



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

LASSA VİRÜS PROTEİNLERİNE KARŞI *IN SİLİKO*
YÖNTEMLERLE İLAÇ YENİDEN KONUMLANDIRMA

Handan ŞİMŞEK

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Şeref GÜL

Aralık, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 22.12.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Şeref GÜL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Onur Emre ONAT
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 1649B022215077 numaralı Tübitak 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--	--

ÖNSÖZ

Eğitimim ve tez çalışma sürecimde her zaman yanımda olan, destekleyen ve ilgi duyduğum projeye yönelmeme teşvik eden, sabırla öğreten, yeri doldurulamaz danışmanım Doç. Dr. Şeref GÜL'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana her zaman yardımcı olan, birlikte olmaktan her zaman mutlu olduğum arkadaşlarım Betül Oruçoğlu ve Selahattin Aydoğan'a teşekkür ederim.

Eğitimimi her zaman destekleyen aileme teşekkür ederim, minnetarım. |

Aralık 2023

[Handan ŞİMŞEK]

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. LASSA VİRÜSÜ TARİHSEL EVRİMİ VE KEŞFİ	1
1.2. LASSA VİRÜSÜ BULAŞMA YOLLARI	2
1.3. LASSA VİRÜSÜ YAPISI	3
1.4. LASSA VİRÜSÜNÜN YAŞAM DÖNGÜSÜ.....	4
1.4.1. Lassa Virüsü Giriş Mekanizması.....	5
1.4.2. Transkripsiyon ve Protein Sentezi.....	6
1.5. POTANSİYEL İLAÇ HEDEF BÖLGELERİ.....	9
1.5.1. NP Yapısı.....	9
1.5.1.1. C Terminal Alanı	10
1.5.1.2. N Terminal Alanı	12
2. Genel Kısımlar	14
2.1. ÇALIŞMANIN AMACI	14
3. MALZEME VE YÖNTEM	16
3.1. YERLEŞTİRME SİMÜLASYONU METODU	17
3.2. MD SİMÜLASYONLARI.....	20
4. Bulgular	24
4.1. YERLEŞTİRME SİMÜLASYONU	24
4.2. MD SİMÜLASYONU	42
4.2.1. RMSD Analizi	44
4.2.2. Zaman-Çizelgesi ve Küme Analizi	47
4.2.3. MMGBSA Hesaplaması ve Alanin Mutasyonu	56
5. Tartışma ve Sonuç	60

6. KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ	68

|



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1: LASV yapısına genel bakış. Sol üstte elektron yoğunluğu haritası. Trimer yapı, her protein için farklı bir renkle (mavi, gri veya pembe) ve SSP, GP1 ve GP2 alt birimleri farklı tonlarla gösterilir. N-bağlı glikanlar küreler olarak gösterilmiştir. Membran çift tabakasının kaba sınırları ve görünür terminaller belirtilmiştir. Şekil Katz, Weinstein vd., (2022)'dan uyarlanmıştır.4
- Şekil 2: Reseptör kullanımı, hücre girişi ve LASV geç endozomal reseptör anahtarı için model (Torriani, Galan-Navarro vd., 2017).5
- Şekil 3: Lassa virüsünün yapısı, genom organizasyonu ve replikasyon stratejisi (Garry 2023)'dan uyarlanmıştır.8
- Şekil 4: a) LASV NP gösterimi. Turkuaz renginde N alanını ve turuncu renkte C alanını temsil etmektedir. Siyah küre Mn^{2+} , mavi küre Zn^{2+} gösterir. b) LASV NP trimerinin halka şeklindeki yapısı. İlk protein (Şekil 4a) turkuaz ve turuncu renklidir, ikinci protein mavi ve üçüncü protein eflatun renklidir. c) NP proteininin elektrostatik yüzey potansiyel haritası. Beyaz noktalı daire, kapak bağlama boşluğunun girişi. Mavi alan pozitif yüklü kalıntıları, kırmızı alan ise negatif yüklü kalıntıları temsil eder. d) 3'-5' ekzoribonükleaz boşluğunun elektrostatik yüzey potansiyel haritası (Qi, Lan vd., 2010)'dan uyarlanmıştır.....10
- Şekil 5: LASV NP proteininin C alanı bir 3'-5' ekzoribonükleazdır. a) C bölgesinin (turuncu) insan TREX1 proteini (yeşil) ile üst üste binmesi, iki yapı arasında yüksek derecede benzerlik olduğunu ortaya koymaktadır. LASV NP'de siyah Mn^{2+} ve TREX1'de kırmızı, Zn^{2+} mavi. b) LASV NP ve TREX1'in ekzonükleaz katalitik kalıntıları aynı konumlarda bulunur ve NP için turuncu ve TREX1 için yeşil ile gösterilir (Qi, Lan vd., 2010)'dan uyarlanmıştır.11
- Şekil 6: a) NP ile dTTP kompleks hale getirilmiştir (PDB kodu:3MX2). b) UTP ile kompleks haline getirilmiş NP (PDB kodu:3MX5) gösterilmiştir. (Qi, Lan vd., 2010)'dan uyarlanmıştır.12
- Şekil 7:AutoDock Vina programında bağlanma bölgesi için ızgara kutusu. (Tang, Ding vd., 2023)'den uyarlanmıştır.18
- Şekil 8: Bir konformasyonu diğerine dönüştürmek için tekli bütan bağı etrafında dönme. Üstte: Newman projeksiyonu; aşağıda: Uzaysal yönelimin tasviri gösterilmiştir (Commons 2023).18
- Şekil 9: Yerleştirme simülasyonunu çalışma prensibi (Commons 2023)'den uyarlanarak gösterilmiştir. Stabil kompleksin proteini siyah renk ile ligandı yeşil renk ile temsil edilmiştir.....19

Şekil 10: Küme analizi şeması (Kapoor, 2022)'den uyarlanmıştır.	22
Şekil 11: MM/GBSA hesaplaması termodinamik döngüye göre yapılmaktadır. (Hati ve Bhattacharyya 2020)'den uyarlanmıştır.	23
Şekil 12: a) Kontrol simülasyonu için PDB'den alınan dTTP ve yerleştirme simülasyonu sonucu dTTP'nin Pymol'de gösterimi. Yerleştirme simülasyonu sonucu dTTP ligandının karbon atomları gri, oksijen atomları kırmızı, azot atomları mavi renk ile; PDB'den alınan dTTP ligandının karbon atomları sarı, azot atomları mavi, oksijen atomları pembe renk temsil edilmiştir. b) Yerleştirme simülasyonu sonucu dTTP'nin amino asitler ile etkileşiminin LigPlot ile 2 boyutlu diyagramı. Hidrojen bağları noktalı çizgiler ile gösterilmiştir. Azot mavi renk ile, oksijen kırmızı renk ile, karbon deniz yeşili renk ile, kükürt sarı renk ile, fosfor atomları kahverengi renk ile, hidrofobik kalıntıları tuğla kırmızısı rengi ile gösterilmiştir.	28
Şekil 13: Metacycline ligandı (a) ve Eltrombopag ligandı (b) Ligplot ile gösterimi.	39
Şekil 14: Glimepiride ligandı(a) ve Lurasidone ligandı(b) Ligplot ile gösterimi.....	40
Şekil 15: Prednisone ligandı(a) ve Paliperidone ligandı(b) Ligplot ile gösterimi.....	40
Şekil 16: Fmn ligandı(a) ve Doxazosin ligandı(b) Ligplot ile gösterimi.	41
Şekil 17: Pimozide ligandının Ligplot ile gösterimi.....	42
Şekil 18: NP-dtpp simülasyonunda proteinin ve dTTP ligandının RMSD sonuçları.....	45
Şekil 19: NP-ilâç simülasyonunda proteinlerin ve ilâçların RMSD sonuçları	45
Şekil 20: NP-ilâç simülasyonunda proteinlerin ve ilâçların RMSD sonucu	46
Şekil 21: NP-ilâç simülasyonunda proteinlerin ve ilâçların RMSD sonucu	46
Şekil 22: dTTP ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	47
Şekil 23: Yerleştirme simülasyonu ve küme analizi sonrası dTTP ligandlarının karşılaştırılması. Yerleştirme simülasyonu sonucu gri renk ile karbon, kırmızı ile oksijen, mavi ile azot, küme analizi sonucunda da sarı renk ile karbon, turuncu ile kükürt, pembe ile oksijen atomları gösterilmiştir, ten rengi ile de aktif aminoasitler görselleştirilmiştir.....	48
Şekil 24: Paliperidone ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	49
Şekil 25: Lurasidone ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	49
Şekil 26: Pimozide ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	50

Şekil 27: Glimepiride ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	51
Şekil 28: Eltrombopag ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	51
Şekil 29: Doxazosin ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	52
Şekil 30: Fmn ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	52
Şekil 31: Metacycline ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	53
Şekil 32: Prednisone ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.....	54
Şekil 33: NP-ligand komplekslerinin küme analizi sonuçlarının Pymol’de görselleştirilmesi.....	55

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: C alanı için yerleştirme simülasyonu sonucu 25 molekül listelenmiştir.....	25
Tablo 2: N alanı için yerleştirme simülasyonu sonucu 100 molekül listelenmiştir.....	29
Tablo 3: Hidrojen bağı ve van der Waals etkileşimleri	56
Tablo 4: MM/GBSA metodu ile hesaplanan bağlanma serbest enerjileri listelenmiştir.	56
Tablo 5: Alanin mutasyonu sonucu BFE'ler ve $\Delta\Delta G$ değerleri listelenmiştir.	57
Tablo 6: İlaç NP bağlanmasında kritik kalıntıların BFE'ye katkısı.	58

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

Å	: Angstrom
α -DG	: Alfa-Distrioglikan
Na	: Sodyum
Cl	: Klor
K	: Kelvin
N	: Sayı
P	: Basınç
R	: Gaz sabiti
T	: Sıcaklık
S	: Küçük
V	: Hacim

Kisaltmalar	Açıklama
-------------	----------

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADT	: AutoDock Tools
BFE	: Bağlanma Serbest Enerjisi
CPU	: İşlemci
DEDD	: DnaQ
DTTP	: Deoxythymidine Triphosphate
ECM	: Hücre Dışı Matris
EPA	: ABD Çevre Koruma Ajansı
ESCRT	: Endozomal Sıralama Kompleksi
FDA	: Food and Drug Administration
FMN	: Flavin Mononükleotid
GP	: Glikoprotein
GPC	: Glikoprotein Öncüsü
IFN	: Interferon
Kcal	: Kilokalori
LASV	: Lassa Virüsü

LF	: Lassa Ateşı
LP	: Viral Polimeraz
MD	: Moleküler Dinamik
MM/GBSA	: Generalized Born ve Surface Area Solvation
MM/PBSA	: Poisson-Boltzmann
mRNA	: Mesajcı RNA
NP	: Nükleoprotein
NS	: Nanosaniye
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler model
PDB	: Protein Veri Bankası
PRR	: Kalıp Tanıma Reseptörleri
PS	: Pikosaniye
RMSD	: Kök Ortalama Kare Sapması
RNA	: Ribonükleik Asid
RNP	: Ribonükleoprotein
SL	: Kök Döngü
SSP	: Kararlı Sinyal Peptit
S1P	: Site-1 proteaz
SKI1	: Substilin/heksin-izoenzim-1
UTP	: Üridin Trifosfat

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LASSA VİRÜS PROTEİNLERİNE KARŞI *IN SİLİKO* YÖNTEMLERLE İLAÇ YENİDEN KONUMLANDIRMA

Handan ŞİMŞEK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Şeref GÜL

Lassa virüsü (LASV), Lassa Ateşine (LF) sebep olarak her yıl binlerce ölüme neden olmaktadır. Batı Afrika’da yıllık 100.000-300.000 LASV enfeksiyonu rapor edilmişken henüz onaylanmış bir aşısı yoktur. Dünya Sağlık Örgütü tarafından LF’nin dünyanın farklı bölgelerinde görülme potansiyelinin yüksek olduğu raporlanmıştır. LF’ye karşı antiviral ilaç olarak ribavirin denenmiş fakat yan etkileri nedeniyle kullanımı durdurulmuştur. Bu nedenle LF’ye karşı ilaç geliştirme çalışmaları büyük önem taşımaktadır. Yenilikçi ilaç geliştirme çalışmaları uzun süreli molekül keşfi ve faz çalışmaları gerektirdiği için kullanımda olan ilaçların yeni ortaya çıkan hastalıklara karşı yeniden konumlandırılması zaman ve maliyet kazanımı sağlamaktadır. LASV’nin konakçıya giriş mekanizması ve yaşam döngüsündeki proteinler ilaç geliştirme çalışmaları için kritik hedeflerdir. LASV, S ve L olarak bilinen iki tek sarmallı bölümden oluşan negatif anlamlı bir RNA genomuna sahiptir. S bölümü, hem nükleoproteini (NP) hem de zarf glikoprotein kompleksinin (GPC) öncüsünü kodlar. NP, viral genomik ve antigenomik RNA’larla bağlanarak nükleokapsidler olarak bilinen ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri oluşturup LASV yaşam döngüsünde önemli bir rol oynar. Bu nükleokapsidler, L polimeraz ile etkileşime girer ve hem viral mRNA transkripsiyonunu hem de viral genom replikasyonunda görev alır. Bu nedenle bu çalışmada NP hedef protein olarak belirlenmiştir. Çözülmüş NP kristal yapılarında, N ve C uçlarındaki iki kritik bölgeye yerleştirme simülasyonu metoduyla FDA onaylı ilaçların aktif moleküllerinin bağlanma afiniteleri belirlenmiştir. Her iki bölge için de en iyi bağlanma afinitesine sahip, yan etkisi düşük ve yaygın kullanımda olan ilaçlar belirlenmiştir. Bu ilaçların yerleştirme simülasyonu analizinden gelen NP ile kompleks yapıları

detaylı olarak moleküler dinamik (MD) simülasyonları ile incelenmiştir. MM/GBSA analizi ile molekül-NP bağlanma enerjileri detaylı olarak hesaplanmış ve *in silico* alanin-tarama yöntemi ile seçilen moleküllerin kritik olarak bağlandığı amino asitler belirlenmiştir. |

Aralık 2023, 84 sayfa.

Anahtar kelimeler: |Lassa, Nükleoprotein, İlaç Yeniden Konumlandırma, Doking, MD Simülasyonu|



SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

[DRUG REPURPOSING AGAINST LASSA VIRUS PROTEINS BY USING *IN SILICO* METHODS]

[Handan ŞİMŞEK]

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Biotechnology]

Supervisor : [Assoc. Prof. Dr.] Şeref GÜL

Lassa virus (LASV) causes thousands of deaths every year by causing Lassa Fever (LF). While 100,000-300,000 LASV infections have been reported annually in West Africa, there is no approved vaccine yet. It has been reported by the World Health Organization that LF has a high potential to occur in different parts of the world. Ribavirin was tried as an antiviral drug against LF, but its use was discontinued due to its side effects. Therefore, drug development studies against LF are of great importance. Since innovative drug development studies require long-term molecule discovery ve phase studies, repositioning of drugs in use against newly emerging diseases provides time ve cost savings. The host entry mechanism of LASV ve the proteins in its life cycle are critical targets for drug development studies. LASV has a negative-sense RNA genome consisting of two single-stranded segments known as S ve L. The S segment encodes both the nucleoprotein (NP) ve the precursor of the envelope glycoprotein complex (GPC). NP plays an important role in the LASV life cycle by binding with viral genomic ve antigenomic RNAs to form ribonucleoprotein (RNP) complexes known as nucleocapsids. These nucleocapsids interact with L polymerase ve are involved in both viral mRNA transcription ve viral genome replication. Therefore, NP was determined as the target protein in this study. Binding affinities of active molecules of FDA-approved drugs were determined by the docking simulation method at two critical regions at the N ve C termini in solved NP crystal structures. Drugs with the best binding affinity for both regions, with low side effects ve in widespread use were determined. The complex structures of these drugs with NP from the docking

simulation analysis were examined in detail by molecular dynamics (MD) simulations. By MM/GBSA analysis, molecule-NP binding energies were calculated in detail, ve the amino acids to which the selected molecules were critically bound were determined by the in silico alanine-scanning method.

December 2023, 84. pages.

Keywords: Lassa, Nucleoprotein, Drug Repositioning, Docking, MD Simulation |



1. GİRİŞ

1.1. LASSA VİRÜSÜ TARİHSEL EVRİMİ VE KEŞFİ

Lassa virüsü, Arenaviridae ailesine ait bir RNA virüsüdür ve Batı Afrika'da endemik olarak bulunan bir zoonotik patojendir (Ogbu, Ajuluchukwu vd., 2007). Bu virüsün tarihsel evrimi, mikrobiyoloji ve bulaşıcı hastalıklar alanındaki çalışmaların bir ürünü olarak şekillenmiştir. LASV ilk olarak 1969'da Nijerya'nın kuzey doğusundaki küçük bir kasaba olan Lassa'daki bir klinikte çalışan bir hemşireden izole edilmiştir (Frame, Baldwin Jr vd., 1970). Bu hastalığın karakteristik özellikleri, ateş, baş ağrısı, halsizlik gibi semptomlar ve zaman zaman kanamalı sendromları içermektedir (McCormick, King vd., 1987). Juliette Dalglish ve Max S. Gear gibi araştırmacılar, bu salgının etkeninin viral bir patojen olduğunu keşfetmişlerdir. Bu yeni virüs, Lassa ateşi olarak adlandırılmış ve hastalığın seyrini belirleyen önemli bir faktör olarak belirlenmiştir (Buckley ve Cabals 1970). 1970'lerde, Lassa virüsünün daha ayrıntılı karakterizasyonu ve moleküler yapısının çözülmesi başlanmıştır. Bu dönemde viral genomunun RNA yapısı belirlenmiş ve protein bileşenleri ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Özellikle virüsün zarfını oluşturan glikoproteinlerin hücreye giriş mekanizmasındaki rolüne dair ilk ipuçları elde edilmiştir (Fichet-Calvet ve Rogers 2009). Sonraki yıllarda, Lassa virüsünün fareler aracılığıyla insanlara bulaşma mekanizmaları ve enfeksiyonun moleküler düzeydeki ayrıntıları daha fazla araştırılmıştır. Genetik analizler, virüsün farklı suşlarının evrimsel ilişkilerini ortaya çıkarmış ve coğrafi yayılma paternleri incelenmiştir. Bu dönemde, Lassa virüsünün neden olduğu hastalığın epidemiyolojisi ve bulaşma yollarının daha iyi anlaşılması, enfeksiyonun kontrol altına alınması ve yayılmasının sınırlandırılması açısından büyük önem taşımıştır (Yun ve Walker 2012).

Günümüzde, Lassa virüsü ve Lassa ateşi hala Batı Afrika'da önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülmektedir (WHO 2023). Genomik analizler, viral bileşenlerin fonksiyonları ve immünolojik tepkiler üzerine yapılan çalışmalar, Lassa virüsünün patojenezini daha derinlemesine anlamamıza yardımcı olmaktadır. Ayrıca, aşı geliştirme çabaları ve ilaç tedavi stratejileri, gelecekteki salgınların etkisini minimize etme amacıyla devam etmektedir. Tarihsel evrimi boyunca, Lassa virüsü araştırmaları mikrobiyoloji ve bulaşıcı hastalıklar alanında

önemli bilimsel ilerlemelere sebep olmuştur. Bu çalışmalar, virüsün biyolojisi ve etkileşimleri hakkındaki anlayışımızı artırmış ve hastalığın kontrolüne yönelik stratejilere yol göstermiştir.

1.2. LASSA VİRÜSÜ BULAŞMA YOLLARI

Lassa virüsünün insanlara bulaşması, kontemine olmuş kemirgen dışkısının solunması veya kontemine olmuş gıda tüketimi ile veya temasıyla gerçekleşir (Stephenson, Larson vd., 1984). *Mastomys natalensis* türü kemirgen Lassa virüsünün doğal konakçısıdır (Monath, Newhouse vd., 1974). Lassa ateşi (LF) özellikle Nijerya, Liberya, Sierra Leone ve Gine'de yaygın olan enfekte kemirgenlerle temasın neden olduğu hemorajik bir insan hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, özellikle yeterli enfeksiyon önleme ve kontrol tedbirlerinin bulunmadığı hastanelerde, bireyler arasında ve laboratuvar ortamlarında da bulaşma gerçekleşebilmektedir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, Afrika'da yılda 100.000-300.000 LASV enfeksiyonu ve ~5.000 LF'ye bağlı ölüm olduğunu bildirmiştir (Department of Health ve Human Services 2023). Ortalama 10 günlük bir kuluçka döneminden sonra ateş, halsizlik ve baş ağrısı gibi genel grip benzeri semptomlar görülür. Şiddetli LF vakalarına hemorajik ve/veya nörolojik tutulum eşlik edebilir (Basler 2017). Her yıl 300.000'e kadar enfeksiyon ve 5000'den fazla ölüm meydana gelmekte olup, mortalite oranları hastanede yatan hastalarda %50'ye, gebeliğin son ayındaki kadınlarda %90'a kadar ulaşmaktadır (Ogbu, Ajuluchukwu vd., 2007). Hastalıktan kurtululanlarda ise sağırılık dahil nörolojik komplikasyonlar sık görülür (Cashman, Wilkinson vd., 2018). Virüsün taşıyıcısı olan kemirgenlerin bulunduğu bölgelerde nüfus artışı, çevresel değişiklikler veya iklim değişiklikleri, yeni salgınların oluşma riskini artırabilir. Lassa ateşi hastalığının hem bölgesel hem de küresel sağlık açısından önemi, yüksek ölüm oranı, zorlu tanı süreci, uluslararası yayılma riski ve sağlık altyapısına olan etkileri gibi faktörlerle belirlenir (Glass, Cheek vd., 2000). Hastalık, sadece bölgesel değil, aynı zamanda uluslararası sağlık otoriteleri ve topluluklar için de dikkate alınması gereken bir sağlık sorunudur. Lassa virüsü, seyahat eden kişiler aracılığıyla da diğer bölgelere yayılabilir. Bu nedenle, dünya genelinde Lassa virüsünün potansiyel bir tehdit olduğu düşünülmektedir.

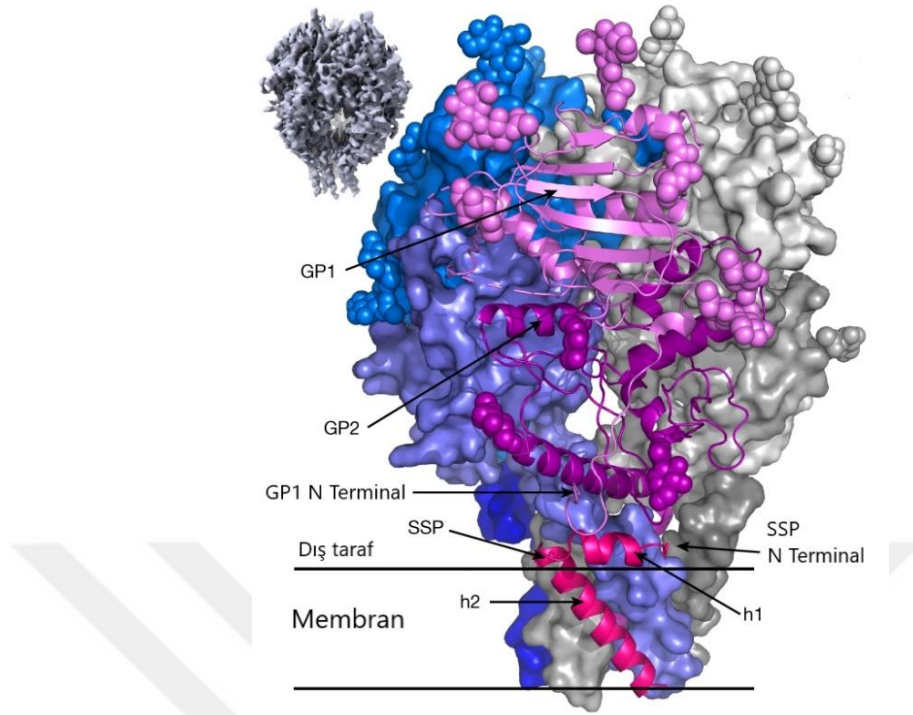
Lassa virüsünün çoğalmasını ve yayılmasını azaltabilen veya yok edebilen antiviral ilaçlar, hastanın hastalığa karşı direnç göstermesini sağlayabilir. Fakat patojen hakkında bilinenlerin az olması antiviral ilaçların gelişmesinde çok büyük bir zorluktur (Garry 2023). Antiviral ilaç olarak denenen ribavirin, erken LF teşhislerinde ölüm riskini azaltabilmektedir, fakat ilacın yan etkilerinden dolayı nadiren kullanılmaktadır (McCormick, King vd., 1986).

1.3. LASSA VİRÜSÜ YAPISI

Lassa virüsü (LASV) Mammaarenavirüs cinsinde ve Arenavirüs ailesinde olan negatif anlamlı zarflı, iki segmentli bir RNA virüsüdür (Kuhn, Adkins vd., 2020). Arenavirüsler, sitozol ile sınırlı, litik olmayan bir yaşam döngüsüne sahip zarflı zincirli RNA virüsleridir. Arenavirüs genomu, zarf glikoprotein öncüsü (GPC) ve nükleoproteini (NP) kodlayan S (küçük) segmenti ve matris proteini (Z) ve viral polimerazı (LP) kodlayan L segmentinden oluşur (Buchmeier 2007).

Glikoprotein öncüsü virüsün hücreye girişini sağlar. GPC tek polipeptit olarak sentezlenmesine rağmen sonra üç bölüme ayrılır: kararlı sinyal peptit (SSP), reseptör bağlama alt birimi GP1 ve membran füzyon alt birimi GP2 (Beyer, Pöppel vd., 2003). SSP, spike ile yer değiştirmesi, olgun kompleksin bir parçasını oluşturması, trans halinde eklenebilmesi ve spike olgunlaşması ve işlevi için gerekli olması bakımından arenavirüslere özgüdür (Cosset, Marianneau vd., 2009). Tüm arenavirüsler tarafından paylaşılan yapılar olsa da, farklı virüsler farklı hücrel reseptörler kullanır: Lassa virüsünde α -distroglikan (Cao, Henry vd., 1998, Kunz, Rojek vd., 2005) (α -DG) kullanır.

Arenavirüslerde bulunan α -DG'nın yapısal temeli bilinmemektedir (Cohen-Dvashi, Cohen vd., 2015). LASV kompleksi ve ilgili proteinler (Israeli, Cohen-Dvashi vd., 2017) üzerindeki diğer yapısal çalışmalar, reseptör tanımanın temeli hakkında ek ipuçları sağlamıştır, ancak mekanizma tam olarak çözülmemiştir. LASV yapısının genel yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



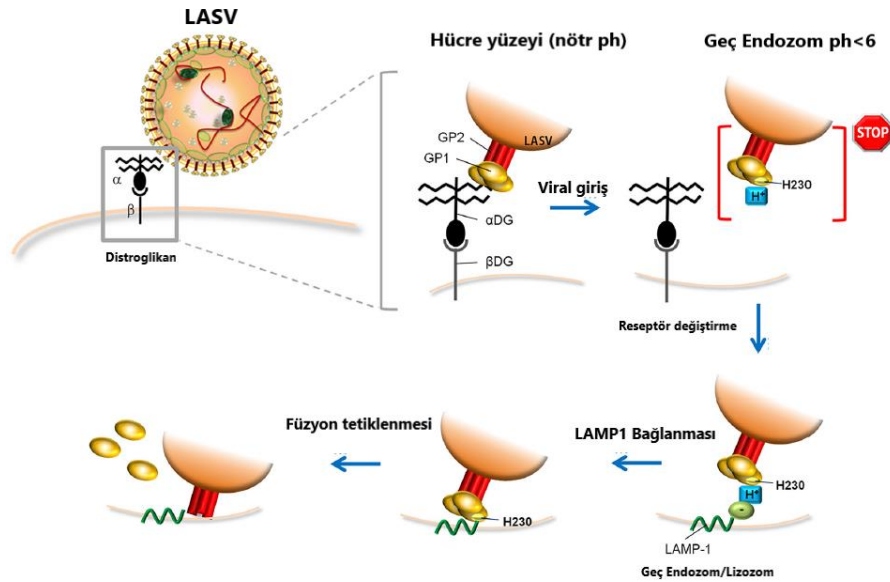
Şekil 1: LASV yapısına genel bakış. Sol üstte elektron yoğunluğu haritası. Trimer yapı, her protein için farklı bir renkle (mavi, gri veya pembe) ve SSP, GP1 ve GP2 alt birimleri farklı tonlarla gösterilir. N-bağlı glikanlar küreler olarak gösterilmiştir. Membran çift tabakasının kaba sınırları ve görünür terminaller belirtilmiştir. Şekil Katz, Weinstein vd., (2022)'dan uyarlanmıştır.

