



***İN SİLİKO* MODELLEME YAKLAŞIMIYLA YENİ
VE SEÇİCİ PROTEİN TİROZİN FOSFATAZ 1B
İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra AKYOL

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Ana Bilim Dalı
Dr. Öğr Üyesi Deryanur KILIÇ
2021
(Her hakkı saklıdır.)**

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

***İN SİLİKO* MODELLEME YAKLAŞIMIYLA YENİ VE SEÇİCİ PROTEİN TİROZİN
FOSFATAZ 1B İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of New and Selective Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors Using *In Silico* Modeling Approach)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra AKYOL

Danışman: Dr. Öğr Üyesi Deryanur KILIÇ

Erzurum
Aralık, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Kübra AKYOL tarafından hazırlanan “İn Siliko Modelleme Yaklaşımıyla Yeni ve Seçici Protein Tirozin Fosfataz 1B İnhibitörlerinin Araştırılması” başlıklı çalışması **24.12.2021** tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU
Atatürk Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Danışman: Dr. Öğr Üyesi Deryanur KILIÇ
Atatürk Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

Jüri Üyesi: Dr. Öğr Üyesi Mert GÜR
İstanbul Teknik Üniversitesi

Aslı ıslak imzalıdır

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

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

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2021-9059

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı ıslak imzalıdır

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr. Öğr Üyesi Deryanur KILIÇ danışmanlığında sunulan “İn siliko modelleme yaklaşımıyla yeni ve seçici Protein Tirozin Fosfataz 1B inhibitörlerinin araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	5	30
Materyal ve Yöntem	5	35
Bulgular	2	20
Tartışma	2	20
Tezin Geneli	4	25

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

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

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Kübra AKYOL	Dr. Öğr Üyesi Deryanur KILIÇ
24.12.2021	24.12.2021
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

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

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

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresince bilgi birikimi ve tecrübesiyle yaptığı katkıların faydasını her zaman yaşadığım, danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Deryanur KILIÇ’a gönülden teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübesiyle destek olan, her zaman güler yüzü ile karşılayan değerli hocam Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU’ na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bize değerli zamanından ayırıp deneyimini koşulsuzca paylaşan Sayın Öğr. Gör. Dr. Özgür Fırat ÖZPOLAT ‘a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca bana desteğini ve fedakârlıklarını esirgemeyen ve tez yazma sürecimde sürekli yanımda olan Annem Mahinur AKYOL’a, maddi ve manevi olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, beni motive eden ve daima güvenen Babam Dursun Murat AKYOL’a ve kardeşlerime en kalbi duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans sürecinden beri tanıdığım ve araştırma sürecinde desteklerini esirgemeyen beni motive eden uzakları yakın kılan destek olan değerli arkadaşlarım Gamze DADAŞOĞLU ve Gülsüm TUNEĞ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kübra AKYOL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***İN SİLİKO* MODELLEME YAKLAŞIMIYLA YENİ VE SEÇİCİ PROTEİN TİROZİN FOSFATAZ 1B İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra AKYOL

Danışman: Dr. Öğr Üyesi Deryanur KILIÇ

Amaç: Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B), Tip II diyabet, obezite ve kanser terapötikleri için umut verici bir hedeftir. Bununla birlikte, PTP1B inhibitör keşfinde T hücre proteini tirozin fosfataz (TCPTP) üzerindeki seçiciliği yakalamak, inhibitör geliştirme süreci için önemli bir görevdir. Mevcut çalışmalar, fosfotirozin (pTyr) bağlanma bölgesinin inhibitörlere seçicilik kazandırdığını göstermektedir. Bu amaçla, DrugBank'taki ilaçlar, PTP1B'nin yeni seçici inhibitörlerini belirlemek için sanal doking araçları kullanılarak aktif ve pTyr bölgesine yerleştirildi.

Yöntem: Drugbank databazındaki tüm ilaçlar indirildi, Ligprep kullanılarak 2B yapıları 3B'a çevrildi ve farklı konformasyonları elde edildi. PTP1B ve TCPTP kristal yapıları önce Schrödinger yazılımı tarafından sağlanan Protein Yapı Hazırlama Sihirbazı kullanılarak hazırlandı ve sırasıyla Glide doking algoritmaları (HTVS, SP ve XP) uygulandı. Yüksek Verimli Sanal Tarama (HTVS) sonucunda listelenen ilaçların ilk %10'unu tutuldu. Ardından bu bileşikler Standart hassasiyet (SP) ile tarandı ve yine ilaçların ilk %10'unu tutuldu. Elde edilen sonuçlar incelendi, teşhis ve kozmetikte kullanılan ilaçlar filtrelendi ve kalan moleküller için ekstra hassasiyet Glide XP uygulandı. Sonuçtaki ilaçlar Maestro Canvas Benzerlik ve Kümeleme programı kullanılarak kümelendi. Ligandların benzerlikleri, 32-bit Molprint 2D parmak izleri ile değerlendirildi. Ardından, ligand tabanlı benzerliklerden kaynaklanan Tanimoto benzerlik matrisi üzerinde "ortalama" bağlantı yöntemi kullanılarak hiyerarşik kümeleme tamamlandı, Prime MM-GBSA toplam serbest bağlanma enerjileri hesaplandı. Protein-ilaç kompleksleri arasındaki dinamikleri analiz etmek için, Desmond programı aracılığıyla referansın ve beş hedef ilacın 200 ns'lik moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirildi. Ayrıca simülasyon yörüngeleri üzerinde MM-GBSA analizine dayalı serbest enerji hesaplama çalışmaları yapıldı.

Bulgular: Bu tez çalışmasında sanal tarama ve moleküler dinamik simülasyon yaklaşımlarının kombinasyonu ile, PTP1B'nin aktif ve ikinci pTyr bağlanma bölgesini hedefleyen beş ilacın (DB03558, DB05123, DB03310, DB05446, DB03530) potansiyel seçici inhibitörler olabileceği bulundu.

Sonuç: Bu çalışma, hedef ilaçların (deneysel, araştırma ve onaylanmış) potansiyel seçici PTP1B inhibitörleri olabileceğini ve ayrıca diyabet ve kanser tedavisi için yararlı olabileceğini göstermiştir. Bu hedef ilaçlar, *in vitro* moleküler testler ve *in vivo* hayvan testleri ile deneysel olarak doğrulanabilir veya devam eden klinik araştırmalara dâhil edilebilir. Ayrıca bu ilaçlar türevlendirilerek daha etkili moleküller tasarlanabilir.

Anahtar Kelimeler: PTP1B, TCPTP, Sanal tarama, Moleküler simülasyon

Aralık 2021, 120 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF NEW AND SELECTIVE PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 1B INHIBITORS USING *IN SILICO* MODELING APPROACH

Kübra AKYOL

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Deryanur KILIÇ

Purpose: Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a promising target for Type II diabetes, obesity and cancer therapeutics. However, capturing selectivity over T-cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) in PTP1B inhibitor discovery is a major task for inhibitor development process. Current studies show that the phosphotyrosine (pTyr) binding site confers selectivity to inhibitors. For this purpose, drugs in the DrugBank were docked using virtual docking tools into the active and the pTyr site to identify novel selective inhibitors of PTP1B.

Method: All drugs in the Drugbank database were downloaded and their 2D structures were converted to 3D using Ligprep and their different conformations were obtained. Crystal structures of PTP1B and TCPTP were first prepared using the Protein Structure Preparation Wizard provided by Schrödinger software and Glide docking algorithms (HTVS, SP and XP) were applied, respectively. As a result of high-throughput virtual screening (HTVS), the top 10% of drugs listed were retained. These compounds were then screened with Standard sensitivity (SP) and again the top 10% of drugs were retained. The results obtained were analyzed, the drugs used in diagnostics and cosmetics were filtered, and the extra sensitivity Glide XP was applied for the remaining molecules. The resulting drugs were clustered using the Maestro Canvas Similarity and Clustering program. Similarities of ligands were evaluated with 32-bit Molprint 2D fingerprints. Then, hierarchical clustering was completed using the "mean" linkage method on the Tanimoto similarity matrix resulting from ligand-based similarities, Prime MM-GBSA total free binding energies were calculated. To analyze the dynamics between protein-drug complexes, 200 ns molecular dynamics simulations of the reference and five target drugs were performed via the Desmond program. In addition, free energy calculation studies based on MM-GBSA analysis were performed on simulation trajectories.

Findings: In this thesis study, it was found that five drugs (DB03558, DB05123, DB03310, DB05446, DB03530) targeting the active and second pTyr binding site of PTP1B could be potential selective inhibitors with a combination of virtual screening and molecular dynamics simulation approaches.

Results: This study showed that the hit drugs (experimental, investigational and approved) can be potential selectivity PTP1B inhibitor and also useful for diabetes and cancer treatment. The hit drugs can be experimentally validated by *in vitro* molecular testing and *in vivo* animal testing, or included in ongoing clinical trials. In addition, more effective molecules can be designed by derivatizing these drugs.

Key Words: PTP1B, TCPTP, Virtual screening, Molecular simulation

December 2021, 120 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Diyabet ve Kanser	1
Protein Fosforilasyonu	3
Protein Tirozin Fosfatazlar.....	3
KURAMSAL TEMELLER.....	19
MATERYAL ve YÖNTEM	33
Materyal	33
Yöntemler.....	33
PTP1B ve TCPTP kristal yapıların hazırlanması.....	33
Drugbank databazının hazırlanması.....	34
Sanal Tarama ve benzerlik araması.....	34
Bağlanma modunu doğrulama	35
Moleküler Mekanik-Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı (MM-GBSA) hesaplamaları..	35
Moleküler Dinamik Simülasyonlar	35
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	37
SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	105

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Ligand Tabanlı ve Yapı Tabanlı Yöntemleri Birleştirmek İçin Benimsenen Üç Ana Stratejinin Şematik Gösterim	9
Tablo 2. Glide HTVS/SP ve XP Modüllerinden Elde Edilen En İyi Doking Pozlarının RMSD'lerin P27 İle Karşılaştırılması	38
Tablo 3. Drugbank'taki İlaçların PTP1B'ye Karşı Taraması Sonucu Belirlenen Onaylanmış, Deneyssel ve Araştırma Amaçlı İlaçlar	39
Tablo 4. PTP1B Hedefine Karşı Belirlenen Hedef İlaçlar	41
Tablo 5. TCPTP Hedefine Karşı Belirlenen Hedef İlaçlar	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sanal tarama akışı	18
Şekil 2. 1 nolu bileşik.....	20
Şekil 3. 2 nolu bileşik.....	21
Şekil 4. 3 nolu bileşik.....	22
Şekil 5. 4 nolu bileşik.....	22
Şekil 6. 5 nolu bileşik.....	23
Şekil 7. 6 nolu bileşik.....	24
Şekil 8. 7 nolu bileşik.....	25
Şekil 9. 8 nolu bileşik.....	25
Şekil 10. 9-10 nolu bileşik.....	26
Şekil 11. 11 nolu bileşik.....	26
Şekil 12. Farklı doking modüllerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 13. DB02651 in 2B gösterimi	45
Şekil 14. DB04204 in 2B gösterimi	46
Şekil 15. DB03154 in 2B gösterimi	47
Şekil 16. DB03483 in 2B gösterimi	48
Şekil 17. DB03557 in 2B gösterimi	49
Şekil 18. DB02014 in 2B gösterimi	50
Şekil 19. DB02784'ün 2B gösterimi	51
Şekil 20. DB02622' in 2B gösterimi	52
Şekil 21. DB04001'in 2B gösterimi	53
Şekil 22. PTP1B- SP-876 kompleksinin Cα ve SP-876 atomlarının RMSD-zaman grafiği....	55
Şekil 23. PTP1B- SP-876 kompleksinin Cα atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	56
Şekil 24. PTP1B ile kompleks SP-876 atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	57
Şekil 25. PTP1B- SP-876 kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'.....	58
Şekil 26. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı SP-876 atom etkileşimleri	59
Şekil 27. PTP1B- SP-876 kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temalarının zaman çizelgesi	60
Şekil 28. PTP1B-Gemcabene kompleksinin Cα ve Gemcabene atomlarının RMSD-zaman grafiği.....	61
Şekil 29. PTP1B- Gemcabene kompleksinin Cα atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	62

Şekil 30. PTP1B ile kompleks Gemcabene atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	63
Şekil 31. PTP1B-Gemcabene kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'	64
Şekil 32. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı Gemcabene atom etkileşimleri	65
Şekil 33. PTP1B-Gemcabene kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi	66
Şekil 34. PTP1B-Glutatyon disülfid kompleksinin Cα ve Glutatyon disülfid atomlarının RMSD-zaman grafiği	67
Şekil 35. PTP1B-Glutatyon disülfid kompleksinin Cα atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	68
Şekil 36. PTP1B ile kompleks Glutatyon disülfid atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	69
Şekil 37. PTP1B- Glutatyon disülfid kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'	70
Şekil 38. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı Glutatyon disülfid atom etkileşimleri	71
Şekil 39. PTP1B-Glutatyon disülfid kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi	72
Şekil 40. PTP1B- LJP 1082 kompleksinin Cα ve LJP 1082 atomlarının RMSD-zaman grafiği	73
Şekil 41. PTP1B- LJP 1082 kompleksinin Cα atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	74
Şekil 42. PTP1B ile kompleks LJP 1082 atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	75
Şekil 43. PTP1B-LJP 1082 kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'	76
Şekil 44. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı LJP 1082 atom etkileşimleri	77
Şekil 45 PTP1B-LJP 1082 kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi	78
Şekil 46 PTP1B- Ceftazidime kompleksinin Cα ve Ceftazidime atomlarının RMSD-zaman grafiği	79
Şekil 47. PTP1B-Ceftazidime kompleksinin Cα atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	80
Şekil 48. PTP1B ile kompleks Ceftazidime atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	81
Şekil 49. PTP1B-Ceftazidime kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'	82
Şekil 50. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı Ceftazidime atom etkileşimleri	83
Şekil 51. PTP1B-Ceftazidime kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi	84
Şekil 52. PTP1B-Referans kompleksinin Cα ve Referans atomlarının RMSD-zaman grafiği	85
Şekil 53. PTP1B-Referans kompleksinin Cα atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	86
Şekil 54. PTP1B ile kompleks Referans atomlarının 200 ns için RMSF grafiği	87
Şekil 55. PTP1B-Referans kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'	88

Şekil 56. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı Referans atom etkileşimleri	89
Şekil 57. PTP1B-Referans kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temalarının zaman çizelgesi	90
Şekil 58. Hedef İlaçlarının ve Referansın MM/GBSA Skorları.....	90



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μM	Mikro Molar
μm	Mikrometre
2B	2 Boyutlu
3B	3 Boyutlu
Å	Anström
A	İvme
ALA	Alanin
ARG	Arjinin
ASN	Asparajin
ASP	Aspartat
BLAR	Beta-Laktamaz İndükleyen Penisilin Bağlayıcı Protein
CADD	Bilgisayar Temelli İlaç Dizaynı
COA	Koenzim A
CYS	Sistein
dTMP	Deoksitimidin 5'-Monofosfat
F	Kuvvet
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
GBSA	Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı
GLN	Glutamin
GLUT-2	Pankreas Glukoz Taşıyıcı Protein 2
GLY	Glisin
GPCR	G-Protein-Bağlı Reseptörleri
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HIS	Histidin
HTVS	Yüksek Verimli Sanal Tarama
IC ₅₀	Hücre Canlılığını %50 Azaltmak İçin Gereken Konsantrasyon
ID	Kimlik Numarası
ILE	İzolösin
IR	İnsülin Reseptörü
IRS	İnsülin Reseptör Substratı
IZD	İzotiazolidinon

JAK	Janus Aktive Kinaz
kcal	Kilokalori
kcal/mol	Kilokalori /Mol
kDA	Kilodalton
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LEU	Lösin
LYS	Lisin
M	Molar
M	Kütle
MD	Moleküler Dinamik
MET	Metiyonin
MM	Moleküler Mekanik
MMGBSA	Moleküler Mekanik -Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NS	Nanosaniye
PBSA	Possion-Boltzmann Yüzey Alanı
PDB	Protein Veri Bankası
PHE	Fenil
PRO	Prolin
PTP	Protein Tirozin Fosfataz
PTP1B	Protein Tirozin Fosfataz 1B
pTyr	Fosfotirozin
QM	Kuantum Mekanik
QSAR	Kantitatif- Yapı Etkinlik İlişkisi
RMSD	Karekök Ortalama Sapma
RMSF	Karekök Ortalama Dalgalanma
SER	Serin
SP	Standart Hassasiyet
STAT	Sinyal Dönüştürücü Ve Transkripsiyon Aktivatörü
T2DM	Tip 2 Diyabet
TC45	T (Yardımcı) Hücre 45
TC48	T (Yardımcı) Hücre 48
TCPTP	T Hücre Proteini Tirozin Fosfataz
TRP	Triptofan
TYR	Tirozin

VAL	Valin
VS	Sanal Tarama
XP	Ekstra Hassasiyet
ΔG	Gibbs Enerjideki Değişim



GİRİŞ

Diyabet ve Kanser

Dünya çapında en yaygın hastalıklardan biri olan diyabet yüksek kan şekeri seviyeleri ile teşhis edilen bir endokrin sistem hastalığıdır (Cho *et al.* 2018). Diyabetli bireylerde makrovasküler ve mikrovasküler sistemin vasküler komplikasyonları görülmesi sonucu bu bireylerde hastalık ve ölümle sonuçlanmaktadır (Morrish *et al.* 2001). Diyabet ve komplikasyonları hem önemli çevresel hem de genetik bileşenleri olan karmaşık, çok faktörlü durumlardır. Diyabet komplikasyonlarının gelişimine sebep olan moleküler mekanizmaları üzerine çalışılmasına rağmen (Zaccardi *et al.* 2016), bunların tam olarak kesin patofizyolojisi anlaşılamamıştır. Ayrıca oksidatif stres, diyabet komplikasyonlarının gelişmesine sebep olan mekanizmalarından biridir. Böylece serbest radikal oluşum hızı antioksidan savunma sistemlerini aştığında gelişir ve serbest radikallerin toksik etkilerine oksidatif stres neden olur (Yaribeygi *et al.* 2018). Serbest radikal türleri biyolojik homeostazda önemli fizyolojik bileşenler olmasına rağmen, ancak üretimleri aşırı ve vücudun antioksidan kapasitesinden daha fazla arttığında oksidatif stres ortaya çıkar (Yaribeygi *et al.* 2019). Ayrıca hastalığın tedavisinin büyük bir maliyete sahip olması sebepleri arasında, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki sağlık harcamalarındaki eşitsizlikten kaynaklanmaktadır. Buna bağlı olarak da diyabette 2017 yılından beri %50 artış görülmüştür ve dahası 2045 yılına kadar 693 milyon yetişkini etkilemesi beklenmektedir (Cho *et al.* 2018).

Şeker hastalığının bilinen 2 tipi vardır, bunlar Tip 1 ve Tip 2'dir. Tip 1 diyabet mellitus (T1DM), endokrin ve metabolik durumlardan biri olup ve çocukluk dönemlerinde daha sık görülür. Bu tip pankreas adacık β -hücrelerinin kaybının sonucu olarak ortaya çıkan insülin eksikliğine bağlı olarak artan kan glukoz seviyeleri (hiperglisemi) ile karakterize, kronik bir otoimmün hastalıktır (Atkinson *et al.* 2014). T1DM ile ilişkili otoimmünite hastalığı, hastaların büyük çoğunluğunda β -hücrelerinin kaybı ile görülmektedir T1DM insidansı dünya çapında artmaktadır ve her yıl yaklaşık 90.000 çocuğa teşhis konduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca insidans hızı ülkeler arasında önemli derecede farklılıklar göstermektedir (Diaz-Valencia *et al.* 2015); Bu hastalığın en fazla görüldüğü ülkeler sırasıyla İskandinav, Avrupa ülkeleri, Kuzey Amerika ve Avustralya izlemektedir. T1DM' un nadir görülen ülkeleri ise Çin, Kore ve Japonya gibi Asya ülkeleridir. Bu varyasyonun nedeni tam olarak

açıklanmamıştır, ancak genetik duyarlılık ve muhtemelen hijyen ve çocukluk enfeksiyonlarını içeren çevresel ve yaşam tarzı faktörleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Diyabetin bilinen bir diğer çeşidi olan Tip 2 diyabet (T2DM) ise, pankreas β -hücre disfonksiyonunun neden olduğu göreceli insülin eksikliği ve hedef organlarda insülin direnci ile karakterizedir (Zhou *et al.* 2016). Tip 2 diyabet, tanı anında %50'ye varan hücre kaybıyla birlikte artmış hiperinsülinemi, insülin direnci ve pankreas β -hücre yetmezliği ile sonuçlanmaktadır (Holman *et al.* 2008). Kardiyovasküler hastalık, Tip 2 diyabet ile ilişkili morbidite ve mortalitenin en büyük nedenidir; buna bağlı olarak komplikasyon ve hastalık ilerleme riskini en aza indirmek için kan basıncının yanı sıra glukoz ve lipid konsantrasyonlarının yoğun bir şekilde yönetilmesini gerektirir (Gæde *et al.* 2003). Küresel olarak artan obezite, fiziksel hareketsizlik ve yoğun diyetler, Tip 2 diyabetli hasta sayısında çok büyük bir artışa neden olmuştur. 1980 ve 2004 yılları arasında obezite, hareketsiz yaşam tarzları ve yaşlanan nüfustaki küresel artış, Tip 2 diyabet insidansını ve prevalansını dört katına çıkarmıştır (Zhou *et al.* 2016). 2015 yılında 415 milyon kişinin diyabetli olduğu tahmin ediliyordu ve bunların %90'ından fazlası tip 2 diyabetliydi ve bu rakamın 2040 yılına kadar 642 milyona çıkacağı tahmin ediliyor (Atlas, 2015).

Günümüzde bir diğer en büyük sağlık problemleri arasında olan kanser ise, dünya çapında ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ölümlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. 2013 yılında kanser 8 milyondan fazla kişinin ölümüne sebep olmuştur; 1990 yılında kalp hastalığını takiben ölüm nedenleri arasında üçüncüyken, 2013'te ise ikinci önde gelen ölüm nedenleri arasına geçmiştir (Murray *et al.* 1997). ABD'de 2013 yılında kalp hastalığı nedeniyle 611,105 kişinin hayatını kaybetmesiyle sonuçlanırken, bunu 584,881 ile kanser izlemiştir. 1990'lardan beri ABD'de ve Avrupa'da çeşitli kanserlerin önlenmesi, teşhisi ve tedavisi ile ilgili önemli ilerleme kaydedilmiştir (Allemani *et al.* 2015). Bununla birlikte, bu ilerlemeye rağmen, artan ve yaşlanan küresel nüfusun yanı sıra sigara, obezite ve beslenme alışkanlıkları gibi risk faktörleri nedeniyle kanser yükü artmaktadır. Kaynakları önleme, tarama, teşhis, tedavi ve palyatif bakıma uygun şekilde tahsis etmek ve bunların etkinliğini izlemek için, tek tek ülkeler için kanser yükü hakkında zamanında bilgi sahibi olmak gerekir.

Dünya çapında kadınlarda en yaygın görülen kanserlerden biri olan meme kanseri ise kanserden ölen kadınların kanser tipleri incelendiğinde ikinci sırada olduğu belirlenmiştir. Sayısal olarak bu sıralama incelendiğinde 2015 yılında yaklaşık 570.000 ölümle sonuçlanırken, dünya genelinde ise her yıl 1,5 milyondan fazla kadın meme kanseri olduğu tespit edilmiştir (Stewart ve Wild 2014). Amerika'da ise 2017 yılında kadın kanser vakalarının tamamının %30' unun meme kanseri olduğu tahmin edilmektedir (Siegel *et al.* 2017). Meme

kanseri sıklıkla kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi uzak organlara yayılabildiği için metastatik kanserler arasındadır. Hastalığın erken teşhisi hayatta kalma şansını artırmaktadır. Kuzey Amerika'da, meme kanseri hastalarının hayatta kalabilme oranlarının erken teşhisi ile 5 yıl içinde yaklaşık %80'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir (DeSantis *et al.* 2015).

Protein Fosforilasyonu

Protein fosforilasyonu olarak adlandırılan proteinlere fosfatın geri dönüşümlü olarak eklenmesi ve çıkarılması, hücrelerin çevrelerindeki uyarılara tepki verme süreci, sinyal iletim mekanizmasının temel özelliğidir. Protein fosforilasyonuna aracılık eden enzimlerin aktiviteleri, çevresel uyarılara hücresel yanıt ve bu enzimlerin işlevine aracılık etmek için sinyal iletim yollarında koordine edilir ve bu enzim aktivitelerinin bozulması, kanser de dahil başlıca insan hastalıkları neden olduğu görülmektedir. Bu tür sinyal iletim yollarını ilaçlarla seçici olarak modüle etmek büyük terapötik potansiyele sahiptir. Protein kinazları hedef alan ilaçlar, kanser tedavisinde çığır açan buluşları temsil etmektedir. Örneğin, HER2 protein tirozin kinaz, birkaç kanserde, özellikle meme kanserinin ~%25'inde amplifiye edildiği ya da aşırı eksprese olduğu görülmüştür. Herceptin (Trastuzumab), insan HER2'ye yönelik antikor olup, HER2-pozitif metastatik meme tümörlerinin tedavisi için bir "akılcı kanser tedavisi" ile karşıma çıkmaktadır. Bu antikor HER2'yi hedefleyerek kanser hücresinin benzersiz bir belirteci olarak işlev görür. Herceptin tercih edilen bir ön tedavi olarak görülmesine rağmen ne yazık ki başarı oranı düşük ve hastaların tedaviye direnç geliştirdiği görülmüştür. Hem *de novo* hem de kazanılmış bu direnç sorunu, genel olarak kinaza yönelik tedavilerin başarılı bir şekilde uygulanmasının önünde bir engel haline gelmiştir. Bu nedenle, bariz potansiyele rağmen, tek başına veya kinaza yönelik ilaçlarla kombinasyon halinde uygulanan yeni alternatif tedavilerin ileriye giden yolu temsil etmesi beklenmektedir.

Protein Tirozin Fosfatazlar

Protein Tirozin Fosfataz (PTP)'lerin yapısal olarak aktif, geniş özgüllüğe sahip, housekeeping enzimlerinden oluşan bir aile olduğu görüşü, hala bu alanda bilinen yanlış bir görüştür. Ayrıca, sinyal iletiminin sistem biyolojisi modellerinde fosfatazların "silgi" olarak reddedilmesi, yalnızca bu tür önyargıyı güçlendirmeye hizmet eder. Hem PTK'ların hem de PTP'lerin işlevi, her iki enzim sınıfında sinyal iletiminin kritik düzenleyicileri olacak şekilde entegre edilmiştir. Ayrıca, her iki enzim sınıfındaki bozulmaların, kanser de dahil olmak üzere başlıca insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Protein tirozin fosfatazlar insanlarda toplam yüz yedi gen içermektedir (Tonks, 2013). Sadece PTP'ye ait bu yapısal çeşitlilik, housekeeping rolünün de ötesinde işlevsel seçiciliği

göstermektedir. Bu genlerin 37'si "klasik" pTyr'e özgü enzimleri kodlar. Bu klasik PTP genleri içinde bulunan 21'i, yapıları, doğrudan ligandla düzenlenen protein tirozin defosforilasyonu yoluyla sinyal olaylarının modülasyonu için potansiyel öneren transmembran reseptör benzeri proteinleri (RPTP'ler) kodlar. PTK'lara benzer şekilde, RPTP'lerin hücre dışı bölümlerindeki çeşitlilik muhtemelen yanıt verdikleri ligandların doğasındakine eşdeğer bir çeşitliliği yansıtır. Prototipik reseptör PTP, CD45'in ilk çalışmaları, hücre sinyalleşmesinin düzenlenmesinde hem olumlu hem de olumsuz işlev görme yeteneklerini sunarak, PTP ailesinin üyelerinin işlevinin bir başka önemli yönünü ortaya çıkardı. Bu, PTP'lerin, sadece PTK fonksiyonunun pasif antagonistleri olarak hareket etmekten ziyade, sinyal yollarının açılmasında önemli direkt bir rol oynayabileceği kavramını daha da güçlendirir. Klasik PTP'ların 16'sı ise, transmembran olmayan, sitoplazmik enzimler olup, katalitik alanın düzenleyici bir işlev görebilecek dizilerle çevrili olduğu belirlenmiştir. Bunlar, PTP'nin aktivitesini hem doğrudan bazal durumda aktif bölgeyi tıkayarak hem de tanımlanmış sinyal komplekslerini hedefleyerek hücre altı dağılımını kontrol ederek dolaylı olarak modüle edebilen SH2 alanlarını içerir. Genel olarak, bu, hücre altı hedeflemenin PTP fonksiyonunun düzenlenmesinin önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir. Hendriks ve Bohmer tarafından belirtildiği gibi, transmembran olmayan PTP'lerde gen duplikasyonunun net kanıtı vardır, örneğin PTP1B ve TCPTP'nin yanı sıra SHP1 ve SHP2. Bu çiftler yüksek derecede sekans özdeşliğine sahip olsalar da farklı, uygun spesifiklik ve fazlalık olmayan işlevler sergilerler. Yapılan araştırmalarda, insanlarda PTPN2 geni tarafından kodlanan TCPTP'nin incelemesi verilmiştir. Bu PTP, STAT transkripsiyon faktörleri yanı sıra RPTK, JAK ve SRC (Src tirozin kinaz) gibi çeşitli PTK'ları, substrat olarak tanınması yoluyla önemli sinyal yollarını etkileyebilir. İki farklı formda bulunur: ER zarlarının sitoplazmik yüzünü hedef alan TC48 ve çekirdeğe girip çıkma yeteneğine sahip TC45. Bu izoformlar aynı katalitik bölge de bulunmasına rağmen farklı substratlar üzerinde hareket etme eğilimine sahiptir. He ve Zhang DUSP, cdc25 ve PRL'nin yanı sıra klasik PTP'lerden PTP1B ve SHP2'ye odaklanarak PTP tabanlı terapötiklerin mevcut durumunu gözden geçirmektedirler (He *et al.* 2013). Bir enzimin aktif bölgesine bağlanan küçük moleküllu ilaçlar geliştirmeyi hedeflemede rol oynayan endüstri, PTP'lerin terapötik gelişim için engelleyici hedefler olduğunu bulmuştur. Örneğin, PTP1B'nin güçlü, spesifik ve geri dönüşümlü inhibitörlerini üretmek mümkün olsa da bu tür moleküller, PTP aracılı katalizin altında yatan kimya nedeniyle yüksek oranda yüklüydü ve oral biyoyararlanımdan yoksundu.

Protein kinazların terapötik olarak hedeflenip hedeflenmediği konusunda önceleri çekinceler olmasına rağmen, kinaz inhibitörleri için küresel pazarda, 2016 yılında 40 milyar dolar değerinde iken, 2010 yılında 28 milyar dolara ulaşmıştır. Kinaz inhibitörleri, kanser ve

diğer büyük hastalıkların tedavisine yönelik yeni yaklaşımlara yol açmasına rağmen *de novo* ve bu tür kinaz inhibitörlerine karşı direnç kazanılması konusunda önünde engel olmaya devam etmiştir. Sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesinde kinazlara tamamlayıcı enzim ailesi olarak fosfatazları hedefleyerek bu zorluğun üstesinden gelme fırsatı, bariz çekiciliğe sahiptir. PTP'lerin terapötik hedefler olarak kabul edilmesinin hem enzimlerin spesifikliği hem de onları hedefleyen inhibitörlerin spesifikliği nedeniyle en büyük engel, spesifiklik sorunu olmuştur. Diğer yandan, genotoksik strese yanıtı düzenleyen ATM, yüzlerce hedefi tanınması gibi (Shiloh ve Ziv 2013) tek tek protein kinazların geniş bir substrat dizisini de tanıyabileceği açık hale geliyor. Öte yandan, PTP'lerin gerçekte ne ölçüde rastgele olduğu net değildir. Aslında, son çalışmalar, bireysel PTP'lerin RNA interferansı ile baskılanmasına, sinyalleşmedeki spesifik değişikliklerin ve tirozin fosforilasyon modellerinde son derece ince değişikliklerin eşlik ettiğini göstermektedir (St-Germain *et al.* 2015). PTP1B'nin terapötik olarak hedeflenmesiyle ilgili bir endişe vardır ki bu da enzim inhibitörlerinin, PTP ailesindeki en yakın akrabası olan TCPTP'yi ne ölçüde inhibe edeceği olmuştur. PTPN1 geninin hedeflenen ablasyonu, diyabet ve obezitede PTP1B'nin inhibe edilmesinin faydalı etkileri olduğunu öne sürse de PTPN2'nin homozigot delesyonu, TCPTP'nin doğumdan kaynaklanan kaybının, bağışıklık sisteminde ölümcül kusurlar ürettiğini göstermiştir. (You-Ten *et al.* 1997).

Tezimde üzerinde duracağım protein ailesi olan, Protein tirozin fosfatazlar (PTP'ler), çok sayıda önemli biyolojik ve patolojik olayda yer alan defosforilasyon süreçlerini düzenleyen bir fonksiyonel enzim sınıfıdır ve metabolizma, hücre büyümesi, proliferasyon ve farklılaşmada önemli bir rol oynar (Shinde *et al.* 2018). Bu süper aile arasında, protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B), insülin ve leptin reseptörlerinin defosforilasyonundan sorumludur (Zhang 2002 ve Tonks 2006). PTP1B, endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzünde lokalizedir ve karaciğer, kas, yağ gibi klasik insülin hedefli dokular dahil olmak üzere her yerde eksprese edilir (Tonks 2003). Biyokimya, genetik ve farmakolojik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, PTP1B'nin hem insülin hem de leptin reseptörünün aracılık ettiği sinyal yollarının negatif düzenleyici olarak hareket ettiğini göstermiştir. PTP1B, aktive edilmiş insülin reseptörü (IR) veya insülin reseptörü substratları (IRS) ile birleşebilir ve defosforile edebilir (Calera *et al.* 2000). Anormal tirozin fosforilasyonu durumunda, diyabet, romatoid artrit, hipertansiyon ve Alzheimer dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Ek olarak, elde edilen önemli kanıtlar da PTP1B'nin meme kanseri (Bentires-Ali ve Nell 2007), prostat kanseri (Lessard *et al.* 2012), otoimmün bozukluklar (Le Sommer *et al.* 2015) ve kardiyovasküler hastalıklar (Abdelsalam *et al.* 2019) gibi çeşitli insan hastalıklarıyla da ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca hücre kültürlerinde PTP1B'nin aşırı

ekspresyonu, IR ve/veya IRS-1'in insülin ile uyarılan fosforilasyonunu azaltırken, antisens oligonükleotitler veya nötralize edici antikörler tarafından PTP1B seviyesindeki azalma, insülinle başlatılan sinyalleşmeyi artırdığı gözlemlenmiştir (Zinker *et al.* 2002). Bunlara bağlı olarak PTP1B'nin yapısal, mekanik özellikleri, diyabet ve obezite için bir ilaç hedefi olarak doğrulanması ve inhibitör keşfindeki gelişmeleri, çeşitli incelemelerde tartışılmıştır.

Protein tirozin fosfataz (PTP) ailesinden bir diğeri ise, T (yardımcı) hücre proteini tirozin fosfataz (TCPTP), Cool ve arkadaşları tarafından T-hücresi tabanlı cDNA kütüphane taraması kullanılarak belirtilmiştir (Cool *et al.* 1989). TCPTP'nin iki varyantı vardır: Nükleerde bulunan TC45 (45 kDa) ve endoplazmik retikulumda bulunan TC48 (48 kDa) (Bussieres-Marmen *et al.* 2014). Bu varyantlardan biri olan TC45, insanlar ve fareler dahil olmak birçok türlerde görülen bir formudur, TC48 ise insana özgü bir varyant olduğu görülmüştür. Çoğu türde, TC45 sitokin uyarısına yanıt olarak çekirdek ve sitoplazma arasındadır (Tiganis *et al.* 1999). Ayrıca TCPTP, farklı substratların fosforilasyonu yoluyla glukoz metabolizması, inflamasyon kontrolü, kanser gelişimi ve diğer biyolojik süreçlerle ilgili çeşitli sinyal yollarını düzenler (Sharp *et al.* 2015). *In vitro* (moleküler deney) ve *in vivo* (hayvansay deney) deneyler, TCPTP'nin Janus aktive kinaz (JAK)/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörünü (STAT) inhibe etmesi sonucu birkaç sitokin sinyal yolunu düzenleyebileceğini doğrulamıştır (Scharl *et al.* 2011). Ayrıca TCPTP'ler bağışıklıkta önemli bir bileşen olan makrofajların düzenlenmesinde rol oynadığı görülmüştür (Bussieres-Marmen *et al.* 2014). T hücresi aktivasyonunu düzenlemede rol oynayan bir fosfataz olan TCPTP eksikliğinde ise farelerde, B-hücresi ve T-hücresinin bozulduğu görülmüştür ve bu da TCPTP'nin hem hematopoezde hem de bağışıklık sisteminde işlevsel olduğunu göstermiştir (Chen *et al.* 2018). Ek olarak kasa spesifik TCPTP eksikliği olan farelerin, insülin sinyalleşmesinde hiçbir değişiklik göstermediği ve yüksek yağlı bir diyetin neden olduğu insülin direncinde hiçbir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, katalitik alandaki %74 amino asit sekans benzerliği olmasına rağmen, PTP1B ve TCPTP proteinlerinin açıkça farklı biyolojik fonksiyonlar yerine getirdiğini göstermiştir. Dolayısıyla yapılan çalışmalardan TCPTP'nin fizyolojik fonksiyonunun PTP1B'den tamamen farklı ve PTP1B inhibitörlerinin TCPTP üzerinde yeterli seçiciliğe sahip olmaları için sıkı bir gereklilik olduğu sonucuna varılmıştır (Low *et al.* 2014; Liv *et al.* 2016).

PTP1B'nin bilinen inhibitörlerinden bahsedecek olursak; güçlü ve spesifik PTP1B inhibitörleri sadece hücresel sinyal iletiminde fonksiyonel araştırma için hayati kimyasal araçlar olarak hizmet etmekle kalmaz, aynı zamanda çeşitli hastalıklar için faydalı terapötikler sağlar (He *et al.* 2013). Ancak, katalitik bölgesinin yüksek oranda korunmuş ve pozitif yüklü

doğası, PTP1B'yi ilaç keşfi için zorlu bir hedef haline getirir ve aynı anda hem seçici bir enzimatik profil hem de kabul edilebilir bir biyoyararlanım elde etmek için katalitik bölge üzerinde hareket eden PTP1B inhibitörleri için zorlu bir hedeftir (Zhang *et al.* 2017). Şimdiye kadar yapısal olarak çeşitli PTP1B inhibitörlerinin bir koleksiyonu tanımlanmıştır ve bunların çoğu, katalitik bölge ile etkileşime giren fosfotirozin (pTyr) mimetikleridir (Kostrzewa *et al.* 2019). Ayrıca fosfotirozini (pTyr) taklit eden, küçük moleküllü bileşikler ve doğal ürünler bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda inhibitör seçiciliğini arttırabilmek için, aktif bölgeye ve ikinci pTyr bağlanma bölgesine bidentat bağlanma stratejisinin kullanılması olduğu düşünülmektedir. Puius ve arkadaşları ilk olarak bis (para-fosfenil) metanla ilgili bir çalışmada bidentat inhibitörleri önermiştir. Ayrıca elde edilen kompleksin kristal yapısının analizi sonucu inhibitörler ve Arg24, Arg254 rezidüleri arasında etkileşimlerin olduğu, aktif bölgeye bitişik derinde olmayan bağlayıcı bir bölge tespit edilmiştir. Bu çalışma grubu tarafından gerçekleştirilen PTP1B ve TCPTP arasındaki dizi hizalaması sonucunda Arg24 ve Arg254'ün her iki enzim için korunduğu, ikinci pTyr bağlanma bölgesinde farklı rezidüleri (Phe52 / Tyr54, Ala27 / Ser29 ve Cys32 / His34 (PTP1B / TCPTP)) bulunduğu belirlenmiştir. Böylece bu farklılıklar PTP1B ve TCPTP arasındaki farkları belirlemek için kullanılabilir olduğunu düşündürmektedir (Puius *et al.* 1997; Iversen *et al.* 2002). Daha ileri çalışmalar, Q-loop üzerindeki Gln262 ve Met258'in, iki bağlanma bölgesi arasındaki temel bağlayıcıları olduğunu belirlemiştir. PTP1B'de bu rezidüleri hedefleyen bidentat inhibisyonu, seçici inhibitörler geliştirmek için yararlı bir strateji olabileceğini düşündürmektedir. Bidentat inhibitörlerinin sanal taramalarının anahtarı hem aktif bölge hem de ikinci pTyr bağlama bölgesinin tanınmasını sağlayan uygun bir yerleştirme stratejisi bulmaktır. İnhibitörlerin dört farklı çeşitte bağlandığı 11 kompleksin X-ışını yapıları incelenmiş ve test edilmiştir. Bu yapılar kristal yapısındaki ligandlarla tekrar kenetlendiğinde elde edilen en düşük RMSD değeri 0,213 Å değerine sahip 1Q1M olarak belirlenmiş ve ayrıca kullanılan tüm kristal yapılar içerisinde PTP1B'ye karşı en yüksek seçiciliği (23,77 kat) göstermiştir. İnhibitörlerin aktif bölgedeki Ser216 ve Arg221 ve ikinci pTyr bağlama bölgelerinde Arg24, Arg254 ve Gln262 rezidüleri ile hidrojen bağları yaptıkları belirlenmiştir (Chen *et al.* 2018). İkinci pTyr bağlama bölgesi, TCPTP ve diğer bazı PTP'lere karşı inhibitörlerin seçiciliğini arttırmak için umut verici bir alan olabileceğinden, tezimizde PTP1B'nin seçici inhibitörlerini belirlemek için bidentat bağlayıcı sanal tarama gerçekleştirilecektir. Tek bir bağlanma bölgesini keşfetmeye yönelik önceki sanal tarama yöntemlerinden farklı olarak hem aktif bölge hem de ikinci bağlanma bölgesi aynı anda bağlanma hedefleri olarak ayarlanacaktır. PTP1B ve TCPTP her iki protein için ayrı ayrı sanal tarama işlemi gerçekleştirilecek ve PTP1B

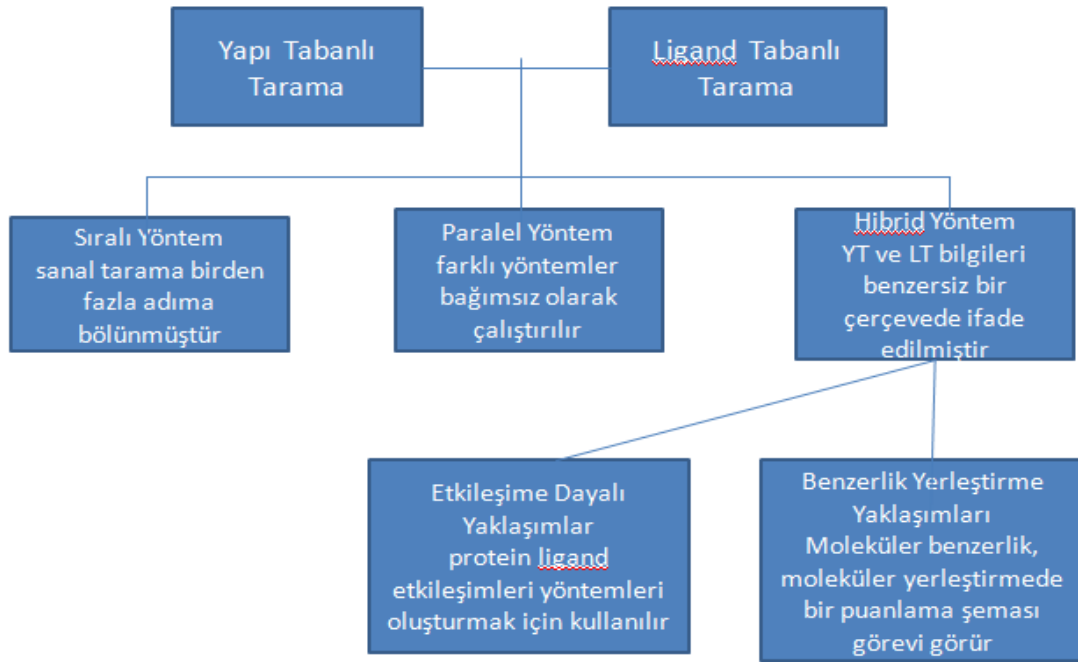
proteinine karşı ilgisi en yüksek TCPTP proteinine karşı ise ilgisi en az olan molekül tespit edilecektir.

