

## ÇEŞİTLİ İNDOL TÜREVLERİNİN P56<sup>LCK</sup> TİROZİN KİNAZ İNİHİTÖRLERİ OLARAK DOKİNG ÇALIŞMALARI İLE ANALİZİ

ANALYSIS OF SEVERAL INDOLE DERIVATIVES AS P56<sup>LCK</sup> TYROSINE  
KINASE INHIBITORS BASED ON DOCKING STUDIES

Süreyya ÖLGEN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06100  
Tandoğan, Ankara - TÜRKİYE

### ÖZET

*Bir seri 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon ve bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol türevleri p56<sup>Lck</sup> inhibitörleri olarak reseptör doking çalışması ile araştırıldı. Bazı bileşiklerin seçici bir inhibitör PPI [1-t-Butil-3-p-tolil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il-amin]'in etkileştiği p56<sup>Lck</sup>'ın enzim aktif yöresine yerleştiği gözlemlendi. Bileşiklerin tümünün enzim aktif yöresi ile etkileşimlerinin, en düşük enerji seviyeleri, hidrojen bağı yapma kapasiteleri ve aktif yöreye yerleşme kabiliyetlerinin doking çalışması ile değerlendirilmesi sonucunda, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon türevlerinin enzim ile etkileşimlerinin ve biyolojik aktivitelerinin daha iyi olabileceği sonucuna varıldı.*

**Anahtar Kelimeler:** Reseptör tirozin kinaz; p56<sup>Lck</sup>; N-Süstitüe indol türevleri; doking

### ABSTRACT

*A series of 3-(substituted-benzylidene)-1,3-dihydroindole-2-one, 3-(substituted-benzylidene)-1,3-dihydroindole 2-thione and bisthio 3-(substituted-benzylidene)-1,3-dihydroindole derivatives were investigated as inhibitor of p56<sup>Lck</sup> by performing receptor docking studies. Some compounds were shown to be docked at the site, where the selective inhibitor PPI [1-tert-Butyl-3-p-tolyl-1H-pyrazolo[3, 4-d]pyrimidine-4-yl-amine] was embedded at the p56<sup>Lck</sup>. Evaluation of all compounds for active site interactions with lowest binding energy level, capability of hydrogen bond formation and superimposibility on enzyme active site by docking studies, it was concluded that 3-(substituted-benzylidene)-1,3-*

*dihydroindol-2-thione derivatives would have good interaction with enzyme active site and have more biological activity.*

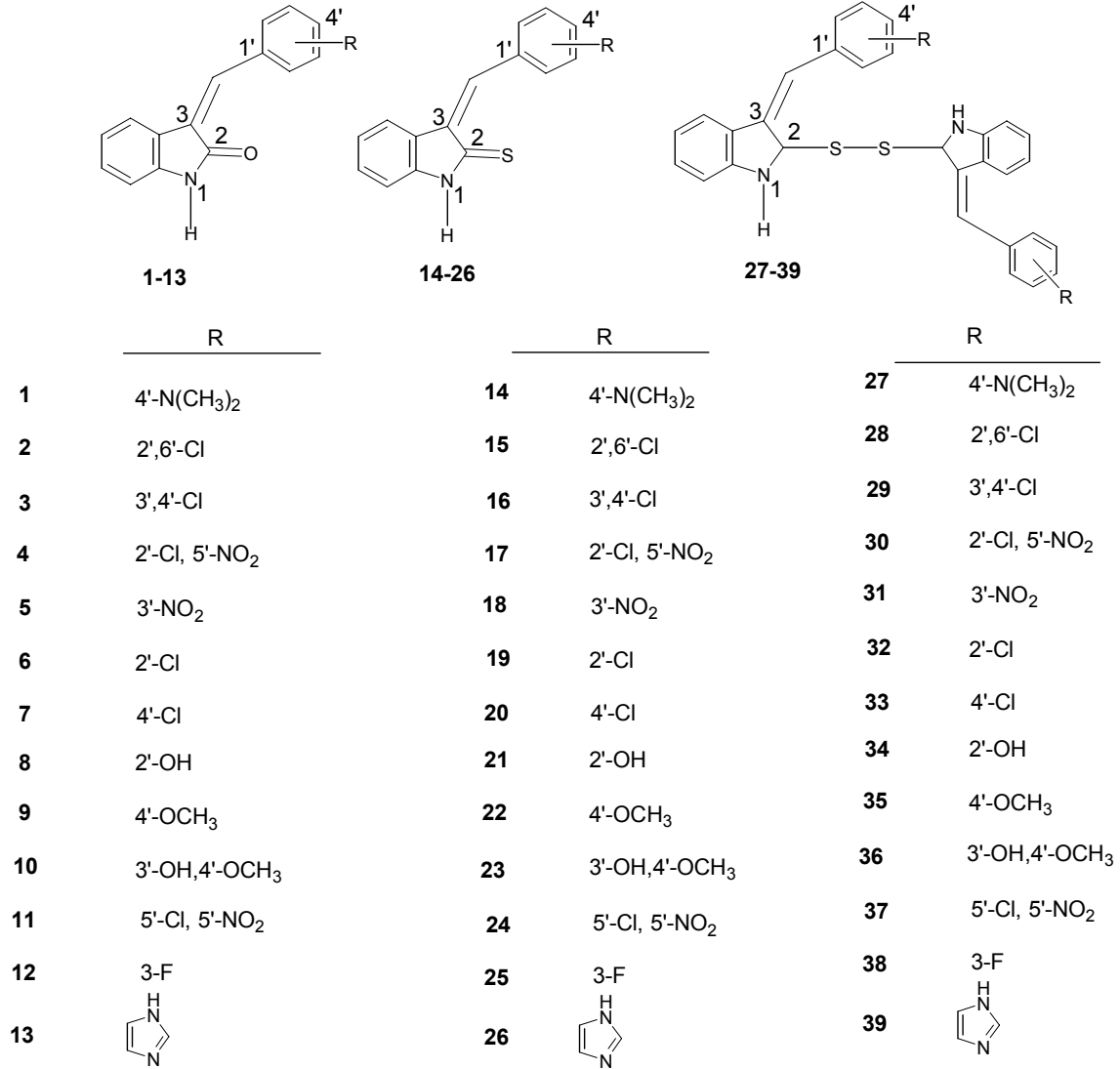
**Key Words:** Receptor tyrosine kinase; p56<sup>Lck</sup>; N-Substituted indole derivatives; docking

## GİRİŞ

Tirozin kinazların, kontrol dışı büyüme gösteren neoplastik hücre oluşumuna neden oldukları saptanmıştır. Bu nedenle, kanser kemoterapisinde kullanılabilecek ilaçların geliştirilmesinde potansiyel hedef olarak seçilmişlerdir (1, 2). Çeşitli reseptör tirozin kinazlar (RTK) VEGF-R2(Flk-1), FGF-R1, PDGF-R $\beta$ , EGF-R ve reseptör olmayan kinazlar olan c-Src tirozin kinazların yapıları aydınlatılmış ve kanser oluşumu üzerine olan etkileri incelenmiştir (3-5). Reseptör olmayan protein tirozin kinaz Src ailesinin 8 üyesi vardır. Bunlar c-src, c-yes, c-fgr, fyn, lck, hck, lyn ve blk olarak adlandırılırlar (6). Lck geninin, 56 kilodalton büyüklüğünde olan, T lenfositlerinde ve doğal öldürücü hücrelerde bulunan şekli p56<sup>Lck</sup> olarak kodlanmıştır. Lck tirozin kinazlar, T lenfosit glikoproteinleri olan CD4 ve CD8 ile kovalen olmayan bir kompleks oluştururlar ve T-hücre aktivasyonunda önemli rol oynarlar (7). Hücre aktivasyonu ve üretiminde rol oynayan p56<sup>Lck</sup>'nin ürettiği sinyallerin spesifik olarak inhibisyonu, çeşitli immün ve neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılabilen yeni grup ilaçların geliştirilmesi çalışmalarını gündeme getirmiştir (8, 9). Protein tirozin kinaz c-Src ailesinin iki üyesi olan p60<sup>c-Src</sup> ve p56<sup>Lck</sup> enzimlerinin inhibisyonunu incelemek için **PP1**[1-*t*-Butil-3-p-tolil-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il-amin] ve **PP2** [1-*t*-Butil-3-p-klorofenil-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il-amin] olarak adlandırılan iki bileşiğin *in vitro* olarak Lck ve c-Src'yi çok düşük konsantrasyonlarda seçici olarak inhibe ettikleri bulunmuştur (10) (Şekil 1).

