



**KOVALENT DOKING TABANLI SANAL
TARAMA İLE PBP3 (PENİSİLİN BAĞLAYICI
PROTEİN 3) İNHİBİTÖRLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Sefa BAYRAM

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Ana Bilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi Deryanur KILIÇ
2022
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**KOVALENT DOKİNG TABANLI SANAL TARAMA İLE PBP3 (PENİSİLİN
BAĞLAYICI PROTEİN 3) İNHİBİTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ**

(Determination of PBP3 (Penicillin Binding Protein 3) Inhibitors By Covalent Docking Based
Virtual Screening)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sefa BAYRAM

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deryanur KILIÇ

Erzurum
Eylül, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Sefa BAYRAM tarafından hazırlanan “Kovalent Doking Tabanlı Sanal Tarama ile PBP3 (Penisilin Bağlayıcı Protein 3) İnhibitörlerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışması **14.09.2022** tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU
Atatürk Üniversitesi Aslı Islak İmzalıdır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deryanur KILIÇ
Atatürk Üniversitesi Aslı Islak İmzalıdır

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Gözde Yalçın ÖZKAT
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FBA-2022-10785

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi Deryanur KILIÇ danışmanlığında sunulan “Kovalent Doking Tabanlı Sanal Tarama ile PBP3 (Penisilin Bağlayıcı Protein 3) İnhibitörlerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	4	30
Materyal ve Yöntem	0	35
Bulgular	4	20
Tartışma	4	20
Tezin Geneli	2	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'ten büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Sefa BAYRAM	Dr. Öğr. Üyesi Deryanur KILIÇ
14.9.2022	14.9.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü ve Bilgisayar Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma boyunca bana her türlü konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım, Dr. Öğr. Üyesi Deryanur KILIÇ'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Başarımdaki maddi ve manevi her anlamda katkıları çok büyük olan, bana daima güvenen ve her zaman yanımda olan hayatımdaki en büyük destekçilerim kıymetli annem Selfiraz BAYRAM'a, kıymetli babam Zeki BAYRAM'a, canım ablam Mehtap BAYRAKÇI'ya ve canım abim Ercan BAYRAM'a her zaman yanımda olan, bir ömrü paylaşacağım, desteklerini hiç esirgemeyen, varlıklarıyla her zaman beni mutlu eden biricik eşim Sebahat BAYRAM ve aslan oğlum Yiđit BAYRAM'a en kalbi duygularıyla şükranlarımı sunuyorum.

Sabırlı ve güler yüzlü arkadaşlarım Tuđba TAŐ, Zeynep Yađmur BABAÖĐLU ve Merve AKKAYA'ya, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve yılların eskitemediği değerli dostum Nejat ARÇELİK'e çok teşekkür ederim.

Sefa BAYRAM

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOVALENT DOKİNG TABANLI SANAL TARAMA İLE PBP3 (PENİSİLİN BAĞLAYICI PROTEİN 3) İNHİBİTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ

Sefa BAYRAM

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deryanur KILIÇ

Amaç: Penisilin bağlayıcı protein 3 (PBP3), murein (peptidoglikan) sakkulus, bakteri zarına gömülü temel bir polimerdir. Murein sentetik reaksiyonları ve sakkulusu büyüten enzimler, penisilin bağlayıcı proteinler olarak bilinmektedir. PBP3 bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde yeni ve umut verici bir hedef olmaktadır. Bu bilgi ışığında, tezde Drugbank databazındaki ilaç molekülleri (FDA onaylı, deneysel, araştırma) içerisindeki PBP3 kovalent inhibitörlerin hesaplamalı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Drugbank databazındaki ilaç moleküllerinin 2B yapıları Ligprep ile 3B'a çevrildi; PBP3 kristal yapısı ise Protein Hazırlama Sihirbazı kullanılarak hazırlandı. Glide kovalent doking algoritması ile sanal tarama yapıldı ve ardından Ligand temelli benzerliklerden kaynaklanan Tanimoto benzerlik matrisi ile kümeleme gerçekleştirildi ve 8 farklı küme elde edildi. Kümelerdeki etkileşimler ve skorlar incelendi ve Terbogrel hedef ilaç molekülü olarak seçildi. Son olarak Desmond program aracılığıyla komplekslerin 200 ns'lik moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirildi.

Bulgular: Bu tez çalışmasında Glide kovalent doking sanal tarama ve moleküler dinamik simülasyon yaklaşımlarının kombinasyonu ile Terbogrel hedef ilaç molekülü olarak belirlendi. PBP3'ün aktif bölgesini hedefleyen hedef ilacın potansiyel yeni kovalent inhibitör olabileceği hesaplamalı yaklaşım sonucu bulundu.

Sonuç: Bu çalışma, Terbogrel'in PBP3'ün potansiyel yeni kovalent inhibitörü ve bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi için potansiyel yeni tedavi ajanı olabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu ilaç, PBP3 kovalent inhibitörü olarak yeni bileşik dizayn çalışmaları için öncü bileşik olabilir.

Anahtar Kelimeler: PBP3, Kovalent Doking, Moleküler Simülasyon, Sanal Tarama

Ağustos 2022, 79 sayfa

ABSTRACT

DETERMINATION OF PBP3 (PENICILLIN BINDING PROTEIN 3) INHIBITORS BY COVALENT DOCKING BASED VIRTUAL SCREENING

Sefa BAYRAM

Supervisor: Assist. Prof. Deryanur KILIÇ

Purpose: Penicillin binding protein 3 (PBP3), murein (peptidoglycan) sacculus is an essential polymer embedded in the bacterial membrane. Murein synthetic reactions and enzymes that enlarge the sacculus are known as penicillin-binding proteins. PBP3 is a new and promising target in the treatment of bacterial infections. In the light of this information, it is aimed to determine the PBP3 covalent inhibitors in drug molecules in the Drugbank database (FDA approved, experimental, investigational) computationally.

Method: 2D structures of drug molecules in the Drugbank database were converted to 3D with Ligprep; The PBP3 crystal structure was prepared using the Protein Preparation Wizard. Virtual screening was performed with the Glide covalent docking algorithm, and then clustering was completed with the Tanimoto similarity matrix resulting from ligand-based similarities, and 8 different clusters were obtained. Interactions and scores in the clusters were examined and Terbogrel was chosen as the hit drug molecule. Finally, 200 ns molecular dynamics simulations of the complexes were performed using the Desmond program.

Findings: In this thesis study, Terbogrel was determined as the hit drug molecule with the combination of Glide covalent docking virtual screening and molecular dynamics simulation. The computational approach found that the hit drug targeting the active site of PBP3 could be a potential new covalent inhibitor.

Results: This study showed that the Terbogrel could be a potential new covalent inhibitor of PBP3 and a potential new therapeutic agent for the treatment of infections caused by bacteria. In addition, the drug may be the lead compound for new compound design studies as a covalent PBP3 inhibitor.

Key Words: PBP3, Covalent Docking, Molecular Simulation

August 2022, 79 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
Bakteri Hücre Duvarı Sentezi	2
Antibiyotikler	4
Penisilin Bağlayıcı Proteinler.....	6
<i>Staphylococcus aureus</i> Bakterisi ve PBP'ler	8
Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD).....	10
KURAMSAL TEMELLER.....	14
MATERYAL ve YÖNTEM	23
Materyal	23
Yöntem.....	23
Protein Hazırlama.....	23
Ligand Hazırlama.....	24
Sanal Tarama.....	24
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	26
Penisilin Bağlayıcı Protein Sanal Tarama Sonuçları	26
SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	65

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. S. aureus PBP3 proteinine karşı belirlenen ilaçlar	30
--	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Penisilin bağlayıcı proteinler tarafından katalize edilen glikosiltransferaz ve transpeptidaz reaksiyonlarının şematik gösterimi.....	4
Şekil 2. CADD'da kullanılan yaklaşımlar	12
Şekil 3. Çalışmanın basamakları	13
Şekil 6. Penisilin ve Avibaktam	15
Şekil 12. Laktivisin	19
Şekil 13. Fosfomisin.....	21
Şekil 14. <i>S. aureus</i> PBP3 proteinin 3B yapısı	24
Şekil 15. Sanal tarama sonucu belirlenen ilaçların ID'leri, Docking skorları ve küme grupları	28
Şekil 16. PBP3-Sefotaksim (referans)' ın 2B gösterimi	33
Şekil 17. DB11385 ilacın 2B gösterimi.....	34
Şekil 18. DB13054 ilacın 2B gösterimi.....	35
Şekil 19. DB14052 ilacın 2B gösterimi.....	36
Şekil 20. DB00430'in 2B gösterimi	37
Şekil 21. DB15222 ilacın 2B gösterimi.....	38
Şekil 22. DB00560 ilacın 2B gösterimi.....	39
Şekil 23. DB04210 ilacın 2B gösterimi.....	40
Şekil 24. DB02820 ilacın 2B gösterimi.....	41
Şekil 25. DB12204 ilacın (Terbogrel) 2B gösterimi	42
Şekil 27. PBP3-Terbogrel kompleksinin $C\alpha$ ve Terbogrel atomlarının RMSD-zaman grafiği	43
Şekil 28. PBP3-Terbogrel kompleksinin $C\alpha$ atomlarının 200 ns için RMSF grafiği.....	44
Şekil 29. PBP3-Terbogrel kompleks atomlarının 200 ns'de RMSF grafiği	45
Şekil 30. PBP3-Terbogrel kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'	46
Şekil 31. PBP3 rezidüleri ile ayrıntılı Terbogrel atom etkileşimleri.....	47
Şekil 32. PBP3-Terbogrel kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi	48
Şekil 33. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleksinin $C\alpha$ ve Sefotaksim atomlarının RMSD-zaman grafiği.....	49
Şekil 34. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleksinin $C\alpha$ atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	50
Şekil 35. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleks atomlarının 200 ns'de RMSF grafiği	51

Şekil 36. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'	52
Şekil 37. PBP3 rezidüleri ile ayrıntılı Sefotaksim atom etkileşimleri.....	53
Şekil 38. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi.....	54



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

2B	2 Boyutlu
3B	3 Boyutlu
3VSL	Proteinin, Protein Databank'daki Kodu
3VSL	Penisilin Bağlayıcı Protein 3'ün Kristal Yapısı
Å	Angstrom
AG	Arabinogalaktan
Ala	Alanin
Asn	Asparajin
C-terminali	Karboksil Ucu
C55-P	Temel Taşıyıcı Lipid Baktoprenil Fosfat
CADD	Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
CAMP	Katyodik Anti-Mikrobiyal Peptit
CD	Siklodekstrin
CEF	Sefotaksim
COX-1	Siklooksijenaz-1
CP	Kapsüler Polisakkarit
CTX-M	Enzim Grubu
ECA	Enterobakteriyel Ortak Antijen
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
GBSA	Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı
GlcNAc	N-Asetilglukozamin
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GSH	Glutatyon
GT	Glikosiltransferez
H-bağ	Hidrojen Bağı
His	Histidin
HMW	Yüksek Moleküler Ağırlıklı
ID	Kimlik Numarası
K	Kelvin
Kcal	Kilokalori
kcal/mol	Kilokalori/mol
Leu	Lösin

LMW	Düşük Moleküler Ağırlıklı
Lys	Lisin
M	Molar
MC	Monokarbam
MD	Moleküler Dinamik
MDR	Çoklu İlaça Dirençli
MM	Moleküler Mekanik
MMGBSA	Moleküler Mekanik -Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı
MOP	Çoklu İlaç / Oligosakkaridil-Lipid / Polisakkarit
MSSA	Metisilin-Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Metisilin-Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MurNAc	N-Asetilmuramik asit
MW	Moleküler ağırlık
N- terminali	Amino Ucu
nm	Nanometre
NPT	Normal Basınç Sıcaklık
NRPS	Ribozomal Olmayan Peptit Sentaz
ns	Nanosaniye
Orn	Ornitin
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
PDB	Protein Veri Bankası
pH	Hidrojen Gücü
PG	Peptidoglikan
PGN	Peptidoglikan
Pkn	Protein Kinaz
Pro	Prolin
RMSD	Karekök Ortalama Sapma
SAR	Yapı Aktivite İlişkisi
SEDS	Şekil, Uzama, Bölünme ve Sporlanma
Ser	Serin
TA	Teikoik Asit
Thr	Treonin
TP	Transpeptidaz
Tyr	Tirozin
UDP	Üridindifosfat

Val

Valin



GİRİŞ

Dünya çapında 700.000'den fazla hastane ölümünün antimikrobiyal kazandığı direnç kaynaklı olduğu tahmin edilmekte ve 2050 yılına kadar 10 milyona çıkması beklenmektedir Gram-negatif ve pozitif bakterilerin, antimikrobiyal ajanların çoğunun etki modundan kaçınabildiği bilinmektedir. *Staphylococcus aureus*'taki mec A,B,C genleri ve *Enterococcus spp*'deki van A,B genleri tarafından kuvvetlendirilen gram-pozitif direnç, zamanla gelişmeye devam ederek kalıcı ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmaktadır (O'Neill, 2016; World Health Organization 2021; Périchon and Courvalin, 2009). Beta-laktamazın Ambler sınıfları tarafından tanımlanan gram-negatif direnç mekanizmaları, dışa akış pompalarının aşırı ekspresyonu ve porin kaybı, antibiyotik silahlarımızı özellikle *Enterobacterales* ve *Acinetobacter baumannii-Pseudomonas aeruginosa* gibi fermente olmayan Gram-negatif organizmalara karşı ciddi şekilde sınırlamaktadır (Breijyeh *et al.* 2020).

Antimikrobiyal direncin artan prevalansı nedeniyle, gelişmiş mikrop direncinin üstesinden gelmek için donatılmış terapötik stratejilere artan bir ihtiyaç olduğu bilinmektedir. Ek olarak, ilaç şirketlerinin yeni antimikrobiyal ajanları pazarlarken karşılaştıkları değişken finansal zorluklar, çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek için yeni ilaç mekanizmalarının mevcudiyetini olumsuz etkilemektedir (FakhriRavari *et al.* 2022). Son 15 yılda hem Gram pozitif hem de Gram negatif patojenlerde bulunan direnç mekanizmalarından kurtulmayı hedefleyen az sayıda antibiyotik geliştirildiği bilinmektedir (Freire-Moran *et al.* 2011). Yeni Antimikrobiyal keşfindeki duraklama süreci, mevcut olanların optimizasyonu ilgi görmeye başladı. Aktiviteleri değişik ajanlarla kombinasyon tedavileri, Gram pozitif, negatif duyarlı ve dirençli mikroorganizmalara karşı makul bir yaklaşım olarak önerilmektedir. Ancak, bazı antibiyotiklerin (aminoglikozit + beta-laktam, florokinolonlar + beta-laktam) hem negatif anormal durumlar hem de iyileştirilmiş hasta klinik sonuçlarıyla ilgili çelişkili kanıtlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (Brochado *et al.* 2018; Rahme *et al.* 2014).

S. aureus, morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmekte ve hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının %20'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir (Klein *et al.* 2007). Antimikrobiyal seçimi hem MSSA hem de MRSA fenotipleri için kandaki *S. aureus* yönetiminde önemli bir rol oynamaya devam etmektedir (Schweizer *et al.* 2011; Alosaimy *et al.* 2021). Özellikle kalıcı enfeksiyon vakalarında MRSA'nın yönetimi

için çeşitli ajanlarla kombinasyonu tedavisini destekleyen literatürler artmaktadır, bu kombinasyonların çoğu ise en az bir beta-laktam içermektedir (Molina *et al.* 2020).

Bakteri Hücre Duvarı Sentezi

Bakteri hücre duvarı, ana stres taşıyan ve şekil koruyan elementtir ve protoplastı ozmotik liziden korumaktadır (Scheffers and Pinho, 2005; Holtje, 1998) Hücrelere kendine özgü formunu verir, mekanik stabilitesinden sorumludur ve koruyucu bir bariyer oluşturarak bu hücresel bütünlüğün korunmasını sağlamaktadır. Gram-negatif, pozitif bakteri hücrelerini murein sacculus olarak da adlandırılan bir tür dış iskelet oluşturmaktadır. Peptid köprüleri aracılığıyla çapraz bağlanmış lineer glikan ipliklerinden oluşan bir polimer olan peptidoglikan (PGN) yapısından oluşan hücre duvarı iskeleti bulunmaktadır. Gram-pozitif organizmalarda hücre duvarının ana bileşeni olmakla birlikte, Gram-negatif bakterilerde önemli ölçüde daha ince olduğu ve bir dış zarla kaplı olduğu bilinmektedir. Anyonik duvar teikoik asitleri, lipoteikoik asitler ve teikoronik asitler gibi ikincil polimerler ve ayrıca yüzey proteinleri, Gram-pozitif bakterilerin peptidoglikan ağına bağlanmaktadır. Özellikle patojenlerde polisakkarit kapsülü ile hücre duvarı kaplı bir şekildedir.

Makromolekül olan peptidoglikan, alternatif N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve N-asetilmuramik asit (MurNAc) birimlerinden oluşan lineer glikan zincirlerinden oluşmakta ve β -1,4 glikosidik bağlarıyla bağlanmaktadır. L-Ala, D-Glu, 3. pozisyonda bir diamino asit ve D-Ala-D- Ala'dan oluşan gövde peptidi, her MurNAc biriminin D-laktik parçasına bir amid bağı ile bağlanmaktadır. Kök peptidin 3. pozisyonuna L-Lys eklenmesinin çoğu Gram pozitif bakteriye özgü olduğu bilinmektedir. mDap ve daha az sıklıkla L-Orn, bunun yerine Gram-negatif organizmaların PGN öncülüne özel olarak dahil edilmektedir. Mekanik stabiliteyi sağlamak için, komşu glikan ipliklerinin kök peptitleri, doğrudan veya kompozisyon türlerine özgü olarak değişebilen kısa peptitler yoluyla çapraz bağlanmaktadır (Schleifer and Kandler, 1972).

Antibakteriyel tedaviler için en önemli hedeflerden biri, bakteriyel hücre duvarı biyosentezidir. İnsanlarda homolog yapılar ve benzer yollar olmadığı için 1940'lardan beri klinik kullanımda başarılı olan ajanlar, hücre duvarı biyosentetik reaksiyonlarına müdahale etmektedir. Bakteri hücre duvarı inhibitörleri, yüksek etkinlik ve iyi güvenlik profilleri ile sonuçlanan düşük hedefle ilişkili yan etkilerle birlikte yüksek hedef özgüllük sergiler ve bu nedenle en güçlü ve yaygın olarak kullanılan antibiyotikler arasında gösterilmektedir.

Bakteri hücre duvarı, bakteriler için çok önemli bir koruyucu yapıyı temsil eder ve ayrıca bütünlüğü hücre canlılığı için kritik öneme sahiptir. Bu yapı, hücre içi ve hücre dışı

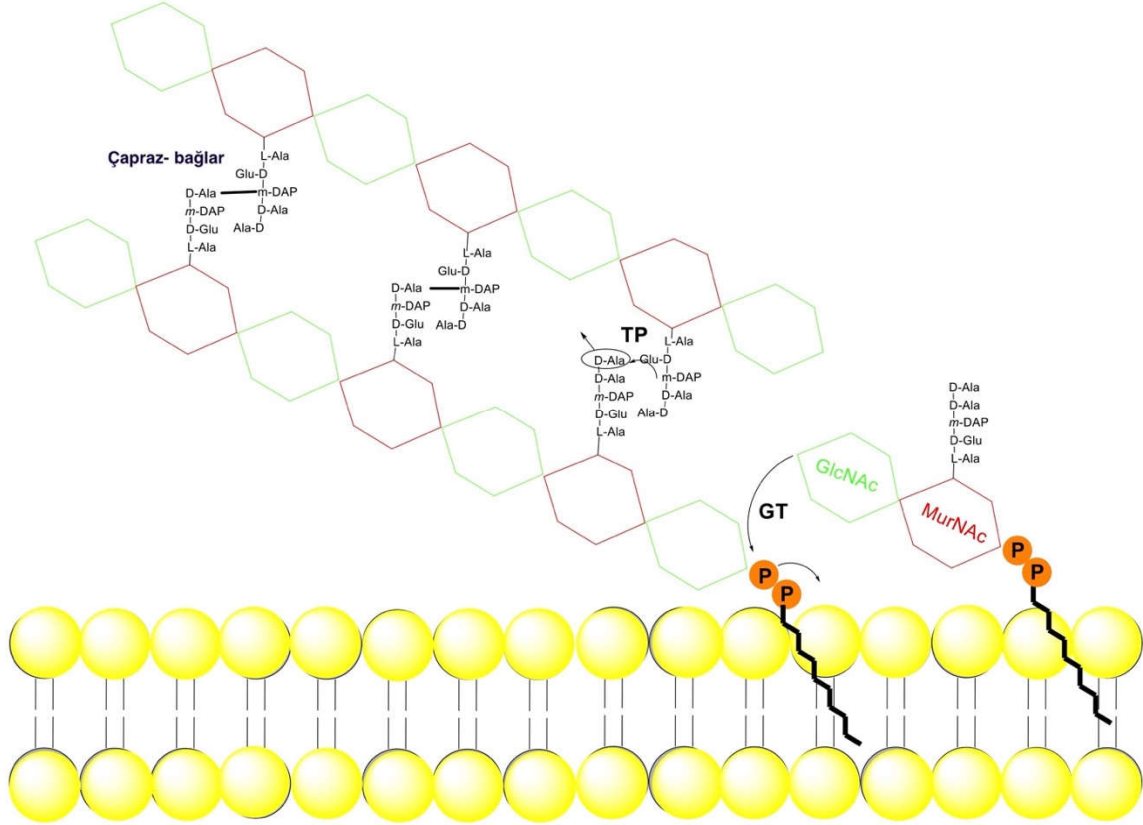
bölümlerinde görev alan birçok enzimin ortak aktiviteleriyle korunmaktadır. Büyüme ve bölünmede hücre canlılığını için, biyosentetik süreçler koordine edilmelidir. Tek bir hedefi bloke etmenin yanı sıra bireysel reaksiyonlara müdahale, tüm biyosentez süreçleri bozabilmektedir. Bu, bakterilerin hayatta kalmasını ciddi şekilde tehlikeye atan bölücü ve replizom gibi enzimatik mekanizma komplekslerini daha da etkileyebilmektedir. Hücre duvarı biyogenezi için gerekli enzimlerin inhibisyonunun yanı sıra, özellikle membrana bağlı biyosentetik ara ürünlerin bloke edilmesi, duyarlı bakterilerin hücre duvarında bir bozulma meydana getirebilmektedir. Bu hücre duvar yapısını oluşturan peptidoglikanların (PGN) nihai öncüsü olan Lipid II, Gram pozitif bakterilerde önemli bir noktayı temsil etmekte ve bakteri hücre duvarı biyosentezinin zayıf noktası olarak kabul edilmektedir (Schneider *and* Sahl., 2010).

Antibiyotik hedefi olarak Lipid II'nin hedeflenmesi için çeşitli nedenler vardır. İlk olarak, Lipid II bakteriler arasında yüksek oranda korunmakla birlikte ökaryotik karşılığı olmamakta ve daha büyük antibiyotikler için bile hücrenin dışından erişilebilmektedir. Ayrıca bir bakteri hücresinde Lipid II miktarı sınırlıdır ve temel baktopenil taşıyıcı lipidin sürekli geri dönüşümünü gerektirmektedir (Kramer *et al.* 2004). Lipid II'nin boyutunun küçük olmasına rağmen, antibiyotikler için çoklu etkileşim bölgeleri sunmakta ve protein olmayan bu yapının modifikasyonunun mutasyonla kolay bir şekilde elde edilemeyecek olması bu yapının hedef olarak gösterilmesine yol açmaktadır. Lipid II yapısının yüksek oranda korunmasının nedeni hücre duvarı biyosentez aşamaları tarafından substrat tanıma ve enzimatik işlemeyi sağlamak için gerekmektedir. Lipid II'ye bağlanan antibiyotiklere karşı direnç gelişimi genellikle zordur. Daha da önemlisi son araştırmalar, PGN'nin pasif bir yapı taşı olmasının ötesine geçen bakteriyel fizyolojide Lipid II'nin hücre rolünü ortaya çıkarmaktadır. Lipid II'nin, membran fosfolipidlerinin düzenlenmesinin modülasyonu ve enzimatik mekanizmaların organizasyonu için çok önemli bir yapısal iskele olarak işlev görebileceği düşünülmektedir. Lipid II, peptidoglikanların çapraz duvar oluşumunu, otoliz ve hücre bölünmesini koordine eden Ser/Thr kinaz, protein kinaz B (PknB) için bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle, Lipid II veya hücre Lipid II seviyeleri, bakteriyel sinyal iletim yollarında önemli roller oynamaktadır (Ulm and Schneider, 2016; Hardt *et al.* 2017). Neticede, Lipid II'yi bloke etmek, hücre ölümüne katkıda bulunan bazı olayları tetikleyebilmektedir. Bu bloke işlemi Lipid II'yi prostaglandinin biyosentezi için kullanılamaz hale getirmektedir. Ancak, Lipid II'nin birikmesi, biyosentez basamaklarının parçalanması, anormal septa oluşumu ve hücre bölünmesinde oluşan anormal durumlar gibi bir dizi hücre sonucunu da tetiklemektedir. Septum alanı, hücre duvarını hedefleyen antibiyotikler için özel bir bağlanma bölgesi oluşturan Lipid II ve anyonik fosfolipidler gibi baktopenil-bağlı öncüler bakımından zengin kabul edilmektedir.

Hücre duvarında peptidoglikanın öncüsü Lipid II'nin yanı sıra, teikoik asit (WTA), kapsüler polisakarit (CP), enterobakteriyel ortak antijen (ECA) ve arabinogalaktan (AG) gibi diğer yüzey polimerlerinin, temel taşıyıcı lipid baktoprenil fosfat (C55-P) üzerinde oluşturulduğu ve farklı hedef bölgelerini temsil ettiği bilinmektedir.

Antibiyotikler

Peptidoglikan (PG), çoğu bakteriyi çevreleyen temel bir makromoleküler sakkulus (kesecik) olarak görev yapmaktadır. PG, bakteri hücre şeklini belirlemekte ve yüksek sitoplazmik ozmotik basınç altında yırtılmaya karşı koruma sağlamaktadır (Vollmer *et al.* 2008). PG yapısı, peptitlerle çapraz bağlanmış β -1,4-bağlı N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve N-asetilmuramik asit (MurNAc) rezidülerinin oluşan glikan ipliklerinden oluşmaktadır (Vollmer *et al.* 2008). Yeni oluşan glikan iplikleri ilk önce lipid II öncüsü (undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc) kullanılarak glikosiltransferazlar (GT'ler) tarafından polimerize edilmekte ve bunlar arasında penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler)/transpeptidazlar (TP'ler) tarafından önceden var olan hücre duvarı ile çapraz bağlanmaktadır (Sauvage *et al.* 2008; Bouhss *et al.* 2007). GT'lerin ve TP'lerin faaliyetlerinin düzenlenmesi, PG sakkulus'un uyumlu bir şekilde örülmesi ve büyütülmesi için birleştirilmektedir (Egan *et al.* 2015).



Şekil 1. Penisilin bağlayıcı proteinler tarafından katalize edilen glikosiltransferaz ve transpeptidaz reaksiyonlarının şematik gösterimi (Sauvage and Terrak, 2016).