İlacın yeniden kullanılması (ilaç yeniden konumlandırma, yeniden profil oluşturma veya yeniden görevlendirme olarak da adlandırılır), orijinal tıbbi endikasyon kapsamı dışında kalan onaylanmış veya araştırma aşamasındaki ilaçların yeni kullanımlarını belirlemeye yönelik bir stratejidir (Ashburn ve Thor 2004). Birincisi ve belki de en önemlisi, yeniden kullanılan ilacın klinik öncesi modellerde ve insanlarda erken aşama denemeleri tamamlanmışsa yeterince güvenli olduğu zaten bulunduğundan, sonraki etkinlik denemelerinde en azından güvenlik açısından başarısız olma olasılığı daha düşüktür. İkincisi, klinik öncesi testlerin, güvenlik değerlendirmesinin ve bazı durumlarda formülasyon geliştirmenin çoğu zaten tamamlanmış olacağından, ilaç geliştirme için zaman çerçevesi azaltılabilir. Üçüncüsü ise, yeniden amaçlanan adayın gelişim aşamasına ve sürecine bağlı olarak büyük ölçüde değişmesi göz önüne alınarak daha az yatırıma ihtiyaç duyulması avantaj katar (Breckenridge ve Jacob 2019). Son olarak Düzenleyici ve faz III maliyetleri ise, klinik öncesi ve faz I ve II maliyetlerinde tasarruflar sağlayabilir ancak aynı endikasyondaki yeni bir ilaç için olduğu kadar, yeniden kullanılan bir ilaç için hemen hemen aynı kalabilir, Yine de bu avantajlar yeniden amaca uygun ilaçların geliştirilmesinde daha az riskli ve daha hızlı bir yatırımla sonuçlanması potansiyeli oldukça yüksektir. Aslında, amacı yenilenmiş bir ilacı pazara sunmanın maliyetlerinin, yeni bir kimyasal varlık için tahmini 2-3 milyar dolar ile karşılaştırıldığında, ortalama olarak 300 milyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir (Nosengo; 2016). En sonunda, amaca uygun olarak değiştirilmiş ilaçlar, daha fazla yararlanılabilecek yeni hedefler ve yollar ortaya çıkarabilir.

İlaç keşfi zaman alıcı ve zorlu bir süreçtir. Hesaplama stratejileri, harcanan zamanı ve maliyeti azaltmaya yardımcı olur. Bu avantajları göz önünde bulundurarak ilaç keşfi için hesaplamalı strateji olarak tezimizde sanal tarama yöntemini kullanacağız. Sanal tarama, ilaç keşfedilmesi sürecinde istenilen spesifik özelliklere sahip yeni hedeflerin tespiti için çok sayıda molekül içeren kütüphanelerin bilgisayar ortamında tarandığı güçlü bir hesaplama yaklaşımı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu taramanın amacı deneysel olarak test edilecek aday sayısını azaltmak, keşif sürecini hızlandırmak veya seçimlerini rasyonelleştirmektir (Reddy *et al.* 2017). Genel olarak sanal tarama, ligand bazlı ve yapı bazlı teknikler olarak sınıflandırılan çeşitli hesaplama yaklaşımları, aktif bileşiklerin araştırılmasında sanal kütüphanelerin taranmasını sağlamak için ligandlar ve hedeflerin temel yapısal ve fizikokimyasal özelliklerini kullanır. Yapı temelli ilaç tasarımı günümüzde tedavi edici ajanların etkin gelişimi ve metabolik süreçlerin anlaşılması için önem arz etmektedir. Bu ilaç tasarımı, bir hastalığın

moleküler temelinin anlaşılmasına ve biyolojik hedefin üç boyutlu (3B) yapı bilgisinin kullanılmasına olanak sağladığı için geleneksel ilaç keşif yolundan daha verimli olduğu kanıtlanmıştır. Genellikle hedef tabanlı olarak adlandırılan yapı tabanlı sanal tarama terimi, hedefin üç boyutlu (3B) yapısından yararlanan yöntemleri kapsar. En yaygın olarak kullanılan yapı tabanlı sanal tarama tekniği, fragman benzeri veya ilaca benzer bir bileşik ile hedef reseptörü arasındaki etkileşimden kaynaklanan yapısal ve kimyasal tamamlayıcılığı kullanan, bağlanma bölgesinde ligandların tercih edilen pozunu aşağıdakilerin kullanılmasıyla tahmin eden moleküler yerleştirmedir (Taylor *et al.* 2002). Öte yandan, ligand tabanlı sanal tarama, moleküler benzerlik ilkesi altında incelenen, bilinen aktif ve inaktif moleküllerin kimyasal iskelesinin yapısal bilgilerine ve fizikokimyasal özelliklerine dayanır (Duan *et al.* 2010). Yapı tabanlı sanal tarama ve ligand tabanlı sanal tarama tekniklerinin birleşik birlikteliği ile hem ligand hedef komplekslerinin yapısı hem de aktif bileşiklerle benzerlik ilişkileri hakkında veriler mevcut olduğunda ümit verici bir strateji olabilir ve bu, ilaç keşif projelerinin başarısını artırmak için uygun bütünsel bir çerçeveye yol açar (Sperandio *et al.* 2008).

Tablo 1. Ligand Tabanlı ve Yapı Tabanlı Yöntemleri Birleştirmek İçin Benimsenen Üç Ana Stratejinin Şematik Gösterimi



(i) Sıralı yaklaşımlar, sanal tarama sürecini kimyasal bileşikler kütüphanesindeki biyolojik test için seçilecek olan en umut verici adaylara doğru aşamalı bir filtreleme gerçekleştirmek amacıyla ardışık adımlara böler. Genellikle, ön filtreleme, hesaplama nedeniyle ligand tabanlı teknikleri kullanılarak sanal tarama sürecinin başlangıcında gerçekleştirilir, oysa hesaplama açısından en zorlu yapı tabanlı yöntemleri, seçim sürecinin son aşamalarında kullanılır.

(ii) Paralel yaklaşımlar hem ligand tabanlı hem de yapı tabanlı yöntemleri bağımsız olarak çalıştırılır ve bu yöntemlerden belirlenen en iyi adaylar biyolojik test için seçilir. 2011 yılında ise Swann ve arkadaşları bu yaklaşımdan yola çıkarak ileriye dönük bir uygulamasını bildirdi (Swann *et al.* 2011). Daha sonraki çalışmalar, ligand tabanlı ve yapı tabanlı yöntemlerinden elde edilenleri birleştirmek için farklı fonksiyonel formları inceledi (Kooistra *et al.* 2016).

(iii) Hibrit stratejiler, ligand tabanlı ve yapı tabanlı tekniklerinin bilgileri benzersiz bir çerçevede ifade edilen yaklaşımları içerir. Bu amaca ulaşmak için iki ana kombinasyon izlenmiştir: (i) etkileşim temelli yöntemler ve (ii) benzerlik doking yöntemleri. Birincisi ele alınırsa, gözlemlenen protein-ligand etkileşimlerini farmakoforik özelliklere ve kantitatif yapı-aktivite ilişkisi modellerine çevirir (Tan *et al.* 2008), bunlar sanal tarama, ligandların profili, reseptörlerin analizi ve *de novo* tasarımlar gibi çeşitli uygulamalar için kullanılmıştır (Meslamani *et al.* 2012). Diğer yandan, son yıllarda ele alınan doking tekniklerinin moleküler benzerlik ve kombinasyonu, uygun şablona karşı çakışmayı ölçerek ligandların öngörülen pozlarının güvenilirliğini değerlendirmek için alternatif bir prosedür ele alınmıştır (Lorenzo *et al.* 2015).

Moleküler Dinamik (MD) simülasyonu, atom ve moleküllerin fiziksel hareketlerini incelemek için bir bilgisayar simülasyon yöntemidir. Bir biyomoleküler sistemdeki tüm atomların konumları göz önüne alındığında (örneğin, su ile çevrili bir protein ve belki de bir lipid çift tabakası), diğer tüm atomlar tarafından her bir atoma uygulanan kuvvet hesaplanabilir. Böylece Newton'un hareket yasaları, her atomun uzaysal konumunu zamanın bir fonksiyonu olarak tahmin etmek için kullanılabilir. Her bir atom üzerindeki kuvvetleri sürekli hesaplayarak ve ardından bu kuvvetleri her atomun konumunu ve hızını güncellemek için kullanır. Ortaya çıkan kareler, her noktada sistemin atomik düzeydeki konfigürasyonunu tanımlayan üç boyutlu bir filmidir. Bu simülasyonlar, herhangi bir deneysel teknikle çok zor olan, zaman içinde her noktada her atomun konumunu ve hareketini yakalaması, simülasyon koşulları kesin olarak bilinmesi ve dikkatli bir şekilde kontrol edilebilmesi nedenleriyle oldukça güçlüdür. Bir proteinin çevresinde başka moleküllerin mevcut olduğu ilk konformasyonu, protonasyonu durum, sıcaklık, bir zar üzerindeki voltaj gibi çeşitli koşullar altında gerçekleştirilen simülasyonları karşılaştırarak herhangi bir proteine hangi ligandların bağlı olduğu, herhangi bir mutasyona veya translasyon sonrası modifikasyonların olup olmadığı belirlenerek çok çeşitli moleküler bozulmaların etkileri tespit edilebilir. MD simülasyonundaki kuvvetleri hesaplamak için, kuantum mekaniksel hesaplamaların sonuçlarına ve tipik olarak belirli deneysel ölçümlere uyan moleküler mekanik kuvvet alanını

kullanır. Örneğin, tipik bir kuvvet alanı, doğal olarak yaklaşık değerler kullanılarak, atomlar arasındaki elektrostatik (Coulombic) etkileşimleri yakalayan, her bir kovalent bağın tercih edilen uzunluğunu modelleyen ve diğer birçok atomlar arası etkileşimi yakalayan terimleri içerir. Simülasyonların çeşitli deneysel verilerle karşılaştırılması, kuvvet alanlarının son on yılda önemli ölçüde iyileştiğini (Lindorff-Larsen *et al.* 2012) ancak kusurlu kaldıklarını ve simülasyon sonuçları analiz edilirken bu yaklaşımların getirdiği belirsizlikler dikkate alınmalıdır. Sistemin küçük bir bölümünün kuantum mekaniksel hesaplamalar kullanılarak ve geri kalanının ise moleküler mekanik simülasyonu kullanılarak modellendiği kuantum mekaniği/moleküler mekanik (QM/MM) simülasyonları, kovalent bağlarda değişiklikler içeren veya ışığın absorpsiyonu tarafından yönlendirilen reaksiyonları incelemek için sıklıkla kullanılır (Seen ve Thiel 2009). Bir MD simülasyonundaki zaman adımları kısa olması yani her biri yalnızca birkaç femtosaniye olması durumunda sayısal kararlılığını sağladığını gösterir. Biyokimyasal ilgi olaylarının çoğu, örneğin proteinlerdeki fonksiyonel olarak önemli yapısal değişiklikler- nanosaniye, mikrosaniye veya daha uzun zaman ölçeklerinde gerçekleşir. Bu nedenden dolayı bir simülasyon milyonlarca veya milyarlarca zaman adımını içerir. Bu ise, tipik olarak tek bir zaman adımında değerlendirilen milyonlarca atomlar arası etkileşimlerin kombinasyonu, simülasyonların hesaplama açısından çok popüler olmasına yol açar. Son on yılda, bilgisayar donanımındaki ve MD için kullanılan algoritmalar ve yazılımlardaki gelişmeler, daha uzun ve daha düşük maliyetle simülasyonların olabileceğini bizlere sundu. Böylece son derece gelişmiş donanım, (Shaw *et al.* 2008), belirli simülasyonların milisaniyelik zaman ölçeklerine ulaşmasına izin vererek, elde edilebilir maksimum hızda büyük bir artışa yol açmıştır. Belki daha da önemlisi, GPU'lar, bir veya iki ucuz bilgisayarda çalışan simülasyonların, daha önce çoğu süper bilgisayarda gerçekleştirilenlerden daha iyi performans göstermesine izin verdi (Salomon-Ferrer *et al.* 2013). Bu GPU'lar, biyolojik olarak anlamlı zaman ölçeklerinde simülasyonları her zamankinden çok daha fazla araştırmacı tarafından erişilebilir hale getirdi. Gerçekten de simülasyonları gerçekleştirmek artık nispeten basittir ve faydalı miktarlarda simülasyon gerçekleştirmek için hesaplama kaynaklarına giderek daha geniş bir şekilde erişilebilir.

Simülasyonlarda bazı aşamalarda uzmanlık gerektirdiği düşünülmektedir. Bunlar ise hangi soruların ele alınabileceğini bulmak, bu sorulara yönelik simülasyonlar tasarlamak ve simülasyon sonuçlarını yorumlamak gerektiği söylenebilir. Simülasyon sonuçlarını yorumlarken bir miktar titreşen atomu tanımlayan büyük miktarda yörünge verisinden biyolojik içgörü elde etmek özellikle zor olabilir. Fakat çok gelişmiş simülasyon teknikleri sayesinde bu tür zorlukların üstesinden gelinebilir

Yeni ilaçların tespiti sürecinde, simülasyonların deneyleri yönlendirdiği yeni bir alan kullanımı başlamıştır (Borhani ve Shaw 2012). Yapısal biyolojideki son gelişmeler, birçok önemli nörobilim ilaç keşif hedefi (örneğin, GPCR'ler, iyon kanalları, taşıyıcılar, vb.) için yeni yapıların bulunmasına neden olmuştur. Bu ve diğer hedefler için yapıya dayalı ilaç tasarımının gücünden tam olarak yararlanmak için bu proteinlerin dinamik özelliklerinin dikkate alınmasını gerekir. MD simülasyonu, bir ligandın etkinliğini veya diğer özelliklerini iyileştirmek için değiştirildiği öncül optimizasyonunda özellikle değerlidir. Niteliksel düzeyde simülasyonlar Simülasyonlar, bir ligand tarafından indüklenen bağlama oyuğunun yeniden düzenlemelerini tahmin etmek veya potansiyel ligand pozlarını test etmek ve iyileştirmek için bir ligandın bağlanma oyuğu ile yaptığı temel etkileşimleri tanımlamak için kullanılabilir (Spahn *et al.* 2017). Bazı durumlarda, ligand bağlama sürecinin bütün simülasyonları, bir ligandın bağlanma bölgesini ve pozunu ortaya çıkarabilir (Shan *et al.* 2011). Nicel düzeyde ise, simülasyona dayalı yöntemler, ligand bağlanma afinitelerinin dokingi gibi diğer hesaplama yaklaşımlardan büyük ölçüde daha doğru tahminlerini sağlayarak avantaj sunar (Perez *et al.* 2016). MD simülasyonunu kullanarak suyun sürekli çözücü modellerine dayanan MM/genelleştirilmiş Born yüzey alanı (GBSA) ve MM/Poisson-Boltzmann yüzey alanı (PBSA) yöntemleri önemli ölçüde hızlı olması avantaj sunarken, doğruluğunun ise daha az olması dezavantajı sağlar (Hou *et al.* 2011). MD, bir hedefe bağlaması tahmin edilen bir ligand setinin seçildiği sanal tarama çalışmaları için de faydalı olabilir. Hedef proteinin tek bir yapısı kullanılarak doking yapılması, geleneksel sanal tarama ile gerçekleştirilir (Shoichet, 2004). Gerçekte, bağlanma oyuğu oldukça esnek olabilir ve tek bir yapıya doking bu nedenle yalnızca bir bağlayıcı alt kümesinin tanımlanmasına yol açacaktır. Tanımlanan bağlayıcı ligandların çeşitliliğini artırabilmesi için simülasyonla tanımlanan birden fazla olası yapının dikkate alınmasıyla gerçekleştirilebilir (Amaro *et al.* 2008).

Simülasyonlar ayrıca, son zamanlarda ilaç etkinliği ve güvenliği için kritik olarak kabul edilen özellikler olan bağlanma ve ayrışma kinetiğine sahip ilaçların tasarımına da yardımcı olabilir. Ligandların belirli hedeflerdeki etkinliği, örneğin, bağlanma afinitesinden ziyade kalma süresi ile daha iyi ilişkilidir. Bir dizi simülasyon çalışması, çeşitli hedeflerde bağlanma ve ayrılma kinetiklerini kontrol eden faktörleri açıklayarak, daha hızlı veya daha yavaş kinetik ile rasyonel ligand tasarımı için bir temel sağladı (Wacker *et al.* 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, MD tabanlı yöntemlerin kullanılmasıyla hedef ligandları ayrışma oranlarına göre sıralandığını göstermiştir (Dickson *et al.* 2017).

Newton'un ikinci yasasına veya $F=ma$ hareket denkleminde dayanan moleküler dinamik simülasyon yöntemi, denklemden yola çıkarak, burada parçacık üzerine uygulanan kuvveti F

ile temsil ederken, parçacığın kütlesini belirtmek için m ve ivmesini ifade ederken a ile verilir. Her bir atom üzerindeki kuvvet bilgisinden, sistemdeki her bir atomun ivmesini belirlemek mümkündür. Hareket denklemlerinin entegrasyonu, zamanla değişen parçacıkların konumlarını, hızlarını ve ivmelerini tanımlayan bir yörünge verir. Özelliklerin ortalama değerleri bu yörüngeden belirlenebilir. Yöntem determinist olup, sistemin durumu gelecekte veya geçmişte herhangi bir zamanda tahmin edilebilmesi her bir atomun konumu ve hızları bilinmesi gerekir.

Newton'un hareket denklemi şu şekilde verilir:

$$F_i = m_i a_i$$

Burada i parçacığına uygulanan kuvveti F_i ile gösterirken, i parçacığının kütlesini m_i , ve, i parçacığının ivmesini belirtmek için a_i kullanılır. Kuvvet, potansiyel enerjinin değişimi olarak da aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$F_i = -\nabla_i V$$

Bu iki denklemin birleştirilmesiyle aşağıdaki denklem elde edilir. Sistemin potansiyel enerjisini V ile ifade edilir. Newton'un hareket denklemi, potansiyel enerjinin türevini, zamanın bir fonksiyonu olarak konumdaki değişikliklerle ilişkilendirebilir.

$$-\frac{dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

Newton'un İkinci Hareket Yasası: basit bir uygulama

$$F = m \cdot a = m \cdot \frac{dv}{dt} = m \cdot \frac{d^2 x}{dt^2}$$

İvmenin sabit olduğu basit durumu ele alırsak

$$a = \frac{dv}{dt}$$

Entegrasyondan sonraki hız için bir ifade elde ederiz

$$v = at + v_0$$

dan beri

$$v = \frac{dx}{dt}$$

Elde etmek için bir kez daha entegre edebiliriz.

$$x = v \cdot t + x_0$$

Bu denklemi hız ifadesi ile birleştirerek, t zamanındaki x değerini ivmenin, a, başlangıç konumu x_0 ve başlangıç hızının, v_0 fonksiyonu olarak veren aşağıdaki bağıntıyı elde ederiz.

$$x = \frac{1}{2} * a * t^2 + v_0 * t + x_0$$

İvme, potansiyel enerjinin konuma göre türevi olarak verilir.

$$a = -\frac{1}{m} \frac{dE}{dr}$$

Bu nedenle, bir yörünge hesaplamak için, yalnızca atomların başlangıç konumlarına, hızların bir başlangıç dağılımına ve potansiyel enerji fonksiyonunun gradyanı tarafından belirlenen ivmeye ihtiyaç vardır. Hareket denklemleri deterministtir, örneğin sıfır zamanındaki konumlar ve hızlar, diğer tüm zamanlardaki konumları ve hızları belirler. Başlangıç konumları, proteinin x-ışını kristal yapısı veya NMR spektroskopisi ile belirlenen çözelti yapısı gibi deneysel yapılardan elde edilebilir.

Hızların ilk dağılımı genellikle, büyüklükleri gerekli sıcaklığa uyan ve düzeltilen rastgele bir dağılımdan belirlenir ve böylece genel bir momentum olmaz

$$P = \sum_{i=1}^N m_i v_i = 0$$

Hızlar (v_i), genellikle belirli bir sıcaklıkta bir Maxwell-Boltzmann veya Gauss dağılımından rastgele seçilir; bu, bir T sıcaklığında bir i atomunun x yönünde v_x hızına sahip olma olasılığını verir.

$$p(v_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left[-\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T} \right]$$

Sıcaklık, ilişki kullanılarak hızlardan hesaplanabilir.

$$T = \frac{1}{(3N)} \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{m_i}$$

Sistemdeki atom sayısı N ile gösterilir.

Glide, Schrödinger tarafından sağlanan ticari bir doking programıdır (Friesner *et al.* 2006). Reseptörün aktif bölgesi bölgesinde ligandın olası konumlarını aramak için hiyerarşik bir dizi filtre kullanır. Kapsamlı bir arama algoritması ile ligand esnekliği için sistematik bir yöntemi vardır. Öngörülen bağlanma afinitesi $\Delta G_{\text{bağlanma}}$ ve bağlanma pozunun

sıralaması, ChemScore işlevine dayalı GlideScore işlevi kullanılarak aşağıdaki denkleme göre gerçekleştirilir.

$$\Delta G_{bağlanma} = C_o + C_{lipo} \sum f(r_{lr}) + C_{hidrojenbağ} \sum g(\Delta r)h(\Delta a) + C_{metal} \sum f(r_{lm}) + C_{rotb}H_{rotb}$$

Glide protokolü 4 adıma dayanır: ligandlar ve protein hazırlama, reseptör sistemi oluşturma ve doking işlemi. Doking adımını başlatmadan önce, Glide, ligand pozlarının giderek daha doğru bir şekilde puanlanmasını sağlayan birkaç farklı alan kümesi kullanarak, reseptörün şeklini ve özelliklerini temsil eden bir sistem oluşturmalıdır. Sistem, reseptörünün yalnızca ilgili bölgesine kenetlenmesine izin vererek, zaman hesaplamalarından tasarruf sağlar. VS iş akışı 3 doking aşama içerir: HTVS (Yüksek Verimli Sanal Tarama), SP (Standart Hassasiyet) ve XP (ekstra Hassasiyet). İlk aşama, HTVS doking işlemini gerçekleştirir. Çok fazla sayıda ligandın hızlı taranması için tasarlanmıştır ve SP dokingden çok daha sınırlı konformasyonel örnekleme sahiptir. İkinci aşama SP doking işlemini gerçekleştirir. Üçüncü aşama, XP doking ve puanlamadır. GlideScore, ChemScore puanlama fonksiyonunun değiştirilmiş ve genişletilmiş versiyonunun bir uygulamasını kullanan daha güçlü ve ayırt edici bir prosedürdür. Aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanır (Friesner *et al.* 2004).

$$\begin{aligned} \Delta G_{bağlanma} = & C_{lipo-lipo} \sum f(r_{lr}) \\ & + C_{hidrojenbağ-nötr-nötr} \sum g(\Delta r)h(\Delta a) \\ & + C_{hidrojenbağ-nötr-yüklü} \sum g(\Delta r)h(\Delta a) \\ & + C_{hidrojenbağ-yüklü-yüklü} \sum g(\Delta r)h(\Delta a) \\ & + C_{max-metal-iyon} \sum f(r_{lm}) + C_{rotb}H_{rotb} \\ & + C_{polar-phob}V_{polar-phob} + C_{coul}E_{coul} + C_{vdW}E_{vdW} \\ & + \text{Çözünme terimleri} \end{aligned}$$

Lipofilik-lipofilik terim ChemScore'da olduğu gibi tanımlanır. Hidrojen bağı terimi ayrıca ChemScore formunu kullanır, ancak verici ve alıcının hem nötr hem de biri nötr, diğerinin yüklü veya her ikisinin de yüklü olmasına bağlı olarak farklı ağırlıklı bileşenlere ayrılır. Optimize edilmiş puanlama fonksiyonunda, ilkinin en dengeleyici olduğu ve

sonuncusu olan yüklü terimin en az önemli olduğu bulunmuştur. Metal-ligand etkileşimi terimi, ChemScore'da kullanılanla aynı fonksiyonel formu kullanmasına rağmen üç temel yolla farklılık gösterir. Bu farklılıklardan ilki olarak, bu terim yalnızca anyonik alıcı atomlarla (bir karboksilat grubunun iki oksijeninden biri gibi) etkileşimleri dikkate alır. Bu modifikasyon, Glide'ın anyonik ligand işlevselliğinin metaloproteazlardaki metal merkezlere koordinasyonu için belirgin güçlü tercihi tanımasını sağlar. Ayrıca, Glide, iki veya daha fazla metal ligasyonu bulunduğunda yalnızca en iyi tek etkileşimi sayar. Üçüncüsü, bağlanmamış apo proteinindeki metal iyonu üzerindeki net yükü değerlendirilir. Genellikle doğrudan koordineli protein yan zincirlerinin incelenmesi yoluyla anlaşılır. Ligand ve reseptör arasındaki Coulomb ve vdW etkileşim enerjilerinden gelen katkıların dahil edilmesidir. Ligand ve reseptör arasındaki Coulomb ve vdW etkileşim enerjilerinden gelen katkıların dahil edilmesi ise ikinci ana bileşeni verir. Gaz fazı Coulomb etkileşim enerjisini bağlanmanın daha iyi bir öngörücüsü yapmak için, karboksilatlar ve guanidinyumlar gibi formal yüklü gruplar üzerindeki net iyonik yük yaklaşık %50 oranında azaltılır ayrıca doğrudan dahil olan atomlar için vdW etkileşim enerjileri de azaltılır. Bir çözme modelinin tanıtılmasını veren ise üçüncü ana bileşendir.

Bir diğer önemli bileşen, bir çözme modelinin tanıtılması ve çözme etkilerinin dahil edilmesidir. Başlıca bileşenler, ligand ve reseptör arasındaki Coulomb ve vdW etkileşim enerjilerinden gelen katılardır. Glide, ligand pozu için suları aktif bölgeye yerleştirir ve çeşitli grupların sulara maruz kalmasını değerlendiren ampirik puanlama terimlerini kullanır.

$$XPGLideScore = E_{coul} + E_{vdW} + E_{bağlanma} + E_{penaltı}$$

$$E_{bağlanma} = E_{hyd_çevreleme} + E_{hb_nn_motif} + E_{hb_yy_motif} + E_{PI} + E_{hb_çift} + E_{fobik_çift}$$

Burada, Ehyd_çevreleme hidrofobik çevrelemeyi temsil eder; Ehb_nn_motif özel nötr-nötr H-bağ motiflerini temsil eder; Ehb_yy_motif, özel yüklü H-bağ motiflerini, EPI pi-istifleme ve pi-kasyon etkileşimlerini ve Efobik_çift hidrofobik atom-atom çifti enerjilerini temsil eder. Ehb_çift terimi, ChemScore puanlama işlevinde tanımlananla aynıdır.

$$E_{penaltı} = E_{desolv} + E_{ligand_gerilme}$$

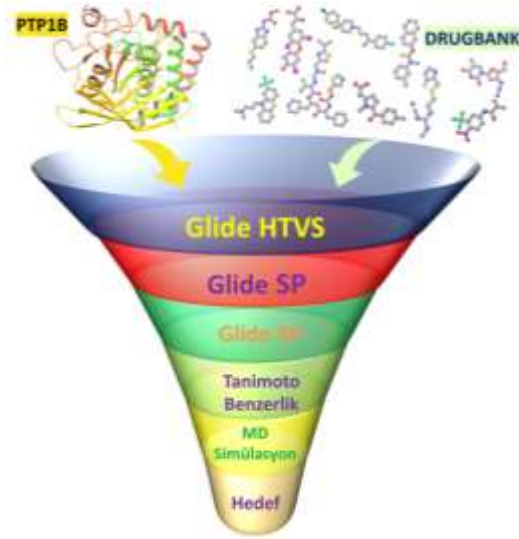
E_{desolv}, desolvasyon penaltılarını ve E_{ligand_gerilme} etkileşim cezalarını temsil eder.

Glide, Schrödinger (Friesner *et al.* 2004) tarafından sağlanan ve yalnızca reseptörün ilgili bölgesini doking için tasarlanmış ticari bir doking programıdır, böylece zaman hesaplamalarından tasarruf sağlar. Sanal tarama iş akışı 3 doking aşaması içerir: HTVS, SP ve XP. İlk aşama, HTVS doking işlemini gerçekleştirir. Çok fazla sayıda ligandın hızlı taranması için tasarlanmıştır ve SP dokingden çok daha sınırlı konformasyonel örneklemeye sahiptir.

İkinci aşama SP doking işlemini gerçekleştirir. Kalitesi bilinmeyen ligandların çok sayıda taranması için uygundur. Üçüncü aşama, XP doking ve puanlamadır. ChemScore puanlama fonksiyonunun GlideScore (Friesner *et al.* 2004) olarak adlandırılan ve ampirik bir puanlama fonksiyonu olarak kategorize edilen değiştirilmiş ve genişletilmiş bir versiyonunun uygulamasını kullanan daha güçlü ve ayırt edici bir prosedürdür. Glide, sanal tarama, doğru bağlama modu hassasiyeti gerçekleştirmek için kullanılabilir ve ayrıca Glide, çeşitli reseptör türleri arasında mükemmel doking doğruluğu ve yüksek zenginleştirme sergiler.

D. E. Shaw Research'te geliştirilmiş bir yazılım paketi olan ve basit bir temele dayanan desmond; basit bir özgün paralel algoritmalar ve sayısal yöntemler kullanılarak birden fazla işlemci içeren platformlarda oldukça yüksek performans elde edilir. Bir yazılım paketi olan desmond, hızlı ve doğru moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirmek için kullanılan algoritmaları destekler. Elektrostatik enerji ve kuvvetler, particle mesh Ewald tabanlı yöntemler kullanılarak hesaplanabilir. Sınırlamalar M-SHAKE algoritması kullanılarak uygulanabilir. Bu yöntemler, zaman ölçekli bölme entegrasyon şemaları ile birlikte kullanılabilir. Desmond, Drude formalizmine dayalı polarize edilebilir kuvvet alanları ile uyumlu olup ayrıca biyomoleküler simülasyonlarda kullanılan birçok standart sabit yüklü kuvvet alanı için enerjileri ve kuvvetleri hesaplayabilir

Desmond yazılım, atomik pozisyonları ve moleküler konfigürasyonları sınırlama yöntemlerinin de destekler; simülasyonların çeşitli periyodik hücre konfigürasyonları kullanılarak gerçekleştirilmesine izin verir. Ayrıca bu yazılım sıcaklık kontrolü (Andersen, Nosé-Hoover ve Langevin) ve basınç kontrolü (Berendsen, Martyna-Tobias-Klein ve Langevin) yöntemleri de dahil çeşitli integratörler uygulanmıştır. Kuvvet alanları parametreleri, Viparr adlı şablon tabanlı bir parametre atama aracı kullanılarak atanabilir. Şu anda CHARMM, Amber ve OPLS kuvvet alanlarının çeşitli versiyonlarını ve farklı su modellerini desteklemektedir



Şekil 1. Sanal tarama akışı

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde bidentate inhibitör stratejisi kullanılarak ilaç reporposing çalışmasının yapılmadığı belirlendi. İlaç reporposing, var olan ilaçların tekrar farklı amaç için kullanılması anlamına gelmektedir. Bu amaçla bu çalışmada Şekil 1’de verilen sanal tarama akışı takip edildi. Drugbank databazı kullanılacak ve PTP1B proteinin hem aktif bölge hemde fosfotirozin bağlanma bölgesi hedef reseptör bölge olarak seçildi. Ayrıca aynı tarama TCPTP proteini için de yapıldı, PTP1B ye ilgisi fazla TCPTP ye ilgisi az olan ilaç molekülü hedef molekül olarak belirlendi. Bu metot sayesinde Drugbank databazındaki ~10767 bileşikler içerisinde PTP1B proteinine karşı ilgisi yüksek TCPTP proteinine karşı ilgisi düşük olan bileşikler tespit edils, ayrıca MMGBSA skorları göz önüne alınarak tespit edilen en etkin inhibitör komplekslerinin, liganda bağlanma stabilitesini ölçmek üzere moleküler dinamik simülasyon çalışmaları yapıldı. Bilinen ilaçların farklı bir amaç için kullanımına olanak sağlayabilecekleri ve potansiyel seçici PTP1B inhibitörleri olabilecekleri belirlendi.

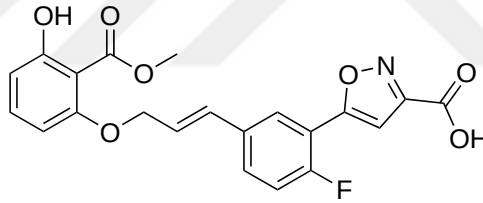
KURAMSAL TEMELLER

Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B), insülin ve leptin sinyal yollarının ana negatif düzenleyicisi olarak işlev görmektedir. Bunun ışığında, PTP1B kanser, diyabet ve obeziteye karşı ilaç geliştirme için önemli bir hedef olduğu düşünülmektedir. Bu hipotezi kanıtlar nitelikteki yapılan bir çalışmada Elchebly ve Klamman arkadaşları tarafından, PTP1B nakavt fareler üzerinde yapılan iki çalışma, PTP1B eksikliğinin insülin duyarlılığını artırdığını, kan glukozunu ve insülin düzeylerini düşürdüğünü, ayrıca yüksek yağlı diyeteye yanıt olarak insülin direncinin gelişmesini engellediğini ortaya koymuştur. Dahası, bu çalışmalar, tip II diyabet ve obezite tedavileri için olası inhibitörlerin araştırılmasına ilgi uyandırmıştır (Elchebly *et al.* 1999; Klamman *et al.* 2000).

Tezde daha önce belirtildiği gibi, kadınlarda en sık görülen kanser çeşitlerinden biri olan meme kanseri, yüksek ölüm oranına sahip olduğundan dünya çapında bir endişe kaynağıdır. Bu durum Tonks ve arkadaşlarını harekete geçirerek, PTP1B'in aşırı ekspresyonunun meme tümörü ile de ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışma bizlere PTP1B inhibitörlerinin meme kanseri için yeni tedavi ajanı olabileceği sonucunu vermiştir (Tonks ve Muthuswamy 2007).

Yapılan araştırmalarda aktif bölgeye ve ikinci pTyr bağlanma bölgesine bidentat bağlanmanın, inhibitör seçiciliğini arttırabileceği düşünülmüştür. Buna bağlı olarak da Puius ve arkadaşları, ilk olarak bis (para-fosfofenil) metanla ilgili bir çalışmada bidentat inhibitörleri önermiştir. Bu çalışma grubu tarafından kompleksin kristal yapısının analizi sonucu inhibitörler ile Arg24- Arg254 rezidüleri arasında etkileşimlerin olduğu ve aktif bölgeye bitişik derinde olmayan bağlayıcı bir bölge tespit edilmiştir. Ayrıca PTP1B ve TCPTP arasındaki dizi hizalaması ile Arg24 ve Arg254'ün her iki enzim için korunduğu, fakat ikinci pTyr bağlanma bölgesinde farklı rezidülerin (Phe52/Tyr54, Ala27/Ser29 ve Cys32/His34 (PTP1B/TCPTP) bulunduğu belirlenmiştir ve bu farklılıklar PTP1B ve TCPTP arasındaki farkları belirlemek için kullanılabilir olduğunu düşündürmektedir (Puius *et al.* 1997; Iversen *et al.* 2002). Daha ileri çalışmalar sayesinde Q-loop üzerindeki Gln262 ve Met258'in, aktif bölge ve pTyr bağlanma bölgeleri arasındaki temel bağlayıcıların olduğu belirlenmiştir. PTP1B deki aktif bölge ve pThr bağlanma bölgelerinde ki bu rezidüleri hedefleyen bidentat inhibisyonu, seçici inhibitörler geliştirmek için yararlı bir strateji olabileceği sonucuna varılmıştır (Chen *et al.* 2018).

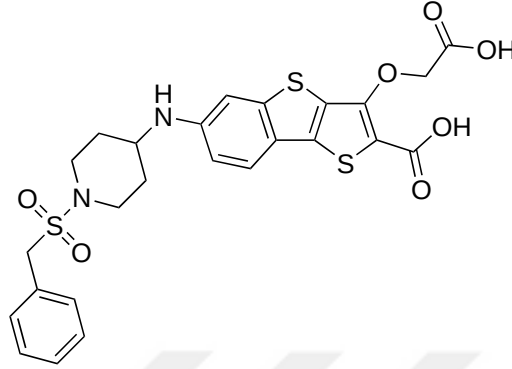
PTP1B'nin katalitik alanı, bir katalitik bölge (A bölgesi) ve üç komşu katalitik olmayan bölge (B bölgesi, C bölgesi ve D bölgesi) olmak üzere dört bölgeye ayrılabilir. A bölgesi, insülin reseptörü kinaz aktivasyon peptidinin fosfotirozin (Tyr) rezidülerinin defosforile edildiği enzimin katalitik oyuğudur. PTP1B, fosfat bağlama bölgesinde ($^{213}\text{VHCSAGIRGRSG}^{223}$) %100 dizi özdeşliği ile TCPTP'ye yüksek homolojiye sahip olduğundan, yalnızca A bölgesine bağlanan inhibitörlerin iyi seçicilik kazanamadıkları bilinmektedir. C-terminali tarafında, ikinci bir pTyr yan zinciri PTP1B yüzeyindeki çöküntüde bulunan Arg24 ve Arg254 rezidüleri tarafından tutularak bir ikincil bağlanma bölgesi (B bölgesi) oluşur. Arg24, Arg254 ile oluşan hidrojen bağları veya Phe52, Cys32, Met258 ile hidrofobik etkileşimler vasıtasıyla bu bölgeyi işgal etmek, eş zamanlı olarak inhibitör aktivitesi ve seçiciliği artırılabilir (Adams *et al.* 2007). C bölgesi yüksek oranda çözücüye maruz kalır ve Lys41 ve Arg47 hariç tamamen sabittir ve A bölgesi ile Tyr46-Asp48 rezidülerini paylaşmaktadır. C bölgesi, bağlanma belirleyicilerinin eksikliği nedeniyle, genellikle süstituentlerin bağlanma konformasyonlarının doğru tahminlerini gerektiren yapı bazlı tasarım teknikleri için A ve B bölgelerinden daha az uygun olacaktır (Ala *et al.* 2006). D bölgesi, çözücünden kısmen korunan, polar ve yüklü rezidülerle (Lys120, Lys116, Asp181 ve Ser216) kaplı küçük, dar bir oyuktan oluşmaktadır (Ala *et al.* 2006).



Şekil 2. 1 nolu bileşik

Daha ileri çalışmalarda, hem insülin reseptöründeki ikinci fosfotirozin (pTyr) bağlanma bölgesine hem de inhibitörlerde hidrojen bağı alıcılarına bağlanmasında, Arg254 ve Arg24 rezidülerinin önemli bir rol oynadıkları görülmüştür. Ayrıca Liu grubu, TCPTP'ye karşı yüksek seçiciliğe sahip bir PTP1B inhibitörü tanımlamıştır. PTP1B ile Şekil 2'de verilen 1 nolu bileşiğin X-ışını kristal yapı kompleksi (1Q1M), salisilat karboksilat grubunun Arg24, Arg254 ve Gln262 ile hidrojen bağlarının oluşturulmasının seçicilik belirleyicisi olduğunu göstermiştir. Salisilat karboksilat grubunun yokluğunda ise, seçicilik seviyesini 4 kat azaldığı belirlenmiştir. Ertesi yıl, Abbott Laboratuvarlarının yaptığı çalışmalarda, Arg24 ve Arg254 rezidülerinin hidrojen bağları oluşturan bir salisilat karboksilat grubu ile seçiciliği (21 kat) olan bir başka PTP1B inhibitörü elde edilmiştir (Zhao *et al.* 2004). Bu sonuçlar inhibitörlerin Arg24 ve Arg254 ile hidrojen bağ oluşturmalarının iyi bir seçicilik getireceğini düşündürmüştür. Buna örnek olarak pTyr bağlanma bölgesindeki Arg24 ve Arg254 rezidüleri

ile etkileşen bir salisilat grubu içeren izotiazolidinon (IZD) inhibitörü, sadece 2 kat seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, Arg254 ve Arg24 ile bir tuz köprüsüne veya H-bağ etkileşimine katılabilen naftoik asit grubunun eklenmesi, inhibe edici aktivitesinde 25 kat iyileşme sağlarken yalnızca 2,23 kat seçicilik sağladığı belirlenmiştir (Szczebankiewicz *et al.* 2003).

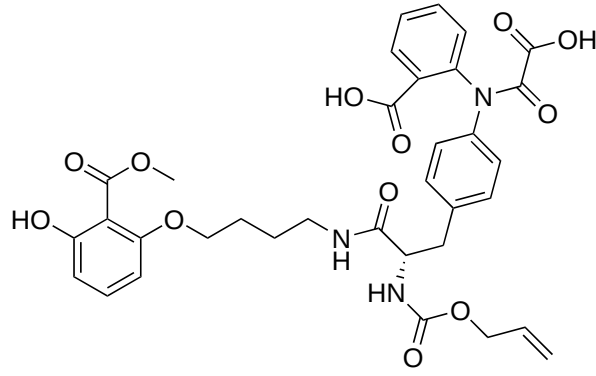


Şekil 3. 2 nolu bileşik

Moretto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 0,370 μM 'lık bir K_i değerine sahip yeni bir PTP1B piridotiyoferen inhibitörü (Şekil 3) tanımlamıştır. Bu PTP1B'nin X-ışını ko-kristal yapısındaki (2B07), sülfonamid oksijenleri, hidrojen bağlarından birinin Gly259'un omurga azotuna, diğeri ise su moleküllerine bağlanarak Arg24 ve Arg254 ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Bu etkileşimler inhibitör aktivitesini (25 kat) artırabilmişken TCPTP'ye göre seçicilik oluşturmamıştır (Moretto *et al.* 2006).

