

Moleküler Kenetlenme Simülasyonları ile Yeni Aday BACE-1 İnhibitörü Tasarımı

Vildan Enisoğlu Atalay^{1*} , Arzu Dalyancı² 

¹Hesaplamalı Bilim ve Mühendislik Anabilim Dalı, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

²Tıbbi Sistem Biyolojisi Anabilim Dalı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.

*enisogluatalayv@itu.edu.tr

Özet

Dünyadaki yaşlı nüfusta görülen artış Alzheimer hastalığının daha yaygın bir hale gelmesine neden olmuştur. Alzheimer hastalığı birden fazla sistemin anormallığı ve bozukluğu ile ilgilidir, patogenezi karmaşık olası sebebi ile önlemek ve tedavi etmek için şu an kullanılan ideal bir ilaç yoktur ve ilaç araştırmaları devam etmektedir. İlgili çalışmada, Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan BACE-1 enziminin 2WJO pdb id kodlu kristal yapısı ile lupeol molekülü ve 32 adet yeni tasarlanan Lupeol türevi ile Autodock Vina yazılımı kullanılarak kenetlenme çalışmaları yapılmıştır. Bu bağlamda öncelikle, Lupeol ve türevlerinin konformerleri ve geometrik optimizasyonları Spartan'16 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Discovery Studio Visualer yazılımında ise görselleştirmeler yapılarak protein ve ligandlar arasındaki etkileşim haritaları çizilmiştir. Kenetlenme çalışmaları sonucunda, Lupeol yapılarından daha yüksek bağlanma enerjilerine sahip L-28, L-23, L-27 ve L-31 olmak üzere dört molekül belirlenmiştir. Yapılan türevlendirme çalışmalarında aktif bölge için daha hidrofilik yapıların tasarımının daha iyi bağlanma afinitesi verdiği tespit edilmiştir. İlgili moleküllerin deneysel olarak incelenmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, Kenetlenme, Lupeol, BACE-1, AutoDock Vina

Design of A New Candidate BACE-1 Inhibitor with Computational Chemistry Method in The Treatment of Alzheimer's Disease

Abstract

In recent years, the incidence of Alzheimer's disease has increased with the increase in the elderly population all over the world. Alzheimer's disease is related to the abnormality and disorder of more than one system; its pathogenesis is complex. Therefore, there is no ideal drug currently used to prevent and treat Alzheimer's, and many studies on Alzheimer's are ongoing. In the related study, docking studies were performed with the 2WJO pdb id coded crystal structure of the BACE-1 enzyme, which is associated with Alzheimer's disease, with the Lupeol molecule and 32 newly designed Lupeol derivatives using Autodock Vina software. In this context, first of all, conformers and geometric optimizations of Lupeol and its derivatives were performed with Spartan'16 software. On the other hand, visualizations and interaction maps between proteins and ligands were made by the Discovery Studio Visualizer software. As a result of docking studies, four molecules as L-28, L-23, L-27, and L-31, with higher binding energies than Lupeol structures are determined. In the derivatization studies, it has been determined that the design of more hydrophilic structures for the active site gives better binding energy. Experimental examination of the relevant molecules is recommended.

Keywords: Alzheimer, Docking, Lupeol, BACE-1, AutoDock Vina

1. GİRİŞ

Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından ilk kez 1906 yılında tanımlanan Alzheimer hastalığı (Alzheimer's Disease, AD) kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. AD, nöronal kayıp, beyin atrofisi ve ilerleyici demans ile karakterize edilmiştir. Dünya çapında en yaygın nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer, bu hastalığa sahip olan vakaların ölüm nedenlerinde yaklaşık olarak %70'ini oluşturmaktadır. Dünya üzerinde 2015 yılında tahmini Alzheimer hastalığının sayısı 46.8 milyon iken, bu sayının 2050'de 131.5 milyona çıkması öngörülmekte bu da sosyal ve mali yük-te önemli bir artış olacağı anlamına gelmektedir [1]. AD yaşlı insanlarda bunamanın en yaygın nedenidir. 85 yaşın üzerindeki kişilerin yaklaşık olarak üçte birinin bu hastalıktan etkilendiği tahmin edilmektedir. Bazal ön beyin kolinerjik sistemindeki disfonksiyon, hafıza bozukluğu ve bilişsel eksiklik AD'nin ayırt edici özelliği olarak kabul edilir [2]. AD birden fazla sistemin anormalliği ve işlev bozukluğu ile ilgili olduğundan patogenezi karmaşıktır ve tedavi etmek için ideal bir ilaç yoktur. Kolinerjik hipotez, amiloid hipotezi, oksidatif stres hipotezi gibi onu açıklamaya çalışan birkaç rakip hipotez vardır [3]. AD patolojisine sebep olan iki ana faktör vardır. Bunlardan biri nörofibril yumruları (NFT) olarak birikmeye yol açan tau hiperfosforilasyonu diğeri ise amiloid oligomerizasyonuna yol açan amiloid beta (A β) oluşumudur [4]. Uygulanan mevcut tedavilerin amacı nöronal disfonksiyonu düzeltmektir [5]. Son yıllarda BACE-1 enzimi inhibitörlerinin üretimi için çok ilerleme kaydedilmiştir. Fakat önerilen sentetik inhibitörlerin birçoğunun genellikle preklinik ve klinik denemeler sırasında ilaca bağlı toksisite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu yüzden inhibitör olarak hareket edebilen doğal ürünler yeniden popülerlik kazanmaktadır ve bu günlerde araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir [6].

