T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLGİSAYAR DESTEKLİ İLAÇ TASARIMI YÖNTEMLERİ KULLANILARAK G PROTEİN-BAĞLI RESEPTÖRLER İÇİN ADAY İLAÇ MOLEKÜLLERİ TAHMİN VE TASARIM ÇALIŞMASI

SELİNAY DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi GÜZİN TUNCA ALPARSLAN

EDİRNE-2024

SELİNAY DEMİR'in hazırladığı "**Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı Yöntemleri Kullanılarak G Protein-Bağlı Reseptörler İçin Aday İlaç Molekülleri Tahmin Ve Tasarım Çalışması**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **Genetik ve Biyomühendislik** Anabilim Dalında bir **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri: **İmza**

Prof. Dr. Gökhan KAÇAR

Doç. Dr. Burcu BAKIR GÜNGÖR

Dr. Öğr. Üyesi Güzin TUNCA ALPARSLAN

Tez Savunma Tarihi:
26/03/2024

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Güzin TUNCA ALPARSLAN
Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı
Prof. Dr. Özlem ÇETİN ERDOĞAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

26/03/2024
Selinay DEMİR
İmza

Yüksek Lisans Tezi

Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı Yöntemleri Kullanılarak G Protein-Bağlı Reseptörler İçin Aday İlaç Molekülleri Tahmin Ve Tasarım Çalışması

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı

ÖZET

Bir ilacın keşfi ve tasarımı, çok zaman ve maliyet gerektiren karmaşık bir süreçtir. Gelişen teknoloji ve bilgisayar işlem gücü ile Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı yaklaşımları, ilaç keşfi ve tasarımında önemli bir yere sahip olan ve geleneksel yöntemlerin kısıtlamalarını aşan yöntemlerdir. Farklı sistem ve hastalık türlerinde aktif rol oynamaları ile dikkat çekici terapötik hedeflerin başında G Protein-Bağlı Reseptörler (GPCR) gelmektedir. GPCR'lerin üç boyutlu yapı bilgilerinin giderek artması, onları Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı çalışmaları için ilgi çekici hale getirmiştir. Yapısal bilgileri bilinmesine rağmen henüz endojen molekülü tanımlanmamış pek çok yetim (orphan) GPCR vardır. Merkezi sinir sistemi hastalıklarında rol oynayan bir yetim GPCR olan GPR52'nin üç boyutlu yapısının 2020 yılında belirlenmesi ilaç hedefi olarak öne çıkmasını sağlamıştır. Bu tez çalışmasında, yapıya dayalı ilaç tasarımı teknikleri kullanılarak GPR52 için olası öncü ilaç molekül adayı bulunması hedeflenmiştir. GPR52 için küçük molekül kütüphanesi hazırlama, farmakofor modelleme, moleküler yerleştirme, konsensüs skorlama, moleküler dinamik simülasyonları, bağlanma serbest enerjisinin hesaplanması ve *in silico* farmakokinetik çalışmaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen moleküllerin *in vitro* ve *in vivo* deneyleri için aday olabileceği veya yeni ilaç keşfi ve geliştirme çalışmalarında öncü ilaç molekül adayları olarak kullanılabileceği beklenmektedir.

Yıl **:** 2024

Sayfa Sayısı **:** 108

Anahtar Kelimeler **:** GPCR, protein, ligand, GPR52, Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı, Farmakofor, Moleküler Yerleştirme, Moleküler Dinamik Simülasyonları

Master's Thesis

Prediction and Design Study of Candidate Drug Molecules for G Protein-Coupled Receptors Using Computer Aided Drug Design Methods

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Genetics and Bioengineering

ABSTRACT

The discovery and design of a drug is a complex process that requires a lot of time and cost. With the advancement of technology and computational power, Computer-Aided Drug Design approaches have become more critical in drug discovery and design and overcome the limitations of traditional methods. G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) are one of the most attractive therapeutic targets due to their active role in different systems and disease types. The increasing three-dimensional structure information of GPCRs has made them interesting for Structure-Based Drug Design (SBDD) studies. There are many orphan GPCRs whose endogenous molecules have not yet been identified, although their structural information is known. The discovery of the three-dimensional structure of GPR52, an orphan GPCR involved in central nervous system diseases, in 2020 made it stand out as a drug target. In this thesis study, it is aimed to find a possible lead drug molecule candidate for GPR52 by using structure-based drug design techniques. The study comprises many SBDD methods including preparation of a small molecule library, pharmacophore modelling, molecular docking, consensus scoring, molecular dynamics simulations, calculation of binding free energy and *in silico* pharmacokinetic studies for GPR52. It is expected that the molecules obtained as a result of the study may be candidates for *in vitro* and *in vivo* experiments or could be used as lead drug molecule candidates in new drug discovery and development studies.

Year **:** 2024

Number of Pages **:** 108

Keywords **:** GPCR, protein, ligand, GPR52, Computer-Aided Drug Design, Pharmacophore, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulations

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca, değerli bilgilerini benimle paylaşan, yardımlarıyla yol gösteren ve desteğini hiç esirgemeyen, akademik tavrı ile bana örnek olan ve öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Güzin TUNCA ALPARSLAN'a teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca Trakya Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik bölümü Hesaplamalı Biyomalzeme Laboratuvarı'ndaki donanımlardan ve olanaklardan faydalanmamı sağlayan laboratuvarın kurucusu Prof. Dr. Gökhan KAÇAR'a içten teşekkürlerimi sunarım. Hesaplamalı Biyomalzeme Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tezimin değerlendirilmesine katkı sağlayan, verdikleri değerli geri bildirimler ile bu çalışmanın geliştirilmesine imkan sağlayan değerli jüri üyeleri Prof. Dr. Gökhan KAÇAR, Doç. Dr. Üyesi Burcu BAKIR GÜNGÖR ve Dr. Öğr. Üyesi Güzin TUNCA ALPARSLAN'a içtenlikle teşekkür ederim. Beni her koşulda destekleyen ve yanımda olan aileme tüm emekleri için minnettarım. Bu tez çalışması TÜSEB tarafından desteklenmiştir (proje no: 20140) ve TÜBİTAK ULAKBİM, TRUBA kaynakları kullanılmıştır.

Selinay DEMİR

2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET....iv
ABSTRACT....vi
TEŞEKKÜR....viii
İÇİNDEKİLER....ix
SİMGELER DİZİNİ....xii
KISALTMALAR DİZİNİ....xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ....xv
ÇİZELGELER DİZİNİ....xvii
EKLER DİZİNİ....xviii
BÖLÜM 1....1
GİRİŞ....1
BÖLÜM 2....5
GENEL BİLGİLER....5
2.1 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı....5
2.2. Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı....8
2.2.1. Hedef Yapı ve Bağlanma Bölgesi....10
2.2.2. Farmakofor Modelleme....11
2.2.3. Küçük Molekül Kütüphanesi....12
2.2.4. Moleküler Yerleştirme (Docking, Kenetleme) ve Skorlama....13

2.2.5. Moleküler Dinamik Simülasyon 16
2.2.6. Bağlanma Serbest Enerjisi 18
2.2.7. Emilim, Dağılım, Metabolizma, Atılım ve Toksisite (ADME-T) Özelliklerini Belirleme 20
2.3. İlaç Hedefi Olarak G Protein-Bağlı Reseptörler 20
2.3.1. G Protein-Bağlı Reseptör 52 22
BÖLÜM 3 25
MATERYAL VE SİMÜLASYON DETAYLARI 25
3.1. Materyallerin Hazırlığı 25
3.1.1. GPR52'nin Bağlanma Bölgesi Analizi 26
3.1.2. GPR52'nin Moleküler Yerleştirme Öncesi Hazırlığı 26
3.1.3. Farmakofor Modeli Oluşturma 26
3.1.4. Küçük Molekül Kütüphanesinin Hazırlığı 28
3.2. GPR52 İçin Moleküler Yerleştirme Çalışması 29
3.3. Konsensüs Skorlama 30
3.4. Moleküler Dinamik Simülasyonlar 32
3.5. Bağlanma Serbest Enerjisi Hesaplama 35
3.6. ADME-T Analizi 37
BÖLÜM 4 38
BULGULAR VE TARTIŞMA 38
4.1. GPR52 Bağlanma Bölgesi Analiz ve Farmakofor Araması Sonuçları 38
4.2. GPR52 İçin Moleküler Yerleştirme Çalışması ve Konsensüs Skorlama Sonuçları 39
4.3. GPR52 İçin Yapılan Moleküler Dinamik Simülasyonu ve Bağlanma Serbest Enerjisi Sonuçları 49
4.4. ADME-T Analizi Sonuçları 57
BÖLÜM 5 64

SONUÇ 64
KAYNAKLAR 67
EKLER 84
ÖZGEÇMİŞ 90

SİMGELER DİZİNİ

ΔE:	Moleküler Mekanik Enerjisi
ΔG:	Bağlanma Serbest Enerjisi
$\Delta G_{SOL:}$	Solvasyon Serbest Enerjisi
ΔS:	Entropi
π:	Pi
K:	Kelvin
T:	Sıcaklık
$\acute{X}$:	Normalizasyon Değeri
$\acute{X}_{Total}$:	Normalizasyon Ortalaması

KISALTMALAR DİZİNİ

3D : Üç Boyutlu (Three-Dimensional)

CADD : Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (Computer Aided Drug Design)

ADME-T : Emilim, Dağılım, Metabolizma, Atılım - Toksisite (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion–Toxicity)

ASP : Aspartik Asit

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat (Cyclic Adenosine Monophosphate)

CYS : Sistein

DSV : Biovia Discovery Studio Visualizer

ECL 2 : Hücre Dışı Döngü 2 (Extracellular Loop 2)

GLU : Glutamik Asit

GPCR : G Protein-Bağlı Reseptörler (G Protein-Coupled Receptor)

GPR52 : G Protein-Bağlı Reseptör 52

GRAFS : Glutamat (G), Rodopsin (R), Adezyon (A), Frizzled/Taste2 (F) ve Sekretin (S)

ILE : İzolösin

LBDD : Liganda Dayalı İlaç Tasarımı (Ligand Based Drug Design)

LEU : Lösin

LPH : Lone Pair Hidrojen

MD : Moleküler Dinamik

MM/PBSA : Moleküler Mekanik Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı (Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann surface area)

MW : Molekül Ağırlığı

nm : Nanometre

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

NPT :	Sabit Parçacık Sayısı, Basınç Ve Sıcaklık
ns :	Nanosaniye
oGPCR :	Yetim (Orphan) GPCR
OPM :	Orientations of Proteins in Membranes
PD:	Farmakodinamik (Pharmacodynamics)
PDB :	Protein Data Bank
PHE :	Fenilalanin
PK:	Farmakokinetik (Pharmacokinetics)
POPC :	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin
ps:	Pikosaniye
PRODIGY :	Protein Bindıng Energy
RMSD :	Kök-Ortalama-Kare Sapması (Root-Mean-Square Deviation)
RO-5 :	Lipinski'nin Beş Kuralı
SBDD :	Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı (Structure Based Drug Design)
THR :	Treonin
TM :	Transmembran
TYR :	Tirozin
VAL :	Valin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. İlaç keşfi ve tasarımı çalışmalarında çeşitli aşamalardaki CADD kullanımı….7
Şekil 2. 2. SBDD ve LBDD aşamalarının örnek gösterimi. 8
Şekil 2.3. Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı (SBDD) yöntemleri ve aşamaları 9
Şekil 2.4. Protein, ligand ve bağlanma bölgesi örnek gösterimi.....10
Şekil 2.5. Farmakofor sorgusu. 12
Şekil 2.6. Moleküler yerleştirme çeşitleri 14
Şekil 3.1. GPR52'nin 6LI0 kodlu yapısı.....25
Şekil 3.2. GPR52 için farmakofor modeli. 27
Şekil 3.3. OPM ile hazırlanan protein-ligand kompleksinin membranda konumlandırılmasının örnek gösterimi. 33
Şekil 3.4. CHARMM-GUI ile oluşturulan sistemin örnek gösterimi.. 34
Şekil 3.5. CHARMM-GUI ile oluşturulan membranın proteinsiz ve üstten görünümü 34
Şekil 4.1. 6LI0 proteinin bağlanma bölgesinin analizi……38
Şekil 4.2. Moleküler dinamik simülasyonları için seçilen ligandlar.....42
Şekil 4.3. Seçilen ligandların proteinin bağlanma bölgesinde gösterimi.....42
Şekil 4.4. Seçilen ligandların proteinin bağlanma bölgesinde gösteriminin devamı.....43
Şekil 4.5. Seçilen ligandların proteinin bağlanma bölgesinde gösteriminin devamı.....44
Şekil 4.6. EN6 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. 44
Şekil 4.7. CHEMBL176088 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. 45
Şekil 4.8. CHEMBL179493 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim 45
Şekil 4.9. CHEMBL179872 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. 46

Şekil 4.10. CHEMBL183274 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. 46
Şekil 4.11. CHEMBL183779 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. 47
Şekil 4.12. CHEMBL2096778 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. 47
Şekil 4.13. CHEMBL369392 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. 48
Şekil 4.14. CHEMBL585766 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim 48
Şekil 4.15. Agonist (CHEMBL3297811) ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. 49
Şekil 4.16. CHEMBL183779 ve CHEMBL585766 ligandları ile protein arasında meydana gelen ring penetrasyonu görüntüsü.. 50
Şekil 4.17. MD simülasyonları sonrası ligandların RMSD grafiği. 51
Şekil 4.18. Ligandların 78 ns – 98 ns aralığındaki RMSD grafiği 52
Şekil 4.19. MD simülasyonları sonucunda elde edilen protein-ligand komplekslerinin son 50 ns'lik RMSD grafiği. 52
Şekil 4.20. MD simülasyonları sonucunda elde edilen protein-ligand komplekslerinin 78 ns – 98 ns aralığındaki RMSD grafiği. 53
Şekil 4.21. Seçilen ligandların bağlanma serbest enerjisi sonuçlarının grafiği. 54
Şekil 4.22. MD simülasyonu sonrası 98.ns'deki protein-ligand etkileşimleri 55
Şekil 4.23. MD simülasyonu sonrası 98.ns'deki protein-ligand etkileşimleri devamı 56
Şekil 4.24. Ligandların oral biyoyararlanım alanı analizi sonuçları 61
Şekil 4.25. Ligandların oral biyoyararlanım alanı analizi sonuçlarının devamı. 62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. EN6 ve Agonist (CHEMBL3297811) ligandın skorlama sonuçları.....40
Çizelge 4.2. Skorlama sonucunda seçilen ligandların listesi. 41
Çizelge 4.3. SwissADME sonuçları. 59
Çizelge 4.4. admetSAR sonuçları. 60

EKLER DİZİNİ

EK 1. Ligandların RMSD grafikleri 84
EK 2. Protein-ligand komplekslerinin RMSD grafikleri 87

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İnsan Genom Projesinin tamamlanması ile hem proteomik hem de yapısal genomik çalışmaların başlaması, bilgisayar teknolojisindeki gelişmeler ve beraberinde hastalık biyolojisinin anlaşılmasındaki ilerlemeler ilaç keşfi için çok sayıda yeni terapötik hedefler ortaya çıkarmış, ilaç keşfi ve geliştirme çalışmaları için önemli katkılar sağlamıştır (Anderson, 2003; Meng, Zhang, Mezei, & Cui, 2011; Schneider vd., 2020). Ancak yeni bir ilacın keşfi, geliştirilmesi ve pazara sürülmesi oldukça pahalı ve karmaşık bir süreçtir. Geleneksel ilaç geliştirme yöntemleri ile yaklaşık 15 yıl süren bu uzun süreçte bir ilacın pazara ulaşmasının maliyeti milyar dolarlara kadar çıkmaktadır (DiMasi, Grabowski, & Hansen, 2016; Song, Lim, & Tong, 2009).

Gelişen teknolojiyle beraber ortaya çıkan yeni yöntemler ile ilaç keşfi ve geliştirme süreci hızlanmakta ve maliyeti azalmaktadır. Bu gelişmelerin sonuçlarından biri olan Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (Computer Aided Drug Design: CADD), son yıllarda ilaç keşfi ve geliştirmede verimliliği artıran, maliyeti düşüren, zaman açısından tasarruf yapmayı sağlayan ve geleneksel yöntemlerin kısıtlamalarını aşan yaygın olarak kullanılmaya başlanmış bir yaklaşımdır. 1980'lerin başı, CADD'nin dikkatleri üzerine çekmesinin ve ilaç endüstrisinde donanım ve yazılıma yapılan milyonlarca dolarlık yatırımların ve bu alanda uzmanlaşmanın başlangıcı olduğu varsayılabilir (Van Drie,

2007). CADD, hesaplamalı kimya ve bilgisayar teknolojisini kullanan ilaç keşfini ve geliştirilmesi çalışmalarını kolaylaştıran, zamandan, maliyetten ve kaynak kullanımında tasarruf edilmesine yardımcı olan bir araçtır.

Yüksek verimli protein saflaştırma, kristalografi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopi yöntemleri geliştirilmiş ve bunlar ile birlikte proteinlerin ve protein-ligand komplekslerinin yapısal ayrıntısı hakkında ayrıntılı bilgi edinilmiştir (Meng vd., 2011). Bu gelişmeler ışığında CADD yöntemlerinin ilaç keşiflerindeki rolü daha da artmıştır. Bir ilacın insan vücudunda bir etki meydana getirebilmesi için bir ligand (ilaç) ile bir makromolekül (hedef) arasındaki moleküler tanımanın gerçekleşmesi gerekmektedir (Taft, Silva, & Silva, 2008). CADD, aday ilaç moleküllerinin tanımlanmasını kolaylaştırmak için hedefin (yapıya dayalı) veya biyoaktiviteye sahip bilinen ligandların (liganda dayalı) yapısal bilgisinden yola çıkar (Macalino, Gosu, Hong, & Choi, 2015) . Esas olarak CADD; Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı (Structure Based Drug Design: SBDD) ve Liganda Dayalı İlaç Tasarımı (Ligand Based Drug Design: LBDD) olmak üzere iki gruba ayrılır (Schenone, Dančík, Wagner, & Clemons, 2013). Yapıya dayalı ve liganda dayalı ilaç tasarımının sağladığı avantajlar deneysel çalışmalar ile desteklendiğinde ilaç keşfi çalışmalarına önemli katkılarda bulunabilir (Macalino vd., 2015).

CADD yöntemlerinin, G Protein-Bağlı Reseptörler (G Protein Coupled Receptor: GPCR) gibi birçok hastalık ve sistem üzerinde etkin rol oynayan büyük reseptör sınıfları için ilaç tasarımı sürecinde kullanılmasının avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir (Congreve, Langmead, Mason, & Marshall, 2011). Temel olarak GPCR'ler, hücre dışı sinyali hücre içine ileten ve üç hücre dışı ve üç hücre içi döngü ile bağlanan hücre membranına gömülü yedi alfa-sarmal olarak tanımlanır. Geçtiğimiz yıllarda, GPCR'lerin yapısal biyolojisinin ortaya konmasında kayda değer ilerlemeler meydana gelmiştir. Kristal yapılarının çözülmesi GPCR'leri, membran-protein biyofiziği, hücre biyolojisi, fizyoloji ve ilaç keşfi çalışmaları açısından büyük bir ilgi odağı haline getirmiştir (Rosenbaum, Rasmussen, & Kobilka, 2009). GPCR'ler gibi birçok hastalık ve sistem üzerinde etkin rol oynayan büyük reseptör sınıfları için ilaç tasarımı sürecinde CADD kullanılmasının avantaj sağlayabileceği düşülmektedir. Son yıllarda birçok laboratuvar ve ilaç şirketi GPCR'ler için SBDD yöntemlerinin kullanmaya başlamıştır. Örnek olarak iki Avrupa şirketi, leadXpro (https://leadxpro.com) ve Confo Therapeutics

(https://www.confotherapeutics.com), SBDD kullanarak GPCR ilaç keşfine odaklanmak için kurulmuştur (Congreve, Graaf, Swain, & Tate, 2020).

GPCR'ler amino asit dizilerine ve fonksiyonel benzerliklerine göre A-F sistemi olarak adlandırılan sınıflandırma sistemi ile 6 sınıfa ayrılır: A Sınıfı (rodopsin benzeri), B Sınıfı (sekretin reseptör ailesi), C Sınıfı (metabotropik glutamat), D Sınıfı (mantar çiftleşme feromon reseptörleri), Sınıf E (cAMP (siklik adenozin monofosfat) reseptörleri) ve F Sınıfı (frizzled/smoothened). Fakat bunlardan D ve E sınıfları omurgalılarda bulunmamaktadır (Attwood & Findlay, 1994; Kolakowski, 1994). Ayrıca yaklaşık 800 insan GPCR dizisinin filogenetik ağacı esas alınarak "GRAFS" adı verilen bir başka sınıflandırma sistemi de mevcuttur. GRAFS: Glutamat (G), Rodopsin (R), Adezyon (A), Frizzled/Taste2 (F) ve Sekretin (S) olarak adlandırılan beş ana aile içermektedir. GRAFS sistemi ile A-F sistemini birbirinden ayıran en temel fark, bu iki ailenin evrimsel geçmişinin birbirinden farklı olduğuna dair bir ön bulguya dayanarak GRAFS sisteminde B sınıfının Sekretin ailesi ve Adezyon ailesi olarak daha fazla bölünmesidir (Hu, Mai, & Chen, 2017; Schiöth & Fredriksson, 2005).

Yaygın olarak kullanılan 6 sınıf GPCR'lerde kendi içinde alt sınıflara ayrılır ve bu alt sınıflardan ilaç tasarımı için en dikkat çekeni henüz endojen molekülü tanımlan(a)mamış GPCR'lardan oluşan orphan (yetim) GPCR (oGPCR) alt sınıflarıdır.

Bu tez çalışması ile A sınıfı orphan reseptör olan G Protein-Bağlı Reseptör 52 (GPR52) için agonist etki oluşturabilecek moleküllerin SBDD teknikleri kullanılarak bulunması hedeflenmiştir. Öncelikle küçük molekül veri tabanlarından elde edilmiş GPR52 agonistleri ve etki değerleri toplanarak bu moleküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Bu moleküller sonraki adımlarda test ve doğrulama amacıyla kullanılmıştır. Ardından sanal tarama yapılacak küçük molekül kütüphanesi oluşturulması için A sınıfı GPCR'lerin deneysel olarak belirlenmiş ligandları veri tabanlarından toplanmıştır. Çalışmanın sonraki aşamalarında GPR52 kristal yapısı kullanılarak farmakofor modeli oluşturulması ve küçük molekül kütüphanesi için farmakofor taraması, tarama sonucunda bulunan ligandlar için moleküler yerleştirme (docking, kenetleme) çalışması, ligandların bağlanma modları için skorlama işlemleri, moleküler dinamik simülasyonları ve bağlanma serbest enerjisinin hesaplanması işlemleri gerçekleştirilmiştir. Son adım olarak da bulunan olası aday molekül için *in silico*

farmakokinetik çalışmaları yapılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilecek sonuçlar ile belirlenen aday ilaç moleküllerinin ilaç olabilirliği araştırılmıştır.

Tez kapsamında GPR52 için yapılan ilk büyük bilgisayar destekli sanal tarama çalışmasının sonucunda elde edilen molekülün *in vitro* ve *in vivo* deneyler için aday olabileceği veya yeni ilaç keşfi ve/veya ilaç geliştirme çalışmalarında öncü ilaç molekül adayları olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

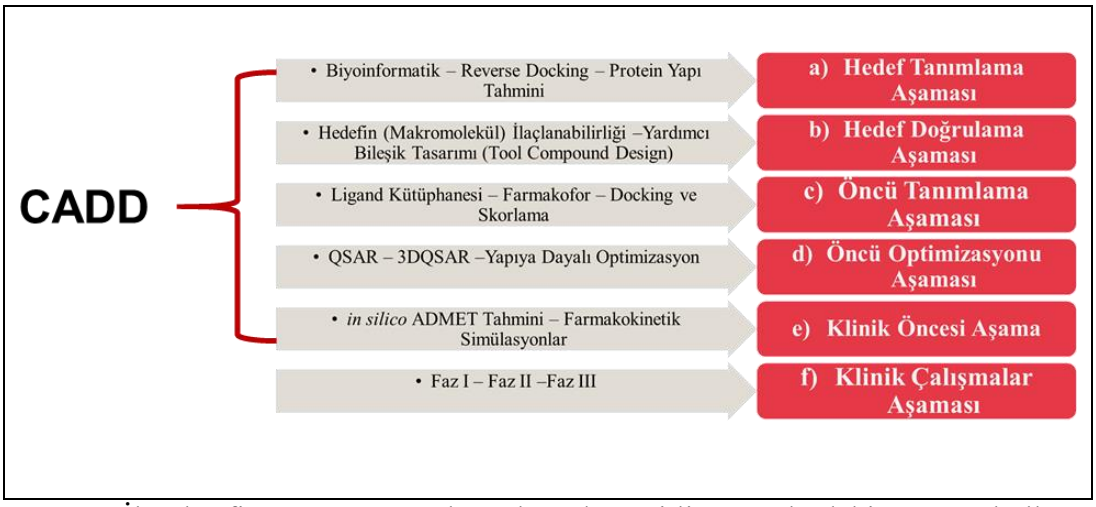
Tarihler boyunca insanlar çeşitli hastalıklarla ve salgınlarla karşı karşıya kalmış ve bunlarla mücadele etmek için çeşitli tedavi yollar aramış ve halen aramaya devam etmektedir.

Tedavi için kimyasal maddelerin kullanımının temelde bitkilerin iyileştirici özelliklere sahip olduğunun ya da ağrı gibi sorunlara iyi geldiğinin fark edilmesiyle yani neden-sonuç ve deneme-yanılma gözlemlerinden ortaya çıkmış olduğu tahmin edilmektedir. Örnek olarak, salisilik asit bakımından zengin söğüt ağacı kabuğundan elde edilen suyun ağrı ve iltihap için kullanımı milattan öncesine dayanmaktadır ancak aktif bileşeni asetil salisilik asit olarak tanımlanması ve aspirin olarak pazarlanması 1800'lerin son yıllarında gerçekleşmiştir. Geleneksel ilaç tasarımı, farklı hastalık durumları için tedaviler geliştirmede etkili olmuş olsa da, yeni zorlukların üstesinden gelmek ve mevcut paradigmaları tamamlayacak yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Bradford & Cowan, 2014; Vane & Botting, 2003). Bu yeni yaklaşımlardan multidisipliner bir yaklaşım olan Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD), geleneksel ilaç tasarımı yaklaşımlarının çeşitli zorluk ve sınırlarını aşarak ilaç keşfi sürecinde avantaj sağlar.

CADD, hastalıkla ilgili etmenin ve/veya hastalık- ligand (Küçük molekül, ilaç)-makromolekül (hedef, Protein, DNA, RNA.) üçgenindeki ilişkilerle ilgili bilgilerin araştırılıp, tanımlanarak açıklığa kavuşturulması, kimyasal ve yapısal biyoloji, hesaplamalı kimya, organik sentez ve farmakoloji gibi farklı disiplinler ışığında elde edilen bu verilerin bilgisayarlı yöntemler ile yeni ilaç etken maddesi bileşiklerin tasarım çalışmalarında kullanılması esasına dayanır.

İlaç keşif süreci, aşağıdaki aşamalardan oluşur (Macalino vd., 2015) (bkz Şekil 2.1):

a) Hedef tanımlama aşaması, hastalığa sebep olan hedeflerin belirlenmesi ve bu hedeflerin işlevlerinin ve hastalıkla bağlantısının araştırılması (Anderson, 2003),
b) Hedef doğrulama aşaması, ilaç hedefinin tedavi edilmek istenen hastalıkla ilgili süreçlerde kritik olarak rol alıp almadığı ve bu hedefe yönelik ilacın terapötik bir etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi (Haberman, 2005),
c) Öncü molekül tanımlama aşaması, hedeflenen hastalığı tedavi edebilecek bir ilaç öncüsünün sentetik bir kimyasal yapıya sahip olduğu varsayımıyla ilaç keşfi çalışmasının başlangıcı (Goodnow & Gillespie, 2007; Kalyaanamoorthy & Chen, 2011),
d) Öncü optimizasyonu aşaması, öncü bileşiğin etki gücünü ve diğer önemli özelliklerini geliştirmek için öncü bileşiğin ve analoglarının değerlendirilmesini ve gerekirse iyileştirilmesi (Andricopulo, Salum, & Abraham, 2009),
e) Klinik öncesi aşama, ilaç sentezi ve formülasyon araştırmalarını, *in vivo* hayvan çalışmalarını ve toksisitenin araştırılması (Cavagnaro, 2002),
f) Klinik çalışmalar aşaması, aday ilacın insan gönüllüler üzerinde güvenliğini, advers yan etkilerini, dozajını, etkinliğini ve farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerini araştıran üç aşamalı faz çalışmalarıdır.

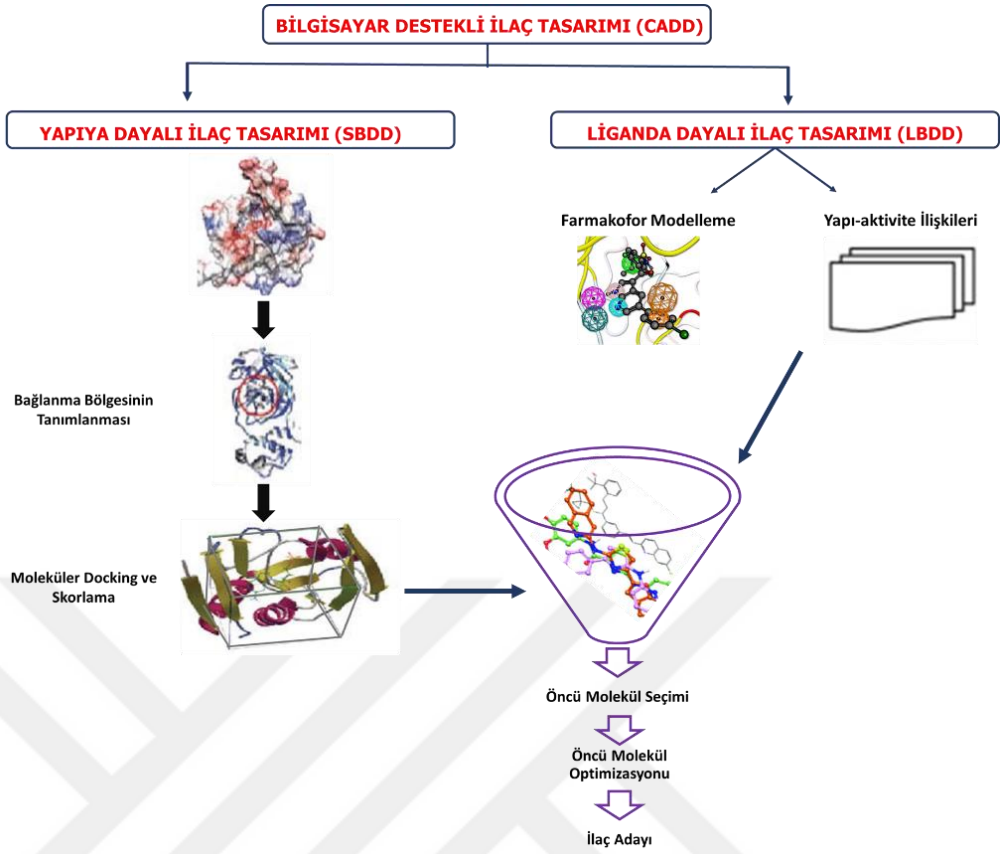


Şekil 2.1. İlaç keşfi ve tasarımı çalışmalarında çeşitli aşamalardaki CADD kullanımı (Bharath, Manjula & Vijaychand (2011)'den düzenlenerek alınmıştır).

Hesaplamalı tekniklerdeki gelişmeler ve ilaç endüstrisi ve akademideki yatırımlarla, keşif sürecinde *in silico* yöntemlerin uygulanması kolaylaşmıştır. CADD, iki kaynak hareket noktası ile yapıya dayalı ve liganda dayalı ilaç tasarımı yöntemleri olmak üzere ikiye ayrılır:

1) Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı (SBDD) yöntemleri, ilaç hedefinin (makromolekül) üç boyutlu (3D) yapısının bilindiği durumlarda,
2) Liganda Dayalı İlaç Tasarımı (LBDD) yöntemleri, ilaç hedefinin 3D yapı bilgisinin yokluğunda ve ilgilenilen biyolojik hedefe bağlanan moleküllerin bilgisine sahip olunan durumlarda kullanılır.

Bu iki yaklaşım da Şekil 2.2'de gösterildiği üzere kendi içlerinde çeşitli teknikleri barındırır.