1.4. LASSA VİRÜSÜNÜN YAŞAM DÖNGÜSÜ

Lassa virüsünün replüksiyon döngüsü, virüsün öncelikle hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücreye girmesiyle başlar (Hastie, Zandonatti vd., 2017). Virüs, spesifik hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla endositoz yoluyla hücreye alınır (Hastie, Igonet vd., 2016). Hangi endositotik yolun kullanıldığı henüz bilinmemektedir, fakat virüs girişinin kolesterol tükenmesi ile sınırlı olduğu kanıtlanmıştır (Hastie, Zandonatti vd., 2017). Hücre girişi için kullanılan reseptör, hücre dışı matris (ECM) proteinleri için yüksek oranda korunan ve her yerde eksprese edilen bir hücre yüzeyi reseptörü olan distroglikandır (Kunz 2009). Daha sonra alfa-distroglikan ve beta-distroglikan olarak parçalanan distroglikan, orijinal olarak çoğu hücrede olgun dokulara eksprese edilir ve ECM ile aktin bazlı hücre iskeleti arasında moleküler bağlantı sağlar (Kunz 2009).

1.4.1. Lassa Virüsü Giriş Mekanizması

Lassa virüsünün hücreye girişini sağlayan GPC'dir (Fedeli, Moreno vd., 2020). GPC tek bir polipeptit olarak sentezlenir fakat daha sonra sinyal peptidaz ve substilin/heksin-izoenzim-1/site-1 proteaz (SKI-1/S1P) tarafından kararlı sinyal peptit (SSP), reseptör bağlama alt birimi GP1 ve membran füzyon alt birimi GP2 olarak üç bölüme ayrılır. SSP, GP1 ve GP2 birbirine kovalent olmayan şekilde bağlıdır ve hepsi bir virüs yüzeyinde paketlenen trimerler oluşturur. SSP'de iki transmembran alanı ve bir ektodomain vardır. SSP 58 amino asitten oluşur (Bederka, Bonhomme vd., 2014). GP1 alt birimi, reseptör tanıma ile ilgilidir ve hücrel reseptörler alfadistroglikan (α -DG) (Acciani, Alston vd., 2017) ve lizozomla ilişkili membran proteini 1 (LAMP1) ile etkileşime girer (Jae, Raaben vd., 2014). LASV GP1, hücre yüzeyinde α -DG tarafından görüntülenen O-matriglikan polisakkaritlerini, ardından makropinositoz ile ilgili olağandışı bir yol ile endositozu etkiler (Iwasaki, Ngo vd., 2014). Geç endozom asitlenmesi, LASV GP1'de DG'den ayrılan ve bir histidin üçlüsü ile düşük pH konformasyonunu benimseyen yapısal bir değişikliğe neden olur. GP1'de H230'un protonlanması, onu ön füzyon durumunda "kilitler" ve erken füzyonu önler. LAMP1 aktivasyonu, GP1'in H230 üzerindeki pozitif yükü nötralize eder ve geç endozom/lizozom sınırlayıcı membran ile verimli füzyona neden olur (Şekil 2) (Cohen-Dvashi, Israeli vd., 2016).



Şekil 2: Reseptör kullanımı, hücre girişi ve LASV geç endozomal reseptör anahtarı için model (Torriani, Galan-Navarro vd., 2017).

TAM ailesi, C tipi lektinler ve AxI, LASV için potansiyel reseptörler olarak tanımlanmıştır (Shimojima, Ströher vd., 2012). Bu, arenavirüslerin birden fazla reseptöre ve giriş noktasına sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca virüs, GP1'in hücrel reseptöre bağlanmasından sonra endositoza tabi tutulur. LASV'lerin endositozu, bilinmeyen bağımsız bir yol aracılığıyla gerçekleşir (Rojek ve Kunz 2008). Bu girdi, hücrel girişte nakil için gerekli endozomal sıralama kompleksi (ESCRT) proteinlerinin önemini açıklamaktadır (Pasqual, Rojek vd., 2011). Son araştırmalar ayrıca makropinositoz yollarının Lassa virüsünün viral girişinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Oppliger, Torriani vd., 2016).

GP2 alt birimi, sınıf I viral füzyon proteini olmasıyla birlikte asidik ortam etkisi altına girdikten sonra membran füzyonunu tetikleyen bir konformasyonel değişim geçirir (Igonet, Vaney vd., 2011). GPC olgunlaşması için SSP temeldir (Burri, Pasquato vd., 2013) ve GP2 alt birimi ile etkileşime girip GPC aracılı pH'a bağlı membran füzyonuna destek olur (Messina, York vd., 2012).

1.4.2. Transkripsiyon ve Protein Sentezi

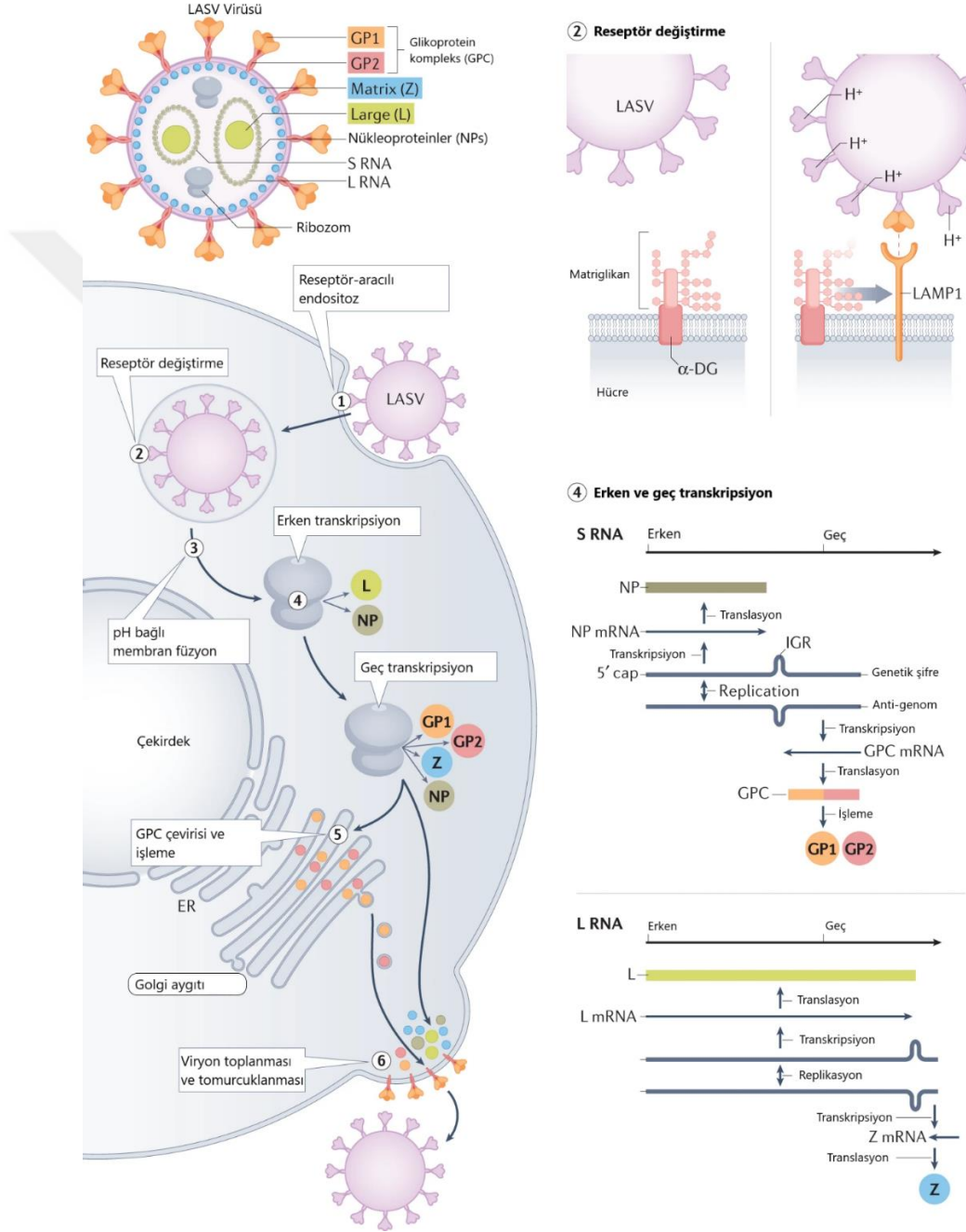
Virüs, alfa-distroglikan aracılı endositoz yoluyla hücreye girdikten sonra, düşük pH ortamı, pH'a bağlı membran füzyonunu tetikler ve RNP (viral ribonükleoprotein) kompleksini sitoplazmaya bırakır (Hass, Gölnitz vd., 2004). Bu, virüsün hücre içine serbestçe girmesine olanak tanır. Virüs, hücre içinde çoğalabilmesi için genomunu hücrenin sitoplazmasına salmalıdır. Genom salındıktan sonra, virüsün genleri hücrenin ribozomları tarafından çevrilir ve sitoplazmada replikasyon ve transkripsiyon başlayarak viral proteinlerin üretilmesi sağlanır (Rojek ve Kunz 2008). Çoğaltma başladığında hem S hem de L RNA genomları antijenomik S ve L RNA'larını sentezler ve antijenomik RNA'lardan genomik S ve L RNA sentezlenir. Transkripsiyon ve çeviri için hem genomik hem de antijenomik RNA'lar gereklidir. S RNA, GP ve NP proteinlerini kodlarken; L RNA, Z ve L proteinlerini kodlar. L proteini viral RNA'ya

bağımlı RNA polimerazı temsil eder (Haas, Breuer vd., 2003). Üretilen viral mRNA'lar virüsün replikasyonu, montajı ve diğer yaşamsal işlevleri için gereklidir. Ayrıca virüsün RNA'sını replike edebilmek ve yeni virüs partiküllerini oluşturabilmek için de kullanılır (Loureiro, D'Antuono vd., 2019).

Yeni oluşan viral partiküller hücrenin yüzeyine taşınır ve hücrenin zarından salınır. Bu, hücrenin ölümüne veya daha az ciddi şekilde, virüsün hücreden salınmasına neden olabilir. Bu serbest bırakılan viral partiküller, enfeksiyonun yayılmasını sağlar (Loureiro, D'Antuono vd., 2019). Hücre virüs tarafından enfekte olduğunda, genomik RNA'nın transkripsiyonuna bağlı olarak LP (L proteini) viral RNP ile ilişkilendirilir. Her iki RNA segmentinin 5' ve 3' terminal 19 nt viral promoter bölgeleri, viral polimerazın tanınması ve bağlanması için gereklidir. Birincil transkripsiyon ilk olarak, sırasıyla NP ve L proteinlerini kodlayan genomik S ve L RNA'larından mRNA'ları transkripte eder (Kranzusch, Schenk vd., 2010). Transkripsiyon, intergenomik bölge içindeki kök-döngü (SL) yapısında sona erer (Yun ve Walker 2012).

Arenavirüsler, hücresel mRNA'lardan başlık yapılarını elde etmek için bir kapak bağlama stratejisi kullanır ve buna LP endonükleaz aktivitesi ve NP'nin kapak bağlama aktivitesi aracılık eder (Qi, Lan vd., 2010). Antigenomik RNA, sırasıyla S ve L segmentlerinden genomik yönde kodlanan viral genler GPC ve Z'yi kopyalar. Antigenomik RNA aynı zamanda replikasyon için şablon görevi görür (Yun ve Walker 2012). GPC'nin çevirisinden sonra, endoplazmik retikulumda çeviri sonrası olarak değiştirilir. GPC, salgılama yolunun sonraki aşamasında GP1 ve GP2'ye bölünür. Bu bölünmeden hücresel proteaz SKI-1/S1P'nin sorumlu olduğu bildirilmiştir (York, Romanowski vd., 2004). Bölünmüş glikoproteinler, virüs tomurcuklandığında ve hücre zarından salındığında virüs zarfına dahil edilir (Şekil 3) (Bederka, Bonhomme vd., 2014).

Virüsün replüksiyon döngüsü içerisinde gerçekteşen viral gen ekspresyonu, hücre içinde çoğalması ve yeni virüs partiküllerinin üretilmesi için kritik bir adımdır. Viral genlerin transkribe edilmesi ve çevrilmesi ise, virüsün yaşam döngüsünün devam etmesi için gereklidir (Smither ve Bell-Kareem 2021).



Şekil 3: Lassa virüsünün yapısı, genom organizasyonu ve replikasyon stratejisi (Garry 2023)'dan uyarlanmıştır.

1.5. POTANSİYEL İLAÇ HEDEF BÖLGELERİ

LASV'nin nükleoproteini (NP), moleküler mekanizmaları bilinmeyen viral RNA sentezinde ve immün baskılanmasında kritik roller oynar (Hass, Gölnitz vd., 2004, Loureiro, D'Antuono vd., 2019). LASV NP'nin 1.80 Angstorm (Å) çözünürlüğünde kristal yapısı rapor edilmekte ve daha önce bildirilen viral NP'lerden farklı olarak N ve C alanların yapılarını ortaya koymaktadır (Green, Zhang vd., 2006).

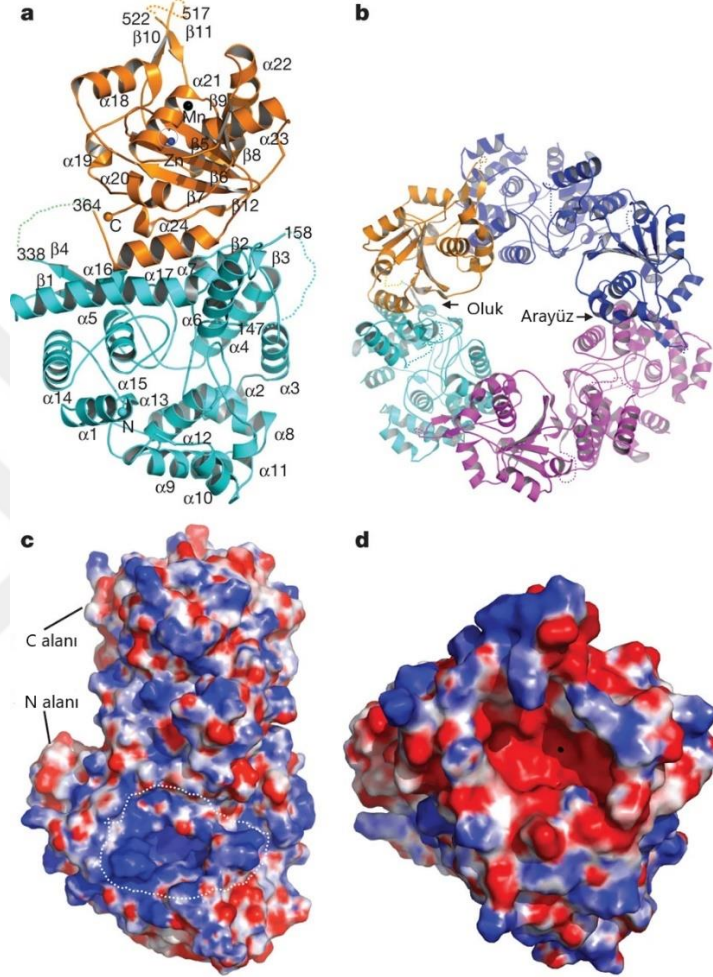
N alanı, viral RNA transkripsiyonu için gerekli olan m⁷GpppN kapak yapısını bağlamak için derin bir boşluğa sahip yeni bir yapıya katlanırken, C alanı, interferon (IFN) indüksiyon baskılamasında yer alan 3'-5' ekzoribonükleaz aktivitesini içerir. Bu bulgular aşı ve ilaç geliştirme için büyük bir potansiyel sunmaktadır (Buchmeier, de la Torre vd., 2007).

NP, viral genomik RNA'ları RNP komplekslerini kaplar ve hem RNA replikasyonu hem de transkripsiyon için gereklidir (Loureiro, D'Antuono vd., 2019). LASV, kesin mekanizması bilinmeyen viral transkripsiyonu başlatmak için primer olarak kullanmak üzere hücrel mRNA'ların kapak yapısını bağlar. LASV kapak bağlama mekanizması, sitoplazmik lokalizasyonları ve çok daha kısa 5' şablonsuz mRNA dizileri (Plotch, Bouloy vd., 1981) ile kanıtlandığı gibi benzersiz görünmektedir. Ölümcül LF vakaları da dahil olmak üzere şiddetli arenavirüs enfeksiyonları, kesin mekanizması bilinmeyen ancak NP'nin tip I IFN indüksiyonunu baskılama yeteneğini içerdiği düşünülen enfekte konaklarda genelleştirilmiş bağışıklık baskılanması ile ilişkilidir (Polyak, Zheng vd., 1995).

1.5.1. NP Yapısı

LASV NP'i, N- ve C-terminal alanlarından oluşur (Şekil 4a) (Qi, Lan vd., 2010). Büyük N alanı çoğunlukla alfa sarmallarından ve bobinlerden oluşurken, C alanı tipik bir sandviç mimarisinden oluşur (Şekil 4b). Yüzey işleme, sırasıyla başlık bağlama bölgesi ve 3' ile 5' ekzoribonükleaz aktif bölgesi olan N alanının altına yakın derin bir boşluk ve C alanının

tepesinde büyük bir boşluk ortaya koymaktadır (Şekil 4c-d). Trimerik formda, üç alt birim, üç katlı simetriye sahip halka şeklinde bir yapı oluşturmak için baştan sona düzenlenir (Pattis ve May 2020).



Şekil 4: a) LASV NP gösterimi. Turkuaz renginde N alanını ve turuncu renkte C alanını temsil etmektedir. Siyah küre Mn^{2+} , mavi küre Zn^{2+} gösterir. b) LASV NP trimerinin halka şeklindeki yapısı. İlk protein (Şekil 4a) turkuaz ve turuncu renklidir, ikinci protein mavi ve üçüncü protein eflatun renklidir. c) NP proteininin elektrostatik yüzey potansiyel haritası. Beyaz noktalı daire, kapak bağlama boşluğunun girişi. Mavi alan pozitif yüklü kalıntıları, kırmızı alan ise negatif yüklü kalıntıları temsil eder. d) 3'-5' ekzoribonükleaz boşluğunun elektrostatik yüzey potansiyel haritası (Qi, Lan vd., 2010)'dan uyarlanmıştır.

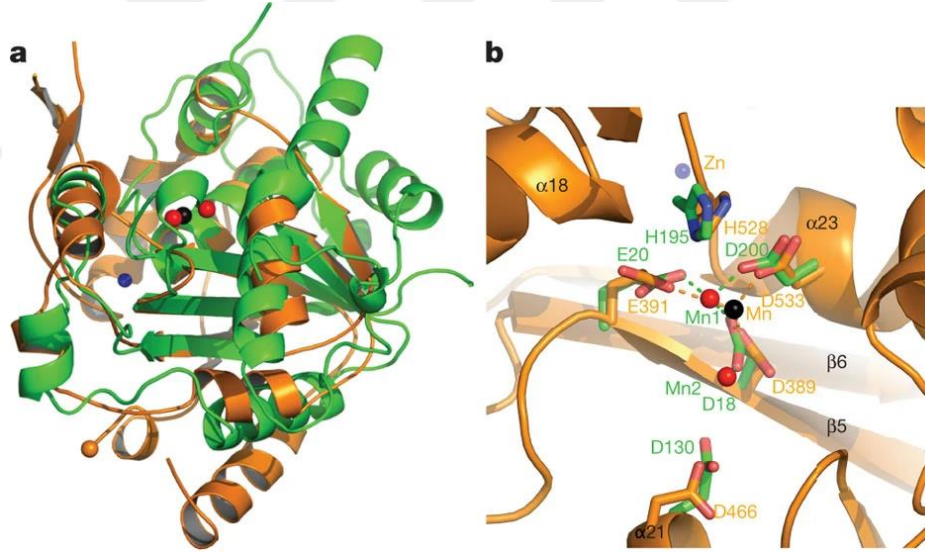
1.5.1.1. C Terminal Alanı

Yapılan çalışmalar, bakteri ve insanlarda (örneğin, insan TREX1), hepsi DEDD (DnaQ) süper ailesine (de Silva, Choudhury vd., 2007) ait olduğu bilinen birkaç 3' ila 5' ekzonükleaz / ekzoribonükleaz dahil olmak üzere NP'nin C alanına benzer birkaç yapı ortaya çıkarmıştır.

İnsan TREX1'in aktif bölgesi iki Mn^{2+} katyonu içerdiği bulunmuştur (Hastie, Kimberlin vd., 2011).

NP C alanı, TREX1'in Mn^{2+} katyonlarını koordine eden kısmıyla iyi bir şekilde üst üste gelir (Şekil 5a), NP'nin 5, 6, 7, 8 ve 9 sarmalı, TREX1'in merkezi tabakaları ile tamamen örtüşür. Varsayılan eksonükleaz katalitik tortuları D389, E391, D466, D533 ve H528, bilinen tüm arenavirüs NP proteinlerinde bulunur ve TREX1 aktif boşluğundaki ile aynı pozisyonlardadır (Şekil 5b). Yapısal kanıtlar birlikte değerlendirildiğinde, LASV NP'nin DEDD 3'-5' eksonükleaz süper ailesinin yeni bir üyesi olduğu görülmektedir (Qi, Lan vd., 2010).

Ek olarak, NP yapısında bir çinko iyonu tanımlanmıştır. Çinko bağlama bölgesi, C alanındaki 3'-5' eksonükleaz aktif bölgesine yakındır. C alanı yapısını stabilize etmek ve/veya substrat bağlanmasına ve eksonükleaz aktivitesinin özgülüne katkıda bulunmak için çinko bağlanmasının gerekli olduğunu varsayılmıştır (Hall 2005).



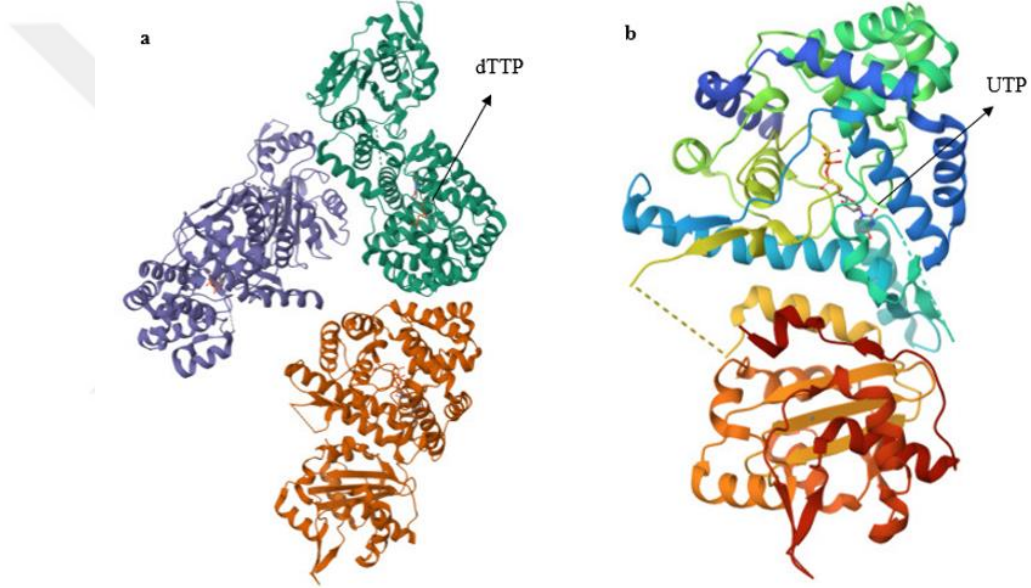
Şekil 5: LASV NP proteininin C alanı bir 3'-5' ekzoribonükleazdır. a) C bölgesinin (turuncu) insan TREX1 proteini (yeşil) ile üst üste binmesi, iki yapı arasında yüksek derecede benzerlik olduğunu ortaya koymaktadır. LASV NP'de siyah Mn^{2+} ve TREX1'de kırmızı, Zn^{2+} mavi. b) LASV NP ve TREX1'in eksonükleaz katalitik kalıntıları aynı konumlarda bulunur ve NP için turuncu ve TREX1 için yeşil ile gösterilir (Qi, Lan vd., 2010)'dan uyarlanmıştır.

Hem viral enfeksiyon kaynaklı hem de immün sistemi uyarıcı RNA kaynaklı IFN üretimini baskılamak için NP ekzoribonükleaz aktivitesinin gerekli olduğu kanıtlanmıştır. NP ribonükleaz aktivitesi, virüs kaynaklı IFN üretimini baskılamada, hücrel PRR'ler (kalıp

tanıma reseptörleri) tarafından tanınacak olan viral PAMP (Patojenle ilişkili moleküler model) RNA'larını çıkarabilme rolünü oynar (de Silva, Choudhury vd., 2007).

1.5.1.2. N Terminal Alanı

NP'nin N terminal alanının doğal ligandı dTTP (deoxythymidine triphosphate) olarak raporlanmıştır. Protein veri bankasından alınan yapı, elektron yoğunluğu dTTP için şekillendirilerek NP'nin yapısını dTTP ile kompleks haline getirilmiş ve görselleştirilmiştir (Şekil 6a) (Qi, Lan vd., 2010).



Şekil 6: a) NP ile dTTP kompleks hale getirilmiştir (PDB kodu:3MX2). b) UTP ile kompleks haline getirilmiş NP (PDB kodu:3MX5) gösterilmiştir. (Qi, Lan vd., 2010)'dan uyarlanmıştır.

dTTP'nin trifosfat grubu, korunan K253, R300, K309, R323 kalıntılarının yan zincirleriyle oluşturulan tuz bağlarıyla, UTP'nin bağlandığı şekilde (Şekil 6b) boşluğa bağlandığı gösterilmiştir (Qi, Lan vd., 2010).

Timidinin, boşluğun derin ucunda F176, W164, L172, M54, L120, L239 ve I241 artıklarından oluşan hidrofobik bir cep işgal ettiği görülmüştür. Bu dTTP bağlayıcı cebin, başlık yapısı m7GTP için bağlanma yeri olduğunu ve içindeki kalıntıların, başlık parçasına uyum sağlamak için konformasyonu değiştirmesi gerekebileceği önerilmiştir. NP'nin N alanının, kapak bağlayıcı proteinlerin hiçbirine yapısal olarak benzer olmamasına rağmen, hidrofobik timidin bağlayıcı cebi, kapak bağlama özelliklerini paylaştığı görülmüştür. Ayrıca, NP başlık bağlama

boşluğu, girişinin hidrofobik kalıntılar Y319, Y209, Y213, L265 ve asidik kalıntı E266'dan oluşan ve potansiyel olarak m7GpppN (Qi, Lan vd., 2010) için bağlanma bölgesi olarak işlev görebilen başka bir hidrofobik bölge içermesi bakımından benzersiz bir özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir, (N, G, C, U veya A) kapak yapısının ikinci tabanını temsil ettiği belirtilmiştir. Kapak bağlama boşluğuna giriş oval şekildedir ve 9 – 13 Å çapa sahiptir, bu da onu tek sarmallı mRNA'nın bağlanması için uygun olduğunu göstermektedir (Fechter ve Brownlee 2005). Derin boşluğun, başlık m7G, trifosfat ve en az bir nükleotid de dahil olmak üzere m7GpppN'nin tüm yapısını içerdiğini ve K236 ile S242 kalıntılarından oluşan bir halkanın, başlıklı şablon için bağlayıcı bir "geçit" olarak hizmet ettiği görülmüştür. Bu bağlanma özelliği, bilinen diğer başlık bağlayıcı proteinlerden farklı özelliktedir, çünkü yalnızca m7G kapakları sandviç arasında kilitlenir ve kalan moleküllerin açıkta kaldığı açıklanmıştır (Guilligay, Tarendeau vd., 2008). Viral RNA transkripsiyonunda kapak bağlama kalıntılarının rolü araştırılmış ve IFN baskılamasında NP fonksiyonunu etkilemediği kanıtlanmıştır (Qi, Lan vd., 2010).