PG biyosentezinin adımların çoğu (üridin difosfat (UDP)-GlcNAc'den polimerik sakkulosa kadar) antibakteriyel hedefler olarak kullanılmaktadır (Silver, 2013), ancak bu hedeflenenler içerisinde en başarılısı enzimleri inaktive eden "mucizevi" penisilin antibiyotiğinin adını taşıyan PBP'ler olduğu bilinmektedir (Sauvage *et al.* 2008). 1940'larda penisilinin keşfiyle tıpta yaygın olarak kullanılmasından bu zamana kadar geçen sürede bu kullanıma bağlı olarak ortaya çıkan dirençli suşlarla başarılı bir şekilde savaşmak için yeni sınıf β -laktam antibiyotiklerinin geliştirildiği bilinmektedir. Ancak, β -laktamazların aracılık ettiği çoğu β -laktama karşı yaygın direnç, β -laktamaz inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanılmadıkça etkinliklerini sınırlandırmaktadır (Fre`re *et al.* 2016). Tüm antibiyotik sınıfları dirençten etkilenmektedir ve dahası çoklu ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkması Dünya çapında büyük bir halk sağlığı krizi haline gelmektedir. Bu nedenle, çoklu ilaca dirençli bakteri suşlarına karşı düşük direnç potansiyeline sahip yeni antibiyotik sınıflarını belirlemek için mevcut tüm olasılıkları değerlendirmek ve yenilerini geliştirmek için sürekli çabalanmaktadır (Chang *et al.*, 2015).

Penisiline ek olarak, diğer birkaç antibiyotik (glikopetidler, laktibiyotikler, vb.), peptidoglikan polimerinin son monomerik öncüsü olan Lipid II substratına bağlanıp polimerazlar tarafından kullanımını önler ve böylece peptidoglikan polimerizasyonunun (GT ve TP) son aşamasını inhibe ederler (Schneider and Sahl, 2010). kültürlenmemiş bir toprak mikroorganizmasından izole edilerek yeni keşfedilen bir doğal ürün olan teixobactin'in hücre duvarı öncülleri olan Lipid II ve Lipid III'e bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe ettiği bilinmektedir (Ling *et al.* 2015). Bu mekanizma, çeşitli yollarla peptidoglikan sentezini hedeflemenin çevredeki mikroplar tarafından sıklıkla kullanıldığı ve doğal ürünlerin en iyi antibiyotik kaynağımız olduğu bir kez daha gösterilmektedir. Mikroorganizmaların sadece küçük bir kısmı izole edilmekte ve yenilikçi tekniklerle analizi henüz yeni başlayan doğal bir ürün deposu olarak büyük potansiyeller göstermektedir (Clardy *et al.* 2006; Ling *et al.* 2015; Nichols *et al.* 2010).

Peptidoglikan metabolizması hakkında derin bir bilgi, ilgili tüm potansiyel hedeflerin daha iyi karakterizasyonu ve bu bilginin yenilikçi tarama deneyleri geliştirmek için kullanılmasında sadece PBP'lerin ve diğer enzimlerin enzimatik aktivitesinin inhibisyonuna değil, aynı zamanda düzenleyici mekanizmaların, protein-protein etkileşimlerinin ve lipid II substratının hedeflenmesine de dayalı olarak, yeni etki mekanizmalarına sahip yeni nesil antibakteriyel ajanların keşfine yol açacağı düşünülmektedir. Peptidoglikan polimerizasyonunun geç aşamasının inhibisyonundaki hedefin sitoplazmik zarın dışında yer alması bir avantajdır ve bu nedenle özellikle Gram pozitif bakterilerde antibakteriyel ajanlara

daha kolay erişim sağlanabilmektedir. PG'nin yapıları ve sentezinde yer alan enzimler bakterilere özgüdür ve bu durum ökaryotik hücreler üzerinde istenmeyen yan etkilerin görülme sıklığını azaltmaktadır (Sauvage and Terrak, 2016).

Penisilin Bağlayıcı Proteinler

PBP'lerden yoksun olan peptidoglikan içermeyen bakteriler (*Mollicutes*, *Dehalococcoides*, *Rickettsia*) ve A sınıfı PBP'lerinden yoksun olan, karakteristik sacculus (Packiam *et al.* 2015; Liechti *et al.* 2014) yerine halka benzeri bir peptidoglikan yapısı içeren *Chlamydiae*'nin dışında, bakterilerin tümünün her sınıftan en az bir PBP'ye sahip olduğu ve genel olarak PBP'nin içeriğinin bakteri morfolojisi ve hücre döngüsü ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Zapun *et al.* 2008). Gram-negatif kokların genellikle septumda aktif olduğu ve bölünme adı verilen tek bir PG sentezleme mekanizmasına sahip olduğu bilinmektedir. Gram negatif çubuk şekilli bakterilerin, uzama fazı sırasında aktif olan ikinci bir peptidoglikan sentezleme mekanizmasına sahip olduğu, böylece en az iki A sınıfı ve iki B sınıfı PBP'ye sahip olduğu bilinmektedir. Gram pozitif bakterilerde, çeşitli yaşam biçimlerinin ek PBP'ler gerektirebileceği daha karmaşık durumlar olmaktadır. Başlıca patojenik Gram-pozitif bakteriler *in vivo* olarak antibiyotik varlığında fonksiyonel transpeptidaz aktivitesini korurken β -laktam antibiyotiklerine karşı duyarlı olan edinilmiş veya endojen PBP'lerin oluşumu, bakteriye yüksek düzeyde bir direnç kazandırmaktadır (Zapun *et al.* 2008). β -laktama duyarsız PBP'ler yalnızca Firmicutes'te, Bacilli'de ve ayrıca bazı Clostridia'da bulunmaktadır. Clostridial enfeksiyona karşı antibiyotik tedavisi genellikle β -laktamlara değil, β -laktama duyarsız PBP'nin varlığının hak ettiği ilgiyi görmediği ve üçüncü kuşak sefalosporinler dahil olmak üzere bağırsak mikroflorasını bozan faktörlere maruz kalmasıyla meydana gelen *Clostridia difficile* enfeksiyonuna dayanmaktadır (Slimings and Riley, 2014).

Penisilin bağlayıcı proteinler, yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı diye ayrılan geniş bir protein grubu temsil etmektedir. Bu ayırım sadece protein boyutu meselesi değil bu proteinlerin farklı fonksiyonlarını da yansıtmaktadır. Örneğin, peptidoglikan sentezinin geç aşamaları yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) penisilin bağlayıcı proteinler tarafından sağlanırken, düşük moleküler ağırlıklı (LMW) penisilin bağlayıcı proteinler esas olarak peptidoglikanın bakımı, yeniden şekillenmesi ve geri dönüşümü ile ilgilenmektedir (Sauvage *et al.* 2008; Van Heijenoort, 2011; Denome *et al.* 1999; Vollmer *et al.* 2008). Genel olarak, bakterinin hayatta kalması için HMW-PBP'nin (sınıf A ve sınıf B) gerekli olduğu, tüm LMW-PBP'lerin (sınıf C) silinmesinin zararlı olmasına rağmen bakteri için ölümcül olmadığı bilinmektedir (Denome *et al.* 1999). Sonuç olarak, HMW-PBP'ler β -laktam antibiyotiklerin birincil hedefleridir, ancak LMW-PBP'ler bakterinin bu antibiyotiklerin duyarlılığını etkileyebilmekte ve HMW ve LMW-

PBP'lerin eşzamanlı inhibisyonu ilginç bir sinerjistik etki sunabilmektedir (Sarkar *et al.* 2010; Dutta *et al.* 2015).

PBP'lerin çoğunlukla etki alanı organizasyonuna ve işlevine göre üç sınıfa (A, B ve C) ayrılan çok bölgeli enzimler olduğu bilinmektedir. B sınıfı PBP'lerin dizilerine dayalı olarak alt bölümleri, bunların inhibisyonu ve direnci ile ilgili sorunları anlamak için özellikle ilgi çekici olmaktadır. Alt sınıf B1 (B1-PBP'ler) gruplarının, Firmicutes'te bulunan duysarsız PBP'ler olduğu; B2- PBP ve B3-PBP'lerin, sırasıyla uzama ve bölünme sırasında aktif olan Gram-negatif PBP'ler olduğu bilinmektedir. B4- ve B5-penisilin bağlayıcı proteinler, B2- ve B3-penisilin bağlayıcı proteinlerin Gram pozitif eşdeğerleri olmaktadır. A sınıfı penisilin bağlayıcı proteinlerin transpeptidaz alanı, değişmez bir şekilde bir N-terminal transglukosilaz alanına bağlı olmakta, ancak ek alanlarla karşılaşılabilir. B sınıfı PBP'lerin N-terminal modülünün enzimatik aktivitesinin olmadığı ve C-terminal TP alanlarının peptidoglikana ulaşmasına izin vererek bir sap görevi gördüğü düşünülmektedir (Macheboeuf *et al.* 2006). N-terminal modülü küçük domainlerden yapılmakta ve peptidoglikan sentez komplekslerindeki protein-protein etkileşimleri için önemli olabilmektedir. GT ve TP aktiviteleri, aynı A sınıfı PBP'ler içinde ve B sınıfı ortaklarıyla birleştirilerek düzenlenmiş ve senkronize PG sentezini göstermektedir (Sauvage *et al.* 2014; Banzhaf *et al.* 2012; Born *et al.* 2006; Bertsche *et al.* 2006).

Katalitik GT ve TP alanlarına ek olarak, *E. coli*'nin A sınıfı PBP1a ve PBP1b gibi bazı PBP'leri, GT ve TP alanları arasında yer alan UB2H olarak adlandırılan bölgede gösterilmektedir (Sung *et al.* 2009). Sırasıyla PBP1a ve PBP1b aktivitelerini uyan, düzenleyici lipoproteinler LpoA ve LpoB'nin bağlanma yerleri olarak işlev gördükleri gösterilmektedir (Typas *et al.* 2010; Paradis-Bleau *et al.* 2010). B Sınıfı penisilin bağlayıcı proteinler ayrıca ek etki domainler içerebilmektedir. Örneğin B4-PBPS'in iki ek C-terminal PASTA alanına (PBP ve Serin/Treonin kinaz ilişkili) sahip olduğu ve bu alanların β -laktam bağlanmasında, protein stabilitesinde ve bakteriyel morfogenezde rol oynadığı bilinmektedir (Maurer *et al.* 2012; Schweizer *et al.* 2014).

C sınıfı PBP'ler, tekli alanlar (tip-7 PBP'ler; AmpH tipi) olarak bulunmaktadır ancak PBP alanına eklenen ek bir C- tip-5 veya tip-4 PBP'leriyle de karşılaşmaktadır. DD-karboksipeptidaz veya endopeptidaz aktivitesine sahip olmaktadır ve genellikle laboratuvar koşullarında terminal etki alanında bakteriyel canlılık için gerekli değildir fakat PG'de çapraz bağlanma derecesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Sauvage *et al.* 2008; Vollmer *et al.* 2008).

PBP/TP alanının genel yapısı, bir alfa-beta ve bir tamamen alfa alt alanından oluşmakta ve her ikisi arasında aktif bir bölge bulunmaktadır (Sauvage *et al.* 2008). Transpeptidaz aktivitesi, aktif bölgelerini süsleyen üç korunmuş motifin (SxxK, SxN ve KTGT) birkaç önemli rezidüsüne dayanmaktadır (Sauvage *et al.* 2008; Goffin and Ghuyssen, 1998). SxxK motifinin serini, iki aşamalı çapraz bağlama reaksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. İlk olarak, bir pentapeptitin terminal D-Ala-D-Ala amid bağının CO'su üzerinde bir nükleofil saldırısı gerçekleştirmekte ve bu terminal D-Ala'nın ayrılmasıyla bir açıl enzim ara ürününün oluşumuna yol açmaktadır; ikinci olarak, komşu bir glikan zincirinden bir peptit bir amino grubu bu komplekse saldırmakta ve çapraz köprünün oluşumuna, serbest enzimin salınmasına neden olmaktadır. PBP'lerin aktif serininin β -laktamlar tarafından açılması, enzimi uzun süre bloke etmektedir. Peptidoglikan öncüsünün peptit yan zincirinin amidasyon veya süstitüsyon gibi modifikasyonlarının, bazı enzimlerin TP aktivitesinin özgülüğünün ve Vankomisin gibi substrat ile etkileşime giren bazı antibiyotiklerin etkinliğinin önemli bir belirleyicisi olduğu bilinmektedir (Zapun *et al.* 2013; Lebar *et al.* 2014; Levefaudes *et al.* 2015).

Yüksek molekül ağırlıklı penisilin bağlayıcı proteinlerin transpeptidaz alanı, çapraz bağlama reaksiyonu için bir donör substrat olarak polimerik peptidoglikana eklenmiş bir peptit gerektirmekte ve bunlar D-Ala-D-Ala ile biten kısa peptitler üzerinde aktif olmamaktadır (Terrak *et al.* 1999; Qiao *et al.* 2014). Ancak, bazı LMW PBP'leri, basit peptit substratları kullanarak transpeptidaz aktivitesini katalize edebilmektedir (Pollock *et al.* 1972; Nguyen-Distèche *et al.* 1982). *Staphylococcus aureus* düşük molekül ağırlıklı PBP4'ün donör olarak Lipid I-II ve peptidoglikan zincirlerini kullandığı gösterilmektedir. Öte yandan, hemen hemen tüm penisilin bağlayıcı proteinlerin transpeptidaz reaksiyonu, alıcı substrat için daha az katı olmakta ve çeşitli D-amino asitleri kullanabilmektedir (Qiao *et al.* 2014; Pollock *et al.* 1972; De Pedro *et al.* 1997; Lupoli *et al.* 2011). Bu durum onların PG'ye dahil edilmesine izin vermekte ve *S. aureus* PBP4'ü Lipid II ve Lipid II öncüllerine dönüştürmektedir. Bu özellikler, canlı hücrelerde peptidoglikan sentezini ve bakteriyel morfogenezini incelemek için uygun bir araç sağlayarak, farklı organizmalarda floresan D-amino asitler tarafından peptidoglikan ve öncülleri etiketlemek için kullanılmaktadır (Van Dam *et al.* 2009; Kuru *et al.* 2012).

***Staphylococcus aureus* Bakterisi ve PBP'ler**

Staphylococcus aureus bakterisi genellikle insan derisine, üst solunum yolu kanallarına, en çok da burun pasajlarına kolonize olan ve yaralanma, ameliyat gibi durumlarda ciddi enfeksiyonlara sebebiyet veren gram pozitif bakteri suşudur. Çok çeşitli klinik durumlarda bu bakterinin sebep olduğu enfeksiyon toksik şok sendromunu meydana getirmektedir. Bu enfeksiyonun tedavisi için Benzilpenisilin antibiyotiği kullanılmaktaydı. Fakat 1950'lerde

Benzilpenisiline dirençli suşların ortaya çıktığı görüldü. Bu dirençli suşların tedavisinde kullanılmak üzere β -laktamazlar tarafından daha az parçalanabilen iki ekstra metoksi grubu taşıyan benzilpenisilin türevi olan metisilin antibiyotiği geliştirildi. Ancak zamanla Metisiline dirençli *S. Aureus* (MRSA) suşları meydana geldi. Bu direncin sebebi PBP2a,3'ü kodlayan mecA geninin aktifleşmesiyle oluşmaktadır. Bu nedenle çoklu dirençli MRSA bizlere çok önemli klinik zorluk sunmaktadır (Morell and Balkin, 2010).

Staphylococcus aureus (gram pozitif) bakterisinde de bulunan peptidoglikan, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) tarafından sentezlenen bakteri hücre duvarının ana bileşenidir (Vollmer *et al.* 2008; Sauvage *et al.* 2008). Hücre canlılığı için neredeyse değişmez bir şekilde gerekli olan ve ökaryotlarda bulunmayan bu bileşen, PBP için çekici ilaç hedefleri olarak değerlendirilmektedir (Banerjee *et al.* 2010). Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde, peptidoglikan öncüsünün kök peptidi, son transpeptidasyon reaksiyonunda salınan iki D-alanin rezidüsü ile bitmektedir (Yoshida *et al.* 2012). Hücre duvarında bulunan bu bileşen *Staphylococcus aureus* (gram pozitif) bakterisinde yaklaşık 30 nm kalınlığında bulunmaktadır

Bugüne kadar incelenen tüm PBP'lerin transpeptidasyon aktif bölgeleri, kesin olarak korunmuş birkaç motife sahiptir. Aktif bölge serin rezidüsü, bir SxxK motifi yapmak için $\alpha 2$ sarmalının başlangıcında standart adlandırma kuralına göre korunmuş bir lizinden önce üç rezidü bulundurmaktadır. İkinci bir motif olan SxN, $\alpha 4$ ve $\alpha 5$ sarmalları arasındaki bir ilmek üzerinde bulunur ve bir KTG motifi, 3 ipliği üzerindeki aktif bölgeye çok yakın bir bölgede yer almaktadır. β -laktamlara direnç, ilacı hızla yok eden hidrolazların ekspresyonu gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla ortaya çıkmaktadır. Ayrıca PBP'lerin kendi içinde de içsel direnç geliştirebilmektedir. Bu da antibiyotiklerin varlığında PBP'lerin substratlara olan afinitelerini yeterince işlev görecektir. Bu mutasyonlar değişen protein esnekliği gibi, protein modellerinin basit görsel incelemesinden anlaşılmayan dolaylı mekanizmalar yoluyla açıklanabilir (Contreras-Martel *et al.* 2009).

PBP'ler boyutlarına göre düşük moleküler ağırlıklı PBP'ler ve yüksek moleküler ağırlıklı PBP'ler olarak iki ana grupta sınıflandırılmaktadır (Goffin and Ghuysen, 1998). Düşük moleküler ağırlıklı PBP'ler (LMW PBP), çapraz bağlanma seviyesini sınırlamak için esas olarak DD-karboksi peptidazlar olarak işlev gören tek alanlı proteinlerdir ve bu düşük moleküler ağırlıklı PBP'ler genellikle dikkate alınmazlar (Ghosh *et al.* 2008). Yüksek moleküler ağırlıklı PBP'lerde (HMW PBP), yalnızca bir tanesi peptidoglikan peptitleri üzerinde etkili olan birkaç alanı taşımaktadır. A Sınıfı HMW PBP'ler temel transglikozilasyon aktivitesine sahipken, B sınıfı HMW PBP'lerin ekstra alanı bilinmeyen bir işleve sahiptir (Memmi *et al.* 2008). *S. aureus*'un dört PBP'si (PBP1–PBP4) vardır ve bunlardan yalnızca PBP4 düşük moleküler

ağırlıklı bir PBP'dir. Bunlar toplumdaki edinilmiş MRSA'nın ilaç direncinde rol oynamış ve kristal yapısı böylece belirlenmiştir. PbpC geni tarafından kodlanan PBP3, bir C-terminal penisilin bağlama alanına sahiptir ve N-terminal alanı diğer türlerle karşılaştırıldığında iyi korunur, böylece *S. aureus* PBP3, *Bacillus*'un birkaç türünde neredeyse değişime uğramadan bulunmaktadır (Pinho *et al.* 2000).

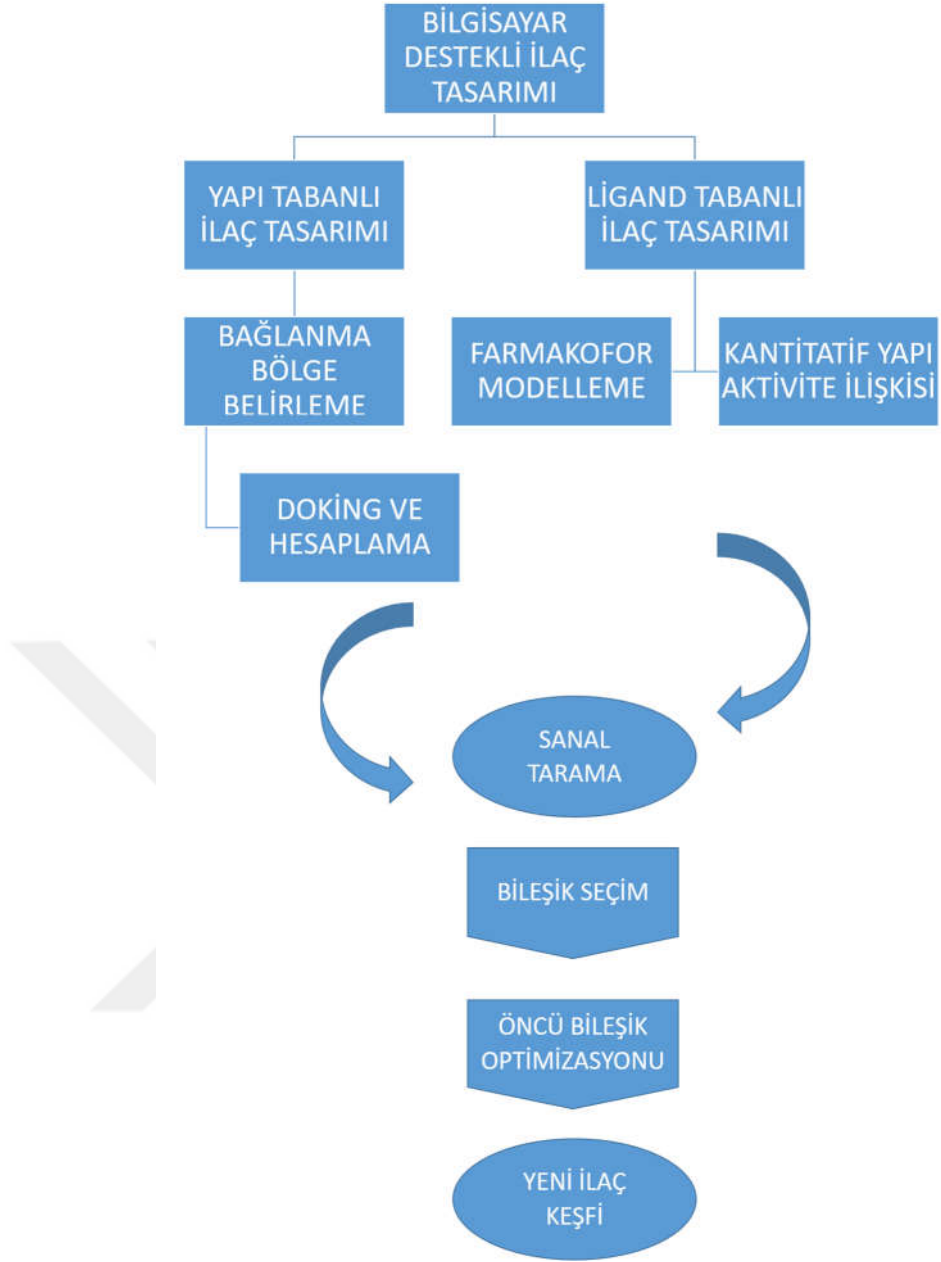
Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD)

Hastalıkların zorlu süreçleri düşünüldüğünde ilaç tasarımı ve keşfi, maliyetli, karmaşık ve zahmetli bir süreçtir. Bu tasarım ve keşif, hedef tespiti ve terapötik olarak güvenli ve etkili olabilecek ilaçların geliştirilmesini içermektedir (Grechishnikova, 2021; Emmerich *et al.* 2021). Bu süreçte, hedef belirlemek, hedefi doğru tespit edebilmek ve biyomedikal belirteçleri etkin bir şekilde analiz etmek için çeşitli hesaplamalı ve istatistiksel yöntemlerin uygulanabileceği bilgisayar destekli ilaç tasarımı yararlanılabilir (Gupta *et al.* 2021). İlaç geliştirmenin tamamlanması için gerekli güvenlik, yeterli etkinliği kazanmak ve toksisiteyi önlemek için CADD birleşik biyokimyasal alanı daha fazla kullanabilir. *In silico* tekniklerin endüstri, akademi ve devlette benimsenmesiyle birlikte, ilaç tasarımı ve keşfinde önemli ilerlemeler gerçekleştirilmiştir (Schaduangrat *et al.* 2020). Son dönemlerde kimyasal, biyolojik ve farmasötik tıpta büyük verilerin büyümesiyle CADD alanında çeşitli makine öğrenme algoritmaları optimize edilmiş ve uygulanmaya başlanmıştır. Bu başlangıç, ilaç tasarımı ve keşif sürecinin verimliliğinde önemli bir gelişme olmuştur. İlaç tasarımında, geliştirilmesinde ve keşfindeki başarılı uygulamalar, ancak etkili hesaplama yöntemleri ve araçları, önceden işlem görmüş doğru -güvenilir verilerle sağlandığında gerçekleştirilmektedir (Lee *et al.* 2022). Geleneksel ilaç keşfinin mevcut yaklaşımları, yapısal biyoloji, protein biyokimyası/biyofiziği, hesaplamalı ve tıbbi kimya, sentetik kimya ve eczacılık gibi farklı disiplinleri kullanmaktadır. (i) Hedef tanımlama aşaması: işlevleri, belirli bir hastalık/bozukluk ile ilişkili biyolojisi için daha fazla incelenen ve ilişkilendirilen ilaç hedeflerinin tanımlanmasını içermektedir. (ii) Hedef doğrulama aşaması: belirlenmiş ilaç hedefinin hastalıkla ilişkisinin ve korelasyonunun, biyolojik fonksiyonları düzenleme kapasitesinin değerlendirilmesini içeren biyolojik tahlillerle doğrulandığı aşamadır. (iii) Öncül belirleme: diğer basamaklarda tanımlanan bir ilaç hedefine karşı daha yüksek ve önemli derecede özgüllük, duyarlılık ve potansiyele sahip sentetik bir kimyasal parçanın tanımlanmasını veya keşfedilmesini sağlamaktadır. Bu aşamada belirlenen öncül, ilaca benzer bir aday veya ilaca benzer bir varlığın öncü parçası olabilmektedir. (iv) Öncül hedef taranması: bu aşama belirlenen öncü hedef tahmininin tekrar eden döngüleri ile öncül hedefin geliştirilmesini içerdiğinden önemli bir aşamadır. Güvenli, spesifik ve verimli bir ilaç geliştirmek için potansiyel adayları sıralamak ve filtrelemek için *in vitro* ve *in vivo* deneyler

gerçekleştirilir. Daha fazla yapı-aktivite ilişki (SAR) stratejileri öncül hedef bileşik analoglarını tahmin edilebilen farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri bulmak için geliştirilmiştir. (v) Klinik öncesi aşama: Bu aşama, bir ilacın laboratuvar ölçeğinde sentezini ve formülasyonunu içerir ve bunu ilacın toksisitesi ve gücü için *in vivo* çalışmalar izlemektedir. (vi) Klinik araştırmalar: İlacın güvenliliğini inceleyen, olası yan etkileri değerlendiren, dozajın etkinliğinin önceden belirlenmesini ve aday ilacın genel farmakolojik profilini inceleyen üç klinik faz aşamasını içeren ilaç keşif ve geliştirme döngüsünün son aşaması olmaktadır (Kalyanamorthy and Chen, 2011).

