



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**SANAL TARAMA YÖNTEMLERİ KULLANILARAK
DİCKKOPF-1 ANTAGONİST ADAYLARININ
BELİRLENMESİ**

SAHRA SETENAY BARAN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ARALIK 2023



**SANAL TARAMA YÖNTEMLERİ KULLANILARAK DİCKKOPF-1
ANTAGONİST ADAYLARININ BELİRLENMESİ**

Sahra Setenay BARAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sahra Setenay BARAN

29/12/2023

SANAL TARAMA YÖNTEMLERİ KULLANILARAK DİCKKOPF-1 ANTAGONİST
ADAYLARININ BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Sahra Setenay BARAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2023

ÖZET

Embriyonik gelişim, doku rejenerasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kemik metabolizması hastalıkları gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayan başlıca sinyal yollarından biri kanatsız/ β -katenin (Wnt/ β -katenin) yoludur. Dickkopf ile ilişkili protein-1 (DKK1), Wnt sinyal yolunun doğal hücre dışı inhibitörlerinden biridir. LRP5/6 reseptörlerine bağlanarak Wnt yolağının bloklanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle DKK1'in LRP5/6'ya bağlanmasını engelleyebilecek DKK1 antagonistleri, Wnt sinyal yolunun modülasyonu için iyi bir yaklaşım olarak görülmüştür. Yeni DKK1 antagonisti adaylarını araştıran çalışmaların çoğu protein bazlı antikorları içermektedir. Ancak küçük moleküllerin DKK1 ile LRP5/6 arasındaki etkileşimi inhibe etmek için daha iyi adaylar olabileceğine inanılmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında küçük moleküllerin DKK1 antagonist adayları olma potansiyelinin bilgisayar destekli moleküler modelleme yöntemleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Aday ligandlar olarak kimyasal veri tabanlarındaki bileşikler seçilmiştir. Bileşiklerin DKK1'in LRP5/6'ya bağlandığı yüzeyi ile etkileşim durumu sanal tarama, moleküler dinamik simülasyon çalışmaları ve bağlanma serbest enerjilerinin hesaplanması ile araştırılmıştır. Ayrıca, bağlanma afinitesi en yüksek ve kararlı olan ligandlar farmakokinetik özellikleri ve ADME-T profilleri de *in-siliko* olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar sırasıyla 13871067, 10265835, 139183638, 657042, 470199, 91490554 ve 445074'ün iyi birer DKK1 antagonist adayları olabileceğini ancak *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar ile araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1090
Anahtar Kelimeler : Dickkopf-1, Kemik, Sanal tarama
Sayfa Adedi : 77
Danışman : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL
İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ŞİMŞEK

IDENTIFICATION OF DICKKOPF-1 ANTAGONIST CANDIDATES USING VIRTUAL-SCREENING METHODS

(M.Sc. Thesis)

Sahra Setenay BARAN

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2023

ABSTRACT

The wingless/ β -catenin (Wnt) pathway is a central signaling cascade involved in many biological processes, such as bone metabolism. Dickkopf-related protein-1 (DKK1) is one of the natural extracellular inhibitors of the Wnt pathway. It causes blockage of the Wnt pathway by binding to LRP5/6 receptors. Therefore, DKK1 antagonists that can inhibit the binding of DKK1 to LRP5/6 have been considered a promising approach for modulation of the Wnt signaling pathway. Most studies investigating novel DKK1 antagonist candidates involve protein-based antibodies. However, small molecules might be better candidates to inhibit the interaction between DKK1 and LRP5/6. Therefore, this thesis study aimed to investigate the potential of small molecules as DKK1 antagonist candidates using computer-aided molecular modeling methods. Compounds in chemical databases were selected as candidate ligands. The interaction state of the compounds with the surface where DKK1 binds to LRP5/6 was investigated by virtual screening, molecular dynamics simulation studies, and calculation of binding free energies. Additionally, the pharmacokinetic properties and ADME-T profiles of the ligands with the highest binding affinity and stability were calculated *in-silico*. The results show that 13871067, 10265835, 139183638, 657042, 470199, 91490554, and 445074 should be investigated by innovative *in-vitro* and *in-vivo* studies.

Science Code : 1090
Key Words : Dickkopf-1, Bone, Virtual Screening
Page Number : 77
Supervisor : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL
Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Yusuf ŞİMŞEK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hem akademik hem de hayata dair tecrübe ve bilgi birikimlerini benden esirgmeden her zaman yol gösteren ve tez çalışmama danışmanlık yapan Prof. Dr. Aylin Sepici Dinçel ve Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Şimşek'e, koşulsuz destek ve yardımları için SD Lab ailesine teşekkürü bir borç bilirim. Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi tarafından 8717 nolu proje olarak desteklenmiştir. Ayrıca, çalışmadaki hesaplamalar için Gazi Üniversitesi Bilgi İşlem birimi tarafından lisansı sağlanan Schrödinger programı kullanılmıştır. Bu sebepten Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimine ve Gazi Üniversitesi Bilgi İşlem Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Bu süre boyunca, yolumun kesiştiği, beraber çalışma fırsatı bulduğum değerli hocalarım ve arkadaşlarıma ve akademik hayatımdaki en büyük destekçim aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR..... | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ..... | xi |
| SİMGE VE KISALTMALAR | xiii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Dickkopf-1 | 3 |
| 2.1.1. Dickkopf-1'in yapısı | 3 |
| 2.2. Dickkopf-1 ve Wnt Sinyal Yolu İlişkisi | 4 |
| 2.3. Wnt/ β -Katenin İnhibitörü Olarak Dickkopf-1 | 5 |
| 2.3.1. Dickkopf-1 ve kanser ilişkisi | 6 |
| 2.3.2. Dickkopf-1 ile kalp-damar sistemi arasındaki ilişki | 8 |
| 2.3.3. Dickkopf-1 ile nörolojik hastalıklar arasındaki ilişki | 9 |
| 2.3.4. Dickkopf-1 ile kemik metabolizma hastalıkları arasındaki ilişki | 9 |
| 2.4. Dickkopf-1 Antagonistlerinin Potansiyel Kullanım Alanları | 11 |
| 2.4.1. Yeni tür statin..... | 11 |
| 2.4.2. Nörodejeneratif hastalıklara yönelik tedaviler..... | 12 |
| 2.4.3. Kardiyovasküler terapi..... | 12 |
| 2.4.4. Kansere yönelik immünoterapi | 13 |
| 2.5. Mevcut Dickkopf-1 Antagonistleri | 13 |
| 2.6. Bilgisayar Destekli Yöntemler Kullanılarak Hedefe Yönelik Adayların Tanımlanması..... | 14 |

Sayfa

| | |
|---|-----------|
| 2.6.1. Sanal tarama..... | 16 |
| 2.6.2. Yapı bazlı sanal tarama çalışmaları | 17 |
| 2.6.3. Farmakokinetik özellikler ve ADME-T profilinin tahmini | 23 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 27 |
| 3.1. Ligandların Hazırlanması..... | 27 |
| 3.2. DKK1 Protein Yapısının Hazırlanması | 27 |
| 3.3. DKK1 Proteini için Grid Oluşturulması | 27 |
| 3.4. Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları ve Analizi | 28 |
| 3.5. Bağlanma Serbest Enerjilerinin Hesaplanması..... | 28 |
| 3.6. Moleküler Dinamik Simülasyon ve Analizi | 29 |
| 3.7. MD Sonrası Analizler | 30 |
| 3.7.1. RMSD | 30 |
| 3.7.2. RMSF..... | 30 |
| 3.7.3. Protein-Ligand etkileşimleri | 30 |
| 3.8. MD Sonrası Bağlanma Serbest Enerjilerinin Hesaplanması | 31 |
| 3.9. Aday Bileşiklerin Farmakokinetik Özelliklerinin Belirlenmesi | 32 |
| 4. BULGULAR | 33 |
| 4.1. Kenetlenme ve MM/GBSA Analizleri..... | 33 |
| 4.2. MD Simülasyon ve MM/GBSA Analizleri..... | 37 |
| 4.2.1. RMSD ve RMSF..... | 38 |
| 4.2.2. Protein-Ligand etkileşimi..... | 43 |
| 4.2.3. MD sonrası MM/GBSA analizi | 56 |
| 4.3. Farmakokinetik ve ADME-T Profili..... | 56 |
| 5. TARTIŞMA | 61 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 65 |

Sayfa

| | |
|--|----|
| KAYNAKLAR | 67 |
| EKLER..... | 75 |
| EK-1. Kenetlenme ve MM/GBSA Analiz Sonuçları | 76 |
| ÖZGEÇMİŞ | 77 |

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge | Sayfa |
|--|-------|
| Çizelge 2.1. Kanser çalışmaları ve DKK1 | 7 |
| Çizelge 2.2. Araştırmaların bilgisayar destekli moleküler modelleme yöntemi kullanılmış ticari ilaçlar | 15 |
| Çizelge 2.3. Bağlanma bölgelerinin belirlenmesi | 19 |
| Çizelge 2.4. Kenetlenme Yöntemlerinin karşılaştırılması | 21 |
| Çizelge 2.5. MD sonrası analizler ve kullanım nedenleri..... | 23 |
| Çizelge 2.6. Biyoyararlanım çalışmalarında kullanılan <i>in-siliko</i> modeller..... | 25 |
| Çizelge 4.1. Kenetlenme hesaplamaları sonucu DKK1 ile yüksek etkileşim gösteren bileşiklere ait skorlar..... | 34 |
| Çizelge 4.2. 100 ns'lik MD sonrası etkileşimleri devam ettiği tespit edilen protein-ligand komplekslerine ait ortalama MM/GBSA skorları | 56 |
| Çizelge 4.3. DKK1 antagonist adayı bileşiklerin farmakokinetik özellikleri ve ADME-T profili | 60 |

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 2.1. DKK1 proteininin yapısı..... | 4 |
| Şekil 2.2. Kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolu..... | 5 |
| Şekil 2.3. DKK1'in çeşitli biyolojik aktiviteleri..... | 6 |
| Şekil 2.4. DKK1'in tümör oluşumu ve immün modülasyonundaki rolü..... | 8 |
| Şekil 2.5. Son 10 yılda yapılan DKK1 ile ilgili yayınların dağılımı..... | 11 |
| Şekil 2.6. NCI8642'nın 2B yapısı..... | 14 |
| Şekil 2.7. Hesaplamalı yaklaşımlarının yeni adayların keşfindeki kilit rolü..... | 15 |
| Şekil 2.8. Sanal tarama çalışmalarındaki basamakların akış diyagramı..... | 17 |
| Şekil 2.9. Yapı bazlı sanal tarama çalışmalarında kullanılan temel <i>in-siliko</i> teknikler . | 18 |
| Şekil 2.10. Aday molekül keşif ve geliştirme sürecindeki klinik başarısızlıkların nedenleri..... | 24 |
| Şekil 3.1. DKK1 ile LRP5/6 reseptörü arasındaki etkileşimin haritası..... | 28 |
| Şekil 4.1. Kenetlenme skorlarının dağılımı..... | 33 |
| Şekil 4.2. Ligandların DKK1 ile etkileşim haritası..... | 36 |
| Şekil 4.3. 13871067 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği.... | 38 |
| Şekil 4.4. 139183638 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği.. | 39 |
| Şekil 4.5. 657042 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği..... | 40 |
| Şekil 4.6. 470199 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği..... | 40 |
| Şekil 4.7. 91490554 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği.... | 41 |
| Şekil 4.8. 445074 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği..... | 42 |
| Şekil 4.9. 10265835 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği.... | 42 |
| Şekil 4.10. NCI8642 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği ... | 43 |
| Şekil 4.11. 13871067 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi..... | 44 |
| Şekil 4.12. 13871067 ile DKK1 arasındaki etkileşimler..... | 45 |
| Şekil 4.13. 10265835 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi..... | 46 |

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 4.14. 10265835 ile DKK1 arasındaki etkileşimler | 46 |
| Şekil 4.15. 139183638 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi..... | 47 |
| Şekil 4.16. 139183638 ile DKK1 arasındaki etkileşimler | 48 |
| Şekil 4.17. 657042 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi..... | 49 |
| Şekil 4.18. 657042 ile DKK1 arasındaki etkileşimler | 49 |
| Şekil 4.19. 470199 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi..... | 50 |
| Şekil 4.20. 470199 ile DKK1 arasındaki etkileşimler | 51 |
| Şekil 4.21. 91490554 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi..... | 52 |
| Şekil 4.22. 91490554 ile DKK1 arasındaki etkileşimler | 52 |
| Şekil 4.23. 445074 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi..... | 53 |
| Şekil 4.24. 445074 ile DKK1 arasındaki etkileşimler | 54 |
| Şekil 4.25. NCI8642 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi..... | 55 |
| Şekil 4.26. NCI8642 ile DKK1 arasındaki etkileşimler | 55 |

SİMGE VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış olan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

| Kısaltmalar | Açıklamalar |
|--------------------|--|
| 2B | 2 Boyutlu |
| 3B | 3 Boyutlu |
| Å | Ångström |
| accptHB | Hidrojen Bağı Alıcısı |
| Ala | Alanin |
| Asn | Asparajin |
| Asp | Aspartik Asit |
| Cl- | Klor iyonu |
| cm | Santimetre |
| CNS | Merkezi sinir sistemindeki olası aktivitesinin tahmini |
| Cys | Sistein |
| DKK1 | Dickkopf-1 |
| donorHB | Hidrojen Bağı Donörü |
| ADME-T | Emilim, Dağılım, Metabolizma, Atılım ve Toksikite |
| FOSA | Çözgen Erişilebilir Yüzey Alanının Oranı |
| Fz | Tiftiklenmiş (Frizzled) |
| g | Gram |
| GB | Genelleştirilmiş Born |
| Gln | Glutamin |
| Glu | Glutamik Asit |
| Gly | Gliserin |
| GPU | Grafik İşlem Birimi |
| Gsk3 | Glikojen Sentaz Kinaz 3 |
| H | Hidrojen |
| H-bağ | Hidrojen bağı |
| HERG | İnsan Ether-à-go-go ile İlgili Gen |
| His | Histidin |

| Kısaltmalar | Açıklamalar |
|--------------------|---|
| HSA | İnsan Serum Albumin |
| HTVS | Yüksek Verimli Sanal Tarama |
| IC50 | %50 İnhibisyon Konsantrasyonu |
| Ile | İzolösün |
| K | Potasyum |
| Leu | Lösün |
| LRP5/6 | Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör ile İlişkilendirilmiş Protein 5/6 |
| Lys | Lizin |
| MD | Moleküler dinamik |
| Met | Metiyonin |
| MM | Moleküler Mekanik |
| MM/GBSA | Moleküler Mekanik/Genelleştirilmiş Doğan Yüzey Alanı |
| N | Azot |
| Na+ | Sodyum iyonu |
| NMR | Nükleer Manyetik Rezonans |
| ns | Nanosaniye |
| OH | Hidroksil |
| p53 | Protein 53 |
| PDB | Protein Veri Bankası |
| PD-L1 | Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 1 |
| Phe | Fenilalanin |
| PISA | Polar Yüzey Alanı |
| PK | farmakokinetik |
| Pro | Prolin |
| QPlogBB | beyin/kan partiyon kat sayısının tahmini |
| QPlogPo/w | Oktanöl/gaz partiyon katsayısı |
| QPPMDCK | Madin-Darby hücre geçirgenliğinin tahmini |
| RMSD | Kök Ortalama Kare Sapması |
| RMSF | Kök Ortalama Kare Dalgalanması |
| SA | Elektrostatik Olmayan Solvasyon Enerjisi |
| sa | Saat |

Kısaltmalar**Açıklamalar****SASA**

Yüzey Erişilebilir Çözgen Alanı

Ser

Serin

SP

Standart hassasiyette

SPC

Basit Nokta Yüğü

Thr

Treonin

Trp

Triptofan

Tyr

Tirozin

Val

Valin

vdW

van der Waals

Wnt

Kanatsız ile ilişkilendirilmiş entegrasyon bölgesi

XP

Ekstra hassasiyette

 β

beta

 ΔG

Gibbs serbest enerjisi

1. GİRİŞ

Fizyolojik süreçleri düzenleyen başlıca sinyal yolları arasında Wnt sinyal yolu dikkat çekicidir. Bu yol, Wnt ailesinin salgılanan lipitle modifiye edilmiş proteinleri tarafından aktive edilen hücreler arası bir sinyalleme kaskadıdır. Sinyalin hücre yüzeyindeki reseptörler aracılığıyla (LRP5/6) hücre içine aktarımının ardından yolağın aktivasyonu, mitotik aktivite, hücre tipi spesifikasyonu veya polarite oluşumu gibi çeşitli hücresel yanıtlara yol açmaktadır. Wnt sinyali, yetişkin organizmada doku homeostazisi ve rejenerasyonunun düzenleyicisi olarak kritik bir rol oynaması nedeniyle kanser, kalp hastalıkları, nörodejeneratif ve kemik metabolizma bozuklukları gibi patolojik koşullar ile de yakından ilişkilidir [1].

Dickkopf ile ilişkili protein-1 (DKK1) Wnt yolağının doğal hücre dışı inhibitörlerinden biridir ve Wnt sinyal yolu ile ilişkili pek çok patolojinin oluşmasında rolü bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda literatürde DKK1'in inhibisyonu yoluyla Wnt sinyal yolağının etkinleştirilmesi iyi bir yaklaşım olarak görülmektedir. DKK1 inhibitörleri arayışı ile ilgili birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen bu aday moleküllerden yalnızca birkaçının klinik araştırmalar düzeyinde çalışmaları devam etmektedir. Bu nedenle yeni aday moleküllerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Bununla birlikte kimyasal yapılı küçük moleküllerin daha iyi bir inhibitör olma potansiyeline sahip olabileceği ve bu alandaki çalışmaların yetersiz olduğu bilinmektedir [2].

Biyolojik bir hedefe yönelik öncü bileşiklerin tanımlanması için kullanılan en yaygın tekniklerden biri büyük kimyasal veri tabanlarının fiziksel olarak taranmasıdır. Sanal tarama adı verilen bu yöntem ile bilinen bir yapıya yönelik spesifik özelliklere sahip bileşikler için çok sayıda molekül içeren veri tabanları hesaplamalı olarak taranmakta ve bu aday bileşikler ile hedef yapı arasındaki olası etkileşim atomik seviyede ayrıntılı olarak tahmin edilebilmektedir [3-5].

Bu kapsamda büyük veri setlerinin taranmasına olanak sağlayan bilgisayar destekli hedefe dayalı sanal tarama çalışmaları küçük moleküller arasından DKK1'e yönelik daha etkin ve hedefe yönelik yeni inhibitör adaylarının keşfi için uygulanabilir ve etkili bir stratejidir. Bu tez çalışması ile de bilgisayar destekli hedefe dayalı sanal tarama yöntemleri kullanılarak yeni DKK1 antagonist adayları öncü küçük moleküllerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, PubChem veri tabanından elde edilen bileşiklerden DKK1'in LRP5/6'ya bağlandığı yüzeyi ile etkileşim durumlarının kenetlenme, moleküler dinamik (MD) simülasyon ve bağlanma serbest enerji hesaplamaları ile filtrelenerek en iyi ve en kararlı bağlanma afinitesine sahip yapıların ortaya konulması hedeflenmiştir. Ayrıca, bu çalışma ile en iyi bağlanma afinitesi gösteren DKK1 antagonist adayı, bu öncü yapıların farmakokinetik özellikleri ve emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksiste (ADME-T) profilleri de belirlenerek terapötik amaçlı bir ajan olabilme potansiyelleri de değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dickkopf-1

Dickkopf-1 (DKK1) sistein açısından zengin Dickkopf protein ailesinin (Dickkopf-1, -2, -3 ve -4) üyelerinden biridir [6]. DKK1 ilk kez 1998 yılında Glinka ve meslektaşlarının çalışmasında tanımlanmış olup, bu çalışmadaki embriyonik kafa gelişiminin tetiklenmesindeki rolü nedeniyle Almanca inatçı, büyük kafalı anlamına gelen "dickkopf" ismini almıştır [7].

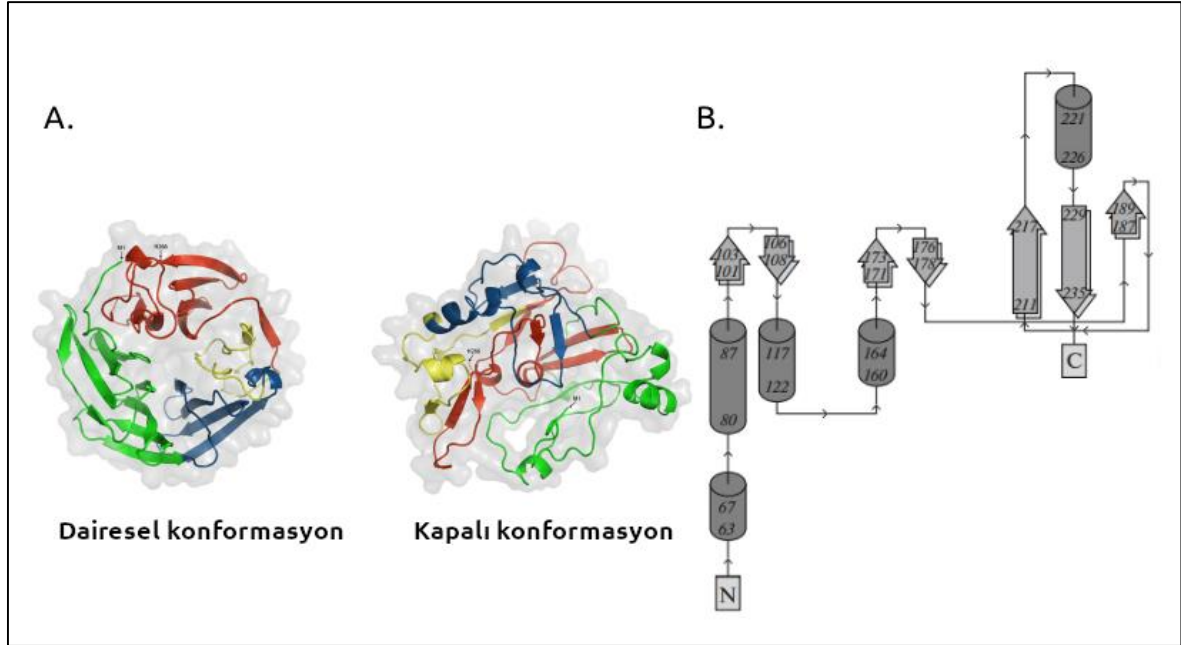
Ekstremitelerin gelişimi, somitogenez, göz oluşumu ve kardiyojenez dahil olmak üzere omurgalı canlıların gelişiminde önemli roller oynayan DKK1 proteini osteositlerde, osteoblastlarda, deride, plasentada ve prostat endotelinde yaygın olarak ifade edilmektedir. Wnt sinyal yolunun düzenlenmesindeki rolü ile tanınmaktadır [8, 9].

2.1.1. Dickkopf-1'in yapısı

Dickkopf-1, bağlayıcılarla ayrılmış N ve C alanlarında (sırasıyla 92-142 ve 179-266 kalıntıları) korunmuş iki sisteince zengin alandan oluşan ve iki glikozilasyon bölgesi içeren 266 amino asit uzunluğunda bir proteindir (Şekil 2.1-A) [8]. DKK1 ayrıca Ser30'a bağlı iki O-bağlantılı glikan ve Asn225'te varsayılan bir N-bağlantılı glikozilasyon bölgesi içermektedir (Şekil 2.1-B). DKK1'in C-terminal tarafındaki sisteince zengin alan, DKK1'in LRP5/6 ile iki önemli bağlanma motifi sayesinde LRP5/6'ya bağlanmaktan sorumludur. Birincisi, DKK1'in döngüsünde yer alan ana bağlanma bölgesi olarak bilinir. 222-231 arası kalıntıları içerir ve LRP5/6'nın üçüncü ve dördüncü pervane alanları ile etkileşim oluşturur. Diğeri ise, DKK1 Arg19 ve LRP6 Asp8301 arasındaki tuz köprüsüdür. Her ikisi de Wnt yolunu inhibe etmek için gerekli ve yeterli bir alan olarak karakterize edilmektedir [2].

Diğeryandan, literatürde DKK1'in esas olarak iki farklı 3B yapı konformasyonuna (dairesele ve kapalı formlar) sahip olabileceği ortaya konulmuştur. Bunlardan biri, C ve N alanları arasında etkileşimli kalıntıları olmayan ve N ve L2 alanları arasında beş güçlü etkileşim içeren dairesele bir formdur. Bu etkileşimin, N alanı ile C alanı arasında etkileşim olmamasından sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Diğeri ise, 11 çift güçlü etkileşimli

kalıntı dahil olmak üzere N ve C alanları arasında üretilen, çoğu etkileşime kapalı konformasyondur. Bu konformasyonda, N ve L2 alanları arasında güçlü bir şekilde etkileşen üç kalıntı çifti vardır. L2 ve C alanlarının N'ye bağlanmak için rekabet ettiğini gösterir [10]. Dairesel formun C alanı ile LRP6 arasındaki bağlanmayı azalttığı bildirilmiştir [11].



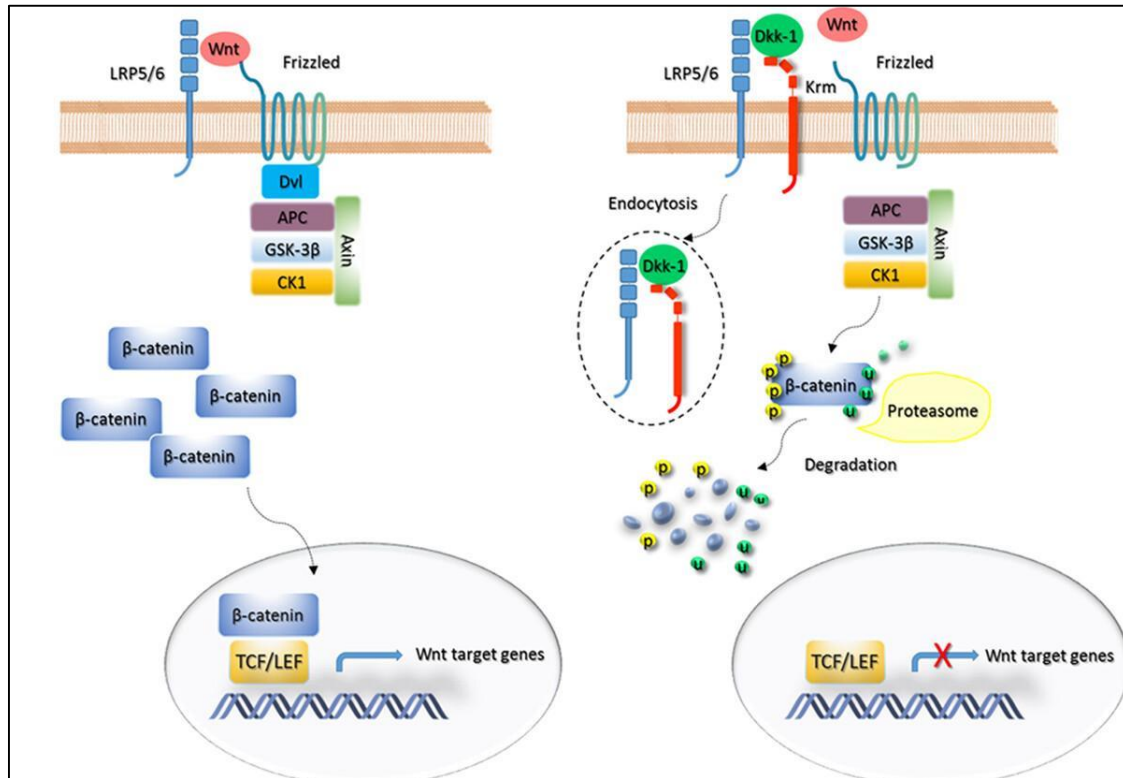
Şekil 2.1. DKK1 proteininin yapısı. A. DKK1'in iki yapısı, B. Kalıntıların şematik gösterimi [12].

2.2. Dickkopf-1 ve Wnt Sinyal Yolu İlişkisi

Wnt sinyal yolu, Wnt ailesinin lipitle modifiye edilmiş proteinleri tarafından aktive edilen hücreler arası bir sinyalleşme kaskadıdır. Bu yol bir Wnt ligandının alıcı hücrenin yüzeyindeki reseptörler tarafından tanınması ile aktive olmakta ve embriyonel gelişimden yetişkin dokuların homeostazına kadar birçok biyolojik sürecin düzenleyicisi olarak kritik bir rol oynamaktadır [1, 13].

Wnt sinyal yolunu başlatmak için, Wnt proteinleri hedef hücrelerin yüzeyindeki Frizzled (Fz) ve düşük yoğunluklu reseptör ilişkili 5/6 (LRP 5/6) reseptörleri ile etkileşime girmektedir. Oluşan bu protein kompleks β -kateninin stabilizasyonuna, çekirdeğe translokasyonuna ve Wnt hedef genlerinin transkripsiyon faktörleriyle etkileşimine yol açan aşağı yönde bir sinyal kaskadını oluşturmaktadır. Wnt sinyalinin negatif düzenleyicisi olarak DKK1, LRP5/6 ve Kremen proteinlerine bağlanarak LRP5/6'nın endositozuna

neden olur. LRP5/6'nın hücre yüzeyinden uzaklaştırılması, sonuçta β -katenin proteasomal bozulmasına yol açan ve Wnt sinyalinin aktivasyonunu engelleyen Wnt-Fz-LRP5/6 reseptör kompleksinin oluşumunu engellemektedir (Şekil 2.2). Bu nedenle DKK1, kanonik Wnt sinyal yolunda bir antagonist olarak hareket etmektedir [8].