LASV NP'nin tüm başlık yapısı m7GpppN'nin boşluk içine gömüldüğü benzersiz kapak bağlama özelliği sayesinde, Arenavirüslerin mekanizmaları hakkında da önemli çıkarımlar elde edilmiştir. NP, 5' kapak m7GpppN'ye bağlandığında ve onu koruduğunda, boşluğun dışındaki mRNA molekülünün geri kalanı, viral ve/veya konak ekzonükleaz aracılı bozulmaya ve/veya endonükleaz aracılı bölünmeye duyarlı olabileceği tahmin edilmiştir. Bu, arenavirüs mRNA'larının nispeten kısa (1-4 nt) 5' şablonsuz dizilerini (Meyer ve Southern 1993, Buchmeier 2007) açıklamaya yardımcı olabilir. Son araştırmalar, LASV NP'nin, N terminalinde kapağa bağlı viral RNA transkripsiyonu için gerekli olan bir endonükleaz alanı içerdiğini ileri sürmektedir (Lelke, Brunotte vd., 2010, Morin, Coutard vd., 2010).

2. GENEL KISIMLAR

Yenilikçi ilaç geliştirme aşamaları zaman ve bütçe olarak oldukça maliyetlidir. Yeni bir etken maddenin ilaç olarak geniş insan kitlelerine ulaşması, faz çalışmaları ve çeşitli onay aşamalarından dolayı 10 yıllar almaktadır. Bu nedenle yeni ortaya çıkan hastalıklarda veya acil ilaç tedavisi bulunması gereken hastalıklarda, FDA onaylı ilaçların yeniden konumlandırma yaklaşımı bu süreçleri aşmamıza olanak sağlamaktadır. *In siliko* ve *in vitro* deneylerinde yeni hastalıklara karşı etkinliği belirlenen FDA onaylı ilaçlarla direkt olarak faz 2 ve 3 çalışmaları başlatılabilmektedir. İlaç tasarımı *in siliko* analizler biyolojik moleküllerin fizikokimyasal özelliklerini temel alarak ligand (ilaç) ve protein arasındaki etkileşimi modellemeye ve yüksek kapasiteli bilgisayarlar yardımıyla bağlanma enerjilerini hesaplamaya yardım eder. Bu nedenle *in siliko* analizler, *in vitro* ve sonrasındaki analizler için rasyonel bir başlangıç noktası oluşturmaktadır. *In siliko* analizlerin çok çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan iki tanesi yerleştirme ve moleküler dinamik (MD) simülasyonlarıdır. Bu iki metot ile Lassa virüsü için hedeflenen aktif bölgelere virüsün yaşam döngüsünü engelleyebilecek potansiyeldeki ilaçlar modellenilebilir.

2.1. ÇALIŞMANIN AMACI

Çalışmada amacımız, Lassa virüsünün yaşam döngüsünde kritik öneme sahip nükleoprotein (NP) hedefine ilaç yeniden konumlandırma yaklaşımıyla *in siliko* yöntemlerle yaklaşık 3500 FDA onaylı ilacın aktif moleküllerinin bağlanma ilgisinin belirlenmesidir. NP'nin aktivitesi için hem N hem de C ucu kritik öneme sahiptir (Qi, Lan vd., 2010). Bu amaçla temel olarak hem N bölgesine hem de C bölgesine ayrı ayrı yerleştirme ve moleküler dinamik (MD) simülasyon yöntemleri kullanılmıştır. Yerleştirme simülasyonu analizinden iyi bağlanma afinitesine sahip ilaçlardan yan etkisi olmayan ve yaygın kullanımda olanlar belirlenerek bu ilaç-protein kompleksinin detaylı MD simülasyonu yapılmıştır. Simülasyon süresince aktif bölgede kalan moleküllerin ilgili bölgeye kararlı bir şekilde bağlandığı sonucuna ulaşılmıştır. Temel olarak reseptör-ligand kompleksinin moleküler dinamik simülasyonlarına dayanan Poisson-Boltzmann veya Generalized Born ve Surface Area Solvation (MM/PBSA ve MM/GBSA) yöntemleriyle birleştirilen moleküler mekanik enerjiler, ligandların biyolojik makromoleküllere bağlanmasının serbest enerjisini tahmin etmek için kullanılan yaklaşımlardır (Genheden ve Ryde 2015). Kararlı bağlanan moleküllerin MM/GBSA metoduyla bağlanma

enerjileri hesaplanmıştır, etkileştiği amino asitler ve bu amino asitlerin bağlanma enerjilerine katkıları *in siliko* alanin tarama metodu ile belirlenmiştir. Çalışmada N-terminal bölgesi için kendi doğal ligandı kontrol olarak kullanılmıştır. Bu kontrol kadar ya da daha güçlü bağlanan moleküllerin LASV inhibitörü olabileceği n görülmektedir. C-terminal için doğal bir ligand olmadığı için, bu çalışmada, en iyi bağlanma afinitesine sahip ilaçlar (yaygın kullanımda ve yan etkisi olmayan) rapor edilmiştir. Böylece *in vitro* alışmalarda denemek için ilaç sayısı rasyonel bir şekilde azaltılmıştır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

Yerleştirme simülasyonu analizlerinde genellikle hedef protein sabit bir konformasyonda tutulurken hedef bölgesine ilaçların esnek bir şekilde bağlanmasına izin verilir ve o poz için ilacın bağlanma konformasyonu ile beraber, bağlanma afinitesi veya skoru da hesaplanır (Fan, Fu vd., 2019). Bu metot hesap gücü ve süresi olarak oldukça ekonomiktir ve kısa zaman içinde binlerce molekül analizine olanak sağlar. Diğer yandan biyolojik sistemler oldukça dinamik sistemlerdir ve proteinin sadece bir konformasyonu üzerinden yapılan yerleştirme simülasyonu analizi bazen yanlış pozitiflere sebep olmaktadır. Şöyle ki analizde kullanılan konformasyonda bazı amino asitler moleküllerin bağlanması için uygun pozisyon almış olabilirken, fizyolojik şartlarda dinamik olarak davranan proteinlerde bu amino asitler farklı konformasyonlar almakta ve yerleştirme simülasyonu analizinde hesaplanan bağlanma şekli korunamamaktadır. Bu seçeneği ortadan kaldırmak ve yerleştirme simülasyon analizlerini doğrulamak için MD simülasyonu yöntemi kullanılmaktadır.

MD simülasyonlarından ve MM/GBSA analizlerinde elde edilen bütün bu detaylı veriler bize kritik bilgiler vermektedir:

- Molekül-protein etkileşiminin kararlılığı,
- Moleküllerin protein üzerinde kararlı olarak etkileştiği amino asitlerin belirlenmesi,
- Molekülle kararlı olarak etkileşen amino asitlerin bağlanma enerjisine katkısı,
- Moleküllerin proteinle etkileştiği ortak bölgelerin belirlenmesi,
- Yenilikçi ilaç tasarımı için molekül etken fragmanlarının ve kritik amino asitlerin belirlenmesi (Gul, Aydın vd., 2020, Gul 2021).

NP'nin C ve N terminalleri, NP'nin aktivitesi için önemli olan iki ayrı enzimatik reaksiyonda yer almaktadır (Green, Zhang vd., 2006). N-terminalinin doğal ligandı dTTP veya UTP olarak rapor edilmişken C-terminal için herhangi bir doğal ligand raporlanmamıştır (Qi, Lan vd., 2010). Bu nedenle çalışmada N-terminal için UTP veya dTTP bütün analizlerde kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrolden daha iyi bağlanma afinitesine sahip ilaçlar; C-terminal için ise en iyi bağlanma afinitesine sahip ilaçlar potansiyel LASV inhibitörü olarak raporlanmıştır.

Çalışmada sırayla şu aşamalar gerçekleştirilmiştir:

- i. Raporlanan kristallerde görülemeyen amino asitleri tamamlamak için protein veri bankasındaki NP (PDB:3MX2) yapısı kullanılarak homoloji modelleme yöntemi ile protein modellenmiştir.
- ii. Modellenen NP'nin C ve N uçlarındaki aktif bölgeler hedef alınarak iki bölge için FDA onaylı ilaçlar yerleştirme simülasyonu yöntemiyle taranmıştır. Hedef alınan bölgeler için kullanılan ızgara kutusu C alanı için $14 \times 18 \times 16 \text{ \AA}^3$ olarak, N alanı için ise $18 \times 20 \times 18 \text{ \AA}^3$ olarak belirlenmiştir.
- iii. Yan etkisi az ve yaygın kullanımda olan ve en iyi bağlanma afinitesine sahip ilaçlarda atom sayısı başına bağlanma enerjisi hesaplanarak en etkin şekilde bağlanan ilaçlar belirlenmiştir ve diğer analizler bu ilaçlar üzerinde yapılmıştır.
- iv. En etkin bağlanan ilaçlardan 9 ilaç-protein kompleksi ve dTTP-protein kompleksi 100 ns boyunca MD simülasyonu ile koşulmuştur. MD simülasyonlarında moleküllerin bağlanma bölgesinden çıkması durumunda bağlanma zayıf olarak değerlendirilmiştir.
- v. Simülasyon boyunca bağlanma bölgesinde kalan ilaçların proteinle bağlanma enerjisi MM/GBSA metoduyla belirlendikten sonra ilaçla etkileşen amino asitler tespit edilmiştir.
- vi. Etkileşen amino asitlerin bağlanma enerjisine katkısı *in siliko* alanin mutasyonu yapıp tekrar bağlanma enerjisi hesaplanarak belirlenmiştir.

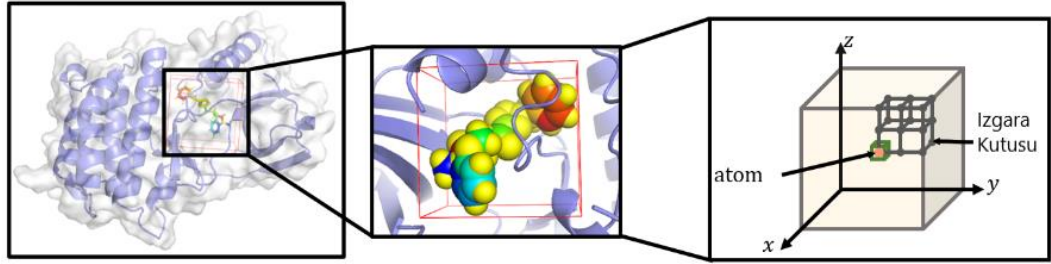
Çalışma sonunda LASV NP aktivitesini N ve C uçlarından inhibe etme potansiyeli olan ilaçlar belirlenmiştir. Bu ilaçlar potansiyel LASV inhibitör özelliğine sahip ileriki *in vitro* deneyler için başlangıç molekülleri olarak rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada ilaçların bağlanması için önemli amino asitler belirlenerek yenilikçi ilaç tasarım çalışmaları için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

3.1. YERLEŞTİRME SİMÜLASYONU METODU

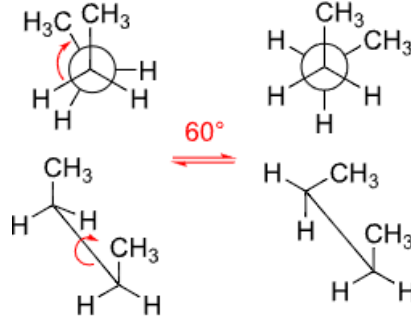
Moleküler yerleştirme, makromoleküllerin veya daha sık olarak bir makromolekülün (reseptör) ve küçük bir molekülün (ligand) kovalent olmayan bağlanmasını verimli bir şekilde tahmin etmeye çalışan bir hesaplama prosedürüdür. Amaç, bağlı konformasyonları ve bağlanma

afinitesini tahmin etmektir. Küçük moleküllerin proteinlere bağlanmasının tahmini, daha fazla ilaç geliştirmeye yönelik ipuçları elde etmek amacıyla ilaç benzeri moleküllerin sanal ilaç kütüphanelerini taramak için kullanıldığından pratik öneme sahiptir. Çalışma süresini önemli ölçüde kısaltmak için sistemdeki birden fazla CPU çekirdeğinden yararlanır. AutoDock Tools, MGL Tools yazılım paketi içinde, özellikle AutoDock veya Vina için girdi (PDBQT dosyaları) oluşturmaya yönelik bir modüldür (Morris, Huey vd., 2009). Sonuçları görüntülemek için de kullanılabilir. AutoDock Vina, en yaygın kullanılan açık kaynaklı yerleştirme yazılımlarından biridir (Trott ve Olson 2010). Basit bir kullanıma ve hızlı gradyan optimizasyonlu konformasyonel aramaya dayanan bir hesaplamalı yerleştirme programıdır.

AutoDock Vina programı ile proteinin aktif aminoasitlerini kapsayacak şekilde ızgara kutusu oluşturulur. Bağlanma cebi denilen bölge ligandın aktif aminoasitler ile etkileşim içerisinde iken dönerek bağ oluşturmalarını ve bu şekilde konformasyon geliştirmesini sağlar. Ligand en iyi bağlanma pozunu bulduktan sonra bağlanma afinitesi hesaplanır. Şekil 7’de ızgara kutusunun koordinatlarının seçilimi gösterilmiştir.



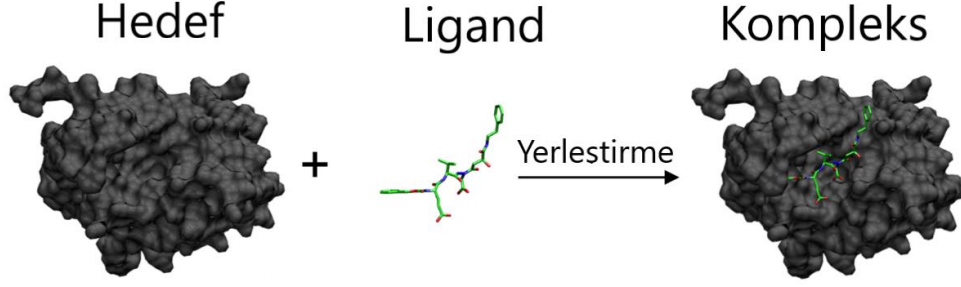
Şekil 7:AutoDock Vina programında bağlanma bölgesi için ızgara kutusu. (Tang, Ding vd., 2023)’den uyarlanmıştır.



Şekil 8: Bir konformasyonu diğerine dönüştürmek için tekli bütan bağı etrafında dönme. Üstte: Newman projeksiyonu; aşağıda: Uzaysal yönelimin tasviri gösterilmiştir (Commons 2023).

Konformasyon geliştirme ligandın döneabilen bağları ile gerçekleşmektedir. Şekil 7’de gösterildiği gibi spesifik bölge seçilir. Yerleştirilen moleküllerin yapıları ve bağlanma bölgesi

de dahil olmak üzere spesifik bölge seçimi yapıldıktan sonra ligand farklı konformasyonlar gerçekleştirir, ardından en iyi bağlanma pozunun bağlanma afinitesi hesaplanır ve AutoDock Vina programı ile görüntülenir (Şekil 9).



Şekil 9: Yerleştirme simülasyonunu çalışma prensibi (Commons 2023)'den uyarlanarak gösterilmiştir. Stabil kompleksin proteini siyah renk ile ligandı yeşil renk ile temsil edilmiştir. AutoDock Vina ile bağlanma afiniteleri Denklem 1'e göre hesaplanır (Trott ve Olson 2010):

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{desolv} + \Delta G_{tors} \quad (1)$$

ΔG_{vdW} : Lennard – Jones Potansiyeli

ΔG_{elec} : Solmajer – dielektrik ile Coulombic

ΔG_{hbond} : Goodford Yönlülüğü ile Potansiyel

ΔG_{desolv} : Stouten Çift Yönlü Atom Çözme Parametreleri

ΔG_{tors} : Dönebilen Bağ Sayısı

Çalışmada öncelikle, SWISS-MODEL sunucusu kullanılarak tam dizi LASV NP yapısı, yüksek çözünürlüklü NP yapısı (PDB ID: 3MX2) kullanarak homoloji modellemesi yapılmıştır (Waterhouse, Bertoni vd., 2018). AutoDock Tools (ADT) aracılığıyla polar hidrojenler eklenmiş ve polar olmayan hidrojenler bağlı atomlarla birleştirilmiştir ve yerleştirme simülasyonlarını çalıştırmak için atom yükleri (Gasteiger) tanımlanmıştır (Huey, Morris vd., 2012). İlaçların yapıları, FDA onaylı ilaçların ZINC15 veritabanı kitaplığından indirilmiştir (Gul, Ozcan vd., 2021). Bu çalışmada kullanılan ilaç seti (3948 molekül), ABD Çevre Koruma Ajansı'nın (EPA) dağıtılmış yapı aranabilir toksisite (DSSTox) veri tabanından alınmıştır. 3948 molekül ve LASV NP inhibitörü (dTTP), ADT programı kullanılarak yerleştirme için

hazırlanmıştır. LASV NP inhibitör bağlanma cebi, N alanı ve C alanı için ayrı hedeflenmiştir. C alanı inhibitör bağlanma bölgesi Asp389, Glu391, Asp466 ve His528 amino asit kalıntıları merkezine; N alanı için inhibitör bağlanma cebi ise, Trp164, Phe176, Lys253, Glu266 amino asit kalıntılarının merkezine yerleştirildiği yerleştirme simülasyonları için hedeflenmiştir (Qi, Lan vd., 2010). Yerleştirme için AutoDock Vina (v. 1.1.2.) kullanılmıştır (Seeliger ve de Groot 2010).

3.2. MD SİMÜLASYONLARI

Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları biyolojik makromoleküllerin veya ilaç gibi küçük moleküllerin zamana bağlı davranışlarını, 3 boyutlu olarak *in silico* ortamda incelenmesini sağlamaktadır. MD simülasyonları sayesinde bu moleküllerin birbirleri ile veya içinde bulundukları biyomoleküler sistem ile zamana bağlı davranışları hesaplanabilir (Hansson, Oostenbrink vd., 2002). AutoDock Vina programı kullanarak ligandın proteine bağlanma afinitesi hesaplanabilirken, fizyolojik şartlarda molekül kararlı olarak bağlanma halini koruyamayıp proteinden ayrılabilir. Bu nedenle molekül-protein kompleksi MD simülasyonu koşarak molekülün kararlı olarak bağlanıp bağlanmadığı incelenmiştir.

MD simülasyonlarında CHARMM36m kuvvet alanı ve NAMD programı kullanılmıştır (Phillips, Hardy vd., 2020). İlaçların parametrelerini oluşturmak için CHARMM-GUI sunucusu kullanılmıştır (Jo, Kim vd., 2008). VMD programı kompleksleri simülasyonu hazırlamada ve simülasyon sonrası sistemi analizde ve görüntülenmede için kullanılmıştır (Humphrey, Dalke vd., 1996).

VMD yardımıyla, LASV NP'nin en dıştaki atomdan 15Å uzaklıkta olacak şekilde TIP3P su molekülleri kullanılarak çözülmüştür. Çözülmüş protein nötrleştirilerek, fizyolojik koşulları taklit etmek için sodyum klorür tuzu (Na^+ ve Cl^-) ile 150 mM nihai konsantrasyona iyonlaştırılmıştır (Gul ve Kavakli 2022). 20,000 adım enerji minimizasyonu (eşlenik gradyan yoluyla) gerçekleştirilmiştir (Karplus ve Petsko 1990). Minimize edilmiş sistem kademeli olarak ısıtılmış ve ardından protein üzerindeki kısıtlamalarla 1.4 ns (NPT topluluğu) için dengelenmiştir (Rappe ve Goddard III 1991). 2 kcal/mol/Å²'den başlayan kısıtlamalar, her 0,4 ns dengeleme çalışması için 0,5 kcal/mol/Å² azaltılmıştır. Dengelenmiş her ilaç nükleoprotein kompleksi için 100 ns'lik üretim simülasyonu, 310K ve 1atm basınçta 2 fs zaman adımı kullanılarak çalıştırılmıştır (Gul ve Kavakli 2022). Langevin termostatu ve Langevin barostat,

sırasıyla sıcaklık ve basıncı korumakta kullanılmıştır. Sisteme etki eden kuvveti hesaplamak için van der Waals (12Å cut-off) ve uzun menzilli elektrostatik etkileşimler (partikül ağırlı Ewald aracılığıyla) hesaplanmıştır (Gul, Rahim vd., 2021).

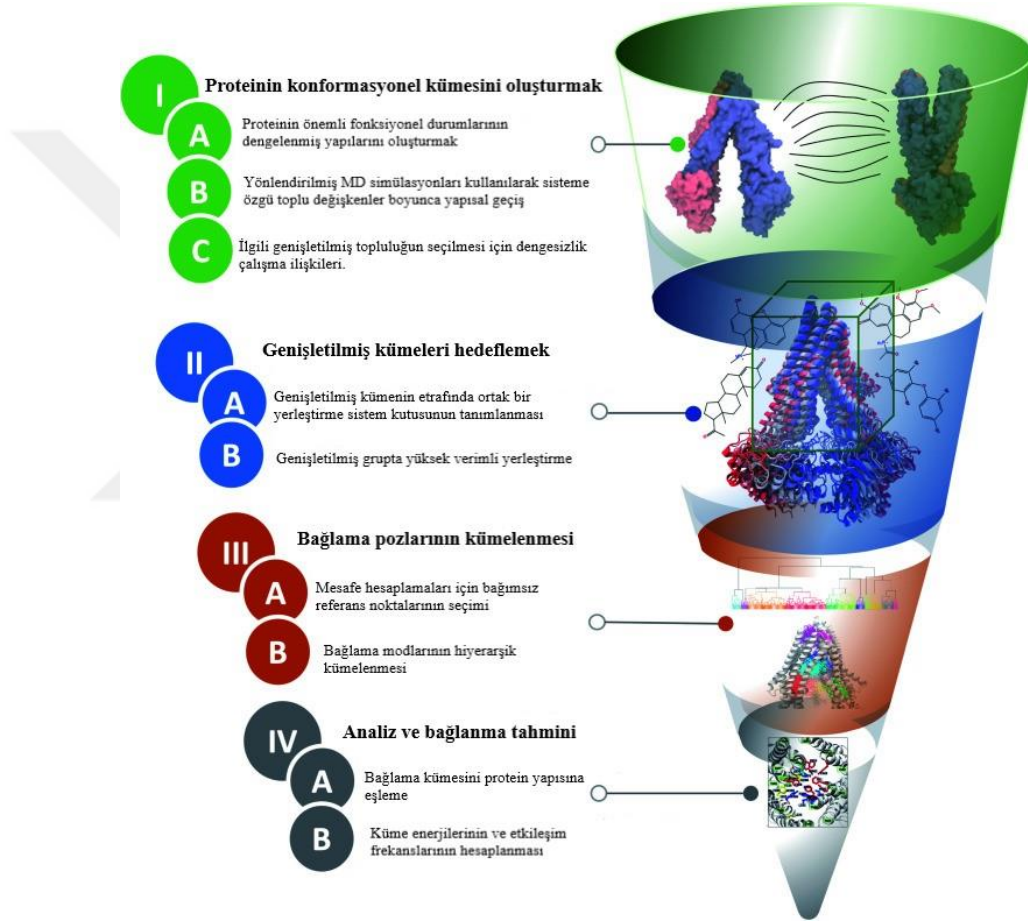
Protein-ilaç etkileşimlerinin analizleri, şu adımlar izlenerek yapılmıştır:

1. Her bir ilaç-protein simülasyonunun MD yörüngesi, ilacın konumunu incelemek için görselleştirilmiştir. Ligandların aktif bölgeden çıktığı durumlarda ligand elemeleri yapılmıştır.
2. İlaç-protein etkileşiminin 100 ns süreyle sürdürüldüğü simülasyonlar için, sistemin başarılı bir şekilde dengelendiğini doğrulamak için Cα atomlarının kök ortalama kare sapması (RMSD) hesaplanmıştır.
3. MD simülasyonundan sonra proteinin ve ligandın simülasyon boyunca topluluk temsili yapısı elde edilmiştir ve en kalabalık topluluğun temsili yapısı 2 boyutlu ve 3 boyutlu olarak görselleştirilmiştir. Küme analizi ile en kalabalık topluluk temsili yapısını bulmak ve görüntülemek için CHIMERA programı kullanılmıştır (Pettersen, Goddard vd., 2004).
4. 2 boyutlu protein-ligand etkileşim diyagramlarının oluşturulması için LigPlot uygulamasından yararlanılmıştır (Laskowski ve Swindells 2011).
5. Bağlanma kalıntıları belirlemek için ilaç ve yakındaki amino asit kalıntıları arasındaki temas sıklığı zaman-çizelgesi analizi ile incelenmiştir.
6. İlaçların bağlanma serbest enerjisi (BFE), MM/GBSA yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.
7. Temas sıklığı yüksek olan amino asit kalıntıları, ilaçların BFE'sine olan katkılarını hesaplamak için alanin mutasyonuna uğratılmıştır.

Tüm MD analizleri yapılmış ve sırasıyla VMD ve Pymol kullanılarak protein ve ligandlar diğer analizler için hazırlanmıştır (Humphrey, Dalke vd., 1996, DeLano 2009). RMSD yörünge aracı ve VMD'deki zaman çizelgesi işlevi, sırasıyla proteinin RMSD'si ve ilaç ile protein arasındaki temas frekansları hesaplanmıştır. RMSD analizi Denklem 2 esasına göre hesaplanmıştır (Humphrey, Dalke vd., 1996):

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{atoms}} ((r_i(t_1) - r_i(t_2))^2)}{N_{atoms}}} \quad (2)$$

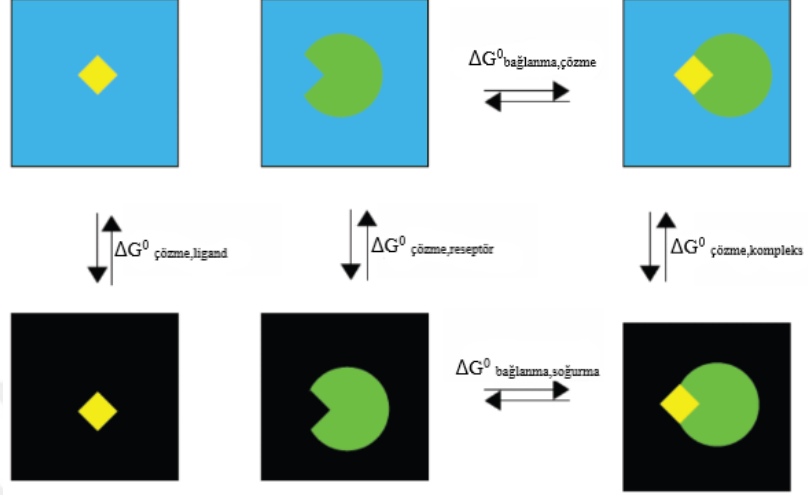
Küme analizi için CHIMERA porgramı kullanılmıştır (Pettersen, 2004). Topluluk kümesi ile, konformasyonel bir topluluğun (her üyenin aynı atomları içerdiği) üyeleri kümelenmiştir ve küme temsilcileri belirlenmiştir. Küme analizi hesaplanması adımları bir şema ile gösterilmiştir:



Şekil 10: Küme analizi şeması (Kapoor, 2022)’dan uyarlanmıştır.

MM/GBSA ve alanin tarama hesaplamaları için AmberTools20'nin MMPBSA.py betiği kullanılmıştır (Case, Cheatham III vd., 2005). Her hesaplama için 100 ns simülasyonlarından 1.000 kare kullanılmıştır. MM-GBSA yönteminin genel amacı, çoğunlukla iki solvatlanmış molekülün bağlı ve bağlanmamış durumunu temsil eden iki durum arasındaki serbest enerji farkını hesaplamak veya alternatif olarak iki farklı solvatlanmış molekülün serbest enerjisini karşılaştırmaktır, fakat solvatlanmış durumların simülasyonunda hesaplama çok fazla zaman

alır. Dolayısıyla daha etkili bir yöntem olarak, hesaplamayı termodinamik döngüye göre hesaplanmaktadır (Şekil 10).



Şekil 11: MM/GBSA hesaplaması termodinamik döngüye göre yapılmaktadır. (Hati ve Bhattacharyya 2020)’den uyarlanmıştır.