Klopfenstein *et al.* (2006)'ın bu çalışmasında, TCPTP'ye göre 2 kat seçiciliğe sahip PTP1B inhibitörleri olarak bir 1,2,3,4-tetrahidroizokinolinil sülfamik asit elde edilmiş, burada sülfamik asit parçası Arg24, Arg254 ve Gln262 ile hidrojen bağı etkileşimlerini gerçekleştirmiştir. Bu örnekler PTP1B ve TCPTP arasındaki seçicilikle ilgili tanıma bölgesinin, Arg24 ve Arg254 rezidüleri olduğunu göstermektedir. Bir salisilat karboksilat grubu ile bu iki rezidülerle hidrojen bağları yapmak, tatmin edici bir seçicilik sağlayabilirken, uygun olmayan grupların ise sadece inhibe edici aktiviteyi iyileştirebileceği görülmüştür.

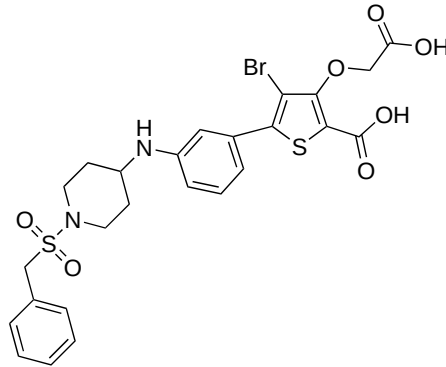
Ortaya çıkan TCPTP kristal yapısının, B bölgesinde Phe52/Tyr54 ve Cys32 /His34 tarafından tanımlanan alanın PTP1B ve TCPTP arasında farklı substrat tanıma kapasiteleri sağlayabileceği ortaya çıkmıştır (Iversen *et al.* 2002). Salisilat bağlama bölgesine, B bölgesinde Phe52/Tyr54 ve Cys32 /His34 tarafından tanımlanan bu alanın çok yakın olduğu görülmüştür (Liu *et al.* 2003).



Şekil 4. 3 nolu bileşik

Abbott laboratuvar grubunun yaptığı bir diğer çalışmada ise TCPTP'ye göre 4 kat seçiciliğe sahip yarışmalı ve güçlü bir PTP1B inhibitörü (Şekil 4) tanımlamıştır. PTP1B'nin X-ışını yapısı ve salisilat karboksilat grubunun Arg24 ve Arg254 ile hidrojen bağı etkileşimi içinde olduğunu göstermiştir (Liu *et al.* 2003).

Lau ve arkadaşları ise, $IC_{50}=0,003 \mu M$ olan güçlü bir PTP1B inhibitörü bulmasına rağmen, TCPTP'ye karşı hiçbir seçicilik bulamamıştır. Bu modellemeyi yola çıkarak, grupların F52'ye doğru çıkıntı yapmasıyla, az miktarda seçicilik elde edilebileceğini öne sürmüştür. Ayrıca, metoksi ve izobutil gibi grupların eklenmesi, PTP1B'de Phe52 ile bir etkileşime zorlamış, ancak bu, TCPTP'de daha büyük Tyr tarafından daha az tolere edilmiş ve bu sonuçta TCPTP'ye karşı orta düzeyde seçiciliğe yol açmıştır. Böyle bir stratejinin birçok başarı örneği olmasına rağmen, benzer keşiflerin tümü tatmin edici olarak bulunmamıştır (Lau *et al.* 2004).



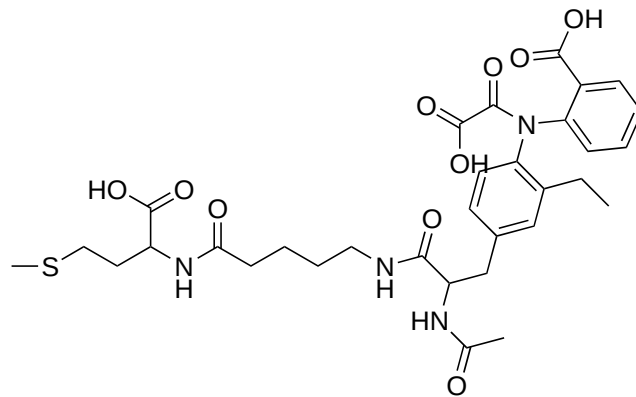
Şekil 5. 4 nolu bileşik

Wan grubu yaptığı çalışmada, tek basamaklı bir sentez ile nanomolar bileşik elde etmiş (4) ve K_i değerini $0,004 \mu M$ olarak bulmuştur. X-ışını kompleks yapısı (2QBP), sülfonil oksijenlerden birinin (Şekil 5) su aracılı hidrojen bağları yoluyla Arg24 ve Arg254 ile etkileşime girdiğini ve benzil grubunun da Phe52 ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Ancak bu bileşiğin PTP1B ve TCPTP arasında seçiciliğinin olmadığı belirlenmiştir B bölgesinin

anahtar bağlantı noktaları Arg24 ve Arg254 ile etkileşimler uzun süredir spesifik PTP1B inhibitörünü tasarlamamanın tek yolu olarak kabul edilmişti. Fakat sonraki çalışmalar, hidrofobik rezidülerle (Phe52, Cys32 ve Met258) etkileşimlerin, Arg24 ve Arg254 ile koordinasyonu olmadan, TCPTP üzerinden yüksek seçici inhibitör verebileceğini bulmuştur (Wilson *et al.* 2007).

Lakshminarayana *et al.* (2009)'un çalışmasında, bir dizi güçlü, yeni, fosfonik olmayan asit içeren PTP1B inhibitörü keşfedilmiştir. Bir incelemede ise, uygun boyut ve uzunluğa sahip hidrofobik grupların TCPTP'ye göre güçlü ve iyi özgüllük sağlayabileceğini ortaya çıkarmıştır. Lakshminarayana'nın görüşüne göre, bileşiğin yan zinciri, maksimum seçiciliği ortaya çıkarmak için pirrolidino grubu ile B bölgesini tamamen işgal etme yeteneği sunmuştur. Li grubu yaptığı bir çalışmada ise B bölgesi ile polar olmayan ve hidrofobik etkileşimlerin, seçiciliği artırabileceğini görmüştür (Zhang ve Blom 2010).

Rezidülerin sekans hizalaması, PTP1B'deki Cys32'nin, B bölgesinin uzağında yer alan önemli bir tanıma bölgesi olduğunu göstermiştir. Seto grubu tarafından yapılan 2010 yılındaki çalışmada, bidentat α -ketoasit bazlı inhibitörlerin birkaç tirozin fosfataza karşı odaklı bir kütüphanesi taranmıştır. Bu tarama sonucu en güçlü bileşik, PTP1B'ye karşı 0,22 μ M 'lik IC₅₀ değerlerine sahip olup ve bu bileşik TCPTP'ye göre 30 kat bir seçicilik göstermiştir. Moleküler modelleme çalışmaları, TCPTP'nin yan zinciri olan His34, TCPTP'ye kıyasla PTP1B'nin büyük ölçüde seçicilik göstermesinde rol oynadığı görülmüştür. Terminal difenil eter halkası üzerindeki 4-fenil gibi daha küçük gruplara dönüştürüldüğünde, TCPTP'ye karşı seçiciliğin azaldığı görülmüştür (Chen ve Seto 2004).

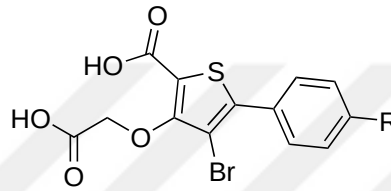


Şekil 6. 5 nolu bileşik

2003 yılında Xin ve arkadaşları, TCPTP'ye göre orta derecede seçiciliğe (5 kat) sahip oldukça güçlü bir PTP1B inhibitörü (Şekil 6) tanımlamıştır. X-ray kristalografik sonucunda elde edilen (1NZ7), Phe52 ve Met258 rezidüleri ile etkileşimin bu tür seçiciliği elde etmenin zor olduğu göstermiştir (Xin *et al.* 2003). Liu ve arkadaşları ise, ikincil bağlanma bölgesini

işgal eden tek bir fenilin, TCPTP'ye göre seçicilik sağlayamayacağını bulmuştur. Ardından fenile, metoksi veya monohalojen eklendiğinde, TCPTP'ye göre seçiciliğin 10 kat arttığı belirlenmiştir. Seçicilik, fenilin piridinil ile değiştirilmesinden sonra daha da güçlendirilmiştir (21 kat) (Liu *et al.* 2012).

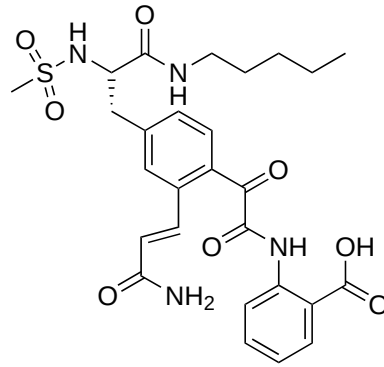
2011 yılında, bir serisi yapısal olarak ayrıcalıklı PTP1B inhibitörü olarak tanımlanan 2,3-disüstitüe edilmiş salisilik 1-metoksi-O-glukosit bileşiklerini tanımlamıştır. En güçlü inhibitör ($IC_{50} = 7,7 \mu M$), TCPTP'ye göre yedi kat seçicilik göstermiştir. Doking çalışmaları, benzen gruplarının Met258 ile hidrofobik etkileşim kurduğunu, salisilik öncüllerden birinin de Lys120 ve Tyr46 ile birkaç hidrojen bağı etkileşimi oluşturduğunu göstermiştir (Tang *et al.* 2011).



Şekil 7. 6 nolu bileşik

Arg47 ve Asp48 rezidüleri, katalitik bölgeye yakındır ve PTP1B'ye göre inhibitör seçiciliğinin sağlanmasında önemli olduğu düşünülmüştür. Buna bağlı olarak, Wan *et al.* (2006)'ın bu çalışmasında, $0,30 \mu M$ K_i değerine sahip bir PTP1B inhibitörü (Şekil 7) elde edilmiştir. X-ışını sonucu (2H4K), para pozisyonunun fenil halkası üzerinde değiştirilmesinin, Arg47 ve Asp48 rezidüleri ile etkileşimleri girebileceğini göstermiştir ve daha sonra, bir karboksilik grup tasarlayarak, Arg47 ile elektrostatik etkileşimini gerçekleştirmesi sağlanmıştır. Bu karboksilik grubun ise, inhibe edici aktivitede önemli bir gelişme göstermiştir. Ancak, PTP1B ve TCPTP'ye karşı inhibitör gücünde bir farklılaşma olmadığı belirlenmiştir

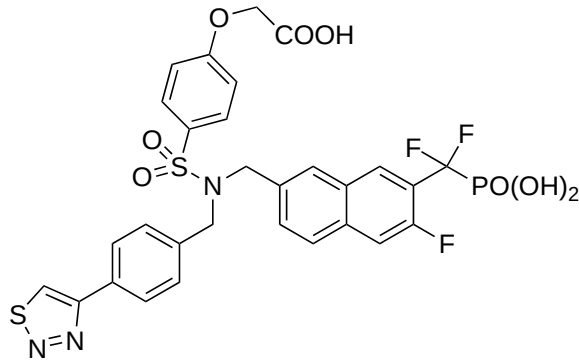
Sun *et al.* (2003)'ün yaptığı çalışmasında ise, TCPTP'ye göre 4 kat seçiciliğe sahip güçlü bir PTP1B inhibitörü bildirmiştir. Aktif bölgeye ek olarak, bu molekül ayrıca bir proksimal katalitik bölge içermeyip ve Arg47, Asp48 ve Lys41 rezidüleri tarafından oluşturulmuştur ve bu katalitik olmayan bölge ile etkileşime girmiştir. Arg47 ve bileşik arasındaki etkileşimler çoğunlukla hidrofobik olup ve her iki Tyr bağlayıcısının fenil halkalarını içerdiğini Sun ve arkadaşları düşünmektedir. Buna bağlı olarak 2005 yılında Xie ve arkadaşları tarafından, aktif bölge ile Arg-47 arasındaki mesafeyi kaplayacak kadar uzun olan iki dişli bir PTP1B inhibitörü sentezlemesine rağmen, bu bileşik, TCPTP üzerinden PTP1B'ye seçicilik göstermemiştir (Xie ve Seto 2005).



Şekil 8. 7 nolu bileşik

Geri dönüşümlü ve yarışmalı PTP1B inhibitörleri olarak bir dizi 2,3-dimetilfeniloksalilaminobenzoik asit türevi Liu ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. PTP1B ile 7 nolu bileşiğin (Şekil 8) oluşturduğu kompleksin (1ONY) X-ışını kristal yapısı, Asp48 ile arasında iki kritik hidrojen bağının gözlemlendiğini, mesafenin sırasıyla 2,57 (ana zincir NH) ve 2,44 (sülfonamido NH) olduğunu göstermesine rağmen, bu bileşikler PTP1B ve TCPTP arasında hiçbir seçicilik göstermemiştir (Liu *et al.* 2003).

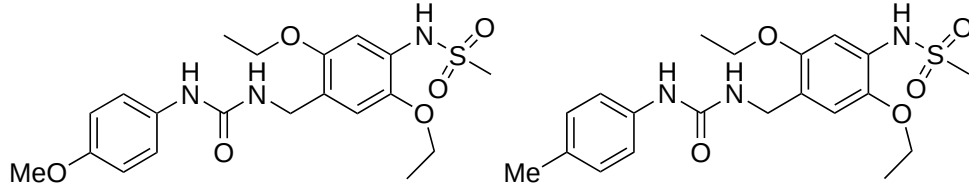
Ypılan bir çalışmada, bir (S) -izotiyazolidinon ((S) -IZD) heterosiklik'i, PTP1B'nin inhibitörü olarak Combs ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Özellikle, birincil amid ve α -amino işlevsellikleri, Asp48 ile bir çift dişli etkileşimi oluştururken, benzamid başlık hidrojeninin karbonili Tyr46 ile bağlanmıştır. Birçok önemli rezidü ile etkileşim olmasına rağmen, bu bileşik hala TCPTP üzerinde hiçbir seçicilik sergilememiştir (Combs *et al.* 2005).



Şekil 9. 8 nolu bileşik

2012 yılında, Patel grubu tarafından güçlü ve seçici PTP1B inhibitörleri olarak bir dizi triaril-sülfonamid türevi rapor edilmiştir. En güçlü bileşik olan Şekil 9'da verilen 8 nolu bileşik, TCPTP üzerinden PTP1B'ye karşı mükemmel seçicilik (96 kat) göstermiştir. Doking sonuçları, bileşiğin hem A hem de B bölgelerine çok iyi yerleştiğini göstermiştir. 2-Fenoksiasetik asit grubu, Asp48 ile iki hidrojen bağı oluşturmuş ve tiadiazolil kısmı, Arg24

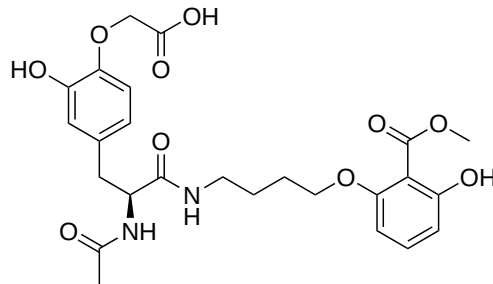
ve Arg254 ile etkileşime girmiştir. Bu olumlu etkileşimler, TCPTP üzerinden mükemmel seçiciliği desteklemiştir (Patel *et al.* 2012).



Şekil 10. 9-10 nolu bileşik

Yakın zamanda Du ve arkadaşları, 1-fenilüre grubunun PTP1B'nin C bölgesindeki Lys41'i işaret ettiği Şekil 10'da verilen kimyasal yapıya sahip 9 nolu bileşik bir PTP1B inhibitörü olarak elde etmiştir. Fenilin 4 pozisyonuna çeşitli hidrofobik gruplar ekleyerek bu hidrofobik etkileşimler keşfedilmiştir. Bunlar arasında, 4 metoksi grubu içeren bileşiğin, TCPTP'ye göre büyük seçicilikle (> 120 kat) en güçlü PTP1B inhibitörü ($IC_{50} = 0,203 \mu M$) olduğu gösterilmiştir. Daha küçük süstituentler benzer aktivite vermişken, Şekil 10'da verilen 10 nolu bileşik TCPTP üzerinde sadece orta derecede seçicilik (sırasıyla 16-kat ve 6-kat) göstermiştir. Böylece bu sonuçlar, hidrofobik etkileşimin Lys41 rezidüsü ile büyük seçicilik getirebileceğini göstermiştir (Du *et al.* 2015).

2011'de Li grubu yaptığı çalışmada, kiral bir bağlantı olarak glukozil iskelesi olan bir dizi yeni triazolil bazlı PTP1B inhibitörü inşa edilmiştir. Bu inhibitör Asp47, Asp48 ve Arg24 ile tirozin rezidüsü arasında hidrojen bağ etkileşimleri oluşturmuştur (He *et al.* 2011).



Şekil 11. 11 nolu bileşik

PTP1B protein yapısındaki 110-121 olarak belirtilen döngü, PTP1B'nin aktif bölgesine oldukça yakın olduğu görülmüş, D bölgesindeki rezidülerin hedeflenmesi, B bölgesini hedeflemek için tasarlanmış inhibitörlere kıyasla daha az hacimli olan seçici inhibitörlerin tasarımını ve sentezini kolaylaştırmalıdır. Örneğin Abbott Laboratuvarları, bir asetik asit bazlı fosfotirosil mimetiğini, TCPTP'ye göre iyi bir seçicilik göstererek, PTP1B inhibitörü olarak tespit etmiştir. X ışını kristal sonuçları (1QXK), karboksilik asit kısmının katalitik oyuktaki sıkıca bağlandığını ve salisilat bazlı ligandın B bölgesine uzandığını göstermiştir. Ayrıca 11 nolu bileşiğin TCPTP'sine karşı seçiciliğin Şekil 11'de verilen, bir su molekülü aracılığıyla

Lys120 ve Tyr46 rezidüleri ile etkileşime giren fenol hidroksil grubunun etkisine bağlı olabileceğini düşünmüştür (Xin *et al.* 2003).

Andersen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TCPTP üzerinden PTP1B için 26,7 kat seçiciliğe sahip bir 2- (oksalilamino) benzoik asit türevi tanımlamıştır. X ışını kristal sonuçları, Phe182 yönüne azot grubunun yöneldiğini ve orto-karboksilik asit grubunun Lys120 rezidüsü ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Buna bağlı olarak Trush ve arkadaşları, PTP1B'nin inhibitörleri olarak birkaç yeni kaliksaren metilenbisfosfonik asitler üzerinde çalışmıştır. Bileşik, PTP1B için en yüksek afinitiyi 1,2 μ M 'lik IC₅₀ ile göstererek ve TCPTP'ye göre de 8 kat seçicilik göstermiştir (Andersen *et al.* 2002).

2011'de Li grubu, PTP1B inhibitörleri olarak triazolil şekeramino asit hibritlerinin bir serisini yayınlamışlardır. Triazole bağlı serinil glukozit, TCPTP'ye göre 2 kat seçicilikle en iyi PTP1B inhibe edici aktiviteye (IC₅₀=6 μ M) sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan doking çalışmalarında, Lys116 ve Lys120 ile triazol halkası üzerindeki iki azot atomunun etkileşime girdiğin, benzen grupları ile Tyr46, Val49 ve Phe182 rezidüleri arasında hidrofobik temasların gözlemlendiğini göstermiştir. Daha sonra Li grubu, birçok glikokonjugatı, TCPTP üzerinden orta derecede seçicilikle (3-6 kat) "klik" reaksiyonu yoluyla PTP1B inhibitörleri olarak tanımlamıştır (Li *et al.* 2011).

Tüm tirozine özgü PTP'lerden PTP1B, Leu'yu 119. pozisyonda taşıyan tek enzimdir. Leu119, potansiyel bir tanıma bölgesi olarak bazı araştırmacıların görüşüne girmiştir. Asante-Appiah *et al.* (2006)'ın yaptığı bu çalışmada, 0,039 μ M IC₅₀ değerine ve TCPTP'ye göre 2 kat seçiciliğe sahip PTP1B'nin inhibitörü olarak bir arildiflorometilfosfonik asit bulmuştur. X-ışını kristal sonuçları, benzil ester grubunun, Leu119, Ser118 ve Tyr46'nın ana ve yan zincir atomlarıyla kaplı bir hidrofobik cebi işgal ettiğini göstermiştir. Ek olarak benzil esterinin oksadiazol grubu ile değiştirilmesi neredeyse 10 kat seçicilik vermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak elde edilen veriler, Leu119'un seçicilik kazandırmak için gerekli ve yeterli olduğunu göstermiştir. Lys116 da incelenmesine rağmen, yeterli bulunmamıştır.

Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TCPTP üzerinden PTP1B için 2,6 kat seçiciliğe sahip bir 2-etil-5-feniltiyazol-4-karboksamid türevini tanımlamıştır. Doking sonucu, bileşiğin indol yan zincirinin B bölgesini tamamen işgal ettiğini ve flor atomu ile Lys116'nın yan zinciri arasında bir hidrojen bağının oluştuğunu göstermiştir (Chen *et al.* 2013).

Doğal ürünleri PTP1B inhibitörleri için yeni prototipler olarak tanımlamak için, doğal ürün kütüphanelere karşı sanal tarama için ligand tabanlı ve yapı tabanlı yaklaşımları birleştiren hiyerarşik bir protokol kullanılmıştır. PTP1B'ye karşı enzimatik değerlendirme için yirmi altı bileşiğe öncelik verilmiştir ve bunlardan on tanesi mikromolar düzeyde IC₅₀

değerlerine sahip güçlü PTP1B inhibitörleri olarak kabul edilmiştir. Homolojisi en fazla olan T-hücresi proteini tirozin fosfataz (TCPTP) dahil olmak üzere dokuz bileşik, diğer dört PTP'ye göre PTP1B'ye belirgin seçicilik göstermiştir. Sonuçlar, doğal ürünlerin yapısal özgünlüklerinin hedef PTP1B ile ilişkili seçicilik sorununa potansiyel bir çözüm olabileceğini öne sürmüştür (Yang *et al.* 2020).

Nörodejeneratif hastalıkların patolojik özelliği olarak nöroinflamasyon olarak kabul edilir. İnflamatuvar koşullar altında, mikrogial hücrelerin aktivasyonu, Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B) seviyelerinin ekspresyonunun artmasıyla ve pro-inflamatuvar yanıtı arttırdığı gözlenmiştir. Manasa *et al.* (2021)'in bu çalışmasında PTP1B inhibitörlerini belirlemek için maestro arayüzü kullanılarak *in siliko* doking çalışmalarına dayalı hesaplama yapılmıştır. ZINC veritabanından 1941 fitomolekül kütüphanesi, bunların PTP1B ile bağlanma potansiyellerinin değerlendirilmesi için taranmış ve daha iyi aktiviteye ve bağlanmaya sahip fitomoleküller, HTVS, SP ve XP doking modundan sonra belirlenmiştir. Hedef moleküllerin rafine edilmesi, QikProp aracı kullanılarak farmakokinetik özelliklerin analizi ve toksisite tahmini ile yapılmıştır. Su haritalama analizi (water map) ve moleküler dinamik simülasyon çalışmalarının yapılması için daha iyi bağlanma ve farmakokinetik özelliklere sahip moleküller seçilmiştir. ZINC000001785780, ZINC000013543704, ZINC000040874044 bileşiklerin doking skoru ve bağlanma etkileşimlerine göre PTP1B'ye karşı güçlü inhibitörler olduğu bulunmuştur. Tanımlanan hedef bileşiklerin, *in vitro* ve *in vivo* deneysel modeller kullanılarak doğrulanmasına gerektiren güçlü bir PTP1B inhibitörü olabileceği sonucuna varılmıştır.

Potansiyel bir PTP1B inhibitörünü mikrobiyal orijin bazlı bileşik kütüphanesinden taramak ve inhibitörün potansiyel anti-diyabetik etkilerini *in vivo* araştırarak, *in vitro* ve *in siliko* birincil anti-diyabetik mekanizmasını belirlemek amaçlanmıştır. Test edilen 545 mikrobiyal orijin bazlı saf bileşik arasında, bir tridepsid olan trivarik asit, 173 μ M IC₅₀ ile güçlü inhibitör aktivite sergileyen bir PTP1B inhibitörü olarak seçilmiştir. Doking ve ITC çalışmaları, trivarik asidin kendiliğinden PTP1B'ye bağlanabildiğini ve fosfatazın katalitik alanını bloke ederek PTP1B'yi inhibe edebileceğini göstermiştir. Ayrıca insülinin IR/IRS/Akt/GLUT2 yolunu uyarmada ve HepG2 hücrelerinde glukoz tüketimini artırmada rol oynayan Trivaric asitin olduğunu göstermiştir. Eudrgit L100-5.5'e kapsüllenmiş olan trivarik asit, diyabetik farelerde, önemli anti-diyabetik etkiler göstermesi için, 5 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında insülin ve leptin direncini, lipid profilini ve ağırlık kontrolünü düzenlendiği görülmüştür. Trivaric asit, PTP1B'yi hedefleyen anti-diyabetik ajanların araştırılmasında potansiyel bir öncü bileşik olabileceği vurgulanmıştır (Sun *et al.* 2017).

Mevcut tedavi yaklaşımlarının belirli sınırlamaları olmasından dolayı, yeni antidiyabetiklerin keşfedilmesi, Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) tedavisi için oldukça önemlidir. Ve yapılan çalışmalarda, protein tirozin fosfataz 1B'nin (PTP1B) önemli antidiyabetik moleküller geliştirmek için değerli bir hedef olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, hesaplama yöntemleri ve biyolojik değerlendirme çalışmaları uygulanarak iyi enzim bağlanma afinitesi ve aktivitesine sahip yeni PTP1B inhibitörleri geliştirilmiştir. SPECS veritabanı bileşiklerinin sanal tarama analizi, PTP1B enzimi üzerinden, Schrodinger programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Belirlenen hedef bileşiklerin *in vitro* (moleküler deney) ve *in vivo* (hayvansal deney) biyolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Bu çalışmada belirlenen moleküllerin PTP1B enziminin aktif bölge rezidüleri ile önemli etkileşimler gösterdiğini ortaya koymuştur. Arg221 ve Gln262 rezidüleri ile önemli bağlanma etkileşimleri sağlayan S1 ve S2 bileşikleri ayrıca önemli *in vitro* PTP1B inhibe edici aktivite ve *in vivo* antidiyabetik aktivite gösterdiler. S1 ve S2 bileşikleri sırasıyla %35,44±%0,12 ve %33,68±%0,08 inhibe edici aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Uyumlu bir farmakokinetik profile sahip yeni PTP1B inhibitörlerinin tasarımı ve geliştirilmesi için belirlenen bu hedefler bir şablon olarak kullanılabilir (Maheshwari *et al.* 2021).

Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B) inhibitörlerinin keşfi, tip 2 diyabet ve obezite tedavisi için terapötikler geliştirmek amacıyla aktif olarak takip edilmiştir. Bağlanma serbest enerji fonksiyonunda ligand solvasyonunun etkilerini göz önünde bulundurarak, doking simülasyonları ile sanal taramayı içeren bilgisayar destekli bir ilaç tasarım protokolü aracılığıyla 9 yeni PTP1B inhibitörünü tanımlanmıştır. Yeni keşfedilen inhibitörler yapısal olarak çeşitli olduklarından ve 50 µM'dan düşük IC₅₀ değerleri ile önemli bir potensi ortaya çıkardıklarından, bunların tümü, yapı-aktivite ilişkisi çalışmaları ile daha fazla geliştirme için düşünülebilir olduğu belirlenmiştir. Yeni tanımlanan inhibitörlerin PTP1B'nin aktif bölge rezidüleri ile etkileşimleriyle ilgili yapısal özellikler ayrıntılı olarak tartışılmıştır (Park *et al.* 2009).

Protein tirozin fosfataz-1B (PTP1B) inhibitörlerinin tasarımı ve sentezi, diyabet ve obeziteyi tedavi etmeyi hedefleyen ilaçlar için önemlidir. Yeni PTP1B inhibitörlerini keşfetmek için farmakofor modelleme ve doking uygulanmıştır. Öncelikli on bileşik, 86 bileşik kütüphanesinden sentezlenmiştir ve Suramin (IC₅₀ 9,5 µM) ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucu, PTP1B *in vitro* inhibitör deneyleri için mikro molar aralıkta pozitif bulunmuştur. Bu aktif bileşikler STZ'nin indüklediği diyabetik sıçan modelinde test edilmiştir ve bu testteki en aktif bileşik N-benzil-N-(2-hidroksi-2-feniletıl)-2, 4, 6-trimetıl benzen sülfonamid, ayrıca C57BL/KsJ-db db farelerinde test edilmiştir. Bileşik N-benzil-N-(2-

hidroksi-2-feniletıl)-2, 4, 6-trimetıl benzen sülfonamid ile tedavi, insülin seviyesini eski haline getirerek ve serum lipit profilini normalleştirerek insülin direncini ve insülin sinyallemesini önemli ölçüde iyileştirilmiştir. Bileşik N-benzil-N-(2-hidroksi-2-feniletıl)-2, 4, 6-trimetıl benzen sülfonamid ayrıca IRS 1–2, PI3K, PTPN1, Akt2, AMPK ve PPAR- α gibi insülin sinyallemesinde yer alan genlerin ekspresyonunu modüle ederek insülin etkisini artırmıştır. Western blot analizi iskelet kası ve karaciğer için yapılarak, kontrol grubuna kıyasla, insülin sinyalinin proteinlerinin ve ara enzimlerinin arttığını göstermiştir. Bileşik N-benzil-N-(2-hidroksi-2-feniletıl)-2, 4, 6-trimetıl benzen sülfonamid, 3T3L-1 hücreleri üzerinde anti-adipojenik etki açısından da araştırılmış ve MDI ile indüklenen lipid birikimini doza bağılı bir şekilde inhibe etmiştir (Balaramnavar *et al.* 2014).

Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B), insülin ve leptin sinyal yollarının ana negatif düzenleyicisi olarak işlev görür. Bunun ışığında, kanser, diyabet ve obeziteye karşı ilaç geliştirme için PTP1B önemli bir hedeftir. Bu çalışmanın amacı PTP1B inhibitörlerini, docking ile sanal tarama yoluyla keşfetmektir. ZINC veri tabanından 523.366 molekül taranmıştır ve DOCK grid skorlarına ve hidrojen bağı etkileşimlerine dayanılarak beş yeni potansiyel inhibitör belirlenmiştir. PTP1B'nin inhibisyonu için potansiyel önde gelen moleküller olarak Zinc databazında bulunan ZINC12502589, ZINC13213457, ZINC25721858, ZINC31392733 ve ZINC04096400 bileşikleri tanımlanmıştır. Tespit edilen moleküller Lipinski'nin beş parametre kuralına tabi tutulmuş ve herhangi bir kuralı ihlal etmedikleri görülmüştür. Farmakolojik parametrelerin spesifik analizleri bir ADME/Tox değerlendirmesi yoluyla incenebildiğinden, bu moleküller için ilaç algoritmaları kullanılarak ADME-Tox profillerini hesaplanmıştır. Genel olarak, tüm moleküller birbirlerine kıyasla avantajlar ve dezavantajlar sergilediği belirlenmiş ve bu moleküller arasında sağlık etkilerinde ve toksisite profillerinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Rao *et al.* 2012).

Tip 2 diyabet için doğrulanmış bir terapötik hedef olan Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B), insülin sinyal yollarının negatif bir düzenleyicisi olarak hareket eder. Aktif bölgeye yönelik PTP1B inhibitörlerinin keşfi, aktif bölgenin yüksek oranda korunmuş doğası ve ligandların çoklu yük gereksinimleri nedeniyle çok zordur. PTP1B allosterik bölgesinin tanımlanması, terapötik müdahale için güçlü ve seçici ligandları keşfetmek için yeni yollar açmıştır. Moleküler dinamik simülasyonu kullanılarak, güçlü allosterik inhibitör tarafından yapılan etkileşimler PTP1B varlığında incelenmiştir. Hesaplamalı olarak optimize edilmiş modeller, PTP1B ve TCPTP'nin ayrı farmakofor modellerini oluşturmak için kullanılmıştır. Rezidülerin konformasyonel esnekliğini dikkate alan farmakofor, büyük bileşik veri tabanlarını tarayarak potansiyel olarak aktif inhibitörleri tanımlamak için farmakofor

hipotezinin geliştirilmesi için kullanılmıştır. Sanal tarama protokolünde ardışık olarak iki farmakofor kullanılarak PTP1B'nin potansiyel seçici ve geçirgen inhibitörlerini belirlenmesi hedeflenmiştir. Moleküler doking ve Moleküler Dinamik yöntemler kullanılarak bu moleküllerin allosterik inhibisyon mekanizması oluşturulmuştur. Geometrik kriter değerleri, PTP1B'yi açık bir konformasyonda stabilize etme yeteneklerini doğrulanmıştır. 23 molekül, potansiyel inhibitörler olarak tanımlanarak PTP1B inhibitör aktivitesi için taranmıştır. Bu tarama sonucunda potansiyel PTP1B inhibitörleri olarak 10 molekül belirlenmiştir. Bu çalışma, seçici ve geçirgen inhibitörlerin PTP1B'nin allosterik bölgesini hedefleyerek tanımlanabileceğini doğrulamıştır (Shinde *et al.* 2018).

Tip II diyabet, obezite ve kanser terapötikleri için ümit verici bir hedef olan protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B), insülin sinyal yollarında önemli bir negatif rol oynar. Bununla birlikte, özellikle T hücre proteini tirozin fosfataz'ın (TCPTP) inhibitör gelişimi için hala bir zorluk olmasının nedeni diğer PTP'ler üzerinde seçiciliğin olmamasıdır. Son çalışmalar, katalitik alana yakın olan ikinci fosfotirozin bağlanma bölgesinin, inhibitörlere seçicilik getirirken bağlanma afinitesini yükseltebileceğini ileri sürmüştür. Bu çalışmalardan yola çıkarak, PTP1B'nin yeni seçici inhibitörlerini belirlemek için hem aktif bölge hemde ikinci pThr bağlanma bölgesini hedefleyen iki dişli (bidentat) stratejisine dayalı sanal bir tarama yöntemi kullanılmıştır. PTP1B'nin hem aktif bölgesini hem de ikinci pTyr bağlanma bölgesini hedef alan üç bileşiğin (CD00466, JFD02943, JFD02945) yarışmalı inhibitörler olduğu bulunmuştur (Ki aralığı 1,79 ile 10,49 μ M). En etkili bileşik olan CD00466, TCPTP'ye (31 kat) göre seçicilik sergilemiştir. Bu çalışma, üç inhibitörün iki dişli modelde PTP1B'ye bağlandığını doğrulamada, moleküler dinamik simülasyonu ve MM/GBSA bağlanma serbest enerji hesaplamasını kullanmıştır. Çalışma, iki dişli sanal taramanın, seçici PTP1B inhibitörlerinin daha fazla araştırılması için potansiyel bir yaklaşım olduğunu göstermiştir (Chen *et al.* 2018).

Mevcut çalışma, doking algoritması Glide kullanan PTP1B'nin katalitik alanına karşı ZINC veri tabanının yüksek verimli bir sanal taramasıyla protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B) enziminin inhibisyonu için yeni öncül molekül ZINC02765569'un tanımlanmasını açıklamıştır. Tanımlanan hedef molekül ZINC02765569 sentezlenmiş ve *in vitro* PTP1B enzim inhibisyonu, *in vitro* hücresel glukoz alım deneyi ve hipergliseminin hayvan modelleri için değerlendirilmiştir. ZINC02765569, 10 μ m testinde PTP1B enziminin umut verici inhibisyon göstermiş, iskelet hücre kas miyotüplerinde ve SLM/STZ hiperglisemik hayvan deneylerinde hücresel glukoz alımını pozitif olarak yukarı regüle etmiştir. Bu çalışmada

bildirilen yeni hedef, analoglarının potansiyel PTP1B enzim inhibitörleri olarak daha da geliştirilmesi için bir platform sağlamıştır (Joshi *et al.* 2013).

Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B), diyabet ve obezite için potansiyel bir ilaç hedefi olmasına rağmen, ilacın gücünü ve biyoyararlanımı birleştiren PTP1B inhibitörlerinin tasarımı büyük bir zorluktur ve bu sorunu aşmak için yeni ipuçlarına ihtiyaç vardır. Mevcut inhibitörlere çok az kimyasal benzerliğe sahip yeni PTP1B inhibitörleri bulmak için sanal tarama iş akışları kullanılabilir. PTP1B inhibitörlerinin tanımlanmasına yönelik önceki sanal tarama iş akışları, az sayıda deneysel olarak test edilmiş bileşik ve bu bileşiklerin düşük biyoaktivitesi sahip olması ne yazık ki çeşitli sınırlamalara sahip olduğunu gösterir. Biyoaktivitesi *in vitro* test edilen 20 bileşikten yapısal olarak farklı 15 PTP1B inhibitörünü tanımlayabilen bir sanal tarama iş akışı geliştirilmiştir. Ayrıca, sanal tarama tarafından bildirilen en yüksek biyoaktiviteye sahip iki PTP1B inhibitörün (1,4 ve 2,1 μM 'lik IC_{50} değerleri), yeni öncül bileşikler olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Gimeno *et al.* 2018).

Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B), yaygın olarak eksprese edilen bir 50 kDa enzimdir ve insan plasenta dokusundan saflaştırılan ilk hücre içi PTP'dir. Protein tirozin fosfataz 1B'nin insülin sinyal yolunun negatif düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı ve PTP1B'nin aşırı ekspresyonunun insülin direncinin azalmasına yol açabileceği kanıtlanmıştır. Bu nedenle tip-2 diyabet tedavisi için yeni ve ümit verici bir terapötik hedef olarak, PTP1B'yi göstermektedir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı, kimyasal sentez ve biyolojik aktivite analizi, 4,46 μM 'lik bir IC_{50} değerine sahip yeni bir güçlü PTP1B inhibitörünün tanımlanmasına yol açmıştır. Son olarak, bu bileşiğin uygun aktivitesi için teorik temeli, MD simülasyonunun analizi ile sağlanmıştır (Wu *et al.* 2020).

Bilindiği üzere ilaç keşfi, zaman alıcı ve zorlu bir süreçtir. Hesaplamalı stratejiler, harcanan zamanı ve parayı azaltmaya yardımcı olur. Bu tez, insan PTP1B inhibitörlerini keşfetmek için yapı bazlı ilaç tasarım stratejilerini kullanır. Bu amaçla, bilgisayar destekli ilaç tasarım stratejileri PTP1B kristal yapısına uygulanmıştır. PTP1B inhibisyonu, yeni ilaç keşif çalışmaları sırasında dikkat çekici noktalardan biridir. PTP1B enziminin inhibe edilmesi, diyabet-2 ve obezite hastalıklar üzerine potansiyel ilaç olabilir. Bu amaçla PTP1B'nin bağlanma oyuğunda atomik ölçekte türetilmiş yörüngedeki yapıların son işlem analizlerini kullanarak önerilen moleküllerin moleküler mekanizmasının yanı sıra yapısal kararlılıklarını araştırmak için çeşitli moleküler tarama yöntemleri *de novo* tasarım stratejileri gerçekleştirilmiş ve ardından moleküler dinamik (MD) simülasyonları yapılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Tez çalışmasında Maestro Schrödinger Programının Protein Hazırlama Sihirbazı, Glide, Desmond modülleri kullanılmıştır. Ayrıca sanal tarama için Drugbank databazı kullanılmıştır. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde bulunan bilgisayarlar kullanılmıştır.

Yöntemler

PTP1B ve TCPTP kristal yapıların hazırlanması

T Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B) (PDB ID 1Q6M) ve T-hücre protein tirozin fosfataz (TCPTP) (PDB ID 1L8K) protein yapıları Protein Veri Bankasından (PDB) indirilmiştir (Scapin *et al.* 2003). Schrödinger'in Protein Hazırlama Sihirbazı modülü kullanılarak protein yapıları, moleküler doking simülasyonları için hazırlanmıştır (Sastry *et al.* 2013). Bu Protein Hazırlama Sihirbaz modülü RCSB Protein Veri Bankasından alınabilen veya kullanıcı tarafından yüklenebilen bir PDB dosyası olarak sağlanan moleküler bir yapıdan başlayarak akıcı bir süreç sağlamak üzere tasarlanmıştır.

Bu modül kullanılarak protein yapısındaki bağ düzenleri ayarlanmış, hidrojen atomları eklenmiş, disülfid bağları oluşturulmuştur. Ayrıca Maestro'nun Prime modülü kullanılarak, yapıdaki eksik yan zincirler ve looplar eklenmiştir. Ardından pK_a tahminleri ve optimizasyonları, PROPKA kullanılarak fizyolojik pH 7,4'de uygulanmıştır. Enerji minimizasyonu OPLS3e kuvvet alanı ile gerçekleştirilmiştir.

Protein yapısı seçildikten sonra yapıda bulunan polipeptit zincirleri belirlenmiş ve hidrojen bağlanmaları, Asn, Gln ve His'in terminal chi açısının 180° döndürülmesiyle optimize edilmiştir. Bu optimizasyon yan zincirlerin hidrojen bağ yeteneklerini önemli ölçüde değiştirirken elektron yoğunluğuna olan uyumu önemli ölçüde değiştiremez. His, Asp ve Glu rezidülerinin nötr ve protonlanmış durumları, iki His tautomeri ($N\delta$ veya $N\epsilon$ nitrojen üzerindeki proton) ve hidrojen bağ ağını optimize etmek için hidroksiller ve tiyoller üzerindeki hidrojenler örneklendirilmiştir.

Drugbank databazının hazırlanması

DrugBank Databazın en son sürümü (sürüm 5.1.8, 2021-01-03'te yayınlandı), 2,684 onaylı küçük molekülü ilaç, 1,467 onaylı biyolojik (proteinler, peptitler, aşılarda ve alerjenler), 131 nutrasötik ve 6,655'ten fazla deneysel dahil olmak üzere 14,532 ilaçtan oluşmaktadır. Drugbank içindeki tüm bileşikler, LigPrep ile ön işleme tabi tutuldu. Yapısal stereoizomerler, tautomerler, halka konformasyonları ve protonasyon durumları için LigPrep ile 2B yapıları 3B yapılara dönüştürülerek bileşikler oluşturulmuştur. Bu modül 2B yapıların 3B koordinatlara dönüştürülmesi, Epik kullanılarak pH 7,0±2,0'da olası iyonlaşma durumlarının oluşması, tautomer üretimi, ligand başına en fazla 32 stereoizomer oluşumu, 3B koordinatlardan kiralite tayini, düşük enerji halkası üretimi yaparak ligandları hazırlamıştır. Ayrıca OPLS3e kuvvet alanı kullanılarak konformasyon ve enerji minimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her ligand için en fazla 50 farklı konformasyon üretilmiştir.