Alzheimer Hastalığının Nedenleri ve Tedavisi

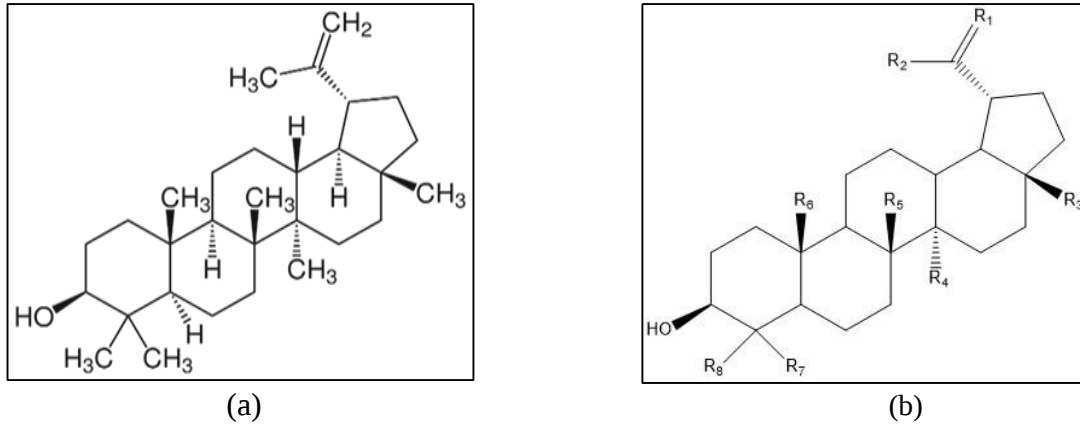
Amiloid plaklar (Ap), AD'nin önemli bir patolojik özelliğidir ve büyük ölçüde 39-43 amino asitlik Ap peptitlerinden oluşur. A β üretimine veya kendi kendine toplanmasına müdahale edecek herhangi bir adım AD'nin başlamasını önlemek veya geciktirmek için potansiyel bir tedavi olmaktadır [7]. Ap bölünmesine neden olan enzimlere genel olarak sekretazlar denmektedir [8]. A β , amiloid öncü proteinden (APP), β - ve γ -sekretaz enzimlerinin sıralı etkisiyle oluşan yaklaşık 4 kDa bir peptididir [9]. Nöropatolojik düzeyde AD nöron kaybı ve amiloid beta (A β) peptidlerinin hücre dışı birikintilerinin oluşumu ve AD hastasının beyinde hiperfosforile tau proteininin hücre içi birikimi ile tanımlanmıştır. Ap peptidleri, amiloid öncü proteinin (APP) β - ve γ -sekretazlar tarafından sıralı proteoliziyle oluşturulmuştur [10]. Amiloid hipotezine göre, çeşitli uzunluklarda A β , ilk olarak kaskadın hız sınırlayıcı enzimi olan BACE-1 tarafından, ardından γ -sekretaz ile Amiloid Prekürsör Proteinin (APP) proteolitik bölünmesiyle üretilir. Bunlar arasında, A β 42, AD hastalarının beyinlerinde gözlenen, agregasyona oldukça yatkındır ve serebral plakların en bol bileşeni bu yapılarıdır [11]. Amiloid hipotezine göre artan bir β parçası oligomerizasyonu, birikimi ve sonra birikmiş A β 1-42, merkezi sinir sisteminin homeostazını bozarak enflamatuvar yanıt ile demansın ana nedenlerinden biri olan oksidatif stres ve nöronal hücre kaybıyla sonuçlanmaktadır. BACE-1 seviyelerindeki artış, Alzheimer hastalarının beyinde A β 'nin toksik formlarının oluşmasına ve konsantrasyonuna yol açarak nörodejenerasyona neden olmaktadır [12]. BACE-1 nakavt fareler, normal farelerinkinden daha az A β 'ye sahip, sağlıklı ve verimli oldukları görülmüş ve bilişsel yetenekte normal görünmektedirler. Bu nedenle BACE-1 ekspresyonunun azaltılması AD için önemli ilaç geliştirme stratejilerinden biri haline gelmiştir. Son yıllarda, BACE-1 inhibitörleri ile ilgili birçok yayın yapılmıştır [13]. BACE-1 proteazlarının toksik Ap peptidi üretmek üzere amiloid öncü proteinin (APP) bölünmesinde temel bir oyuncu olarak tanınmasıyla, BACE-1 inhibitörlerinin geliştirilmesi, AD ilaç keşfinde en umut verici yaklaşımlardan biri haline gelmiştir [14]. Literatürde BACE-1 için yapılan inhibitor çalışmalarında Verubecestat (MK-8931), Lanabecestat (AZD3293), Atabecestat (JNJ-54861911) ve LY2886721 gibi birkaç BACE-1 inhibitörünün anormal karaciğer fonksiyonuna neden olduğu, hatta Lanabecestat'ın aynı zamanda epidermiste ve saçta depigmentasyona neden olduğu rapor edilmiştir [15, 16]. Bu noktada yeni inhibitor adaylarının geliştirilmesinin Alzheimer tedavisine yönelik katkılar sunması amaçlanmaktadır.

