



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BAZI LİPİD DÜŞÜRÜCÜ İLAÇLARIN SERUM
PARAOKSONAZ-1 ENZİMİNE
AFİNİTELERİNİN DOCKING METODU İLE
İNCELENMESİ

Zekeriya DÜZGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Birgül KURAL

Prof. Dr. İlkay YILDIZ

TRABZON – 2013



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BAZI LİPİD DÜŞÜRÜCÜ İLAÇLARIN SERUM
PARAOKSONAZ-1 ENZİMİNE
AFİNİTELERİNİN DOCKING METODU İLE
İNCELENMESİ

Zekeriya DÜZGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Birgül KURAL

Prof. Dr. İlkay YILDIZ

TRABZON – 2013

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Zekeriya DÜZGÜN'ün hazırladığı “Bazı lipid düşürücü ilaçların serum paraoksonaz-1 enzimine afinitelerinin docking metodu ile incelenmesi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Birgül KURAL _____

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Edip KEHA _____

Prof. Dr. Murat KÜÇÜK _____

..... _____

..... _____

..... _____

Tarih: .../.../201...

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih

Zekeriya DÜZGÜN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamda ve akademik hayatımda son derece değerli görüşleriyle en başından beri desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Birgül KURAL'a,

İn siliko çalışmamda bana yol göstereci olup önümü görmemi sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilimdalı Başkanı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İlkey YILDIZ'a,

Kıymetli bilgileri ile katkılarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Asım ÖREM başta olmak üzere Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalındaki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Edip KEHA, Sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER, Sayın Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Sayın Doç. Dr. Ahmet ALVER ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Yüksek lisans sürecinde güler yüzünü esirgemeyen ve her zaman yardıma hazır tüm arkadaşlarıma,

En başından beri maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme,

Tez sürecinde desteklerini esirgemeyen Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesindeki değerli hocalarıma ve Giresun Üniversitesi Hastanesindeki sevgili arkadaşlarıma,

Çalışmamda yüksek performans bilgisayarları kullanmamda yardımları ile beni yönlenderin başta Sefa ARSLAN olmak üzere tüm TRGRID personeline teşekkür ederim.

Bu araştırmada yer alan nümerik hesaplamalar TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA Kaynaklarında) gerçekleştirilmiştir.

Zekeriya DÜZGÜN

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Paraoksonaz ailesi	5
4.1.1. Paraoksonaz-1 (PON1)	6
4.1.1.1. PON1'in Katalitik Aktivitesi	7
4.1.1.2. PON1 Gen Polimorfizmi	9
4.2. Lipid Düşürücü İlaçlar	9
4.2.1. Statinler	10
4.2.1.1. Atorvastatin	10
4.2.1.2. Fluvastatin	11
4.2.1.3. Lovastatin	12
4.2.1.4. Mevastatin	13
4.2.1.5. Pitavastatin	13
4.2.1.6. Pravastatin	14
4.2.1.7. Rosuvastatin	14
4.2.1.8. Simvastatin	15
4.2.1.9. Paraoksonaz ve Statinler	15
4.2.2. Fibratlar	16
4.2.2.1. Bezafibrat	17
4.2.2.2. Ciprofibrat	17
4.2.2.3. Klofibrat	18
4.2.2.4. Fenofibrat	18
4.2.2.5. Gemfibrozil	19

4.2.2.6. Paraoksonaz ve Fibratlar	19
4.2.3. Fitosteroller	19
4.2.4. Diğer Lipid Düşürücü İlaçlar	20
4.2.4.1. Ezetimib	20
4.2.4.2. Niasin	20
4.2.4.3. Orlistat	21
4.2.4.4. Probukol	21
4.2.4.5. Sibutramin	22
4.2.4.6. Paraoksonaz ve Diğer Lipid Düşürücü İlaçlar	22
4.3. Sanal Görüntüleme (Virtual Screening)	22
4.3.1. Protein Veri Bankası	23
4.3.2. Homoloji Modelleme	24
4.3.3. Moleküler Dinamik Simülasyonu	24
4.3.3.1. Algoritmalar	25
4.3.3.2. Etkileşim Fonksiyonu	25
4.3.3.3. Kuvvet Alanı	26
4.3.3.4. Topoloji	26
4.3.4. Protein-Ligand Docking	26
5. GEREÇ VE YÖNTEM	32
5.1. Ligandlar	32
5.2. Donanım	36
5.3. Yazılım	37
5.4. Yöntem	37
5.4.1. Paraoksonaz Proteinin Modellenmesi	38
5.4.1.1. Moleküler Dinamik Simülasyon	39
5.4.1.2. GROMACS ile Çalışmaya Hazırlık	40
5.4.1.3. GROMACS Topoloji Dosyası Oluşturma	41
5.4.1.4. Ortama Çözücü (Su) Ekleme	41
5.4.1.5. Ortama İyon Ekleme	42
5.4.1.6. Enerji Minimizasyon	42
5.4.1.7. Denge Durumuna Getirme	43
5.4.1.8. Tam Moleküler Dinamik Simülasyon	43

5.4.1.9. Simülasyonun Analizi	44
5.4.2. Docking İşlemi	44
5.4.2.1. Hedef Proteinin Hazırlanması	45
5.4.2.2. Ligandın Hazırlanması	45
5.4.2.3. Grid Map'ın Hazırlanması	46
5.4.2.4. Docking Parametrelerinin Ayarlanması	46
5.4.2.5. Autodock ve Autogrid'in Yürütülmesi	47
5.4.2.6. Autodock Vina Konfigürasyon Dosyası (Grid Alan Bilgileri, Exhaustiveness) Hazırlanması	47
6. BULGULAR	48
6.1. Homoloji Modelleme	48
6.2. Moleküler Dinamik Simulasyon	49
6.2.1. Enerji Minimizasyonu	50
6.2.2. Dengeleme Aşaması	51
6.2.3. Tam Moleküler Dinamik Simülasyonda RMSD, RMSF Ve Rg	53
6.2.4. Moleküler Docking	56
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	68
7.1. Homoloji Modelleme	69
7.2. Moleküler Dinamik Simülasyon	70
7.3. Moleküler Docking	72
7.4. Lipid Düşürücü İlaçlar ve Paraoksonaz	75
8. KAYNAKLAR	79
9. ÖZGEÇMİŞ	92

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada kullanılan Substratlar	32
Tablo 2. Çalışmada değerlendirilen statinler	34
Tablo 3. Fibrat ve diğer lipid düşürücü ilaçlar	35
Tablo 4. Fitosteroller	36
Tablo 5. Proteinlerin yapı kalitesi istatistikleri	48
Tablo 6. MD sistemin moleküler içeriği	50
Tablo 7. Şekil 29-31'e göre 10 ns'lik simülasyondaki ortalama sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerleri	53
Tablo 8. Tüm substratların afinite değerleri (Ortalama $\pm$ S.E.) (n=11)	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. İnsan PON1 G2E6 varyantının X-RAY kristalografik yapısı	7
Şekil 2. PON1'in aktif bölgesinde yer alan Ca ⁺² (yeşil küre)'in ve katalitik aktiviteden sorumlu aminoasitlerin X-RAY kristalografik görüntüsü	8
Şekil 3. Çeşitli paraoksonaz substratları	8
Şekil 4. Atorvastatin	11
Şekil 5. Fluvastatin	12
Şekil 6. Lovastatin	12
Şekil 7. Mevastatin	13
Şekil 8. Pitavastatin	13
Şekil 9. Pravastatin	14
Şekil 10. Rosuvastatin	15
Şekil 11. Simvastatin	15
Şekil 12. Bezafibrat	17
Şekil 13. Ciprofibrat	17
Şekil 14. Klofibrat	18
Şekil 15. Fenofibrat	18
Şekil 16. Gemfibrozil	19
Şekil 17. Ezetimib.	20
Şekil 18. Niasin	20
Şekil 19. Orlistat	21
Şekil 20. Probukol	21
Şekil 21. Sibutramin	22
Şekil 22. PDB.org web sitesi görünümü	23
Şekil 23. Çalışma akış şeması (Uygulanan yazılım sıralamasına göre)	38
Şekil 24. Chimera yazılımı ve MODELLER aracı	39
Şekil 25. Gromacs Akış şeması	40
Şekil 26. Homoloji modelleme ile üretilmiş PON1 normal(mavi), (M/L) 55(yeşil), (Q/R) 192(sarı) yapılar ile 3SRE pdb kodlu rePON1-G2E6 (pembe) hizalandırılmış görüntü. L1: düğüm bölgesi	49

Şekil 27. A. Protein yapı ve B. SPC su modeli eklenmiş, Na ⁺ 1 ve Cl ⁻ 1 ile nötralize edilmiş sistemin görüntüsü	50
Şekil 28. Mimizasyon eğrisi	51
Şekil 29. Denge fazında sıcaklık değişimi	52
Şekil 30. Denge fazında basınç değişimi	52
Şekil 31. Denge fazında yoğunluk değişimi	52
Şekil 32. RMSD değişim grafiği	53
Şekil 33. RMSF değişim grafiği	54
Şekil 34. PON1 yapıların RMSF özelliklerinin B-faktörü diyagramı ile gösterimi	55
Şekil 35. Dönme yarıçapının zamana göre değişimi	56
Şekil 36. 19 substratın PON1 normal yapı üzerindeki konformasyonları	57
Şekil 37. 19 substratın PON1 M/L55 polimorfik yapı üzerindeki konformasyonları	57
Şekil 38. 19 substratın PON1 Q/R 192 polimorfik yapı üzerindeki konformasyonları	59
Şekil 39. Substratların Normal, L/M 55 ve Q/R 192 PON1 polimorfik yapılara afiniteleri	60
Şekil 40. Normal PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen 2-kumarinin konformasyonu	61
Şekil 41. Normal PON1'in aktif merkezindeki 2-kumarinin aminoasit etkileşimi	61
Şekil 42. M/L 55 PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen dihidrokumarinin konformasyonu	62
Şekil 43. M/L 55 PON1'in aktif merkezindeki dihidrokumarinin aminoasit etkileşimi	62
Şekil 44. Q/R192 PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen dihidrokumarinin konformasyonu	63
Şekil 45. Q/R 192 PON1'in aktif merkezindeki dihidrokumarinin aminoasit etkileşimi	63
Şekil 46. Lipid düşürücü ilaçların PON1 ve polimorfik yapılarına afinite değerleri	64
Şekil 47. Q/R 192 PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen sibutraminin konformasyonu	65
Şekil 48. Q/R 192 PON1'in aktif merkezindeki sibutraminin aminoasit etkileşimi	65

Şekil 49. Normal PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen brassikasterol konformasyonu	66
Şekil 50. Normal PON1'in aktif merkezindeki brassikasterolun aminoasit etkileşimi	66
Şekil 51. M/L 55 PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen stigmasterol konformasyonu	67
Şekil 52. M/L 55 PON1'in aktif merkezindeki stigmasterol'ün aminoasit etkileşimi	67

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ADT	: Autodock tools
AMBER	: Assisted Model Building with Energy Refinement
CHARMM	: Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
FDA	: Food and Drug Administration
GROMACS	: Groningen Machine for Chemical Simulations
HDL	: High density lipoprotein
HIV	: Human immunodeficiency virus
HMG-CoA	: 3 hidroksi 3 metil glutaril Koenzim A
kDa	: Kilo Dalton (atomic kütle)
LDL	: Low density lipoprotein
LINCH	: Linear constraint solver
MD	: Moleküler dinamik
mRNA	: Mesajcı RNA (Ribonükleik asit)
NAMD	: Not (just) Another Molecular Dynamics
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NPT	: Number of particles, pressure, temperature
NVT	: Number of particles, volume, temperature
PBC	: Periodic boundary conditions
PDB	: Protein databank dosya biçimi
PMF	: Potential of mean force
PON	: Paraoksonaz
PPAR	: Peroxisome proliferator activated receptor
RMSD	: Root mean square deviation
RMSF	: Root mean square fluctuation
SPC	: Simple point charge
UCSF	: University of California, San Francisco
VLDL	: Very low density lipoprotein
VMD	: Visual Molecular Dynamics

Simgeler

ΔG	: Delta G
K°	: Kelvin derece
C°	: Santigrat derece
A°	: Angstrom
ns	: Nano saniye
ps	: Piko saniye
mM	: Mili molar
GHz	: Giga Hertz
T	: Sıcaklık

ÖZET

BAZI LİPİD DÜŞÜRÜCÜ İLAÇLARIN SERUM PARAOKSONAZ-1 ENZİMİNE AFİNİTELERİNİN DOCKİNG METODU İLE İNCELENMESİ

Paraoksonaz 1 (PON1) enzimi, paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitesi gösteren yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ilişkili bir ester hidrolazdır. Bu enzim, LDL'nin oksidasyonunu engelleyerek ve okside lipid düzeyini düşürerek ateroskleroz oluşumunu azaltmaktadır. Bu çalışmanın amacı, lipid düşürücü ilaçların (statinler, fibratlar, niasin, ezetimib, orlistat, sibutramin, probucol ve bazı fitosteroller) PON1 enzimine afinitelerinin, polimorfik yapıları [PON1 (M/L) 55, (Q/R) 192] göz önüne alınarak incelenmesi idi. Bu inceleme için homoloji modelleme metodu ile X-RAY kristalografik yapısı belirlenmiş serum PON1 enzimine 10 ns'lik moleküler dinamik simülasyonun ardından AutoDock 4 yazılımı ile moleküler docking metodu uygulandı. Bu çalışmada en yüksek afiniteye sahip olan ilaçlar PON1 normal yapıda brassikasterol, Q/R 192 polimorfik yapıda sibutramin ve M/L 55 polimorfik yapıda stigmasterol iken; en düşük afiniteye sahip olan ilaçlar PON1 normal ve M/L 55 polimorfik yapıda orlistat, Q/R 192 polimorfik yapıda atorvastatin olarak hesaplandı. Lakton yapıya sahip statinler olan simvastatin, lovastatin ve mevastatin diğer statin grubu ilaçlardan daha yüksek afinite gösterdi. Steroller PON1 normal yapı ve M/L 55 polimorfik yapıda en yüksek afinite değerlerine sahip olmasına rağmen Q/R 192 polimorfik yapıda ortalamanın altında afinite değerlerine sahipti. Hiperlipidemi tedavisinde, yüksek afiniteye sahip ilaçların (brassikasterol, sibutramin ve stigmastreol) paraoksonaz enziminin aktivitesini düşürebilme etkisini sahip olabileceği göz önüne alındığında düşük afiniteye sahip ilaçların (orlistat ve atorvastatin) kullanılmasının daha uygun olabileceği kanısına varıldı. Ancak bu sonuçların *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile desteklenmeye ihtiyacı vardır.

Anahtar Sözcükler: Biyoinformatik, Fibrat, Fitosterol, Paraoksonaz, Protein docking, Statin

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE AFFINITIES OF PARAOXONASE-1 ENZYME TO SOME LIPID-LOWERING DRUGS BY DOCKING METHOD

Paraoxonase 1 (PON1) enzyme is an ester hydrolase associated with high density lipoprotein (HDL) and having paraoxonase, arylesterase and laktonase activities. This enzyme reduces the formation of atherosclerosis by preventing the oxidation of LDL and by reducing the level of oxidized lipids. The aim of this study was to examine the affinities of lipid lowering drugs (statins, fibrates, niacin, ezetimibe, orlistat, sibutramine, probucol and some phytosterols) on PON1 enzyme by considering polymorphic structures [PON1 (M/L) 55, (Q/R) 192]. For this investigation the molecular docking method was applied using Autodock4 software on X-RAY crystallographic structure of PON1 determined by homology modeling method after 10 ns molecular dynamic simulation. In this study, while the highest affinity drug are brassicasterol for PON1 normal, sibutramine for Q/R 192 and stigmasterol for M/L 55 polymorphic structures, the lowest affinity drugs are orlistat for PON1 normal and M/L 55 polymorphic structures, and atorvastatin for Q/R 192 structure. Simvastatin, lovastatin, and mevastatin, which are lactone structure statins, showed higher affinity than the other statin group drugs. Despite sterols having the highest affinities in normal and polymorphic structure of PON1; they have below-average affinity values on Q/R 192 polymorphic structure. It was concluded that it may be more appropriate to use the low affinity drugs (orlistat and atorvastatin) in hyperlipidemia treatment considering that the highest affinity drugs (brassicasterol, sibutramine ve stigmasterol) can have effect of reducing the activity of paraoxonase. However, these findings need to be supported with *in vivo* and *in vitro* studies.