İndol halkası içeren bileşiklerin farklı aktivitelere ve özellikle de antikanser aktiviteye sahip oldukları bulunmuş ve farklı mekanizmalarla açıklanan antikanser aktivitenin bazı tümörler açısından, tirozin kinaz enziminin inhibisyonu ile ortaya çıktığı ortaya konulmuştur. Son on yılda, bazı 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on türevleri tümör büyümesi, metastaz ve anjiyojenezise sebep olan çeşitli RTK'lara karşı potent ve selektif inhibitör olarak rapor edilmişlerdir. Bunlar arasında, **SU5416** ve **SU6668**'in (Şekil 1) VEGF-R (Flk-1/KDR, Flt-1)'in spesifik inhibitörü oldukları *in vitro* çalışmalarla kanıtlanmıştır (11, 12).





**Şekil 2.** Doking çalışması ile p56<sup>Lck</sup> tirozin kinaz enzim inhibitörü olarak değerlendirilen, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidro indol-2-tiyon ve bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol türevleri

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Moleküler Doking

DOCK 4.0 programı, küçük yapıdaki inhibitör moleküllerin aktif yöreye ya da hedeflenen yüzey alana uygun bir şekilde yerleşimlerini tayin etmek için spesifik olarak geliştirilen bir

programdır (14, 15). DOCK 4.0 programı ile herbir inhibitorün enerji sıralaması için, ön hesaplı temas skor kafesi (inhibitör atomlar ve yüzey hedef atomlar arasındaki mesafeye bağlı) ve itme alanlı skor kafesi (Van der Waals ve elektrostatik komponentlerin yarattığı moleküler mekanik etkileşme enerjilerine bağlı) oluşturulur. Bu şekilde kafes oluşturularak bileşik atomlarının amino asit atomları ile tek tek etkileşimi kesin olarak yapılabilir. Bileşikler kafese yerleştirildikten sonra, kafesin herbir hücresindeki tüm yörelerde kendi etrafındaki dönüş hareketi ile birlikte dönerler. Bileşikler bu dönme hareketini, enzim yöresindeki herbir cebin tüm yüzeylerini dolaşarak tamamlarlar. Ceplerin yüzeylerinin tanımlanması DOCK 4.0 programındaki sphengen yardımı ile yapılmaktadır. En yüksek sayıda yüzey alanı olan cep, en geniş anlamda işgal edilebilen yüzey ve dolayısı ile de enzimin aktif yöresi olarak tanımlanır. DOCK 4.0 programı en düşük 25 enerji seviyesini hesaplayarak vermektedir. Kafeslerdeki tüm dönüşlerden elde edilen değerler hesaba katılsaydı, yaklaşık 500 milyon enerji sonucu elde edilirdi. Bu nedenle Kuntz (16), bileşiklerin enzim ile etkileşimlerini en düşük enerji seviyelerinde en etkin şekilde oluşturacaklarını kabul ederek, en düşük enerji seviyesindeki 25 değeri, bileşiklerin enzim etkileşimlerini değerlendirmek için kabul edilebilecek en uygun değerler olduğunu bildirmiştir.

DOCK 4.0'ün vermiş olduğu doking enerji sonuçları, Eşitlik 1.'de görülen formülden yararlanılarak elde edilmiştir. Eşitlikten de anlaşılacağı üzere söz konusu olan enerji, enzim ve inhibitor bileşikler arasındaki elektrostatik ve Van der Waals etkileşim enerjilerinin toplamıdır.

$$\sum_{i=1}^{lig} \sum_{j=1}^{rec} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + 332 \frac{q_i q_j}{Dr_{ij}} \right]$$

**Eşitlik 1.**

$r_{ij}$ ; i ve j atomları arasındaki mesafe

$q_i, q_j$ ; i ve j atomları arasındaki potent enerji yükü

$A_{ij}, B_{ij}$ ; Van der Waals geri tepme ve etkilenme parametreleri

$D$ ; dielektrik sabitesi

332; elektrostatik enerjiyi kkal/mol'e dönüştüren faktör

$i$ ; inhibitor atomları

$j$ ; enzim atomları

DOCK 4.0'ün parametre dosyası olan dock.in içerisinde, enzim katı (rijid) konformasyon olarak nitelendirilirken, ligandların esnek olduğu hesaba katılmaktadır. Bu nedenle doking enerji sonuçları, olması gerektiği kadar etraflı olmadığı halde, ligandlar için başlıca fonksiyon belirleyici sonuçlar olarak değerlendirilebilir.

Tablo 1-3'de yer alan RMSD (standart sapmanın kare kökü) değeri, DOCK 4.0 ile hesaplanan bir değerdir (17). Mesafelerine bağlı olarak iki molekülün yapısal karşılaştırmasını ve üst üste çakıştırılabilme yeteneğini ifade etmektedir. Geometrik bir merkez yaratılarak, bileşiklerin yapı geçişlerinin ve dönüşlerinin hesaplanması ile elde edilen bir değerdir. Atomların kartezyen koordinatlarının bileşiklerin yapısını tanımladığını varsaydığımızda ve  $n \times 3$  koordinat matrisi ( $n$ , moleküldeki atomların sayısıdır) ile bunu ifade ettiğimizde; yapı geçişleri, koordinat matrisindeki herbir dizine geçiş vektörlerinin ilavesi ile hesaplanabilir. Yapıların dönüşü ise, rotasyon matrisleri ile koordinat matrislerinin çarpımı ile elde edilir. X ve Y, geometrik merkezlerdeki geçişleri aynı olan iki farklı yapının koordinat matrislerini ifade etmektedir.

Doking sonuçlarının değerlendirilmesi, 4 farklı parametre göz önüne alınarak yapılmaktadır (18, 19):

1- En düşük enerji seviyesinde aktif yöreye bağlanan bileşiklerin enzim inhibisyonu için daha seçici ve biyolojik olarak aktif bileşikler olacağı düşünülmektedir.

2- Enzim aktif yöresine seçiliği olan ve enzimi inhibe ettiği bilinen aktif bir bileşik ile, test edilen bileşiklerin üst üste çakıştırılabilme kabiliyeti değerlendirilmektedir.

Bileşiklerin bu yörede üst üste çakışma kabiliyetleri ne kadar iyi ise bileşikler o kadar seçici ve aktif olabilir (RMSD değerleri bu değerlendirmenin bir göstergesi olarak hesaplanmaktadır).