Lupeol Molekülü

Bu çalışmada alternatif bir ilaç adayı olarak ülkemizde Kudzu olarak adlandırılan, geleneksel Çin tıbbındaki en eski ve aynı zamanda en değerli yenilebilir ham bitkilerden biri olan *Pueraria lobata* bitkisi seçilmiştir [10, 12]. Modern farmakolojik çalışmalar, bu bitkinin hipertansiyon, diyabet, kardiyovasküler bozukluklar ateş, akut dizanteri, ishal, diyabet ve iskemik inme gibi çok çeşitli hastalık üzerinde terapötik etkilerini göstermiştir [17, 18]. Çalışmanın odak noktasını oluşturan *Pueraria lobata* bitkisinin etken maddesi olan Lupeol molekülü, Kuzey Amerika, Japonya, Çin, Latin Amerika ve Karayip adalarında çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Lupeol, *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde güçlü anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-mutajenik aktiviteye sahiptir [13, 19]. Aynı zamanda, protein kinazların ve serin proteazların güçlü bir inhibitörü olarak görev yapar ve kanser tedavisi için iyi bilinen bir hedef olan DNA topoizomera II'nin aktivitesini inhibe etmektedir [20]. Güçlü ve spesifik olan küçük molekül BACE-1 enzimi inhibitörlerinin geliştirilmesi önemle takip ediliyor olsa da *in vivo* olarak BACE-1'i inhibe etmek için farmakolojik stratejiler şu anda yeterli değildir [21]. Kapalı formülü $C_{30}H_{50}O$ olan ve anti inflammatuar bir bitki metaboliti olan Lupeol molekülünün Şekil 1. a'da verilen 2 boyutlu çiziminde de görülebileceği gibi yapıda halkalara bağlı $-CH_3$ grupları bulunmaktadır. Lupeol molekülünün yapısının modifiye edilmesi aşamasında ise yapının aşağıda Şekil 1. b'de verilen R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 ve R8 olarak tanımlanan pozisyonlarına Çizelge 1'de verilen fonksiyonel gruplar takılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

Lupeol molekülünün en kararlı konformer yapısını elde etmek amacıyla Spartan'16 programında [22] yarı deneysel PM6 metodu [23, 24] ile konformer taraması yapılmıştır. Ardından tespit edilen en kararlı konformerin geometri optimizasyonu yine yarı deneysel PM6 metodu ile aynı program ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Lupeol molekülünün (a) 2 boyutlu yapısı, (b) süstitüe grupların takıldığı pozisyonları

Lupeol molekülünün türevlendirme çalışmalarında da tasarlanan molekül optimizasyon ve kenetlenme işlemlerine başlamadan önce SwissAdme yazılımı kullanılarak [4, 13] özellikle Lipinski'nin logP (-0.7 - +5.0), M_A (150-500 g.mol⁻¹), polar yüzey alanı (20-130 Å²), doymamışlık Csp³ oranı (0.25- 1) ve dönebilen bağ sayısı (0-9) kriterlerinden [12] geçen 32 adet türevlendirilmiş yeni Lupeol molekülünün de kararlı konformer taraması PM6 ve geometri optimizasyonu PM6 ile yapılmıştır. Kenetlenme sonuçlarından elde edilen bağlanma enerjilerini yorumlayabilmek için moleküllerin logP, polarizabilite, hacim, dipol moment, ağırlık, enerji parametreleri de hesaplanmıştır. Yapılan ligand tasarımı çalışmasında Lupeol molekülünün ana iskeleti bozulmadan Şekil 1. b'de gösterilen pozisyonlara aşağıda Çizelge 1'de belirtilen fonksiyonel gruplar takılarak 32 adet yeni Lupeol türevi elde edilmiştir. Bu çalışmada yürütülen kenetlenme çalışmaları

için BACE-1 proteininin kristal yapısı olarak Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) veri tabanından 2.5 Å çözünürlüklü 2WJO pdb id kodlu yapısı seçilmiştir. Kenetlenme işlemine başlamadan önce kristal yapıdaki su molekülleri silinmiş ve yapıya H atomları eklenmiştir.

Tablo 1. Lupeol molekülüne bağlanan fonksiyonel gruplar ve bağlanma pozisyonları

Ligand No	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
L-1	O	OH						
L-2	O	NH ₂						
L-3	O	OH		NH ₂				
L-4	O	OH			NH ₂			
L-5	O	OH					NH ₂	
L-6	O	OH						NH ₂
L-7	O	OH						COOH
L-8	O	OH		NH ₂				COOH
L-9	O	OH			NH ₂			COOH
L-10	O	OH				NH ₂		COOH
L-11	O	OH					NH ₂	COOH
L-12	O	OH	NH ₂					CH ₂ OH
L-13	O	OH				NH ₂		CH ₂ OH
L-14	O	OH					NH ₂	CH ₂ OH
L-15	O	OH		H			NH ₂	COOH
L-16	O	OH			NH ₂		H	COOH
L-17	O	OH			NH ₂			COOH
L-18	O	OH			NH ₂			COOH
L-19	O	OH			NH ₂	H	H	CH ₂ OH
L-20	O	OH	H		NH ₂	H		COOH
L-21	O	OH				NH ₂		CH ₂ OH
L-22	O	OH		OH		NH ₂		COOH
L-23	O	OH					CH ₂ OH	NH ₂
L-24	O	OH	H			H	NH ₂	CH ₂ OH
L-25	O	OH	H	H			CH ₂ OH	NH ₂
L-26	O	OH	H	H			NH ₂	CH ₂ OH
L-27	O	OH					NH ₂	CH ₂ OH
L-28	O	OH		NH ₂				COOH
L-29	O	OH		H			NH ₂	CH ₂ OH
L-30		NH ₂	H	H			NH ₂	CH ₂ OH
L-31	O	NH ₂	H	H			NH ₂	CH ₂ OH
L-32	O	CH ₂ OH		H			NH ₂	OH