Key Words: Bioinformatics, Fibrat, Paraoxonase, Phytosterol, Protein docking, Statin

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Lipid düşürücü ilaçlar günümüzde ilaç sanayinde son derece önemli bir yere sahiptir. Ateroskleroz ve kardiovasküler hastalıkların tedavisinde de kullanılan bu ilaçların vücuttaki etki mekanizmaları günümüzde hala araştırmacıların favori konuları arasındadır. PON1 enziminin lipid düşürücü ilaçlar ile ilişkisi birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ortaya çelişkili sonuçlar çıkmıştır (1). Deneysel yöntemlerle çalışılan bu ilaçların daha çok enzim aktivitesine nasıl etki ettiği üzerinde durulmuş ve hesaplamalı yöntemlerle afinite ilişkisi literatürde yer almamıştır.

Son 10-15 yılda hesaplamalı bilimler ve bilgisayar teknolojisindeki takip edilemez ilerleme, tıp ve farmakolojik bilimleri de etkisi altına almıştır. Protein, küçük molekül, nükleotid ve amino asit gibi canlılığın vaz geçilmez yapı taşlarına ait yapısal bilgileri içeren veri bankalarının geçmişi 80'li yıllara kadar dayanmaktadır. Protein data bank gibi makro moleküler veri bankaları, *pubchem* ve *chemspider* gibi ilaç, metabolitler, pestisitler gibi küçük molekülleri içerisinde barındıran dev veri tabanları, *GenBank* ve *Uniprot* gibi nükleotid ve amino asit düzeyindeki veri bankaları bunlardan sadece bir kaçıdır. Fakat bu devasa veri bankalarının işlenmesi için gerekli olan yüksek hesaplama gücüne sahip düşük maliyetli bilgisayarlar son on yılda ticari sektör ve bilim insanlarının hizmetine sunulabilmiştir. Canlı bünyesinde cereyan eden enzim substrat etkileşimleri, ilaçların protein reseptörlere olan ilgileri, proteinlerin, hücre zarları ve virüslerin üç boyutlu yapı ve *in situ* davranışları bilgisayar ortamında son derece karmaşık yazılım ve algoritmalar ile incelenerek araştırmacıların eşsiz bilgi ve bulgulara ulaşmasına yardımcı olmuştur. Anti-HIV ilaç geliştirilmesi gibi Bu alanda gerçekleşen bir çok başarı hikayesi ve hızla artan oranda araştırmacının bu alana büyük ilgi duyması biyomühendislik, protein mühendisliği gibi bilim dallarının ortaya çıkması ve popüler hale gelmesinin yolunu açmıştır.

Moleküler docking yöntemi yıllardan beri ilgi odağı olmuştur. Genelde bugün AutoDock, Flexx, GOLD ve DOCK gibi, makul doğruluk ve hızlarda çalışan docking programları ile protein-ligand karmaşık yapılar tahmin edilebilmektedir. Bu tür docking programları veri bankalarındaki yüzbinlerce molekülü hedef moleküldeki bağlanma

bölgesine afinitesi ve konformasyonlarını hesaplamaktadırlar. Deneysel çalışmalarla karşılaştırıldığında bilgisayarların güçlü hesaplama yeteneği sayesinde maliyet ve iş gücünü büyük oranda düşürmeyi hedeflemektedir. Bu postgenomik çağda "ilaç hedefi olabilecek" biyolojik hedeflerin sayısında dramatik bir artış ile moleküler docking şüphesiz ilaç keşfinde önemli bir rol oynamaya devam edecektir (2). Autodock kullanımı kolay olması ve kabul edilebilir doğrulukta sonuçlar ortaya koyması nedeniyle literatürde en çok tercih edilen moleküler docking programıdır.

Son yıllarda artan bir ivmeyle çalışma konusu olan ve özellikle anti aterosklerotik özelliği ve toksik metabolitleri hidrolizi ile önem kazanan PON1 enzimi, (M/L) 55 ve (Q/R) 192 polimorfik yapıları ile lipid düşürücü ilaçlar arasında nasıl bir afinite ilişkisi vardır? Sorusuna hesaplamalı bilimler ve bilgisayar teknolojilerinden faydalanılarak bu çalışmada yanıt aranmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada moleküler docking metodundan faydalanılarak lipid düşürücü ilaçların PON1 ve polimorfik yapılarına afinitelerinin ölçülüp değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile lipid düşürücü ilaçların enzim aktivitesine etkisi moleküler docking metodundan faydalanılarak hangi ilacın PON1 enzimi ile ilişkisi açısından faydalı olabileceği hedeflenmiş olup her herhangi bir kimyasala maruz kalmadan zaman ve paradan tasarruf yapılarak ileri çalışmalar için bir öneri olarak sunulmuştur.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Paraoksonaz Ailesi

Paraoksonaz enzim ailesi, son yıllarda özellikle detoksifikasyon özelliği ile geniş uygulama alanlarında ilgi görmüştür. Paraoksonaz, homosistein, tiyolakton, ilaç metabolizması ve sinir ajanlarının detoksifikasyonu dâhil olmak üzere fizyolojik olarak önemli rollere sahip bir paraoksonaz enzimdir. 1950'li yıllarda Aldridge (3), birçok memeli türü ve insan serumunda paraoksonun hidrolizini çalışmış ve organofosfatları hidroliz etme kabiliyetinden dolayı diğer esterazlardan ayırmak için A-esteraz (paraoksonaz) adını önermiştir. İnsan paraoksonaz ailesi kromozom 7'de yer alır. Farklı tipte birçok substrat çeşidine karşı hidrolitik aktiviteye sahip olan üç tipi vardır (4). Paraoksonaz gen ailesi, Parmo ve arkadaşları (5) tarafından 1996 yılında multi gen ailesi olarak keşfedilerek PON1, PON2 ve PON3 olarak isimlendirilmiştir. İnsan PON1 ve PON2 genlerinin her biri 9 eksona ve eşdeğer pozisyonlarda ekson-intron bağlantılarına sahiptir. PON1, PON2 ve PON3 genleri insanda kromozom 7'nin uzun kolunda farede ise kromozom 6'da yerleşmiştir (5). Bu üç gen arasında nükleotid düzeyinde %70, amino asit düzeyinde %60 benzerlik vardır. PON1, PON2 ve PON3 dokuz eksona sahiptir fakat PON1 ekson 4'te pozisyon 106 (lizin)'ya denk gelen ekstra bir kotona daha sahiptir (5, 6). PON1 mRNA'sı karaciğerde ifade edilirken PON3 mRNA'sı birincil olarak karaciğerde ayrıca böbrekte ifade edilir. PON1 ve PON3'ün aksine PON2 böbrekler, karaciğer, akciğer, ince bağırsak, plasenta, dalak, mide ve testis gibi birçok dokuda ifade edilir (7). PON1 özellikle son yıllarda anti toksikolojik özellikleri ile yaygın araştırma konusu olmuştur. PON1'in aksine, PON2 ve PON3 enzimi çok daha az incelenmiştir. PON2 yaklaşık 44 kDa molekül kütleli hücre içi bir proteindir (7). PON2 mRNA'sı yüksek oranda karaciğer, akciğer, plasenta, testisler ve kalp olmak üzere hemen hemen tüm insan dokusunda ifade edilir. PON2 mRNA'sı aynı zamanda endotel hücresi, düz kas hücresi ve makrofaj içeren arter duvar hücreleri içinde de bulunur. PON2, HDL (high density lipoprotein) veya LDL (low density lipoprotein) ile ilişkili değildir (8, 9). PON2, PON1 ve PON3 gibi N-terminal sinyal sekansına sahip olmasına rağmen plazma membranı ile ilişkili olarak hücrede bulunduğu görülmektedir. PON2'nin sadece küçük miktarlarda hücreden salgılandığı ya da hemen parçalandığı

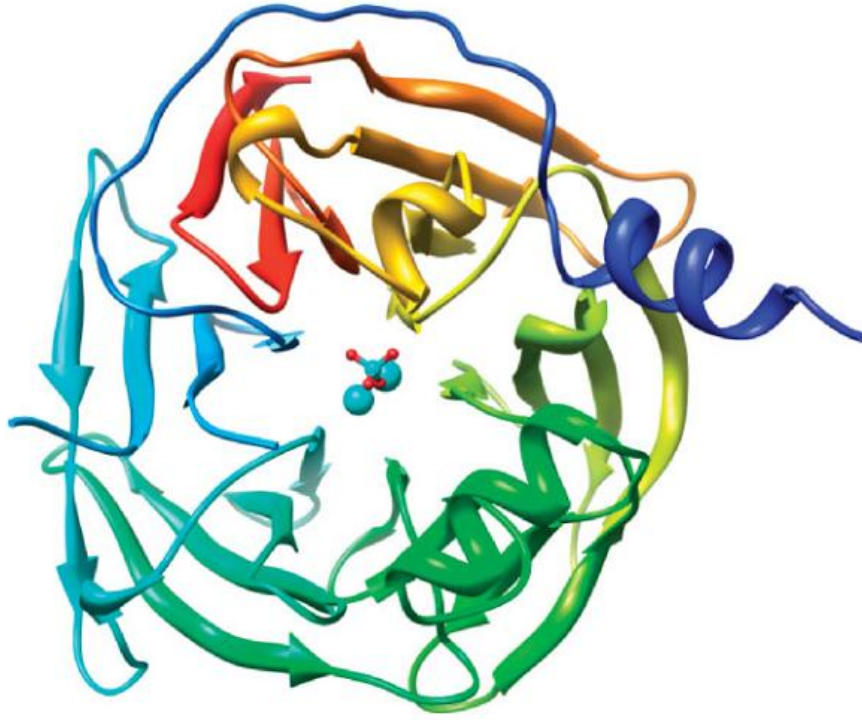
düşünülmektedir (9). Her üç PON enzim içerisinde, PON3 en son olarak keşfedilmiştir. PON3 ağırlıklı olarak karaciğerde sentezlenir ve serum içinde HDL ile ilişkili fakat PON1'e göre çok daha düşük seviyelerdedir. PON3 mRNA'sının karaciğerde ekspresyonunun yanı sıra, aynı zamanda böbrekte ifade edildiği tespit edilmiştir. PON3 yaklaşık olarak 40 kDa molekül ağırlığında olup antioksidan özelliğe sahiptir (9).

4.1.1. Paraoksonaz-1 (PON1)

PON1, yapısında kalsiyum bulunduran 43-47 kDa ağırlığında ve 354 amino asitten oluşan bir glikoproteindir. Ağırlıklı olarak karaciğerde eksprese edilen PON1, HDL'ye bağımlı apolipoprotein A1 ile birlikte dolaşıma katılır (10). LDL'nin oksidasyonunu engellemektedir (11). PON1, paraoksonaz (E.C.3.1.8.1), laktonaz (EC 3.1.1.81) ve arilesteraz (E.C.3.1.1.2) aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır (12-14).

90'lı yıllardaki çalışmalar insan ve tavşan paraoksonazının saflaştırılmasına olanak tanımış, klonlama ve sekanslama da bunu takip etmiştir (15). Memeli rekombinant PON1'in üç boyutlu yapısı Harel M ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir (16). Fonksiyonları ve fizyolojik substratları bilinmesine rağmen PON1 tam olarak anlaşılamamıştır. PON1'in anti aterosklerotik etki ve ilaç metabolizmasındaki rolünde geniş bir hidrolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (17).

İnsanlarda tek nükleotid polimorfizmi PON1'in durumunu anlamlı düzeyde belirlemektedir. Yüksek PON1 düzeyi düşük kardiyovasküler hastalık riski ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür (18). *İn-siliko* veri tabanları kullanarak çeşitli transkripsiyon faktörleri ve mikroRNA'nın PON1 için varsayılan düzenleyici olabileceği önerilmiştir. Genetik faktörler ve yaşam tarzının yanında PON1 aktivitesine ilaçlar ve diyetel faktörler de etkili olabilmektedir. PON1'in durumu; yağ ve yağ asitleri, antioksidan vitaminler (örneğin askorbik asit ve tokoferol), polifenoller ve polifenol açısından zengin besinleri içeren diyetlerle belirlenmektedir (18). Şekil.1'de Sanan ve arkadaşlarının (19) insan PON1 G2E6 varyantının X-RAY kristalografik yapısından faydalanarak elde ettiği PON1 görüntüsü şematize edilmiştir.

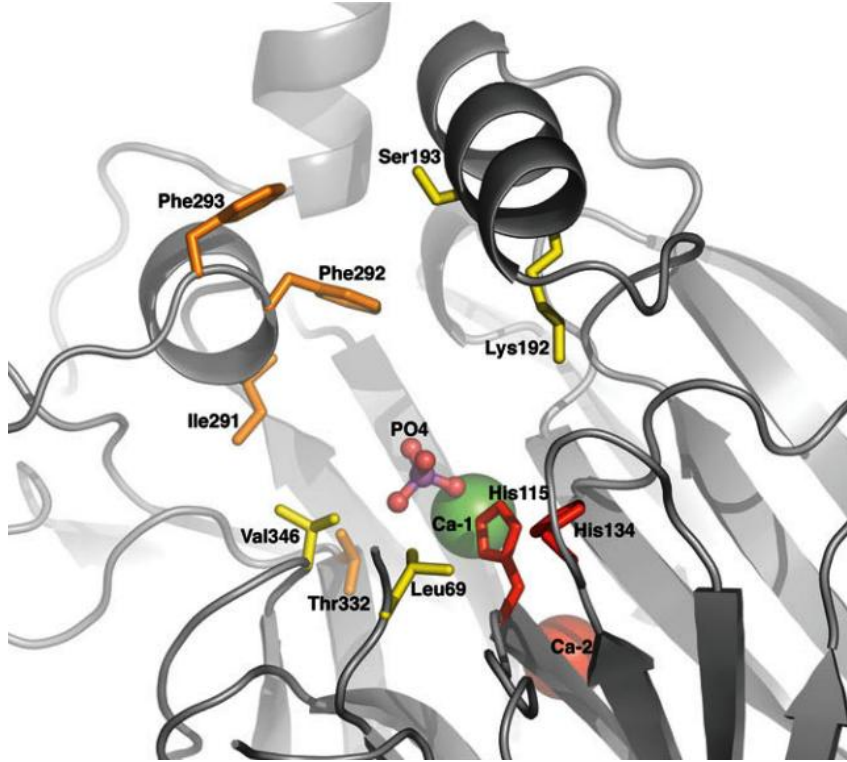


Şekil 1. İnsan PON1 G2E6 varyantının X-RAY kristalografik yapısı (19).