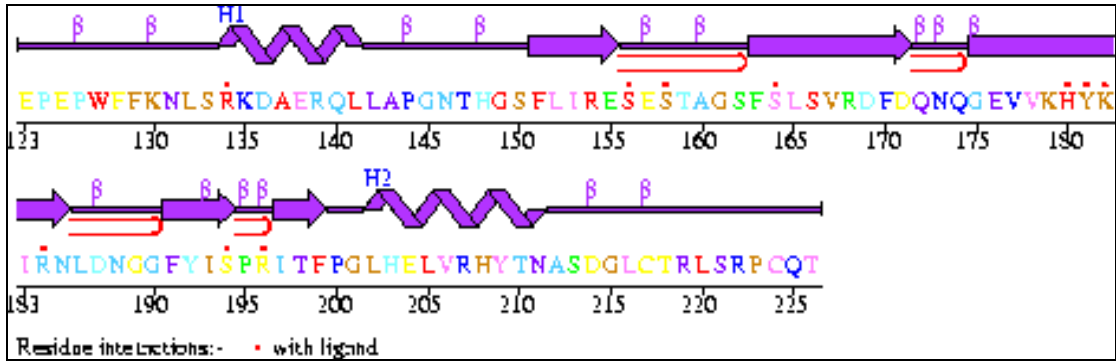
3- Bileşikler mümkün olabilen en düşük enerji seviyelerinde ne kadar fazla sayıda H bağı yapabiliyorsa ve bu bağı mümkün olan en düşük ( $3 \text{ \AA}$ 'den az) mesafede gerçekleştirebiliyorsa o kadar seçici ve aktif bileşikler olabilecekleri kabul edilmektedir.

4- Hidrofobik etkileşimlerin rolünün değerlendirilmesi ile yapılmaktadır.

Protein bilgi bankalarından tirozin kinaz enzimlerindeki hidrofobik ceplerin nerelerde olduğu yer almaktadır. Bileşiklerin hidrofobik bölgeye geometrik yakınlığı hidrofobik etkileşim güçlerini ifade etmektedir. DOCK 4.0 programı yardımı ile hidrofobik bölgeyle etkileşime girebilecek fonksiyonel grupların bileşiklere takılması sonucu daha iyi hidrofobik etkileşimlerin oluşturulması ve yeni etkin bileşiklerin tasarlanması mümkün olmaktadır.

## Doking Yöntemi

Enzim ve inhibitörlerin hazırlanması ve doking uygulamaları için SGI İndigo (R4400) bilgisayar istasyonundan yararlanılmıştır. Insight II programı (MSI) bileşikler için üç boyutlu çizmek için kullanılmıştır. H atomlarını yerleştirmek için bileşikler Sybyl (Tripos) mol2 dosyalarına dönüştürülmüştür. Deneysel kısmi atom yükleri Insight II programındaki CVFF (Kimyasal Varyasyon İtme Alanı) kullanılarak hesaplanmıştır. Enzimler p56<sup>Lck</sup> Protein Bilgi Bankasından (PDB, URL: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum>) alınarak, Insight II programında inhibitörlerin de yerleştirileceği üç boyutlu ortama yerleştirilmiştir (P56<sup>Lck</sup>'ın üç boyutlu yapısı X-ray analizi ile elde edilerek protein bilgi bankasına konulmuştur). Tirozin kinaz p56<sup>Lck</sup> enziminin aktif yoresini His 203 ve Leu 202 amino asitlerinin temsil ettiği düşünülmüştür. Selektif bir p56<sup>Lck</sup> enzim inhibitörü olduğu bilinen **PP1**, aynı programla çizilmiş ve aktif yöreye yerleştirilmiştir. PDB enzim bankasından alınan tirozin kinaz p56<sup>Lck</sup> enziminin iki boyutlu yapısı Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Protein Data Bankasından alınan PTK p56<sup>Lck</sup>'nin iki boyutlu yapısı.

DOCK 4.0'ın uygulanışı aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir:

1. PDB bilgi bankasından enzimin yapısı alındı, hidrojen atomları eklendi ve yükleri belirlendi.
2. Enzim aktif yöresine bağlanacağı düşünülen bileşikler (ligandlar) Insight II programı yardımı ile üç boyutlu olarak çizildi, hidrojen atomları eklendi ve yükleri belirlendi.
3. DOCK 4.0/sphengen ile aktif yöreyi temsil eden ceplerin yüzeyleri belirlendi.
4. DOCK 4.0/grid.in ile bileşiklerin hareket enerjilerini belirlemek için oluşturulan kafesler yaratıldı.
5. DOCK 4.0/dock.in ile bileşiklerin enzim ile etkileşimi için kriter olan parametreler (Van der Waals etkileşim, elektrostatik, intra ve intermoleküler) yaratıldı.

6. DOCK 4.0, tüm pametrelerin değerlendirilmesiyle elde edilen en düşük 25 enerji seviye sonuçlarını, RMSD değerlerini, intra ve intermoleküler bileşen değerlerini, Van der Waals ve elektrostatik etkileşim değerlerini listeler halinde sıraladı.
7. Insight II programı yardımı ile aktif yöre ve çevresinde oluşan H bağları tüm enerji seviyeleri için saptandı ve yerlerine yerleştirildi.
8. Bileşiklerin grafikleri snapshot programı yardımı ile alındı.

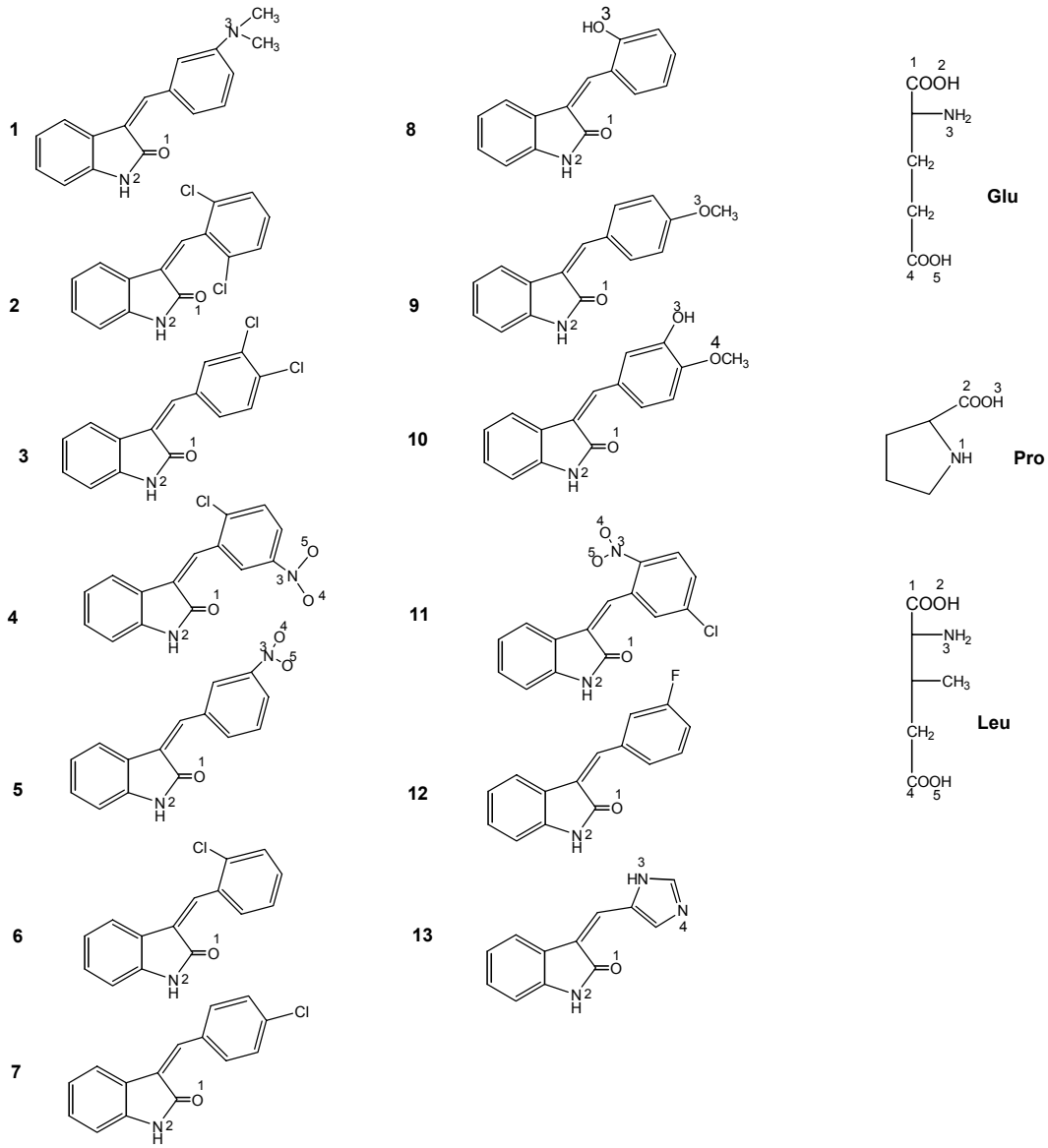
En düşük enerji seviyesinde en fazla H bağı yapan bileşiğin enzim aktif yöresine olan inhibisyon etkisi ve seçiciliği değerlendirilmiş; bu bileşiğin diğer bileşiklerden daha sıkıca enzime bağlandığı ve enzimi daha güçlü inhibe ettiği kabul edilmiştir.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