Sanal Tarama ve benzerlik araması

Maestro'da doking çalışmalarında kullanılan algoritmalar, esnek ligandlı Glide/HTVS, Glide/SP ve Glide/XP'yi içermektedir. Şekil 1' de verildiği gibi ilk olarak Glide'ın yüksek iş hacmine sahip sanal taraması (HTVS) ile ardından standart hassasiyetli (Glide/SP) ve son olarak ekstra hassasiyeti (Glide/XP) doking modülleri kullanılarak doking çalışması gerçekleştirildi (Friesner *et al.* 2006).

Sanal tarama çalışmaları, Protein tirozin fosfataz 1B'nin (PTP1B) (çözünürlük 2,20 Å) ve T hücre proteini tirozin fosfatazın (TCPTP) (çözünürlük 2,56 Å) kristal yapıları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Schrödinger yazılımı tarafından Protein Hazırlama Sihirbazı kullanılarak önce kristal yapılar işlendi, ardından ızgara nesilleri oluşturularak önce HTVS daha sonra SP ve XP kayma yerleştirmeleri yapıldı. PTP1B'ye karşı Drugbank veritabanında etkili bileşikler bulmak için sanal taramanın iş akışı, yüksek verimli sanal tarama (HTVS), standart hassasiyet (SP) ve ekstra hassasiyetten (XP) oluşur. Yüksek verimli sanal tarama olan HTVS, listelenen bileşiklerin ilk %10'unu ve her bileşik için 1 pozu kurtardı ve Standart hassas puanlama ve örnekleme (SP), sıralanan bileşiklerin ilk %10' unu koruyarak her bileşik için 1 poz kaydedildi. Elde edilen sonuçlar incelenmiş, teşhis ve kozmetikte kullanılan ilaçlar filtrelenmiştir. Geri kalan moleküller için Glide XP uygulandı. Geri kalan bileşikler Maestro Canvas Benzerlik ve Kümeleme programı ile kümelendi Ligandların benzerlikleri, 32-bit Molprint 2B parmak izleri ile değerlendirildi. Ardından, hiyerarşik kümeleme tamamlamak için, Tanimoto benzerlik matrisi yani ligand bazlı benzerlikler üzerinden "ortalama" bağlantı yöntemi kullanıldı (Duan *et al.* 2010).

Bağlanma modunu doğrulama

Elde edilen doking pozları ile kristal yapıdaki ligandlar üst üste çakıştırılacak ve RMSD değerleri belirlendi. Genellikle, RMSD değeri 2'den küçük olduğundan sonuçlar kabul edilebilir bulundu.

Moleküler Mekanik-Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı (MM-GBSA) hesaplamaları

PTP1B potansiyel inhibitörlerinin teorik bağlanma serbest enerjilerini belirlemek için Maestro 2019-4 Prime modülü tercih edildi. Prime MM-GBSA (Moleküler Mekanik-Genelleştirilmiş Doğan Model ve Çözücü Erişilebilirliği) sabitlenmiş komplekslerin hesaplanan bağlanma serbest enerjisi ve parametreler varsayılan olarak ayarlandı (Sirin *et al.* 2014). OPLS3e kuvvet alanı, VSGB solvent modeli ve rotamer arama algoritmaları kullanılarak hesaplama sırasında bağlayıcı serbest enerjiyi tanımlandı. Prime MM-GBSA simülasyonu, toplam serbest bağlanma enerjisini hesaplamak için moleküllerin Glide poz görüntüleyici dosyası kullanılarak gerçekleştirildi. Verilen denklem sayesinde bağlanma olaylarındaki serbest enerji değişimleri belirlendi.

$$\Delta G_{\text{bağ}} = G_{\text{komp}} - (G_{\text{protein}} + G_{\text{ligand}})$$

$\Delta G_{\text{bağ}}$ bağlanma enerjisidir, G_{komp} kompleksin serbest enerjisidir, G_{protein} reseptörün ligandsız serbest enerjisidir ve G_{ligand} bağlanmamış ligandın enerjisidir.

Moleküler Dinamik Simülasyonlar

Glide tabanlı doking algoritmaları, reseptörü katı bir varlık olarak ele alırken, protein-ligand etkileşimlerinin kararlı görüntülerini sunar. Ancak bilindiği gibi bu etkileşimler fizyolojik sistemde dinamiktir. Desmond programı (Shaw, 2019) aracılığıyla referansın ve beş hedefin moleküler dinamik simülasyonları elde edilerek protein-ilaç kompleksleri arasındaki dinamikleri analizi elde edildi. Hedef ilaçlar olan SP-876, Glutasyon disülfid, Gemcabene, LJP 1082 ve Ceftazidimin PTP1B ile birliktaki termodinamik stabiliteleri, Schrodinger Desmond modülü kullanılarak moleküler dinamikler (MD) ile belirlendi (Shaw, 2019). İlk olarak, PTP1B-ilaç komplekslerinin Glide XP kenetlenmiş pozları giriş yapılar olarak kullanıldı bu yapılar modülün sistem kurulum seçeneği ile hazırlandı. Ardından kompleksler TIP3P su modeli ile çözüldü. Ortorombik periyodik sınır koşulları oluşturularak, 10 Å mesafelerde tamponlanan tekrar eden birimin şekli ve boyutu belirlendi. Başlangıçta PTP1B-ligand kompleksleri için 408,270 Å³ olarak hesaplanan sınır koşulları kutu hacimleri, 372,628 Å³e indirildi. Sistem yükünü dengelemek için PTP1B-SP-876 için beş, PTP1B-Gemcabene

için dört, PTP1B-Glutatyon disülfid için dört, PTP1B-LJP 1082 için üç, PTP1B-Ceftazidim için dört ve PTP1B- referans için altı sodyum iyonları eklenerek sistemler elektriksel olarak nötralize edildi. Daha sonra 0,15 M konsantrasyonda solvatlı sisteme rastgele yerleştirildi. PTP1B ile ilaç komplekslerinin çözülmüş sistemleri OPLS3e kuvvet alanı parametreleri ile minimize edildi ve sonrasında gevşetildi. Aynı kuvvet alanı kullanılarak NPT periyodik sınır koşulları ile moleküler dinamik simülasyonlar gerçekleştirildi. Sıcaklık (T) ve basınç (P), Nose-Hoover sıcaklık ve izotropik ölçekleme kullanılarak 310 K ve 1 atmosfer basına ayarlandı. Daha sonra, NPT retim simülasyonları 200 ns için çalıştırılarak elde edilen konfigürasyonlar 20 ps aralıklarla kaydedildi.

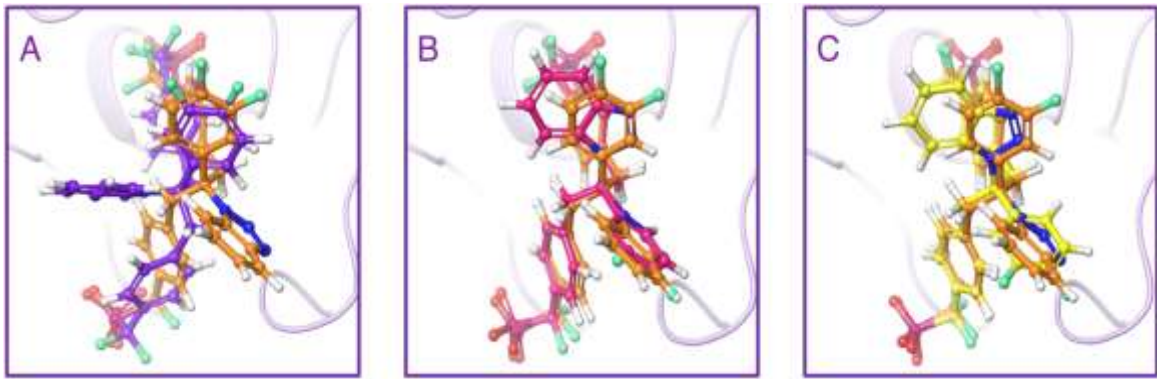


ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Tip 2 diyabet, obezite ve kanserin tedavisi için çekici bir hedef olarak bilinen Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B) inhibitörleri, bu önemli hedefle diğer PTP'lere, özellikle T hücresi protein tirozin fosfataz (TCPTP) üzerinde etkileşime giren inhibitörlerin seçiciliğinin olmaması büyük bir sorundur. Son yıllarda PTP1B inhibitörü çalışmaları hem katalitik bölgeye hem de ikinci fosfotirozin bağlanma bölgesine (pTyr) bağlanmanın seçiciliği artırabileceğini ileri sürmüştür (Chen *et al.* 2018). İki dişli stratejiye dayalı (bidentat) sanal bir tarama yöntemi kullanıldı. Bu çalışmalardan ele alarak, yeni seçici PTP1B inhibitörlerini tanımlamak için bidentat sanal bir tarama yöntemi kullanıldı. PTP1B'nin {[2- (1h-1,2,3-Benzotriazol-1-Yl) -2- (3,4-Diflorofenil) Propan-1,3-Diyl] Bis [4,1 Fenilen (Diflorometilen)]} Bis (Fosfonik Asit) inhibitörünü içeren (PDB ID: 1Q6M) ve TCPTP (1L8K) proteinleri taramalar için şablon olarak seçildiler.

Onaylanmış ilaçların orijinal tıbbi endikasyonlarının ötesinde yeni kullanımlarını belirlemeye yönelik ilaç yeniden kullanımı, etkili bir ilaç keşif stratejisi haline gelmiştir. (Pushpakom *et al.* 2019). Üç aşamalı hiyerarşik sanal taramalar gerçekleştirilerek, DrugBank'tan indirilen yaklaşık 10767 onaylı deneysel ve araştırma ilaç setinden PTP1B ve TCPTP'yi hedefleyen ilaçları belirlendi.

Aktif bölgeye ligandların doğru bağlanma modunu bulmak ve moleküler yerleştirme protokollerinin başarısını tahmin etmek için bağlanma bölgesine birlikte kristalize edilen P27 ligandının yeniden dokingi yapıldı. Elde edilen yeni doking pozları, kristal yapı içerisindeki P27 ligandı ile karşılaştırıldı ve karekök ortalama sapma (RMSD) değerleri verildi (Tablo 2). 2 Å 'nın altındaki RMSD değerleri, protokolün doğru bağlanma modunu tahmin etmektedir.



Şekil 12. Farklı doking modüllerinin karşılaştırılması

PTP1B'nin kristal yapısındaki P27 ligand (turuncu) konformasyonu ile doking sonucu elde edilen Glide/HTVS (mor), Glide/SP (pembe), Glide/XP (sarı) doking pozlarının üst üste karşılaştırılması sonucu elde edilen görüntüler Şekil 12' de verildi.

Şekil 12A' daki turuncu renkli ligand PTP1B kristal yapı içerisindeki P27' nin konformasyonu, mor renkli ligand ise Glide/HTVS doking pozisyonundan gelen ligandın konformasyonunu göstermektedir. Şekil 12B' deki pembe renkli konformasyon Glide/SP doking sonucundan gelen konformasyonu gösterirken turuncu renkli ligand ise PTP1B kristal yapı içerisindeki P27' nin konformasyonu göstermektedir. Şekil 12C' de turuncu renkli ligand PTP1B' nin kristal yapısındaki P27' nin konformasyonu sunarken sarı renkli ligand ise Glide/XP'nin en iyi doking sonucunu sunmaktadır.

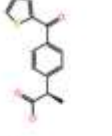
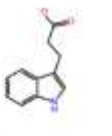
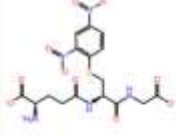
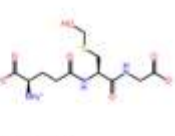
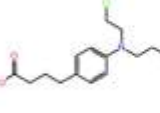
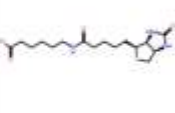
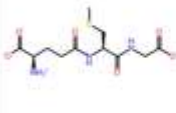
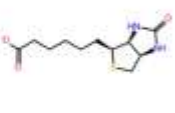
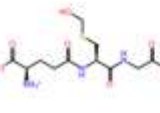
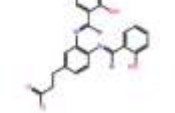
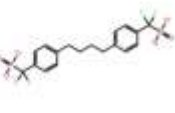
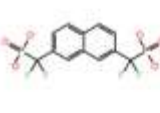
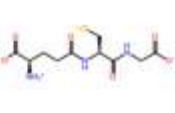
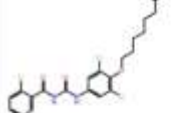
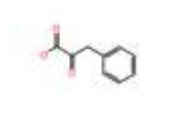
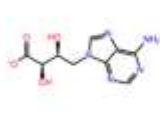
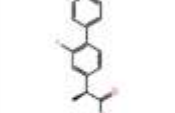
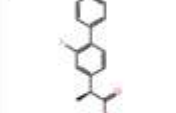
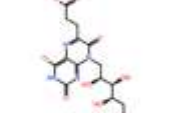
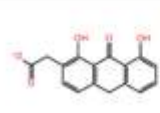
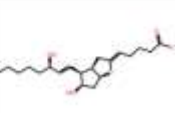
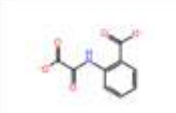
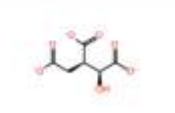
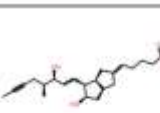
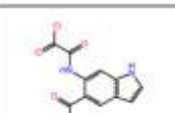
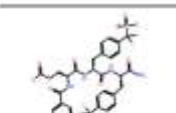
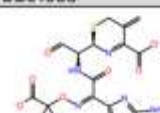
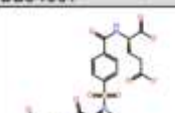
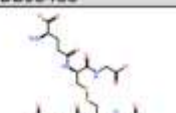
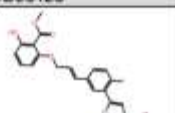
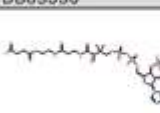
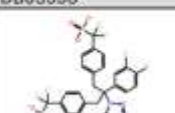
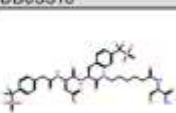
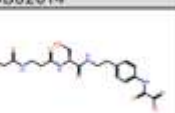
Tablo 2. Glide HTVS/SP ve XP Modüllerinden Elde Edilen En İyi Doking Pozlarının RMSD'lerin P27 İle Karşılaştırılması

	Glide		
	Glide/HTVS	Glide/SP	Glide/XP
RMSD (Å)	3,2268	1,9368	1,8493

Glide HTVS/SP ve XP doking pozlarının PTP1B'in kristal yapısındaki P27 ligandının konformasyonu ile karşılaştırılması Tablo 2'de gösterilmiştir. Tablo 2 bütün ligand atomlarının kullanıldığı RMSD değerlerini göstermektedir.

PTP1B'ye karşı sanal taramada yüksek verimli sanal tarama (HTVS), standart hassasiyet (SP) ve ekstra hassasiyetten (XP) doking algoritmaları kullanıldı. Glide HTVS sonuçlarının ilk %10'u alındı ve bu bileşikler Glide SP'ye aktarıldı. Glide SP sonuçlarının ilk %10'u kaydedildi. Geri kalanlar için Glide XP skorları belirlendi.

Tablo 3. Drugbank'taki İlaçların PTP1B'ye Karşı Taraması Sonucu Belirlenen Onaylanmış, Deneysel ve Araştırma Amaçlı İlaçlar

			
DB00870	DB02758	DB02458	DB05446
			
DB00291	DB03139	DB04701	DB03112
			
DB04153	DB04809	DB04279	DB04204
			
DB03154	DB00143	DB04642	DB03884
			
DB03769	DB05289	DB00712	DB04262
			
DB02019	DB01240	DB02622	DB01727
			
DB01088	DB04001	DB03483	DB05123
			
DB03530	DB03558	DB03310	DB02014
			
DB03699	DB02651	DB03557	DB02784

Drugbank veritabanında PTP1B hedefine karşı tarama sonucu belirlenen 36 onaylanmış araştırma ve deneysel ilaçlar Tablo 3'de sunuldu. Ayrıca Glide XP yerleştirme skorları, MMGBSA, kümeler ve hedef parametreleri şekideki gibi Tablo 3'de verildi. Daha

sonra ligand bazlı benzerliklerden kaynaklanan Tanimoto benzerlik matrisi üzerinde "ortalama" bağlantı yöntemi kullanılarak hiyerarşik kümeleme gerçekleştirilmiş ve hit 36 ilacın beş farklı kümeden oluştuğu tespit edildi.



Tablo 4. PTP1B Hedefine Karşı Belirlenen Hedef İlaçlar

ID	İlaç Adı	Glide XP	MMGBSA (kcal/mol)	Küme	Hedef		
Numara							
1	DB02651	{[2-(1h-1,2,3-Benzotriazol-1-Yl)-2-(3,4-Diflorofenil)Propan-1,3-Diyl]Bis[4,1 Fenilen(Diflorometilen)]}Bis(Fosfonik Asit)	Deneysel	-15.14	-105.16	5	PTP1B
2	DB04204	[(4-{4-[4-(Difloro-Fosfono-Metil)-Fenil]-Bütıl}-Fenil)-Difloro-Metil]-Fosfonik Asit	Deneysel	-13.66	-75.86	5	PTP1B
3	DB03154	{[7-(Difloro-Fosfono-Metil)-Naftalen-2-Yl]-Difloro-Metil}-Fosfonik Asit	Deneysel	-13.79	-38.36	5	PTP1B
4	DB03483	(4S)-5-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-Amino-3-[4 [difloro(fosfono)metil]fenil]-1-oksopropan-2-il]amino]-3 -[4-[difloro(fosfono)metil]fenil]-1-oksopropan-2-il]amino]-4-benzamido-5-oksopentanoik asit	Deneysel	-14.45	-68.45	5	PTP1B
5	DB03557	4-[[[(2S)-1-[[6-[(1-Amino-1-okso-3-sülfanilpropan-2-il)amino]-6-oksoheksil]amino]-3-[4-[difloro(fosfono)metil]fenil]-1-oksopropan-2-il]amino]-3-[[2-[4-[difloro(fosfono)metil]fenil]asetil]amino]-4-oksobütanoik asit	Deneysel	-15.50	-92.07	5	PTP1B
6	DB00712	Flurbiprofen	Onaylandı	-13.92	-62.44	4	Prostaglandin G/H sentaz 1
7	DB05289	Tarenflurbil	Araştırma	-13.92	-62.44	4	NF-kappa-B temel modülatör
8	DB04809	Salofen-10-Propiyonat Demir Şelat	Deneysel	-13.75	-75.52	4	Hem oksijenaz
9	DB02758	İndolpropionik asit	Deneysel	-13.27	-61.49	4	Grup IIE salgılayıcı fosfolipaz A2
10	DB00291	Klorambusil	Onaylandı	-13.39	-80.12	4	DNA
11	DB02019	Asetil ditranol	Deneysel	-14.04	-64.83	4	ActVA 6 protein
12	DB00870	Suprofen	Onaylandı	-13.26	-66.23	4	Prostaglandin G/H sentaz 1
13	DB04642	7-[2,6-dikloro-4-[3-(2-kloro-benzoil)-üreido]-fenoksi]-heptanoik asit	Deneysel	-13.83	-82.20	4	Glikojen fosforilaz, kas formu
14	DB03769	D-Eritridin	Deneysel	-13.92	-57.60	4	Adenosilhomosisteinaz
15	DB03699	Süksinil-Koenzim A	Deneysel	-14.90	-74.28	4	2,3,4,5-tetrahidropiridin-2,6-dikarboksilat N-süksiniltransferaz
16	DB04262	3-(7-hidroksi-8-ribitillumazin-6-il) propiyonik asit	Deneysel	-13.98	-62.55	4	6,7-dimetil-8-ribityllumazin sentaz
17	DB02458	S-(2,4-dinitrofenil)glutayton	Deneysel	-13.29	-71.35	4	Glutayton S-transferaz Mu 1
18	DB03558	SP-876	Deneysel	-14.59	-69.71	4	Timidilat sentaz
19	DB05123	Gembabene	Araştırma	-14.48	-95.44	4	düşürür (LDL-C), yükseltir (HDL-C).
20	DB01727	İzositrik Asit	Deneysel	-14.11	-23.22	4	İzositrat dehidrojenaz
21	DB00143	Glutayton	Onaylandı	-13.83	-54.85	4	Mikrozomal glutayton S-transferaz 3
22	DB03112	6-(2-Okso-Heksahidro-Tieno[3,4-D]İmidazol-4-l)-Heksanoik Asit	Deneysel	-13.49	-73.08	4	Streptavidin
23	DB04701	S-Metil glutayton	Deneysel	-13.44	-62.30	4	Glutayton S-transferaz Mu 2
24	DB03310	Glutayton disülfıt	Onaylandı	-14.64	-79.05	4	Glutayton S-transferaz Mu 2
25	DB04153	S-Hidroksimetil Glutayton	Deneysel	-13.50	-64.40	4	Alkol dehidrojenaz sınıf-3
26	DB05446	LJP 1082	Araştırma	-13.38	-61.62	4	Beta-2-glikoprotein 1
27	DB03139	6-[5-(2-Okso-Heksahidro-Tieno[3,4-D]İmidazol-4-il)-Pentanoilamino]-Heksanoik Asit	Deneysel	-13.44	-77.19	4	Streptavidin
28	DB04279	3-İzopropilmalik Asit	Deneysel	-13.61	-35.41	4	3-izopropilmalat dehidrojenaz
29	DB01088	İloprost	Onaylandı	-13.24	-90.26	4	Prostasiklin reseptörü
30	DB01240	Epoprostenol	Onaylandı	-14.07	-85.65	4	Prostasiklin reseptörü
31	DB02014	5-(2-Floro-5-{(1E)-3-[3-hidroksi-2-(metoksikarbonil)fenoksi]-1-propen-1-il}fenil)-1,2-oksazol-3-karboksilik asit	Deneysel	-14.81	-75.01	3	PTP1B
32	DB03884	Fenilpiruvik asit	Deneysel	-13.87	-50.03	2	Hidroksiasit oksidaz 1
33	DB02784	N-(Bromoasetil)-beta-alanil-N-(2-{4-[(karboksikarbonil)amino]fenil}etil)-L-serinamid	Deneysel	-15.69	-65.38	2	PTP1B
34	DB02622	2-(Oksalil-Amino)-Benzoik Asit	Deneysel	-14.10	-23.59	2	PTP1B
35	DB04001	6-(Oksalil-Amino)-1h-İndol-5-Karboksilik Asit	Deneysel	-14.21	-27.15	2	PTP1B
36	DB03530	Ceftazidime	Deneysel	-14.68	-79.76	1	Düzenleyici protein BlaR1

Tablo 5. TCPTP Hedefine Karşı Belirlenen Hedef İlaçlar

ID Numara	İlaç Adı	İlaç Grupları	Glide XP
1	DB03905 Süksinamid-CoA	Deneysel	-14.03
2	DB01895 Aspartil-Adenozin-5'-Monofosfat	Deneysel	-10.01
3	DB12994 MIP-1095 I-123	Araştırma	-10.05
4	DB03732 Etheno-Nadp	Deneysel	-10.10
5	DB02363 2'-Monofosfoadenosin-5'-Difosfat	Deneysel	-10.20
6	DB03108 4-fosfo-D-eritronik asit	Deneysel	-10.20
7	DB04023 GDP-alfa-D-mannuronik asit	Deneysel	-10.23
8	DB01575 Kaolin	Onaylandı	-10.29
9	DB02931 CoA-s-asetil triptamin	Deneysel	-10.32
10	DB04362 Adenozin Difosfat 5-(Beta-Etil)-4-Metil-Tiazol-2-Karboksilik Asit	Deneysel	-10.42
11	DB06197 Bimosiamoz	Araştırma	-10.50
12	DB03117 2-karboksipropil-koenzim A	Deneysel	-11.01
13	DB03042 5-Fosfoarabinonik Asit	Deneysel	-11.10
14	DB02223 LY231514 tetra glu	Deneysel	-11.14
15	DB01777 CoA-S-trimetilen-asetil-triptamin	Deneysel	-11.16
16	DB09487 İyotrolan	Onaylandı	-11.79
17	DB03481 5,10-Dimetilen Tetrahidrometanopterin	Deneysel	-11.96
18	DB01890 N,N-Bis(3-(D glukonamido)propil)deoksikolamid	Deneysel	-8.92
19	DB09275 Bizmut subsitrat potasyum	Onaylandı	-8.94
20	DB11093 Kalsiyum sitrat	Onaylandı	-8.94
21	DB13995 Ferrik pirofosfat sitrat	Onaylandı	-8.94
22	DB14495 Manganez sitrat	Deneysel	-8.94
23	DB01675 Metakrilil-Koenzim A	Deneysel	-9.04
24	DB13191 Fosfokreatin	Nutrasötik	-9.04
25	DB01812 Adenozin 3',5'-difosfat	Deneysel	-9.10
26	DB02098 Adenozin-2'-5'-Difosfat	Deneysel	-9.15
27	DB01763 7-tionikotinamid-adenin-dinükleotit fosfat	Deneysel	-9.22
28	DB01652 4-hidroksibenzoil-CoA	Deneysel	-9.30
29	DB02778 2,5-Anhidroglusitol-1,6-Bifosfat	Deneysel	-9.31
30	DB04566 İnosinik Asit	Deneysel	-9.31
31	DB09281 Magnezyum trisilikat	Onaylandı	-9.34
32	DB03557 4-[[[(2S)-1-[[6-[(1-Amino-1-okso-3-sülfanilpropan-2-il)amino]-6 oksoheksil]amino]-3-[4-(difloro(fosfono))metil]fenil]-1 oksopropan-2-il]amino]-3-[[2-[4 (difloro(fosfono)metil]fenil]asetil]amino]-4-oksobutanoik asit	Deneysel	-9.36
33	DB02338 NADPH	Deneysel	-9.43
34	DB02800 5-hidroksimetil-5,6-dihidrofolik asit	Deneysel	-9.43
35	DB09267 Stronsiyum ranelat	Onaylandı	-9.47
36	DB06178 Talotreksin	Araştırma	-9.60
37	DB03182 Alfa-Floro-karboksimetildetiya koenzim A kompleksi	Deneysel	-9.65
38	DB03942 Karboksilik PRPP	Deneysel	-9.73
39	DB04067 4-hidroksibenzil koenzim A	Deneysel	-9.74
40	DB14965 CTT-1057	Araştırma	-9.74
41	DB02783 4'-Deoksi-4'-Asetilamino-Piridoksal-5'-Fosfat	Deneysel	-9.78
42	DB03041 UDP-alfa-D-glukuronik asit	Deneysel	-9.83
43	DB14978 MIP-1095 I-131	Araştırma	-9.84
44	DB01753 4-okso-nikotinamid-adenin dinükleotit fosfat	Deneysel	-9.95

Ayrıca ilginç bir şekilde, Tablo 4'te ilaçların kümelenmesi incelendiğinde, küme 5'deki DB02651, DB04204, DB03154, DB03483 ve DB03557 ilaçların Drugbank databazında verilen hedef reseptörlerinin PTP1B olduğu belirlendi. Ayrıca bu moleküllerin yapıları incelendiğinde en düşük kayma XP puanına sahip DB02651'in çalışmada sanal tarama için seçilen PTP1B kristal yapısındaki (1Q6M) ligandın olduğu belirlendi. Bu sonuçlar ise sanal taramanın etkinliğini kanıtlar niteliğindedir. 36 hedef ilaçların Glide XP puanları Tablo 4' te verildi. Proteinle kristalleşen DB02651'in Glide XP skoru -15,14 diğer 36 ilacın skorlarının -15,50 ile -13,24 arasında değişmektedir. En düşük skora sahip hedeflerin, birlikte kristalize edilmiş ligand DB06251 ile karşılaştırıldığında daha iyi bağlanma verimliliğine sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca, bağlanma serbest enerjisini hesaplamak için MMGBSA yaklaşımı kullanılmış ve 36 hedef bağlanma serbest enerji skorları Tablo 4' te verildi. Tablo 4 'te, ΔG bağlanma değerlerinin -23,22 ve -105,16 kcal/mol arasında değiştiği görüldü. PTP1B ile kristalize edilen referans DB02651'in bağlanma değerinin 36 hedef bileşik içinde en düşük değer olan -105,16 kcal/mol olduğu belirlendi.

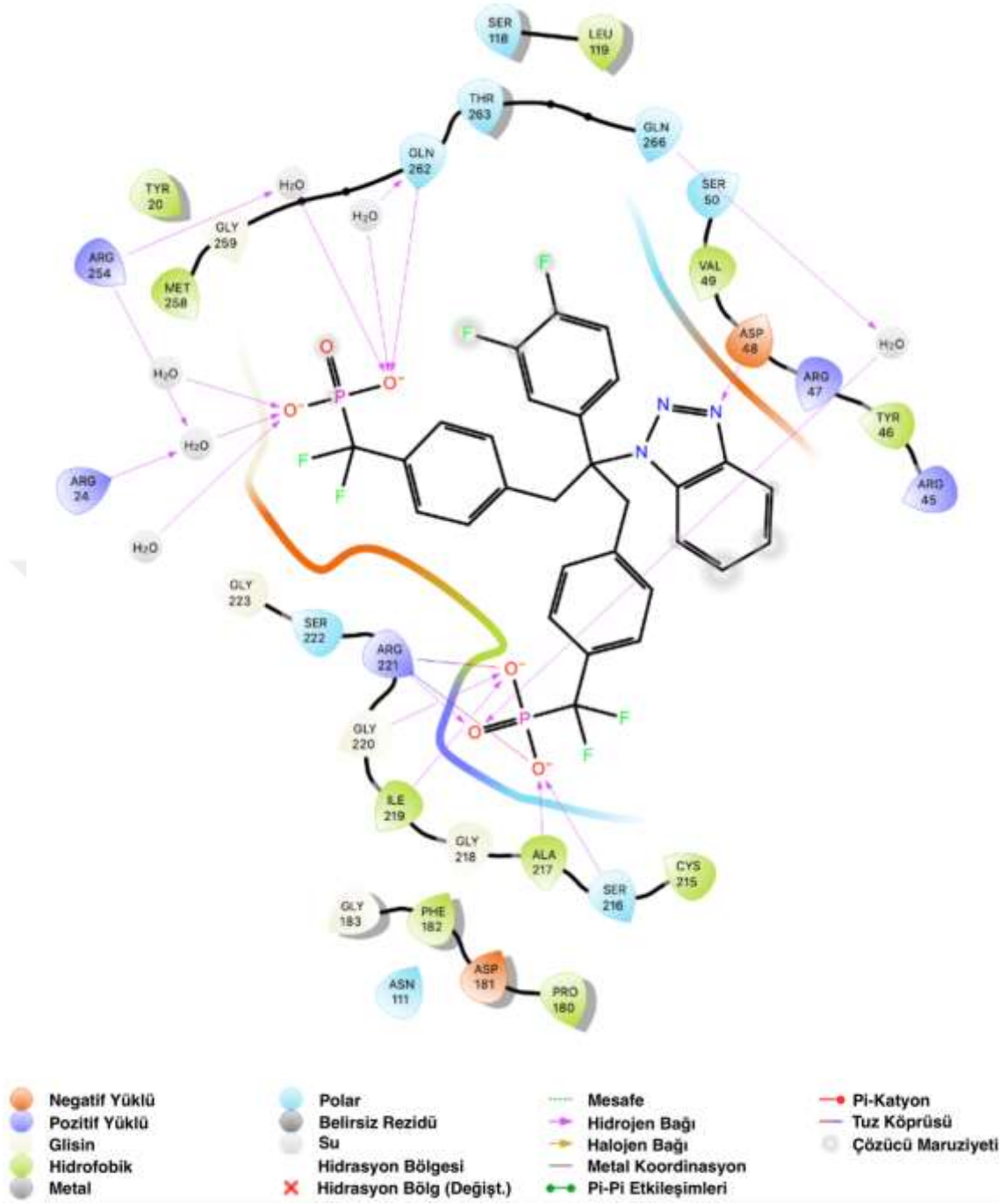
Kümeleme sonucu elde edilen küme 4' deki ilaçların hedef reseptörleri ise Prostaglandin G/H sentaz 1, NF-kappa-B temel modülatör, Hem oksijenaz, Grup IIE salgılayıcı fosfolipaz A2, DNA, ActVA 6 protein, Prostaglandin G/H sentaz 1, Glikojen fosforilaz kas formu, Adenosilhomosisteinaz, 2,3,4,5-tetrahidropiridin-2,6-dikarboksilat N-süksiniltransferaz, 6,7-dimetil-8-ribityllumazin sentaz, Glutasyon S-transferaz Mu 1, Timidilat sentaz, LDL-HDL-C, İzositrat dehidrogenaz, Mikrozomal glutasyon S-transferaz 3, Streptavidin, Glutasyon S-transferaz Mu 2, Alkol dehidrogenaz, Beta-2-glikoprotein, Streptavidin. 3-izopropilmalat dehidrogenaz ve Prostatiklin reseptörüdür. Bu kümenin Glide XP değerleri -14,90 ile -13,24 aralığında iken MMGBSA değerleri ise -95,44 ile -23,22 kcal/mol aralığında olduğu tespit edildi. Küme 3'ün DB02014 ID numarasına sahip bir tek ilaçtan oluştuğu ve bu ilacın etkileştiği hedef reseptörün ise PTP1B olduğu belirlendi. Ayrıca bu ilacın Glide XP değerinin -14,81, MMGBSA değerinin ise -75,01 kcal/mol oldukları görüldü. Küme 2' de ise DB03884 ID numaralı ilacın hedef reseptörünün Hidroksiasit oksidaz 1 olduğu, DB02784, DB02622 ve DB0400 numaralı ilaçların ise hedef reseptörlerinin PTP1B olduğu tespit edildi. Bu kümedeki ilaçların Glide XP değerleri -15,69 ile -13,87 aralığında iken MMGBSA değerleri ise -65,38 ile -23,59 kcal/mol aralığında olduğu tespit edildi.

Son olarak küme 1'in sadece DB03530 ID numarasına sahip bir ilaç molekülünden oluştuğu ve hedef reseptörünün ise düzenleyici protein BlaR olduğu belirlendi. Bu ilacın Glide XP değeri -14,68, MMGBSA değeri ise -79,76 kcal/mol olarak hesaplandı. Bu çalışmada Tablo 3'de verildiği gibi hedef bileşik olarak belirlenen 36 bileşikten (DB02651,

DB04204, DB03154, DB03483, DB03557, DB04809, DB02758, DB02019, DB04642, DB03769, DB03699, DB04262, DB02458, DB03558, DB01727, DB03112, DB04701, DB04153, DB03139, DB04279, DB02014, DB03884, DB02784, DB02622, DB04001 ve DB03530) 26 tanesinin deneysel aşamada, (DB00712, DB00291, DB00870, DB00143, DB03310, DB01088 ve DB01240) 7 tanesinin onaylanmış, ve son olarak (DB05289, DB05123 ve DB05446) 3 tanesinin araştırma aşamadaki ilaçlar olduğu belirlendi.

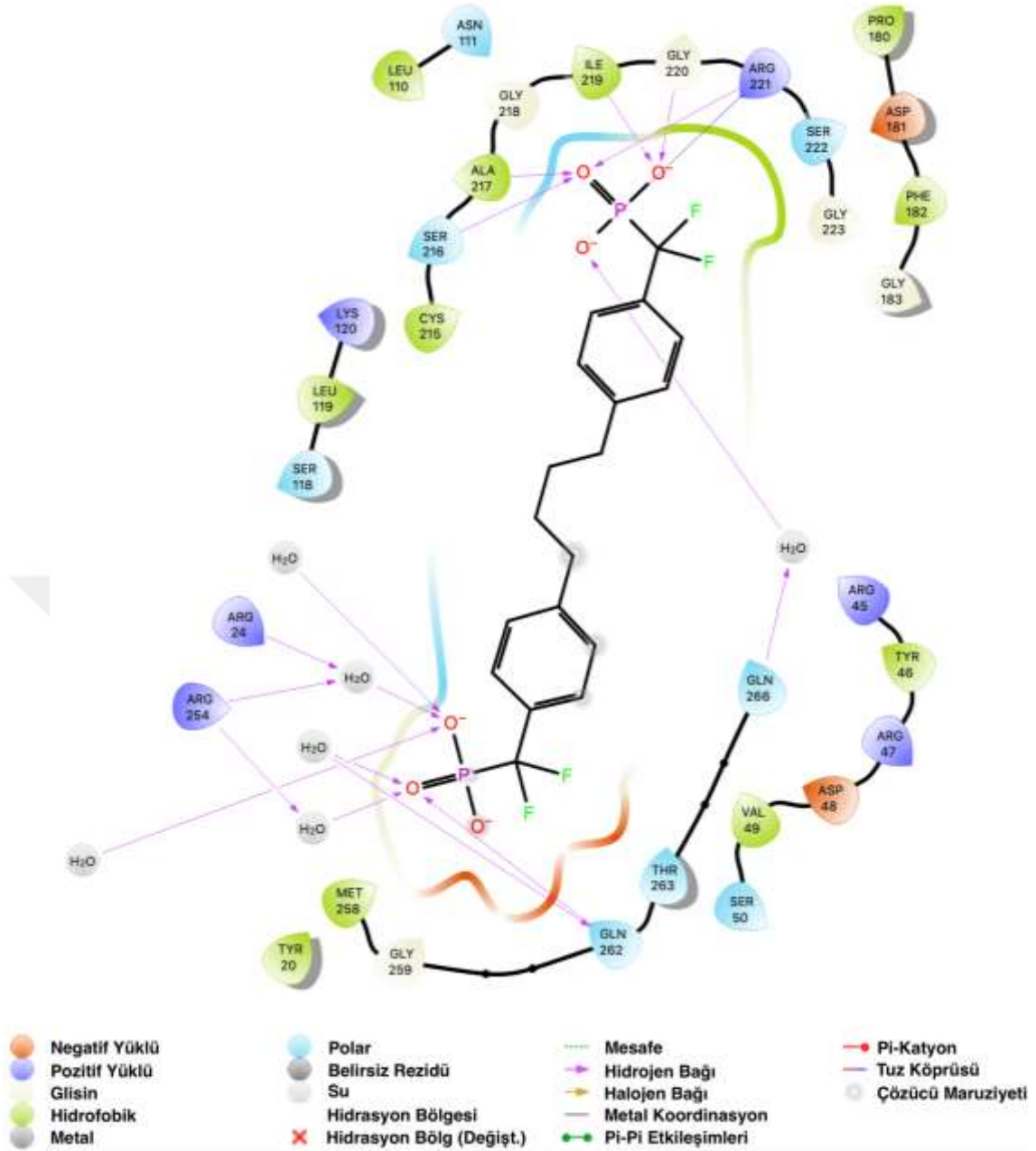
Bilindiği üzere tez çalışmamızın amacı var olan ilaçlar arasından yeni ve seçici PTP1B inhibitörlerini sanal tarama ile keşfetmektir. Bu amaçla yapılan bu tarama sonucu elde edilen ilaçların kümelenmesi incelendiğinde, küme 3 ve 5'in tüm hedeflerinin, Küme 2'nin ise biri dışında diğerlerinin hedef proteinin PTP1B olduğu belirlendi. Ayrıca bu ilaçların hepsinin deneysel aşamadaki ilaçlar olduğu tespit edildi ve ilaçların yapıları incelendiğinde, çalışmada sanal tarama için seçilen PTP1B kristal yapısındaki (1Q6M) ligandının, en iyi XP skoruna sahip DB0251 ilacı ile aynı olduğu belirlendi. Sanal tarama sonucu elde edilen 36 hedef molekül içinden 9 tanesinin PTP1B proteinini hedef alan ilaç olması sanal taramanın etkinliğini kanıtlamaktadır.

Bu tezde amacımız sadece PTP1B yi hedef alan güçlü inhibitör seçmek değil aynı zamanda bu inhibitörlerin TCPTP proteini ile olan etkileşiminin minimize olması istenmektedir. Bu amaçla bu tezde hem aktif bölgeyi hemde pTyr bölgesini hedef alan ilaçların tespit edilmesi hedeflendi. Sanal tarama sonucu Drugbank'da bulunan deneysel aşamadaki PTP1B'yi hedef alan 9 ilacın her iki bölge rezidüsü ile etkileşip etkileşmediğini belirlemek amacıyla 2D analizleri yapıldı ve Şekil (13- 21)'de verildi. Küme 3 ve 5'deki inhibitörlerinin hem aktif bölge hemde pTyr bölge rezidüleri ile etkileştiği fakat Küme 2'dekilerin sadece aktif bölge rezidüleri ile etkileştiği belirlendi. Geri kalan 27 ilaçların PTP1B ile hidrojen bağlarının tek tek analizi yapılmış ve hem aktif bölgede Ser216 ve Arg221, hem de pTyr bağlanma bölgesindeki Arg24, Arg254 ve Gln262 rezidüleriyle hidrojen bağı yapan ilaçlar (DB03558, DB05123, DB03310, DB05446, DB03530) tespit edildi.



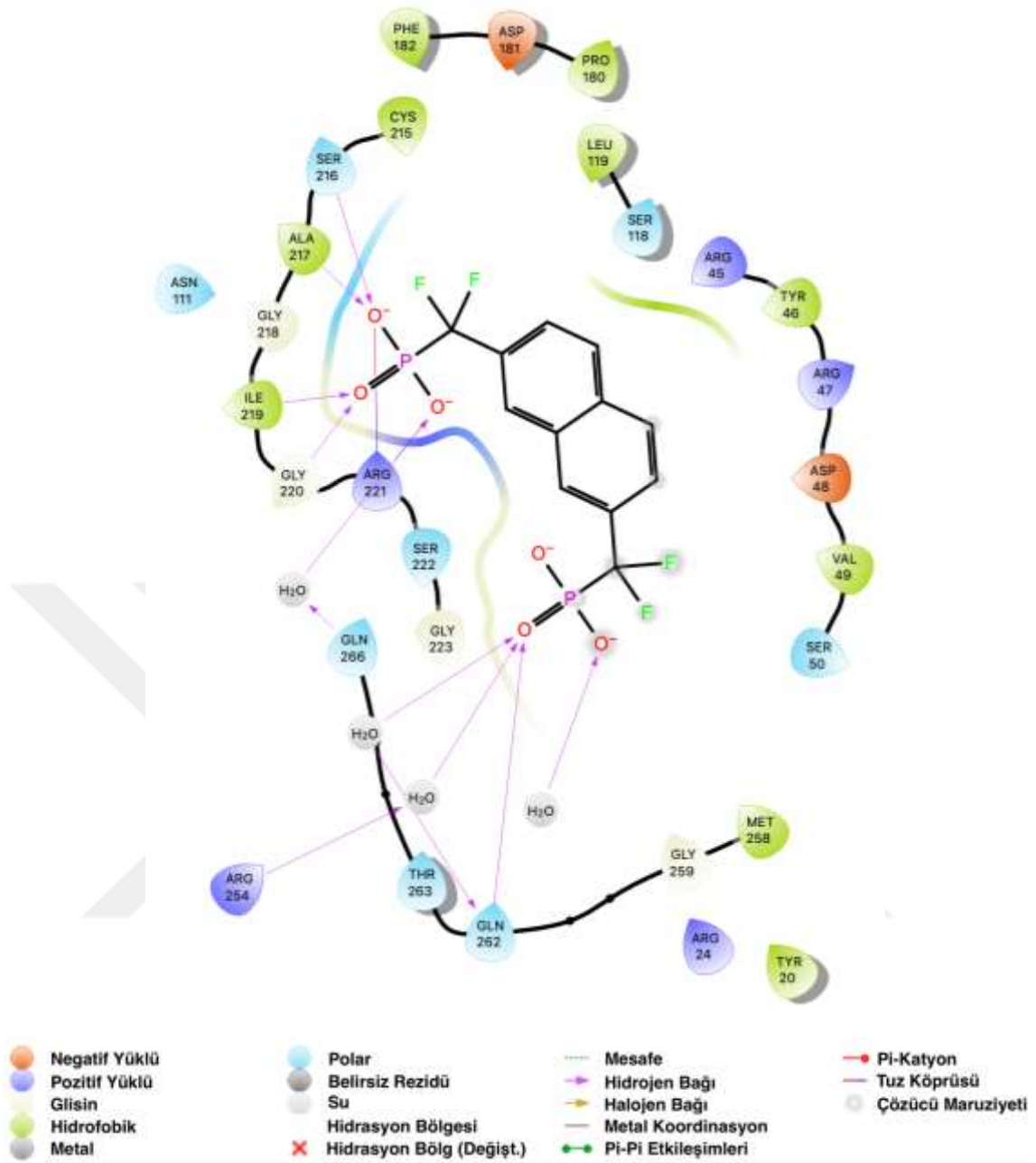
Şekil 13. DB02651 in 2B gösterimi

DB02651' in PTP1B ile olan 2B etkileşimi Şekil 13'de verilmiştir. Oluşan etkileşimler incelendiğinde, DB02651'in fosfat gruplarından birinin aktif bölgeye yönlendiği ve Arg221, Gly220, Ile219, Ala217 ve Ser216 ile hidrojen bağları yaptığı ayrıca Arg221 ile tuz köprüleri oluşturduğu belirlenmiştir. DB02651'in fosfat gruplarından bir diğeri ise ikinci pTyr bağlanma bölge rezidülerinden Gln262 ile hidrojen bağı yaptığı belirlenmiştir. Asp48 ile hidrojen bağları yaptıkları gözlemlenmiştir.



