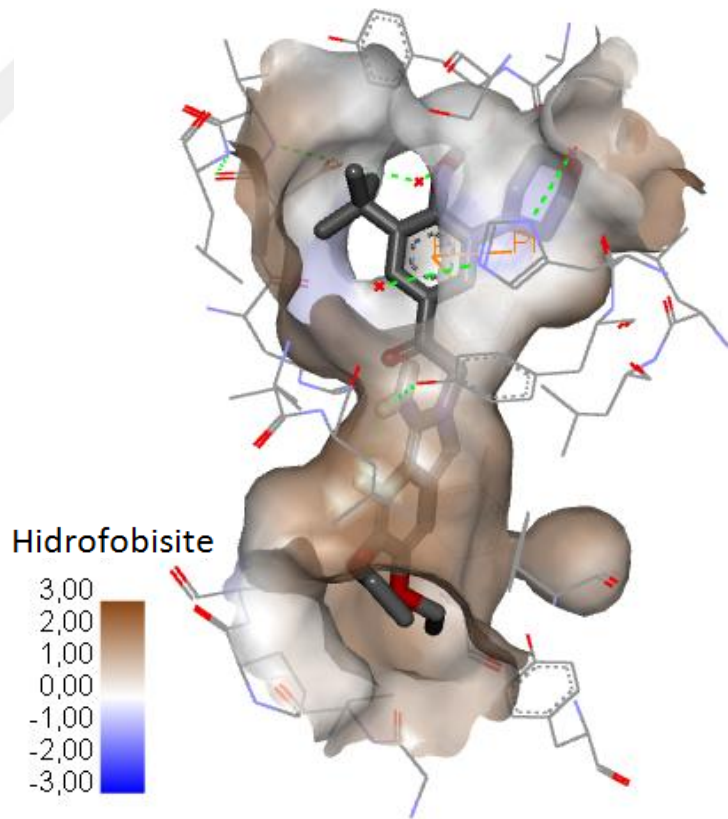
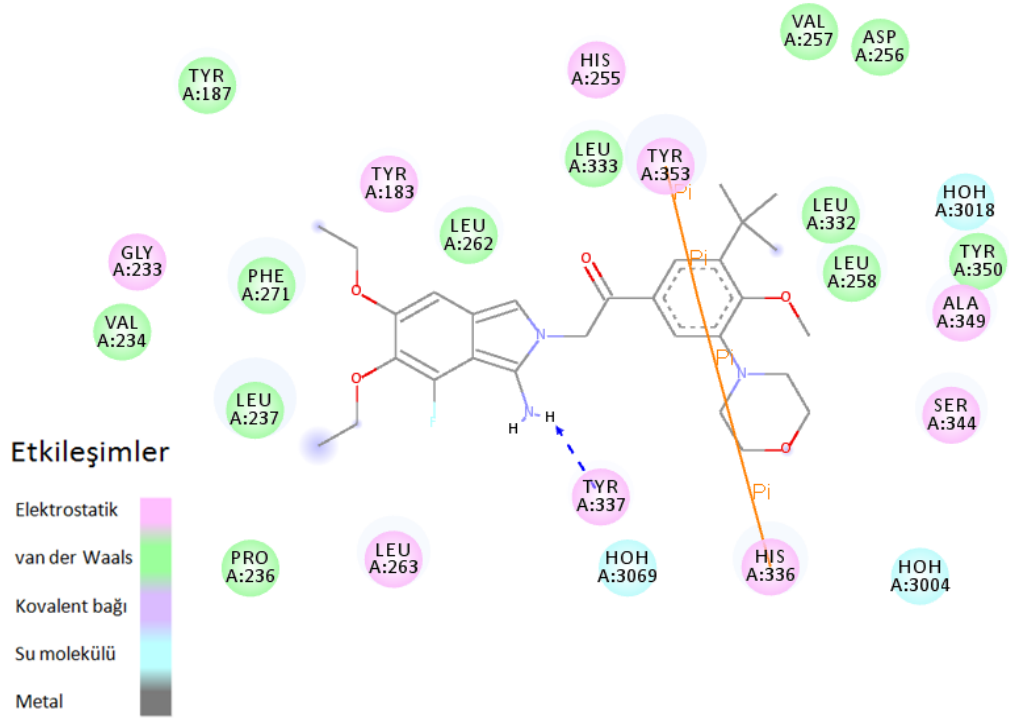
Şekil 5.1. PAR1 için yapılan yinelenen moleküler doking sonucu. Doking skoru = -13,3 kkal/mol, RMSD = 0,790 Å.

Çizelge 5.2. Autodock Vina programı kullanılarak PAR1 için doking sonuçları

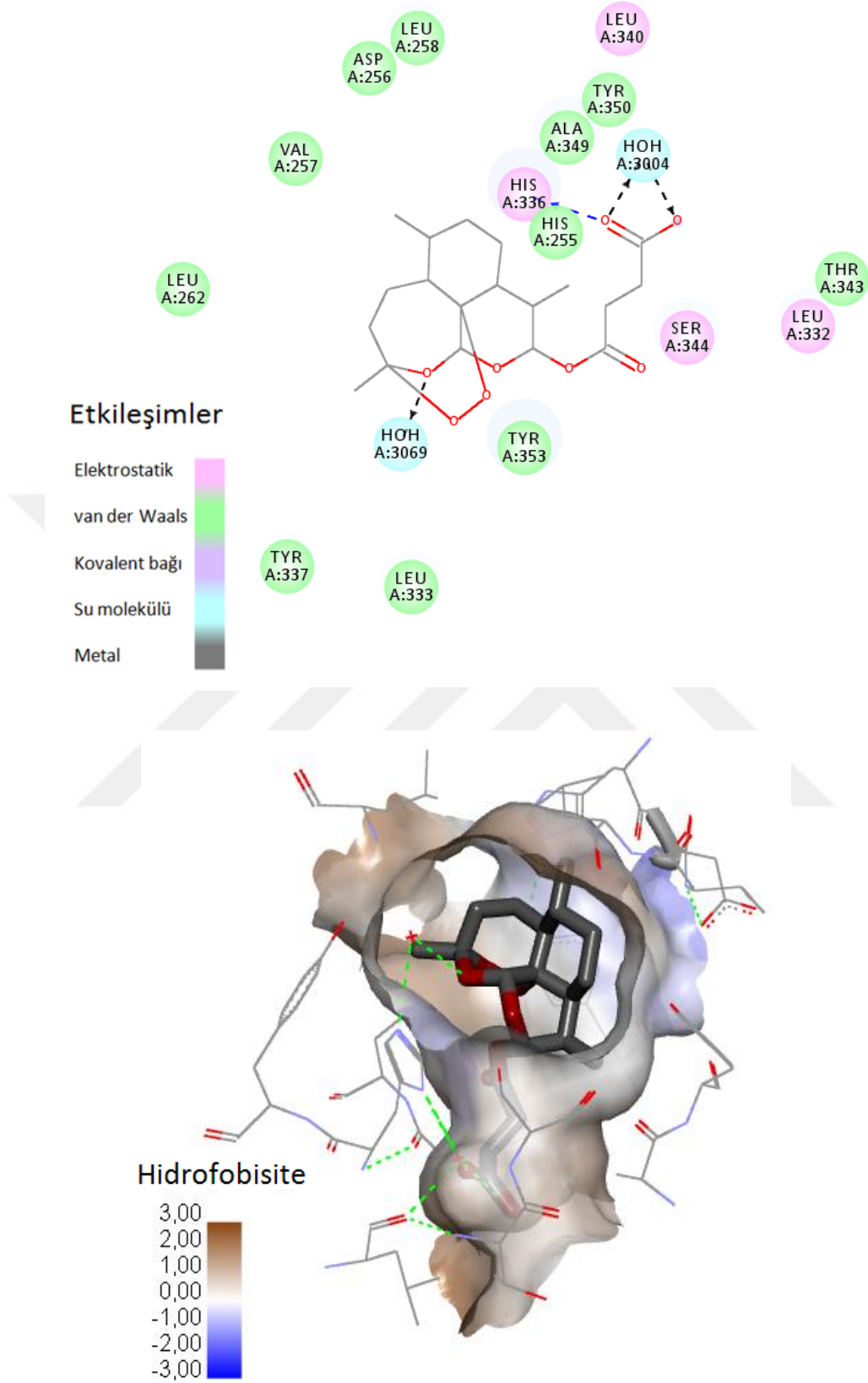
No	Ligantlar	Doking Skoru E_{bind} (kkal/mol)	Amino asit etkileşimleri (van der Waals temas mesafesi <4 Å)
1	Vorapaksar	-13,3	TYR337 , LEU258, ALA349, (HOH3004-LEU340, HIS336)
2	Atopaksar	-8,0	TYR337
3	Artesunat	-9,6	HIS336, (HOH3004 – LEU340), (HOH3069 –THR261, LEU262, TYR337)
4	XT5	-9,9	TYR337 , (HOH3069 – HIS336, THR261, LEU262, TYR337), (HOH3018 – ASP256, TYR95, TYR350)
5	XT2B	-9,1	TYR337 , HOH3069