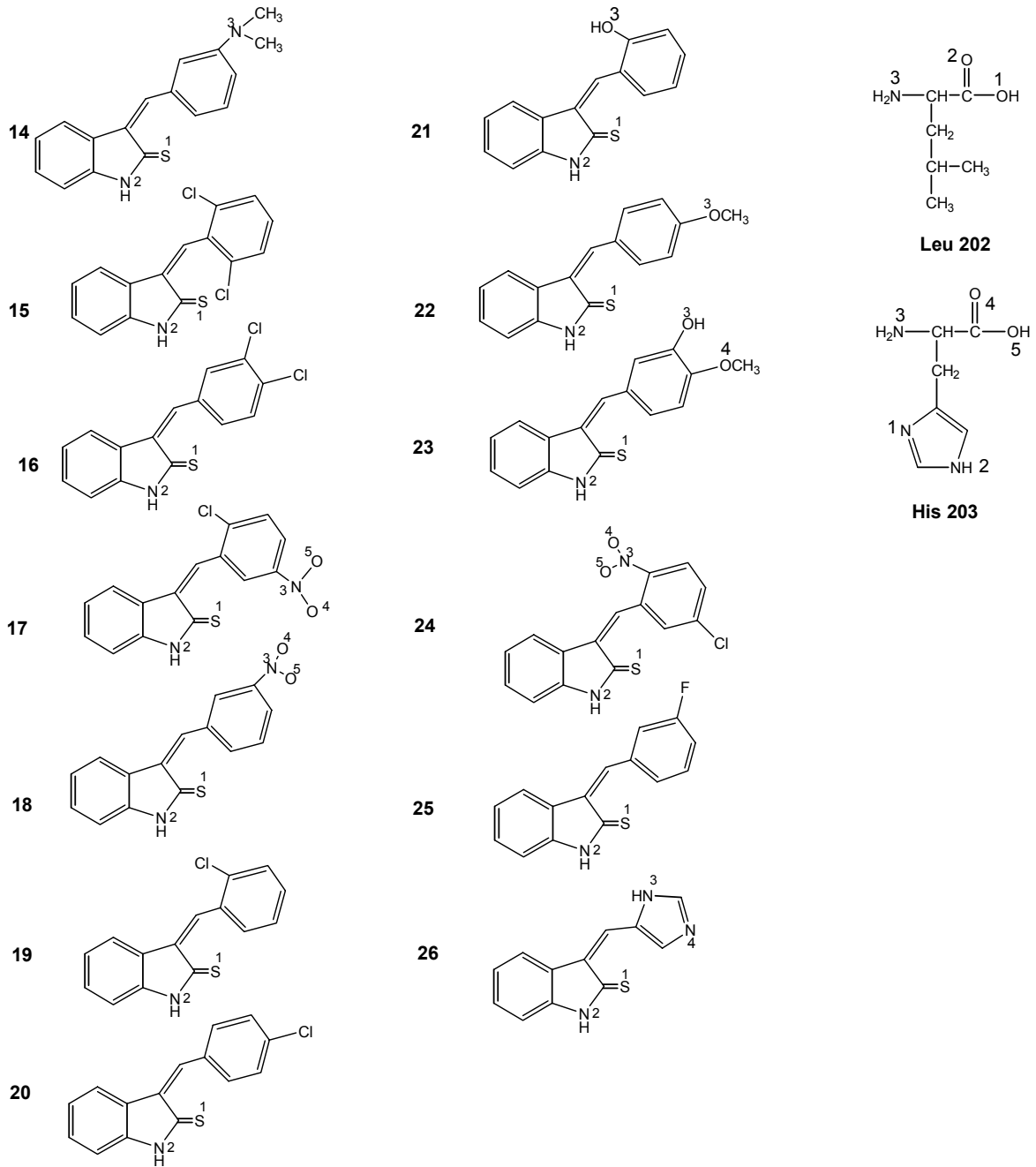
DOCK 4.0 programı, p56<sup>Lck</sup> tirozin kinaz enzim inhibitörü olarak tasarlanan indol türevlerinin bağlanma kapasitelerini incelemek için kullanılmıştır. 3-(Süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon ve bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol türevlerinin doking çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve Tablo 1-3'de gösterilmiştir. Atomlardan sorumlu hidrojen bağlarını gerçekleştirecek atomlara üstlü rakamlar verilmiştir (Şekil 4-6).

En düşük enerji seviyesinde en fazla H bağı yapan ve en küçük RMSD'e sahip maddenin, genel olarak enzim inhibisyonu için iyi bir aday olduğu düşünülmüştür. RMSD, ideal bir bileşiğin enzim aktif yöresine ne kadar uzaklıkta yerleştiğini ve ayrıca iki bileşiğin üst üste çakışabilme kabiliyetinin ne kadar olabildiğini göstermektedir. Bütün bileşiklerin benzer negatif doking (-11 ~ -28 kkal/mol) enerji seviyeleri, aktif yöreye bağlanabilmek için yeterince düşük değerlerdir. Tüm bileşiklerin RMSD değer aralığı 34-43 arasında bulunmuştur. Bu değerler de bileşiklerin üst üste çakışma ve aktif yöreye yerleşme kabiliyeti açısından normal kabul edilebilecek değerlerdir (15, 16).