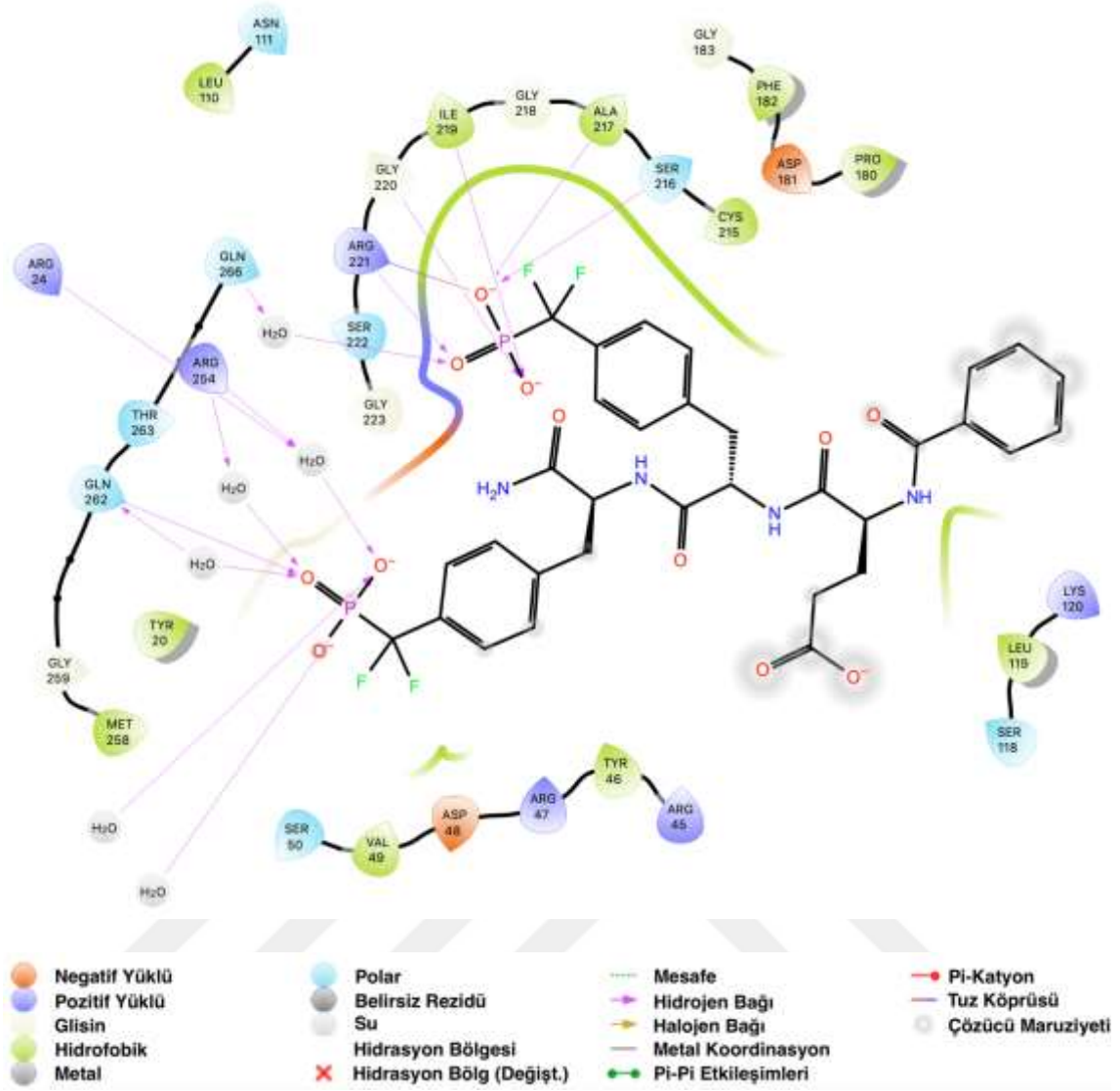
Şekil 14. DB04204 in 2B gösterimi

DB04204 'in PTP1B ile olan 2B etkileşimi Şekil 14'de verilmiştir. Oluşan etkileşimler incelendiğinde, DB04204'in fosfat gruplarından birinin aktif bölgeye yöneldiği ve Ser216, Ala217, Ile219, Gly220 ve Arg221 ile hidrojen bağları yaptığı ayrıca Arg221 ile tuz köprüsü oluşturduğu belirlenmiştir. DB04204'in fosfat gruplarından diğeri ise ikinci pTyr bağlanma bölge rezidülerinden Gln262 ile hidrojen bağı yaptığı belirlenmiştir.



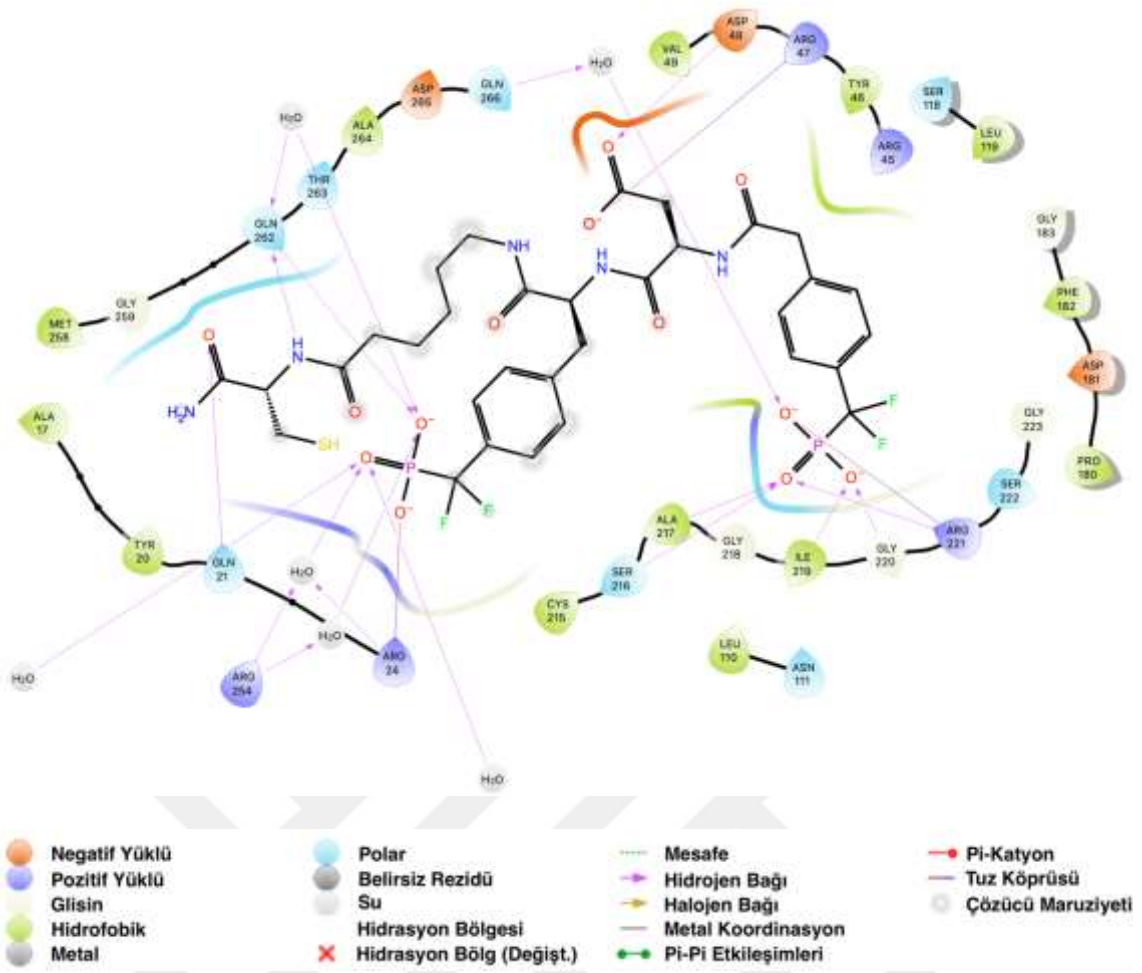
Şekil 15. DB03154 in 2B gösterimi

DB03154'in PTP1B ile olan 2B etkileşimi Şekil 15'de verilmiştir. Oluşan etkileşimler incelendiğinde, DB03154'in fosfat gruplarından birinin aktif bölgeye yöneldiği ve Ser216, Ala217, Ile219, Gly220 ile hidrojen bağları yaptığı ayrıca Arg221 ile tuz köprüleri oluşturduğu belirlenmiştir. DB03154'in fosfat gruplarından bir diğeri ise ikinci pTyr bağlanma bölge rezidülerinden Gln262 ile hidrojen bağı yaptığı belirlenmiştir.



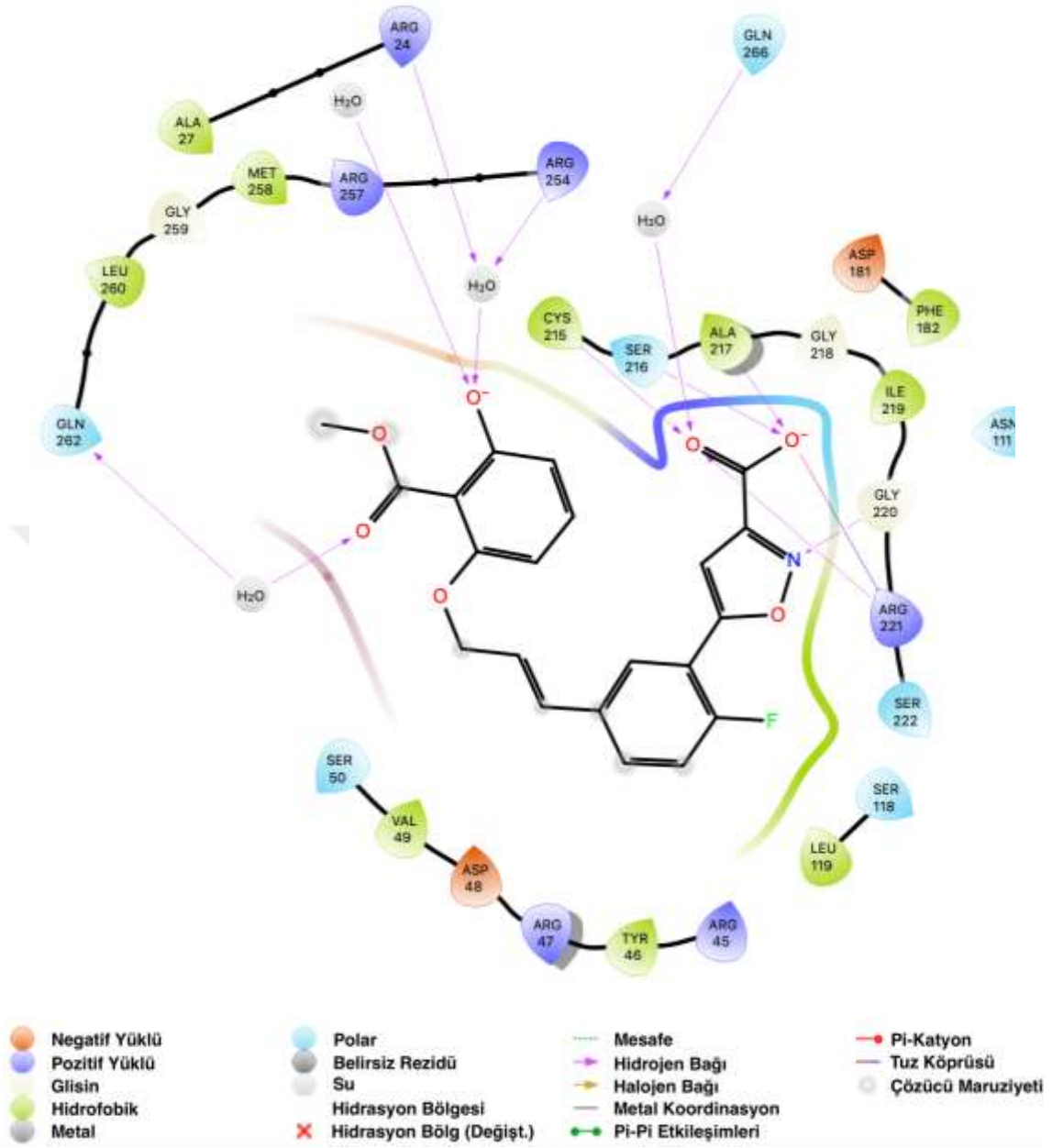
Şekil 16. DB03483 in 2B gösterimi

DB03483'in PTP1B ile olan 2B etkileşimi Şekil 16'de verilmiştir. Oluşan etkileşimler incelendiğinde, DB03483'in fosfat gruplarından birinin aktif bölgeye yöneldiği ve Arg221, Gly220, Ile219, Ala217 ve Ser216 ile hidrojen bağları yaptığı ayrıca Arg221 ile tuz köprüsü oluşturduğu belirlenmiştir. DB03483'in fosfat gruplarından bir diğeri ise ikinci pTyr bağlanma bölge rezidülerinden Gln262 ile hidrojen bağı yaptığı belirlenmiştir.



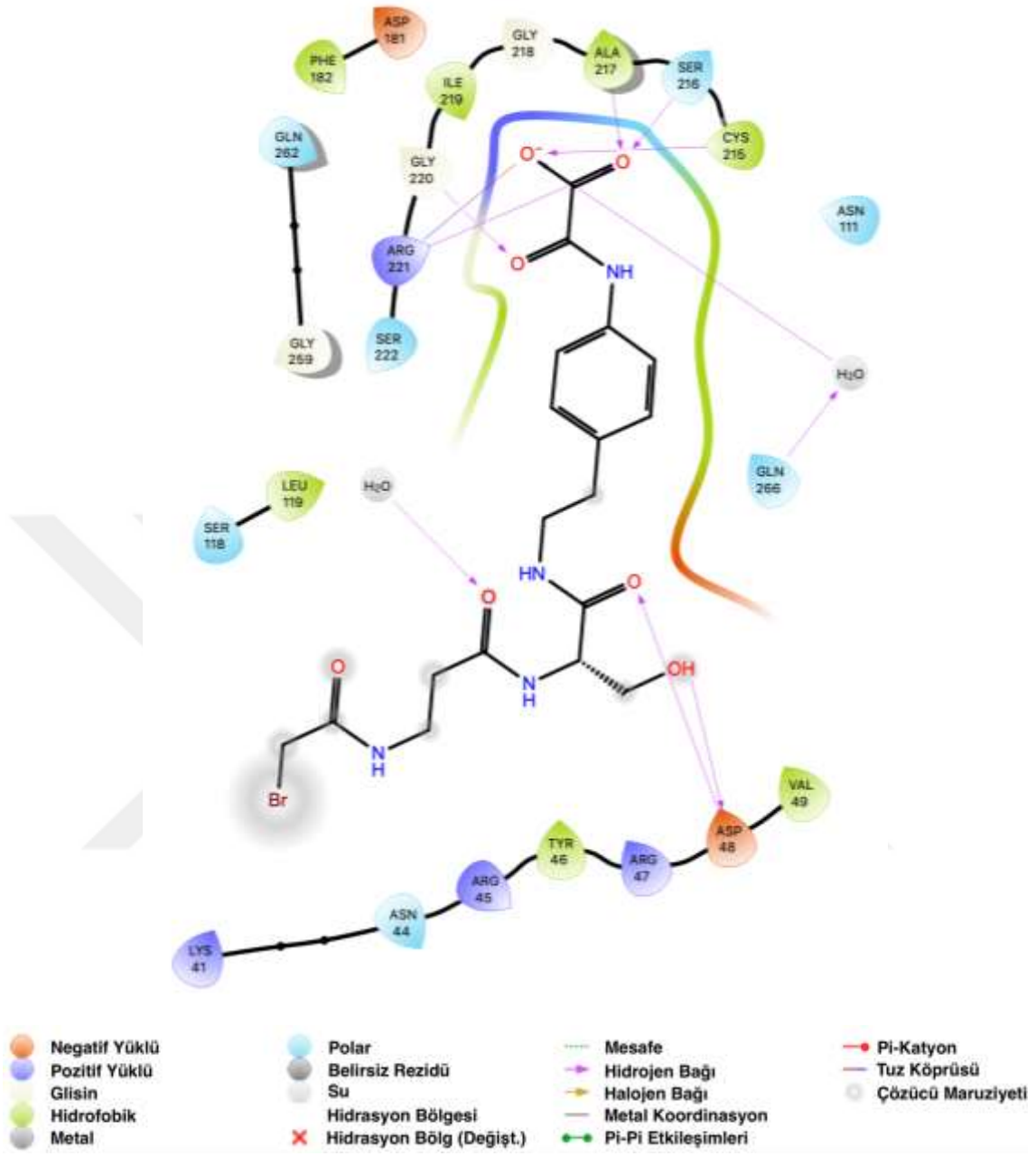
Şekil 17. DB03557 in 2B gösterimi

DB03557'in PTP1B ile olan 2B etkileşimi Şekil 17'de verilmiştir. Oluşan etkileşimler incelendiğinde, DB03557'in fosfat gruplarından birinin aktif bölgeye yöneldiği ve Ser216, Ala217, Ile219, Gly220 ve Arg221 ile hidrojen bağları yaptığı ayrıca Arg221 ile tuz köprüsü oluşturduğu belirlenmiştir. DB03557'in fosfat gruplarından diğeri ise ikinci pTyr bağlanma bölge rezidülerinden Gln262 ile hidrojen bağı yaptığı, Arg24 ile tuz köprüsü oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca Gln21 ve Asp48 rezidüleri ile hidrojen bağları yaptığı, ayrıca Arg47 ile tuz köprüsü oluşturduğu gözlemlenmiştir.



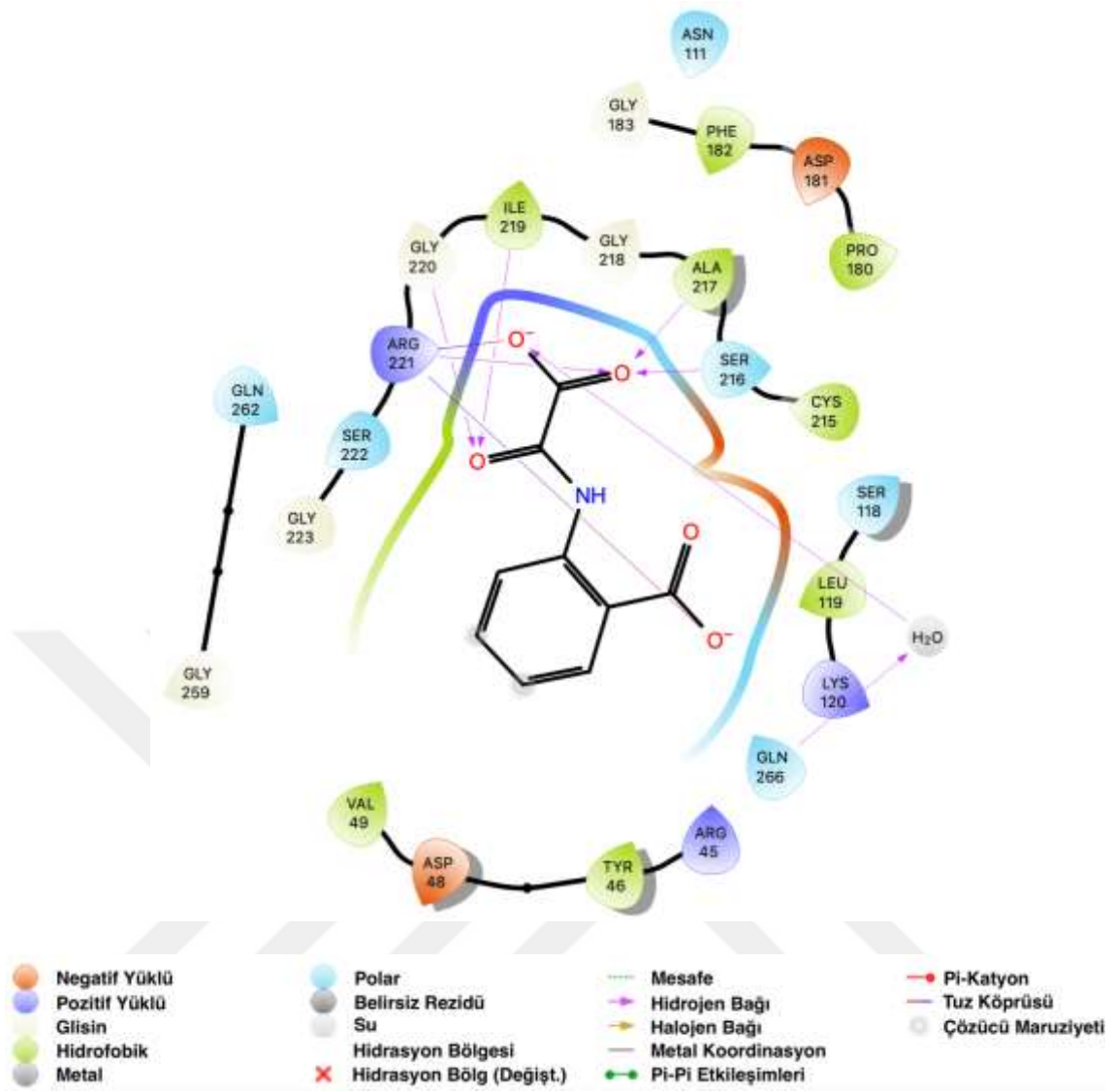
Şekil 18. DB02014 in 2B gösterimi

DB02014'ün PTP1B ile olan 2B etkileşimi Şekil 18'de verilmiştir. Oluşan etkileşimler incelendiğinde, DB02014 fosfat gruplarından birinin aktif bölgeye yöneldiği ve Cys215, Ser216, Ala217, Gly220 ve Arg221 ile hidrojen bağları yaptığı ayrıca Arg221 ile tuz köprüsü oluşturduğu belirlenmiştir.



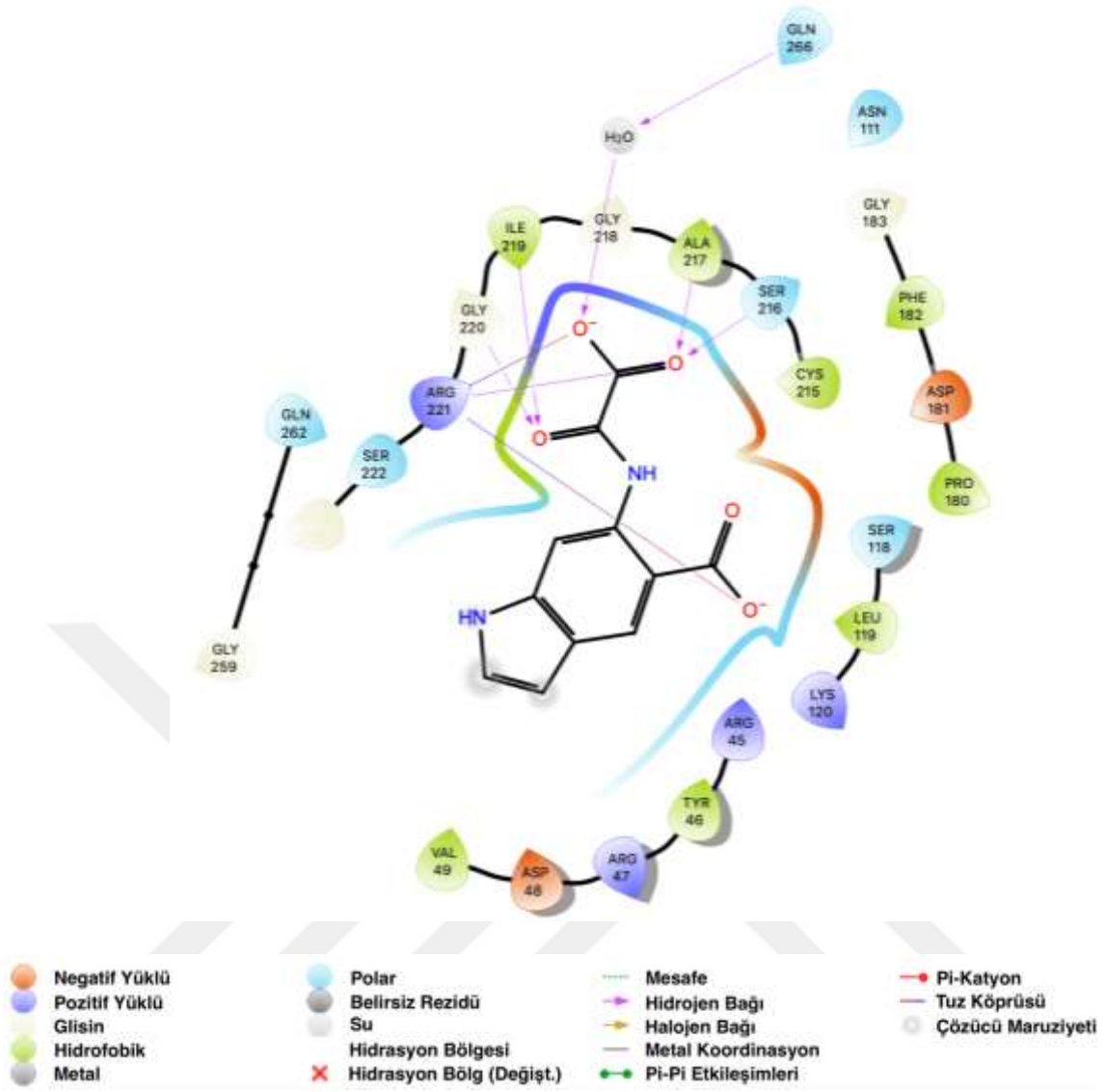
Şekil 19. DB02784'ün 2B gösterimi

DB02784'ün PTP1B ile olan 2B etkileşimi Şekil 19'de verilmiştir. Oluşan etkileşimler incelendiğinde, DB02784 fosfat gruplarından birinin aktif bölgeye yöneldiği ve Cys215, Ser216, Ala217, Gly220 ve Arg221 ile hidrojen bağları yaptığı ayrıca Arg221 ile tuz köprüsü oluşturduğu belirlenmiştir. Asp48 ile hidrojen bağları yaptıkları gözlemlenmiştir.

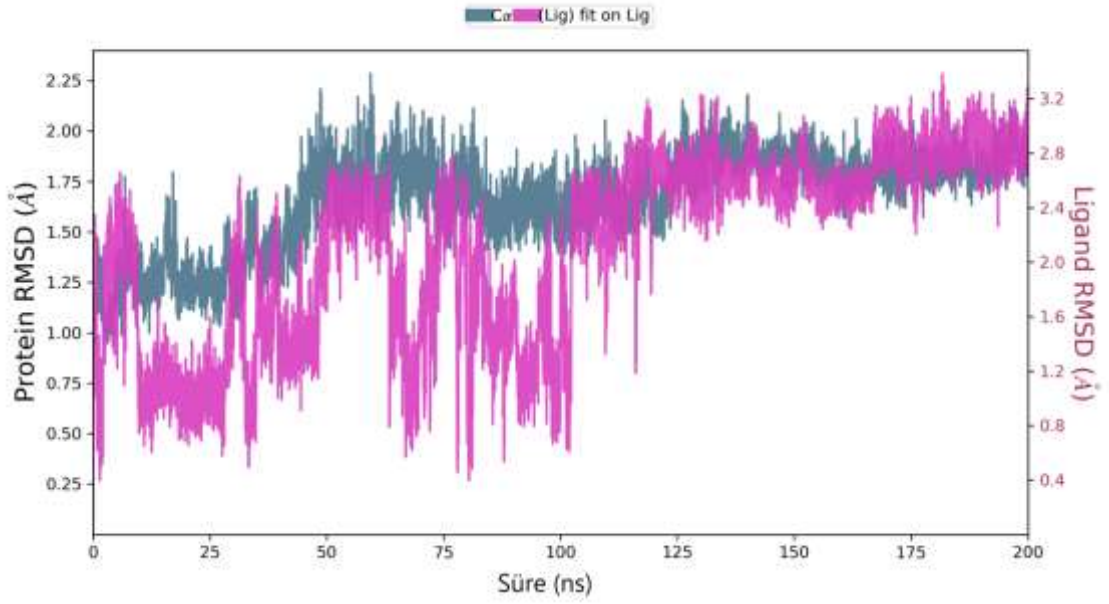


Şekil 20. DB02622' in 2B gösterimi

DB02622'in PTP1B ile olan 2B etkileşimi Şekil 20'de verilmiştir. Oluşan etkileşimler incelendiğinde, DB02622 fosfat gruplarından birinin aktif bölgeye yöneldiği ve Ser216, Ala217, Ile219, Gly220 ve Arg221 ile hidrojen bağları yaptığı ayrıca Arg221 ile tuz köprüsü oluşturduğu belirlenmiştir.

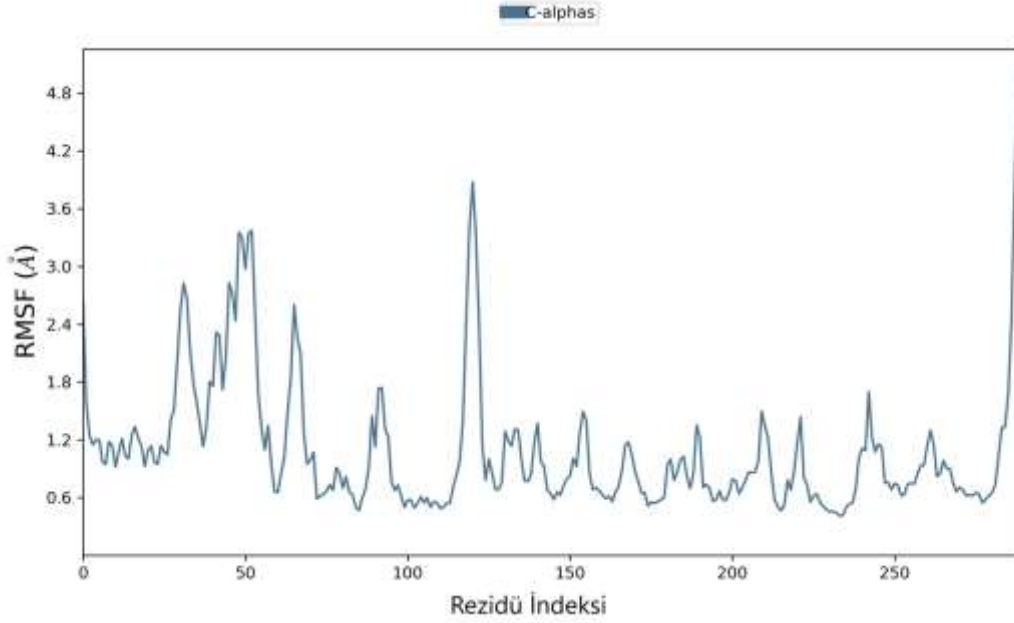


Glide XP doking algoritması tarafından tahmin edilen SP-876, Gemcabene, Glutasyon disülfid, LJP 1082 ve Ceftazidime -PTP1B kompleksleri arasındaki etkileşimin dinamik doğasına daha fazla ışık tutmak ve bağlanma sistemlerinin stabilitesini test etmek için fizyolojik koşullar altında 200 ns MD simülasyonları yapılmıştır. Bu çalışma için yürütülen beş MD simülasyonları çok önemli miktarda veri sağlamıştır. Simülasyon boyunca proteinin yapısal dinamikleri ile protein-ligand arasındaki etkileşimler belirlenmiştir. Bilindiği üzere simülasyon sırasında meydana gelen protein ve ligant'daki konformasyonel değişiklikler, Karekök Ortalama Sapma (RMSD) olarak belirlenebilir ve ifade edilebilir. Globüler proteinler için 3 Å içindeki herhangi bir RMSD tamamen kabul edilebilirken, daha büyük sapmalar, proteinin simülasyon sırasında büyük konformasyonel değişikliklere uğradığını gösterir, bu da protein-ligand kompleksinin kararsız olduğu anlamına gelir. Protein-ligand etkileşimlerinde odaklanılan kısımlar aktif bölge ve pTyr bağlanma bölgelerindeki ligand ve amino asitler arasındaki etkileşimler üzerineydi. Bu etkileşimlerin, iki bölgedeki anahtar amino asitler ile olup olmadığı ve ayrıca hangi amino asitlerin ligandlar tarafından tercih edildiği araştırılmıştır. Bir referans yapıya göre belirli bir yapı için seçilen atomun yer değiştirmesindeki ortalama değişikliği ölçmek için kullanılan ve yörüngedeki tüm yapılar için hesaplanan Karekök Ortalama Sapma (RMSD) grafikleri elde edilmiştir.



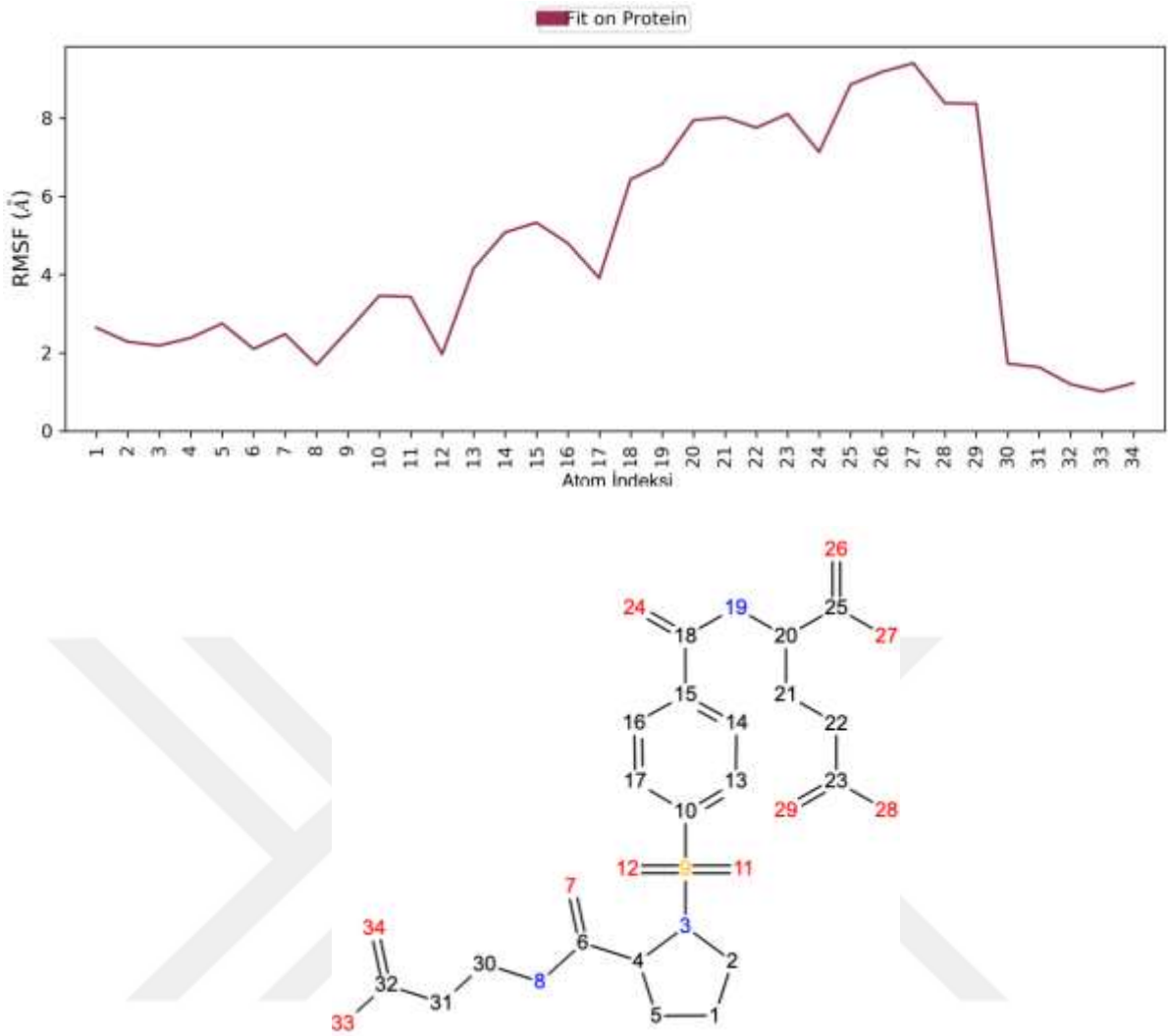
Şekil 22. PTP1B- SP-876 kompleksinin Ca ve SP-876 atomlarının RMSD-zaman grafiği

SP-876 -PTP1B kompleks protein omurgası RMSD görülmektedir. İlk protein yapısının stabilizasyonu nedeniyle ilk 1ns için büyük bir sapma gösterdi ve sistem 1ns sonra stabilize edildi ve kararlı durum dinamikleri gösterdi. RMSD grafiği (Şekil 22) PTP1B için 0,78 ila 2,29 Å ve ilaç için 0,40 Å ila 3,24 Å arasında uzanan RMSD değerlerinden oluştuğunu göstermiştir. Protein RMSD aralığının 3,0 Å olarak tahmin edilen eşiğin üst sınırı içinde olduğu, ligand RMSD değerinin ise çok kısa sürede üst sınırı aştığı belirlendi.



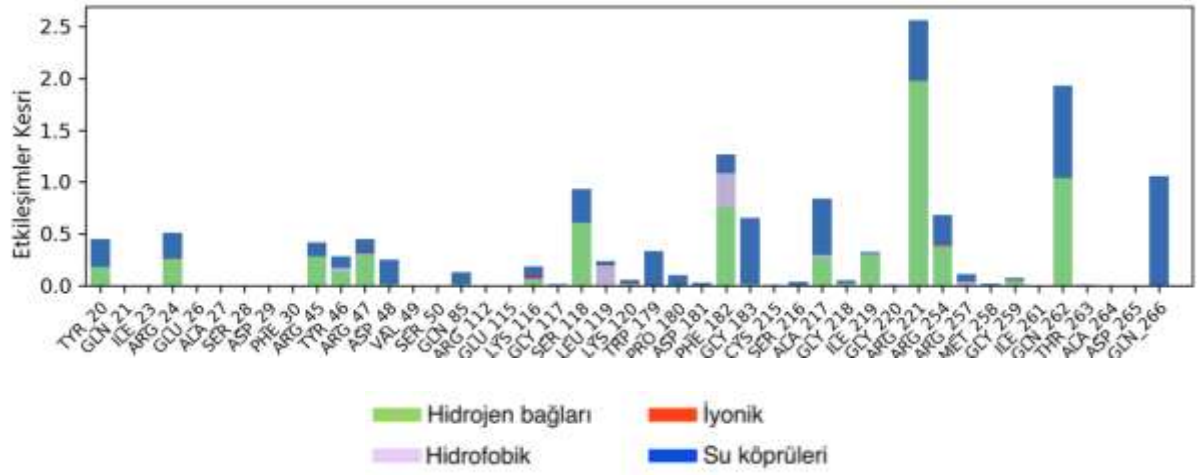
Şekil 23. PTP1B- SP-876 kompleksinin C α atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Kök Ortalama Kare Dalgalanma (RMSF), protein polipeptidi boyunca bölgesel değişiklikleri karakterize etmek için kullanılır. Simülasyon sırasında, SP-876'nın protein omurgası üzerindeki her amino asit rezidüsünün atomlarının hareketliliği üzerindeki etkisini incelemek ve tanımlamak için karmaşık analizlerle bir RMSF grafiği oluşturuldu ve Şekil 23 verildi. Zirveler, zincir üzerindeki en hareketli rezidüleri ve N- ve C-terminallerinin en hareketli protein parçaları olduğunu gösterdi. Bu komplekste Gly117 rezidüsünün diğer rezidülere göre en hareketli kısım olduğu belirlendi.