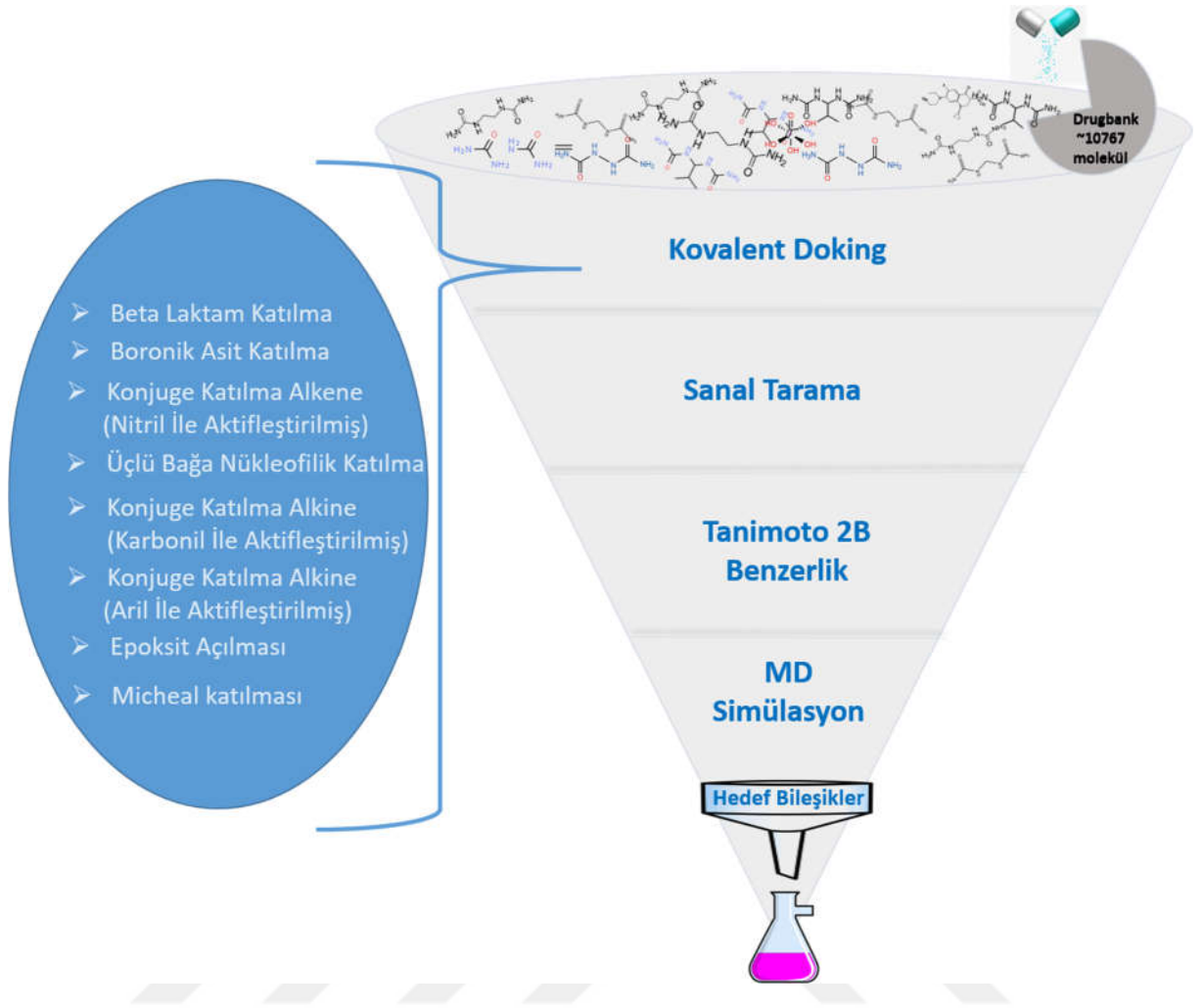
Yapıya dayalı modelleme yaklaşımı, deneysel olarak elde edilmiş 3B yapının sayesinde elde edilen protein-ligand etkileşimleri hakkındaki bilgileri sunmaktadır. Yapı tabanlı yöntemler, protein-ligand kristal yapılarının sayısının her geçen gün artmasıyla son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Geleneksel yapı tabanlı çalışmalar, buluşsal yöntemler kullanılarak veya kuvvet alanı enerji hesaplamaları sayesinde doğrudan protein-ligand komplekslerinden türetilmektedir. Burada kullanılan 3B hedef proteine bağlanan yapı için reseptör bölgesi, tüm yapı kitaplığı üzerinde ligand bağlanmasını sağlayan rezidülerin tamamı olarak tanımlanır. Bu hedefe bağlanan çoklu inhibitörlerin karşılaştırılmasını sağlayan etkileşim profillerini kullanmaktadır. Bu nedenle, protein-ligand kompleksi boyunca etkileşimlerin korunma derecesi önem arz etmektedir.

Liganda dayalı farmakofor modelleme yaklaşımı ise benzerlik alt yapı analizi farmakofor taraması, üç boyutlu şekil eşleştirme ve nicel yapı-aktivite ilişkileri (QSAR) gibi farklı teknikleri içerir. Bu bilinen aktif ligandlar, devasa veri kümelerini oluşturan topolojik indeksler, kuantum mekanik tanımlayıcılar gibi sayısız tanımlayıcı veya özellik ile karakterize edilebilir (Mostafa *et al.* 2022).



Şekil 2. CADD'da kullanılan yaklaşımlar

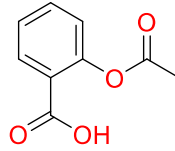
Bu tez çalışmasında da proteinin 3 boyutlu kristalografik yapısından faydalanılarak hesaplamalı inhibitör taraması gerçekleştirildi. Bu tarama ile “Drugbank”teki yaklaşık 10767 ilaç molekülünün *S. aureus* PBP3 ile kovalent bağ yapabilme potansiyelleri hesaplamalı olarak belirlendi. En iyi etkileşime sahip ilaç molekülleri arasından araştırma aşamasında olan Terbogrel hedef bileşik olarak seçildi. Ardından Terbogrel ve hedef bileşiğin moleküler dinamik simülasyonları yapıldı. Bu tez çalışmasının genel basamakları Şekil 3’de verildi.



Şekil 3. Çalışmanın basamakları

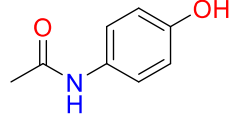
KURAMSAL TEMELLER

Kovalent inhibitörler, enzimlere bağlanan ve onları geçici veya kalıcı olarak etkisiz hale getiren küçük moleküllerdir. Kovalent inhibisyon iki aşamadan meydana gelen bir işlemdir (Suto *et al.* 2021). İlk aşamada, bir inhibitör hedef enzim ile tersine çevrilebilir bir şekilde birleşir ve inhibitörün ana kimyasal savaşıncısını enzimdeki hedeflenen bir reaktif rezidünün yakınına getirir. Ardından ikinci adımda, bir kovalent bağ oluşturmak için inhibitör ve enzimin iki reaktif varlığı arasında tepkimeler meydana gelir. Tersinir inhibitörler ikinci adımı içermezler ve bu nedenle de kovalent inhibitörlerden farklıdırlar. Kovalent olarak bağlı inhibitörler, bir süre sonra hedef enzimden salınmak için farklı kimyasal dönüşümler geçirebilir, hedefe kalıcı olarak bağlanarak enzimin inaktif durumda kalmasına da neden olabilir (Singh *et al.* 2011). Bayer'in bir ağrı kesici ve iltihap önleyici ilaç olarak asetilsalisilik asit (Aspirin) (1) ürettiği 19. yüzyıldan beri, hücrelerde işlevsel olarak kritik enzimleri hedefleyen kovalent inhibitörler olarak küçük moleküllerin kullanımı uygulanmaktadır. 20. yüzyılın başından beri piyasada olmasına rağmen, Aspirinin etki mekanizması olan prostaglandin biyosentezinde araçsal bir rolü olan siklooksijenaz 1'i (COX-1) geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiği 1970'lere kadar ortaya çıkmamıştı (Roth *et al.* 1975). Burada aspirin COX-1 ile etkileşime girdikten sonra, aktif bölge serin rezidüsünü asetiller ve böylece COX-1'i etkisiz hale getirir.



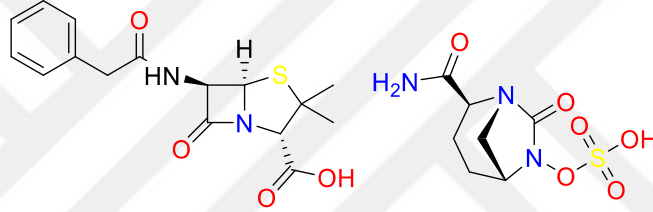
Şekil 4. Aspirin

Aspirinin keşfinden sonra asetaminofen (2) de 19. yüzyılda keşfedilerek hızlı bir şekilde ağrı kesici olarak tıbbi uygulamaya girdi. Etki mekanizması net olarak bilinmese de, asetaminofenin elektron açısından zengin özellikleri kinon benzeri yapılara yol açan oksidasyona eğilimlidir. Benzeri olmayan bu moleküller, protein-enzim inhibisyonu ile sonuçlanabilecek nükleofilik protein/enzim rezidülerinin saldırısına karşı savunmasızdır. Bu nedenle, asetaminofen kovalent bir inhibitör olarak da düşünülebilir (Baillie, 2015).



Şekil 5. Asetaminofen

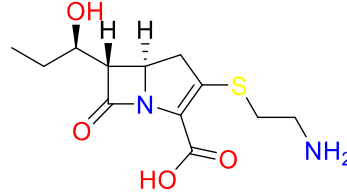
Bir başka öncü kovalent ilaç olan Penisilin (3), tesadüfen bir antibiyotik olarak tanımlanmış ve ilaç keşfi tarihinin en önemli bulgulardan biri olarak kabul edilmiştir. Günümüze kadar, insanların tedavisinde kullanılan bir dizi penisilin analogu onaylanmıştır. Penisilin ile birlikte, hepsi kimyasal savaş başlığı olarak bir β -laktam içerir ve benzer bir etki mekanizmasını paylaşırlar. β -laktam, bakteri hücre duvarı biyosentezinde yer alan d-Ala-d-Ala transpeptidazında aktif bölge serin rezidüsü ile reaksiyona girer. Bunun inaktivasyonu ile bakteri hücre duvarı biyosentezinin bozulması gerçekleşir ve bu durum da bakteri hücre lizisine yol açar (Yocum *et al.* 1980).



Şekil 6. Penisilin ve Avibaktam

Avibaktam (4) (Ehmann *et al.* 2012), Tienamisin (5) (Kahan *et al.* 1979) ve Sefalosporin (Yotsuji *et al.* 1988) gibi diğer kovalent antibiyotikler, bazı β -laktamaz inhibitörleri içerir. İnsan sağlığını etkileyen koşulları tedavi etmek için kovalent inhibitörler uzun süredir kullanılmasına rağmen, kovalent inhibisyon fikri 1990'lara kadar ön planda değildi, çünkü bunun nedeni birçok kovalent ilaç metabolitinin olumsuz etkilerinin belirlenmesiydi (Davis *et al.* 1974). Örneğin, Asetaminofenin hücre metabolitlerinin hepatotoksik olduğu tespit edildi. Asetaminofenin metabolizmasında Sitokrom P450 tarafından, kovalent modifikasyonlar için proteinlerde bulunan glutatyon (GSH) veya sistein rezidülerinin sülfhidril grubu ile reaksiyona giren yüksek reaktif kinon ara ürünlerine (NAPQI ve benzokinin) oksitlenir. Spesifik olmayan kovalent ilaç-protein etkileşimleri hastalarda istenmeyen immünojenik tepkilere neden olabilir. Bu gibi dezavantajlara rağmen, terapötik ajanlar olarak kovalent ilaçların geliştirilmesine olan ilgi birkaç faktör sayesinde canlanmıştır. Bunlardan birincisi, Aspirin ve Penisilin gibi piyasada bulunan başarılı kovalent ilaçlardır. İkinci olarak da, her kovalent ilaç metabolik aktivasyona uğradıktan sonra toksik hale gelmez. Ayrıca, birçok doğal ürün kovalent inhibitördür ve tersinir inhibitörlere göre hastalarda güçlü hedef afinitesi, uzun süreli aktivite gibi avantajlar sergilerler. Bu nedenle, bu inhibitörlerin farmakodinamik özellikleri plazmadaki ölçülebilir inhibitör

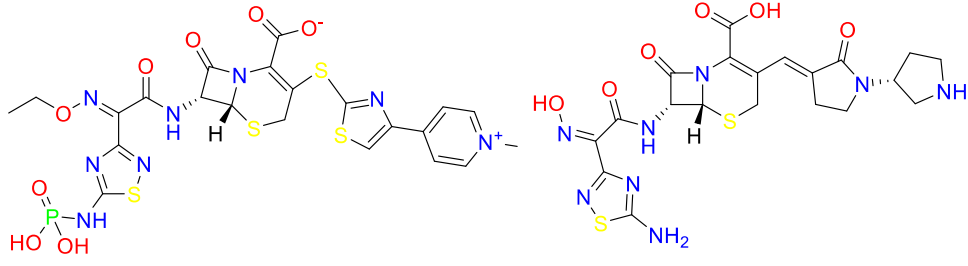
konsantrasyonlarından daha uzun süre dayanabileceğinden, istenmeyen farmakokinetik özellikler tolere edilebilir düzeydedir. Bu gözlemler ile birlikte, bir kovalent inhibitörün ana savaşınsının reaktivitesi kontrol edilebilirse, terapötik olarak kullanımına ilişkin önemli endişelerin en aza indirilebileceği sonucuna varılmıştır. Böylece, son on yılda kovalent inhibitörlerin gelişimi artmıştır (Ghosh *et al.* 2019).



Şekil 7. Tienamisin

Son yıllarda geliştirilen önemli bir başka husus, β -laktam antibiyotiklere dirençte PBP'lerin ve β -laktamazların rolünü anlamak için aktinobakterilerde hücre duvarı yeniden şekillenmesi kavramıdır. Ticari olarak temin edilebilen PBP inhibitörleri neredeyse sadece dört üyesi β -laktam halkasını içermektedir. Penisilinler, Sefalosporinler, Monobaktamlar ve Karbapenemler doğal temsilcilerinden geliştirilmekte ve Penisilin türevleri dışında en zararlı bakterilere karşı aktif yeni bileşikler bulmak için araştırmalar sürdürülmektedir. β -laktam antibiyotikler, PBP'yi cezbetmek için doğal substratın D-Ala-D-Ala parçasına olan yapısal benzerliklerinden yararlanmaktadır (Tipper and Strominger, 1965).

Yeni nesil Sefalosporinlerin geliştirilmesindeki çabalar, metisiline dirençli *S. aureus*'a karşı aktif iki bileşik olan Seftarolin ve Seftobiprolin pazarlanmasıyla doruğa ulaşmaktadır. Seftarolin, *P. aeruginosa* ve geniş spektrumlu β -laktamaz üreten Enterobacteriaceae gibi önemli istisnalar dışında, Gram pozitif patojenlere ve birkaç Gram negatif patojene karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahiptir (Mpenge and MacGowan, 2015; Ghamrawi *et al.* 2015). Seftobiprolin'ün, Gram-negatif ve diğer Gram-pozitif bakterilere, özellikle de Seftriakson dirençli streptokoklara karşı geniş spektrumlu aktivitelerle MRSA'ya karşı aktif olduğu bilinmektedir (Davies *et al.* 2012). Her iki bileşiğin de PBP2a'ya ve *E. faecium* PBP5'e bağlandığı, ancak PBP5'in PBP2a'ya kıyasla az afiniteye sahip olduğu gösterilmektedir (Henry *et al.* 2013). Her iki bileşiğin bağlanması, aktif bölge rezidülerinin yapısal olarak yeniden düzenlenmesini, esas olarak β zincirinde bir kaymayı ve rezidü omurgasının ve yan zincir atomlarının bükülmesini içermektedir. PBP2a'nın aktif bölgesinde Seftarolin bağlanması penisilin bağlanma domaini dışında bulunan bir allosterik bölgeyi kapsamakta ancak böyle bir allosterik bölgenin varlığı, ne PBP2a'da ne de PBP5m'de diğer β -laktamların bağlanması üzerine rapor edilmemiştir (Fishovitz *et al.* 2014).



Şekil 8. Seftarolin, Seftobiprolin

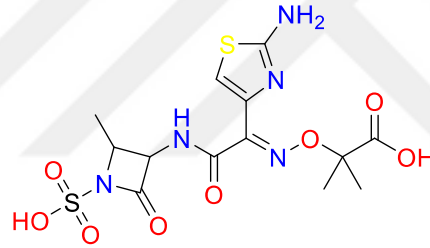
Han ve arkadaşları, *P. aeruginosa* PBP3'ün yapısını çeşitli bileşiklerle çözmektedirler. Seftazidimin B3-PBP'ler için afinitesinin, aminotiyazol halkasının birkaç aromatik rezidüden oluşan bir oyuğa oturmasından kaynaklandığını göstermektedir. Aminotiyazol afinite oyuğunu kaplayan rezidüler B3-PBP'lerde korunmakta ve bu nedenle aminotiyazol halkalı bir yan zincir taşıyan bileşiklerin Gram negatif bakterilere karşı aktif olma şansı yüksek olmaktadır. Seftazidim yan zinciri bir karboksipropiloksiimino parçasına sahip olmakta, ancak 2-amino-4-tiazolil metoksiimino yan zincirinin birçok üçüncü kuşak sefalosporin için ortak olduğu bilinmektedir. C sınıfı β -laktamazların zararlı etkisine direnmekte ve yeni β -laktamaz inhibitörlerinin geliştirilmesi için kullanılabilir. Ne yazık ki, bir 2-amino-4-tiazolil metoksiimino yan zincir taşıyan bileşik ile kompleks halindeki bir B3-PBP'nin yapısı çözülememekte ve metoksiimino kısmının aminotiyazol halka bağlama oyuğuna yerleşip yerleşmeyeceği bilinmemektedir (Trehan *et al.* 2002).

Karbapenemlerin en son kullanılan β -laktam antibiyotikler olduğu bilinmektedir. Geniş spektrumlu aktiviteleri ve antimikrobiyal ajanlar olarak yüksek güçleri, B2-penisilin bağlayıcı proteinlerin yanı sıra B3- penisilin bağlayıcı proteinleri bağlama yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (Davies *et al.* 2008). LD-transpeptidazları da inhibe etme yetenekleri dikkate değer görülmektedir (Mainardi *et al.* 2007; Triboulet *et al.* 2013; Lecoq *et al.* 2013). LD-transpeptidazlar, DD-transpeptidazlar tarafından oluşturulan klasik 4,3 çapraz bağ yerine bir 3,3 peptidoglikan çapraz bağ oluşumunu katalize etmektedir (Schanda *et al.* 2014). 3,3 çapraz bağ *M. tuberculosis*'in peptidoglikanında baskın olmadığı görülmekte ve klavulanik asit ile kombinasyon halinde olan karbapenemlerin ilaca dirençli *M. tuberculosis*'e karşı bakterisit olduğu bilinmektedir (Lavollay *et al.* 2008).

Beta-laktamaz üretiminin aracılık ettiği direncin yayılması ve yeni direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasıyla, bakteriler geliştiricilerin yaratıcılığına karşı savaşı kazanmaktadır. Direncin tüm karbapenemleri etkilediğinin görülmesi yeni etkili karbapenem arayışını azaltmış ve *in silico* analiz sonucu olarak belirlenen deneysel kanıt bekleyen yeni türev önerileri artmıştır (Chowdhury *et al.* 2015).

Karbapenemlere direnç, esas olarak β -laktamaz üretimi ile sağlanmaktadır. Karbapenemazların ilk önce metallo β -laktamazlar olarak bulunduğu, ancak şimdi tüm β -laktamaz sınıflarının karbapenemazlar içerdiği bilinmektedir. Son çalışmalara kadar, PBP2 mutasyonlarından kaynaklanan bir karbapenem-direnç mekanizması sadece deneysel olarak mutS ve tolC eksikliği olan bir *E. coli* suşunda görülmekteydi (Yamachika *et al.* 2013). Yakın tarihli bir makale, *E. coli*'nin klinik izolatlarını İmipeneme duyarlı olmayan hale getirmek için yeni bir mekanizma olarak PBP2'deki bir mutasyonu bildirmektedir (Aissa *et al.* 2015). PBP2'de ikinci motif alaninin bir serin ile süstitüe edilmesi, muhtemelen İmipenem hidroksietil grubu ile B2-PBP'lerin 2. motifinde bulunan aspartik asit arasındaki etkileşimi bozarak, İmipenem'in PBP2'ye afinitesini azaltmaktadır.

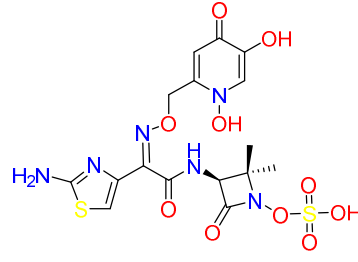
Birçok monobaktam geliştirilmiş olmasına rağmen, FDA onaylı tek monobaktam, Aztreonam antibiyotığıdır. Gram-negatif bakterilere etki ederken Gram-pozitifleri etkilememektedir. *P. aeruginosa* PBP3 yapısındaki, Seftazidim yan zincirinin aminotiyazol halkasını sıkıca barındıran enzim oyuğunun, gram-negatif B3-penisilin bağlayıcı protein kristal yapısı-aztreonamın aminotiyazol halkasını aynı şekilde kabul ettiğini gösterir.



Şekil 9. Aztreonam

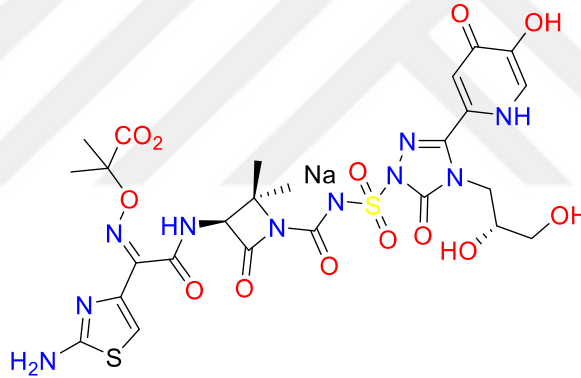
Son yapılan yeni monosiklik β -laktam tasarım çalışmaları, direnci önlemek için demir alım sistemlerinden yararlanan bir siderofor grubunun dahil edilmesini içermektedir. Monosülfaktam BAL30072'nin, 2-amino-4-tiazolil metoksiimino yan zincirinin metoksiimino parçasına bağlı bir siderofor grubuna sahip bir monobaktam olduğu bilinmektedir (Page *et al.* 2010).

P. aeruginosa, *A. baumannii* ve KPC'ye sahip *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı aktif olduğu ve meropenem veya kolistin ile kombine edildiğinde artan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Landman *et al.* 2014; Higgins *et al.* 2012; Russo *et al.* 2011). BAL30072, PBP3'ün yanı sıra PBP1a ve PBP1b için de yüksek bir afiniteye sahip olmaktadır (Page *et al.* 2010). Aminotiyazol grubunun, PBP3 için yüksek bir afinite ile sonuçlanan PBP3 aktif bölgesine uyması beklenmektedir. Aynı doğrultuda, yeni monokarbamlar N-1 konumunda bir karbonilaminosülfonil aktive edici gruba sahip monosiklik β -laktamlar olarak görülmekte ve Pfizer ve arkadaşları tarafından geliştirilmektedir.



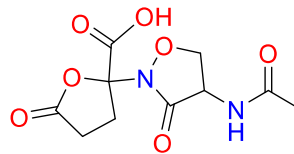
Şekil 10. BAL30072

MC-1'in, *P. aeruginosa* klinik izolatlarına karşı oldukça aktif bir siderofor-konjuge monokarbam olduğu ve PBP3 ile eklentinin kristal yapısı, hedef optimizasyonu için yapısal bir temel sağlamaktadır (Han *et al.* 2010). İyi farmakokinetik özelliklere sahip güçlü *P. aeruginosa* PBP3 inhibitörleri sağlayan triazolon bazlı siderofor-konjuge monokarbam için yapı aktivite ilişkileri araştırılmaktadır (Murphy-Benenato *et al.* 2015). Sideroforla konjuge monokarbamların değerli özelliklerine rağmen, siderofor aracılı demir alım sistemlerinin çeşitli bileşenlerine bağlı genlerdeki mutasyonlar yoluyla direnç hızla ortaya çıkabilmektedir (Kim *et al.* 2015).



Şekil 11. MC-1

PBP'lerin β -laktam olmayan inhibitörleri β -laktamazların etkisinden kaçmakta, ancak hiçbiri henüz klinik deneyleri başlatmak için gerekli aşamalardan geçmemiştir. Penisilin bağlayıcı proteinlerin en umut verici β -laktam olmayan inhibitörleri kesinlikle Laktivisin analoglarıdır.



Şekil 12. Laktivisin

Laktivisin türevleri 30 yıldan fazla bir süredir bilinmekte ve geniş bir bakteri yelpazesine karşı antimikrobiyal aktivite sergilemektedir (Tamura *et al.* 1990; Brown *et al.* 2010). Laktivisin analogları, aktif bölge serin ve *S. pneumoniae* PBP1b (Macheboeuf *et al.* 2007) ve *P. aeruginosa* PBP3- PBP1a (Starr *et al.* 2014) ile rezidülerinin kristal yapıları ile stabil bir kovalent kompleks oluşturmakta, aktif serinin açılması üzerine hem monosiklik siklosterin hem de γ -lakton halkalarının açılmasını ortaya çıkarmaktadır. Son gelişmeler, siderofor reseptörü alım stratejisinden yararlanmak için bir siderofor parçasının dahil edilmesini içermektedir (Starr *et al.* 2014). Yan zincir oksimin grubuna bağlı bir hidrokspiridon parçasının dahil edilmesi, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında MIC'leri iyileştirmektedir. PBP-Laktivisin yapılarında gözlemlendiği gibi her iki halkanın açılmasına ek olarak, *P. aeruginosa* PBP3'ün kristal yapısı, aminotiyazolün Seftazidim ve Aztreonam'deki gibi konumlanırken, etilen karboksilat parçasının açılmasından kaynaklanan etilen karboksilat parçası lakton halkası ve dihidrokspiridonun sideromimik kısmı, enzim ile güçlü etkileşimler oluşturamamakta ve şaşırtıcı bir şekilde, daha etkili bir sideromimik α -lakton pozisyonuna bağlamak, daha düşük MIC'lerle sonuçlanmaktadır. Ayrıca penisilin bağlayıcı protein'lerin aktif serini ile diğer reaktif merkezlerin reaksiyona girdiği gösterilmektedir. Uygun bir peptidoglikan mimetik yan zinciri taşıyan bir boronik asit ve bir trifloro keton, Actinomadura R39 DD-peptidaz ile kovalent kompleksler oluşturabilmektedir (Dzhekieva *et al.* 2013). Diğer boronik asitler de tasarlanmış ve *pneumoniae* PBP1b'ye bağlandığı gösterilmiştir (Contreras-Martel *et al.* 2011). Çarpıcı bir şekilde, peptidoglikan mimetik boronik asit, HMW-PBP'lere bağlanamamakta, bu da HMW-PBP'lerin doğal substratları için zayıf afinitesini ortaya koymaktadır. Boronik asit gibi bir Seftazidimin CTX-M-9 16 sınıf A β -laktamazlara sıkı bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir (Delmas *et al.* 2008).

Kovalent olmayan inhibitörler, ileriye dönük bir seviyede kalmaktadır. Genellikle *in silico* taramaya dayanan son araştırmalar, öncelikle MRSA PBP2a'yı hedefleyen ilginç bileşikler ortaya çıkarmaktadır. Örneğin, oksadiazoller, ZINC veri tabanından (Irwin *et al.* 2012) bileşiklerin *in silico* taramasıyla keşfedilmekte ve Gram-pozitif bakteri suşlarına (Spink *et al.* 2015) karşı çekici özellikler göstermektedir. Makrosiklik gömülü β -laktamlar ayrıca *S. aureus* PBP2a ve *E. faecium* PBP5 ile orta düzeyde PBP inhibisyon özellikleri göstermektedir (Dive *et al.* 2013).

PBP2a, aktif bölge açılmasını tetiklemek için bir allosterik bölge kullanıyor gibi görünmektedir (Otero *et al.* 2013; Fishovits *et al.* 2014). Bu gözlem, moleküler doking teknikleri (Rani *et al.* 2016; Lavanya *et al.* 2016) yardımıyla allosterik bölgeye bağlanan yeni

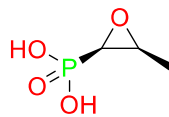
bileşiklerin araştırılmasını teşvik etmektedir. Bu bileşiklerin etki mekanizması ve klinik olarak faydalı bakterisidal ilaçlara yol açma potansiyelleri daha fazla analiz gerektirmektedir.