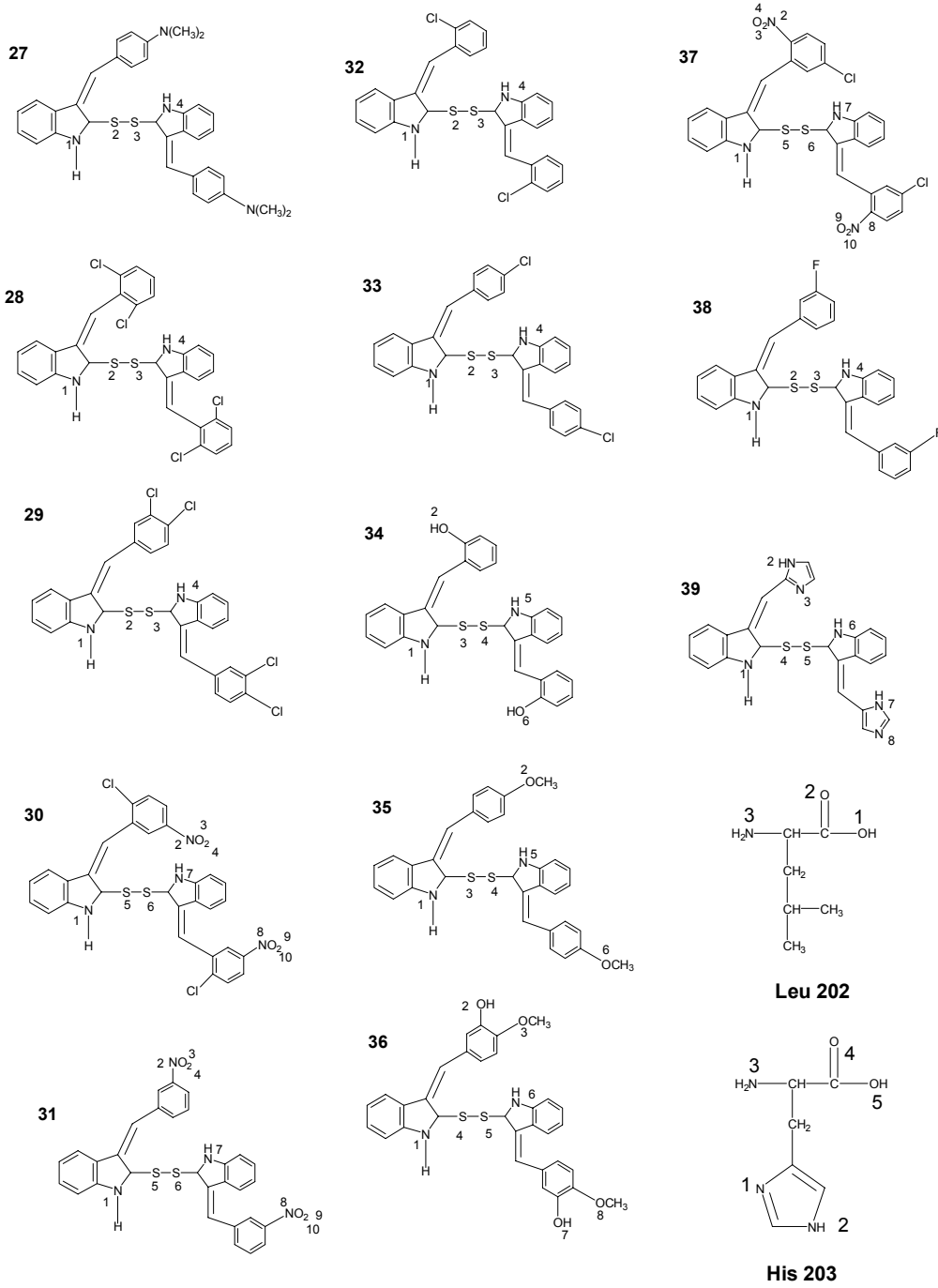




**Şekil 4.** Hidrojen bağı yapımından sorumlu olan atomlar: üstlü gösterilen rakamlar amino asitlerle hidrojen bağı yapan atomları ifade etmektedir.



**Şekil 5.** Hidrojen bağı yapımından sorumlu olan atomlar: üstlü gösterilen rakamlar amino asitlerle hidrojen bağı yapan atomları ifade etmektedir.



**Şekil 6.** Hidrojen bağı yapımından sorumlu olan atomlar: üstlü gösterilen rakamlar amino asitlerle hidrojen bağı yapan atomları ifade etmektedir.

3-(Süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on türevlerinin p56<sup>Lck</sup> enzimi ile etkileşimi sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 1'de yer almaktadır. Bileşiklerin hiçbirinin enzim aktif yöre

amino asitleri olan Leu 202 ve His 203 ile H bağı yapmadığı gözlenmiştir. Bileşiklerden **3** ve **9**, Glu 155; **10**, Pro 126; **11**, Leu 132; **13**, Glu 125 ile H bağı yapmıştır. Bu amino asitler aktif yöre amino asitlerine komşu olan diğer amino asitlerdir. Fakat gerek etkileşme enerjilerinin (-11 ~ -18 kkal/mol), gerekse RMSD (34 ~ 42) değerlerinin, güçlü aktivite gösteren bileşiklerde gözlenen kadar düşük düzeylerde olmaması, enzim aktif yöresine bağlanma açısından, normal etkileşme gösteren bileşikler olduklarını ortaya koymaktadır. Fakat hidrofobik etkileşimlerin de bileşiklerin enzim ile olan etkileşiminde önemli bir faktör olduğu göz önünde bulundurulursa, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on türevlerinde enzim ile etkileşim ve dolayısıyla biyolojik aktivite üzerine hidrofobik etkileşimlerin daha fazla rol oynamasının mümkün olabileceği düşünülmektedir.

**Tablo 1.** P56<sup>Lck</sup> enzim aktif yöresi ile etkileşen 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on türevlerinin doking sonuçları

Bileşik No	Enerji* (kkal/mol)	p56 <sup>Lck</sup> ile oluşan H bağı (mesafe Å)	RMSD (standart sapmanın kare kökü)
<b>3</b>	14. -16.66	14. N-2 with O-3 of Glu 155 (2.47)	34.79
<b>9</b>	21. -11.35	21. N-2 with O-4 of Glu 155 (2.33)	35.02
<b>10</b>	06. -18.46	06. N-2 with O-2 of Pro 126 (2.35)	43.07
<b>11</b>	09. -14.45	05. O-4 with O-4 of Leu 132 (2.94)	34.86
<b>13</b>	04. -18.51	04. N-2 with O-2 of Glu 125 (2.22)	42.70

\* Kolonda solda yer alan numaralar enzim ile etkileşimi H bağı yaparak gösteren molekülün sahip olduğu enerjinin kaçmıncı seviyede olduğunu göstermektedir.

3-(Süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon türevlerinin p56<sup>Lck</sup> ile etkileşiminin doking değerlendirme sonuçları Tablo 2’de yer almaktadır. Bu bileşiklerin tamamının aktif yöre amino asitleri olan Leu 202 ve His 203 ile hidrojen bağlarını 2. konumdaki S atomu üzerinden yaptıkları gözlenmiştir. Bileşik **15**, **16**, **18-20**, **23**, **24**, **26** dışındaki bileşikler, bu etkileşimi en düşük enerji seviyelerinde gerçekleştirmiştir. Bununla beraber, en düşük enerji seviyelerinin -13 ~ -19 kkal/mol arasında, RMSD değerlerinin ise 35 ~ 39 olması ve aktif yöre amino asitleri ile olan hidrojen bağlarının ~ 3 Å gibi uzun mesafede oluşması, bileşiklerin enzim aktif yöre amino asitlerine bağlanma kapasitelerinin çok da üstün olmadığını, fakat etkileşimlerinin diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında kabul edilebilir yeterlilikte olduğunu göstermiştir.