4.1.1.1. PON1'in Katalitik Aktivitesi

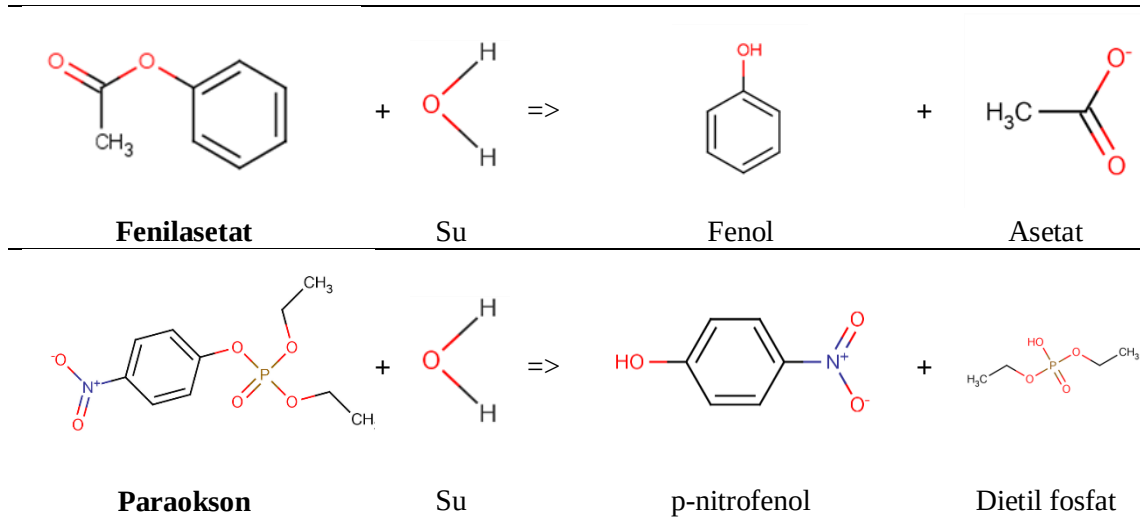
Kofaktör olarak yapısal ve katalitik aktivitede rolü olan iki kalsiyum atomu paraoksonaz içindeki tünelde yerleşmiş haldedir (16). Enzimin aktif bölgesinde yer alan histidin- histidin çiftinin (H115 ve H134) katalitik mekanizmada rolü vardır (20).

Bir takım amino asitlerin esteraz ve PON1 aktivitesindeki önemi, eksikliğinde aktivitede azalma ya da kaybolmaya sebebiyet vermesiyle ortaya konulmuştur. Bu amino asitlerden bazıları L69, H115, H134, D169, F222, D269, H285, F292, T332, V346 ve W281'dir (21). İleri çalışmalar laktonaz / esteraz ve fosfotriesteraz aktivitelerini etkileyen amino asitlerin aktif bölgenin farklı kısımlarında yer aldığını göstermiştir (14, 22). Şekil 2'de Harel ve arkadaşlarının (16) çalışmalarında elde ettiği paraoksonaz enzimin aktif merkezi gösterilmiştir.



Şekil 2. PON1'in aktif bölgesinde yer alan Ca^{+2} (yeşil küre)'in ve katalitik aktiviteden sorumlu aminoasitlerin X-RAY kristalografik görüntüsü (16).

Şekil 3'te fenilasetat ve paraoksonun paraoksonaz ile hidrolizi gösterilmiştir (23).



Şekil 3. Çeşitli paraoksonaz substratları (23).

4.1.1.2. PON1 Gen Polimorfizmi

PON1'in kodlandığı iki ortak polimorfizm vardır. Bunlardan biri metiyonin ile lösinin yer değiştirdiği 55'ci konum (M/L 55) diğeri ise glutamin ve argininin yer değiştirdiği 192. konumdur (Q/R192). mRNA seviyesinde M/L 55 polimorfizminde 260'cı mRNA pozisyonunda timin yerine adenin gelirken (TTG⇒ATG) Q/R 192 polimorfizminde ise 672'ci mRNA pozisyonunda adenin yerine guanin (CAA⇒CGA) gelmiştir (24). M/L 55 polimorfizmi, inme, koroner arter hastalığı, Parkinson hastalığı, total ve LDL kolesterol düzeylerinde farklılıklar ve PON1 mesajı ile paraoksonun aktivite düzeyleri ile ilişkili iken Q/R 192 polimorfizmi ise paraokson, diazoxon, soman ve sarin gibi çeşitli moleküllerin hidroliz oranlarını etkilediği ve buna ek olarak koroner arter hastalığı, inme, ailesel hiperkolesterolemi, tip 2 diyabet ve Parkinson hastalığı ile ilişkisi gözlenmiştir (25).

Herhangi bir kıstasa göre belirlenmiş bir insan popülasyonunda serum PON1 aktivitesi en az 40 kat değişebilir. Bu değişkenliğin çoğu PON1 geninin kodlama [PON1 (M/L) 55, (Q/R) 192] bölgesinde ve promoter (108C/T) bölgedeki genetik bölgesinde bulunmaktadır. PON1 (Q/R) 192 polimorfizmi, enzimin hidrolitik aktivitesinde substrat polimorfizmi ile izah edilebilir (26). PON1 (M/L) 55 polimorfizmi, PON1'in HDL-C ile bağlanmasında rol oynayan N-terminal kısmında görülür (27). Her iki polimorfik yapının paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinin benzer olduğu gösterilmiştir (28).

4.2. Lipid Düşürücü İlaçlar

Lipid düşürücü ilaçlar, genel olarak, hiperlipidemi hastalarında lipidin farklı formlarının yükselmiş seviyelerini kontrol etmede yardımcı olur. Lipid düşürücü ilaçlar olan statinler kolesterol düşürücü iken fibratlar yağ asidi ve trigliserit üzerinde etkilidir. Buna ek olarak ezetimib ve niasin gibi ilaçlar da kolesterolün kontrolünde kullanılmaktadır (1). Yapılan çalışmalar bazı lipid düşürücü ilaçların PON1 aktivitesini baskıladığını rapor ederken bazı ilaçların ise aksine PON1 aktivitesini artırdığını gözlemlemiştir (29).

4.2.1. Statinler

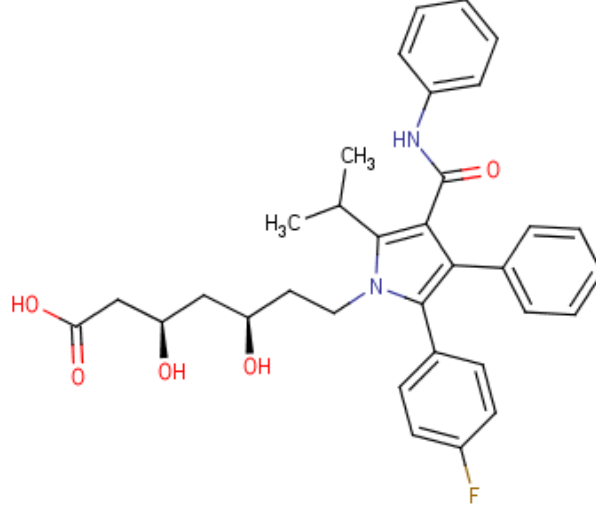
Fungusların savunma mekanizmaları üzerine çalışan Endo ve arkadaşları (30) statinlerin 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktazı inhibe ettiğini ve böylece kolesterol biyosentezini baskıladığını göstererek mevastatin yapısını ilk statin grubu bileşik olarak rapor etmişlerdir. Farmasötik formda bulunan statinler arasında lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin ve pitavastatin bulunmaktadır (31). İlk elde edilen statinlerden olan lovastatin ve mevastatin fungiden elde edilirken diğer bileşikler, ilk statinlerin çeşitli modifikasyonları sonucunda kimyasal sentez yolu ile elde edilmişlerdir (1).

Statin moleküllerinde ortak olarak dihidroksi heptanoik veya heptenoik asit yanzincirleri bulunur (32). Bu zincir HMG-CoA redüktaz enziminin aktif bölgesine bağlanır ve yarışmalı bir inhibisyona neden olur. Bu inhibisyon ile Asetil CoA'dan mevalonik asit sentezi gerçekleşemez ve kolesterol sentezi inhibe olur. Hücre içinde sentezlenen kolesterolün azalması ile karaciğer hücre yüzeyinde bulunan LDL ve VLDL reseptörlerinin sayısı artar. Bu reseptörler dolaşımda bulunan LDL ve VLDL'yi yakalayıp karaciğer hücrelerine alarak plazmadaki miktarlarının azalmasına neden olur. Yani statinlerin kolesterol düşürücü etkileri bir yandan hücre içi sentezi azaltıp, diğer yandan da dolaşımdaki LDL'nin hücre içine alınmasını sağlayarak gerçekleşir (33).

4.2.1.1. Atorvastatin

Atorvastatin ilk defa 1985 yılında Bruce Roth tarafından sentezlenmiştir (34) (Şekil 4). Dislipidemi ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (35). Diğer statinler gibi atorvastatin de HMG-CoA'nın yarışmalı inhibitörüdür. HMG-CoA'dan mevalonat sentezini inhibe ederek hepatik kolesterol biyosentezini azaltır (34). Atorvastatinin enzimi inhibe etmesi ile hepatositlerdeki LDL reseptör sayısı artar ve serum LDL konsantrasyonu azalır (36). Kural ve arkadaşları (37) atorvastatinin serum paraoksonaz aktivitesi ve HDL düzeyini anlamlı derecede arttığını göstermiştir. Abdin ve arkadaşları (38) tip 2 diyabetli mısırlı hastalarda atorvastatin tedavisinin paraoksonaz aktivitesini artırdığını gözlemlemişler ve paraoksonazın

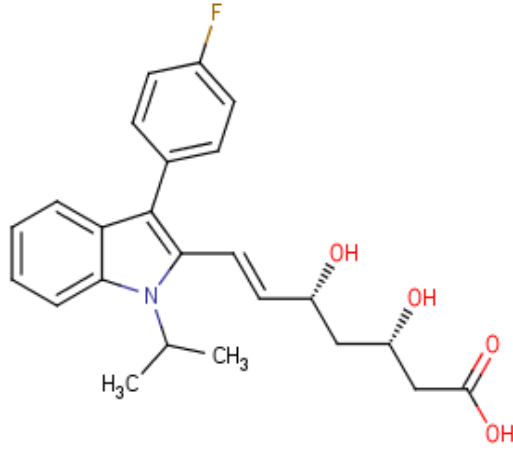
diyabetin ve diyabetik nöfropatinin tedavisinde yeni bir seçenek olabileceğini ileri sürmüşlerdir.



Şekil 4. Atorvastatin (Pubchem.org- CID 60823)

4.2.1.2. Fluvastatin

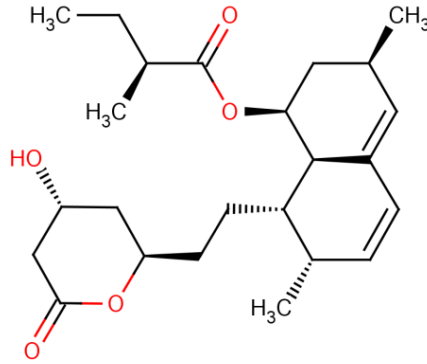
Fluvastatin hiperkolesterolemi tedavisinde ve kardiyovasküler hastalığı önlemek için kullanılan statin grubu ilaç sınıfının bir üyesidir. HMG-CoA'nın yarışmalı inhibitörüdür. HMG-CoA'dan Mevalonat sentezini inhibe ederek hepatik kolesterol biyosentezini azaltır (34). Yapılan çalışmalar fluvastatinin PON-1 aktivitesini paraokson ve fenilasetata göre yaklaşık %24 ile %17 oranında azalttığını göstermiştir (39). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek dozda fluvastatin verilen sıçanların karaciğer ve plazma PON1 seviyelerinin düştüğü fakat düşük dozda sadece karaciğer PON1 aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (40).



Şekil 5. Fluvastatin (Pubchem.org-CID 1548972).

4.2.1.3. Lovastatin

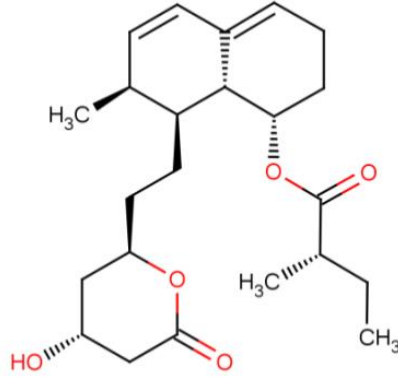
Güçlü bir HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan lovastatin 1970’lerde plazma LDL seviyesini düşürücü lakton içeren statin grubu bir ilaç olarak keşfedilmiştir (41). Lovastatin özellikle istiridye mantarı ve kırmızı pirinç maya gibi gıdalarda bulunan doğal bir ilaçtır (42, 43).



Şekil 6. Lovastatin (Pubchem.org-CID 53232).

4.2.1.4. Mevastatin

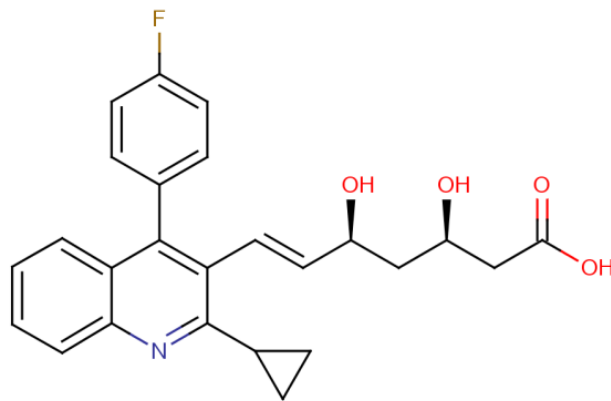
Mevastatin 1970'lerde Akira Endo tarafından *Penicillium citrinum*'dan izole edilmiş ve HMG-CoA redüktaz inhibitörü olarak tanımlanmıştır (30). Lakton içeren bir ilaç olan lovastatinin PON1 tarafından metabolize edildiği gösterilmiştir (44).



Şekil 7. Mevastatin (Pubchem.org-CID 64715).

4.2.1.5. Pitavastatin

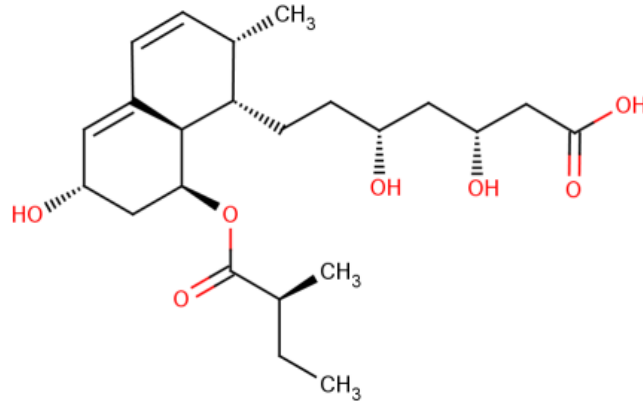
Diğer statinler gibi HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan Pitavastatin, Nissan Kimya Endüstrileri ve Kowa İlaç tarafından Tokyo'da keşfedilmiştir (45). Yapılan çalışmalar Pitavastatinin PON1 promoter aktivitesini artırdığını göstermiştir (46).



Şekil 8. Pitavastatin (Pubchem.org-CID 5282452).

4.2.1.6. Pravastatin

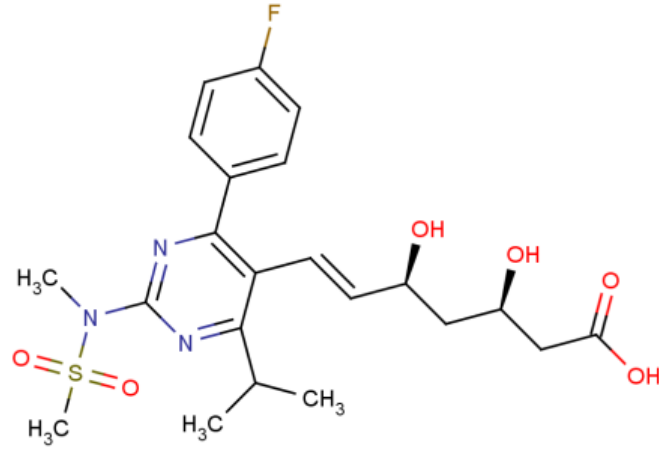
Başlangıçta CS-514 olarak bilinen ilaç, Sankyo İlaç A.Ş. araştırmacıları tarafından *Nocardia autotrophica* adı verilen bir bakteride tespit edilmiştir (47). Pravastatinin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerinde kayda değer anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (40).



Şekil 9. Pravastatin (Pubchem.org-CID 54687).