İlaç ve protein arasındaki bağlanma afinitesi Denklem 3’e göre hesaplanır (Macke, Svrcek-Seiler vd., 2010):

$$\Delta G_{bağlanma} = G_{kompleks} - G_{reseptör} - G_{ligand} \quad (3)$$

$G_{kompleks}$: Protein-ligand kompleksinin enerjisi

$G_{reseptör}$: Sadece proteinin enerjisi

G_{ligand} : Bağlanmamış ligandın enerjisi

4. BULGULAR

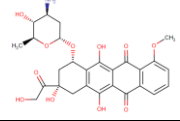
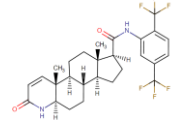
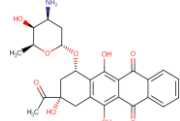
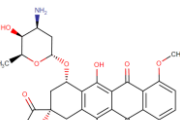
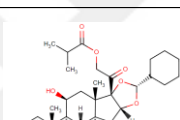
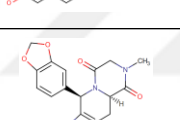
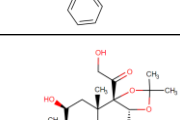
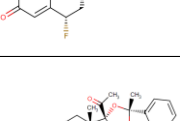
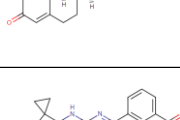
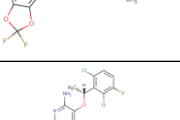
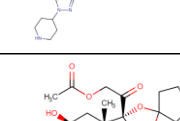
Bir antiviral ilaç keşfetmek için viral replikasyon enzimlerinden virüs girişini kolaylaştıran konakçı proteinlere ve virüs salınımından sorumlu proteinlere kadar çeşitli hedefler mevcuttur. Hedef olarak LASV'nin viral RNA sentezinde, transkripsiyonda ve immün baskılamada önemli rolü olduğu belirlenen NP alınmıştır. Yapılan çalışmalarda NP'nin N ve C terminal alanlarındaki aktif bölgeler tanımlanmıştır; N terminal alanı viral RNA transkripsiyonu için kritik bir öneme sahipken, C terminal alanı ise immün baskılamada kritik bir öneme sahiptir (Qi, Lan vd., 2010).

İlaç yeniden konumlandırma yöntemi kullanarak NP'ninin N ve C terminal alanlarının bağlanma cebine afinitesi yüksek olan ilaçlar, LASV'nin hücrede transkripsiyon ve immün baskılamasını bloke ederek tedavi amaçlı kullanılabilir. Çalışmada *in silico* yöntemlerinden moleküler yerleştirme ve MD Simülasyonları kullanılmıştır.

4.1. YERLEŞTİRME SİMÜLASYONU

LASV NP yapısı metot kısmında açıklandığı şekilde elde edilmiştir. NP'nin C terminal ve N terminal alanlarındaki aktif bölgeler hedef alınarak iki bölge için FDA onaylı 3948 molekül yerleştirme simülasyonu yöntemiyle taranmıştır (Seeliger ve de Groot 2010). C terminal alanı için bağlanma cebi Asp289, Glu391, Asp466 ve His528 amino asitleri kalıntılarını kapsayacak şekilde merkez olarak alınmıştır. C alanı için doğal bir inhibitör belirtilmemiş olduğu için en iyi bağlanma afiniteleri raporlanmıştır. C alanı için yerleştirme simülasyonu sonuçları Tablo 1'de listelenmiştir.

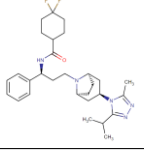
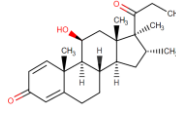
Tablo 1: C alanı için yerleştirme simülasyonu sonucu 25 molekül listelenmiştir.

ZINC tanımları/İlaç isimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC000003938704 / Epirubicin		-9,5	Primer meme kanseri nedeniyle cerrahi rezeksiyon yapılan hastalarda koltuk altı lenf düğümü metastazlarının tedavisinde yardımcı madde olarak kullanılır.
ZINC000003932831 / Dutasteride		-9,3	Yetişkin erkeklerde semptomatik iyi huylu prostat hiperplazisinin (BPH) 5-alfa redüktaz inhibitörü olarak kullanılır.
ZINC000003920266 / Idarubicin		-9	Yetişkinlerde akut miyeloid lösemi (AML) tedavisi için kullanılan bir antrasiklin antineoplastik ajandır.
ZINC000003917708 / Daunorubicin		-8,9	Lenfositik olmayan lösemi ve akut lenfositik lösemisinin remisyonunu indüklemek için kullanılan bir antrasiklin aminoglikozittir.
ZINC000003915154 / Ciclesonide		-8,8	Yetişkinlerde ve ergenlerde mevsimsel ve sürekli alerjik rinit ile ilişkili nazal semptomların semptomatik olarak giderilmesinde kullanılan bir glukokortikoiddir.
ZINC000003993855 / Tadalafil		-8,5	Eretil disfonksiyon, iyi huylu prostat hiperplazisi ve pulmoner arter hipertansiyonunu tedavi etmek için kullanılan bir fosfodiesteraz 5 inhibitörüdür.
ZINC000004097308 / Flurandrenolide		-8,5	Kortikosteroide duyarlı dermatozların tedavisinde kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC000004172334 / Algestone Acetophenide		-8,5	Enjekte edilebilir bir kontraseptif olarak östrojen ile kombinasyon halinde gösterilen bir progestindir.
ZINC0000064033452 / Lumacaftor		-8,4	CFTR genindeki F508del mutasyonu için homozigot olan hastalarda kistik fibrozis tedavisinde ivacaftor ile kombinasyon halinde kullanılan bir protein şaperondur.
ZINC0000035902489 / Crizotinib		-8,4	Tümörlerin anaplastik lenfoma kinaz (ALK) veya ROS1 pozitif olduğunun doğrulandığı metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanserini (NSCLC) tedavi etmek için kullanılan bir reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür.
ZINC000003977777 / Amcinonide		-8,4	Çeşitli dermatozlara bağlı inflamasyon ve kaşıntı tedavisinde kullanılan topikal bir kortikosteroiddir.

Tablo 1'in devamı listelenmiştir.

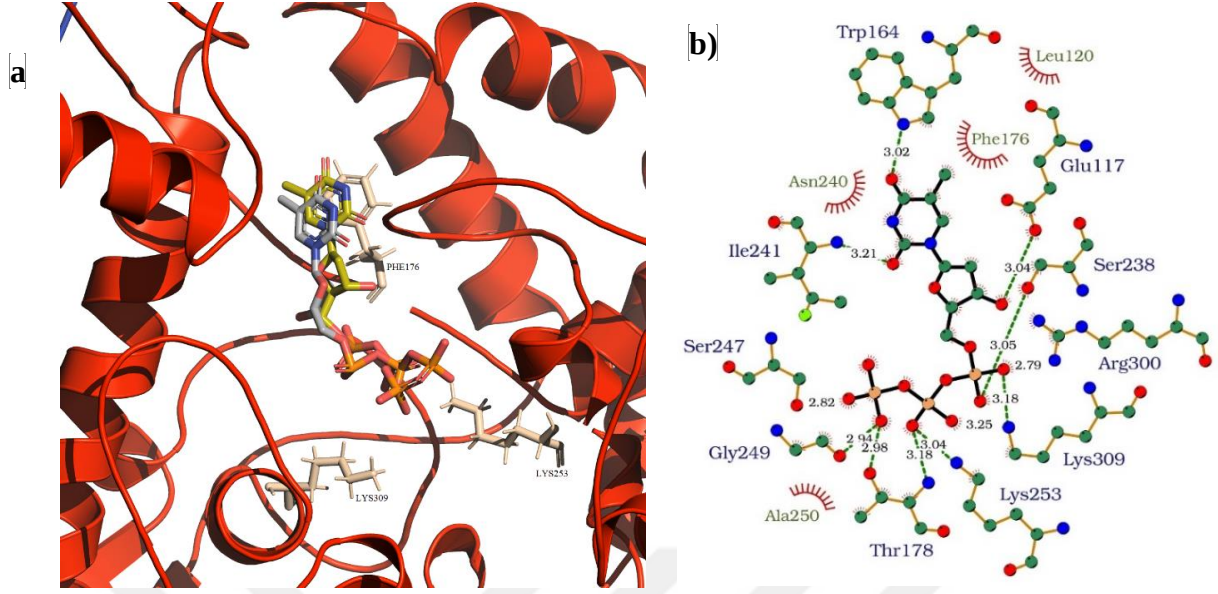
ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlama Afinitesi	Özellikler
ZINC000021981454 / Clocortolone		-8,3	Kafa derisinin inflamatuvar ve kaşıntılı dermatozlarını tedavi etmek için kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC000006716957 / Nilotinib		-8,3	Philadelphia kromozomu pozitif olan Kronik Miyeloid Lösemisinin (KML) kronik faz tedavisinde ve imatinib içeren tedaviye dirençli KML tedavisinde kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC000003881958 / Danazol		-8,2	Endometriozis tedavisinde ve iyi huylu fibrokistik memelerle ilişkili şiddetli ağrı ve hassasiyetin semptomatik tedavisinde kullanılan sentetik bir steroid ve hipofiz gonadotropin inhibitörüdür.
ZINC000003875560 / Methylprednisolone		-8,2	Çeşitli organ sistemleri, endokrin bozuklukları ve neoplastik hastalıklarda inflamasyonu veya bağışıklık reaksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC00000538312 / Risperidone		-8,2	Şizofreni, bipolar mani, psikoz gibi bir dizi zihinsel sağlık bozukluğunu tedavi etmek için veya şiddetli depresyona yardımcı olarak kullanılan ikinci nesil bir antipsikotik ilaçtır.
ZINC000004097305 / Flunisolide		-8,2	Astımın idame tedavisinde profilaktik tedavi olarak kullanılan inhale bir kortikosteroiddir.
ZINC000001481956 / Paliperidone		-8,2	Şizofreni ve diğer şizofreni veya şizofreni benzeri bozuklukların tedavisinde kullanılan atipik bir antipsikotiktir.
ZINC000004097286 / Budesonide		-8,2	Crohn hastalığı, astım, KOAH, saman nezlesi ve alerjiler ile ülsertif kolit tedavisinde kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC000003977981 / Fluocinolone acetonide		-8,2	Cilt rahatsızlıklarını, ekzematöz otitis ekzematöz, diyabetik maküla üdemini ve görünür arka segmentinin enfeksiyöz olmayan üveitini tedavi etmek için kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC000001530788 / Cromoglicic acid		-8,2	Astım, göz ve burundaki alerjik reaksiyonların yanı sıra sıra mast hücreleri reaksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır.
ZINC000003977978 / Fluocinonide		-8,2	Bir dizi inflamatuvar cilt rahatsızlığı için topikal olarak yaygın olarak kullanılan yüksek etkili bir kortikosteroiddir.
ZINC000100003902 / Maraviroc		-8,2	CCR5-tropik HIV-1 enfeksiyonunun tedavi etmek için diğer antiretroviral ilaçlarla birlikte kullanılan bir CCR5 yardımcı reseptör antagonistedir.

Tablo 1'in devamı listelenmiştir.

ZINC000100003902 / Maraviroc		-8,2	CCR5-tropik HIV-1 enfeksiyonunu tedavi etmek için diğer antiretroviral ilaçlarla birlikte kullanılan bir CCR5 yardımcı reseptör antagonistidir.
ZINC000003945984 / Rimexolone		-8,1	Göz iltihabını tedavi etmek için kullanılan bir glukokortikoiddir.

Yerleştirme simülasyonları sırasında, reseptör (NP) sabit bir gövde olarak ele alınmıştır ve ilaçların proteinin aktif bölgelerine farklı konformasyonlar ile bağlanması sağlanmıştır. NP'nin N terminal alanının doğal inhibitörü olan dTTP (Qi, Lan vd., 2010), ilaçların NP'e karşı bağlanma afinitelerini değerlendirmek için kontrol olarak NP'nin N terminal alanına yerleştirilmiştir. N terminal alanı için doğal inhibitörü olan dTTP'nin bağlanma cebi, Trp164, Phe176, Lys253, Glu266 amino asit kalıntılarından merkezi yerleştirme simülasyonları için aktif bölge merkezi olarak hedeflenmiştir. AutoDock Vina programı, daha önce açıklandığı gibi bağlanma afinitesini hesaplamak ve moleküllerin hedef cebe bağlanma modunu tahmin etmek için kullanılmıştır (Huey, Morris vd., 2012).

Kontrol ligandı olan dTTP'nin Vina bağlanma afinitesi -10.3 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Ortaya çıkan bağlanma modunun kristal yapıda tanımlanana çok benzer olduğu görülmüştür (RMSD'si 1.8Å) (Şekil 11a). Protein data bank'tan alınan 3MX2 yapısındaki dTTP ile yerleştirme simülasyonu yapılan dTTP molekülü Pymol'de hizalanıp görselleştirilmiştir (Seeliger ve de Groot 2010). dTTP'nin sabitlenmiş konformasyonu, kristal yapısında (PDB: 3MX2) gözlemlenene benzer şekilde çeşitli etkileşimlere girmiştir. Etkileşimleri daha iyi analiz edebilmek için LigPlot'ta 2 boyutlu diyagram çizilmiştir (Şekil 11b).

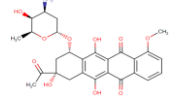
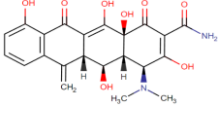
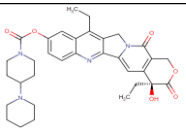
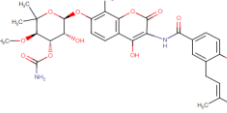
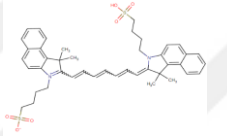
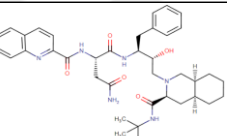
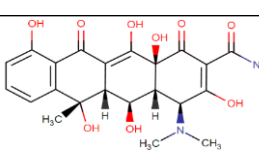
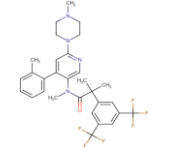
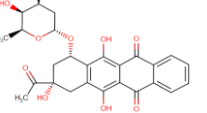
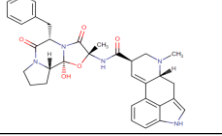
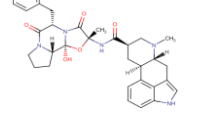


Şekil 12: a) Kontrol simülasyonu için PDB’den alınan dTTP ve yerleştirme simülasyonu sonucu dTTP’nin Pymol’de gösterimi. Yerleştirme simülasyonu sonucu dTTP ligandının karbon atomları gri, oksijen atomları kırmızı, azot atomlar mavi renk ile; PDB’den alınan dTTP ligandının karbon atomları sarı, azot atomları mavi, oksijen atomları pembe renk temsil edilmiştir. b) Yerleştirme simülasyonu sonucu dTTP’nin amino asitler ile etkileşiminin LigPlot ile 2 boyutlu diyagramı. Hidrojen bağları noktalı çizgiler ile gösterilmiştir. Azot mavi renk ile, oksijen kırmızı renk ile, karbon deniz yeşili renk ile, kükürt sarı renk ile, fosfor atomları kahverengi renk ile, hidrofobik kalıntıları tuğla kırmızısı rengi ile gösterilmiştir.

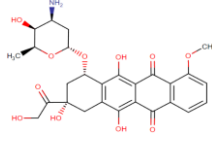
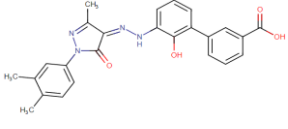
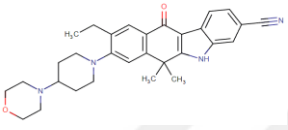
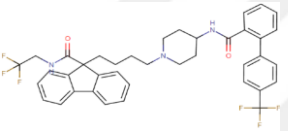
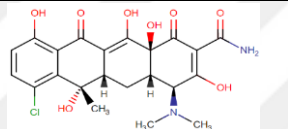
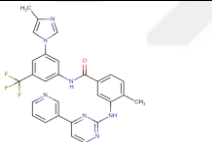
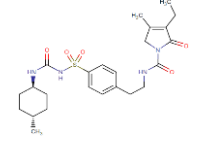
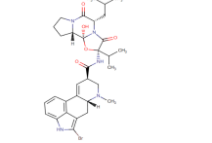
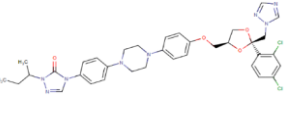
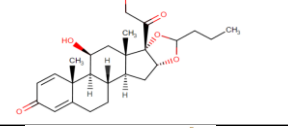
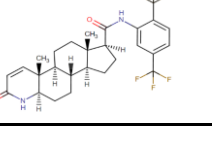
Bu etkileşimler hidrojen bağlarını, tuz köprülerini ve Trp164, Thr178, Asn240, Lys253, Arg300 ve Lys309 ile atomlar arası mesafelerin yaklaşık 3 Å veya daha az olduğu polar-polar etkileşimleri içerdiğini göstermiştir. Ek olarak dTTP, Phe176 ile pi-pi etkileşimleri sergilemiştir. Ayrıca dTTP ile Leu120, Leu172 ve Gly177 arasında hidrofobik etkileşimler meydana gelmiştir.

Yerleştirme simülasyonları, 350 molekülün (kütüphanedeki tekrarlayan moleküller dahil) -10.3 kcal/mol veya daha düşük Vina bağlanma afinitelerine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Vina bağlanma afiniteleri -12.4 ile -10.3 kcal/mol arasında olan ilaçlar ZINC veri tabanındaki tanımları, yapıları ve türleri belirtilerek gösterilmiştir. Yerleştirme simülasyonundan elde edilen ilk 100 molekül Tablo 2’de verilmiştir.

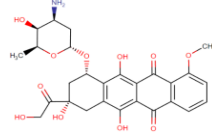
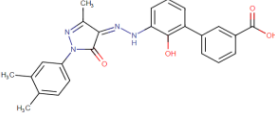
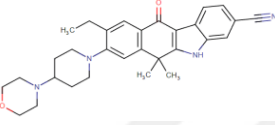
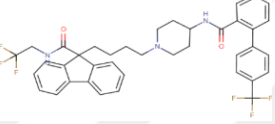
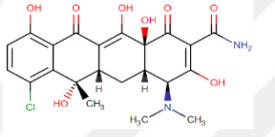
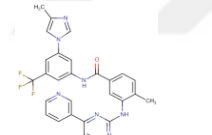
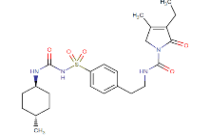
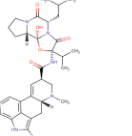
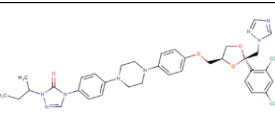
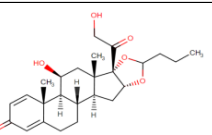
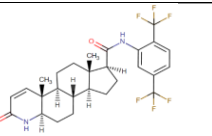
Tablo 2: N alanı için yerleştirme simülasyonu sonucu 100 molekül listelenmiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC00003830633 / Daunorubicin		-12,4	Lenfositik olmayan lösemi ve akut lenfositik lösemisinin remisyondan çıkmasını sağlamak için kullanılan bir antrasiklin aminoglikozittir.
ZINC84480349 / Metacycline		-12,3	Tetrasikline benzeyen ancak daha yavaş atılan ve etkili kan seviyelerini daha uzun süre koruyan geniş spektrumlu yarı sentetik bir antibiyotik.
ZINC1612996 / Irinotecan		-12,3	Esas olarak kolorektal kanserin tedavisinde kullanılan bir antineoplastik enzim inhibitörüdür.
ZINC3831234 / Novobiocin		-12,2	Aktinomiset Streptomyces niveus tarafından üretilen bir aminokumarin antibiyotiktir. Novobiocin, DNA giraza bağlanır ve adenozin trifosfat (ATP) aktivitesini bloke eder.
ZINC8101127 / Indocyanine Green		-12	Kalp debisinin, karaciğer fonksiyonunun ve karaciğer kan akışının belirlenmesinde ve oftalmik anjiyografide kullanılan bir teşhis ajanıdır.
ZINC3914596 / Saquinavir		-12	İleri immün yetmezlikli HIV-1'in tedavisinde diğer antiretroviral ajanlarla kombinasyon halinde kullanılan bir HIV proteaz inhibitörüdür.
ZINC000036384720 / Oxytetracycline		-11,9	Oksitetrasiklin, çok çeşitli duyarlı bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir tetrasiklin antibiyotiktir.
ZINC11681563 / Netupitant		-11,8	Kemoterapinin neden olduğu akut ve gecikmiş kusma ve bulantıyı önlemek için palonosetron ile kombinasyon halinde kullanılan antiemetik bir ajandır.
ZINC00003830924 / Idarubicin		-11,8	Yetişkinlerde akut miyeloid lösemi (AML) tedavisi için kullanılan bir antrasiklin antineoplastik ajandır.
ZINC52955754 / Ergotamine		-11,8	Aural veya aurasız migrenleri ve küme baş ağrıları için tedavi etmek için kullanılan bir alfa-1 seçici adrenerjik agonist vazokonstriktördür.
ZINC3978005 / Dihydroergotamine		-11,8	Migren baş ağrısı ve küme baş ağrısının akut tedavisinde kullanılan bir ergot alkaloididir.

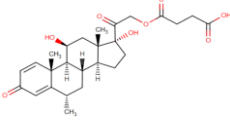
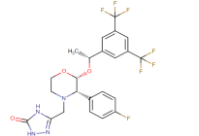
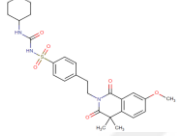
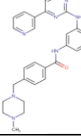
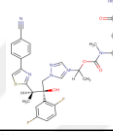
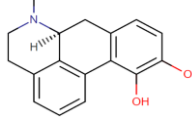
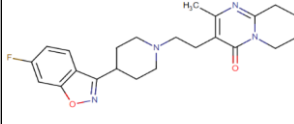
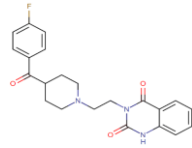
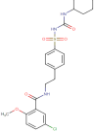
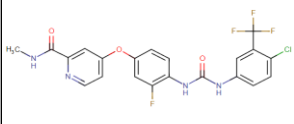
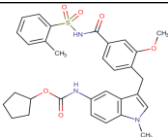
Tablo 2'nin devamı listelenmiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC3830732 / Doxorubicin / Epirubicin		-11,8	Doxorubicin, AIDS ile ilişkili Kaposi Sarkomu ve metastatik kanserlerin tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Epirubicin, primer meme kanseri nedeniyle cerrahi rezeksiyon geçirmiş hastalarda aksiller lenf bezi metastazlarının tedavisinde adjuvan olarak kullanılan bir antrasiklin topoizomera II inhibitörüdür.
ZINC000011679756 / Eltrombopag		-11,7	Çeşitli etiyolojilerle ilişkili trombositopeni veya aplastik anemi tedavisi için kullanılan bir trombopoietin reseptör agonistidir.
ZINC66166864 / Alectinib		-11,6	Anaplastik lenfoma kinaz pozitif metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC27990463 / Lomitapide		-11,6	Homozigot ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili kolesterolü düşürmek, miyokard enfarktüsü ve felç gibi kardiyovasküler olay riskini azaltmak için kullanılan bir mikrozomal trigliserit transfer protein inhibitörüdür.
ZINC14768423 / Chlortetracycline		-11,5	Veterinerlik amacıyla en yaygın olarak kullanılan ilk tetrasiklin antibiyotiktir.
ZINC6716957 / Nilotinib		-11,5	Philadelphia kromozomu pozitif olan Kronik Miyeloid Lösemisin (KML) kronik faz tedavisinde ve imatinib içeren tedaviye dirençli KML tedavisinde kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC537791 / Glimepiride		-11,4	Yetişkinlerde tip 2 diyabetin tedavisinde monoterapi olarak glisemik kontrolü iyileştirmek amacıyla diyet ve egzersizle ek olarak endikedir.
ZINC53683151 / Bromocriptine		-11,4	Hiperprolaktinemiye bağlı galaktore ve diğer prolaktin ile ilişkili durumların yanı sıra erken Parkinson Sendromunun tedavisinde kullanılan bir dopamin D2 reseptör agonistidir.
ZINC3830975 / Itraconazole		-11,4	Pulmoner ve ekstrapulmoner blastomikoz, histoplazmoz ve onikomikoz gibi immün sistemi baskılanmış ve immün sistemi baskılanmamış hastalarda çeşitli mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal bir ajandır.
ZINC00004097286 / Budesonide		-11,3	Crohn hastalığı, astım, KOAH, saman nezlesi ve alerjiler ile ülseratif kolit tedavisinde kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC3932831 / Dutasteride		-11,3	Yetişkin erkeklerde semptomatik iyi huylu prostat hiperplazisinin (BPH) 5-alfa redüktazı inhibe ederek tedavisinde kullanılan antiandrojenik bir bileşiktir.

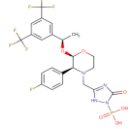
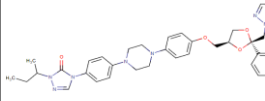
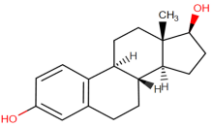
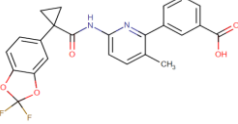
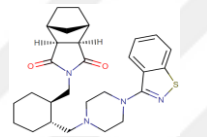
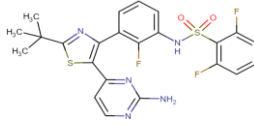
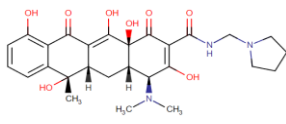
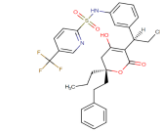
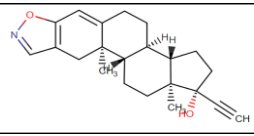
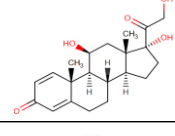
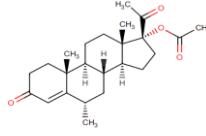
Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC3830732 / Doxorubicin / Epirubicin		-11,8	Doxorubicin, AIDS ile ilişkili Kaposi Sarkomu ve metastatik kanserlerin tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Epirubicin, primer meme kanseri nedeniyle cerrahi rezeksiyon geçirmiş hastalarda aksiller lenf bezi metastazlarının tedavisinde adjuvan olarak kullanılan bir antrasiklin topoizomera II inhibitörüdür.
ZINC000011679756 / Eltrombopag		-11,7	Çeşitli etiyolojilerle ilişkili trombositopeni veya aplastik anemi tedavisi için kullanılan bir trombopoietin reseptör agonistidir.
ZINC66166864 / Alectinib		-11,6	Anaplastik lenfoma kinaz pozitif metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC27990463 / Lomitapide		-11,6	Homozigot ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili kolesterolü düşürmek, miyokard enfarktüsü ve felç gibi kardiyovasküler olay riskini azaltmak için kullanılan bir mikrozomal trigliserit transfer protein inhibitörüdür.
ZINC14768423 / Chlortetracycline		-11,5	Veterinerlik amacıyla en yaygın olarak kullanılan ilk tetrasiklin antibiyotiktir.
ZINC6716957 / Nilotinib		-11,5	Philadelphia kromozomu pozitif olan Kronik Miyeloid Lösemisinin (KML) kronik faz tedavisinde ve imatinib içeren tedaviye dirençli KML tedavisinde kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC537791 / Glimepiride		-11,4	Yetişkinlerde tip 2 diyabetin tedavisinde monoterapi olarak glikemik kontrolü iyileştirmek amacıyla diyet ve egzersize ek olarak endikedir.
ZINC53683151 / Bromocriptine		-11,4	Hiperprolaktinemiye bağlı galaktore ve diğer prolaktin ile ilişkili durumların yanı sıra erken Parkinson Sendromunun tedavisinde kullanılan bir dopamin D2 reseptör agonistidir.
ZINC3830975 / Itraconazole		-11,4	Pulmoner ve ekstrapulmoner blastomikoz, histoplazmoz ve onikomikoz gibi immün sistemi baskılanmış ve immün sistemi baskılanmamış hastalarda çeşitli mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal bir ajandır.
ZINC000004097286 / Budesonide		-11,3	Crohn hastalığı, astım, KOAH, saman nezlesi ve alerjiler ile ülseratif kolit tedavisinde kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC3932831 / Dutasteride		-11,3	Yetişkin erkeklerde semptomatik iyi huylu prostat hiperplazisinin (BPH) 5-alfa redüktazı inhibe ederek tedavisinde kullanılan antiandrojenik bir bileşiktir.

Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC3977781 / Methylprednisolone Hemisuccinate		-11,2	Şiddetli alerjik reaksiyonları, dermatolojik hastalıkları, endokrin bozuklukları, gastrointestinal hastalıkları, hematolojik bozuklukları, neoplastik hastalıkları, sinir sistemi rahatsızlıkları, göz hastalıkları, böbrek hastalıkları, solunum hastalıkları ve romatizmal bozuklukları tedavi etmek için kullanılan suda çözünür bir kortikosteroiddir.
ZINC27428713 / Aprepitant		-11,2	Kemoterapi ve ameliyatın neden olduğu bulantı ve kusmayı tedavi etmek için kullanılan bir P/nörokinin 1 reseptör antagonistidir.
ZINC1482077 / Gliquidone		-11,2	Tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan bir sülfonilüre ilacıdır.
ZINC19632618 / Imatinib		-11,2	Lösemi, miyelodisplastik/miyeloproliferatif hastalık, sistemik mastositöz, hiperezinozofilik sendrom, dermatofibrosarkom protuberans ve gastrointestinal stromal tümörlerin tedavisinde kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörüdür.
ZINC49637509 / Isavuconazonium		-11,2	İnvaziy aspergilloz ve mukormikoz tedavisinde kullanılan triazol antifungaldir.
ZINC000000155525 / (s)apomorphine		-11,1	Apomorfin, ilerlemiş Parkinson hastalığının hipomobil "kapalı" dönemlerini tedavi etmek için kullanılan bir morfin türevi D2 dopamin agonistidir.
ZINC000000538312 / Risperdal		-11,1	Şizofreni, bipolar mani, psikoz gibi bir dizi zihinsel sağlık bozukluğunun tedavisinde veya şiddetli depresyonda yardımcı olarak kullanılan ikinci nesil bir antipsikotik ilaçtır.
ZINC000000537877 / Ketanserin		-11,1	Ketanserin, Septik Şok, Şiddetli Sepsis ve Diyabetik Ayak Ülseri tedavisinde araştırılmıştır.
ZINC537805 / Glyburide		-11,1	İnsüline bağımlı olmayan diyabet tedavisinde kullanılan bir sülfonilüredir.
ZINC6745272 / Regorafenib		-11,1	Metastatik kolorektal kanser, rezeke edilemeyen, lokal olarak ilerlemiş veya metastatik gastrointestinal stromal tümörler ve hepatoselüler karsinom hastalarını tedavi etmek için kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC896717 / Zafirlukast		-11,1	Astımın profilaksisi ve kronik tedavisinde kullanılan bir lökotrien reseptör antagonistidir.

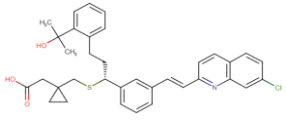
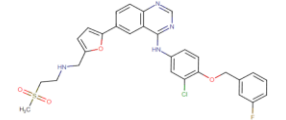
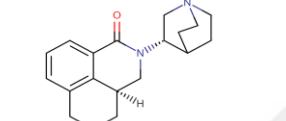
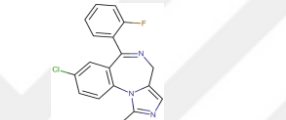
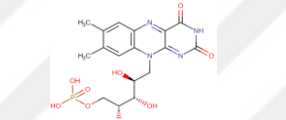
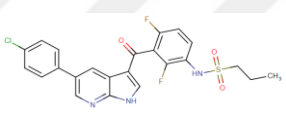
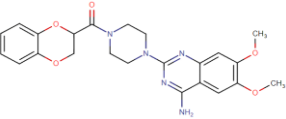
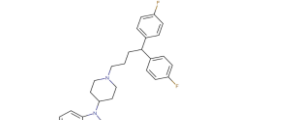
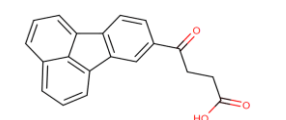
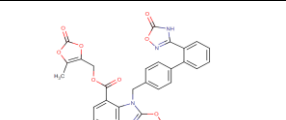
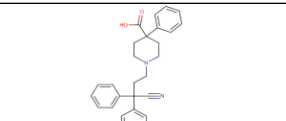
Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç isimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC3939013 / Fosaprepitant		-11,1	Kemoterapinin neden olduğu akut ve gecikmiş bulantı ve kusmanın önlenmesi için diğer antiemetik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılan antiemetik bir ilaçtır.
ZINC4097344 / Itraconazole		-11,1	Itrakonazol, pulmoner ve ekstrapulmoner blastomikoz, histoplazmoz ve onikomikoz gibi immün sistemi baskılanmış ve immün sistemi baskılanmamış hastalarda çeşitli mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal bir ajandır.
ZINC000003830773 / Estradiol		-11	Menopozda vulvar ve vajinal atrofinin vazomotor semptomlarını, hipoöstrojenizmi, menopoz sonrası osteoporozun önlenmesini, meme kanserinin tedavisini ve prostatın ilerlemiş androjene bağımlı karsinomunu tedavi etmek için kullanılan östrojenik bir steroiddir.
ZINC64033452 / Lumacaftor		-11	CFTR genindeki F508del mutasyonu için homozigot olan hastalarda kistik fibrozun tedavisinde ivacaftor ile kombinasyon halinde kullanılan bir protein şaperondur.
ZINC3927822 / Lurasidone		-11	Şizofreni ve bipolar I bozuklukla ilişkili depresif dönemleri tedavi etmek için kullanılan atipik bir antipsikotiktir.
ZINC68153186 / Dabrafenib		-11	Belirli melanom türleri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve tiroid kanseri olan hastaları tedavi etmek için kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC57678900 / Rolitetracycline		-11	Yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulan durumlarda veya oral uygulamanın pratik olmadığı durumlarda kullanılan geniş spektrumlu bir tetrasiklin antibiyotiktir.
ZINC100016058 / Tipranavir		-11	Birden fazla proteaz inhibitörüne dirençli HIV-1'i tedavi etmek için kullanılan bir proteaz inhibitörüdür.
ZINC000003830630 / Danazol		-10,9	Endometriozis tedavisinde ve iyi huylu fibrokistik memelerle ilişkili şiddetli ağrı ve hassasiyetin semptomatik tedavisinde kullanılan sentetik bir steroid ve hipofiz gonadotropin inhibitörüdür.
ZINC000003875348 / Prednisolone		-10,9	Adrenokortikal yetmezliği, inflamatuvar durumları ve bazı kanserleri tedavi etmek için kullanılan bir glukokortikoiddir.
ZINC000005029557 / Provera		-10,9	Kontraseptif olarak ve sekonder amenore, anormal uterin kanama, endometriozisten kaynaklanan ağrı, endometrial ve renal karsinomlar, erkeklerde parafili ve erken ergenlik tedavisinde kullanılan bir progestindir.

Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç isimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC4214700 / Paliperidone		-10,9	Şizofreni tedavisinde kullanılan atipik bir antipsikotiktir.
ZINC68202099 / Sonidegib		-10,9	Lokal ileri rekürren bazal hücreli karsinomun cerrahi ve radyoterapi sonrasında tedavisinde veya radyasyon tedavisinin uygun olmadığı durumlarda kullanılan antineoplastik bir ajandır.
ZINC11677837 / Apixaban		-10,9	Kalça veya dizde kapak dışı atriyal fibrilasyonda inme ve sistemik emboli ile pulmoner emboliye yol açan derin ven trombozunun profilaksisi için kullanılan bir antikoagülandır.
ZINC22446654 / Indinavir		-10,9	HIV enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan bir proteaz inhibitörüdür.
ZINC000039251873 / Norethynodrel		-10,8	Sentetik bir progesteron hormonu. Fonksiyonel uterus kanama ve endometriozis tedavisinde kullanılmaktadır.
ZINC000003936683 / Solifenacin		-10,8	Muskarinik bir antagonisttir. Aciliyet ve aşırı aktif mesane ile ilişkili idrar sıklığında kullanılır.
ZINC000003875560 / Methylprednisolone		-10,8	Çeşitli organ sistemleri, endokrin koşulları ve neoplastik hastalıklarda inflamasyonu veya bağışıklık reaksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC4097305 / Flunisolide		-10,8	Astımın idame tedavisinde profilaktik tedavi olarak kullanılan inhale bir kortikosteroiddir.
ZINC13831130 / Raltegravir		-10,8	HIV enfeksiyonlarının tedavisinde diğer antiretrovirallerle birlikte kullanılan bir antiretroviral ajandır.
ZINC1493878 / Sorafenib		-10,8	Rezeke edilemeyen karaciğer karsinomunun ve ilerlemiş böbrek karsinomunun tedavisinde kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC36701290 / Ponatinib		-10,8	Çeşitli tiplerde kronik miyeloid lösemi (KML) hastalarının tedavi etmek için kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.

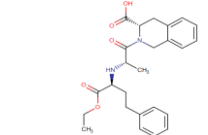
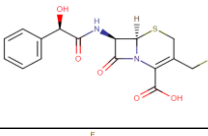
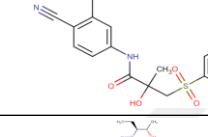
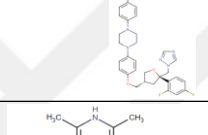
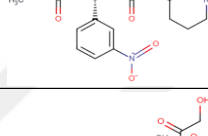
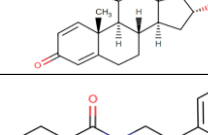
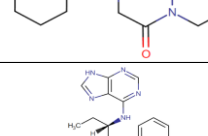
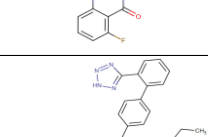
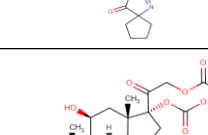
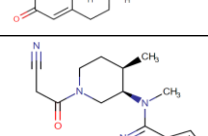
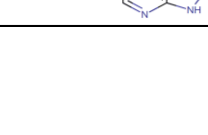
Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC3831150 / Montelukast		-10,8	Egzersiz kaynaklı bronkokonstriksiyonu önlemek ve mevsimsel alerjik riniti tedavi etmek için astım tedavisi rejiminin bir parçası olarak kullanılan bir lökotrien reseptör antagonistidir.
ZINC1550477 / Lapatinib		-10,8	Önceden kemoterapötik tedavi almış hastalarda ilerlemiş veya metastatik HER-negatif meme kanserinin tedavisinde kullanılan bir antineoplastik ajan ve tirozin kinaz inhibitörüdür.
ZINC00003795819 / Palonosetron		-10,7	Emetojenik kemoterapiden kaynaklanan kusmanın profilaksisi veya tedavisinde ve postoperatif bulantı ve kusmanın tedavisinde kullanılan bir serotonin antagonistidir.
ZINC000095626706 / Midazolam		-10,7	Nöbetler, anestezi ve anksiyete bozukluklarında yaygın olarak kullanılan, hızlı başlangıçlı, kısa etkili bir benzodiazepindir.
ZINC3831426 / Flavin Mononucleotide		-10,7	Anemi, migren, alkolizm ve hiperhomosisteinemi riboflavin'i eski haline getirmek için kullanılan bir B2 vitamini şeklidir.
ZINC52509366 / Vemurafenib		-10,7	BRAF V600 mutasyonuna sahip Erdheim-Chester Hastalığı hastalarını ve BRAF V600E mutasyonuna sahip hastalarda melanomu tedavi etmek için kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC94566093 / Doxazosin		-10,7	Hipertansiyon ve iyi huylu prostat hiperplazisine bağlı idrar tıkanıklığını tedavi etmek için kullanılan bir alfa-1 adrenerejik reseptördür.
ZINC4175630 / Pimozide		-10,7	Tourette Bozukluğu olan hastalarda yatıştırıcı motor ve ses tiklerini yönetmek için kullanılan bir antipsikotiktir.
ZINC000002036732 / Florantyrone		-10,6	Safra diskinezinin tedavisinde kullanılır.
ZINC000014210642 / Azilsartan Medoxomil		-10,6	Hipertansiyonu tek başına veya kortalidon gibi diğer antihipertansif ajanlarla kombinasyon halinde tedavi etmek için kullanılan bir anjiyotensin II reseptör blokeridir.
ZINC000000601317 / Difenoxin		-10,6	Akut spesifik olmayan ishalin ve kronik fonksiyonel ishalin akut alevlenmelerinin tedavisinde yardımcı olarak kullanılan bir antidiyareik ajandır.

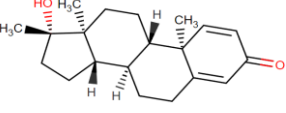
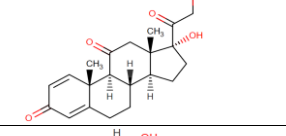
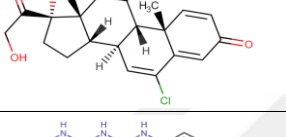
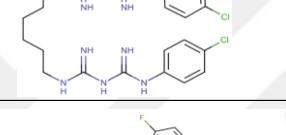
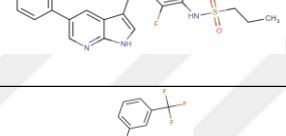
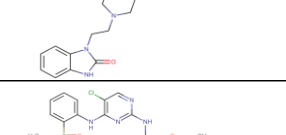
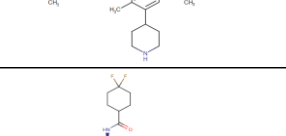
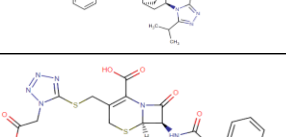
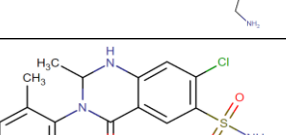
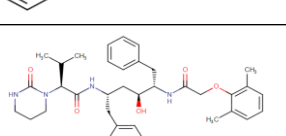
Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC000000601317 / Difenoxin		-10,6	Akut spesifik olmayan ishalin ve kronik fonksiyonel ishalin akut alevlenmelerinin tedavisinde yardımcı olarak kullanılan bir antidiyareik ajandır.
ZINC000001542113 / Vilazodone		-10,6	5-HT taşıyıcısını ve 5-HT1A reseptörlerini hedef alan majör depresif bozukluğun tedavisinde kullanılan bir antidepresan ajandır.
ZINC000070466416 / Cabozantinib		-10,6	İleri renal hücreli karsinom, hepatoselüler karsinom ve medüller tiroid kanserini tedavi etmek için kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörüdür.
ZINC000000643153 / Ketoconazole		-10,6	Seboreik dermatit ve mantar cilt enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan geniş spektrumlu bir antifungaldir.
ZINC000001550499 / Cinacalcet		-10,6	Kronik böbrek hastalığında sekonder hiperparatiroidizmi ve paratiroid karsinomunda hiperkalsemiyi tedavi etmek için kullanılan bir kalsiyum algılayıcı reseptör agonistidir.
ZINC000000000903 / Alprazolam		-10,5	Depresyonla ilişkili anksiyetenin yanı sıra panik bozukluklarını ve genel anksiyeteyi tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan, orta başlangıçlı bir triazolobenzodiazepindir.
ZINC000000537795 / Glipizide		-10,5	Pankreas beta hücrelerini hassaslaştırmak ve insülin salınımını uyarmak için Tip 2 Diyabette kullanılan bir sülfonilüre ilacıdır.
ZINC000003875334 / Cortisone		-10,5	Doğal olarak oluşan bir glukokortikoid. Adrenal yetmezlik için replasman tedavisinde ve anti-inflamatuar ajan olarak kullanılmıştır.
ZINC000011617039 / Pazopanib		-10,5	Önceden kemoterapi görmüş hastalarda ilerlemiş renal hücreli kanser ve ileri yumuşak doku sarkomunun tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ajandır.
ZINC000084400879 / Nicardipine		-10,5	Hipertansiyon ve kronik stabil anjınının kısa süreli tedavisinde kullanılan bir kalsiyum kanal blokeridir.
ZINC000003797541 / Abiraterone		-10,5	Metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri ve metastatik yüksek riskli kastrasyona duyarlı prostat kanserinin tedavisinde kullanılan bir antiandrojendir.

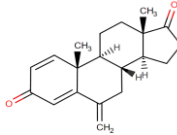
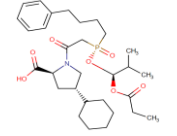
Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC000003801163 / Quinapril		-10,5	Hipertansiyonu, konjestif kalp yetmezliğini ve böbrek hastalığının yavaş ilerleme hızını tedavi etmek için kullanılan bir ACE inhibitörü ön ilacıdır.
ZINC000003830428 / Cefonicid		-10,5	İntravenöz veya intramüsküler olarak uygulanan ikinci kuşak sefalosporin. İdrar yolu enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonlarında kullanılır.
ZINC000000538564 / Bicalutamide		-10,5	Prostatın Evre D2 metastatik karsinomunu tedavi etmek için kullanılan bir androjen reseptör inhibitörüdür.
ZINC000003938482 / Posaconazole		-10,5	Ciddi derecede bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda Candida türlerinin ve Aspergillus türlerinin neden olduğu invaziv enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir triazol antifungal ilaçtır.
ZINC000100014880 / Benidipine		-10,5	Hipertansiyon ve anjina pectoris tedavisinde kullanılan sentetik bir dihidropiridin kalsiyum kanal blokeridir.
ZINC000004212851 / Desonide		-10,4	Kortikosteroidlere yanıt veren dermatozların inflamatuvar ve kaşıntılı belirtilerinin semptomatik tedavisinde kullanılan topikal bir kortikosteroiddir.
ZINC000000403566 / Praziquantel		-10,4	Şistozomiyaz gibi bir dizi paraziter solucan enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan antelmintik bir ilaçtır.
ZINC000013986658 / Idelalisib		-10,4	Kronik lenfositik lösemi (CLL), tekrarlayan foliküler B hücreli Hodgkin olmayan lenfomayı (FL) ve tekrarlayan küçük lenfositik lenfomayı (SLL) tedavi etmek için kullanılan bir antineoplastik kinaz inhibitörüdür.
ZINC000003872931 / Irbesartan		-10,4	Hipertansiyonu tedavi etmek, diyabetik nefropatinin ilerlemesini geciktirmek ve konjestif kalp yetmezliğini tedavi etmek için kullanılan bir anjiyotensin reseptör blokeridir.
ZINC000003938652 / Prednicarbate		-10,4	Duyarlı cilt durumlarıyla ilişkili kaşıntı ve inflamasyonu yönetmek için kullanılan orta etkili bir topikal kortikosteroiddir.
ZINC000003818808 / Tofacitinib		-10,3	Romatoid artrit ve ankilozan spondilit ve ülseratif kolit gibi romatizmal durumların tedavisinde kullanılan bir Janus kinaz (JAK) inhibitörüdür.

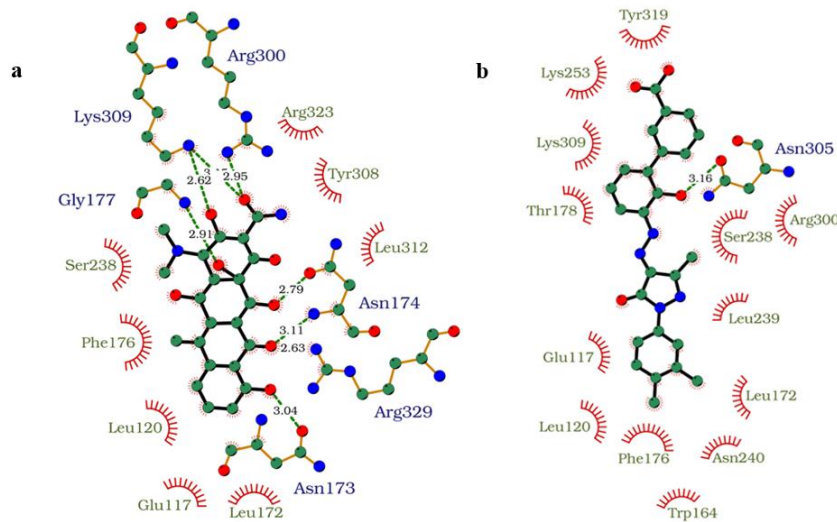
Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC000003875469 / Metandienone		-10,3	Anoreksi hastalarında iştahın uyarılması için endike olan bir anabolik steroiddir.
ZINC000003875357 / Prednisone		-10,3	İnflamasyonu veya immün aracı reaksiyonları tedavi etmek ve endokrin veya neoplastik hastalıkların tedavisi için kullanılan bir kortikosteroiddir.
ZINC000004215431 / Cloprednol		-10,3	Artrit ve astım tedavisinde endike olan bir glukokortikoiddir.
ZINC000014768621 / Chlorhexidine		-10,3	Ameliyatlarda ve sağlık uygulamalarında sterilize etmek, periodontitte cep derinliğini azaltmak ve diş eti iltihabını tedavi etmek için kullanılan bir antiseptiktir.
ZINC000052509366 / Vemurafenib		-10,3	BRAF V600 mutasyonuna sahip Erdheim-Chester Hastalığı hastalarını ve BRAF V600E mutasyonuna sahip hastalarda melanomu tedavi etmek için kullanılan bir kinaz inhibitörüdür.
ZINC000052716421 / Flibanserin		-10,3	Edinilmiş, genelleştirilmiş hipoaktif cinsel istek bozukluğu (HSDD) olan seçilmiş menopoz öncesi kadınların tedavisinde kullanılan bir 5-HT reseptör modülatörüdür.
ZINC000096272772 / Ceritinib		-10,3	Yetersiz klinik yanıtı veya krizotinib'e intoleransı olan hastalarda anaplastik lenfoma kinaz (ALK)-pozitif metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanserini (KHDAK) tedavi etmek için kullanılan bir antineoplastik kinaz inhibitörüdür.
ZINC000100003902 / Maraviroc		-10,3	CCR5-tropik HIV-1 enfeksiyonunu tedavi etmek için diğer antiretroviral ilaçlarla birlikte kullanılan bir CCR5 yardımcı reseptör antagonistidir.
ZINC000003830434 / Ceforanide		-10,3	Sefalosporin antibiyotiği olan sefamandolünikine çok benzer, tek farkı, seforanidin gram-pozitif organizmaların çoğuna karşı daha az etkin olmasıdır.
ZINC000000896755 / Metolazone		-10,3	Hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiyazid benzeri bir diüretiktir.
ZINC000003951740 / Lopinavir		-10,2	İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunu tedavi etmek için ritonavir ile kombinasyon halinde kullanılan bir HIV-1 proteaz inhibitörüdür.

Tablo 2 devamı listelemiştir.

ZINC tanımları/İlaç İsimleri	2D Yapı	Bağlanma Afinitesi	Özellikler
ZINC000003973334 / Exemestane		-10,2	Menopoz sonrası kadınlarda tamoksifen tedavisinden sonra meme kanserini tedavi etmek için kullanılan bir aromataz inhibitörüdür.
ZINC000003977764 / Fosinopril		-10,2	Hafif ila orta dereceli hipertansiyonu, konjestif kalp yetmezliğini tedavi etmek ve hipertansif diyabetiklerde böbrek hastalığının ilerlemesini yavaşlatmak için kullanılan bir ACE inhibitörüdür.

Yerleştirme simülasyonları, DrugBank'taki açıklamalara göre (Wishart vd, 2006), antikanser, antipsikotikler, antiinflamatuvar, antibiyotikler, antidiyabetikler ve östrojen hormonu gibi çeşitli ilaç türlerinin NP'e bağlanabileceğini göstermiştir. İlerleyen analizlerde antiviraller ve kemoterapötikler gibi yan etkilere duyarlı farmasötik bileşikler hariç tutulmuştur. Daha ileri analizler için yaygın olarak kullanılan ilaçlar metacycline (-12.3 kcal/mol), eltrombopag (- 11.7 kcal/mol), glimepiride (-11.3 kcal/mol), lurasidone (-11 kcal/mol), paliperidone (-10.7 kcal/mol), doxazosin (-10.7 kcal/mol), pimozide (-10.7 kcal/mol), flavin mononükleotid (fmn) (-10.7 kcal/mol), prednisone (-10.3 kcal/mol) seçilmiştir. Seçilen ilaçlar için yerleştirme sonuçlarının 2 boyutlu görselleştirilmesi, kontrol ligandı dTTP yerleştirme simülasyonunda etkileşen amino asitlere yakınlığını ortaya koymuştur.

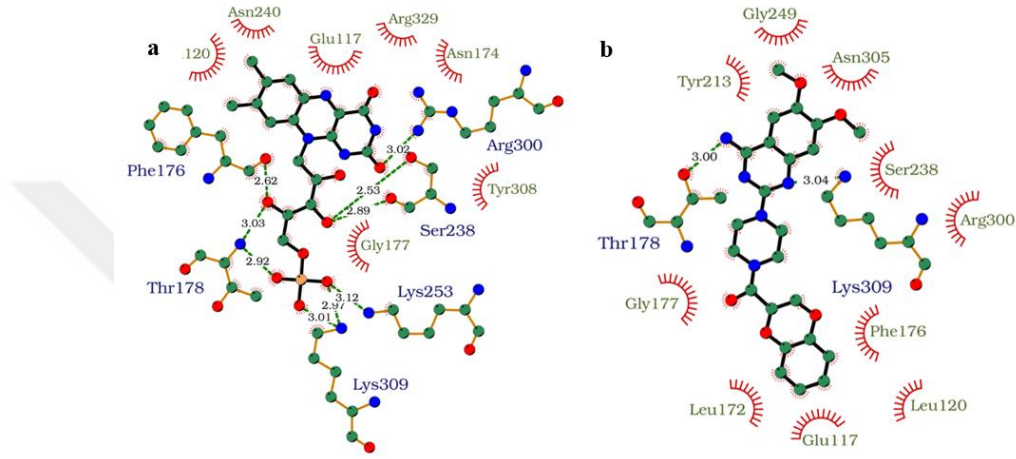


Şekil 13: Metacycline ligandı (a) ve Eltrombopag ligandı (b) Ligplot ile gösterimi.

Ayrıntılı olarak incelendiğinde metacycline ilacının, Asn174, Arg300, Lys309, Arg329'un yan zincirleri ve Gly177'nin ana zinciri ile tuz köprüleri ve hidrojen bağı etkileşimleri kurduğu

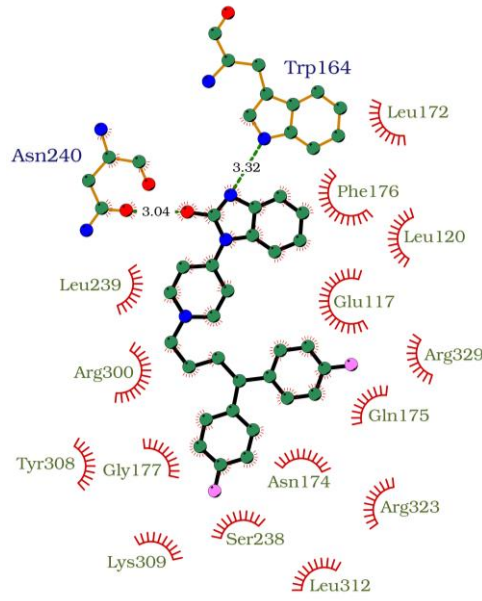
Prednisone, Trp164, Lys309 ve Arg300 ile hidrojen bağı ve tuz köprüsü etkileşimleri kurduğu görülmüştür. Molekül ile Phe176 arasındaki pi-pi etkileşimi korunmuştur. Leu120, Leu172 ve

Gly177 aminoasitlerinin hidrofobik etkileşimlere katkıda bulunan amino asitler olduğu gözlenmiştir (Şekil 14a). Paliperidone ligandının, Phe176 ile pi-pi etkileşimi kurduğu ve Thr178'in yan zinciri ve Gly249'un ana zinciri ile hidrojen bağı etkileşimleri kurduğu görülmüştür. Ayrıca Ile241'in ana zinciri ve Asn305 ve Lys309'un yan zincirleri ile polar-polar etkileşimler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak molekül, hidrofobik kuvvetler aracılığıyla Leu120, Gly177 ve Ala250 ile de etkileşime girmiştir (Şekil 14b).



Şekil 16: Fmn ligandı(a) ve Doxazosin ligandı(b) Ligplot ile gösterimi.