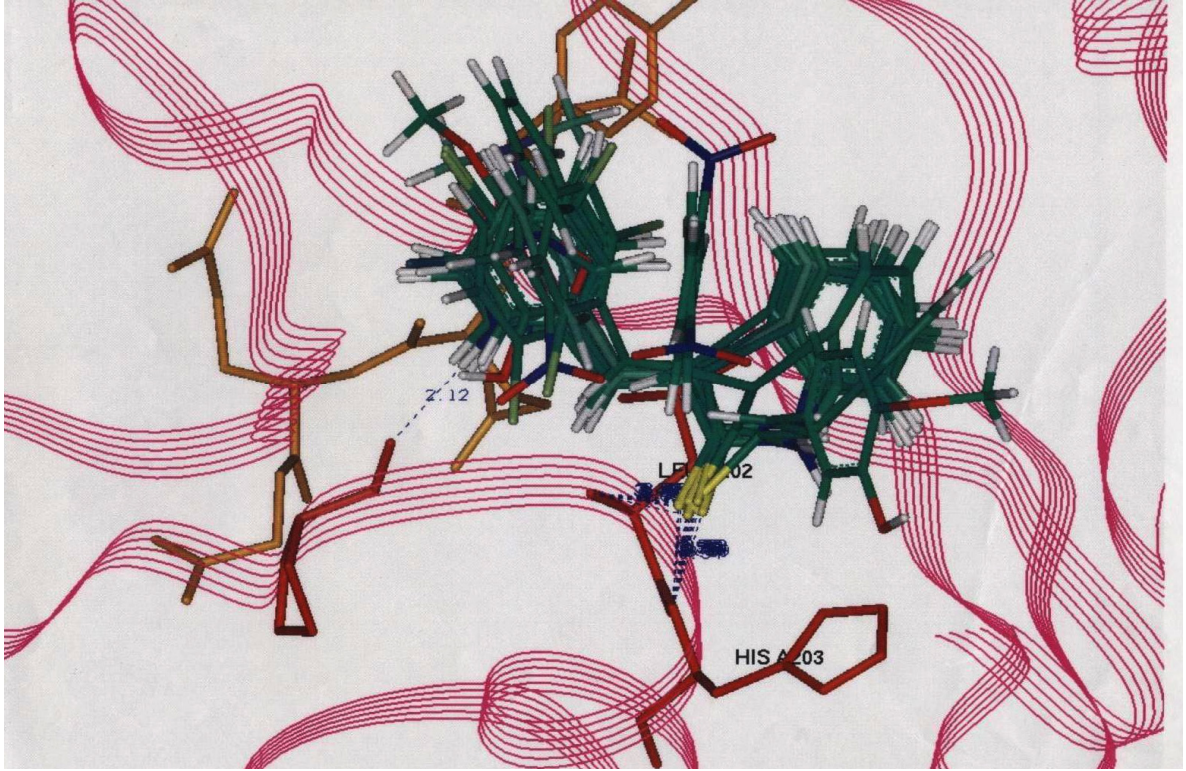
**Tablo 2.** P56<sup>Lck</sup> enzim aktif yöresi ile etkileşen 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon türevlerinin doking sonuçları

Bileşik No	Enerji* (kkal/mol)	p56 <sup>Lck</sup> ile oluşan H bağı (mesafe Å)	RMSD (standart sapmanın kare kökü)
14	01. -17.68	01. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.57) S-1 with N-3 of His 203 (3.51)	35.93
15	05. -15.56	05. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.43) S-1 with N-3 of His 203 (3.58)	36.70
16	02. -18.31	01. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.54) S-1 with N-3 of His 203 (3.63)	36.27
17	01. -18.77	01. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.51) S-1 with N-3 of His 203 (3.56)	35.92
18	03. -19.19	03. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.52) S-1 with N-3 of His 203 (3.59)	36.43
19	03. -17.47	03. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.62) S-1 with N-3 of His 203 (3.54)	36.45
20	03. -17.70	03. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.57) S-1 with N-3 of His 203 (3.55)	36.37
21	01. -17.92	01. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.51) S-1 with N-3 of His 203 (3.62)	36.47
22	01. -17.51	01. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.40) S-1 with N-3 of His 203 (3.48)	36.16
23	17. -13.76	01. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.55) S-1 with N-3 of His 203 (3.59)	39.68
24	06. -18.26	06. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.34) S-1 with N-3 of His 203 (3.52)	36.19
25	01. -17.98	01. S-1 with N-3 of Leu 202 (3.45) S-1 with N-3 of His 203 (3.57)	36.39
26	03. -19.56	03. S-1 with N-3 of His 203 (3.59) N-3 with O-2 of Pro 200 (2.12)	36.82

\* Kolonda solda yer alan numaralar enzim ile etkileşimi H bağı yaparak gösteren molekülün sahip olduğu enerjinin kaçmıcı seviyede olduğunu göstermektedir.

3-(Süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon bileşiklerinin tümünün, aktif yöre amino asitleri Leu 202 ve His 203 ile etkileşimi grafiksel olarak Şekil 7’de gösterilmiştir. Şekilde enzimin sadece aktif yöresi büyütülmüştür. İnhibitör bileşiklerin tamamı çubuk şeklinde ve yeşil renkte, aktif yöre amino asitleri Leu 202 ve His 203 ise çubuk şeklinde ve kırmızı renkte gösterilmiştir. Bileşiklerden **26**’nın aktif yöre komşusunda yer alan diğer bir amino asit Pro 200 ile 2.12 Å’lük mesafede hidrojen bağı oluşturduğu gözlenmiştir. Hidrojen bağı yapma açısından tüm bileşikleri karşılaştırdığımızda 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon bileşiklerinin tümünün aktif yöre amino asitleri ile H bağı yaptığı, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on bileşiklerinin

hiç yapmadığı ve bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol bileşiklerinin sadece birkaçının H bağı yaptığı gözlenmiştir. Bu nedenle 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon bileşiklerinin enzimle etkileşmeye diğer bileşiklerden daha güçlü bir şekilde girdiği ve aktif bileşikler olabilecekleri sonucuna varılmıştır.



**Şekil 7.** 3-(Süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon türevlerinin en düşük enerji seviyesinde p56<sup>Lck</sup> enzimi ile etkileşimi sonucu elde edilen ve üst üste çakıştırılan karşılaştırmalı grafikleri [indol türevleri (yeşil), aktif yöre amino asitleri (kırmızı)]

Tablo 3’de yer alan bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidro-indol bileşiklerinin doking sonuçları, bileşiklerden sadece **31**, **34**, **35**, **37** ve **38**’in aktif yöre amino asitleri Leu 202 ve His 203 ile etkileştiğini göstermiştir. Diğer türevlerin enzim aktif yöresine komşu çok çeşitli amino asitlerle etkileştiği gözlenmiştir. Enzim aktif yöre amino asitleri olan Leu 202 ve His 203 ile etkileşim, bileşiklerin enzim ile etkileşimlerini değerlendirmek açısından önemli olduğundan, bu tabloda diğer amino asitlerle oluşan H bağlarına yer verilmemiştir. Enzim ile etkileşim enerji değerleri (-12 ~ -28 kkal/mol) diğer grup bileşiklerden daha düşük bulunmuştur. Bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol bileşiklerinin hacimsel olarak çok büyük oldukları ve S atomlarının bağ yapma

yeteneklerinin bloke olması nedeniyle enzimle etkileşimde zayıf kaldıkları düşünülmektedir. RMSD değerlerinin 35 ~ 37 arasında olması, bu bileşiklerin aktif yöreye yerleşimlerinin diğer grup bileşikler ile aynı değerlerde olduğunu göstermiştir. 2 ~ 3 Å uzunluğunda oluşan H bağları ile diğer bileşiklere benzer şekilde enzim aktif yöre amino asitlerine bağlandıkları bulunmuştur. Fakat enzim ile H bağı yaparak etkileşim açısından, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on bileşiklerinden daha iyi durumda olmalarına rağmen 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon bileşiklerine göre zayıf kaldıkları sonucuna varılmıştır.