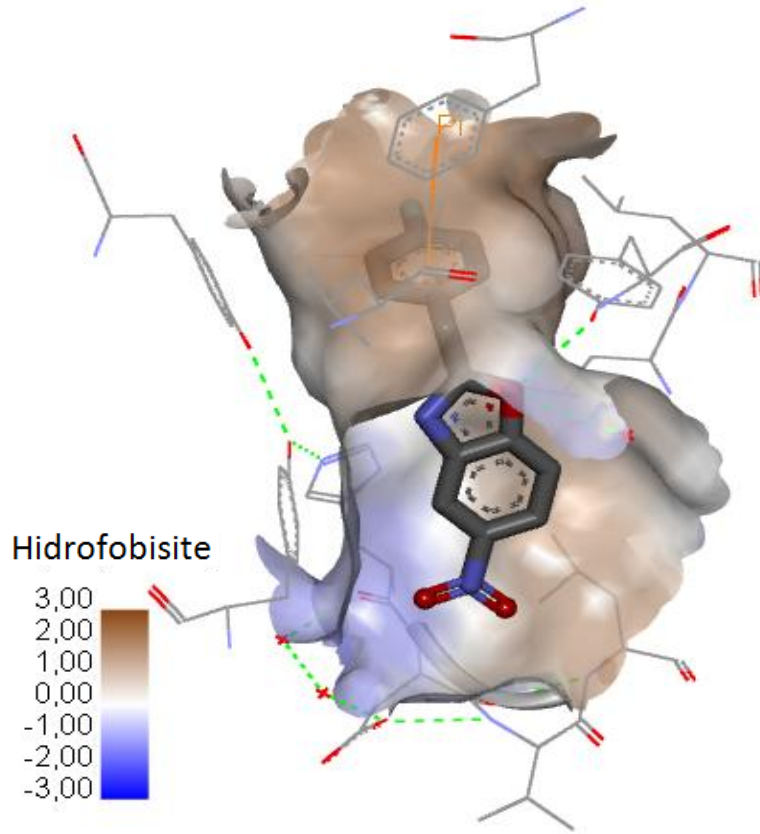
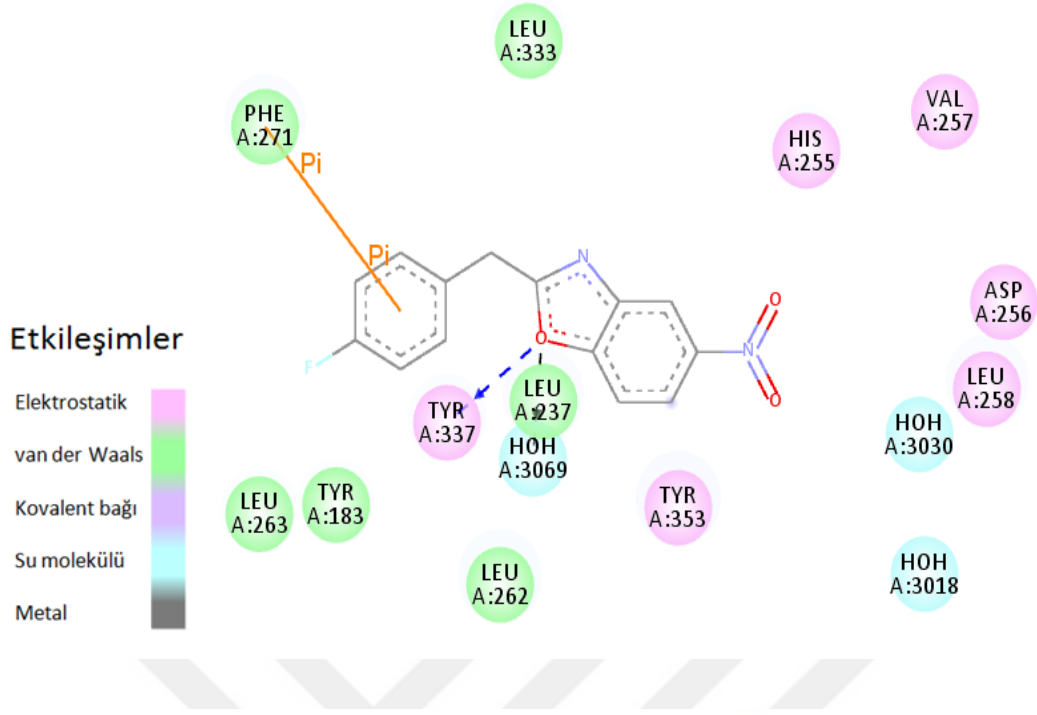
Şekil 5.2. Vorapaksar ile PAR1 arasında etkileşimler



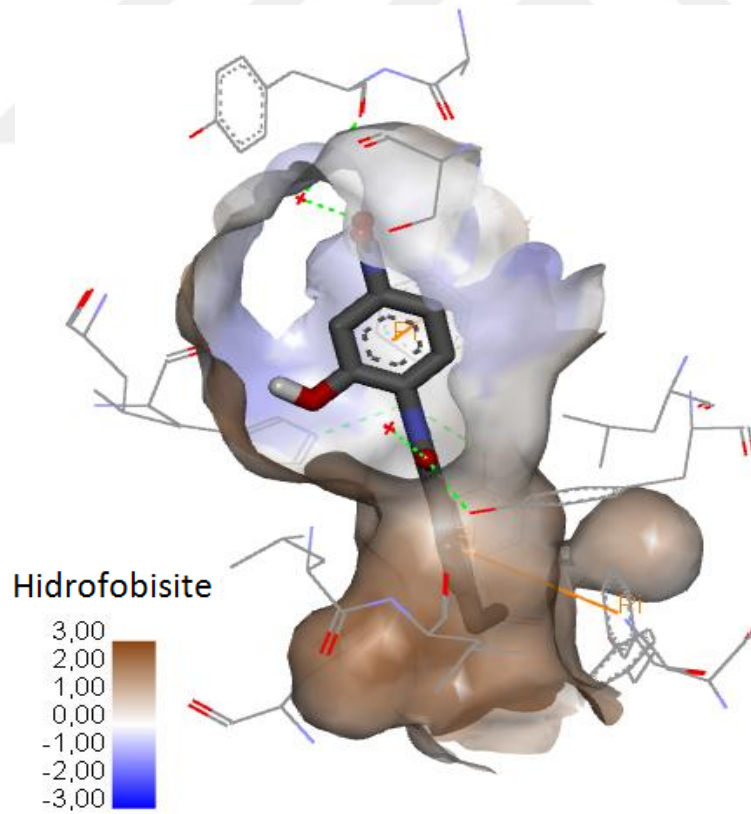
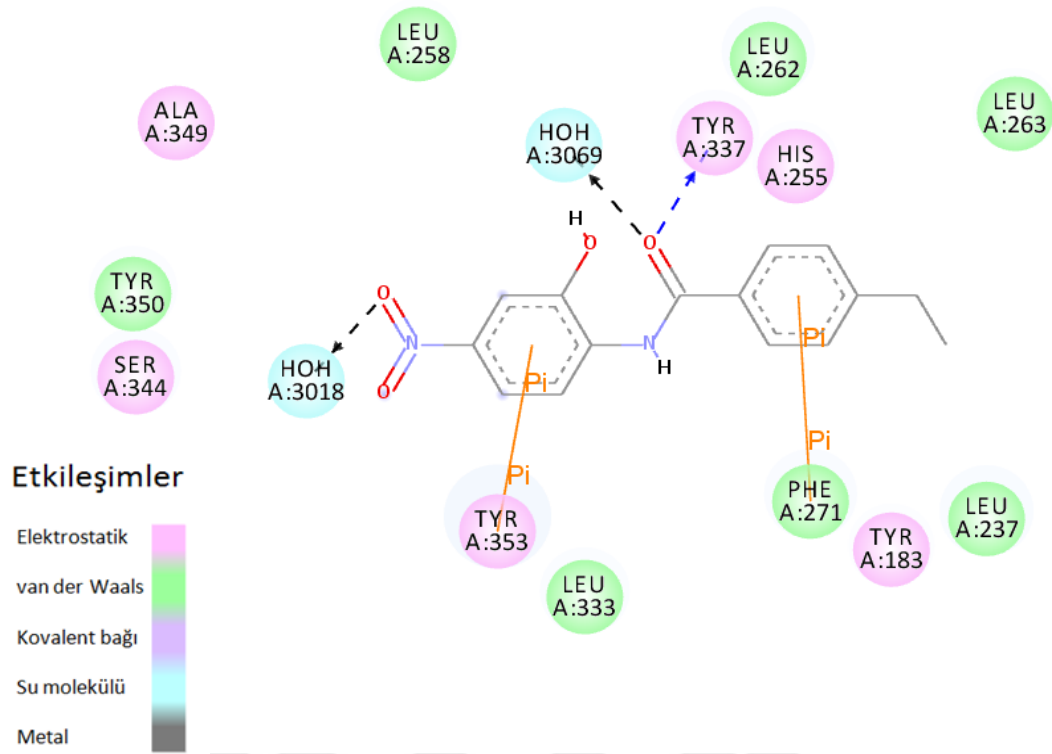
Şekil 5.3. Atopaksar ile PAR1 arasında etkileşimler



Şekil 5.4. Artesunat ile PAR1 arasında etkileşimler



Şekil 5.5. XT2B ile PAR1 arasında etkileşimler



Şekil 5.6. XT5 ile PAR1 arasında etkileşimler

5.3. NN (NEURAL NETWORK) SKORLAMA FONKSİYONU HESAPLANMASI

PAR1 proteini ile Autodock Vina programı kullanılarak yapılan moleküler doking çalışması sonuçları ardından yineden NN skorlama fonksiyonu kullanılarak tahmin edilen ayrışma sabiti (K_d) ve yeni doking skoru Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 5.3. NN Score tarafından sağlanan K_d tahmini (ayrışma sabiti) ve yeniden doking skorlama değerleri

<i>No</i>	<i>Ligantlar</i>	<i>Model</i>	<i>NNScore</i>	<i>STD</i>	<i>Tahmin edilen K_d</i>
1	Vorapaksar	MODEL 1	9,877	2,046	132,86 pM
2	Atopaksar	MODEL 2	6,219	2,678	603,31 nM
3	Artesunat	MODEL 2	6,976	1,517	105,58 nM
4	XT5	MODEL 7	7,590	2,767	25,70 nM
5	XT2B	MODEL 7	7,779	3,618	16,63 nM

Not : STD = standart sapması, K_d = ayrışma sabiti.

