



ANTI-APOPTOTİK PROTEİN İÇİN YENİ İNHİBİTÖRLERİN İN-SİLİKO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF NEW INHIBITORS FOR ANTI-APOPTOTIC PROTEIN BY IN-SILICO METHODS

Mehmet Altay UNAL^{1*} 

¹Ankara Üniversitesi, Kök Hücre Enstitüsü, 06520, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu araştırma makalesinin amacı, terapötik müdahale için yeni yollar keşfetmek üzere in-siliko yöntemler kullanarak anti-apoptotik protein inhibitörlerini incelemektir. Bununla birlikte ilaç keşif süreçlerini hızlandırmada hesaplamalı yaklaşımların potansiyelini vurgulamakta ve daha fazla deneysel doğrulama için umut verici adayları belirlemek için uygun maliyetli ve zaman açısından verimli bir strateji sunmayı hedeflemektedir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, önemli anti-apoptotik proteinleri hedef alan potansiyel inhibitörleri belirlemek için gelişmiş hesaplama teknikleri kullanılmıştır. Moleküler yerleştirmeden yararlanarak, hedef proteinlerle bağlanma ilgileri ve etkileşim modellerini tespit etmek için çeşitli kimyasal kütüphaneleri sistematik olarak taranmıştır. Çalışma, potansiyel ilaç adaylarının tasarımını optimize etmek için bu etkileşimlerin yapısal inceliklerini aydınlatmaya odaklanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Bulgularımız, yüksek bağlanma afiniteleri ve uygun farmakokinetik özelliklere sahip umut verici öncü bileşikler ortaya çıkarmakta ve bunları daha fazla deneysel doğrulama için aday olarak sunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen hesaplamalı içgörüler, anti-apoptotik protein inhibitörleri hakkındaki artan bilgi birikimine katkıda bulunmakla kalmayıp, aynı zamanda anormal apoptotik düzenleme ile karakterize edilen hastalıklarla mücadelede yeni terapötiklerin rasyonel tasarımı için bir temel sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Anti-apoptotik protein, inhibitör, in-siliko

ABSTRACT

Objective: The aim of this research article is to study anti-apoptotic protein inhibitors using in-silico methods to discover new avenues for therapeutic intervention. It also highlights the potential of computational approaches in accelerating drug discovery processes and aims to provide a cost-effective and time-efficient strategy to identify promising candidates for further experimental validation.

Material and Method: In this study, advanced computational techniques were used to identify potential inhibitors targeting important anti-apoptotic proteins. Taking advantage of molecular docking, various chemical libraries were systematically screened to detect binding interests and interaction patterns with target proteins. The study focused on elucidating the structural subtleties of these interactions to optimize the design of potential drug candidates.

Result and Discussion: Our findings reveal promising lead compounds with high binding affinities and favorable pharmacokinetic properties and present them as candidates for further experimental

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Mehmet Altay Unal
e-posta / e-mail: mehmetaltayunal@gmail.com, Tel. / Phone: +905339228714

Gönderilme / Submitted : 31.12.2023

Kabul / Accepted : 28.02.2024

Yayınlanma / Published : 20.05.2024

validation. The computational insights obtained in this study not only contribute to the growing body of knowledge on anti-apoptotic protein inhibitors, but also provide a basis for the rational design of novel therapeutics to combat diseases characterized by abnormal apoptotic regulation.