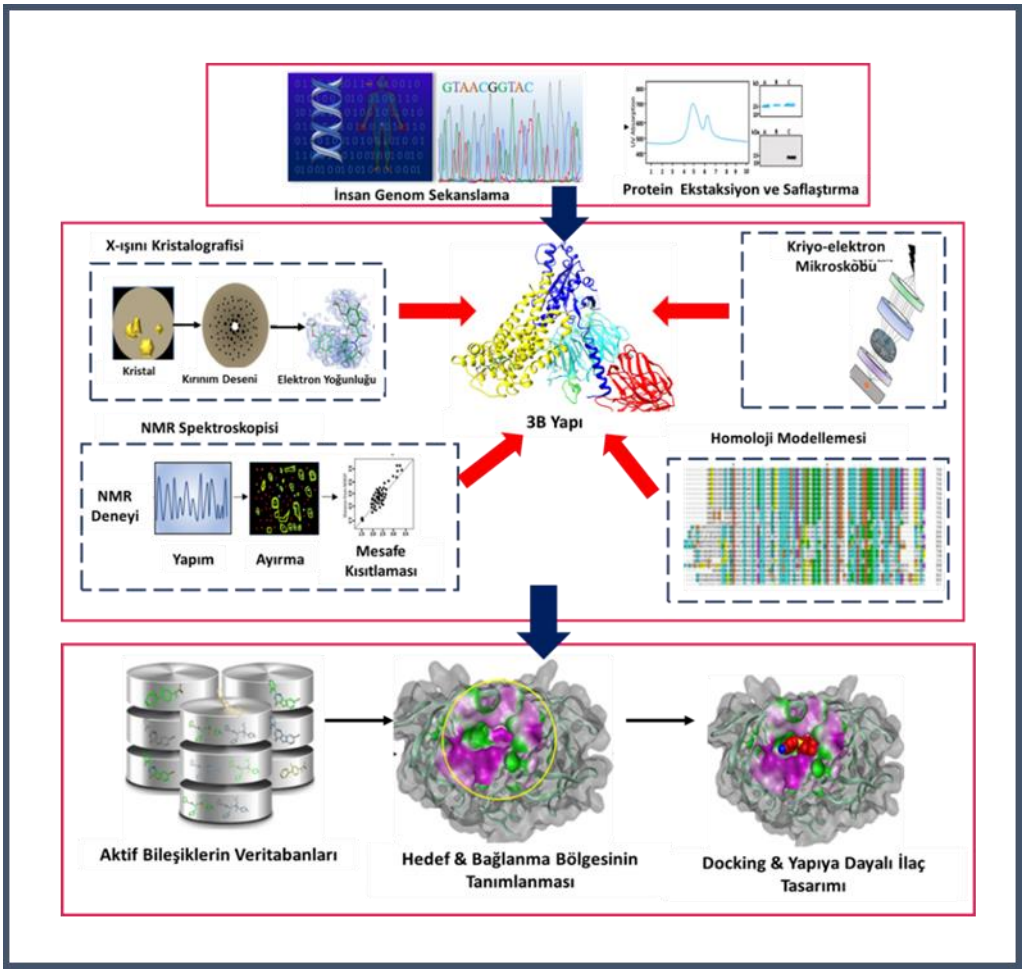


Şekil 2.2. SBDD ve LBDD aşamalarının örnek gösterimi. Yapı hakkında bilgilerin olduğu durumlarda SBDD kullanılırken, yapı hakkında bilginin mevcut olmadığı fakat bilinen ligand bilgisinin mevcut olduğu durumlarda LBDD kullanılır. Her iki molekülünde (yapı+ligand) bilindiği durumlarda bu yöntemler birlikte de kullanılabilir (Rajkishan, Rachana, Shruti, Bhumi, & Patel (2021)'den düzenlenerek alınmıştır).

2.2. Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı

Hedef yapı ve bağlanma bölgesinin tanımlanması SBDD'nin ilk adımıdır. X-ışını kristalografisi, NMR, kriyo-elektron mikroskobu ve yapı modelleme tekniklerindeki gelişmeler ile binlerce proteinin 3D yapısı çözülmüş ve bu gelişmeler potansiyel olarak ilaç hedefleri çalışmalarında önemli roller oynamaktadır (Berman vd., 2000; Ferreira, Dos Santos, Oliva, & Andricopulo, 2015). Yapı bilgisinin olmadığı fakat dizi bilgilerinin bulunduğu durumlarda kullanan karşılaştırmalı modelleme veya homoloji modelleme, 3D yapıların tahmini için bir yöntemdir ve ilaç keşfi alanındaki geniş bir uygulama yelpazesi için uygun modeller sağlar. Hedefin dizisi ile şablon yapısı arasındaki daha yüksek bir dizi özdeşliği, daha güvenilir bir modelin üretilmesini vaat etmektedir. Ayrıca hedef

genin dizilenmesi ve klonlanması, ardından proteinin ekstraksiyonu, saflaştırılması yöntemleri de 3D yapısının belirlenmesinde rol almaktadır. Kısaca *in silico* ve deneysel yöntemlerin birlikte kullanılması ile hedef yapılar hakkındaki bilgiler daha da artmıştır. SBDD yöntemlerinde, biyolojik hedeflerden elde edilen 3D yapısal bilgilerin kullanılması ilaç keşif ve geliştirme çalışmaları için önemli bir imkan sağlamıştır. Hedefin yapı bilgisi ile başlayan SBDD süreci, Şekil 2.3'te gösterildiği gibi birçok yöntem ve aşama içerir.

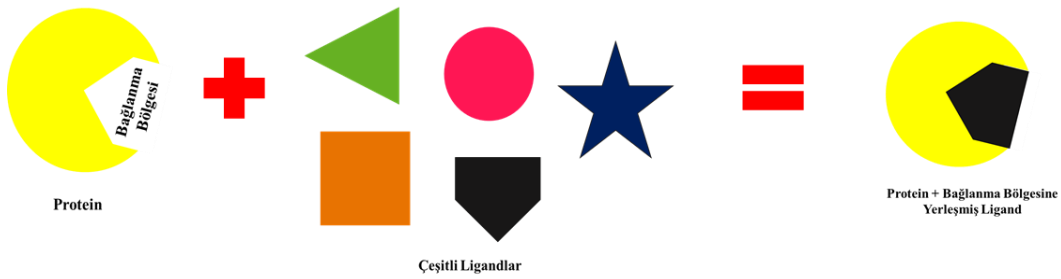


Şekil 2.3. Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı (SBDD) yöntemleri ve aşamaları (Batool, Ahmad, & Choi (2019)'dan düzenlenerek alınmıştır).

2.2.1. Hedef Yapı ve Bağlanma Bölgesi

Hedef ile ilaç arasındaki ilişkiyi anlamak ilaç çalışmalarının temelini oluşturur. Bu yüzden SBDD'nin ilk adımı hedefin tanımlanması ve doğrulanmasıdır.

İlaç hedef molekülleri için en çok kullanılan araçlardan biri olan RCSB Protein Data Bank (PDB) veritabanında Homo sapiens ile ilişkli 65.959 3D yapı bulunmaktadır ve bunların 65.692 tanesi Homo sapiens protein 3D yapısıdır (10/12/2023 tarihi itibarıyla https://www.rcsb.org/ adresinden alınan bilgilere göre) ("RCSB PDB: Homepage", t.y.). Bir makromolekülün ilaç hedefi olabilmesi için bir hastalık sürecine ait sinyal veya metabolik yolaklarda yer alması gerekmektedir (Fuller, Burgoyne, & Jackson, 2009; Mandal, Moudgil, & Mandal, 2009). Aksi takdirde hedefe yönelik yapılan ilaç çalışması sadece zaman ve maliyet kaybına neden olabilir, bunun önüne geçmek için doğru hedefin seçilmesi çok önemlidir. İdeal hedef makromolekülün, insan hastalığıyla yakından bağlantılı olmasının yanı sıra aynı zamanda işlevini yerine getirmek için küçük bir molekülü ile bağlı olmalı ve/veya genellikle iyi tanımlanmış bir bağlanma bölgesine sahip olmalıdır. Kısaca hedefin ilaçlanabilir olması gerekmektedir. Böylece tasarlanan diğer küçük moleküller, hedefin işlevine etki etmek için gerekli seviyede doğal küçük molekül ile rekabet edebilir ve bağlanma bölgesine doğru şekilde bağlanabilir (bkz Şekil 2.4) (Anderson, 2003). Bilinen ligandları (endojen) ile birlikte kristalize edilen proteinlerin literatürü de bağlanma bölgesi hakkında etkili bilgi sağlar.



Şekil 2.4. Protein, ligand ve bağlanma bölgesi örnek gösterimi. Ligandın proteine bağlanabilmesi için bağlanma bölgesine uyum sağlayacak yapıda olması ilaç keşfi çalışmalarında dikkat edilmesi gereken unsurlardan biridir. Hedef yapı ve bağlanma bölgesinin olabilecek en doğru şekilde tanımlanması, olası ilaç aday molekülünün bağlanması ve bağlanma bölgesine uyacak şekilde bağlanamayan küçük moleküllerin elenmesi CADD çalışmalarına katkı sağlar.

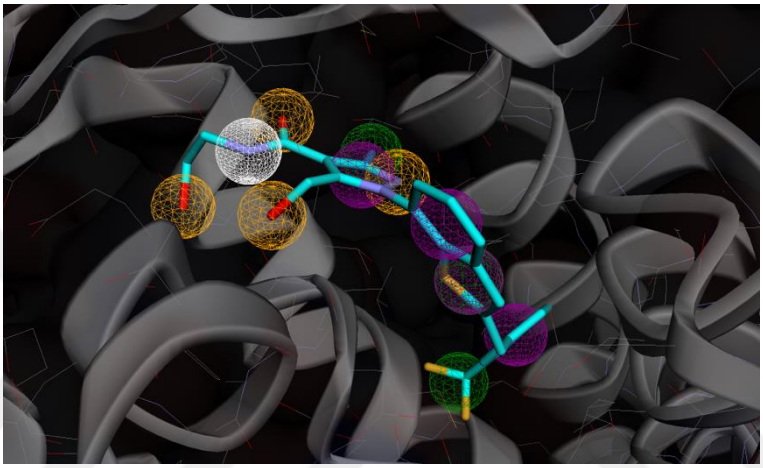
Bağlanma bölgesinin belirlenmesi, protein-ligand ilişkisi hakkında, moleküler yerleştirme (docking, kenetleme) sonrası etkileşimler, hidrojen bağı oluşumu, kompleks (makromolekül + ligand) yapının serbest enerjileri vb. hakkında bilgiler sağlayabilir ve bu da yeni ligandın en iyi farmakoforlarını bulmak için kullanılabilir (Ghersi & Sanchez, 2011; X. Wang, Song, Li, & Chen, 2018). Fakat bağlanma bölgesinin bilinmediği durumlarda ise bağlanma bölgesi hakkında bilgi edinmeye yardımcı olabilecek DeepSite (J Jiménez, Doerr, Martínez-Rosell, Rose, & De Fabritiis, 2017), DoGSite (Volkamer, Griewel, Grombacher, & Rarey, 2010), CASTp (Dundas vd., 2006), MetaPocket2.0 (Zhang, Li, Lin, Schroeder, & Huang, 2011), GalaxySite (Heo, Shin, Lee, & Seok, 2014), PrankWeb (P2Rank) (Jendele, Krivak, Skoda, Novotny, & Hoksza, 2019) ve POCASA (Yu, Zhou, Tanaka, & Yao, 2010) gibi birçok sunucu ve araç bulunmaktadır.

2.2.2. Farmakofor Modelleme

Farmakofor, ilk olarak Paul Ehrlich'in "bir moleküldeki belirli kimyasal grupların veya işlevlerin biyolojik etkiden sorumlu olduğu ve benzer etkiye sahip moleküllerin benzer ortak işlevlere sahip olduğu" fikrinden ortaya çıkmıştır (P.Ehrlich'ten aktaran Qing vd., 2014). Farmakofor kelimesi Schueler FW'nin 1960 tarihli "Kemobiyodinamik ve İlaç Tasarımı" kitabında ise "bir ilacın (pharmacon) biyolojik aktivitesinden sorumlu olan temel özellikleri taşıyan (phoros) moleküler bir çerçeve" olarak tanımlanmıştır (Qing vd., 2014). Tıbbi kimyada kullanılan terimler sözlüğü göre ise farmakofor şu şekilde tanımlanmaktadır: " Bir farmakofor, belirli bir biyolojik hedefle optimal supramoleküler etkileşimleri sağlamak ve biyolojik tepkisini tetiklemek (veya engellemek) için gerekli olan sterik ve elektronik özellikler topluluğudur" (Wermuth, Ganellin, Lindberg, & Mitscher, 1998).

Özetle, farmakoforlar bir ligandın reseptöre optimum şekilde bağlanabilmesi için sahip olması gereken özelliklere göre tanımlanır. Bunlardan bazıları aromatik veya hidrofobik olma, hidrojen bağ donorü veya alıcısı olma ve anyon veya katyon olma ve elektrostatik olma özellikleridir (bkz Şekil 2.5). Farmakofor modelleme ise, varsa bilinen ligand ile reseptör arasındaki etkileşimler dikkate alınarak yoksa da hedefin bağlanma bölgesi ve fonksiyonu incelenerek, ilaç keşfi için arama yapılacak molekül

kütüphanelerinde özdeş özellikleri içeren molekülleri bulmak için oluşturulmuş farmakofor özellikleri ile yapılan bir filtreleme yöntemidir. Farmakofor modelleme için mevcut olan programlar ve web sunucularından bazıları şunlardır (Jayachandran, Ilango, Paital, Bhanja, & Nirmaladevi, 2021): Pharmer (Koes & Camacho, 2011), LigandScout (Wolber & Langer, 2005), Discovery Studio (BIOVA Discovery Studio) ("Pharmacophore and Ligand-Based Design - BIOVIA - Dassault Systèmes®", t.y.), ZINCPharmer (Koes & Camacho, 2012) ve Pharmit (Sunseri & Koes, 2016).



Şekil 2.5. Farmakofor sorgusu. Mavi: Ligand, Koyu Gri: Protein, Sarı Daire: Hidrojen Bağ Alıcı, Beyaz Daire: Hidrojen Bağ Donörü, Yeşil Daire: Hidrofobik Mor Daire: Aromatik Halka

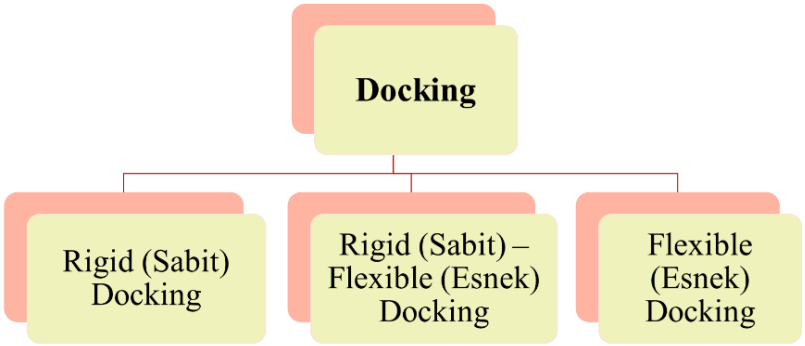
2.2.3. Küçük Molekül Kütüphanesi

İlaç keşfi ve geliştirme çalışmalarındaki bir diğer adım ise makromolekül hedefine bağlanacak öncü bileşiklerin tanımlanmasıdır (Thompson & Ellman, 1996). Ligandlar veya ilaç benzeri bileşikleri içeren pek çok ücretli ve ücretsiz bileşik kütüphanesi vardır. Bu kütüphaneler bileşiklerin birçok formatını bulmaya, benzerlik araması yapmaya ve bileşiklerin deneysel bilgilerini bulmaya yardımcı olur. Kütüphane kullanımda yapılması gerekenler kütüphanedeki bileşik sayısının fazlalığına bakmak değil reseptörün varsa bilinen ligandları veya bağlanma bölgesi ile ilgili bilgileri dikkate alarak arama yapılmasıdır. Ayrıca Lipinski'nin Beş Kuralı (RO-5) (Lipinski, 2000) (logP değerleri, moleküler ağırlık, H-bağı verici ve alıcılarının sayısı) kütüphanelerde filtreleme yapmak

için kullanılabilir. PubChem (Bolton, Wang, Thiessen, & Bryant, 2008), ZINC (Irwin & Shoichet, 2005), DrugBank (Wishart vd., 2006), GPCRdb (Kolakowski, 1994), Guide to Pharmacology (Alexander vd., 2021), MolPort ("Compound Sourcing, Selling and Purchasing Platform", t.y.) (https://www.molport.com/) ve ChEMBL (Gaulton vd., 2012) küçük molekül kütüphanelerine örnek olarak verilebilir (Kalyaanamoorthy & Chen, 2011; Kontoyianni, 2017).

2.2.4. Moleküler Yerleştirme (Docking, Kenetleme) ve Skorlama

Gelişen teknolojiyle ilaç keşfi ve geliştirmesinde bilgisayar gücü ve kullanımı artmıştır. Bununla birlikte pek çok bileşik ve büyük molekül kütüphaneleri ve veri tabanları kullanıma sunulmuştur. Moleküler yerleştirme (Docking, Kenetleme), büyük bileşik kütüphanelerinde sanal tarama yapmak, tarama sonuçlarını sıralamak ve ligandların hedefe nasıl etki ettiğine dair yapısal hipotezler sunmak için kullanılabilir, bu da öncü ligand optimizasyonunda çok değerlidir. 3D yapısı bilinen reseptörün bağlanma bölgesine göre ligandın hem yapısal olarak olası bağlanma modlarını bulmak hem de bağlanma afinitesini tahmin etmek moleküler yerleştirme çalışmasının amaçlarındandır. Moleküler yerleştirme, genellikle protein–ligand arasındaki bağlanmanın modellenmesinde kullanılsa da protein-protein yerleştirme modellemeleri yapmak da mümkündür (Morris & Lim-Wilby, 2008). Moleküler yerleştirme işleminin üç temel türü vardır. Bunlar Şekil 2.6'da görülmektedir.



Şekil 2.6. Moleküler yerleştirme çeşitleri. Rigid (Sabit) Docking işleminde makromolekül ve küçük molekülün uzaysal şekilleri değiştirilemez. Rigid (Sabit) – Flexible (Esnek) Docking işlemin sırasında makromolekül sabit, küçük molekül esnek haldedir. Yaygın olarak bu docking işlemi tercih edilir. Flexible (Esnek) Docking işleminde ise özellikle torsiyon açısı ve dönebilen bağlar bakımında hem makromolekül hem de küçük molekül esnek yani hareketli haldedir. Bu işlem için bilgisayar donanımının yüksek olması gerekir (Fan, Fu, & Zhang (2019)'dan düzenlenerek alınmıştır).

Yapıya dayalı ligand yerleştirmede, bir ligand hedef proteinin biliniyorsa bağlanma bölgesi içine hizalanır ve ortaya çıkan yerleştirme pozları belirli bir skorlama fonksiyonu ile değerlendirilir. Skorlama fonksiyonu her poz için bir skor üretir ve elde edilen değerler farklı pozları ve ligandları sıralamak için kullanılır (Pantsar & Poso, 2018). Eğer bağlanma bölgesi bilinmiyorsa bu durumda hedefin tüm yüzeyinin taranmasıyla olası bağlanma bölgeleri varsa ligandın oraya bağlanmasına (Hetényi & van der Spoel, 2006) izin verilen kör yerleştirme (blind docking) (Hetényi & van der Spoel, 2002) işlemi bağlanma bölgesi bilinen hedef için uygulanan moleküler yerleştirme işlemi ile aynı şekilde uygulanır.

Moleküler yerleştirme işlemi genellikle iki bölümde gerçekleşir (Stanzione, Giangreco, & Cole, 2021):

I. Arama algoritması: Ligandların gerçek bağlanma modunun tanımlanmasını kolaylaştırmak için ligandın reseptörün içine farklı yönlerde yerleştirildiği bir 'pozlama (posing)' mekanizması aracılığıyla konformasyonel alanın etkili bir şekilde aranmasını ve bağlanma bölgesindeki yerinin ve yöneliminin tahminini içerir.

II. Skorlama fonksiyonları: Reseptörle etkileşimleri açısından her poz için enerji tabanlı bir puan, ‘skorlama işlevleri’ sağlanır. İkinci bölüm, hesaplanan skorlara göre pozların sıralanması işlemlerini içerir.

Moleküler yerleştirme için kullanılan çeşitli hem ticari hem de akademik olmak üzere altmıştan fazla yazılım vardır. Hedef protein ile ligand etkileşimlerini tahmin etmek için kullanılan yazılımlara DOCK (Allen vd., 2015). AutoDock (Morris vd., 2009), GOLD (Jones, Willett, Glen, Leach, & Taylor, 1997), Autodock Vina (Trott & Olson, 2010), Glide (Friesner vd., 2004) ve ZDOCK (Pierce vd., 2014) örnek verilebilir. Bu yazılımları her biri kendi arama algoritmaları ve skorlama fonksiyonlarına sahiptir. Bu tez çalışmasında da kullanılmış olan Autodock Vina aracının optimizasyonu için bu aracın geliştiricisi tarafından çeşitli optimizasyon yöntemleri araştırılmış olduğu ve en son Abagyan ve arkadaşlarınınkine (Abagyan, Totrov, & Kuznetsov, 1994) benzer Yinelemeli Yerel Arama (Iterated Local Search) global optimizasyon (Baxter, 1981; Lourenço, Martin, & Stützle, 2003) yönteminde karar kılındığı belirtilmiştir (Trott & Olson, 2010). AutoDock Vina, yerel optimizasyon için yarı-Newton yöntemi olan Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) (Nocedal & Wright, 1999) yöntemini kullanır. Bu yöntemi diğer yarı-Newton yöntemlerinden ayıran ise yalnızca puanlama fonksiyonunun değerini kullanmıyor, aynı zamanda puanlama fonksiyonunun değişkenlerini de kullanıyor olmasıdır. Kısaca ligandın yerinin ve yöneliminin yanında liganddaki aktif dönebilen bağlar ve varsa esnek rezidüler için torsiyon değerlerini hesaba katar (Trott & Olson, 2010).

Sadece bir algoritma tarafından belirlenen skorlar kullanılarak ligand seçiminin yapılması bazen olası ilaç adaylarının elenmesine yol açabilir. Bu yüzden birden fazla skorlama fonksiyonu kullanılarak ligand-reseptör kompleksleri skorlanabilir. Bu skorlama fonksiyonlarının tüm sonuçları konsensüs skorlama (Charifson, Corkery, Murcko, & Walters, 1999) ile ortak tek bir sonuca dönüştürülebilir. Birden fazla skorlama fonksiyonunu ayrı ayrı değerlendirmektense ortak bir sonuca varmak bireysel skorlama fonksiyonlarının eksikliklerini gideren bir yöntem olarak düşünülebilir. Konsensüs skorlama ile tek bir moleküler yerleştirme algoritmasının skorlama fonksiyonunun sınırlayıcılığının elimine edilerek ligandların sıralanmasının daha yüksek doğrulukla yapılması ve olası aday ilaç moleküllerinin elenmemesi amaçlanmaktadır. AutoDock Vina skorlama fonksiyonuna ek olarak bu tez çalışmasında diğer skorlama fonksiyonu

araçları olarak NNScore 2.0 (Durrant & McCammon, 2011) (*https://github.com/durrantlab/nnscore2*, t.y.) ve KDEEP (José Jiménez, Škalič, Martínez-Rosell, & De Fabritiis, 2018) ("Kdeep: a protein-ligand binding affinity predictor [WEB APP]", t.y.) kullanılmıştır. NNScore 2.0, sinir ağı tabanlı skorlama yapar. NNScore 2.0, ligand pozlarının her birini 20 farklı sinir ağı skorlama fonksiyonunu kullanarak 20 ağın her biri ayrı ayrı değerlendirmekte ve skorlarına göre 20 farklı şekilde sıralanmaktadır. Pozlar 20 ağ tarafından verilen en iyi skora ve skorlarına ortalamasına göre sıralanmaktadır. Bu skorlama fonksiyonu için tavsiye edilen sıralama skorların ortalamalarına göre yapılmış olan sıralamadır. KDEEP, PlayMolecule web sunucusunda yer alan derin evrişimli sinir ağları temelli bir protein-ligand afinite tahmin aracıdır. Yapılar ilk olarak 8 farklı farmakoforik benzeri özelliğe göre (hidrofobik, aromatik, hidrojen bağı donörü ve alıcısı, pozitif ve negatif iyonize edilebilir, metalik ve toplam hariç tutulan hacim) iki boyutlu yapıdan üç boyutlu yapıya çevrilir. Üç boyutlu hale çevrilen yapılar PDBbind v.2016 (Liu vd., 2017) veri tabanı aracılığı ile daha önce eğitilmiş olan bir derin evrişimli sinir ağları modeli için girdi olarak kullanılır ve skorlama yapılır.

2.2.5. Moleküler Dinamik Simülasyon

Moleküler Dinamik (MD) simülasyon yöntemi, Newton fiziği temelli moleküllerin ya da atomların zaman içerisindeki hareketini modelleyen ve simüle eden yaklaşımlara verilen genel addır. Ayrıca biyolojik olayların bir bilgisayar simülasyonu ile gerçeğe yakın şekilde kopyalanmasına yardımcı olan bir araçtır. İlaç-hedef komplekslerinin konformasyonel esnekliği ve fiziksel hareketlerinin zamana bağlı bir şekilde gözlemlenebilmesinde önemli bir rol oynar (Shukla & Tripathi, 2021). MD simülasyonları femtosaniye gibi çok küçük zaman aralıklarında moleküllerde meydana gelen konformasyonel değişim, ligand bağlanması ve protein katlanması vb. gibi durumları belirleyebilir. Hem deneysel çalışmalarla elde edilen sonuçları değerlendirmek hem de deneysel çalışmalara katkı sağlamak için pek çok alanda kullanılmaya başlanmıştır (Hollingsworth & Dror, 2018). Son yıllarda sıklıkla kullanılan MD simülasyonları ilk olarak 1950'lerin sonlarında gerçekleştirilmiştir (Alder & Wainwright, 1957). 1970'lerin sonun ilk protein MD simülasyonu sığır pankreatik tripsin inhibitörü

(BPTI) için yapılmış ve yaklaşık 500 atom ile yalnızca 9.2 pikosaniye sürmüştür (McCammon, Gelin, & Karplus, 1977). Artık bir rutin haline gelen MD simülasyonları, 10^4 – 10^6 atom sayısı ile çok daha uzun dengeleme zaman aralıkları ve yüzlerce nanosaniyelik üretim simülasyonları ile yapılabilmektedir (Adcock & McCammon, 2006).

MD simülasyonunun temeli, biyomoleküler sistemdeki bütün atomların konumlarının dikkate alınarak her atomun diğer atomlara uyguladığı kuvvetin hesaplanabilmesidir. Bu kuvvetlerin hesaplanması Newton'un hareket kanunlarına göre her bir atomun uzaysal konumunu zamanın bir fonksiyonu olarak tahmin edilmesi için kullanılmasıyla mümkün hale gelir. Deneysel olarak elde edilmesi güç olan tüm atomların simülasyon süresince her bir zaman adımındaki konumunun ve hareketinin bilgilerinin elde edilmesi bu simülasyonların önemli yönlerindendir. Ayrıca simülasyon koşullarının bilinip kontrol edilebilir olmasıyla farklı koşullarda gerçekleştirilen simülasyonlar karşılaştırılabilir ve en ince ayrıntıya kadar meydana gelmiş birçok durum gözlemlenebilir. MD simülasyonları ile birçok önemli uygulama yapılabilir. Bunlar protein katlanması, deneysel olarak belirlenmiş proteine bağlı ligandın çıkarılarak proteinde meydan gelen olayların incelenmesi, proteinde meydana gelen mutasyonların, modifikasyonların, protonasyonların vb. durumların gözlemlenmesi ve bu tez çalışmasında da kullanılan bağlı bir ligandın farklı bir ligandla değiştirilmesi veya deneysel yapıda mevcut olmayan bir ligandın eklenmesi ile oluşan durumların incelenmesi bunlara örnek verilebilir (Hollingsworth & Dror, 2018).

Moleküler yerleştirme sonrası protein ve ligand arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması için ligandların hedefe yakınlığı, bağlanma serbest enerjilerinin çeşitli tahminleri ve hesaplanması işlemleri yapılabilir. Bu işlemlerin yapılması sonraki adımlarda aday ilaç moleküllerinin diğerlerinden ayrışmalarına ve optimizasyon çalışmaları için olası aday olarak değerlendirilmelerine yardımcı olur.

MD simülasyonlarında GROMACS (Berendsen, van der Spoel, & van Drunen, 1995; Van Der Spoel vd., 2005), NAMD (Nelson vd., 1996), AMBER (Case vd., 2005), CHARMM (Brooks vd., 1983) gibi çeşitli yazılımlar ve AMBER (J. Wang, Wolf, Caldwell, Kollman, & Case, 2004) , CHARMM (MacKerell vd., 1998) , GROMOS (Oostenbrink, Villa, Mark, & Van Gunsteren, 2004) ve OPLS (Jorgensen, Maxwell, &

Tirado-Rives, 1996) gibi kuvvet alanlarının çeşitli versiyonları kullanılır. Her bir kuvvet alanı benzer işlevsel formlara sahip olsa da her birinin belirli ve diğerine göre ayırt edici yönleri vardır. Örneğin, bu tez kapsamında kullanılan yazılım olan GROMACS yazılımının kendine ait belirli bir kuvvet alanı yoktur fakat çeşitli kuvvet alanlarını desteklemektedir.

2.2.6. Bağlanma Serbest Enerjisi

Birçok biyolojik süreç moleküllerin birbirine bağlanma ve birbirinden ayrılma özelliklerine bağlıdır (Murcko, 1995). Proteinlerin birbirlerine ve farklı ligandlara spesifik bir şekilde bağlanma kabiliyetine sahip olması birçok biyolojik sürecin anlaşılmasına önemli katkı sağlar. Özellikle SBDD'nin merkezinde yer alan geri dönüşümlü ligand tasarımı ve tahmini için kovalent olmayan etkileşimlerin gücünün anlaşılması önemlidir. Bu nedenle moleküler komplekslerin yapılarının karakterizasyonlarının yanı sıra bağlanma enerjilerinin de karakterizasyonu kompleksin biyolojik işlevinin anlaşılması açısından yararlı bağlantı sağlayan bir faktör olarak değerlendirilir (Brandsdal vd., 2003) . İlaç keşfi ve tasarımı çalışmalarında, moleküllerin birbirini nasıl tanıdığı ve bağlanma sonrasında nasıl fonksiyon gösterdiğini anlamak çok önemlidir. Bağlanma serbest enerjisi, moleküllerin arasındaki etkileşimlerin afinitesini ve ilaçların etkinliğini anlamak için kullanılır (Hata, Phuoc Tran, Marzouk Sobeh, & Kitao, 2021). Günümüzde MD simülasyonları, bu amaçla sistemlerin çeşitli durumlarından bilgi çıkarmak için özel yöntemlerle birleştirilerek bağlanma serbest enerji hesaplamalarında kullanılabilir. Moleküler simülasyonlardan serbest enerjileri hesaplama, sadece atomistik olarak altta yatan süreçlerin değil, aynı zamanda deneysel olarak erişilemeyen bir sistemin durumlarını anlamaya da imkan sağlar. Özellikle, bir sistemin serbest enerjisinin kesin ve doğru tahminleri doğrudan sayısal simülasyonlardan elde edilebilirse, ligand bağlanma sabitleri gibi bir sistemin termodinamik özelliklerini deneyler ile ölçme ihtiyacı büyük ölçüde azalacaktır. Moleküler sistemlerin termodinamik özellikleri hakkında bilgi edinmek için deneysel yöntemlerin kullanımı genellikle pahalı ve zaman alıcı olduğundan, serbest enerjilerinin sayısal simülasyon yoluyla teorik hesaplamaları giderek yaygınlaşmaktadır (Christ, Mark, & van Gunsteren, 2010; E. Wang vd., 2019).

Moleküler dinamikteki son gelişmeler ile birçok bağlanma serbest enerji hesaplama yöntemleri ortaya çıkmıştır.

Bu tez kapsamında Moleküler Mekanik Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı (Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area: MM/PBSA) (Srinivasan, Cheatham, Cieplak, Kollman, & Case, 1998) yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşıma ek olarak, Serbest Enerji Pertürbasyonu (Free Energy Perturbation: FEP) (Zwanzig, 1954), Termodinamik Entegrasyon (Thermodynamic Integration: TI) (Kirkwood, 1935) ve Lineer Etkileşim Enerjisi (Linear Interaction Energy: LIE) (Åqvist, Medina, & Samuelsson, 1994) yaklaşımları örnek verilebilir.

Son nokta (End-Point) metotlarından yaygın olarak kullanılanlar Moleküler Mekanik Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı (Molecular Mechanics Poisson− Boltzmann Surface Area: MM/PBSA) ve Moleküler Mekanik Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı (Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area:MM/GBSA) yöntemleridir. Sistemin ilk ve son durumlarını değerlendirerek hesaplama yapılmaktadır. MM/PBSA yöntemi oldukça hızlı sonuç vermektedir. MM/PBSA ile serbest ligand, bağlanmamış reseptör ve protein-ligand kompleksinin serbest enerjisi hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Bağlanma serbest enerjisinin hesaplanmasında aşağıdaki denklemler kullanılmaktadır (bkz Denklem 2.1). Protein ve ligand arasındaki bağlanma serbest enerjisi (ΔG) üç faktör ile kontrol edilir. Moleküler mekanik enerji (ΔE_{MM}) bunlar bağ, açı ve dihedral enerjileri, elektrostatik enerjiler ve van der Waals enerjileri, solvasyon serbest enerjisi (ΔG_{SOL}) ve sistem entropisindeki değişim ($T\Delta S$), Denklem 2.1'de (Kollman vd., 2000) ifade edildiği gibi MM/PBSA ile hesaplanabilir.

$$\Delta G = \Delta E_{\mathrm{MM}} + \Delta G_{\mathrm{SOL}} - T\Delta S \tag{2.1}$$

Bu tez çalışmasında kullanılan bağlanma serbest enerjisi yöntemi MM/PBSA, gmx_MMPBSA aracı kullanılarak hesaplanmıştır (Valdés-Tresanco, Valdés-Tresanco, Valiente, & Moreno, 2021).