5.4. SERBEST ENERJİLERİN HESAPLANMASI

PAR1 proteini ile Autodock Vina programı kullanılarak yapılan moleküler doking çalışması sonuçları takibinde etkileşim afinitesini belirlemek amacıyla HYDE programı kullanılarak tahmin edilen serbest enerjisi, ligant verimliliği ve inhibisyon konsantrasyonu Çizelge 5.4.'te verilmiştir.

Çizelge 5.4. HYDE programı kullanarak serbest enerji tahmini

<i>No</i>	<i>Ligantlar</i>	<i>Serbest Enerji ΔG (kJ/mol)</i>	<i>Ligand Efficiency (LE)</i>	<i>Inhibisyon Tahmini (konsantrasyon)</i>
1	Vorapaksar	-46	0,30	nM
2	Atopaksar	-44	0,28	nM
3	Artesunat	11	0,00	mM
4	XT5	-18	0,21	μ M
5	XT2B	-18	0,21	μ M

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Proteaz aktive eden reseptör 1 (PAR1), hücrelerin bazı proteazlara karşı tepki vermesine yol açan G-Protein-çifti reseptörleri (GPCR) ile ilişkili çeşitli kanser türlerini de kapsayan birçok hastalıkta umut verici bir hedef olarak varsayılmıştır (41-43). PAR1, kanserleri de içeren çeşitli patofizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır ve PAR1 antagonistleri, yeni anti-tümör maddelerin üretilmesi için oldukça elverişli olabilirler.

Daha önce grubumuz tarafından yapılan araştırmalara göre farklı bir yapı kullanılarak sentezlenen bazı yeni bileşenlerin aktivitesi üzerine gerçekleştirilmiştir (161). Teşhis (n:46)(NDMM) ya da yinelemede (n:45)(RRMM) CD38+138+ plazma hücreleri elde edilen hastalarda, akış sitometrisi tarafından ifade edilen PAR1'in incelenmesi için *in vitro* gerçekleştirilen çalışma sonuçları, yapılan kontrollerle karşılaştırılmıştır.

İfade düzeylerinin normal kemik iliği plazma hücrelerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. PAR1 ifadesi ISS, LDH, FISH kemik iliği plazma hücre oranı ya da tedaviye yanıt verme oranı ile ilişkili bulunmamıştır. On bir anti-PAR1 molekülünün laboratuvar ortamında test edilmesi sonucu MTT iki kümesinin (XT5 ve XT2B) en düşük IC₅₀ yoğunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Ek-1). IC₅₀ değerlerinin HMCL'ler üzerinde benzer aralıklarda oldukları ve PAR1 ifadesinin seviyesiyle ilişkili olmadıkları belirlenmiştir.

PAR1, myeloma hastalarında teşhis ve yineleme aşamalarında farklı düzeylerdeki plazma hücreleri tarafından ifade edilmektedir. Bu yeni bağlayıcı PAR1 molekülleri laboratuvar ortamında hem birincil hem de Bortezomib refrakter hücre dizileri üzerinde anti-myelom sitotoksik etkilere sahiptir. Bortezomib içeren tedavilerde direnci artıran heparanaz aktivitenin desteklendiği görüldüğünden bu moleküller, saflaştırıcı heparanaz etkisini engelleyerek aktivitelerini yerine getirebilirler. Sonuç olarak MTT kümeleri olan XT2B ve XT5'in PAR1 içerisinde önemli bir engelleyici aktivite gerçekleştirdikleri bulunmuştur.

Yüksek çözünürlükte kristal yapıya sahip insan PAR1 proteini (PDB: 3VW7) (5) üzerinde bilinen ligantlara karşı, karşılaştırmalı doking çalışmaları gerçekleştirdik ve yeni bileşenlerin test edilmesi için Vina araçları kullandık (112). Dahası, elde edilen sonuçlar

Neural Network (NN) skorlama işlevi (166) ve HYDE bağlayıcı değerlendirme skorlama işlevi (167) kullanılarak doğrulanmıştır.

6.1.1. LİGANTLARIN FİZİKO-KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN SAPTANMASI

Doking hesaplaması yapılmadan önce, ilaç etkisinin ve en çok kullanılan kriterlerden biri olan Lipinski'nin 5 kuralının (*Lipinski's rule of five*) test edilebilmesi için ligantlara ait fiziko-kimyasal özellikler test edilmiştir (164). İlaç etkisi analizinde kullanılan diğer bir kriter ise biyoelverişlilik için önem arz eden Veber kurallarıdır (165). BIOVIA Discovery Studio 3.5 Moleküler Özellik Hesaplaması Yöntemi kullanılarak hesaplanan PAR1 doking çalışması içerisinde kullanılan ligantların fiziko-kimyasal özellikleri Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir. Söz konusu ligantlardan lipofilisite (AlogP), moleküler ağırlık (MW), hidrojen akseptörü sayısı (PSA) gibi önemli özellikler belirlendikten sonra kural ihlallerini (Lipinski'nin orijinal çalışmasına göre) 1'e indirerek, Lipinski'nin 5 kuralı ve Veber'in kural parametrelerine dayanarak ligantları filtrelenmiştir (164). Sonuç olarak, tüm ligantların Lipinski ve Veber'in kurallarını sağladığı görüldü. Filtreleri geçen ligantların biyoelverişlilik oranlarının daha yüksek olduğu belirlendi ve tüm bu bileşenlerin insan vücudunda ilaç etkisi yaratabileceği görüldü.

6.1.2. AUTODOCK VINA İLE MOLEKÜLER DOKİNG HESAPLANMASI

Yeni test edilen bileşikler, benzoksazol ve benzamit türelerinin (XT2B ve XT5 bileşikleri) bağlayıcı afiniteleri PAR1 üzerinde incelendi ve elde edilen sonuçlar bilinen PAR1 antagonistleri olan vorapaksar ve atopaksar ile ve yeni araştırılan multipl miyelom (MM) üzerinde antikanser etkilere sahip sıtma ilacı olan artesunat (168) ile karşılaştırıldı.

Moleküler doking, bağırsız yapılardan, MD simülasyonlarından elde edilen yapılardan ya da homoloji modelinden başlayarak, makro moleküllerin ya da bir makro molekül (reseptör) ve küçük bir molekülün (ligant) kovalent olmayan bağlarının tahmin edilmesine çalışan hesaba dayalı bir prosedürdür. Burada hedef, bağ oluşumlarının ve bağlanma afinitesinin bulunmasıdır. Bu çalışmada kullanılan moleküler doking tekniği, Autodock Vina kullanarak PAR1 karşıtı ligantların bağlanma durumlarının analiz edilmesini amaçlanmaktadır. Kullanılan moleküler doking programı yaygın olarak kullanılan, en çok atıfta bulunulan ve bilgisayar ortamındaki (*in silico*) moleküler doking çalışmalarında en iyi sonuçları veren programdır (112). Moleküler doking akışı olarak, kristalize edilmiş PAR1 ve ligantı, vorapaksar arasında yinelenen doking işlemi ile başlamıştır. Yinelenen

moleküler doking çalışmasının sonucunda RMSD skoru 0,790 Å ve moleküler doking skoru 13,3 kkal/mol olarak elde edilmiş ve vorapaksara bağlı PAR1 kristal yapılarıyla önemli bir benzerlik tespit edilmiştir (Şekil 5.1.). Moleküler doking çalışmasının yinelenmesi oldukça önemlidir, çünkü bağlanma sapması ya da RMSD değerinin kristale daha yakın olması (< 2,0 Å) ya da kristale yakın amino asitlerle bağlanma etkileşimlerin tespit edilmesi, moleküler doking sisteminin diğer molekül ve ligantlar için kullanıma hazır olduğu anlamına gelmektedir. Şekil 5.1.'de belirtildiği gibi, daireler ve oval şekiller hem kristal yapı hem de yapılan Autodock Vina moleküler doking işlemi sonucunda aynı bağlanma etkileşimi gösteren benzer amino asitleri işaret etmektedir. Yuvarlaklar bağlanmamış etkileşimleri gösterirken amino asitler üzerindeki oval işaretler reseptörle kurulan hidrojen etkileşimlerini ifade etmektedir. Vorapaksar içerisindeki hidrojen bağları ve hem kristal yapıda hem de Autodock Vina işlemi sonucunda elde edilen etkileşimler TYR337, LEU258, ALA349 aminoasit rezidüleri ve su molekülü HOH3004 ile görülmektedir. Diğer hidrojen bağları ise, su molekülü HOH3004 ile LEU340 ve HIS336'dan elde edilmiştir (Çizelge 5.2.). Yenilenen moleküler doking çalışmasında Autodock Vina tarafından hesaplanan bağlayıcı afinite değerinin -13.3kkal/mol olduğu belirlenmiştir.