Keywords: Anti-apoptotic protein, inhibitor, in-silico

GİRİŞ

Anti-apoptotik protein BCL-2, programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. BCL-2'nin Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonunu kısıtlayarak apoptozu engellediği bulunmuştur [1]. Ayrıca, anti-apoptotik BCL-2 ve pro-apoptotik Bax arasındaki denge apoptoz indüksiyonunun düzenlenmesi için gereklidir [2]. Çalışmalar ayrıca BCL-2'nin endoplazmik retikulumda kalsiyum homeostazının korunmasında rol oynadığını ve düşük hücre dışı Ca^{2+} 'nin antiapoptotik etkisini azalttığını göstermiştir, bu da sitozolik Ca^{2+} yükselmesinin optimal ER havuzu dolumu ve BCL-2 tarafından apoptoz inhibisyonu için gerekli olabileceğini düşündürmektedir [3]. Ayrıca, Bim/Bcl-2 dengesinin naif ve hafızalı T hücresi homeostazını korumak için kritik olduğu tespit edilmiş ve BCL-2'nin bağışıklık hücresi düzenlemesindeki önemi vurgulanmıştır [4]. Dahası, BCL-2'nin mikroRNA'lar tarafından düzenlenmesi çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Örneğin, yukarı regüle miR-1183'ün BCL-2 ailesindeki apoptoz proteinlerinin dengesini bozduğu, romatizmal kalp hastalığı bağlamında apoptoz kaskad reaksiyonlarının artmasına ve anti-apoptoz etkilerinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir [5]. Ayrıca, BCL-XL ve MCL-1 anti-apoptotik proteinlerinin ikili inhibisyonunun kanser hücrelerinin sitotoksitesini artırdığını gösteren çalışmalarla BCL-2'yi hedeflemenin terapötik potansiyeli araştırılmıştır [6]. Ayrıca, BCL-2'nin diğer proteinlerle etkileşimi de araştırılmıştır. Örneğin, BCL-2'nin BCL-2 benzeri bir şekilde işlev gören bir dizi sadece BH3 proteinini ve aktif Bax'ı bağladığı ve nötralize ettiği bulunmuştur [7]. Ayrıca, ülseratif kolitin iltihaplı kolon mukozasında Bax'ın aşağı regülasyonu, BCL-2'nin antiapoptotik etkisine karşı koyma ile ilişkilendirilmiştir [8]. Sonuç olarak, BCL-2 apoptozun önemli bir düzenleyicisidir ve diğer proteinler ve mikroRNA'lar ile karmaşık etkileşimleri, bağışıklık hücresi homeostazı, kanser ve kalp hastalığı dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

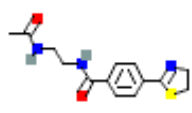
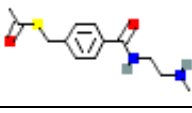
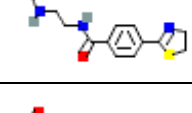
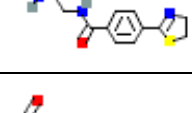

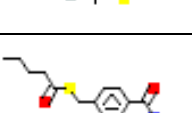
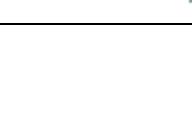
Anti-apoptotik proteinin yapısı (PDB ID: 7YB7) PDB veritabanından indirilmiştir. Molekül yapılarının benzerliği PubCHEM veritabanından araştırılmış benzerlik oranı %93 olacak şekilde ayarlanmıştır. (Tablo 1). Protein yapısının indirilmesi ve temizlenmesi için Biovia Discovery Studio program [9] kullanılmıştır. Docking analizi için Autodock [10] yazılımı ile vina [11] ve vinaro [12] kuvvet alanları, DFT hesabında ise Gaussian [13] programı kullanılmıştır (Versiyon G09), DFT hesaplarının görselleştirmesinde Gausview5 [14] programı kullanılmıştır. Ligandların 3 boyutlu yapıları pubchem sitesinden indirilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Tablo 2'de görüldüğü gibi, docking sonuçlarına göre bağlanma enerjisi en düşük olan molekül (4R)-2-(2-benzamidopropan-2-il)-N-metil-4,5-dihidro-1,3-tiyazol-4-karboksamid (PubChemID: 11141281)'dir. Tablo incelendiğinde, Anti-apoptotik protein ait PDB ID: 7YB7 yapısında bulunan inhibitorün (PubChem ID: 168654843) bağlanma enerjisi -6.5 kcal/mol iken benzerlik taramasında göre bulunan (4R)-2-(2-benzamidopropan-2-il)-N-metil-4,5-dihidro-1,3-tiyazol-4-karboksamid (PubChem ID: 11141281) adlı molekülün bağlanma enerjisi -6.8 kcal/mol olarak bulunmuştur. Docking sonuçlarının analizinde sadece bağlanma enerjisini dikkate almak yanıltıcı sonuçlar doğurabilir. Sadece docking skoruna göre yapılan analizler protein-ligand etkileşimi hakkında sınırlı bilgi erişimi sağlar. Bu sınırlılıktan kaçınmak için çalışmaya konu olan protein ile 168654843 ve 11141281 ID'li moleküllere ait ayrıntılı etkileşim analizleri yapılmıştır. Şekil 1'e göre, 168654843 ID'li molekül TYR130 rezidüsü ile hidrojen ve Pi bağı, TYR77 rezidüsü ve ALA81 rezidüsü ile de Pi-Alkyl bağı yapmaktadır (Şekil 2A ve 2B). SAS analiziyle bakıldığında (Şekil 2C) bağ kurulan bu bölgelerin su ile etkileştiği, bağ kuran bölgelerin su ile etkileşme ihtimallerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum 80, 84, 85, 88, 89,