**Tablo 3.** P56<sup>Lck</sup> enzim aktif yöresi ile etkileşen bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol türevlerinin doking sonuçları

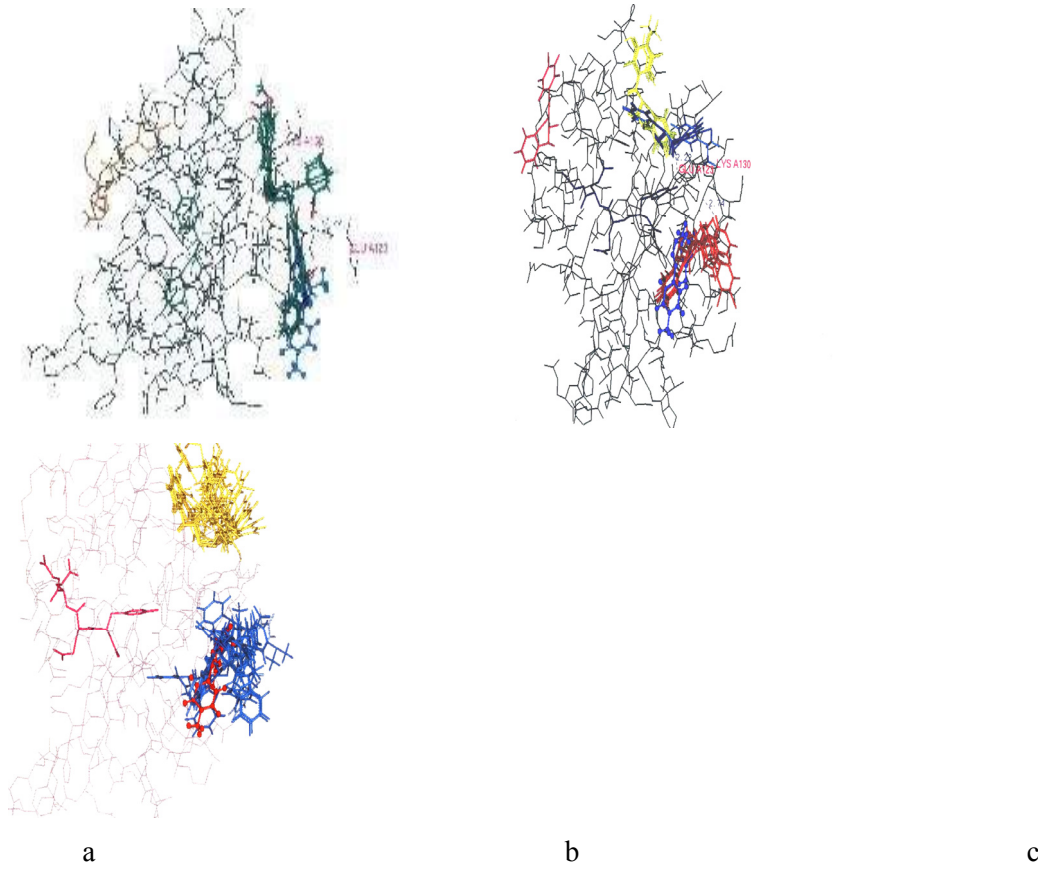
Bileşik No	Enerji* (kcal/mol)	p56 <sup>Lck</sup> ile oluşan H bağı (mesafe Å)	RMSD (standart sapmanın kare kökü)
31	18. -26.15	18. O-3 with O-5 of Glu 204 (2.47)	36.24
		S-6 with N-3 of His 203 (3.67)	
		S-6 with N-3 Leu 202 (3.60)	
34	15. -28.73	15. S-4 with N-3 of Leu 202 (3.67)	35.79
		O-6 with N-1 of His 203 (2.49)	
35	22. -12.53	22. S-4 with N-3 of Leu 202 (3.69)	36.89
		S-4 with N-3 His 203 (3.62)	
37	16. -23.79	16. S-6 with N-3 of His 203 (3.64)	37.96
		S-6 with N-3 of Leu 202 (3.59)	
38	22. -19.49	22. S-3 with N-3 of His 203 (3.62)	36.74
		S-3 with N-3 Leu 202 (3.58)	

\* Kolonda solda yer alan numaralar enzim ile etkileşimi H bağı yaparak gösteren molekülün sahip olduğu enerjinin kaçmıncı seviyede olduğunu göstermektedir.

Şekil 8'de p56<sup>Lck</sup> enziminin tüm yapısı ile birlikte her üç gruptaki bileşiklerin enzim ile etkileşim grafikleri ayrı ayrı yer almaktadır. Tasarladığımız enzim inhibitörü bileşiklerin en düşük enerji seviyelerinde enzim aktif yöresi ile etkileşimi, **PP1** ile karşılaştırmalı olarak bu grafiklerde yer almaktadır. 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on (grafik, a) ve 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon (grafik, b) bileşiklerinin hemen hemen tamamına yakını en düşük enerji seviyelerinde **PP1**'in bağlandığı aktif yöreye bağlanmışlardır. Bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol (grafik, c) türevlerinin yarıya yakını ise **PP1**'in bağlandığı yöreden daha uzakta bir yerde enzim ile etkileşime girmişlerdir.

Bileşiklerin aktivitelerinin en düşük enerji seviyelerinde gözleneceği varsayımını gözönüne aldığımızda, bileşiklerden 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon türevlerinin enzimin

aktif yöresine daha yakınlık gösterdikleri ve daha etkin bileşikler olabileceklerini söyleyebiliriz. Ayrıca 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on bileşiklerinin de bu bileşiklere benzer şekilde enzim aktif yöresine daha yakın olmaları ve daha fazla sayıda bileşiğin üst üste çakışarak **PP1**'a yakınlık göstermesi, aktif yöre amino asitleri ile hidrojen bağı yapmamalarına karşın, yine de biyolojik etkin bileşikler olabilecekleri ihtimalini ortaya koymaktadır. Şekil 7'de de görüldüğü gibi bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol türevlerinin boyutsal olarak çok büyük olmaları nedeniyle, en düşük enerji seviyelerinde aktif yöreye yakınlıklarının ve üst üste çakışma kabiliyetlerinin azaldığı söylenebilir.



**Şekil 8.** Doking çalışması ile p56<sup>Lck</sup> tirozin kinaz enzim inhibitörü olarak değerlendirilen ve 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-on (a), 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon (b) ve bistiyo 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol türevleri (c)

(a) PP1 (mavi, çubuk ve top modeli), indol-on türevleri (yeşil, çubuk modeli)

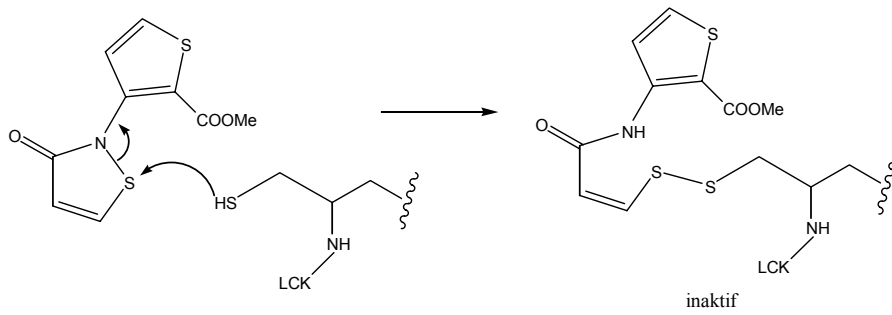
(b) PP1 (mavi, çubuk ve top modeli), indol-tiyon türevleri (kırmızı ve sarı, çubuk modeli)



(c) PP1 (kırmızı, çubuk ve top modeli), bistiyo indol türevleri (mavi ve sarı)

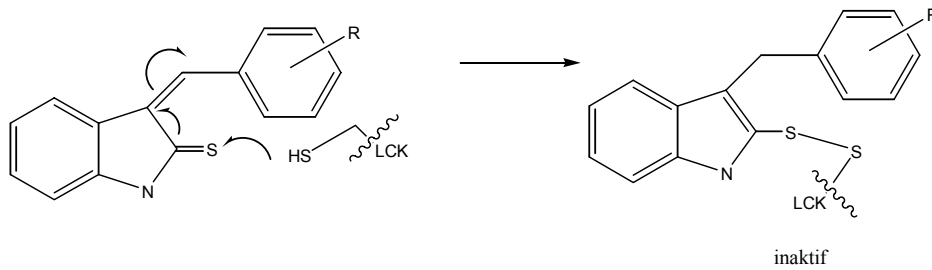
Üç grup bileşik arasında en düşük seviyede enzim aktif yöresi ile etkileşim, H bağı oluşturma ve aktif yörede üst üste çakıştırılabilme yetenekleri açısından genel bir değerlendirme yaptığımızda, 3-(süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon bileşiklerinin enzim ile etkileşimde daha üstün oldukları ve dolayısıyla daha aktif bileşikler olabilecekleri sonucuna varabiliriz.