Merkez koordinatları $x=26.593$, $y=41.585$, $z=41.026$ olan $30 \times 30 \times 30 \text{ Å}^3$ 'lük bir grid kutusu seçilmiş, kapsamlılık parametresi 8 olarak kabul edilmiş [25] ve 0.375 Å grid aralığı belirlenerek Lamarckian Genetik algoritma ile moleküler kenetlenme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kenetlenme çalışmaları her bir ligand için üç kez yapılmış ve tekrar eden sonuçlar alındığında kabul edilmiştir. Kenetlenme çalışmaları AutoDock Vina programı [26] ile gerçekleştirilmiş olup, tüm görüntüleme işlemleri BIOVIA Discovery Studio Visualizer programı [27] ile gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

Bu çalışmada Lupeol ve 32 tane tasarlanmış Lupeol türevi bileşik için optimizasyon, kenetlenme, SwissAdme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aşağıda Çizelge 2'de çalışılan moleküller için hesaplanan fizikokimyasal parametre ve bağlanma enerji değerleri verilmiştir.

Tablo 2. Lupeol ve türevleri için hesaplanan fizikokimyasal parametre
(A: Alan, Å^2 ; V: Hacim, Å^3 ; M_A : Molekül kütlesi, amu; LogP: Lipofilisite; ρ : Polarize edilebilirlik; μ : Dipol Moment, debye; E: Enerji, kJ.mol^{-1} ve BA: Bağlanma afinitesi, Kcal.mol^{-1})

	A	V	M_A	LogP	ρ	μ	E	BA
L	450,5	491,5	426,7	8,3	78,6	2,46	-526,8	-9,2
L-1	428,7	468,8	430,7	6,8	76,9	6,32	-911,9	-9,7
L-2	434,9	472,4	429,7	6,2	77,1	5,86	-739,5	-9,8
L-3	427,6	463	431,7	4,9	76,5	6,65	-882,8	-9,3
L-4	428,2	463,6	431,7	4,9	76,6	4,83	-885,2	-9,3
L-5	425,9	462,7	431,7	4,8	76,5	4,41	-881	-9,5
L-6	425,2	462,2	431,6	4,8	76,4	7,01	-878,1	-9,4
L-7	436,1	477,9	460,6	5,8	77,5	8,64	-1233,6	-9,7
L-8	437,7	472,7	461,6	3,9	77,3	6,4	-1203	-9,3
L-9	435,1	472,3	461,6	3,9	77,3	7	-1205,2	-9,3
L-10	439,2	473,7	461,6	3,9	77,3	7,1	-1211,4	-9,5
L-11	436,4	472,5	461,6	4,1	77,2	7,2	-1215,1	-9,5
L-12	431,4	469,8	447,6	3,7	77,1	5,4	-1046,9	-9,2
L-13	434,3	470,8	447,6	3,7	77,1	6,7	-1057,1	-9,3
L-14	434,4	470,4	447,7	3,9	77,2	6,5	-1052,5	-9,3
L-15	430	456,9	447,6	3,6	75,9	7,2	-1209,1	-9,5
L-16	428,5	456,9	447,6	3,2	76,1	3,8	-1203,1	-9,2
L-17	430,9	461,8	455,6	3,1	76,5	4,5	-869,7	-9,7
L-18	431,9	458,6	453,5	2,9	76,2	3,8	-788,7	-9,7
L-19	407,1	423,1	411,5	1,8	73,3	4,9	-609,7	-9,4
L-20	406,8	425	425,5	2	73,5	6,6	-764,4	-9,6
L-21	427	456,5	439,5	2,7	76	6,6	-624,8	-9,8
L-22	429,1	456,4	459,5	2,01	76	6,83	-1185,5	-9,3
L-23	421,8	454,4	439,5	2,84	75,8	6,5	-624	-9,9
L-24	405,5	422,9	411,5	1,9	73,3	6,02	-612,2	-9,5
L-25	402,2	421,9	411,5	1,9	73,2	5,6	-600,9	-9,8
L-26	403,3	422,5	411,5	1,9	73,3	6,37	-599,2	-9,7
L-27	425,2	455,3	439,5	2,84	75,9	6,71	-622,2	-9,9
L-28	424,3	453,1	451,5	2,66	75,8	7,44	-645,4	-10,3
L-29	416,4	439,4	425,5	2,37	74,6	6,53	-616,7	-9,4
L-30	431,8	453	416,6	2,57	75,7	5,83	-622,7	-9,3
L-31	408,9	425,7	410,5	1,25	73,5	5,51	-429,5	-9,9
L-32	415,3	439,1	425,5	2,96	74,6	3,71	-604,5	-9,2

Lupeol ve türevlerinin 2WJO pdb kodlu kristal yapısı ile yapılan kenetlenme işlemlerinden elde edilen etkileşim haritaları incelendiğinde aday moleküllerin etkileşime girdiği aminoasitler aşağıda Tablo 3'te listelenmiştir.