92, 126 ve 129 no'lu rezidüleriyle olan van der Waals etkileşimlerinin etkisini azaltmaktadır. 11141281 ID'li bileşik ile olan etkileşim incelendiğinde LEU87 rezidüsü ile hidrojen ve alkil etkileşimleri olduğu görülmektedir. MET65 rezidüsü ile kurulan pi-Sulfur etkileşiminin bağlanma enerjisine büyük katkısı olduğu görülmektedir. ALA99, ARG96, VAL83 rezidüleriyle Pi-Alkyl etkileşimleri bulunmaktadır. TYR58, GLU86 ve GLU64 rezidüleri van der Waals etkileşimleri içerisindedir. SAS analizi yapıldığında, bağların yoğun olduğu aromatik halka'nın proteinin SAS değeri düşük kısmıyla etkileştiği görülmektedir. Bağ yapılan bölge su ile daha az temas ettiği için kurulan etkileşime nispeten daha güçlü olmaktadır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan moleküllerin yapıları, molekül formülleri, moleküler ağırlıkları ve 2D gösterimleri

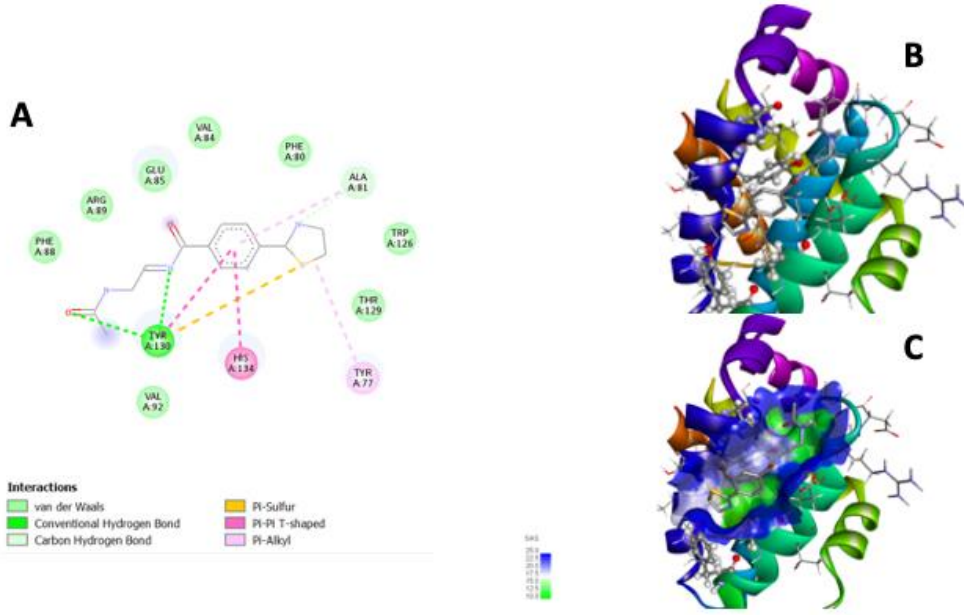
Molekül	MF*	MA**	2D Yapısı	PubChem ID
<i>N</i> -(2-asetamidoetil)-4-(4,5-dihidro-1,3-tiyazol-2-il)benzamid	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₂ S	291.37 g/mol		168654843
<i>S</i> -[[4-[2-(metilamino)etilkarbamoyl]-fenil]metil] etanetiyoat ***	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂ S	266.36 g/mol		156074004
<i>S</i> -[[4-(2-aminoetilkarbamoyl)-fenil]metil] etanetiyoat	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	252.33 g/mol		156038047
<i>S</i> -[[4-(2-aminoetilkarbamoyl)-fenil]metil] pentanetiyoat	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂ S	294.4 g/mol		146404377
<i>N</i> -(2-asetamido-etil)-4-etilsulfanil-metil)benzamid	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₂ S	280.39 g/mol		119041195
(4 <i>R</i>)-2-(2-benzamidopropan-2-il)- <i>N</i> -metil-4,5-dihidro-1,3-tiyazol-4-karboksamit	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₂ S	305.4 g/mol		11141281
2-[[4-(Pentanoilsulfanil-metil)benzoil]amino]etilazanium	C ₁₅ H ₂₃ N ₂ O ₂ S ⁺	295.4 g/mol		167587006