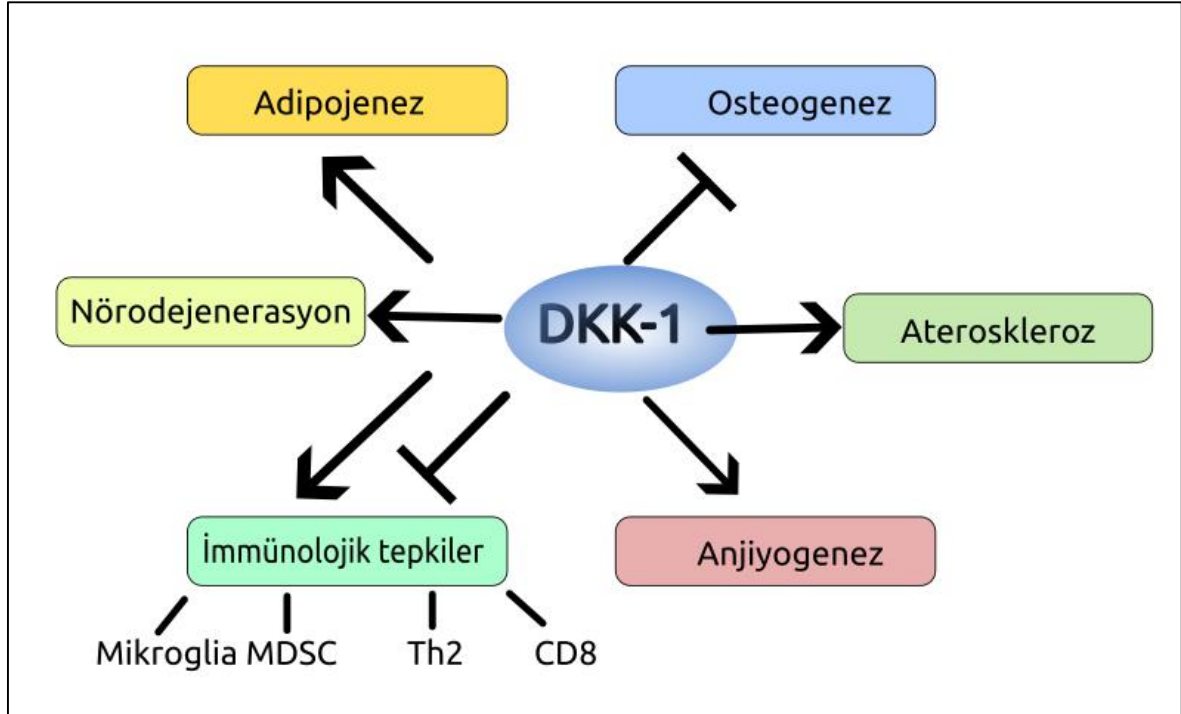
Şekil 2.2. Kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolu [14].

2.3. Wnt/ β -Katenin İnhibitörü Olarak Dickkopf-1

Kristal yapı çalışmaları DKK1'in LRP5/6 üzerindeki çoklu Wnt alanlarını işgal ettiğini ve bu durumun muhtemelen reseptöre, neredeyse tüm Wnt sinyallerinin bağlanmasını engellediğini göstermektedir. Ayrıca, DKK1'in LRP5/6'ya bağlanması, allosterik olarak Wnt bağlanmasını engelleyebilecek bir konformasyonel değişikliği tetikleyebileceği de düşünülmektedir [5].

DKK1 hem hücre içi hem de hücre dışı ortamlardaki biyolojik süreçlerde rol alan önemli bir proteindir. Etkinliğinin bulunduğu hücre tipi ve şartlara göre değişiklik gösterdiği ortaya konulmuş olmasına karşın Wnt sinyal yolunun düzenlenmesindeki rolü ile temel gelişimsel süreçler, doku homeostazisi ve çeşitli patolojik durumlar üzerine etki edebileceği bilinmektedir [14]. DKK1'in araştırıldığı başlıca çalışma alanları kanser,

kemik metabolizması, nörolojik hastalıklar, immün yanıt, adipojeniz ve embriyonik gelişimdir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. DKK1'in çeşitli biyolojik aktiviteleri. DKK1, tümör oluşumu başta olmak üzere kemik oluşumunun, anjiyogenezin, iltihaplanmanın ve bağışıklık homeostazisinin düzenlenmesine de katılır [10].

2.3.1. Dickkopf-1 ve kanser ilişkisi

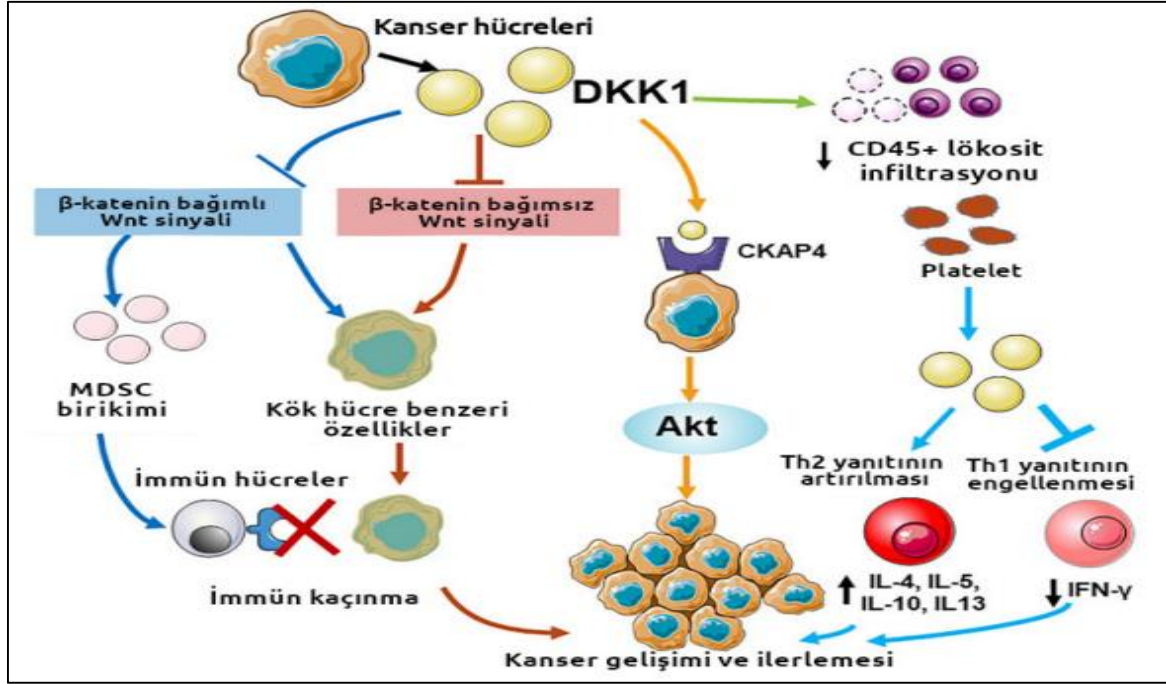
Farklı tümör tipleri ve evrelerinde DKK1 karmaşık ve çok yönlü etkilere sahiptir. Çizelge 2.1'de de özetlendiği gibi literatürdeki birçok çalışma DKK1'i kanser oluşumu ve gelişiminin teşviki ile ilişkilendirmektedir [5]. Pankreas duktal adenokarsinoma, hepatosellüler ve gastrointestinal kanser tipleri için serum DKK1 seviyelerinin iyi bir biyobelirteç olabileceği tartışılmaktadır [16, 17]. DKK1'in tümör oluşum mekanizmaları üzerindeki etkileri Şekil 2.4'te özetlenmiştir. Bu mekanizmalardan biri; β -katenin bağımsız Wnt sinyal yolu aracılığıyla immünsüpressif tümör mikroçevrelerinin oluşumunun tetiklenmesidir. Bu myeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin (MDSCs) birikimine neden olarak sağlanmaktadır. Ayrıca, $CD45^+$ T hücrelerinin çoğalmasını baskılayarak tümör hücrelerinin immün sistem yanıtından kaçınmasını sağlamaktadır. Diğer yandan, Wnt aktivasyonunun baskılanması yoluyla kanser hücrelerinin kök hücre özellikleri kazanması ve Akt sinyalinin aktivasyonu ile de DKK1 kanser hücrelerinin çoğalmasını ve çoğalma

hızını artırabilmektedir. Son olarak DKK1'in alerjen tanıma modeli aracılığı ile de tümör gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [10].

Çizelge 2.1. Kanser çalışmaları ve DKK1 [5]

| Kanser türleri | Etkileri |
|-------------------|---|
| Meme | DKK1 aktivitesi tümör büyümesini ve neovaskülarizasyonu artırmakta ve bağışıklık yanıtından kaçmakta |
| Kolanjiokarsinoma | DKK1'in baskılanması, göç, invazyon, proliferasyon tümör büyümesi ile ilişkili genlerin ifadesini azaltmaktadır |
| Kolorektal | DKK1 kanserle ilgili genlerin ifadesini düzenlemektedir |
| Özofagus | DKK1'nin aşırı ifadesi, proliferasyonu ve invazyonu artırmaktadır |
| Karaciğer | DKK1 göçü, invazyonu, tümör büyümesini, metastazını ve anjiyogenezi teşvik etmektedir Kanser kök hücre benzeri karaciğer hücreleri DKK1'in ifadesini artırmaktadır |
| Melanoma | Anti-DKK1 antikorunun bir genetik özdeş fare modelinde etkili olduğu gösterilmiştir |
| Ovaryan | DKK1'in susturulması tümör gelişimini azaltmakta, invazyonu engellenmektedir |
| Pankreas | DKK1 susturulması, göçü, invazyonu ve proliferasyonu azaltır, PI3K/Akt sinyalini aktive eder |

Diğer yandan, DKK1'in, kanserde sıklıkla aşırı aktifleşen bir yol olan β -katenin bağımlı Wnt sinyalini inhibe etme kabiliyeti nedeniyle, DKK1'in tümör baskılayıcı anti-kanser role sahip olabileceği de ortaya konulmuştur [18]. Bununla birlikte β -katenin bağımlı Wnt sinyalinin bir inhibitörü olan DKK1'in, aktifleştirilmiş Wnt yolağının bir göstergesi olan β -kateninli tümörlerde yüksek seviyelerde tespit edilmesi şaşırtıcı bulunmaktadır. DKK1'in tümör baskılayıcı veya promotör olarak işlev görme yeteneğinin kanser türü, tümör içindeki heterojenite, Wnt sinyal iletim modu, DKK1'in β -katenin dışı diğer hücresel düzenleyici etkilerinin ve tümör mikro ortamı gibi çok sayıda faktöre bağlı olabileceği düşünülmektedir [5, 19].



Şekil 2.4. DKK1'in tümör oluşumu ve immün modülasyonundaki rolü [10]

2.3.2. Dickkopf-1 ile kalp-damar sistemi arasındaki ilişki

Wnt sinyalizasyonundaki inhibitör rolü nedeniyle kanser araştırmalarında yaygın bir şekilde çalışılmasının yanı sıra son yıllarda DKK1'in arteriyel duvar patofizyolojileri ve vasküler sistem hastalıkları için de önemli bir protein olduğu ortaya konulmuştur. DKK1'in ateroskleroze erken aşamalarındaki inflamasyonun, trombosit aktivasyonunun ve endotel disfonksiyonun aşamalarına katkıda bulunabileceği düşünölmektedir. Öyle ki, artan DKK1 seviyelerinin koroner arter ve karotis plaklı hastaların hem serumlarında hem de lezyon bölgelerinde tespit edildiği raporlanmıştır. Bununla birlikte, aterosklerotik plakların çevresindeki inflamatuvar aktivitenin trombositlerden DKK1 salınımını artırabileceği ve böylelikle Wnt sinyal yolunu inhibe edebileceği gösterilmiştir. Ayrıca, ateroskleroz ve onun risk faktörleri üzerine popölyasyona dayalı prospektif bir araştırma plazma DKK1 seviyesi ile erken ateroskleroze belirteci olan karotis arter intima-media kalınlığı (boyun bölgesindeki karotis arterlerinin iç tabakası ile orta tabakası arasındaki mesafeyi) arasında önemli bir pozitif ilişki olduğunu göstermiştir. Diğer yandan hayvan çalışmaları da DKK1'in susturulmasının hayvanlardaki aterosklerotik lezyon gelişimini azalttığı, aşırı ifadesinin ise plak oluşumunu ve endotel hücrelerdeki apoptoz riskini artırdığı ortaya konulmuştur. Bu nedenle, DKK1'in, kardiyovasküler ölüm, miyokard enfarktüsü, inme ve akut koroner sendrom ile ilişkisi nedeniyle kardiyovasküler risklerin

değerlendirilmesi ve prognozunun belirlenmesinde iyi bir biyobelirteç olabileceği savunulmaktadır. Diğer yandan, arterlerde mineral birikimiyle karakterize edilen vasküler kalsifikasyon aterosklerozun ilerlemesindeki önemli risk faktörlerinden biridir. Mineral birikim süreci Wnt sinyal yolu gibi birkaç sinyal yolu tarafından düzenlenmekte olup, yapılan çalışmalar ile aort kapak stenozu olan hastalarda serum DKK1 düzeyleri ile aort kapak kalsifikasyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu ilişkinin aktive trombositler aracılığı ile ortaya çıkabileceği düşünülmektedir [14].

2.3.3. Dickkopf-1 ile nörolojik hastalıklar arasındaki ilişki

Wnt sinyal yolunun nöronal hayatta kalıma katkıda bulunduğu ve merkezi sinir sistemi (MSS) homeostazı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Son çalışmalar artmış DKK1 ifadesinin Alzheimer, Parkinson ve inme gibi nöral patofizyolojiler ile de yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. DKK1 normal şartlar altında sağlıklı insan beyinlerinde çok düşük miktarlarda bulunmaktadır. Ancak AH ve hipokampal sklerozlu temporal epilepsi hasta beyinlerinde yüksek olduğu gösterilmiştir [20]. Bununla birlikte hasta ve transgenik Alzheimer hayvan modellerinden alınan doku örneklerinde de artmış DKK1 seviyeleri tespit edilmiştir. Alzheimer hastalığında DKK1 ifadesinin β -amiloid peptite maruz kalan kortikal nöronlarda arttığı ve bunun da tau hiperfosforilasyonunu tetiklediği gösterilmiştir [2, 21]. Bununla birlikte, DKK1'in hem NMDA hem de glutamat aracılı nörotoksositeye neden olabileceğine dair kanıtlar mevcuttur [20]. Ayrıca, DKK1'in aktif pre-sinaptik bölge sayısının ve sinaptik proteinlerin azalmasına neden olabileceği de gösterilmiştir. Parkinsonda ise DKK1 intrakraniyal ventriküller enjeksiyonu β -kateninin azalması ve GSK-3 β 'nin yükselmesi yoluyla dopaminerjik nöronlarda hücre ölümü tetiklemektedir [2, 21]. Bunun yanı sıra, DKK1'in metabolite 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPP⁺) ile Parkinson modeli oluşturulan dopaminerjik nöronlarda Wnt/Fzd sinyalini engelleyerek toksisitesine karşı nöral koruma/toleransın zayıflamasına neden olmuştur [22].

2.3.4. Dickkopf-1 ile kemik metabolizma hastalıkları arasındaki ilişki

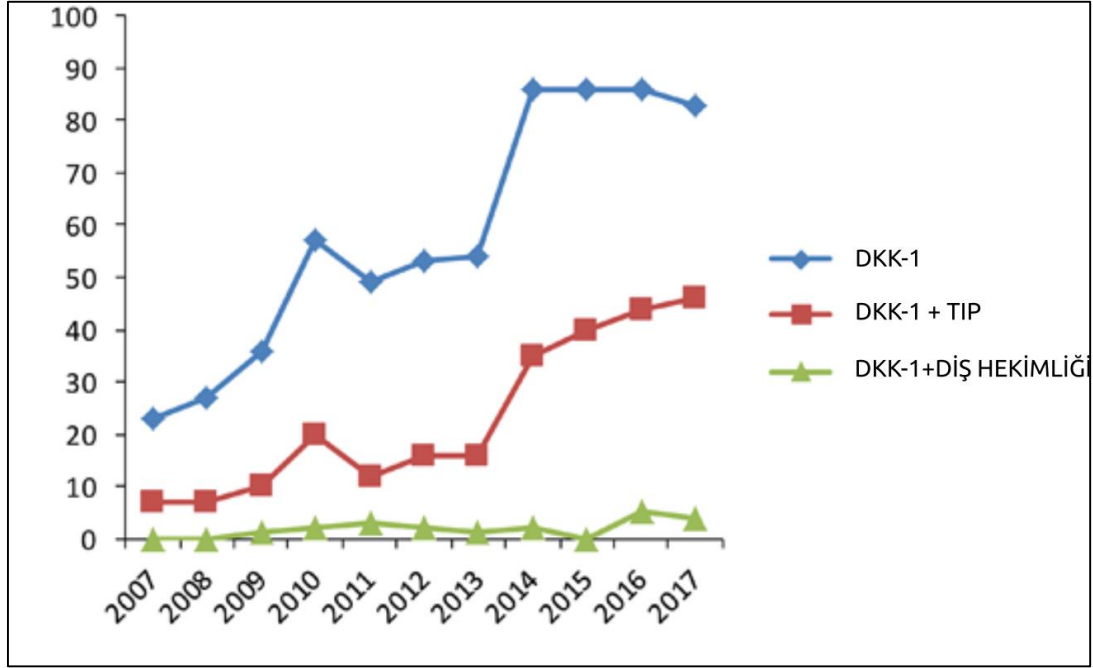
Kemik metabolizması mevcut kemik dokusunun yeniden şekillendirilmesi, normal kemik yapısının korunması, yaşa ve gelişime bağlı olarak iskelet gelişiminin sürdürülmesini içeren bir süreçtir [23]. Kemik oluşumundan sorumlu olan osteoblastlar ile kemik

rezorpsiyonundan (kemik yıkımını) sorumlu olan osteoklastların aktiviteleri tarafından yönetilmektedir. Osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki dengenin bozulması kemik yeniden yapılmasında metabolik bozukluklara neden olmaktadır [24]. Wnt sinyali, osteoblast farklılaşmasını uyararak osteoblastlar ve osteoklastlardaki dengeyi düzenleyerek iskelet bütünlüğünün korunmasında ki önemli yollardan biridir [13]. Wnt sinyal yolunun aktivasyonu, Wnt sinyalinin hedef hücrelerdeki Fz ve LRP 5/6 reseptörleri ile etkileşimi ile başlar. Bu protein kompleksi, β -kateninin stabilizasyonuna ve translokasyonuna ve Wnt hedef genlerinin transkripsiyon faktörleriyle etkileşimine yol açan sinyal kaskatının oluşumunu desteklemektedir. Sonuç olarak, kemik dokusunda bu yol, osteoblastlar aracılığıyla kemik oluşumunu uyarmakta ve osteoklastogenezi azaltmaktadır.

Kemik metabolizmasında lokal salınımlı inhibitör olarak görev yapan DKK1'in özellikle kemik rezorpsiyonunu kontrol ederek kemik sağlığını etkileyebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur [25, 26]. Osteositler tarafından üretilen DKK1, Wnt sinyali için bir antagonisttir. Doğrudan Wnt veya Fz ile etkileşime girmez, ancak hücre yüzeyinde LRP6 ile kompleksler oluşturur [10]. LRP5/6'ya bağlanarak LRP5/6'nın endositozuna neden olur. LRP5/6'nın hücre yüzeyinden çıkarılması, Wnt-Fz-LRP5/6 reseptör kompleksinin oluşumunu engeller, bu da sonuçta beta-kateninin proteasomal bozulmasına yol açar ve Wnt sinyalinin aktivasyonunu engellemektedir. Wnt sinyalinin engellenmesi sonucunda kemik oluşumu ve yeniden şekillenme süreçleri baskılanmakta ve kemik mikromimarisinde bozulma meydana gelmektedir [8, 27]. DKK1, osteoblast farklılaşmasına etki ederek kemik oluşumunu engellemektedir [28]. Artan DKK1 ekspresyonunun hem hayvan modellerinde hem de osteoporoz gibi kemik hastalığı olan kişilerde kemik yoğunluğunun azalmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [13]. Bu nedenle DKK1, kemik oluşumunu ve yeniden şekillenmesini düzenlemede kritik bir rol oynar ve negatif düzenlenmesi, kemik metabolizmasını sürdürmek ve kemik oluşumunu uyarmak için iyi bir yaklaşım olarak kabul edilir [27, 29]. Hem klinik öncesi hem de klinik veriler, DKK1'in bloke edilmesinin kemik onarımını desteklediğini ve kemik kütlesini ve kuvvet artışlarını teşvik ettiğini düşündürmektedir [2].

2.4. Dickkopf-1 Antagonistlerinin Potansiyel Kullanım Alanları

Tıp alanında DKK1 ile ilgili yayınların 10 yıllık analizi DKK1'e karşı artan bir ilgi olduğunu açık bir şekilde ortaya koymaktadır (Şekil 2.5) [12]. Bu bölümde DKK1 antagonistlerinin terapötik amaçlı potansiyel kullanım alanları kısaca özetlenmiştir.



Şekil 2.5. Son 10 yılda yapılan DKK1 ile ilgili yayınların dağılımı [12]

2.4.1. Yeni tür statin

Statinler, kolesterol biyosentezindeki hız sınırlayıcı adım olan HMG-CoA redüktazı inhibe eden ilaçlardır. Statin tedavisi, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol ve trigliserit seviyelerinin azalmasını, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol seviyelerinin ise artmasına neden olmaktadır [30]. Atorvastatin iyi bilinen statin grubu bir kolestrol ilacıdır. Atorvastatinin hem tavşanlar hem de primer insan vasküler hücreleri (endotel hücreleri ve aort düz kas hücreleri) üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, atorvastatinin (8 hafta boyunca 2,5 mg/kg/gün) kontrol tavşanları ile karşılaştırıldığında DKK1 düzeylerini düşürebileceği tespit edilmiştir (%42 oranında). Hücre kültürü çalışmaları ile ise, atorvastatinin Cdc42, Rho ve Rac geranilgeranile edilmiş proteinlerin inhibisyonu aracılığıyla DKK1 ifade düzeyini hem mRNA hem de protein seviyesinde düzenleyebileceği ortaya konmuştur. Ayrıca çalışmada statinlerden etkilenen proteinlerin %21'inin DKK1 tarafından da düzenlendiği gösterilmiştir. Sonuç olarak DKK1'in

statinlerin hedeflerinden biri olabileceği ve statinlerinin etkilerinden bazılarının DKK1 aracılığı ile meydana gelebileceği gösterilmiştir [31]. Bu bulgular DKK1 antagonistlerinin statin etkisi yaratma potansiyeline sahip olabileceğini ve kolesterol düzeyi ile ilişkili patolojiler için yeni bir tedavi stratejisi sunabileceğini işaret etmektedir [32].

2.4.2. Nörodejeneratif hastalıklara yönelik tedaviler

Wnt sinyal yolunun ve DKK1'in yetişkin nöral rejenerasyonundaki rolü hakkında hala tartışmalar olsa da, azalan DKK1 ifadesinin Wnt sinyal yolunu aktive ederek nöral rejenerasyonu teşvik edebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Böylece aktive Wnt sinyal yolağı durumu ile nöronal öncü hücrelerde kendi kendini yenileme ve immature nöron üretimi teşvik edilmektedir. DKK1 inhibitörlerinin Wnt sinyal yolları dışında, prostaglandin J2 aracılı tau hiperfosforilasyonunu engelleyerek Alzheimer için ümit olabileceği vurgulanmaktadır [20].

Bir çalışmada Bölüm 1.6'da bahsedilen ve bir DKK1 antagonisti olan NCI8642 ve türevlendirilmiş formlarının anti-Alzheimer etkinliği hem deneysel hem de hesaplamalı olarak araştırılmıştır. Çalışmada bileşiklerin birçoğunun DKK1 ile LRP5/6 arasındaki bağlanma oranının düşmesine neden olduğu ortaya konulmuştur. Kenetlenme çalışmalarında ise bu bileşiklerin LRP5/6 yüzeyindeki bağlanma bölgesi ile etkileşimi incelenmiş olup, LRP üzerindeki Ser851, Asp874, Trp850, Asp874 ve Tyr875 rezidülerinin etkileşime aracılık edebileceği ortaya konulmuştur [33].

2.4.3. Kardiyovasküler terapi

İn-vitro hücre ve deney hayvanları ile yapılan çalışmalar DKK1'in kardiyovasküler terapi için iyi bir hedef olabileceğini savunmaktadır. ApoE^{-/-} farelerinde DKK1'in susturulmasının aterogenezis oluşumunu azalttığı, buna karşın aşırı ifadesinin hem lezyon hassasiyetini ve oluşumunu artırdığı hem de endotelial apoptozu indüklediği bilinmektedir. Ayrıca, insan göbek kordonu endotel hücreleri ile gerçekleştirilen bir çalışma vektör transdüksiyonu yoluyla DKK1'i ifade eden hücrelerde proaterojenik faktörlerin arttığı (laminer akış stresinin oluşması ve oksitlenmiş LRP), DKK1'in susturulmasının ise bu faktörlere bağlı endotel hücre fonksiyondaki zararlı etkileri önlediği ortaya konmuştur. Bu ve literatürdeki diğer bu tarz bulgular DKK1 antagonizasyonunun,

arteriyel hasarın önlenmesinde umut verici bir strateji olabileceğini öne sürmektedir [31, 34, 35].

2.4.4. Kansere yönelik immünoterapi

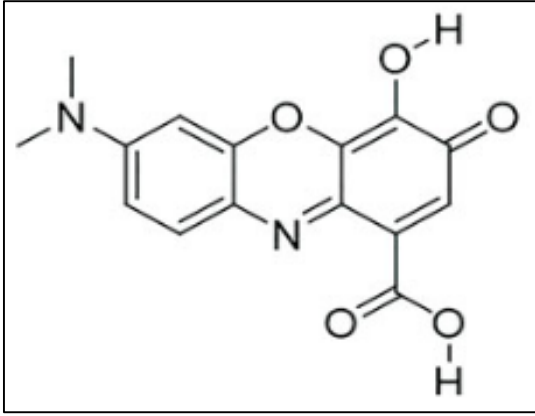
Bölüm 1.4.2’de de bahsedildiği gibi çeşitli kanser türlerinde yapılan klinik ve klinik öncesi çalışmalar ile yüksek DKK1 seviyelerinin kanser gelişimini teşvik ettiği ve kanser mikroçevrelerindeki bağışıklık yanıtlarının modülasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir. Bu durum klinik çalışmalarda da hastalığın kötü prognozu ile ilişkilendirilmektedir.

Dickkopf-1 antagonistleri kanser immünoterapisi için umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. Öğleki bununla ilgili çalışmaların sayısı hem deneysel hem de klinik araştırmalarda her geçen gün artmaktadır. PD-L1 (Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 1) ve DKK1’e yönelik geliştirilen bir aşı ile multiple miyeloma türü kanserlerde hem tümör mikroçevresindeki immün hücrelerin aktivasyonunun artırılabilirdiği hem de DKK1 ve PD-L1’in etkilerine karşı tümörler ile savaşılan bağışıklık yanıtının güçlendirilebileceği raporlanmıştır. Diğer yandan bir anti-DKK1 antikoru DKN-01’in tümör mikroçevrelerindeki MDSC’lerin azalması ve CD45⁺ hücrelerinin artması yoluyla anti-tümör immün modülatör etki gösterebileceği ortaya konmuştur. Bir çalışmada ise Wnt sinyal yolunu inhibe edebilen bir döngüsel oligopeptit ile tümör yoğunluğunun azaltılabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak, DKK1 immünoterapi için ideal bir anti-kanser terapötik hedef olarak kabul edilmektedir [10].