4.2.1.7. Rosuvastatin

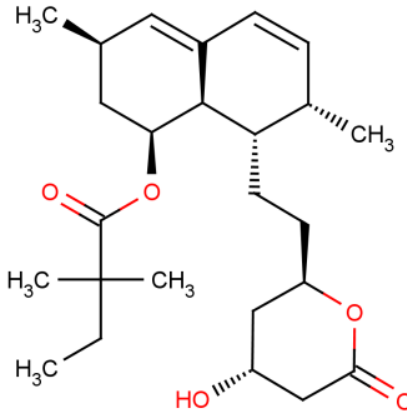
Statin grubu ilaç sınıfında yer alan rosuvastatin, yüksek kolesterol ve kardiyovasküler hastalıklara karşı kullanılır (48, 49). Rosuvastatinin diğer statinlerden farklı olarak yapısında sülfon grubu bulunur (50). Rosuvastatin HMG-CoA redüktazın yarışmalı inhibitörüdür. Ortalama yarı ömrü 19 saat ve oral yolla alımda plazma pik konsantrasyonu 3-5 saat kadardır (51). Rosuvastatin ile yapılan tedavilerde PON-1 aktivitesinin anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (52).



Şekil 10. Rosuvastatin (Pubchem.org-CID 446157).

4.2.1.8. Simvastatin

Simvastatin, dislipidemi ve kardiyovasküler hastalığın önlenmesinde kullanılan statin grubu lakton yapıları bir ilaçtır (53, 54). Diğer statinler gibi HMG-CoA redüktaz inhibitörüdür (55). *İn vitro* kültür medyumunda insan HuH7 hepatoma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada simvastatinin PON1 aktivitesini ve PON1 mRNA düzeyini %25-50 düşürdüğü gözlenmiştir (56).



Şekil 11. Simvastatin (Pubchem.org-CID 54454).

4.2.1.9. Paraoksonaz ve Statinler

Son yıllarda, çeşitli klinik çalışmalarda PON1 aktivitesi üzerine statinlerin etkisi incelenmiştir. Ağırlıklı olarak simvastatin ve atorvastatinin kullanıldığı çalışmalarda

sonuçlar çelişkili olsa da ağırlıklı olarak statinlerin PON1 aktivitesi ve PON1/HDL oranını artırdığı gözlenmiştir (57). *In vitro* kültür ortamında insan HuH7 hepatoma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada pravastatin, simvastatin ve fluvastatinin PON1 aktivitesini ve PON1 mRNA düzeyini %25-50 düşürdüğü gözlenmiştir. Yine aynı hücrelerde yapılan çalışmada fenofibrik asidin PON1 aktivitesini %30-50 artırdığı gözlenmiştir (56). İzole edilmiş lipoproteinler üzerine yapılan bir başka *in vitro* alışmada atorvastatinin iki okside metaboliti ve gemfibrozil metabolitinin HDL ile ilişkili PON1 aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (58). Gouédard ve arkadaşları insan hepatoma hücre kültüründe (HuH7) pravastatin, simvastatin ve fluvastatin'in PON1 aktivitesi ve mRNA düzeylerini anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir. Yapılan çalışmada birkaç transkripsiyon başlama sitesi tespit edilerek fibrat ve statinlerin düzenlemede katkıları olduğu gösterilmiştir (59). Tomás ve arkadaşları'nın simvastatin tedavisinin PON1 aktivitesi üzerinde PON1-192 ve PON1-55 genetik polimorfizminin etkili olup olmayacağını araştırmıştır. PON1-192 ve PON1-55 polimorfizminin etkisinin simvastatin tedavisi öncesi ve sonrası değerlendirildiğinde anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği bildirilmiştir (60).

4.2.2. Fibratlar

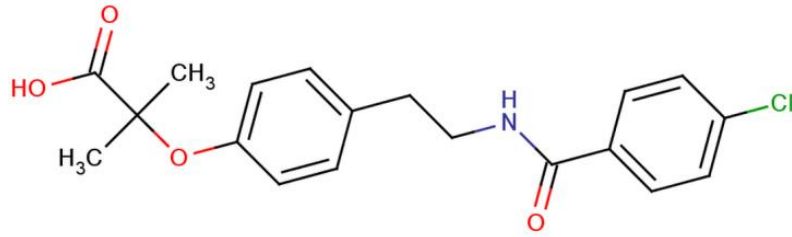
Lipit düzenleyici tedavide yaygın olarak kullanılan fibratlar, plazma trigliserit düzeyini önemli ölçüde düşürerek sonuçta LDL kolesterol düzeyinin azalmasına ve HDL kolesterol konsantrasyonlarının artmasına yardım ederler (61). Klofibrat 1960'da Japonya'da keşfedilen İlk fibrattır. Ciprofibrat, bezafibrat, fenofibrat ve gemfibrozil gibi diğer fibratlar sonraki çalışmalarda üretilmişlerdir. Yapılan alışmalar klofibrat ve ciprofibrat gibi ilaçların uzun süre kullanımının peroksizom proliferasyonuna sebebiyet verdiğini ve karaciğerde hepatomegali ve tümör oluşumlarına yol açtığını göstermiştir (62, 63).

Fibratlar, lipoprotein metabolizmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunda değişiklikler yaparak etkilerini gösterirler. " Peroksizom Proliferatör aktive edici Reseptörler " (PPAR) olarak isimlendirilen nükleer hormon reseptörleri bu etki için aracılık rolünü üstlenir (64). PPAR'ler çevreden aldıkları sinyalleri genoma taşıyan

transkripsiyon faktörleridir. Nükleer reseptörler DNA'yı tanıyarak "response element" olarak isimlendirilen spesifik yerlere bağlanır. Fibrat etkisiyle aktive olan PPAR'ler diğer bir nükleer reseptörle (retinoik asit -x- reseptör) heterojen bir şekilde birleşerek "peroksizom proliferatör response element" olarak adlandırılan spesifik RE'ye bağlanır ve hedef genin transkripsiyon hızını değiştirir. Fibratların lipoproteinler üzerine etkisi PPAR α aracılığıyla (64).

4.2.2.1. Bezafibrat

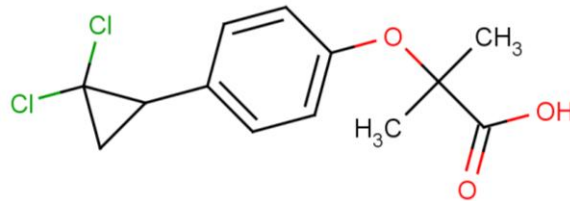
Bezafibrat hiperlipidemi tedavisinde kullanılan fibrat türü bir ilaçtır. Kandaki LDL kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürmede ve HDL düzeyini artırmada yardımcı olur (65).



Şekil 12. Bezafibrat (Pubchem.org-CID 39042).

4.2.2.2. Ciprofibrat

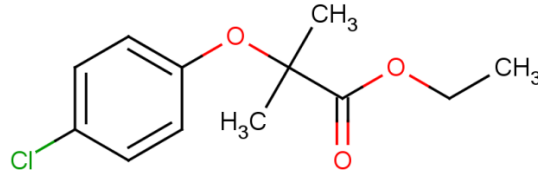
Ciprofibrat diğer fibratlar gibi kardiyovasküler riskin azaltılması ve dislipidemi tedavisinde kullanılmaktadır (66). Ciprofibrat ile yapılan tedavide plazma LDL ve Apo B-100 seviyesinde belirgin azalma gözlenmiştir. Ayrıca trigliserit ve serbest kolesterol düzeyinin normale dönmesine yardımcı olduğu görülmüştür (67).



Şekil 13. Ciprofibrat (Pubchem.org-CID 2763).

4.2.2.3. Klofibrat

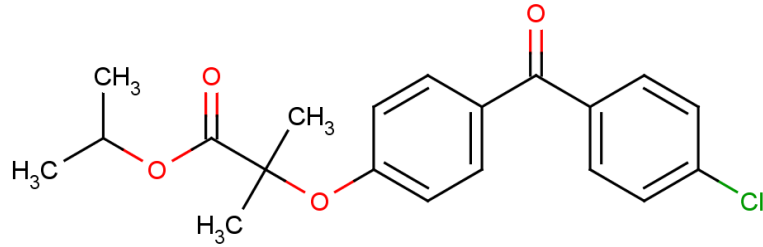
Atromid-S ticari ismine sahip Fibrat türü molekül olan Klofibrat plazma kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürmeye yardımcıdır. Lipoprotein lipaz aktivitesini artırarak VLDL(very low density lipoprotein)'nin LDL'ye dönüşümünü hızlandırır ve böylece plazma VLDL seviyesinin düşmesini sağlar (68).



Şekil 14. Klofibrat (Pubchem.org-CID 2796).

4.2.2.4. Fenofibrat

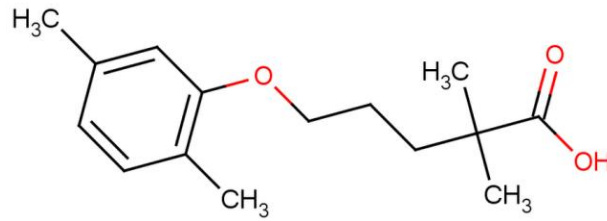
Diğer fibratik asit türevleriyle yapısal benzerliğe sahip olan fenofibrat klofibrat gibi lipid düzenleyici bir ilaçtır. Hiper trigliseridemik ve hiperkolesterolemik hastalarda plazma trigliserit ve total kolesterol miktarlarının azaltılmasında etkindir. Tedavi öncesi düşük değerlere sahip hastalarda yüksek dansiteli kolesterol (HDL) seviyesi genellikle artar. Fenofibrat, hiper lipoproteinemili diyabetik hastalarda glisemik kontrolde herhangi bir yan etki oluşturmadan eşit derecede etkili olduğu görülmüştür. Plazma lipid düzeyi üzerindeki fenofibratın etkisi uzun süreli (2 ila 7 yıl) tedavi sırasında devam etmektedir (69).



Şekil 15. Fenofibrat (Pubchem.org-CID 3339).

4.2.2.5. Gemfibrozil

Gemfibrozil FDA (U.S. Food and Drug Administration) onaylı fibrat türü bir ilaçtır. Yapısal olarak amfipatik karakterli karboksilik asit molekülüdür. Serum lipid düşürücü olarak 1968’de Detroit şehrinde ilk kez Parke Davis Araştırma Laboratuvarı tarafından tasarlanmıştır (70). 1976 yılında hipolipidemik ve plazma trigliserit düşürücü güçlü özellikleriyle markete başarılı şekilde giriş yapmıştır (71).



Şekil 16. Gemfibrozil (Pubchem.org-CID 3463).

4.2.2.6. Paraoksonaz ve Fibratlar

Fibratların paraoksonaz üzerine etkisini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Gemfibrozil’in PON1 aktivitesi üzerine yaptığı etkiyi gösteren bir çalışmada PON1 aktivitesi %44-33 oranında düşük rapor edilmiştir(72). İzole edilmiş lipoproteinler üzerine yapılan bir başka *in vitro* çalışmada atorvastatinin iki okside metaboliti ve gemfibrozil metabolitinin HDL ile ilişkili PON1 aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (58). Simvastatin, gemfibrozil ve fenofibrat ile tedavi edilen hastalarda PON1 aktivitesi artarken ciprofibrat, bezafibrat ve gemfibrozil ile tedavi edilen hastalarda PON1 aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (73-77).

4.2.3. Fitosteroller

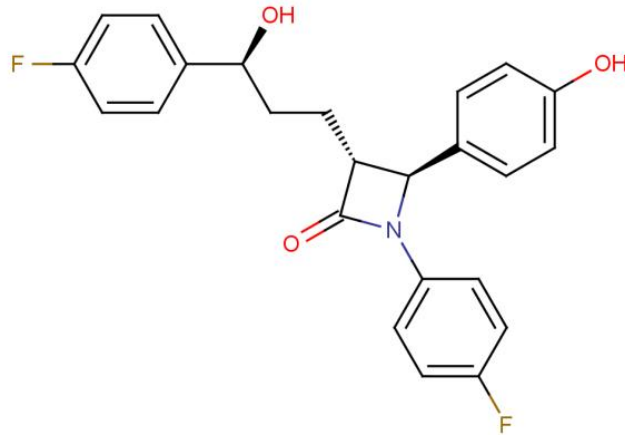
Bitki sterolleri ve stanollerini kapsayan fitosteroller, karbon yan zinciri oluşumu ve çift bağ varlığı ya da yokluğuna göre kolesterole benzemektedirler. Stanoller, sterol halka yapısında çift bağ bulundurmadığından doymuş sterollerdir. 200’den fazla sterol ve benzer yapısı tanımlanmıştır (78). Diyetle alınan fitosteroller, karaciğer lipid

metabolizmasını etkiler, Asetil-CoA karboksilaz ve malik enzim aktiviteleri anlamlı düzeyde azaltarak düzenleyici rol oynarlar (79).

4.2.4. Diğer Lipid Düşürücü İlaçlar

4.2.4.1. Ezetimib

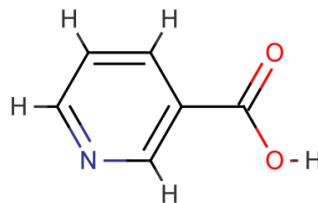
Ezetimib, diyet ve safra kökenli kolesterolün bağırsak duvarından emilimini engelleyen kolesterol emilim inhibitörüdür (80). Tang ve arkadaşları *in vitro* çalışmalarına göre ezetimibin PON1 paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesini azaltıcı etkiye sahip olduğunu ifade etmişlerdir (81).



Şekil 17. Ezetimib (Pubchem.org-CID 150311).

4.2.4.2. Niasin

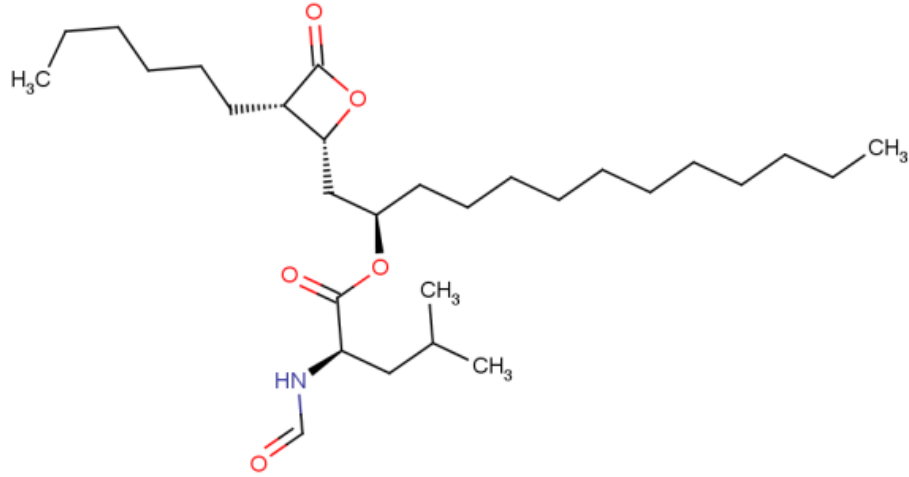
Tang ve arkadaşlarının *in vitro* çalışmalarına göre niasinin PON1 paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı ifade edilmiştir (81).



Şekil 18. Niasin (Pubchem.org-CID 938).

4.2.4.3. Orlistat

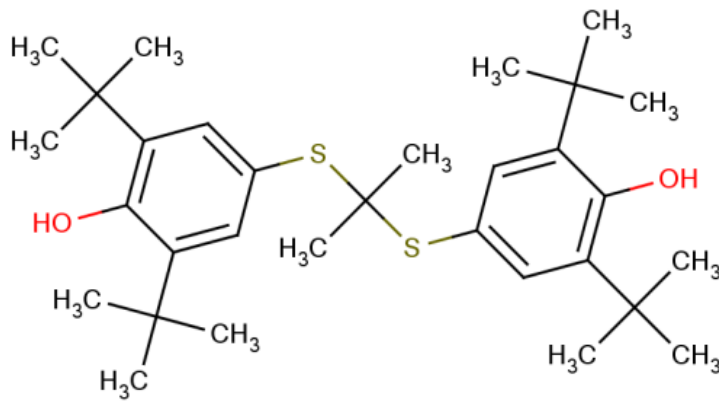
Orlistat, bağırsak lipazı inhibe ederek diyet trigliseridin emilimini azaltır. Orlistat tedavisi kilo kaybı ile ilişkisine nazaran plazma LDL-kolesterol konsantrasyonunda daha büyük bir azalma ile ilişkilidir (82).