Vorapaksar ve PAR1 arasında gerçekleştirilen ve iyi sonuçlar veren moleküler doking çalışmasına dayanarak doking sistem bilgisini, gerçekleştirilen moleküler doking hesaplarının diğer ligantlara uygulanmasında kullandık. Tüm ligantlar için PAR1 karşıtı, Autodock Vina kullanılarak gerçekleştirilen moleküler doking çalışmasının sonuçları Çizelge 5.2.'de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre vorapaksar en yüksek moleküler doking skoruna sahipken atopaksar diğer ligantlar arasında en düşük değeri göstermektedir.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda tarafından sentezlenmiş olan benzoksazol (XT2B) ve benzamit (XT5) türevleri olan bileşikleri, PAR1'e karşı Autodock Vina moleküler doking programı ile kullanılarak bilinen antagonistleri ile karşılaştırdığında etkili bulunmuştur. Yapılan moleküler doking sonucunda XT2B bağlanma afinitesini -9,1 kkal/mol ve XT5 -9,9 kkal/mol saptanmıştır. Autodock Vina programından sonuçlanan bağlanma pozuna göre PAR1 ve ligantları arasındaki etkileşimleri, çeşitli kovalent olmayan bağlanmaları tespit edilmektedir. PAR1'de bulunan TYR337 amino asit rezidüsü, hemen hemen bütün test edilen ligantlar

hidrojen bağı oluşmuştur. Bu gözlenen rezidü bir hidrojen bağ verici rezidüdür. Vorapaksar ve PAR1 arasında yeniden yapılan moleküler doking sonucu gözlenen etkileşimleri kristal yapılarına göre benzerlik bulunmaktadır. Bu etkileşimleri TYR337 olmak üzere, LEU258 ve ALA349 rezidüleri gibi üç hidrojen bağı bulunmaktadır. Aynı zamanda bir su molekülü ile de etkileşim oluşturmuştur (HOH3004-LEU340, HIS336). Atopaksar ise, TYR337 hidrojen bağ verici olan ile bir hidrojen bağı etkileşimi vardır. Bu arada, artesunat ile PAR1’ de bulunan rezidüler bir hidrojen bağı (HIS336) olup iki tane su molekülü ((HOH3004-LEU340) ve (HOH3069-THR261, LEU262, TYR337)) etkileşimleri bulunmaktadır. Test edilen yeni bileşikler, XT2B ve XT5, PAR1’e karşı bulunan etkileşimleri ise ayrıca önemli rezidüler ile hidrojen bağları oluşmuştur. XT5 molekülü, TYR337 hidrojen bağ verici rezidü ile bir etkileşim oluşmuştur ve iki tane su molekülü ((HOH3069-HIS336, THR261, LEU262, TYR337) ve (HOH3018-ASP256, TYR95, TYR350)) ile hidrojen bağları bulunmaktadır, XT2B molekülü ise sadece TYR337 rezidüsü ve HOH3069 ile bir hidrojen bağı etkileşimi oluşmuştur. Bu sonuçları, PAR1 etki mekanizmaları konusunda TYR337 rezidüsü önemli bir rezidü olduğunu göstermektedir ve yapı-aktivite ilişkileri çalışmalarında bir hedef olarak çalışılabilir (Şekil 5.1.).

Zhang ve ark., PAR1’de bulunan trans-membran 6 (TM6) bölgesinin C-terminal ucunda yer alan TYR337 rezidüsü, vorapaksar’da bulunan piridin halkası ile güçlü bir hidrojen bağı oluşturduğu bildirilmiştir (5). Diğer etkili amino asit rezidüleriyle birlikte, non-kovalent TRY337 rezidüsü etkileşimi, PAR1’in stabilitesine ve bağlanma cebinin genel yapısına katkıda bulunarak, dolaylı olarak ligant bağlanma seçiciliğini de etkileyebilmektedir. TYR337 rezidüsü yerine, PHE337 ile mutasyon oluşturulduğunda, hücre dışı ifadesinde azalma meydana gelir ve PAR 1’in agonist peptid ile aktivasyonu da azalır. Ligant ile bağlanmada hidrojen bağlarının, en az üç farklı işlevi vardır, bunlar (i) bağlanma ortağı ile ligant konformasyonel değişikliklere katkısı vardır, (ii) agonist, antagonist, substrat ve/veya inhibitör arasında ayırım yapmak için bir tanıma işlevi vardır ve önemli olan (iii) kendi reseptörüne karşı bağlanma afinitelerine ligant katkısı mevcuttur. Bu nedenle, hidrojen bağları, reseptöre karşı bazı bileşiklerin etkileşim kabiliyetlerini korumak için çok önemlidir ve oluşan etkileşim sonunda daha fazla moleküler eylemi başlatabilir.

Moleküler doking tahmini için geçerli puanlama fonksiyonları üç genel kategoriye ayrılmaktadır. İlk kategori, moleküler kuvvet alanına dayalı bir yaklaşımdır ve elektrostatik

ile van der Waals kuvvetlerinin tahminine dayalı bağlanma enerjisinin öngörülmesidir. Autodock programı, bu tür puanlama fonksiyonunu kullanmaktadır. İkinci kategori, ampirik puanlama fonksiyonu olarak bilinmektedir, tüm hidrojen bağı ve hidrofobik temasların ağırlıklı toplamını hesaplayarak bağlanma enerjileri tahmin edilmesidir. Üçüncü kategori ise, bilgi tabanlı puanlama fonksiyonudur. Bu tür puanlama fonksiyonu, kristal yapı veritabanlarının istatistiksel analizlere dayanmaktadır (89).

6.1.3. MOLEKÜLER DOKİNG ANALİZLERİ: NNSCORE PUANLANMASI

Moleküler doking hesaplanması sonucunda daha fazla doğru sonucu elde etmek için, önemli bir parametre olan, en iyi doking pozuna karar vermek amacıyla bağlanma serbest enerjisinin tahminine gereksinim vardır. Bu amaçla, sinir ağına dayalı NNScore, Autodock Vina programında ile bir hesaplama modeli olarak kullanılmaktadır (166). Ayrıca, HYDE puanlama fonksiyonu, protein-ligant komplekslerinde hidrojen bağı ve dehidrasyon enerji bilgilerine dayalı olan skorlama fonksiyonu (167) kullanılarak, serbest enerji tahmini de gerçekleştirilmektedir.

Mevcut PAR1 doking sonuçları, hızlı ve doğruluğa sahip olan sinir ağı algoritmasına dayalı NNScore programı kullanılarak yeniden puanlanmıştır (Çizelge 5.3.). Burada sağlanan NNScore bağlanma puanı, hesaplanma sırasında oluşturulan 20 ağdan modelin ortalama puanı arasında en iyi mertebeden ilişkilendirilmiştir. Yeniden puanlama fonksiyonu ile birlikte, NNScore ayrıca ayrışma sabiti (K_d) ni de tahmin eder. Bu ayrışma sabiti, iyi ve kötü bağlayıcıları, birbirinden ayırt etmek için önemlidir. Eğer protein-ligant komplekslerin ayrışma sabitin değerini $25 \mu\text{M}$ 'dan az ($K_d < 25 \mu\text{M}$) ise iyi bir bağlayıcı demektir, tam tersine, eğer protein-ligant komplekslerin ayrışma sabitin değerini $25 \mu\text{M}$ 'dan fazlaysa ($K_d > 25 \mu\text{M}$) kötü bir bağlayıcı demektir. Bilinen PAR1 proteinin antagonisti, vorapaksar, yüksek bir NNScore puanına sahiptir (Model 1), böylece hesaplanan ayrışma sabiti iyi sayılır ve konsantrasyonu pM derecesine kadar ulaşır (vorapaksar = $9,877 \pm 2,046$; $K_d = 132,86 \text{ pM}$). Ancak, şaşırtıcı bir sonuç PAR1'in diğer antagonisti, atopaksar ile görülmüştür. Onun NNScore puanı en düşük olarak bulunmuştur (atopaksar = $6,219 \pm 2,678$; $K_d = 603,31 \text{ nM}$). XT5 ve XT2B ile kayda değer bir sonuca ulaşılmıştır. Bunlar, iyi NNScore puanı ve ayrışma sabiti nM konsantrasyonuna sahiptir (XT5 = $7,590 \pm 2,767$; $K_d = 25,70 \text{ nM}$, XT2B = $7,779 \pm 3,618$; $K_d = 16,63 \text{ nM}$). Artesunat için, Autodock vina sonuçları iyi olmasına rağmen, NNScore puanı XT5 ve XT2B bileşiklerinden daha düşük, ayrışma sabiti konsantrasyonu ise yüksek çıkmıştır (artesunat =

6,976±1,517; $K_d = 105,58$ nM). Bütün test edilen ligantların ayrışma sabiti (K_d) 25 μ M'dan daha az konsantrasyonda saptanmış ve bu sonuçlara göre PAR1'e karşı hepsi iyi bir bağılayıcı olarak değerlendirilmiştir. NNScore puanı ve tahmin edilen K_d sonuçlarına göre, yeni sentezlenen bileşikler XT5 ve XT2B, vorapaksara kadar PAR1'e karşı iyi bir bağılayıcı gücü sahiptirler, atopaksardan bile daha iyidir. Böylece, yeni bir umut verici antagonist olarak değerlendirilebilir.

6.1.4. MOLEKÜLER DOKING ANALİZLERİ: SERBEST ENERJİ HESAPLANMASI

Hedef tabanlı ilaç tasarımında, bağlanma serbest enerji tahmini önemli bir faktördür. Bu tez çalışmaları kapsamında, protein-ligant komplekslerinde hidrojen bağı ve dehidrasyon enerjilerinin tutarlı bilgilerine dayalı olan HYDE skorlama fonksiyonu kullanılarak Gibbs serbest enerjisi (ΔG), ligant verimliliği ve inhibitör konsantrasyonu bulunmuştur. Temel ilke olarak, HYDE puanlama fonksiyonu bağlanma afinitesini optimize etmek için belirli parametrelerle, yerel hidrofobiklik, çözücü erişebilir alanı ve temas yüzeyi alanı gibi çözünme enerjileri hesaplanmıştır. Bu nedenle, bu yaklaşım belirli protein-ligant komplekslerin bağlanma afinitesine karşı, atomik düzeyde olumlu ve olumsuz enerji katkısı hesaplamak için kullanılabilir. Hidrasyon ve desolvasyon özellikleri küçük moleküllerin oktanol / su katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır.