Fmn, Phe176, Thr178, Ser238 ve Ile241'in omurga atomlarıyla çok sayıda hidrojen bağı etkileşimi oluşturmuştur. Aynı zamanda Ser238 Lys253, Arg300, Lys309 ve Arg329'un yan zincirleriyle hidrojen bağı ve tuz köprüsü etkileşimlerine de katılmıştır. Özellikle, bu hidrojen bağı etkileşimlerine ek olarak da Phe176 molekülle pi-pi etkileşimini korumuştur. Yalnızca Leu120 ve Gly177 amino asitleri Fmn ile hidrofobik etkileşimi içindedir (Şekil 15a). Doxazosin, Thr178 ve Lys309'un yan zincirleri ile hidrojen bağı etkileşimleri oluşturmuştur. Ayrıca sırasıyla Phe176 ve Ser238 ile pi-pi ve kutup-kutup etkileşimleri oluşturmuştur. Gly117, Leu120, Leu170, Gly249 amino asitleri molekül ile hidrofobik etkileşim içindedir (Şekil 15b).



Şekil 17: Pimozide ligandının Ligplot ile gösterimi.

Pimozide, Phe176 ile pi-pi etkileşimleri, Asn240 ile kutupsal-kutupsal etkileşimler ve Leu120, Leu172, Gly177, Leu239 ve Leu312 ile bir dizi güçlü hidrofobik etkileşim kurmuştur (Şekil 16). Genel olarak yerleştirme simülasyonları, seçilen tüm ilaçların Phe176 ile pi-pi etkileşimlerine girdiğini ve Lizin (253 veya 309) veya Arjinin (300, 323 veya 329) amino asitleriyle minimum iki hidrojen bağı kurduğunu ortaya çıkarmıştır. dTTP ile gözlemlenen benzer bağlar görülmüştür. Bu bulgular, bu bileşiklerin potansiyel olarak NP'nin N-terminal bölgesine bağlanabileceğini ve NP inhibitörleri olarak işlev görebileceğini göstermiştir. Fizyolojik ortamlara yaklaşan koşullar altında molekül-NP komplekslerinin sağlamlığını ve bağlanma gücünü değerlendirmek için Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

4.2. MD SİMÜLASYONU

Moleküler dinamik simülasyonları bir molekülün veya kompleksin yerleştirme uygulamalarında konformasyonel alanı araştırmak için ligand bağlanması gibi kimyasal reaksiyonlar için serbest enerji farklarını hesaplamak için kullanılır (Hansson, Oostenbrink vd., 2002). MD simülasyonunda ilk yapı yerleştirme simülasyonu analizinden gelmekte fakat sistem istenen süre boyunca (100 ns) fizyolojik şartlara yakın (bir su kutusu içinde, 310K ve 150mM NaCl tuz varlığında) şartlarda simüle edilmektedir. Simülasyon boyunca bütün amino asitlerin ve ilacın fizyolojik şartlarda serbestçe hareket etmesine yani farklı konformasyonlar

almasına izin verilmektedir. Her oluşan konformasyon 1 ps'lik aralıklarla kaydedilmekte böylece 100 ns simülasyonda 105 farklı konformasyon kaydedilmektedir. İlaç, MD simülasyonu boyunca yerleştirme simülasyonu analizlerinde hesaplandığı gibi hedef bölge içinde kalması bu etkileşimin kararlı olduğunu gösterir. Bu kararlılığı nicel olarak ifade etmek için bağlanma enerjisi hesaplanmaktadır. Bağlanma enerjisini MM-GBSA metoduyla detaylı olarak simülasyon boyunca elde edilen 105 tane ilaç-protein yapısı kullanılarak hesaplanmaktadır. Bu analizden, bağlanma enerjisine katkıda bulunan hidrofobik, elektrostatik, van der Waals gibi etkileşim türleri de elde edilebilmektedir.

MD simülasyonu 4 adımda gerçekleştirilmiştir:

1. Minimizasyon: Amaç, sistemin enerjisini yapay olarak yükseltecek atomlar arasındaki çarpışmaları önlemek için proteinin koordinatlarını ayarlayarak enerjiyi en aza indirmektir. Minimizasyon işlemi, optimizasyon sürecinin sadece bir adımıdır ve bize kinetik enerjiyi hesaba katmadan potansiyel enerji minimumunu sağlar. Bu nedenle sistemi optimize etmek ve MD simülasyonunu çalıştırmak için daha fazla analize ihtiyacımız vardır. Bu aşamada sistemimizin koordinatlarını elimizde tutuyoruz. Ancak deneye devam etmeden önce atomların başlangıç hızlarını da belirlememiz gerekir. Hızların, sistemin toplam momentumu sıfır olacak ve simülasyon kutusunun sürüklenmesini önleyecek şekilde ayarlanması gerekir.
2. Isıtma: Minimizasyon adımı kinetik enerjiyi hesaba katmadan potansiyel enerji minimumu sağlandıktan sonra ısıtma adımı kinetik enerji için başlangıç hızını belirleyip 310K'e kadar ısıtılır ve sabit sıcaklık olarak 310K'de dengeleme adımına geçilir.
3. Dengeleme: Bu aşamada, ilk konfigürasyondan başlayarak sistemin dengeye gelmesi, çeşitli parametrelerin kararlı değerlere ulaşana kadar izlenmesi gerekiyor. Parametreler büyük ölçüde simülasyon için seçilen termodinamik topluluğun türüne bağlıdır. Stabilite amacıyla, üretim aşamasına geçmeden önce sabit sıcaklıkta ve hacimde bir dengeleme çalışması gerçekleştirilir. Bu nedenle, bir NVT dengeleme çalışması ilk adımdır ve basınç (P) ayarlanır sabit hacimde (V) ve sıcaklıkta (T) bir simülasyon gerçekleştirilir.
4. Üretim: MD simülasyonunun son adımı üretim aşamasıdır. Bu süreç NPT veya NVT gibi belirli bir topluluk içinde yürütülen bir simülasyondan oluşur. Laboratuvarındaki reaksiyonların genellikle sabit basınçta gerçekleştirildiği için NPT kullanılır. Üretim çalışmasının sonucunda moleküllerin davranışı ve özellikleri incelenir.

Ayrıca, MD simülasyonundan sonra MM/GBSA hesaplandıktan sonra simülasyon boyunca ilaç ile etkileşim halinde olan amino asitler belirlenip, sık etkileşen amino asitlerin *in siliko* olarak alanine çevrilerek o amino asidin bağlanma enerjisine katkısı hesap edilmektedir.

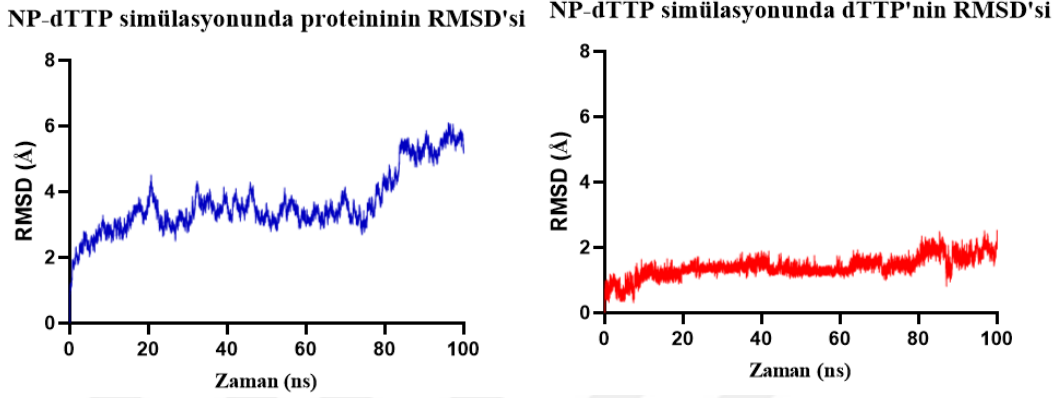
MD simülasyonları yapıldıktan sonra ilaçların aktif bölgeden uzaklaşmasına göre elemeleri yapılmıştır. C-terminal alanına yerleştirilen ve en iyi bağlanan ilaçların (flurandrenolide, danazol, methylprednisolone, risperidone) MD denemeleri yapılmıştır fakat simülasyon tamamlanmadan ilaçların aktif bölgeden uzaklaştığı, N-terminal alanındaki ilaçların ise simülasyon boyunca aktif bölgede kaldığı görülmüştür. N alanı için seçilen ilaçların 100 ns süren simülasyonlarda dengelendiğini kanıtlamak için Ca atomlarının kök kare sapması (RMSD) hesaplanmıştır. Daha sonra bu simülasyonda protein ve ligandın simülasyon boyunca en stabil kaldığı görüntüyü elde etmek için CHIMERA programı kullanılarak küme analizi yapılmıştır. CHIMERA analizinden elde edilen kompleks pdb formatında kaydedildikten sonra 2 boyutlu etkileşim diyagramı oluşturulmuştur. Bu 2 boyutlu diyagramlar için LigPlot programı kullanılmıştır. Bununla birlikte simülasyon sonrasında proteinin aktif bölgesindeki amino asitler ile ligandın temas sıklığı incelenmek üzere VMD programı kullanılarak zaman çizelgesi analizi yapılmıştır. Ligandların bağlanma serbest enerjisi MM/GBSA metodu ile hesaplanmıştır. Zaman-çizelgesi analizi yapıldıktan sonra temas sıklığı yüksek olan amino asitler seçilerek, ligandların bağlanma serbest enerjisine olan etkilerini hesaplamak amacıyla alanin mutasyonuna uğratılmıştır.

4.2.1. RMSD Analizi

Bir yörünge içindeki farklı protein konformasyonları arasındaki yapısal benzerliğin bir ölçüsü olan RMSD, MD yörüngelerinin değerlendirilmesinde yer alır. Bir referans yapısı ile ardışık çerçeveler arasındaki seçilen atomların koordinat sapmalarının derecesini tahmin ederek bir proteinin konformasyonunun simülasyon sırasında nasıl değiştiğini gösterir.

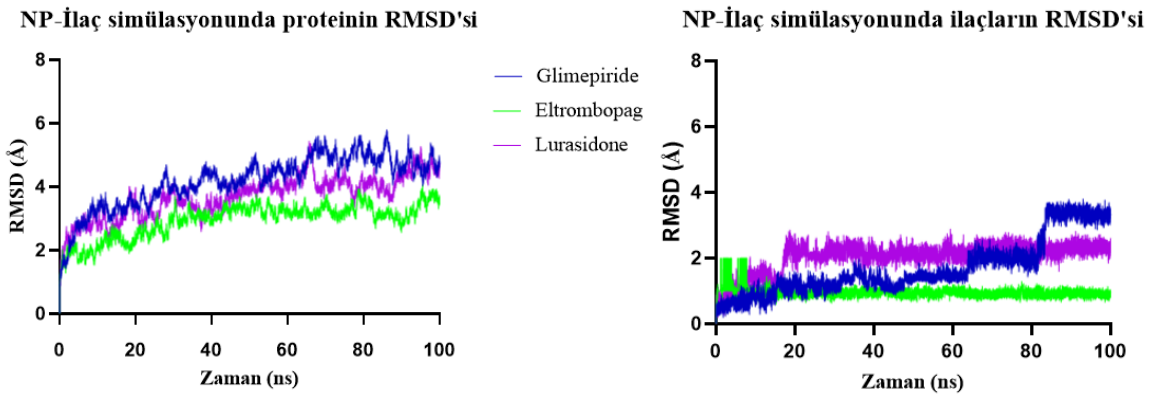
dTTP-NP ve molekül-NP kompleksleri 100 ns boyunca simüle edilmiştir. Uzun simülasyonların görsel incelemesi, seçilen tüm ilaçların ve inhibitörün, tüm simülasyon boyunca bağlanma pozisyonlarının dikkate değer bir stabilitesi olduğunu gösterdi. Ca atomlarının kök ortalama kare sapma analizi (RMSD) hesaplanıp görselleştirilerek konformasyonel değişikliklerin kapsamlı bir değerlendirilmesi yapılmıştır. RMSD yörünge aracı ve VMD'deki zaman çizelgesi işlevi, sırasıyla proteinin RMSD'sini ve ilaçların moleküler

konformasyonel dinamikleri hakkında daha fazla bilgi edinmek için ilacın RMSD'sini hesaplamak için kullanılmıştır. MD simülasyonu yapılırken izlenen adımlar içerisinde 100 ns koşulan üretim adımının ilk çerçeve referans olarak alınmıştır ve ilk adımdan son adıma RMSD analizi çıkartılmıştır.



Şekil 18: NP-dTTP simülasyonunda proteinin ve dTTP ligandının RMSD sonuçları

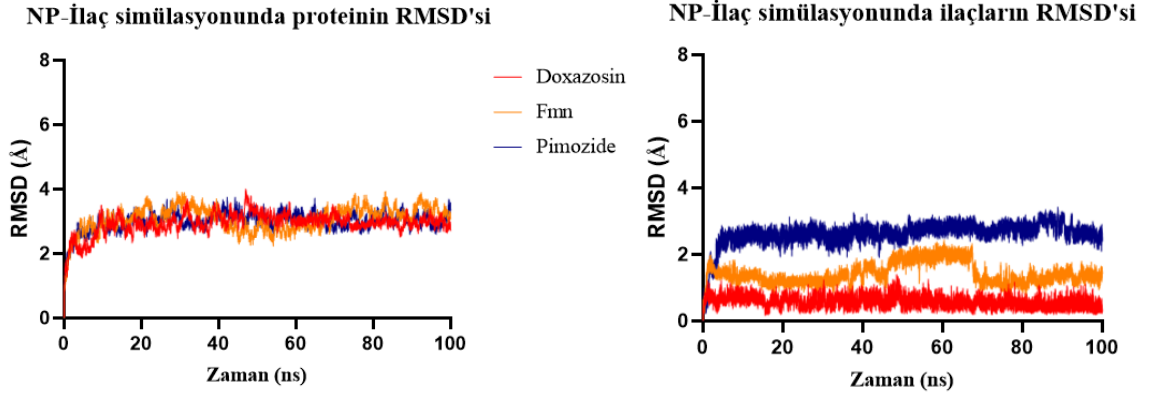
NP-dTTP kompleksinin protein RMSD'sinde, simülasyonun 20 ns ve 80 ns civarında küçük sıçramalar görülmüştür, 100 ns içinde 4Å civarına ulaştığı gösterilmiştir (Şekil 17). Kontrol ligandı (dTTP) için yapılan RMSD analizinde (Şekil 17) molekülün 1Å civarında RMSD değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç dTTP'nin bağlanma konformasyonun simülasyon boyunca büyük değişimlere uğramadığı ve kararlı bir şekilde hedef bölgede kaldığını göstermektedir.



Şekil 19: NP-ilaç simülasyonunda proteinlerin ve ilaçların RMSD sonuçları

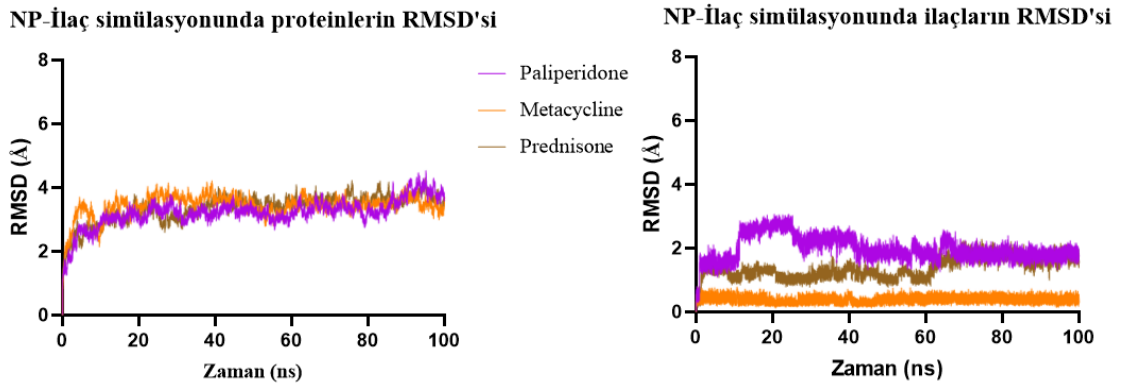
Daha önce de bahsedildiği gibi yerleştirme simülasyonundan sonra antikanser gibi yan etkisi çok olan ligandlar elendikten sonra seçilen ligandların MD simülasyonu (100 ns) koşulmuştur. Kontrol ligandından sonra ilk olarak glimepiride, eltrombopag ve lurasidone ilaçlarının RMSD

analizi çıkartılmıştır. Proteinlerin RMSD sonuçları üretim adımı başladıktan 3-4 ns sonra yaklaşık 4Å değerine ulaşmıştır (Şekil 18). Ligandların RMSD sonuçlarına bakıldığında, glimepiride 100 ns'lik simülasyonda 80 ns civarında küçük bir sıçrama yaşamış olsa bile, bağlanma cebinde kaldığı görülmüştür. Glimepiride, eltrombopag, lurasidone ilaçlarının yaklaşık 2Å değerinde olduğu hesaplanmıştır (Şekil 18).



Şekil 20: NP-ilaç simülasyonunda proteinlerin ve ilaçların RMSD sonucu

Proteinlerin RMSD sonuçları üretim adımı başladıktan yaklaşık 2-3 ns sonra yaklaşık 3Å çevresinde hesaplanmıştır (Şekil 19). Ligandların RMSD sonuçlarına bakıldığında hepsi oldukça kararlı bir şekilde ilk bağlanma bölgesinde kaldığı görülmektedir. Doxazosin, flavin mononükleotid (fmn), pimoziye ilaçları incelendiğinde organik yapısı nedeniyle pimoziye dönebilen açıları nedeniyle yaklaşık 65 ns aralığında farklı konformasyon geliştirmiştir (Şekil 19).



Şekil 21: NP-ilaç simülasyonunda proteinlerin ve ilaçların RMSD sonucu

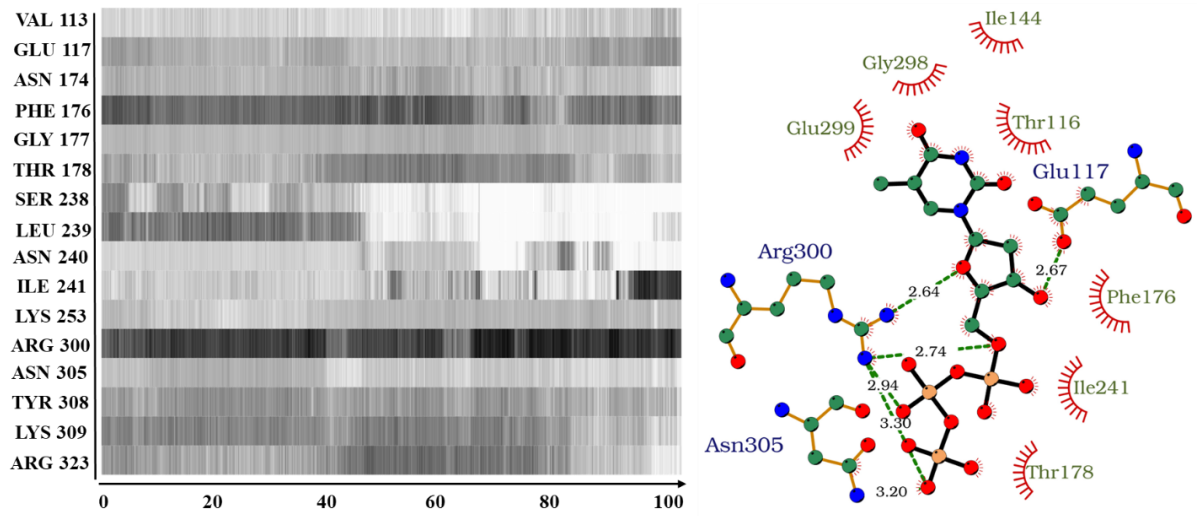
Paliperidone, metacycline ve prednisone ilaçlarının NP ile komplekslerinin proteinleri 100 ns simülasyonda benzer stabilite göstermiştir. Proteinlerin RMSD değerleri Şekil 20'de

gösterilmiştir. İlaçların RMSD değerleri arasından en stabil konformasyonda kalan ilacın metacycline olduğu Şekil 20’de görselleştirilmiştir. Paliperidone ilacı tüm simülasyon boyunca yaklaşık 15 ns ve 22 ns aralıklarında farklı konformasyonlar geliştirse de stabilitesini korumuştur. Paliperidone, metacycline ve prednisone ligandlarının kimyasal yapıları incelendiğinde dönme açısı ile en fazla konformasyon geliştiren paliperidone ligandıdır. RMSD analizleri görselleştirilip değerlendirilmiştir, tüm simülasyonlardaki proteinler 3-4 Å civarında ilaçlar ise 1-2 Å civarındadır. 1-2 Å’luk düşük RMSD değerleri, ligandların simülasyonlar boyunca kenetlenme konformasyonlarını stabil bir şekilde koruduklarını göstermiştir. RMSD analizinden sonra Zaman-Çizelgesi analizi yapılmıştır.

4.2.2. Zaman-Çizelgesi ve Küme Analizi

Zaman-Çizelgesi analizi bir tuz köprüsünün kırılma olayını anlamak, kullanıcı tanımlı seçimdeki protein ve nükleotid kalıntıları listelemek, tüm kalıntıların ikincil yapılarını elde etmek veya ilaçlar ve amino asit kalıntıları arasındaki etkileşimleri değerlendirmek için kullanılır. Küme analizi simülasyon boyunca protein ve ligand için topluluk temsili yapıları elde edilir ve en kalabalık topluluk CHIMERA programı ile görüntülenebilir.

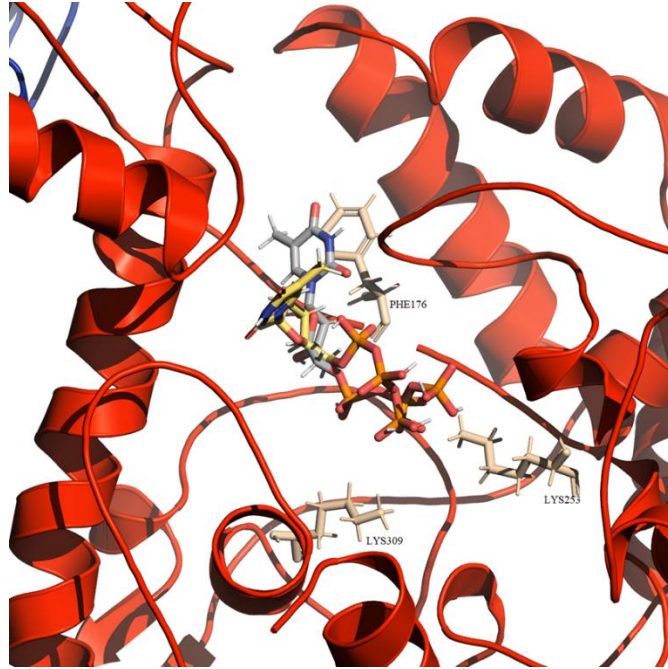
MD simülasyonlarında seçilen amino asitler ve ilaçlar arasındaki etkileşimleri değerlendirmek için, temas sıklığını niceliksel olarak analiz etmek üzere VMD Zaman-Çizelgesi programı kullanılmıştır.



Şekil 22: dTTP ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.

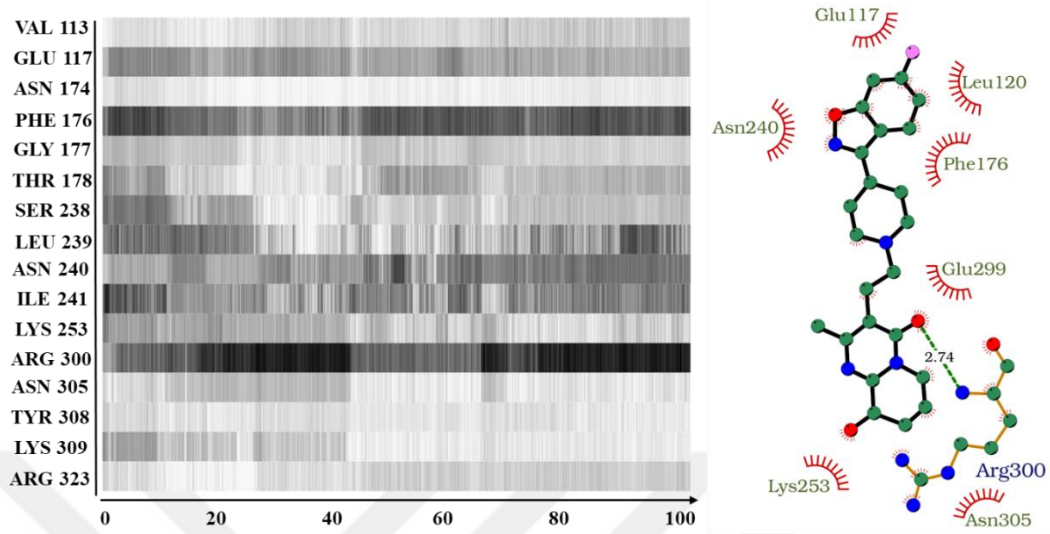
dTTP kontrol simülasyonunun zaman çizelgesi analizi, yerleştirme simülasyonunda gözlemlenen etkileşimlerin simülasyon boyunca neredeyse tamamen korunduğunu göstermiştir (Şekil 21). dTTP ile Thr178, Lys253 ve Arg300 amino asitleri arasında yerleştirme simülasyonunda karakterize edilen hidrojen bağları veya tuz köprüleri etkileşimleri büyük ölçüde bozulmadan kalmıştır. Her ne kadar Ser238, Leu239 ve Asn240 amino asitleri ile etkileşimleri ağırlıklı olarak korunmuş olsa da simüle edilmiş molekülün bazı kısımları, muhtemelen büyük bağlanma cebi sebebiyle çoklu dönebilen bağlar ile yönelme yeteneği nedeniyle bağlantılarını kaybetmiştir. Bununla birlikte, dTTP'nin bağlanma cebinde güvenli bir şekilde kalmasına olanak sağlayan temel etkileşimler korunmuştur.

dTTP ile yapılan bu kontrol simülasyonu yalnızca deney düzeneğini doğrulamakla kalmamıştır aynı zamanda bunun diğer ligand-NP komplekslerine uygulanabilirliğini de önermiştir. Daha sonra CHIMERA kullanılarak küme analizi yapılmıştır ve protein ile ligandın 100 ns'lık simülasyon için topluluk temsili yapıları kümelendirilmiştir. En kalabalık topluluğun temsili yapısı LigPlot ile 2 boyutlu diyagram olarak çizdirilmiştir (Şekil 21) ve Pymol'de 3-boyutlu olarak yerleştirme simülasyonu çıktısı ve MD simülasyonu sonrası kompleks yapılar görüntülenmiştir (Şekil 22).



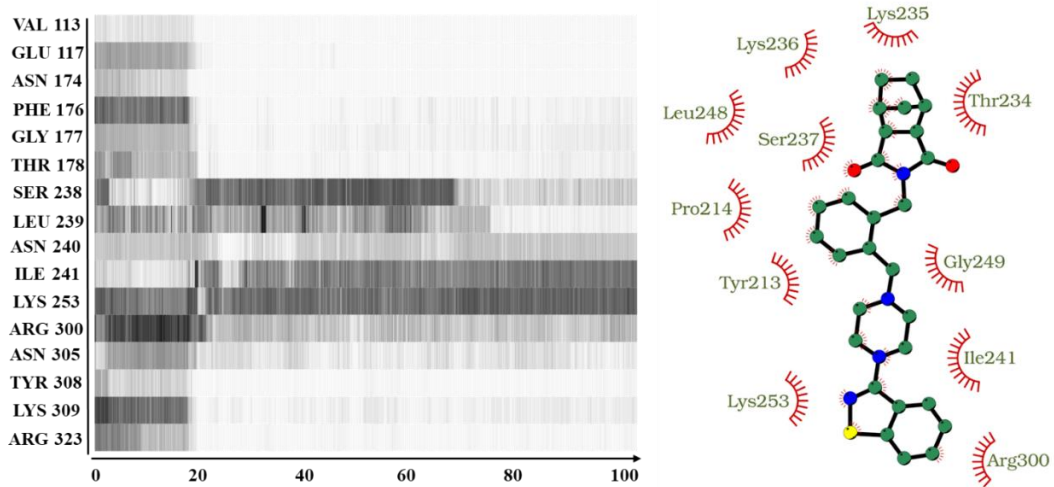
Şekil 23: Yerleştirme simülasyonu ve küme analizi sonrası dTTP ligandlarının karşılaştırılması. Yerleştirme simülasyonu sonucu gri renk ile karbon, kırmızı ile oksijen, mavi ile azot, küme

analizi sonucunda da sarı renk ile karbon, turuncu ile kükürt, pembe ile oksijen atomları gösterilmiştir, ten rengi ile de aktif aminoasitler görselleştirilmiştir.