Şekil 19. Orlistat (Pubchem.org-CID 3034010).

4.2.4.4. Probukol

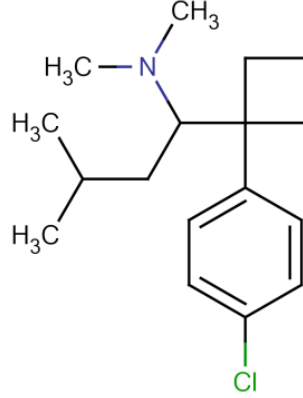
Probukol antilipidemik bir ilaçtır. İlk olarak, koroner arter hastalığının tedavisinde geliştirilmiştir (83).



Şekil 20. Probukol (Pubchem.org-CID 4912)

4.2.4.5. Sibutramin

Sibutramin, genellikle hidroklorür mono hidrat tuzu halinde bir anoreksiyan olup 2010 yılına kadar pazarlanan, diyet ve egzersiz ile birlikte eksojen alınan obezite tedavisinde ilave bir tedavi olarak kullanılan ilaçtır (84).



Şekil 21. Sibutramin (Pubchem.org-CID 5210).

4.2.4.6. Paraoksonaz ve Diğer Lipid Düşürücü İlaçlar

Diğer lipid düşürücü ilaçlar ile PON1 aktivitesi arasındaki ilişkiyi gösteren çeşitli çalışmalar literatürde yer almaktadır. Tang ve arkadaşlarının (85) yaptığı çalışmada niasinin paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesine etki etmediği fakat ezetimibin paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesini düşürdüğü gözlenmiştir. Audikovszky ve arkadaşları (86) yaptıkları çalışmada orlistatin paraoksonaz aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Hong ve arkadaşları (87) probukolun serum PON1 ve hepatositlerde mRNA ifadesini artırdığını göstermiştir.

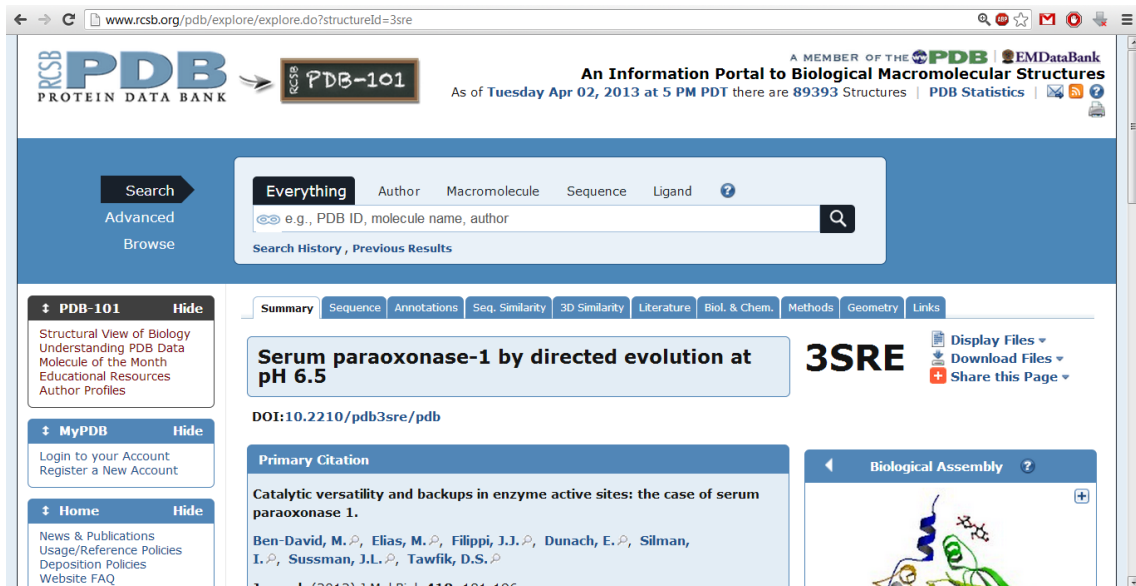
4.3. Sanal Görüntüleme (Virtual Screening)

Hesaplamalı kimyadaki yeni gelişmeler ve yüksek verimli görüntüleme kimyagerlere çok sayıda bileşiği sentezleme olanağı vermiştir. Sanal tarama araştırmacılara bilgisayar teknolojisinin gelişmesine paralel olarak zaman ve masraf kaybını minimize ederek daha isabetli ve hızlı sonuçlar almayı mümkün kılmıştır (88). Halen gelişmekte olan bir yöntem olmasına rağmen, hesaplama tekniklerindeki

ilerlemeler sanal görüntüleme üzerinde olumlu bir etkiye sahip olmuştur (89). Lipid düşürücü ilaçların PON1 enzimi ile etkileşimini docking metodu ile hesaplamalı yöntemler kullanılarak inceleyen çalışmalara rastlanılmamıştır.

4.3.1. Protein Veri Bankası

Protein veri bankası (PDB : Protein Data Bank) biyolojik makro moleküler kristal yapılar için bir arşiv olarak 1971 yılında Brookhaven Ulusal Laboratuvarı'nda kurulmuştur (90). Başlangıçta arşiv, yedi yapı ile başlamış her yıl bir miktar daha eklenerek büyümüştür. 1980'lerde eklenen yapıların sayısını önemli ölçüde artmaya başlamıştır. Buna kristalografi sürecinin tüm yönleri ile geliştirilmesi, nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemlerle belirlenen yapıların yanı sıra veri paylaşımı ile ilgili değişiklikler neden olmuştur. 1990'ların başlarında dergilerin çoğunluğu PDB kodu gerekliliğini benimsemiş ve en az bir finansman kurumu (Genel Sağlık Bilimleri Ulusal Enstitüsü) bütün yapıları için Uluslararası Kristalografinin Birliği tarafından yayınlanan kuralları benimsemiştir (91). Banka kristalografik çalışmalarda elde edilen kısmi bağlar ve atomik koordinatlar içeren PDB formatını içerir. Ayrıca format, molekülün elde edildiği türler, difraksiyon verileri, literatür alıntıları, ikincil yapı özellikleri ve çözünürlük gibi çeşitli bilgiler de verir (92).



Şekil 22. PDB.org web sitesi görünümü.

4.3.2. Homoloji Modelleme

Homoloji modelleme, şablon olarak deneysel olarak belirlenen yapıları kullanarak üç boyutlu protein yapıda modeller oluşturmayı amaçlamaktadır. Hedef protein ve şablon yapı arasında aminoasit dizisi hizalamaya dayalı olarak üç boyutlu modeller oluşturulur. Yapı kalitesi değerlendirme araçları ile modelin güvenilirliği test edilir. Homoloji modelleme güvenilir yapısal bir model oluşturmak için sayısal bir yöntem olup rutin birçok biyolojik uygulamada kullanılmaktadır (93). Günümüzde yaygın kullanılan homoloji modelleme araçları arasında *MODELLER*, *I-TASSER* VE *SWISS-MODEL* gelmektedir (94-96).

4.3.3. Moleküler Dinamik Simülasyonu

Kristalografik çalışmalarda ligand bağlanmasında protein esnekliğinin önemli rol oynuyor olması ve bunun masraflı ve yoğun iş gücüne gereksinim duyması araştırmacıları protein davranışını tahmin etmede birçok hesaplama tekniğın arayışına itmiştir (97). İlk moleküler dinamik (MD) simülasyon gerçekleştirildiğinden bu yana 35 yıl geçmiştir (98). Bu süre zarfında, moleküler dinamik simülasyonlar biyomoleküler çalışmalarda deneysel teknikler ile tamamlayıcı olan bir araç haline gelmiştir. Biyomoleküler dinamik simülasyonlar üç temel alanda uygulanmaktadır.

1. MD simülasyonları çözelti içindeki biyomoleküllerin farklı zaman ölçeğinde doğal dinamik ilişkileri hakkında bilgi edinmek için kullanılır.
2. MD simülasyonları, yapının moleküler özelliklerinin termal ortalamalarını gösterir. Ergodik hipotezine göre, etrafındakilerle birlikte tek bir molekül belli bir zaman periyodunda simüle edilebilir ve ortalama belli bir zamandaki moleküler özellikler deneysel ölçüm yaklaşımı ile analiz edilebilir. Bu işlemle genellikle ligand bağlanma gibi serbest enerji farklılıkları için kimyasal işlemler ve sıvı içindeki yığın özellikleri hesaplanır.
3. MD, bir molekülün konformasyonlarını veya bir kompleksin termal etkileşimlerini hesaplayabilir. Bu teknik ligand yerleştirme uygulamaları gibi konformasyonel alan araştırmalarında kullanılır (99). Günümüzde MD

uygulamalarında AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement), GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations), NAMD (Not (just) Another Molecular Dynamics), CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) gibi programlar yaygın olarak kullanılmaktadır (100-103).

4.3.3.1. Algoritmalar

MD hesaplama yazılımları kompleks ve kendi içinde farklı fonksiyonlara sahip programcıklardan oluşur. Bu programcıkların her biri farklı algoritmalara sahiptir. Bu algoritmalar arasında periyodik sınır şartları (PBC : Periodic boundary conditions), kısıtlama algoritmaları ve enerji minimizasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Periyodik sınır şartları kristal yapıların teorik modelleme çalışmalarında yaygın olarak uygulanmaktadır. PBC, uygulanan hücrenin şekli, kafes tipini belirler ve hücrenin içeriği kafesin esasını oluşturur. Özellikle, kuantum *ab initio* hesaplamalarda güçlü hesaplama şemaları oluşturmak için düzlem-dalga açılımları ve periyodik sınır koşulları kombine edilir (104). Kısıtlama algoritmaları, atomlar arasındaki bağların hareketini sınırlandırır. Bu yöntem sistemin dengelenme aşamasında sıklıkla kullanılır ve sistemin bozulmasını engeller. SHAKE ve LINCH(A linear constraint solver) yaygın olarak kullanılan algoritmalar (105, 106). Hesaplamalı kimyada enerji minimizasyonu yöntemleri, moleküllerin ve katıların denge konfigürasyonlarını hesaplamak için kullanılır. Moleküler sistemlerin kararlı durumları onların potansiyel enerji yüzeylerindeki tüm ve kısmi minimum'lara karşılık gelmektedir. Enerji minimizasyonu, dengede olmayan bir moleküler geometriden başlayarak atomların üzerindeki net kuvvetleri azaltmak amacıyla kuvvet değerleri önemsiz oluncaya kadar atomları hareket ettiren bir matematiksel yöntem kullanır (107, 108).

4.3.3.2. Etkileşim Fonksiyonu

Potansiyel fonksiyonlar üç kısma ayrılır.

1. Bağ yapmamış: Lennard-Jones, Buckingham ve Coulomb veya modifiye Coulomb

2. Bağ yapmış: Kovalent, bağ-germe, açı-bükme, yanlış dihedraller ve uygun dihedraller.

3. Sınırlayıcılar: Konum kısıtlamaları, açı kısıtlamaları, mesafe sınırlamaları, yönlendirme kısıtlamaları ve dihedral kısıtlamaları (109).

4.3.3.3. Kuvvet Alanı

Moleküler modelleme bağlamında bir kuvvet alanı, sistem partiküllerinin potansiyel enerjisini tanımlamak için matematiksel işlev parametrelerini kullanır. Kuvvet alanı fonksiyonları ve parametre setleri deneysel çalışmalar ve yüksek seviyeli kuantum mekaniksel hesaplamalardan türetilmiştir. Tüm atom kuvvet alanları sistemdeki her bir atom tipi için parametreler sunarken birleşik atom güç alanları tek bir etkileşim merkezi olarak metil ve metilen gruplarda karbon ve hidrojen atomlarını hesaba katar. Coarse-grained (serbest açı ve sürtünme azaltılmış basit potansiyeller için) güç alanları sıklıkla uzun süreli protein simülasyonlarında artan hesaplama verimliliği için çok daha fazla ham veri sağlar (110). Yaygın kullanıma sahip kuvvet alanlarından bazıları GROMOS-96, OPLS/AA, AMBER ve CHARMM kuvvet alanlarıdır (111, 112).

4.3.3.4. Topoloji

Moleküler dinamik programları, atom ve atom kombinasyonlarının potansiyel fonksiyonlara katkılarını ve fonksiyonlara uygulanan parametrelerin ne olduğunu bilmek zorundadır. Tüm bu bilgiler her bir atomun belirli bir özelliğini listeleyen topoloji dosyasında mevcuttur. Birçok atom tipi ve molekül olmasına karşın bunlardan sadece biyolojik sistemlerde mevcut olanlar parametrelendirilmiştir (113).

4.3.4. Protein-Ligand Docking

Moleküler docking, iki veya daha fazla molekül bileşeni arasındaki moleküller arası kompleks formları tahmin etmeye çalışır. 1980'li yıllarda ortaya çıkmış ve günümüzde geniş bir araştırma alanı olarak ilaç geliştirme çalışmalarında faydalı bir

araç olmuştur (114). Bu gibi yapıya dayalı tasarım ve tarama stratejileri ile HIV proteaz inhibitörleri gibi çok sayıda ilaç geliştirilmiştir. Ancak, mevcut skorlama şemaları ile ilgili olarak özellikle bu yaklaşımların uygulanmasında, problemler vardır. Bu problemler ligandın doğru konformasyonun tespitinde ve isabetli skorlamada ortaya çıkmaktadır. Genel olarak docking işlemlerinin doğru yapısal araştırma metodu (search method) ve doğru aktivite tahmini (scoring function) olmak üzere iki hedefi vardır. Ancak, belirli bir biyolojik aktiviteden sorumlu moleküler özelliklerin belirlenmesi veya aktivitenin gücünü artırıcı olacak şekilde modifiye bileşiklerin tahmini, genellikle anlaşılması ve bilgisayarda simüle edilmesi zor konulardır. Bu sorunların ışığında docking, genellikle her adımı bir veya daha fazla ilave karmaşıklık derecesine sahip çok aşamalı bir işlem olarak tasarlanmıştır (114, 115). Süreç, küçük moleküllerin aktif bölgeye yerleşiminin docking algoritması ile uygulanması ile başlar. Kendi içinde bu zordur, hatta nispeten basit organik moleküller birçok konformasyonel değişiklik içerebilir. Algoritmalar aktivite tahmini ile tamamlanmaktadır ki bu aşamada bileşikler ve potansiyel hedefleri arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesi yoluyla biyolojik aktivite tahminen hesaplanır.

Yapısal modelleme, ligand esnekliği ya da bazı ölçülerde protein esnekliğini ele alarak algoritma kullanır. Ligand esnekliği işlemine yaklaşım, sistematik yöntemler (inkremental yapı, konformasyonel arama, veri tabanları), rastgele yöntemler (Monte Carlo, genetik algoritmalar, tabu arama) ve simülasyon yöntemleri (moleküler dinamik, enerji minimizasyonu) olmak üzere üç temel kategoride ele alınabilir (114, 115).

Rastgele araştırma algoritması (genellikle stokastik metot olarak ifade edilir) rastgele olarak ya ligandı ya da ligand popülasyonunu değiştirir. Yeni elde edilmiş bir ligand daha önce tanımlanmış olabilirlik fonksiyonunun temeli üzerine geliştirilir. Monte Carlo ve Genetik Algoritma iki popüler rastgele metot yaklaşımıdır. Autodock programındaki popüler formunu içeren alternatif Monte Carlo araştırma formları geliştirilmiştir (114, 116, 117). Bundan farklı olarak diğer bazı programlar (DOCK ve GOLD gibi) genetik algoritmayı uygular (114).