2.2.7. Emilim, Dağılım, Metabolizma, Atılım ve Toksisite (ADME-T) Özelliklerini Belirleme

İlaç keşfi ve tasarımı sürecinin bir adımı olarak olası ilaç adayının farmakokinetik (Pharmacokinetics: PK) ve farmakodinamik (Pharmacodynamics: PD) özelliklerinin araştırılmalıdır. Bir ilacın piyasa sürülmesi için sadece iyi bir etkinliğe sahip olması yeterli değildir. Bununla birlikte kabul edilebilir emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion–Toxicity: ADME-T) özelliklerine de sahip olması gerekir. Günümüzde ilaç keşfi ve tasarımı çalışmalarında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarının yanı sıra *in silico* ADME-T çalışmaları da yapılmaktadır (Merlot, 2010; Moroy, Martiny, Vayer, Villoutreix, & Miteva, 2012). PK/PD, ilaca benzerlik, lipofiliklik, suda çözünürlük gibi özellikler de ADME-T çalışmalarında dikkate alınan özelliklerdir (Kar & Leszczynski, 2020). Gelişen teknoloji ile beraber ADME-T için *in vitro* olarak değerlendirme yapmaya yardımcı olabilecek birçok yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen pek çok *in silico* yöntemi, ADME-T'in *in vitro* tahmini çalışmalarında başarıyla uygulanmıştır (Wu vd., 2020). ADME-T parametreleri hakkındaki fikir sahibi olabilmek için regresyon ve sınıflandırma tabanlı yaklaşımlar, makine öğrenimi ve yapay zeka yöntemlerini içeren *in silico* tahmin araçları kullanılmaktadır. Çoğu tahmin araçları, sadece mevcut ve onaylanmış ilaçların değil aynı zamanda taranmakta olan deneysel ilaçların entegre veri tabanlarını kombine halde kullanabilir (Kar & Leszczynski, 2020). Bu şekilde çalışan ticari ve açık erişimli *in silico* araçlar mevcuttur.

2.3. İlaç Hedefi Olarak G Protein-Bağlı Reseptörler

G protein-bağlı reseptörler (G protein-coupled receptor: GPCR) veya hücre membranındaki yapılarına ve topolojilerine bağlı olarak 7-transmembran reseptörleri, terapötik hedef olarak en dikkat çeken protein ailelerinden biridir. Depresyondan kansere, dolaşım sisteminden merkezi sinir sistemine kadar birçok sistem ve hastalık üzerinde kritik süreçlerde etkin olan en çeşitli membran reseptörleridir. GPCR'lerin endojen ligandları fotonlar, peptitler, karbonhidratlar, lipitler, aminler gibi çeşitlilik gösteren bileşiklerden oluşur.

Hücre membranınında bulunan ve temel görevi hücre dışı sinyali hücre içine iletip fizyolojik etkiye dönüştürmek olan GPCR'ler insan genomunda kodlanan en büyük protein ailesidir. İlaçlanabilirliği, birçok süreçte rol alması, farklı dokulardaki dağılımı ve özellikle ortosterik bağlanma bölgesinin hücrenin dışındaki kısımda olması da ilaç geliştirmeyi kolaylaştırır çünkü plazma membranını geçecek şekilde tasarlanmaları gerekmez. Ortosterik bağlanma bölgesinin boyutu, şekli ve amino asit dizilerinin elverişliliği buraya bağlanan ve GPCR'nin aktivitesini engelleyen (antagonistler) veya aktive eden (agonistler) küçük sentetik moleküllerin tasarlanması için de çok uygundur. Aynı zamanda onaylı ilaçların en büyük hedef ailesidir (Congreve vd., 2020; Hilger, Masureel, & Kobilka, 2018; Shoichet & Kobilka, 2012; Sriram & Insel, 2018; D. Yang vd., 2021). (Congreve vd., 2020; Hilger vd., 2018; Shoichet & Kobilka, 2012; Sriram & Insel, 2018; D. Yang vd., 2021). Şu anda onaylanan küçük moleküllü ilaçların yaklaşık %35'i birçok açıdan ideal ilaç hedefleri olarak kabul edilen GPCR'leri hedef alır, ancak yaklaşık 800 insan GPCR'sinin yalnızca %15'i şu anda hedeflenmektedir. GPCR'lerin kısıtlı hedeflenmesindeki etkenlerden en büyüğü, işlevsel rollerini tanımlamaya yardımcı olacak endojen ligandlardan yoksun olan 100'den fazla yetim GPCR olması ve birçoğunun sinyal mekanizmaları ile sağlıklı ve hastalıklı hücrelerde meydana getirdikleri hakkındaki bilgi eksikliğidir. Yeni tekniklerin, araçların ortaya çıkması ve çeşitli metodolojiler ile GPCR'ler hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak mümkün hale gelmektedir (Insel vd., 2019; Santos vd., 2017).

BÖLÜM 1'de bahsedildiği gibi GPCR'lerin iki adlandırılma sistemi vardır. Bu tez çalışması kapsamında amino asit dizi benzerliğine göre olan adlandırma sistemi esas alınarak GPCR'ler hakkındaki bilgiler verilmiştir. Buna göre adlandırılan ve hücre dışı bir N terminali, yedi transmembran alanı (TM) ve hücre içi C terminali ile aynı genel yapısal topoloji sahip olan GPCR'ler A Sınıfı (rodopsin benzeri), B Sınıfı (sekretin reseptör ailesi), C Sınıfı (metabotropik glutamat), D Sınıfı (mantar çiftleşme feromon reseptörleri), E Sınıfı (cAMP reseptörleri) ve F Sınıfı (frizzled/smoothened) olmak üzere 6 sınıfa ayrılır. GPCR'lerin sadece dört sınıfı (A, B, C ve F) insanlarda bulunur ve bu sınıflar da çeşitli alt sınıflara ayrılır.

A Sınıfı (rodopsin benzeri) en fazla sayıda GPCR içerir. En çeşitli sınıf olan A Sınıfı GPCR'ler insan fizyolojisinin neredeyse her alanında yer alır. 719 üyeden oluşan A Sınıfı reseptörleri çeşitli alt gruplara ayrılır: aminerjik, peptid, protein, lipid, melatonin,

nükleotid, steroid, alikarboksilik asit, duyusal ve yetim. Diğer sınıflarla karşılaştırıldığında en çok hedeflenen sınıf olan A'nın çeşitli veritabanlarında onaylanmış birçok ligandı bulunur. Migrenden tansiyona, glokomdan şizofreniye kadar birçok hastalıkta rol alan ve 500'den fazla ilacın hedefin olan A Sınıfı'nın büyük çoğunluğu yetim alt sınıfından oluşur (Foster vd., 2019; D. Yang vd., 2021). Bu tez kapsamında A Sınıfı'nın alt sınıf olan yetim GPCR'lerden olan GPR52 ile çalışılmıştır.

B Sınıfı, insanda iki alt sınıfa ayrılır: Sekretin (B1) ve Adhezyon (B2), bunlar sırasıyla 15 ve 33 üye içerir (Alexander vd., 2019). Büyük hücre dışı alana sahip olan Sekretin (B1) alt sınıfı sekretin ve glukagon reseptörleri gibi hormon reseptörlerini içerir. Hücre adhezyonu ve göçünden sorumlu olduğu gösterilen Adhezyon (B2) alt sınıf ise, yedi transmembrana bağlı, çeşitli yapısal ögeler içeren, uzun hücre dışı amino terminallere (N-terminal) sahip GPCR'lerden oluşur (Harmar, 2001; D. Yang vd., 2021). C Sınıfı, beş alt sınıfta olmak üzere 22 reseptör içerir. Bunlar, bir tane kalsiyum algılayıcı reseptör (CaSR), iki tane gama-aminobütirik asit (GABA) tip B reseptörü ($GABA_{B1}$ ve $GABA_{B2}$), 3 tane tat 1 reseptörü (TS1R1-3), 8 tane metabotropik glutamat reseptörü (mGluR1-8) ve 8 yetim GPCR'lerdir (Niswender & Conn, 2010; D. Yang vd., 2021). F Sınıfı, on Frizzled (FZD1-10) ve bir Smoothened (SMO) dahil olmak üzere toplam 11 reseptörden oluşan bir sınıftır (Schulte, 2010).

2.3.1. G Protein-Bağlı Reseptör 52

A Sınıfı'nın yetim (orphan GPCR : oGPCR) reseptör alt sınıfında bulunan G protein-bağlı reseptör 52 (G protein-coupled receptor 52: GPR52), 1.kromozomda q25.1 (1q25.1) lokasyonunda bulunur ve 361 amino asitlik diziden oluşur ("Gene symbol report | HUGO Gene Nomenclature Committee", t.y.; Sawzdargo vd., 1999). 3D deneysel yapısının 2020 yılında yayınlanmasıyla beraber GPR52 bu tez çalışmasının da hedefi olmuştur.

GPR52'nin hem agonist, hem antagonist, hem de invers agonist moleküller tarafından modüle edilebildiği gözlemlenmiştir. GPR52 agonistleri şizofreni (Nishiyama vd., 2017), bilişsel (kognitif) bozukluklar (Komatsu, 2015) , hiperaktivite (Setoh vd., 2014), çeşitli psikiyatrik rahatsızlıklar (Alavi, Shamsizadeh, Azhdari-Zarmehri, &

Roohbakhsh, 2018; Komatsu vd., 2014) ve beyin malformasyonu (Krutzke vd., 2016) gibi hastalıklar için terapötik etki potansiyeli taşımaktadır. Bununla beraber GPR52 antagonist ve invers agonistlerinin ise Huntington Hastalığı (Yao vd., 2015; Song vd., 2018) için ilaç adayları olabileceği düşünülmektedir. Birkaç vekil ligand rapor edilmiş olsa da henüz endojen ligandı tanımlanmamış GPR52, bu hastalıkların tedavisi için umut verici bir terapötik hedef olarak görülmektedir.

Lin ve arkadaşları tarafından 2020 yılında (Lin vd., 2020) insan GPR52'nin üç farklı halde, dört yüksek çözünürlüklü yapıları sunulmuştur. Bunlardan iki tanesi ligandsız yapı, bir tanesi G_s-bağlı kendi kendine aktive edebilen yapı ve potansiyel bir allosterik ligand bağlı olan yapıdır. GPR52'nin ligandsız (apo) halleri olan GPR52-Fla-apo ve GPR52-Rub-apo (sırasıyla PDB kodları: 6LI1 ve 6LI2) farklı hücre içi döngü 3 (ICL3) füzyon-protein ortaklarından rubredoksin (Rub) ve flavodoksin (Fla) ile tasarlanmış ve kristalize edilmiştir. Bu değişiklikler proteinin verimini ve stabilitesini etkileyebilir. GPR52- Fla-apo ve GPR52- Rub -apo yapılarının, transmembran bölgedeki genel konformasyonlarında, sarmal demetlerin Cα atomları için yapılan kök-ortalama-kare sapması (RMSD: Root-Mean-Square Deviation) hesaplamasıyla yapıların çok benzer olduğunu bulunmuştur. GPR52-apo (GPR52- Fla-apo ve GPR52- Rub -apo) yapılarının incelenmesi sonucunda bilinen diğer tüm GPCR'lerde olmayan bir özellik Lin ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bu özellik, ufak bir modül halinde katlanan ve GPR52'nin ortosterik bağlanma bölgesini işgal eden, aynı zamanda konfigürasyonunu korumak için transmembran helikslerle etkileşimler kuran 22 rezidülük ECL2 (Hücre Dışı Döngü 2)'ye sahip olmasıdır. Yapısal olarak ECL2 iki bölüme ayrılabilir. İlk bölüm 179-181 ve 191-200 rezidülerini kapsar ve bu rezidüler birlikte reseptörün üst kısmından bağlanma bölgesini örtmek için bir kapak işlevi görür. İkinci bölüm ise ECL2'nin ortasındadır (182-190 rezidüleri) ve 3_{10} sarmalı ile genişletilmiş bir konformasyon ile ortosterik bağlanma bölgesindeki büyük hidrofobik boşluğa sığar ve sarmalın çekirdeğindeki bir rezidü grubu ile çevrilidir. Bu rezidüler şu anda bilinen neredeyse tüm A Sınıfı GPCR yapılarında topolojik olarak eşdeğerdir ve ligandlarla bağlanmasına yardımcı olur. Ayrıca kapağın konformasyonunun değişmemesini sağlayan ve dolayısıyla ikinci ECL2 bölümünü bağlanma bölgesinde tutan bir disülfit bağı vardır (Lin vd., 2020). Bu disülfit bağı iyi korunmuştur ve diğer A Sınıfı GPCR'ların ortosterik bağlanma bölgesindeki farklı agonistlerin stabilizasyonunda önemli bir rol oynar (Venkatakrishnan

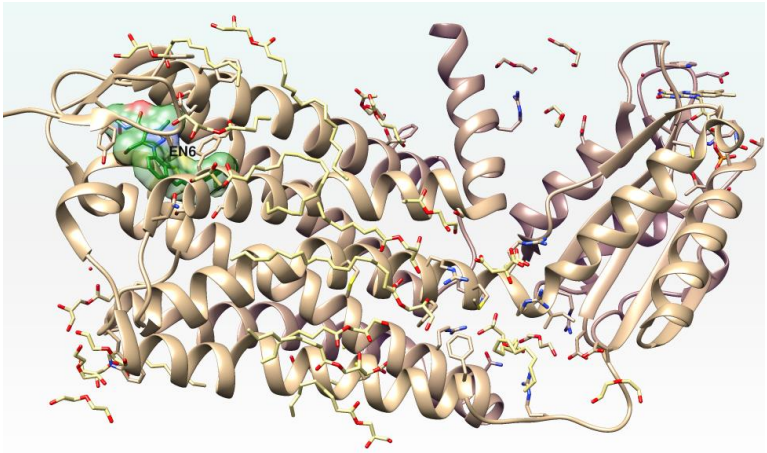
vd., 2013). Bu yapısal paralellik, ECL2'nin ikinci bölümünün ortosterik bağlanma bölgesindeki reseptörü aktive etmek için yerleşik bir 'agonist' olarak davranabileceği düşüncesinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Lin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar ile ECL2'nin GPR52'nin içsel aktivitesinde kilit bir rolü olduğu hipotezi doğrulanmıştır (Lin vd., 2020). ECL2 tarafından neredeyse tamamen kaplanan ortosterik bağlanma cebi yeni bir ligand için herhangi bir alan bırakmadığı gözlemlenmiş ve bunun sonucunda da vekil bir c17 molekülü ile birlikte kristalize ederek bir GPR52 agonistinin bağlanma modu araştırılmıştır. GPR52-c17 kompleksinde, N-terminal ucu ve ECL2'nin ligandı bir tarafa doğru ittiği ve kanonik ortosterik bağlanma bölgesinden ayırmak için 'yan cep' olarak adlandırılan yeni bir ligand cebinin oluşumunda katkıda bulunduğu ortaya çıkmıştır. Yan cepteki alanın ECL2 ve TM7 tarafından büyük ölçüde sınırlandırıldığı ve en dar noktada sadece 3.7 Å genişliğinde olduğu tespit edilmiştir. GPR52 ve c17 arasındaki etkileşimler; hidrojen bağları, hidrofobik temaslar ve aromatik istiflenmedir. Ligand ve reseptörün ana zincir atomları arasında dört çift hidrojen bağı vardır: Ile189 ve Glu191 ile c17'nin üst hidroksil grubu; Asp188 ile orta hidroksil grubu, ve Cys40 ile amid grubu. Ligand, hidrofobik rezidüler olan Tyr34, Val39, Ile47, Leu101, Phe117 ve Thr303 ile temas halinde olarak yan cepte daha da stabilize edilir. Özellikle, c17'nin aromatik halka sistemi cebin alt kısmında Phe300 ile π-π (pi-pi) etkileşimleri oluşturur. Moleküler yerleştirme analizi bildirilen tüm GPR52 agonistlerinin, farklı kimyasal iskelelere sahip olmalarına rağmen, muhtemelen yan cebi benzer bir şekilde işgal ettiği düşünülmektedir (Lin vd., 2020; Nakahata vd., 2018; Nishiyama vd., 2017; Setoh vd., 2014) .

BÖLÜM 3

MATERYAL VE SİMÜLASYON DETAYLARI

3.1. Materyallerin Hazırlığı

Bu tez kapsamında hedef protein olarak A Sınıfı yetim GPCR olan GPR52'nin PDB veritabanındaki 6LI0 kodlu kristal yapısı kullanılmıştır (bkz Şekil 3.1) . Ligandlar için ise öncelikle GPR52'nin 6LI0 ile birlikte kristalize edilmiş olan agonisti c17 (PDB: EN6) ile GPR52'nin bilinen agonistleri ve insan A Sınıfı GPCR'lerin tüm ligandları kullanılmıştır. Bu çalışmanın geri kalanında GPR52 kristal yapısında bulunan ligand EN6 olarak isimlendirilecektir.



Şekil 3.1. GPR52'nin 6LI0 kodlu yapısı.

3.1.1. GPR52'nin Bağlanma Bölgesi Analizi

RCSB Protein Data Bank veri tabanından (Berman vd., 2000) 6LI0 PDB kodlu GPR52'nin kristal yapısı indirilmiştir. 6LI0 yapısının agonisti olan EN6'nın bağlanma bölgesindeki konfromasyonu esas alınarak Biovia Discovery Studio Visualizer (DSV) 2020 ile bağlanma bölgesinin analizi gerçekleştirilmiştir ("BIOVIA Discovery Studio - BIOVIA - Dassault Systèmes®", t.y.).

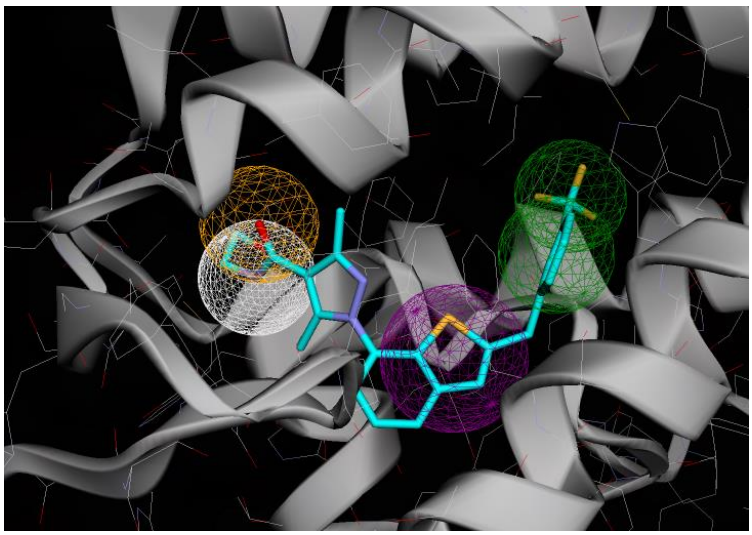
3.1.2. GPR52'nin Moleküler Yerleştirme Öncesi Hazırlığı

6LI0 yapısı, UCSF Chimera (Pettersen vd., 2004) programı kullanılarak su moleküllerinden ve diğer ligandlardan temizlenmiş ve pdb formatında kaydedilmiştir. Daha sonra MGL Tools (AutoDockTools-1.5.6) (Morris vd., 2009) programı ile polar olmayan tüm hidrojenler ve reseptörün tüm atomlarına Kollman yükleri (Singh & Kollman, 1984) eklenmiş ve reseptör dosyası moleküler yerleştirme aşaması için pdbqt formatında kaydedilmiştir.

3.1.3. Farmakofor Modeli Oluşturma

6LI0 PDB kodlu yapıdaki bağlanma bölgesi ve bağlı agonist ligand (EN6) verileri yardımıyla, farmakofor modelinin oluşturulması için Pharmit platformu (Sunseri & Koes, 2016) (https://pharmit.csb.pitt.edu/) kullanılmıştır. Pharmit platformu, bir hedef moleküle (tipik olarak bir protein reseptörü veya enzim) bağlanabilecek molekülleri tanımlamak amacıyla, başka bir küçük molekül ile yapısal ve kimyasal benzerliklerine dayalı olarak farmakofor modelleri oluşturulması ve farmakofor taraması yapılmasına olanak tanır. Farmakofor modeli, molekülün üç boyutlu yapısını kapsayan molekül özelliklerini gösterir. Pharmit platformu ile, reseptör (GPR52) ve ligand (EN6) arasındaki etkileşimler belirlenerek olası tüm farmakoforik özellikleri listelenmiştir. Farmakoforlar, bir ligandın hedef proteine optimum şekilde bağlanabilmesi için sahip olması gereken yapısal, kimyasal ve fiziksel özelliklerden tanımlanır. 6LI0 yapısında reseptör ve ligand arasında π-π (pi-pi) interaksiyonları, hidrojen bağlar ve hidrofobik etkileşimlerle desteklenen pek

çok ilişki bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında, Pharmit tarafından listelenen farmakoforik özelliklerin kombinasyonları kullanılarak farklı farmakofor modelleri oluşturulmuştur. Farmakofor model, proteinle uyumlu olmayan ligandları ayırt edebilecek kadar seçici, fakat ligand çeşitliliğini kısıtlamayacak kadar esnek olarak ayarlanmıştır. Tüm bu kriterleri gerçekleştirmek için birden fazla farmakofor model oluşturulmuş, oluşturulan farmakofor modellerinin testi için bilinen GPR52 agonistleri kontrol kümesi olarak kullanılmıştır. Oluşturulan farklı farmakofor modelleri ile bilinen GPR52 agonistleri taranmış ve tüm kontrol moleküllerini bulan model küçük molekül kütüphanesinin taranması için kullanılmıştır. Tüm kontrol kümesi agonistlerini bulan ve bu çalışmada kullanılan farmakofor modeli Şekil 3.2'de verilmiştir. Bu modelde GPR52 bağlanma bölgesindeki EN6 ve proteinin bilinen agonistlerinden yola çıkılarak: EN6'nın aromatik halka sistemi ile Phe300 ile π-π etkileşimleri ifade eden 1 adet aromatik halka özelliği, ligand ile Ile47, Leu101, Phe117 ve Thr303 rezidüleri arasındaki hidrofobik etkileşimleri ifade eden 2 adet hidrofobik özellik, Glu191 ile EN6'nın üst hidroksil grubu arasında 1 adet hidrojen bağ donörü özellik ve Asp188 ile EN6 orta hidroksil grubu arasında 1 adet hidrojen bağı alıcısı özellik belirlenmiştir. Farmakofor ayrıca yalnızca molekül ağırlığı 600'den ve dönebilen bağ sayısı 15'ten küçük molekülleri tarayacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.2. GPR52 için farmakofor modeli. Yeşil daireler hidrofobik kısımları, mor daire aromatik halkayı, turuncu daire hidrojen bağ alıcısını ve beyaz daire ise hidrojen bağ donörünü temsil etmektedir.

3.1.4. Küçük Molekül Kütüphanesinin Hazırlığı

İlk olarak ilaç benzeri özelliklere sahip biyoaktif molekülleri içeren bir açık veri tabanı olan CHEMBL (Gaulton vd., 2012) (https://www.ebi.ac.uk/ChEMBL/) veri tabanı kullanılarak GPR52 için deneysel olarak bilinen 202 adet (19/04/2022 tarihinde) agonist, antagonist ve invers agonist molekülleri belirlenmiş, ardından tekrar edenler ve agonist olmayan moleküller çıkarıldıktan sonra kalan 85 adet moleküller kontrol kütüphanesi olarak kullanılmıştır.

Bir sonraki aşama için taranacak küçük molekül kütüphanesini oluşturmak amacıyla GPCR'lerin en büyük veri tabanı olan GPCRdb (https://gpcrdb.org/) (Kolakowski, 1994; Kooistra vd., 2020) veri tabanından insan A sınıfı GPCR'lerin ligandları toplanmıştır. A sınıfı GPCR ligandlarının seçilme sebebi GPR52'nin A sınıfı bir yetim GPCR olmasından kaynaklanmaktadır. GPCRdb'den alınan ligandlar kütüphane oluşturabilmek için çeşitli adımlardan geçirilmiştir. Öncelikle GPCRdb'den bir boyutlu SMILES (Weininger, 1988) formatında 163.197 adet (23/03/2022 tarihinde) molekül toplanmıştır. Toplanan ligandlardan birden fazla sayıda bulunanlar ve GPR52'nin agonistleri çıkarıldığında 107.793 adet molekül kalmıştır.

Toplanan moleküllerden kütüphane oluşturma işlemi ise online ve ücretsiz Pharmit platformu kullanılarak yapılmıştır. Pharmit platformu, farmakofor modelleri oluşturma ve farmakofor taraması yapmasının yanı sıra tarama yapılacak küçük molekül kütüphanelerinin oluşturulması ve düzenlenmesine de olanak sağlamaktadır. Kütüphane oluşturulması amacıyla GPCRdb'den toplanan moleküller Pharmit platformuna SMILES formatında yüklenmiştir. Pharmit ile SMILES formatında yüklenen moleküller için OpenBabel (O'Boyle vd., 2011) yardımıyla protonasyon durumlarının belirlenmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir, ardından RDKit ("RDKit: Open-source cheminformatics. https://www.rdkit.org", t.y.) ve UFF (Rappe, Casewit, Colwell, Goddard, & Skiff, 1992) güç alanı kullanılarak her bir molekül için on taneye kadar konformer oluşturulmuştur.

Daha sonra Pharmit platformuna yüklenen bu agonist ve küçük molekül kütüphaneleri oluşturulan farmakofor modeline göre taranmıştır. Tarama sonucunda elde edilen ligandlara minimizasyon işlemi uygulama için *minimize*, birden fazla konformasyona sahip olan ligandların sadece bir konformasyonunu dahil etmek için *single conformer* seçenekleri seçilerek ve platformda kullanılan AutoDock Vina skorlama

fonksiyonu ile skorları hesaplanan ligandlar için *max score* seçeneği **0** olarak belirlenerek tekrar filtreleme işlemi uygulanmıştır. Bu tarama işlemleri sonucunda agonist kütüphanesinden 77, oluşturulan GPCRdb kaynaklı küçük molekül kütüphanesinden ise 10.638 adet molekül kalmıştır.

Farmakofor taraması sonucu filtrelenmiş bu kütüphaneler sdf (Dalby vd., 1992) formatında indirilmiş ve pek çok kimyasal dosya formatı arasında çevirim yapmaya yardımcı olan; moleküler modelleme, ilaç tasarımı ve biyokimya projelerinde sıklıkla kullanılan açık kaynaklı ve ücretsiz bir program olan OpenBabel (O'Boyle vd., 2011) kullanılarak moleküler yerleştirme aşaması için gerekli olan formata çevrilmiştir. Kütüphane hazırlığının son aşaması olarak hidrojen atomlarının eklenmesi, yüklerin belirlenmesi ve MMFF94 kuvvet alanı (Halgren, 1996) kullanılarak enerji minimizasyonu işleminden geçirilen moleküller pdbqt formatına çevrilerek kaydedilmiştir. Ayrıca OpenBabel ile yapılan tüm işlemler GPR52'nin 6LI0 yapısı ile kristalize edilmiş olan EN6 içinde uygulanmıştır.

3.2. GPR52 İçin Moleküler Yerleştirme Çalışması

Bu çalışmada rijid protein-esnek ligand moleküler yerleştirme işlemleri yapılmıştır. Öncelikle 6LI0 yapısındaki GPR52 ile birlikte kristalize edilmiş EN6 agonistinin proteine yeniden moleküler yerleştirme işlemi AutoDock Vina programı ile gerçekleştirilmiştir. Yeniden moleküler yerleştirme adımının yapılmasının sebebi moleküler yerleştirme sonucunda elde edilen bağlanma modları ile orijinal agonistin bağlanma modunun karşılaştırılarak moleküler yerleştirme prosedürünün doğrulanmasıdır. Bu adımın amacı orijinal bağlanma moduna ulaşılıp ulaşılamayacağının tespiti ve moleküler yerleştirme çalışmasında kullanılacak parametrelerin belirlenmesidir.

EN6 ile yapılan yeniden moleküler yerleştirme simülasyonunda kristal yapıdaki orijinal bağlanma moduna ulaşılmıştır. Bu sonuca ulaşılmayı sağlayan moleküler yerleştirme için oluşturulan arama kutusunun (grid) boyutu 30 Å x 30 Å x 30 Å olarak belirlenmiştir. Bağlanma bölgesi analizi sonucu arama kutusunun konumu center_x = 33.960, center_y = 71.193, center_z = 66.606 olacak şekilde ayarlanmıştır. Yapılan

taramanın hassasiyetini ifade eden exhaustiveness (varsayılan değeri=8) ve ligand başına bulunan bağlanma modlarının sayısı belirleyen *num*_modes (varsayılan değeri=9) bağlanma modlarının sayısı parametreleri ise sırasıyla 20 ve 10 olarak ayarlanmıştır.

Daha sonra bilinen GPR52 agonistlerine ve hazırlanan küçük molekül kütüphanesindeki ligandlara, EN6 için belirlenmiş olan moleküler yerleştirme parametreleri kullanılarak AutoDock Vina programı ile moleküler yerleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bilinen GPR52 agonistlerin ve 6LI0 yapısındaki GPR52 ile birlikte kristalize edilmiş EN6 agonistinin moleküler yerleştirme skorları belirlenmiştir. GPR52 agonistlerin ve EN6'nın skorları küçük molekül kütüphanesindeki ligandların sıralanmasında eşik değeri olarak kullanılmıştır. Tüm moleküler yerleştirme işlemlerinde her bir ligand GPR52 bağlanma bölgesine yerleştirilmiş ve rijid protein-esnek ligand yaklaşımı ile ligand başına on farklı konformasyon (bağlanma modu) oluşturulmuştur. Autodock Vina'nın skorlama fonksiyonu kullanılarak bu konformasyonlar skorlanmış ve her bir ligand için sadece en iyi bağlanma afinitesi skorunu veren konformasyon tespit edilmiştir. Bu konformasyonlar ligandların sonraki adımlarda kullanılacak konformasyonları olarak seçilmiştir.

3.3. Konsensüs Skorlama

En iyi bağlanma afinitesi skoru sonucu veren ligandlar Autodock Vina skorlarına göre sıralanmıştır. Buna ek olarak iki farklı skorlama fonksiyonu NNScore2 ve KDEEP kullanılmıştır. Kullanılan üç farklı skorlama fonksiyonu konsensüs skorlama yardımıyla ortak bir değere dönüştürülmüştür. Her skorlama fonksiyonu kendine özgü sonuçlar vermektedir. Örneğin AutoDock Vina ve KDEEP bağlanma afinitesi sonucunu olarak çıkan iyi skorları negatif değer ile ifade ederken, NNScore2 ise iyi skorları pozitif değer ile ifade etmektedir. Bu yüzden karışıklıkların önüne geçmek ve ligand seçiminde olası aday ligandları gözden kaçırmamak için önce tüm değerlere önce 0 – 1 arasında (0 kötü, 1 iyi değer) olacak şekilde normalizasyon işlemi uygulanmıştır (Denklem 3.1) (Raju, Lakshmi, Jain, Kalidindi, & Padma, 2020).

$$\acute{X} = \frac{[(X) - (X_{minimum})]}{[(X_{maksimum}) - (X_{minimum})]} \quad (3.\ 1)$$

Denklem 3.1'de her bir bağlanma afinitesi değeri X, en iyi değer $X_{maksimum}$, en kötü değer $X_{minimum}$ ve normalizasyon sonucu ise Ẋ ile ifade edilmiştir.

Daha sonra tüm ligandların her bir skorlama fonksiyonuna göre normalizasyon sonucu kullanılarak ligandların normalizasyon ortalaması ($\acute{X}_{Total}$) hesaplanmıştır (Denklem 3.2).

$$\acute{X}_{Total} = \frac{[(\acute{X}_{AutoDock\ Vina}) + (\acute{X}_{KDEEP}) + (\acute{X}_{NNScore})]}{3} \quad (3.\ 2)$$

Denklem 3.2'de ligandların normalizasyon sonucunda skorlama fonksiyonlarına göre verdikleri değerler $\acute{X}_{AutoDockVina}$, $\acute{X}_{KDEEP}$ ve $\acute{X}_{NNScore}$ olarak değerlendirilmiş ve 3 değerin ortalaması $\acute{X}_{Total}$ belirleyicisi olarak belirtilmiştir.

Bunlara ek olarak ligandların her bir skorlama fonksiyonundaki sonuçları kendi içerisinde en iyi sonuçtan en kötü sonuca göre sıralanmış ve sıralama değerlerinin ortalamaları alınmıştır. Bu değerlerin sonucu *Sıralama Ortalama* belirleyicisi olarak kullanılmıştır (bkz. Denklem 3.3).

$$\text{Sıralama Ortalama} = \frac{[(A_{AutoDock\ Vina}) + (A_{KDEEP}) + (A_{NN\ Score})]}{3} \quad (3.\ 3)$$

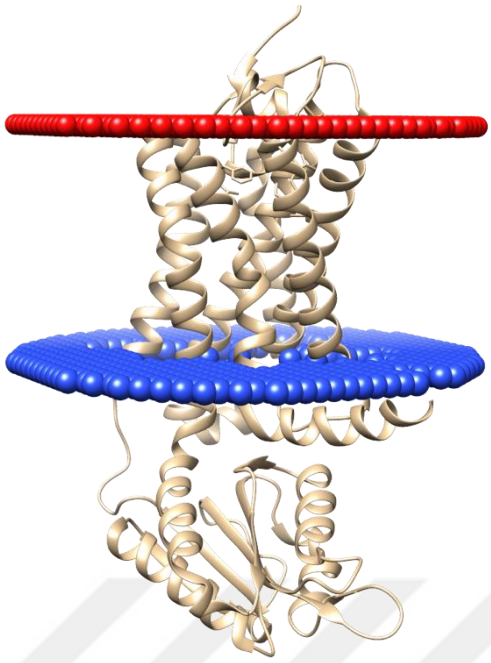
Denklem 3.3'teki 'A' değeri her bir ligandın skorlama fonksiyonundaki sıralamasını temsil etmektedir.