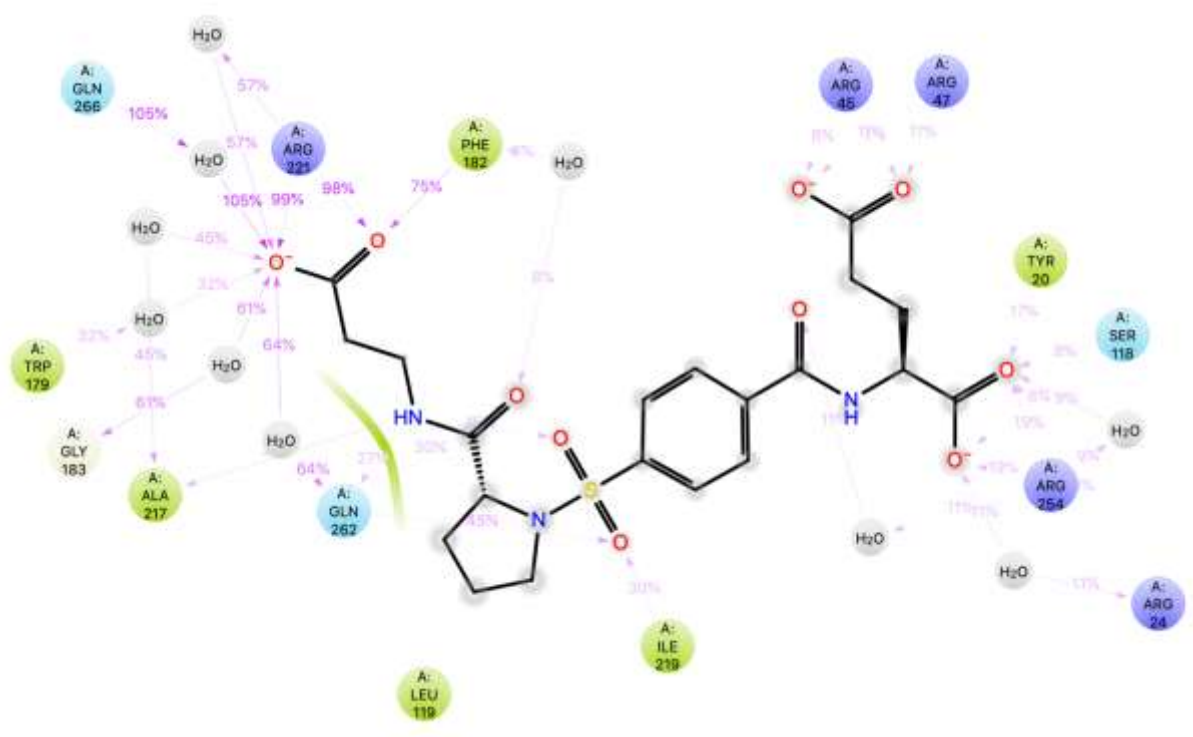
Şekil 24. PTP1B ile kompleks SP-876 atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Ligand atom pozisyonlarındaki değişiklikleri karakterize etmek için Ligand Kök Ortalama Kare Dalgalanması (L-RMSF) kullanıldı. Ligand RMSF (Şekil 24), grafiğin üst panelinde verilen SP-876 atomlarının dalgalanmalarını gösterdi. PTP1B ve SP-876'nın bağlanma olayında çoğunlukla 25 ve 27 atomlarının dalgalanması olduğu belirlendi.



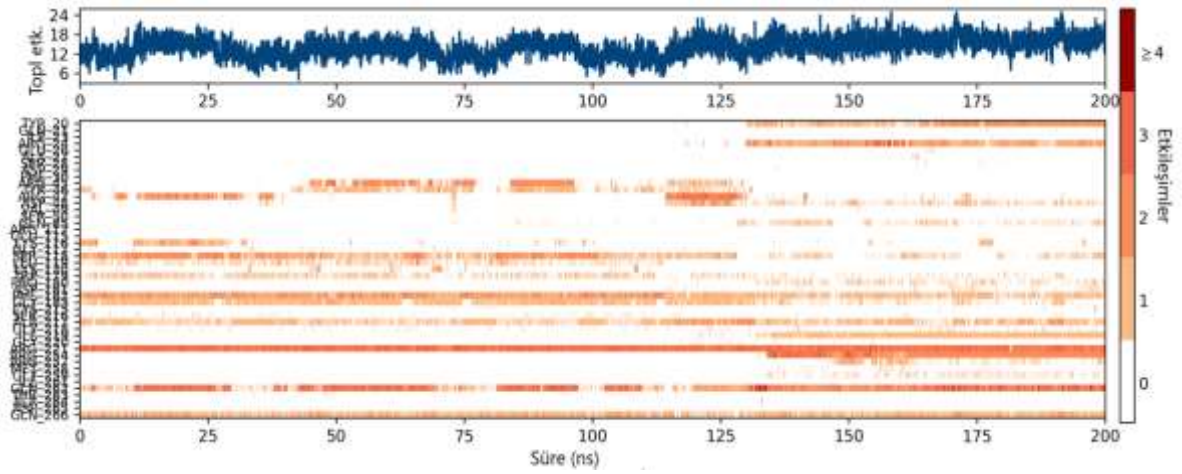
Şekil 25. PTP1B- SP-876 kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'

SP-876 ve PTP1B rezidüleri arasındaki etkileşimler hesaplandı ve Şekil 25' de temsil edildi. SP-876'nın PTP1B'de Tyr20, Arg24, Arg45, Tyr46, Arg47, Lys116, Ser118, Phe182, Ser216, Ala217, Ile219, Arg221, Arg254 ve Gln262 rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturdıkları belirlendi. SP-876'nın proteine bağlanmasını desteklemesi ise Gly183, Ala217, Arg221, Gln262 ve Gln266 rezidüleri ile oluşturulan su köprüleri ile sağlandı.



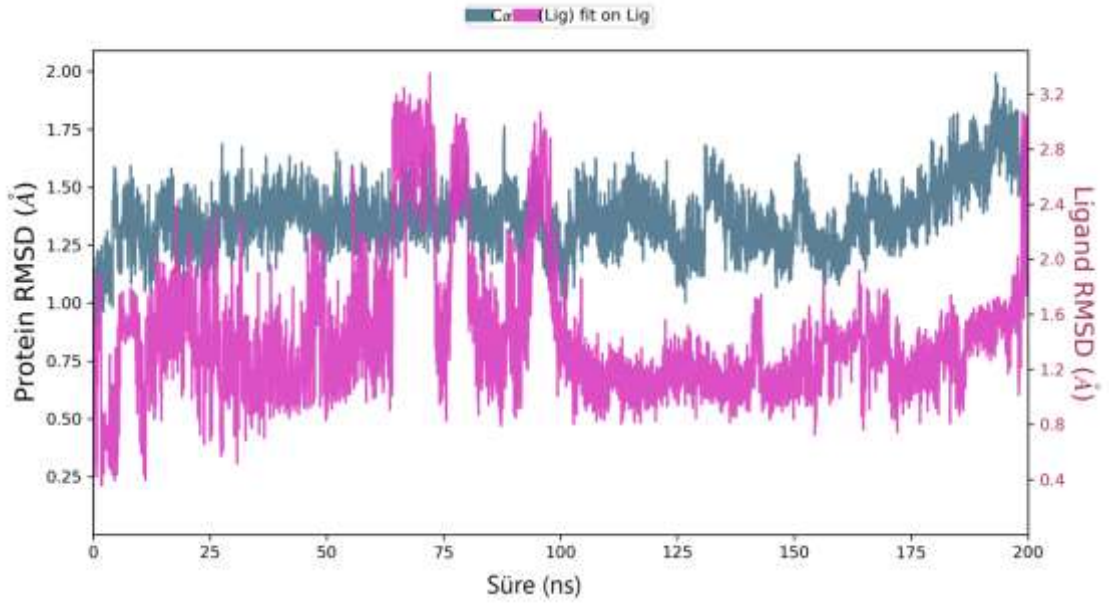
Şekil 26. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı SP-876 atom etkileşimleri

200 ns boyunca simülasyon süresinin %8,0'dan fazlası için PTP1B ve SP-876 arasındaki spesifik etkileşimleri şekil 26'da gösterildi. SP-876'nın karboksilat gruplarından birinin aktif bölge rezidüleri ile etkileşime girdiği ve diğer karboksilat grubunun pTyr bağlanma yeri rezidüleriyle etkileşime girdiği gözlemlendi. SP-876 ve aktif bölge rezidüleri Arg221 simülasyon süresinin sırasıyla en az %98 boyunca tutuldu. SP-876 ile doğrudan temasların pTyr bağlanma yeri rezidüleri olan Arg24, Arg254 ve Gln262 rezidüleri ile sağlandığı ve simülasyon süresinin en az %8, %19 ve %45'i boyunca tutuldu.



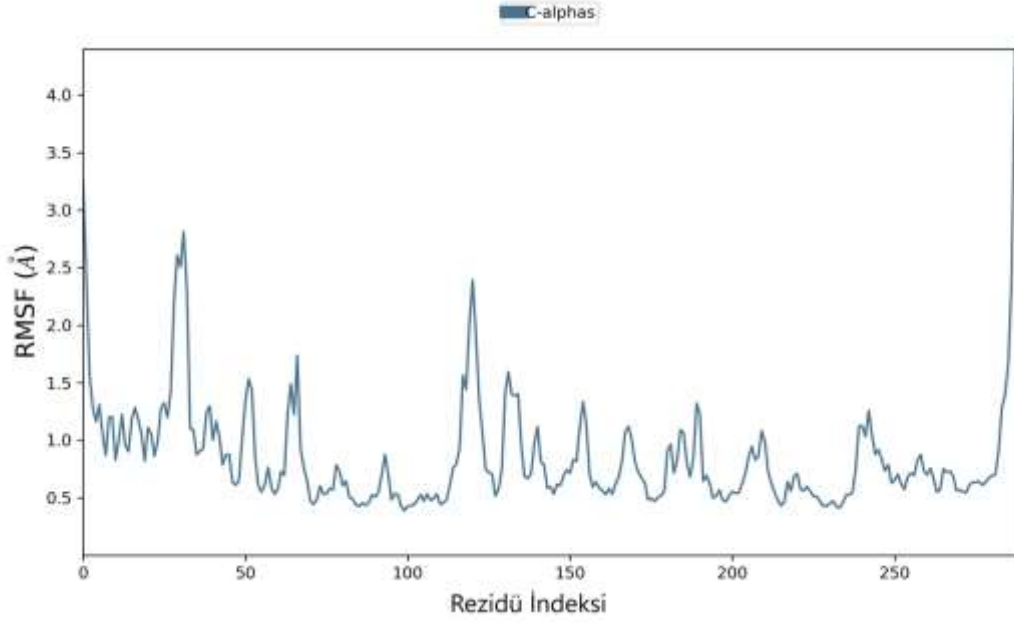
Şekil 27. PTP1B- SP-876 kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi

Şekil 27 'da hidrojen bağları, su köprüleri, hidrofobik ve iyonik etkileşimler gibi PTP1B-SP-876 etkileşimlerinin ve 200 ns simülasyon periyodu sırasında oluşan bir zaman çizelgesi çizilmiş ve temas süresine göre gösterilmiştir (X eksen), belirli rezidüler ve etkileşimleri renk yoğunluğuna göre verilmiştir (Y eksen). Bu grafiğin üst paneli, belirli PTP1B-SP-876 etkileşimlerinin toplam sayısını gösterirken, alt panel, SP-876'nın rezidü seviyesindeki etkileşimleri gösterdi. Bu çizelgede SP-876'nın PTP1B aktif bölge rezidüsü Arg221 ile etkileşiminin simülasyon sırasında çoğunlukla devam ettiği belirlendi. Ligand, simülasyon sırasında pTyr bağlanma bölgesi rezidülerinden biri (Gln262) ile etkileşime devam ederken, diğer Arg24 ve Arg254 rezidüleri ile etkileşimleri başladı ve yaklaşık 130 ns sonrasında devam etti.



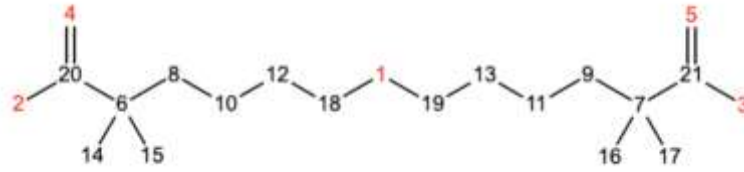
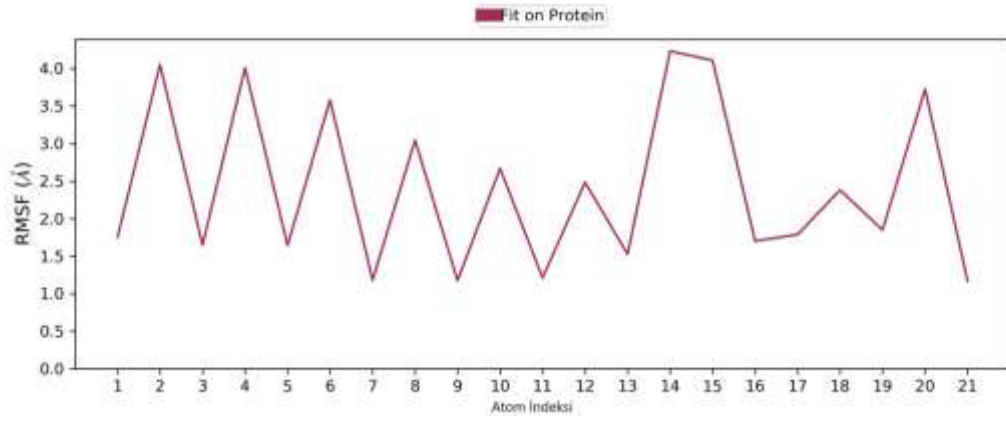
Şekil 28. PTP1B-Gemcabene kompleksinin Ca ve Gemcabene atomlarının RMSD-zaman grafiği

RMSD grafiği Şekil 28, PTP1B için 0.70 ile 1,83 Å ve Gemcabene için 0,36 Å ile 3,12 Å arasında uzanan RMSD değerlerinden oluştuğunu göstermiştir. Aralıkların 3,0 Å olarak tahmin edilen eşiğin üst sınırı içinde olduğu belirlendi. Bu nedenle, PTP1B-Gemcabene kompleksinin tüm simülasyon periyodu boyunca stabil olduğunu bu grafikler göstermektedir.



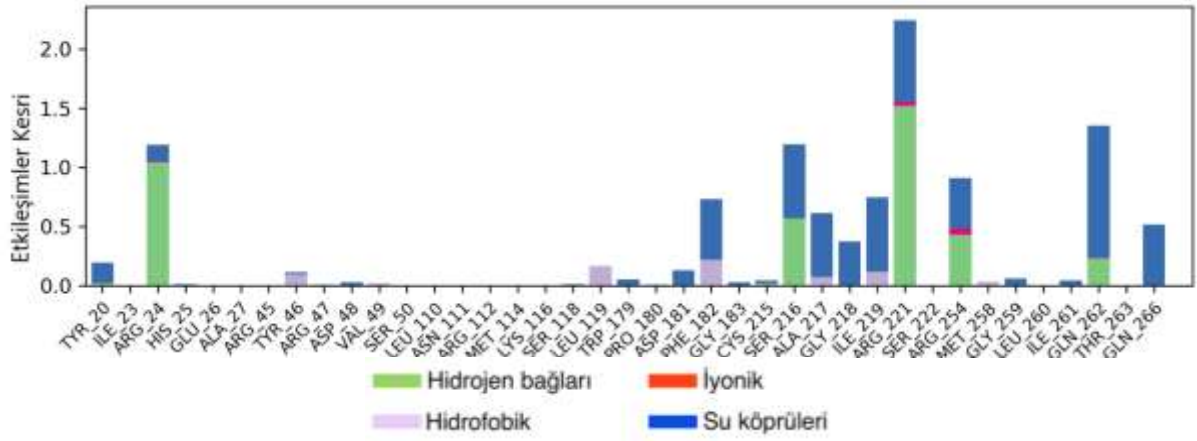
Şekil 29. PTP1B- Gemcabene kompleksinin C α atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Simülasyon sırasında, Gemcabene'nin protein iskeleti üzerindeki her amino asit rezidüsünün atomlarının hareketliliği üzerindeki etkisini incelemek ve tanımlamak için karmaşık analizlerle bir RMSF grafiği oluşturuldu ve Şekil 29' verildi. N- ve C-terminallerinin en hareketli protein kısımlarını ile zincir üzerindeki en hareketli rezidüleri piklerde görülmektedir. Yine bu komplekste Ser28 ve Gly117 rezidülerinin diğer rezidülere göre en hareketli kısımlar olduğu belirlendi.



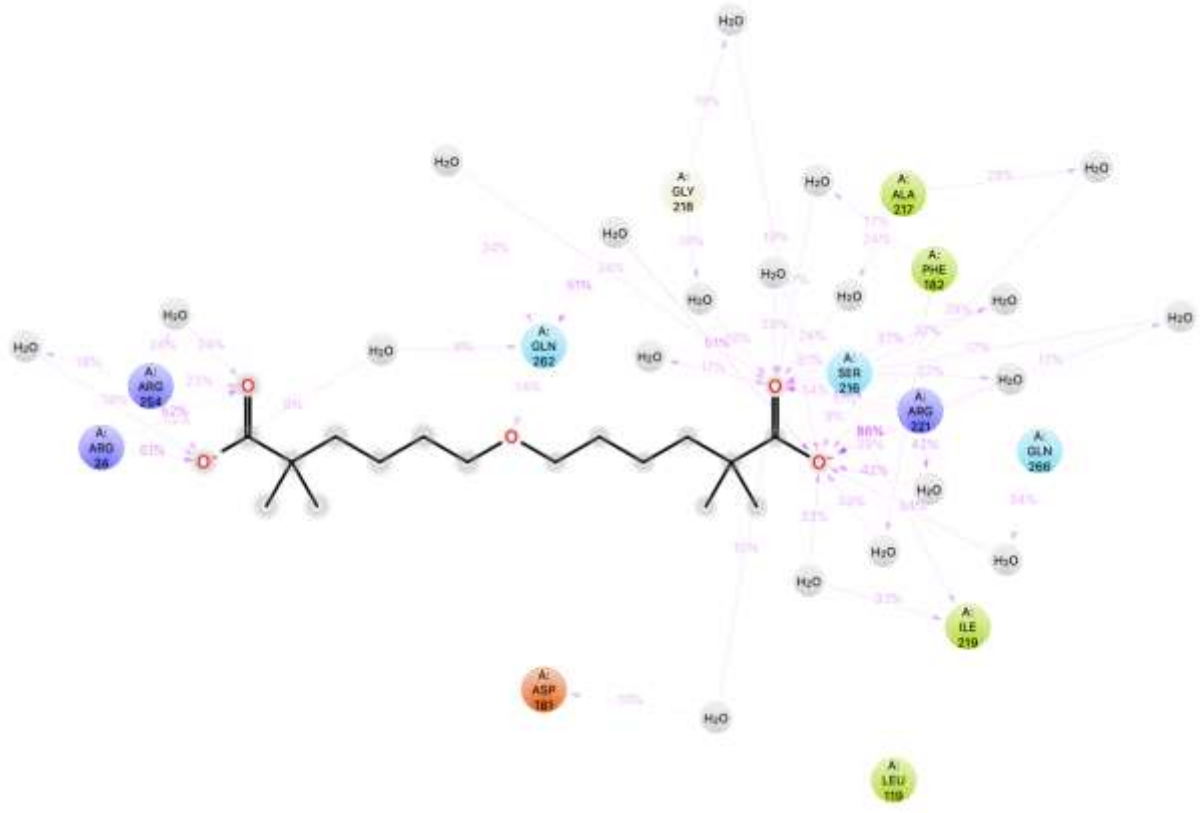
Şekil 30. PTP1B ile kompleks Gemcabene atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Ligand RMSF (Şekil 30), grafiğin üst panelinde verilen Gemcabene atomlarının dalgalanmalarını gösterdi. PTP1B ve Gemcabene'nin bağlanma olayında en çok 14 ve 15 atomlarında dalgalanma olduğu belirlendi.



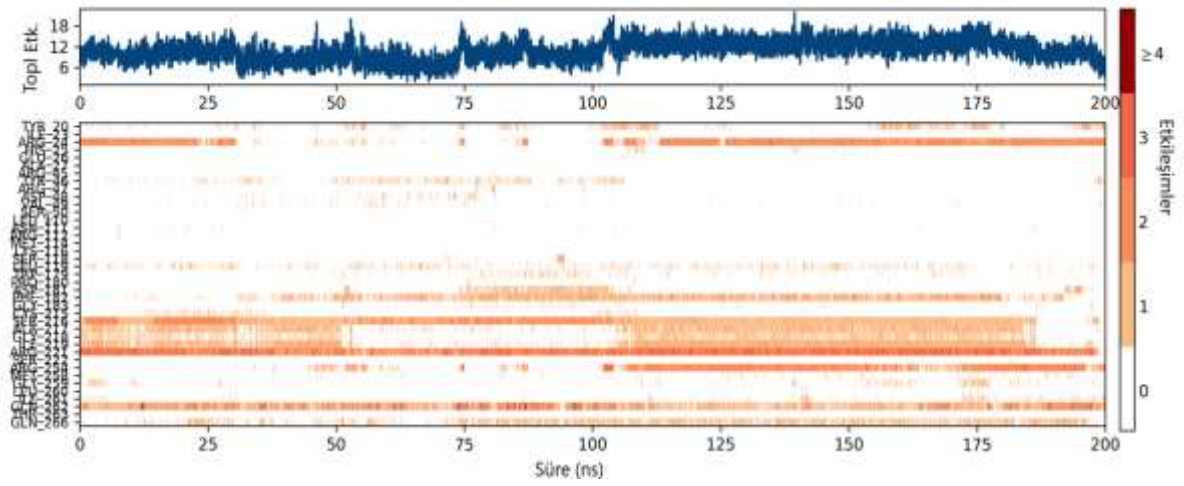
Şekil 31. PTP1B-Gemcabene kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'

Gemcabene ve PTP1B rezidüleri arasındaki etkileşimler hesaplandı ve Şekil 31'de gösterildi. Gemcabene'nin PTP1B'deki hidrojen bağı ile ilişkili olduğu rezidülerin, Arg24, Ser216, Arg221, Arg254 ve Gln262 rezidüleri ile olduğu belirlendi. Phe182, Ser216, Ala217, Ile219, Arg221 ve Gln262 rezidüleri ile oluşturulan su köprüleri de Gemcabene'nin proteine bağlanmasını desteklemiştir.



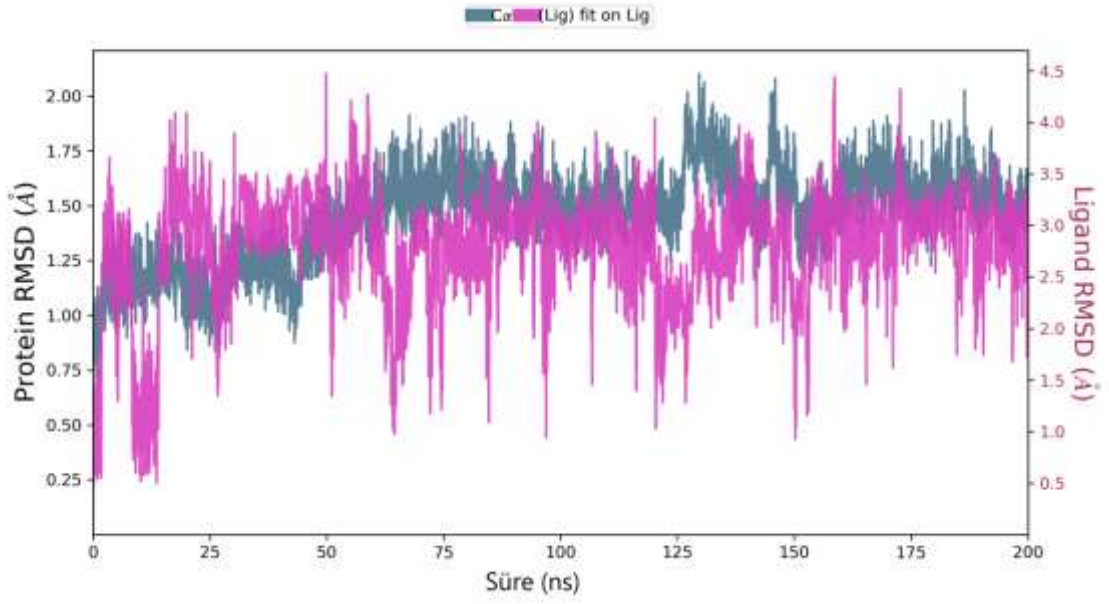
Şekil 32. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı Gemcabene atom etkileşimleri

200 ns boyunca simülasyon süresinin %8,0'dan fazlası için PTP1B ve Gemcabene arasındaki spesifik etkileşimleri Şekil 32'de gösterildi. Gemcabene'nin karboksilat gruplarından birinin aktif bölge rezidüleri ile etkileşime girdiği ve diğer karboksilat grubunun pTyr bağlanma bölge rezidüleri ile etkileşime girdiği gözlemlendi. Gemcabene ile hidrojen bağlarını aktif bölge rezidüleri Arg221 ve Ser216 rezidüleri ile sağladığı, simülasyon süresinin sırasıyla en az %86 ve %31'ü boyunca tutuldu. Gemcabene ile doğrudan temasların pTyr bağlanma bölgesi rezidüleri Arg24, Arg254 ve Gln262 rezidüleri ile sağlandığı, simülasyon süresinin sırasıyla en az %52, %23 ve %14'i boyunca tutuldu.



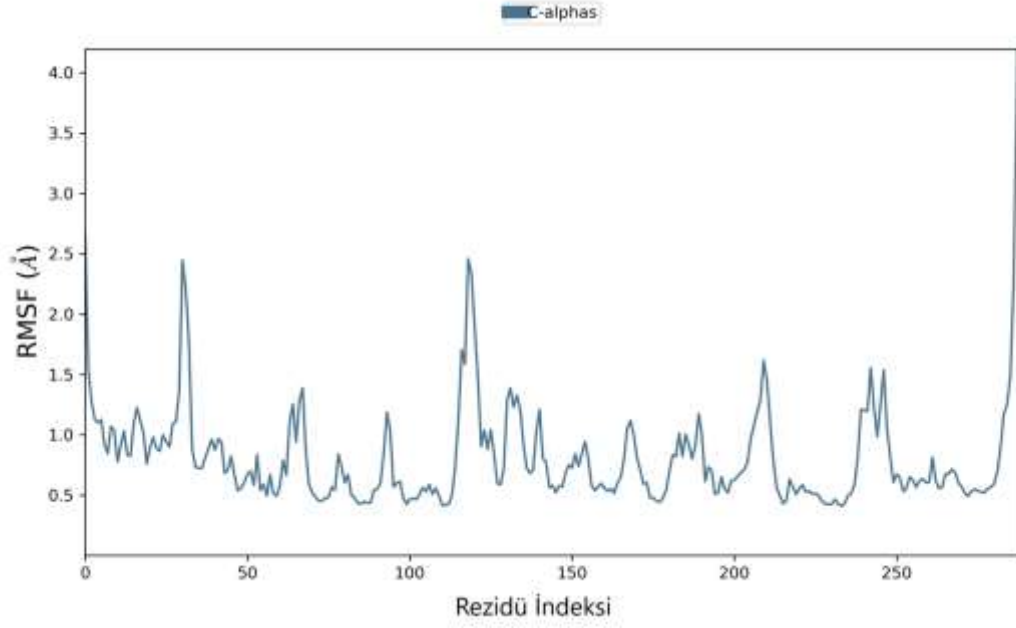
Şekil 33. PTP1B-Gemcabene kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi

Şekil 33, PTP1B-Gemcabene etkileşimlerinin bir zaman çizelgesinde, Gemcabene, PTP1B aktif bölge rezidülerinin (Ser216, Arg221) ve pTyr bağlanma yeri rezidüsünün (Gln262) simülasyon boyunca çoğunlukla etkileşime devam ettiği belirlendi. Arg 24 ve Arg254, pTyr bağlanma bölge rezidülerinin simülasyonun 100-130 ns periyodunda Gemcabene atomları ile etkileşime girdiği belirlendi. Ayrıca farklı zamanlarda kısa süreli etkileşimleri Arg24 ve Arg 254 rezidüleri oluşturdu.



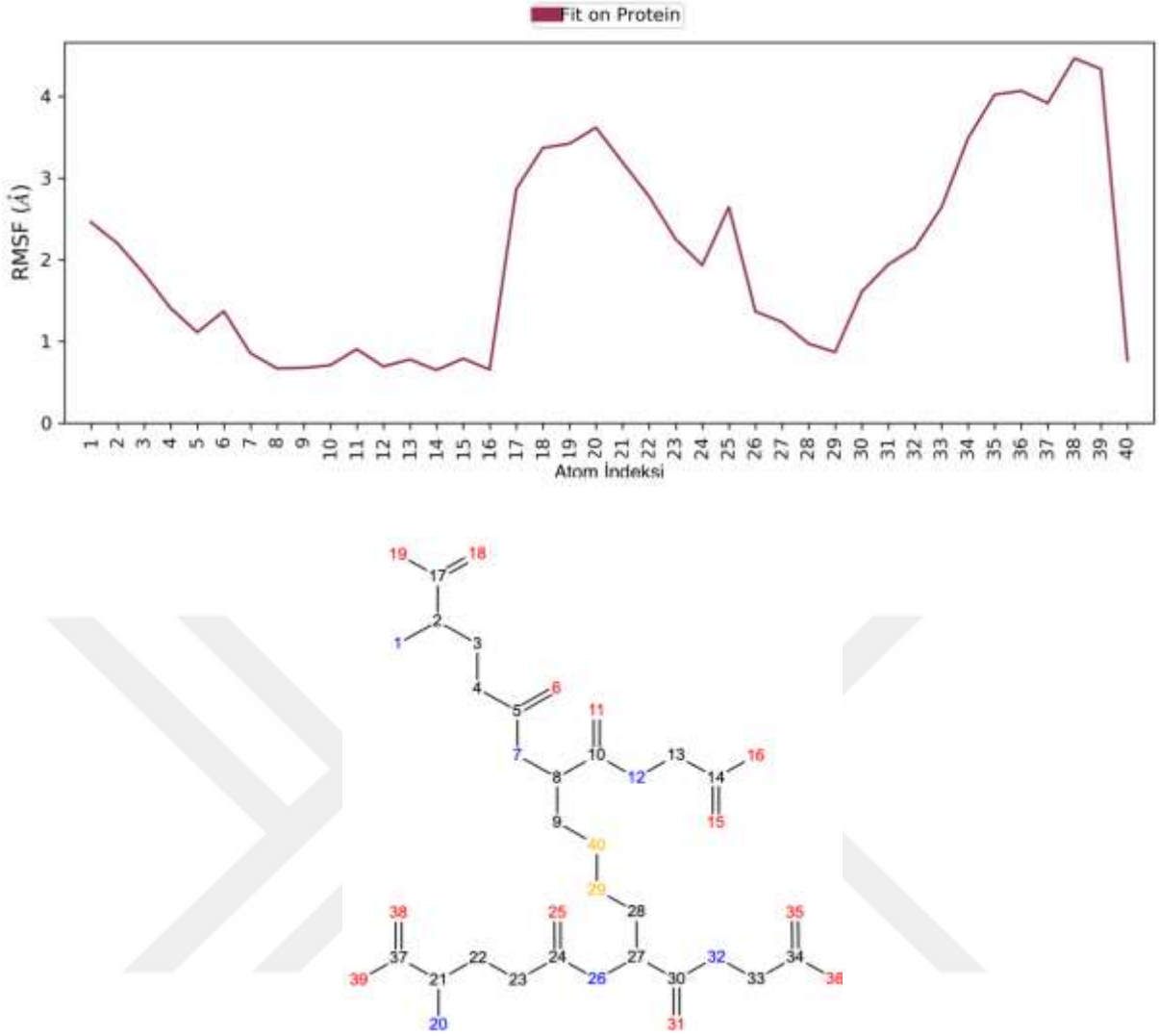
Şekil 34. PTP1B-Glutatyon disülfid kompleksinin C α ve Glutatyon disülfid atomlarının RMSD-zaman grafiği

Şekil 34'de verilen Glutatyon disülfid-PTP1B kompleksinin 1-200 ns simülasyonu boyunca belirlenen protein omurgasının RMSD'si, orijinal yapıya kıyasla 0,72 Å ile 1,96 Å arasındaydı. Ayrıca, Glutatyon disülfidin RMSD'si 0,54 Å ile 4,47 Å arasındaydı.



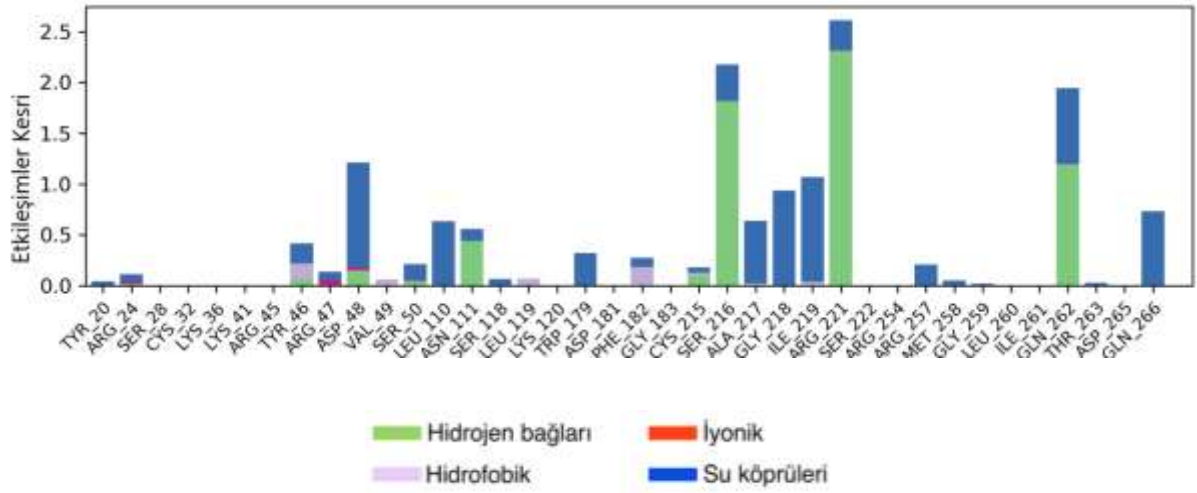
Şekil 35. PTP1B-Glutatyon disülfid kompleksinin C α atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Şekil 35'deki glutatyon disülfid RMSF grafiği, Ala 27 ve Lys116 rezidülerinin diğer rezidülere kıyasla en hareketli kısım olduğunu ve N-C-terminallerinin en hareketli protein parçaları olduğunu gösterdi.



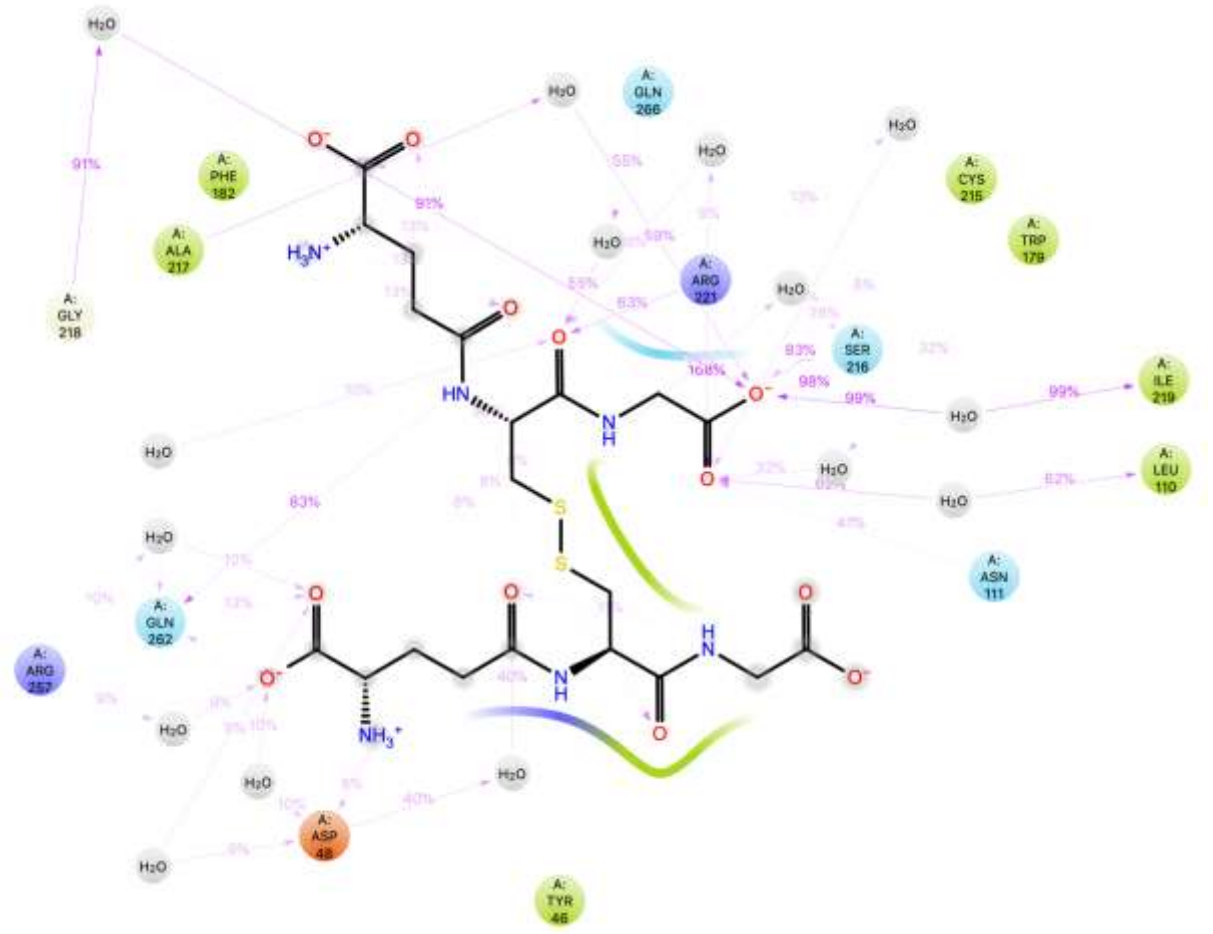
Şekil 36. PTP1B ile kompleks Glutasyon disülfid atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Grafiğin üst panelinde verilen Glutasyon disülfid atomlarının dalgalanmalarını gösteren Ligand RMSF (Şekil 36), simülasyon sırasında PTP1B ve Glutasyon disülfid bağlanma olayında en fazla 38 ve 39 atomda dalgalanmalar sunmaktadır.



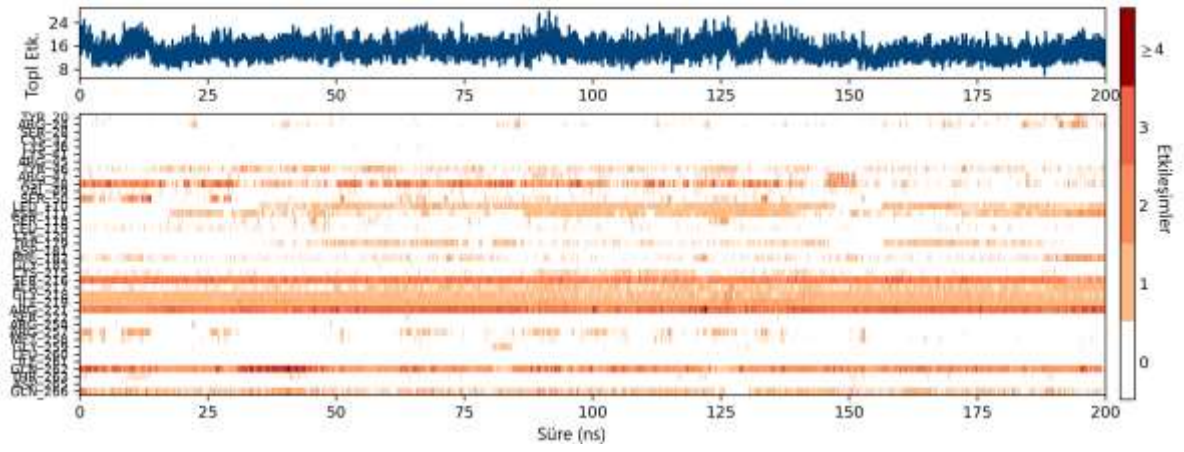
Şekil 37. PTP1B- Glutasyon disülfid kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'

Glutasyon disülfid ve PTP1B rezidüleri arasındaki etkileşimler hesaplandı ve Şekil 37'de gösterildi. Glutasyon disülfidin, PTP1B'deki Tyr46, Asp48, Asn111, Cys215, Ser216, Arg221 ve Gln262 rezidüleri ile hidrojen bağı yoluyla etkileşime girdiği belirlendi. Asp48, Leu110, Ala217, Gly218, Ile219, Arg221, Gln262 ve Gln266 rezidüleri ile oluşturulan su köprüleri de Glutasyon disülfidin proteine bağlanmasını desteklemiştir.



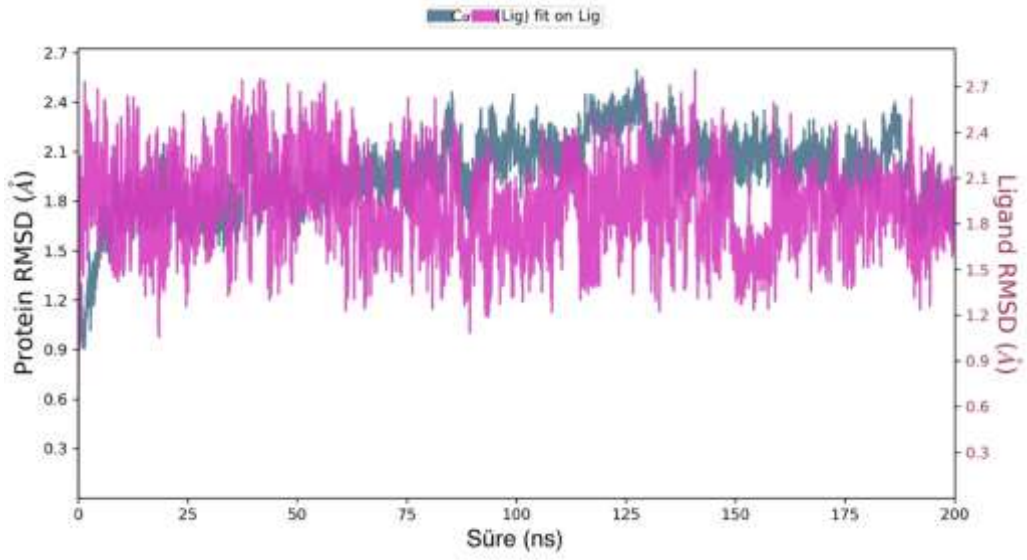
Şekil 38. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı Glutasyon disülfid atom etkileşimleri

200 ns boyunca simülasyon süresinin %8,0'dan fazlası için PTP1B ve Glutasyon disülfid arasındaki spesifik etkileşimleri Şekil 38'de gösterildi. Glutasyon disülfid ile hidrojen bağlarını aktif bölge rezidüleri Arg221, Ser216 ile sağladığı, simülasyon süresinin sırasıyla en az %168 ve %98'i boyunca devam etti. Glutasyon disülfid, PTP1B pTyr bağlanma yeri rezidüleri Gln262 ile hidrojen bağları oluşturdu ve bu hidrojen bağları simülasyon süresinin en az %83'ü boyunca tutuldu.