Yakın zamanda, *N. gonorrhoeae* penisilin bağlayıcı protein 2'ye karşı elli bin bileşiğin taranmasına ve penisiline dirençli gonokok suşları üzerinde aktif olan, β -laktam olmayan 7 bileşiğin tanımlanmasına izin veren *in silico* yöntemlere ek yüksek verimli bir tarama testi geliştirilmiştir (Fedarovich *et al.* 2012). Test, bir floresan β -laktam olan Bocillin-FL'nin çözünürleştirilmiş PBP'ler ile etkileşimine dayanmakta ve bu, zamana bağlı bir şekilde floresan anizotropisinde bir artışa neden olmaktadır. Test, TP inhibitörlerinin nispeten yüksek verimli taramasının geliştirilmesine izin veren mikrotitre plakalarında sürekli olarak izlenebilmektedir.

Son olarak, antibiyotiklere direnci aşmak için β -laktamların diğer β -laktamlar, β -laktamaz inhibitörleri veya diğer metabolik yolu hedefleyen ilaçlarla kombinasyon halinde sinerjik kullanımı yeniden canlandırılmaktadır. Bu kombinasyonlar sadece dirençli patojenlerle mücadelede değil, aynı zamanda *in vitro*, özellikle klinik durumlarda görünüşte duyarlı olan bakterilerde de faydalı olabilmektedir (English, 2014).

Yeni β -laktamaz inhibitörleri ve yeni PBP inhibitörleri bir araya getirilerek, esas olarak karbapenemaz üreten Gram-negatif patojenlere karşı hedeflenen orijinal kombinasyonlar elde edilmektedir. Şu anda birkaç kombinasyon klinik aşamada olduğu ve bunlardan ikisinin (Seftolozan/Tazobaktam ve Seftazidim/Avibaktam) yakın zamanda FDA tarafından onaylandığı bilinmektedir. Ayrıca Gram-negatif bakteriler için ikili β -laktam tedavisi, en az Gram-negatif enfeksiyon tedavisi için önerilen (bir β -laktam +bir aminoglikozid) kombinasyonları kadar etkili olduğu belirlenmiştir (Rahme *et al.* 2014). İkili β -laktam tedavisi, Gram-negatif bakterilerle sınırlı olmamakta, aynı zamanda MRSA'da dirençle mücadeleye de katkıda bulunabilmektedir (Gonzales *et al.* 2015).

Yeni küçük moleküllerin son zamanlarda çeşitli patojenlere karşı β -laktam aktivitesini güçlendirdiği belirlenmiştir; örneğin hipotetik hücre duvarı sentezi hedefleme işlevine sahip β -siklodekstrin türevi olan Fosfomisin protein sentezi inhibitörleri ve MRSA'ya karşı Sefepim arasında pozitif etkileşimler bulunmaktadır (Guignard *et al.* 2013; Deng, 2013; Del Rio *et al.* 2016; Nair *et al.* 2015).



Şekil 13. Fosfomisin

İlaç geliştirme çok zaman alıcı ve yoğun sermaye gerektiren bir süreçtir. 2014 yılında yapılan bir araştırma, reçeteli bir ilacın geliştirilmesinin maliyetinin ortalama 2,87 milyar dolar olduğunu gösterirken büyük olasılıkla o zamandan günümüze maliyetler giderek artmıştır. Potansiyel bir ilacın elde edilmesi, ilaç gelişim aşamaları ve klinik deneme fazlarından oluşmaktadır. Bu süreç ise yıllar almakta ve çoğu zaman piyasaya ulaşmadan önce bileşikler başarısız olmaktadır. İlaç geliştirme sürecinin tamamına bakıldığında binlerce hatta milyonlarca aday bileşik arasından potansiyel öncül bileşiğin belirlenmesinin problemli evrelerinden biri olduğu gözlenmektedir. Bu evrede genellikle “Yüksek Verimli Tarama” sistemi kullanılmaktadır. Bu sistem özellikle ilaç keşiflerinde kullanılan robotik, veri işleme/kontrol yazılımı, sıvı taşıma cihazları ve hassas dedektörleri kullanarak, bir araştırmacının milyonlarca kimyasal, genetik veya farmakolojik testlerini hızlı bir şekilde yapmasını sağlar. Bu sistemin tespit ettiği öncül ilaç sayısına bakıldığında yapılan taramanın çok ağır maliyete ve zaman kaybına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden günümüzde birçok araştırmacı *in vitro* “Yüksek Verimli Tarama” yı sanal Tarama ile desteklemeyi seçmektedir.

Sanal tarama, ilaç keşfedilmesi sürecinde istenilen spesifik özelliklere sahip yeni hedeflerin tespiti için çok sayıda molekül içeren kütüphanelerin bilgisayar ortamında tarandığı güçlü bir hesaplama yaklaşımı olarak ortaya çıkmaktadır. Diğer hesaplama yaklaşımlarına benzer şekilde, bu sanal tarama çalışmalarının amacı *in vitro* veya *in vivo* deneylerinin yerine geçmek değil; keşif sürecini hızlandırmak, deneysel olarak test edilecek aday sayısını azaltmak veya seçimlerini rasyonelleştirmektir. Yapı temelli ilaç tasarımı günümüzde tedavi edici ajanların etkin gelişimi ve metabolik süreçlerin anlaşılması için önem arz etmektedir. Bu ilaç tasarımı, bir hastalığın moleküler temelini anlaşılmasına ve biyolojik hedefin üç boyutlu (3D) yapı bilgisinin kullanılmasına olanak sağladığı için geleneksel ilaç keşif yolundan daha verimli olduğu kanıtlanmıştır. Hesaplamalı yöntemler ve protein hedeflerinin 3D yapısal bilgileri kullanılarak, ligand-protein bağlanmasında yer alan temel moleküler etkileşimler araştırabilmekte ve bu sayede deneysel sonuçlar atomik seviyede ayrıntılı olarak yorumlanabilmektedir. Sonuç olarak hesaplama uygulamaları, ilaç tasarım sürecini hızlandırmış, binlerce bileşiğin anında taranmasını mümkün kılmıştır ve potansiyel adayları istenen biyolojik hedefe karşı seçme olanağı sağlamıştır. Yüksek verimli tarama sıklıkla hatalı negatiflerle sıkıntı oluşturduğundan, yapı temelli ilaç tasarımı ilaç endüstrisi için ümit verici bir araç olarak ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bu tez kapsamında; özellikle bazı hastalıklar için yüksek maliyet gerektiren yeni moleküllerin sentezlenmesi yerine piyasada var olan ilaçların bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılması amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Tez çalışmasında Maestro Schrödinger Programının Protein Hazırlama Sihirbazı, Glide, Desmond modülleri ve sanal tarama için Drugbank databazı kullanıldı. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü ve Bilgisayar Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkez'inde bulunan bilgisayarlar kullanıldı.

Yöntem

Protein Hazırlama

RCSB Protein Databank'dan PDB ID'leri CEF ligandı ile kompleks 3VSL protein kristal yapı indirildi ve Maestro'nun Protein Hazırlama sihirbazı kullanılarak hazırlandı. Hazırlama sürecinde hidrojenlerin eklenmesi, PROPKA ile pH 7'de hidrojen bağlarının belirlenmesi, Kuvvet alanı OPLS4 kullanılarak yapının minimize edilmesi ve son olarak bağlanma oyuğunda fonksiyonu bulunmayan su moleküllerinin yapıdan uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Hazırlanan bu yapıdan beraber kristalize edilmiş ligandın Ser392 rezidüsü ile oluşturduğu kovalent bağ koparıldı. Ardından Ser392 rezidüsüne hidrojen eklenerek tekrar inşa edildi.



Şekil 14. *S. aureus* PBP3 proteininin 3B yapısı

Ligand Hazırlama

Drugbank databankındaki tüm moleküller (~10767) indirildi ve LigPrep modülü ile hazırlandı (Schrödinger Release, 2019-4: LigPrep, 2019). Bu modül 2D yapıların 3D koordinatlara dönüştürülmesi, Epik kullanılarak pH $7.0 \pm 2,0$ 'da olası iyonlaşma durumlarının oluşması, tautomer üretimi, ligand başına en fazla 32 stereoizomer oluşumu, 3D koordinatlardan kiralite tayini, düşük enerji halkası üretimi yaparak ligandları hazırlamaktadır. OPLS4 kuvvet alanı kullanılarak konformasyon ve enerji minimizasyonu gerçekleştirildi. Sonuçta Ligprep kullanılarak kütüphane hazırlandığında ilaç molekül sayısının ~23038 olduğu belirlendi.

Sanal Tarama

Hazırlanan protein yapısına kovalent doking protokolü kullanılarak ko-ligand olan Sefotaksim'in tekrar dokingi yapıldı. Ardından ilaç databankasında bulunan ilaçlar içerisinde “beta laktam katılma”, “boronik asit katılma”, “konjuge katılma alkene (nitril ile aktifleştirilmiş)”, “konjuge katılma alkine (karbonil ile aktifleştirilmiş)”, “konjuge katılma alkine (aril ile aktifleştirilmiş)”, “epoksit açılması”, “Micheal katılması” ve “üçlü bağa

nükleofilik katılma” yapabilecek reaksiyon bölgeleri belirlendi ve ardından Glide kovalent doking işi başlatıldı. Böylece ilaçların *S. aureus* PBP3 ile etkileşimlerinin incelenebilmesi için pozlar elde edildi. Tarama sonucu belirlenen ilaçlar içinde aynı Drugbank ID sine sahip birden fazla sonuç elde edildi. Bu oluşumun sebebi kiral merkeze sahip moleküllerin enantiyomerlerinin oluşmasındandır. Bu yüzden aynı Drugbank ID sine sahip skorlar incelendi ve proteine ilgisi az olan enantiyomerler ve tanı -kozmetik amaçlı kullanılan ilaç ve ilaç adayları elendi. Kalan moleküller için Maestro Canvas Benzerlik ve Kümeleme programı kullanılarak kümeler oluşturuldu. Ligandların benzerlikleri, Tanimoto benzerlik matrisi üzerinde "ortalama" bağlantı yöntemi kullanılarak hiyerarşik kümeleme ile tamamlandı. Her kümedeki en yüksek skora sahip moleküllerin iki boyutlu etkileşim grafiklerinin analizi yapıldı. Aktif bölge rezidüleri ile etkileşimleri görsel olarak incelendi. Bu inceleme sonucu MD simülasyonu gerçekleştirilecek ilaç molekülü belirlendi ve kompleksin stabilitesini belirlemek amacıyla 200 ns’lik simülasyonu gerçekleştirildi (Duan *et al.* 2010; Schrödinger Release, 2019-1: Desmond). Sistem oluşturucu paneli, TIP3P modeliyle bir orthorhombik simülasyon kutusu hazırlamak için kullanılacak ve protein yüzeyi ile simülasyon kutusunun arası minimum 10 Å mesafe olacak şekilde ayarlandı. Nötralizasyon işlemi için iyonlar eklendi. Sistem, 1 kcal/mol/Å çakışma kriteri ile 2000 tekrarlamayla minimize yapıldı. Minimize sistemler, simülasyondan önce varsayılan ayarlar ile 310 K ve 1.013 bar da NPT (normal Basınç ve sıcaklık) kullanılarak 200 ns’lik MD simülasyonlarına tabi tutuldu. Nose-Hoover termostatu ve Martyna-Tobias-Klein barostat sırasıyla sıcaklık ve basıncı korumak için kullanıldı. Simülasyon boyunca her 20 piko saniyede bir enerji ve yapı yörüngeye kaydedildi. Üç boyutlu yapılar ve yörüngeler Maestro kullanılarak görsel olarak incelendi (Hoover, 1985; Bowers *et al.* 2006).

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

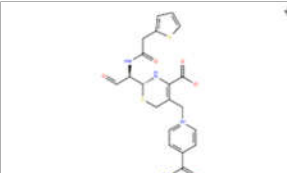
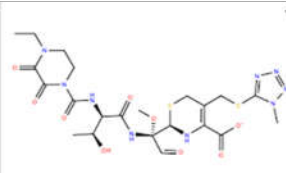
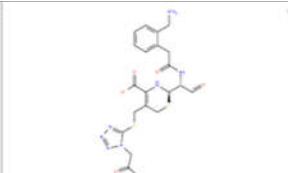
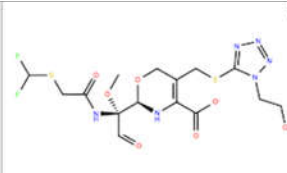
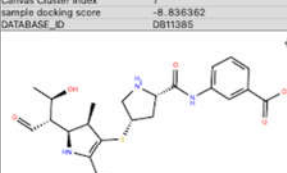
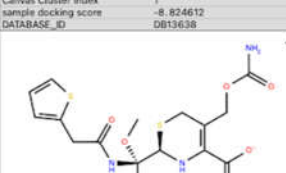
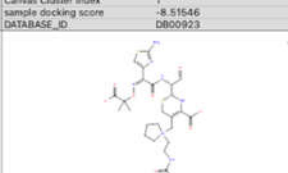
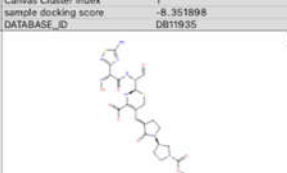
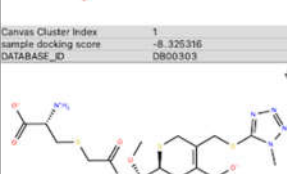
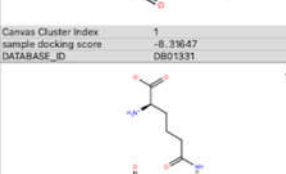
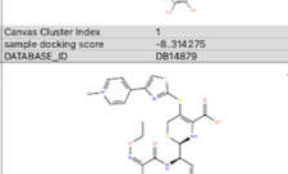
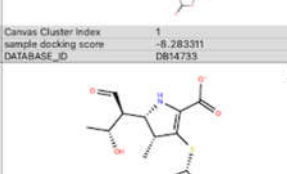
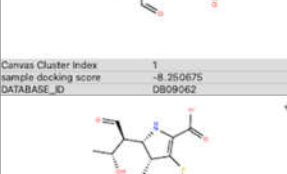
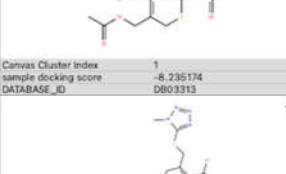
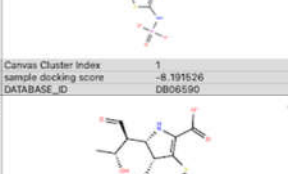
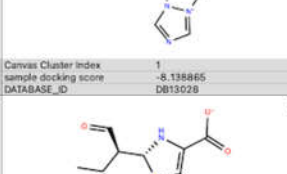

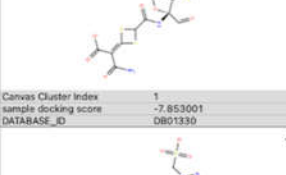

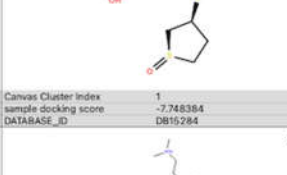

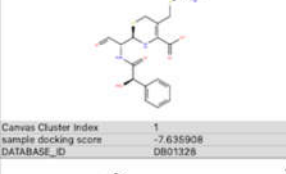
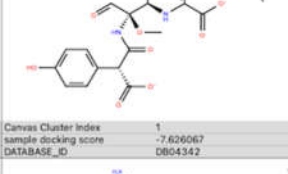
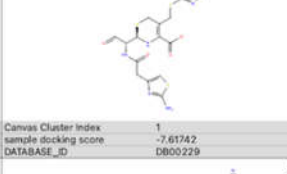
Staphylococcus aureus yaygın bir Gram pozitif fırsatçı patojendir ve metisiline dirençli formunun (MRSA) klinik olarak tedavisi özellikle daha zordur. PBP3, bazen dimerizasyon alanı olarak adlandırılan bir N-terminali penisilin bağlamayan domaine ve bir C-terminal transpeptidaz domainine sahip olan bir B sınıfı PBP'dir. PBP proteinleri, proteinlerin transpeptidaz alanlarını devre dışı bırakan ve böylece bakteri hücre duvarının PBP ile indüklenen çapraz bağlanmasına müdahale eden β -laktam antibiyotikler tarafından hedeflenmektedir (Carlos, 2011). Bu tezde ise *Staphylococcus aureus* PBP3'üne karşı yeni, β -laktam olmayan inhibitörleri keşfetmek için, var olan ilaçların tekrar kullanımını amacıyla Drugbank databazı kullanarak kovalent dokinge dayalı sanal tarama gerçekleştirildi.

Penisilin Bağlantıcı Protein Sanal Tarama Sonuçları

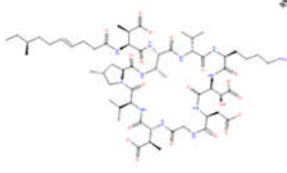
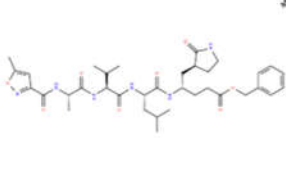
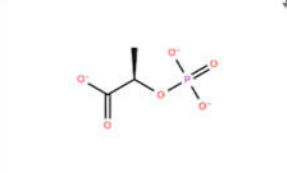
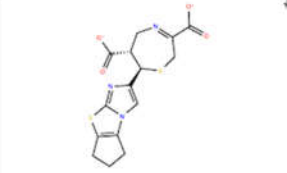
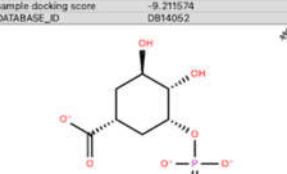
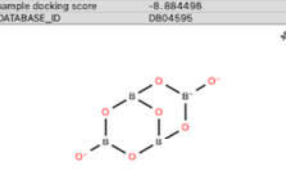

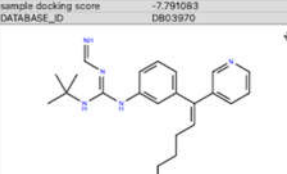
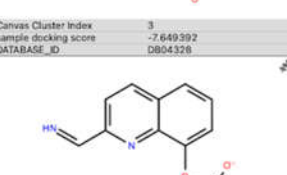

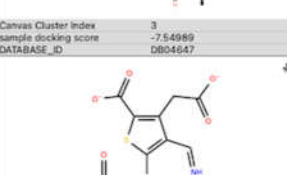
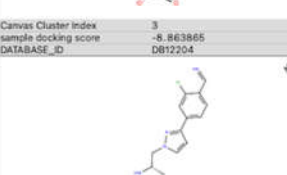
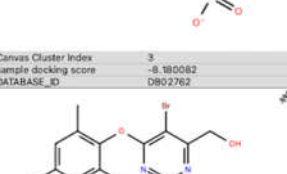
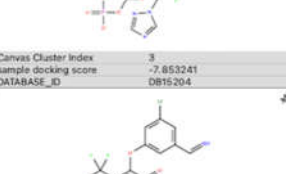
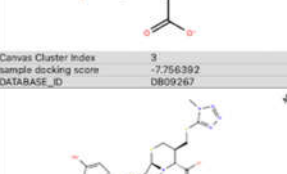
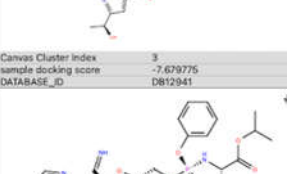
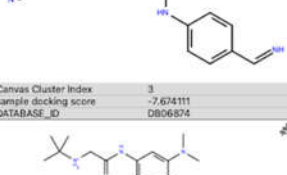


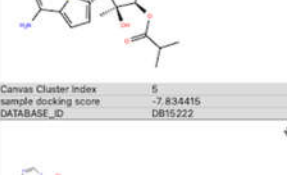
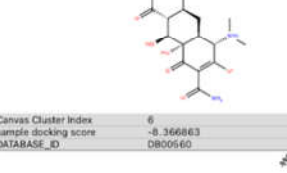
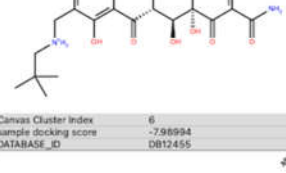
Küçük moleküllerin geleneksel tasarımından farklı olarak, kovalent inhibisyon, hedefle tersinir veya tersinmez olabilen açık bir bağ oluşturarak çalışır. Bağın ne kadar uzun süre de olduğu, aktif bölgede bulunma yüzdesi ve özgülük veya hedef dışı bağlanma gibi kavramlar, bu moleküllerin tasarımında dikkate alınması gereken birçok önemli faktörden birkaçıdır. Geleneksel ilaç tasarımından farklı olarak, kovalent inhibisyon, bağlanma termodinamiği yerine reaksiyon kinetiği tarafından yönetilir. Sanal Tarama modu, kovalent protein-ligand kompleksleri için pozları tahmin etmenin hızlı ve doğru bir yolunu sağlarken, Poz Tahmin modu, kovalent yerleştirme hesaplamalarını gerçekleştirmenin daha kapsamlı bir yöntemidir.

Bir kovalent doking işinin yapısal çıktısı, bir Maestro dosyasındaki kovalent olarak bağlı pozlardan oluşur. Her pozun kendisiyle ilişkili üç ana özelliği vardır: afinite puanı (cdock afinitesi), pozun Prime enerjisi (Prime Energy) ve ligandın birden fazla bölgesi varsa ligand üzerindeki reaktif bölgeyi tanımlayan bir indeks (ligand reaksiyon bölgesi). Pozları karşılaştırmak yalnızca aynı bölgeye bağlanan pozlar için anlamlı olduğundan, belirli bir ligand bölgesi için pozları seçmek ve karşılaştırmak için indeks kullanılabilir. Puanlama özellikleri (i)cdock afinite (tepkime öncesi ve sonrası pozların Glide Skorlarının ortalaması) (ii) score docking score (tepkime sonrası pozun Glide Skorları) (iii). sample docking score (tepkime öncesi pozların GlideSkorları) (iv) docking score (Afinitenin en iyi tahmincisi, bileşiklerin sıralanmasında kullanılması önerilir. Poz tahmin modu için "cdock afinitesi" ile aynı; tarama modu için "sample docking score" aynıdır).

Bu tezde PBP3 protein kristal yapısı kullanılarak Drugbank’da bulunan ilaçlar içerisinde “beta laktam katılma”, “boronik asit katılma”, “konjuge katılma alkene (nitril ile aktifleştirilmiş)”, “konjuge katılma alkine (karbonil ile aktifleştirilmiş)”, “konjuge katılma alkine (aril ile aktifleştirilmiş)”, “epoksit açılması”, “Micheal katılması” ve “üçlü bağa nükleofilik katılma” yapabilecek reaksiyon bölgeleri belirlendi ve ardından Glide kovalent doking başlatıldı. Elde edilen sonuçlardan doking skorlar göz önüne alınarak sıralama yapıldı. Sıralamada aynı Drugbank ID’sine sahip birden fazla sonuç olduğu belirlendi. Bu oluşumun sebebi kiral merkeze sahip moleküllerin enantiyomerlerinin de içinde olmasıdır. Kiral merkeze sahip moleküllerin enantiyomerlerinden ilgisi en fazla olanlar seçildi ve diğerleri elendi. Geri kalan moleküller tek tek incelendi tanı ve kozmetikte kullanılanlar hariç tutuldu. Son olarak geri kalan moleküller Maestro Canvas Benzerlik ve Kümeleme programı kullanılarak kümeler oluşturuldu ve bileşiklerin 8 farklı kümeden olduğu belirlendi (Şekil 15). Ayrıca ilaçların Drugbank ID’leri, doking skorları ve hangi kümede yer aldıkları Şekil 15’de verildi.