Bu sıralamalardan ilk 100 değer içinde olanlara 1, olmayan değerlere 0 puan atanmıştır. Bu değerlerin her bir skorlama fonksiyonu için verdiği sonuçlar toplanarak *Total 100* belirleyicisi oluşturulmuştur. *Total 100* belirleyicisinde, bir ligand her skorlama fonksiyonu için sıralama yapıldığında ilk 100 içerisinde ise 3 puan, iki skorlama fonksiyonu için ilk 100 içerisinde ise 2 puan, yalnızca bir skorlama fonksiyonunda için ilk 100 içerisinde ise 1 puan ve hiçbiri için ilk 100 değer içerisinde değil ise 0 puan olacak şekilde puanlanmıştır.

3.4. Moleküler Dinamik Simülasyonlar

Moleküler yerleştirme algoritmaları hızlı bir şekilde sonucu tahmin etmesiyle ilgi çekici bir yöntem olarak sıklıkla kullanılır. Fakat moleküler yerleştirme algoritmalarının ligand kadar protein esnekliğinin olmaması veya zayıf olması, su moleküllerinin etkisinin açıkça incelenememesi gibi bazı kısıtlayıcılıkları vardır. Bu tez çalışmasının hedef proteini olan GPR52 için proteinin bulunduğu membranın da moleküler yerleştirme algoritmaları içinde bir gösterimi mevcut değildir. Moleküler Dinamik (MD) simülasyonlar bu kısıtlamaların önüne geçebilen fakat moleküler yerleştirme algoritmalarına göre daha pahalı ve zaman alan bir süreçtir. Bu nedenle moleküler yerleştirme algoritmaları ile büyük molekül kütüphanelerinin taranması ve yerleştirme işleminin gerçekleştirilmesinden sonra protein, ligand ve protein-ligand kompleksi hakkında daha ayrıntılı sonuçlar elde etmek için MD simülasyonları da kullanılabilir (Alonso, Bliznyuk, & Gready, 2006). Bu tez çalışmasında moleküler yerleştirme ve MD simülasyonları kombine şekilde kullanılmıştır.

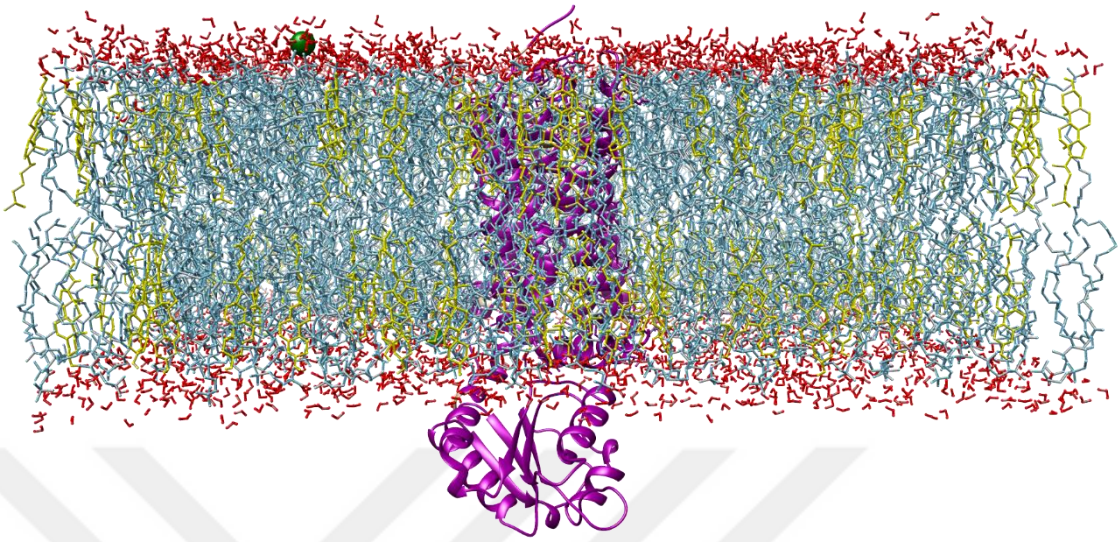
Moleküler yerleştirme işlemi sonrasında, MD simülasyonlarına başlamadan önce konsensüs skorlama sonucunda oluşturulan belirleyicilere göre ligandlar belirlenmiştir. Seçilen her bir ligand-protein kompleksi MD simülasyonlarının başlangıç yapısı olacak şekilde hazırlanmıştır. Ligand-protein kompleksleri pdb formatında kaydedilmiş ve pdb dosyaları OPM (Orientations of Proteins in Membranes) (M. A. Lomize, Lomize, Pogozheva, & Mosberg, 2006; “OPM”, t.y.) veri tabanında bulunan PPM 3.0 (A. L. Lomize, Todd, & Pogozheva, 2022) aracı kullanılarak proteinlerin membranlarda konumlandırılması işlemine tabii tutulmuştur. Protein-ligand komplekslerinin membrandaki yerleşiminin çıktısının bir örnek gösterimi Şekil 3.3’te verilmiştir.



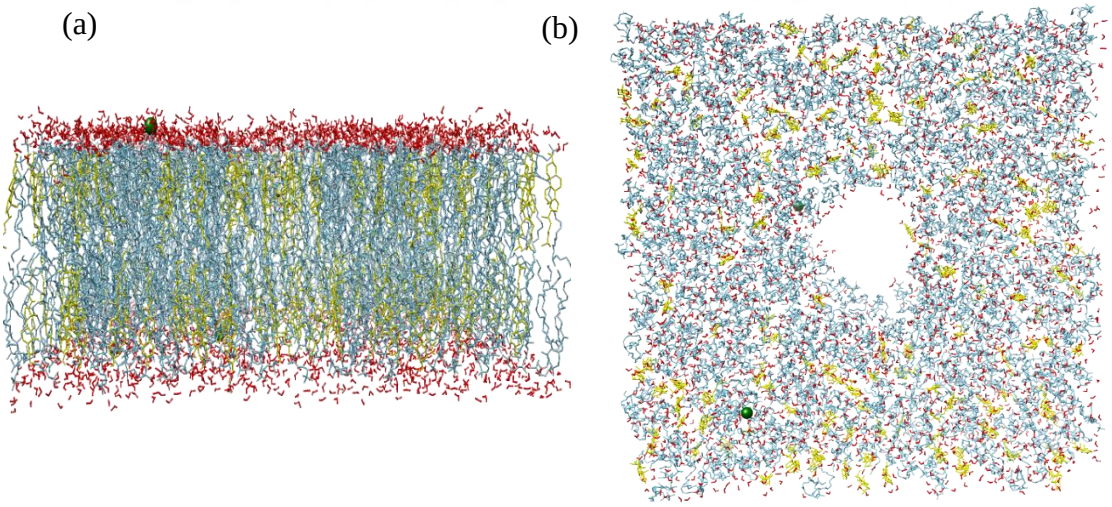
Şekil 3.3. OPM ile hazırlanan protein-ligand kompleksinin membranda konumlandırılmasının örnek gösterimi. Şekilde kırmızı ile belirtilmiş olan kısım membranın üst bölgesini, mavi ile belirtilmiş olan kısım membranın alt bölgesini temsil etmektedir.

OPM ile elde edilen membran içine yerleştirilmiş ligand-GPR52 komplekslerine ait pdb çıktıları CHARMM-GUI'deki (Jo, Kim, Iyer, & Im, 2008) modüllerden biri olan ve birçok MD programı içinde başlangıç yapı ve parametre dosyaları çıktısı veren Membrane Builder (Jo, Kim, & Im, 2007) ile MD simülasyonlarına hazır hale getirilmiştir. Öncelikle moleküler yerleştirme çıktısı protein-ligand kompleksleri Membrane Builder ile dikdörtgen bir simülasyon kutusu içerisine yerleştirilmiştir. Sistem aşağı ve yukarı lipid membranın her bir yarısı için sırasıyla 230 adet POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin) ve 70-72 adet CHOL (Kolesterol) lipidleri, solvent olarak TIP3P su modeli (Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey, & Klein, 1983) ile oluşturulmuştur. İyon konsantrasyonu için 0.15M NaCl (Sodyum klorür) eklenmiştir. Oluşturulan sistemin bir örnek gösterimi Şekil 3.4'te verilmiştir. Şekil 3.5'te ise membranın proteinsiz ve üstten görünümü görülebilir. Proteinler, lipitler ve ilaç benzeri ligandlar için parametreleri kapsamlı olarak optimize edilmiş ve doğrulanmış olan CHARMM36m (Huang vd., 2017) kuvvet alanı ve 310 Kelvin (K), NPT (sabit parçacık sayısı, basınç ve sıcaklık) toplulukta (ensemble) dengeleme opsiyonları ile hazırlanmış

ve GROMACS çıktısı olarak alınmıştır. Tüm moleküler dinamik simülasyonlar GROMACS 2022.5 (*GROMACS 2022.5 Manual*, t.y.) paketi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. CHARMM-GUI ile oluşturulan sistemin örnek gösterimi. Şekilde POPC molekülleri açık mavi, Kolesterol molekülleri sarı, TIP3P suları kırmızı ve iyonlar Sodyum (Na) ve Klor (Cl) koyu yeşil, ligand turkuaz ve protein mor renk ile belirtilmiştir.



Şekil 3.5. CHARMM-GUI ile oluşturulan membranın proteinsiz ve üstten görünümü. Membranın proteinsiz görünümü (a) ve üstten görünümü (b) verilmiştir.

CHARMM-GUI ile elde edilen başlangıç yapılarının önce en dik azalan (steepest-descent) algoritması kullanılarak enerji minimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Protein

iskelet (backbone) ve fonksiyonel grupları (side chain) kısımları, lipid baş gruplarının P (fosfor) atomları ve POPC lipid moleküllerinde kısıtlamalar uygulanmıştır.

Bu kısıtlamalar, cis-izomeri korumak için tipik olarak dihedral açı gibi çeşitli pozisyonel ve dihedral kısıtlamalardır ("A Beginner's Guide to Perform Molecular Dynamics Simulation of a Membrane Protein using GROMACS — GROMACS tutorials https://tutorials.gromacs.org documentation", t.y.). Kısıtlamalar minimizasyon ve dengeleme aşamalarında uygulanmış ve kuvvet sabitleri kademeli olarak azaltılmıştır. Üretim aşamasında ise herhangi bir kısıtlama uygulanmamıştır. Dengeleme aşamalarında, periyodik sınır şartlarında (Periodic Boundary Conditions, PBC), 310 K ve 1 bar'da Berendsen (Berendsen, Postma, van Gunsteren, DiNola, & Haak, 1984) termostatı kullanılmıştır. 2 kez NVT (sabit parçacık sayısı, hacim ve sıcaklık) topluluğu ve basınç bağlantısı yarı izotopik olacak şekilde Berendsen-barostatı kullanılarak 4 kez NPT topluluğu dengeleme işlemi yapılmıştır. Her bir aşaması 0.5 nanosaniye (ns) süren toplam 3 ns'lik dengeleme işlemi yapılmıştır. Bu aşamalarının sonucunda elde edilen yapılar için basınç Parrinello-Rahman (Parrinello & Rahman, 1981) barostatı kullanılarak 1 bar'da, sıcaklık ise Nosé-Hoover (Evans & Holian, 1985) termostatı kullanılarak 310 K'de sabit olacak şekilde 100 ns süren üretim aşaması gerçekleştirilmiştir. Kesim mesafesi (cut-off) şeması olarak Verlet integratorü (Grubmüller, Heller, Windemuth, & Schulten, 1991), hem Coulomb hem de van der Waals etkileşimlerinde 1.2 nanometre (nm) kesim mesafesinden itibaren uzak erimli (long-range) etkileşimleri ifade etmek için Particle Mesh Ewald (PME) algoritması (Essmann vd., 1995) uygulanmıştır. Bu işlemlere ek olarak tüm aşamalarda 5 pikosaniyelik bir zaman sabiti bağlantısı, 4.51×10^{-5} bar^{-1}'lık bir sıkıştırılabilirlik ve 1 bar'lık bir referans basınç kullanılmıştır. LINCS (Hess, 2008; Hess, Bekker, Berendsen, & Fraaije, 1997) algoritmaları ile hidrojen bağları sınırlandırılmıştır. Yörüngeler bağlanma enerjisi hesaplamalarında kullanılmak üzere 2 femtosaniye aralıklarla kaydedilmiştir.

3.5. Bağlanma Serbest Enerjisi Hesaplama

Seçilen ligandlar ve orijinal ligand EN6 için bağlanma serbest enerjisi hesaplamaları gmx_MMPBSA programı (Valdés-Tresanco vd., 2021) ile Moleküler Mekanik/Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı (MM/PBSA) yöntemi (Massova & Kollman,

2000) kullanılarak yapılmıştır. Bağlanma serbest enerjisi hesaplamalarına başlanmadan önce RMSD analizi yapılmış ve komplekslerin en dengede olduğu zaman aralıkları arasında hesaplama yapılmıştır. MM/PBSA yönteminin nihai amacı çözeltideki bir protein-ligand kompleksinin bağlı durum (bound state) ve bağlanmamış durumu (unbound state) arasındaki enerji farkını bularak mutlak bağlanma serbest enerjisini hesaplamaktır. Doğruluk ve işlemsel açıdan hızlılık arasında bir denge kuran MM/PBSA, bağlanma serbest enerjisi hesaplama konusunda en popüler yöntemlerden biri olarak öne çıkmaktadır. Ligand ve protein komplekslerinin bağlanma enerjilerinin hesaplanması için kullanılacak olan gmx_MMPBSA, GROMACS moleküler dinamik yörünge çıktılarına MM/PBSA yöntemini uygular. MM/PBSA yöntemini çeşitli GPCR yapılarına uygulayan ve moleküler yerleştirme sonuçlarına göre daha başarılı sonuçlar elde edilen çalışmalardan (Yau, Emtage, Chan, Doughty, & Loo, 2019; Yau, Emtage, & Loo, 2020) yola çıkarak gmx_MMPBSA programında iç (interior) dielektrik sabiti (indi) parametresi için 4, dış (exterior) dielektrik sabiti (exdi) parametresi için ise 80 değerleri kullanılmıştır. gmx_MMPBSA sisteme örtülü (implicit) membran eklenmesine de izin vermektedir, membran için dielektrik sabitinin değeri ise program tarafından önerilen değer olan 7 olarak belirlenmiştir. Ayrıca CHARMM-GUI çıktılarında halojen atomlarına bağlı pozitif yüklü sanal bir parçacık olan lone pair hidrojenler (LPH) bulunmaktadır. Bu parçacıkların gmx_MMPBSA ile yapılan hesaplamaların hatayla sonuçlanmasına neden olacağı belirtilmiştir. Bu yüzden hesaplamalar sırasında programın gereği olarak LPH parçacıklarını içermeyecek şekilde dosyalar düzenlenmiştir. Parametre dosyası hazırlığında diğer parametrelere ek olarak Etkileşim Entropisi (Interaction Entropy) yöntemi eklenerek bağlanma serbest enerjisi hesaplamalarına dahil edilmiştir.

gmx_MMPBSA programına ek olarak bağlanma enerjisi tahmini için gmx_MMPBSA ile hesaplama aşamasının son zaman adımındaki (98. ns'deki) yapılar PROtein binDIng enerGY (PRODIGY) web sunucusunun protein-ligand komplekslerindeki afinitenin tahminini sağlayan PRODIGY-LIG ("Prodigy Webserver", t.y.; Vangone vd., 2019) aracı ile bağlanma enerjisi hesaplama işlemi yapılmıştır. PRODIGY ile hesaplama işlemi moleküler yerleştirme sonrası yapılan skorlama sonucunda konsensüs skorlama eşik değerini geçen ligandlar, bilinen agonist ve orijinal ligand olan EN6'ya uygulanmıştır.

gmx_MMPBSA sonucunda EN6 için hesaplanan bağlanma enerjisi değeri eşik değeri olarak belirlenmiş ve eşik değerinden daha iyi sonuç veren moleküllerin bir sonraki aşamada biyo-uygunluk analizleri yapılarak moleküllerin ilaç olarak kullanılabilirlik araştırmaları yapılmıştır.

3.6. ADME-T Analizi

Bu tez çalışmasında bağlanma serbest enerjisi hesaplamaları sonucunda seçilen küçük moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinin tahmini SwissADME (http://www.swissadme.ch/) (Daina, Michielin, & Zoete, 2017) servisi kullanılarak yapılmıştır. SwissADME, İsviçre Biyoenformatik Enstitüsü tarafından geliştirilen ve küçük moleküllerin ADME (absorbsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım) parametrelerini ve ilaca benzerliklerini değerlendiren ücretsiz bir çevrimiçi araçtır. Toksisite özelliklerine bakmak için ise admetSAR 2.0 (http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2/) (H. Yang vd., 2019) aracı kullanılmıştır.

Bu adımda optimal özellikler gösteren ligandların ve ileri *in silico* yöntemlerle geliştirilebilecek türevlerinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için aday olabileceği veya yeni ilaç keşfi ve/veya ilaç geliştirme çalışmalarında öncü ilaç molekül adayları olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

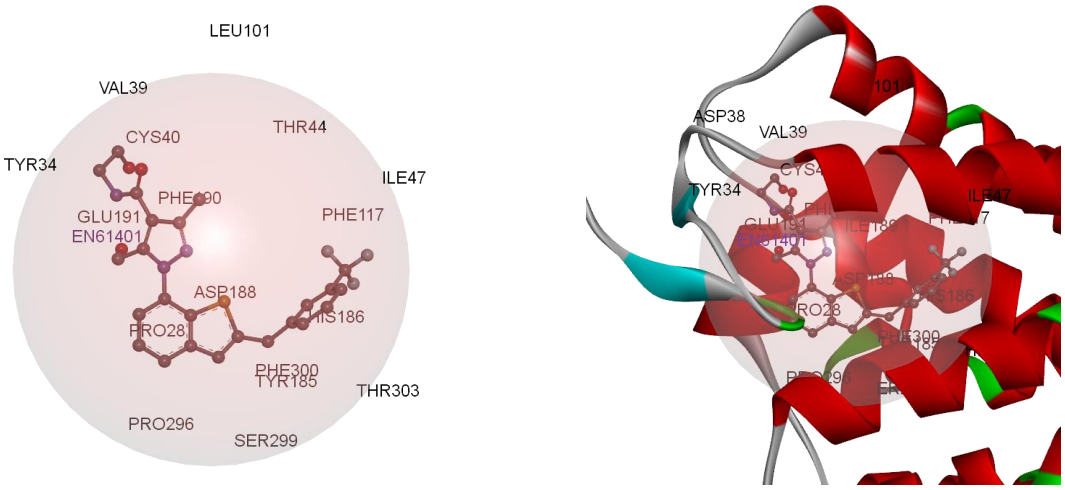
BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. GPR52 Bağlanma Bölgesi Analiz ve Farmakofor Araması Sonuçları

6LI0 yapısının agonisti olan EN6'nın bağlanma bölgesi esas alınarak DSV ile bağlanma kutusunun konumu center_x = 33.960, center_y = 71.193, center_z = 66.606 olarak tespit edilmiştir. Bağlanma bölgesindeki protein rezidüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.

Farmakofor arama işlemleri sonucunda agonist kütüphanesinde 77, oluşturulan GPCRdb kaynaklı küçük molekül kütüphanesinde ise 10.638 adet molekül kalmıştır.



Şekil 4.1. 6LI0 proteinin bağlanma bölgesinin analizi.

4.2. GPR52 İçin Moleküler Yerleştirme Çalışması ve Konsensüs Skorlama Sonuçları

Pharmit platformuna yüklenen ve oluşturulan farmakofor modeline göre taranarak elde edilen agonist kütüphanesindeki 77, GPCRdb kaynaklı kütüphanedeki 10.638 adet molekül ve EN6 için moleküler yerleştirme çalışması yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda her ligand için oluşturulan 10 bağlanma modundan en iyi bağlanma enerjisine sahip bağlanma modu kullanılarak konsensüs skorlama işlemi uygulanmıştır. Konsensüs skorlama moleküler yerleştirme yapılan tüm ligandlar için gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerden sonra her bir skorlama fonksiyonu grubu kendi içinde en iyi 100 ligandı gösterecek şekilde sıralanmıştır. BÖLÜM 3'te bahsedilen yöntemler kullanılarak yapılan skorlama sıralamasında eşik değeri için kullanılması planlanan agonistlerin herhangi birisinin yapılan *Total*, *Sıralama Ortalama* ve *Total 100* belirleyiciler sıralamalarının hiçbirinde ilk 20 içinde olmamaları sonucunda agonistler yapılmış olan diğer hesaplama işlemlerinde eşik değeri olarak kullanılmamıştır. Bu aşamadan sonra yapılan tüm bağlanma enerjisi ve afinite hesaplamaları için eşik değeri olarak EN6 dikkate alınmıştır. EN6 ligandının skorlama sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Eşik değeri olarak bilinen agonistler kullanılmasalar bile diğer tüm ligandlar ile birlikte sıralanmış ve sıralamada en iyi sonuç veren bilinen agonist CHEMBL3297811, EN6 ile beraber diğer ligandların sonuçları hakkında daha fazla çıkarım yapılabilmesi amacıyla kullanılmıştır. Çizelge 4.1'de bilinen agonistlerden en iyi skorlama sonucunu veren agonistin değerleri de verilmiştir. Tüm ligandlara yapılan skorlama işlemlerinin sonuçları ise Çizelge 4.2'te verilmiştir. Skorlama işlemlerinin sonucunda tüm skorlama fonksiyonların ortak olarak en iyi sonucu veren ligandlar ile yapılan ve konsensüs skorlama kriterlerini karşılayan 8 ligand moleküler dinamik simülasyonları için seçilmiştir. Seçim yapılırken ilk önce *Total* belirleyicisine göre büyükten küçüğe sıralama yapılmıştır. Sonrasında *Sıralama Ortalama* belirleyicisine göre küçükten büyüğe sıralama yapılmıştır. En son olarak ise *Total 100* belirleyicisine göre büyükten küçüğe sıralanmıştır. Her bir belirleyiciye göre sıralamada ilk 20 sıralama içerisinde yer alan ligandlar işaretlenmiştir. Ligand seçme aşamasında en son adım olarak üç belirleyici için de ortak olanlar seçilmiştir. Ortak olarak işaretlenmiş olan ligandlar sonraki adım olan MD simülasyonları için hazırlanmıştır. Şekil 4.2 ile ise seçilen ligandların moleküler yerleştirme sonucu bağlanma bölgesindeki konumları verilmiştir. Seçilen ligandlar CHEMBL176088, CHEMBL179493,

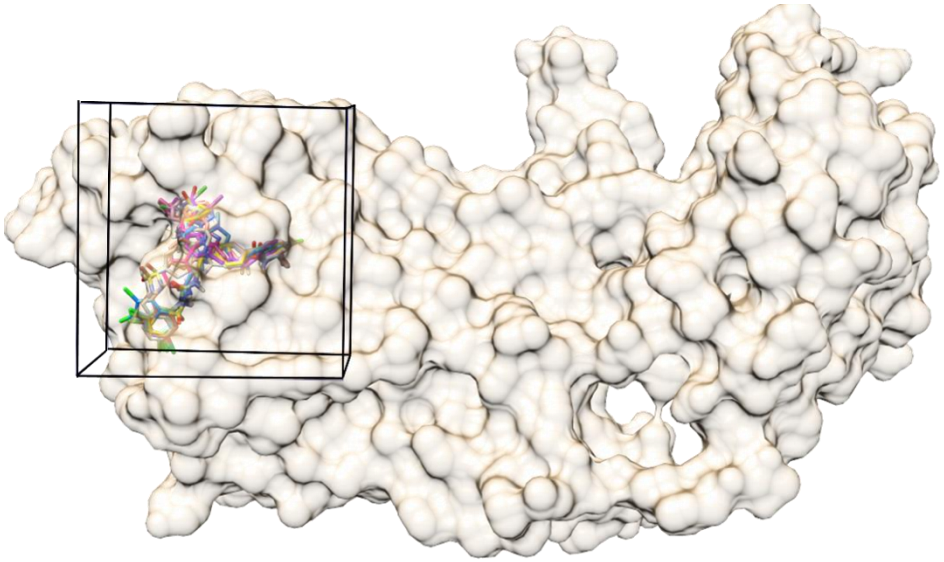
CHEMBL179872, CHEMBL183274, CHEMBL183779, CHEMBL2096778, CHEMBL369392, CHEMBL585766 isimli ligandlardır (bkz Şekil 4.3 ve Şekil 4.5 aralığı).

Çizelge 4.1. EN6 ve Agonist (CHEMBL3297811) ligandın skorlama sonuçları.

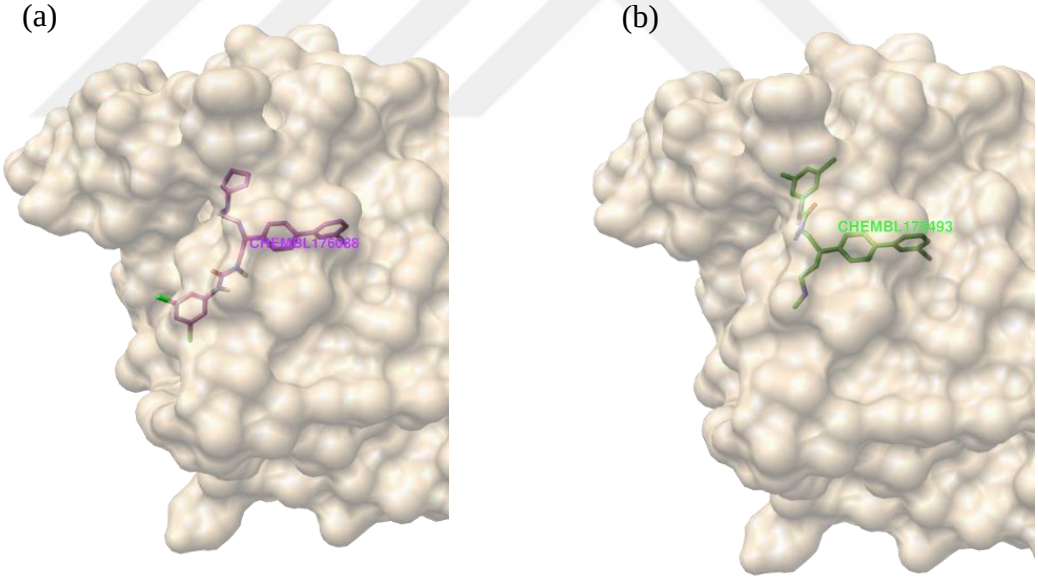
Sıralama	İsim	AutoDockVina Normalizasyon	AutoDockVina 100	AutoDockVina Sıralama	KDEEP Normalizasyon	KDEEP 100	KDEEP Sıralama	NNScore Normalizasyon	NNScore 100	NNScore Sıralama	AutoDockVina Bağlanma Enerjisi	KDEEP Bağlanma Enerjisi	NNScore	Total	Sıralama Ortalama	Total 100
49	AGONİST CHEMBL3297811	0.82	1	46	0.55	0	3687	0.75	0	283	-13.5	-10.78	8.44	0.7	1338.67	1
88	EN6	0.84	1	30	0.48	0	5475	0.73	0	403	-13.73	-10.12	8.2	0.68	1969.33	1

Çizelge 4.2. Skorlama sonucunda seçilen ligandların listesi. Çizelgede ilk 20 değer arasında olanlar için *Total* belirleyicisini sağlayanlar kalın, *Sıralama Ortalama* değerini sağlayanlar açık mavi, *Total 100* belirleyicisini sağlayanlar italik şekilde gösterilmiştir. Tüm sıralamaların sonucunda tüm belirleyiciler için ortak olan ve diğer aşamalar için seçilen ligandların ise altı çizilerek gösterilmiştir.

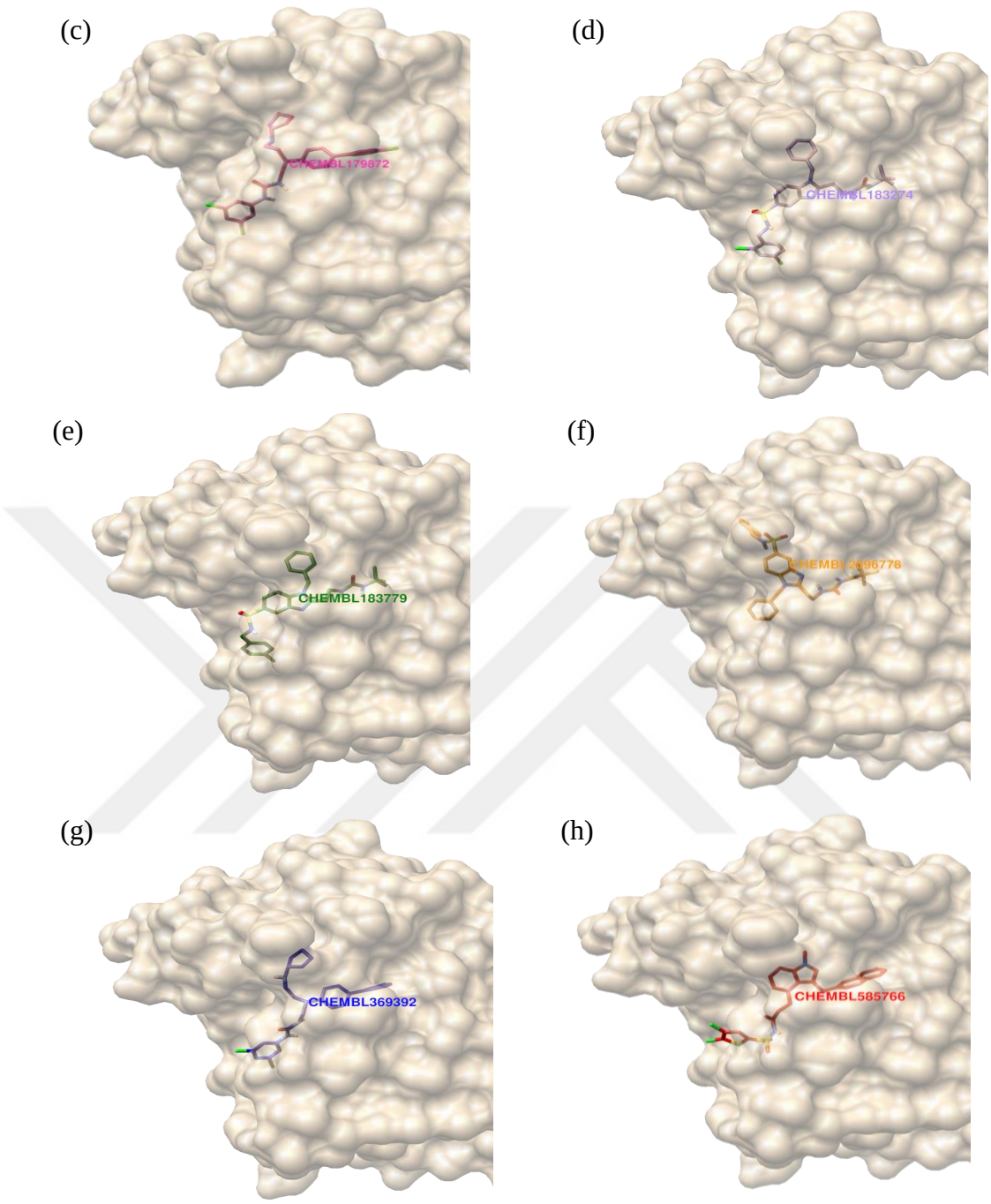
Sıralama	İsim	AutoDockVina Normalizasyon	AutoDockVina 100	AutoDockVina Sıralama	KDEEP Normalizasyon	KDEEP 100	KDEEP Sıralama	NNScore Normalizasyon	NNScore 100	NNScore Sıralama	AutoDockVina Bağlanma Enerjisi	KDEEP Bağlanma Enerjisi	NNScore	Total	Sıralama Ortalama	Total 100
1	***CHEMBL179872***	***0.8***	***1***	***83***	***0.72***	***0***	***602***	***0.99***	***1***	***2***	***-13.3***	***-12.54***	***11.12***	***0.83***	***229***	***2***
2	***CHEMBL2096778***	***0.66***	***0***	***1116***	***0.88***	***1***	***33***	***0.86***	***1***	***34***	***-12***	***-14.22***	***9.71***	***0.8***	***394.33***	***2***
3	CHEMBL360732	0.85	1	23	0.87	1	46	0.58	0	1904	-13.8	-14.05	6.54	0.76	657.67	2
4	CHEMBL188178	0.58	0	3087	0.88	1	37	0.82	1	69	-11.2	-14.15	9.28	0.76	1064.33	2
5	CHEMBL1214530	0.86	1	15	0.85	1	59	0.45	0	4025	-13.9	-13.92	5.1	0.72	1366.33	2
6	CHEMBL221662	0.87	1	13	0.98	1	3	0.18	0	9059	-14	-15.19	2.04	0.68	3025	2
7	***CHEMBL176088***	***0.8***	***1***	***84***	***0.77***	***0***	***309***	***0.75***	***0***	***286***	***-13.3***	***-13.03***	***8.43***	***0.77***	***226.33***	***1***
8	***CHEMBL369392***	***0.81***	***1***	***63***	***0.74***	***0***	***473***	***0.74***	***0***	***311***	***-13.4***	***-12.74***	***8.39***	***0.76***	***282.33***	***1***
9	***CHEMBL179493***	***0.72***	***0***	***404***	***0.73***	***0***	***552***	***0.87***	***1***	***26***	***-12.6***	***-12.62***	***9.84***	***0.77***	***327.33***	***1***
10	***CHEMBL183274***	***0.68***	***0***	***814***	***0.79***	***0***	***220***	***0.94***	***1***	***5***	***-12.2***	***-13.26***	***10.61***	***0.8***	***346.33***	***1***
11	***CHEMBL183779***	***0.68***	***0***	***816***	***0.73***	***0***	***505***	***0.82***	***1***	***78***	***-12.2***	***-12.69***	***9.26***	***0.75***	***466.33***	***1***
12	CHEMBL182178	0.66	0	1117	0.75	0	402	0.81	1	97	-12	-12.85	9.09	0.74	538.67	1
13	***CHEMBL585766***	***0.83***	***1***	***35***	***0.8***	***0***	***173***	***0.61***	***0***	***1464***	***-13.6***	***-13.41***	***6.92***	***0.75***	***557.33***	***1***
14	CHEMBL1950879	0.73	0	329	0.85	1	58	0.61	0	1543	-12.7	-13.92	6.84	0.73	643.33	1
15	CHEMBL490692	0.83	1	36	0.67	0	1107	0.67	0	816	-13.6	-12.07	7.58	0.72	653	1
16	CHEMBL565597	0.63	0	1699	0.75	0	385	0.82	1	76	-11.7	-12.89	9.26	0.74	720	1
17	CHEMBL298983	0.62	0	1922	0.85	1	63	0.77	0	192	-11.6	-13.88	8.7	0.75	725.67	1
18	CHEMBL1085565	0.64	0	1501	0.71	0	683	0.89	1	16	-11.8	-12.44	10.08	0.75	733.33	1
19	CHEMBL1950877	0.7	0	595	0.89	1	31	0.6	0	1633	-12.4	-14.24	6.76	0.73	753	1
20	CHEMBL1270221	0.66	0	1118	0.67	0	1190	0.87	1	28	-12	-12.01	9.82	0.73	778.67	1
21	CHEMBL48897	0.71	0	494	0.96	1	5	0.58	0	1970	-12.5	-14.94	6.49	0.75	823	1