Moleküler doking sonucunda PAR1'e için tüm ligantların en iyi tahmin edilen pozundan HYDE skorlama fonksiyonu kullanarak serbest enerjileri, ligant verimliliği ve inhibisyon konsantrasyonu hesaplanmıştır (Çizelge 5.4.). Bilinen PAR1 antagonistleri, vorapaksar ve atopaksar, serbest enerjileri değerini diğer ligantlarla karşılaştırıldığında en yüksek skora sahiptirler (-46 kJ/mol ve -44 kJ/mol). Aynı zamanda bunların ligant verimlilikleri yüksektir ve nM aralığında güçlü bir inhibisyon konsantrasyonuna sahiptirler. Artesunatin serbest enerjisi ise pozitif çıkmıştır (11 kJ/mol) ve aynı zamanda ligant verimliliği ve inhibisyon konsantrasyonu da düşük olmuştur. Yeni sentezlenen bileşikler, XT5 ve XT2B ile de, anlamlı bir sonuca ulaşılmıştır, ikisi de negatif serbest enerjiye sahiptirler (XT5 ve XT2B = -18 kJ/mol). Ayrıca bu bileşiklerin, verimli birer ligant olduğu ve μ M düzeyde inhibisyon konsantrasyonuna sahip olduğu düşünülmektedir.

Ligant verimliliği ölçümü genellikle küçük bileşiklerin (ilaç molekülü gibi) moleküler özelliklerini (boyut ve lipofilisite özelliği) ölçmek için kullanılmaktadır. Bu özellikleri,

bazı reseptör veya protein hedefine karşı bağlanma afinitesi elde etmek için önemli bir faktördür. Matematiksel olarak, ligant verimliliği, bileşik içinde Gibbs serbest enerjisi (ΔG)'nin ağır atomların sayısına oranı olarak tanımlanabilir

$$LE = (\Delta G) / N$$

Burada, $\Delta G = -RT \ln K_i$ ve N, ağır atomları veya hidrojen olmayan atomların sayısı demektir. Ligant verimliliği değeri ile serbest enerji değeri orantılı olarak bilinmektedir. Çizelge 5.4.'teki bulunan sonuçlara göre bütün yüksek serbest enerjisi olan ligantlar, bilinen PAR1'in antagonistleri, vorapaksar ve atopaksar olmak üzere, test edilen yeni bileşikler (XT2B ve XT5) gibi aynı zamanda iyi bir ligant verimliliği değerine ($LE > 0$) de sahiptirler. PAR1 bağlanma yöresinde bulunan birçok olumsuz etkileşim, cezalar nedeniyle artesunat için serbest enerji pozitif değerde çıkmıştır ve ligant verimliliği de düşük olmuştur, bu nedenle artesunat PAR1 antagonisti olarak uyumlu değildir.

Bu yüksek lisans tez çalışmaları kapsamında özet olarak, PAR1'e bağlanan XT2B ve XT5 bileşikleri, bulunan hidrojen bağı etkileşimlerinde TRY337 aminoasit rezidüsünün önemli olduğunu saptanmıştır. Ayrıca, bu yeni bileşiklerin NNScore ve HYDE hesaplanma sonuçları da kayda değer görülmüştür ve böylece PAR1'e yüksek bağlanma afinitesi olması düşünülmektedir. Bu yapılan moleküler doking sonuçları, yeni sentezlenen XT5 ve XT2B moleküllerinin PAR1 antagonisti olarak etki mekanizması hakkında bir fikir ortaya koymaktadır.

6.2. SONUÇ

PAR1, invaziv ve metastatik kanserlerin ilerleyişini durdurmak için yeni ve dikkat çekici bir terapötik hedeftir. Bu tezde gerçekleştirilen bilgisayar destekli moleküler modelleme çalışmaları sonucunda PAR1 ile etkileşme gösteren ve antagonist olarak davranan yeni bileşikler belirlenerek, etki mekanizmaları aydınlatılmıştır. XT5 ve XT2B bileşikleri, *in vitro* ortamda PAR1'e karşı düşük IC_{50} konsantrasyonlarında iyi etkili olarak bulunmuşlardır. Ayrıca, PAR1 antagonistlerinin bağlandığı kritik amino asit olan TYR337 rezidüsü üzerinden reseptöre bağlanmaları PAR1 antagonisti olabileceklerini göstermektedir. Bu bileşikler, PAR1 antagonizmasının etki mekanizmasının aydınlatılmasında önemli bir role sahip olmakla birlikte, kansere karşı PAR1 üzerinden etkili bileşiklerin geliştirilmesinde öncü olarak kullanılabileceklerdir.

7. KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the Cancer Incidence and Mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. Mar 2007;3:581-592.
2. Xiang P, Zhou T, Wang L, et al. Novel Benzothiazole, Benzimidazole and Benzoxazole Derivatives as Potential Antitumor Agents: Synthesis and Preliminary in Vitro Biological Evaluation. *Molecules*. 2012;17:873-883.
3. Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G, al e. Treatment of multiple myeloma. *Blood*. 2004;103:20-32.
4. Shaughnessy J, Barlogie B, Tian E, ZhoU Y, Inventors. Copy Number Variant-Dependent Genes as Diagnostic Tools, Predictive Biomarker and Therapeutic Targets. WO2012011952A2, 2013.
5. Zhang C, Srinivasan Y, Arlow D, et al. High-Resolution Crystal Structure of Human Protease-Activated Receptor 1. *Nature*. 2012.
6. Chackalamannil S, al. e. Discovery of Potent Orally Active Thrombin Receptor (Protease Activated Receptor 1) Antagonists as Novel Anti-Thrombotic Agents. *J. Med. Chem*. 2005;48:5884-5887.
7. Wurster T, May A. Atopaxar A Novel Player in Antiplatelet Therapy? *Hämostaseologie*. 2012;32(3):171-242.
8. Dunwell D, Evans D. Synthesis and Anti Inflammatory Activity of Some 2-Aryl-6-Benzoxazoleacetic Acid Derivatives. *J. Med. Chem*. 1977;20:797-801.
9. Arisoy M, Temiz-Arpaci O, Yildiz I, et al. Synthesis, Antimicrobial Activity and QSAR Studies of 2,5-Disubstituted Benzoxazoles. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 2008;19(5-6):589-612.
10. Ertan-Bolelli T, Yildiz İ, Ozkan S, et al. Synthesis and Biological Evaluation of New N-(2-hydroxy-4(or 5)-nitro/aminophenyl)Benzamides and Phenylacetamides as Antimicrobial Agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007;15:2032-2044.

11. Ryu C, Han J, Jung O, Lee S, Lee J, Jeong S. Synthesis and Antifungal Activity of Noble 5-arylamino- and 6-arylthio-4,7-dioxobenzoxazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005;15(3):679.
12. Akbay A, Oren I, Temiz-Arpaci O, AKi-Sener E, Yalcin I. Synthesis and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor Activity of Some 2,5,6-Substituted Benzoxazole, Benzimidazole, Benzothiazole and Oxazole (4,5-b)pyridine Derivatives. *Arzneim. Forsch.* 2003;53(4):266.
13. Lage H, Aki-Sener E, Yalcin I. High Antineoplastic Activity of New Heterocyclic Compounds in Cancer Cells with Resistance against Classical DNA Topoisomerase II-Targeting Drugs. *Int. J. Cancer.* 2006;119:213-220.
14. Jauhari P, Bhavani A, Varalwar S, Singhal K, Raj P. Synthesis of Some Novel 2-Substituted Benzoxazoles as Anticancer, Antifungal, and Antimicrobial Agents. *Med. Chem. Res.* 2008;7(2-7):412-424.
15. Pinar A, Yurdakul P, Yildiz İ, et al. Some Fused Heterocyclic Compounds as Eukaryotic Topoisomerase II Inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004;317(2):670-674.
16. Varga A, Aki-Sener E, Yalcin I, et al. Induction of Apoptosis and Necrosis by Resistance Modifiers Benzazoles and Benzoxazines on Tumour Cell Line Mouse Lymphoma L5718 Mdr+cells. *In vivo.* 2005;19:1087-1092.
17. Kiessig S, Rockensuess K, Varga A, et al., Inventors. Composition, Useful e.g. for the Chemosensibilizing and Simultaneous Apoptosis Induction of Multidrug Resistance of Tumor Cells and Bacteria, Comprises Substituted Disiloxane Compound in Combination with Benzoxazole Derivatives. DE102008027361, 2009.
18. Aliabadi A, Andisheh S, Tayarani-Najaran Z, Tayarani-Najaran M. 2-(4-Fluorophenyl)-N-phenylacetamide Derivatives as Anticancer Agents: Synthesis and In-vitro Cytotoxicity Evaluation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 2013;12(3):267-271.
19. Raab M, Podar K, Breitkreutz I, Richardson P, Anderson K. Multiple myeloma.

- Lancet*. July 2009;374(9686):324-339.
20. Kyle R, Rajkumar S. Multiple myeloma. *Blood*. 2008;111(6):2962-2972.
 21. Malpas J, Bergsagel D, Kyle R, Anderson C. *Multiple myeloma: biology and management*. Oxford: Oxford University Press; 1998.
 22. Cohen H, Crawford J, Rao M, Pieper C, Currie M. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *Am J Med*. 1998;104:439-444.
 23. Group IMW. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br. J. Haematol*. 2003;121(5):749-757.
 24. Kyle R, Rajkumar S. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukimia*. January 2009;23(1):3-9.
 25. Peacock C, Wang Q, Gesell G, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *PNAS*. December 2006;104(10):4048-4053.
 26. Derian C, Maryanoff B, Zhang H, Andrade-Gordon P. Therapeutic potential of protease-activated receptor-1 antagonists. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2003;12(2):209-221.
 27. Han N, Jin K, He K, Cao J, Teng L. Protease-activated receptors in cancer: A systematic review. *Oncology Letters*. 2011;2:599-608.
 28. Mook O, Frederiks W, van Noorden C. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1705:69-89.
 29. López-Otín C, Matrisian L. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:800-808.
 30. Déry O, Corvera C, Steinhoff M, Bunnett N. Proteinase activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*. 1998;274:C1429-C1452.