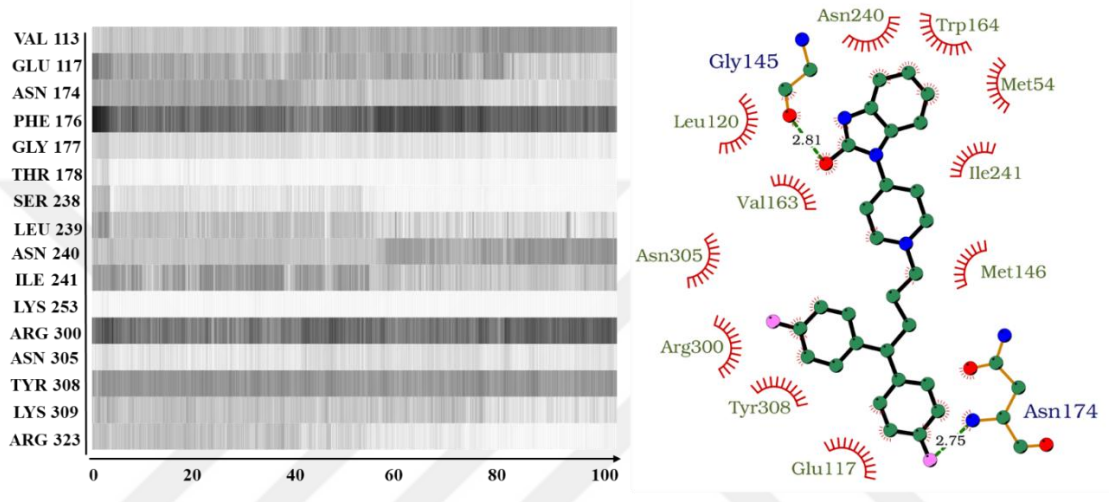
Şekil 24: Paliperidone ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.

NP-Paliperidone kompleksi dışındaki tüm NP-ilac komplekslerinde en az bir hidrojen bağı oluşturan etkileşim korunmuştur (Tablo 3). Asn174, Phe176, Gly177, Thr178, Ser238, Ile241, Lys253, Lys300, Asn305, Arg308, Lys309 ve Arg323 amino asit kalıntıları yan zincirleri veya omurga atomları yoluyla hidrojen bağı oluşturan amino asitler olduğu görülmüştür. Zaman-Çizelgesi analizi, bazı simülasyonlarda ilaç ile etkileşime giren amino asitlerin zaman içerisinde değişiklikler sergilediğini göstermiştir (Şekil 23).



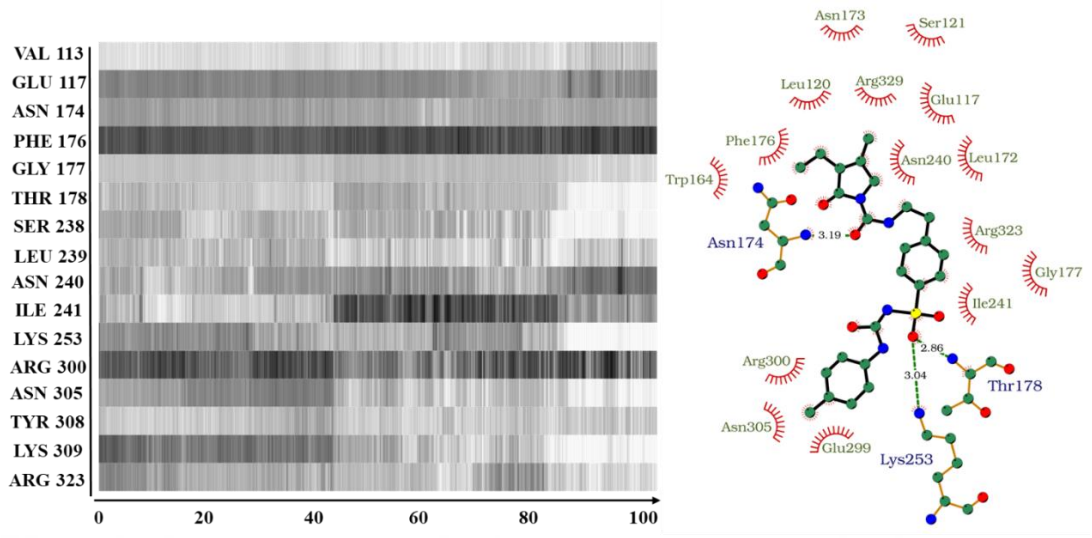
Şekil 25: Lurasidone ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.

NP-lurasidone kompleksinin simülasyonunda molekül ile Val113, Glu117, Tyr308 ve Arg323 amino asitler arasındaki etkileşim simülasyonun ilk 20 ns'ından sonra kaybolmasa bile azalmıştır. Bu değişiklikler, bağlanma cebinin büyük olmasından kaynaklanmaktadır. Büyük bir cep ile dönebilen bağlara sahip esnek moleküller simülasyon boyunca daha uygun bir konum bulmak amacıyla kendilerini yeniden yönlendirilebilirler. Öte yandan, Asn240, Ile241 ve Lys253 amino asitleri ile arasındaki etkileşim simülasyon boyunca korunmuştur (Şekil 24).

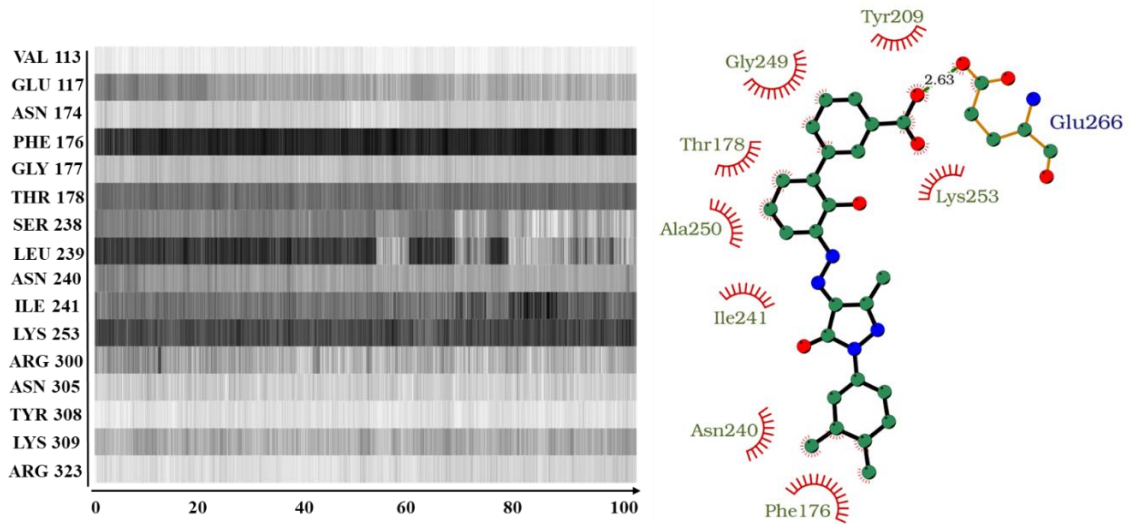


Şekil 26: Pimozide ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.

NP-pimozide kompleksine bakıldığında, pimozide ilacı ile Val113, Phe176, Arg300 ve Thr308 amino asit kalıntıları arasındaki etkileşim sıkı bir şekilde korunmaktadır (Şekil 25). Toplu olarak, zaman-çizelgesi ve küme analizi, seçilen ilaçların, 100 ns NP-ilac simülasyonları üzerinde bağlanma bölgesi amino asitleri ile stabil bir şekilde etkileşime girdiği görülmüştür.

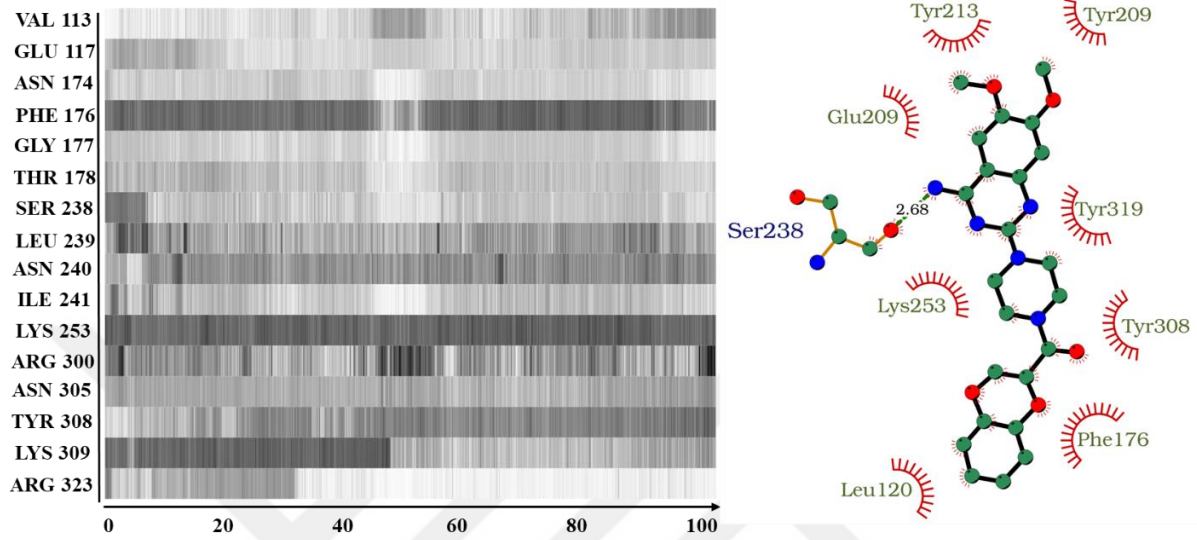


Şekil 27: Glimepiride ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı. NP-glimepiride kompleksinin simülasyonunda molekül ile Thr178, Ser238, Lys253 ve Lys309 amino asitleri arasındaki etkileşim simülasyonun 80 ns'ından sonra kaybolmasa bile azalmıştır (Şekil 26). Bunun sebebi, bağlanma cebi büyük olduğu için dönebilen bağlar ile daha uygun konum bulmak için konformasyon geliştirmesidir. Aynı zamanda, Val113, Glu117, Phe176, Asn240, Ile241 ve Arg300 amino asitleri ile arasındaki etkileşim simülasyon boyunca korunmuştur.



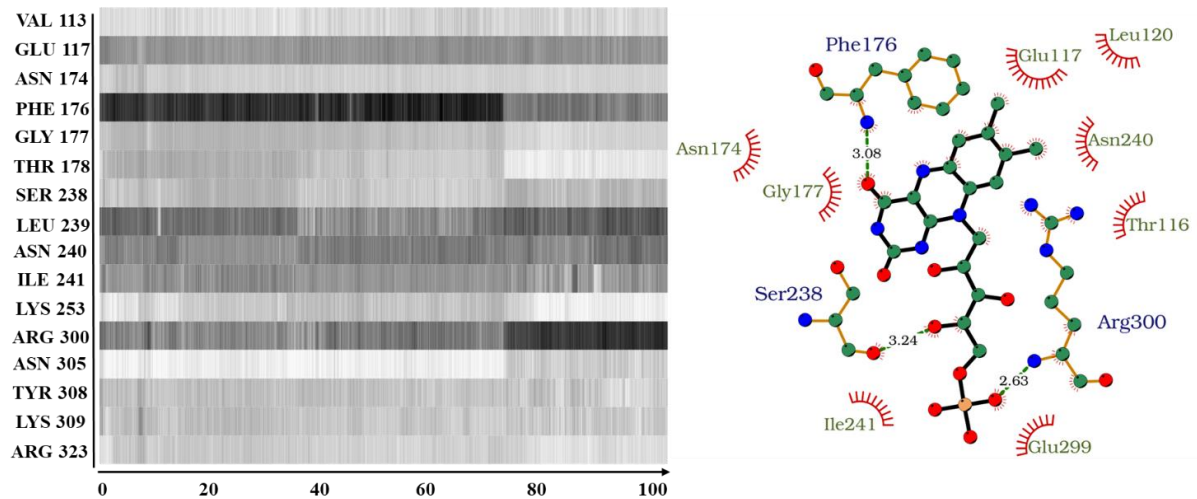
Şekil 28: Eltrombopag ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.

NP-eltrombopag kompleksi simülasyonu, molekülün özellikle Phe176, Thr178, Leu239, Ile241 ve Lys253 amino asitleri ile etkileşiminin korunduğunu göstermiştir. Küme analizi de Leu239 haricinde aynı amino asitlerin korunduğunu kanıtlamıştır (Şekil 27).



Şekil 29: Doxazosin ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.

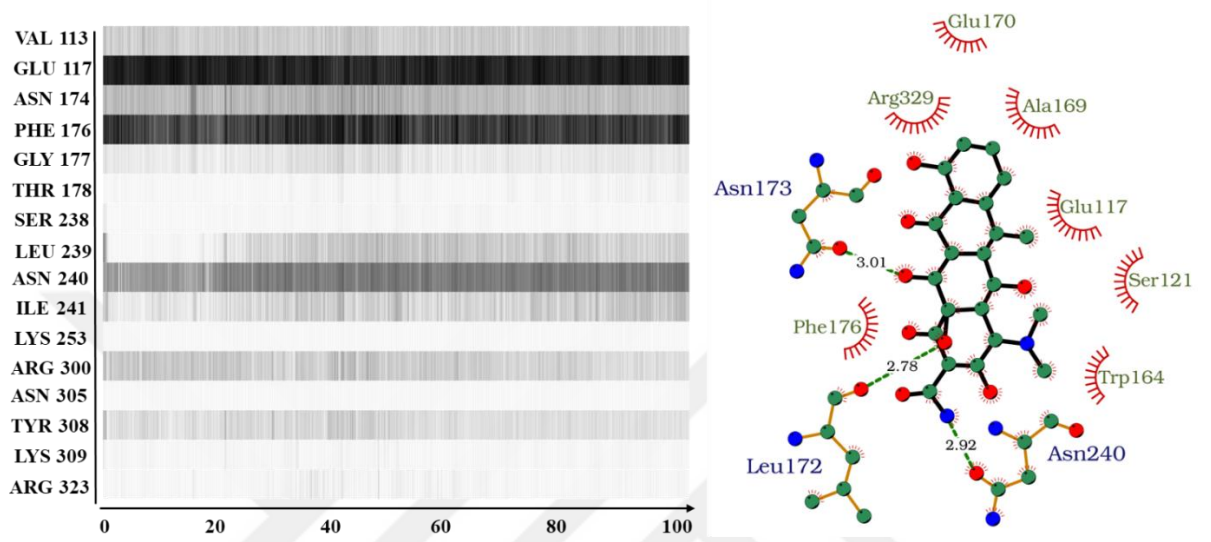
NP-doxazosin simülasyonu ise, molekülün en fazla Phe176 ve Lys253 amino asitleriyle etkileşimini göstermiştir. Arg323 amino asiti ile yaklaşık 35 ns civarında etkileşimi tamamen yok olmamıştır fakat önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 28).



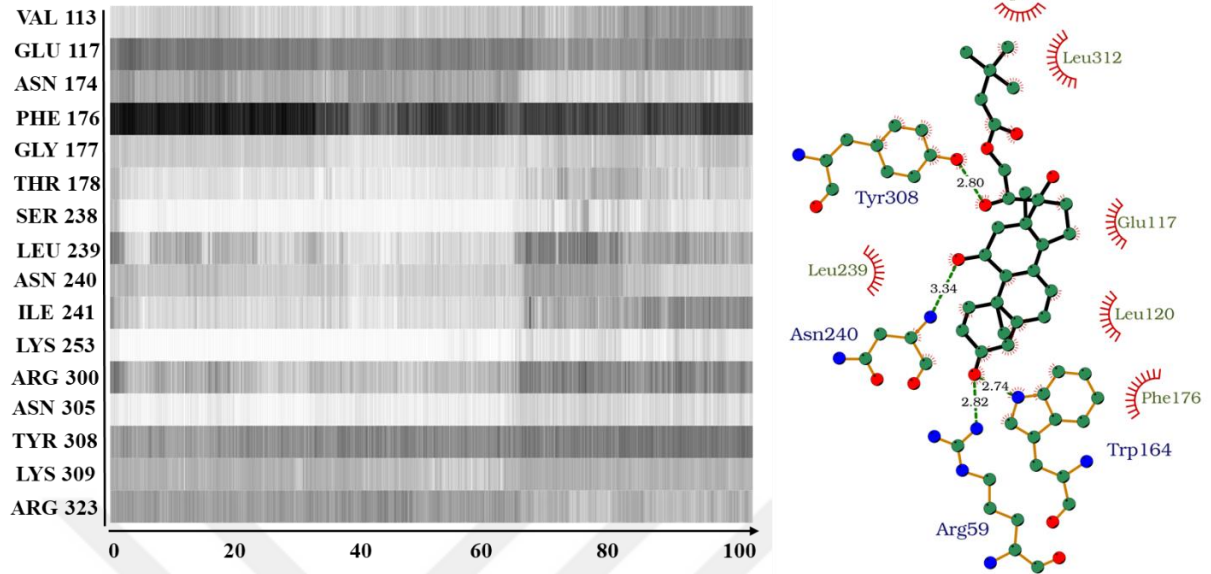
Şekil 30: Fmn ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı.

Fmn ligandının NP ile oluşturduğu kompleksin simülasyonu sonucunda yapılan zaman-çizelgesi analizi, molekül ile Phe176 amino asiti arasında etkileşim simülasyonun 80. ns'inden

sonra azalmıştır fakat etkileşim hala iyi düzeydedir. Aynı şekilde, Arg300 amino asiti de yaklaşık 75-80 ns civarından sonra çok daha iyi bir etkileşim göstermiştir. Küme analizinden çıkan sonuca göre de zaman-çizelgesi analizi ile ortak etkileşimi çıkan amino asitlerin Phe176, Ser238, Asn240 ve Arg300 olduğu görüntülenmiştir (Şekil 29).

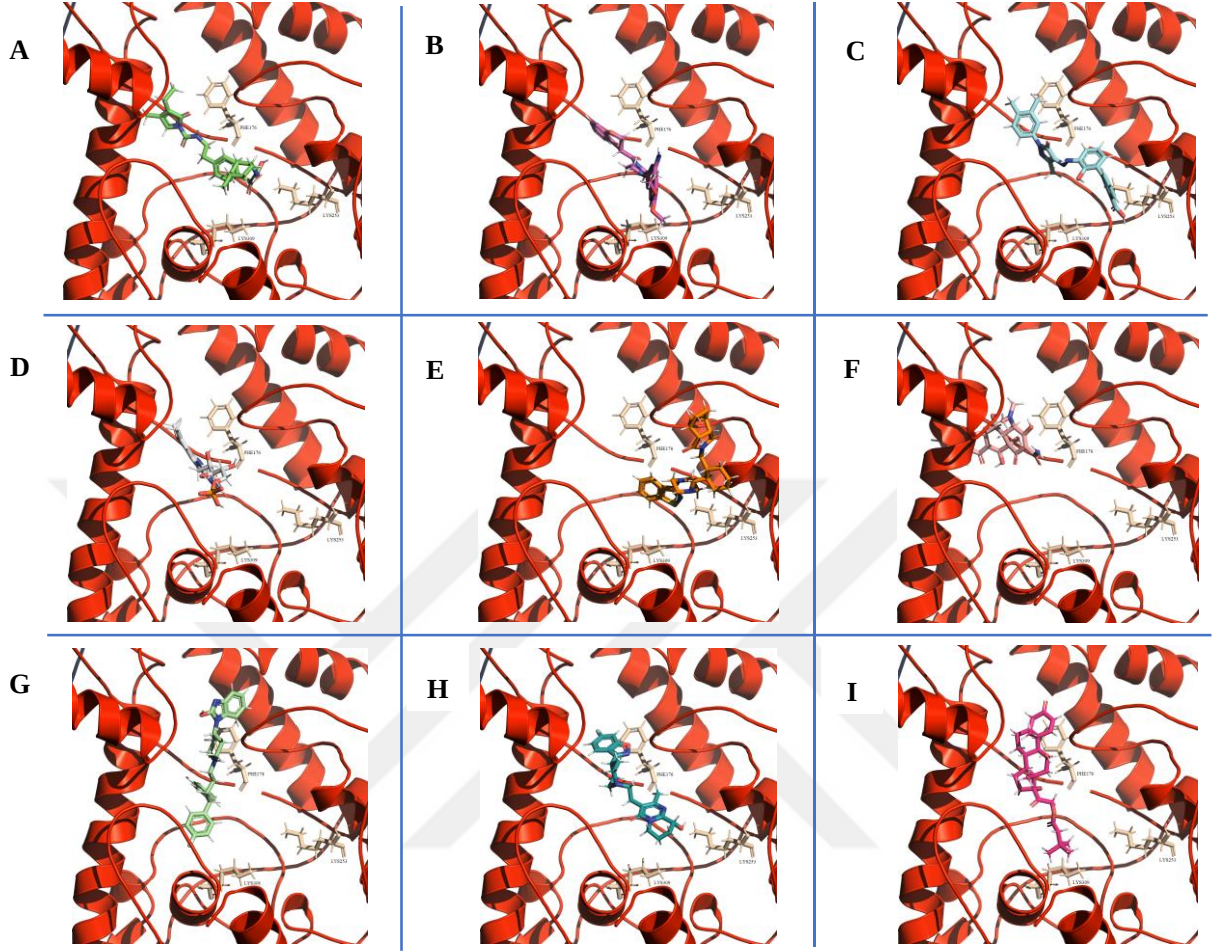


Şekil 31: Metacycline ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı. Metacycline ligandının NP ile kompleksin simülasyonundan çıkan sonucuna göre yapılan zaman-çizelgesi analizi, molekülün özellikle 100 ns simülasyon boyunca Glu117 ve Phe176 ile çok iyi etkileşim içerisinde olduğunu göstermiştir. Asn240 amino asitinin ise Glu117 ve Phe176 amino asitlerine göre daha az etkileşim göstermiş olmasına rağmen iyi etkileşim içerisinde olduğu görülmüştür. Küme analizi ve zaman-çizelgesi analizinin ortak sonuçlarına göre gözlemlenen ise (Şekil 30), Glu117, Phe176 ve Asn240 amino asit kalıntılarının molekül ile simülasyon boyunca etkileşiminin güçlü olduğudur.



Şekil 32: Prednisone ligandının zaman çizelgesi analizi ve küme analizinin 2 boyutlu diyagramı. Prednisone-NP kompleksinin simülasyon boyunca etkileşimi ve küme analizi incelendiğinde ortak etkileşimde olan amino asitlerin Glu117, Phe176, Asn240, Tyr308 ve Arg323 olduğu görülmüştür (Şekil 31).

Protein ile ligandın 100 ns'lık simülasyonu için topluluk temsil yapılar kümelendirilmiştir. En kalabalık topluluk ise Pymol ile 3 boyutlu görselleştirilmiştir. Simülasyon boyunca en kalabalık topluluk aktif bölgede yerini korumuştur. Aktif amino asitler de 3 boyutlu olarak gösterilmiştir (Şekil 32).



Şekil 33: NP-ligand komplekslerinin küme analizi sonuçlarının Pymol’de görselleştirilmesi.

Pymol ile görselleştirilen ligandlar için; beyaz renk ile hidrojen atomları, kırmızı ile oksijen atomları, mavi ile azot atomları, sarı ile kükürt atomları ve turuncu ile fosfor atomları temsil edilmiştir. Karbon atomları glimepiride ligandı için yeşil renk ile (Şekil 32-A), doxazosin için mor renk ile (Şekil 32-B), eltrombopag için açık mavi renk ile (Şekil 32-C), fmn için gri renk ile (Şekil 32-D), lurasidone için turuncu renk ile (Şekil 32-E), metasiklin için pembe renk ile (Şekil 32-F), pimoziide için açık yeşil renk ile (Şekil 32-G), paliperidone için turkuaz renk ile (Şekil 32-H), prednisone için koyu pembe renk (Şekil 32-I) ile temsil edilmiştir.

Küme analizinde görülen temsili yapı, zaman-çizelgesi analizini ve yerleştirme simülasyonu sırasında gözlemlenen etkileşimleri doğrulayarak, hidrojen bağı ve tuz köprüsü oluşumunda yer alan amino asitleri gösterir. Tüm NP-ilaç simülasyonları için aynı analizler yapılmıştır. Yerleştirme simülasyonu, zaman-çizelgesi ve küme analizinde toplu olarak gözlemlenen hidrojen bağı ve van der Waals etkileşimleri Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3: Hidrojen bağı ve van der Waals etkileşimleri

İlaç	Hidrojen bağı	van der Waals
Metacycline	Asn174, Gly177, Arg308	Glu117, Asn 174, Phe176, Tyr308
Eltrombopag	Asn305	Glu117, Thr178, Phe176, Ser238, Lys253, Arg300, Lys311
Glimepiride	Asn174, Thr178, Lys253, Arg323	Glu117, Asn 174, Phe176, Gly177, Arg300, Tyr308
Lurasidone	Thr178, Lys253	Ser238, Leu239, Asn240, Leu241, Arg300
Prednisolone	Arg300	Glu117, Asn174, Gly177, Thr178, Phe176, Asn240, Tyr308, Arg323
Paliperidone	-	Phe176, Asn240, Arg300, Ser238, Gly177, Asn305, Thr178, Lys253
Flavin Mononucleotide	Ser238, Lys253, Lys309, Thr178, Phe176, Arg300	Gly177, Asn174, Tyr308, Asn240, Glu117
Doxazosin	Thr178, Lys309	Glu117, Phe176, Gly177, Ser238, Arg300, Asn305
dTTP	Glu117, Thr178, Ile241, Lys253, Arg300, Lys309	Phe176, Asn240

4.2.3. MMGBSA Hesaplaması ve Alanin Mutasyonu

Seçilen ilaçların ve NP'nin bağlanma afinitesi hakkında daha derin bilgi edinmek için bağlanma serbest enerjilerini (BFE'ler) hesaplamak için Moleküler Mekanik Genelleştirilmiş Doğan Yüzey Alanı (MM/GBSA) yöntemini kullanılmıştır (Tablo 4).

Tablo 4: MM/GBSA metodu ile hesaplanan bağlanma serbest enerjileri listelenmiştir.

İlaç	BFE (kcal/mol)
Dttp	-32,54
Fmn	-32,26
Prednisone	-30,98
Metacycline	-28,65
Pimozide	-27,87
Glimepiride	-27,42
Eltrombopag	-22,04
Lurasidone	-17,14
Paliperidone	-13,63
Doxazosin	-12,06

DTTP'nin BFE'si -32,54 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Seçilen moleküller içinde Fmn, Prednisone, Metasiklin, Pimozide ve Glimepiride ligandları dTTP'ye benzer bağlanma afiniteleri sergilemiştir; ilgili BFE'ler -32,3, -31,0, -28,7, -27,9 ve -27,4 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Diğer ilaçlar ise; eltrombopag, lurasidone, paliperidone ve doxazosin, NP'ye göre dTTP'ninkinden 10 kcal/mol'den daha düşük BFE'ler sergilemiştir (Tablo 4).