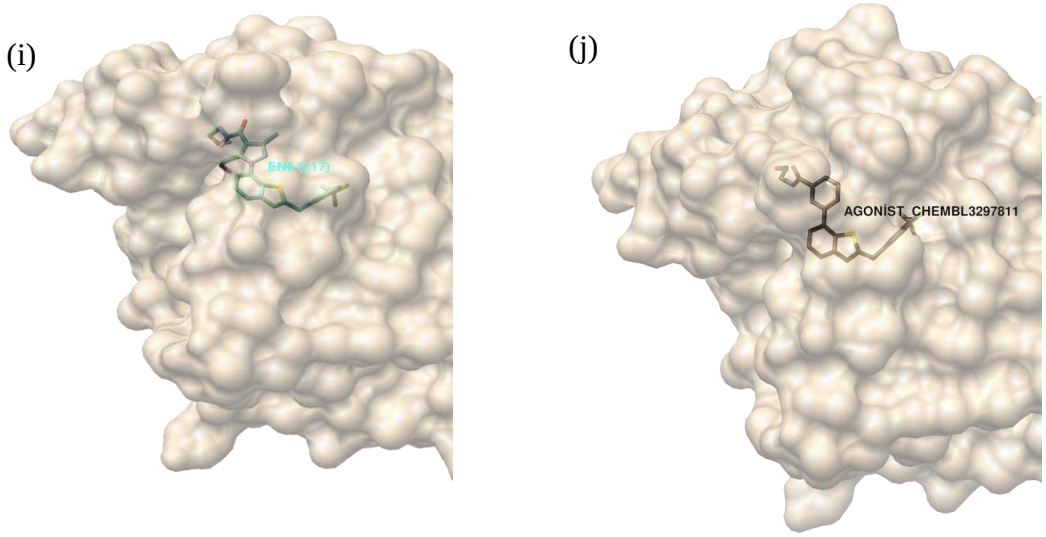
Şekil 4.2. Moleküler dinamik simülasyonları için seçilen ligandlar. MD simülasyonları için seçilen 8 ligand, bilinen agonist ligand ve EN6'nın moleküler yerleştirme sonucu bağlanma bölgesindeki konumları



Şekil 4.3. Seçilen ligandların proteinin bağlanma bölgesinde gösterimi. Moleküler yerleştirme işlemi ve konsensüs skorlama sonucunda MD simülasyonları yapılmak üzere seçilen ligandların protein bağlanma bölgesindeki gösterimi verilmiştir. (a) CHEMBL176088, (b) CHEMBL179493

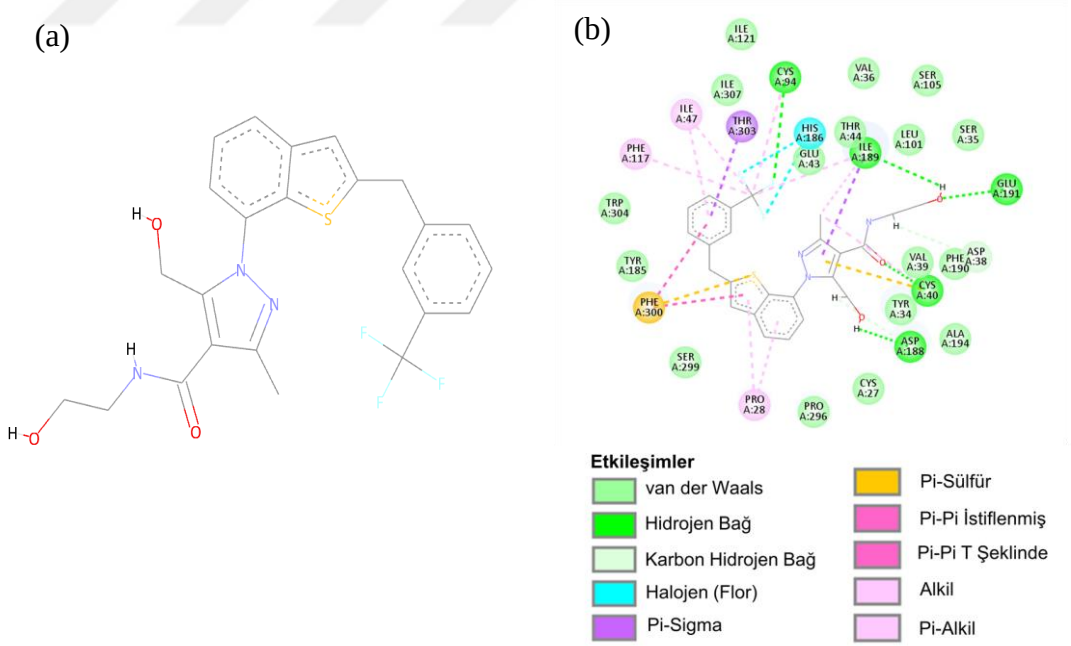


Şekil 4.4. Seçilen ligandların proteinin bağlanma bölgesinde gösteriminin devamı. Moleküler yerleştirme işlemi ve konsensüs skorlama sonucunda MD simülasyonları yapılmak üzere seçilen ligandların protein bağlanma bölgesindeki gösterimi verilmiştir. (c) CHEMBL179872, (d) CHEMBL183274, (e) CHEMBL183779, (f) CHEMBL2096778, (g) CHEMBL369392 ve (h) CHEMBL585766

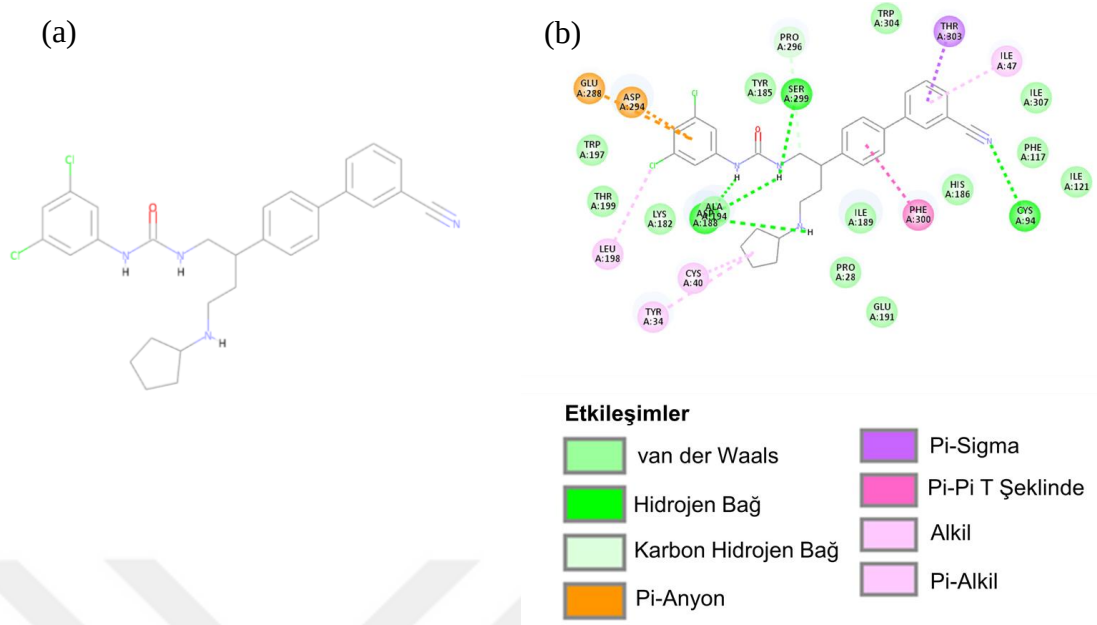


Şekil 4.5. Seçilen ligandların proteinin bağlanma bölgesinde gösteriminin devamı. Moleküler yerleştirme işlemi ve konsensüs skorlama sonucunda MD simülasyonları yapılmak üzere seçilen ligandların protein bağlanma bölgesindeki gösterimi verilmiştir. (i) EN6 ve (j) Bilinen agonist CHEMBL3297811

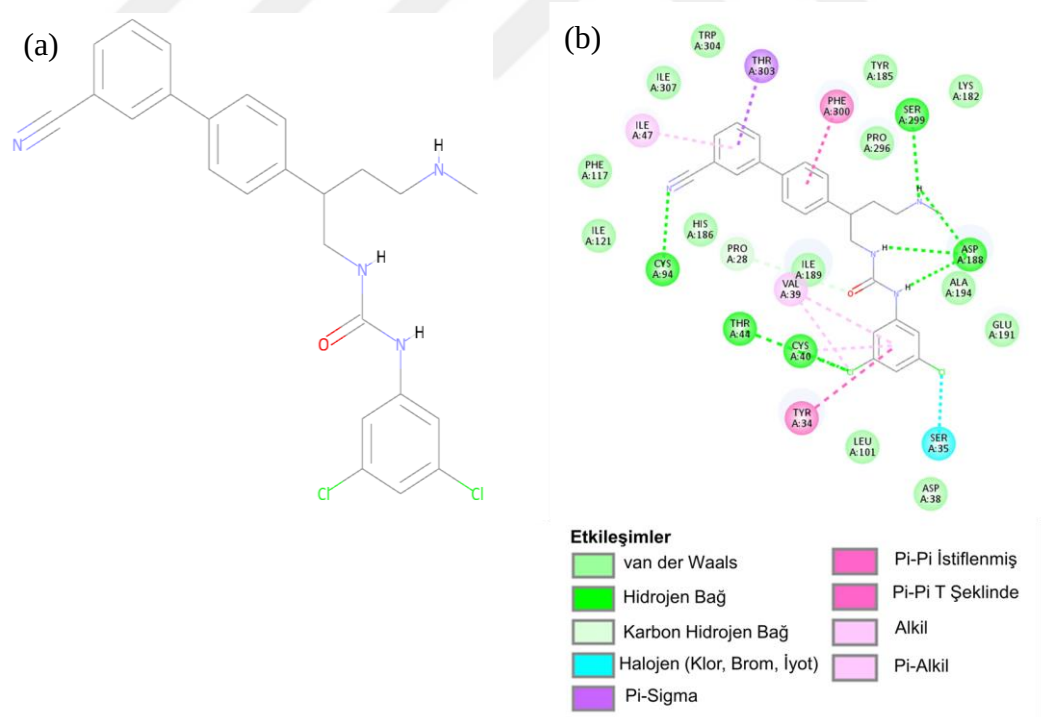
Seçilen ligandların iki boyutlu gösterimi ve moleküler yerleştirme sonucu protein ile etkileşimleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



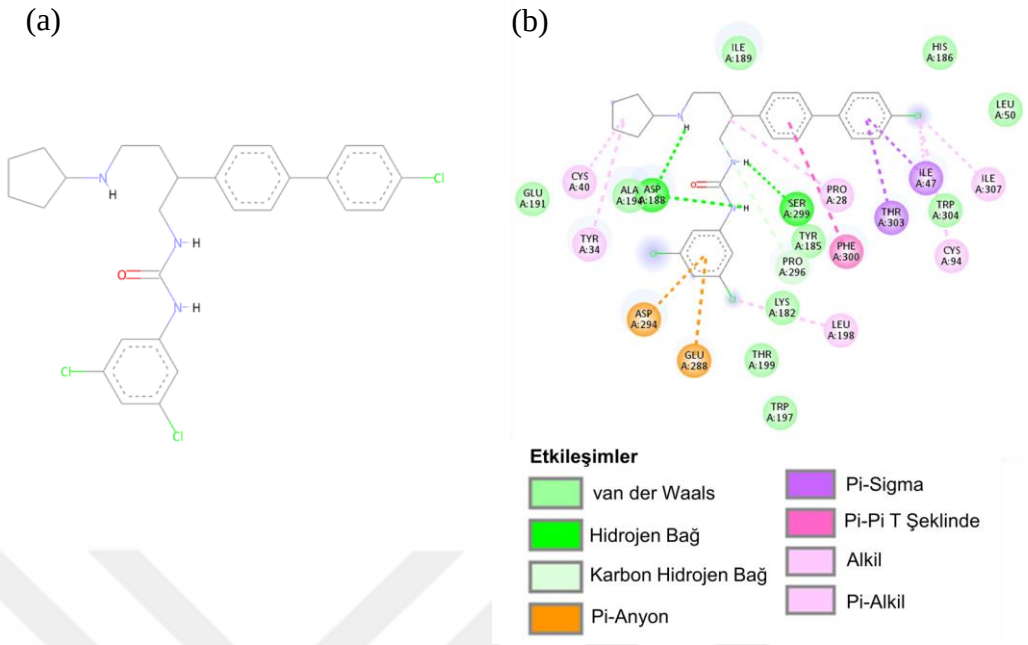
Şekil 4.6. EN6 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) EN6'nın 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu



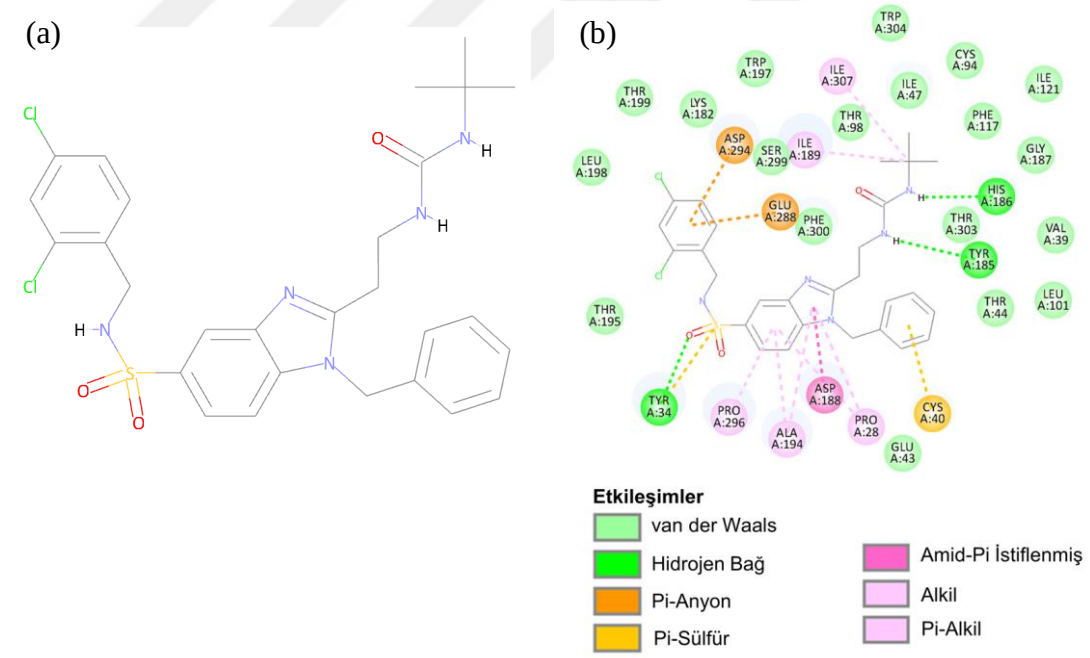
Şekil 4.7. CHEMBL176088 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) CHEMBL176088'in 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu



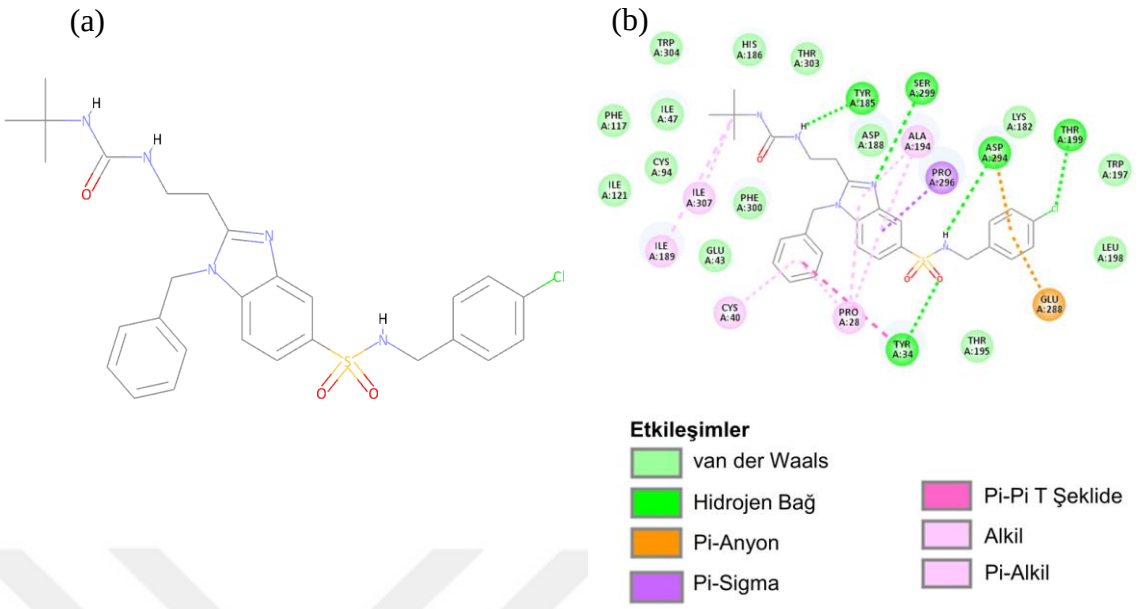
Şekil 4.8. CHEMBL179493 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) CHEMBL179493'ün 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu



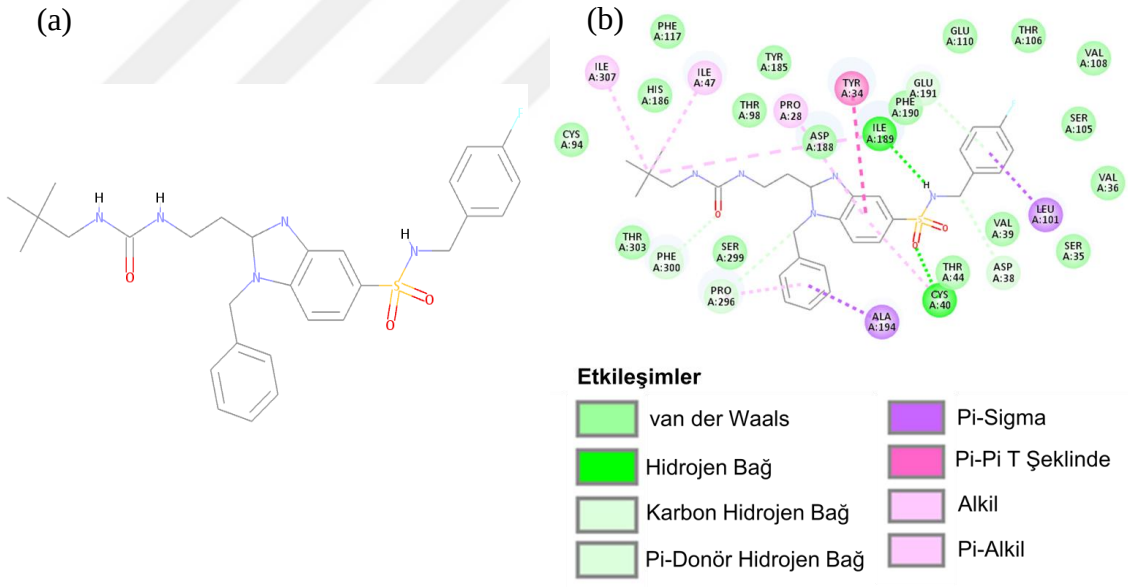
Şekil 4.9. CHEMBL179872 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) CHEMBL179872'nin 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu



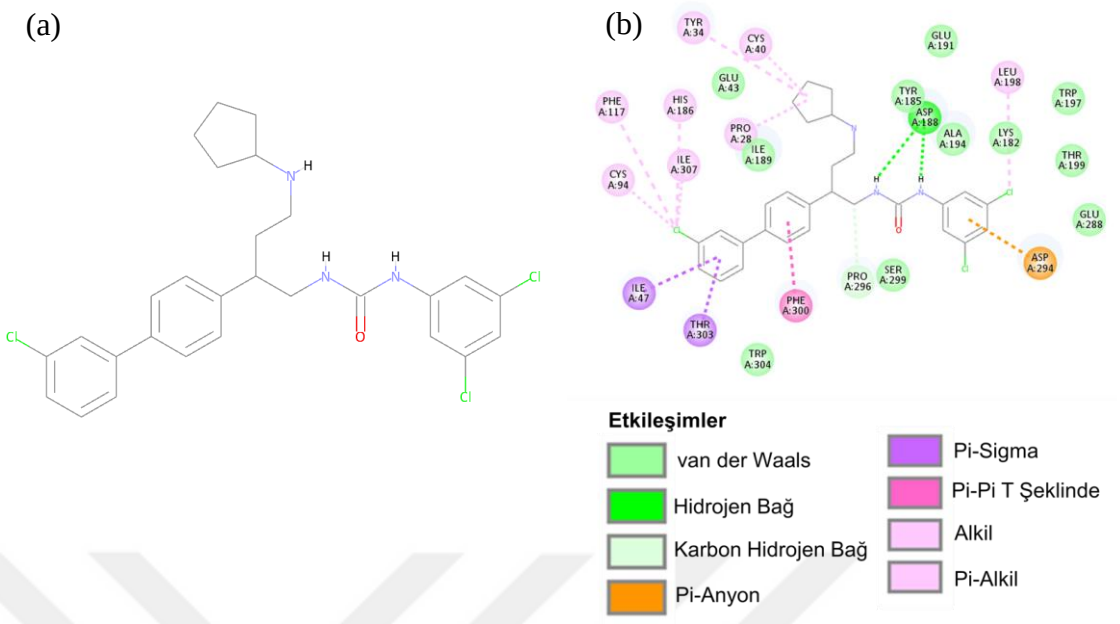
Şekil 4.10. CHEMBL183274 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) CHEMBL183274'ün 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu



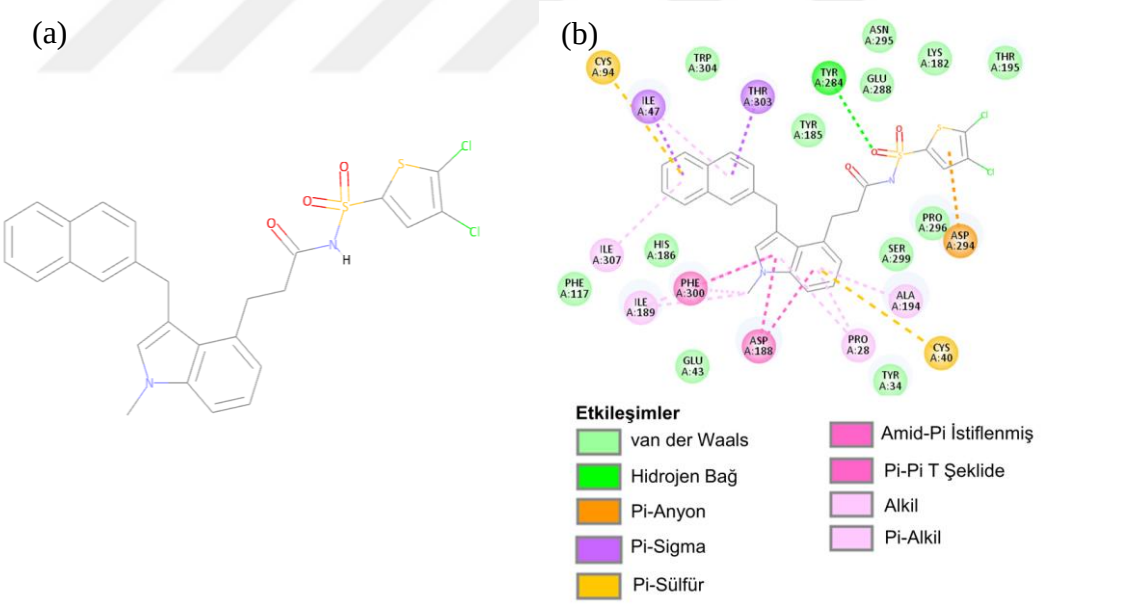
Şekil 4.11. CHEMBL183779 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) CHEMBL183779'un 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu



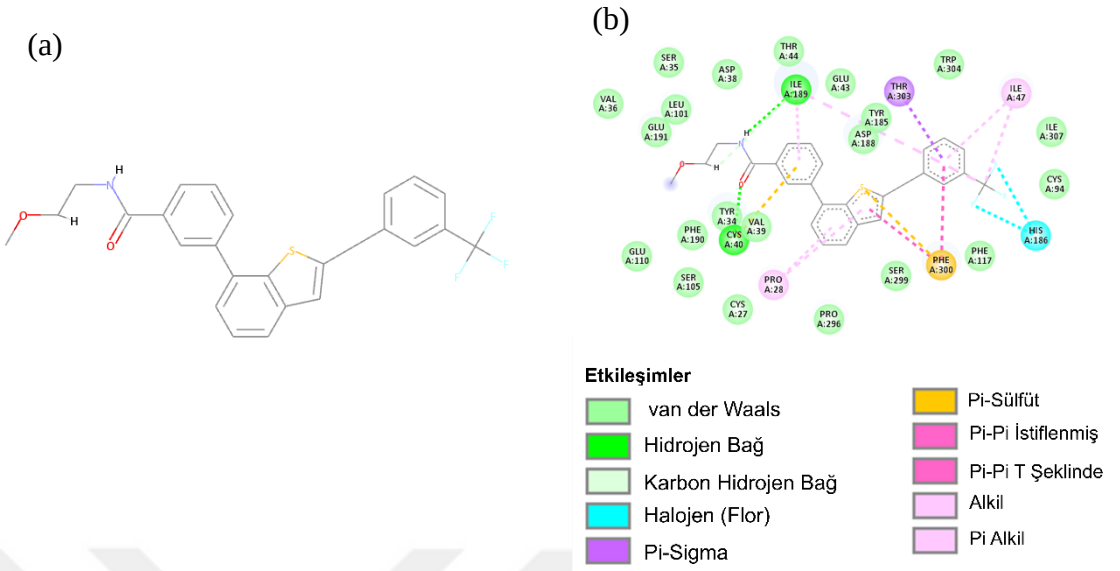
Şekil 4.12. CHEMBL2096778 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) CHEMBL2096778'in 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu



Şekil 4.13. CHEMBL369392 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) CHEMBL369392'nin 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu



Şekil 4.14. CHEMBL585766 ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) CHEMBL585766'nın 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu

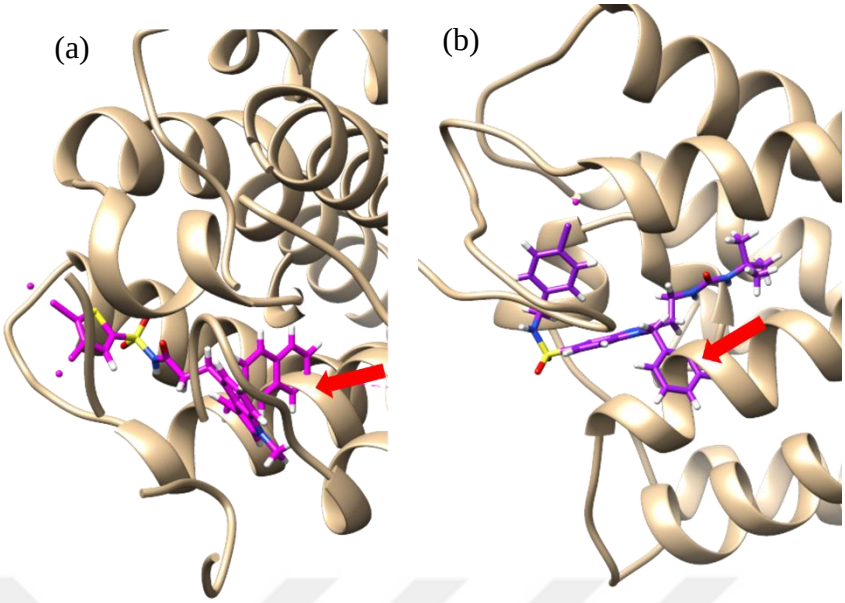


Şekil 4.15. Agonist (CHEMBL3297811) ve moleküler yerleştirme sonrası protein ile arasındaki etkileşim. (a) Agonistin (CHEMBL3297811) 2 boyutlu gösterimi (b) Etkileşim sonucu

Moleküler yerleştirme ile elde edilen etkileşim sonuçlarına göre özellikle Tyr34, Cys40, Tyr185, Asp188, Ser299, Phe300 ve Thr303 rezidülerinin tüm ligandlar ile çeşitli hidrojen bağları ve etkileşimler (van der Waals, pi, alkil vb.) göstererek bağlanma sırasında aktif rol oynadığı gözlenmiştir.

4.3. GPR52 İçin Yapılan Moleküler Dinamik Simülasyonu ve Bağlanma Serbest Enerjisi Sonuçları

Moleküler yerleştirme sıralamaları sonucunda seçilen 8 ligand, EN6 ve agonist (CHEMBL3297811) için MD simülasyonları ve bağlanma serbest enerjisi çalışmaları için başlangıç yapıları CHARMM-GUI ile hazırlanmıştır. Fakat CHEMBL183779 ve CHEMBL585766 ligandları kullanılarak CHARMM-GUI ile hazırlanan başlangıç yapılarında protein ile aralarında olağandışı ring penetrasyonu meydana gelmesinden dolayı bu iki ligand MD simülasyon çalışmalarına dahil edilmemiştir (Şekil 4.16). Sonuç olarak kalan 6 ligand, EN6 ve agonist (CHEMBL3297811) ligandlarının 100 ns'lik MD simülasyonları ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda ligandların ve protein-ligand komplekslerinin son 50 ns'lik RMSD grafikleri incelenmiştir.

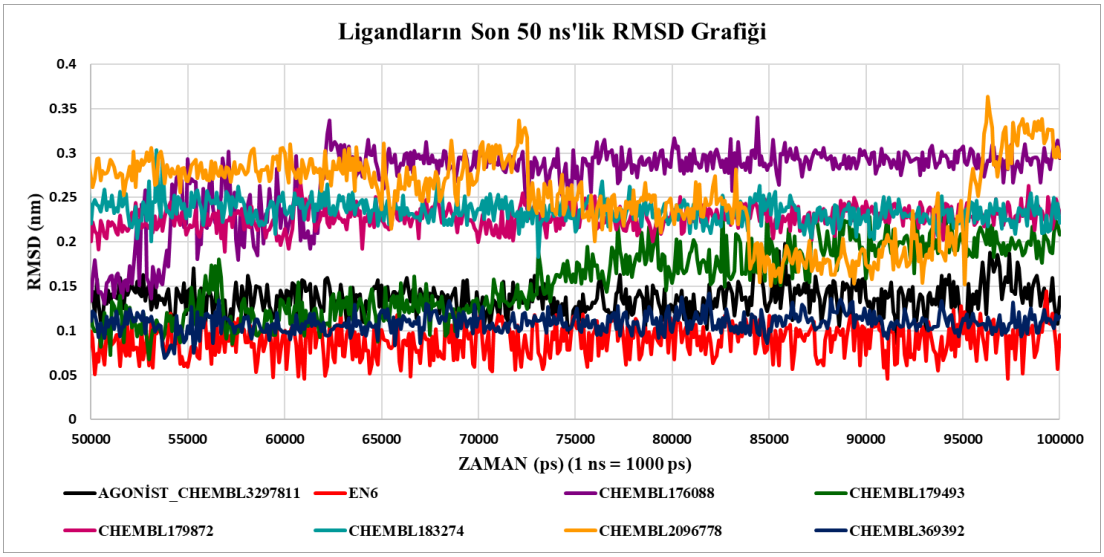


Şekil 4.16. CHEMBL183779 ve CHEMBL585766 ligandları ile protein arasında meydana gelen ring penetrasyonu görüntüsü. (a) CHEMBL183779 (b) CHEMBL585766 ligandları ile protein arasında meydana gelen ring penetrasyonu durumları kırmızı ok ile gösterilmiştir.