31. Macfarlane S, Seatter M, Kanke T, Hunter G, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol.* 2001;53:245-282.
32. Coughlin S. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000;407:258-264.
33. Garcí'a-Lo'pez M, Gutierrez-Rodriguez M, Herranz R. Thrombin-activated receptors: promising targets for cancer therapy?. *Curr. Med. Chem.* 2010;17:109–128.
34. Ramachandran R, Noorbakhsh F, Defea K, Hollenberg M. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nature Rev. Drug Discov.* 2012;11:69-86.
35. Hartz PA. Coagulation Factor II Receptor; F2R. *OMIM.* June 18, 2014. Available at: <http://www.omim.org/entry/187930>. Accessed June 27, 2016.
36. Rasmussen U, Vouret-Craviari V, Jallat S, et al. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett.* 1991;288:123–128.
37. Vu TK, Hung D, Wheaton V, Coughlin S. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991;64(6):1057-1068.
38. Sambrano G, Weiss E, Zheng Y, Huang W, Coughlin S. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature.* September 2001;413(6851):74-78.
39. Scarborough R, Naughton M, Teng W, et al. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem.* July 1992;267(19):13146-13149.
40. Chen J, Ishii M, Wang L, Ishii K, Coughlin S. Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular binding mode. *J. Biol. Chem.* 1994;269:16041–16045.

41. Chu H, Cheng C, Chou W, et al. A novel estrogen receptor-microRNA 190a-PAR-1-pathway regulates. *Hum. Mol. Genet.* 2014;23:355–367.
42. Gratio V, Beaufort L, Seiz L, et al. Kallikrein-related peptidase 4: A new activator of the aberrantly expressed protease-activated. *Am. J. Pathol.* 2010;176:1452–1461.
43. Chay C, Cooper C, Gendernalik J, et al. A functional thrombin receptor (PAR1) is expressed on bone derived prostate cancer cell lines. *Urology.* 2002;60:760-765.
44. Bangham J. Moving PARts. *Nat. Rev. Cancer.* 2005;5:247.
45. Turm H, Maoz M, Katz V, Yin Y, Offermanns S, Bar-Shavit R. Protease-activated receptor-1 (PAR1) acts via a novel G α 13-dishevelled axis to stabilize β -catenin levels. *J. Biol. Chem.* 2010;285:15137–15148.
46. Tian E, Usmani S, Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy J. Thrombin-induced PAR1 signaling pathway modulates β -catenin in the transformation of symptomatic myeloma cells into the quiescent phenotype. Paper presented at: ASH Workshop, 2011; San Diego.
47. Morin P. Beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays.* 1999;21:1021-1030.
48. Tricoci P, Huang Z, Held C, Moliterno D, Armstrong eaTI. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2012;366:20-33.
49. Baker N, Lipinski M, Lhermusier T, Waksman R. Overview of the 2014 Food and Drug Administration Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee meeting about vorapaxar. *Circulation.* Oct 2014;130(15):1287-1294.
50. O'Donoghue M, Bhatt D, Wiviott S, et. al. Safety and tolerability of atopaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: The lessons from antagonizing the cellular effects of thrombin-acute coronary syndromes trial. *Circulation.* April 2011;123:1843-1853.
51. Jason Kahn. LANCELOT: Antiplatelet Agent Shows Positive Signs in Patients With ACS, Stable CAD. *TCTMD.* April 21, 2011. Available at:

<http://www.tctmd.com/show.aspx?id=105576>. Accessed June 27, 2006.

52. Huang S, Xia H, Chi F, Khalaf N, Jong A. Chemoinfectomics in Drug Design and Development. *Anti-Infective Agents*. 2013;11(12):100-108.
53. Chakraborty C, Roy S, Hsu C, Wen Z, Lin C. Network Building of Proteins in a Biochemical Pathway: a Computational Biology Related Model for Target Discovery and Drug-Design. *Current Bioinformatics*. 2010;5(4):290-295.
54. Ratti E, Trist D. Continuing Evolution of the Drug Discovery Process. *Pure Appl Chem*. 2001;73:67-75.
55. Gilbert J, Henske P, Singh A. Rebuilding Big Pharma's Business Model. *In vivo Business and Medicine Report*. 2003;21:10.
56. Whittaker P. What is the Relevance of Bioinformatics to Pharmacology? *Trend Pharmacol Sci*. Aug 2003;24(8):434-439.
57. Vikramkumar V, Sen D, Tyagi S. Correlation Between Chemoinformatics and Bioinformatics in Drug Discovery: A Farsight of Pharmacy-The Millenium Oath. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*. 2013;1(5):47-54.
58. Cohen N. The Molecular Modeling Perspective in Drug Design. In: Cohen N, ed. *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design*. III ed: Academic Press, INC.; 1996.
59. Hughes J, Rees S, Kalindjian S, Philpott K. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol*. 2011;162:1239-1249.
60. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev*. 1997;23:2-25.
61. Berman H. The protein data bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:235-242.
62. Weigelt J. Structural genomics-Impact on biomedicine and drug discovery. *Exp. Cell Res.* 2010;316:1332-1338.

63. Young D. *Computational Drug Design: A Guide for Computational and Medicinal Chemists*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2009.
64. Kalyaanamoorthy S, Chen Y. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discov. Today*. 2011;16:831-839.
65. Acharya C, Coop A, Polli J, Mackerell JA. Recent advances in ligand-based drug design: Relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. *Curr. Comput. Aided Drug Des*. 2011;7:10-22.
66. Bacilieri M, Moro S. Ligand-based drug design methodologies in drug discovery process an overview. *Curr. Drug Discov. Technol*. 2006;3:155-165.
67. Drwal M, Griffith R. Combination of ligand-and structure-based methods in virtual screening. *Drug Discov. Today Technol.* 2013;10: e395–e401.
68. Trossini G, Guido R, Oliva G, Ferreira E, Andricopulo A. Quantitative structure-activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. *J. Mol. Graph. Model*. 2013;28:3-11.
69. Valasani K, Vangavaragu J, Day V, Yan S. Structure based design, synthesis, pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies for identification of novel cyclophilin D inhibitors. *J. Chem. Inf. Mod.* 2014;54:902-912.
70. Akı-Şener E, Yalçın I. *Farmasötik/Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-I, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR)*. Vol 86. 3 ed. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 2003.
71. Ghosh A, Dawson Z, Mitsuya H. Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV. *Bioorg. Med. Chem.* 2007;15(24):7576–7580.
72. Hargreaves R, Ferreira J, Hughes D, et al. Development of aprepitant, the first neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1222:40-48.

73. Duncia J, Chiu A, Carini D, et al. The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: a new class of potent antihypertensives. *J Med Chem.* 1990;33(5):1312-1329.
74. Weinstock J, Keenan R, Samanen J, et al. 1-(Carboxybenzyl)imidazole-5-acrylic acids: potent and selective angiotensin II receptor antagonists. *J Med Chem.* 1991;34(4):1514-1517.
75. Lin X, Huang X, Chen G, et al. Life Beyond Kinases: Structure-Based Discovery of Sorafenib as Nanomolar Antagonist of 5-HT Receptors. *J Med Chem.* 2012;55(12):5749-5759.
76. Tsai J, Lee J, Wang W, et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105(8):3041-3046.
77. Blaney J. A very short history of structure-based design: How did we get here and where do we need to go?. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2012;26:13-14.
78. Mandal S, Moudgil M, Mandal S. Rational drug design. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;625:90-100.
79. Urwyler S. Allosteric modulation of family C G-protein-coupled receptors: From molecular insights to therapeutic perspectives. *Pharmacol. Rev.* 2011;63:59-126.
80. Wilson G, Lill M. Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design. *Future Med. Chem.* 2011;3:735-750.
81. Fang Y. Ligand-receptor interaction platforms and their applications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2012;7:969-988.
82. Shoichet B, Kobilka B. Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012;33:268-272.
83. Meng X, Zhang H, Mezei M, Cui M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2011;7:146-157.

84. López-Vallejo F, Caulfield T, Martínez-Mayorga K, et al. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2011;14:475-487.
85. Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology.* 1996;3:402-406.
86. Kitchen D, Decornez H, Furr J, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;11:935-949.
87. Höltje H, Sippl W, Rognan D, Folkers G. Scope and limits of molecular docking. *Molecular Modelling Basic Principles and Applications.* 2nd ed. Zurich: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2003.
88. Kapetanovic I. Computer-aided drug discovery and development (CADD): In silico-chemicobiological approach. *Chem. Biol. Interact.* 2008;171:165-176.
89. Huang S, Grinter S, Zou X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010;12:12899–12908.
90. Yuriev E, Agostino M, Ramsland P. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *J. Mol. Recognit.* 2011;24:149-164.
91. Agrafiotis D, Gibbs A, Zhu F, Izrailev S, Martin E. Conformational sampling of bioactive molecules: A comparative study. *J. Chem. Inf. Model.* 2007;47:1067–1086.
92. Zsoldos Z, Reid D, Simon A, Sadjad S, Johnson A. eHiTS: A new fast, exhaustive flexible ligand docking system. *J. Mol. Graph. Model.* 2007;26:198–212.
93. Gorelik B, Goldblum A. High quality binding modes in docking ligands to proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 2008;71:1373–1386.
94. Sousa S, Fernandes P, Ramos M. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 2006;65:15-26.