Docking işleminde moleküler dinamiklerin kullanımı en popüler simülasyon yaklaşımlarından biridir. Moleküler dinamik simülasyonlarında genellikle makul simülasyon zaman periyodunda yüksek enerji bariyerinin aşılması olanaksızdır ve böylece sadece uygun ligandlar enerji yüzeyinde minimize olacak şekilde yerleşmiş olur (114, 118). Lokal minimizasyon problemindeki bir diğer adresleme stratejisi, farklı ligand pozisyonlarından moleküler dinamik hesaplarına girişilmesidir. Moleküler dinamiklerden farklı olarak enerji minimizasyon metodu nadiren tek başına araştırma metodu olarak kullanılır (114, 119).

Öngörülen ligand konformasyonlarının sıralanması ve tespiti, yapı temelli sanal taramanın kritik bir konusudur. Bağlanma enerjisi doğru olarak öngörülse dahi eğer yanlış olanlardan doğru konformasyonlar ayıklanmazsa ve doğru ligandlar tanımlanmazsa hesaplama sonuçta başarısız olur. Bundan dolayı güvenilir aktivite tahmininin tasarımı ve şematize edilmesi çok önemlidir. Serbest enerji simülasyon teknikleri, kantitatif protein ligand etkileşimin modellemesi ve bağlanma afinitesinin öngörülmesi için geliştirilmektedir (114). Ancak bu pahalı hesaplamalar çok sayıda protein ligand kompleksinin oluşturulması için pratik değil ve daima doğruluktan uzaktır. Docking programlarında uygulanan aktivite tahmini modellenmiş komplekslerin değerlendirilmesinde çeşitli sadeleştirmeler ve varsayımlar oluşturur ve moleküler tanınmanın belirlenmesinde entropik etki gibi sayısız fiziksel olayı tam olarak dikkate almaz. Esasen günümüzde üç tip veya üç sınıf aktivite tahmini metodu uygulanmaktadır: KUVVET-ALANI (FORCE FIELD) temelli, deneysel ve bilgiye dayalı aktivite tahmini.

Kuvvet Alanı Esasına Dayalı Aktivite Tahmini: Aktivite tahmininde kuvvet alanı, genellikle moleküler mekanikteki reseptör-ligand etkileşim enerjisi ve iç ligand enerjisinin (örneğin bağlanmada oluşturulan sterik gerginlik gibi) toplamı ile ölçülür. Kuvvet alanı, büyük ölçüde skorlamayı kolaylaştıran, iç protein enerjisi hesabını ihmal eden, tek bir protein konformasyonunu hesaba katar. Çeşitli kuvvet alanı aktivite tahminleri farklı kuvvet alanında parametre setlerine dayanmaktadır. Örneğin G-Score, TRIPOS kuvvet alanı ve Autodock, AMBER kuvvet alanı esasına dayalı olarak aktivite tahminleri yapar (114).

Ligand ve reseptör arasındaki etkileşimler çok sıklıkla van der waals ve elektrostatik enerji kurallarının kullanımına göre tanımlanır. Elektrostatik terimi yük-yük etkileşiminin katkısını azaltan dielektrik fonksiyon bağımlı bir mesafe ve kolombik formülasyonu ile açıklanmaktadır. İnternal ligand enerjisinin fonksiyonel formu tipik olarak protein-ligand etkileşim enerjisine çok benzerdir ve ayrıca van der waals ve elektrostatik katkılarını içerir.

DeneySEL Esasa Dayalı Aktivite Tahmini: Böhm tarafından önerilmiş deneySEL esasa dayalı aktivite tahmini, bağlanma enerjileri ve konformasyon gibi çok parametrelili fonksiyonların toplanarak, yeniden üretilmesi şeklindedir (120). Ampirik aktivite tahmininin tasarımı, bağlanma enerjilerinin tek tek ilintisiz terimlerin toplamı olarak yaklaşık ifade edilebileceği fikrine dayanmaktadır. Aktivitenin tahmini çeşitli terimlerin katsayıları, bağlanma enerjileri ve X-RAY yapısal bilgiler kullanılarak oluşturulan regresyon analizinden elde edilir. Fonksiyonel formlar, kuvvet alanı moleküler mekanik koşullarının benzeri olmasına rağmen genel olarak kuvvet alanı aktivite tahmini metodundan daha basittir. Ampirik fonksiyonların iyi yönü genellikle değerlendirmek için basit fakat kuvvet alanı fonksiyonlarına benzer yaklaşımlara dayanmasıdır. Bu yöntemlerin dezavantajı regresyon analizi ve uyumda moleküler veri setleri üzerine bağımlılığıdır. Bu skorlama genellikle çeşitli koşullarda farklı dengeleyici faktörleri oluşturur. Sonuç olarak farklı şekilde oluşturulmuş aktivite tahmini metotlarından kolaylıkla yeni bir skorlama sistemi oluşturulamaz.

Bilgi Tabanlı Aktivite Tahmini: Bu metod, bağlanma enerjilerinden ziyade deneySEL yapıların yeniden üretimi üzerine tasarlanmıştır. Birçok atom tipinin etkileşimi, moleküler ortamına bağlı olarak tanımlanmıştır. Ampirik yöntemlerle ortak olarak, bilgi tabanlı aktivite tahmini metodu, belirgin şekilde modellenmesi zor olan bağlanma enerjilerini yakalamaya çalışır. Bu tür fonksiyonların Popüler uygulamaları “Potential of mean force” (PMF) ve “DrugScore” ayrıca ikili potansiyellere çözücü erişilebilirliğini de hesaplar (114). “SMoG” protein-ligand etkileşimlerini değerlendirmek için atom çiftlerinin potansiyellerinden faydalanan bu sınıfa ait bir diğer aktivite tahmini metodudur (121).

Mevcut aktivite tahmini metotlarının kusurları göz önüne alındığında, son zamanlarda bu alanda konsensüs skorumaların oluşturulması eğilimi ortaya çıkmıştır (114, 122). Konsensüs skorumaları, farklı skor bilgilerini derleyip hataları dengelemek suretiyle tek bir skor oluşturur ve doğru ligandların belirleme olasılığını artırır. Konsensüs skorumaya örnek bir uygulama olarak GOLD, DOCK, ChemScore, PMF ve Flexx aktivite tahminlerini birleştiren X-CSCORE vardır (123). Ancak, Konsensüs skorumalarının potansiyel değeri sınırlı olabilir, çünkü farklı aktivite tahmini metotları anlamlı bir korelasyona sahipse hesaplamaları dengelemek yerine, daha yanlış sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Autodock 4, 2 Morris ve arkadaşları tarafından geliştirilen Lamarckian genetik algoritma ve Ampirik bağlanma enerjisi fonksiyonu kullanan popüler docking yazılımıdır (124). Trott ve arkadaşları tarafından geliştirilen Autodock Vina günümüzün en modern ve en popüler docking uygulamalarından biridir. Autodock Vina arama metodu (Search method) olarak genetik algoritmalar, parçacık optimizasyonu, “simulated annealing” gibi stokastik genel optimizasyon yaklaşımları ve çeşitli lokal optimizasyon yaklaşımlarından oluşturulmuş tekrarlamalı yerel arama kapsamlı optimizasyon “Iterated Local Search global optimizer” algoritması kullanır (125). Autodock Vina’da ampirik ve bilgi tabanlı yaklaşımın kombinasyonundan oluşturulmuş aktivite tahmini metodu kullanılmaktadır. Bu yaklaşımda genel olarak formülasyon; $\Delta G_{\text{bağlama}} = \Delta G_{\text{gauss}} + \Delta G_{\text{itme}} + \Delta G_{\text{hbağ}} + \Delta G_{\text{hidrofobik}} + \Delta G_{\text{torsiyon}}$ şeklindedir (125).

Afinite nicel olarak bağlanma serbest enerjisi ile ölçülebilmektedir. Bağlanma serbest enerjisi ölçümünde yukarıdaki yaklaşım gibi birçok yaklaşım geliştirilmiş ve geliştirilmektedir. Neredeyse tüm bu yaklaşımlar, hidrofobik etki, hidrojen bağı ve konformasyonel entropik etkileşimlerden kaynaklanan katkıların toplamını alarak ΔG ’yi doğrudan tahmin etmeye çalışırlar. Genellikle ilk iki katkı istikrarlı değerlere sahipken konformasyonel entropik etkileşimlerden kaynaklanan serbest enerji değişimleri değişkenlik gösterebilmektedir. ΔG yüksek değerlerde sapma gösterebilmektedir (126). AutoDock programı 1998 yılında literatüre girdiğinden beri “web of science” indeksine göre 3500’ün üzerinde yayında kullanılmıştır. Autodock Vina programı ise 2010 yılında literatürde yer aldığından beri 225’den fazla yayında kullanılmıştır ve kullanımı hızla

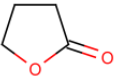
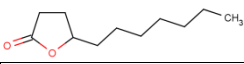
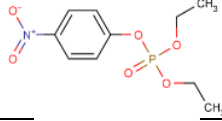
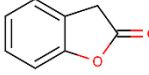
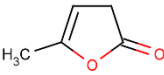
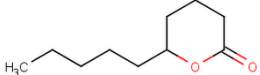
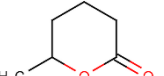
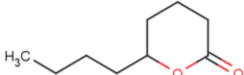
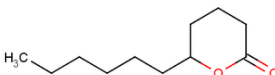
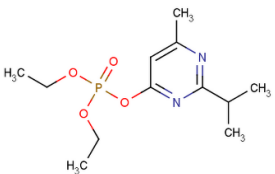
artmaktadır. Autodock Vina programının tercih edilmesinin nedenleri AutoDock 4.2 programına göre kolay kullanımı, hızlı olması ve yüksek doğrulukta oryantasyon ve skorlama yeteneğine sahip olmasıdır. Ayrıca ücretsiz olarak temin edilebilmektedir. Docking uygulamalarında işlemi gerçekleştiren programın dışında ligand ve reseptörün işleme hazırlanması ve sanal gösterimi için yardımcı biyoinformatik araçlara ihtiyaç vardır (127). Autodock 4.2 ve Autodock Vina docking yazılımları için aynı enstitü tarafından AutoDock Tools programı geliştirilmiştir (128). Program docking işlemi için kullanılacak reseptör ve ligandın işleme uygun hale getirilmesinde kullanılır. PDB (protein data bank dosya formatı) formatında protein data banktan (pdb.org) elde edilen reseptör verisi içinde solvent ve genellikle ligand bilgileri de yer alabilir. Docking işlemi öncesi bu solvent ve ligandların ve polar olmayan hidrojen atomlarının uzaklaştırılıp reseptörün saflaştırılması daha sonra gasteiger yükü ile yüklenip PDBQT (Autodock ve Autodock vina için özelleştirilmiş dosya formatı) formatında kaydedilip docking işlemine hazır hale getirilmesi gerekmektedir (128). AutoDock Tools aracının ara yüzü kullanışlıdır fakat daha hızlı, kullanışlı ve daha fazla dosya türünü destekleyen PyRx (129) gibi docking araçları geliştirilmiştir. PyRx aracı AutoDock Tools aracının yaptıklarını uygulama sihirbazı şeklinde basamaklandırıp kolay ve hızlı bir şekilde docking işlemini yapmamızı sağlar. Eksik yanları arasında sanal gösterim araçlarının yetersiz olması az sayıda dosya türüne destek veriyor oluşu gösterilebilir. UCSF (University of California, San Francisco) Chimera(130) ve Accelrys Discovery Studio Visualizer (Accelrys Inc.) sanal gösterim için kullanılan en popüler araçlardan ikisidir. Ligand çizimi, küçük moleküllere ideal 3 boyutlu yapı kazandırma, polar olmayan hidrojenleri uzaklaştırma gibi çok sayıda aracın yanında desteklediği birçok dosya formatı ile Marvin Suite diğer araçların eksikliğini tamamlamaktadır (ChemAxon Inc.).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

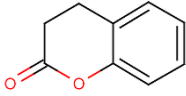
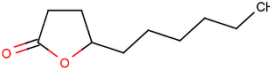
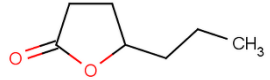
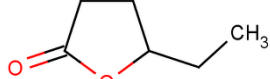
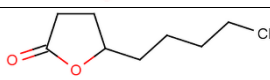
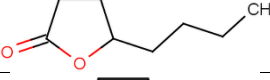
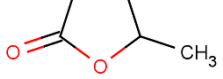
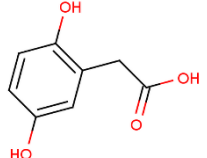
5.1. Ligandlar

PON1'in kendi substratları ve lipid düşürücü ilaçlar olarak ezetimib, ciprofibrat, klofibrat, fenofibrat, gemfibrozil, beta-sitosterol, brassikasterol, kampesterol, stigmasterol, bezafibrat, niasin, orlistat, probukol, sibutramin, atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin ve simvastatin enzim ligandı olarak kullanılmıştır.

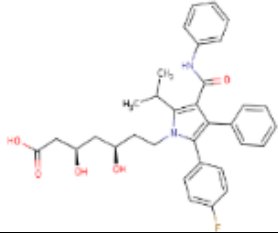
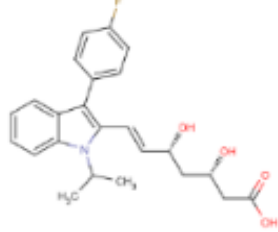
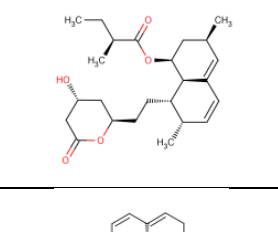
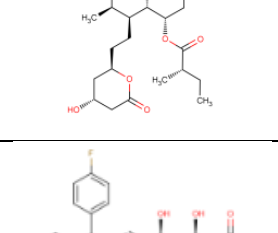
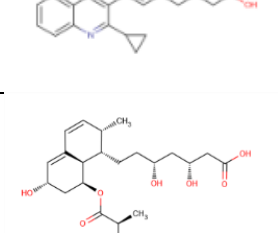
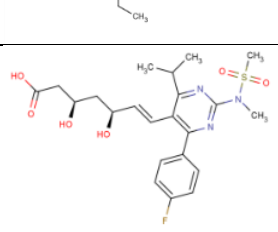
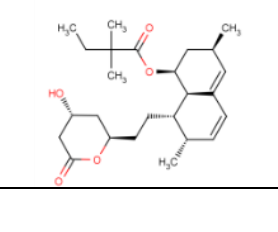
Tablo 1. Çalışmada kullanılan Substratlar

Molekül Adı	Molekül Yapısı	IUPAC İsmi	Referans Kodu (pubchem)
Gamma-butirolakton		Oksolan-2-on (2-oksofuran)	CID 7302
Gamma-undekalakton		5-heptiloksolan-2-on (5-heptil-2-oksofuran)	CID 7714
Paraokson		Dietil(4-nitrofenil)fosfat	CID 9395
2- kumaron		3H-1-benzofuran-2-on	CID 68382
alfa-angelika-lakton		5-metil-3H-furan-2-on	CID 11559
delta-Dekalakton		6-pentiloksan-2-on	CID 12810
delta-Hekzalakton		6-metiloksan-2-on	CID 13204
delta-nanolakton		6-butiloksan-2-on	CID 18698
delta-Undekalakton		6-hekziloksan-2-on	CID 61204
diazokson		Dietil((6-metil-2-propan-2-il)pirimidin-4-il)fosfat	CID 13754