 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.836362 DB11385	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.824612 DB13638	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.51546 DB00923	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.351898 DB11935
 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.326316 DB00303	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.33647 DB01331	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.314275 DB14879	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.283311 DB14733
 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.260675 DB09062	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.235174 DB01331	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.191526 DB06590	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.138865 DB13028
 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -8.034467 DB12587	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.853001 DB01330	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.79422 DB06211	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.748384 DB16284
 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.722958 DB01329	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.635908 DB01328	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.626067 DB04342	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.61742 DB00229
 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.549229 DB00760	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -7.510118 DB04293	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	1 -6.66736 None	 Canvas Cluster Index sample docking score DATABASE_ID	2 -8.458768 DB13054

Şekil 15. Sanal tarama sonucu belirlenen ilaçların ID'leri, Docking skorları ve küme grupları

 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -9.211574 DATABASE_ID DB14062	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -8.884498 DATABASE_ID DB04596	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -8.292162 DATABASE_ID DB01819	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.791083 DATABASE_ID DB03970
 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.649392 DATABASE_ID DB04328	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.852475 DATABASE_ID DB14553	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.54989 DATABASE_ID DB04647	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -8.863865 DATABASE_ID DB12204
 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -8.180082 DATABASE_ID DB02782	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.853241 DATABASE_ID DB15204	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.756392 DATABASE_ID DB09267	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.679775 DATABASE_ID DB12941
 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.674111 DATABASE_ID DB06874	 Canvas Cluster Index 3 sample docking score -7.673625 DATABASE_ID DB12301	 Canvas Cluster Index 4 sample docking score -8.087393 DATABASE_ID DB00430	 Canvas Cluster Index 5 sample docking score -7.834415 DATABASE_ID DB15222
 Canvas Cluster Index 6 sample docking score -8.366883 DATABASE_ID DB00560	 Canvas Cluster Index 6 sample docking score -7.96994 DATABASE_ID DB12455	 Canvas Cluster Index 7 sample docking score -8.565857 DATABASE_ID DB04210	 Canvas Cluster Index 8 sample docking score -8.706019 DATABASE_ID DB02820
 Canvas Cluster Index 8 sample docking score -8.880393 DATABASE_ID DB03698	 Canvas Cluster Index 8 sample docking score -7.668177 DATABASE_ID DB00197		

Şekil 15. Sanal tarama sonucu belirlenen ilaçların ID'leri, Doking skorları ve küme grupları (Devamı)

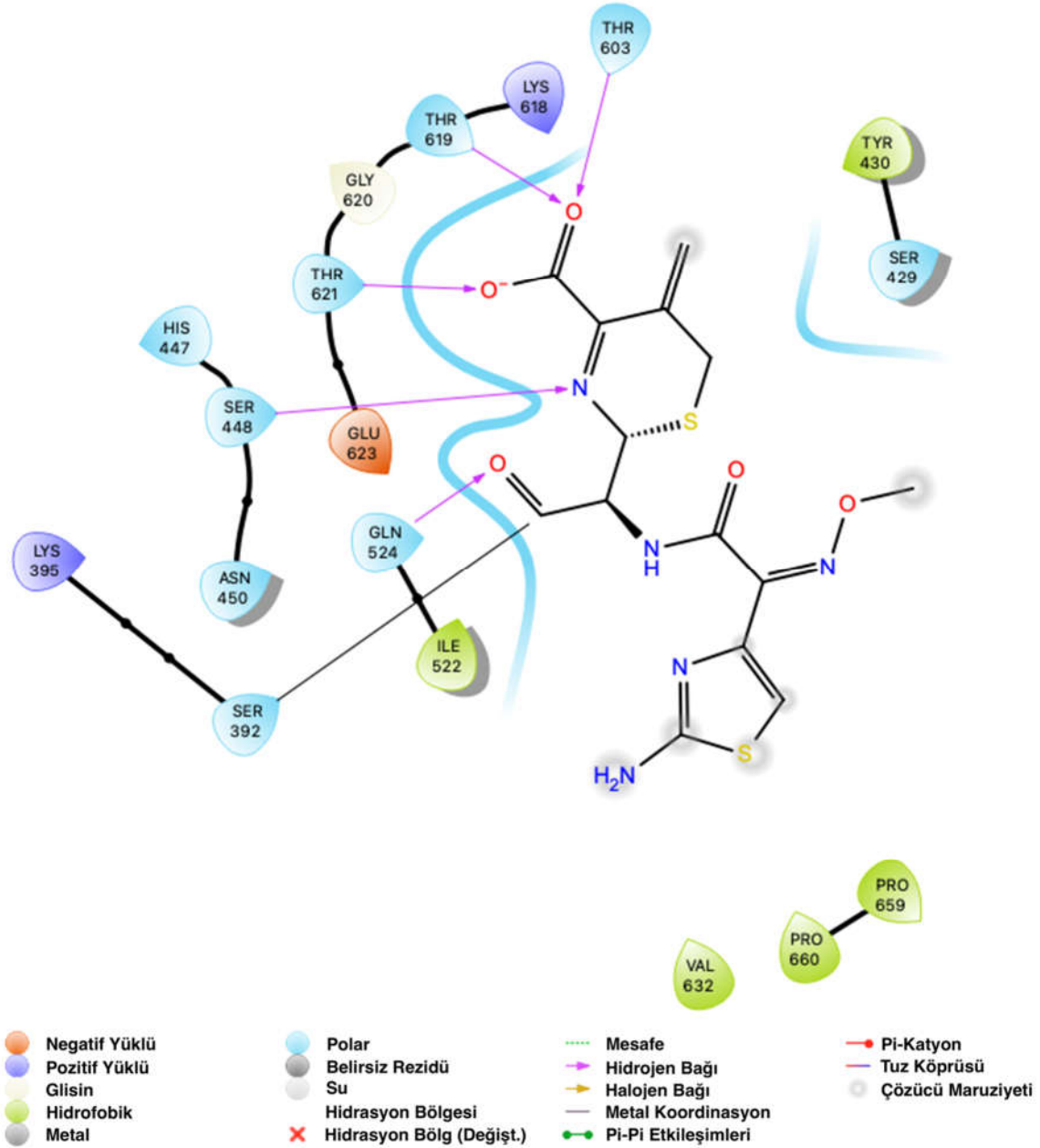
Tablo 1. *S. aureus* PBP3 proteinine karşı belirlenen ilaçlar

ID Numara	İlaç Adı	Grup	Dokim Skor	Küme	Hedef veya Tedavi	
1	DB02820	1-azepan-1-yl-2-fenil-2-(4-tiyokso-1,4-dihidro-pirazolo[3,4-d]pirimidin-5-yl)etanon	Deneysel	-9,700	8	3-hidroksiasil-CoA dehidrojenaz tip-2
2	DB14052	Malasidin B	Deneysel	-9,211	3	Peptidoglikanın NAM/NAG peptid alt birimleri
3	DB04595	(E)-(4s,6s)-8-metil-6-((s)-3-metil-2-((s)-2-[(5-metil-izoksazol-3-karbonil)-amino]-propionilamino)-butirilamino)-5-okso-4-((r)-2-okso-pirrolidin-3-ilmetil)-non-2-enoik asit benzil ester	Deneysel	-8,884	3	-
4	DB03698	5-merkaptetan-2-desenoil-koenzim a	Deneysel	-8,880	8	2,4-dienoil-CoA redüktaz [NADPH]
5	DB12204	Terbogrel	Araştırma	-8,863	3	Pulmoner hipertansiyon tedavisi
6	DB11385	Sefalonyum	Deneysel, Veteriner onaylı	-8,836	1	Penisilin bağlayıcı protein
7	DB13638	Sefbuperazon	Deneysel	-8,824	1	Penisilin bağlayıcı protein
8	DB04210	3-(alfa-D-galaktopiranosiloksi)-N-(3-{4-[3-({3-((heksopiranosiloksi)-5-nitrofenil)karbonil})amino]propil}piperazin-1-il)propilamino]-3,4-dioksosiklobut-1-en-1-il)amino)propil}piperazin-1-il)propil)-5-nitrobenzamid	Deneysel	-8,563	7	Kolera enterotoksin alt birimi B
9	DB00923	Seforanid	Onaylı	-8,515	1	Penisilin bağlayıcı protein 2
10	DB13054	ACT-451840	Araştırma	-8,458	2	Sıtma tedavisi
11	DB00560	Tigesiklin	Onaylı	-8,366	6	16S ribozomal RNA. 30S ribozomal protein S9, S12, S13, S14, S19
12	DB11935	Flomoksef	Araştırma	-8,351	1	İdrar yolu enfeksiyon tedavisi
13	DB00303	Ertapenem	Onaylı, Araştırma	-8,325	1	Penisilin bağlayıcı protein 2, 1A, 1B. Peptidoglikan sentaz FtsI, D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacB, DacC
14	DB01331	Sefoksitin	Onaylı	-8,316	1	D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacC, DacA, DacB. D-alanil-D-alanin endopeptidaz. Penisilin bağlayıcı protein 1A, 1B, 3, 1b, 2a, 2B. Peptidoglikan sentaz FtsI.
15	DB14879	Sefiderokol	Onaylı, Araştırma	-8,314	1	Penisilin bağlayıcı protein 3, 1A, 1B, 2. D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacB.
16	DB01819	Fosfoenolpiruvat	Deneysel	-8,292	3	2-dehidro-3-deoksifosfooktonat aldolaz, beta-enolaz, Fosfoenolpiruvat karboksikinas (sitozolik [GTP]), Fosfo-2-dehidro-3-deoksiheptonat aldolaz, (Phe'ye duyarlı). Kapsül biyosentez proteini
17	DB14733	Seftobiprol medokaril	Onaylı, Deneysel, Araştırma	-8,283	1	Bakteriyel enfeksiyon ve Zatürre tedavisi
18	DB09062	Sefminoks	Deneysel	-8,250	1	Antibiyotik
19	DB03313	Sefalosporin C	Deneysel	-8,235	1	Penisilin bağlayıcı protein 1b,-1A, 2B, 2a, 3, D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz
20	DB06590	Seftarolin Fosamil	Onaylı, Araştırma	-8,191	1	Bakteriyel enfeksiyon tedavisi
21	DB02762	RU79072	Deneysel	-8,180	3	Proto-onkogen tirozin-protein kinaz Src
22	DB13028	Biapenem	Araştırma	-8,138	1	Bakteriyel enfeksiyon tedavisi
23	DB00430	Sefpiramid	Onaylı	-8,087	4	Peptidoglikan sentaz FtsI, Penisilin bağlayıcı protein 1B, 1A, 2a, D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacC

Tablo 1. S. aureus PBP3 proteinine karşı belirlenen ilaçlar (Devamı)

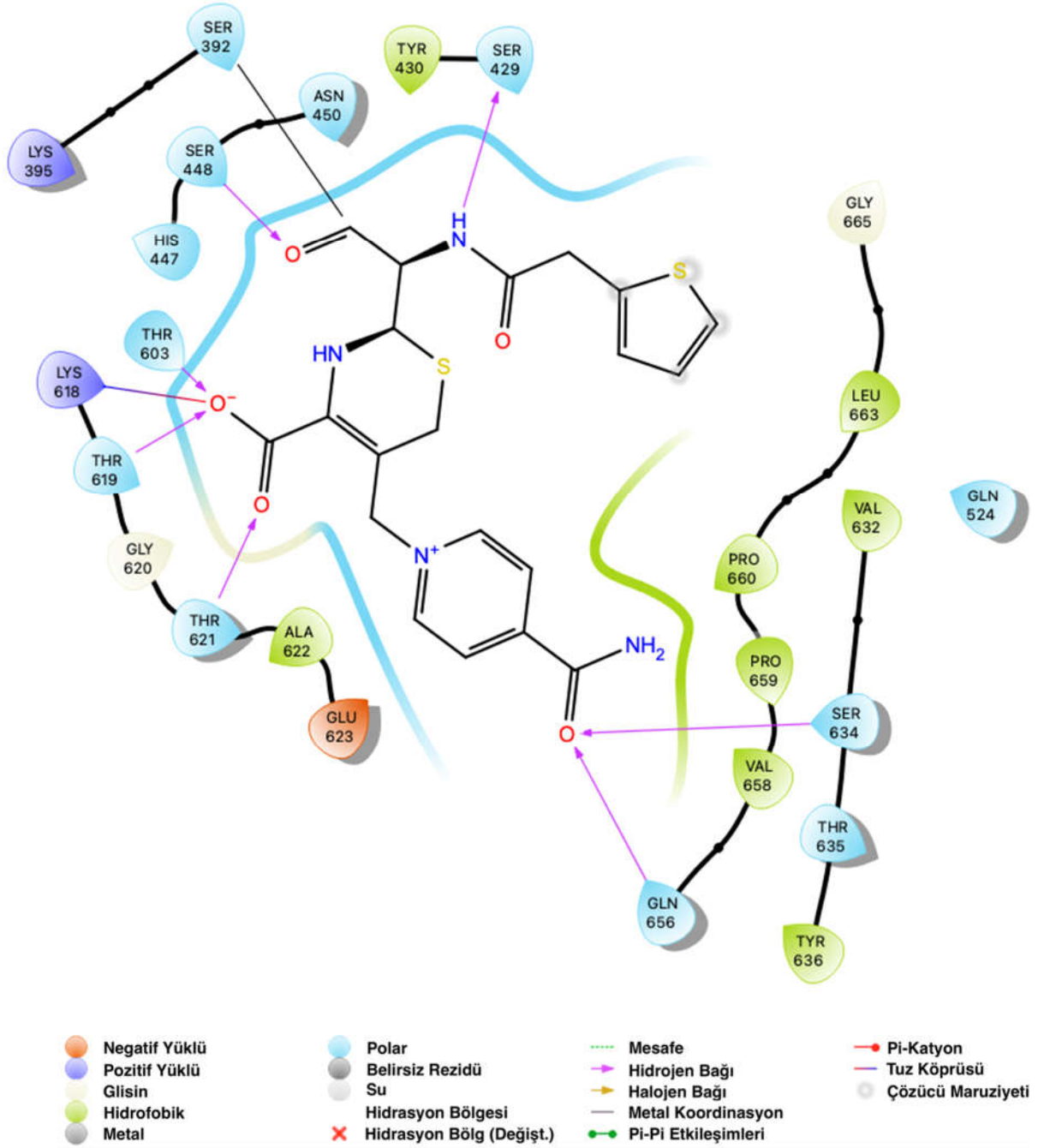
ID Numara	İlaç Adı	Grup	Dokimg Skor	Küme	Hedef veya Tedavi
24	DB12587 Razupenem	Araştırma	-8,036	1	Deri enfeksiyon tedavisi
25	DB12455 Omadasiklin	Onaylı, Araştırma	-7,989	6	30S ribozomal protein S3-S7, S8, S19, S14. 16S ribozomal RNA
26	DB15204 Fosravukonazol	Araştırma	-7,853	3	Chagas hastalığı ve Miçetom tedavisi
27	DB01330 Sefotetan	Onaylı	-7,853	1	Penisilin bağlayıcı protein 3
28	DB14553 Borat iyonu	Deneysel	-7,852	3	-
29	DB15222 GS-6620	Araştırma	-7,834	5	Kronik Hepatit C Virüsü (HCV) Enfeksiyonu
30	DB06211 Doripenem	Onaylı, Araştırma	-7,794	1	Penisilin bağlayıcı protein 1A, 1B, 2, 3, 4
31	DB03970 (7R)-7-(6,7-Dihidro-5H-siklopenta[d]imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-2-il)-2,7-dihidro-1,4-tiazepin -3,6-dikarboksilik asit	Deneysel	-7,791	3	Beta-laktamaz SHV-1, beta-laktamaz
32	DB09267 Stronsiyum ranelat	Onaylı, Geri Çekildi	-7,756	3	Osteoporoz tedavisi
33	DB15284 Sülopenem	Araştırma	-7,748		Komplike İdrar Yolu Enfeksiyonu, Karın İçi Enfeksiyonlar ve Bakteriyel Pnömoni Tedavisi
34	DB01329 Sefoperazon	Onaylı, Araştırma	-7,722	1	Peptidoglikan sentaz FtsI. Penisilin bağlayıcı protein 1B, 2, 1A. D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacC, DacA, DacB.
35	DB12941 Darolutamid	Onaylı, Araştırma	-7,679	3	Androjen reseptörü. Progesteron reseptörü
36	DB06874 (6-[4-(aminometil)-2,6-dimetilfenoksi]-2-{{4-(aminometil)fenil}amino}-5-bromopirimidin-4-il)metanol	Deneysel	-7,674	3	Gag-Pol poliproteini
37	DB12301 Doravirin	Onaylı, Araştırma	-7,673	3	Ters transkriptaz / RNaseH
38	DB04328 Shikimate-3-Fosfat	Deneysel	-7,649	3	3-fosfoşikimat 1-karboksiviniltransferaz
39	DB01328 Sefonisit	Onaylı, Araştırma	-7,635	1	Penisilin bağlayıcı protein 1A, 1B, 2. Peptidoglikan sentaz FtsI. D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacB.
40	DB04342 7-((karboksi(4-hidroksifenil)asetil)amino)-7-metoksi-(3-((1-metil-1h-tetrazol-5-yl)tiyo)metil)-8-okso-5-oksa-1-azabisiklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboksilik asit	Deneysel	-7,626	1	Beta-laktamaz OXA-10
41	DB00229 Sefotiam	Onaylı, Araştırma	-7,617	1	Penisilin bağlayıcı protein 1A
42	DB00157 NADH	Onaylı, Nutrasötik	-7,568	8	144 farklı hedef
43	DB04647 Boc-gamma-d-glu-l-lys(cbz)-d-boroala	Deneysel	-7,549	3	D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacA
44	DB00760 Meropenem	Onaylı, Araştırma	-7,549	1	D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacB
45	DB04293 7-(2-amino-2-fenil-asetilamino)-3-kloro-8-okso-1-aza-bisiklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboksilik asit	Deneysel	-7,510	1	Beta-laktamaz
46	DB00493 Sefotaksim (Referans)	Onaylı	-6,667	-	Penisilin bağlayıcı protein 1B, 2A, 3, 1A, 2B

Kümeleme sonucu elde edilen ilaçların hedef reseptörleri ve tedavileri, küme 1 (Penisilin bağlayıcı protein 1A, 1B, 2, 3, 1b, 2a, 2B, 4; Peptidoglikan sentaz FtsI; D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacA, DacC, DacB; D-alanil-D-alanin endopeptidaz; Peptidoglikan sentaz FtsI; Bakteriye, Deri enfeksiyon ve Zatürre tedavisi; Beta-laktamaz OXA-10), küme 2 (Sıtma tedavisi), küme 3 (Peptidoglikanın NAM/NAG peptid alt birimleri; Pulmoner hipertansiyon tedavisi; 2-dehidro-3-deoksifosfooktonat aldolaz; beta-enolaz; Fosfoenolpiruvat karboksikinaz (sitozolik [GTP]); Fosfo-2-dehidro-3-deoksiheptonat aldolaz (Phe'ye duyarlı); Kapsül biyosentez proteini; Proto-onkogen tirozin-protein kinaz Src; Chagas hastalığı ve Miçetom tedavisi; Beta-laktamaz SHV-1, beta-laktamaz; Osteoporoz tedavisi; Androjen reseptörü, Progesteron reseptörü, Gag-Pol poliproteini; Ters transkriptaz / RNaseH; 3-fosfoşikimat 1-karboksivini), küme 4; (Peptidoglikan sentaz FtsI, Penisilin bağlayıcı protein 1B, 1A, 2a, D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacC), küme 5 (Kronik Hepatit C Virüsü (HCV) Enfeksiyonu), küme 6; (16S ribozomal RNA, 30S ribozomal protein S9, S12, S13, S14, S19, S3-S7, S8), küme 7 (Kolera enterotoksin alt birimi B), küme 8 (3-hidroksiasil-CoA Dehidrojenaz tip-2, 2,4-dienoil-CoA redüktaz [NADPH], 144 farklı hedef protein). Glide doking skor değerleri Küme 2'de -8,458, küme 4'de -8,087, küme 5'de -7,834, küme 7'de -8,563'dür. Geri kalan 4 kümenin Glide doking skor değer aralıkları 1. kümede -7,510/-8,836, 3. kümede -7,549/-9,211, 6. kümede -7,989/-8,366, 8. kümede -7,568/-9,700 şeklindedir. Bu çalışmada Tablo 5'de verildiği gibi hedef bileşik olarak belirlenen 45 bileşikten (DB02820, DB14052, DB04595, DB03698, DB12204, DB11385, DB13638, DB04210, DB00923, DB13054, DB00560, DB11935, DB00303, DB01331, DB14879, DB01819, DB14733, DB09062, DB03313, DB06590, DB02762, DB13028, DB00430, DB12587, DB12455, DB15204, DB01330, DB14553, DB15222, DB06211, DB03970, DB09267, DB15284, DB01329, DB12941, DB06874, DB12301, DB04328, DB01328, DB04342, DB00229, DB00157, DB04647, DB00760, DB04293) 18 tanesi deneysel aşamada (DB02820, DB14052, DB04595, DB03698, DB11385, DB13638, DB04210, DB01819, DB09062, DB03313, DB02762, DB14553, DB03970, DB06874, DB04328, DB04342, DB04647, DB04293), 1 tanesi onaylanmış ve sonrasında geri çekilmiş (DB09267), 8 tanesi araştırma (DB12204, DB13054, DB11935, DB13028, DB12587, DB15204, DB15222, DB15284), 18 tanesi onaylı (DB00923, DB00560, DB00303, DB01331, DB14879, DB14733, DB06590, DB00430, DB12455, DB01330, DB06211, DB01329, DB12941, DB12301, DB01328, DB00229, DB00157, DB00760) ve bu 18 taneden 12 tanesi aynı zamanda yeni hedefler için araştırma aşamasındaki (ilaçlar olduğu belirlendi. Ayrıca Glide doking skorlar ve kümelerdeki iki boyutlu etkileşimler göz önüne alınarak hedef bileşik olarak 8. kümede bulunan Pulmoner hipertansiyon tedavisi için araştırma aşamasında olan DB12204 (Terbogrel) seçildi.



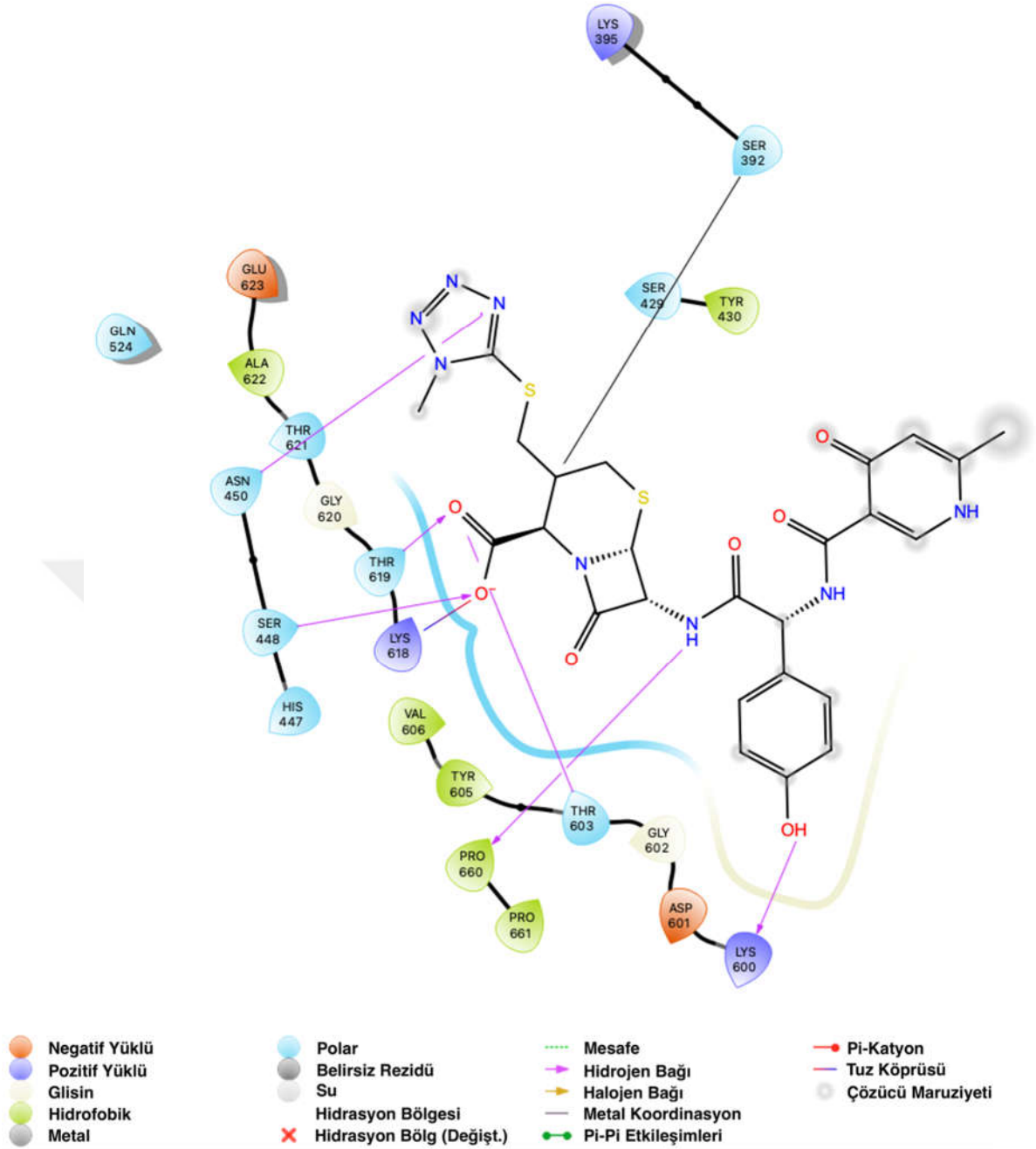
Şekil 16. PBP3-Sefotaksim (referans)' ın 2B gösterimi

Referans olan Sefotaksim ligandın PBP3'ün aktif bölgesi olarak bilinen Ser392 ile kovalent bağ; Ser448, Thr619, Thr603, Thr621, Gln524 ile güçlü hidrojen bağları oluşturduğu belirlenmiş ve Şekil 16'da 2B olarak verilmiştir.



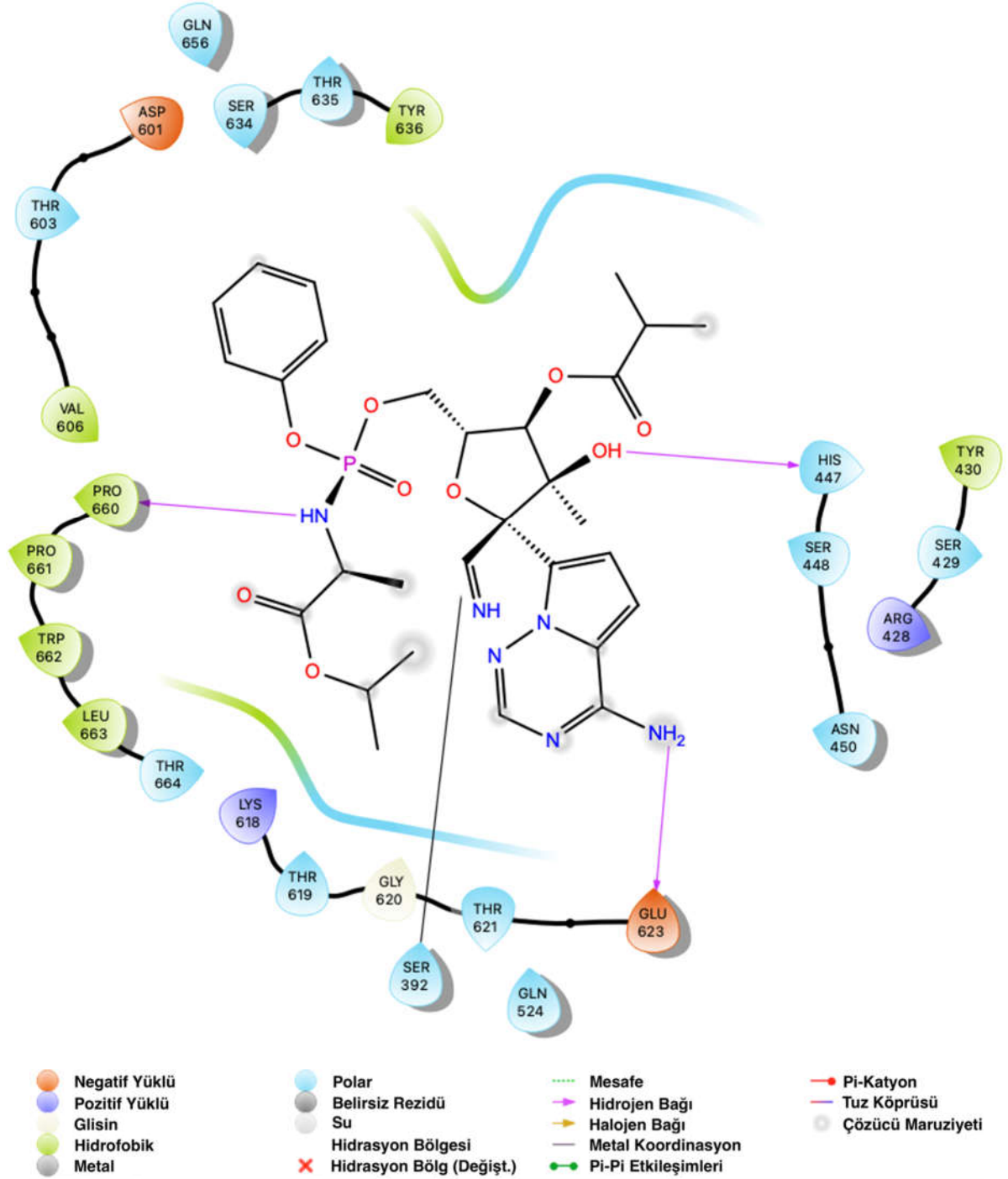
Şekil 17. DB11385 ilacın 2B gösterimi

DB11385 (1. Küme) ilacın PBP3'ün aktif bölgesi olarak bilinen Ser392 ile kovalent bağ oluşturduğu belirlenmiş ve Şekil 17'de 2B olarak verilmiştir. Ser429, Ser448 Thr 603 Thr619, Thr621 Gln656, Ser634 rezidüleri ile hidrojen bağı; Lys618 rezidüsü ile tuz köprüsü oluşturduğu gözlemlenmiştir.