95. Morris G, Goodsell D, Halliday R, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 1998;19(14):1639-1662.
96. Ferreira L, dos Santos R, Oliva G, Andricopulo A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. 2015;20:13384-13421.
97. Foloppe N, Hubbard R. Towards predictive ligand design with free-energy based computational methods?. *Curr. Med. Chem.*. 2006;13:3583-3608.
98. Jain A. Scoring functions for protein-ligand docking. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2006;7:407-420.
99. Huang S, Zou X. Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int. J. Mol. Sci.*. 2010;11:3016-3034.
100. Englebienne P, Moitessier N. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 5. Force-field-based prediction of binding affinities of ligands to proteins. *J. Chem. Inf. Model.*. 2009;49:2564–2571.
101. Murray C, Auton T, Eldridge M. Empirical scoring functions. II. The testing of an empirical scoring function for the prediction of ligand-receptor binding affinities and the use of Bayesian regression to improve the quality of the model. *J. Comput. Aided Mol. Des.*. 1998;12:503-519.
102. Eldridge M, Murray C, Auton T, Paolini G, Mee R. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 1997;11:425-445.
103. Jain A. Surflex: Fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J. Med. Chem.*. 2003;46:499-511.
104. Rarey M, Kramer B, Lengauer T, Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.*. 1996;261:470–489.
105. Bohm H. LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor

- leads. 1992. *J Comput Aided Mol Des*;6:593-606.
106. DeWitte RSS E. SMOG: de novo design method based on simple, fast, and accurate free energy estimates. 1. Methodology and supporting evidence. *J Am Chem Soc.* 1996;118:11733-11744.
107. Charifson P, Corkery J, Murcko M, Walters W. Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J. Med. Chem.* 1999;42:5100–5109.
108. Feher M. Consensus scoring for protein-ligand interactions. *Drug Discov. Today.* 2006;11:421-428.
109. Wang R, Lai L, Wang S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2002;16:11-26.
110. Mysinger M, Shoichet B. Rapid context-dependent ligand desolvation in molecular docking. *J. Chem. Inf. Model.* 2010;50:1561–1573.
111. Ruvinsky A. Role of binding entropy in the refinement of protein-ligand docking predictions: Analysis based on the use of 11 scoring functions. *J. Comput. Chem.* 2007;28:1364–1372.
112. Trott O, Olson A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31:455-461.
113. Murphy K. Predicting binding energetics from structure: looking beyond DeltaG degrees. *Med Res Rev.* July 1999;19(4):333-339.
114. Taylor R, Jewsbury PEJ. A review of protein-small molecule docking methods. 2002. *J Comput Aided Mol Des* ;16:151-166.
115. Morris G, Huey R, Lindstrom W, Sanner M, Belew R, al e. AutoDock 4 and AutoDock Tools 4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30:2785-2791.

116. Schrödinger L. The PyMOL Molecular Graphics System; Version 1.7.4.
117. Seeliger D, de Groot B. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput.-Aided Mol.* 2010;24:417-422.
118. BIOVIA DS. *Discovery Studio Modeling Environment*. Release 3.5 ed. San Diego: Dassault Systèmes; 2002.
119. Lyne P. Structure-based virtual screening an overview. *Drug Discov. Today*. 2002;7:649–657.
120. Stahura F, Bajorath J. Virtual screening methods that complement HTS. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2004;7:259–269.
121. Kodadek T. The rise, fall and reinvention of combinatorial chemistry. *Chem. Commun.* 2011;47:9757–9763.
122. Oprea T, Matter H. Integrating virtual screening in lead discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004;8:349–358.
123. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis D, Cournia Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: Principles, applications and recent advances. 2014. *Curr. Top. Med. Chem.* ;14:1923–1938.
124. Gangwal R, Damre M, Das N, et al. Structure based virtual screening to identify selective phosphodiesterase 4B inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* 2015;57:89–98.
125. Scior T, Bender A, Tresadern G, et al. Recognizing pitfalls in virtual screening: A critical review. 2012;52:867–881.
126. Cavasotto C, Orry W, Andrew J. Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 2007;7:1006–1014.
127. Kirchmair J, Markt P, Distinto S, Wolber G, Langer T. Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—What can we learn from earlier mistakes? *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2008;22:213-139.

128. Jain A, Nicholls A. Recommendations for evaluation of computational methods. *J. Comput. Aided Mol.* 2008;22:133-139.
129. Moura Barbosa A, del Rio A. Freely accessible databases of commercial compounds for high- throughput virtual screenings. *Curr. Top. Med. Chem.* 2012;12:866-877.
130. Sastry M, Lowrie J, Dixon S, Sherman W. Large-scale systematic analysis of 2D fingerprint methods and parameters to improve virtual screening enrichments. *J. Chem. Inf. Model.* 2010;50:771–784.
131. Akdemir A, Rucktooa P, Jongejan A, et al. Acetylcholine binding protein (AChBP) as template for hierarchical in silico screening procedures to identify structurally novel ligands for the nicotinic receptors. *Bioorganic Med. Chem.* 2011;19:6107-6119.
132. Lin J. Accommodating protein flexibility for structure-based drug design. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011;11:171-178.
133. Salsbury FJ. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010;10:738-744.
134. Durrant J, McCammon J. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* 2011;9:doi:10.1186/1741-7007-9-71.
135. Harvey M, de Fabritiis G. High-throughput molecular dynamics: The powerful new tool for drug discovery. *Drug Discov. Today.* 2012;17:1059-1062.
136. Alonso H, Bliznyuk A, Gready J. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.* 2006;26:531-568.
137. Chen Y. Beware of docking!. *Trends Pharmacol. Sci.* 2015;36:78–95.
138. Nichols S, Baron R, Ivetac A, McCammon J. Predictive power of molecular dynamics receptor structures in virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* 2011;51:1439-1446.
139. Cornell W, Cieplak P, Bayly C, et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995;117:5179-5197.

140. Brooks B, Bruccoleri R, Olafson B, States D, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.* 1983;4:187-217.
141. Christen M, Hünenberger P, Bakowies D, et al. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *J. Comput. Chem.* 2005;26:1719-1751.
142. Geppert H, Vogt M, Bajorath J. Current trends in ligand-based virtual screening: Molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation. *J. Chem. Inf. Model.* 2010;50:205-216.
143. Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EJ. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 2013;66:334-395.
144. Inglese J, Auld D, Jadhav A, et al. Quantitative high-throughput screening: A titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103:11473–11478.
145. Spitzer G, Heiss M, Mangold M, et al. One concept, three implementations of 3D pharmacophore-based virtual screening: Distinct coverage of chemical search space. *J. Chem. Inf. Model.* 2010;50:1241-1247.
146. Wolber G, Seidel T, Bendix F, Langer T. Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discov. Today.* 2008;13:23-29.
147. Cramer R, Patterson D, Bunce J. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc.* Aug 1988;110(18):5959-5967.
148. Xu M, Zhang A, Han S, Wang L. Studies of 3D-quantitative structure–activity relationships on a set of nitroaromatic compounds: CoMFA, advanced CoMFA and CoMSIA. *Chemosphere.* 2002;48(7):707-715.
149. Barreca M, Carotti A, Carrieri A, et al. Comparative molecular field analysis (CoMFA) and docking studies of non-nucleoside HIV-1 RT inhibitors (NNIs).

- Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1999;7(11):2283-2292.
150. Boeckler F, Ohnmacht U, Lehmann T, Utz W, Hübner H, Gmeiner P. CoMFA and CoMSIA Investigations Revealing Novel Insights into the Binding Modes of Dopamine D3 Receptor Agonists. *J Med Chem*. 2005;48(7):2493-2508.
151. Pajeva I, Wiese M. Molecular Modeling of Phenothiazines and Related Drugs As Multidrug Resistance Modifiers: A Comparative Molecular Field Analysis Study. *J Med Chem*. 1998;41(11):1815-1826.
152. Klebe G, Abraham U, Mietzner T. Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity. *J Med Chem*. 1994;37(24):4130-4146.
153. Thaimattam R, Daga P, Rajjak A, Banerjee R, Iqbal J. 3D-QSAR CoMFA, CoMSIA studies on substituted ureas as Raf-1 kinase inhibitors and its confirmation with structure-based studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004;12(24):6415-6425.
154. Gao Q, Yang L, Zhu Y. Pharmacophore Based Drug Design Approach as a Practical Process in Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*. 2010;6:37-49.
155. Meyers F, Jawetz E, Goldfien A. Part VII. Chemotherapeutic Agents. *Review of Medical Pharmacology*. 5th ed; 1976.
156. Oksuzoglu E, Tekiner-Gulbas B, Alper S, et al. Some Benzoxazoles and Benzimidazoles as DNA Topoisomerase I and II Inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2008;23(1):37-42.
157. Kaplan-Ozen C, Tekiner-Gulbas B, Foto E, et al. Benzothiazole derivatives as human DNA topoisomerase II α inhibitors. *Med. Chem. Res*. 2013;22(12):5798-5808.
158. Aki-Yalcin E, Ertan-Bolelli T, Taskin-Tok T, et al. Evaluation of Inhibitory Effects of Benzothiazole and 3-Amino-benzothiazolium Derivatives on DNA Topoisomerase II by Molecular Modeling Studies. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 2014;25(8):637-649.

159. Zilifdar F, Alper-Hayta S, Yilmaz S, et al. Genotoxic potentials and eukaryotic DNA topoisomerase I inhibitory effects of some benzoxazine derivatives. *Med. Chem. Res.* 2014;23(1):480-486.
160. El-Hady H, Abubshait S. Synthesis and anticancer evaluation of imidazolinone and benzoxazole derivatives. *Arabian Journal of Chemistry.* 2014;Article in Press.
161. Beksac M, Ataca P, Kirazli B, et al. Frequency Of Protease Activated Receptor1 (PAR1) Expression And The In Vitro Effects Of XT5 And XT2B, Two Novel PAR1 Binding Molecules, On Primary And Bortezomib Refractory Myeloma Cell Lines. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2015;15:e235.
162. Irwin J, T S, Mysinger M, Bolstad E, Coleman R. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* 2012.
163. Rosenthal P. Artesunate for the treatment of severe falciparum malaria. *The New England journal of medicine.* 2008;358(17):1829-1836.
164. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64:4-17.
165. Veber D, Johnson S, Cheng H, Smith B, Ward K, Kopple K. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 2002;45:2615-2623.
166. Durrant J, McCammon J. NNScore: a neural-network-based scoring function for the characterization of protein-ligand complexes. *J.Chem. Inf. Model.* 2010;50:1865-1871.
167. Schneider N, Lange G, Hindle S, Klein R, Rarey M. Consistent Description of HYdrogen Bond and DEhydration Energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *Journal of Chemical Information and Modeling.* January 2013;27(1):15-29.