* Molekül Formülü ** Molekül Ağırlığı

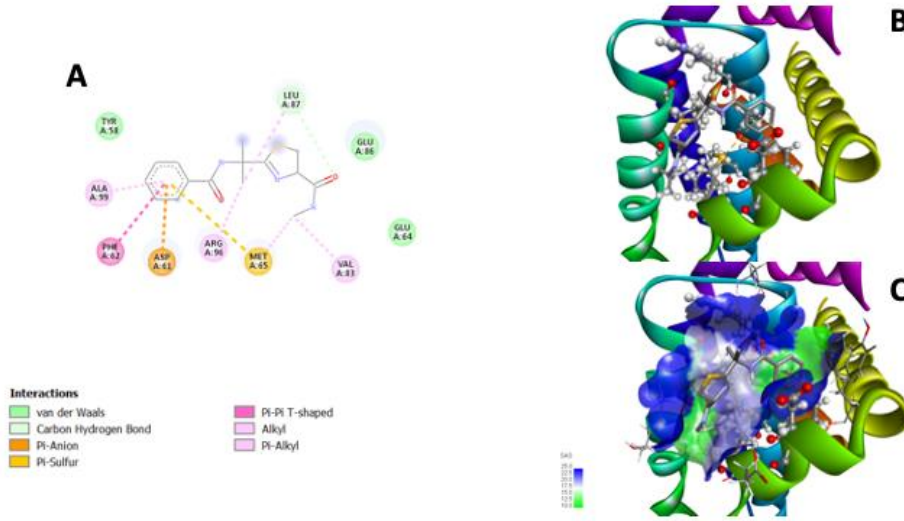
Docking Sonuçlarının Analizi

Tablo 2. Çalışmada kullanılan moleküllerin docking skorları

Ligand (PubChem ID)	Bağlanma Affinitesi kcal/mol (Vina)	Bağlanma Affinitesi kcal/mol (Vinaro)
11141281	-6.882	-5.786
168654843	-6.502	-5.043
167587006	-6.001	-4.615
119041195	-5.83	-4.812
156074004	-5.712	-4.952
156038047	-5.588	-4.766
146404377	-5.52	-4.269



Şekil 1. 168654843 ID'li molekülün docking sonuçlarının 2 boyutlu (A), 3 boyutlu (B) ve SAS gösterimi (C)

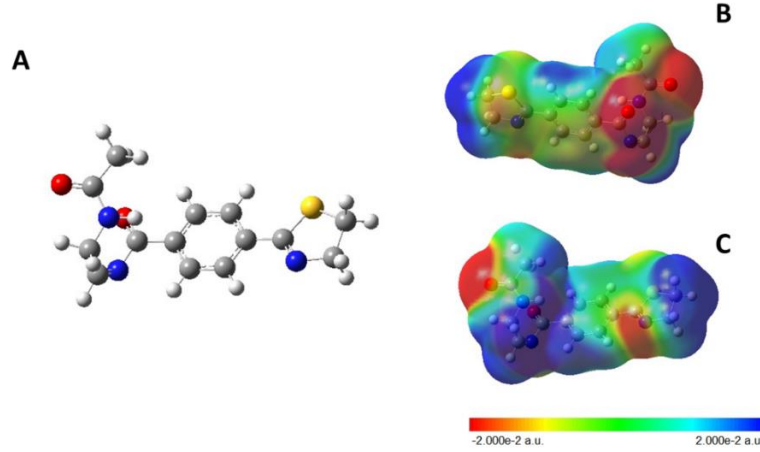


Şekil 2. 11141281 ID'li molekülün docking sonuçlarının 2 boyutlu (A), 3 boyutlu (B) ve SAS gösterimi (C)