Tablo 3. 2WJO ile Lupeol ve türevlerinin aktif bölgede etkileşime girdiği aminoasitler

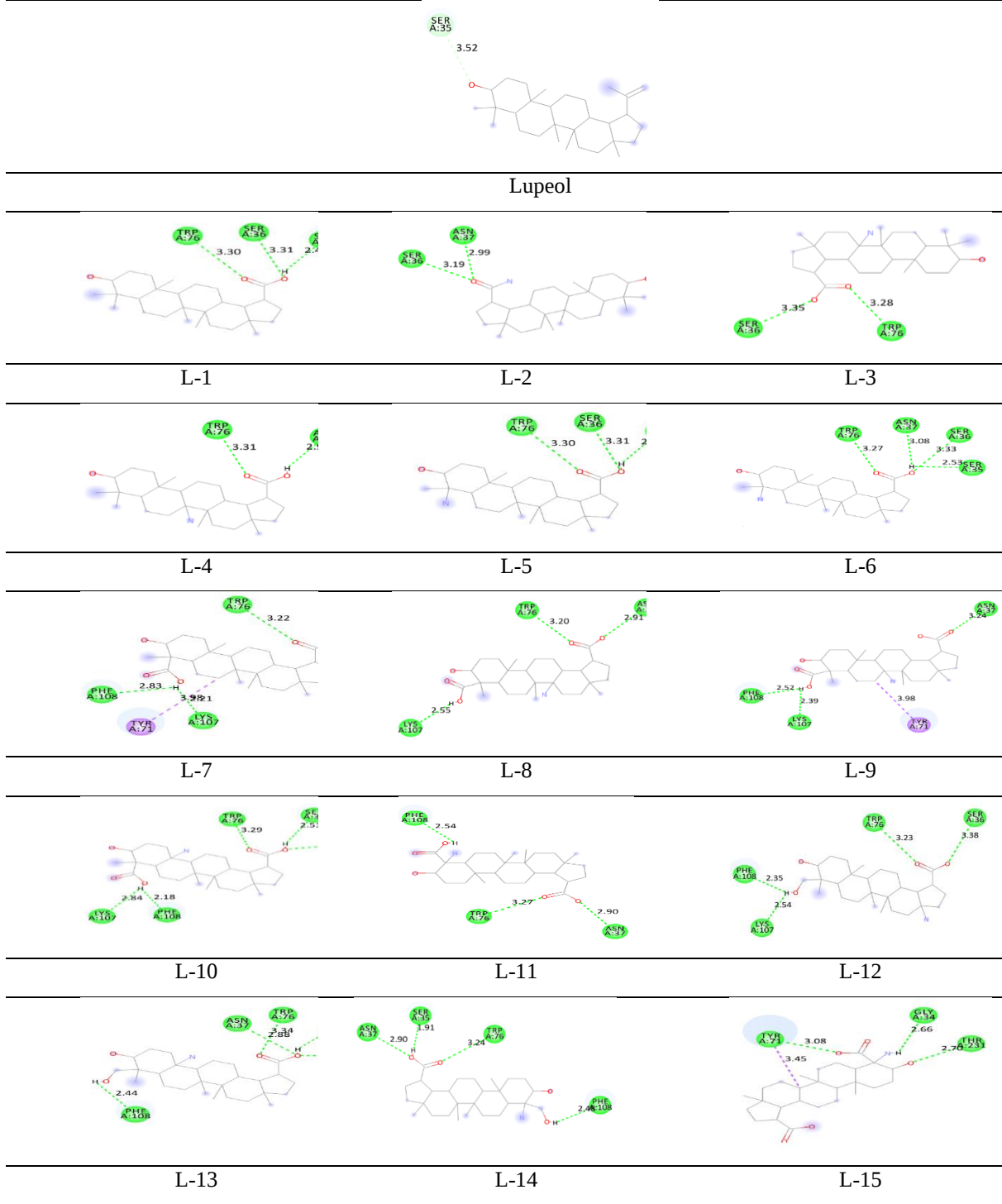
Ligant	L	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32
Gly34																x										x					x	x	x
Ser35	x	x				x	x				x			x	x			x				x	x				x						
Ser36		x	x	x		x	x				x		x	x	x		x						x	x			x						
Asn37			x		x		x		x	x		x		x	x		x		x	x	x	x	x	x	x			x	x				
Val69																					x				x								
Tyr71								x		x						x			x						x	x			x	x	x	x	
Gln73																										x	x			x	x		
Trp76	x		x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x		x	x				x	x					x					
Lys107								x	x	x			x			x	x					x	x	x					x				x
Phe108								x		x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x			x	x				
Arg128																									x								
Asp228																										x	x			x	x	x	x
Thr231																										x	x			x	x	x	x