2.5. Mevcut Dickkopf-1 Antagonistleri

Son yıllarda DKK1 inhibitörleri ile ilgili birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen bu aday moleküllerden yalnızca birkaçının klinik araştırmalar düzeyinde çalışmalarını devam ettirmektedir ve bu nedenle yeni moleküllerin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. DKK1 inhibitörlerinin devam eden klinik deneylerinin neredeyse tamamı monoklonal antikorlar içermektedir. Diğer yandan küçük moleküllerin bu kapsamda çok az örneği bulunmaktadır. NCI8642 şimdiye kadar DKK1 antagonisti olarak en etkin olduğu düşünülen küçük moleküldür. NCI8642, antra-9, 10-kinon yapısına sahip, epimediyum türevli bir bileşiktir (Şekil 2.5). Hem hesaplamalı hem de hücresele deneylerle DKK1 ile LRP5/6’nın

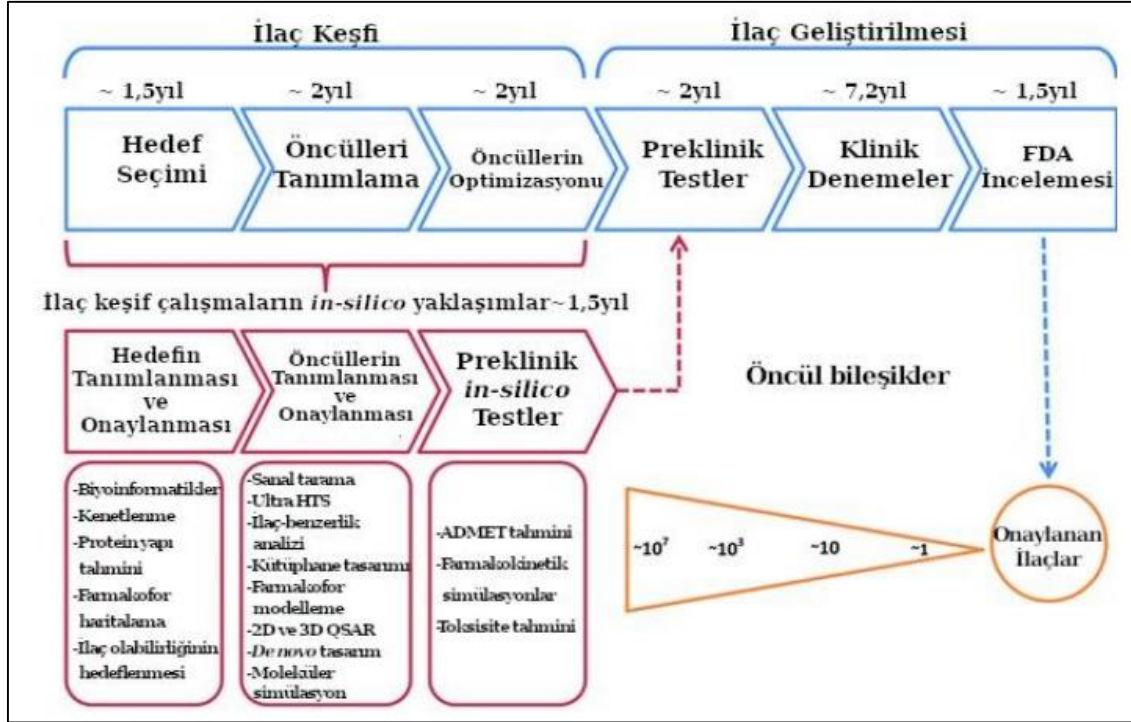
etkileşimini başarılı bir şekilde engelleyebildiği tespit edilmiştir [36, 37] . Ancak çalışmalar istikrarlı bir *in-vivo* etki yaratabilecek terapötik aday olmadığını göstermektedir [36]. Özellikle NCI8642'nin DKK1-LRP6 etkileşimini bloke edebildiği bulgusunun ardından, DKK1'in LRP5/6 ile etkileşime girdiği alana bağlanabilecek küçük moleküllerin daha fazla araştırmanın odak noktası olması gerektiği ve bu alandaki çalışmaların yetersiz olduğu düşünülmektedir [2].



Şekil 2.6. NCI8642'nin 2B yapısı.

2.6. Bilgisayar Destekli Yöntemler Kullanılarak Hedefe Yönelik Adayların Tanımlanması

Bilgisayar destekli yöntemler ile hedefe yönelik adayların tanımlanması, uygun biyokimyasal özelliklere sahip aktif moleküllerin keşfedilmesi, geliştirilmesi ve analiz edilmesi için kullanılan hesaplamalı yaklaşımlar içeren bir süreçtir [38, 39]. Geleneksel yöntemler ile hedefe yönelik yeni bir adayın geliştirilmesi uzun zaman gerektiren maliyetli ve başarı oranı oldukça düşük olan bir süreçtir. Buna karşın büyük veri setlerini anlama ve işleme kapasiteleri sayesinde bilgisayar destekli moleküler modelleme yöntemleri, geleneksel yöntemlere kıyasla düşük maliyetli daha hızlı sonuçlar üretebilmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.7. Hesaplamalı yaklaşımlarının yeni adayların keşfindeki kilit rolü [40]

Bu nedenle hedefe yönelik öncü adayların seçilmesi amacıyla bilgisayar destekli hesaplamalı araçların pre-klinik araştırmada kullanımı her geçen gün daha da yaygınlaşan bir yaklaşımdır [38, 39]. Bugüne kadar, 70'ten fazla ticarileştirilmiş ilacın keşif sürecindeki öncül moleküllerin seçiminde bu hesaplamalı yaklaşımların rol aldığı bilinmektedir. Bu moleküllerden bazıları Çizelge 2.2'de listelenmiştir [38].

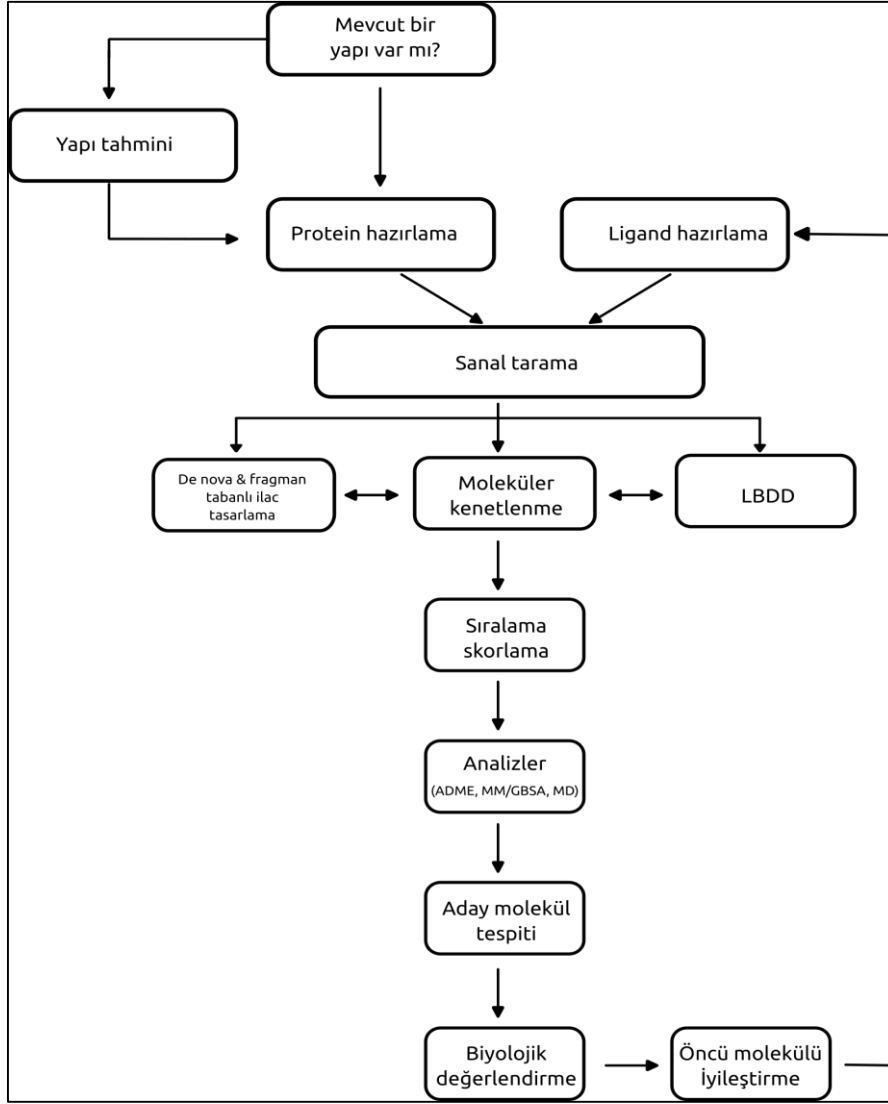
Çizelge 2.2. Araştırmaların bilgisayar destekli moleküler modelleme yöntemi kullanılmış ticari ilaçlar

| İnhibitör Adı | Protein Hedefi | İlaç Keşfinde Bilgisayar Katkısı | Onay yılı |
|----------------------|-------------------------------------|---|-----------|
| Kaptopril (Capoten) | Angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) | Yapı-aktivite ilişkisi (SAR), Ligand ve yapı bazlı tabanlı ilaç tasarımı 1981 | 1981 |
| Flurbiprofen | Siklooksijenaz-2 | Moleküler kenetlenme | 1988 |
| Venetoclaks | Bcl-2/(BAX/BAK) | BCL-2 için rasyonel tasarım | 2016 |
| Rukaparib (Zepatier) | Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP-1) | Ligand tabanlı moleküler modelleme | 2016 |

2.6.1. Sanal tarama

Sanal tarama, öncü bileşik tanımlama çalışmalarında kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Bu yöntemde belirli bir hedefe bağlanma olasılığı en yüksek olan bileşiklerin belirlenebilmesi için kimyasal bileşiklerden oluşan büyük kütüphaneler taranmaktadır [38, 41, 42].

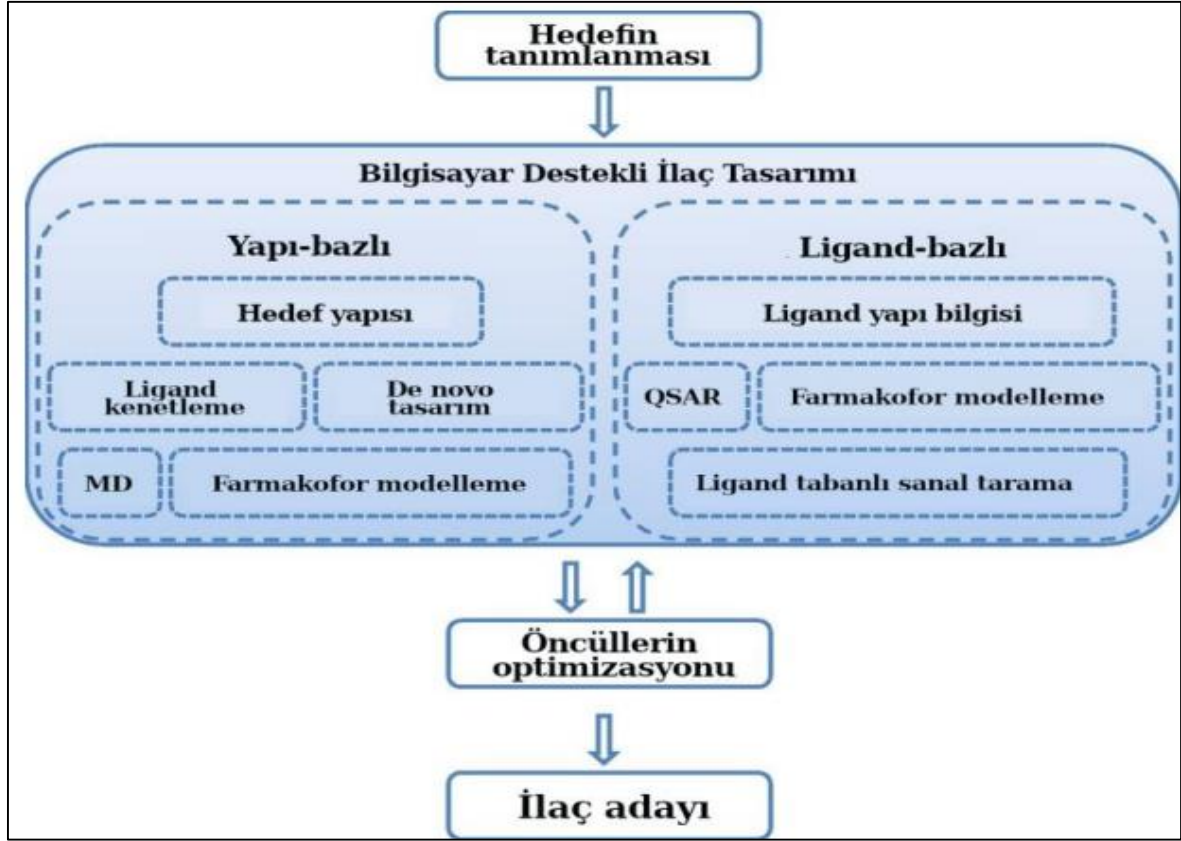
Sanal tarama çalışmalarında yapı ve ligand bazlı olmak üzere iki temel yaklaşım bulunmaktadır (Şekil 2.7). Yapı bazlı sanal tarama çalışmalarında biyolojik hedefe ilişkin 3B yapının bilinmesi gerekmektedir. Bilinen bu 3B yapıdaki ilgili/hedeflenen bölgesinin ligand molekülleri ile etkileşimi incelenip, en güçlü ve en stabil bağlanma afinitesine sahip molekülün öncü bileşik olarak tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Diğer yandan ligand bazlı sanal tarama çalışmaları ise genelde protein hedefinin 3B yapısı mevcut olmadığı durumlarda uygulanmaktadır. Bu yöntemde de olası öncü bileşikler, bilinen bir dizi aktif molekülden türetilen yapı-aktivite verilerinin kullanılması ile ortaya konulmaktadır. Bu tür çalışmalarda genel olarak aktif moleküllerin üst üste bindirilmesi ve ortak temel kimyasal özelliklerin çıkarılması prensiplerinden yararlanılmaktadır [43].



Şekil 2.8. Sanal tarama çalışmalarındaki basamakların akış diyagramı [43].

2.6.2. Yapı bazlı sanal tarama çalışmaları

Hedef biyomolekülün deneysel yöntemler (X-ışını kristalografisi, NMR spektroskopisi ve kriyo-elektron gibi) veya bilgisayar tabanlı modelleme ve biyoinformatik araçlar (Phyre2, I-TASSER, AlphaFold gibi) ile belirlenen 3B yapısal bilgisini esas alan bir yaklaşımdır [43, 45]. Bu 3B yapı üzerindeki bağlanma cebi hedef alınarak ligand ile hedef bölge arasındaki bağlanma afinitesi hesaplanmaktadır. Yapı bazlı sanal tarama çalışmalarında kullanılan temel basamaklar Şekil 2.8'deki özetlenmiştir.



Şekil 2.9. Yapı bazlı sanal tarama çalışmalarında kullanılan temel *in-siliko* teknikler [44]

Hedef protein yapısının belirlenmesi

Yapı bazlı sanal tarama çalışmalarında ilk adım protein yapısının belirlenmesidir. Bu yapılar, 3B protein ve nükleik asit yapılarının depolandığı Protein Veri Bankasında (PDB) mevcut olabilir ve yüksek çözünürlüklü 3B formları buradan indirilebilir. Yapı henüz çözülmemişse, benzer dizilime sahip diğer yapılardan yararlanılarak veya sıfırdan tahmin edilebilir [46].

Protein ve ligandların hazırlanması

Üç boyutlu yapılarda sıklıkla eksik hidrojen atomları, tamamlanmamış yan zincir ve halkalar, belirsiz protonizasyon durumları ve kalıntıların yanlış yere yerleşmesi gibi sorunlar bulunmaktadır. Bu nedenle kenetlenme hesaplamalarında önce bu sorunların düzeltilebilmesi için protein ve ligandlara ait 3B yapıların hazırlanması gerekmektedir [44].

Bağlanma bölgesinin belirlenmesi

Kenetlenme tabanlı sanal taramada protein üzerindeki bağlanma bölgesinin konumu tanımlanmalıdır. Bağlanma bölgesi, bir ligand molekülünün istenen çıktıyı (aktivasyon, inhibisyon veya modülasyon) üretmek için bağlandığı proteinin içbükey bölgesi veya küçük bir cebidir. PDB'deki protein yapılarının çoğu, bağlanma cebini tanımlayan ve bize geometrileri ile ilgili fikir veren holo (ligand içeren) yapılardır. Ligand bulundurmayan (apo), ve bu nedenle bağlanma bölgesinin belirlenemediği yapılar için potansiyel bağlanma bölgelerinin belirlenmesinde kullanılan farklı yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlar ve çalışma prensipleri Çizelge 2.3'de kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Bağlanma bölgelerinin belirlenmesi

| Yöntem Türü | Açıklama | Örnek Metotlar |
|----------------------------|---|--|
| Şablon Tabanlı | Protein dizilerini kullanarak korunmuş ve bağlanma için önemli olan kalıntıları bulur. | Firestar, 3DLigandSite, Libra |
| Geometri Tabanlı | Girinti ve cepleri, boyut ve derinlik temelinde arar. | CurPocket, Surfnet, SiteM |
| Enerji Tabanlı | Protein yüzeyinde energetik olarak uygun olan bölgeleri bulur. | FTMap, Q-SiteFinder |
| Hibrit ve Makine Öğrenmesi | Geleneksel yöntemleri birleştirir veya makine öğrenmesi kullanır. Ayrıca, allosterik bağlanma bölgelerini ve protein-protein etkileşimlerini analiz eder. | ConCavity, MPLs-Pred, DeepSite, Kalasanty, DeepCSeqSite |
| İlaç Olabilme Potansiyeli | Bağlanma bölgelerinin modülasyonu içinçük molekül ilaçlarla etkileşim Olasılığını değerlendirir. | MAPPOD, Dscore, GSiteScorer, Sitemap, DLID, DrugPred, PockDrug |

Kenetlenme

Moleküler kenetlenme algoritmaları, ligand molekülünün hedef proteinin bağlanma cebi ile nasıl etkileşime girebileceğini anlamak için kullanılan bir tekniktir. İlk defa Emil Fischer tarafından ortaya atılan moleküler kenetlenme kavramı esasen anahtar-kilit modeline dayanmaktaydı ve bu amaçla geliştirilen ilk programlar hem proteini hem de ligandları rijit cisimler olarak ele almaktaydı. Ancak proteinler biyolojik işlevler açısından önemli olan esnekliğe sahiptir ve yan zincirlerin yeniden düzenlenmesi gibi ince değişiklikler,

bağlanma bölgesinin boyutunu ve şeklini değiştirebilir. Dolayısıyla bu durum kenetlenme sonuçlarının hesabında yanılmaya neden olabilir. Günümüzde ise protein esnekliğini ele alan 4 farklı yöntem bulunmaktadır; yumuşak kenetlenme, yan zincir esnekliği, moleküler rahatlama ve protein kümesi kenetlenmesidir [43].

Yumuşak kenetlenme, kenetlenme hesaplamalarında atomlar arası Van der Waals (vdW) etkileşimlerini yumuşatarak protein ve ligand arasında küçük derecelerde örtüşmeye izin vermektedir. Bu en basit ve hesaplama açısından verimli bir yöntemdir. Ancak, yalnızca küçük değişiklikleri hesaba katabilirler.

Yan zincir esnekliği, protein omurgaları sabit tutulurken, temel torsiyon serbestlik derecelerini değiştirerek yan zincir konformasyonlarının örneklenmesine olanak tanımaktadır.

Moleküler rahatlama yöntemi hem protein iskeletinde esnekliğe hem de yan zincirde konformasyonel değişikliklere izin vermektedir. Genellikle ligandı bağlanma bölgesine yerleştirmek için önce rijit-protein kenetlenme metodunu kullanır, ardından protein iskeletini ve yan zincir atomlarını rahatlatarak protein-ligand etkileşimlerinin daha gerçekçi bir şekilde modellenmesine olanak sağlamaktadır.

Protein kümesi kenetlenmesi yaklaşımında ise ligand, esnek bir reseptörü temsil eden farklı konformasyonlara sahip bir dizi rijit protein yapısı üzerine yerleştirilmektedir. Daha sonra her konformasyon için elde edilen kenetlenme sonuçları yeniden analiz edilmektedir.

Bu kenetlenme yaklaşımlarından biri veya birkaçı birlikte kullanılabilir. Örneğin bu tez çalışmasındaki hesaplamalar için Schrödinger yazılımındaki Glide modülü kullanılmıştır. Glide, hedef bölge için öngörülen ligand bağlanma konformasyonlarını sıralamak için bir dizi hiyerarşik filtre ve üç farklı yaklaşımı kullanan (SP, XP ve HTV) hızlı bir kenetlenme yöntemidir. Esnekliği farklı şekilde ele alan kenetlenme metodolojilerine sahiptir [46, 50].

Çizelge 2.4. Kenetlenme Yöntemlerinin karşılaştırılması

| Yöntemler | Ligand esnekliği | Protein esnekliği | Avantajları | Dezavantajları |
|--|------------------|-------------------|---|--|
| HTVS (Yüksek Verimli Sanal Tarama) | Yok* | Yok | Hızlı tarama | Zayıf güvenilirlik Sınırlı konformasyonel örneklem Puanlama yapamaması |
| SP (Standart Hassasiyet) | Var | Yok | Detaylı ve güvenilir sonuçlar | Uzun hesaplama süresi |
| XP (eXtra Hassasiyet) | Var | Yok | Daha fazla konformasyonel örneklem Yüksek hassasiyet Daha detaylı sonuç | Uzun hesaplama süresi Büyük işlem gücü |

*yalnızca minimizasyon

Arama algoritmaları ve puanlama işlevleri, moleküler yerleştirme programları için temel bileşenlerdir. İyi bir arama algoritması olası tüm bağlama modlarını keşfetmelidir ve bu zorlu bir görev olabilir. Puanlama fonksiyonları üç geniş tipte sınıflandırılabilir: Kuvvet alanına dayalı, ampirik, bilgiye dayalı ve makine öğrenimine dayalı. Kuvvet alanı tabanlı puanlama fonksiyonları, bağlanma poz etkileşimini vdW, elektrostatik ve bağ germe/bükme/burulma enerjileri açısından parametreler kullanarak değerlendirir. Ampirik puanlama fonksiyonları, bilinen afiniteleri kullanarak ligand bağlanma enerjisini tahmin eder. Protein-ligand komplekslerinin deneysel olarak belirlenmiş bilgilerine dayanan bilgi tabanlı puanlama fonksiyonlarıdır [51].

MM/GBSA

Ligandların proteine bağlanma serbest enerjisini tahmin etmenin daha sağlam bir yolu, birleşik Moleküler Mekanik/Genelleştirilmiş Doğan Yüzey Alanı (MM/GBSA) yaklaşımını kullanmaktır. MM/GBSA, proteinin, ligandın ve çözeltideki kompleksin serbest enerjileri arasındaki farktan bağlanmanın serbest enerjisini hesaplayan, kuvvet alanı bazlı bir yöntemdir. Serbest enerji, gaz fazı moleküler mekaniği (MM) enerjisi, elektrostatik solvasyon enerjisi (GB) ve elektrostatik olmayan solvasyon enerjisine (SA) katkının bir kombinasyonu kullanılarak hesaplanır. Daha doğru bir tahmin sağlar çünkü hem ligandı hem de proteini esnek olarak ele alabilir ve uyarılmış uyum pozu için gereken yapısal yeniden düzenlemelere izin vermektedir. MM/GBSA, geleneksel kenetlenme çalışmalarına kıyasla hesaplama açısından daha pahalıdır, bu nedenle genellikle seçilen

ligandları yeniden puanlamak için tamamlanmış bir kenetlenme çalışmasından sonra uygulanmaktadır [43].

Toplam bağlanma serbest enerjisi ΔG_{bind} aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanabilir. Burada Ekompleks optimize edilmiş kompleksin enerjisidir, Eligand ve Ereseptör ise sırasıyla optimize edilmiş serbest ligand ve reseptörün enerjisidir (Eş. 2.1):

$$\Delta G(\text{bind}) = \Delta H - T\Delta S = \Delta G(\text{solv}) + \Delta E(\text{MM}) - T\Delta S \quad (2.1.)$$

Moleküler dinamik simülasyon

Moleküler dinamik (MD), model sistemlerin zaman içindeki bireysel parçacık hareketlerini incelemek için MM'e dayalı, *in-siliko* bir simülasyon yöntemidir. Atomik hareketleri simüle etmek ve hesaplama karmaşıklığını azaltmak için Newton'un hareket denkleminin çözümünden yararlanmaktadır. MD, atomlar ve moleküller arasındaki etkileşimleri atomik seviyede simüle ederek, zamana bağlı protein katlanması, konformasyonel değişiklikler, ligand bağlanması ve ayrılması gibi biyomoleküler süreçlere ilişkin bilgiler sağlamaktadır. Aday molekül tanımlama çalışmalarında proteinlerin dinamik yapısal özelliklerinin ve protein-ligand komplekslerinin stabilitesinin anlaşılması açısından önemlidir. Ayrıca, allosterik bölgeler gibi aday moleküllerin hedef bölge dışındaki bağlanma bölgelerinin tanımlanmasına da yardımcı olmaktadır. Bu sayede öncül bileşiklerin tanımlanması ve bunların optimizasyonu için bilgi sağlamaktadır. Bu amaç için kullanılacak Gromacs, AMBER, Lammps, NAMD, CHARMM ve Desmond gibi çeşitli MD yazılım paketleri mevcuttur. MD simülasyonuna yönelik bu programlar benzer işlevleri paylaşır ve grafik işlem birimlerinin (GPU'lar) bilgi işlem gücünden ve hızından yararlanarak yüksek performanslı hesaplamalar ortaya koymaktadırlar [32, 34].

Ligand bağlanma süreçleri için MD ve moleküler kenetlenme çalışmaları her zaman bir arada yürütülmektedir. Bilindiği gibi, protein yapısının esnekliği, hem proteinin biyolojik fonksiyonunda hem de bağlanma cebinin şeklinde temel bir faktördür. Bununla birlikte, yapı bazlı çalışmalarda kullanılan protein yapısı genellikle X-ışını kristal kırınımı veya kriyo-EM gibi deneysel yöntemlerden elde edilen proteinin anlık bir pozudur. Gerçekte proteinin farklı konformasyonları mevcuttur ve protein dinamikleri bağlanma sürecini derinden etkilemektedir. Bu nedenle kenetlenme çalışmaları ile ortaya konulan protein-

ligand kompleksindeki konformasyonel değişimler MD simülasyonlar ile ortaya konmaktadır [43-46].

Ligand bağlanma süreçleri için MD ve moleküler kenetlenme çalışmaları her zaman bir arada yürütülmektedir. Bilindiği gibi, protein yapısının esnekliği hem proteinin biyolojik fonksiyonunda hem de bağlanma cebinin şeklinde temel bir faktördür. Bununla birlikte, yapı bazlı çalışmalarda kullanılan protein yapısı genellikle X-ışını kristal kırınımı veya kriyo-EM gibi deneysel yöntemlerden elde edilen proteinin anlık bir pozudur. Gerçekte proteinin farklı konformasyonları mevcuttur ve protein dinamikleri bağlanma sürecini derinden etkilemektedir. Bu nedenle, kenetlenme çalışmaları ile ortaya konulan protein-ligand kompleksindeki konformasyonel değişimler, MD simülasyonları ile ortaya konmaktadır [46]. Diğer yandan, MD simülasyonları, tüm atom zaman yörüngelerini oluşturarak, biyolojik olarak yönlendirilen bir analiz gerektiren büyük miktarda veri üretmektedir [52]. Bu verilerin analizinde kullanılan başlıca yöntemler Çizelge 2.5’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. MD sonrası analizler ve kullanım nedenleri

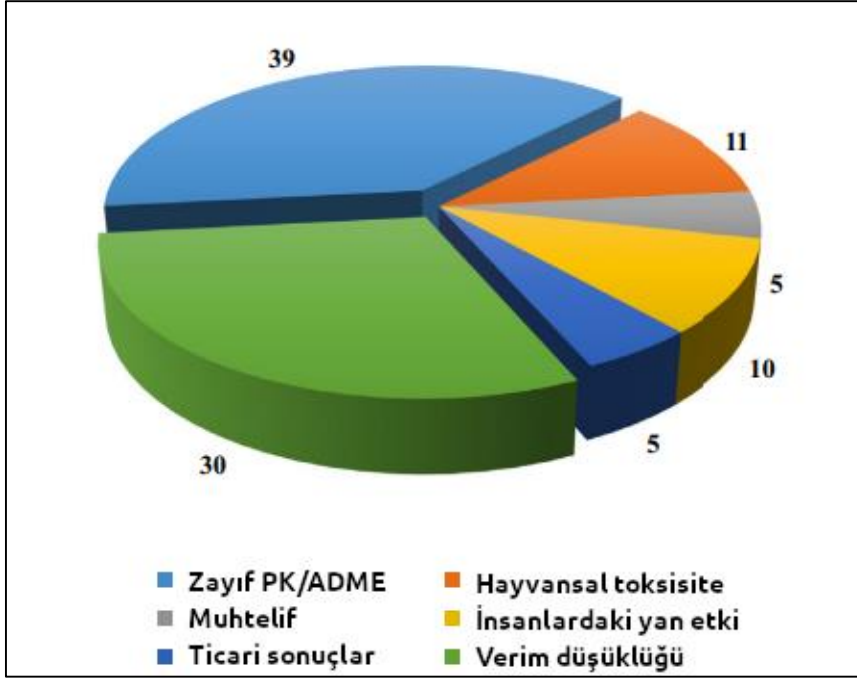
| Değer | Kullanım Nedenleri | Hesaplama Yöntemi |
|-------------------|---|----------------------|
| RMSD | Protein yapısındaki değişimin göstergesidir | Matematiksel formül* |
| RMSF | Proteindeki esnek ve hareketli bölgelerin rezidü bazında tespit edilmesi. | Matematiksel formül |
| Gyrasyon Yarıçapı | Moleküler kompaktlığı hesaplayarak konformasyonel esneklik hakkında bilgi vermektedir. | Matematiksel formül |
| Bağlanma Analizi | Protein-ligand etkileşimlerini ve bu etkileşimlerde rol alan bağ türlerinin anlaşılması | Analiz yöntemi |

*atomlarının yer değiştirmesindeki ortalama değişikliği ölçerek

2.6.3. Farmakokinetik özellikler ve ADME-T profilinin tahmini

Farmakokinetik, aday moleküllerin organizmadaki emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (ADME-T) gibi süreçleri kapsayan potansiyel hareketliliğini ve değişimini inceleyen bir bilim dalıdır. Aday moleküllerin hedef ile başarılı etkileşiminin yanı sıra, vücuttaki yolculuğu ve etkinliğinin anlaşılmasında önemlidir. Öyle ki, etken madde keşif

ve geliştirme sürecindeki başarısızlıkların yaklaşık %60'ı, bu bileşiklerin ADME-T açısından zayıf biyoyararlanıma sahip olması ve *in-vivo* terapötik etkiyi azaltan olumsuz farmakokinetik (PK) özellikleri ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.9). Bu nedenle biyoyararlanım profilinin de klinik amaçlarda kullanılmaya elverişli olması gerekmekte olup, farmakokinetik özelliklerin ve ADME-T profilinin taranması keşif ve geliştirme çalışmaları için önemli bir kılavuzdur [53].