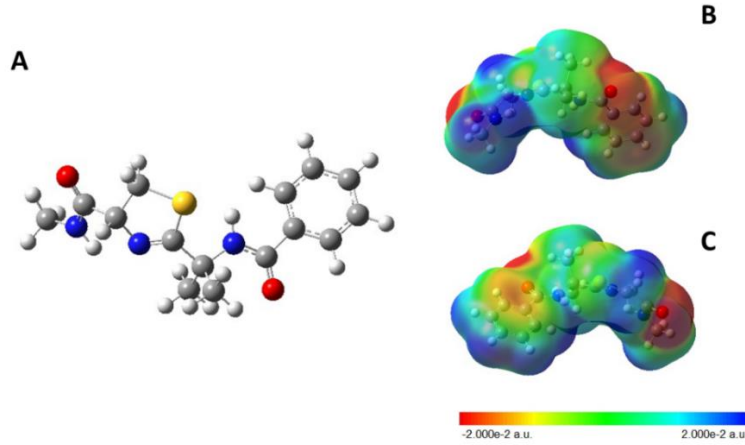
168654843 ve 11141281 ID'li Moleküllerin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Analizi

Yapılan DFT hesapları ile her iki yapı da ayrıntılı olarak incelenmiştir. 168654843 ID'li molekülün polar olduğu tespit edilmiş ve dipol momentini 6.441854 Debye ve optimizasyon enerjisi -1255.417971 Hartree olarak hesaplanmıştır. Şekil 3A'da 168654843 ID'li molekülün optimizasyon sonucu elde edilmiş kararlı yapısı görülmektedir. Moleküle ait elektrostatik yük haritası önden Şekil 2B ve arkadan Şekil 3C'de hesaplanmıştır. Oksijenin bulunduğu bölgede elektron donörü olarak davranma eğiliminin yüksek olduğu görülmektedir. 2 boyutlu docking etkileşiminde de görüldüğü gibi bu bölge protein ile hidrojen bağı kurmaktadır. Molekülün mavi kısımlarının donör olarak davranma potansiyelinin; özellikle nitrojen atomlarının bulunduğu bölgede yüksek olduğu görülmektedir. 11141281 ID'li molekülün DFT hesapları sonucunda (Şekil 4) bu molekülün de diğeri gibi polar olduğu

tespit edilmiştir. Dipol momenti 1.058436 Debye ve optimizasyon enerjisi-1295.963944 Hartree olarak hesaplanmıştır. Optimizasyon enerjisi değerine göre 11141281 ID'li molekülün diğerine göre daha kararlı olduğunu söyleyebiliriz. Elektrostatik yük haritası değerlendirmesine göre 11141281 ID'li molekül de hem donör hem de akseptör olarak davranma özelliğine sahiptir. Ancak, bu molekülün negatif yüzeyi nispeten küçük olduğu için akseptör olarak davranma kabiliyeti diğer moleküle göre daha azdır (Şekil 4B ve 4C).

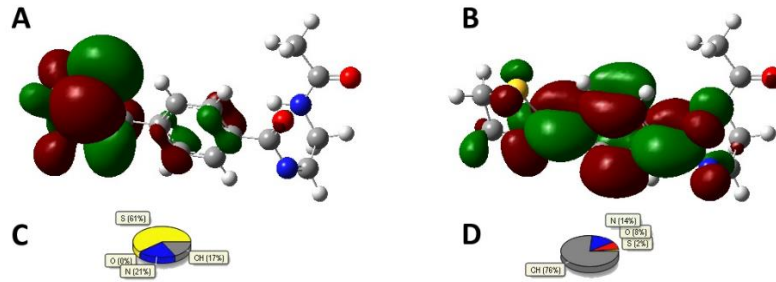


Şekil 3. 168654843 ID'li moleküle ait optimize yapı (A), Elektronik yük yoğunluğu haritasının önden (B) ve arkadan (C) görüntüsü