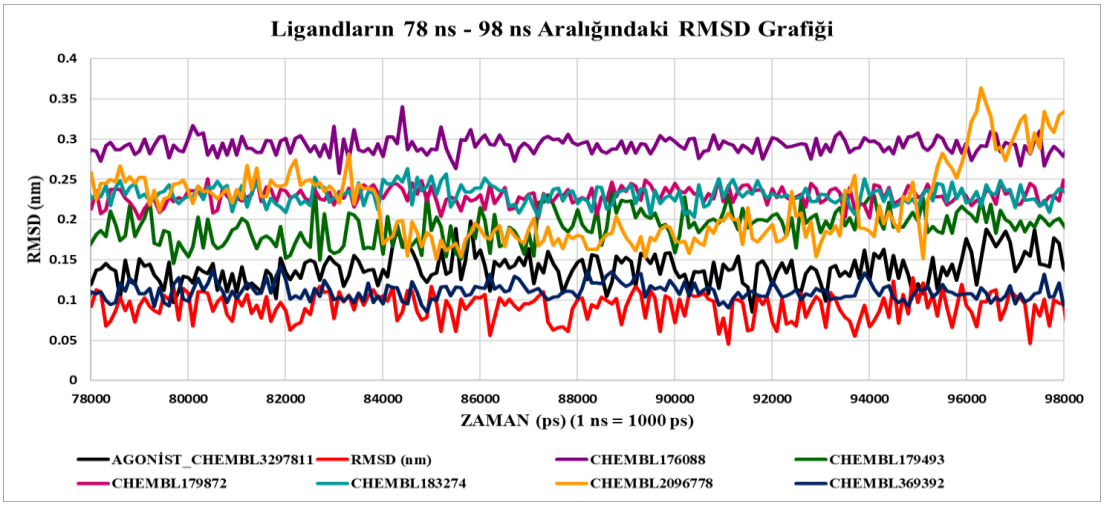
RMSD grafiklerinin incelenmesi sonucunda gmx_MMPBSA programı ile bağlanma serbest enerjisi hesaplanmak üzere en dengede olduğu zaman aralığı olan 78.ns ile 98.ns arasındaki zaman aralığı seçilmiştir. Ayrıca ligand ve ligand-protein komplekslerine ait RMSD değişim grafikleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir (bkz Şekil 4.17 ile Şekil 4.20 arası). Elde edilen sonuçlara göre ligandların RMSD değişimlerinin zamana göre 0.05 ile 0.35 nm arasında olduğu görülmüştür. Bu değerler ligandların başlangıç durumları ile son durumlarının benzer olduğunu göstermiştir. Ligandların genel olarak protein üzerindeki bağlanma bölgesi içerisinden uzaklaşmadığı çok fazla hareket ve değişim göstermediği gözlenmiştir. Şekil 4.17'deki sadece ligandlardaki değişimlerde CHEMBL2096778 ligandının EN6, agonist ve diğer ligandlara göre daha fazla hareket ettiği görülmektedir. Bu ligandın 50-70 ns aralığında sabit olduğu görülürken, 70-95 ns aralığında hareketinde azalma olduğu ve daha sonra tekrar hareketliliğini arttırdığı gözlenmiştir. CHEMBL369392 ligandının RMSD değişimleri grafiklerde incelendiğinde yapısında meydana gelen değişim ve hareketliliğin az olması yapılan moleküler yerleştirmenin diğer ligandlara göre daha iyi sonuç verdiğini göstermektedir. Protein-ligand komplekslerinin ise son 50 ns boyunca 0.25 nm ile 0.7 nm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 4.19'da protein-CHEMBL176088 kompleksinin son 50 ns

boyunca yaklaşık olarak 0.5 ile 0.65 nm aralığında ve protein-CHEMBL179872 kompleksinin ise son 30 ns boyunca 0.4 ile 0.7 nm aralığında RMSD değişimi gösterdiği görülmektedir. Protein-CHEMBL176088 ve protein-CHEMBL179872 kompleksleri haricinde tüm komplekslerin 0.25 ile 0.5 nm arasında bir değişim gösterdiği gözlemlenmektedir. Protein-CHEMBL176088 ve protein-CHEMBL179872 komplekslerinin bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 ligand protein komplekslerinin değişim ve hareketine kıyasla daha fazla hareket ve değişim göstermesi diğer ligandlardan farklı bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. CHEMBL183274, CHEMBL2096778, CHEMBL369392, bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 ligand protein komplekslerinin RMSD grafikleri incelendiğinde değişim ve hareketliliğin diğer komplekslere kıyasla daha stabil olduğu görülmektedir. Tüm ligandların ve protein-ligand komplekslerinin her biri için ayrıca oluşturulmuş RMSD grafikleri EK 1 ve EK 2'de verilmiştir.

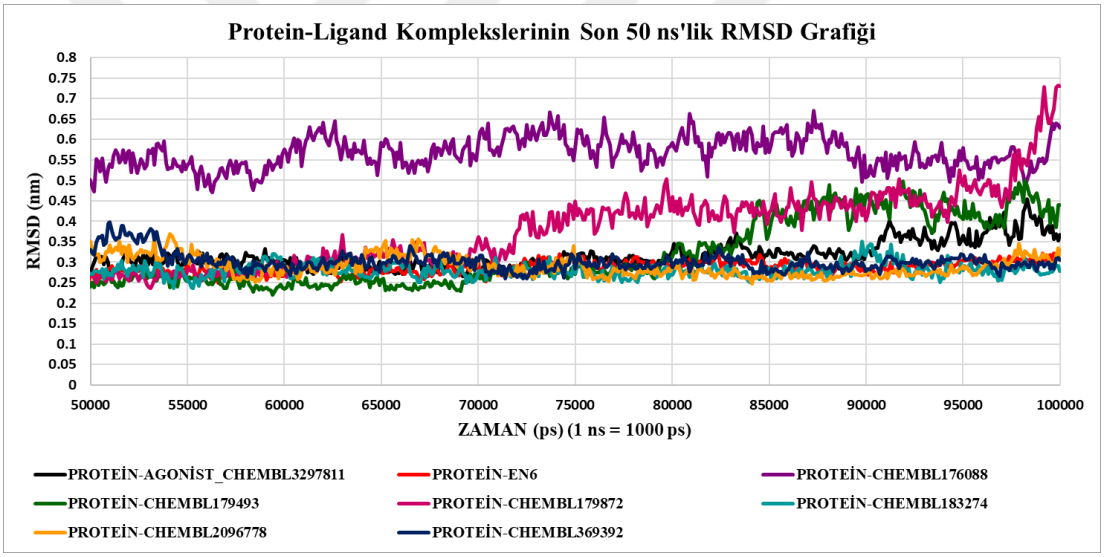
Ayrıca gmx_MMPBSA programı ile hesaplama yapılan son adım olan 98. ns'deki protein-ligand kompleksleri pdb formatına çevrilerek PRODIGY web sunucusunun PRODIGY-LIG aracı ile bağlanma enerjisi hesaplanmıştır.



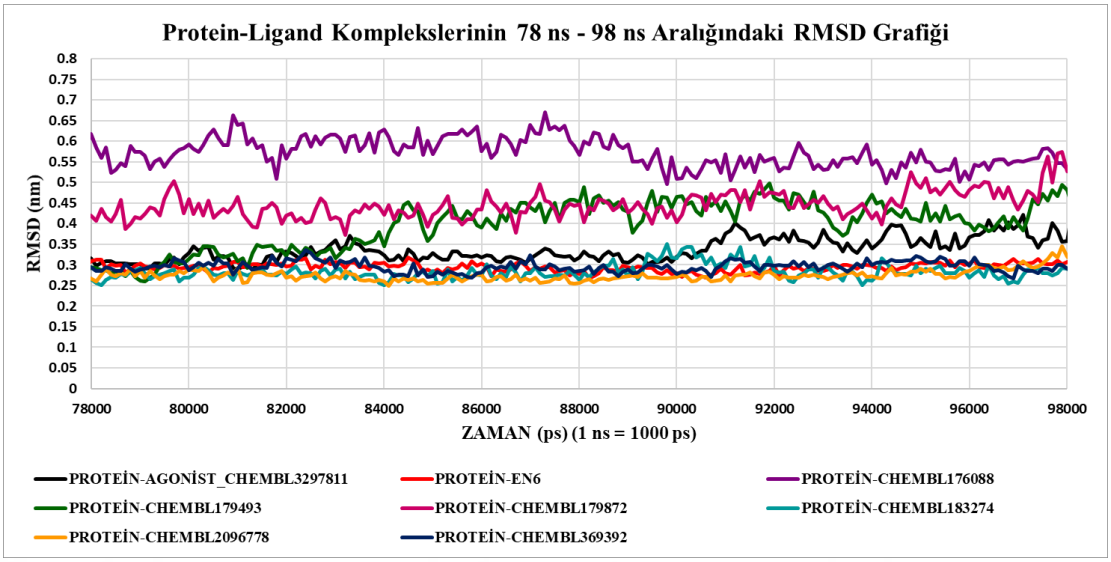
Şekil 4.17. MD simülasyonları sonrası ligandların RMSD grafiği. Ligandların son 50 ns boyunca gösterdiği değişimin RMSD grafiği şekilde verilmiştir.



Şekil 4.18. Ligandların 78 ns – 98 ns aralığındaki RMSD grafiği.



Şekil 4.19. MD simülasyonları sonucunda elde edilen protein-ligand komplekslerinin son 50 ns'lik RMSD grafiği.

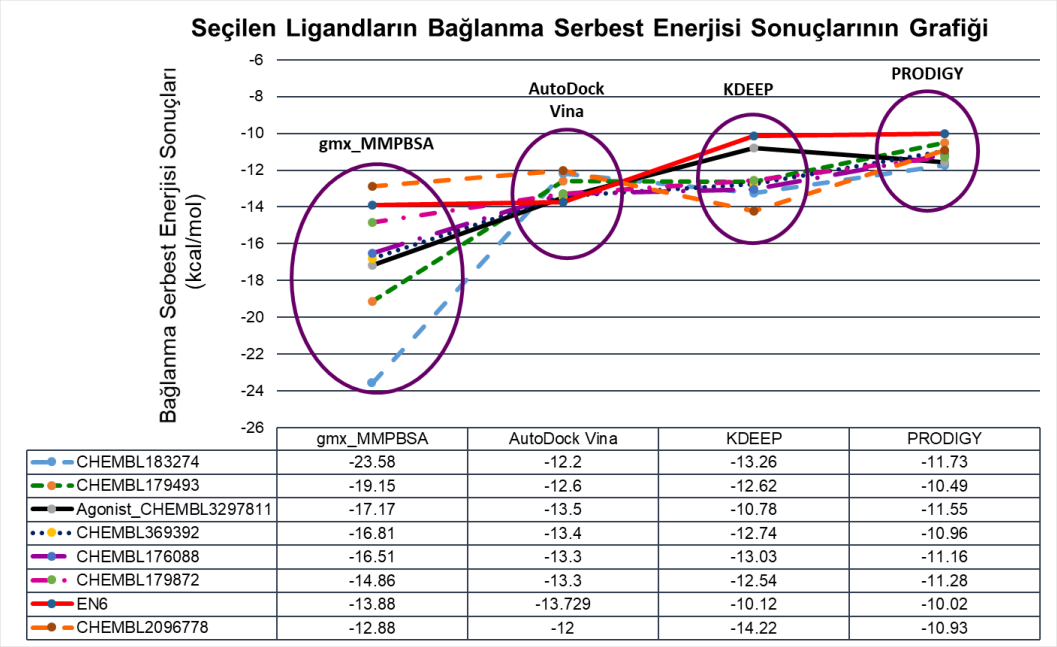


Şekil 4.20. MD simülasyonları sonucunda elde edilen protein-ligand komplekslerinin 78 ns – 98 ns aralığındaki RMSD grafiği.

RMSD grafikleri kontrol edildikten sonra 78 ns – 98 ns zaman aralığında gmx_MMPBSA kullanılarak her bir ligandın bağlanma serbest enerjisi hesaplanmıştır. 78. ns ve 98. ns arasındaki 201 frame içeren aralığın son 51 frame içeren kısmı ile Etkileşim Entropisi hesaplanmıştır. Etkileşim Entropisi yöntemi kullanılırken etkileşim enerjisinin standart sapması değerinin (σIE) > ~ 3.6 kcal/mol'dan fazla olmayacak şekilde sonuç vermesine dikkat edilmiştir. σIE > ~ 3.6 kcal/mol üzeri olması gerçekçi olmayan büyüklükte entropiler olduğunu ve IE entropisini yakınsamanın neredeyse imkansız olacağını ifade etmektedir (Ekberg & Ryde, 2021). Sadece CHEMBL183274 ligandının σIE değeri 4.03 çıkmıştır. Bu sonuç, entropi yaklaşımının hesaplamada güvenilir olmayabileceği, ancak göreceli sıralama (relative ranking) için dikkate alınabileceğini göstermektedir (Ekberg & Ryde, 2021). gmx_MMPBSA sonucu EN6 ligandından iyi olan CHEMBL2096778 ligandı dışındaki tüm ligandlar (CHEBML176088, CHEMBL179493, CHEMBL179872, CHEMBL183274, CHEMBL369392 ve agonist (CHEMBL3297811)) ADME-T araştırması yapılmak üzere seçilmiştir.

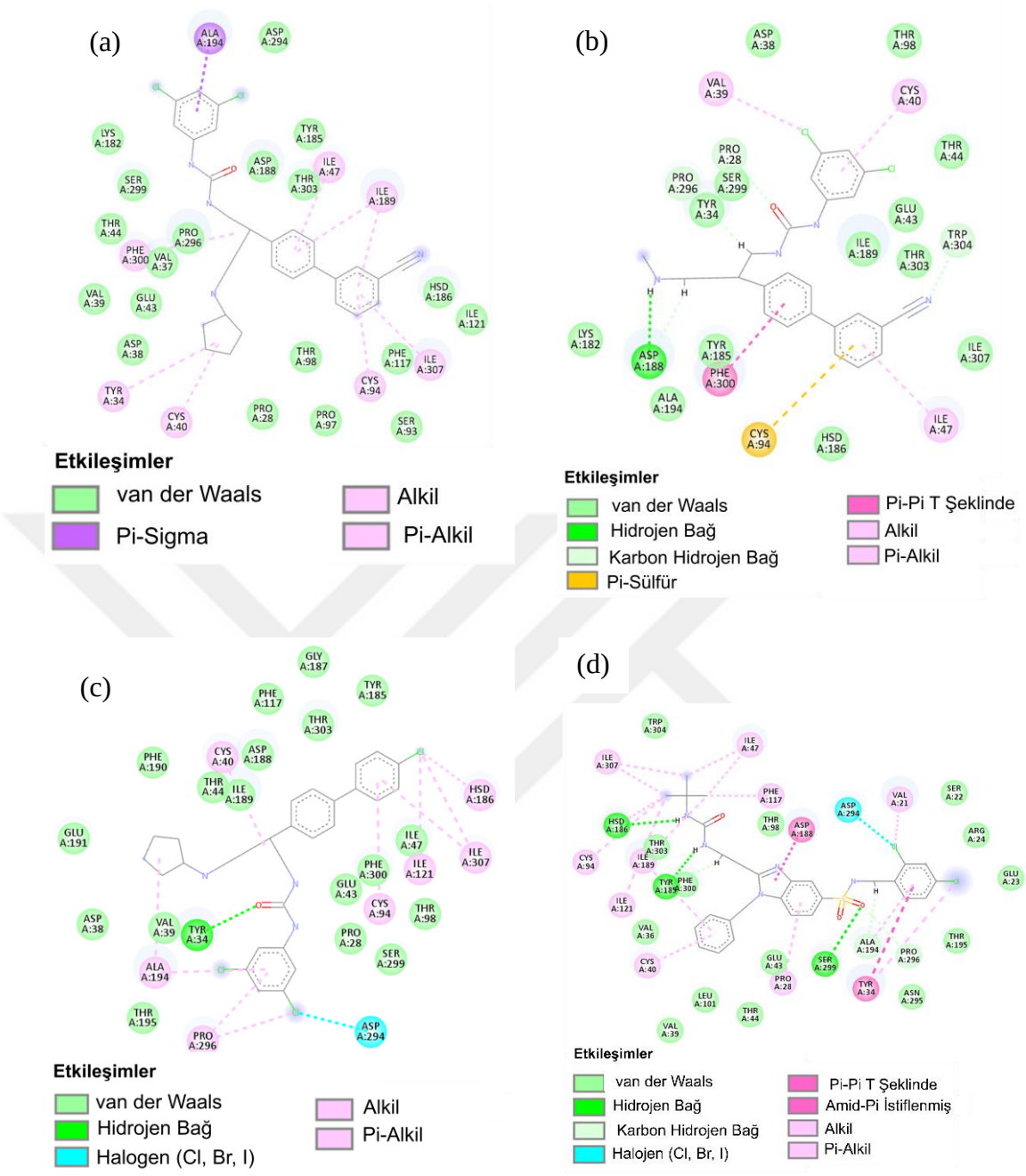
Şekil 4.21'de MD simülasyonları öncesi AutoDock Vina ve KDEEP ile MD simülasyonları sonrası gmx_MMPBSA ve PRODIGY araçlarından elde edilen tüm bağlanma enerjilerinin grafiği verilmiştir.

Bağlanma enerjisi analizi sonuçlarına göre ADME-T analizi yapılmak üzere seçilen ligandların 98.ns'deki protein ile etkileşimleri Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te verilmiştir.

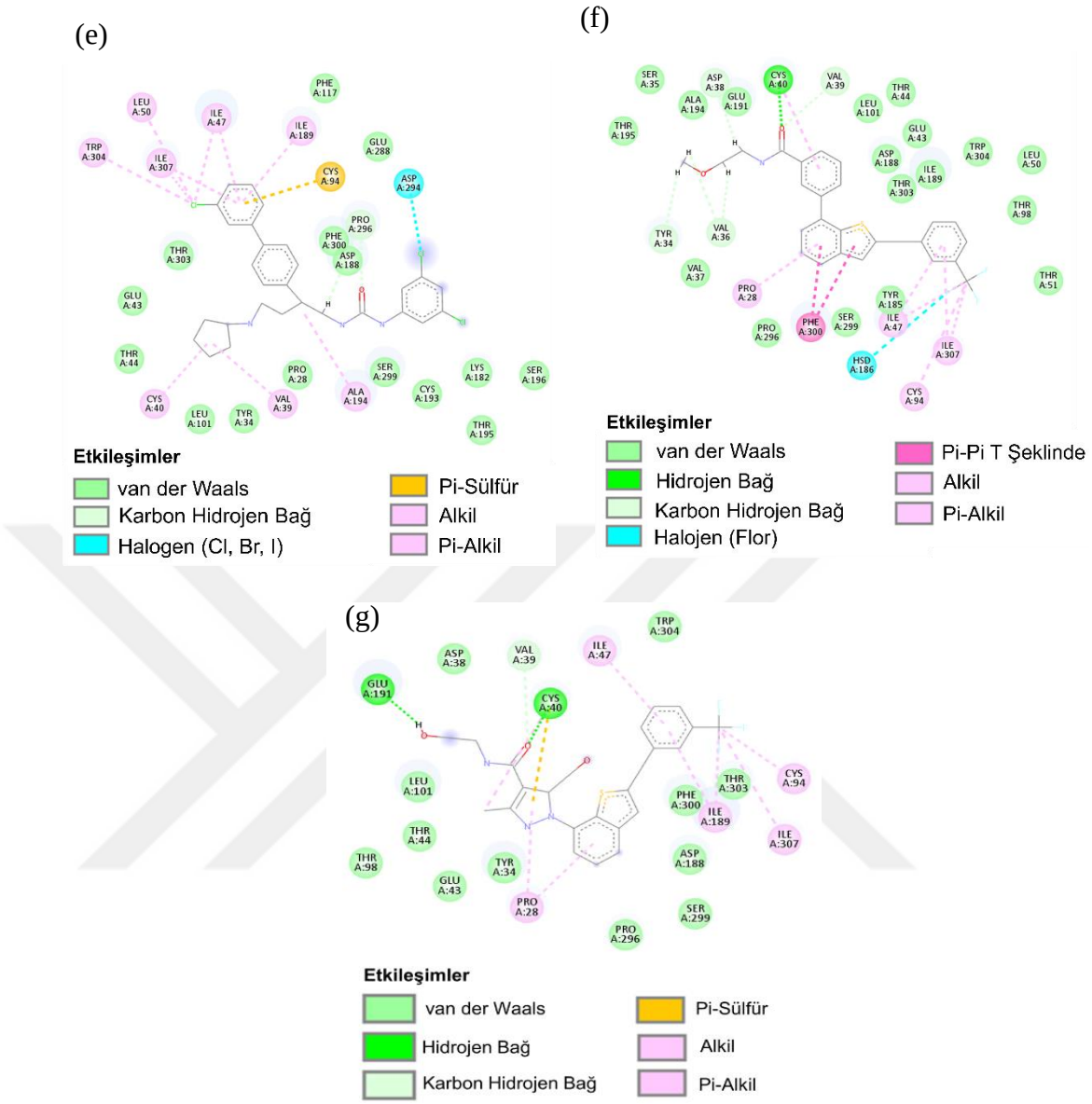


	gmx_MMPBSA	AutoDock Vina	KDEEP	PRODIGY
CHEMBL183274	-23.58	-12.2	-13.26	-11.73
CHEMBL179493	-19.15	-12.6	-12.62	-10.49
Agonist_CHEMBL3297811	-17.17	-13.5	-10.78	-11.55
CHEMBL369392	-16.81	-13.4	-12.74	-10.96
CHEMBL176088	-16.51	-13.3	-13.03	-11.16
CHEMBL179872	-14.86	-13.3	-12.54	-11.28
EN6	-13.88	-13.729	-10.12	-10.02
CHEMBL2096778	-12.88	-12	-14.22	-10.93

Şekil 4.21. Seçilen ligandların bağlanma serbest enerjisi sonuçlarının grafiği. Ligandların bağlanma enerjisi sonuçları grafikteki tabloda verilmiştir. Grafikte ise her bir aracın alanı daire içinde gösterilmektedir.



Şekil 4.22. MD simülasyonu sonrası 98.ns'deki protein-ligand etkileşimleri. (a) CHEMBL176088 (b) CHEMBL179493 (c) CHEMBL179872 (d) CHEMBL183274



Şekil 4.23. MD simülasyonu sonrası 98.ns'deki protein-ligand etkileşimleri devamı. (e) CHEMBL369392, (f) Agonist (CHEMBL3297811) ve (g) EN6

Moleküler yerleştirme sonucunda elde edilen etkileşimler (bkz BÖLÜM 4.2) ile Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'teki MD simülasyonlarının 98.ns'deki protein-ligand etkileşimleri karşılaştırıldığında Tyr34, Cys40, Asp188, Phe300, Tyr185, Ser299 ve Thr303 rezidülerinin CHEMBL369392, Agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 ligandları dışında kalan tüm ligandlar ile çeşitli hidrojen bağları ve etkileşimler (van der Waals, pi, alkil vb.) ile etkileşime girdiği görülmektedir. CHEMBL369392 ve EN6 ligandlarının ise Tyr185 dışında kalan diğer rezidüler ile (Tyr34, Cys40, Asp188, Phe300, Ser299 ve

Thr303); agonist CHEMBL3297811 ligandının ise Ser299 dışındaki rezidüler (Tyr34, Cys40, Asp188, Phe300, Tyr185ve Thr303) ile çeşitli etkileşimlerde bulunduğu gözlenmiştir.

4.4. ADME-T Analizi Sonuçları

Bağlanma serbest enerjisi sonucuna göre seçilen CHEMBL176088, CHEMBL179493, CHEMBL179872, CHEMBL183274, CHEMBL369392, bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve oijinal ligand EN6'ya ADME analizi yapılmıştır. ADME analizleri yapılırken SwissADME (Daina vd., 2017) ve admetSAR 2.0 (H. Yang vd., 2019) araçları kullanılmıştır. Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te SwissADME ve admetSAR sonuçları verilmiştir. Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te ise SwissADME aracı tarafından oluşturulmuş ligandların oral biyoyararlanım alanı analizi sonuçları verilmiştir.

Ligandların fizikokimyasal özelliklerinin analizi ilaç geliştirme sürecinin erken aşamalarında uygulanan Lipinski'nin Beş Kuralı (RO-5) doğrultusunda yapılmıştır. RO-5, bir ilaç molekülünün log *p* (lipofiliklik) ≤ 5; MW (molekül ağırlığı) ≤ 500 dalton; HBA (hidrojen bağ alıcısı) ≤ 10 ve HBD (hidrojen bağ donörü) ≤ 5 olduğu durumlarda iyi oral biyoyararlanım, sorunsuz membran geçirgenliği ve insan bağırsağında iyi gastrointestinal emilim gösterdiğini belirtir. Tez çalışması kapsamında iyi sonuçlar vermesi sonucunda seçilmiş olan ligandlardan bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve CHEMBL179493 ligandlarının log *p* (lipofiliklik) ≤ 5 kuralını; CHEMBL183274 ligandının MW ≤ 500 dalton kuralını, geri kalanları ise log *p* (lipofiliklik) ≤ 5; MW ≤ 500 dalton kurallarını ihlal ettiği görülmektedir. EN6 ligandının ise herhangi bir ihlali bulunmamaktadır (bkz Çizelge 4.3). Lipinski kurallarının yanı sıra Ghose (Ghose, Viswanadhan, & Wendoloski, 1999), Veber (Veber vd. 2002), Egan (Egan, Merz, & Baldwin, 2000), Muegge (Muegge, Heald, & Brittelli, 2001) filtrelerinin sonuçları da Çizelge 4.3'te mevcuttur. CHEMBL179493 ligandının gastrointestinal emiliminin yüksek olduğu geri kalanlarının ise düşük olduğu görülmektedir. Oral biyoyararlanım analizi sonucunda CHEMBL176088, CHEMBL179872, CHEMBL369392 için 0.17; kalan diğer ligandlar için ise 0.55 oral biyoyararlanım puanı vermiştir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımının ilaç keşfi çalışmalarına önemli katkı sağlayan bir özelliği ise sentezlenebilecek ve/veya *in vitro* ve *in vivo* deneylerde kullanılabilecek ilaç aday sanal moleküllerin seçimine

yardımcı olmasıdır. Bu amaçla SwissADME ile araştırılan sentetik erişilebilirliği (sentez kolaylığı) faktörü, bu seçim sürecinde dikkat edilmesi gereken unsurlardan biridir. Ligand moleküllerinin sentetik erişilebilirliği ise CHEMBL176088, CHEMBL179493, CHEMBL179872, CHEMBL183274, CHEMBL369392, bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 için sırasıyla 3.89, 3.53, 3.76, 3.94, 3.77, 3.41 ve 3.62 olarak çıkmıştır. Bir molekülün sentetik erişilebilirliği 1 (yapımı kolay) ve 10 (yapımı çok zor) arasında puanlanarak karakterize edebilmektedir (Ertl & Schuffenhauer, 2009).

Ayrıca ligandların biyodegradasyon özelliklerinin bulunduğu ve kanserojenik (ikili) özelliklerinin negatif/nontoksik olduğu ve admetSAR aracında bulunan ve U.S. EPA (Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı: United States Environmental Protection Agency) kriterlerine göre dört kategoride sınıflandırılan Akut Oral Toksisite sınıflarından ise 3.sınıfta (1. Sınıf: toksik, 4. Sınıf: toksik olmayan) yer aldığı görülmektedir (bkz Çizelge 4.4). AMES testinde ise bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 ligandları haricindeki diğer ligandlar nontoksik değere sahiptir. Cilt ve göz tahrişi özellikleri de tüm ligandlar için nontoksik olarak görülmektedir. Bilinen agonist (CHEMBL3297811) hariç tüm ligandların hepatotoksisite ile toksik olarak ilişkili olduğu bulunmuştur. Şekil 4.24. ve Şekil 4.25'te ise ligandların oral biyoyararlanım alanı analizi sonuçları verilmiştir. Bu analiz sonucunda şekildeki pembe alan bir ilacın iyi oral biyoyararlanıma sahip olması için içinde bulunması gereken alan olarak değerlendirilmektedir. Bu alanı tanımlayan değerler ve sahip olmaları gereken aralıklar Şekil 4.24. ve Şekil 4.25'te belirtilmiştir. Bu analiz sonucunda EN6 ligandının pembe alan içinde olduğu gözlemlenmektedir. CHEMBL179493 ligandının ise diğer ligandlara kıyasla pembe alanı daha az ihlal eden (FLEX ve INSATU özellikleri ihlali) ligand olduğu gözlemlenmektedir. Şekil 4.24 ve Şekil 4.25 ligandların oral biyoyararlanım alanı analizi sonuçlarını göstermektedir. Bu analizdeki özelliklerin değerleri ise LIPO (Lipophilicity) (Lipofiliklik): ($-0.7 <$ XlogP3 $< +0.5$); SIZE (Boyut): ($150 <$ MW < 500 g/mol); POLAR (Polarite): (20 Å2 <TPSA < 130 Å2); INSOLU (Insolubility) (Çözünmezlik): ($-6 <$ Log S (ESOL) < 0); INSATU (Insaturation) (Doymamışlık): ($0.25 <$ Fraksiyon Csp 3 < 1) ve FLEX (Flexibility): ($0 <$ Dönebilen Bağların Sayısı < 9) şeklindedir.

Çizelge 4.3. SwissADME sonuçları.

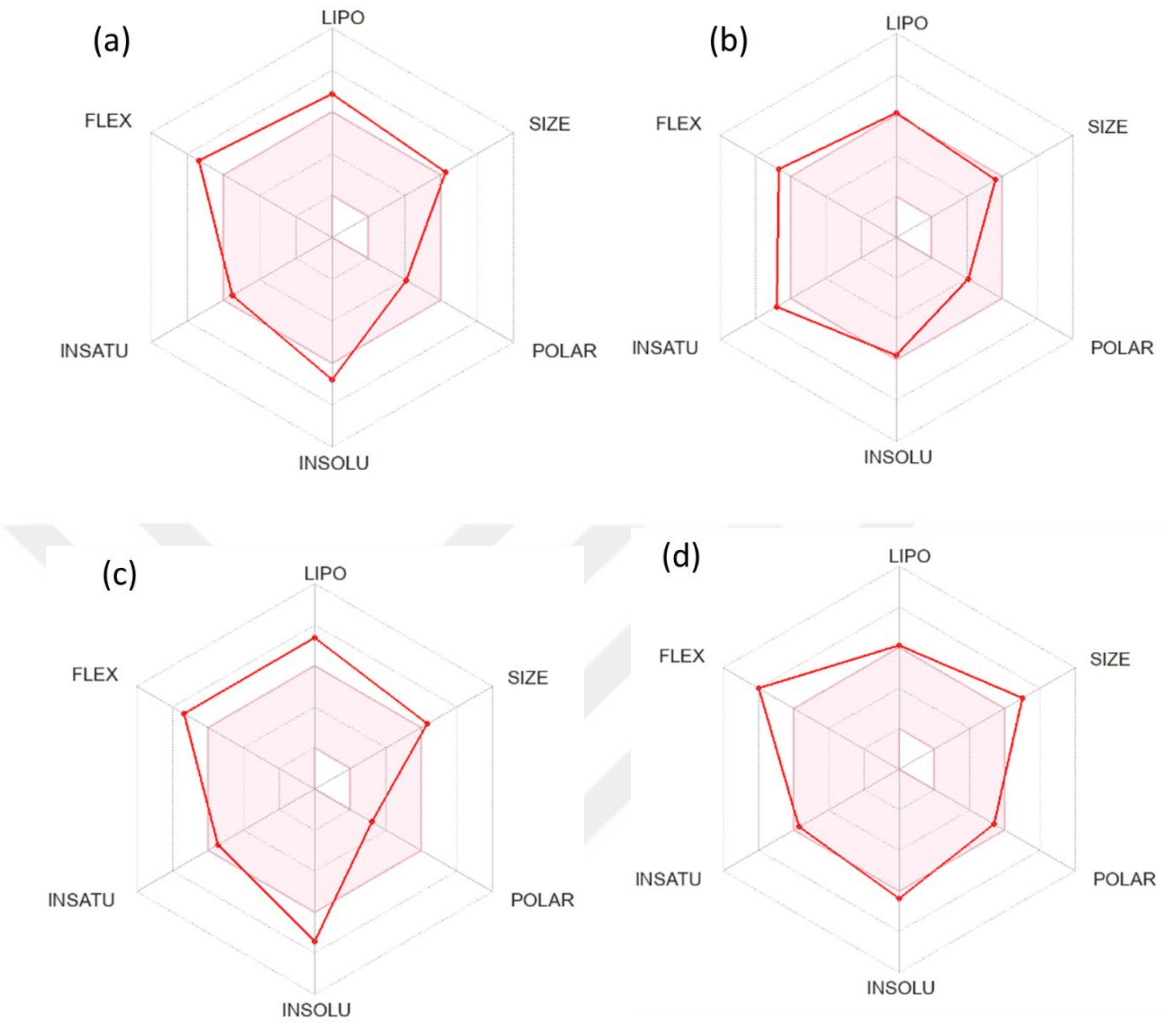
SwissADME sonuçlarında "+" etiketi karşılık geldiği özelliği sağladığı anlamına gelirken "-" etiketi karşılık geldiği özelliği sağlamadığı anlamına gelir.