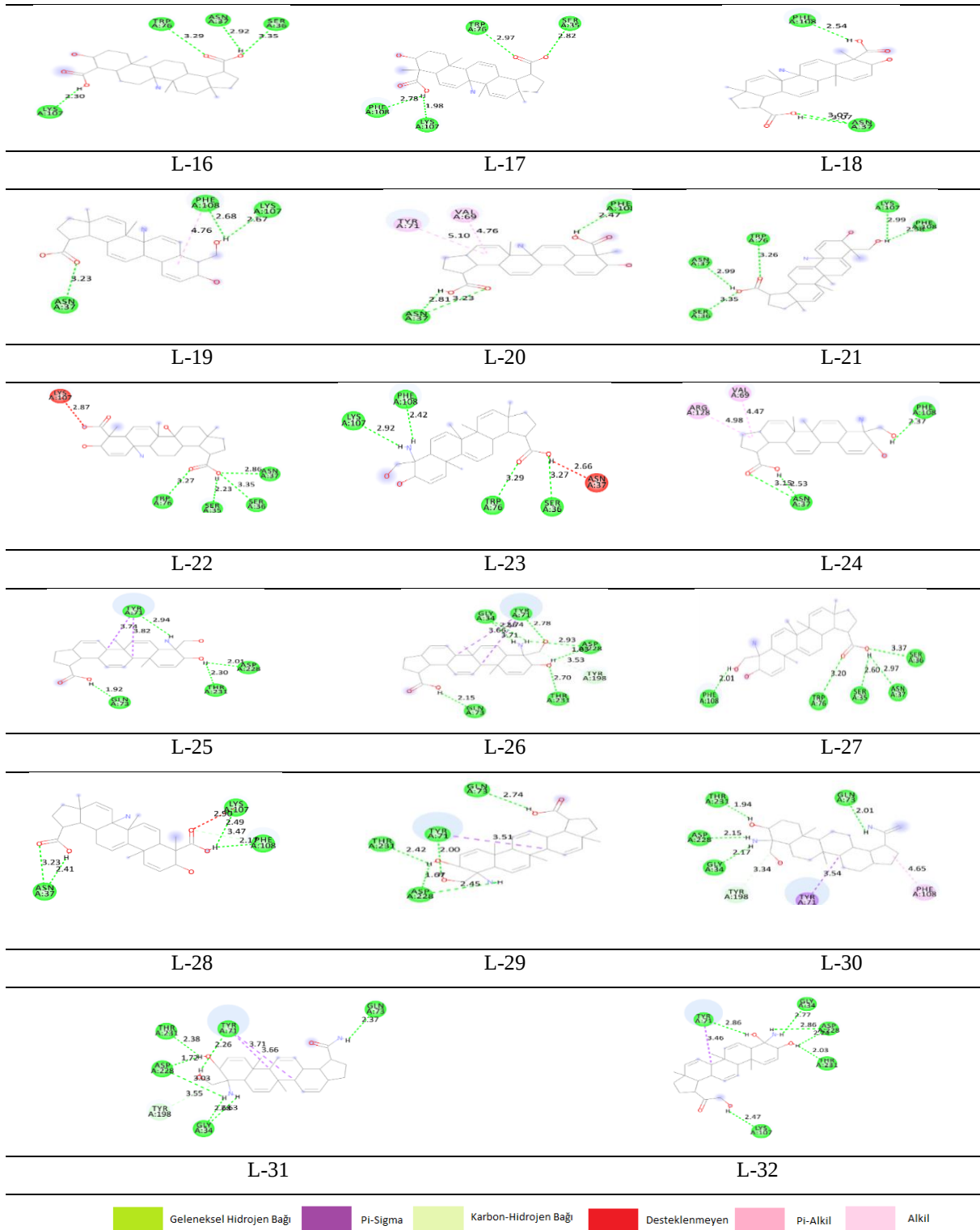
Diğer taraftan Lupeol ve 32 adet türevi için BACE-1 enziminin 2WJO pdb kodlu kristal yapısı ile yapılan kenetlenme çalışmalarından elde edilen iki boyutlu etkileşim haritaları aşağıda Şekil 2'de verilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada binlerce yıl geleneksel bitkisel tedavilerde kullanılmış olan Lupeol ve Lupeol tabanlı yeni tasarlanan 32 adet molekülün Alzheimer hastalığının BACE-1 ile kenetlenme çalışmalarındaki bağlanma enerjileri, yapıların sahip olduğu fonksiyonel gruplara göre aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimleri irdelenmiştir. Literatürde BACE-1'in 2WJO pdb id kodlu kristal yapısı için farklı ligandlar ile olan kenetlenme çalışmasına bakıldığında ilgili çalışmada Cardamonin, Pinocembrin ve Pinostrobin bileşikleri için sırasıyla -9.5, -7.9 ve -7.6 kkal.mol⁻¹'lik bağlanma enerji tespit edilmiştir [28], belirtilen ligandlar için yapılan kenetlenme çalışmaları tekrarlanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 2 incelendiğinde ise Lupeol molekülü temel alınarak dizayn edilen yeni L-1, L-2, L-7, L-17, L-18, L-20, L-21, L-23, L-25, L-26, L-27, L-28 ve L-31 moleküllerinin bileşiklerinden daha iyi bağlanma afinitesi verdiği tespit edilmiştir. Kenetlenme çalışmalarından elde edilen Çizelge 2'de verilen bağlanma enerji değerlerine bakıldığında Lupeol molekülü sadece Cardamonin, Pinocembrin ve Pinostrobin çevre aminoasitlerinden Ser35 ile 3,52 Å uzaklığında bir C-H etkileşimine girerek -9.2 kkal.mol⁻¹'lik bir bağlanma enerjiye sahip olurken, yapılan türevlendirme çalışmalarında Lupeol-32 yapısının ise aktif bölge aminoasitlerinden Gly34, Tyr71, Lys107, Asp228 ve Thr231 ile geleneksel H bağı etkileşimlerine girmesine rağmen başlangıç Lupeol formuna göre daha düşük bir enerji değeri (-9.1 kkal.mol⁻¹) bulunmuştur. Diğer taraftan L-28 yapısı ise Asn37, Lys107 ve Phe108 aminoasitleri ile geleneksel -H bağı etkileşimi oluşturarak en iyi bağlanma afinitesini verdiği gözlemlenmiştir. Bu noktada bağlanma afinitesinden elde edilen değerlerin sadece girilen aminoasit sayısı ile değerlendirilemeyeceği, aynı zamanda oluşan moleküller arası bağ mesafesinin, bağ türünün ve diğer fizikokimyasal parametrelerin de bağlanma afinitesi üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Yapısal farklılık yönüyle moleküller incelendiğinde ise en iyi enerjiye sahip olan L-28 ve L-32 molekül yapılarının arasındaki temel farkın L-28 molekülünün R4 pozisyonuna -NH₂, R8 pozisyonuna -COOH grubu takılı iken L-32 molekülünde ise ilgili pozisyonlarda sırasıyla -H ve -OH gruplarının takıldığı görülmektedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde $-NH_2$ ve $-COOH$ gruplarının H bağı yapabilme gücünün bağlanma afinitesine yansıdığı görülmüştür. PM6 ile hesaplanan fizikokimyasal parametreler incelendiğinde ise Lupeol molekülünün başlangıç formunda en dikkat çekici farklılığın 8.31 gibi yüksek olan logP ve 2.46 D olan dipol moment değerlerinde yapılan değişiklikler olduğu görülmektedir.