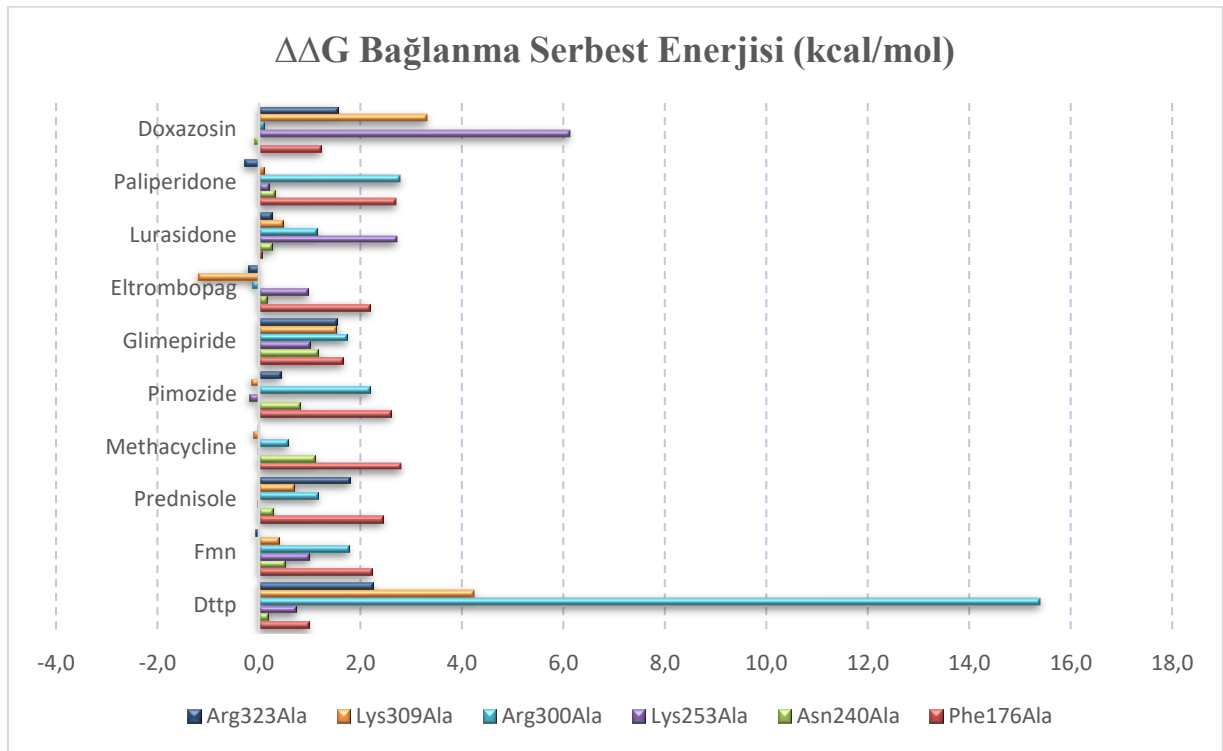
İlaç bağlanmasından sorumlu temel amino asitleri belirlemek için, zaman çizelgesi analizi boyunca ilaçlarla dikkate değer etkileşimler sergileyen amino asitlere odaklanan bir alanin tarama analizi gerçekleştirilmiştir. Bunlar arasında Phe176, Asn240, Lys253, Arg300, Lys309 ve Arg323 amino asitleri daha önce bildirildiği gibi NP'nin enzimatik aktivitesinde belirlenmiş önemleri nedeniyle seçilmiştir (Qi ve diğerleri, 2010). Bu seçilen amino asitlere alanin mutasyonlarının eklenmesinin ardından, mutant NP ile ilaçlar arasındaki bağlanma serbest enerjileri (BFE'ler) hesaplanmıştır ve ardından bağlanma enerjilerindeki değişiklikleri ($\Delta\Delta G$) hesaplanmıştır (Tablo 5). 0'ı aşan bir $\Delta\Delta G$ değeri, mutasyonun etkileşimi istikrarsızlaştırdığını gösterirken, 0'ın altındaki bir $\Delta\Delta G$ değeri, mutasyonun etkileşimi stabilize ettiğini gösterir.

Tablo 5: Alanin mutasyonu sonucu BFE'ler ve $\Delta\Delta G$ değerleri listelenmiştir.

BFE (kcal/mol)/ $\Delta\Delta G$						
İlaç	Mutasyonlar					
	Phe170Ala	Asn240Ala	Lys253Ala	Arg300Ala	Lys309Ala	Arg323Ala
dTTP	-31.6/1.0	-32.4/0.2	-31.8/0.7	-17.1/15.4	-28.3/4.2	-30.3/2.3
Fmn	-30.0/2.2	-31.7/0.5	-31.3/1.0	-30.5/1.8	-31.9/0.4	-32.3/-0.1
Prednisone	-28.5/2.4	-30.7/0.3	-31.0/0.0	-29.8/1.2	-30.3/0.7	-29.2/1.8
Methacycline	-25.9/2.8	-27.5/1.1	-28.7/0.0	-28.1/0.6	-28.8/-0.1	-28.7/-0.1
Pimozide	-25.3/2.6	-27.1/0.8	-28.1/-0.2	-25.7/2.2	-28.0/-0.2	-27.4/-0.4
Glimepiride	-25.8/1.7	-26.3/1.2	-26.4/1.0	-25.7/1.7	-25.9/1.5	-25.9/1.5
Eltrombopag	-19.8/2.2	-21.9/0.1	-21.1/1.0	-22.2/-0.1	-23.2/-1.2	-22.3/-0.2
Lurasidone	-17.1/0.1	-16.9/0.3	-14.4/2.7	-16.0/1.1	-16.7/0.5	-16.9/0.3
Paliperidone	-10.9/2.7	-13.3/0.3	-13.4/0.2	-10.8/2.8	-13.5/0.1	-13.9/0.3
Doxazosin	-10.8/1.2	-12.2/-0.1	-5.9/6.1	-12.0/0.1	-8.8/3.3	-10.5/1.5

Dengede protein-protein etkileşimlerindeki serbest enerji değişimi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilir: $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$, burada ΔG° standart serbest enerji değişimini temsil eder, R gaz sabitidir ve T mutlak sıcaklıktır. Bu formülde $R = 1,987 \times 10^{-3}$ kcal/mol ve $T = 298$ K olarak alındığında, ΔG° 'de (verilerimizde $\Delta\Delta G$) $\sim 0,5$ kcal/mol'lük bir artış, ligand bağlı protein durumunda iki kat azalmaya neden olur. Bu nedenle, $\Delta\Delta G > 0,5$ kcal/mol'e yol açan mutasyonları, ilaç-protein bağlanması için kritik amino asitler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 33).

Tablo 6: İlaç NP bağlanmasında kritik kalıntıların BFE'ye katkısı.



Hesaplamalar, Phe176'nın lurasidone hariç seçilen diğer ilaçların NP'ye bağlanmasında çok önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Phe176 dışında seçilen tüm amino asitler ilaç bağlanması üzerinde farklı etkiler sergilemiştir. Arg300Ala, Lys309Ala ve Arg323Ala mutasyonları, dTTP'nin BFE'sinde sırasıyla 15,4, 4,2 ve 2,3 kcal/mol gibi dikkate değer değişikliklere neden olmuştur. Lys253Ala, BFE'yi 0,5'ten fazla değiştirirken Asn240Ala, doğal bağlayıcı nükleotid dTTP'nin BFE'sinde hafif bir değişikliğe neden olmuştur. Fmn için, Lys 309 ve Arg323 hariç seçilen tüm amino asitler, bağlanma serbest enerjisine (BFE) 0,5 kcal/mol'ü aşan önemli katkılarda bulunmuştur; Phe176 ise en belirgin katkıyı yapmıştır (2,2 kcal/mol). Prednisone dikkate alındığında, Phe176 (2,4 kcal/mol), Arg323 (1,8 kcal/mol), Arg300 (1,2 kcal/mol) ve Lys309 (0,7 kcal/mol) amino asitleri, bu sırayla NP bağlanmasına en

önemli katkıları sergilemiştir. Özellikle Asn240 ve Lys253, BFE'ye katkıda bulunmadığı görülmüştür. Phe176 (2,8 kcal/mol), Asn240 (1,1 kcal/mol) ve Arg300 (0,6 kcal/mol) amino asitleri bu açıdan Metasiklin ligandının BFE'sine en fazla katkıda bulunan amino asitler olmuştur. Pimozide için Phe176 (2,6 kcal/mol), Arg300 (2,2 kcal/mol) ve Asn240 (0,8 kcal/mol) BFE'ye kritik katkı yapmıştır. Alanin taraması için seçilen tüm amino asitler, Glimepiride'in BFE'sinde 1 kcal/mol'den fazla değişikliğe neden olmuştur. Phe176 (2,2 kcal/mol) ve Lys253 (1,0 kcal/mol), Eltrombopag'ın BFE'sine katkıda bulunan amino asitlerdir. Şaşırtıcı bir şekilde, Lys309Ala mutasyonu olumlu bir BFE ($\Delta\Delta G = -1,2$ kcal/mol) ile sonuçlanmıştır; bu, Lys309 ile Eltrombopag arasındaki etkileşimin simülasyon boyunca olumsuz gözlemlendiğini göstermiştir. Lys253 (2,7 kcal/mol), Arg300 (1,1 kcal/mol) ve Lys309 (0,5 kcal/mol), Lurasidone-NP bağlanmasına kritik katkıda bulunduğu görülmüştür. Arg300 (2,8 kcal/mol) ve Phe176 (2,7 kcal/mol), Paliperidon'un BFE'sinde dikkate değer değişikliklere neden olmuştur. Her ne kadar Doxazosin, analiz edilen ilaçlar arasında NP için en düşük afiniteyi (-10,8 kcal/mol) gösterse de, Lys253Ala mutasyonu, bağlanma serbest enerjisinde (BFE) kritik bir değişime yol açarak afiniteye 6,1 kcal/mol'lük önemli bir düşüşe yol açmıştır. Ek olarak Lys309 (3,3 kcal/mol), Arg323Ala (1,5 kcal/mol) ve Phe 170 (1,2 kcal/mol) BFE'yi belirgin şekilde değiştirdi. Toplu olarak analizimiz, seçilen her ilacın farklı amino asitlerle kritik olarak etkileşime girdiğini göstermiştir. Phe176 ve Arg300, ilaçlar arasında bağlanma serbest enerjisine (BFE) en önemli katkıyı yapan iki amino asit olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 6).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lassa virüsü (LASV), insanlarda Lassa ateşinden sorumlu olan ve öncelikle kemirgen dışkılarıyla temas yoluyla bulaşan zoonotik bir virüstür (Ogbu, Ajuluchukwu vd., 2007). Enfeksiyon önleme tedbirlerinin bulunmadığı sağlık bakım ortamlarında insandan insana bulaşma meydana gelebilir (McCormick, King vd., 1987). Bu, yılda tahmini 100.000-300.000 LASV enfeksiyonu ve 5.000 Lassa ateşi virüsüne bağlı ölümle Afrika'da önemli bir sağlık tehdididir (Department of Health ve Human Services 2023). LASV, artan küresel hareket nedeniyle önem kazanmıştır. Şu an itibariyle, hastalığın erken evrelerindeki ribavirin tedavisi dışında Lassa ateşi için onaylanmış herhangi bir ilaç veya aşı mevcut değildir (McCormick, King vd., 1986). Geleneksel ilaç geliştirme süreciyle ilişkili zaman ve ekonomik kısıtlamalar göz önüne alındığında, bu çalışmada özellikle NP hedeflenmiştir ve mevcut ilaçların potansiyel olarak yeniden tasarlanma potansiyelini araştırmak için FDA onaylı ilaçlarla *in siliko* yerleştirme ve moleküler dinamik deneyler yapılmıştır. FDA onaylı ilaç molekülleri NP'nin N-terminaline ve C-terminaline (PDB ID:3MX2) yerleştirilmiştir ve bağlanma afiniteleri hesaplanmıştır. Bu çalışmada N-terminal alanındaki tüm analizler için kontrol olarak dTTP kullanılmıştır. Kontrol olarak dTTP nükleotidi ile yapılan yerleştirme simülasyonu, RMSD'si 1,8 Å ve bağlama enerjisi -10,3 kcal/mol olan kristal yapıya benzer bir bağlanma modunu ortaya çıkarmıştır (Şekil 11A). C alanı için bağlanma enerjileri, ZINC/İlaç isimleri, yapıları ve tıbbi uygulamalarıyla birlikte ilk 25 molekülün bir listesi Tablo 1'de verilmiştir, N alanı için ise aynı şekilde, ilk 100 molekülün listesi Tablo 2'de listelenmiştir. Kanser önleyici anti-kanser gibi yan etkilere duyarlı bileşikler hariç, yaygın olarak tanınan ve iyi tolere edilen ilaçlara odaklanılmıştır. Fark edilebilir kenetlenme bağlanma enerjilerine sahip ilaçlar metasiklin, eltrombopag, glimepiride, lurasidone, paliperidone, prednisone, doxazosin, fmn ve pimozide -12,3 ile -10,3 kcal/mol arasında bağlanma afiniteleri sergilemiştir (Tablo 2). MD simülasyonları sırasında, C alanı için seçilen ilaçlar MD simülasyonu sırasında aktif bölgeden uzaklaştığı için simülasyon sonrası analizleri tamamlanamamıştır. N alanı için ise, seçilen ilaçlar 100 ns süren simülasyonda aktif bölgeden uzaklaşmamıştır ve MD simülasyonu sonrasında RMSD analizi, Zaman-Çizelgesi analizi, Küme analizi ve MM/GBSA ve Alanin hesaplamaları yapılmıştır. Genel olarak zaman çizelgesi ve küme analizleri, seçilen ilaçların 100 ns'lik ilaç-NP simülasyonları boyunca bağlanma bölgesindeki amino asitlerle tutarlı bir şekilde etkileşime girdiğini göstermiştir. İlaç-NP bağlanmasının gücünü değerlendirmek amacıyla aralarındaki BFE'leri hesaplamak için MM/GBSA yöntemi kullanılmıştır. DTTP için BFE'nin -32,5

kcal/mol olduğu belirlenmiştir. Seçilen moleküller arasında Fmn, Prednisone, Metasiklin, Pimozide ve Glimepiride, sırasıyla -32,3, -31,0, -28,7, -27,9 ve -27,4 kcal/mol BFE'lerle dTTP'ye benzer bağlanma afiniteleri göstermiştir (Tablo 4). İlaç bağlanmasından sorumlu kritik amino asitleri tanımlamak için, zaman çizelgesi analizinde gözlemlenen ilaçlarla önemli etkileşimlere sahip amino asitlere odaklanan bir alanin tarama analizi yapılmıştır. Phe176, Asn240, Lys253, Arg300, Lys309 ve Arg323, NP enzimatik aktivitesinde bilinen önemleri nedeniyle seçilmiştir. Bu amino asitlere *in siliko* alanin mutasyonları uygulanmıştır ve mutant NP ile ilaçlar arasındaki bağlanma enerjilerindeki ($\Delta\Delta G$) değişiklikler hesaplanmıştır (Tablo 6). Yapılan analiz, Phe176'nın, lurasidone dışında seçilen ilaçların NP'ye bağlanmasında çok önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Seçilen diğer amino asitlerin ilaç bağlanması üzerinde çeşitli etkileri görülmüştür. Özetle, analiz seçilen her ilaç ile çeşitli amino asitler arasındaki önemli etkileşimleri vurgulamıştır. Özellikle Phe176 ve Arg300, hem dTTP hem de ilaçlar için bağlanma serbest enerjisinin (BFE) belirlenmesinde sürekli olarak önemli roller oynamıştır (Tablo 6). Bu amino asitlerin doğal ligand dTTP'ye bağlanmada tamamlayıcı oldukları ve NP'nin enzimatik fonksiyonu için gerekli oldukları göz önüne alındığında, dTTP'ye benzer BFE seviyeleri sergileyen seçilmiş ilaçlar, özellikle Fmn, Prednisone, Metacycline, Pimozide ve Glimepiride ilaçlarının sonuçlarının umut verici olduğu görülmüştür. Bu *in siliko* bulguları, bu moleküllerin LASV'ye karşı güçlü inhibitörler olma potansiyelini güçlü bir şekilde vurgulamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada tanımlanan ilaçlar, deneysel ve klinik araştırmalarda daha ileri değerlendirmeler için önceliklendirilmeyi hak etmektedir. |

6. KAYNAKLAR

- Acciani, M., vd., (2017). "Mutational analysis of Lassa virus glycoprotein highlights regions required for alpha-dystroglycan utilization." *Journal of virology* 91(18): 10.1128/jvi.00574-00517.
- Basler, C. F. (2017). Molecular pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Seminars in immunopathology*, Springer.
- Bederka, L. H., vd., (2014). "Arenavirus stable signal peptide is the keystone subunit for glycoprotein complex organization." *MBio* 5(6): 10.1128/mbio.02063-02014.
- Beyer, W. R., vd., (2003). "Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P." *Journal of virology* 77(5): 2866-2872
- Buchmeier, M. (2007). "Arenaviridae: the viruses ve their replication." *Fields virology*: 1792-1827.
- Buchmeier, M., vd., (2007). *Fields Virology*, Vol. II, edited by DM Knipe & PM Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Buckley, S. M. ve J. Cabals (1970). "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. III. Isolation ve characterization of the virus." *American Journal of Tropical Medicine ve Hygiene* 19(4): 680-691.
- Burri, D. J., vd., (2013). "The role of proteolytic processing ve the stable signal peptide in expression of the Old World arenavirus envelope glycoprotein ectodomain." *Virology* 436(1): 127-133.
- Cao, W., vd., (1998). "Identification of α -dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus ve Lassa fever virus." *Science* 282(5396): 2079-2081.
- Case, D. A., vd., (2005). "The Amber biomolecular simulation programs." *Journal of computational chemistry* 26(16): 1668-1688.
- Cashman, K. A., vd., (2018). "Immune-mediated systemic vasculitis as the proposed cause of sudden-onset sensorineural hearing loss following Lassa virus exposure in cynomolgus macaques." *MBio* 9(5): 10.1128/mbio.01896-01818.
- Cohen-Dvashi, H., vd., (2015). "Molecular mechanism for LAMP1 recognition by Lassa virus." *Journal of virology* 89(15): 7584-7592.
- Cohen-Dvashi, H., vd., (2016). "Role of LAMP1 binding ve pH sensing by the spike complex of Lassa virus." *Journal of virology* 90(22): 10329-10338.
- Cosset, F.-L., vd., (2009). "Characterization of Lassa virus cell entry ve neutralization with Lassa virus pseudoparticles." *Journal of virology* 83(7): 3228-3237.

- Crow, Y. J. ve J. Rehwinkel (2009). "Aicardi-Goutieres syndrome ve related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity." *Human molecular genetics* 18(R2): R130-R136.
- de Silva, U., vd., (2007). "The crystal structure of TREX1 explains the 3' nucleotide specificity ve reveals a polyproline II helix for protein partnering." *Journal of Biological Chemistry* 282(14): 10537-10543.
- DeLano, W. L. (2009). PyMOL molecular viewer: Updates ve refinements. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA.
- Department of Health ve Human Services, C. f. D. C. a. P. (2023, April 26, 2022). "Lassa Fever." Retrieved October 4, 2023, 2023, from <https://www.cdc.gov/vhf/lassa/index.html>.
- Fan, J., vd., (2019). "Progress in molecular docking." *Quantitative Biology* 7: 83-89.
- Fechter, P. ve G. G. Brownlee (2005). "Recognition of mRNA cap structures by viral ve cellular proteins." *Journal of General Virology* 86(5): 1239-1249.
- Fedeli, C., vd., (2020). "The Role of Receptor Tyrosine Kinases in Lassa Virus Cell Entry." *Viruses* 12(8).
- Fichet-Calvet, E. ve D. J. Rogers (2009). "Risk maps of Lassa fever in West Africa." *PLoS neglected tropical diseases* 3(3): e388.
- Frame, J. D., vd., (1970). "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description ve pathological findings." *American Journal of Tropical Medicine ve Hygiene* 19(4): 670-676.
- Garry, R. F. (2023). "Lassa fever—the road ahead." *Nature Reviews Microbiology* 21(2): 87-96.
- Genheden, S. ve U. Ryde (2015). "The MM/PBSA ve MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities." *Expert opinion on drug discovery* 10(5): 449-461.
- Glass, G. E., vd., (2000). "Using remotely sensed data to identify areas at risk for hantavirus pulmonary syndrome." *Emerging infectious diseases* 6(3): 238.
- Green, T. J., vd., (2006). "Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex." *Science* 313(5785): 357-360.
- Guilligay, D., vd., (2008). "The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2." *Nature structural & molecular biology* 15(5): 500-506.
- Gul, S. (2021). "In silico drug repositioning against human NRP1 to block SARS-CoV-2 host entry." *Turk J Biol* 45(4): 442-458.

- Gul, S., vd., (2020). "The Arg-293 of Cryptochrome1 is responsible for the allosteric regulation of CLOCK-CRY1 binding in circadian rhythm." *Journal of Biological Chemistry* 295(50): 17187-17199.
- Gul, S. ve I. H. Kavakli (2022). The structure-based molecular-docking screen against core clock proteins to identify small molecules to modulate the circadian clock. *Circadian Regulation: Methods ve Protocols*, Springer: 15-34.
- Gul, S., vd., (2021). "In silico identification of widely used ve well-tolerated drugs as potential SARS-CoV-2 3C-like protease ve viral RNA-dependent RNA polymerase inhibitors for direct use in clinical trials." *Journal of Biomolecular Structure ve Dynamics* 39(17): 6772-6791.
- Gul, S., vd., (2021). "Structure-based design ve classifications of small molecules regulating the circadian rhythm period." *Scientific reports* 11(1): 18510.
- Haas, W. H., vd., (2003). "Imported Lassa fever in Germany: surveillance ve management of contact persons." *Clinical infectious diseases* 36(10): 1254-1258.
- Hall, T. M. T. (2005). "Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins." *Current opinion in structural biology* 15(3): 367-373.
- Hansson, T., vd., (2002). "Molecular dynamics simulations." *Current opinion in structural biology* 12(2): 190-196.
- Hass, M., vd., (2004). "Replicon system for Lassa virus." *Journal of virology* 78(24): 13793-13803.
- Hastie, K. M., vd., (2016). "Crystal structure of the prefusion surface glycoprotein of the prototypic arenavirus LCMV." *Nature structural & molecular biology* 23(6): 513-521.
- Hastie, K. M., vd., (2011). "Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2396-2401.
- Hastie, K. M., vd., (2017). "Structural basis for antibody-mediated neutralization of Lassa virus." *Science* 356(6341): 923-928.
- Huey, R., vd., (2012). "Using AutoDock 4 ve AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial." *The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory* 10550(92037): 1000.
- Humphrey, W., vd., (1996). "VMD: visual molecular dynamics." *Journal of molecular graphics* 14(1): 33-38.
- Igonet, S., vd., (2011). "X-ray structure of the arenavirus glycoprotein GP2 in its postfusion hairpin conformation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(50): 19967-19972.

- Israeli, H., vd., (2017). "Mapping of the Lassa virus LAMP1 binding site reveals unique determinants not shared by other old world arenaviruses." *PLoS pathogens* 13(4): e1006337.
- Iwasaki, M., vd., (2014). "Sodium hydrogen exchangers contribute to arenavirus cell entry." *Journal of virology* 88(1): 643-654.
- Jae, L. T., vd., (2014). "Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch." *Science* 344(6191): 1506-1510.
- Jo, S., vd., (2008). "CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM." *Journal of computational chemistry* 29(11): 1859-1865.
- Karplus, M. ve G. A. Petsko (1990). "Molecular dynamics simulations in biology." *Nature* 347(6294): 631-639.
- Katz, M., vd., (2022). "Structure ve receptor recognition by the Lassa virus spike complex." *Nature* 603(7899): 174-179.
- Kranzusch, P. J., vd., (2010). "Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(46): 20069-20074.
- Kuhn, J. H., vd., (2020). "2020 taxonomic update for phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales ve Mononegavirales." *Archives of virology* 165(12): 3023-3072.
- Kunz, S. (2009). "Receptor binding ve cell entry of Old World arenaviruses reveal novel aspects of virus–host interaction." *Virology* 387(2): 245-249.
- Kunz, S., vd., (2005). "Characterization of the interaction of Lassa fever virus with its cellular receptor α -dystroglycan." *Journal of virology* 79(10): 5979-5987.
- Laskowski, R. A. ve M. B. Swindells (2011). *LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery*, ACS Publications.
- Lelke, M., vd., (2010). "An N-terminal region of Lassa virus L protein plays a critical role in transcription but not replication of the virus genome." *Journal of virology* 84(4): 1934-1944.
- Loureiro, M. E., vd., (2019). "Virus(-)Host Interactions Involved in Lassa Virus Entry ve Genome Replication." *Pathogens* 8(1).
- McCormick, J. B., vd., (1987). "A case-control study of the clinical diagnosis ve course of Lassa fever." *Journal of Infectious Diseases* 155(3): 445-455.
- McCormick, J. B., vd., (1986). "Lassa fever." *New England Journal of Medicine* 314(1): 20-26.
- Messina, E. L., vd., (2012). "Dissection of the role of the stable signal peptide of the arenavirus envelope glycoprotein in membrane fusion." *Journal of virology* 86(11): 6138-6145.

- Meyer, B. J. ve P. J. Southern (1993). "Concurrent sequence analysis of 5' and 3' RNA termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases ve 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mRNAs." *Journal of virology* 67(5): 2621-2627.
- Monath, T. P., vd., (1974). "Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone." *Science* 185(4147): 263-265.
- Morin, B., vd., (2010). "The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription." *PLoS pathogens* 6(9): e1001038.
- Morris, G. M., vd., (2009). "AutoDock4 ve AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." *Journal of computational chemistry* 30(16): 2785-2791.
- Ogbu, O., vd., (2007). "Lassa fever in West African sub-region: an overview." *Journal of vector borne diseases* 44(1): 1.
- Oppliger, J., vd., (2016). "Lassa virus cell entry via dystroglycan involves an unusual pathway of macropinocytosis." *Journal of virology* 90(14): 6412-6429.
- Pasqual, G., vd., (2011). "Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body ve depend on the endosomal sorting complex required for transport." *PLoS pathogens* 7(9): e1002232.
- Pattis, J. G. ve E. R. May (2020). "Markov State Model of Lassa Virus Nucleoprotein Reveals Large Structural Changes during the Trimer to Monomer Transition." *Structure* 28(5): 548-554 e543.
- Pettersen, E. F., vd., (2004). "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research ve analysis." *Journal of computational chemistry* 25(13): 1605-1612.
- Phillips, J. C., vd., (2020). "Scalable molecular dynamics on CPU ve GPU architectures with NAMD." *The Journal of chemical physics* 153(4).
- Plotch, S. J., vd., (1981). "A unique cap (m⁷GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription." *Cell* 23(3): 847-858.
- Polyak, S. J., vd., (1995). "5' termini of Pichinde arenavirus S RNAs ve mRNAs contain nontemplated nucleotides." *Journal of virology* 69(5): 3211-3215.
- Qi, X., vd., (2010). "Cap binding ve immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure." *Nature* 468(7325): 779-783.
- Rappe, A. K. ve W. A. Goddard III (1991). "Charge equilibration for molecular dynamics simulations." *The Journal of Physical Chemistry* 95(8): 3358-3363.
- Rojek, J. M. ve S. Kunz (2008). "Cell entry by human pathogenic arenaviruses." *Cellular microbiology* 10(4): 828-835.

- Seeliger, D. ve B. L. de Groot (2010). "Ligand docking ve binding site analysis with PyMOL ve Autodock/Vina." *Journal of computer-aided molecular design* 24(5): 417-422.
- Shimajima, M., vd., (2012). "Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry." *Journal of virology* 86(4): 2067-2078.
- Smelt, S. C., vd., (2001). "Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor α -dystroglycan correlate with viral tropism ve disease kinetics." *Journal of virology* 75(1): 448-457.
- Smither, A. R. ve A. R. Bell-Kareem (2021). *Ecology of Lassa virus*, Springer.
- Stephenson, E. H., vd., (1984). "Effect of environmental factors on aerosol-induced Lassa virus infection." *Journal of medical virology* 14(4): 295-303.
- Stetson, D. B., vd., (2008). "Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity." *Cell* 134(4): 587-598.
- Sullivan, B. M., vd., (2011). "Point mutation in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is necessary for receptor binding, dendritic cell infection, ve long-term persistence." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(7): 2969-2974.
- Torriani, G., vd., (2017). "Lassa Virus Cell Entry Reveals New Aspects of Virus-Host Cell Interaction." *J Virol* 91(4).
- Trott, O. ve A. J. Olson (2010). "AutoDock Vina: improving the speed ve accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, ve multithreading." *Journal of computational chemistry* 31(2): 455-461.
- Waterhouse, A., vd., (2018). "SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures ve complexes." *Nucleic Acids Research* 46(W1): W296-W303.
- WHO (2023). "Lassa Fever ". Retrieved 03.10.2023, 2023, from <https://www.who.int/health-topics/lassa-fever/>.
- York, J., vd., (2004). "The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated ve forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex." *Journal of virology* 78(19): 10783-10792.
- Yun, N. E. ve D. H. Walker (2012). "Pathogenesis of Lassa fever." *Viruses* 4(10): 2031-2048. |

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Handan ŞİMŞEK
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik-Mimarlık Fakültesi
Bölümü	Biyomedikal Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	13.07.2020

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Biyoteknoloji

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	