Moleküler ve Fizikokimyasal Tanımlayıcılar	**CHEMBL176088**	**CHEMBL179493**	**CHEMBL179872**	**CHEMBL183274**	**CHEMBL369392**	**AGONİST (CHEMBL3297811)**	**EN6**
Formül	C29H30Cl2N4O	C25H24Cl2N4O	C28H30Cl3N3O	C28H31Cl2N5O3S	C28H30Cl3N3O	C26H22F3NO2S	C24H22F3N3O3S
Molekül ağırlığı (MW)	521.48	467.39	530.92	588.55	530.92	469.52	489.51
Ağır atom sayısı	36	32	35	39	35	33	34
Aromatik ağır atomların sayısı	18	18	18	21	18	21	20
Karbon bağı doygunluğu (Fraksiyon Csp3)	0.31	0.2	0.32	0.29	0.32	0.19	0.25
Dönebilen bağ sayısı	11	10	11	12	11	9	9
H-bağ alıcılarının sayısı	3	3	2	5	2	5	7
H-bağı donörlerinin sayısı	3	3	3	3	3	1	3
Molar Kırılma (MR)	147.75	130.63	148.04	155.92	148.04	125.41	123.46
Topolojik kutup yüzey alanı (TPSA)	76.95	76.95	53.16	113.5	53.16	66.57	115.62
Lipofiliklik	**CHEMBL176088**	**CHEMBL179493**	**CHEMBL179872**	**CHEMBL183274**	**CHEMBL369392**	**AGONİST (CHEMBL3297811)**	**EN6**
Log Po/w (iLOGP)	4.6	4.03	5	3.86	5.02	4.26	1.83
Log Po/w (XLOGP3)	6.47	5.2	7.38	5.17	7.38	6.54	3.89
Log Po/w (WLOGP)	7.17	5.86	7.95	6.44	7.95	7.71	5.22
Log Po/w (MLOGP)	4.81	4.42	5.98	3.76	5.98	4.93	3.15
Log Po/w (SILICOS-IT)	6.68	5.75	7.26	4.69	7.26	8.15	5.96
Konsensüs Log Po/w	5.94	5.05	6.71	4.78	6.72	6.32	4.01
Su Çözünürlüğü	**CHEMBL176088**	**CHEMBL179493**	**CHEMBL179872**	**CHEMBL183274**	**CHEMBL369392**	**AGONİST (CHEMBL3297811)**	**EN6**
ESOL Log S	-6.79	-5.77	-7.44	-6.35	-7.44	-6.75	-5.17
ESOL Solubility (mg/ml)	8.39E-05	7.94E-04	0.0000195	2.61E-04	0.0000195	8.39E-05	0.00333
ESOL Solubility (mol/l)	1.61E-07	1.70E-06	3.67E-08	4.44E-07	3.67E-08	1.79E-07	0.00000681
ESOL Class	Zayıf çözünür	Orta derecede çözünür	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür	Orta derecede çözünür
Ali Log S	-7.88	-6.56	-8.33	-7.3	-8.33	-7.74	-6.02
Ali Solubility (mg/ml)	6.86E-06	1.28E-04	0.00000251	2.95E-05	0.00000251	8.63E-06	0.000472
Ali Solubility (mol/l)	1.32E-08	2.73E-07	4.72E-09	5.02E-08	4.72E-09	1.84E-08	0.000000964
Ali Class	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür
Silicos-IT LogSw	-11.07	-10.36	-11.59	-10.92	-11.59	-10.46	-7.97
Silicos-IT Solubility (mg/ml)	4.44E-09	2.04E-08	1.37E-09	7.03E-09	1.37E-09	1.63E-08	0.00000529
Silicos-IT Solubility (mol/l)	8.51E-12	4.36E-11	2.58E-12	1.19E-11	2.58E-12	3.47E-11	1.08E-08
Silicos-IT class	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez	Zayıf çözünür
Farmakokinetik	**CHEMBL176088**	**CHEMBL179493**	**CHEMBL179872**	**CHEMBL183274**	**CHEMBL369392**	**AGONİST (CHEMBL3297811)**	**EN6**
Gastrointestinal Emilimi	Düşük	Yüksek	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük
Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği	-	-	-	-	-	-	-
P-Glikoprotein substratı	+	+	+	-	+	+	+
CYP1A2 inhibitörü	-	-	-	-	-	+	-
CYP2C19 inhibitörü	+	+	+	+	+	+	+
CYP2C9 inhibitörü	-	+	-	+	-	-	+
CYP2D6 inhibitörü	+	+	+	+	+	+	+
CYP3A4 inhibitörü	+	+	+	+	+	+	+
log Kp (ciltte nüfuzu) (cm/s)	-4.89	-5.46	-4.3	-6.22	-4.3	-4.52	-6.52
İlaca Benzerlik	**CHEMBL176088**	**CHEMBL179493**	**CHEMBL179872**	**CHEMBL183274**	**CHEMBL369392**	**AGONİST (CHEMBL3297811)**	**EN6**
Lipinski ihlali	2	1	2	1	2	1	0
Ghose ihlali	3	2	3	3	3	1	1
Veber ihlali	1	0	1	1	1	0	0
Egan ihlali	1	0	1	1	1	1	0
Muegge ihlali	1	1	1	1	1	1	0
Biyoyararlanım Puanı	0.17	0.55	0.17	0.55	0.17	0.55	0.55
Tıbbi Kimya	**CHEMBL176088**	**CHEMBL179493**	**CHEMBL179872**	**CHEMBL183274**	**CHEMBL369392**	**AGONİST (CHEMBL3297811)**	**EN6**
PAINS uyarı	0	0	0	0	0	0	0
Brenk uyarı	0	0	0	0	0	0	0
Leadlikeness ihlali	3	3	3	3	3	3	3
Sentetik erişilebilirlik	3.89	3.53	3.76	3.94	3.77	3.41	3.62

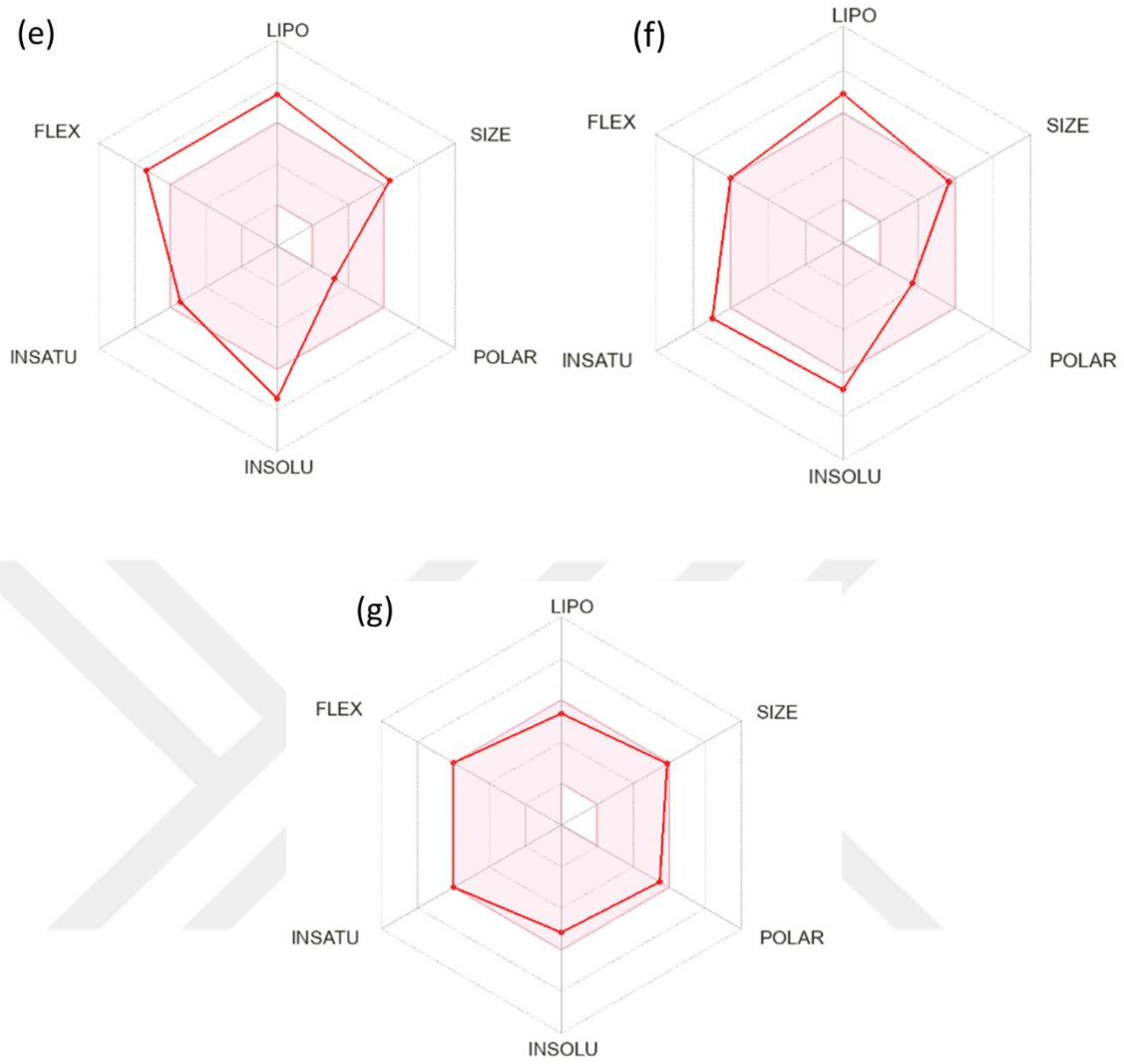
Çizelge 4.4. admetSAR sonuçları.

admetSAR sonuçlarında "+" etiketi Pozitif/Toksik anlamına gelirken "-" Negatif/Nontoksik anlamına gelir.

	CHEMBL176088	CHEMBL179493	CHEMBL179872	CHEMBL183274	CHEMBL369392	AGONİST (CHEMBL3297811)	EN6
Ames mutajenezi	-	-	-	-	-	+	+
Akut Oral Toksisite (c)	III	III	III	III	III	III	III
Androjen reseptör bağlanması	+	+	+	+	+	+	+
Aromataz bağlanması	+	+	+	-	+	+	+
Kan beyin bariyeri	+	+	+	-	+	+	+
BRCP inhibitörü	-	-	-	-	-	-	-
BSEP inhibitörü	+	+	+	+	+	+	+
Caco-2	-	-	-	-	-	-	-
Kanserojenite (ikili)	-	-	-	-	-	-	-
CYP1A2 inhibisyonu	+	+	+	-	+	+	+
CYP2C19 inhibisyonu	+	+	+	-	+	+	+
CYP2C8 inhibisyonu	+	+	+	+	+	+	+
CYP2C9 inhibisyonu	+	+	+	+	+	+	+
CYP2C9 substratı	-	-	-	-	-	-	-
CYP2D6 inhibisyonu	-	-	+	-	+	-	-
CYP2D6 substratı	+	+	+	-	+	-	-
CYP3A4 inhibisyonu	+	-	+	+	+	+	+
CYP3A4 substratı	+	+	+	+	+	+	+
CYP engelleyici karışıklık	+	+	+	+	+	+	+
Göz korozyonu	-	-	-	-	-	-	-
Göz tahrişi	-	-	-	-	-	-	-
Östrojen reseptör bağlanması	+	+	+	+	+	+	+
Glukokortikoid reseptör bağlanması	+	+	+	+	+	+	+
Hepatotoksisite	+	+	+	+	+	-	+
İnsan Ether-a-go-go-İlgili Gen inhibisyonu	+	+	+	+	+	+	+
İnsan Bağırsak Emilimi	+	+	+	+	+	+	+
İnsan oral biyoyararlanımı	+	+	+	-	+	+	+
MATE1 inhibitörü	-	-	-	-	-	-	-
Mitokondriyal toksisite	-	+	-	+	-	+	+
Mikronükleer	+	+	+	+	+	+	+
Nefrotoksisite	-	+	-	-	-	-	-
Akut oral toksisite (log(1/(mol/kg)))	2.5317	2.6011	2.5141	2.2431	2.2921	2.3969	2.3863
OATP1B1 inhibitörü	+	+	+	+	+	+	+
OATP1B3 inhibitörü	+	+	+	+	+	+	+
OATP2B1 inhibitörü	-	-	-	+	-	-	-
OCT1 inhibitörü	-	-	-	-	-	-	-
OCT2 inhibitörü	-	-	-	-	-	-	-
P-glikoprotein inhibitörü	+	+	+	+	+	+	+
P-glikoprotein substratı	+	+	+	+	+	+	+
PPAR gama	+	+	+	+	+	+	+
Plazma protein bağlanması	1.0384	1.1486	1.1148	0.8870	1.0653	0.8809	1.0437
Üreme toksisitesi	+	+	+	+	+	+	+
Solunum toksisitesi	+	+	+	+	+	+	+
Cilt korozyonu	-	-	-	-	-	-	-
Cilt tahrişi	-	-	-	-	-	-	-
cilt hassasiyeti	-	-	-	-	-	-	-
Hücre altı lokalizasyonu	Mitokondri	Mitokondri	Mitokondri	Mitokondri	Mitokondri	Mitokondri	Mitokondri
Tiroid reseptör bağlanması	+	+	+	+	+	+	+
UGT katalize edilmiş durumda	-	-	-	-	-	-	+
Suda çözünürlüğü (logS)	-4.8043	-4.1978	-4.8896	-4.0795	-4.8896	-3.9044	-3.5701



Şekil 4.24. Ligandların oral biyoyararlanım alanı analizi sonuçları. (a) CHEMBL176088, (b) CHEMBL179493, (c) CHEMBL179872 ve (d) CHEMBL183274



Şekil 4.25. Ligandların oral biyoyararlanım alanı analizi sonuçlarının devamı. (e) CHEMBL369392, (f) Agonist (CHEMBL3297811) ve (g) EN6

Yapılan ADME-T analizlerinin ilaç keşfi ve tasarımı çalışmalarının erken aşamalarında ilaç öncü moleküllerinin özelliklerinin optimize edilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. *in silico* ADME-T çalışmaları ile öncü moleküllerin iyileştirilmesi düşünülen özellikleri tespit edilebilir ve buna yönelik çalışmalar yapılabilir. Böylece öncü moleküller *in vivo* deneyler öncesinde olası başarısızlıkları en aza indirmek için düzenlenebilir.

Sonuç olarak, ligand seçiminde herhangi bir kısıtlama veya gruplandırma yapılmamasına rağmen, MD simülasyonları sonucunda seçilen 5 liganddan 4 tanesinin (CHEMBL176088, CHEMBL179493, CHEMBL179872 ve CHEMBL369392) Melanin

Konsantre Edici Hormon Reseptörü 1 (Melanin- Concentrating Hormone Receptor 1: MCHR1) proteininin ligandları olduğu görülmüştür. CHEMBL183274 ligandı ise Gonadotropin Salgılayan Hormon Reseptörü (Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor 1: GNRH1) ile ilişkili bir liganddır.

BÖLÜM 5

SONUÇ

GPCR'ler farklı sistem ve hastalık türlerinde aktif rol oynamaları nedeni ile ilgici çekici terapötik hedeflerin başında yer almaktadır. Günümüzde gelişen teknolojiyle beraber yapıları ortaya konmuş GPCR'ler ilaç keşfi ve tasarımı çalışmalarında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanı sıra GPCR'lerin çoğu endojen molekülleri tanımlan(a)mamış orphan (yetim) reseptörüdür. Memeli sinir sisteminde Huntington ve Alzheimer hastalıkları gibi bazı nörodejeneratif bozukluklarında rol alan GPR52 de bir orphan reseptör ve reseptörü hedef alan herhangi bir ilaç henüz tanımlanmamıştır. Dikkat çekici bir terapötik hedef olan GPR52 için bu tez çalışmasında öncü bir ilaç aday molekülü tanımlamak amacıyla küçük molekül kütüphanesi hazırlama, farmakofor modelleme, moleküler yerleştirme, skorlama, moleküler dinamik simülasyonları, bağlanma serbest enerjisinin hesaplanması ve *in silico* farmakokinetik yöntemleri kullanılarak araştırma yapılmıştır. ADME-T tahminleri için çeşitli araçlar kullanılmıştır. Bu çalışma, A sınıfı GPCR'lerin bilinen ligandlarından oluşturulan küçük molekül kütüphanesi, GPR52'nin bilinen agonistlerinden oluşturulan molekül kütüphanesi ve EN6 ligandı taranarak gerçekleştirilmiştir. GPR52'nin EN6 ligandı kullanılarak bir farmakofor modeli oluşturulmuş ve kütüphaneler bu doğrultuda taranmıştır. Tarama sonucu ile belirlenen kütüphanelerdeki moleküller kullanılarak proteine moleküler yerleştirme işlemi uygulanmıştır. EN6 ve GPR52'nin bilinen agonistler kontrol grubu

olarak seçilmiş olmalarına rağmen yapılan moleküler yerleştirme ve skorlama işlemleri sonrasında agonistlerin gerekli koşulları sağlayamaması sonucunda kontrol ve eşik değeri olarak EN6 ligandı ile devam edilmiştir fakat sonuçlar hakkında daha fazla bilgi edinmek için skorlama sonucunda en iyi sonucu veren bilinen agonist olan CHEMBL3297811 de diğer aşamalara dahil edilmiştir. Bağlanma bölgesinde bulunan Tyr34, Cys40, Asp188, Phe300, Tyr185, Ser299 ve Thr303 rezidülerinin tüm ligandlar ile çeşitli etkileşimlere girerek moleküler yerleştirme sırasında aktif rol aldığı gözlemlenmiştir. Skorlama sonrasında iyi sonuç verdiği tespit edilen CHEMBL176088, CHEMBL179493, CHEMBL179872, CHEMBL183274, CHEMBL2096778, CHEMBL369392 ligandları, bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 için 100 ns'lik moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiş ve bağlanma serbest enerjisi hesaplamalanmıştır. MD simülasyonları sonucunda RMSD grafikleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda, CHEMBL176088 ve CHEMBL179872 ligand protein komplekslerinin bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 ligand protein komplekslerinin değişim ve hareketine kıyasla daha fazla hareket ve değişim göstermesi, diğer ligandlardan farklı bir etkiye sahip olabileceği bunun validasyonunun ise *in vitro* deneyler ile sağlanabileceği düşünülmektedir. Bu işlemlerin analizi sonucunda, EN6 ligandı ve ondan iyi sonuç vermiş olan CHEMBL176088, CHEMBL179493, CHEMBL179872, CHEMBL183274, CHEMBL2096778 ve CHEMBL369392 ligandlarının yanısıra bilinen agonist (CHEMBL3297811) ligandının MD simülasyonlarının 98.ns'deki protein-ligand etkileşimleri özellikle moleküler yerleştirme sonucunda elde edilen etkileşimler ile incelendiğinde Tyr34, Cys40, Asp188, Phe300, Tyr185, Ser299 ve Thr303 rezidülerinin CHEMBL369392, Agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 ligandları dışında kalan tüm ligandlar ile çeşitli hidrojen bağları ve etkileşimlere (van der Waals, pi, alkil vb.) ile girdiği, CHEMBL369392 ve EN6 ligandlarının ise Tyr185 dışında kalan diğer rezidüler ile (Tyr34, Cys40, Asp188, Phe300, Ser299 ve Thr303), agonist CHEMBL3297811 ligandının ise Ser299 dışındaki rezidüler (Tyr34, Cys40, Asp188, Phe300, Tyr185ve Thr303) ile çeşitli etkileşimlerde bulunduğu gözlenmiştir.

Seçilen 5 ligand, agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 için ADME-T özelliklerinin araştırması çeşitli araçlar kullanılmıştır. Ligandların biyodegradasyon özelliğine sahip olduğu, hepatoksisite gösterdiği, cilt ve göz tahrişi özelliklerinin ise nontoksik olduğu gözlemlenmiştir. Oral biyoyararlanım puanları CHEMBL176088,

CHEMBL179872, CHEMBL369392 için 0.17; CHEMBL179493, CHEMBL183274, agonist (CHEMBL3297811) ve EN6 için ise 0.55 olan ligandların kanserojenik özellik göstermediği ve 3.sınıf Akut Oral Toksisite sınıfında bulunduğu tespit edilmiştir. Ligandların sentetik erişilebilirliklerinin göreceli olarak daha kolay erişilebilir çıkmış olması da önemlidir. Çünkü CADD ile yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilen moleküllerin, ilaç keşfi ve tasarımı çalışmalarında ilaç aday molekülleri olarak sentezlenebilir olması gerekmektedir. Son olarak seçilen 5 ligandın tümü A sınıfı GPCR'ler ile ilişkili olan ligandlar oldukları için hem tez çalışmasındaki hedef molekül olan GPR52 hem de kendi hedef molekülleri için *in vitro* ve *in vivo* deneyleri için olası ilaç aday molekülleri olabilecekleri yapılan çalışmalar sonucunda düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

A Beginner's Guide to Perform Molecular Dynamics Simulation of a Membrane Protein using GROMACS — GROMACS tutorials https://tutorials.gromacs.org documentation. (t.y.). Geliş tarihi 01 Aralık 2023, gönderen https://tutorials.gromacs.org/docs/membrane-protein.html

Abagyan, R., Totrov, M., & Kuznetsov, D. (1994). ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of Computational Chemistry*, *15*(5), 488-506.

Adcock, S. A., & McCammon, J. A. (2006). Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chemical reviews*, *106*(5), 1589-1615.

Alavi, M. S., Shamsizadeh, A., Azhdari-Zarmehri, H., & Roohbakhsh, A. (2018). Orphan G protein-coupled receptors: The role in CNS disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *98*, 222-232.

Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of chemical physics*, *27*(5), 1208-1209.

Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., … Yao, C. (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, *176*(Suppl 1), S21-S141.

Alexander, S. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., … Southan, C. (2021). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2021/22: Introduction and other protein targets. *British journal of pharmacology*, *178*, S1-S26.

Allen, W. J., Balius, T. E., Mukherjee, S., Brozell, S. R., Moustakas, D. T., Lang, P. T., … Rizzo, R. C. (2015). DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *Journal of Computational Chemistry*, *36*(15), 1132-1156.

Alonso, H., Bliznyuk, A. A., & Gready, J. E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal Research Reviews*, *26*(5), 531-568.

Anderson, A. C. (2003). The Process of Structure-Based Drug Design. *Chemistry & Biology*, *10*(9), 787-797.

Andricopulo, A. D., Salum, L. B., & Abraham, D. J. (2009). Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current topics in medicinal chemistry*, *9*(9), 771-790.

Åqvist, J., Medina, C., & Samuelsson, J.-E. (1994). A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Engineering, Design and Selection*, *7*(3), 385-391.

Attwood, T. K., & Findlay, J. B. C. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Engineering, Design and Selection*, *7*(2), 195-203.

Batool, M., Ahmad, B., & Choi, S. (2019). A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(11), 2783.

Baxter, J. (1981). Local optima avoidance in depot location. *Journal of the Operational Research Society*, *32*(9), 815-819.

Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, *81*(8), 3684-3690.

Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., & van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, *91*(1), 43-56.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., … Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235-242.

Bharath, E. N., Manjula, S. N., & Vijaychand, A. (2011). In silico drug design tool for overcoming the innovation deficit in the drug discovery process. *Int J Pharm Pharm Sci*, *3*(2), 8-12.

BIOVIA Discovery Studio—BIOVIA - Dassault Systèmes®. (t.y.). Geliş tarihi 01 Ekim 2023, gönderen https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/

Bolton, E. E., Wang, Y., Thiessen, P. A., & Bryant, S. H. (2008). Annual reports in computational chemistry. *PubChem: İntegrated platform of small molecules and biological activities*. American Chemical Society Washington, DC.

Bradford, S. S., & Cowan, J. A. (2014). From traditional drug design to catalytic metallodrugs: A brief history of the use of metals in medicine. *Metallodrugs*, *1*(1).

Brandsdal, B. O., Österberg, F., Almlöf, M., Feierberg, I., Luzhkov, V. B., & Åqvist, J. (2003). Free Energy Calculations and Ligand Binding. In: *Protein Simulations*: *C. 66. Advances in Protein Chemistry* (ss. 123-158). Academic Press.

Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. a, & Karplus, M. (1983). CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, *4*(2), 187-217.

Case, D. A., Cheatham III, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz Jr., K. M., … Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16), 1668-1688.

Cavagnaro, J. A. (2002). Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1*(6), 469-475.

Charifson, P. S., Corkery, J. J., Murcko, M. A., & Walters, W. P. (1999). Consensus Scoring: A Method for Obtaining Improved Hit Rates from Docking Databases of Three-Dimensional Structures into Proteins. *Journal of Medicinal Chemistry*, *42*(25), 5100-5109.

Christ, C. D., Mark, A. E., & van Gunsteren, W. F. (2010). Basic ingredients of free energy calculations: A review. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(8), 1569-1582.

Compound Sourcing, Selling and Purchasing Platform. (t.y.). Geliş tarihi 10 Ekim 2023, gönderen Molport website: https://www.molport.com/shop/index

Congreve, M., Graaf, C. de, Swain, N. A., & Tate, C. G. (2020). Impact of GPCR Structures on Drug Discovery. *Cell*, *181*(1), 81-91.

Congreve, M., Langmead, C. J., Mason, J. S., & Marshall, F. H. (2011). Progress in Structure Based Drug Design for G Protein-Coupled Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *54*(13), 4283-4311.

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, *7*(1), 42717.

Dalby, A., Nourse, J. G., Hounshell, W. D., Gushurst, A. K. I., Grier, D. L., Leland, B. A., & Laufer, J. (1992). Description of several chemical structure file formats used by computer programs developed at Molecular Design Limited. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, *32*(3), 244-255.

DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, *47*, 20-33.

Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., & Liang, J. (2006). CASTp: Computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*, *34*(Web Server issue), W116-W118.

Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). NNScore 2.0: A Neural-Network Receptor–Ligand Scoring Function. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *51*(11), 2897-2903.

Egan, W. J., Merz, Kenneth M., & Baldwin, J. J. (2000). Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(21), 3867-3877.

Ekberg, V., & Ryde, U. (2021). On the Use of Interaction Entropy and Related Methods to Estimate Binding Entropies. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *17*(8), 5379-5391.

Ertl, P., & Schuffenhauer, A. (2009). Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. *Journal of Cheminformatics*, *1*, 8.

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of chemical physics*, *103*(19), 8577-8593.

Evans, D. J., & Holian, B. L. (1985). The Nose–Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, *83*(8), 4069-4074.

Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, *7*(2), 83-89.

Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, *20*(7), 13384-13421.

Foster, S. R., Hauser, A. S., Vedel, L., Strachan, R. T., Huang, X.-P., Gavin, A. C., … Gloriam, D. E. (2019). Discovery of Human Signaling Systems: Pairing Peptides to G Protein-Coupled Receptors. *Cell*, *179*(4), 895-908.e21.

Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., … 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.

Fuller, J. C., Burgoyne, N. J., & Jackson, R. M. (2009). Predicting druggable binding sites at the protein-protein interface. *Drug Discovery Today*, *14*(3-4), 155-161.

Gaulton, A., Bellis, L. J., Bento, A. P., Chambers, J., Davies, M., Hersey, A., … Overington, J. P. (2012). ChEMBL: A large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D1100-D1107.

Gene symbol report | HUGO Gene Nomenclature Committee. (t.y.). Geliş tarihi 27 Eylül 2023, gönderen https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:4508

Ghersi, D., & Sanchez, R. (2011). Beyond structural genomics: Computational approaches for the identification of ligand binding sites in protein structures. *Journal of structural and functional genomics*, *12*(2), 109-117.

Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, *1*(1), 55-68.

Goodnow, R., & Gillespie, P. (2007). 1Hit and Lead Identification: Efficient Practices for Drug Discovery. İçinde F. D. King & G. Lawton (Ed.), *Progress in Medicinal Chemistry* (C. 45, ss. 1-61). Elsevier.

GROMACS 2022.5 Manual. (t.y.).

Grubmüller, H., Heller, H., Windemuth, A., & Schulten, K. (1991). Generalized Verlet Algorithm for Efficient Molecular Dynamics Simulations with Long-range Interactions. *Molecular Simulation*, *6*(1-3), 121-142.

Haberman, A. (2005). Strategies to move beyond target validation. *Genetic Engineering News*, *25*.

Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, *17*(5-6), 490-519.

Harmar, A. J. (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology*, *2*(12), reviews3013.1-reviews3013.10.

Hata, H., Phuoc Tran, D., Marzouk Sobeh, M., & Kitao, A. (2021). Binding free energy of protein/ligand complexes calculated using dissociation Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics and Markov state model. *Biophysics and Physicobiology*, *18*, 305-316.

Heo, L., Shin, W.-H., Lee, M. S., & Seok, C. (2014). GalaxySite: Ligand-binding-site prediction by using molecular docking. *Nucleic Acids Research*, *42*(Web Server issue), W210-W214.

Hess, B. (2008). P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *4*(1), 116-122.

Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *18*(12), 1463-1472.

Hetényi, C., & van der Spoel, D. (2002). Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Science*, *11*(7), 1729-1737.

Hetényi, C., & van der Spoel, D. (2006). Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues. *FEBS Letters*, *580*(5), 1447-1450.

Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature structural & molecular biology*, *25*(1), 4-12.

Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, *99*(6), 1129-1143.

https://github.com/durrantlab/nnscore2. (t.y.).

Hu, G.-M., Mai, T.-L., & Chen, C.-M. (2017). Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Scientific Reports*, *7*(1), 15495.

Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., de Groot, B. L., … MacKerell, A. D. (2017). CHARMM36m: An Improved Force Field for Folded and Intrinsically Disordered Proteins. *Nature methods*, *14*(1), 71-73.

Insel, P. A., Sriram, K., Gorr, M. W., Wiley, S. Z., Michkov, A., Salmerón, C., & Chinn, A. M. (2019). GPCRomics: An approach to discover GPCR drug targets. *Trends in pharmacological sciences*, *40*(6), 378-387.

Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC− a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, *45*(1), 177-182.

Jayachandran, P., Ilango, S., Paital, B., Bhanja, S., & Nirmaladevi, R. (2021). Approaches for network based drug discovery. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, *13*(1), 30-43.

Jendele, L., Krivak, R., Skoda, P., Novotny, M., & Hoksza, D. (2019). PrankWeb: A web server for ligand binding site prediction and visualization. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W345-W349.

Jiménez, J, Doerr, S., Martínez-Rosell, G., Rose, A. S., & De Fabritiis, G. (2017). DeepSite: Protein-binding site predictor using 3D-convolutional neural networks. *Bioinformatics*, *33*(19), 3036-3042.

Jiménez, José, Škalič, M., Martínez-Rosell, G., & De Fabritiis, G. (2018). KDEEP: Protein–Ligand Absolute Binding Affinity Prediction via 3D-Convolutional Neural Networks. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *58*(2), 287-296.

Jo, S., Kim, T., & Im, W. (2007). Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. *PLOS ONE*, *2*(9), e880.

Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, *29*(11), 1859-1865.

Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking11Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, *267*(3), 727-748.

Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, *79*(2), 926-935.

Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J. (1996). Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, *118*(45), 11225-11236.

Kalyaanamoorthy, S., & Chen, Y.-P. P. (2011). Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discovery Today*, *16*(17), 831-839.

Kar, S., & Leszczynski, J. (2020). Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *15*(12), 1473-1487.

Kdeep: A protein-ligand binding affinity predictor [WEB APP]. (t.y.). Geliş tarihi 05 Aralık 2023, gönderen https://www.playmolecule.com/Kdeep/

Kirkwood, J. G. (1935). Statistical mechanics of fluid mixtures. *The Journal of chemical physics*, *3*(5), 300-313.

Koes, D. R., & Camacho, C. J. (2011). Pharmer: Efficient and Exact Pharmacophore Search. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *51*(6), 1307-1314.

Koes, D. R., & Camacho, C. J. (2012). ZINCPharmer: Pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Research*, *40*(Web Server issue), W409-W414.

Kolakowski, L. F. (1994). GCRDb: A G-protein-coupled receptor database. *Receptors & Channels*, *2*(1), 1-7.

Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., … Cheatham, T. E. (2000). Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Accounts of Chemical Research*, *33*(12), 889-897.

Komatsu, H. (2015). Novel Therapeutic GPCRs for Psychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(6), 14109-14121.

Komatsu, H., Maruyama, M., Yao, S., Shinohara, T., Sakuma, K., Imaichi, S., … Mori, M. (2014). Anatomical Transcriptome of G Protein-Coupled Receptors Leads to the Identification of a Novel Therapeutic Candidate GPR52 for Psychiatric Disorders. *PLoS ONE*, *9*(2), e90134.

Kontoyianni, M. (2017). Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. In: I. M. Lazar, M. Kontoyianni, & A. C. Lazar (Ed.), *Proteomics for Drug Discovery: Methods and Protocols* (ss. 255-266). New York, NY: Springer.

Kooistra, A. J., Mordalski, S., Pándy-Szekeres, G., Esguerra, M., Mamyrbekov, A., Munk, C., … Gloriam, D. E. (2020). GPCRdb in 2021: İntegrating GPCR sequence, structure and function. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D335-D343.

Krutzke, S. K., Engels, H., Hofmann, A., Schumann, M. M., Cremer, K., Zink, A. M., … Reutter, H. (2016). Array-based molecular karyotyping in fetal brain

malformations: Identification of novel candidate genes and chromosomal regions. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *106*(1), 16-26.

Lin, X., Li, M., Wang, N., Wu, Y., Luo, Z., Guo, S., … Xu, F. (2020). Structural basis of ligand recognition and self-activation of orphan GPR52. *Nature*, *579*(7797), 152-157.

Lipinski, C. A. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *44*(1), 235-249.

Liu, Z., Su, M., Han, L., Liu, J., Yang, Q., Li, Y., & Wang, R. (2017). Forging the Basis for Developing Protein–Ligand Interaction Scoring Functions. *Accounts of Chemical Research*, *50*(2), 302-309.

Lomize, A. L., Todd, S. C., & Pogozheva, I. D. (2022). Spatial arrangement of proteins in planar and curved membranes by PPM 3.0. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *31*(1), 209-220.

Lomize, M. A., Lomize, A. L., Pogozheva, I. D., & Mosberg, H. I. (2006). OPM: Orientations of Proteins in Membranes database. *Bioinformatics*, *22*(5), 623-625.

Lourenço, H. R., Martin, O. C., & Stützle, T. (2003). Iterated local search. In: *Handbook of metaheuristics* (ss. 320-353). Springer.

Macalino, S. J. Y., Gosu, V., Hong, S., & Choi, S. (2015). Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research*, *38*(9), 1686-1701.