Şekil 2.10. Aday molekül keşif ve geliştirme sürecindeki klinik başarısızlıkların nedenleri [53].

Farmakokinetik özelliklerin ve ADME-T profilinin taranması, zayıf veya uygun olmayan fizikokimyasal özelliklere sahip bileşiklerin erken aşamalardan itibaren çalışmaların dışında tutulmasına olanak sağlayarak, araştırma verimliliğinin artmasına buna karşın maliyetinin ise düşmesine olanak sağlamaktadır. Bu sayede arzulanan özelliklerdeki öncü bileşiklerin değerlendirilmesini kolaylaştırmaktadır. Bu özelliklerin araştırılması için kan örneklerinin analizi, dokular arası dağılım çalışmaları, emilim, metabolizasyon ve eliminasyon hızının belirlenmesi gibi deneysel yöntemlere dayanan teknikler kullanılmaktaydı. Ancak gelişen teknoloji ile birlikte 2000'li yılların başından beri, kimyasal moleküllerden oluşan büyük veri setlerinin hızlıca değerlendirilmesini sağlayan çeşitli hesaplama araçları da bu süreçlere dahil edilmeye başlandı.

Bu *in-siliko* yöntemler molekül içi ve moleküller arası kuvvetler, katı haldeki yapı stabilitesi, konformasyonel esneklik, hidrofobiklik ve lipofiliklik, geçirgenlik ve çözünürlük gibi fizikokimyasal özelliklerden çıkarım yapıp, farmakokinetik profili iyi bilinen bileşiklerle kıyaslayarak biyoyararlanımını tahmin etmektedir [53]. Biyoyararlanım çalışmalarında kullanılan yaygın *in-siliko* modeller Çizelge 2.6’da amaçları ile birlikte özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Biyoyararlanım çalışmalarında kullanılan *in-siliko* modeller.

| Amaç | Yöntem | İn-siliko Modeller | |
|---------------------------|--------------------------|--|---------------------------|
| Emilim | Fizikokimyasal Yöntemler | MlogP, cLogP ve çözünürlük modelleri | |
| | İnsan Bağırsak Emilimi | MDCK ve Caco-2 geçirgenlik modelleri | |
| | İnsan % Oral Emilimi | Nicel çoklu doğrusal regresyon modelleri | |
| Dağılım | BBB Penetrasyonu | BBB penetrasyon modelleri | |
| | Protein Bağlanması | İnsan serum albümin bağlanma tahmin modeli | |
| | Efflüks | "P-glikoprotein (Pgp) substratı için mekanistik modeller | |
| Metabolizma | İlaç-İlaç Etkileşimi | CYP inhibisyonu empirik modelleri | |
| | Metabolik Kararlılık | Empirik modeller: karaciğer mikrozomal T1/2'nin metaboliti için tahmini (COMPACT, META) ve CYP için regiyoselektif modeller: 2D6, 3A4, 2U1 | |
| Eliminasyon | Böbrek Atılımı | "Kantitatif Yapı Farmakokinetik İlişkiler" tabanlı bileşiklerin temizlenme oranlarının tahmini | |
| Toksosite | Genotoksosite | DEREK, TOPKAT | |
| | Temel Sitotoksosite | TOPKAT, COMPACT, DEREK | |
| Transdermal taşıma hızı | Jm | QPlogKp, QPlogS, ACD/Percepta | |
| İlaç olabilme potansiyeli | Lipinskinin 5 kuralı | MW < 500, QPlogPo/w < 5, donorHB ≤ 5, accptHB ≤ 10. | ChemBioDraw, ACD/Percepta |
| | Jorgensenin 3 kuralı | QPlogS > -5.7, QP PCaco > 22 nm/s, Ana metabolitler < 7 | ChemBioDraw, ACD/Percepta |

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması *in-siliko* hesaplamalı yaklaşımların kullanılması üzerine planlanmış olup, Gazi Üniversitesi Bilgi İşlem Daire Başkanlığı tarafından lisansı sağlanan Schrödinger programı ve açık kaynak araçlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Ligandların Hazırlanması

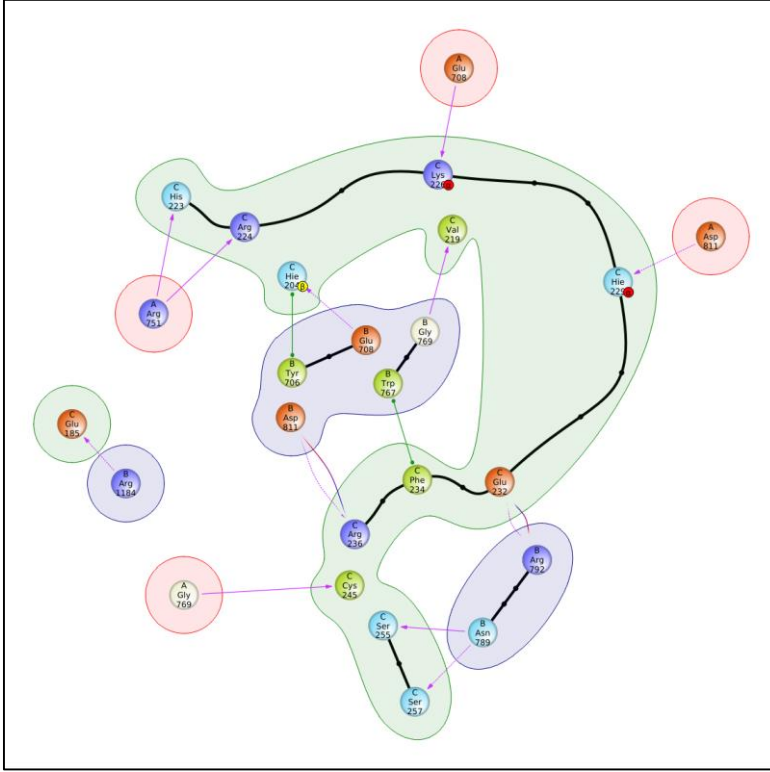
Ligand hazırlama, aday bileşiklerin bilgisayar destekli moleküler modelleme çalışmalarında kullanılabilmesi için daha optimize hale getirilmesini sağlamaktadır. Aday bileşiklerin hedef bölge ile etkileşimlerinin doğru şekilde modellenebilmesi için gerekli bir adımdır. Bu nedenle, sanal tarama çalışmaları ile DKK1 inhibitör aday olma potansiyeli değerlendirilen PubChem bileşiklerinin en uygun konformasyonu ve stereokimyasal yapısı Schrödinger yazılımında OPLS3e kuvvet alanı ve yükleri kullanılarak belirlenmiştir [54, 55]. Olası tüm protonizasyon, tautomer ve iyonizasyon durumları Epik ile hesaplanmıştır (7,2 pH) [56]. Optimize formların seçiminde tautomerizasyon özelliği ve iyonizasyon ceza puanları esas alınmıştır. Elde edilen 3B yapılar sanal tarama basamaklarında incelenmiştir.

3.2. DKK1 Protein Yapısının Hazırlanması

İnhibitör adaylarında olduğu gibi protein yapılarının da optimize edilerek, hesaplamalı analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaç için DKK1 proteininin RCSB veri tabanındaki 3S2K PDB kodlu kristal yapısı indirilmiştir. 3B kristal yapıdaki eksik atomlar ve bağlar Schrödinger yazılımının Protein Preparation modülü kullanılarak tamamlanmıştır [57]. Yapının optimizasyonu ve minimizasyonu 7,2 pH değerindeki OPLS3e kuvvet alanı parametreleri ile gerçekleştirilmiştir [58-59].

3.3. DKK1 Proteini için Grid Oluşturulması

Bilgisayar destekli moleküler modelleme çalışmalarında hedef proteinler üzerindeki potansiyel bağlanma bölgelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada DKK1 proteininin LRP5/6 reseptörü ile etkileşime giren yüzeyi hedef alınmıştır (Şekil 3.1). Seçilen bu bölge için gerekli grid hesaplamaları Glide modülündeki varsayılan parametreleri kullanılmıştır [59-60].



Şekil 3.1. DKK1 ile LRP5/6 reseptörü arasındaki etkileşimin haritası. Yeşil ile çevrili rezidümler DKK1'e, mor ve kırmızı ile çevrili rezidümler ise LRP5/6'ya aittir.

3.4. Moleküler Kenetlenme Hesaplamaları ve Analizi

Aday bileşiklerin proteinde hedeflenen bölge ile kenetlenme durumları (pozisyonları ve puanları) Schrödinger yazılımındaki Glide modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalar için sırasıyla HTVS, SP ve XP hassasiyetlerinin varsayılan parametreleri ile çalışılmıştır. Kenetlenme hesaplamaları sonrası tüm pozlar minimizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Program tarafından bağlanma afinitesi, iç gerginlik enerjisi, Coulomb ve vdW etkileşimleri gibi parametreler esas alınarak her bir ligand-protein kompleksi için kenetlenme puanı hesaplanmıştır [61].

3.5. Bağlanma Serbest Enerjilerinin Hesaplanması

Kenetlenme çalışmaları sonrası aday molekül ile hedeflenen bölge arasındaki bağlanma gücünün ve termodinamik stabilitesinin değerlendirilmesi, etkileşimin gücü ve etkinliğinin ortaya konulması adına önemli bir adımdır. Bu nedenle, kenetlenme çalışması sonucunda elde edilen pozların bağlanma serbest enerjileri Prime modülündeki Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM/GBSA) yöntemi kullanılarak

hesaplanmıştır. En iyi MM/GBSA değerine sahip 25 bileşik-protein kompleksi moleküler dinamik simülasyon (MD) çalışmaları için seçilmiştir [62-64].

3.6. Moleküler Dinamik Simülasyon ve Analizi

Kenetlenme çalışmaları proteinlerin ve ligandların anlık pozunu/sabit konformasyonunu kullanarak olası bağlanma konformasyonlarını tahminini sağlamaktadır. Bu nedenle sistemlerin esnek ve dinamik yapısının anlaşılmasında yetersiz kalmaktadır. Belirli bir birim zaman içerisindeki moleküler sistemlerin davranışını simüle eden MD çalışmaları ise simülasyon süresi boyunca sistemlerdeki yapısal esneklikleri ve konformasyonel değişimlerin takip edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu nedenle biyolojik sistemlerin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması için kendine özgü avantajlara sahip bu iki yöntem genelde birlikte kullanılmaktadır .

Öncelikle MM/GBSA değeri esas alınarak seçilen kompleksler için Schrödinger yazılımındaki Desmond programı kullanılarak simülasyon sistemleri hazırlanmıştır. Oktahedral kutu içerisine yerleştirilen sistemde en az 10 Å'lık tampon çözelti bölgesi oluşturularak SPC su modeli kullanılmıştır. Sistem nötralizasyonu için kutuya Na⁺ veya Cl⁻ iyonları eklenmiştir [65, 66].

Desmond programındaki varsayılan parametreler kullanılarak enerji minimizasyonu ve ısıtma işlemleri gerçekleştirilmiştir (OPLS3e kuvvet alanı) [67, 68]. Kimyasal bağ uzunluklarının korunması ve H atom hareketliliğinin kısıtlanması için SHAKE (Solvation, Hydrogen, and Kinetic Energy) algoritmasından yararlanılmıştır [69]. Sistem sıcaklığı Nose-Hoover termostatı kullanılarak 310 K'da dengelenmiş olup [70], basıncı ise Berendsen barostat termostatı kullanılarak 1 barda sabitlenmiştir. Hesaplamalar hem atomik düzeydeki bağ oluşumlarının gözlemlenebileceği hem de çok hesaplama yüküne neden olmayan 2,0 ps'lik zaman aralıklarında gerçekleştirilmiştir [71]. Aday bileşikler ile hedeflenen bölge arasındaki etkileşim sürekliliği MD hesaplamalarından elde edilen trajektör dosyalarının analizi ile ortaya konulmuştur. Bu analizler de RMSD ve RMSF değerleri ile birlikte moleküler etkileşim türü ve süresi incelenmiştir.

3.7. MD Sonrası Analizler

3.7.1. RMSD

RMSD trajektör dosyasındaki tüm çerçeveler için atomların ilk çerçevedeki konumları referans alınarak yer değiştirmesindeki ortalama değişiklik hesaplanmıştır. Bu hesaplama için (3.1.)’deki formülden yararlanılmıştır.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^T (r_{i'}(t_x) - r_i(t_{ref}))^2} \quad (3.1)$$

RMSD hesabının formülü: x, çerçeveyi; N, atom seçimindeki atom sayısını temsil eder; t, zaman; tref ise, referans zamanıdır (ilk çerçeve); ve r', seçilen atomların x çerçevesindeki konumunu tanımlamaktadır.

3.7.2. RMSF

Protein zinciri boyunca oluşan yapıdaki lokal değişiklikler ise RMSF ile belirlenmiştir. Bu hesaplama için (3.2.)’deki formülden yararlanılmıştır.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^T \langle (r_{i'}(t)) - r_i(t_{ref}) \rangle^2} \quad (3.2)$$

RMSF hesabının formülü: T, trajektörü süresi; tref ise, referans zaman; ri amino asidin konumunu temsil eder; r' ise referans üzerinde süperpozisyon yapıldıktan sonra amino asidin atomlarının konumunu temsil etmektedir; < > işaretleri, amino asidin atomlarının seçimi üzerinde kare mesafenin ortalamasının alındığını belirtmektedir.

3.7.3. Protein-Ligand etkileşimleri

MD simülasyon süresi boyunca proteinin ligand ile etkileşimleri analiz edilerek, bu etkileşimlerin sürekliliği ve türleri belirlenmiştir. Etkileşimler hidrojen bağları, hidrofobik, iyonik etkileşimler ve su köprüler olmak üzere dört grupta incelenmiştir.

Hidrojen Bağları (H-bağları), ligand bağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Protein ile ligand arasındaki hidrojen bağları, omurga alıcı; omurga verici; yan zincir alıcı; yan zincir verici olmak üzere dört alt tipe ayrılabilir. Mevcut geometrik kriterlere göre protein-ligand H-bağ uzaklığı: verici ve alıcı atomlar arasındaki 2.5 \AA ($D-H\cdots A$); verici-hidrojen-alıcı atomları arasındaki açı $\geq 120^\circ$ ($D-H\cdots A$); ve alıcı-hidrojen-bağlı atom atomları arasındaki açı $\geq 90^\circ$ ($H\cdots A-X$)'dir. Hidrofobik temaslar: π -katyon; π - π ; ve diğer (belirli olmayan etkileşimler) olmak üzere üç alt tipe ayrılmaktadır. Genellikle bu tür etkileşimler, bir hidrofobik amino asidin ve ligandın aromatik veya alifatik grubunun bir araya gelmesi ile oluşur, ancak bu kategoriye π -Katyon etkileşimlerini de dahil edilmiştir. Hidrofobik etkileşimlerin mevcut geometrik kriterleri şunlardır: π -Katyon — 4.5 \AA içinde aromatik ve yüklü gruplar; π - π — yüzeyden yüzeye veya kenara yığılmış iki aromatik grup; diğer — 3.6 \AA içinde bir ligandın aromatik veya alifatik karbonlarına bağlı olmayan bir belirsiz hidrofobik yan zincir içermesi gerekmektedir.

İyonik etkileşimler (polar etkileşimler): birbirine zıt yük taşıyan iki atom arasındaki 3.7 \AA içinde olan etkileşimlerdir ve bir hidrojen bağı içermez. Ayrıca bu kapsamda Protein-Metal-Ligand etkileşimlerini de izlenmiş olup, bu da bir metal iyonunun proteinin ve ligandın ağır atomlarına (karbon hariç) 3.4 \AA içinde koordine olduğu durumlar olarak tanımlanmıştır. Tüm iyonik etkileşimler, bir protein omurgası veya yan zincirler aracılığıyla iletilen olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır.

Su Köprüleri: su molekülünün aracılık ettiği hidrojen bağlı protein-ligand etkileşimleridir. Buradaki hidrojen bağına geometrisi, standart H-bağ tanımından biraz daha esnektir. Mevcut geometrik kriterlere göre bir protein-su veya su-ligand H-bağ uzaklığı: verici ve alıcı atomlar arasındaki 2.8 \AA ($D-H\cdots A$); verici-hidrojen-alıcı atomları arasındaki verici açısı $\geq 110^\circ$ ($D-H\cdots A$); ve alıcı-hidrojen-bağlı atom atomları arasındaki alıcı açısı $\geq 90^\circ$ ($H\cdots A-X$)'dur.

3.8. MD Sonrası Bağlanma Serbest Enerjilerinin Hesaplanması

Moleküler dinamik simülasyon sonrası bağlanma gücü ve termodinamik stabilitenin değerlendirilmesi amacıyla trajektör dosyalarından serbest enerji hesaplamaları yapılmıştır. Seçilen protein-ligand komplekslerinin serbest bağlanma enerjileri, MD sonrası oluşturulan trajektör dosyalarında Schrödinger yazılımının Prime modülündeki Molecular

Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM/GBSA) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Prime, etkileşimleri simüle etmek için VSGB 2.0 çözüm modeli ve OPLS3e kuvvet alanı kullanılmıştır [62-64].

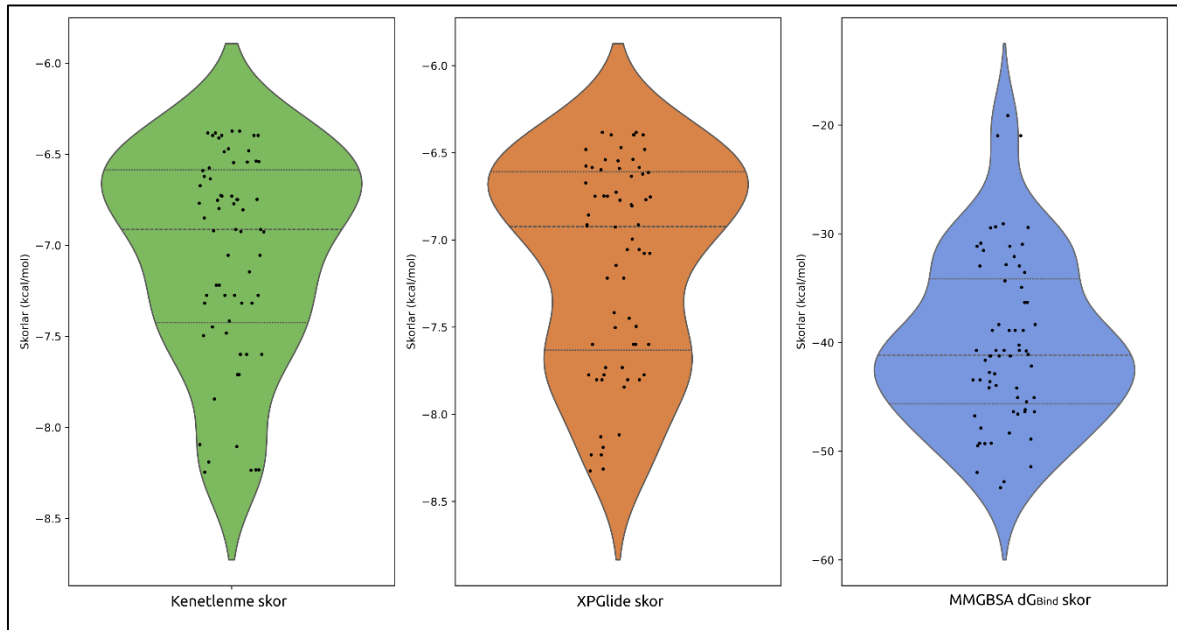
3.9. Aday Bileşiklerin Farmakokinetik Özelliklerinin Belirlenmesi

Aday bileşiklerin ortaya konulmasını amaçlayan çalışmalardaki en büyük sorunlardan biri bölüm 2.6.3’de de belirtildiği gibi bileşiğin biyoyararlanım profilidir. Bu nedenle kenetlenme, MD simülasyon ve enerji hesaplarının ardından, en yüksek bağlanma afinitesi gösteren bileşiklerin farmakokinetik özellikleri ve biyoyararlanım profillerinin tahmini de ortaya konulmuştur. Bu amaç için Schrödinger 2023-1 yazılımının Qikprop modülü kullanılarak değerlendirilmiştir [72].

4. BULGULAR

4.1. Kenetlenme ve MM/GBSA Analizleri

Moleküler kenetlenme çalışmaları, aday molekül ile proteinin anlık pozundaki hedef bölge arasındaki bağlanma mekanizmalarının atomik düzeyde anlaşılabilmesini, MM/GBSA ise kenetlenme durumundaki bağlanma serbest enerjilerinin hesaplanabilmesini sağlamaktadır. Bu sebepten kimyasal veri tabanı bileşikleri ile DKK1'in LRP5/6'ya bağlanan bölgesi arasındaki etkileşim durumları HTVS, SP ve XP kenetlenme hesaplamaları ve MM/GBSA analizi ile tahmin edilmiştir. Bu bölümde MM/GBSA sonuçları referans alınarak yalnızca yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğu tespit edilen bileşiklerin kenetlenme skor ve durumları raporlanmıştır. Diğer bileşiklere ait sonuçlar ise Şekil 4.1'deki kenetlenme skorlarının dağılım grafiği ve EK 1'deki tablo ile verilmiştir.



Şekil 4.1. Kenetlenme skorlarının dağılımı

Çizelge 4.1'de de görülebileceği üzere, en yüksek bağlanma afinitesine sahip bileşik 102082490'dır (-53.36 kcal/mol). Fakat diğer bileşikler de güzel MMGBSA dG_{Bind} skorlarına sahiptir. Referans molekül olarak seçilen NCI8642'nin kenetlenme skoru ve bağlanma enerjisinin ise sırasıyla -4.950 ve -30.87 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kenetlenme hesaplamaları sonucu DKK1 ile yüksek etkileşim gösteren bileşiklere ait skorlar

| # | Kimyasal ID | Kenetlenme Skoru | Glide GSkoru | XP GSkoru | MMGBSA dG_{Bind} (kcal/mol) |
|----|-------------|------------------|--------------|-----------|--------------------------------------|
| 1 | 102082490 | -6.726 | -6.726 | -6.726 | -53.36 |
| 2 | 24741647 | -6.540 | -6.540 | -6.540 | -52.80 |
| 3 | 129868322 | -6.575 | -6.576 | -6.576 | -51.95 |
| 4 | 15333756 | -6.470 | -6.470 | -6.470 | -51.42 |
| 5 | 657042 | -8.105 | -8.129 | -8.129 | -49.49 |
| 6 | 11708277 | -7.844 | -7.844 | -7.844 | -49.30 |
| 7 | 101742079 | -6.749 | -6.749 | -6.749 | -49.27 |
| 8 | 11277569 | -7.146 | -7.146 | -7.146 | -48.89 |
| 9 | 10265835 | -7.448 | -7.449 | -7.449 | -48.33 |
| 10 | 10017376 | -6.772 | -6.772 | -6.772 | -47.87 |
| 11 | 139183638 | -7.482 | -7.503 | -7.503 | -46.58 |
| 12 | 91490554 | -7.318 | -7.774 | -7.774 | -46.37 |
| 13 | 54578370 | -6.481 | -6.481 | -6.481 | -46.18 |
| 14 | 2748048 | -6.798 | -6.798 | -6.798 | -45.45 |
| 15 | 11435629 | -8.233 | -8.233 | -8.233 | -45.07 |
| 16 | 85692821 | -8.235 | -8.314 | -8.314 | -44.19 |
| 17 | 139055031 | -7.416 | -7.417 | -7.417 | -43.95 |
| 18 | 139089580 | -6.546 | -6.546 | -6.546 | -43.60 |
| 19 | 10375526 | -6.383 | -6.383 | -6.383 | -43.44 |
| 20 | 102472709 | -8.190 | -8.190 | -8.190 | -42.88 |
| 21 | 139121395 | -6.486 | -6.597 | -6.597 | -42.17 |
| 22 | 56851256 | -6.769 | -6.769 | -6.769 | -41.64 |
| 23 | 470199 | -7.275 | -7.802 | -7.802 | -41.24 |
| 24 | 139092170 | -6.753 | -6.753 | -6.753 | -41.10 |
| 25 | 139077984 | -6.926 | -6.926 | -6.926 | -40.78 |
| 26 | 139083129 | -7.599 | -7.599 | -7.599 | -40.73 |
| 27 | 102335278 | -7.599 | -7.599 | -7.599 | -40.73 |
| 28 | 129716195 | -6.920 | -6.920 | -6.920 | -40.24 |
| 29 | 163040 | -6.397 | -6.397 | -6.397 | -38.89 |
| 30 | NCI8642 | -4.950 | -4.962 | -4.962 | -30.87 |

En iyi bağlanma afinitesi gösteren 5 bileşiğin ve NCI8642'nin kenetlenme etkileşim haritaları Şekil 4.2'deki gibidir. 102082490 ile DKK1 arasındaki etkileşimlerin çoğu proteindeki polar ve hidrofobik rezidüer ile kurulmuştur. Bunlar ligandın OH grupları ile kurulan H-bağları ve fenil halkası ile kurulan π - π etkileşimleridir. Kenetlenmeden sorumlu olan rezidüer ise Thr221, His223, Arg236, Cys237 ve Tyr238'dir.

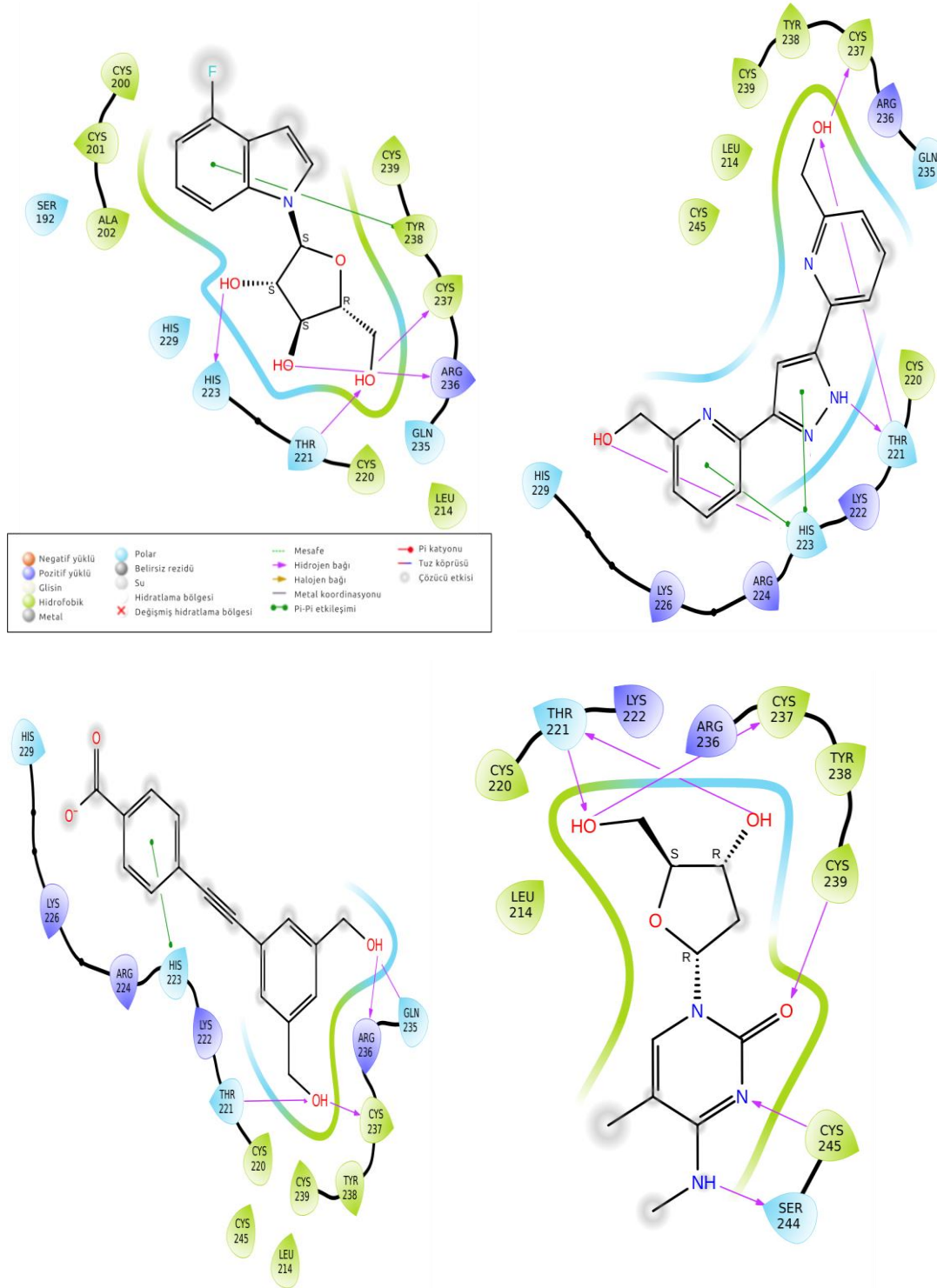
24741647 ile DKK1 arasındaki kenetlenme durumuna da polar ve hidrofobik rezidüer ile kurulan H-bağları ve π - π etkileşimleri eşlik etmektedir. H-bağlarının kurulmasında ligandaki OH ve NH gruplarının görev aldığı, π - π etkileşimlerinin ise pürin halkası ile kurulduğu tespit edilmiştir. Kenetlenmede rol alan rezidüer Thr221, His223 ve Cys237'dir.

129868322 ile DKK1'in etkileşim haritası incelendiğinde kenetlenmenin H-bağları ile OH grubu ve π - π 'nin ise fenil halkası ile kurulan etkileşimlere dayandığı görölmektedir. Kenetlenmedeki önemli rezidüer Thr221, His223, Gln235, Arg236 ve Cys237'dir.