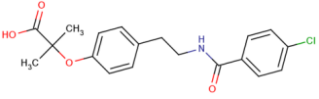
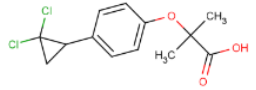
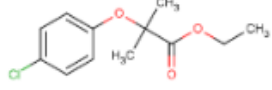
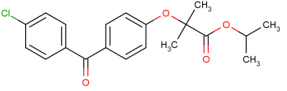
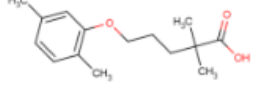
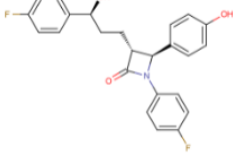
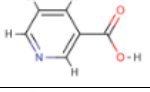
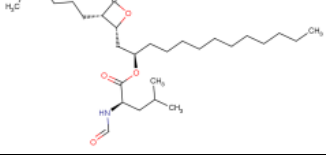
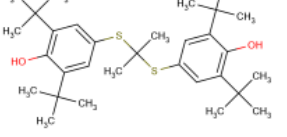
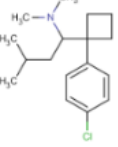
Tablo 1. (devam) Çalışmada kullanılan Substratlar

dihidrocumarin		3, 4-dihidrokromen-2-on	CID 660
gamma-Dekanolakton		5-hekziloksolan-2-on	CID 12813
gamma-Heptalakton		5-propiloksolan-2-on	CID 7742
gamma-Hekzalakton		5-etiloksolan-2-on	CID 12756
Gamma-nonalakton		5-pentiloksolan-2-on	CID 7710
gamma-Oktanolakton		5-butiloksolan-2-on	CID 7704
gamma-valerolakton		5-metiloksolan-2-on	CID 7921
Homogentisik asit lakton		2-(2, 5-dihidroksifenil)asetik asit	CID 780

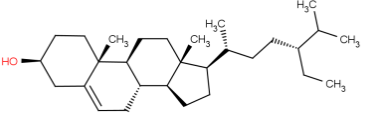
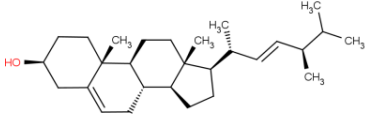
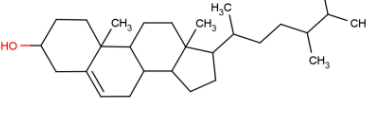
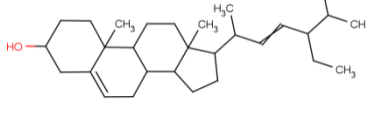
Tablo 2. Çalışmada değerlendirilen statinler

Molekül Adı	Molekül Yapısı	IUPAC İsmi	Referans Kodu (pubchem)
Atorvastatin		(3R, 5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoyl)-5-propan-2-il pirol-1-il]-3, 5-dihidroksiheptanoik asit	CID 60823
Fluvastatin		(E, 3S, 5R)-7-[3-(4-fluorofenil)-1-propan-2-il indol-2-il]-3, 5-dihidroksi heptanoik asit	CID 1548972
Lovastatin		[(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-8-[2-[(2R, 4R)-4-hydroxy-6-oksooksan-2-il]etil]-3, 7-dimetil-1, 2, 3, 7, 8, 8a heksahidronaftalin-1-il] (2S)-2-metilbutonoat	CID 53232
Mevastatin		[(1S, 7S, 8S, 8aR)-8-[2-[(2R, 4R)-4-hidroksi-6-oksooksan-2-il]etil]-7-metil-1, 2, 3, 7, 8, 8a-heksahidronaftalen-1-il] (2S)-2-metilbutonoat	CID 64715
Pitavastatin		(E, 3R, 5S)-7-[2-siklopiropil-4-(4-fluorofenil)kinolin-3-yl]-3, 5-dihidroksi heptanoik asit	CID 5282452
Pravastatin		(3R, 5R)-7-[(1S, 2S, 6S, 8S, 8aR)-6-hidroksi-2-metil-8-[(2S)-2-metil butanoil]oksi-1, 2, 6, 7, 8, 8a-heksahidronaftalen-1-yl]-3, 5-dihidroksi heptanoik asit	CID 54687
Rosuvastatin		(E, 3R, 5S)-7-[4-(4-fluorofenil)-2-[metil(metilsulfonyl)amino]-6-propan-2-ilpirimidin-5-yl]-3, 5-dihidroksihept-6-enoik asit	CID 446157
Simvastatin		[(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-8-[2-[(2R, 4R)-4-hidroksi-6-oksooksan-2-il]etil]-3, 7-dimetil-1, 2, 3, 7, 8, 8a-heksahidronaftalen-1-il] 2, 2-dimetilbutonoat	CID 54454

Tablo 3. Fibrat ve diğer lipid düşürücü ilaçlar.

Molekül Adı	Molekül Yapısı	IUPAC İsmi	Referans Kodu (pubchem)
Bezafibrat		2-[4-[2-[(4-klorobenzoil)amino]etil]fenoksi]-2-metilpropanoik asit	CID 39042
Ciprofibrat		2-[4-(2, 2-diklorosiklopiropil)fenoksi]-2-metilpropanoik asit	CID 2763
Klofibrat		etil 2-(4-klorofenoksi)-2-metilpropanat	CID 2796
Fenofibrat		propan-2-il 2-[4-(4-klorobenzoil)fenoksi]-2-metilpropanat	CID 3339
Gemfibrozil		5-(2, 5-dimetilfenoksi)-2, 2-dimetilpentanoik asit	CID 3463
Ezetimib		(3R, 4S)-1-(4-fluorofenil)-3-[(3S)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropil]-4-(4-hidroksifenil)azetidin-2-on	CID 150311
Niasin		piridin-3-karboksilik asit	CID 938
Orlistat		[(2S)-1-[(2S, 3S)-3-hexyl-4-oksooksetan-2-il]tridekan-2-yl](2S)-2-formamido-4-metilpentanoat	CID 3034010
Probukol		2, 6-ditert-bütül-4-[2-(3, 5-ditert-bütül-4-hidroksifenil)sülfonilpropa n-2-ilsülfonil]fenol	CID 4912
Sibutramin		1-[1-(4-klorofenil)siklobütül]-N, N, 3-trimetilbütan-1-amin	CID 5210

Tablo 4. Fitosteroller.

Molekül Adı	Molekül Yapısı	IUPAC İsmi	Referans Kodu (pubchem)
Beta-sitosterol		(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-17-[(2R, 5R)-5-etil-6-metilheptan-2-il]-10, 13-dimetil-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodekadro-1H-siklopenta[a]fenantiren-3-ol	CID 222284
Brassika-sterol		(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-17-[(E, 2R, 5R)-5, 6-dimetilhept-3-en-2-il]-10, 13-dimetil-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodekadro-1H-siklopenta[a]fenantiren-3-ol	CID 5281327
Kampesterol		17-(5, 6-dimetilheptan-2-yl)-10, 13-dimetil-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodekadro-1H-siklopenta[a]fenantiren-3-ol	CID 312822
Stigmasterol		17-(5-etil-6-metilhept-3-en-2-yl)-10, 13-dimetil-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodekadro-1H-siklopenta[a] fenantiren -3-ol	CID 122544

5.2. Donanım

Tüm docking ve moleküler dinamik simülasyonları TÜBİTAK'ın araştırmacılara sunduğu yeni bir hizmet olan Trgrid'de yürütülmüştür. Trgrid yüksek başarılı bilgisayar kümelerinden oluşan ve araştırmacılara çok yüksek bilgisayar performansı gerektiren kuantum mekanik, moleküler dinamik, topolojik çalışmalar ve benzeri yüksek başarımlı gerektiren uygulamalarda büyük avantaj sağlayan ve kullanım sertifikası gerektiren bir hizmettir (131). Trgrid'de kullanılan bilgisayar kümelerinin her biri, 12 çekirdekli “opteron 6174” işlemcisinden iki adet bulunduran 24 çekirdekli nodlardan oluşmaktadır. Moleküler dinamik simülasyonları GROMACS yazılımı ile birden fazla kümede paralel olarak yürütülmüştür. docking işlemleri “Autodock 4” ve “Autodock Vina” yazılımı ise 4 çekirdekli intel Core i3 işlemcili bilgisayarda yürütülmüştür.

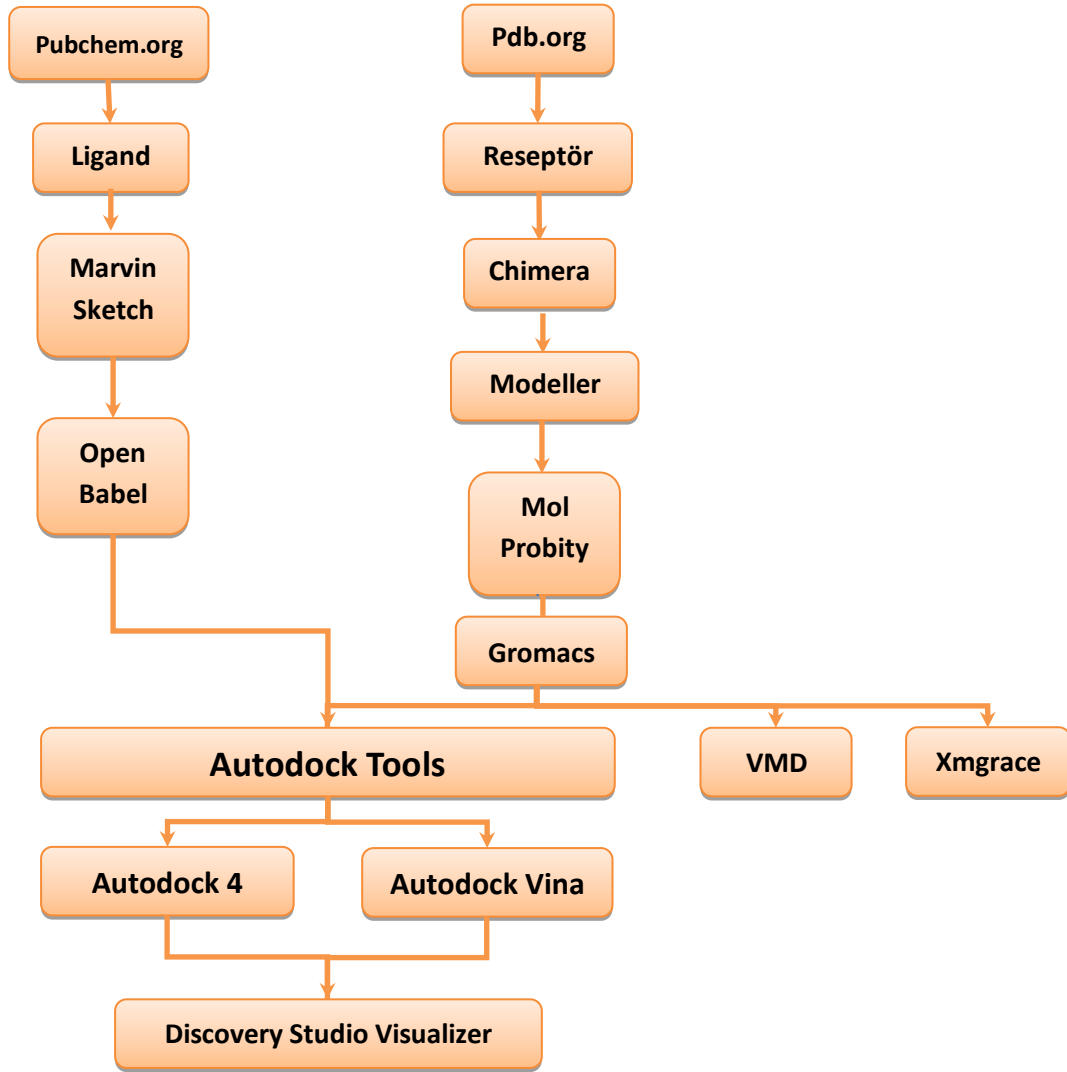
5.3. Yazılım

Protein ve ligandların temin edilmesinden homoloji modelleme, moleküler dinamik simülasyon, docking işlemi ve veri analizine kadar bir dizi yazılım kullanılmıştır. Bu yazılımlar:

- ChemAxon Marvin Sketch: Ligandların mol2 formatına çevrilmesi.
- Open Babel: Ligandların enerji minimizasyonu.
- Discovery Studio Visualizer 3.1: Enzim ligand etkileşiminin gösterimi ve analizi.
- Chimera: Enzim yapısındaki solvent ve ligandların çıkartılıp saflaştırılması.
- MODELLER: Homoloji modelleme işleminin yürütülmesi.
- Gromacs: Moleküler dinamik simülasyonu ve enerji minimizasyonu gerçekleştirilmesi.
- Autodock Tools (ADT): Ligand ve reseptörün docking işlemine hazırlanması.
- Pyrx: Autogrid işleminin yürütülmesi.
- Autodock 4: Ligand docking işleminin yürütülmesi.
- Autodock Vina: Ligand docking işleminin yürütülmesi.
- VMD: Gromacs ile elde edilen verilerin görselleştirilmesi.
- Xmgrace: Gromacs çıktılarının grafiksel analizi.

5.4. Yöntem

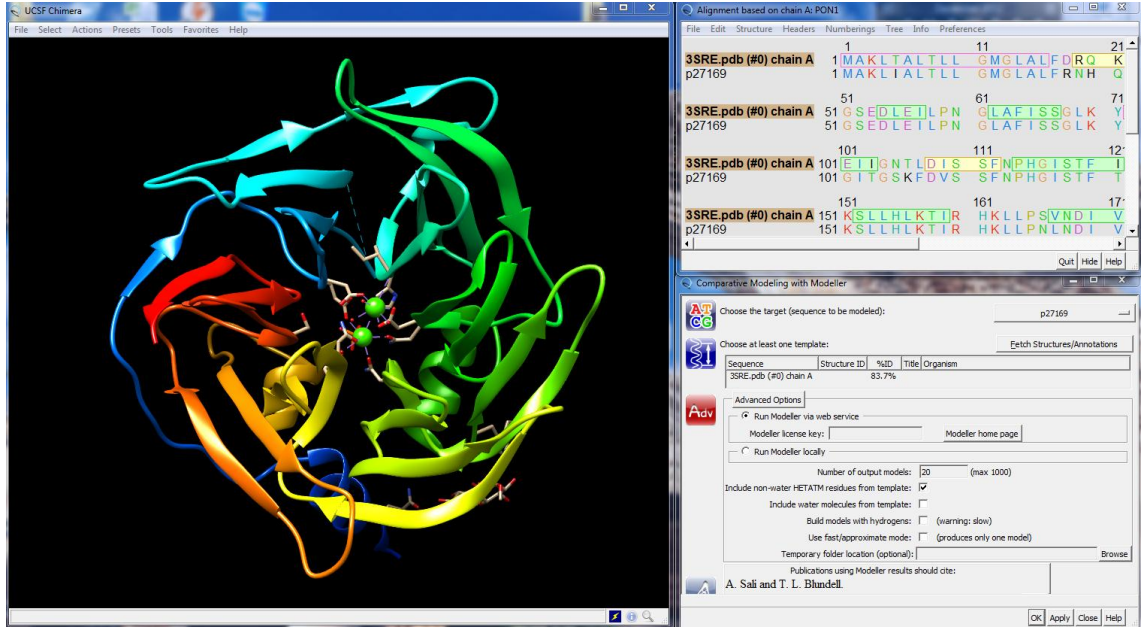
Tüm ligandlar *pubchem* ligand veri bankasından temin edilmiştir (132). PON1 enzimi (1V04, 3SRE, 3SRG) X-RAY kristal yapı formunda ve PDB formatında Protein data bank'dan temin edilmiş en yüksek çözünürlüğe sahip ve en güncel yapı olan 3SRE kodlu X-RAY yapı çalışmada tercih edilmiştir (133). Tüm ligandlar “ChemAxon Marvin Sketch” programı ile ideal üç boyutlu yapıya dönüştürülerek “mol2” formatında kaydedilmiştir. Protein databank'tan elde edilen paraoksonaz enziminin (3SRE) X-ray kristal yapı formu Chimera programı ile ligand ve solventlerinden ayrıştırılarak saflaştırılmıştır (130). Tüm çalışma Şekil 23'de gösterilen akış şemasına göre yürütülmüştür.