Şekil 2. Lupeol ve türevlerinin 2WJO pdb id kodlu kristal yapı ile kenetlenme çalışmalarından elde edilen 2 boyutlu etkileşim haritaları

Yapılan türevlendirme çalışmalarında logP değerleri başlangıç noktasından daha aşağı daha hidrofil bir aralığa çekilirken dipol moment değeri yukarılara çıkarılmıştır. Aynı şekilde Lupeol-28 molekülü incelendiğinde logP=2.66 ve dipol momentin ise 7.44 olarak hesaplandığı görülmektedir. Bu farklılıkların bağlanma afinitesinde yaklaşık 10 kat bir iyileşmeye neden olması BACE-1'in 2WJO pdb id kodlu kristal yapısını bağlanma bölgesinin daha hidrofilik aminoasitler ile çevrili olduğunu ve bağlanacak molekülde polar gruplar takılı olanları ile daha iyi etkileşimler sağlandığı gözlemlenmiştir.

Literatürde Lupeol bileşiğinin yine BACE-1'in 2WJO pdb id kodlu kristal yapısı ile yapılan kenetlenme çalışmasına bakıldığında ilgili bileşik için tespit edilen etkileşimde olunan çevre aminoasitlerini benzerlik göstermesi, seçilen aktif bölge yapısının doğruluğunu desteklemektedir [8]. Bu bağlamda önemli bir veri de Çizelge 3'te verilen Lupeol türevleri için verilen etkileşime girilen aminoasit listesidir. Çizelge 3 incelendiğinde yeni tasarlanan 18 Lupeol türevi ile etkileşime giren aminoasidin hidrofilik karakterde olan Asn olması dipol moment ve logP değerlerindeki değişimlerin bağlanma afinitesi üzerindeki etkisini desteklemektedir. Bu veriyi destekleyen diğer önemli bir noktada toplamda 58 adet hidrofilik aminoasit ve Lupeol türevi arasında etkileşim tespit edilmesidir. Bu bulgu BACE-1 aktif bölgesindeki hidrofilik etkileşimlerin daha desteklenir olduğunu ve yeni tasarlanacak ligandlar için alifatik fonksiyonel grup taşımanın bağlanmanın üzerinde olumlu katkılarının olduğu sonucunu vermiştir.

KAYNAKLAR

- [1] J. P. S. Ferreira, H. M. T. Albuquerque, S. M. Cardoso, A. M. S. Silva, and V. L. M. Silva, "Dual-target compounds for Alzheimer's disease: Natural and synthetic AChE and BACE-1 dual-inhibitors and their structure-activity relationship (SAR)," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 221, pp. 113492, 2021.
- [2] M. T. Gabr and M. S. Abdel-Raziq, "Design and synthesis of donepezil analogues as dual AChE and BACE-1 inhibitors," *Bioorg. Chem.*, vol. 80, pp. 245–252, 2018.
- [3] Z. Sang, K. Wang, P. Zhang, J. Shi, W. Liu, and Z. Tan, "Design, synthesis, in-silico and biological evaluation of novel chalcone derivatives as multi-function agents for the treatment of Alzheimer's disease," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 180, pp. 238–252, 2019.
- [4] A. Kumar, G. Srivastava, and A. Sharma, "A physicochemical descriptor-based method for effective and rapid screening of dual inhibitors against BACE-1 and GSK-3 β as targets for Alzheimer's disease," *Comput. Biol. Chem.*, vol. 71, pp. 1–9, 2017.
- [5] X. J. Zhao, D. M. Gong, Y. R. Jiang, D. Guo, Y. Zhu, and Y. C. Deng, "Multipotent AChE and BACE-1 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis and bio-analysis of 7-amino-1,4-dihydro-2H-isoquinlin-3-one derivatives," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 138, pp. 738–747, 2017.
- [6] J. K. Dhanjal, S. Goyal, S. Sharma, S. Hamid, and A. Grover, "Mechanistic insights into mode of action of potent natural antagonists of BACE-1 for checking Alzheimer's plaque pathology," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 443, pp. 1054–1059, 2014.
- [7] A. J. Doig, and P. Derreumaux, "Inhibition of protein aggregation and amyloid formation by small molecules," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 30, pp. 50–56, 2015.
- [8] C. Bohm, F. Chen, J. Sevalle, S. Qamar, R. Dodd, Y. Li, G. Schmitt-Ulms, P. E. Fraser, and P. H. St George-Hyslop, "Current and future implications of basic and translational research on amyloid- β peptide production and removal pathways," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 66, pp. 3–11, 2015.