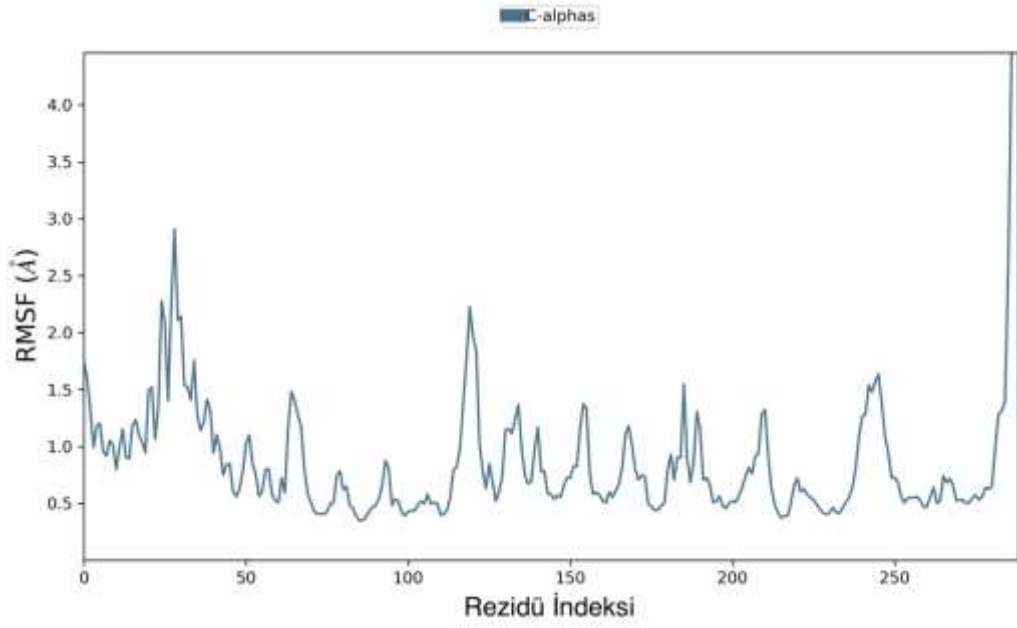
Şekil 39. PTP1B-Glutatyon disülfid kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi

(Şekil 39), PTP1B-Glutatyon disülfid etkileşimlerinin bir zaman çizelgesi, Glutatyondisülfid'in PTP1B aktif bölge rezidüleri (Ser216, Arg221) ve pTyr bağlanma bölgesi rezidüsü (Gln262) ile etkileşime girdiğini, çoğunlukla simülasyon boyunca etkileşime devam ettiğini göstermiştir. Ayrıca simülasyon boyunca Arg 24 ve Arg254'ün etkileşimleri ihmal edilebilir düzeyde olduğu görüldü.



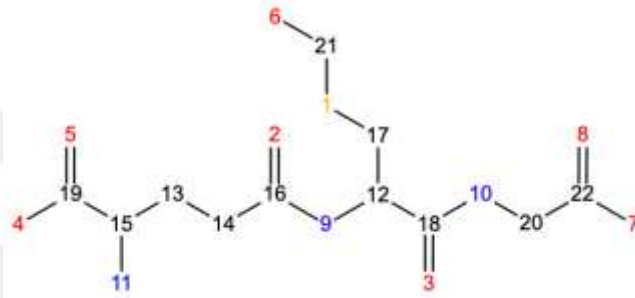
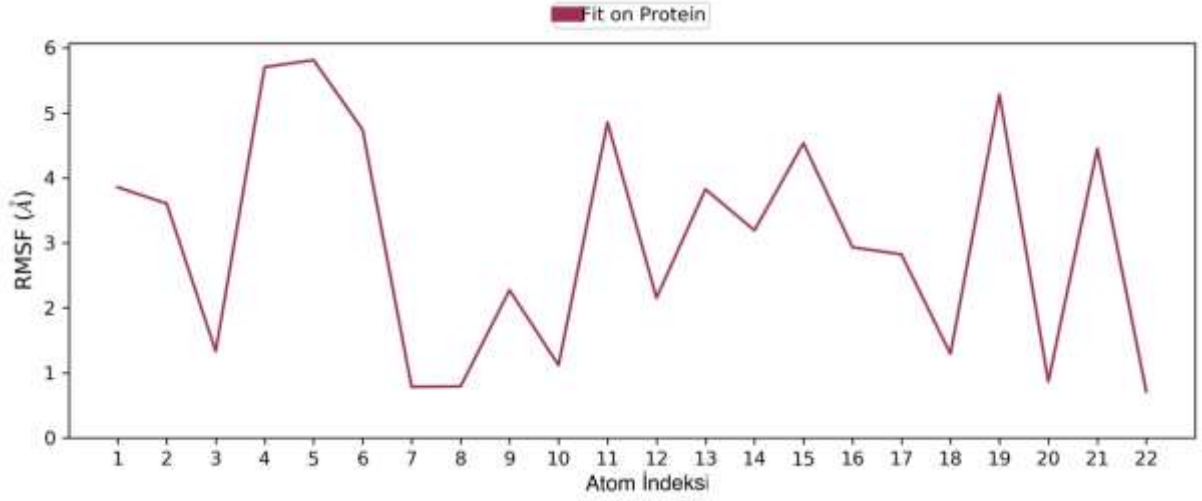
Şekil 40. PTP1B- LJP 1082 kompleksinin $C\alpha$ ve LJP 1082 atomlarının RMSD-zaman grafiği

Şekil 40'da verilen LJP 1082-PTP1B kompleksinin 1-200 ns simülasyonu boyunca belirlenen protein omurgasının RMSD'si, orijinal yapıya kıyasla 0,79 Å ila 2,50 Å arasındaydı. Ayrıca, LJP 1082' nin RMSD'si 0,73 Å ila 2,80 Å arasında olduğu tespit edildi. Aralıkların 3,0 Å olarak tahmin edilen eşiğin üst sınırı içinde olduğu belirlendi.



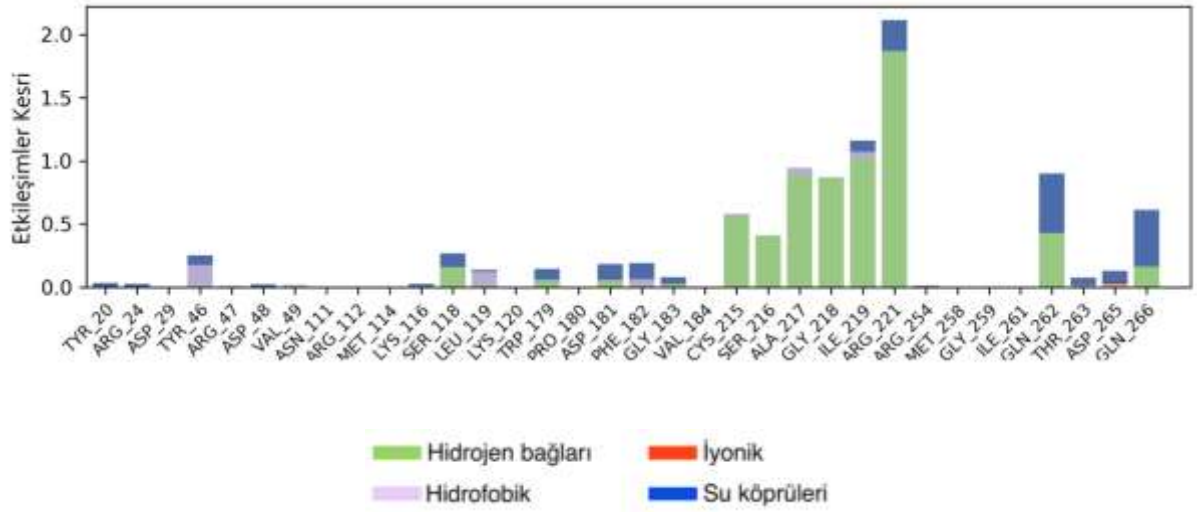
Şekil 41. PTP1B- LJP 1082 kompleksinin C α atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Şekil 41'deki LJP 1082 RMSF grafiği, Lys116 ve His25 rezidülerinin diğer rezidüleriye kıyasla en hareketli kısım olduğunu ve N-C-terminallerinin en hareketli protein kısımları olduğunu gösterdi.



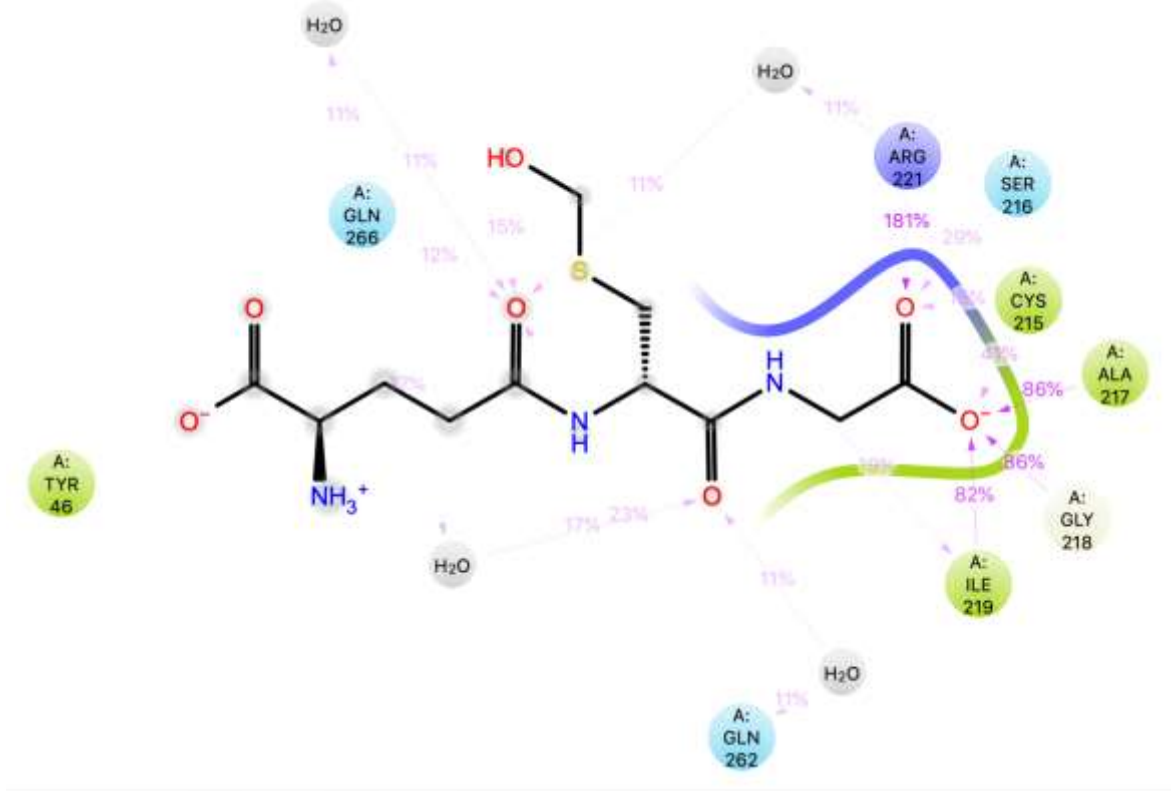
Şekil 42. PTP1B ile kompleks LJP 1082 atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Grafiğin üst panelinde verilen LJP 1082 atomlarının dalgalanmalarını gösteren Ligand RMSF (Şekil 42), simülasyon sırasında PTP1B ve LJP 1082'nin bağlanma olayında en fazla 4 ve 5 atomda dalgalanmalar sunmaktadır.



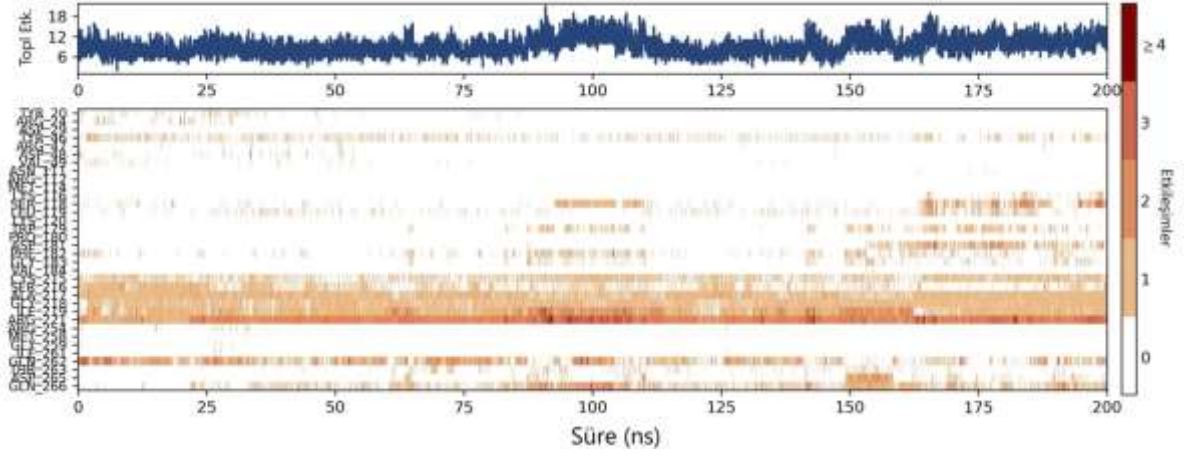
Şekil 43. PTP1B-LJP 1082 kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'

LJP 1082 ve PTP1B rezidüleri arasındaki etkileşimler hesaplandı ve Şekil 43'de gösterildi. LJP 1082'nin hidrojen bağı ile PTP1B'deki Ser118, Cys215, Ser216, Ala 217, Gly218, Ile219, Arg221, Gln262 ve Gln266 rezidüleri ile ilişkili olduğu belirlendi. Arg221, Gln262 ve Gln266 rezidüleri ile oluşturulan su köprüleri de LJP 1082' nin proteine bağlanmasını destekledi.



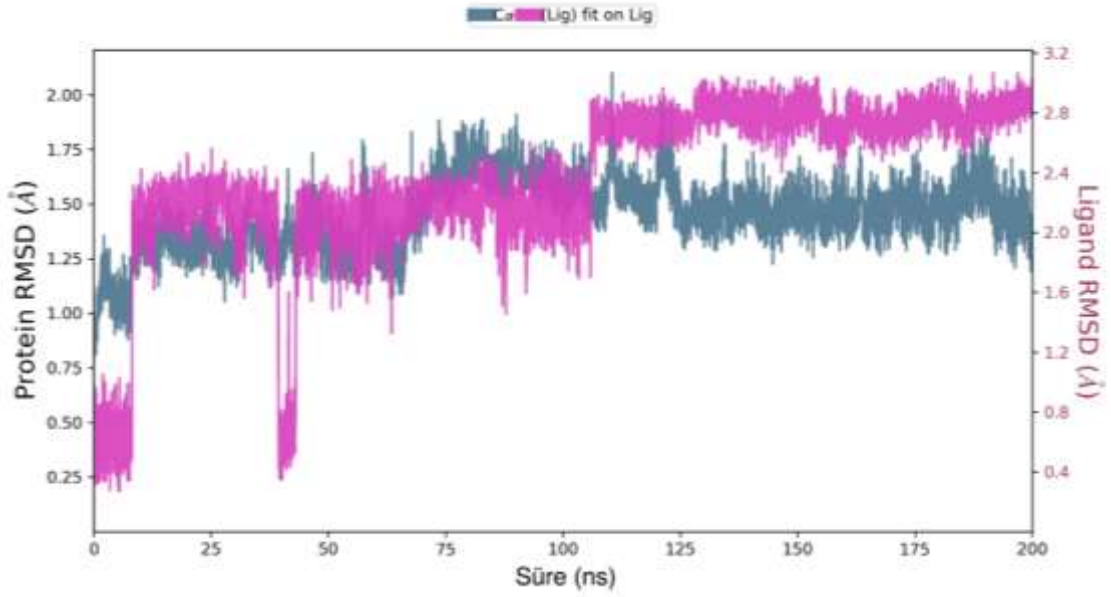
Şekil 44. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı LJP 1082 atom etkileşimleri

200 ns boyunca simülasyon süresinin %8,0'dan fazlası için PTP1B ve LJP 1082 arasındaki spesifik etkileşimleri gösterir. LJP 1082, hidrojen bağlarını aktif bölge rezidüleri olan Arg221, Ser216 ile yaptığını, simülasyon süresinin sırasıyla en az %181 ve %29'ü boyunca tutuldu. LJP 1082, PTP1B pTyr bağlanma yeri rezidüsü Gln262 ile temaslar oluşturdu ve bu temaslar simülasyon süresinin en az %23 boyunca tutuldu.



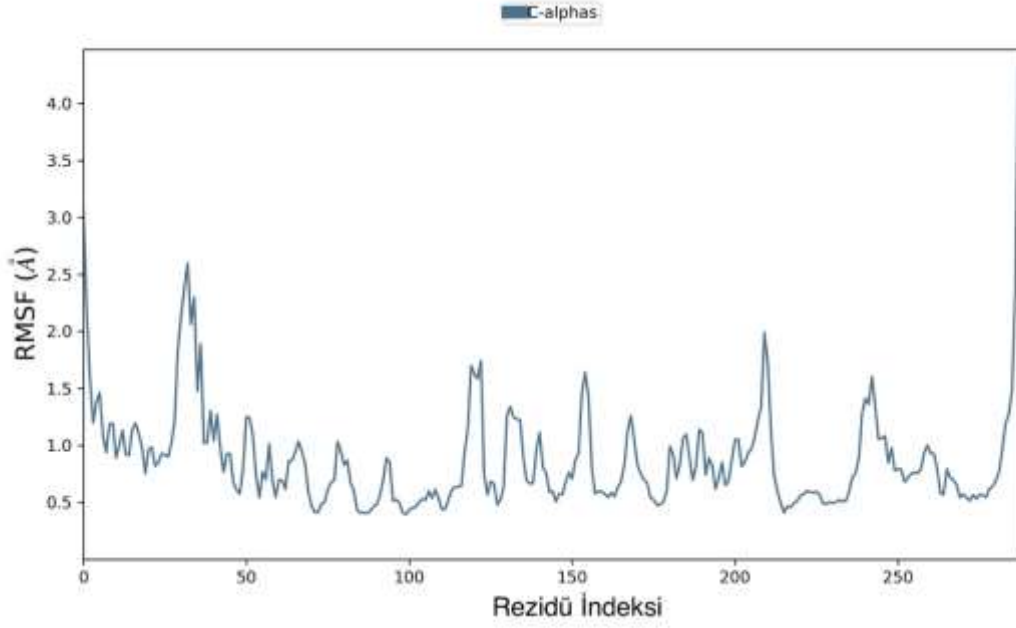
Şekil 45 PTP1B-LJP 1082 kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi

(Şekil 45), PTP1B-LJP 1082 etkileşimlerinin bir zaman çizelgesi, LJP 1082'nin PTP1B aktif bölge rezidüleri (Ser216, Arg221) ile etkileşime girdiğini ve pTyr bağlanma bölgesi rezidüsünün (Gln262) çoğunlukla sadece simülasyon boyunca etkileşime devam ettiğini göstermiştir. Ayrıca farklı zamanlarda Arg24 rezidüsünün kısa süreli etkileşimler oluşturduğu tespit edildi.



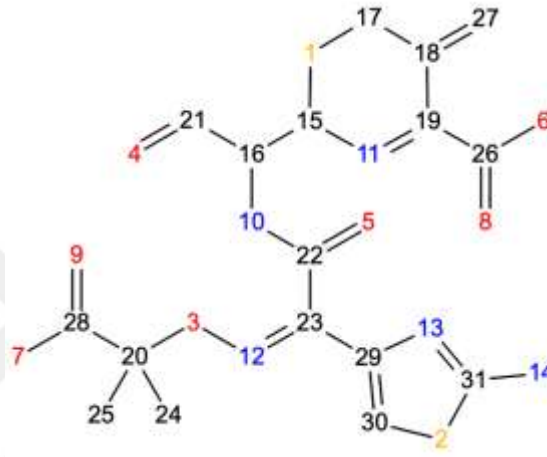
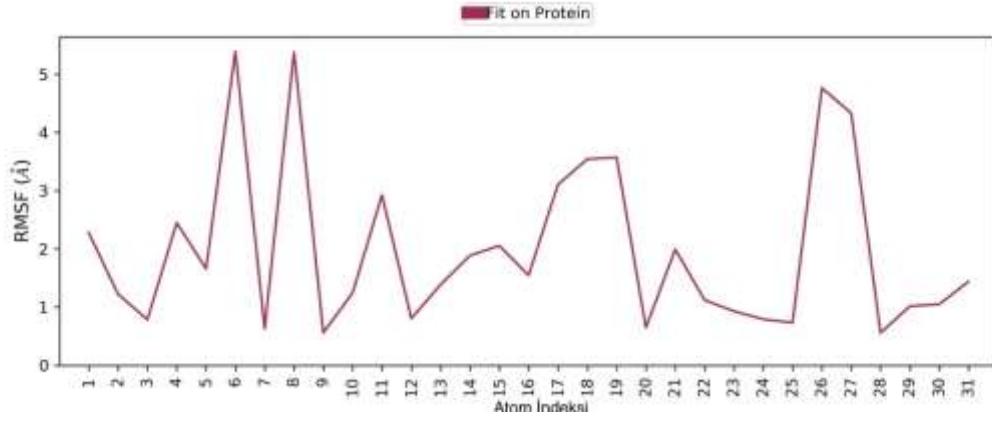
Şekil 46 PTP1B- Ceftazidime kompleksinin Ca ve Ceftazidime atomlarının RMSD-zaman grafiği

Şekil 46'da verilen Ceftazidim -PTP1B kompleksinin 1-200 ns simülasyonu sırasında belirlenen protein omurgası RMSD, orijinal yapıya kıyasla 0,82 Å ila 1,95 Å arasında değişmektedir. Ayrıca, Ceftazidime'nin RMSD'si 0,38 Å ila 2,94 Å arasında olduğu belirlendi. Aralıkların 3,0 Å olarak tahmin edilen eşik üst sınırı içinde olduğu belirlendi.



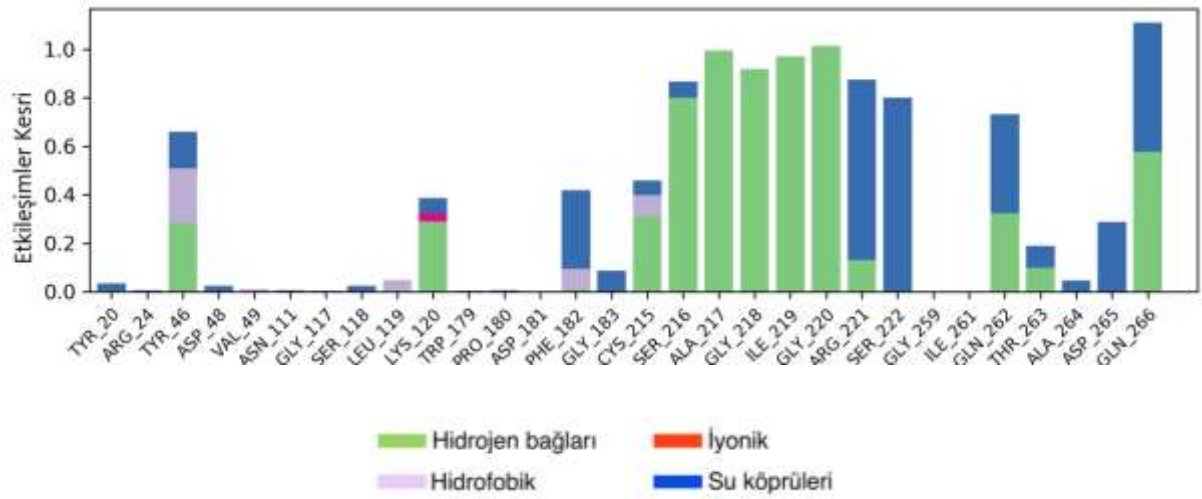
Şekil 47. PTP1B-Ceftazidime kompleksinin Cα atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Şekil 47'deki Ceftazidime'nin RMSF grafiğinde Asp29'un rezidüsünün diğer rezidülere kıyasla en hareketli kısım olduğunu ve N-C-terminallerinin en hareketli protein parçaları olduğunu gösterdi.



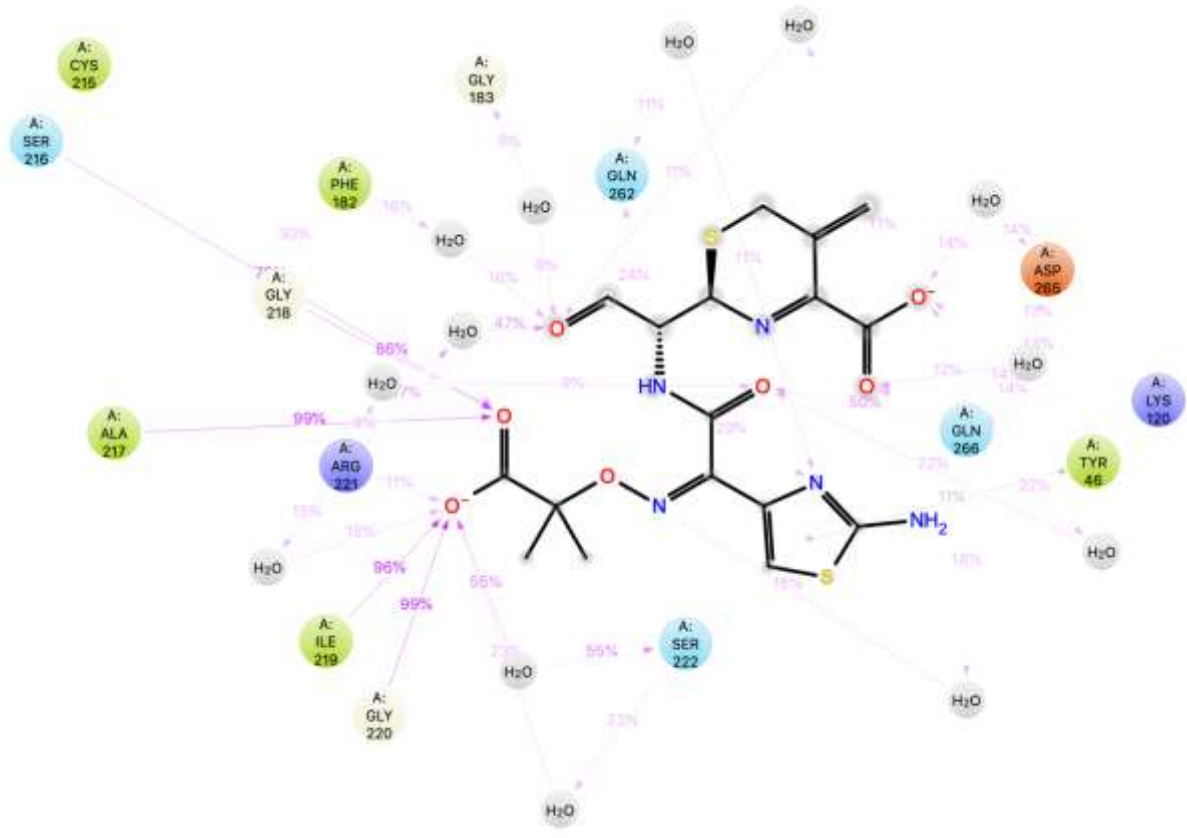
Şekil 48. PTP1B ile kompleks Ceftazidime atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Grafiğin üst panelinde verilen Ceftazidime atomlarının dalgalanmalarını gösteren Ligand RMSF (Şekil 48), simülasyon sırasında PTP1B ve Ceftazidim'in bağlanma olayında en fazla 6 ve 8 atomlarında dalgalanmalar olduğunu sunmaktadır.



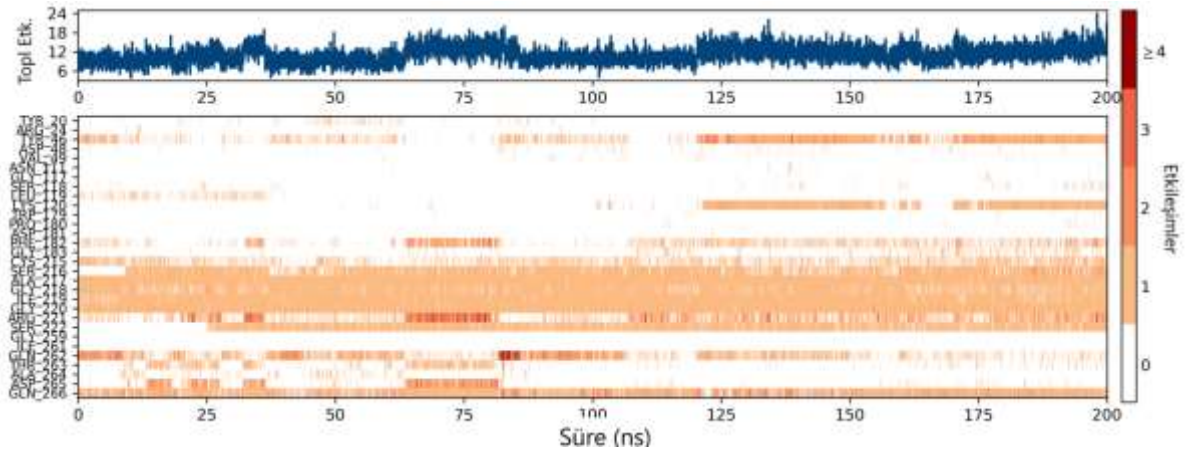
Şekil 49. PTP1B-Ceftazidime kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'

Ceftazidime ve PTP1B rezidüleri arasındaki etkileşimler hesaplandı ve Şekil 49'da gösterildi. Ceftazidime 'nin PTP1B'de Tyr46, Lys120, Cys215, Ser216, Ala 217, Gly218, Ile219, Gly220, Arg221, Gln262, Thr263 ve Gln266 rezidüleri ile hidrojen bağı ile ilişkili olduğu belirlendi. Arg221, Ser222, Gln262 ve Gln266 rezidüleri ile oluşturulan su köprüleri de Ceftazidime'nin proteine bağlanmasını desteklemiştir.



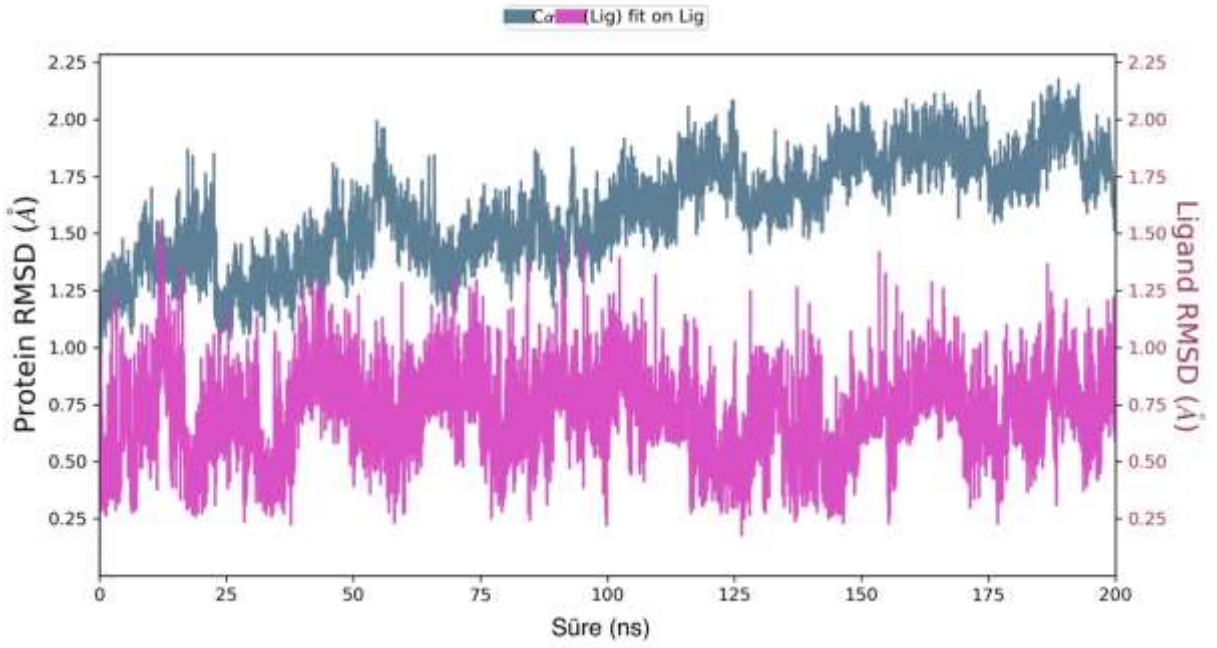
Şekil 50. PTP1B rezidüleri ile ayrıntılı Ceftazidime atom etkileşimleri

200 ns boyunca simülasyon süresinin %8,0'dan fazlası için PTP1B ve Ceftazidime arasındaki spesifik etkileşimleri Şekil 50'de verildi. Ceftazidime, hidrojen bağlarını aktif bölge rezidüleri olan Arg221, Ser216 rezidüleri ile yaptığı, simülasyon süresinin sırasıyla en az %11 ve %78'i boyunca tutuldu. Ceftazidime'nin PTP1B pTyr bağlanma yeri rezidüsü Gln262 ile temaslar oluşturduğu ve bu temasların simülasyon süresinin en az %24'ü boyunca muhafaza edildiği belirlendi.



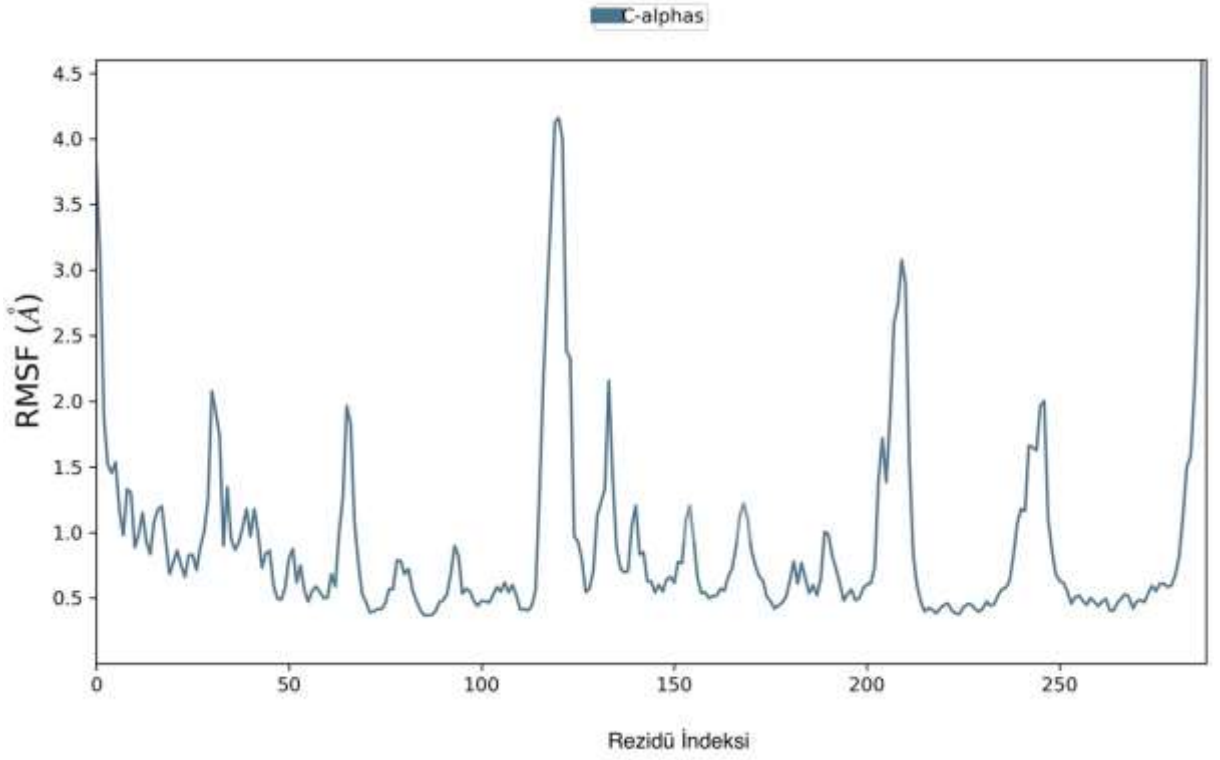
Şekil 51. PTP1B-Ceftazidime kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi

(Şekil 51)'de, PTP1B-Ceftazidim etkileşimlerinin bir zaman çizelgesi, Ceftazidimin pTyr bağlanma bölgesi rezidüsü (Gln262) ile etkileşime girdiğini, simülasyon boyunca çoğunlukla etkileşime devam ettiğini göstermiştir.



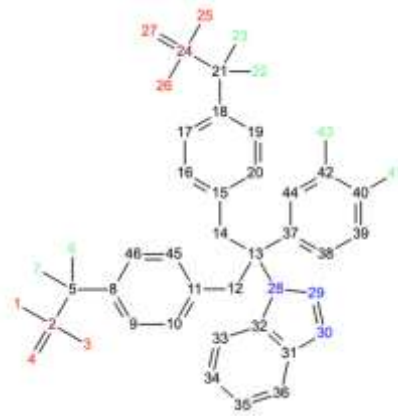
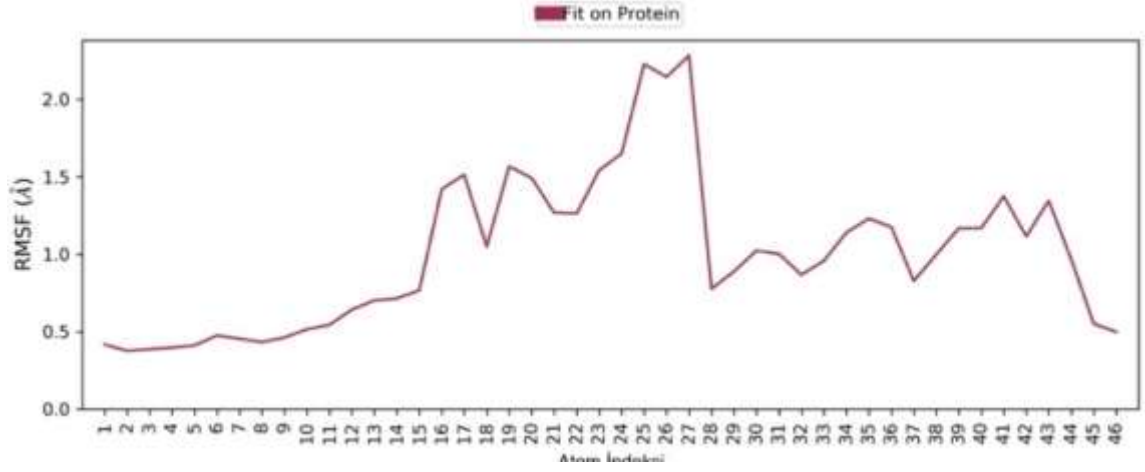
Şekil 52. PTP1B-Referans kompleksinin Cα ve Referans atomlarının RMSD-zaman grafiği

Şekil 52'de verilen (referans ilaç) DB02651-PTP1B kompleksinin 1-200 ns simülasyonu boyunca belirlenen protein omurgasının RMSD'si, orijinal yapıya kıyasla 0,91 Å ile 2,15 Å, DB02651'in RMSD'si 0,18 Å ile 1,56 Å arasında değiştiği belirlendi. Aralıkların 3,0 Å olarak tahmin edilen eşik üst sınırı içinde olduğu belirlendi.



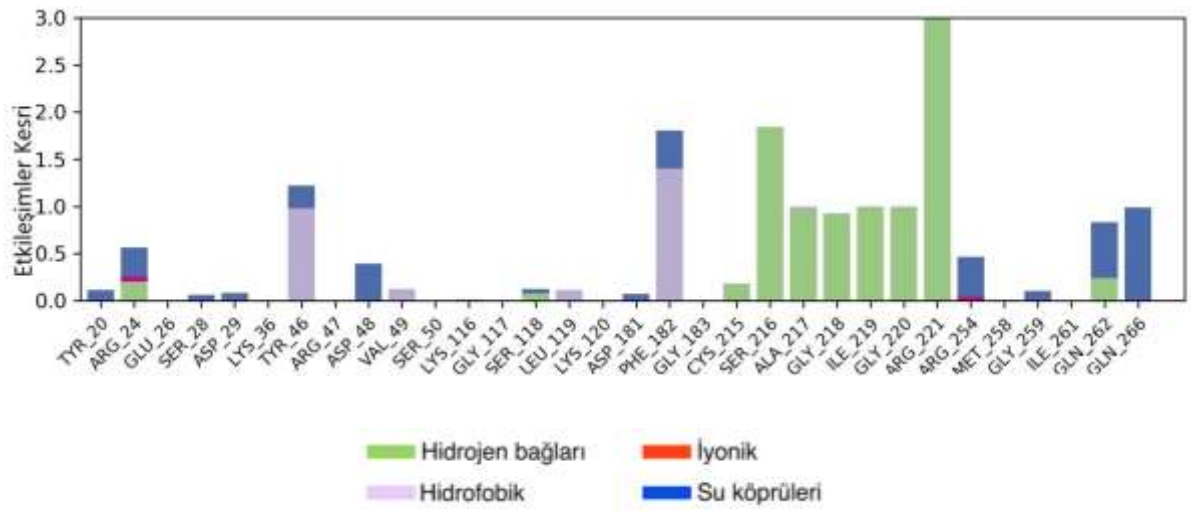
Şekil 53. PTP1B-Referans kompleksinin C α atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Şekil 53'deki DB02651 RMSF grafiği, Lys116 ve Gly117 rezidülerinin diğer rezidülerle kıyasla en hareketli kısım olduğunu ve N-C-terminallerinin en hareketli protein parçaları olduğunu gösterdi.



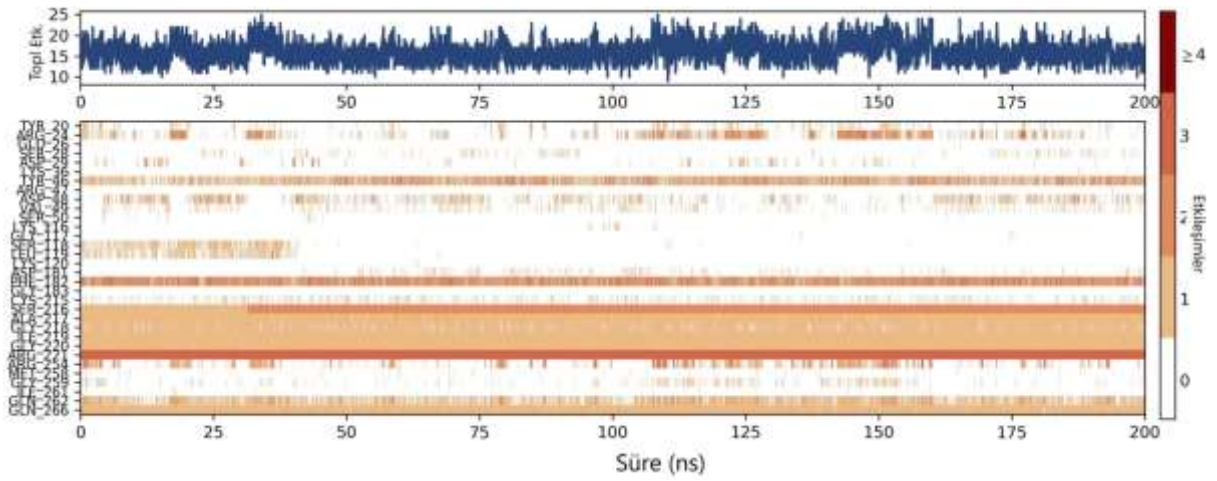
Şekil 54. PTP1B ile kompleks Referans atomlarının 200 ns için RMSF grafiği

Grafiğin üst panelinde verilen DB02651 atomlarının dalgalanmalarını gösteren RMSF (Şekil 54), simülasyon sırasında PTP1B ve DB02651'in bağlanma olayında en fazla 25, 26 ve 27 atomda dalgalanmalar sunmaktadır.