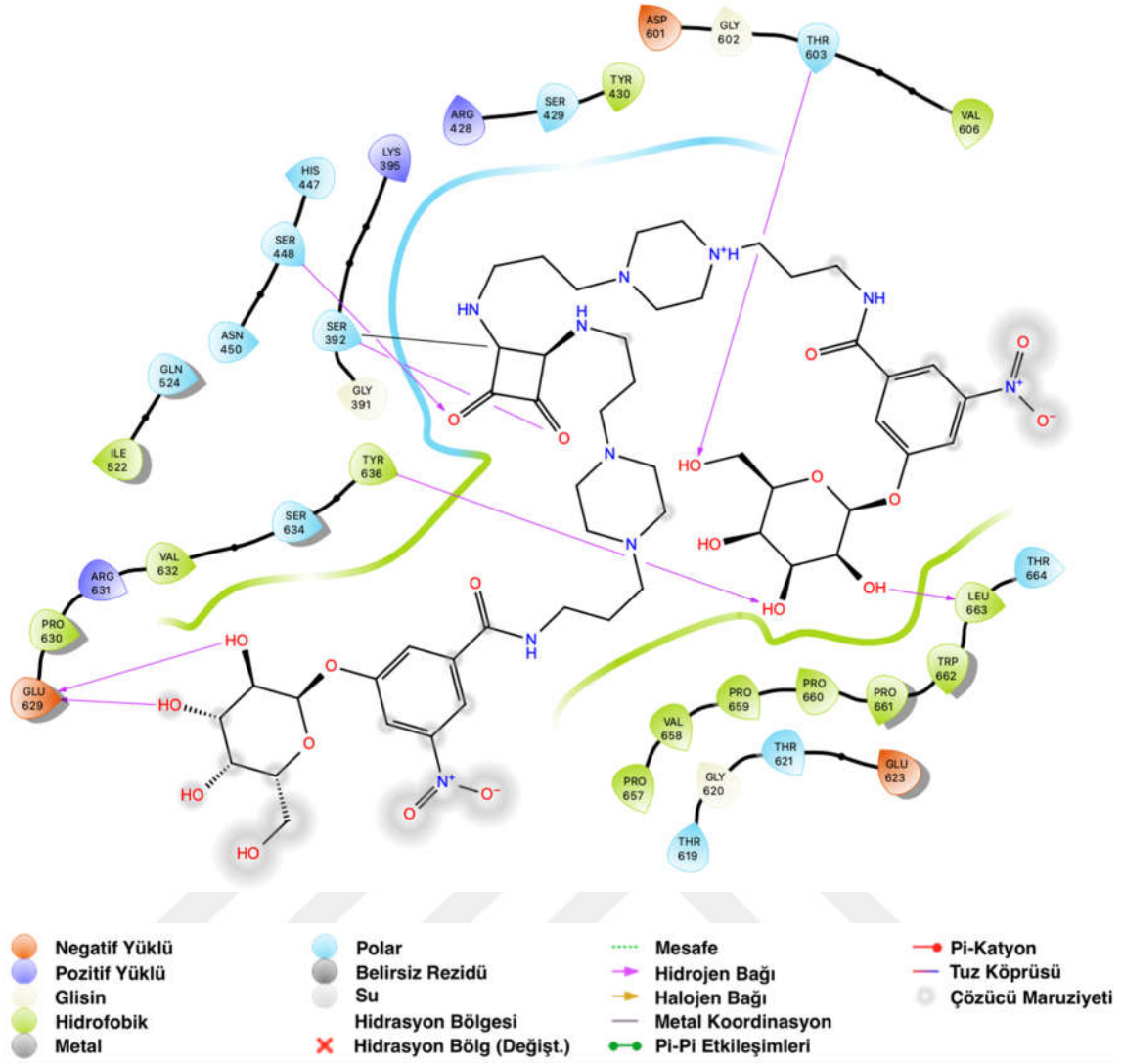
Şekil 20. DB00430'in 2B gösterimi

DB00430 (4. küme) ilacın PBP3'ün aktif bölgesi olarak bilinen Ser392 ile kovalent bağ oluşturduğu belirlenmiş ve Şekil 20'de 2B olarak verilmiştir. Ayrıca Lys618 ile tuz köprüsü; Asn450, Ser448, Thr619, Pro660, Thr603, Lys600 rezidüleri ile hidrojen bağları oluşturduğu gözlemlenmiştir.



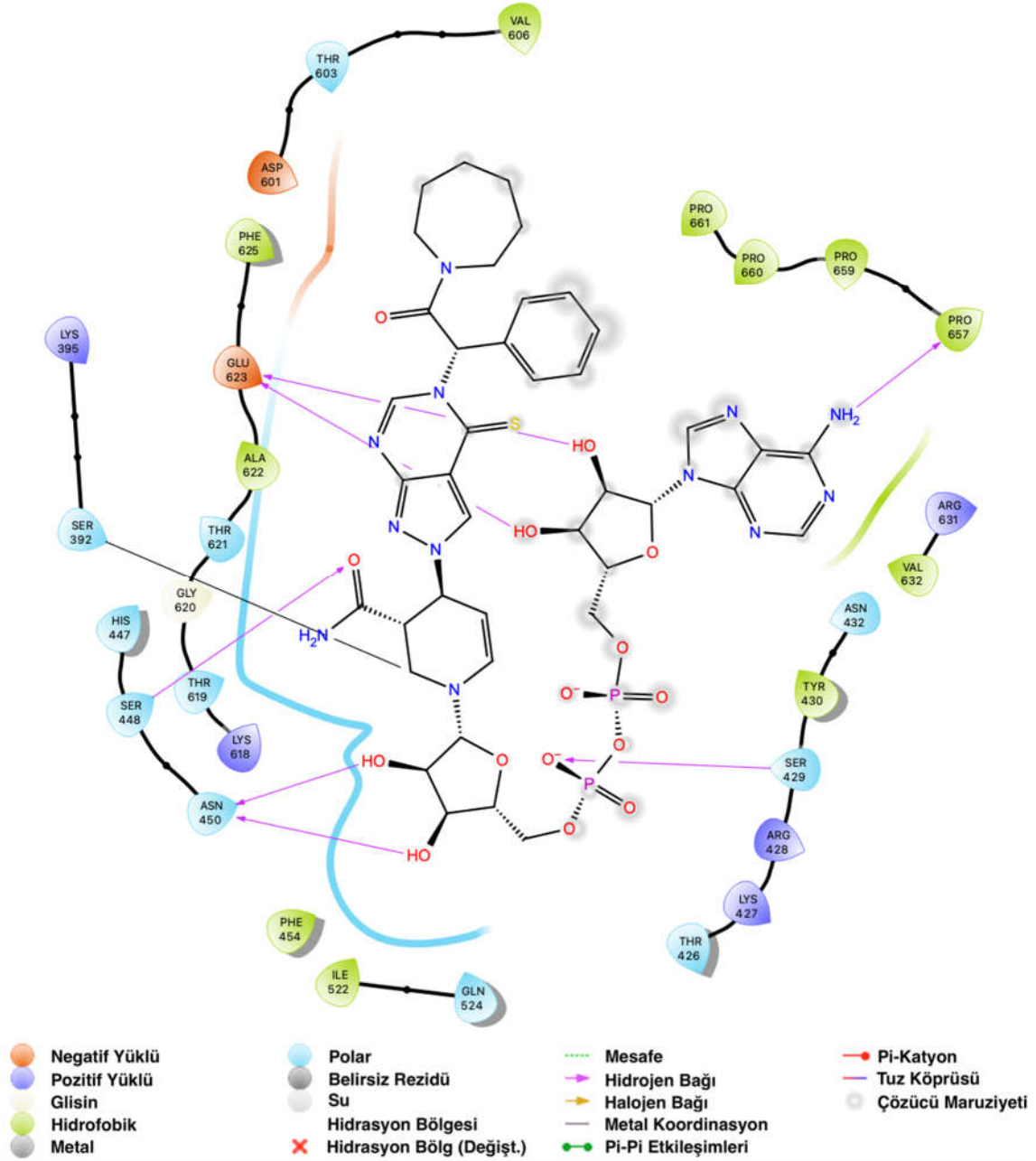
Şekil 21. DB15222 ilacın 2B gösterimi

DB15222 (5. küme) ilacın PBP3'ün aktif bölgesi olarak bilinen Ser392 kovalent bağ oluşturduğu belirlenmiş ve Şekil 21'de 2B olarak verilmiştir. His447, Pro660 ve Glu623 ile hidrojen bağları oluşturduğu gözlenmiştir.



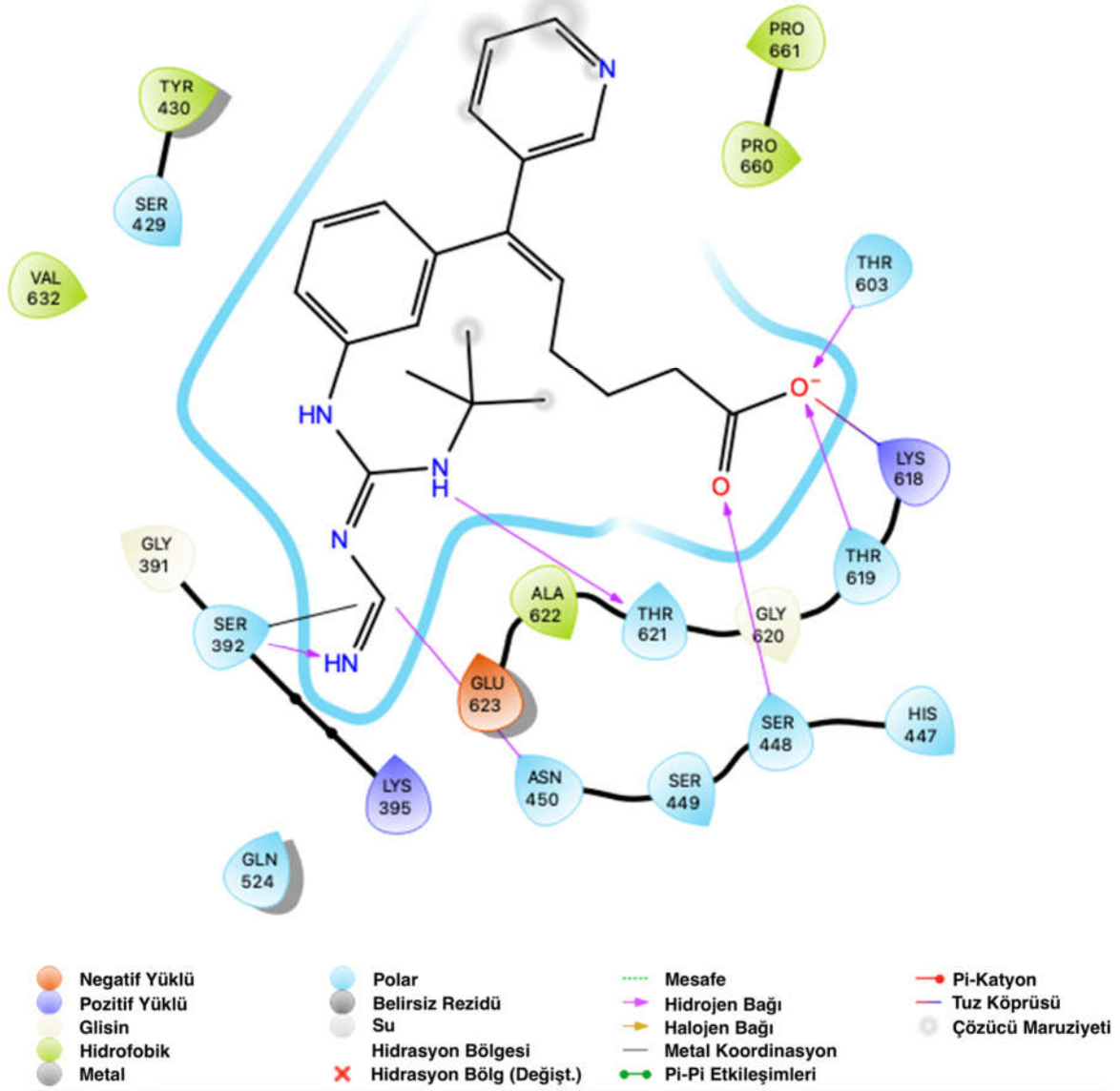
Şekil 23. DB04210 ilacın 2B gösterimi

DB04210 (7. küme) ilacın PBP3'ün aktif bölgesi olarak bilinen Ser392 ile kovalent bağ oluşturduğu belirlenmiş ve Şekil 23'de 2B olarak verilmiştir. Thr603, Ser448, Ser392, Tyr636, Glu629, Leu663 rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturduğu gözlemlenmiştir.



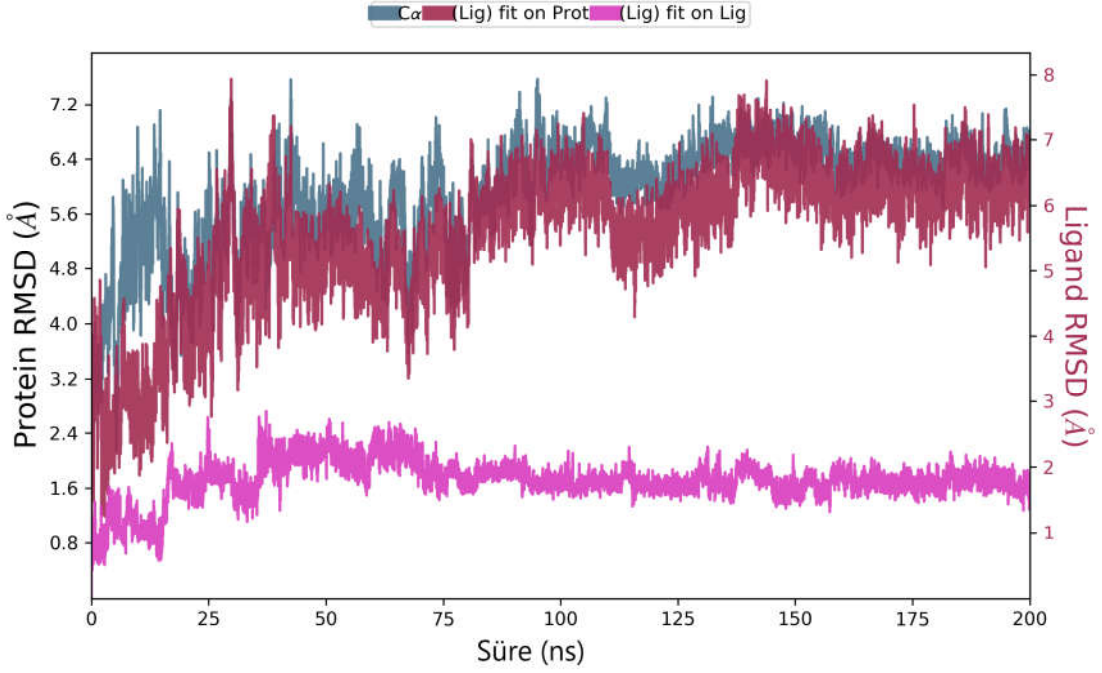
Şekil 24. DB02820 ilacın 2B gösterimi

DB02820 (8. küme) ilacın PBP3'ün aktif bölgesi olarak bilinen Ser392 ile kovalent bağ oluşturduğu belirlenmiş ve Şekil 24'de 2B olarak verilmiştir. Glu623, Ser448, Asn450, Ser429, Pro657 rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturduğu gözlemlenmiştir.



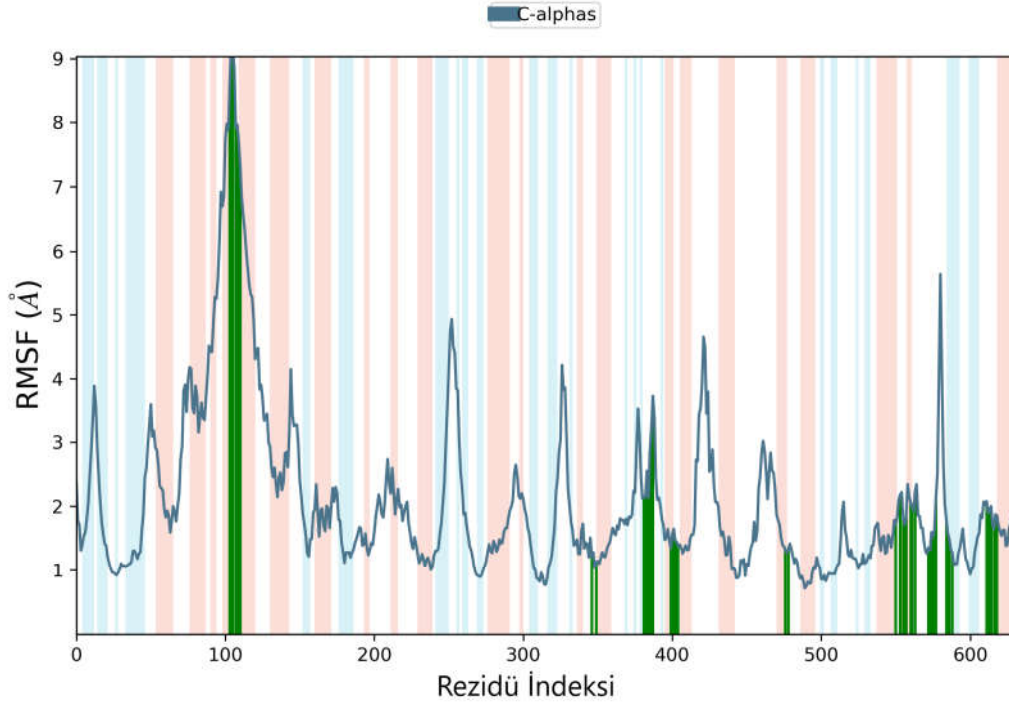
Şekil 25. DB12204 ilacın (Terbogrel) 2B gösterimi

DB12204 (3. küme) ilacın PBP3'ün aktif bölgesi olarak bilinen Ser392 ile bağ oluşturduğu belirlenmiş ve Şekil 25'de 2B olarak verilmiştir. Lys618 ile tuz köprüsü; Ser392, Asn450, Thr621, Ser448, Thr619, Thr603 rezidüleri ile hidrojen bağları oluşturduğu gözlemlenmiştir.



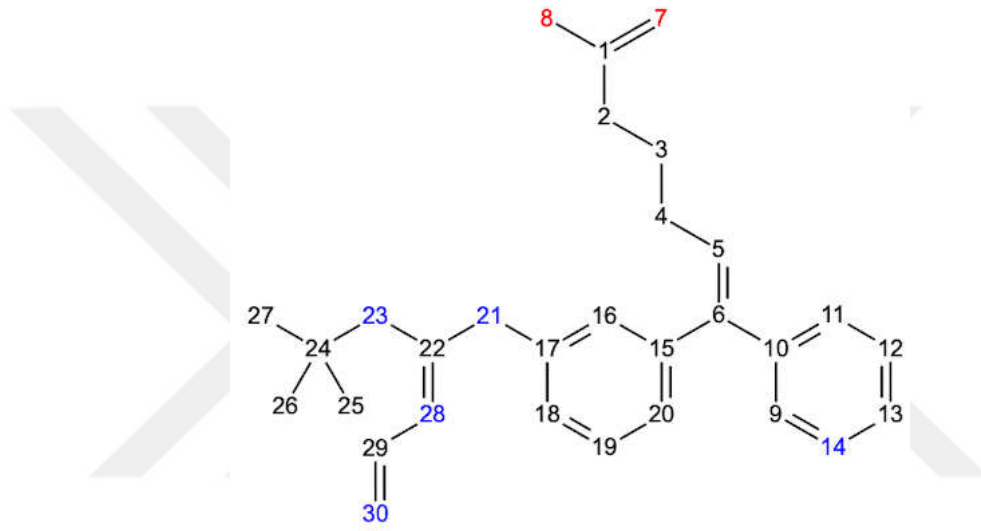
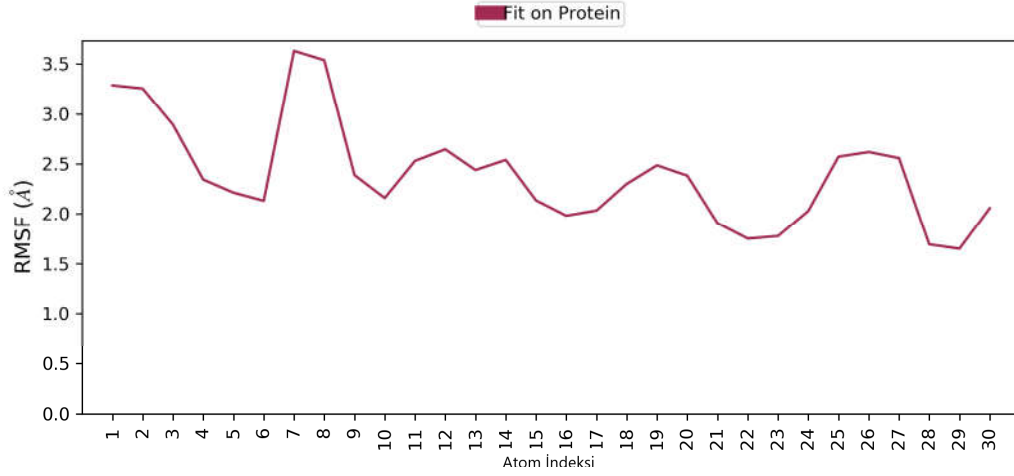
Şekil 27. PBP3-Terbogrel kompleksinin C α ve Terbogrel atomlarının RMSD-zaman grafiği

Protein RMSD, aktif bölgede ligand varlığında proteindeki büyük ölçekli hareketleri anlamak için hesaplanır. Şekil 27’de verilen PBP3-Terbogrel kompleks C α RMSD profili, 80 ns’den sonra yaklaşık 5,6-7,4 Å aralıkta kararlı durum dinamikleri gösterdiği belirlendi. Bu gözlem, proteinin aktif bölgesinde Terbogrel varlığının, simülasyon çalışması boyunca protein omurgasının stabilitesini etkilemediğini öne sürdü. "(Lig) fit on Prot", protein-ligand kompleksi protein omurgası üzerinde hizalandığında (t=0 ns’de) ilgili ligandın RMSD’sini gösterirken; "(Lig) fit on Lig", t=0 ns’deki konformasyonuna göre ligandın RMSD’sini gösterir. Ayrıca (Lig) fit on Lig), ligand iç dalgalanmalarını anlamak için hesaplandı ve 200 ns’lik simülasyon sırasında herhangi bir büyük sapma olmaksızın kabul edilebilir aralığında (0,43 ile 2,76 Å) değiştiği belirlendi. Simülasyon etkileşim diyagramında protein omurgası üzerine hizalanan Terbogrel ligandın RMSD (Lig) fit on Prot)’indeki değişim kırmızı olarak sunuldu ve 120 ns’den sonra 4,9 ile 7,9 Å aralıkta olduğu belirlendi. (Lig) fit on Prot) RMSD, proteine göre ligandın dalgalanmalarını ölçer. Bu değerler incelendiğinde Protein RMSD’inden genel olarak küçük olan ligandın RMSD (Lig) fit on Prot) değerleri, ligandın başlangıç konumundan uzağa dağılmadığını gösterdi. Hesaplanan ligand RMSD’ler Terbogrel’in bağlanma oyuğunda aktif ve ayrıca hidrojen bağı etkileşimlerinin muntazam bir şekilde olduğu tespit edildi.



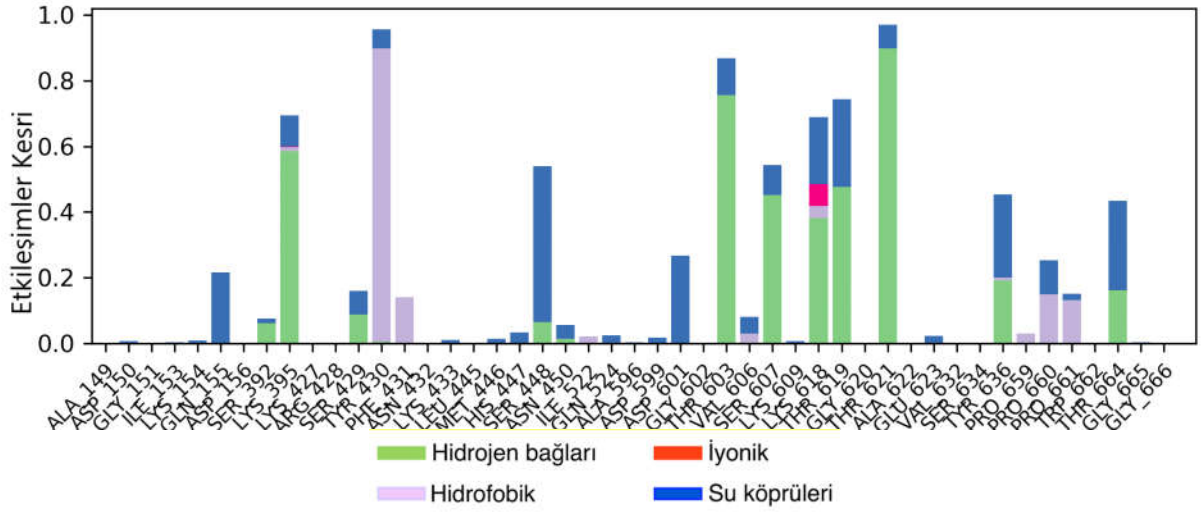
Şekil 28. PBP3-Terbogrel kompleksinin C α atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Kare Kök Ortalama Dalgalanma (RMSF), protein polipeptidi boyunca bölgesel değişiklikleri karakterize etmek için kullanıldı. Şekil 28’de protein rezidülerinin dalgalanmaları gösterildi, ikincil yapı (Pembe: α sarmal; Mavi: β kırmalı) ve ligand ile etkileşen rezidüler yeşil dikey çizgilerle verildi. Pikler, zincir üzerindeki en hareketli rezidüleri gösterir. Bu komplekste Asp150 (9,27 Å) rezidüsünün diğer rezidülere göre en hareketli kısım oldukları belirlendi. Bunlar incelendiğinde en fazla dalgalanma olan rezidülerin bazılarının ligand ile etkileşim halinde olduğu belirlendi.



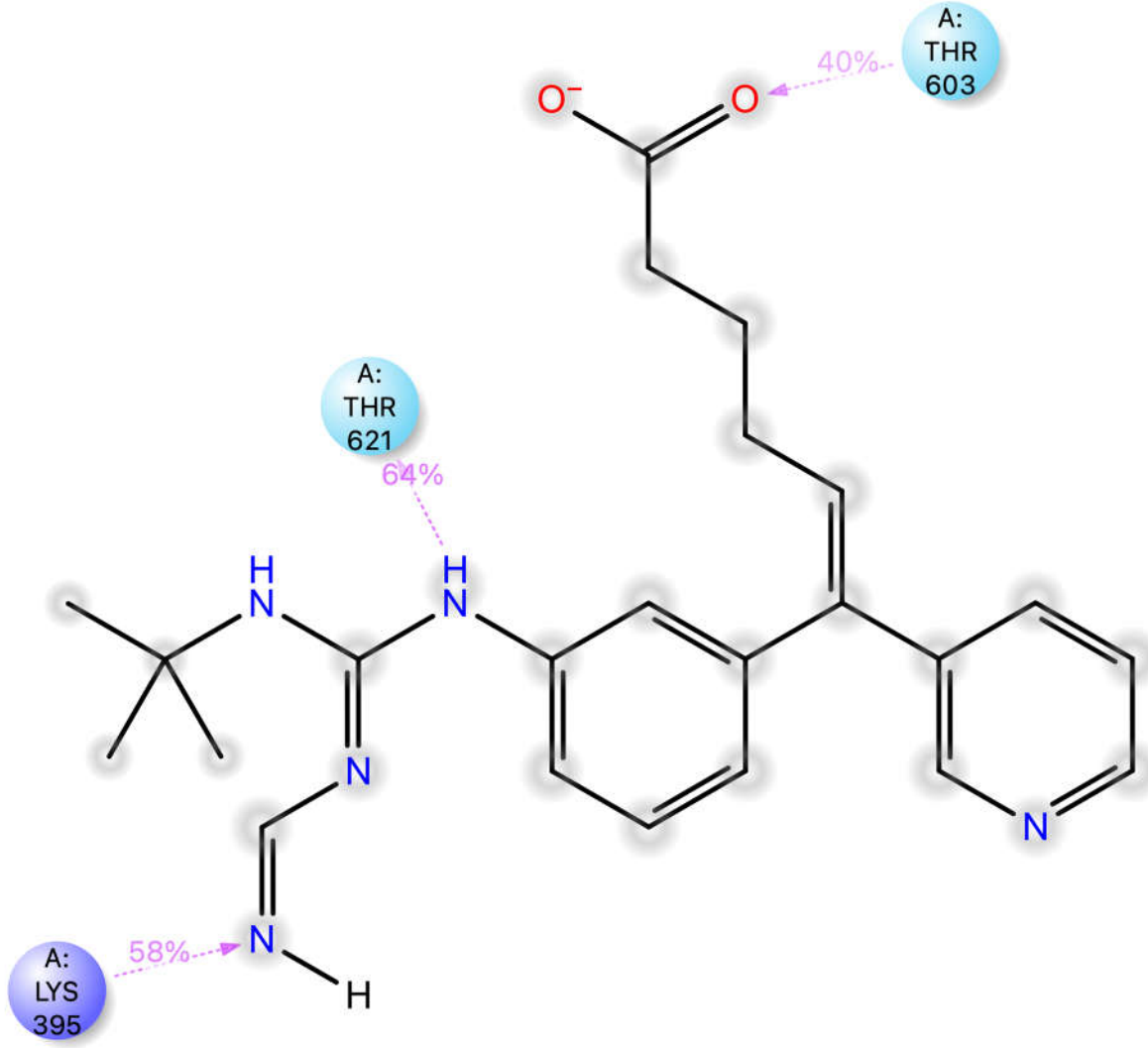
Şekil 29. PBP3-Terbogrel kompleks atomlarının 200 ns’de RMSF grafiği

Ligand atom pozisyonlarındaki değişiklikleri karakterize etmek için Ligand Kare Kök Ortalama Dalgalanması (L-RMSF) kullanıldı. Ligand RMSF (Şekil 29), grafiğin üst panelinde verilen atomlarının dalgalanmalarını gösterdi. PBP3 ve Terbogrel’in bağlanma olayında çoğunlukla 7 ve 8 nolu atomlarda dalgalanmaların olduğu belirlendi. Bu atomlardaki dalgalanmaların yaklaşık 3,5 Å’luk mesafede olduğu gözlemlendi.