- [9] P. Picón-Pagès, J. Bonet, J. García-García, J. Garcia-Buendia, D. Gutierrez, J. Valle, C. E. S. Gómez-Casuso, V. Sidelkivska, A. Alvarez, A. Perálvarez-Marín, A. Suades, X. Fernández-Busquets, D. Andreu, R. Vicente, B. Oliva, and F. J. Muñoz, "Human albumin impairs amyloid β -peptide fibrillation through its C-terminus: From docking modeling to protection against neurotoxicity in Alzheimer's disease," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 17, pp. 963–971, 2019.
- [10] J. Janssens, B. Hermans, M. Vandermeeren, E. Barale-Thomas, M. Borgers, R. Willems, G. Meulders, C. Wintmolders, D. van den Bulck, A. Bottelbergs, L. Ver Donck, P. Larsen, D. Moechars, W. Edwards, M. Mercken, and B. van Broeck, "Passive immunotherapy with a novel antibody against 3pE-modified A β demonstrates potential for enhanced efficacy and favorable safety in combination with BACE inhibitor treatment in plaque-depositing mice," *Neurobiol. Dis.*, vol. 154, p. 105365, 2021.
- [11] S. Das, T. Majumder, A. Sarkar, P. Mukherjee, and S. Basu, "Flavonoids as BACE-1 inhibitors: QSAR modelling, screening and in vitro evaluation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 165, pp. 1323–1330, 2020.
- [12] P. Gürbüz, A. H. Dokumacı, M. G. Gündüz, C. Perez, F. Göger, M. Y. Paksoy, M. B. Yerer, and L. Ömür Demirezer, "In vitro biological activity of *Salvia fruticosa* Mill. Infusion against amyloid β -peptide-induced toxicity and inhibition of GSK-3 β , CK-1 δ , and BACE-1 enzymes relevant to Alzheimer's disease," *Saudi Pharm. J.*, vol. 29, pp. 236–243, 2021.
- [13] D. Huang, Y. Liu, B. Shi, Y. Li, G. Wang, and G. Liang, "Comprehensive 3D-QSAR and binding mode of BACE-1 inhibitors using R-group search and molecular docking," *J. Mol. Graph. Modell.*, vol. 45, pp. 65–83, 2013.
- [14] G. Ribaud, P. Coghi, E. Zanforlin, B. Y. K. Law, Y. Y. J. Wu, Y. Han, A. C. Qiu, Y. Q. Qu, G. Zagotto, and V. K. W. Wong, "Semi-synthetic isoflavones as BACE-1 inhibitors against Alzheimer's disease," *Bioorg. Chem.*, vol. 87, pp. 474–483, 2019.
- [15] Lahiri DK, et al. Lessons from a BACE1 inhibitor trial: off-site but not off base. *Alzheimers Dement.* 2014;10(5 Suppl):S411–9.
- [16] Das, B., Yan, R. A Close Look at BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *CNS Drugs* 33, 251–263 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00613-7>
- [17] Y. Gao, X. Wang, and C. He, "An isoflavonoid-enriched extract from *Pueraria lobata* (kudzu) root protects human umbilical vein endothelial cells against oxidative stress induced apoptosis," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 193, pp. 524–530, 2016.
- [18] Z.-B. Wang, B. B. Chen, L. Luo, and J. K. Yan, "Fractionation, physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from *Pueraria lobata* roots," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 67, pp. 54–60, 2016.
- [19] M. Saleem, "Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene," *Cancer Lett.*, vol. 285, pp. 109–115, 2009.
- [20] A. K. Srivastava, S. Mishra, W. Ali, and Y. Shukla, "Protective effects of lupeol against mancozeb-induced genotoxicity in cultured human lymphocytes," *Phytomedicine*, vol. 23, pp. 714–724, 2016.

- [21] M. Ohno, E. A. Sametsky, L. H. Younkin, H. Oakley, S. G. Younkin, M. Citron, R. Vassar, and J. F. Disterhoft, "BACE-1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease," *Neuron*, vol. 41, pp. 27–33, 2004.
- [22] J. Kong, C. A. White, A. I. Krylov, C. D. Sherrill, R. D. Adamson, T. R. Furlani, M. S. Lee, A. M. Lee, S. R. Gwaltney, T. R. Adams, C. Ochsenfeld, A. T. B. Gilbert, G. S. Kedziora, V. A. Rassolov, D. R. Maurice, N. Nair, Y. Shao, N. A. Besley, P. E. Maslen, J. P. Dombroski, H. Daschel, W. Zhang, P. P. Korambath, J. Baker, E. F. C. Byrd, T. V. Voorhis, M. Oumi, S. Hirata, C. P. Hsu, N. Ishikawa, J. Florian, A. Warshel, B. G. Johnson, P. G. M. Gill, M. H. Gordon, and J. A. Pople, "Q-Chem 2.0: a high-performance ab initio electronic structure program package," *J. Comput. Chem.*, vol. 21, pp. 1532–1548, 2000.
- [23] J. J. P. Stewart, "Application of the PM6 method to modeling the solid-state," *J. Mol. Model.*, vol. 14, pp. 499–535, 2008.
- [24] J. J. P. Stewart, "Application of the PM6 method to modeling proteins," *J. Mol. Model.*, vol. 15, p. 765, 2009.
- [25] An accurate and universal protein-small molecule batch docking solution using Autodock Vina, Results in Engineering, 19, 101335, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101335>, Xinhao Che and Qilei Liu and Lei Zhang
- [26] O. Trott and A. J. Olson, "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," *J. Comput. Chem.*, vol. 31, pp. 455–461, 2010.
- [27] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego, CA, USA: Dassault Systèmes, 2016.
- [28] K. Youn and M. Jun, "Biological evaluation and docking analysis of potent BACE1 inhibitors from *Boesenbergia rotunda*," *Nutrients*, vol. 11, p. 662, 2019.