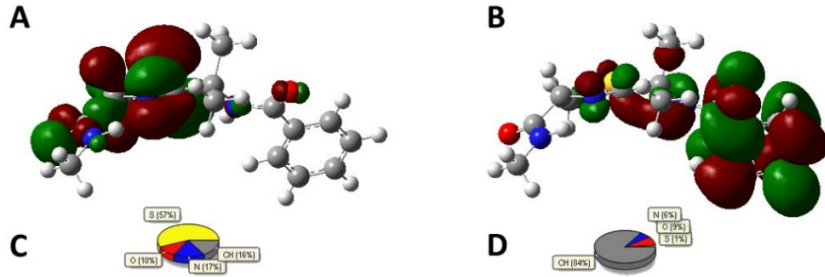


Şekil 4. 11141281 ID'li moleküle ait optimize yapı (A), Elektronik yük yoğunluğu haritasının önden (B) ve arkadan (C) görüntüsü

Moleküler düzeyde yapılan HOMO-LUMO etkileşimlerinin incelenmesinde ise 168654843 ID'li molekülde yükün, molekülün orta yerinde lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 5A ve 5B). Bu durum etkileşimin etkinliğini azaltmaktadır. Bu molekülün HOMO orbitallerinde aktif olan fragmentler Kükürt, Azot ve Karbon elementleridir (Şekil 5C). 11141281 ID'li molekülde, molekül için yük transferi olduğu görülmektedir (Şekil 6A ve 6B). Başta bir deyişle molekül içi yük hareketliliği bu molekülde daha fazladır. Burada valans bandından iletkenlik bandına daha hızlı elektron aktarılmakta ve molekül polarizasyonunu korumaktadır. Bu durum etkileşme anında, etkileşmenin etkinliğini arttırmaktadır ki bu da docking etkileşme enerjilerinin verildiği Tablo1 kapsamında gösterilmiştir. Bu molekülün HOMO orbitallerinde aktif fragmentler Kükürt, Azot, Karbon ve diğer molekülden farklı olarak Oksijen'dir (Şekil 6C). Bu da molekülün Oksijen atomlarının da akseptör olarak davranmasına neden olmaktadır. Bu davranış afinite değerini, diğer moleküle göre arttırmakta ve Tablo 1'deki değerini açıklamaktadır.



Şekil 5. 168654843 ID'li moleküle ait HOMO (A), LUMO (B) ve HOMO Fragment (C) ve LUMO (D) Fragment gösterimi



Şekil 6. 11141281 ID'li moleküle ait HOMO (A), LUMO (B) ve HOMO Fragment (C) ve LUMO (D) Fragment gösterimi