Tirozin kinaz p56<sup>Lck</sup>'ın inhibisyon için çalışılan bileşiklerden izotiazolonların (9) enzim inhibisyon mekanizması incelenmiş ve p56<sup>Lck</sup> enziminin SH grubunun izotiazolon halkasının N-S bağına nükleofilik atak yaparak inaktif hale dönüştüğü bulunmuştur (Şekil 9).



Şekil 9. İzotiazolon türevi bileşiklerin p56<sup>Lck</sup> enzimini inhibe edici mekanizmaları

3-(Süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon türevlerinin, izotiazolon türevi bileşiklerinin p56<sup>Lck</sup> enzimini inhibe etme mekanizmalarına benzer şekilde, S atomu üzerinden bağlanma ile enzimi inaktive ederek farmakolojik aktivitelerini gösterecekleri düşünülmektedir. Şekil 10'da bu inhibisyonun olası mekanizması yer almaktadır. LCK enziminde yer alan amino asitlerin SH grupları, indolin halkasının 2. konumundaki S atomları ile bağ oluştururlar. Sonuç olarak, indolin halkasının indole dönüşümü ve S-S bağı oluşumu ile enzimin inaktif hale dönüşeceği düşünülebilir.



Şekil 10. 3-(Süstitüe-benziliden)-1,3-dihidroindol-2-tiyon bileşiklerinin p56<sup>Lck</sup> enzimini olası inhibe edici mekanizmaları

**Kaynaklar**

1. **Bridges A.J.** "Chemical Inhibitors of Protein Kinases" *Chem. Rev.*, **101**, 2541-2571 (2001).
2. **Traxler, P., Lydon, N.**, "Recent Advances in Protein Tyrosine kinase Inhibitors" *Drugs of the Future* **20** (12), 1261-1274 (1995).
3. **Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., Connelly, P.A.**, "Discovery of A Novel Potent, and Src Family-Selective Tyrosine Kinase Inhibitor" *J. Biol. Chem.* **271**, 695-701 (1996).
4. **Hamby, J.M., Showalter, H.D.H.**, "Small Molecule Inhibitors of Tumor Promoted Angiogenesis, Including Protein Kinase Inhibitors" *Pharmacol. Ther.* **82**, 169-193 (1999).
5. **Noonberg, S.B., Benz, C.C.**, "Tyrosine Kinase Inhibitors Targeted to the Epidermal Growth Factor Receptor Subfamily" *Drugs*, **59**, 753-767 (2000).
6. **Li, Z.-H., Burke, T.R., Bolen, J.B.**, "Analysis of Styryl-Based Inhibitors of the Lymphocyte Tyrosine Protein Kinase p56<sup>Lck</sup>" *Biochem. Biophysical Res. Commun.*, **180** (2), 1048-1056 (1991).
7. **Eck, M.J., Atwell, S.K., Shoelson, S.E., Harrison S.C.**, "Structure of the Regulatory Domains of the Src-Family Tyrosine Kinase Lck" *Nature*, **368**, 764-769 (1994).
8. **Burke, T.R., Lim, B., Marquez, V.E., Li, Z.-H., Bolen, J.B.**, "Bicyclic Compounds as Ring-constrained Inhibitors of Protein-Tyrosine Kinase p56<sup>Lck</sup>" *J. Med. Chem.*, **36** (4), 425-432 (1993).
9. **Trevillyan, J.M., Chiou X.G., Ballaron, S.J., Tang, Q.M., Buko, A., Sheets, M.P., Smith, M.L., Putman, C.B., Wiedeman, P., Tu, N., Madar, D., Smith, H.T., Gubbins, E.J., Warrior, U.P., Chen, Y.-W., Mollison, K.W., Faltynek, C.R., Djuric, S.W.**, "Inhibition of p56<sup>Lck</sup> Tyrosine Kinase by Isothiazolone" *Arch. Biochem. Biophysics*, **364** (1), 19-29 (1999).
10. **Zhu, X., Kim, J.L., Newcomb, J.R., Rose, P.E., Stover, D.R., Toledo, L.M., Zhao, H., Morgenstern, K.A.** "Structural Analysis of the Lymphocyte-Specific Kinase Lck in Complex with Non-Selective and Src Family Selective Kinase" *Structure*, **7**, 651-661 (1999).
11. **Fong, T.A.T., Shawver, L.K., App, H., Sun, L., Tang, C., Rice, A., Kim, Y.H., Schreck, R., Chen, J., Dowd, B., Suto, E., Vasile, S., Wang, X., Hirth, K.P., McMahon, G.**, "SU5416: A Potent and Selective Flk-1/KDR Kinase Inhibitor that Blocks Flk-1 Phosphorylation, Endothelial Cell Mitogenesis, and Tumor Growth" *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **39**, 560 (1998).

12. Sun, L., Tran, N., Liang, C., Hubbard, S., Tang, F., Lipson, K., Schreck, Y., Zhou, Y., McMahon, G., Tang, C., "Identification of Substituted 3-[(4,5,6,7-Tetrahydro-1H-indol-2-yl)methylene]-1,3-dihydroindol-2-ones as Growth Factor Receptor Inhibitors for VEGF-R2 (Flk-1/KDR), FGF-R1 and PDGF-R  $\beta$  Tyrosine Kinases" *J. Med. Chem.* **43**, 2655-2663 (2000).
13. Olgen, S., Akaho, E., Nebioğlu, D. "Synthesis and Anti-Tyrosine Activity of 3-(Substituted-Benzylidene)-1, 3-Dihydro-Indolin Derivatives: Investigation of Their Role Against p60<sup>c-Src</sup> Receptor Tyrosine Kinase with the Application of Receptor Docking Studies" *Il Farmaco*, **60**, 497-506 (2005).
14. Ewing, T.J.A., Kuntz, I.D. "Critical Evaluation of Search Algorithms for Automated Molecular Docking and Database Screening" *J. Comput. Chem.* **18**, 1175-1189 (1997).
15. Ewing, T.J.A., Makino, S., Skillman, A.G., Kuntz, I.D. "DOCK 4.0: Search Strategies for Automated Molecular Docking Flexible Molecular Databases" *J.Comp.-Aided Mol. Des.*, **15**, 411-428 (2001).
16. Kuntz, I.D., "DOCK 4.0" University of California, San Francisco (1998).
17. Akaho, E., Fujikawa, C., Runion, H. I., Hill, C.R., Nakaho, H. "A Study on Docking Mode of HIV Protease and Their Inhibitors" *J. Chem. Software*, **5**, 147 -162 (1999).
18. Meng, E.C., Shoichet, B.K., Kuntz, I.D., "Automated Docking with Grid-Based Energy Evaluation" *J. Comp. Chem.*, **13 (4)**, 505-524 (1992).
19. Lyne P.D., "Structure-based Virtual Screening: An Overview" *Drug Discovery Today*, **7 (20)**, 1047-1055 (2002).

Received: 26.05.2006

Accepted: 14.06.2006