MacKerell, A. D. Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L. Jr., Evanseck, J. D., Field, M. J., … Karplus, M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, *102*(18), 3586-3616.

Mandal, S., Moudgil, M., & Mandal, S. K. (2009). Rational drug design. *European Journal of Pharmacology*, *625*(1-3), 90-100.

Massova, I., & Kollman, P. A. (2000). Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, *18*(1), 113-135.

McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, *267*(5612), 585-590.

Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, *7*(2), 146-157.

Merlot, C. (2010). Computational toxicology—A tool for early safety evaluation. *Drug Discovery Today*, *15*(1), 16-22.

Moroy, G., Martiny, V. Y., Vayer, P., Villoutreix, B. O., & Miteva, M. A. (2012). Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *17*(1), 44-55.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785-2791.

Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular Docking. In: A. Kukol (Ed.), *Molecular Modeling of Proteins* (ss. 365-382). Totowa, NJ: Humana Press.

Muegge, I., Heald, S. L., & Brittelli, D. (2001). Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(12), 1841-1846.

Murcko, M. A. (1995). Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes. *Journal of medicinal chemistry*, *38*(26), 4953-4967.

Nakahata, T., Tokumaru, K., Ito, Y., Ishii, N., Setoh, M., Shimizu, Y., … Aso, K. (2018). Design and synthesis of 1-(1-benzothiophen-7-yl)-1H-pyrazole, a novel series of G protein-coupled receptor 52 (GPR52) agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *26*(8), 1598-1608.

Nelson, M. T., Humphrey, W., Gursoy, A., Dalke, A., Kale, L. V., Skeel, R. D., & Schulten, K. (1996). NAMD: A parallel, object-oriented molecular dynamics program. *International Journal of High Performance Computing Applications*, *10*(4), 251-268.

Nishiyama, K., Suzuki, H., Harasawa, T., Suzuki, N., Kurimoto, E., Kawai, T., … Shimojo, M. (2017). FTBMT, a Novel and Selective GPR52 Agonist, Demonstrates Antipsychotic-Like and Procognitive Effects in Rodents, Revealing a Potential Therapeutic Agent for Schizophrenia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *363*(2), 253-264.

Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *50*, 295-322.

Nocedal, J., & Wright, S. J. (Ed.). (1999). Sequential Quadratic Programming. In: *Numerical Optimization* (ss. 526-573). New York, NY: Springer.

O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, *3*(1), 33.

Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., & Van Gunsteren, W. F. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1656-1676.

OPM. (t.y.). Geliş tarihi 15 Ekim 2023, gönderen https://opm.phar.umich.edu/

Pantsar, T., & Poso, A. (2018). Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules*, *23*(8), 1899.

Parrinello, M., & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, *52*(12), 7182-7190.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605-1612.

Pharmacophore and Ligand-Based Design—BIOVIA - Dassault Systèmes®. (t.y.). Geliş tarihi 20 Kasım 2023, gönderen https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/pharmacophore/

Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B.-H., Vreven, T., & Weng, Z. (2014). ZDOCK server: İnteractive docking prediction of protein–protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*, *30*(12), 1771-1773.

Qing, X., Lee, X. Y., Raeymaecker, J. D., Tame, J. R., Zhang, K. Y., Maeyer, M. D., & Voet, A. R. (2014). Pharmacophore modeling: Advances, limitations, and current utility in drug discovery. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, *7*, 81-92.

Rajkishan, T., Rachana, A., Shruti, S., Bhumi, P., & Patel, D. (2021). Computer-Aided Drug Designing. In: V. Singh & A. Kumar (Ed.), *Advances in Bioinformatics* (ss. 151-182). Singapore: Springer.

Raju, V. N. G., Lakshmi, K. P., Jain, V. M., Kalidindi, A., & Padma, V. (2020). Study the Influence of Normalization/Transformation process on the Accuracy of Supervised Classification. *2020 Third International Conference on Smart Systems and Inventive Technology (ICSSIT)*, 729-735.

Rappe, A. K., Casewit, C. J., Colwell, K. S., Goddard, W. A. I., & Skiff, W. M. (1992). UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, *114*(25), 10024-10035.

RCSB PDB: Homepage. (t.y.). Geliş tarihi 23 Eylül 2023, gönderen https://www.rcsb.org/

RDKit: Open-source cheminformatics. https://www.rdkit.org. (t.y.).

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *459*(7245), 356-363.

Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., … Overington, J. P. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, *16*(1), 19-34.

Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D. K., Lynch, K. R., Cheng, R., Heng, H. H. Q., … O'Dowd, B. F. (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, ΨGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain1Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library under Accession Nos. AF096784-AF096786, AF100789.1. *Molecular Brain Research*, *64*(2), 193-198.

Schenone, M., Dančík, V., Wagner, B. K., & Clemons, P. A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature chemical biology*, *9*(4), 232-240.

Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology*, *142*(1), 94-101.

Schneider, P., Walters, W. P., Plowright, A. T., Sieroka, N., Listgarten, J., Goodnow, R. A., … Schneider, G. (2020). Rethinking drug design in the artificial intelligence era. *Nature Reviews Drug Discovery*, *19*(5), 353-364.

Schulte, G. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The Class Frizzled Receptors. *Pharmacological Reviews*, *62*(4), 632-667.

Setoh, M., Ishii, N., Kono, M., Miyanohana, Y., Shiraishi, E., Harasawa, T., … Kori, M. (2014). Discovery of the First Potent and Orally Available Agonist of the Orphan G-Protein-Coupled Receptor 52. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(12), 5226-5237.

Shoichet, B. K., & Kobilka, B. K. (2012). Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *33*(5), 268-272.

Shukla, R., & Tripathi, T. (2021). Molecular Dynamics Simulation in Drug Discovery: Opportunities and Challenges. In: S. K. Singh (Ed.), *Innovations and Implementations of Computer Aided Drug Discovery Strategies in Rational Drug Design* (ss. 295-316). Singapore: Springer. h

Singh, U. C., & Kollman, P. A. (1984). An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, *5*(2), 129-145.

Song, C. M., Lim, S. J., & Tong, J. C. (2009). Recent advances in computer-aided drug design. *Briefings in Bioinformatics*, *10*(5), 579-591.

Sriram, K., & Insel, P. A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular Pharmacology*, *93*(4), 251-258.

Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Chapter Four—Use of molecular docking computational tools in drug discovery. İçinde D. R. Witty & B. Cox (Ed.), *Progress in Medicinal Chemistry* (C. 60, ss. 273-343). Elsevier.

Sunseri, J., & Koes, D. R. (2016). Pharmit: İnteractive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Research, 44*(W1), W442-W448.

Taft, C. A., Silva, V. B. da, & Silva, C. H. T. de P. da. (2008). Current topics in computer-aided drug design. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 97*(3), 1089-1098.

Thompson, L. A., & Ellman, J. A. (1996). Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries. *Chemical Reviews*, *96*(1), 555-600.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: İmproving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational chemistry*, *31*(2), 455-461.

Valdés-Tresanco, M. S., Valdés-Tresanco, M. E., Valiente, P. A., & Moreno, E. (2021). gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *17*(10), 6281-6291.

Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16), 1701-1718.

Van Drie, J. H. (2007). Computer-aided drug design: The next 20 years. *Journal of Computer-Aided Molecular Design, 21*(10), 591-601.

Vane, J. R., & Botting, R. M. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research, 110*(5), 255-258.

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(12), 2615-2623.

Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *494*(7436), 185-194.

Volkamer, A., Griewel, A., Grombacher, T., & Rarey, M. (2010). Analyzing the Topology of Active Sites: On the Prediction of Pockets and Subpockets. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *50*(11), 2041-2052.

Wang, E., Sun, H., Wang, J., Wang, Z., Liu, H., Zhang, J. Z. H., & Hou, T. (2019). End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. *Chemical Reviews*, *119*(16), 9478-9508.

Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(9), 1157-1174.

Wang, P., Felsing, D. E., Chen, H., Stutz, S. J., Murphy, R. E., Cunningham, K. A., … Zhou, J. (2020). Discovery of Potent and Brain-Penetrant GPR52 Agonist that Suppresses Psychostimulant Behavior. *Journal of medicinal chemistry*, *63*(22), 13951-13972.

Wang, X., Song, K., Li, L., & Chen, L. (2018). Structure-based drug design strategies and challenges. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *18*(12), 998-1006.

Weininger, D. (1988). SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, *28*(1), 31-36.

Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., & Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, *70*(5), 1129-1143.

Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., … Woolsey, J. (2006). DrugBank: A comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research*, *34*(suppl_1), D668-D672.

Wolber, G., & Langer, T. (2005). LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *45*(1), 160-169.

Wu, F., Zhou, Y., Li, L., Shen, X., Chen, G., Wang, X., … Huang, Z. (2020). Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development. *Frontiers in Chemistry*, *8*, 726.

Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., … Wang, M.-W. (2021). G protein-coupled receptors: Structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 1-27.

Yang, H., Lou, C., Sun, L., Li, J., Cai, Y., Wang, Z., … Tang, Y. (2019). admetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*, *35*(6), 1067-1069.

Yao, Y., Cui, X., Al-Ramahi, I., Sun, X., Li, B., Hou, J., … Ma, L. (2015). A striatal-enriched intronic GPCR modulates huntingtin levels and toxicity. *Elife*, *4*, e05449.

Yau, M. Q., Emtage, A. L., Chan, N. J. Y., Doughty, S. W., & Loo, J. S. E. (2019). Evaluating the performance of MM/PBSA for binding affinity prediction using class A GPCR crystal structures. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *33*(5), 487-496.

Yau, M. Q., Emtage, A. L., & Loo, J. S. E. (2020). Benchmarking the performance of MM/PBSA in virtual screening enrichment using the GPCR-Bench dataset. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *34*(11), 1133-1145.

Yu, J., Zhou, Y., Tanaka, I., & Yao, M. (2010). Roll: A new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. *Bioinformatics*, *26*(1), 46-52.

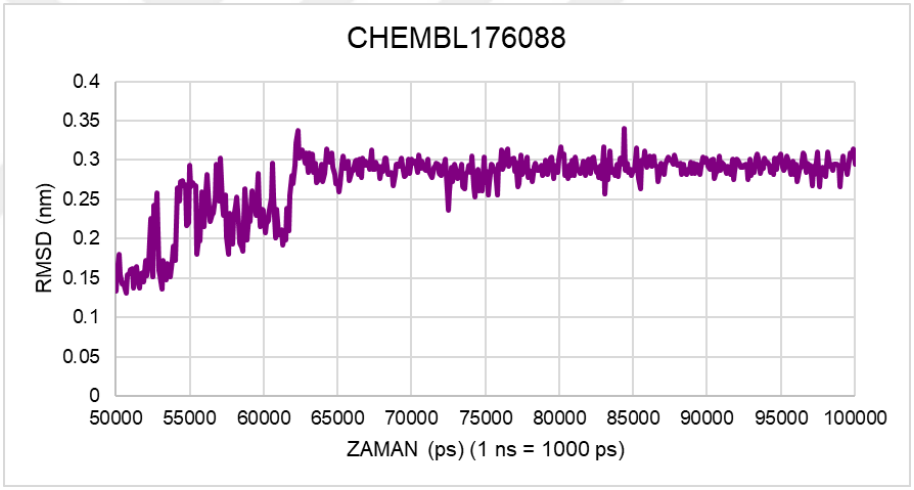
Zhang, Z., Li, Y., Lin, B., Schroeder, M., & Huang, B. (2011). Identification of cavities on protein surface using multiple computational approaches for drug binding site prediction. *Bioinformatics*, *27*(15), 2083-2088.

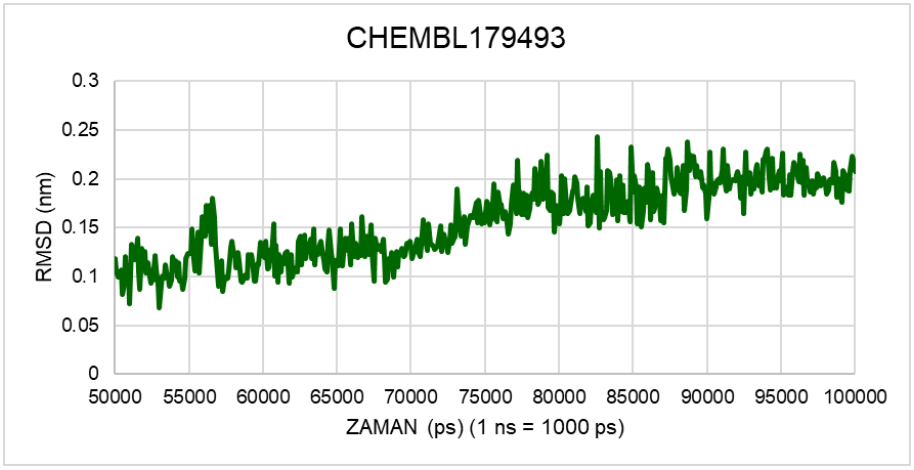
Zwanzig, R. W. (1954). High-temperature equation of state by a perturbation method. I. Nonpolar gases. *The Journal of Chemical Physics*, *22*(8), 1420-1426.

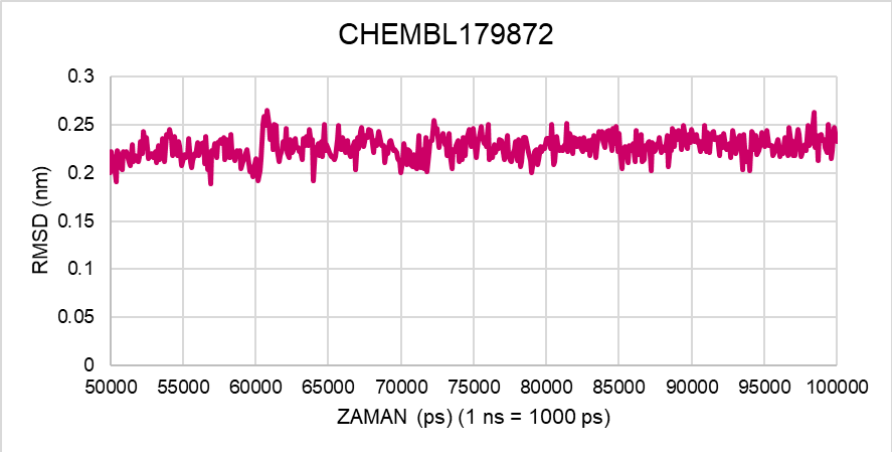
EKLER

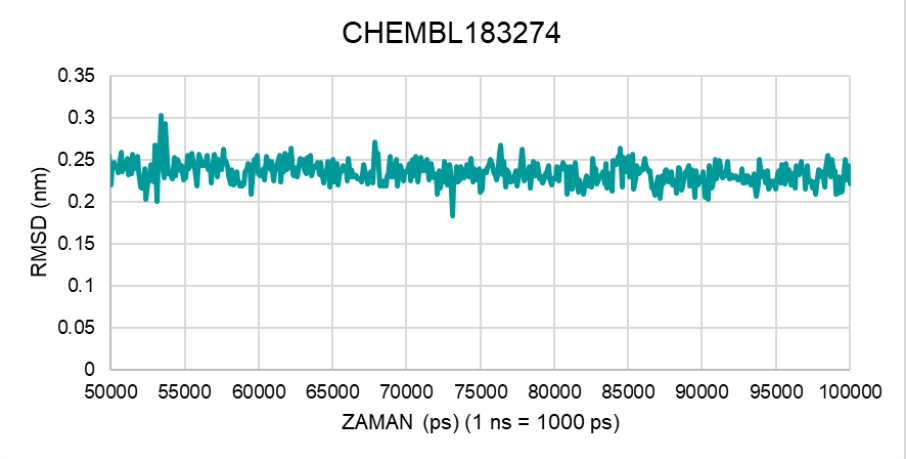
EK 1. Ligandların RMSD grafikleri.

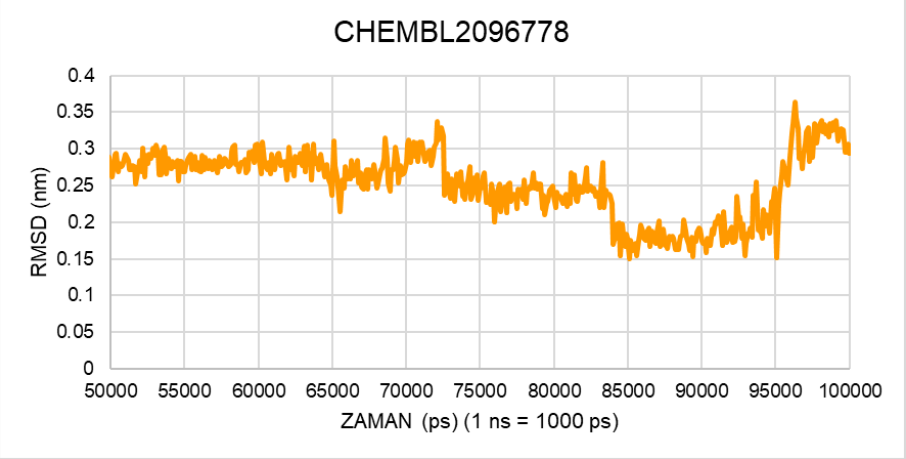
Sırası ile CHEMBL176088, CHEMBL179493, CHEMBL179872, CHEMBL183274, CHEMBL2096778, CHEMBL369392, bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve oijinal ligand EN6'nın son 50 ns'lik RMSD grafikleri

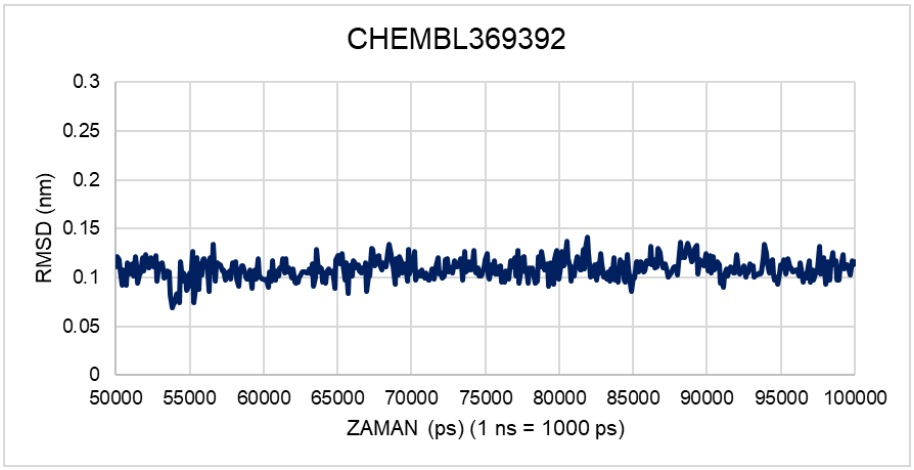


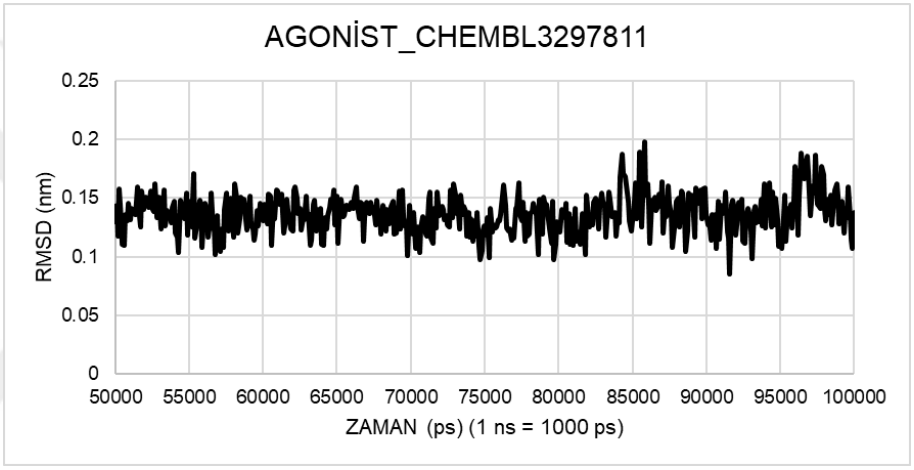


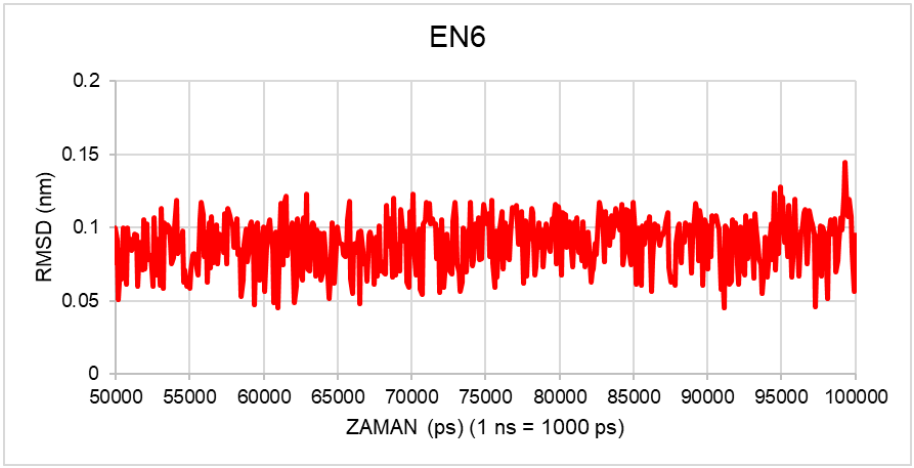

CHEMBL179872
RMSD (nm)
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)


CHEMBL183274
RMSD (nm)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)


CHEMBL2096778
RMSD (nm)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)

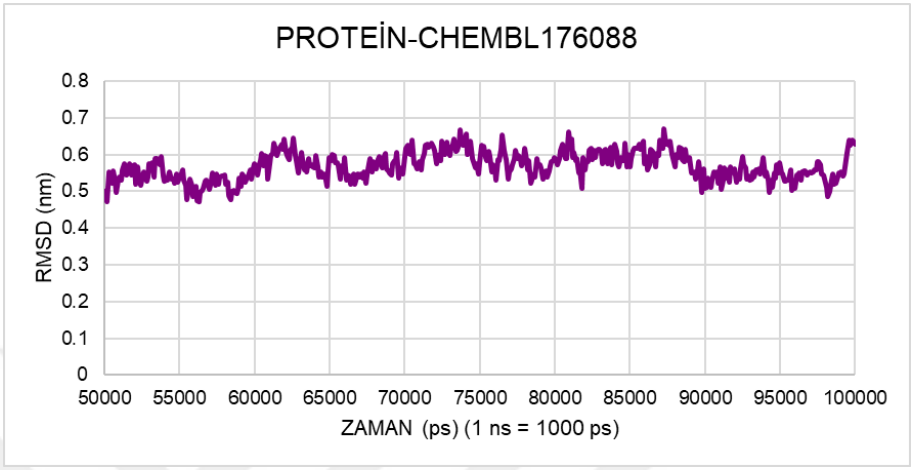

CHEMBL369392
RMSD (nm)
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)

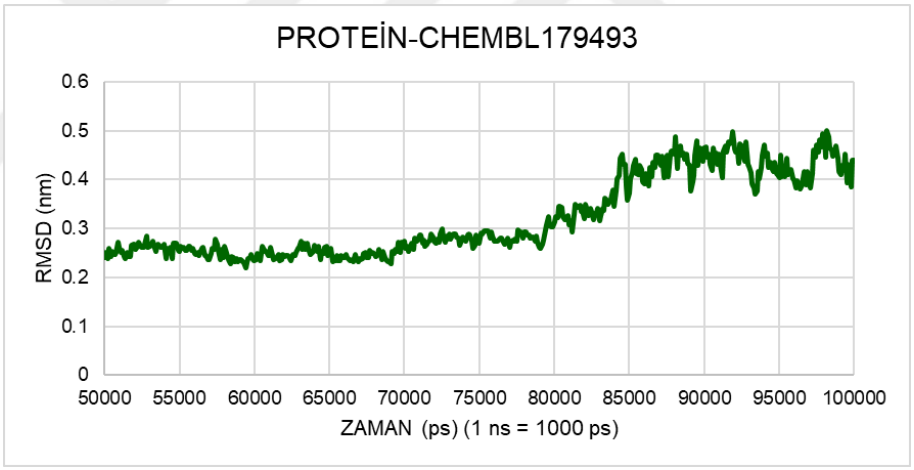

AGONİST_CHEMBL3297811
RMSD (nm)
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)

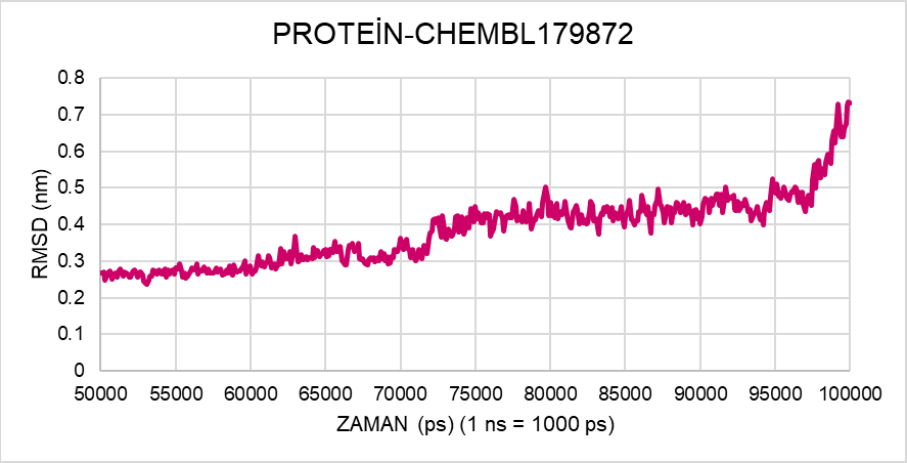

EN6
RMSD (nm)
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)

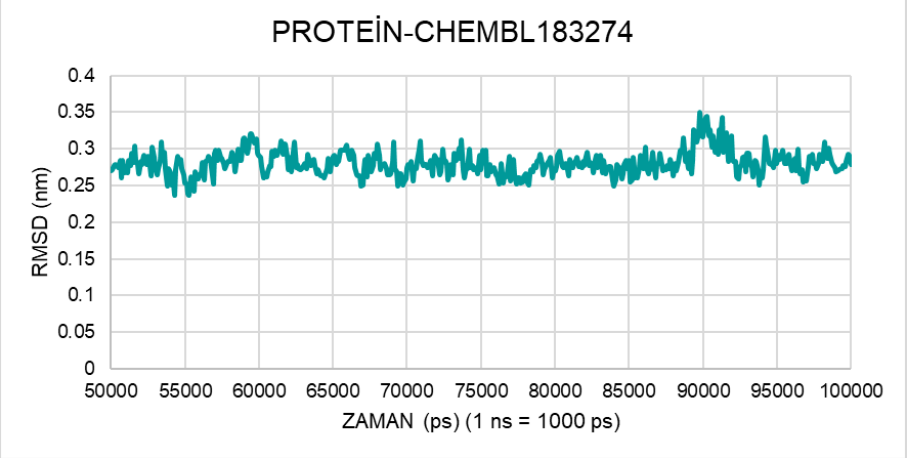
EK 2. Protein-ligand komplekslerinin RMSD grafikleri.

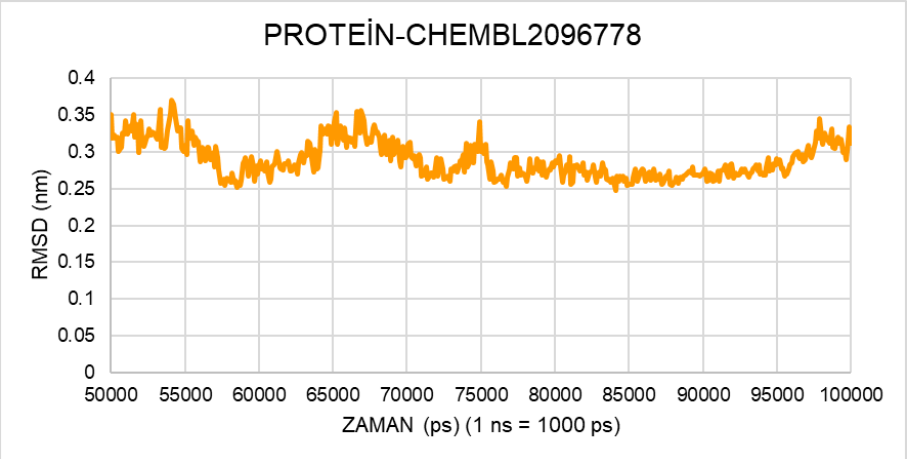
Sırası ile CHEMBL176088, CHEMBL179493, CHEMBL179872, CHEMBL183274, CHEMBL2096778, CHEMBL369392, bilinen agonist (CHEMBL3297811) ve oijinal ligand EN6 protein-ligand komplekslerinin son 50 ns'lik RMSD grafikleri

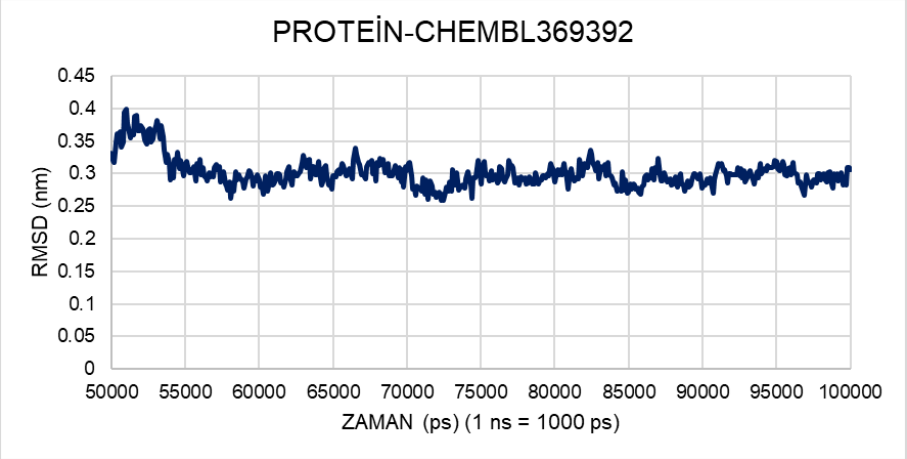


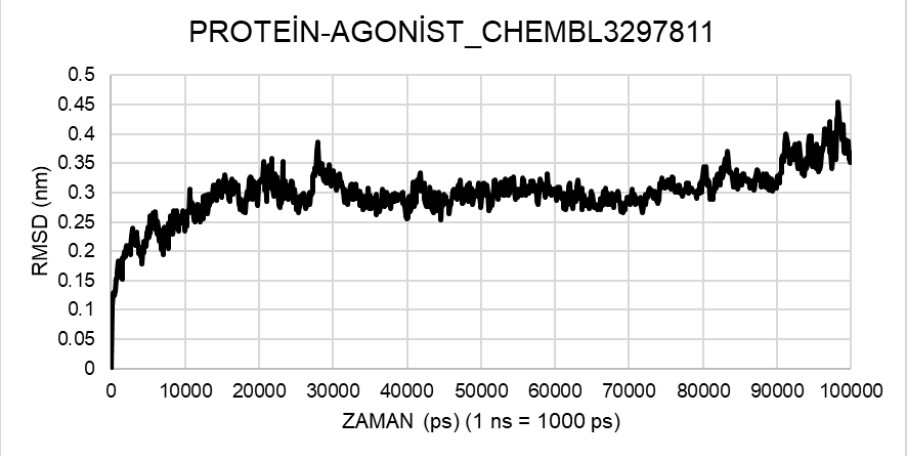


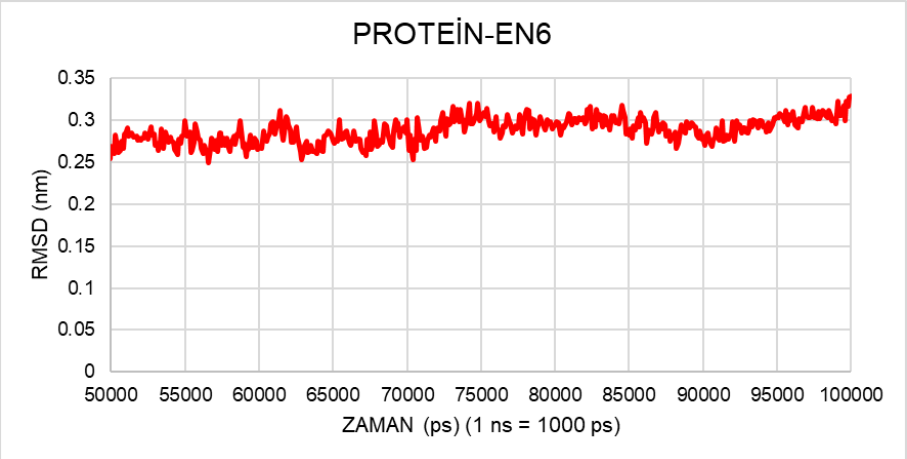

PROTEİN-CHEMBL179872
RMSD (nm)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)


PROTEİN-CHEMBL183274
RMSD (nm)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)


PROTEİN-CHEMBL2096778
RMSD (nm)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)


PROTEİN-CHEMBL369392
RMSD (nm)
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)


PROTEİN-AGONİST_CHEMBL3297811
RMSD (nm)
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0 10000 20000 30000 40000 50000 60000 70000 80000 90000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)


PROTEİN-EN6
RMSD (nm)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
50000 55000 60000 65000 70000 75000 80000 85000 90000 95000 100000
ZAMAN (ps) (1 ns = 1000 ps)

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve ortaöğrenimini İstanbul'da tamamlamıştır. Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden 2020 yılında mezun olmuştur. 2020 yılında T.Ü. Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.