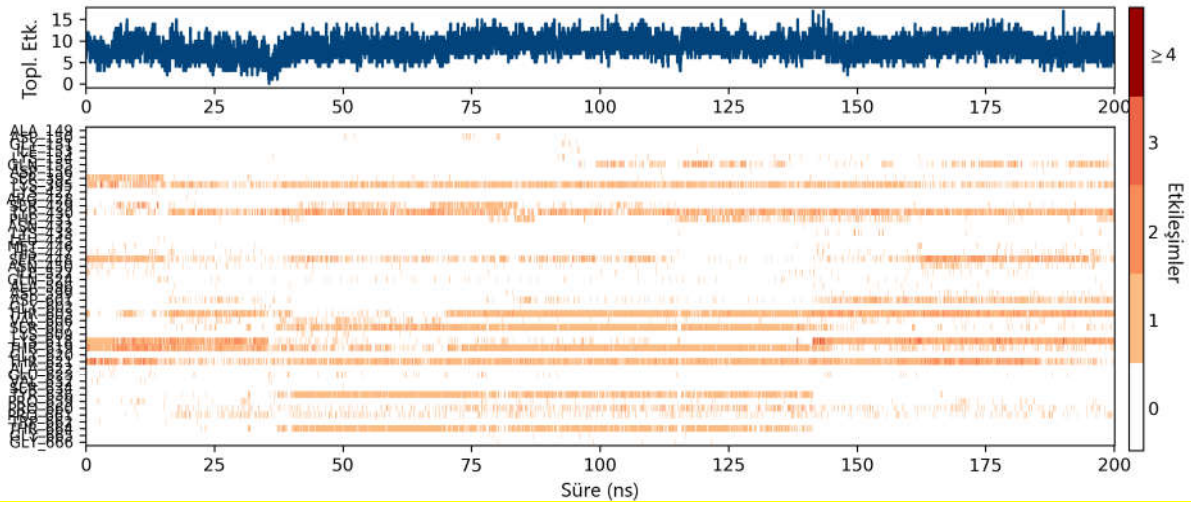
Şekil 30. PBP3-Terbogrel kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'

Terbogrel ve PBP3 rezidüleri arasındaki etkileşimler hesaplandı ve Şekil 30'da temsil edildi. Terbogrel'in PBP3'deki Lys395, Thr603, Ser607, Lys618, Thr619, Thr621 ve Tyr636 rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturdukları belirlendi. Ser448 ile oluşan su köprüsü ve Tyr430 rezidüsü ile oluşan hidrofobik etkileşimlerin Terbogrel'in proteine bağlanmasına ayrıca yardımcı olduğu belirlendi.



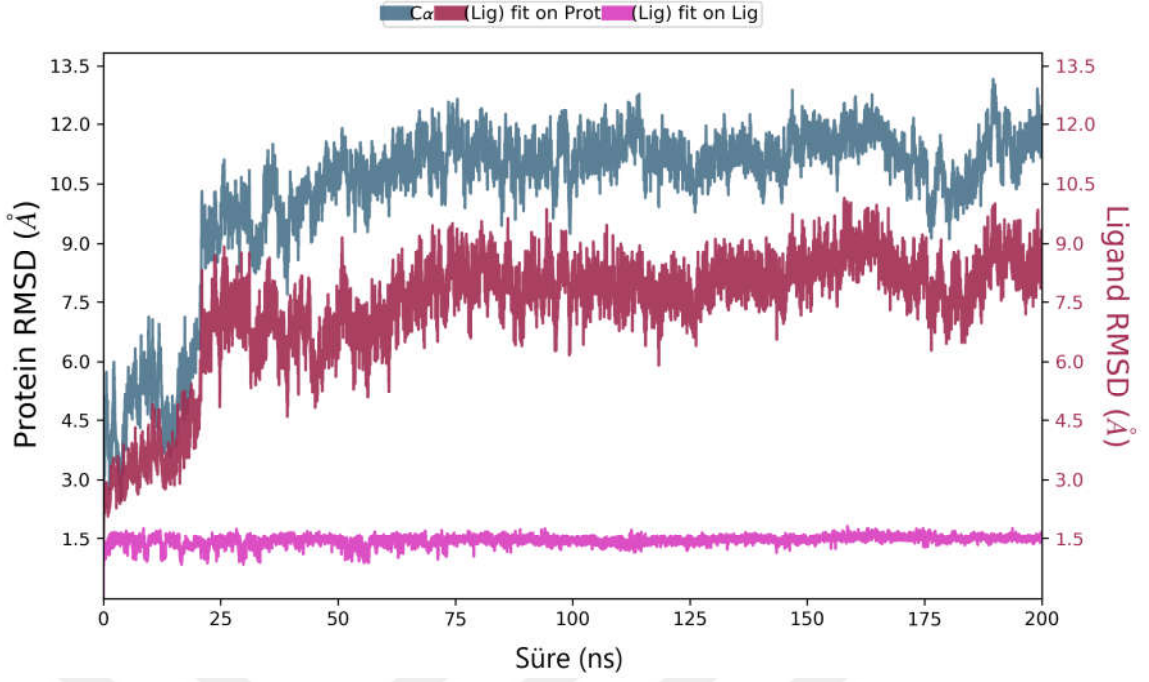
Şekil 31. PBP3 rezidüleri ile ayrıntılı Terbogrel atom etkileşimleri

Şekil 31, 200 ns'lik simülasyon süresinin %20,0'undan daha fazla devam edebilen PBP3 ve Terbogrel arasındaki spesifik etkileşimleri göstermektedir. Terbogrel'in Lys395, Thr621 ve Thr603 rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturdukları ayrıca sırasıyla bu temasların, simülasyon süresinin en az %58, %64 ve %40'ı boyunca tutulduğu belirlendi.



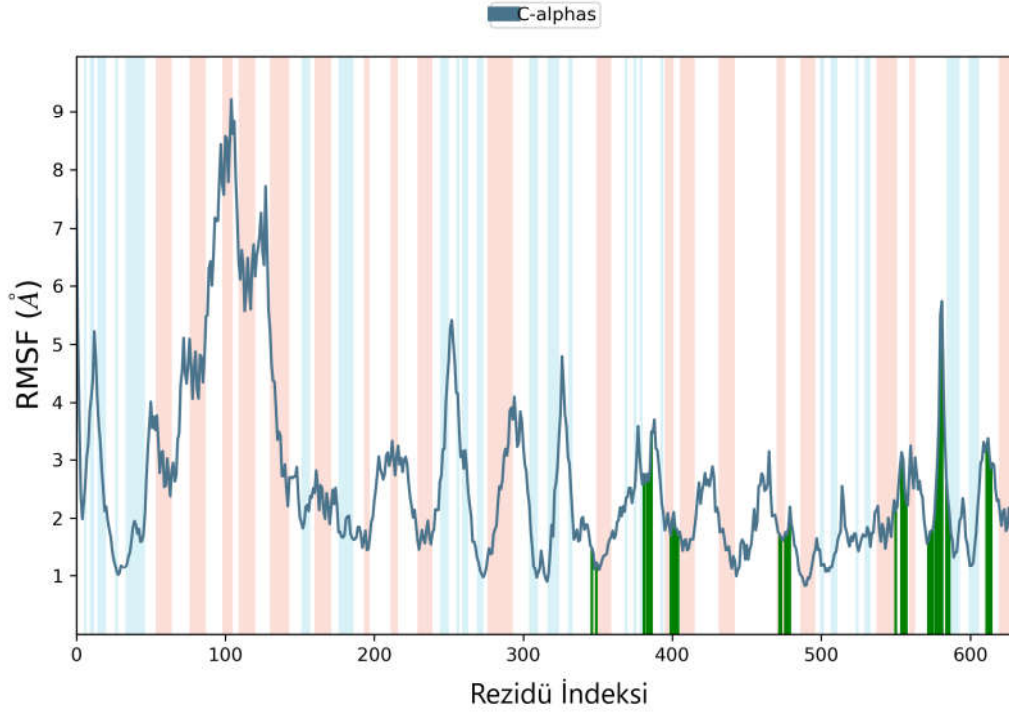
Şekil 32. PBP3-Terbogrel kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi

Şekil 32'da hidrojen bağları, su köprüleri, hidrofobik ve iyonik etkileşimler gibi PBP3-Terbogrel etkileşimlerinin ve 200 ns simülasyon periyodu sırasında oluşan bir zaman çizelgesi çizilmiş ve temas süresine göre gösterilmiştir (X eksen), belirli rezidüler ve etkileşimleri renk yoğunluğuna göre verilmiştir (Y eksen). Bu grafiğin üst paneli, belirli PBP3-Terbogrel etkileşimlerinin toplam sayısını gösterirken, alt panel, Terbogrel'in rezidü seviyesindeki etkileşimleri gösterdi. Bu çizelgede Terbogrel'in PBP3 aktif bölge rezidüsü Lys395, Tyr430 ve Thr621 ile etkileşimlerinin simülasyon sırasında çoğunlukla devam ettiği belirlendi.



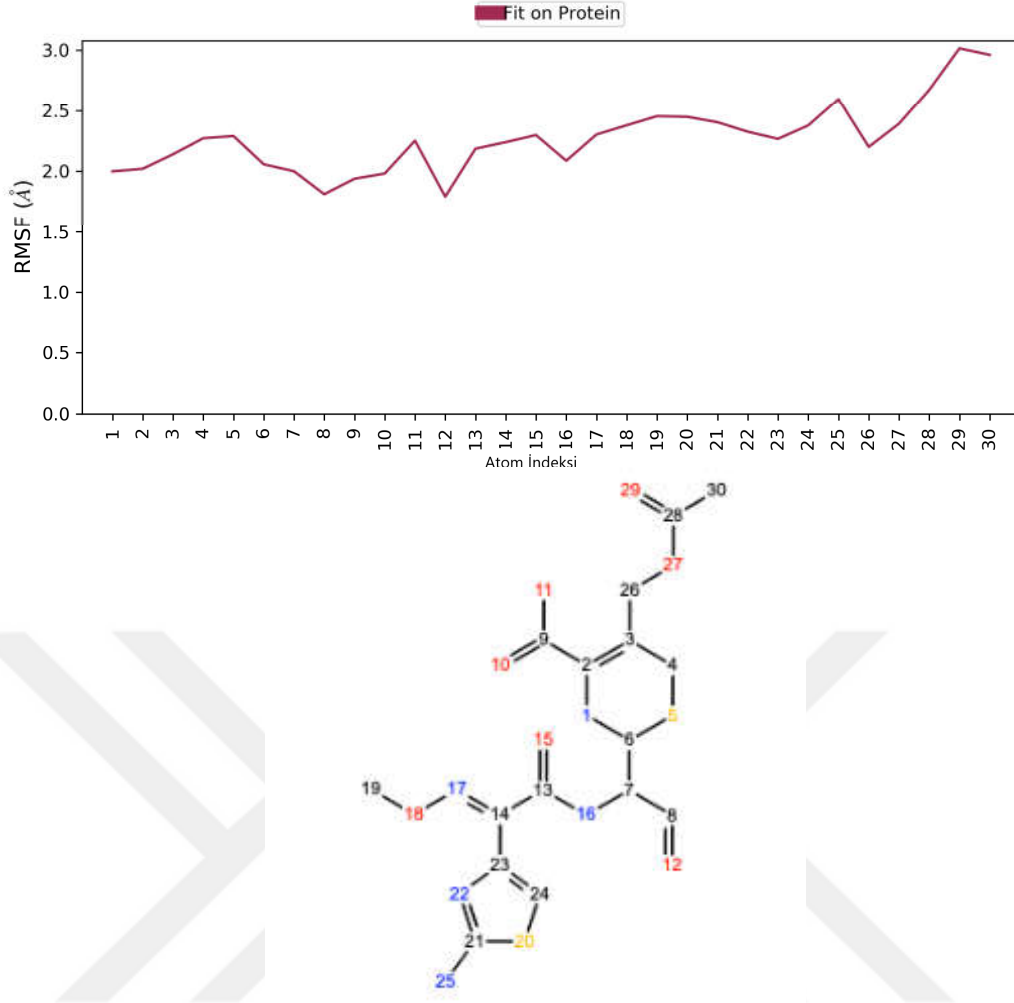
Şekil 33. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleksinin C α ve Sefotaksim atomlarının RMSD-zaman grafiği

Protein RMSD, aktif bölgede ligand varlığında proteindeki büyük ölçekli hareketleri anlamak için hesaplanır. Şekil 33’de verilen PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleks C α RMSD profili, başlangıçta 10,4 Å'a kadar kademeli olarak arttığını ve ardından 42 ns’den sonra yaklaşık 8,3-12,8 Å aralıkta kararlı durum dinamikleri gösterdiği belirlendi. Bu gözlem, proteinin aktif bölgesinde Sefotaksim varlığının, simülasyon çalışması boyunca protein omurgasının stabilitesini etkilemediğini öne sürdü. "(Lig) fit on Prot", protein-ligand kompleksi protein omurgası üzerinde hizalandığında (t=0 ns'de) ilgili ligandın RMSD'sini gösterirken; "(Lig) fit on Lig", t=0 ns'deki konformasyonuna göre ligandın RMSD'sini gösterir. Ayrıca (Lig) fit on Lig), ligand iç dalgalanmalarını anlamak için hesaplandı ve 200 ns’lik simülasyon sırasında herhangi bir büyük sapma olmaksızın kabul edilebilir aralığında (0,81 ile 1,83 Å) değiştiği belirlendi. Simülasyon etkileşim diyagramında protein omurgası üzerine hizalanan Sefotaksim ligandın RMSD (Lig) fit on Prot)’indeki değişim kırmızı olarak sunuldu ve 63 ns’den son 5,9-10,0 Å aralıkta olduğu belirlendi. (Lig) fit on Prot) RMSD, proteine göre ligandın dalgalanmalarını ölçer. Bu değerler incelendiğinde Protein RMSD’sinden önemli ölçüde daha küçük olan ligandın RMSD (Lig) fit on Prot) değerleri, ligandın başlangıç konumundan uzağa dağılmadığını gösterdi. Hesaplanan ligand RMSD’ler Sefotaksim’in bağlanma oyuğunda aktif ve ayrıca Ser 392 ve hidrojen bağı etkileşimlerinin muntazam bir şekilde olduğu tespit edildi.



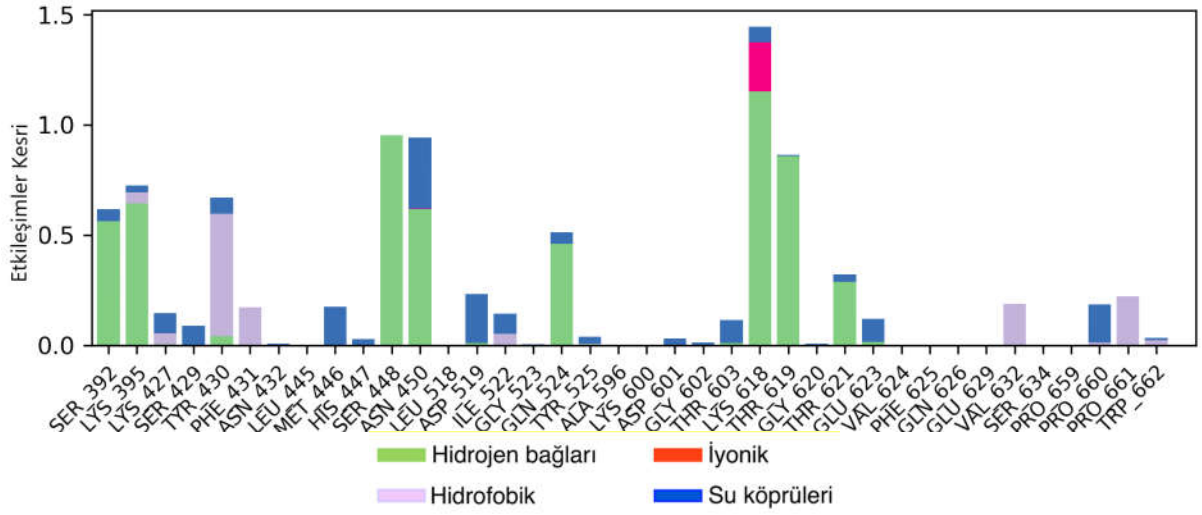
Şekil 34. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleksinin C α atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Kare Kök Ortalama Dalgalanma (RMSF), protein polipeptidi boyunca bölgesel değişiklikleri karakterize etmek için kullanıldı. Şekil 34’da protein rezidülerinin dalgalanmaları gösterildi, sekonder yapı (Pembe: α sarmal; Mavi: β kırmalı) ve ligand ile etkileşen rezidüler yeşil dikey çizgilerle verildi. Pikler, zincir üzerindeki en hareketli rezidüleri gösterir. Asp150 (9,21 Å)’nin diğer rezidülere göre en hareketli rezidü olduğu belirlendi. Bunlar incelendiğinde en fazla dalgalanma olan rezidülerin ligand ile etkileşim halinde olmadığı belirlendi.



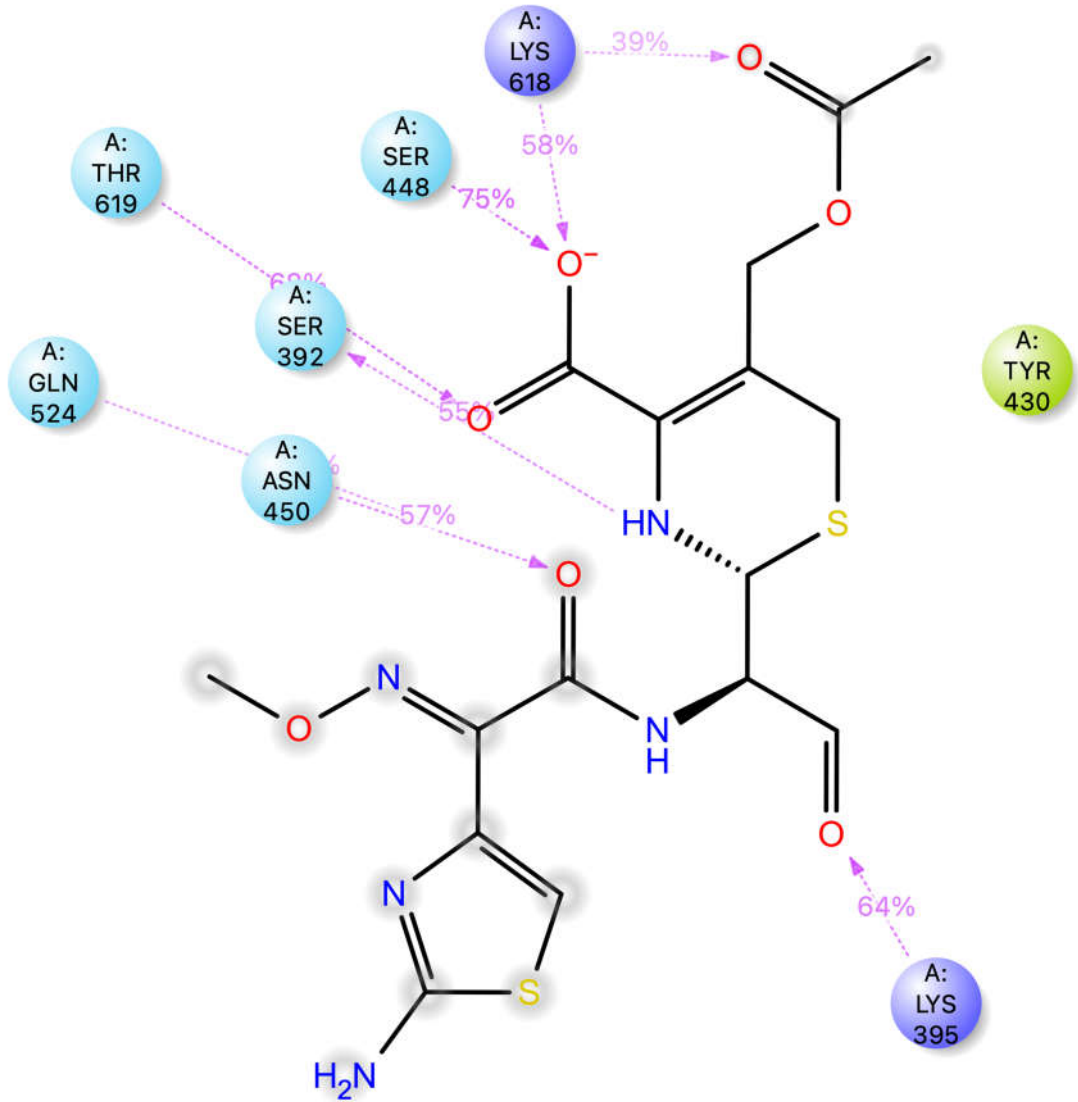
Şekil 35. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleks atomlarının 200 ns’de RMSF grafiği

Ligand atom pozisyonlarındaki değişiklikleri karakterize etmek için Ligand Kare Kök Ortalama Dalgalanması (L-RMSF) kullanıldı. Ligand RMSF (Şekil 35), grafiğin üst panelinde verilen atomlarının dalgalanmalarını gösterdi. PBP3 ve Sefotaksim’in bağlanma olayında çoğunlukla 29 ve 30 nolu atomlarda dalgalanmaların olduğu belirlendi. Bu atomlardaki dalgalanmaların yaklaşık 3 Å’luk mesafede olduğu gözlemlendi.



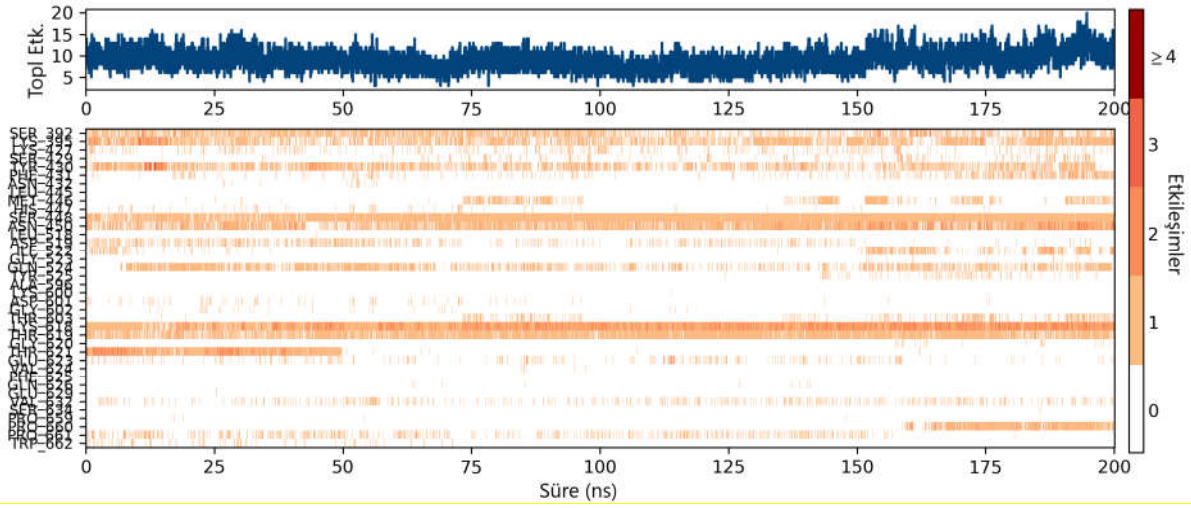
Şekil 36. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'

Sefotaksim'in ve PBP3 rezidüleri arasındaki etkileşimler hesaplandı ve Şekil 36'da temsil edildi. Sefotaksim'in PBP3'deki Ser392, Lys395, Ser448, Asn450, Gln524, Lys618, Thr619 ve Thr621 rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturdıkları belirlendi. Asn450 ile oluşan su köprüsü ve Tyr430 rezidüsü ile oluşan hidrofobik etkileşimlerin Sefotaksim'in proteine bağlanmasına ayrıca yardımcı olduğu belirlendi.



Şekil 37. PBP3 rezidüleri ile ayrıntılı Sefotaksim atom etkileşimleri

Şekil 37, 200 ns'lik simülasyon süresinin %20,0'undan daha fazla devam edebilen PBP3 ve Sefotaksim arasındaki spesifik etkileşimleri göstermektedir. Sefotaksim'in Lys395, Lys618, Ser448, Thr619, Ser392, Gln524 ve Asn450 rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturdukları ayrıca sırasıyla bu temasların, simülasyon süresinin en az %64, %58, %75, %69, %55, %44 ve %57'si boyunca tutulduğu belirlendi.



Şekil 38. PBP3-Sefotaksim (Referans) kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi

Şekil 38'de hidrojen bağları, su köprüleri, hidrofobik ve iyonik etkileşimler gibi PBP3-Sefotaksim (Referans) etkileşimlerinin ve 200 ns simülasyon periyodu sırasında oluşan bir zaman çizelgesi çizilmiş ve temas süresine göre gösterilmiştir (X eksen), belirli rezidüler ve etkileşimleri renk yoğunluğuna göre verilmiştir (Y eksen). Bu grafiğin üst paneli, belirli PBP3-Sefotaksim (Referans) etkileşimlerinin toplam sayısını gösterirken, alt panel, Sefotaksim'in rezidü seviyesindeki etkileşimleri gösterdi. Bu çizelgede Sefotaksim'in PBP3 aktif bölge rezidüsü Ser392, Lys395, Tyr430, Ser448, Asn450, Lys618 ve Thr619 ile etkileşimlerinin simülasyon sırasında çoğunlukla devam ettiği belirlendi.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yeni ilaç keşfi çalışmaları uzun zaman alması, sürecin zor olması ve maliyetinin yüksek olması sebebiyle araştırmacıları yeni stratejiler bulmaya yöneltmiştir. Bu yöntemlerin başında hesaplamalı stratejiler gelmektedir. Hesaplamalı stratejiler zamandan çok büyük tasarruf etmesi ve yeni ilaç keşfi maliyetlerinin azaltılmasına yol açması nedeniyle yeni inhibitörlerin keşfine olanak sağlamaktadır

β -laktam antibiyotikler, hücre duvarı biyosentezi için hayati önem taşıyan enzimler olan Penisilin Bağlayıcı Proteinlere (PBP) geri dönüşümsüz olarak bağlandıkları için bakteriyel enfeksiyonlar için uzun süredir tercih edilen bir tedavi yöntemi olmuştur. Fakat birçok patojen, ilaca duyarsız PBP'leri ifade ederek β -laktamları etkisiz hale getirmekte ve dirençli suşlara karşı aktif olan yeni tip PBP inhibitörlerine olan ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır.