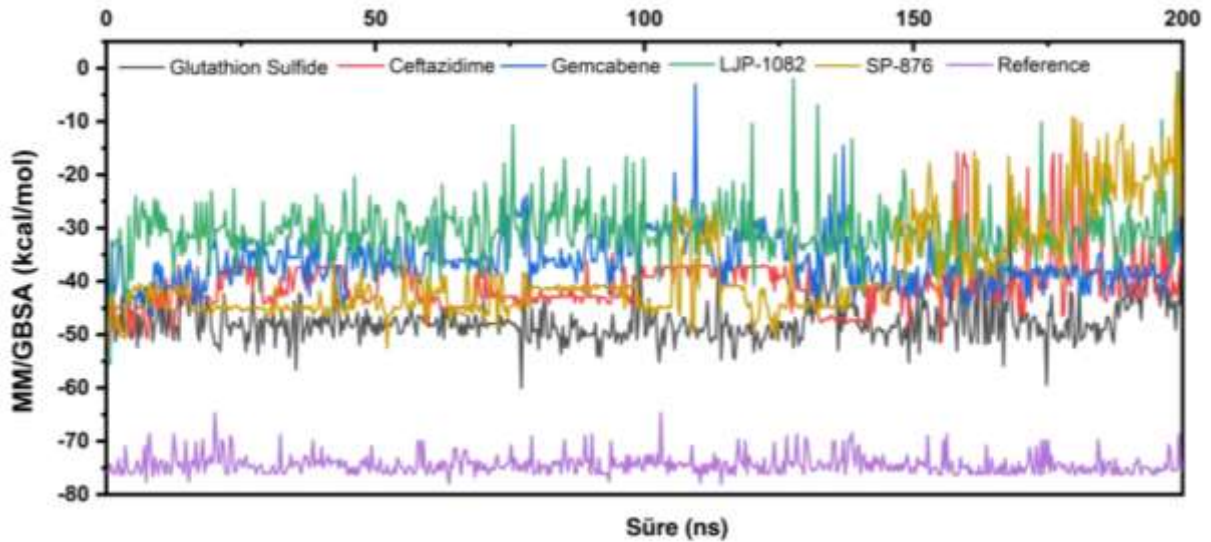
Şekil 55. PTP1B-Referans kompleksinin 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması'

DB02651 ve PTP1B rezidüleri arasındaki etkileşimler hesaplandı ve Şekil 55'de temsil edildi. DB02651'in PTP1B'de Arg24, Cys215, Ser216, Ala 217, Gly218, Ile219, Gly220, Arg221 ve Gln262 rezidüleri ile hidrojen bağı ile etkileşime girdiği belirlendi. Su köprülerini ise Phe182, Gln262 ve Gln266 rezidüleri ile oluşturularak DB02651'in proteine bağlanmasını destekledi.



Şekil 57. PTP1B-Referans kompleksinin MD simülasyonları boyunca etkileşimlerinin ve temaslarının zaman çizelgesi

(Şekil 57)'de, PTP1B-DB02651 etkileşimlerinin bir zaman çizelgesi, DB02651'in pTyr bağlanma yeri rezidüsü (Gln262) ile etkileşime girdiğini, simülasyon boyunca çoğunlukla etkileşime devam ettiğini göstermiştir. Arg24 ve Arg254'ün farklı zamanlarda kısa süreli etkileşimler oluşturduğu belirlendi. Ayrıca bu ilaçlar tablo 5'te sunulan TCPTP hedefine karşı belirlenen hedef ilaçlar arasında yer almamaktadır. Bu sonuç da beş hedef ilacın seçici olabileceğini göstermektedir.



Şekil 58. Hedef İlaçlarının ve Referansın MM/GBSA Skorları

Kararlı modellerin simülasyon çerçeveleri üzerinde MM-GBSA analizine dayalı serbest enerji hesaplama çalışmaları yapıldı. Şekil 58'de görüldüğü gibi, bu analize dayalı olarak referans ilaç en düşük enerji değerini $-74,4 \pm 1,9$ kcal/mol ile sunarken, bunu $-47,5 \pm 3,7$ kcal/mol ile Glutathion disülfid, $-40,6 \pm 4,9$ kcal/mol ile Ceftazidime, $-38,6 \pm 8,8$ kcal/mol ile SP-

876, $-36,3 \pm 4,7$ kcal/mol ile Gemcabene ve $-30,3 \pm 5,4$ kcal/mol ile LJP 1082 izlediği tespit edildi.

SP-876, organik bileşikler sınıfında olup, bir peptit bağıyla bağlanmış en az iki farklı tipte amino asit içeren, hibrit peptitler olarak tanımlanmıştır (Overington *et al.* 2006; Imming *et al.* 2006). Aynı zamanda DNA biyosentezi için tek *de novo* dTMP kaynağı sunan timidilat sentez proteinini de hedefler (Erlanson *et al.* 2000).

Gemcabene orta zincirli bir yağ asidi yapısıdır. İlaç, trigliseritleri azaltan, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü düşüren ve yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterolü yükselten bir ilaç olup, ayrıca hiperlipidemi, ateroskleroz ve kardiyovasküler gibi bozuklukların tedavisi için araştırılan bir ilaçtır (Mandema *et al.* 2005; Bays *et al.* 2003).

Glutasyon disülfür, peptitler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına ait olup, iki veya daha fazla amino karboksilik asit molekülünden birinin karbonil karbonundan diğerinin azot atomuna kovalent bir bağ oluşturarak türetilen bir amid içeren bir ilaçtır. Ayrıca bu ilaç Faz 2 denemeleri tamamlanmış olup, yumurtalık ve meme kanseri tedavisi için kullanıldığı tespit edilmiştir (Montero *et al.* 2012).

LJP 1082, oligopeptitler olarak tanımlanan organik bileşikler sınıfına ait olup ayrıca beta 2-glikoprotein I'e karşı antikorlar oluşturan B hücrelerini kapatmak için bir Toleragendir. Derin ven trombozu, felç ve antikor aracılı tromboz tedavisi için LJP 1082 denenmektedir (Cockerill *et al.* 2004; Bayes *et al.* 2003).

Ceftazidime, bir beta-laktam antibiyotiği olup ayrıca zatürree, jinekolojik enfeksiyonlar, kemik ve eklem enfeksiyonları ve septisemiye içeren bakteriyel enfeksiyonların çeşitliliğini önlemek veya tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ceftazidime FDA tarafından onaylanmıştır ve şu anda çeşitli bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için tek başına veya avibaktam ile kombinasyon halinde elde edilebilmektedir (Shirley 2018).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Protein tirozin fosfatazlar (PTP'ler), çok sayıda önemli biyolojik ve patolojik olayda yer alan defosforilasyon süreçlerini düzenleyen bir fonksiyonel enzim sınıfıdır. Bu süper aile arasında, protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B); insülin ve leptin reseptörlerinin defosforilasyonundan sorumludur. Ayrıca PTP1B, insülin ve leptin reseptörünün aracılık ettiği sinyal yollarının negatif düzenleyicisi olarak hareket edip vücut ağırlığı, glukoz homeostazı ve enerji tüketimini düzenlemede önemli bir role sahiptir. Anormal tirozin fosforilasyonu durumunda ise kanser, diyabet, romatoid artrit, hipertansiyon, kalp-damar ve alzheimer dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Fakat T hücresi aktivasyonunu düzenlemede rol oynayan bir fosfataz olan TCPTP eksikliğinde ise farelerde, B-hücresi ve T-hücresinin bozulduğu görülmüş ve bu da TCPTP'nin hem hematopoezde hem de bağışıklık sisteminde işlevsel olduğunu göstermiştir. Ayrıca kasa spesifik TCPTP eksikliği olan farelerin, insülin sinyallemede hiçbir değişiklik göstermediği ve yüksek yağlı bir diyetin neden olduğu insülin direncinde hiçbir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, katalitik alandaki %74 amino asit sekans benzerliği olmasına rağmen, PTP1B ve TCPTP proteinlerinin açıkça farklı biyolojik fonksiyonlar yerine getirdiğini göstermiştir. Dolayısıyla yapılan çalışmalardan TCPTP'nin fizyolojik fonksiyonunun PTP1B'den tamamen farklı ve PTP1B inhibitörlerinin TCPTP üzerinde yeterli seçiciliğe sahip olmaları için sıkı bir gereklilik olduğu sonucuna varılmıştır.

Bilindiği üzere ilaç keşfi, zaman alıcı ve zorlu bir süreçtir. Hesaplamalı stratejiler, harcanan zamanı, maliyeti azaltmaya ve onaylanmış veya araştırma aşamasındaki ilaçların orijinal tıbbi endikasyonlarının dışında kalan yeni kullanımlarını belirlenmesine yardımcı olur (Pushpakom *et al* 2019). Bu amaçla tezde, insan PTP1B'nin yeni ve seçici inhibitörlerini tanımlamak için hem aktif bölge hem de ikinci pTyr bağlama bölgesinin tanınmasını sağlayan bidentat inhibisyon stratejisine dayanan sanal tarama metodu kullanıldı. PTP1B proteinine karşı ilgisi en yüksek TCPTP proteinine karşı en düşük olan ilaçlar tespit edildi.

DrugBank veritabanında bulunan potansiyel olarak seçici ve PTP1B'ye karşı güçlü olan otuz altı ilacı belirlemek için moleküler dokinge dayalı yapı tabanlı sanal tarama kullanıldı. Seçici PTP1B inhibitörleri hedeflendiğinden, seçiciliği sağlayan pTyr bağlanma bölge rezidüleri dikkate alınarak otuz altı bileşik içerisinde beş hedef bileşik belirlendi. Ek olarak, PTP1B ile ilk beş hedef bileşiklerin ve referans ilaç (DB02651) komplekslerinin

bütünlüğünü ve stabilitesini incelemek için moleküler dinamik simülasyonlar gerçekleştirildi. 200 ns'lik bu simülasyonlar sırasında komplekslerin konformasyonel değişikliklerinin az olduğu ve iyi stabilite gösterdikleri belirlendi. Tüm sonuçlar ayrıntılı analiz edildiğinde SP-876, Gemcabene, Glutasyon disülfid, LJP 1082 ve Ceftazidime'in aktif bölge boşluğuna yerleştiğini ve ayrıca seçicilik sağlayan pTyr bağlanma bölgesi rezidüleri (Arg24, Arg254 ve Gln262) ile etkileşime girdikleri belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışma hesaplamalı olarak belirlenen bu dört hedef ilaçların (deneysel, araştırma ve onaylanmış) potansiyel seçici inhibitörler olabileceğini ve diyabet ve kanser tedavisi için yararlı olabileceğini göstermektedir. Bu hedef ilaçların PTP1B'ye karşı inhibe edici aktivitesini belirlemek için *in vitro* ve *in vivo* deneyler yoluyla araştırma çalışmaları dizayn edilecektir. Ayrıca seçiciliğin ve etkinliğin artırılması için bu ilaçların öncül bileşikler olarak kabul edilip türevlendirilmeleri planlanabilir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, F., Li, P. M., Meyerovitch, J., & Goldstein, B. J., 1995. Osmotic loading of neutralizing antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative regulation of the insulin action pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20503-20508.
- Allemani, C., Weir, H. K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X. S., ... & CONCORD Working Group., 2015. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*, 385(9972), 977-1010.
- Ala, P. J., Gonneville, L., Hillman, M., Becker-Pasha, M., Yue, E. W., Douty, B., ... & Wynn, R., 2006. Structural insights into the design of nonpeptidic isothiazolidinone-containing inhibitors of protein-tyrosine phosphatase 1B. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 38013-38021.
- Adams, D. R., Abraham, A., Asano, J., Breslin, C., Dick, C. A., Ixkes, U., ... & Takano, Y., 2007. 2-Aryl-3, 3, 3-trifluoro-2-hydroxypropionic acids: a new class of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(23), 6579-6583.
- Abrahamian, E., Fox, P. C., Nærum, L., Christensen, I. T., Thøgersen, H., & Clark, R. D., 2003. Efficient generation, storage, and manipulation of fully flexible pharmacophore multiplets and their use in 3-D similarity searching. *Journal of chemical information and computer sciences*, 43(2), 458-468.
- Abdelsalam, S. S., Korashy, H. M., Zeidan, A., & Agouni, A., 2019. The role of protein tyrosine phosphatase (PTP)-1B in cardiovascular disease and its interplay with insulin resistance. *Biomolecules*, 9(7), 286.
- Amaro, R. E., Baron, R., & McCammon, J. A., 2008. An improved relaxed complex scheme for receptor flexibility in computer-aided drug design. *Journal of computer-aided molecular design*, 22(9), 693-705.
- Asante-Appiah, E., Patel, S., Desponts, C., Taylor, J. M., Lau, C., Dufresne, C., ... & Scapin, G., 2006. Conformation-assisted inhibition of protein-tyrosine phosphatase-1B elicits inhibitor selectivity over T-cell protein-tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(12), 8010-8015.
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B., 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 3(8), 673-683.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W., 2014. Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69-82.
- Atlas, D., 2015. International diabetes federation. *IDF Diabetes Atlas*, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.
- Balaramnavar, V. M., Srivastava, R., Rahuja, N., Gupta, S., Rawat, A. K., Varshney, S., ... & Saxena, A. K., 2014. Identification of novel PTP1B inhibitors by pharmacophore based virtual screening, scaffold hopping and docking. *European journal of medicinal chemistry*, 87, 578-594.

- Banks, J. L., Beard, H. S., Cao, Y., Cho, A. E., Damm, W., Farid, R., ... & Levy, R. M., 2005. Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1752-1780.
- Bayes, M. X. J. R., Rabasseda, X., & Prous, J. R., 2003. Gateways to clinical trials. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 25(3), 225.
- Bays, H. E., McKenney, J. M., Dujovne, C. A., Schrott, H. G., Zema, M. J., Nyberg, J., ... & Gemcabene Study Group., 2003. Effectiveness and tolerability of a new lipid-altering agent, gemcabene, in patients with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *The American journal of cardiology*, 92(5), 538-543.
- Bentires-Alj, M., & Neel, B. G., 2007. Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer research*, 67(6), 2420-2424.
- Beuming, T., Che, Y., Abel, R., Kim, B., Shanmugasundaram, V., & Sherman, W., 2012. Thermodynamic analysis of water molecules at the surface of proteins and applications to binding site prediction and characterization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(3), 871-883.
- Borhani, D. W., & Shaw, D. E., 2012. The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *Journal of computer-aided molecular design*, 26(1), 15-26.
- Breckenridge, A., & Jacob, R., 2019. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. *Nature reviews Drug discovery*, 18(1), 1-2.
- Bussieres-Marmen, S., Hutchins, A. P., Schirbel, A., Rebert, N., Tiganis, T., Fiocchi, C., ... & Tremblay, M. L., 2014. Characterization of PTPN2 and its use as a biomarker. *Methods*, 65(2), 239-246.
- Calera, M. R., Vallega, G., & Pilch, P. F., 2000. Dynamics of protein-tyrosine phosphatases in rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6308-6312.
- Chen, X., Gan, Q., Feng, C., Liu, X., & Zhang, Q., 2018. Virtual screening of novel and selective inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B over T-cell protein tyrosine phosphatase using a bidentate inhibition strategy. *Journal of chemical information and modeling*, 58(4), 837-847.
- Chen, Y. T., & Seto, C. T., 2004. Parallel synthesis of a library of bidentate protein tyrosine phosphatase inhibitors based on the α -ketoacid motif. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(12), 3289-3298.
- Chen, Y. T., Tang, C. L., Ma, W. P., Gao, L. X., Wei, Y., Zhang, W., ... & Nan, F. J., 2013. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 2-ethyl-5-phenylthiazole-4-carboxamide derivatives as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors with improved cellular efficacy. *European journal of medicinal chemistry*, 69, 399-412.
- Cho, N., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y. D., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B., 2018. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 138, 271-281.
- Cleves, A.E., Jain, A.N., 2020 Structure- and ligand-based virtual screening on DUD-E+: Performance dependence on approximations to the binding pocket. *J. Chem. Inf. Model*, 60, 4296-4310
- Cockerill, K. A., Iverson, G. M., Jones, D. S., & Linnik, M. D., 2004. Therapeutic potential of toleragens in the management of antiphospholipid syndrome. *BioDrugs*, 18(5), 297-305.

- Coleman, M. P., Gatta, G., Verdecchia, A., Esteve, J., Sant, M., Storm, H., ... & Berrino, F., 2003. EUROCare-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Annals of oncology*, 14, v128-v149.
- Combs, A. P., Yue, E. W., Bower, M., Ala, P. J., Wayland, B., Douty, B., ... & Metcalf, B., 2005. Structure-based design and discovery of protein tyrosine phosphatase inhibitors incorporating novel isothiazolidinone heterocyclic phosphotyrosine mimetics. *Journal of medicinal chemistry*, 48(21), 6544-6548.
- Concepts and Applications of Molecular Similarity; Johnson, M.A., Maggiora, G.M. (Eds.) John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 1990
- Cool, DE., Tonks, NK., Charbonneau, H., Walsh, KA., 1989. Fischer, EH., Krebs EG. cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 86:5257–61. doi: 10.1073/pnas.86.14.5257
- Corbeil, C. R., & Moitessier, N., 2009. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 3. Impact of input ligand conformation, protein flexibility, and water molecules on the accuracy of docking programs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(4), 997-1009.
- Cross, S., Baroni, M., Carosati, E., Benedetti, P., & Clementi, S., 2010. FLAP: GRID molecular interaction fields in virtual screening. validation using the DUD data set. *Journal of chemical information and modeling*, 50(8), 1442-1450.
- Cui, L., He, X. P., Gao, L. X., Li, J., & Chen, G. R., 2013. Click Synthesis of Triazolyl Phenylalaninyl and Tyrosinyl Derivatives as New Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 50(3), 684-688.
- Rocha, F. J., Ogurtsova, K., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Seuring, T., Zhang, P., ... & Makaroff, L. E., 2016. IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 117, 48-54.
- DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Goding Sauer, A., Kramer, J. L., Smith, R. A., & Jemal, A., 2016. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 31-42.
- Diaz-Valencia, P. A., Bougnères, P., & Valleron, A. J., 2015. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC public health*, 15(1), 1-15.
- Dodd, G. T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S. E., Wiede, F., Balland, E., ... & Tiganis, T., 2015. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell*, 160(1-2), 88-104.
- Donath, M. Y., Dalmás, É., Sauter, N. S., Böni-Schnetzler, M., 2013. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell metabolism*, 17(6), 860-872.
- Du, Y., Ling, H., Shen, J., & Li, Q., 2015. Discovery of novel, potent, selective and cellular active ADC type PTP1B inhibitors via fragment-docking-oriented de novo design. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(15), 4891-4898.
- Duan, J.X., Dixon, S.L., Lowrie, J.F., W. Sherman, W., 2010 Analysis and comparison of 2D fingerprints: Insights into database screening performance using eight fingerprint methods, *J Mol Graph Model* 29(2), 157-170

- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., ... & Ramachandran, C., 1999. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 283 (5407), 1544-1548.
- Erlanson, D. A., Braisted, A. C., Raphael, D. R., Randal, M., Stroud, R. M., Gordon, E. M., & Wells, J. A., 2000. Site-directed ligand discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9367-9372.
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., Mainz, D. T., 2006. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 6177–6196.
- Gæde, P., Vedel, P., Larsen, N., Jensen, G. V., Parving, H. H., & Pedersen, O., 2003. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 348(5), 383-393.
- Galic, S., Klingler-Hoffmann, M., Fodero-Tavoletti, M. T., Puryear, M. A., Meng, T. C., Tonks, N. K., & Tiganis, T., 2003. Regulation of insulin receptor signaling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Molecular and cellular biology*, 23(6), 2096-2108.
- Gimeno, A., Ardid-Ruiz, A., Ojeda-Montes, M. J., Tomás-Hernández, S., Cereto-Massagué, A., Beltrán-Debón, R., ... & Garcia-Vallvé, S., 2018. Combined Ligand-and Receptor-Based Virtual Screening Methodology to Identify Structurally Diverse Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors. *ChemMedChem*, 13(18), 1939-1948.
- Hawkins, P.C.D., Skillman, A.G., Nicholls, A., 2007. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. *J. Med. Chem*, 50, 74–82.
- He, R., Zeng, L. F., He, Y., Zhang, S., & Zhang, Z. Y., 2013. Small molecule tools for functional interrogation of protein tyrosine phosphatases. *The FEBS journal*, 280(2), 731-750.
- He, X. P., Deng, Q., Gao, L. X., Li, C., Zhang, W., Zhou, Y. B., ... & Chen, K., 2011. Facile fabrication of promising protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitor entities based on ‘clicked’ serine/threonine–monosaccharide hybrids. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(13), 3892-3900.
- He, X. P., Li, C., Jin, X. P., Song, Z., Zhang, H. L., Zhu, C. J., ... & Xie, J., 2011. Microwave-assisted construction of triazole-linked amino acid–glucoside conjugates as novel PTP1B inhibitors. *New Journal of Chemistry*, 35(3), 622-631.
- Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R., & Neil, H. A. W., 2008. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *New England journal of medicine*, 359(15), 1577-1589.
- Hoover, W. G., 1985. Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions. *Physical Review A*, 31, 1695.
- Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W., 2011. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of chemical information and modeling*, 51(1), 69-82.
- Hudáky, P., & Perczel, A., 2005. Toward direct determination of conformations of protein building units from multidimensional NMR experiments VI. Chemical shift analysis of his to gain 3D structure and protonation state information. *Journal of computational chemistry*, 26(13), 1307-1317.

- Imming, P., Sinning, C., & Meyer, A., 2006. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature reviews Drug discovery*, 5(10), 821-834.
- Iversen, L. F., Møller, K. B., Pedersen, A. K., Peters, G. H., Petersen, A. S., Andersen, H. S., ... & Møller, N. P. H., 2002. Structure determination of T cell protein-tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19982-19990.
- Jacobson, M. P., Pincus, D. L., Rapp, C. S., Day, T. J. F., Honig, B., Shaw, D. E., Friesner, R. A., 2004. A Hierarchical Approach to All-Atom Protein Loop Prediction, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 55, 351-367.
- Jørgensen, A. M. M., & Pedersen, J. T., 2001. Structural diversity of small molecule libraries. *Journal of chemical information and computer sciences*, 41(2), 338-345.
- Joshi, P., Deora, G. S., Rathore, V., Tanwar, O., Rawat, A. K., Srivastava, A. K., & Jain, D., 2013. Identification of ZINC02765569: a potent inhibitor of PTP1B by vHTS. *Medicinal Chemistry Research*, 22(1), 28-34.
- Kevin, J. Bowers., Edmond, Chow., Huafeng, Xu., Ron, O. Dror., Michael, P. Eastwood., Brent, A. Gregersen., John, L. Klepeis., Istvan, Kolossvary., Mark, A. Moraes., Federico, D. Sacerdoti., John, K. Salmon., Yibing, Shan., and David, E. Shaw., 2006. "Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters," *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, 11-17.
- Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., ... & Stricker-Krongrad, A., 2000. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Molecular and cellular biology*, 20(15), 5479-5489.
- Klopfenstein, S. R., Evdokimov, A. G., Colson, A. O., Fairweather, N. T., Neuman, J. J., Maier, M. B., ... & Peters, K. G., 2006. 1, 2, 3, 4-Tetrahydroisoquinoliny sulfamic acids as phosphatase PTP1B inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(6), 1574-1578.
- Kooistra, A.J., Vischer, H.F., McNaught-Flores, D., Leurs, R., De Esch, I.J.P., De Graaf, C., 2016. Function-specific virtual screening for GPCR ligands using a combined scoring method. *Sci*, 6, 28288.
- Kostrzewa, T., Styszko, J., Gorska-Ponikowska, M., Sledzinski, T., & Kuban-Jankowska, A., 2019. Inhibitors of protein tyrosine phosphatase PTP1B with anticancer potential. *Anticancer research*, 39(7), 3379-3384.
- Lakshminarayana, N., Prasad, Y. R., Gharat, L., Thomas, A., Ravikumar, P., Narayanan, S., ... & Gopalan, B., 2009. Synthesis and evaluation of some novel isochroman carboxylic acid derivatives as potential anti-diabetic agents. *European journal of medicinal chemistry*, 44(8), 3147-3157.
- Lau, C. K., Bayly, C. I., Gauthier, J. Y., Li, C. S., Therien, M., Asante-Appiah, E., ... & Scapin, G., 2004. Structure based design of a series of potent and selective non peptidic PTP-1B inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(4), 1043-1048.
- Le Sommer, S., Martina, P., Martin-Granados, C., & Delibegovic, M., 2015. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) in the immune system. *Inflammation & Cell Signaling*.
- Lessard, L., Labbé, D. P., Deblois, G., Bégin, L. R., Hardy, S., Mes-Masson, A. M., ... & Tremblay, M. L., 2012. PTP1B is an androgen receptor-regulated phosphatase that promotes the progression of prostate cancer. *Cancer research*, 72(6), 1529-1537.

- Li, C., He, X. P., Zhang, Y. J., Li, Z., Gao, L. X., Shi, X. X., ... & Tang, Y., 2011. Click to a focused library of benzyl 6-triazolo (hydroxy) benzoic glucosides: Novel construction of PTP1B inhibitors on a sugar scaffold. *European journal of medicinal chemistry*, 46(9), 4212-4218.
- Li, X., Wang, L., & Shi, D., 2016. The design strategy of selective PTP1B inhibitors over TCPTP. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 24(16), 3343-3352.
- Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Piana, S., Eastwood, M. P., Dror, R. O., & Shaw, D. E., 2012. Systematic validation of protein force fields against experimental data. *PloS one*, 7(2), e32131.
- Liu, G., Xin, Z., Liang, H., Abad-Zapatero, C., Hajduk, P. J., Janowick, D. A., ... & Jirousek, M. R., 2003. Selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: targeting the second phosphotyrosine binding site with non-carboxylic acid-containing ligands. *Journal of medicinal chemistry*, 46(16), 3437-3440.
- Liu, J., Jiang, F., Jin, Y., Zhang, Y., Liu, J., Liu, W., & Fu, L., 2012. Design, synthesis, and evaluation of 2-substituted ethenesulfonic acid ester derivatives as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 57, 10-20.
- Lloyd, D. G., Buenemann, C. L., Todorov, N. P., Manallack, D. T., Dean, P. M., 2004. Scaffold hopping in de novo design. Ligand generation in the absence of receptor information. *J. Med. Chem.*, 47, 493-496.
- Lorenzo, V. P., Barbosa Filho, J. M., Scotti, L., Scotti, M. T., 2015. Combined structure- and ligand-based virtual screening to evaluate caulerpin analogs with potential inhibitory activity against monoamine oxidase B. *Rev. Bras. Farmacogn*, 25, 690-697
- Low, J. L., Chai, C. L., & Yao, S. Q., 2014. Bidentate inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Antioxidants & redox signaling*, 20(14), 2225-2250.
- Maheshwari, N., Karthikeyan, C., Bhadada, S. V., Verma, A. K., Sahi, C., Moorthy, N. H. N., & Trivedi, P., 2021. Virtual Screening Based Discovery of PTP1B Inhibitors and Their Biological Evaluations. *Letters in Drug Design & Discovery*, 18(2), 121-130.
- Manasa, B., Manandhar, S., Hari, G., Priya, K., Kumar, H., & Pai, K. S. R., 2021. Virtual structure-based docking, WaterMap, and molecular dynamics guided identification of the potential natural compounds as inhibitors of protein-tyrosine phosphatase 1B. *Journal of Molecular Structure*, 1226, 129396.
- Mandema, J. W., Hermann, D., Wang, W., Sheiner, T., Milad, M., Bakker-Arkema, R., & Hartman, D., 2005. Model-based development of gemcabene, a new lipid-altering agent. *The AAPS journal*, 7(3), E513-E522.
- Marthey, L., Mateus, C., Mussini, C., Nachury, M., Nancey, S., Grange, F., ... & Carbonnel, F., 2016. Cancer immunotherapy with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies induces an inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 10(4), 395-401.
- Meslamani, J., Li, J., Sutter, J., Stevens, A., Bertrand, H. O., Rognan, D., 2012. Protein-ligand-based pharmacophores: Generation and utility assessment in computational ligand profiling. *J. Chem. Inf. Model*, 52, 943-955.
- Moretto, A. F., Kirincich, S. J., Xu, W. X., Smith, M. J., Wan, Z. K., Wilson, D. P., ... & Lee, J., 2006. Bicyclic and tricyclic thiophenes as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(7), 2162-2177.
- Montero, A. J., Diaz-Montero, C. M., Deutsch, Y. E., Hurley, J., Koniaris, L. G., Rumboldt, T., ... & Glück, S., 2012. Phase 2 study of neoadjuvant treatment with NOV-002 in combination with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel in

- patients with HER-2 negative clinical stage II–IIIc breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 132(1), 215-223.
- Morrish, N. J., Wang, S. L., Stevens, L. K., Fuller, J. H., & Keen, H., 2001. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*, 44(2), S14-S21.
- Murray, C. J., & Lopez, A. D., 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *The lancet*, 349(9061), 1269-1276.
- Myrianthopoulos, V., Kritsanida, M., Gaboriaud-Kolar, N., Magiatis, P., Ferandin, Y., Durieu, E., ... & Skaltsounis, A. L., 2013. Novel inverse binding mode of indirubin derivatives yields improved selectivity for DYRK kinases. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(1), 22-26.
- Nosengo, N., 2016. Can you teach old drugs new tricks?. *Nature News*, 534(7607), 314.
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L., 2006. How many drug targets are there?. *Nature reviews Drug discovery*, 5(12), 993-996.
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J., 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews*, 9(2), 91-102.
- Park, H., Bhattarai, B. R., Ham, S. W., & Cho, H., 2009. Structure-based virtual screening approach to identify novel classes of PTP1B inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 44(8), 3280-3284.
- Patel, D., Jain, M., Shah, S. R., Bahekar, R., Jadav, P., Joharapurkar, A., ... & Kapadnis, P., 2012. Discovery of potent, selective and orally bioavailable triaryl-sulfonamide based PTP1B inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(2), 1111-1117.
- Perez, A., Morrone, J. A., Simmerling, C., & Dill, K. A., 2016. Advances in free-energy-based simulations of protein folding and ligand binding. *Current opinion in structural biology*, 36, 25-31.
- Puius, Y. A., Zhao, Y., Sullivan, M., Lawrence, D. S., Almo, S. C., & Zhang, Z. Y., 1997. Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: a paradigm for inhibitor design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13420-13425.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., ... & Pirmohamed, M., 2019. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews Drug discovery*, 18(1), 41-58.
- Rao, P. S., Muvva, C., Geethanjali, K., Bastipati, S. B., & Kalashikam, R., 2012. Molecular docking and virtual screening for novel protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors. *Bioinformation*, 8(17), 834.
- Reddy, H., Kim, H., Cha, S., Lee, B., & Kim, Y. J., 2017. Structure-Based Virtual Screening of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors: Significance, Challenges and Solutions. *J. Microbiol. Biotechnol*, 27(5), 878-895.
- Salomon-Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., Le Grand, S., & Walker, R. C., 2013. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. *Journal of chemical theory and computation*, 9(9), 3878-3888.
- Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W., 2013. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design*, 27(3), 221-234.

- Sastry, G.M., Dixon, S.L., Sherman, W., 2011. Rapid shape-based ligand alignment and virtual screening method based on atom/feature-pair similarities and volume overlap scoring. *J. Chem. Inf. Model*, 51, 2455–2466.
- Scapin, G., Patel, S. B., Becker, J. W., Wang, Q., Despons, C., Waddleton, D., ... & Asante-Appiah, E., 2003. The structural basis for the selectivity of benzotriazole inhibitors of PTP1B. *Biochemistry*, 42(39), 11451-11459.
- Scharl, M., McCole, D. F., Weber, A., Vavricka, S. R., Frei, P., Kellermeier, S., ... & Rogler, G., 2011. Protein tyrosine phosphatase N2 regulates TNF α -induced signalling and cytokine secretion in human intestinal epithelial cells. *Gut*, 60(2), 189-197.
- Schmidtke, P., Luque, F. J., Murray, J. B., & Barril, X., 2011. Shielded hydrogen bonds as structural determinants of binding kinetics: application in drug design. *Journal of the American Chemical Society*, 133(46), 18903-18910.
- Schrödinger Release 2019-4: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2019. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2019.
- Schrödinger Release 2019-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- Schrödinger Release 2019-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019
- Schrödinger Release 2019-4: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2019. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2019.
- Senn, H. M., & Thiel, W., 2009. QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(7), 1198-1229.
- Shan, Y., Kim, E. T., Eastwood, M. P., Dror, R. O., Seeliger, M. A., & Shaw, D. E., 2011. How does a drug molecule find its target binding site?. *Journal of the American Chemical Society*, 133(24), 9181-9183.
- Sharp, R. C., Abdulrahim, M., Naser, E. S., & Naser, S. A., 2015. Genetic variations of PTPN2 and PTPN22: role in the pathogenesis of type 1 diabetes and Crohn's disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 95.
- Shaw, D. E., Deneroff, M. M., Dror, R. O., Kuskin, J. S., Larson, R. H., Salmon, J. K., ... & Wang, S. C., 2008. Anton, a special-purpose machine for molecular dynamics simulation. *Communications of the ACM*, 51(7), 91-97.
- Shiloh, Y., & Ziv, Y., 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(4), 197-210.
- Shinde, R. N., Kumar, G. S., Eqbal, S., & Sobhia, M. E., 2018. Screening and identification of potential PTP1B allosteric inhibitors using in silico and in vitro approaches. *PloS one*, 13(6), e0199020.
- Shivakumar, D., Williams, J., Wu, Y., Damm, W., Shelley, J., & Sherman, W., 2010. Prediction of absolute solvation free energies using molecular dynamics free energy perturbation and the OPLS force field. *Journal of chemical theory and computation*, 6(5), 1509-1519.
- Shoichet, B. K., 2004. Virtual screening of chemical libraries. *Nature*, 432(7019), 862-865.
- Sirin, S., Kumar, R., Martinez, C., Karmilowicz, M. J., Ghosh, P., Abramov, Y. A., ... & Sherman, W., 2014. A computational approach to enzyme design: predicting ω -aminotransferase catalytic activity using docking and MM-GBSA scoring. *Journal of chemical information and modeling*, 54(8), 2334-2346.

- Shirley, M., 2018. Ceftazidime-avibactam: a review in the treatment of serious gram-negative bacterial infections. *Drugs*, 78(6), 675-692.
- Song, Z., He, X. P., Li, C., Gao, L. X., Wang, Z. X., Tang, Y., ... & Chen, G. R., 2011. Preparation of triazole-linked glycosylated α -ketocarboxylic acid derivatives as new PTP1B inhibitors. *Carbohydrate research*, 346(1), 140-145.
- Spahn, V., Del Vecchio, G., Labuz, D., Rodriguez-Gaztelumendi, A., Massaly, N., Temp, J., ... & Stein, C., 2017. A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations. *Science*, 355(6328), 966-969.
- Sperandio, O., Miteva, M., Villoutreix, B., 2008. Combining ligand- and structure-based methods in drug design projects. *Curr. Comput. Aided Drug Des*, 4, 250–258.
- St-Germain, J. R., Taylor, P., Zhang, W., Li, Z., Ketela, T., Moffat, J., ... & Moran, M. F., 2015. Differential regulation of FGFR3 by PTPN1 and PTPN2. *Proteomics*, 15(2-3), 419-433.
- Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2014.
- Sun, J. P., Fedorov, A. A., Lee, S. Y., Guo, X. L., Shen, K., Lawrence, D. S., ... & Zhang, Z. Y., 2003. Crystal structure of PTP1B complexed with a potent and selective bidentate inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12406-12414.
- Sun, W., Zhang, B., Zheng, H., Zhuang, C., Li, X., Lu, X., ... & Xiu, Z., 2017. Trivaric acid, a new inhibitor of PTP1b with potent beneficial effect on diabetes. *Life sciences*, 169, 52-64.
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., ... & Zhu, H. P., 2017. Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1387.
- Swann, S.L., Brown, S.P., Muchmore, S.W., Patel, H., Merta, P., Locklear, J., Hajduk, P.J. A., 2011. Unified, probabilistic framework for structure- and ligand-based virtual screening. *J. Med. Chem*, 54, 1223–1232
- Szczepankiewicz, B. G., Liu, G., Hajduk, P. J., Abad-Zapatero, C., Pei, Z., Xin, Z., ... & Jirousek, M. R., 2003. Discovery of a potent, selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor using a linked-fragment strategy. *Journal of the American Chemical Society*, 125(14), 4087-4096.
- Talevi, A., Gavernet, L., Bruno-Blanch, L., 2009. Combined virtual screening strategies. *Curr. Comput. Aided Drug Des*, 5, 23–37
- Tan, L., & Bajorath, J., 2009. Utilizing target–ligand interaction information in fingerprint searching for ligands of related targets. *Chemical biology & drug design*, 74(1), 25-32.
- Tan, L., Lounkine, E., Bajorath, J., 2008. Similarity searching using fingerprints of molecular fragments involved in protein-ligand interactions. *J. Chem. Inf. Model*, 48, 2308–2312.
- Tang, Y. H., Hu, M., He, X. P., Fahnbulleh, S., Li, C., Gao, L. X., ... & Chen, G. R., 2011. Monosaccharide as a central scaffold toward the construction of salicylate-based bidentate PTP1B inhibitors via click chemistry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32(3), 1000-1006.
- Taylor, R. D., Jewsbury, P. J., & Essex, J. W., 2002. A review of protein-small molecule docking methods. *Journal of computer-aided molecular design*, 16(3), 151-166.

- Tiganis, T., Kemp, B. E., & Tonks, N. K., 1999. The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27768-27775.
- Tonks, N. K., 2003. PTP1B: from the sidelines to the front lines!. *FEBS letters*, 546(1), 140-148.
- Tonks, N. K., 2013. Protein tyrosine phosphatases—from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *The FEBS journal*, 280(2), 346-378.
- Tonks, N. K., & Muthuswamy, S. K., 2007. A brake becomes an accelerator: PTP1B—a new therapeutic target for breast cancer. *Cancer cell*, 11(3), 214-216.
- Tonks, N. K., 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(11), 833-846.
- Trush, V. V., Cherenok, S. O., Tanchuk, V. Y., Kukhar, V. P., Kalchenko, V. I., & Vovk, A. I., 2013. Calix [4] arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(20), 5619-5623.
- Vázquez, J., Deplano, A., Herrero, A., Gibert, E., Herrero, E., Luque, F.J., 2020. Assessing the performance of mixed strategies to combine lipophilic molecular similarity and docking in virtual screening. *J. Chem. Inf. Model*, 60, 4231–4245.
- Vázquez, J., Deplano, A., Herrero, A., Ginex, T., Gibert, E.; Rabal, O., Oyarzabal, J., Herrero, E., Luque, F.J., 2018. Development and validation of molecular overlays derived from three-dimensional hydrophobic similarity with PharmScreen. *J. Chem. Inf. Model*, 58, 1596–1609.
- Vázquez, J., López, M., Gibert, E., Herrero, E., & Luque, F. J., 2020. Merging Ligand-Based and Structure-Based Methods in Drug Discovery: An Overview of Combined Virtual Screening Approaches. *Molecules*, 25(20), 4723.
- Wacker, D., Stevens, R. C., & Roth, B. L., 2017. How ligands illuminate GPCR molecular pharmacology. *Cell*, 170(3), 414-427.
- Wan, Z. K., Lee, J., Xu, W., Erbe, D. V., Joseph-McCarthy, D., Follows, B. C., & Zhang, Y. L., 2006. Monocyclic thiophenes as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: capturing interactions with Asp48. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(18), 4941-4945.
- WHO. Non-communicable diseases country profile 2014. July, 2014. <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2014/en/> (accessed Oct 6, 2016).
- Wilson, D. P., Wan, Z. K., Xu, W. X., Kirincich, S. J., Follows, B. C., Joseph-McCarthy, D., ... & Lee, J., 2007. Structure-based optimization of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: from the active site to the second phosphotyrosine binding site. *Journal of medicinal chemistry*, 50(19), 4681-4698.
- Wu, J., Ma, Y., Zhou, H., Zhou, L., Du, S., Sun, Y., ... & Wang, R., 2020. Identification of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors through De Novo Evoluton, synthesis, biological evaluation and molecular dynamics simulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 526(1), 273-280.
- Xie, J., & Seto, C. T., 2005. Investigations of linker structure on the potency of a series of bidentate protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(8), 2981-2991.
- Xin, Z., Liu, G., Abad-Zapatero, C., Pei, Z., Szczepankiewicz, B. G., Li, X., ... & Jirousek, M. R., 2003. Identification of a monoacid-based, cell permeable, selective inhibitor of

- protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 13(22), 3947-3950.
- Yang, Y., Tian, J. Y., Ye, F., & Xiao, Z., 2020. Identification of natural products as selective PTP1B inhibitors via virtual screening. *Bioorganic chemistry*, 98, 103706.
- Yaribeygi, H., Atkin, S. L., Butler, A. E., & Sahebkar, A., 2019. Sodium–glucose cotransporter inhibitors and oxidative stress: an update. *Journal of cellular physiology*, 234(4), 3231-3237.
- Yaribeygi, H., Butler, A. E., Barreto, G. E., & Sahebkar, A., 2019. Antioxidative potential of antidiabetic agents: a possible protective mechanism against vascular complications in diabetic patients. *Journal of cellular physiology*, 234(3), 2436-2446.
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Rezaee, R., & Sahebkar, A., 2018. Oxidative stress induces renal failure: A review of possible molecular pathways. *Journal of cellular biochemistry*, 119(4), 2990-2998.
- You-Ten, K. E., Muise, E. S., Itié, A., Michaliszyn, E., Wagner, J., Jothy, S., ... & Tremblay, M. L., 1997. Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase–deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 186(5), 683-693.
- Zaccardi, F., Webb, D. R., Yates, T., & Davies, M. J., 2016. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate medical journal*, 92(1084), 63-69.
- Zhang, Y., & Blom, P. W., 2010. Field-assisted ionization of molecular doping in conjugated polymers. *Organic Electronics*, 11(7), 1261-1267.
- Zhang, Z. Y., 2017. Drugging the undruggable: therapeutic potential of targeting protein tyrosine phosphatases. *Accounts of chemical research*, 50(1), 122-129.
- Zhang, Z. Y., 2002. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42(1), 209-234.
- Zhao, H., Liu, G., Xin, Z., Serby, M. D., Pei, Z., Szczepankiewicz, B. G., ... & Jirousek, M. R., 2004. Isoxazole carboxylic acids as protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(22), 5543-5546.
- Zhou, B., Lu, Y., Hajifathalian, K., Bentham, J., Di Cesare, M., Danaei, G., ... & Gaciong, Z., 2016. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*, 387(10027), 1513-1530.
- Zinker, B. A., Rondinone, C. M., Trevillyan, J. M., Gum, R. J., Clampit, J. E., Waring, J. F., ... & Jirousek, M. R., 2002. PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11357-11362.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Kübra AKYOL
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Medeni Hali:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
Faks:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Nenehatun Kız Anadolu Lisesi, Erzurum
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bölümü
Doktora:	-
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
	-
İlgi Alanları ve Hobiler	