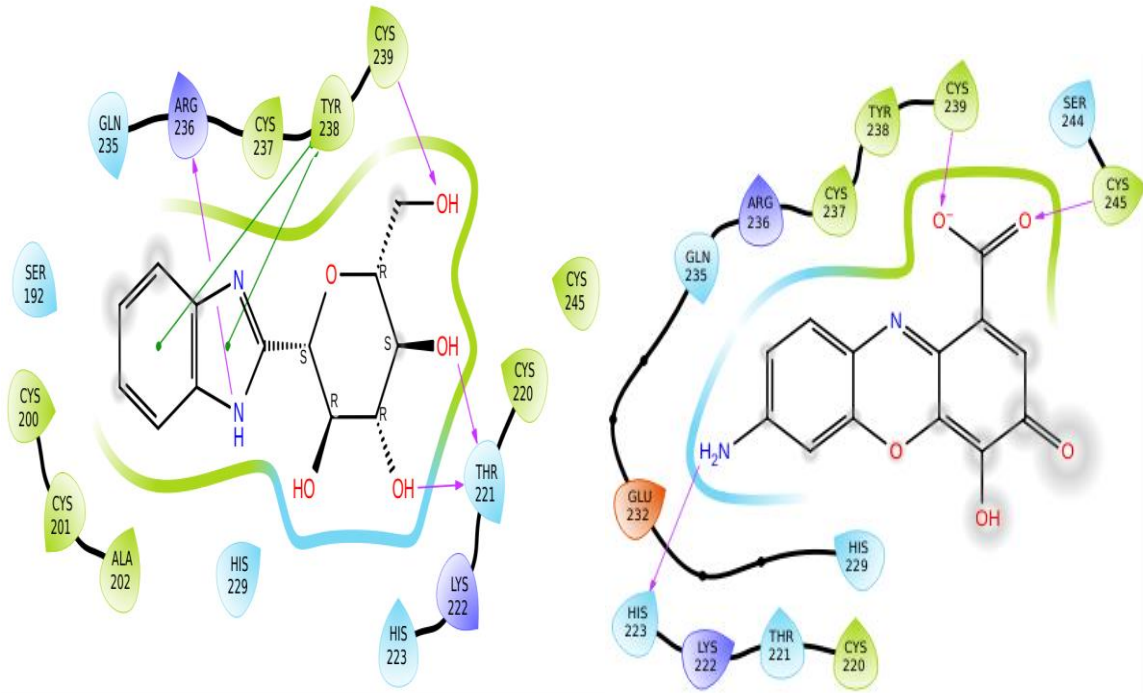
15333756 ile DKK1'in kenetlenme pozunda etkileşime yalnızca polar ve hidrofobik rezidüer ile yapılan H-bağları aracılık etmektedir. 15333756'nın pirimidin halkasındaki N'lerin Ser244 ve Cys245 ile, furan halkasındaki OH gruplarını ise Thr221 ve Cys237 ile bağ yaptığı tespit edilmiştir.

657042 ile DKK1'in kenetlenmesinde ise pirimidin halkası ile kurulan π - π etkileşimlerine ve tetrahidropiran halkasının OH grubu ile yapılan H-bağları tespit edilmiştir. Kenetlenmedeki önemli rezidüerlerin Thr221, Arg236, Tyr238 ve Cys239 olduğu belirlenmiştir.

Referans molekül olarak seçilen NCI8642'nin DKK1 ile kenetlenme pozunda ise rezidüer ile yalnızca H-bağı yaptığı tespit edilmiştir. His223, Cys239 ve Cys245'in kenetlenmedeki ana rezidüer olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 4.2. Ligandların DKK1 ile etkileşim haritası. A: 102082490 ile DKK1 B: 24741647 ile DKK1 C: 129868322 ile DKK1 D: 15333756 ile DKK1 E: 657042 ile DKK1 F: NCI8642 ile DKK1. Ala: Alanin, Arg: Arjinin, Cys: Sistein, Gln: Glutamin, His: Histidin, Leu: Lösin, Lys: Lizin, Ser: Serin, Thr: Treonin, Tyr: Tirozin'i sembolize etmektedir.



Şekil 4.2. (devam) Ligandların DKK1 ile etkileşim haritası A: 102082490 ile DKK1 B: 24741647 ile DKK1 C: 129868322 ile DKK1 D: 15333756 ile DKK1 E: 657042 ile DKK1 F: NCI8642 ile DKK1. Ala: Alanin, Arg: Arjinin, Cys: Sistein, Gln: Glutamin, His: Histidin, Leu: Lösin, Lys: Lizin, Ser: Serin, Thr: Treonin, Tyr: Tirozin'i sembolize etmektedir.

4.2. MD Simülasyon ve MM/GBSA Analizleri

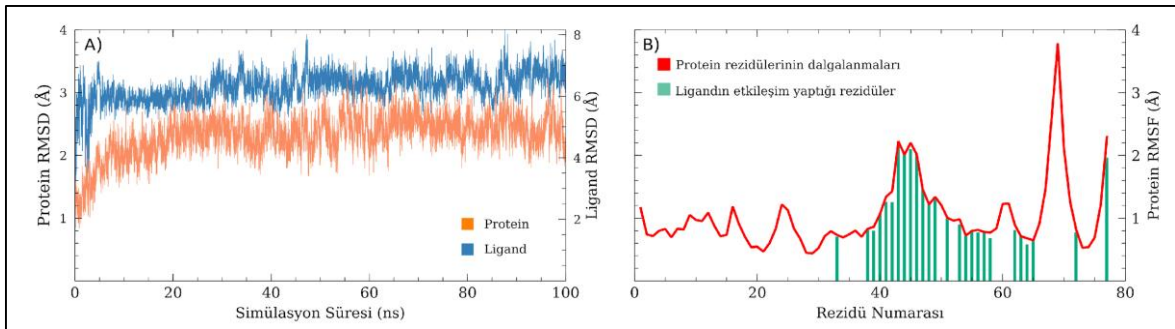
MD simülasyon hesaplamaları hem atomik hem de moleküller etkileşimdeki değişimlerin simülasyon süresi boyunca anlık olarak incelenmesini sağlamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında Çizelge 4.1'de de verilen en iyi MM/GBSA sonucuna sahip protein-ligand kompleksleri için MD simülasyon hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Bu komplekslerin kenetlenme pozunu MD simülasyon çalışmaları için başlangıç pozunu olarak kabul edilmiştir. MD simülasyon çalışmaları sonrası, 100 ns'lik simülasyon süresi boyunca bu bileşiklerden 7 tanesinin DKK1'in LRP5/6'ya bağlanan bölgesi ile etkileşimini sürdürmeye devam ettiği tespit edilmiştir. MD sonrası analizler için yalnızca bu 7 bileşiklere ait sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır. 100 ns'lik MD simülasyonu boyunca protein-ligand kompleksindeki konformasyonel değişimler Ca atomlarının RMSD değerleri hesaplanmıştır. Simülasyon süresi boyunca en çok dalgalanan protein segmentlerinin belirlenerek, bunların ligand ile etkileşimleri ve ikincil yapı elemanlarıyla ilişkisini görselleştirilmesinde RMSF değerlerinden yararlanılmıştır. Kimyasal bileşikler ile ilgili bölge arasındaki etkileşim haritası ve bu etkileşimde rol oynayan bağ türleri ise

Schrödinger yazılımındaki "Protein-Ligand Interactions" kullanılarak görselleştirilmiştir. Son olarak, 7 protein-ligand kompleksi için de trajektör dosyaları üzerinden MM/GBSA analizi gerçekleştirilerek sistemlerin serbest enerjileri hesaplanmıştır.

4.2.1. RMSD ve RMSF

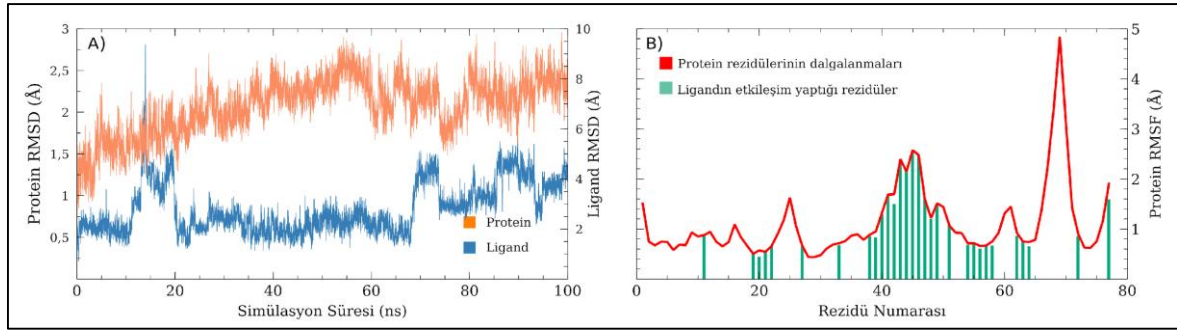
Bu çalışmada antagonist adayları ile etkileşime giren DKK1 proteinindeki yapısal değişimler, proteinin Ca atomlarına ait RMSD değerlerinin analizi ile değerlendirilmiştir. Diğer yandan protein zinciri boyunca meydana gelen yerel değişiklikler ise RMSF ile ifade edilmiştir.

13871067 ile DKK1 kompleksinin RMSD sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.3-A), sistemin simülasyon süresi boyunca kabul edilebilir aralıklarda olduğu ve 5. sn'den sonra dengeye girdiği görülmektedir. 100 ns'lik bu sistemin ortalama RMSD değeri 2.37 Å olarak belirlenmiştir. 3.5 Å ise simülasyon süresi boyunca saptanan en yüksek RMSD değeridir. Sonuçlar 13871067'in proteinin yapı veya stabilitesinde değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Diğer yandan grafikteki mavi çizgiler 13871067'nin proteine göre RMSD'sini temsil etmektedir ve ligandın protein ve bağlanma bölgesine göre ne kadar stabil olduğunu ifade etmektedir. 13871067'ye ait RMSD değeri incelendiğinde, simülasyon süresi boyunca 13871067'nin kararlı bir şekilde bağlanma bölgesinde kaldığı görülmektedir. Şekil 4.3-B'deki RMSF grafiği incelendiğinde en çok dalgalanmanın 70. rezidüde olduğu tespit edilmiştir ($\approx 4\text{Å}$).



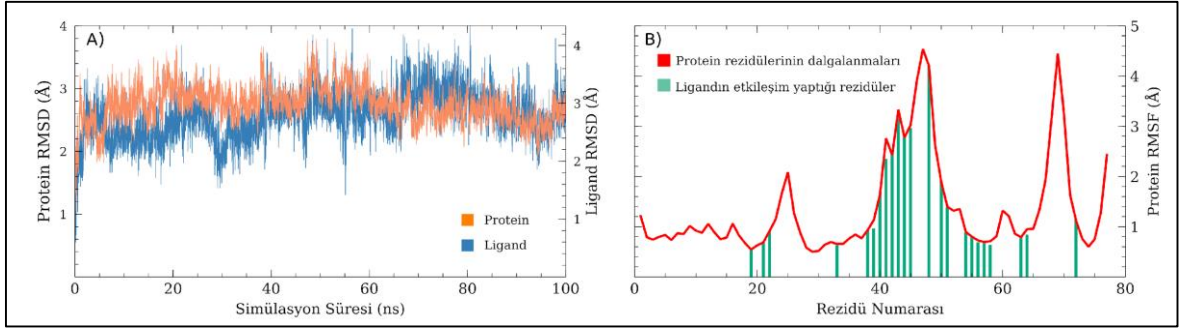
Şekil 4.3. 13871067 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği. A: Ca atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri B: DKK1'in enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi noktalar ligandın, turuncu noktalar ise proteinin RMSD değerlerini göstermektedir. Yeşil çizgiler ise DKK1'deki etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir.

139183638 ve DKK1 kompleksine ait 100ns'lik MD simülasyonunda proteine ait RMSD değerinin 0.72 Å ile 3.04 Å arasında değiştiği tespit edilmiştir. Simülasyonun ortalama RMSD değeri 2.14 Å olarak hesaplanmıştır. Simülasyon süresi başlangıcından itibaren ligand RMSD'si ile protein RMSD'si arasında büyük bir fark olduğu ve bu nedenle ligandın proteine uyumlu bir şekilde bağlanamadığı tespit edilmiştir. Ancak, 70. ns'den sonra RMSD'ler arasındaki farkın azaldığı görülmektedir (Şekil 4.4-A). Bu sistemin dengeye ulaşması için biraz daha vakte ihtiyaç duyduğunu gösteriyor olabilir. Bu nedenle simülasyon süresinin uzatılarak verilerin değerlendirilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Şekil 4.4-B'deki RMSF grafiği incelendiğinde en çok dalgalanmanın 70. rezidüde olduğu tespit edilmiştir ($\approx 4\text{Å}$).



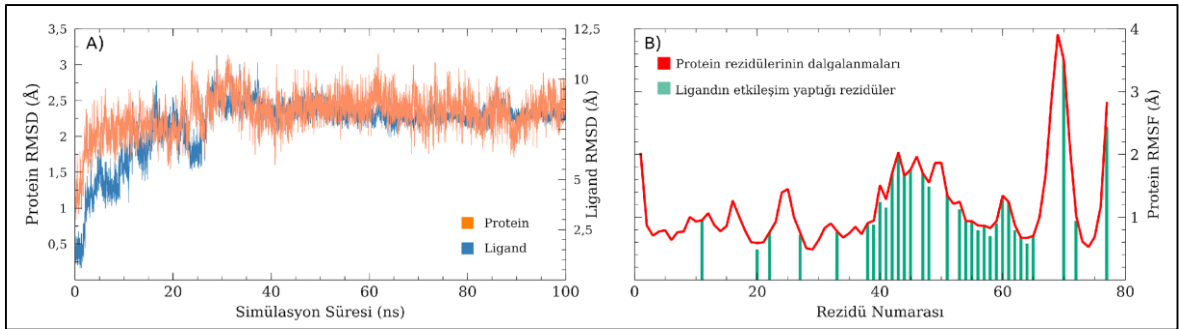
Şekil 4.4. 139183638 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği. A: $C\alpha$ atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri B: DKK1'in enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi noktalar ligandın, turuncu noktalar ise proteinin RMSD değerlerini göstermektedir. Yeşil çizgiler ise DKK1'deki etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir.

657042 ve DKK1'in 100 ns'lik MD simülasyon süresi boyunca RMSD değerlerinin 2-3.92 Å arasında olduğu saptanmıştır. Ortalama RMSA 2.79 Å olarak hesaplanmıştır. Proteinde yapı ve stabilite açısından bir değişiklik tespit edilmemiştir. 657042'nin ligand RMSD'si incelendiğinde sonuçlar molekülün bağlanma bölgesine kararlı ve stabil bir şekilde bağlı kalabildiğini göstermektedir (Şekil 4.5-A). RMSF verileri diğer rezidüler ile kıyaslandığında başlıca iki bölgenin daha esnek ve hareketli olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.5-B). Bunlardan ilki, 45-50. rezidüler arasındaki bölgedir. Alfa-heliks yapısının hakim olduğu bu bölgedeki ortalama RMSD değeri $\sim 4\text{Å}$ 'dır. Diğer bölge ise 70. rezidüdür. Şekil de de görüldüğü üzere iki bölgede RMSD değerleri yaklaşık 4Å 'dur.



Şekil 4.5. 657042 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği. A: $C\alpha$ atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri B: DKK1'in enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi noktalar ligandın, turuncu noktalar ise proteinin RMSD değerlerini göstermektedir. Yeşil çizgiler ise DKK1'deki etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir.

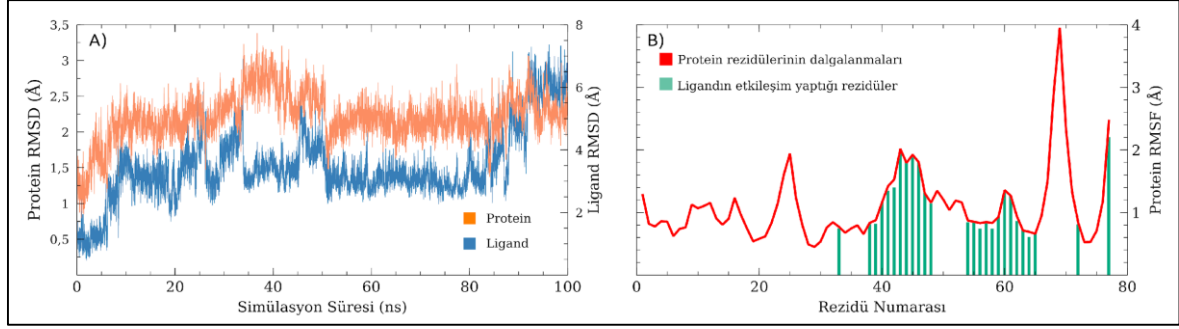
470199 ve DKK1'in MD simülasyonu boyunca RMSD değerinin 0.80 ile 3.25 Å aralığında olduğu, ortalama RMSD'nin 2.33 Å olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6-A). 100 ns'li simülasyondan elde edilen bu veriler kabul edilen aralıkta olup, simülasyon süresi boyunca protein yapısında anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Ligand RMSD ise 470199'in simülasyonun başların proteindeki bağlanma cebine yerleşmeye çalıştığını, 30ns'den sonra ise yerleşerek, bu bölgede kararlı bir şekilde kaldığını göstermektedir. Şekil 4.6-B'de verilen RMSF analizi, kompleksteki en çok dalgalanmanın 70. rezidüde olduğunu işaret etmektedir. ($\approx 4.2\text{Å}$).



Şekil 4.6. 470199 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği. A: $C\alpha$ atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri B: DKK1'in enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi noktalar ligandın, turuncu noktalar ise proteinin RMSD değerlerini göstermektedir. Yeşil çizgiler ise DKK1'deki etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir.

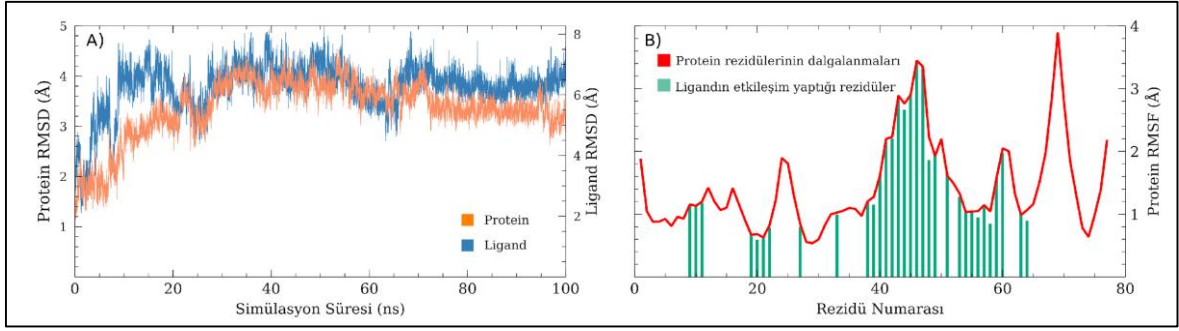
91490554 ile DKK1 kompleksinin 100ns'lik MD simülasyonunda elde edilen RMSD değerleri 0.73 - 3.48 Å aralığındadır. Simülasyonun ortalama RMSD'si 2.25 Å'dur (Şekil 4.7-A). Ligandın protein ile yer yer etkileşime girebildiği ancak sistemin dengeye

giremediği görülmektedir. Özellikle 30ns'den sonra hedeflenen bağlanma bölgesi ile güçlü etkileşim kurmakta zorlandığı fark edilmiştir. Sonuçların daha doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için simülasyon süresinin uzatılarak yeniden incelenmesi gerekmektedir. Rezidülere ait RMSF değerleri kabul edilen aralıkta olup, 70. rezidüde yaklaşık 4.4 Å'luk dalgalanma tespit edilmiştir (Şekil 4.7-B).



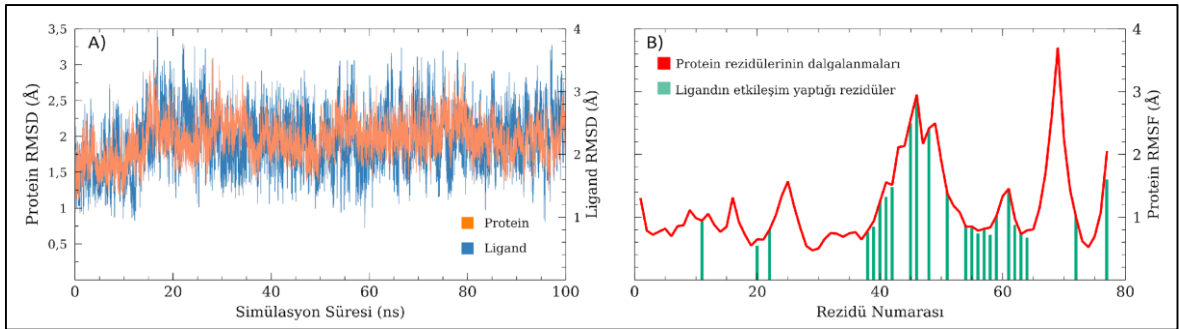
Şekil 4.7. 91490554 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği. A: C α atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri B: DKK1'in enzim ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi noktalar ligandın, turuncu noktalar ise proteinin RMSD değerlerini göstermektedir. Yeşil çizgiler ise DKK1'deki etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir.

445074 ve DKK1'in 100 ns'lik MD simülasyonunda RMSD değerlerinin 0.778 - 4.573 Å aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu protein ligand kompleksi için ortalama RMSD değerini 3.38 Å olarak hesaplanmıştır Şekil 4.8-A'da da görüldüğü üzere sistem dengeye ulaştıktan sonraki RMSD değerleri 3'ün üzerindedir. Bu durum, simülasyon süresince proteinde yapısal farklılıkların veya konformasyonel değişikliklerin olduğunu göstermektedir. Aynı şekildeki ligand RMSD değerleri incelendiğinde 445074'e ait RMSD'nin değiştiği; yapının başlangıç konumu ile kıyaslandığında farklılık gösterebileceği tespit edilmiştir. RMSF grafiği incelendiğinde proteindeki yüksek RMSD'ye 40.-50. rezidüler arasında kalan bölge ile 70. rezidünün katkı sağladığı fark edilmektedir (Şekil 4.8-B).



Şekil 4.8. 445074 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği. A: $C\alpha$ atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri B: DKK1'in enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi noktalar ligandın, turuncu noktalar ise proteinin RMSD değerlerini göstermektedir. Yeşil çizgiler ise DKK1'deki etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir.

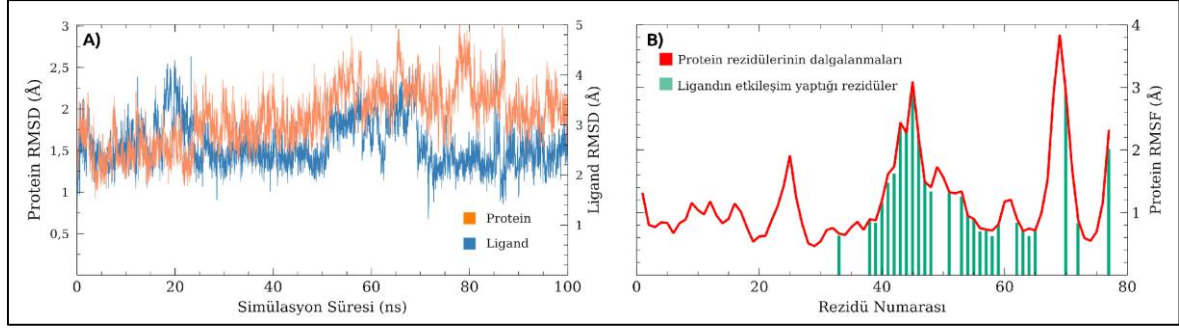
10265835 ile DKK1 kompleksinin RMSD sonuçları da Şekil 4.9-A'da verilmiştir. Simülasyon süresi boyunca RMSD değerinin 1.2 Å ile 3 Å arasında değiştiği ve sistemin 40. ns sonrasında dengeye girdiği görülmektedir. 10265835-DKK1 kompleksinin 100 ns'lik simülasyonu boyunca ortalama RMSD değeri 2.00 Å olarak hesaplanmıştır. 10265835'in DKK1'in yapı ve stabilitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Ligand RMSD'si de simülasyon süresi boyunca stabil ve kabul edilebilir aralıklardadır. Şekil 4.9-B'deki RMSF verileri döngü bölgesine karşılık gelen 70. rezidünün esnek ve hareketliliğe elverişli bir bölge olduğunu göstermektedir ($\approx 4\text{Å}$).



Şekil 4.9. 10265835 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği. A: $C\alpha$ atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri B: DKK1'in enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi noktalar ligandın, turuncu noktalar ise proteinin RMSD değerlerini göstermektedir. Yeşil çizgiler ise DKK1'deki etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir.

NCI8642 ile DKK1 kompleksinin RMSD sonuçları da Şekil 4.10-A'da verilmiştir. Simülasyon süresi boyunca RMSD değerinin 1.2 Å ile 3 Å arasında değiştiği ve sistemin 40. ns sonrasında dengeye girdiği görülmektedir. NCI8642-DKK1 kompleksinin 100 ns'lik

simülasyonu boyunca ortalama RMSD değeri 2.00 Å olarak hesaplanmıştır. 10265835'in DKK1'in yapı ve stabilitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Ligand RMSD'si de simülasyon süresi boyunca stabil ve kabul edilebilir aralıklardadır. Şekil 4.10-B'deki RMSF verileri döngü bölgesine karşılık gelen 70. rezidünün esnek ve hareketliliğe elverişli bir bölge olduğunu göstermektedir ($\approx 4\text{Å}$).



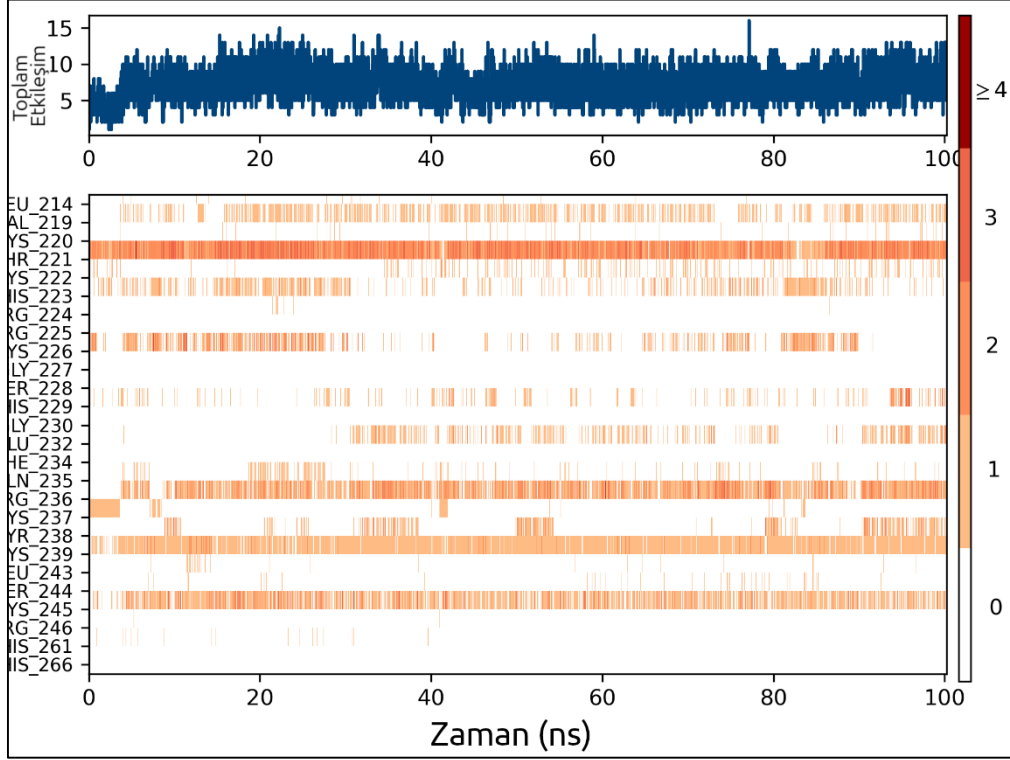
Şekil 4.10. NCI8642 ile DKK1 kompleksinin RMSD ve RMSF değerlerinin grafiği. A: $C\alpha$ atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri B: DKK1'in enzimin ağır atomlarına göre hesaplanan RMSF değerleri. Mavi noktalar ligandın, turuncu noktalar ise proteinin RMSD değerlerini göstermektedir. Yeşil çizgiler ise DKK1'deki etkileşime giren rezidüleri ifade etmektedir.