168. Papanikolaou X, Johnson S, Garg T, et al. Artesunate overcomes drug resistance in multiple myeloma by inducing mitochondrial stress and non-caspase apoptosis. *Oncotarget*. 2014;5(12):4118-4128.



8. EKLER

EK-1

Birincil ve Bortezomib Refrakter HMCL'deki (İnsan Miyelom Hücre Hatları) Bileşiklerin MTT Tarama Sonuçları (72 saat, IC₅₀ değerleri µM aralığı) (161)

HMCL	XT5	XT2B	Diğer Bileşikler
U266BR	9.15 ± 0.78	18.86 ± 0.65	41.47 – 224
U266	9.77 ± 0.47	34.3 ± 0.59	45.21 – 218
JJN3BR	7.64 ± 0.19	24.87 ± 0.42	38.29 – 5145
JJN3	7.38 ± 0.15	14.27 ± 0.56	23.87 – 138
H929R	8.12 ± 0.17	33.89 ± 1.61	-
OPM2	6.5 ± 0.16	25.75 ± 350.05	-
OPM2R	7.89 ± 0.17	30.18 ± 1.35	-
KMS28PE	10.71 ± 0.61	41.42 ± 8.18	-

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Andry Nur Hidayat

Doğum Yeri : Kendari

Doğum Tarihi: 04.07.1987

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce, Türkçe

Eğitim Durumu

Lise : SMA Negeri 1 Kendari (2002-2005)

Lisans : Bogor Ziraat Enstitüsü, Matematik ve Fen Bilimleri Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı (2005-2009)

İş Tecrübesi

Kurumu: Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta-Indonesia

DNA İD Ünit ve Biyoinformatik Laboratuvar

Görevi: Asistan Araştırmacı

Yılları: 2010-2011

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Yüksek Lisans Öncesi Yayınlar

Andry Nur Hidayat, Esin Aki-Yalcin, Meral Beksac, Erming Tian, Saad Z. Usmani, Tugba Ertan-Bolelli, Ismail Yalcin, "Insight into Human Protease Activated Receptor-1 as Anticancer Target by Molecular Modeling", SAR and QSAR in Environmental Research, 26(10), 795-807 (2015).

DOI:10.1080/1062936X.2015.1095799.

M. Beksac, P. Ataca, B. Kirazli, K. Dalva, **A. Nur Hidayat**, S. Yalcin, E. Aki-Yalcin, X. Papanikalaou, S.Z. Usmani, E. Tian. Frequency Of Protease Activated Receptor1 (PAR1) Expression And The In Vitro Effects Of XT5 And XT2B, Two Novel PAR1 Binding Molecules, On Primary And Bortezomib Refractory Myeloma Cell Lines. Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia, Volume 15, e235.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2015.07.501>.

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

Esin Aki-Yalcin, Ozum Ozturk, Kayhan Bolelli, Tugba Ertan-Bolelli, **Andry Nur Hidayat**, Ozlem Bingol-Ozakpinar, Filiz Ozdemir, Ismail Yalcin. Mechanism of Action of Neurokinin-1 Receptors as an Anticancer Target, 3rd International BAU-Drug Design Symposium 2015, Bahçeşehir University, Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey, CL-22: p39-40, 1-3 October 2015.

E. Aki-Yalcin, O. Ozturk, T. Ertan-Bolelli, K. Bolelli, S. Yilmaz, **A. H. Nur**, O. Bingol-Ozakpinar, and F. Ozdemir. Mechanism of Action of Some New Anticancer Active Neurokinin-1 (NK1) Receptor Antagonists, 10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS 2015), International Convention Center Jeju, Jeju, Korea, OP4-4: p256, 18-21 October 2015.

Esin Aki-Yalcin, Ozum Ozturk, Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Serap Yilmaz, **A.H. Nur**, S. Sahin, Ismail Yalcin, Ozlem Bingol-Ozakpinar, Filiz Ozdemir. Molecular Modeling Studies on Neurokinin 1 (NK1) Receptors, 8th International Symposium on

Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources (CMTPI-2015), Chios, Greece, MT-12: p47, 21-25 June 2015.

Andry Nur Hidayat, Esin Aki-Yalcin, Ismail Yalcin, Meral Beksac, Erming Tian, Saad Z. Usmani. Docking Study of Human Protease Activated Receptor 1 (PAR1) Antagonists, 8th International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources (CMTPI-2015), Chios, Greece, OC-28: p53, 21-25 June 2015.

Esin Aki-Yalcin, Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Serap Yilmaz, Ozum Ozturk, Tugba Taskin-Tok, **Andry Nur Hidayat**, Ilkay Yildiz, Ismail Yalcin. Anticancer Drug Design Studies using Molecular Modeling Techniques, The 3rd International Conference on Computation for Science and Technology, Aston Denpasar Hotel and Convention Center, Bali, Indonesia, IS-02: p10, 23-25 September 2014.

Insight into human protease activated receptor-1 as anticancer target by molecular modelling†

A.N. Hidayat^a, E. Aki-Yalcin^{b*}, M. Beksac^c, E. Tian^d, S.Z. Usmani^e, T. Ertan-Bolelli^b and I. Yalcin^b

^aBioinformatics Department, Ankara University, Ankara, Turkey; ^bPharmaceutical Chemistry Department, Ankara University, Ankara, Turkey; ^cInternal Medicine Department, Ankara University, Ankara, Turkey; ^dMyeloma Institute, University of Arkansas for Medical Sciences, Arkansas, USA; ^eLevine Cancer Institute, Carolinas Healthcare, Charlotte, USA

(Received 22 June 2015; in final form 15 September 2015)

Protease-activated receptor 1 (PAR1) has been established as a promising target in many diseases, including various cancers. Strong evidence also suggests its role in metastasis. It is proved experimentally that PAR1 can induce numerous cell phenotypes, i.e. proliferation and differentiation. A strong link between PAR1 gene overexpression and high levels of β -catenin was suggested by a study of the PAR1–G α (13)–DVL axis in β -catenin stabilization in cancers. An *in vitro* study was carried out to analyze PAR1 expression by flow cytometry on CD38+138+ plasma cells obtained from patients either at diagnosis (n : 46) (newly diagnosed multiple myeloma (NDMM)) or at relapse (n : 45) (relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM)) and compared with the controls. Our previously synthesized benzoxazole (XT2B) and benzamide (XT5) derivatives were tested with *in vitro* 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays, which revealed significant inhibitory activity on PAR1. We provide docking studies using Autodock Vina of these newly tested compounds to compare with the known PAR1 inhibitors in order to examine the binding mechanisms. In addition, the docking results are validated using HYDE binding assessment and a neural network (NN) scoring function.

Keywords: anticancer; benzamide; benzoxazole; molecular docking; PAR1 antagonist

1. Introduction

Protease-activated receptors (PARs) are part of the large seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptor (GPCR) family, shown to couple to G $_{16}$, G $_q$ or G $_{12/13}$ within the same cell type [1]. Of the 16 G protein genes found in the mammalian genome, the subfamily member G $_{12}$ is of the most interest to cancer biologists. G $_{12}$ and its sister family member, G $_{13}$, are the only G proteins that have the capability to transform fibroblasts on the overexpressed condition in their wild-type (WT) form. Recent studies have demonstrated that G $_{12}$ is markedly up-regulated in adenocarcinoma of the breast and have identified the G $_{12}$ protein as an important indicator of breast and prostate cancer invasion. The G $_{12}$ protein subunit also plays a role in disrupting the cadherin–catenin interaction and down-regulation of the extra-cellular cell-cell adhesive function of cadherins [2].

*Corresponding author. Email: esinaki@ankara.edu.tr

†Presented at the 8th International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources, CMTPI-2015, 21–25 June 2015, Chios, Greece.



Frequency Of Protease Activated Receptor1 (PAR1) Expression And The In Vitro Effects Of XT5 And XT2B, Two Novel PAR1 Binding Molecules, On Primary And Bortezomib Refractory Myeloma Cell Lines

M. Beksac¹, P. Ataca¹, B. Kirazli¹, K. Dalva¹, A. Nur Hidayat², S. Yalcin³, E. Aki-Yalcin³, X. Papanikalaou⁴, S.Z. Usmani^{4, 5}, E. Tian⁴

[Show more](#)

doi: 10.1016/j.clml.2015.07.501

[Get rights and content](#)

Introduction and Aim

Heparanase activity has been shown to be associated with aggressive behavior or Bortezomib resistance and can lead to increased levels of proteases as well as shedding of heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 (CD138) from myeloma cells. Heparin is an inhibitor of thrombin and heparanase enzyme activity, but cannot be used at high concentrations as an anti-tumor drug because of its anti-coagulant activity. We have recently published in vivo anti-myeloma effects of low molecular weight heparin (Beksac et al Acta Haematol 2015). Protease activated Receptor (PAR1) is a thrombin receptor. Gene and antigen expression has been detected on myeloma patient samples and cell lines (HMCL) by University of Arkansas (UAMC) group (Tian et al ASH 2011). Expression was found to be highest among patients with 5q amplification where the PAR1 gene is located. HMCLs H929, U266, JJN3 were positive but OPM2 lacked PAR1.