Bu amaçla tezde Drugbank databazında bulunan yaklaşık 10767 ilaç içinden PBP3'ün yeni inhibitörlerini belirlemek kovalent doking tabanlı sanal tarama kullanıldı. En iyi etkileşime sahip ilaç molekülleri arasından araştırma aşamasında olan Terbogrel hedef bileşik olarak seçildi. Ardından Terbogrel ve referans bileşik (Sefotaksim) komplekslerinin stabilitesini incelemek için moleküler dinamik simülasyonları yapıldı. 200 ns'lik bu simülasyonlar sırasında tüm sonuçlar ayrıntılı analiz edildiğinde Terbogrel'in Ser392 ile kovalent bağ, Ser 448, Thr619, Thr603, Thr621 ve Gln524 ile hidrojen bağ yaparak bağlanma oyuğuna yerleştiğini belirlendi. Ayrıca referans bileşiğe kıyasla Terbogrel-PBP3 kompleksinin daha düşük RMSD değerinde stabil olduğu belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışma hesaplamalı olarak belirlenen bu hedef bileşiğin yeni inhibitör olabileceğini, bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi için potansiyel yeni tedavi ajanı olabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu ilaç, PBP3 kovalent inhibitörü olarak yeni bileşik dizayn çalışmaları için öncü bileşik olabilir.

KAYNAKLAR

- Aissa, N., Mayer, N., Bert, F., Labia, R., Lozniewski, A., & Nicolas-Chanoine, M. H., 2016. A new mechanism to render clinical isolates of *Escherichia coli* non-susceptible to imipenem: substitutions in the PBP2 penicillin-binding domain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 76-79.
- Alosaimy, S., Lagnf, A. M., Morrisette, T., Jorgensen, S. C., Trinh, T. D., Zasowski, E. J., ... & Rybak, M. J., 2021. Standardized treatment and assessment pathway improves mortality in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: STAPH study. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 8, No. 7, p. ofab261). US: Oxford University Press.
- Baillie, T. A., 2015. The contributions of Sidney D. Nelson to drug metabolism research. *Drug Metabolism Reviews*, 47(1), 4-11.
- Banerjee, R., Gretes, M., Harlem, C., Basuino, L., & Chambers, H. F., 2010. A mec A-Negative Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with High-Level β -Lactam Resistance Contains Mutations in Three Genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4900-4902.
- Banzhaf, M., van den Berg van Saparoea, B., Terrak, M., Fraipont, C., Egan, A., Philippe, J., ... & Vollmer, W., 2012. Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation. *Molecular microbiology*, 85(1), 179-194.
- Bertsche, U., Kast, T., Wolf, B., Fraipont, C., Aarsman, M. E., Kannenberg, K., ... & Vollmer, W., 2006. Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 61(3), 675-690.
- Born, P., Breukink, E., & Vollmer, W., 2006. In vitro synthesis of cross-linked murein and its attachment to sacculi by PBP1A from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 26985-26993.
- Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D., & Mengin-Lecreulx, D., 2007. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 208-233.
- Bowers, K. J., Chow, D. E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., ... & Shaw, D. E., 2006. Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. In *SC'06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing* (pp. 43-43). IEEE.
- Brejijeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R., 2020. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 25(6), 1340.
- Brochado, A. R., Telzerow, A., Bobonis, J., Banzhaf, M., Mateus, A., Selkrig, J., ... & Typas, A., 2018. Species-specific activity of antibacterial drug combinations. *Nature*, 559(7713), 259-263.
- Brown Jr, T., Charlier, P., Herman, R., Schofield, C. J., & Sauvage, E., 2010. Structural basis for the interaction of lactivicins with serine β -lactamases. *Journal of medicinal chemistry*, 53(15), 5890-5894.
- Chang, H. H., Cohen, T., Grad, Y. H., Hanage, W. P., O'Brien, T. F., & Lipsitch, M., 2015. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 101-116.

- Chowdhury, A., Paul, P., Bhattacharjee, A., Das Talukdar, A., & Dutta Choudhury, M., 2015. Virtual high throughput screening of carbapenem derivatives as new generation carbapenemase and penicillin binding protein inhibitors: a hunt to save drug of last resort. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 18(1), 18-23.
- Clardy, J., Fischbach, M. A., & Walsh, C. T., 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature biotechnology*, 24(12), 1541-1550.
- Contreras-Martel, C., Amoroso, A., Woon, E. C., Zervosen, A., Inglis, S., Martins, A., ... & Dessen, A., 2011. Structure-guided design of cell wall biosynthesis inhibitors that overcome β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA). *ACS chemical biology*, 6(9), 943-951.
- Contreras-Martel, C., Dahout-Gonzalez, C., Martins, A. D. S., Kotnik, M., & Dessen, A., 2009. PBP active site flexibility as the key mechanism for β -lactam resistance in pneumococci. *Journal of molecular biology*, 387(4), 899-909.
- Davies, T. A., Shang, W., Bush, K., & Flamm, R. K., 2008. Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1510-1512.
- Davies, T.A.; Flamm, R.K.; Lynch, A.S., 2012. Activity of ceftobiprole against *Streptococcus pneumoniae* isolates exhibiting high-level resistance to ceftriaxone. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2012, 39, 534–538.
- Davis, D. C., Potter, W. Z., Jollow, D. J., & Mitchell, J. R., 1974. Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sciences*, 14(11), 2099-2109.
- De Pedro, M. A., Quintela, J. C., Höltje, J. V., & Schwarz, H., 1997. Murein segregation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 179(9), 2823-2834.
- Del Río, A., Garcia-De-La-Maria, C., Entenza, J. M., Gasch, O., Armero, Y., Soy, D., ... & Miró, J. M., 2016. Fosfomycin plus Beta-lactams: Synergistic Bactericidal Combinations in Methicillin-resistant (MRSA) and Glycopeptide-Intermediate Resistant (GISA) *Staphylococcus aureus* Experimental Endocarditis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2016,, 1, 478-486.
- Delmas, J., Chen, Y., Prati, F., Robin, F., Shoichet, B. K., & Bonnet, R., 2008. Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum β -lactamases. *Journal of molecular biology*, 375(1), 192-201.
- Deng, J. Z., 2013. Methicillin/per-6-(4-methoxylbenzyl)-amino-6-deoxy- β -cyclodextrin 1: 1 complex and its potentiation in vitro against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics*, 66(9), 517-521.
- Denome, S. A., Elf, P. K., Henderson, T. A., Nelson, D. E., & Young, K. D., 1999. *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *Journal of bacteriology*, 181(13), 3981-3993.
- Dive, G., Bouillon, C., Sliwa, A., Valet, B., Verlaine, O., Sauvage, E., & Marchand-Brynaert, J., 2013. Macrocyclic-embedded β -lactams as novel inhibitors of the Penicillin Binding Protein PBP2a from MRSA. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 365-376.
- Duan, J., Dixon, S. L., Lowrie, J. F., & Sherman, W., 2010. Analysis and comparison of 2D fingerprints: insights into database screening performance using eight fingerprint methods. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 29(2), 157-170.

- Dutta, M., Kar, D., Bansal, A., Chakraborty, S., & Ghosh, A. S., 2015. A single amino acid substitution in the Ω -like loop of E. coli PBP5 disrupts its ability to maintain cell shape and intrinsic beta-lactam resistance. *Microbiology*, 161(4), 895-902.
- Dzhekheva, L., Adediran, S. A., Herman, R., Kerff, F., Duez, C., Charlier, P., ... & Pratt, R. F., 2013. Inhibition of DD-peptidases by a specific trifluoroketone: Crystal structure of a complex with the Actinomadura R39 DD-peptidase. *Biochemistry*, 52(12), 2128-2138.
- Egan, A. J., Biboy, J., van't Veer, I., Breukink, E., & Vollmer, W., 2015. Activities and regulation of peptidoglycan synthases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), 20150031.
- Ehmann, D. E., Jahić, H., Ross, P. L., Gu, R. F., Hu, J., Kern, G., ... & Fisher, S. L., 2012. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11663-11668.
- Emmerich, C. H., Gamboa, L. M., Hofmann, M. C., Bonin-Andresen, M., Arbach, O., English, B. K., 2014. Limitations of beta-lactam therapy for infections caused by susceptible Gram-positive bacteria. *Journal of Infection*, 69, S5-S9.
- FakhriRavari, A., Simiyu, B., Morrisette, T., Dayo, Y., & Abdul-Mutakabbir, J. C., 2022. Infectious disease: how to manage Gram-positive and Gram-negative pathogen conundrums with dual beta-lactam therapy. *Drugs in Context*, 11.
- Fedarovich, A., Djordjevic, K. A., Swanson, S. M., Peterson, Y. K., Nicholas, R. A., & Davies, C., 2012. High-throughput screening for novel inhibitors of Neisseria gonorrhoeae penicillin-binding protein 2.
- Fishovitz, J., Rojas-Altuve, A., Otero, L. H., Dawley, M., Carrasco-López, C., Chang, M., ... & Mobashery, S., 2014. Disruption of allosteric response as an unprecedented mechanism of resistance to antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, 136(28), 9814-9817.
- Freire-Moran, L., Aronsson, B., Manz, C., Gyssens, I. C., So, A. D., Monnet, D. L., ... & ECDC-EMA working group., 2011. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria—Time to react is now. *Drug resistance updates*, 14(2), 118-124.
- Frère, J. M., Sauvage, E., & Kerff, F., 2016. From “An Enzyme Able to Destroy Penicillin” to carbapenemases: 70 years of beta-lactamase misbehaviour. *Current drug targets*, 17(9), 974-982.
- Ghamrawi, R. J., Neuner, E., & Rehm, S. J., 2015. Ceftaroline fosamil: A süper-cephalosporin?. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 82(7), 437-444.
- Ghosh, A. K., Samanta, I., Mondal, A., & Liu, W. R., 2019. Covalent inhibition in drug discovery. *ChemMedChem*, 14(9), 889-906.
- Ghosh, A. S., Chowdhury, C., & Nelson, D. E., 2008. Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in Escherichia coli. *Trends in microbiology*, 16(7), 309-317.
- Goffin, C., & Ghuysen, J. M., 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(4), 1079-1093.
- Gonzales, P. R., Pesesky, M. W., Bouley, R., Ballard, A., Bidy, B. A., Suckow, M. A., ... & Dantas, G., 2015. Synergistic, collaterally sensitive β -lactam combinations suppress resistance in MRSA. *Nature Chemical Biology*, 11(11), 855-861.

- Grechishnikova, D., 2021. Transformer neural network for protein-specific de novo drug generation as a machine translation problem. *Scientific reports*, 11(1), 1-13.
- Guignard, B., Vouillamoz, J., Giddey, M., & Moreillon, P., 2013. A positive interaction between inhibitors of protein synthesis and cefepime in the fight against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 32(7), 899-907.
- Gupta, R., Srivastava, D., Sahu, M., Tiwari, S., Ambasta, R. K., & Kumar, P., 2021. Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery. *Molecular Diversity*, 25(3), 1315-1360.
- Han, S., Zaniewski, R. P., Marr, E. S., Lacey, B. M., Tomaras, A. P., Evdokimov, A., ... & Shanmugasundaram, V., 2010. Structural basis for effectiveness of siderophore-conjugated monocarbams against clinically relevant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22002-22007.
- Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., ... & Grein, F., 2017. The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(1), 1-10.
- Henry, X., Verlaine, O., Amoroso, A., Coyette, J., Frère, J. M., & Joris, B., 2013. Activity of ceftaroline against *Enterococcus faecium* PBP5. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(12), 6358-6360.
- Higgins, P. G., Stefanik, D., Page, M. G., Hackel, M., & Seifert, H., 2012. In vitro activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against meropenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(5), 1167-1169.
- Höltje, J. V., 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1), 181-203.
- Hoover, W. G., 1985. Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions. *Physical Review A*, 31, 1695.
- Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S., & Coleman, R. G., 2012. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *Journal of chemical information and modeling*, 52(7), 1757-1768.
- Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., ... & Birnbaum, J., 1979. Thienamycin, a new β -lactam antibiotic I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of antibiotics*, 32(1), 1-12.
- Kalyaanamoorthy, S., & Chen, Y. P. P., 2011. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug discovery today*, 16(17-18), 831-839.
- Kim, A., Kutschke, A., Ehmman, D. E., Patey, S. A., Crandon, J. L., Gorseth, E., ... & Nicolau, D. P., 2015. Pharmacodynamic profiling of a siderophore-conjugated monocarbam in *Pseudomonas aeruginosa*: assessing the risk for resistance and attenuated efficacy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(12), 7743-7752.
- Klein, E., Smith, D. L., & Laxminarayan, R., 2007. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging infectious diseases*, 13(12), 1840.
- Kramer, N. E., Smid, E. J., Kok, J., de Kruijff, B., Kuipers, O. P., & Breukink, E., 2004. Resistance of Gram-positive bacteria to nisin is not determined by lipid II levels. *FEMS microbiology letters*, 239(1), 157-161.

- Kuru, E., Hughes, H. V., Brown, P. J., Hall, E., Tekkam, S., Cava, F., ... & VanNieuwenhze, M. S., 2012. In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angewandte Chemie*, 124(50), 12687-12691.
- Landman, D., Singh, M., El-Imad, B., Miller, E., Win, T., & Quale, J., 2014. In vitro activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against contemporary Gram-negative pathogens from New York City, including multidrug-resistant isolates. *International journal of antimicrobial agents*, 43(6), 527-532.
- Lavanya, P., Ramaiah, S., & Anbarasu, A., 2016. A molecular docking and dynamics study to screen potent anti-staphylococcal compounds against ceftaroline resistant MRSA. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(2), 542-548.
- Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., ... & Mainardi, J. L., 2008. The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L, D-transpeptidation. *Journal of bacteriology*, 190(12), 4360-4366.
- Lebar, M. D., May, J. M., Meeske, A. J., Leiman, S. A., Lupoli, T. J., Tsukamoto, H., ... & Kahne, D., 2014. Reconstitution of peptidoglycan cross-linking leads to improved fluorescent probes of cell wall synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 136(31), 10874-10877.
- Lecoq, L., Dubée, V., Triboulet, S., Bougault, C., Hugonnet, J. E., Arthur, M., & Simorre, J. P., 2013. Structure of *Enterococcus faecium* L, D-transpeptidase acylated by ertapenem provides insight into the inactivation mechanism. *ACS chemical biology*, 8(6), 1140-1146.
- Lee, J. W., Maria-Solano, M. A., Vu, T. N. L., Yoon, S., & Choi, S., 2022. Big data and artificial intelligence (AI) methodologies for computer-aided drug design (CADD). *Biochemical Society Transactions*.
- Levefaudes, M., Patin, D., de Sousa-d'Auria, C., Chami, M., Blanot, D., Hervé, M., ... & Mengin-Lecreux, D., 2015. Diaminopimelic acid amidation in *Corynebacteriales*: new insights into the role of LtsA in peptidoglycan modification. *Journal of Biological Chemistry*, 290(21), 13079-13094.
- Liechti, G. W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y. V., VanNieuwenhze, M., & Maurelli, A. T., 2014. A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature*, 506(7489), 507-510.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., ... & Lewis, K., 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455-459.
- Lupoli, T. J., Tsukamoto, H., Doud, E. H., Wang, T. S. A., Walker, S., & Kahne, D., 2011. Transpeptidase-mediated incorporation of D-amino acids into bacterial peptidoglycan. *Journal of the American Chemical Society*, 133(28), 10748-10751.
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., & Dessen, A., 2006. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS microbiology reviews*, 30(5), 673-691.
- Macheboeuf, P., Fischer, D. S., Brown, T., Zervosen, A., Luxen, A., Joris, B., ... & Schofield, C. J., 2007. Structural and mechanistic basis of penicillin-binding protein inhibition by lactivicins. *Nature chemical biology*, 3(9), 565-569.
- Mainardi, J. L., Hugonnet, J. E., Rusconi, F., Fourgeaud, M., Dubost, L., Moumi, A. N., ... & Arthur, M., 2007. Unexpected inhibition of peptidoglycan LD-transpeptidase from

- Enterococcus faecium by the β -lactam imipenem. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30414-30422.
- Maurer, P., Todorova, K., Sauerbier, J., & Hakenbeck, R., 2012. Mutations in *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2x: importance of the C-terminal penicillin-binding protein and serine/threonine kinase-associated domains for beta-lactam binding. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), 314-321.
- Memmi, G., Filipe, S. R., Pinho, M. G., Fu, Z., & Cheung, A., 2008. *Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for β -lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(11), 3955-3966.
- Molina, K. C., Morrisette, T., Miller, M. A., Huang, V., & Fish, D. N., 2020. The emerging role of β -lactams in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(7), e00468-20.
- Morell, E. A., & Balkin, D. M., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. *The Yale journal of biology and medicine*, 83(4), 223-233.
- Mostafa, A. A., Alhossary, A. A., Salem, S. A., & Mohamed, A. E., 2022. GBO-kNN a new framework for enhancing the performance of ligand-based virtual screening for drug discovery. *Expert Systems with Applications*, 197, 116723.
- Mpenge, M. A., & MacGowan, A. P., 2015. Ceftaroline in the management of complicated skin and soft tissue infections and community acquired pneumonia. *Therapeutics and clinical risk management*, 11, 565.
- Murphy-Benenato, K. E., Dangel, B., Davis, H. E., Durand-Réville, T. F., Ferguson, A. D., Gao, N., ... & Zhao, S. X., 2015. SAR and structural analysis of siderophore-conjugated monocarbam inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* PBP3. *ACS medicinal chemistry letters*, 6(5), 537-542.
- Nair, D. R., Monteiro, J. M., Memmi, G., Thanassi, J., Pucci, M., Schwartzman, J., ... & Cheung, A. L., 2015. Characterization of a novel small molecule that potentiates β -lactam activity against Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 1876-1885.
- Nguyen-Distèche, M., Leyh-Bouille, M., & Ghuysen, J. M., 1982. Isolation of the membrane-bound 26 000-M r penicillin-binding protein of *Streptomyces* strain K15 in the form of a penicillin-sensitive d-alanyl-d-alanine-cleaving transpeptidase. *Biochemical Journal*, 207(1), 109-115.
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., ... & Epstein, S., 2010. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Applied and environmental microbiology*, 76(8), 2445-2450.
- O'Neill, J., 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations
- Otero, L. H., Rojas-Altuve, A., Llarrull, L. I., Carrasco-López, C., Kumarasiri, M., Lastochkin, E., ... & Hermoso, J. A., 2013. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), 16808-16813.
- Packiam, M., Weinrick, B., Jacobs Jr, W. R., & Maurelli, A. T., 2015. Structural characterization of mucopeptides from *Chlamydia trachomatis* peptidoglycan by mass spectrometry resolves "chlamydial anomaly". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(37), 11660-11665.

- Page, M. G., Dantier, C., & Desarbre, E., 2010. In vitro properties of BAL30072, a novel siderophore sulfactam with activity against multiresistant gram-negative bacilli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(6), 2291-2302.
- Paradis-Bleau, C., Markovski, M., Uehara, T., Lupoli, T. J., Walker, S., Kahne, D. E., & Bernhardt, T. G., 2010. Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell*, 143(7), 1110-1120.
- Périchon, B., & Courvalin, P., 2009. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(11), 4580-4587.
- Pinho, M. G., de Lencastre, H., & Tomasz, A., 2000. Cloning, characterization, and inactivation of the gene *pbpC*, encoding penicillin-binding protein 3 of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 182(4), 1074-1079.
- Pollock, J. J., Ghuysen, J. M., Linder, R., Salton, M. R. J., Perkins, H. R., Nieto, M., ... & Johnson, K., 1972. Transpeptidase activity of *Streptomyces* D-alanyl-D-carboxypeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(3), 662-666.
- Qiao, Y., Lebar, M. D., Schirner, K., Schaefer, K., Tsukamoto, H., Kahne, D., & Walker, S., 2014. Detection of lipid-linked peptidoglycan precursors by exploiting an unexpected transpeptidase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 136(42), 14678-14681.
- Rahme, C., Butterfield, J. M., Nicasio, A. M., & Lodise, T. P., 2014. Dual beta-lactam therapy for serious Gram-negative infections: is it time to revisit?. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(4), 239-259.
- Rani, N., Vijayakumar, S., PTV, L., & Arunachalam, A., 2016. Allosteric site-mediated active site inhibition of PBP2a using Quercetin 3-O-rutinoside and its combination. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34(8), 1778-1796.
- Release, S., 2019. 4: LigPrep. Schrödinger, LLC, New York, NY.
- Roth, G. J., Stanford, N., & Majerus, P. W., 1975. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(8), 3073-3076.
- Russo, T. A., Page, M. G., Beanan, J. M., Olson, R., Hujer, A. M., Hujer, K. M., ... & Bonomo, R. A., 2011. In vivo and in vitro activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against *Acinetobacter baumannii*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(4), 867-873.
- Sarkar, S. K., Chowdhury, C., & Ghosh, A. S., 2010. Deletion of penicillin-binding protein 5 (PBP5) sensitises *Escherichia coli* cells to β -lactam agents. *International journal of antimicrobial agents*, 35(3), 244-249.
- Sauvage, E., & Terrak, M., 2016. Glycosyltransferases and transpeptidases/penicillin-binding proteins: valuable targets for new antibacterials. *Antibiotics*, 5(1), 12
- Sauvage, E., Derouaux, A., Fraipont, C., Joris, M., Herman, R., Rocaboy, M., ... & Charlier, P., 2014. Crystal structure of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from *Escherichia coli*. *PLoS One*, 9(5), e98042.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P., 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 234-258.
- Schaduangrat, N., Lampa, S., Simeon, S., Gleeson, M. P., Spjuth, O., & Nantasenamat, C., 2020. Towards reproducible computational drug discovery. *Journal of cheminformatics*, 12(1), 1-30.

- Schanda, P., Triboulet, S., Laguri, C., Bougault, C. M., Ayala, I., Callon, M., ... & Simorre, J. P., 2014. Atomic model of a cell-wall cross-linking enzyme in complex with an intact bacterial peptidoglycan. *Journal of the American Chemical Society*, 136(51), 17852-17860.
- Scheffers, D. J., & Pinho, M. G., 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and molecular biology reviews*, 69(4), 585-607.
- Schendel, P., ... & Parnham, M. J., 2021. Improving target assessment in biomedical research: the GOT-IT recommendations. *Nature reviews Drug discovery*, 20(1), 64-81.
- Schleifer, K. H., & Kandler, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*, 36(4), 407-477.
- Schneider, T., & Sahl, H. G., 2010. An oldie but a goodie—cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2-3), 161-169.
- Schneider, T., & Sahl, H. G., 2010. Lipid II and other bactoprenol-bound cell wall precursors as drug targets. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 11(2), 157-164.
- Schrödinger Release 2019-1: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2019. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2019.
- Schweizer, I., Peters, K., Stahlmann, C., Hakenbeck, R., & Denapate, D., 2014. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: the mutation Ala707Asp within the C-terminal PASTA2 domain leads to destabilization. *Microbial Drug Resistance*, 20(3), 250-257.
- Schweizer, M. L., Furuno, J. P., Harris, A. D., Johnson, J. K., Shardell, M. D., McGregor, J. C., ... & Perencevich, E. N., 2011. Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC infectious diseases*, 11(1), 1-7.
- Silver, L. L., 2013. Viable screening targets related to the bacterial cell wall. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), 29-53.
- Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A., & Whitty, A., 2011. The resurgence of covalent drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 10(4), 307-317.
- Slimings, C., & Riley, T. V., 2014. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), 881-891.
- Spink, E., Ding, D., Peng, Z., Boudreau, M. A., Leemans, E., Lastochkin, E., ... & Mobashery, S., 2015. Structure–activity relationship for the oxadiazole class of antibiotics. *Journal of medicinal chemistry*, 58(3), 1380-1389.
- Starr, J., Brown, M. F., Aschenbrenner, L., Caspers, N., Che, Y., Gerstenberger, B. S., ... & Han, S., 2014. Siderophore receptor-mediated uptake of lactivicin analogues in gram-negative bacteria. *Journal of medicinal chemistry*, 57(9), 3845-3855.
- Sung, M. T., Lai, Y. T., Huang, C. Y., Chou, L. Y., Shih, H. W., Cheng, W. C., ... & Ma, C., 2009. Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), 8824-8829.
- Suto, N., Kamoshita, S., Hosoya, S., & Sakurai, K., 2021. Exploration of the Reactivity of Multivalent Electrophiles for Affinity Labeling: Sulfonyl Fluoride as a Highly Efficient and Selective Label. *Angewandte Chemie*, 133(31), 17217-17224.

- Tamura, N., Matsushita, Y., Kawano, Y., & Yoshioka, K., 1990. Synthesis and antibacterial activity of lactivicin derivatives. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 38(1), 116-122.
- Terrak, M., Ghosh, T. K., Van Heijenoort, J., Van Beeumen, J., Lampilas, M., Aszodi, J., ... & Nguyen-Distèche, M., 1999. The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 34(2), 350-364.
- Tipper, D. J., & Strominger, J. L., 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(4), 1133-1141.
- Trehan, I., Morandi, F., Blaszcak, L. C., & Shoichet, B. K., 2002. Using steric hindrance to design new inhibitors of class C β -lactamases. *Chemistry & biology*, 9(9), 971-980.
- Triboulet, S., Dubée, V., Lecoq, L., Bougault, C., Mainardi, J. L., Rice, L. B., ... & Arthur, M., 2013. Kinetic features of L, D-transpeptidase inactivation critical for β -lactam antibacterial activity. *PloS one*, 8(7), e67831.
- Typas, A., Banzhaf, M., van Sapperoo, B. V. D. B., Verheul, J., Biboy, J., Nichols, R. J., ... & Vollmer, W., 2010. Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell*, 143(7), 1097-1109.
- Ulm, H., & Schneider, T., 2016. Targeting bactoprenol-coupled cell envelope precursors. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(18), 7815-7825.
- Van Dam, V., Orlachs, N., & Breukink, E., 2009. Specific labeling of peptidoglycan precursors as a tool for bacterial cell wall studies. *Chembiochem*, 10(4), 617-624.
- Van Heijenoort, J., 2011. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4), 636-663.
- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 149-167.
- Yamachika, S., Sugihara, C., Kamai, Y., & Yamashita, M., 2013. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology*, 62(3), 429-436.
- Yocum, R. R., Rasmussen, J. R., & Strominger, J. L., 1980. The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 255(9), 3977-3986
- Yoshida, H., Kawai, F., Obayashi, E., Akashi, S., Roper, D. I., Tame, J. R., & Park, S. Y., 2012. Crystal Structures of Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Apo and Cefotaxime-Bound Forms. *Journal of molecular biology*, 423(3), 351-364.
- Yotsuji, A., Mitsuyama, J., Hori, R., Yasuda, T., Saikawa, I., Inoue, M., & Mitsushashi, S., 1988. Mechanism of action of cephalosporins and resistance caused by decreased affinity for penicillin-binding proteins in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(12), 1848-1853.
- Zapun, A., Philippe, J., Abrahams, K. A., Signor, L., Roper, D. I., Breukink, E., & Vernet, T., 2013. In vitro reconstitution of peptidoglycan assembly from the Gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *ACS chemical biology*, 8(12), 2688-2696.
- Zapun, A., Vernet, T., & Pinho, M. G., 2008. The different shapes of cocci. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 345-360.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Sefa BAYRAM
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Medeni Hali:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
Faks:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Atatürk Lisesi, Erzurum
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı
Doktora:	-
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
İlgi Alanları ve Hobiler	