4.2.2. Protein-Ligand etkileşimi

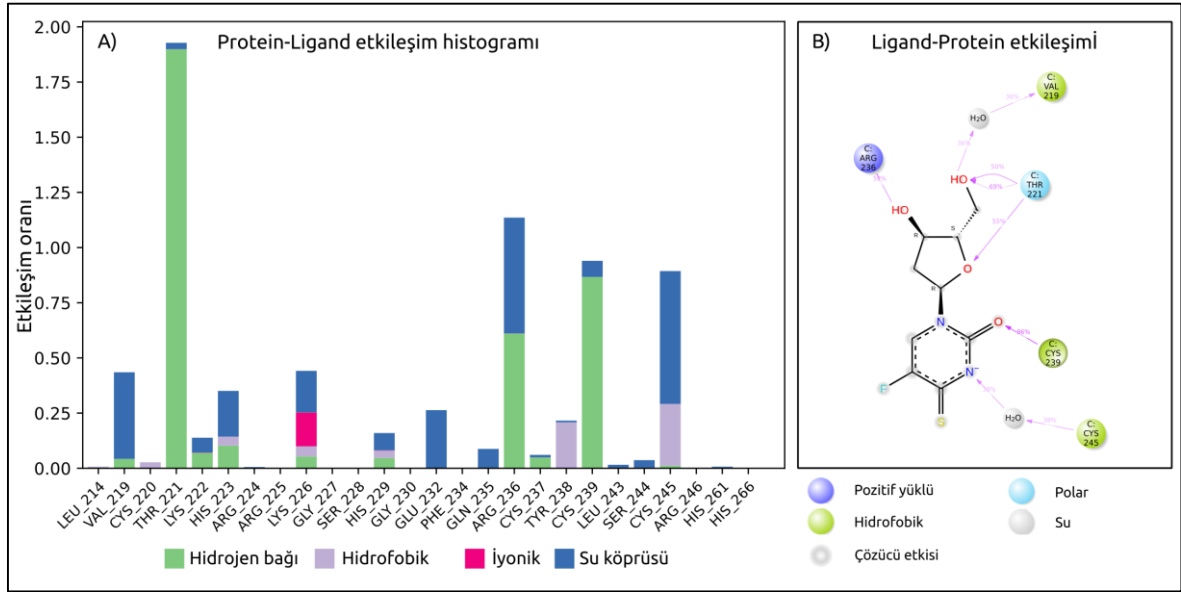
Bu bölümde MD simülasyon süresi boyunca süren/kurulan etkileşimler, türleri ve bu etkileşimlere aracılık eden rezidüler analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar simülasyonun her adımındaki toplam etkileşim miktarı ve bunların dağılımının gösterildiği diyagramlar ve etkileşim haritaları ile özetlenmiştir.

Şekil 4.11'de de görüldüğü üzere, 13871067 ile DKK1 arasındaki etkileşim 100 ns boyunca sürmekte olup, etkileşimde rol oynayan başlıca rezidüler Val219, Thr221, His223, Arg226, Arg236, Cys239 ve Cys245'dir. Şekil 4.12'deki etkileşim oran grafiği incelendiğinde, 13871067 ile DKK1 arasındaki etkileşimde ağırlıklı olarak H-bağlarının ve su köprülerinin rol aldığı görülmektedir. 2B etkileşim haritasında özetlendiği gibi, Arg236, Val219 ve Thr221 13871067'nin furan halkası ile, Cys239 ve Cys245 ise imidazol halkası ile etkileşime girmektedir. Arg236 ve Thr221'nin simülasyon süresinin yarısından fazlası boyunca süren etkileşimi furan halkasındaki sırasıyla OH ucu ve oksijen atomu ile kurduğu H-bağına dayanmaktadır. Val219 ise simülasyon süresinin %36'sında furan halkası ile su köprüsü kurmuştur. Diğer yandan imidazol halkasındaki etkileşimlerde Cys239 ile kurulan

H-bağının (simülasyon süresinin %86'sı boyunca) ve Cys245 ile kurulan su köprüsünün (simülasyon süresinin %38'si boyunca) rol aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

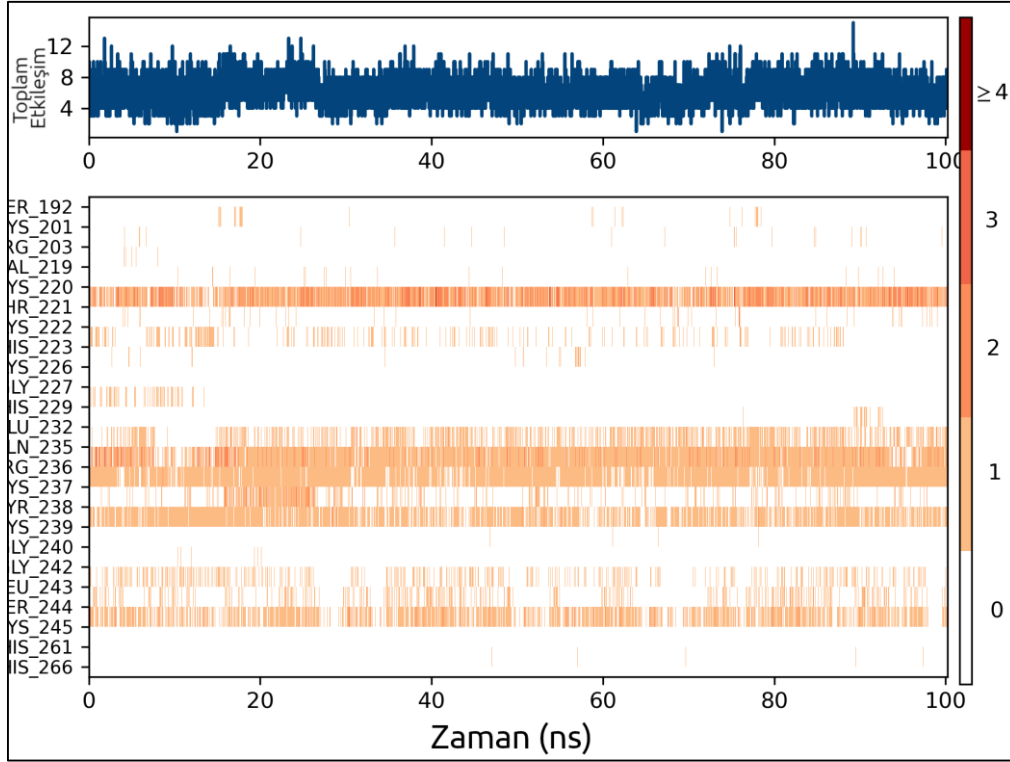


Şekil 4.11. 13871067 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi. A) 100 ns boyunca kurulan toplam etkileşim miktarındaki değişim B) Etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısının yoğunluğu sağ taraftaki renk skalasında belirtilmiştir.

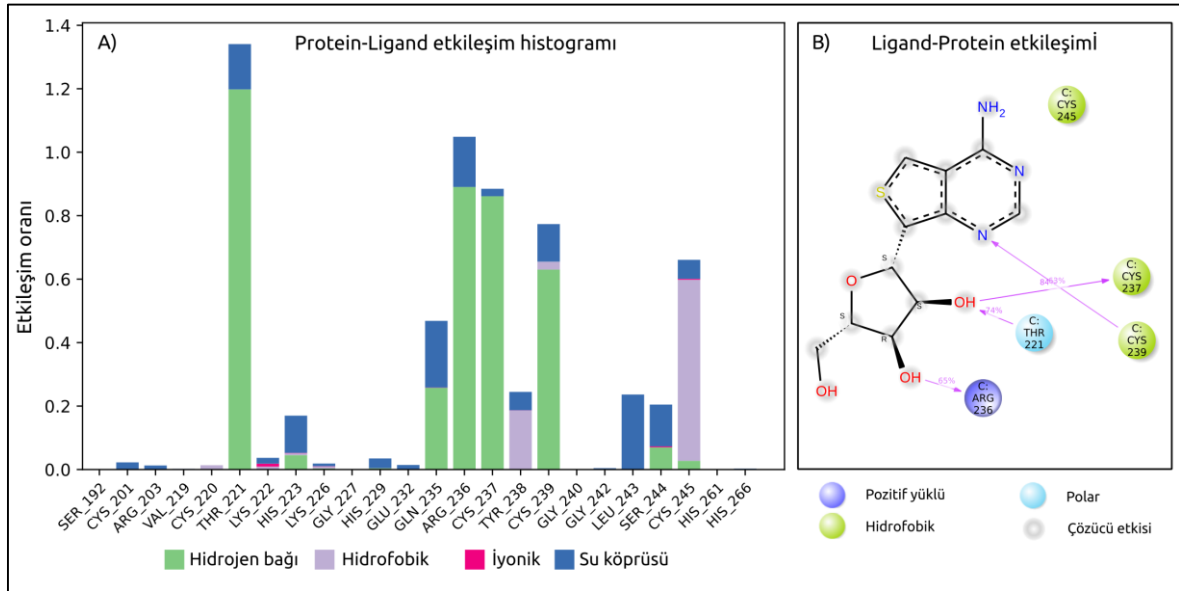


Şekil 4.12. 13871067 ile DKK1 arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %30'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

10265835 ile DKK1'in 100 ns'lik etkileşimine Thr221, Gln235, Arg236, Cys237, Cys239 ve Cys245 rezidüleri aracılık etmektedir (Şekil 4.13). Kurulan etkileşimlerinin çoğu H-bağından oluşmaktadır (Şekil 14.14). Simülasyondaki en kuvvetli etkileşimin Cys239 ile 10265835'in pürin halkasındaki N atomu arasındaki H-bağıdır. Bu bağ simülasyon süresinin %84'ü boyunca sürdüğü tespit edilmiştir. Diğer rezidülerin ise furan halkası ile etkileşime girdiği saptanmıştır. Bu rezidülerden Arg236'nın furan halkasının R pozisyonundaki OH grubu ile simülasyon süresinin %65'i boyunca Thr221 ve Cys237'nin ise sırasıyla simülasyon süresinin %74'ü ve %63'ü boyunca S pozisyonundaki OH grubu ile H-bağ kurduğu tespit edilmiştir. Bu durumda Thr221'nin amino grubu H-bağ donörü olarak hareket ederek, Cys237 ise H-bağ akseptörü olarak aynı rezidü ile etkileşime girmişlerdir.

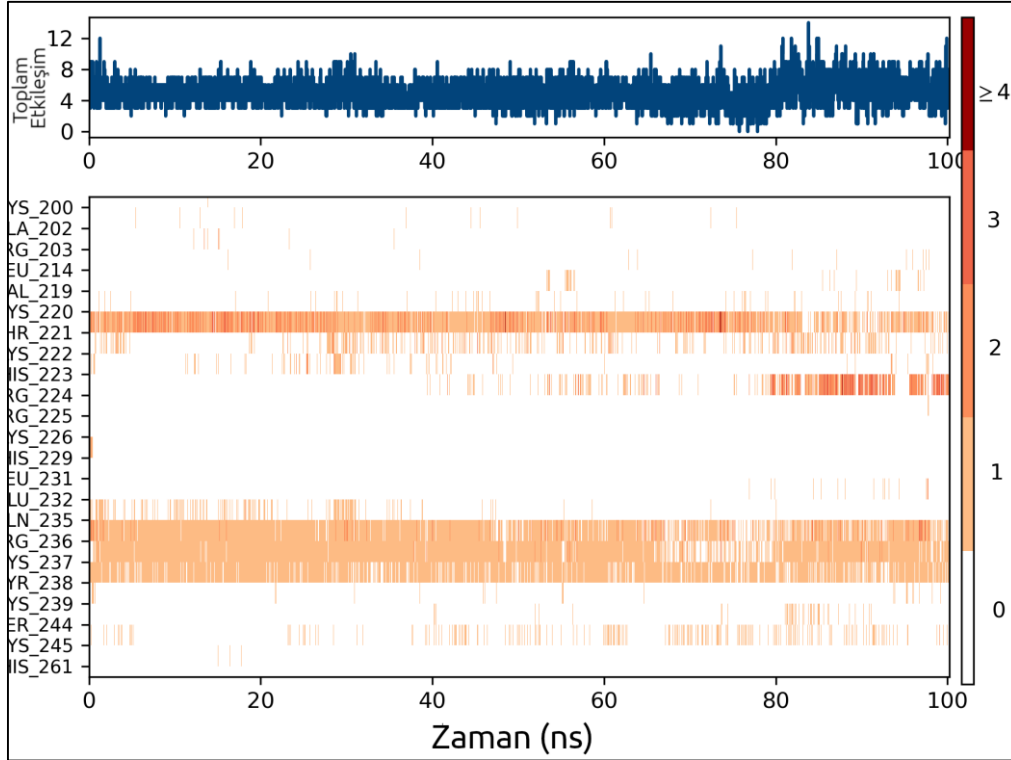


Şekil 4.13. 10265835 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi. A) 100 ns boyunca kurulan toplam etkileşim miktarındaki değişim B) Etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısının yoğunluğu sağ taraftaki renk skalasında belirtilmiştir.

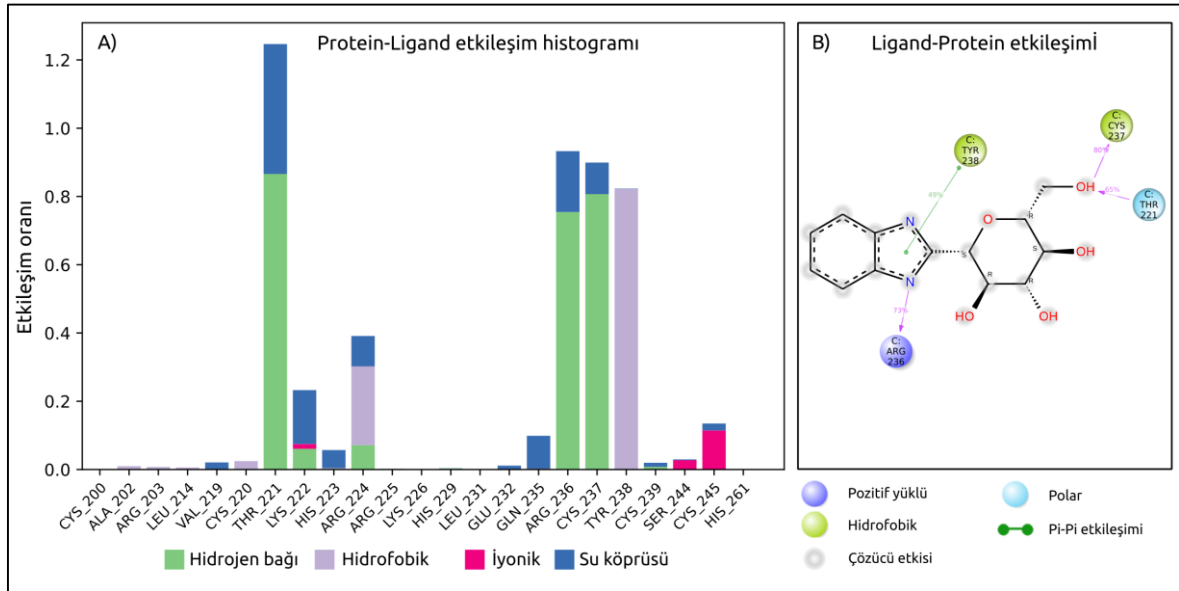


Şekil 4.14. 10265835 ile DKK1 arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %30'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

139183638 ile DKK1'in etkileşimine Thr221, His223, His229, Arg236, Tyr238 ve Cys239 rezidüleri ile kurulan bağlar aracılık etmektedir (Şekil 4.15). Şekil 4.16'da da görüldüğü



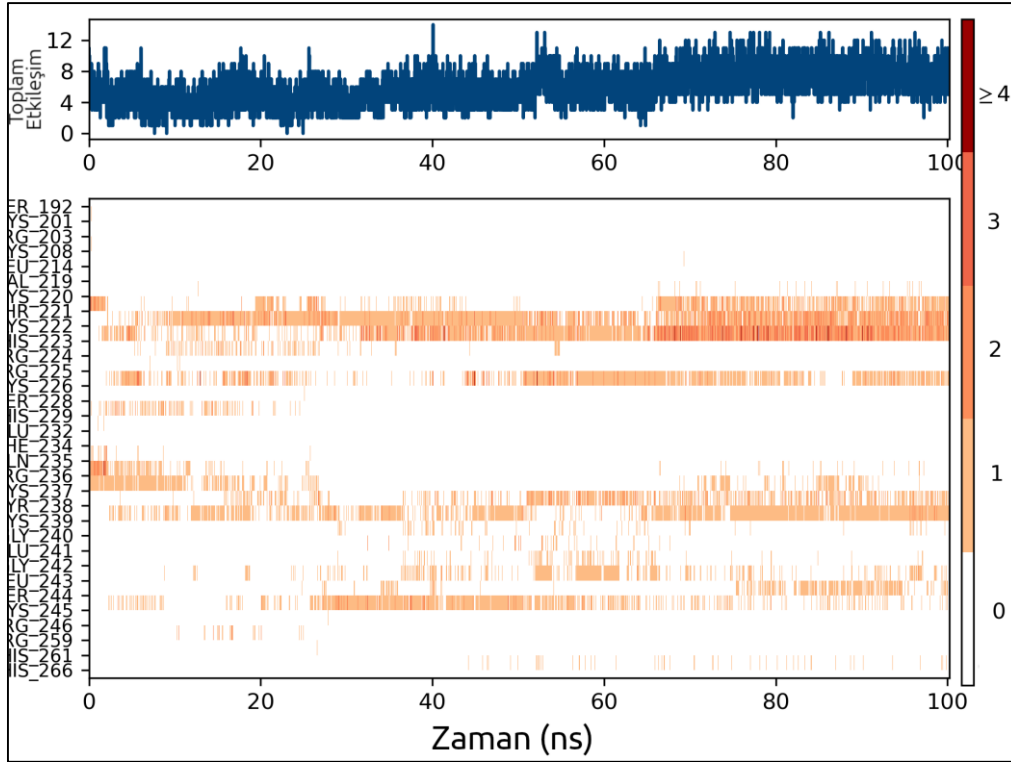
Şekil 4.17. 657042 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi. A) 100 ns boyunca kurulan toplam etkileşim miktarındaki değişim B) Etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısının yoğunluğu sağ taraftaki renk skalasında belirtilmiştir.



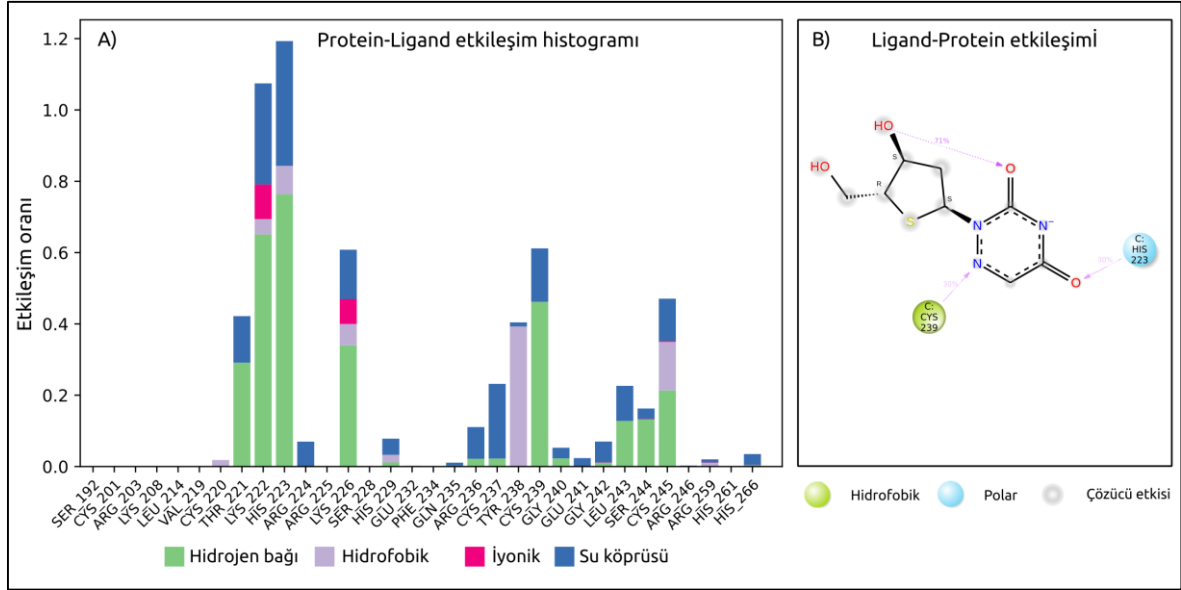
Şekil 4.18. 657042 ile DKK1 arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %30'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

470199 ile DKK1 arasındaki 100 ns'lik MD simülasyon sonuçları etkileşime aracılık eden önemli rezidülerin Lys222, His223, Lys226 ve Cys239 olduğunu ve etkileşimlerin esasen

H-bağları ve su köprülerine dayandığını göstermektedir. Bunun yanı sıra Lys222 ve Lys226 ile yapılan etkileşimlerde yaklaşık %2'lik iyonik bağ oluştuğu da gözlemlenmiştir. (Şekil 4.19. ve Şekil 4.20). Şekil 4.20-B'deki 2B etkileşim haritasında da görüldü üzere ligandın triazinon halkasının Cys239 ve His223 ile etkileşimi protein-ligand kompleksinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır.

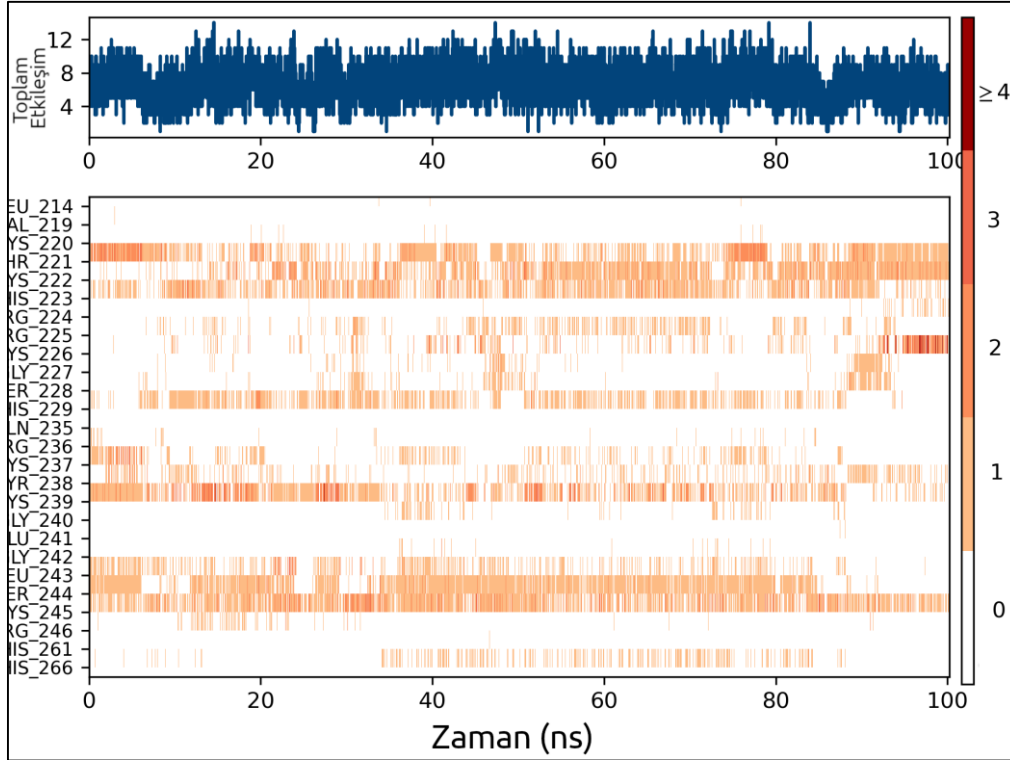


Şekil 4.19. 470199 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi. A) 100 ns boyunca kurulan toplam etkileşim miktarındaki değişim B) Etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısının yoğunluğu sağ taraftaki renk skalasında belirtilmiştir.

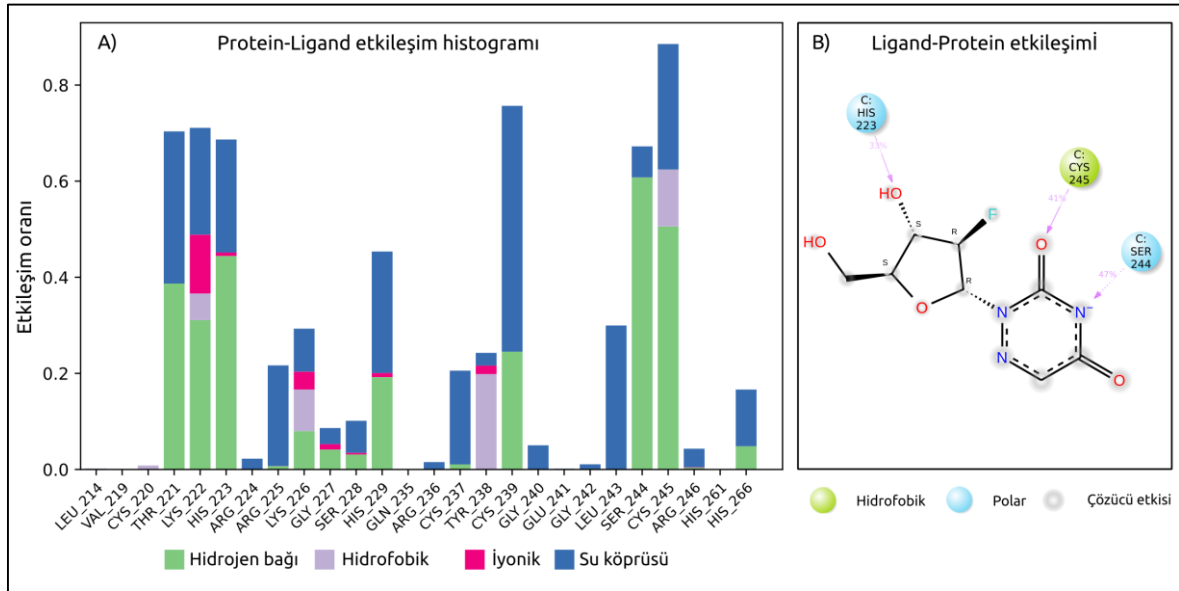


Şekil 4.20. 470199 ile DKK1 arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %30'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

91490554 ve DKK1 arasındaki etkileşimde Thr221, Lys222, His223, Cys239, Ser244 ve Cys245'in etkileşimden sorumlu rezidüler olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21). Etkileşim oran grafiği incelendiğinde, rezidülerle olan etkileşimlerin büyük bir kısmının H-bağları ve su köprüleri tarafından oluşturulduğu görülmektedir. Aynı zamanda, Lys222, Lys226 ve Tyr238 gibi 7 rezidü ile etkileşimde iyonik bağların da oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22). Etkileşim haritası incelendiğinde His223'ün ligandın furan halkasının OH grubu ile simülasyon süresinin %33'ü boyunca H-bağı kurduğu görülmektedir. Cys245 ve Ser244 ise sırasıyla triazinon halkasındaki O ve N atomları ile yaptığı H-bağları ile etkileşime katkı sağlamaktadır (simülasyon süresinin %40'ından fazladır).



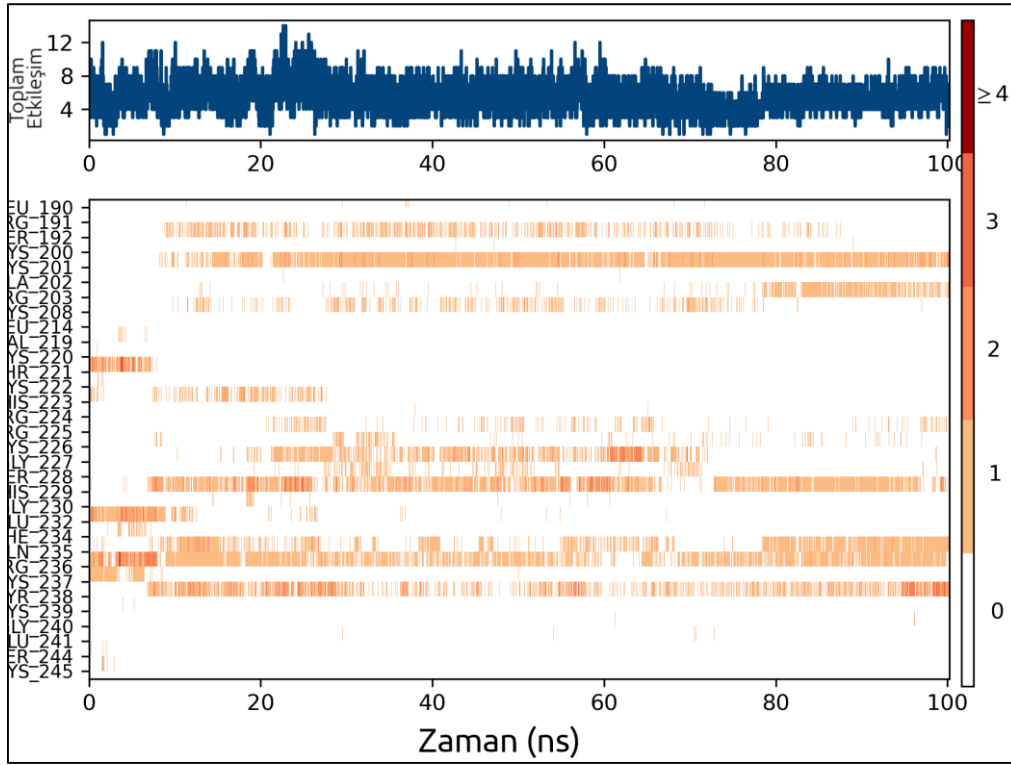
Şekil 4.21. 91490554 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi. A) 100 ns boyunca kurulan toplam etkileşim miktarındaki değişim B) Etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısının yoğunluğu sağ taraftaki renk skalasında belirtilmiştir.