Sonuç olarak, anti-apoptotik protein inhibitörlerine yönelik *in-siliko* araştırmamız, düzensiz apoptotik süreçlerle kendini gösteren hastalıklarda terapötik müdahale için potansiyel yollara ilişkin değerli bilgiler sağlamıştır. Bu çalışmada kullanılan hesaplama yöntemleri ile önemli anti-apoptotik proteinlere karşı umut verici inhibitör özelliklere sahip yeni bileşiklerin tanımlanması ve karakterizasyonu gösterilmiştir. Moleküler etkileşimlerin, moleküler yerleştirme ve dinamik simülasyonları yoluyla sistematik analizi, inhibitörler ve hedef proteinler arasındaki etkileşimi yöneten karmaşık bağlanma modellerin ve yapısal farkların ayırt edilmesi sağlanmıştır. Bu yaklaşım, gelişmiş farmakokinetik profillere sahip güçlü ve seçici inhibitörlerin rasyonel tasarımı için kritik önem taşımaktadır. Yüksek bağlanma afinitesine sahip öncü bileşiklerin tanımlanması, deneysel doğrulama için öncül bilgiler sunarak, hesaplama tahminlerinin somut farmasötik çözümlere dönüştürülmesinin önünü açmaktadır. Hesaplama yöntemlerinin çıktıları deneysel çalışmalar ile tamamlandığında, daha verimli ve kolaylaştırılmış bir ilaç keşif sürecine olanak sağlamaktadır. Hesaplamalı biyologlar, tıbbi kimyagerler ve deneysel biyologlar arasındaki işbirliği, *in-siliko* bulguların klinik olarak ilgili terapötiklere başarılı bir şekilde dönüştürülmesinin anahtarıdır. Ayrıca, biyolojik sistemlerin dinamik yapısı, öngörülmesi doğruluklarını artırmak için hesaplama modellerinin ve yöntemlerinin sürekli olarak iyileştirilmesini gerektirmektedir. Bu araştırma, sadece anti-apoptotik protein inhibisyonunun anlaşılmasına katkıda bulunmakla kalmayıp, aynı zamanda ilaç keşfini hızlandırmada *in-siliko* metodolojilerinin daha geniş potansiyele sahip olduğunu da altını çizmektedir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.A.U.; Tasarım: M.A.U.; Denetim: M.A.U.; Kaynaklar: M.A.U.; Malzemeler: M.A.U.; Veri Toplama ve/veya İşleme: M.A.U.; Analiz ve/veya Yorumlama: M.A.U.; Literatür Taraması: M.A.U.; Makalenin Yazılması: M.A.U.; Kritik İnceleme: M.A.U.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

ETİK KURUL ONAYI

Yazar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Adams, J., Cory, S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, 19(5), 488-496. [\[CrossRef\]](#)
2. Li, Y., Zhang, S., Geng, J., Hu, X. (2013). Curcumin inhibits human non-small cell lung cancer a549 cell proliferation through regulation of bcl-2/bax and cytochrome c. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(8), 4599-4602. [\[CrossRef\]](#)
3. He, H., Lam, M., McCormick, T., Distelhorst, C. (1997). Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by bcl-2. *The Journal of Cell Biology*, 138(6), 1219-1228. [\[CrossRef\]](#)
4. Wojciechowski, S., Tripathi, P., Bourdeau, T., Acero, L., Grimes, H., Katz, J., Hildeman, D. (2007). Bim/bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory t cell homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1665-1675. [\[CrossRef\]](#)
5. Li, N., Zhu, L., Zhou, H., Zheng, D., Xu, G.L.S., Shao, G. (2020). Mirna-1183-targeted regulation of bcl-2 contributes to the pathogenesis of rheumatic heart disease. *Bioscience Reports*, 40(11). [\[CrossRef\]](#)
6. Rahman, S., Azlan, A., Lo, K., Azzam, G., Mohana-Kumaran, N. (2022). Dual inhibition of anti-apoptotic proteins bcl-xl and mcl-1 enhances cytotoxicity of nasopharyngeal carcinoma cells. *Discover Oncology*, 13(1). [\[CrossRef\]](#)
7. Westphal, D., Ledgerwood, E., Tyndall, J., Hibma, M., Ueda, N., Fleming, S., Mercer, A. (2009). The orf virus inhibitor of apoptosis functions in a bcl-2-like manner, binding and neutralizing a set of bh3-only proteins and active bax. *Apoptosis*, 14(11), 1317-1330. [\[CrossRef\]](#)
8. Iimura, M., Nakamura, T., Shinozaki, S., Iizuka, B., Inoue, Y., Suzuki, S., Hayashi, N. (2000). Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut*, 47(2), 228-235. [\[CrossRef\]](#)
9. BIOVIA, Dassault Systèmes, [Discovery Studio], [2022], San Diego: Dassault Systèmes, [2022]
10. Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791. [\[CrossRef\]](#)
11. Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791. [\[CrossRef\]](#)
12. Quiroga, R., Villarreal, M.A. (2016). Vinardo: A scoring function based on autodock vina improves scoring, docking, and virtual screening. *PLOS ONE*, 11(5), e0155183. [\[CrossRef\]](#)
13. Frisch, M.J. (2009) Gaussian 09, Revision B. 01. Gaussian, Inc., Wallingford.
14. Nielsen, A.B., Holder, A.J. (2009) Gauss View 5.0, User's Reference. GAUSSIAN Inc., Pittsburgh.