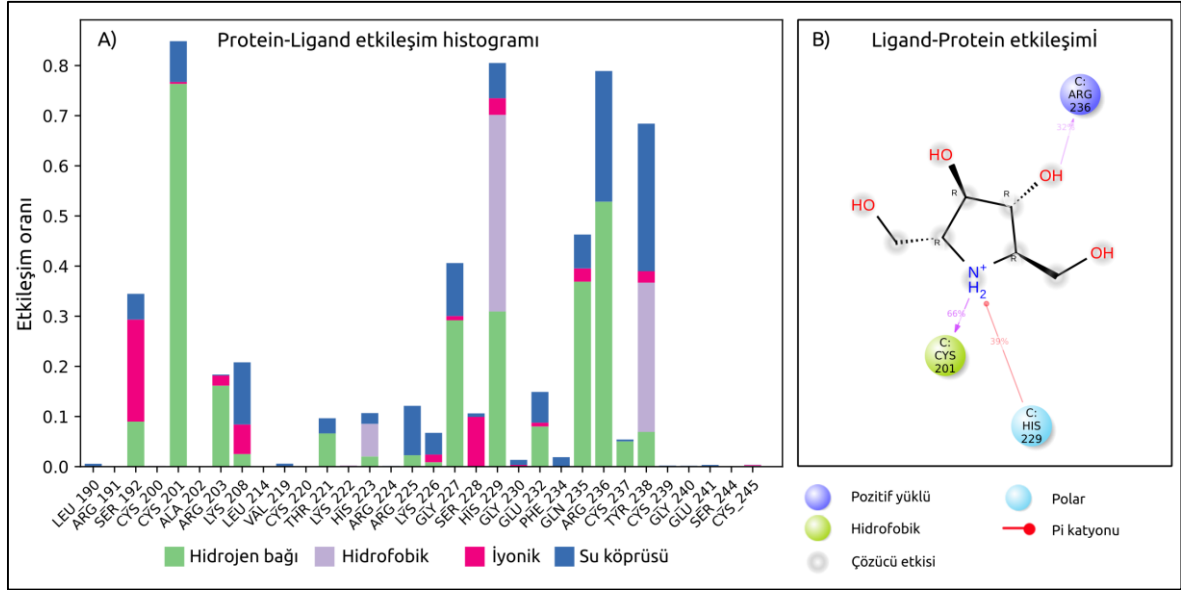
Şekil 4.22. 91490554 ile DKK1 arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %30'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

445074 ile DKK1'in 100ns boyunca süren ve ağırlıklı olarak H-bağ oluşumuna dayanan etkileşimde rol alan başlıca rezidülerin Cys201, His229, Arg236 ve Tyr238 olduğu tespit

edilmiştir (Şekil 4.23). Bunun yanı sıra özellikle His229 ve Tyr238 ile simülasyon süresinin yarısından fazlasında etkileşime önemli katkılar sağlayan hidrofobik etkileşimler kurulmuştur (Şekil 4.24-A). 2B etkileşim haritası incelendiğinde pozitif yüklü His amino asidi ile ligandın metal katyonlara sahip amino grubu arasında simülasyonun %39'u boyunca süren pi-katyon etkileşimleri olduğu görülmektedir. Diğer yandan ligand iki farklı noktası ile de etkileşim için önemli H-bağları kurmaktadır. Bu H-bağlarından ilkinin amino grubu ile Cys201 arasında simülasyon süresinin %66'sı boyunca, diğerinin ise OH grubu ile Arg236 arasında simülasyon süresinin %32'si boyunca kurulduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24-B).

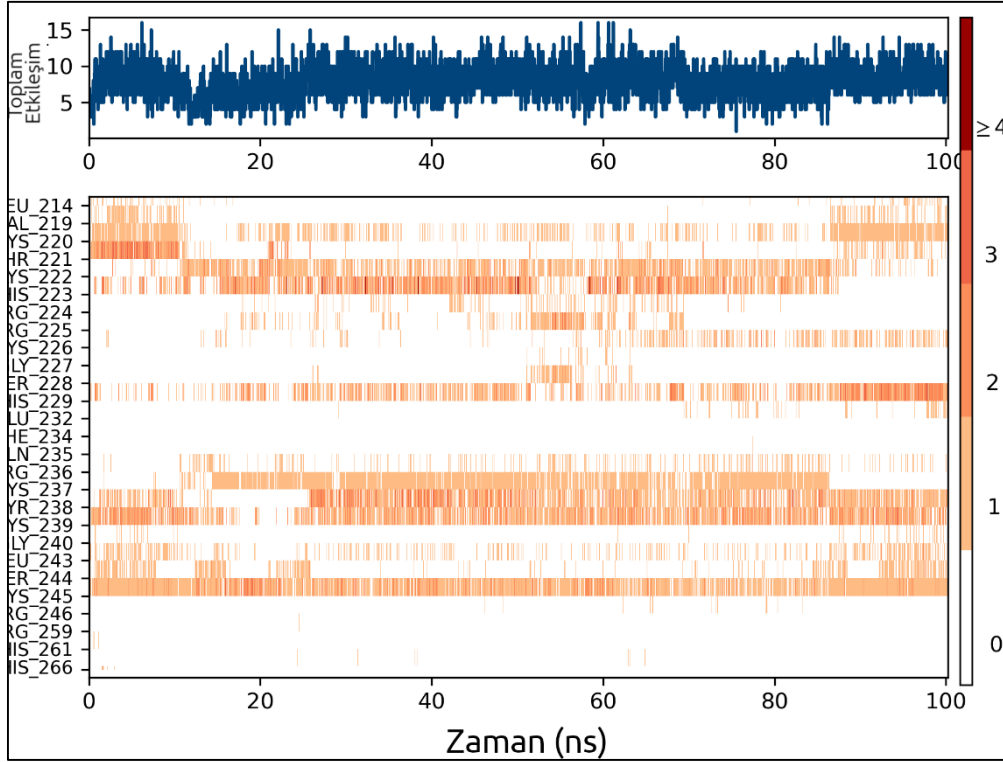


Şekil 4.23. 445074 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi. A) 100 ns boyunca kurulan toplam etkileşim miktarındaki değişim B) Etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısının yoğunluğu sağ taraftaki renk skalasında belirtilmiştir.

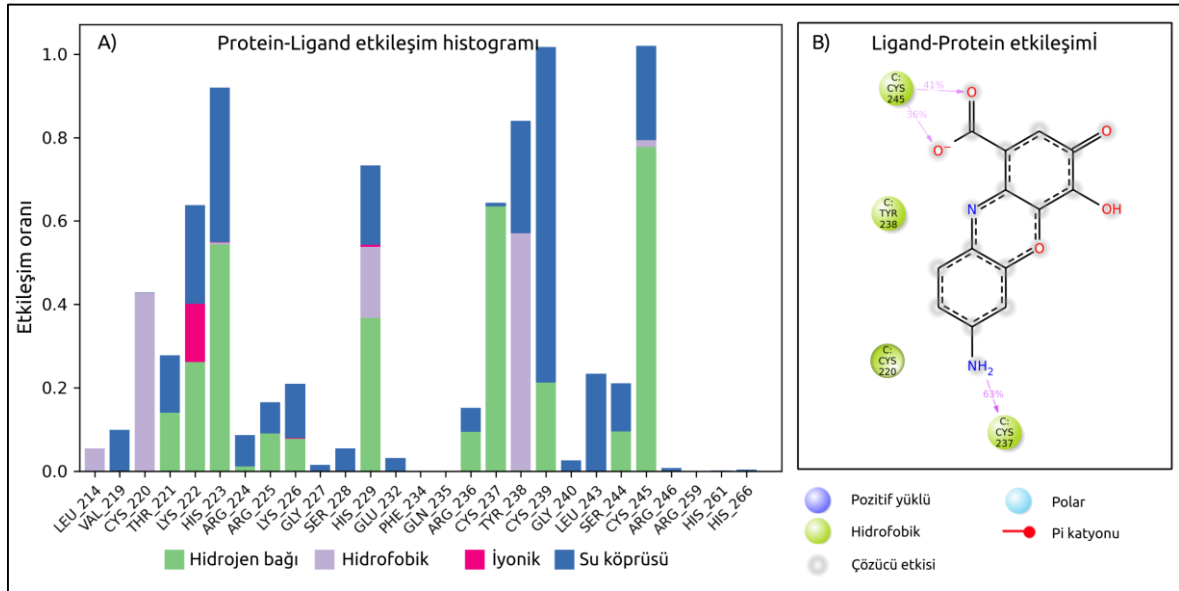


Şekil 4.24. 445074 ile DKK1 arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %30'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

Şekil 4.25'de de görüldüğü üzere NCI8642 ile DKK1'in MD simülasyonun 100 ns boyunca sürdüğü ve etkileşimde ağırlıklı olarak Lys221, His223, His229, Cys237, Tyr238, Cys239 ve Cys245 rezidülerin rol aldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.26-B'de etkileşim oran grafiğinde simülasyon süresi boyunca kurulan etkileşimlerin H-bağı olduğu görülmektedir (%30'dan kuvvetli H-bağ sayısı 3). Etkileşim haritasının analizi hidrofobik yüklü rezidülerin etkileşimde önemli rol oynadığı göstermiştir. Cys245 ile ligandın terminal O atomları arasında simülasyonun %41 ve %36'sı boyunca süren etkileşimler tespit edilmiştir. Diğer H-bağı ise Cys237 ile ligandın amino grubu arasında kurulmuştur ve simülasyon süresinin %63'si boyunca sürmüştür (Şekil 4.26-B).



Şekil 4.25. NCI8642 ile DKK1 arasındaki etkileşimin zamansal değişimi. A) 100 ns boyunca kurulan toplam etkileşim miktarındaki değişim B) Etkileşime dâhil olan rezidülerin zamana göre değişimi. Etkileşimdeki bağ sayısının yoğunluğu sağ taraftaki renk skalasında belirtilmiştir.



Şekil 4.26. NCI8642 ile DKK1 arasındaki etkileşimler. A) Tüm simülasyon boyunca rezidüler ile kurulan etkileşim türlerinin oranı B) %30'dan kuvvetli etkileşimlerin bağlanma stabilitesinin 2B etkileşim grafiği üzerinde gösterimi

4.2.3. MD sonrası MM/GBSA analizi

MD sonrası etkileşimleri devam ettiği tespit edilen 7 protein-ligand kompleksinin ortalama MM/GBSA bağlanma serbest enerjileri hesaplanmıştır. Çizelge 4.2’de de görülebileceği üzere tüm protein-ligand kompleksleri negatif skorlu bağlanma serbest enerjisine sahiptir. Bu durum etkileşimlerin termodinamik olarak mümkün ve stabil olduğunu göstermektedir. En düşük bağlanma enerji skoruna sahip olması nedeniyle 13871067 DKK1’e en stabil bağlanma afinitesine sahip ligand adayıdır.

Çizelge 4.2. 100 ns’lik MD sonrası etkileşimleri devam ettiği tespit edilen protein-ligand komplekslerine ait ortalama MM/GBSA skorları

| Kimyasal ID | MM/GBSA Enerji Skoru (kcal/mol) |
|-------------|---------------------------------|
| 13871067 | -51.842 |
| 10265835 | -49.69 |
| 139183638 | -48.473 |
| 657042 | -42.397 |
| 470199 | -37.435 |
| 91490554 | -35.665 |
| 445074 | -31.076 |
| NCI8642 | -53.312 |

4.3. Farmakokinetik ve ADME-T Profili

Bu tez çalışmasında en iyi bağlanma afinitesine sahip olduğu tespit edilen 7 bileşiği farmakokinetik özellikleri ve biyoyararlanım potansiyellerinin de ortaya konulması amaçlanmıştır. Ligandların başlıca fizikokimyasal özellikleri ve ADME-T profillerine ilişkin sonuçlar ise Çizelge 4.3’de özetlenmiştir.

Rotor değeri yapıdaki dönebilen bağların sayısı göstermektedir. Ligandın esnekliği ve olası konformasyon değiştirebilme potansiyelinin anlaşılabilmesi açısından önemli bir değerdir. DKK1 antagonist adayı olan 7 bileşik bu açıdan değerlendirildiğinde, 445074’ün yapısındaki 6 dönebilen bağı ile en çok konformasyonel değişiklik gösterebilecek molekül olduğu tespit edilmiştir. Onu yapısındaki 5 dönebilir bağ ile 657042 ve 10265835 takip etmektedir.

SASA (Surface Accessible Solvent Area), FOSA (Fraction of Solvent Accessible Surface Area), ve PISA (Polar Surface Area) bir bileşiğin farmakokinetik ve farmakodinamik

özelliklerini anlamak için kullanılan başlıca parametrelerden biridir. Antagonist adaylarının bileşiğin çözünürlüğünü gösteren SASA değerleri incelendiğinden hepsinin kabul edilebilir referans aralığında olduğu görülmektedir. Ancak artan SASA değeri ile birlikte moleküler çözünürlüğün de artması nedeniyle 657042 diğerleri ile karşılaştırıldığında daha iyi çözünürlük profili gösterebilecek bir bileşiktir.

Yalnızca solvent ile etkileşime açık olan alanı oransal olarak ifade eden FOSA değerleri solvent ile etkileşen ve etkileşmeyen kısımları arasındaki farkı belirlenmesi açısından önemlidir. Aday bileşiklerin FOSA değerleri hepsinin kabul edilen referans aralığında ve nispeten orta büyüklükte bileşikler olduğunu göstermektedir. 445074 FOSA değeri en yüksek olduğu tespit edilen antagonist adaydır.

Sırasıyla sulu bir çözeltideki çözünen maddenin su moleküllerine vereceği tahmini hidrojen bağı sayısı ve su moleküllerinden çözünen madde tarafından kabul edilebilecek tahmini hidrojen bağlarının sayısı temsil eden donorHB ve accptHB skorları da hesaplanmıştır. (Bu değerler, bir dizi konfigürasyon üzerinde alınan ortalamalar olması nedeniyle genellikle tam sayı olmayabilir). 7 bileşiğinde de donorHB ve accptHB skorları kabul edilebilir aralıklardadır. Yapısal olarak en çok H-bağı verebilecek ligandlar 445074, 657042 ve 10265835 (donorHB skoru 5)'dir. 657042 ise 10 accptHB skoru ile en çok H-bağ kabul etmeye açık moleküldür.

Oktanöl/gaz partiyon katsayısı ($QPlogPo/w$), bileşiğin oktanöl ve su arasındaki partiyon (ayrım/dağılım) durumunu tahmin eden logaritmik bir parametredir. LogP değerinin yüksek olması molekülün hidrofobik özelliklere sahip olduğunu, lipofilik çözünürlüğünün yüksek olduğunu ve biyolojik membran ve zarlardan kolay bir şekilde geçebileceğini göstermektedir. LogP düşük ise bu durum bileşiğin hidrofilik ve su da daha iyi çözünen bir bileşik olduğunu işaret etmektedir. Bu iki fizikokimyasal özellik çözücü seçiminde ve ADME profillerinin tahmininde kullanılması nedeniyle aday bileşik araştırmaları için önemlidir. Çizelge 4.3'de de görülebileceği üzere aday antagonistlerden 445074 dışındaki tüm bileşikler referans değeri içerisindedir. 470199, 657042, 10265835 ve 91490554 gibi negatif değere sahip bileşikler hidrofilik özellik göstermektedir. Diğer yandan 13871067'nin yağ ve su arasında nötr bir dağılıma sahip olduğu tespit edilmiştir. 139183638 ise antagonist adayları içerisindeki tek lipofilik yapılu bileşiktir.

QPlogS değeri ise bileşiğin suda çözünürlüğünün göstermektedir. QPlogS sonuçları 445074 dışındaki tüm bileşiklerin düşük oranda suda çözünürlüğü sergileyebileceğini tespit edilmiştir.

QPPCaco parametresi nm cinsinden tahmini görünür Caco-2 hücre geçirgenliğini ifade etmektedir ve molekülün bağırsak-kan bariyer geçirgenliğini tahmin edilmektedir. Bu kapsama QPPCaco değerinin 25'den küçük olması bileşiklerin zayıf, 500'den büyük olması ise çok iyi bir emilim profiline sahip olduğunu göstermektedir. Bu kapsamda DKK1 için antagonist aday bileşiklerin çok iyi bir emilim profiline sahip olmadığı görülmektedir. 139183638 diğerleri ile karşılaştırıldığında en iyi emilim profiline sahip olabilecek bileşiktir (353.930 nm/sn).

QPlogKhsa, bileşiklerin kan plazmasında bulunan ve birçok molekülün taşınmasında rol oynayan insan serum albüminine (HSA) bağlanma durumunun tahmin etmektedir.-1.5 ile 1.5 arasında değişen referans aralığı göz önüne alındığında aday ligandlar kabul edilebilir sınır içerisinde. Bu da ligandların plazma proteinlerine bağlanarak ilgili doku ve hücrelere taşınabileceğini, dolayısıyla dolaşımda serbest dolaşan formlarının az miktarda tespit edilebileceği anlamına gelmektedir.

QPlogBB (beyin/kan partiyon kat sayısının tahmini), QPPMDCK (Madin-Darby köpek böbrek hücrelerinin geçirgenliğinin tahmini) ve CNS (merkezi sinir sistemindeki olası aktivitesinin tahmini), bileşiklerin kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sisteminde etkinliğine ilişkin öngörüler sağlayan parametrelerdir. DKK1 antagonist aday bileşikleri bu açılardan değerlendirildiğinde, 13871067'de dışındaki diğer adayların kötü MDCK geçirgenliğine ve beyin/kan partiyon katsayısına sahiptir. Bu da bu bileşiklerin kan beyin bariyer geçirgenliğinin zayıf olduğu göstermektedir. CNS ise yalnızca 445074 ve 13871067'nin nöral sistemde etki gösterebilme potansiyeline sahip olduğunu, ancak etkinliklerinin zayıf olabileceğini işaret etmektedir.

Aday bileşiklerin insan oral emilim oranının %42-78 arasında değişebileceği tahmin edilmektedir. insan oral emilim % en yüksek olan bileşik ise, lipofilik yapıya ve en iyi QPPCaco değerine sahip olan 139183638'dir (%78).

J_m , transdermal taşıma hızının bir ölçüsüdür. Maddenin cilt yoluyla emilim hızını saatteki cm^2 başına düşen mikrogram cinsinden tahmin etmektedir. Sonuçlar 139183638'in iyi bir dermal emilime sahip olduğu ($343 \mu\text{g cm}^{-2} \text{sa}^{-1}$), buna karşın diğer bileşiklerin dermal emilim profilininin zayıf kaldığını göstermektedir.

Aday molekül keşif ve geliştirme araştırmalarındaki başarısızlığın en büyük nedeni bileşiklerin yüksek toksisite profiline sahip olmasıdır. Yapı-aktivite ilişkileri sayesinde bazı fizikokimyasal özellikler toksisite ile ilişkilendirilmektedir. Bu fizikokimyasal özelliklerden biri reaktif fonksiyonel gruplar varlığıdır. Literatürde yapısında 2'den fazla reaktif fonksiyonel grup bulunduran bileşiklerin toksisite gösterebileceğine dair kanıtlar mevcuttur [73]. Aday moleküllerden yalnızca 91490554'ün yapısında 1 reaktif özel fonksiyonel grup içerdiği, bununda katekol olduğu tespit edilmiştir. Toksisite ile yakından ilişki olan bir diğer parametre de HERG K^+ kanal blokerlarının toksik olması nedeniyle HERG potasyum kanallarını bloke edebilecek tahmini IC_{50} (inhibisyon konsantrasyonu 50%) değeridir. Tablodaki QPlogHER bunu ifade etmekte olup, 657042, 10265835 ve 139183638 bileşikleri HERG açısından toksik olmadığını görülmektedir. Buna karşın diğer bileşikler HERG potasyum kanalları için inhibitör olma potansiyeline sahiptir.

Çizelge 4.3. DKK1 antagonist adayı bileşiklerin farmakokinetik özellikleri ve ADME-T profili

| Kimyasal ID | Farmakokinetik Özellikler | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|------------|--------------------------|----------------|------------------------|-----------------------|------------|------------|-------------|----------|
| | #rotor | mol_MA | #rtvFG | SASA | FOSA | donorH B | accptHB | QPlogPo/w | QPlogS | |
| Referans Değerler | 0 – 15 | – | 0 – 2 | 300.0 – 1000.0 | 0.0 – 750.0 | 0.0 – 6.0 | 2.0 – 20.0 | –2.0 – 6.5 | –6.5 – 0.5 | |
| 445074 | 6 | 163.173 | 0 | 349.734 | 154.753 | 5.000 | 8.300 | -2.112 | 401 | |
| 470199 | 3 | 245.253 | 0 | 408.723 | 132.999 | 3.000 | 7.400 | -512 | -1.675 | |
| 657042 | 5 | 280.280 | 0 | 530.345 | 111.400 | 5.000 | 10.000 | -771 | -2.424 | |
| 10265835 | 5 | 283.301 | 0 | 488.104 | 98.847 | 5.000 | 9.300 | -892 | -2.185 | |
| 13871067 | 3 | 262.255 | 0 | 435.457 | 124.373 | 3.000 | 8.100 | 0 | -2.273 | |
| 91490554 | 3 | 247.183 | 1 | 386.920 | 96.724 | 3.000 | 8.600 | -904 | -1.365 | |
| 139183638 | 4 | 276.291 | 0 | 510.290 | 127.664 | 3.000 | 6.850 | 1.002 | -2.769 | |
| NCI8642 | 3 | 272.217 | 0 | 472.008 | 0 | 3.500 | 7.250 | -126 | -2.344 | |
| Kimyasal ID | ADME-T Profili | | | | | | | | | |
| | QPPCaco | QPlogKhs a | CNS | QPlogBB | QPPMDCK nm/sec | İnsan % Oral Emilim | Jm | QPlogHE RG | Beş Kural ı | Üç Kurah |
| Referans Değerler | <25 zayıf, >500 yüksek | | -2 (inaktif), +2 (aktif) | -3.0 – 1.2 | <25 zayıf, >500 yüksek | 25% zayıf >80% yüksek | | | | |
| 445074 | 34.978 | -852 | -1 | -870 | 14.596 | 42.212 | 103 | -3.227 | 0 | 0 |
| 470199 | 130.962 | -682 | -2 | -1.085 | 83.714 | 61.842 | 97 | -2.983 | 0 | 0 |
| 657042 | 74.290 | -803 | -2 | -1.861 | 29.783 | 55.919 | 35 | -5.069 | 0 | 0 |
| 10265835 | 54.776 | -786 | -2 | -1.769 | 33.166 | 52.841 | 18 | -4.257 | 0 | 1 |
| 13871067 | 255.512 | -698 | -1 | -691 | 502.705 | 70.033 | 83 | -3.191 | 0 | 0 |
| 91490554 | 62.388 | -769 | -2 | -1.238 | 39.624 | 53.778 | 39 | -2.431 | 0 | 0 |
| 139183638 | 353.930 | -395 | -2 | -1.034 | 160.984 | 78.432 | 343 | -4.799 | 0 | 0 |
| NCI8642 | 5.483 | -747 | -2 | -2.101 | 2.264 | 39.432 | 2 | -2.776 | 0 | 1 |

5. TARTIŞMA

Wnt sinyal yolu, kemik metabolizması gibi birçok biyolojik süreçte yer alan merkezi bir sinyalleşme kaskadıdır. DKK1, Wnt sinyal yolunun doğal hücre dışı inhibitörlerinden biridir. LRP5/6 reseptörlerine bağlanarak Wnt sinyal yolunun engellenmesine neden olmaktadır. DKK1 ile LRP5/6 arasındaki bu etkileşimin kanser, kalp ve damar rahatsızlıkları, nörodejeneratif ve kemik metabolizma bozuklukları gibi pek çok farklı patolojik duruma neden olabileceğini gösteren kanıtlar mevcuttur [10, 13, 14]. Bu nedenle DKK1'in LRP5/6'ya bağlanmasını engelleyebilecek DKK1 antagonistleri, Wnt sinyal yolunun modülasyonu için iyi bir yaklaşım olarak görülmektedir [8, 27, 34]. Klinik ve klinik öncesi çalışmalar ile yeni DKK1 antagonist arayışları devam etmekte olup, bunların neredeyse tamamı antikor bazlı adaylardır. NCI8642 etkin olduğu düşünülen DKK1 antagonistidir. Ancak stabil bir *in-vitro* etki gösterememesi nedeniyle iyi bir terapötik aday olarak görülmemektedir [36, 37]. NCI8642'in başarısızlığının ardından, DKK1-LRP6 etkileşimini bloke edebilecek küçük yapıli moleküllerin daha fazla araştırılması gerektiği, bu konudaki mevcut çalışmaların yetersiz olduğu ortaya konmuştur [2].

Diğer yandan bilgi ve enformasyon teknolojilerindeki gelişim ile, bilgisayar destekli moleküler modelleme yöntemlerinin aday molekül keşif ve geliştirme çalışmalarındaki rolü de artmıştır. Bu yöntemler büyük veri setlerindeki bileşiklerin olası etki ve etkileşimlerinin kolayca tahmin edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemler hem atomik ve moleküler düzeyde etkileşimlerin incelenmesine hem de bunun normal deneysel koşullar ile gözlemlenmesi imkansız zaman aralıklarında değerlendirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında bilgisayar destekli hedefe yönelik sanal tarama yöntemleri kullanılarak yeni DKK1 antagonisti küçük moleküllerin ortaya konulması amaçlanmıştır. Öncelikle 68.710 bileşikten oluşan küçük molekül kütüphanemizdeki ligandların potansiyelinin değerlendirildiği sanal tarama çalışmaları sonrası 68 tanesinin DKK1'in LRP5/6'ya bağlandığı yüzey ile etkileşime girebildiği tespit edilmiştir. Olası çözücü etkileri, elektriksel ve vdW etkileşimleri gibi parametreleri hesaplamaya dahil ederek, bağlanma enerjisinin daha detaylı bir değerlendirmesine imkan sağladığı için en iyi bağlanma afinitesine sahip bileşiklerin belirlenmesinde kenetlenme sonrası MM/GBSA skorları esas alınmıştır. En iyi MM/GBSA skoruna sahip 29 tanesi için MD simülasyon hesaplamaları

gerçekleştirilmiştir. 100 ns'lik MD simülasyon sonucunda ligandlardan yalnızca 7 tanesinin etkileşimi sürdürdüğü tespit edilmiştir. Bu protein-ligand komplekslerinin MM/GBSA enerjileri ve ligandların farmakokinetik profilleri ve ADME-T özellikleri ortaya konmuştur. Ayrıca elde edilen sonuçların karşılaştırılabilmesi amacıyla literatür de DKK1-LRP6 etkileşimini bloke edebildiği raporlanan NCI8642, referans molekül olarak seçilmiştir ve sanal tarama, MD simülasyon ve enerji hesaplamaları NCI8642 için de gerçekleştirilmiştir.

Kenetlenme sonuçları siklik halkaya sahip ligandların DKK1 üzerindeki LRP5/6 bağlanma bölgesine daha yüksek kenetlenme skoru ile bağlanabildiğini göstermektedir. Kenetlenme etkileşim haritaları incelendiğinde H-bağlarının yanı sıra π - π istiflenme (stacking) etkileşimlerinin protein ve ligandlar arasındaki moleküler etkileşimlerde önemli role sahip olduğu görülmektedir.

13871067, 10265835, 139183638, 657042, 470199, 470199 ve 445074'ün MD simülasyon sonrası yüksek ve kararlı bağlanma afinitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu protein-ligand komplekslerine ait ortalama RMSD değerleri 2 ile 3.38 Å arasındadır. Protein-ligand kompleksindeki yapısal değişiklikleri gösteren bu değerler kabul edilebilir aralıklar olup, 7 ligandın da DKK1'e kararlı bir şekilde bağlanabileceğini göstermektedir. RMSD değerlerinin zamana göre değişimi incelendiğinde ise bazı komplekslerde sistemin dengeye ulaşması için daha fazla zamana ihtiyacı olduğu görülmektedir. Özellikle 91490554 ve 139183638 kimyasal ID'li sistemlerin sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için MD simülasyon sürelerinin uzatılarak, sonuçların yeniden değerlendirilmesi daha iyi bir yaklaşım olacaktır. 445074 kimyasal ID'li bileşiğe ait MD simülasyon analizler hem proteinin hem de ligandın RMSD değerinin diğerlerinden yüksek olduğunu göstermiştir. Bu durumun ligandın düşük moleküler ağırlığa ve yapıya sahip olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. DKK1 üzerindeki hedef bölge ile iyi bir şekilde etkileşime girebilecek fonksiyonel grupların ligand yapısına dahil edilmesi, hem iki molekülün kararlılığını hem de etkileşim oranını artıracak iyi bir yaklaşım olacaktır.

RMSF sonuçları ise 40-60. rezidülerin etkileşimden sorumlu anahtar rezidüler olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer yandan tüm simülasyonlarda 70. rezidüdeki dalgalanmanın ortalamanın üzerinde olduğunu ve buranın esnek bölge olduğu görülmektedir. Ayrıca, kimyasal ID'si 470199, 13871067, 91490554 ve 139183638 olan bileşiklerin 40 ile 50.

rezidüer arasındaki etkileşiminin bu bölgedeki dalgalanmayı azaltarak proteinin daha stabil bir duruma gelmesini sağlanmıştır.

DKK1 ile ligandlar arasındaki özgül etkileşim mekanizmalarının analizi hidrojen ve iyonik bağlar, su köprüleri, π - π katyon ve π - π istifleme gibi çeşitli etkileşim türlerinin bağlanmaya aracılık ettiğini ortaya koymaktadır. Ancak H-bağ türünün diğer etkileşimlere kıyasla baskın etkileşim türü olduğu görülmektedir. DKK1 ile LRP5/6 arasındaki etkileşimin H-bağlarına dayandığı düşünüldüğünde, H-bağ temelli ligand etkileşimleri DKK1'in LRP5/6'ya bağlanan yüzeyinin kapatılmasında daha etkin ve kararlı adaylar olabilir.

Her ligand molekülü için farklı rezidüer ile yapılan etkileşimler önemli olsa da, çalışmada Thr221, Arg236, Cys239 ve Cys245 rezidülerinin tüm etkileşimlerde rol alan anahtar rezidüer olduğu görülmektedir. Diğer yandan ligandlardaki siklik yapılar özellikle de fenolik, furan ve triazinon gibi halkalar etkileşimlerin oluşmasında kritik rol oynamaktadır. Spyros ve arkadaşlarının LRP5/6'yı hedeflediği çalışmasında siklik halkalara sahip fenoksazin yapısının DKK1-LRP5/6 etkileşimi engelleyebileceği raporlanmıştır. Bununla birlikte, NC18642 ligandının da halkalı yapıya sahip olması ve hesaplamalı çalışmalarda güçlü bağlanma afinitesi göstermesi, çalışma bölgemizi ve sonuçlarımızı destekler niteliktedir [33].

Diğer yandan bileşiklerin farmakokinetik ve ADME-T özellikleri, lipofilik yapıları 139183638 dışındaki bileşiklerin zayıf bağırsak-kan bariyer geçirgenliğine sahip olduğunu göstermektedir. Diğer yandan bu bileşiklerin dermal emiliminin de zayıf olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin alternatif ilaç yolları (intravenöz, intramüsküler veya lokal uygulama) veya lipozom teknolojileri ile kaplanarak kullanılması ile biyoyararlanımındaki kayıpları engellenebilir. QPlogKhsa, 7 DKK1 antagonist adayının da plazma proteinleri yoluyla doku ve hücrelere taşınabileceğini göstermektedir. Bileşiklerin kan-beyin bariyeri geçirgenliği ve CNS aktivitesinin zayıf olması nöral sistemde etkin ve iyi adaylar olmayabileceğini işaret etmektedir. Diğer yandan bu durum bu bileşiklere bağlı direkt nöral toksisitenin düşük olacağı anlamına da gelmektedir.

Toksisite aday molekül keşif ve geliştirme sürecindeki en problemliler basamaklardan biridir. Bu kapsamda bileşiklerin yapısındaki reaktif fonksiyonel gruplara bağlı ciddi bir toksisite

riski ön görülmemiştir. Diğer yandan, 657042, 10265835 ve 139183638 kimyasal ID'li yapılar dışındaki bileşiklerin HERG K+ kanalı için toksik etkiye sahip olabileceği tespit edilmiştir.

Bileşiklerin ilaç keşif geliştirme çalışmaları için iyi bir hesaplamalı referans olan 3 ve 5 kuralına da uyduğu ve iyi birer ilaç-benzeri yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular terapötik amaçlar için kullanımlarının umut verici olabileceğini destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, DKK1 antagonist adayı 7 bileşiğin de termodinamik olarak mümkün ve stabil bir şekilde DDK-1'in LRP5/6'ya bağlanan yüzeyi ile etkileşime girebileceğini ve bu bileşiklerin zayıf emilim ve nöral etki profilleri dışında iyi birer ilaç adayı olabileceği saptanmıştır. Bu ligandların DKK1 ile etkileşimine dair yayınlanmış bir çalışma olmaması nedeniyle bulgularımız literatürde ilk olma niteliğindedir. Literatürde bu bileşiklerden sadece ikisinin biyolojik aktiviteler üzerindeki etkisine dair çalışmalar olduğu tespit edilmiştir. Kimyasal ID'si 13871067 olan bileşik ile ilgili çalışmalarda lösemi hücrelerinin büyümesini engelleyerek anti-HBV (Hepatit B Virüsü) aktiviteye sahip olduğu [74] ve kanserde önemli role sahip olan memeli tümör timidilat sentaz enzimi ile etkileşime girerek inhibe edebileceği gösterilmiştir [75]. DKK1'in kanserdeki rolü de göz önüne alındığında, 13871067'nin kanser metabolizmasında rol alan birden fazla hedefi etkileyerek anti-kanser aktivite göstermesinin olası olduğu düşünülmektedir.

Diğer bileşik ise 470199'dur ve Herpes simpleks virüsü tip 1 timidin kinaza (HSV-1 TK) yönelik substrat olma potansiyelinin araştırıldığı bir çalışma bulunmaktadır. Çalışma sonucunda 470199'nin HSV-1 TK için iyi substrat olmadığı veya çok zayıf bir afiniteye sahip olduğu raporlanmıştır [76]. Bir başka çalışma da 445074'in farklı kaynaklardan alınan glukozidaz (alfa ve beta) ve fruktofuranosidaz enzimlerini inhibe edebileceği gösterilmiştir [77].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Wnt sinyal yolu biyolojik süreçlerdeki dengenin korunmasında rol oynayan önemli yollardan biridir. Wnt sinyal yolunun aktivasyonu, birçok sistemde doku homeostazisi ve rejenerasyona katkıda bulunmaktadır. Buna karşın Wnt yolundaki değişikliklerin kanser, kalp hastalıkları, nörodejeneratif ve kemik metabolizma bozuklukları gibi patolojik süreçlere yol açabildiği de bilinmektedir. Bu nedenle Wnt sinyal yolağının etkinleştirilmesi bu hastalıklardan korunmada iyi bir terapötik yaklaşım olarak görülmektedir. Wnt sinyal yolunun doğal hücre dışı inhibitörlerinden biri olan DKK1'in de bu hastalık patolojilerinde önemli roller oynayan bir protein olduğu bilinmektedir. Son yıllarda literatürde DKK1'in inhibisyonu yoluyla Wnt sinyal yolunun etkinleştirilmesi iyi bir yaklaşım olarak görülmektedir. DKK1'e yönelik antagonist arayışı ile ilgili birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen bu aday moleküllerden yalnızca birkaçının klinik araştırmalar düzeyinde çalışmaları devam etmektedir. Bu nedenle yeni aday moleküllerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Bununla birlikte kimyasal yapılı küçük moleküllerin daha iyi bir inhibitör olma potansiyeline sahip olabileceği ve bu alandaki çalışmaların yetersiz olduğu bilinmektedir.

Bu tez çalışması ile de bilgisayar destekli hedefe yönelik sanal tarama yöntemleri kullanılarak yeni DKK1 antagonist öncü adayı küçük moleküllerin tanımlanması amaçlanmaktadır.

Çalışmamız neticesinde;

- Gerçekleştirdiğimiz hesaplamalı çalışmalar ile DKK1'in LRP 5/6'ya bağlanmasında görev alan bölge ile yüksek afiniteli ve kararlı bir şekilde etkileşime girebilecek 7 öncü bileşik tanımlanmıştır.
- Bileşikler arasından DKK1'e en yüksek afinite ve kararlılıkla bağlanabilecek adayın 13871067 olduğu tespit edilmiştir.
- Hedeflenen etki öncü bileşiklerin kimyasal yapılarındaki grupların daha etkin etkileşim profiline sahip yeni fonksiyonel gruplar ile değiştirilmesi veya eklenmesi ile artırılabilir. Böylece literatüre yeni bileşikler de kazandırılmış olunabilir.

- 139183638 dışındaki diğer bileşiklerin zayıf emilim profiline sahip olduğu fark edilmiş olması nedeniyle alternatif uygulama yontemleri ile kullanılmasının gerekebileceği 6ng6r6lm6řt6r.
- Siklik halkaya sahip bileşiklerin DKK1 ile LRP 5/6 arasındaki etkileşimin engellenmesinde iyi adaylar olabileceği g6sterilmiştir.
- 13871067'nin anti-kanser etkinliğine ilişkin literat6rler ve DKK1'in kanser metabolizmasındaki rol6, 13871067'in kanser 6nc6 bileşiği olarak araştırılması gerektiğini d6ř6nd6rm6řt6r.

Sonuç olarak DKK1 için antagonist olma potansiyeline sahip bu bileşiklerin etkinliklerinin *in-vitro* ve *in-vivo* alışmalar ile araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Rim, E. Y., Clevers, H., and Nusse, R. (2022). The Wnt pathway: From signaling mechanisms to synthetic modulators. *Annual Review of Biochemistry*, 91, 571–598.
2. Jiang, H., Zhang, Z., Yu, Y., Chu, H. Y., Yu, S., Yao, S., Zhang, G., and Zhang, B. T. (2022). Drug discovery of DKK1 inhibitors. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 847387.
3. Deane, C., and Mokaya, M. (2021, 15 December). *A virtual drug-screening approach to conquer huge chemical libraries*. *Nature*, 601(7893), 322–323.
4. Maia, E. H. B., Assis, L. C., De Oliveira, T. A., Da Silva, A. M., and Taranto, A. G. (2020). Structure-based virtual screening: From classical to artificial intelligence. *Frontiers in Chemistry*, 8, 343.
5. Kagey, M. H., and He, X. (2017). Rationale for targeting the Wnt signalling modulator Dickkopf-1 for oncology. *British Journal of Pharmacology*, 174(24), 4637–4650.
6. Jaschke, N., Hofbauer, L. C., Göbel, A., and Rachner, T. D. (2020). Evolving functions of Dickkopf-1 in cancer and immunity. *Cancer Letters*, 482, 1–7.
7. Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391(6665), 357–362.
8. Khalili, S., Rasaee, M. J., and Bamdad, T. (2017). 3D structure of Dkk1 indicates its involvement in both canonical and non-canonical Wnt pathways. *Molecular Biology*, 51, 155–166.
9. Tao, S. S., Cao, F., Sam, N. B., Li, H. M., Feng, Y. T., Ni, J., Wang, P., Li, X. M., and Pan, H. F. (2022). Dickkopf-1 as a promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Clinical Immunology*, 109156.
10. Chu, H. Y., Chen, Z., Wang, L., Zhang, Z. K., Tan, X., Liu, S. S., Zhang, B. T., Lu, A., Yu, Y., and Zhang, G. (2021). Dickkopf-1: A promising target for cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12, 658097.
11. Brott, B. K., and Sokol, S. Y. (2002). Regulation of Wnt/lrp signaling by distinct domains of dickkopf proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 22(17), 6100–6110.
12. Samiei, M., Janjić, K., Cvikl, B., Moritz, A., and Agis, H. (2019). The role of sclerostin and dickkopf-1 in oral tissues—a review from the perspective of the dental disciplines. *F1000Research*, 8.
13. Vlashi, R., Zhang, X., Wu, M., and Chen, G. (2022). Wnt signaling: Essential roles in osteoblast differentiation, bone metabolism and therapeutic implications for bone and skeletal disorders. *Genes and Diseases*.

14. Baetta, R., and Banfi, C. (2019). Dkk (dickkopf) proteins: emerging new players in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(7), 1330–1342.
15. Kikuchi, A., Matsumoto, S., and Sada, R. (2022). Dickkopf signaling, beyond wnt-mediated biology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 125, 55–65.
16. Liang, B., Zhong, L., He, Q., Wang, S., Pan, Z., Wang, T., and Zhao, Y. (2015). Serum dickkopf-1 as a biomarker in screening gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Oncotargets and Therapy*, 8, 3115–3122.
17. Igbini, E., Guo, F., Jiang, S. W., Kelley, C., and Li, J. (2019). Dkk1 involvement and its potential as a biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 488, 226–234.
18. Zhuang, X., Zhang, H., Li, X., Li, X., Cong, M., Peng, F., Yu, J., Zhang, X., Yang, Q., and Hu, G. (2017). Differential effects on lung and bone metastasis of breast cancer by wnt signalling inhibitor DKK1. *Nature Cell Biology*, 19(10), 1274–1285*.
19. Zhu, G., Song, J., Chen, W., Yuan, D., Wang, W., Chen, X., Liu, H., Su, H., and Zhu, J. (2021). Expression and role of dickkopf-1 (dkk1) in tumors: from the cells to the patients. *Cancer Management and Research*, 659–675.
20. Ren, C., Gu, X., Li, H., Lei, S., Wang, Z., Wang, J., Yin, P., Zhang, C., Wang, F., and Liu, C. (2019). The role of dkk1 in Alzheimer's disease: A potential intervention point of brain damage prevention?. *Pharmacological Research*, 144, 331–335.
21. Sharma, A., Gundamaraju, R., Pant, K., Mani, S., Singh, S. K., Maccioni, R. B., Datta, T., Singh, S. K., Gupta, G., Prasher, P., Dua, K., Dey, A., Sharma, C., Mughal, Y. H., Ruokolainen, J., Kesari, K. K., and Ojha. (2022). Molecular mechanisms of developmental pathways in neurological disorders: A pharmacological and therapeutic review. *Open Biology*, 12(3), 210289.
22. L'Episcopo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M. C., Cossetti, C., D'Adamo, P., Zardini, E., Andreoni, L., Ihekweba, A. E. C., and di Porzio, U. (2011). Reactive astrocytes and Wnt/ β -catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 41(2), 508–527.
23. Sepinci Dincel, A., Jørgensen, N. R., and IOF-IFCC Joint Committee on Bone Metabolism (C-BM). (2023). New emerging biomarkers for bone disease: sclerostin and dickkopf-1 (Dkk1). *Calcified Tissue International*, 112(2), 243–257.
24. Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B., and Shim, J. (2020). Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. *Cells*, 9(9), 2073.

25. Gifre, L., Vidal, J., Carrasco, J. L., Filella, X., Ruiz-Gaspà, S., Muxi, A., Portell, E., Monegal, A., Guañabens, N., and Peris, P. (2015). Effect of recent spinal cord injury on Wnt signaling antagonists (sclerostin and Dkk-1) and their relationship with bone loss: A 12-month prospective study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(6), 1014–1021.
26. Spatz, J. M., Wein, M. N., Gooi, J. H., Qu, Y., Garr, J. L., Liu, S., Barry, K. J., Uda, Y., Lai, F., Dedic, C., Babij, P., Nishimori, S., Kronenberg, H. M., Chung, U. I., Divieti Pajevic, P., and Rosen, C. J. (2015). The Wnt inhibitor sclerostin is up-regulated by mechanical unloading in osteocytes in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 290(27), 16744–16758.
27. Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., and Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 3.
28. Houshyar, K. S., Tapking, C., Borrelli, M. R., Popp, D., Duscher, D., Maan, Z. N., Chelliah, M. P., Li, J., Harati, K., Wallner, C., Rahmanian-Schwarz, A., Volk, S. W., and Siemers, F. (2019). Wnt pathway in bone repair and regeneration—What do we know so far. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 170.
29. Kim, J. H., Liu, X., Wang, J., Chen, X., Zhang, H., Kim, S. H., Cui, J., Li, R., Zhang, W., Kong, Y., Zhang, J., Shui, W., Lamplot, J., Rogers, M. R., Zhao, C., Wang, N., Rajan, P., Tomal, J., Statz, J., Wu, N., Luu, H. H., Haydon, R. C., and He, T. C. (2013). Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 5(1), 13–31.
30. Hirota, T., Fujita, Y., and Ieiri, I. (2020). An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 16(9), 809–822.
31. Pontremoli, M., Brioschi, M., Baetta, R., Ghilardi, S., and Banfi, C. (2018). Identification of Dkk-1 as a novel mediator of statin effects in human endothelial cells. *Scientific Reports*, 8(1), 16671.
32. Niedzielski, M., Broncel, M., Gorzelak-Pabiś, P., and Woźniak, E. (2020). New possible pharmacological targets for statins and ezetimibe. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 129, 110388.
33. Mpousis, S., Thysiadis, S., Avramidis, N., Katsamakas, S., Efthimiopoulos, S., and Sarli, V. (2016). Synthesis and evaluation of galloxyanine dyes as potential agents for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 108, 28–38.
34. Li, M., Liu, X., Zhang, Y., Di, M., Wang, H., Wang, L., Chen, Y., Liu, X., Cao, X., Zeng, R., Zhang, Y., and Zhang, M. (2016). Upregulation of dickkopf1 by oscillatory shear stress accelerates atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, 94, 431–441.
35. Di, M., Wang, L., Li, M., Zhang, Y., Liu, X., Zeng, R., Wang, H., Chen, Y., Chen, W., Zhang, Y., and Zhang, M. (2017). Dickkopf1 destabilizes atherosclerotic

- plaques and promotes plaque formation by inducing apoptosis of endothelial cells through activation of ER stress. *Cell Death and Disease*, 8(7), e2917.
36. Iozzi, S., Remelli, R., Lelli, B., Diamanti, D., Pileri, S., Bracci, L., Roncarati, R., Caricasole, A., and Bernocco, S. (2012). Functional characterization of a small-molecule inhibitor of the Dkk1-LRP6 interaction. *International Scholarly Research Notices*, 2012, 2012.
 37. Wu, D., Zhang, Y., Liu, P., Li, X., Zhang, J., Shan, J., and Engelhardt, D. (2014). Compositions and methods for bone formation and remodeling. *US Patent 8,637,506*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
 38. Sabe, V. T., Ntombela, T., Jhamba, L. A., Maguire, G. E. M., Govender, T., Naicker, T., and Kruger, H. G. (2021). Current trends in computer-aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113705.
 39. Bisht, N., and Singh, B. K. (2018). Role of computer-aided drug design in drug development and drug discovery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(4), 1405–1415.
 40. Rocha-Roa, C., Molina, D., and Cardona, N. (2018). A perspective on thiazolidinone scaffold development as a new therapeutic strategy for toxoplasmosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 360.
 41. Katsila, T., Spyroulias, G. A., Patrinos, G. P., and Matsoukas, M. T. (2016). Computational approaches in target identification and drug discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 177–184.
 42. Giordano, D., Biancaniello, C., Argenio, M. A., and Facchiano, A. (2022). Drug design by pharmacophore and virtual screening approach. *Pharmaceuticals*, 15(5), 646.
 43. Chang, Y., Hawkins, B. A., Du, J. J., Groundwater, P. W., Hibbs, D. E., and Lai, F. (2023). A guide to in silico drug design. *Pharmaceutics*, 15(1), 49.
 44. Sliwoski, G. R., Meiler, J., and Lowe, E. W. (2014). Computational methods in drug discovery. Prediction of protein structure and ensembles from limited experimental data. *Computational Methods in Drug Discovery*, 66(1), 334–395.
 45. David, A., Islam, S., Tankhilevich, E., and Sternberg, M. J. E. (2022). The AlphaFold database of protein structures: *A biologist's guide*. *Journal of Molecular Biology*, 434(2), 167336.
 46. Shaker, B., Ahmad, S., Lee, J., Jung, C., and Na, D. (2021). In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*, 137, 104851.
 47. Halgren, T. A. (2009). Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), 377–389.

48. Wass, M. N., Kelley, L. A., and Sternberg, M. J. E. (2010). 3dligandsite: Predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl 2), W469–W473.
49. Kalidas, Y., and Chandra, N. (2008). Pocketdepth: A new depth-based algorithm for identification of ligand binding sites in proteins. *Journal of Structural Biology*, 161(1), 31–42.
50. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., and Shenkin, P. S. (2004). Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749.
51. Jain, A. N. (2006). Scoring functions for protein-ligand docking. *Current Protein and Peptide Science*, 7(5), 407–420.
52. Justino, G. C., Nascimento, C. P., and Justino, M. C. (2021). Molecular dynamics simulations and analysis for bioinformatics undergraduate students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(4), 570–582.
53. Daoud, N. E.-H., Borah, P., Deb, P. K., Venugopala, K. N., Hourani, W., Alzweiri, M., Bardaweel, S. K., and Tiwari, V. (2021). ADMET profiling in drug discovery and development: Perspectives of in silico, in vitro and integrated approaches. *Current Drug Metabolism*, 22(7), 503–522.
54. Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., Wang, L., Lupyan, D., Dahlgren, M. K., Knight, J. L., Kaus, J. W., Cerutti, D. S., Krilov, G., Jorgensen, W. L., Abel, R., and Friesner, R. A. (2016). OPLS3: A force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 281–296.
55. Schrödinger, LLC. (2023). Schrödinger Release 2023-4: LigPrep. 2023.
56. Greenwood, J. R., Calkins, D., Sullivan, A. P., and Shelley, J. C. (2010). Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24(6-7), 591–604.
57. Schrödinger, LLC. (2023). Schrödinger Release 2023-4: Protein Preparation Wizard, Epik. 2023.
58. Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., and Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27, 221–234.
59. Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Xiang, Z., and Honig, B. (2002). On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations. *Journal of Molecular Biology*, 320(3), 597–608.
60. Schrödinger, LLC. (2023). Schrödinger Release 2023-4: Glide. 2023.

61. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., and Shenkin, P. S. (2004). Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749.
62. Lyne, P. D., Lamb, M. L., and Saeh, J. C. (2006). Accurate prediction of the relative potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(16), 4805–4808.
63. Greenidge, P. A., Kramer, C., Mozziconacci, J. C., and Wolf, R. M. (2012). MM/GBSA binding energy prediction on the PDBbind data set: Successes, failures, and directions for further improvement. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(1), 201–209.
64. Schrödinger, LLC. (2023). Schrödinger Release 2023-4: Prime. 2023.
65. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., and Hermans, J. (1981). Interaction models for water in relation to protein hydration. In A. Pullman (Eds.), *Intermolecular Forces: Proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, Israel*. Springer Netherlands, pp. 331–342.
66. Takemura, K., and Kitao, A. (2012). Water model tuning for improved reproduction of rotational diffusion and NMR spectral density. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(22), 6279–6287.
67. Schrödinger. (2023). Schrödinger Release 2023-4: Desmond Molecular Dynamics System. 2023.
68. Bowers, K. J., Chow, E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., & Shaw, D. E. (2006, November). *Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters*. Paper presented at the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06), Tampa, Florida.
69. Kräutler, V., Van Gunsteren, W. F., and Hünenberger, P. H. (2001). A fast SHAKE algorithm to solve distance constraint equations for small molecules in molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 22(5), 501–508.
70. Berendsen, H. J. C., Postma, J. V., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. R. H. J., and Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684–3690.
71. Evans, D. J., and Holian, B. L. (1985). The Nose–Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, 83(8), 4069–4074.
72. Schrödinger, LLC. (2023). Schrödinger Release 2023-4: QikProp. 2023.
73. Hevener, K. E. (2018). Computational toxicology methods in chemical library design and high-throughput screening hit validation. In A. Betekhtin and A. Piński (Eds.), *Computational Toxicology: Methods and Protocols*. Springer Netherlands, pp. 275–285.

74. Hawata, M. A., El-Sayed, W. A., and Abdel-Rahman, A. A.-H. (2018). Synthesis and anti-HBV activity of novel substituted pyrimidine glycosides and their acyclic analogues. *Russian Journal of General Chemistry*, 88, 1734–1744.
75. Dzik, J. M., Kulikowski, T., Zielinski, Z., Ciesla, J., Rode, W., and Shugar, D. (1987). Interaction of 5-fluoro-4-thio-2-deoxyuridine 5-phosphate with mammalian tumour thymidylate synthase: Role of the pyrimidine N(3)-H dissociation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 149(3), 1200–1207.
76. Inguaggiato, G., Hughes, D., De Clercq, E., Balzarini, J., and Simons, C. (1999). Novel 6 azapyrimidine-2-deoxy-4-thionucleosides: Synthesis, biological evaluation and conformational analysis. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 10(5), 241–249.
77. Legler, G., Korth, A., Berger, A., Ekhart, C., Gradnig, G., and Stütz, A. E. (1993). 2, 5-dideoxy-2, 5-imino-d-mannitol and-d-glucitol: Two-step bio-organic syntheses from 5-azido-5-deoxy-d-glucofuranose and-l-idofuranose; evaluation as glucosidase inhibitors and application in affinity purification and characterisation of invertase from yeast. *Carbohydrate Research*, 250(1), 67–77.

EKLER

EK-1. Kenetlenme ve MM/GBSA Analiz Sonuçları

| Kimyasal ID | Kenetlenme Skor | Glide GSkor | XP GSkor | MMGBSA dG _{Bind} (kcal/mol) |
|-------------|-----------------|-------------|----------|--------------------------------------|
| 85692821 | -8.246 | -8.325 | -8.325 | -44.16 |
| 85692821 | -8.235 | -8.314 | -8.314 | -44.19 |
| 11435629 | -8.233 | -8.233 | -8.233 | -45.07 |
| 11435629 | -8.233 | -8.233 | -8.233 | -45.07 |
| 102472709 | -8.190 | -8.190 | -8.190 | -42.88 |
| 657042 | -8.105 | -8.129 | -8.129 | -49.49 |
| 657042 | -8.094 | -8.118 | -8.118 | -46.75 |
| 11708277 | -7.844 | -7.844 | -7.844 | -49.30 |
| 445074 | -7.710 | -7.732 | -7.732 | -29.42 |
| 445074 | -7.710 | -7.732 | -7.732 | -29.36 |
| 102335278 | -7.599 | -7.599 | -7.599 | -40.73 |
| 139083129 | -7.599 | -7.599 | -7.599 | -40.73 |
| 139083129 | -7.599 | -7.599 | -7.599 | -40.73 |
| 102335278 | -7.599 | -7.599 | -7.599 | -40.73 |
| 12309654 | -7.496 | -7.496 | -7.496 | -30.97 |
| 139183638 | -7.482 | -7.503 | -7.503 | -46.58 |
| 10265835 | -7.448 | -7.449 | -7.449 | -48.33 |
| 139055031 | -7.416 | -7.417 | -7.417 | -43.95 |
| 91490554 | -7.318 | -7.774 | -7.774 | -46.37 |
| 91490554 | -7.318 | -7.774 | -7.774 | -46.36 |
| 91490554 | -7.318 | -7.774 | -7.774 | -46.36 |
| 470199 | -7.275 | -7.802 | -7.802 | -41.24 |
| 470199 | -7.275 | -7.802 | -7.802 | -41.24 |
| 470199 | -7.275 | -7.802 | -7.802 | -41.24 |
| 470199 | -7.275 | -7.802 | -7.802 | -41.24 |
| 5317407 | -7.219 | -7.219 | -7.219 | -32.96 |
| 2724552 | -7.219 | -7.219 | -7.219 | -32.96 |
| 11277569 | -7.146 | -7.146 | -7.146 | -48.89 |
| 11332753 | -7.055 | -7.055 | -7.055 | -38.35 |
| 11332753 | -7.055 | -7.055 | -7.055 | -38.35 |
| 139077984 | -6.926 | -6.926 | -6.926 | -40.78 |
| 27281625 | -6.925 | -6.995 | -6.995 | -34.33 |
| 129716195 | -6.920 | -6.920 | -6.920 | -40.24 |
| 16104903 | -6.913 | -6.913 | -6.913 | -36.32 |
| 16104903 | -6.913 | -6.913 | -6.913 | -36.32 |
| 13871067 | -6.850 | -6.857 | -6.857 | -29.08 |
| 132559777 | -6.805 | -6.805 | -6.805 | -30.87 |
| 2748048 | -6.798 | -6.798 | -6.798 | -45.45 |
| 10017376 | -6.772 | -6.772 | -6.772 | -47.87 |
| 56851256 | -6.769 | -6.769 | -6.769 | -41.64 |
| 139092170 | -6.753 | -6.753 | -6.753 | -41.10 |
| 101742079 | -6.749 | -6.749 | -6.749 | -49.27 |
| 101742079 | -6.749 | -6.749 | -6.749 | -49.27 |
| 15386579 | -6.748 | -6.748 | -6.748 | -29.45 |
| 12989416 | -6.730 | -7.077 | -7.077 | -20.98 |
| 12989416 | -6.730 | -7.077 | -7.077 | -20.98 |
| 102082490 | -6.726 | -6.726 | -6.726 | -53.36 |
| 12302977 | -6.673 | -6.673 | -6.673 | -32.09 |
| 11769286 | -6.635 | -6.635 | -6.635 | -34.93 |
| 22858013 | -6.622 | -6.622 | -6.622 | -33.55 |
| 5170124 | -6.590 | -6.590 | -6.590 | -19.13 |
| 129868322 | -6.575 | -6.576 | -6.576 | -51.95 |
| 139089580 | -6.546 | -6.546 | -6.546 | -43.60 |
| 27281625 | -6.543 | -6.613 | -6.613 | -32.84 |
| 24741647 | -6.540 | -6.540 | -6.540 | -52.80 |
| 54578370 | -6.538 | -6.538 | -6.538 | -42.75 |
| 139121395 | -6.486 | -6.597 | -6.597 | -42.17 |
| 54578370 | -6.481 | -6.481 | -6.481 | -46.18 |
| 15333756 | -6.470 | -6.470 | -6.470 | -51.42 |
| 27281625 | -6.411 | -6.481 | -6.481 | -31.53 |
| 163040 | -6.397 | -6.397 | -6.397 | -38.89 |
| 163040 | -6.397 | -6.397 | -6.397 | -38.89 |
| 163040 | -6.397 | -6.397 | -6.397 | -38.89 |
| 163040 | -6.397 | -6.397 | -6.397 | -38.89 |
| 10375526 | -6.383 | -6.383 | -6.383 | -43.44 |
| 10375526 | -6.383 | -6.383 | -6.383 | -43.44 |
| 25587282 | -6.373 | -6.584 | -6.584 | -31.15 |
| 25587282 | -6.373 | -6.584 | -6.584 | -31.15 |

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, adı : BARAN, Sahra Setenay

Uyruğu : T.C.

Eğitim

| Derece | Eğitim Birimi | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|---|------------------|
| Yüksek Lisans | Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı | Devam Ediyor |
| Yüksek Lisans | Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı | 2022 |
| Lisans | Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü | 2017 |
| Lise | Kalaba Lisesi | 2013 |

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Yusuf Şimşek, Sahra Setenay Baran, Belma Aslim., “In-silico Identification of SARS-CoV-2 Cell Entry Inhibitors from Selected Natural Antivirals” *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol.109, pp.108038, 2021.
2. Sahra Setenay Baran, Belma Aslim., “Nörodejeneratif Hastalıkların Ca²⁺ Homeostazisi ile İlişkisi ve Ca²⁺ Homeostazisinin Düzenlenmesini Hedef Alan Doğal Bileşenler” *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, vol 1 pp. 36-50 (1-2).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