Şekil 23. Çalışma akış şeması (Uygulanan yazılım sıralamasına göre)

5.4.1. Paraoksonaz Proteinin Modellenmesi

PDB.org’den temin edilen 3SRE kodlu PON1 proteini, en güncel ve en yüksek çözünürlüğe sahip yapı olması nedeniyle homoloji modelleme için şablon yapı olarak kullanılmıştır. Öncelikli olarak Chimera yazılımı ile 3SRE yapısının ligandları uzaklaştırılarak homoloji modelleme için saflaştırılmıştır. Homoloji modelleme için “MODELLER” yazılımı kullanılmıştır. İnsan serum paraoksonaz enziminin amino asit dizisi şablon olarak kullanılmıştır. Dizi Uniprot protein sekans veribankasından temin edilmiştir (kod:P27169). Paraoksonaz enziminin Q/R192 ve M/L55 polimorfik yapıları da analiz edileceği için 55. ve 192. bölgelerdeki aminoasitler Q/R192 ve M/L55 polimorfizmine uygun olarak değiştirilmiştir.

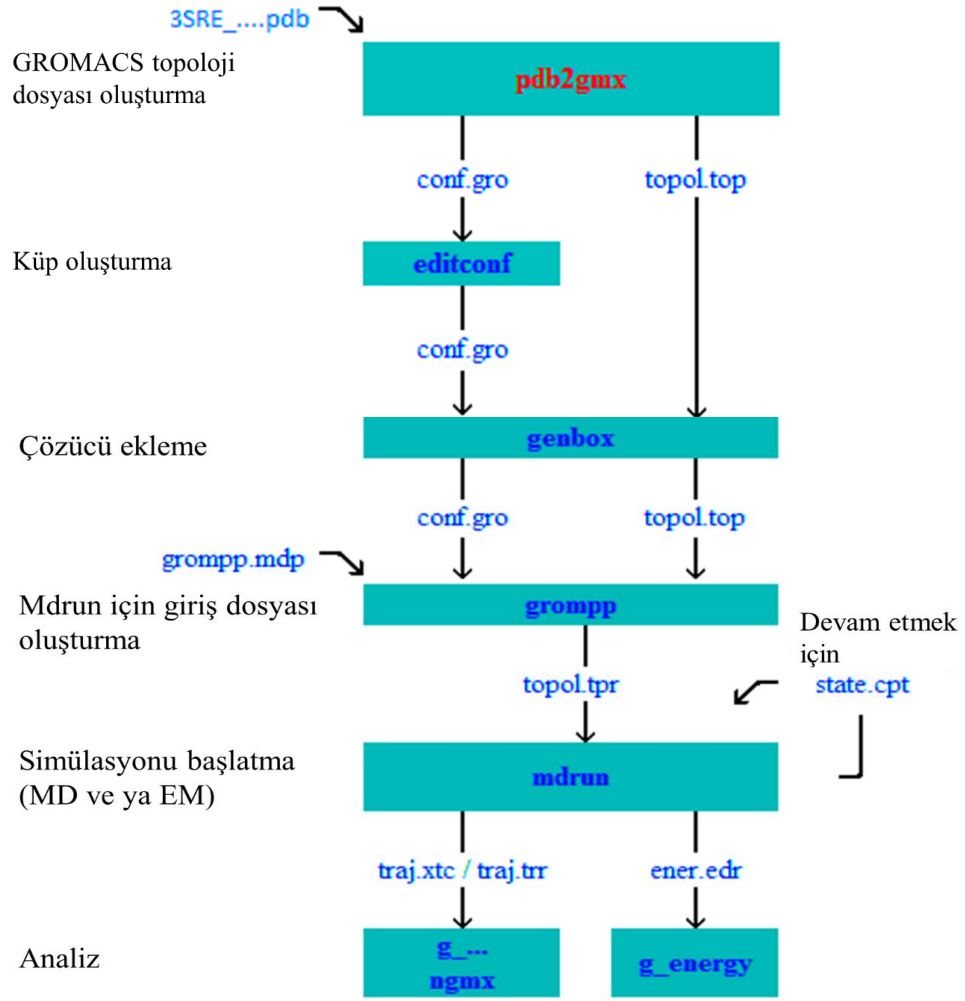


Şekil 24. Chimera yazılımı ve *MODELLER* aracı.

MODELLER programı ile her bir şablon için (Normal, Q/R192 ve M/L55) 20 adet model çıktı alınmıştır ve Ca^{+2} kofaktörünü de içermesi için şablondan “su dışındaki HETATM (hetero atom) residüleri içer” ikonu işaretlenmiştir. Her bir şablon için elde edilen 20 model, protein yapı kalitesinin tespiti için Molprobitiy server kullanılarak sınanmıştır ve en yüksek skora sahip model tercih edilmiştir (134).

5.4.1.1. Moleküler Dinamik Simülasyon

Tüm moleküler dinamik hesaplamalar Trgrid üzerindeki bilgisayar kümelerinde her biri 24 çekirdekli (AMD Opteron) 4 noddaki GROMACS 4.5.5 programı ile yürütülmüştür. Daha önce “*MODELLER*” homoloji modelleme yazılımı ile elde edilen PDB dosya formatındaki yapılar aşağıdaki diyagrama göre bir dizi aşamadan geçirilmiştir.



Şekil 25. Gromacs Akış şeması (135). Pdb2gmx: topoloji dosyası oluşturma komutu. Editconf: Çözelti sistemini çevreleyen bir küp oluşturmak için gerekli komut. Genbox: ortama çözücü olarak su ve nötralizasyon için gerekli iyonları eklemek için gerekli komut. Grompp: Sistemdeki atomların tüm parametrelerini içeren atomik seviyede bir giriş dosyası (.tpr) oluşturmak için gerekli komut dosyası. Mdrun: Simülasyonu başlatmak için gerekli komut dosyası. G_energy: Basınç, sıcaklık, hacim gibi değerlerin analizi için gerekli komut dosyası.

5.4.1.2. GROMACS ile Çalışmaya Hazırlık

GROMACS moleküler dinamik yazılımını çalıştırmadan önce bir takım hazırlıkların yapılması gerekmektedir. SSH güvenli bağlantısı ile Trgrid bilgisayar kümelerine bağlandıktan sonra “ssh” komutu ile satıra “ssh lufer1” yazılarak lufer1 sunucusuna giriş yapılmıştır.

5.4.1.3. GROMACS Topoloji Dosyası Oluşturma

Topoloji dosyası (topol.top olarak isimlendirilir.) bir simülasyon içindeki molekülü tanımlamak için gerekli tüm bilgileri içerir. Bu bilgiler, atom tipleri ve yüklere ilaveten bağlar, açılar ve dihedralleri de kapsamaktadır. Topoloji dosyası oluşturmak için “*pdb2gmx*” komutu kullanılmaktadır. Komut satırına aşağıdaki komut girilerek topoloji dosyası oluşturulmuştur. Bu komut ile PDB dosyası GROMACS programının okuyabileceği formata dönüştürülmüştür.

“*forcefiled*” (kuvvet alanı) olarak AMBER99SB-ILDN, en güncel ve doğruluğu en yüksek güç alanlarından biri olduğu için tercih edilmiştir (136). Su modeli olarak da SPC (simple point charge), literatürde doğruluğu en yüksek modellerden biri olduğu için tercih edilmiştir (137).

5.4.1.4. Ortama Çözücü (Su) Ekleme

Simülasyon doğruluğunun yüksek olabilmesi ve *in vivo* şartlara uygunluğu için ortama çözücü eklenmesi gerekmektedir. Çözücü eklenmeden önce simülasyon ortamının hacminin belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmada protein ve çözücü ortam sınırı arasında 1 nm’lik uzaklık olacak şekilde bir küp oluşturmak için “*editconf*” komutu kullanılmıştır. Simülasyonun gerçekleştirileceği küp tanımlandıktan sonra yapıdaki “*clash contact*” olarak tabir edilen atomlar arası çakışmaların giderilmesi için vakum ortamda ön minimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tr-Grid üzerinde bilgisayar kümelerinden faydalanabilmek için slurm betikleri oluşturulması gerekmektedir. Çalışma için hazırlanmış slurm dosyası ile kuyruğa aşağıdaki komut ile iş gönderilerek ön minimizasyon işlemi başlatılmıştır. “*genbox*” komutu ile kübün ne kadar su molekülü içereceği otomatik olarak hesaplanmış ve çözücü olarak su eklenmiştir.

5.4.1.5. Ortama İyon Ekleme

Ortamin nötralizasyonu için ortama iyon eklenmesi gerekmektedir. Ortama iyon eklenmesi ile sistemin toplam yükü sıfır olmaktadır. Bu durum da *in vitro* şartların sağlanması ve uzun süreli MD simülasyonlarda protein yapının kararlılığı için gereklidir. Ortam nötralizasyonu için Na^+ ve Cl^- kuantum mekaniksel özellikleri iyi bilindiği için en sık tercih edilen elementlerdir. “*genion*” komutu ile tek atomlu iyonlar ile su molekülleri en uygun elektrostatik potansiyelde ya da rastgele bir şekilde yer değiştirilir. “*Genion*” komutunu kullanmadan önce koordinat ve topoloji dosyalarını işleyen “*grompp*” komutu ile atomik seviyede bir giriş dosyası oluşturulmuştur(.tpr). tpr dosyası sistemdeki atomların tüm parametrelerini içermektedir. “*Grompp*” komutu ile “*.tpr*” dosyası oluştururken işlem için gerekli çeşitli parametreleri tanımlayan bir “*.mdp*” (moleküler dinamik parametre dosyası) dosyası hazırlanması gerekmektedir. “*.mdp*” dosyası minimizasyon çeşidi, Periodic Boundary koşulları, elektrostatik ve Van der Waals etkileşimin özellikleri gibi bir dizi parametreyi tanımlayan bir dosyadır. ions.tpr dosyası oluşturulduktan sonra “*genion*” komutu ile sistem içerisinde su molekülleri ile iyonların değişimi aşağıdaki komut girilerek değiştirilmiştir. “*-neutral*” komutu ile ortamın nötralizasyonu için optimum iyon sayısı genion aracı ile otomatik hesaplanmıştır.

5.4.1.6. Enerji Minimizasyon

Enerji minimizasyon işlemi iyon ekleme işlemi ile benzerlik göstermektedir. Önceki işlem gibi “*grompp*” aracı ile aşağıdaki komut girilerek “*.tpr*” dosyası oluşturulmuştur. Toplam 5000 adım “steepest descent” minimizasyon algoritması kullanılmıştır.

Bu işlem ile dört çıktı oluşmuştur. Bunlar;

- em.log: EM işleminin ASCII metin log dosyası
- em.edr: Binary enerji dosyası
- em.trr: Binary tam-hassas trajectory
- em.gro: Enerjisi minimize edilmiş yapı

5.4.1.7. Denge Durumuna Getirme

Bir moleküler dinamik simülasyon gerçekleştirilmeden önce sistemin sanal olarak laboratuvar koşullarına uygun hale getirilmesi gerekmektedir. Bu süreç iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Birincisi sıcaklık ve hacmin dengelendiği NVT (number of particles, volume, temperature)'dir. İkincisi ise izotermik-izobarik değerlendirme olan NPT(number of particles, pressure, temperature)'dir. Bu aşamada sıcaklık ve basınç dengelenmektedir.

Enerji minimizasyonu ile protein yapı üzerindeki atomların bir birine göre enerji durumları azaltılıp temaslar yok edilmiştir. Bu aşamadan sonra protein ve etrafındaki çözücü ve iyonların sistem içerisinde dengeye getirilmesi gerekmektedir. Aksi takdirde direk MD simülasyona geçildiğinde sistem kararsızlaşıp protein yapı bozulabilmektedir. Bu aşamada protein üzerindeki ağır atomları sabitleyen bir algoritma kullanılmaktadır. Pozisyon sabitleme algoritması bize çözücü içindeki proteinin herhangi bir yapısal değişikliğe neden olmamasını sağlamaktadır.

Denge aşaması NVT (sıcaklık ve hacim stabilitesi için) ve NPT (basınç ve yoğunluk stabilitesi için) fazı olmak üzere iki fazda gerçekleşmektedir. Öncelikle 100 ps'lik NVT fazı başlatılmıştır. Diğer aşama ise iki aşamalı bir NPT fazıdır. İlk aşama pozisyon sabitleme algoritmasının kullanıldığı 100 ps'lik aşama, ikinci aşama pozisyon sabitleme algoritmasının kullanılmadığı 1 ns'lik son denge aşamasıdır.

5.4.1.8. Tam Moleküler Dinamik Simülasyon

Sıcaklık ve basıncın istenilen seviyeye getirilip dengelendiği İki fazlı dengeleme işlemi bittikten sonra sistem, pozisyon sabitleyicilerin kaldırılıp tam moleküler dinamik simülasyonun başlatılacağı ve verilerin elde edileceği aşamaya getirilmiştir. Yine önceki aşamadakiler gibi .tpr dosyası oluşturmak için “grompp” aracı kullanılmıştır. 10 ns'lik MD simülasyonu için gerekli bilgileri içeren. tpr dosyası oluşmuştur.

5.4.1.9. Simülasyonun Analizi

Simülasyonun başarılı bir şekilde yürütüldüğünün anlaşılması için bir takım verilerin incelenmesine ihtiyaç vardır. Bunlardan ilki yapısal kararlılıktır. Bunun için “*g_rms*” aracı kullanılarak RMSD hesaplamaları yapılmıştır. Proteindeki her bir rezidünün hareketliliğini göstermek için *g_rmsf* komutu kullanılmıştır. Bir proteinin dönme yarıçapı o proteinin kompaktlığının bir ölçüsüdür. Eğer bir protein istikrarlı bir şekilde katlanmışsa belli bir sabitede *Rg* değerini gösterecek şekilde bir grafik oluşmaktadır.

5.4.2. Docking İşlemi

Docking işlemi iki farklı hesaplama algoritmasına sahip Autodock4 ve Autodock Vina üzerinde yürütülmüştür. Homoloji modelleme ile 3SRE tavşan PON1 enziminden elde edilen insan PON1 modeli, *in vivo* şartlara uygun yapı ve davranışı kazanabilmesi için GROMACS yazılımı ile MD simülasyon uygulanmıştır, 3SRE modelindeki 72-81 aralığındaki esnek kayıp rezidüleri bu işlem ile eklenmiştir. Y71 ve R292 rezidüleri her iki docking işleminde de esnek olarak işleme tabi tutulmuştur. Autodock 4.2 yazılımı için Ben-David ve arkadaşlarının kullandığı docking prosedürü uygulanmıştır (138). AutoDock 4.2’de docking işlemi için PON1 Enziminin aktif merkezi hedef alınarak ortalama 39 Å³ (Angstrom) küp, grid hacmi için uygulama yapılmıştır. AutoDock Vina’da ise docking işlemi için Autodock 4’deki grid hacmine karşılık gelecek şekilde PON1 Enziminin aktif merkezi hedef alınarak ortalama 17 Å³ (Angstrom), grid hacmi için uygulama yapılmıştır. Exhaustiveness 4 olarak ayarlanmıştır. Vina ve Autodock 4.2 tüm ligandları esnek Y71 ve R292 rezidüleri dışındaki tüm reseptörleri ise sabit olarak kabul edip işlem yapmıştır. Elektrostatik alan 1 Å³’luk grid alanına göre hesaplanmış ve Vina ile ilgili diğer tüm ayarlar varsayılan olarak bırakılmıştır. MD simülasyonda 9 ns’den sonra her 500 ps’deki protein görüntüleri docking işlemine tabi tutulmuştur. Her polimorfik yapı için kendi substratları ile uygunluk için 11 olmak üzere toplam 33 yapı docking işlemine tabi tutulmuştur. Draganov ve arkadaşlarının (139) Deneyisel verileri ile en yüksek korelasyona sahip dörder yapı toplamda on iki yapı lipid düşürücü ilaçların afinitesinin hesaplanması için seçilmiştir. Vina Ca⁺² kofaktörü ve proteinin

elektrostatik yükünü hesaplamayıp kötü korelasyon ve yanlış konformasyon oluşturduğundan ilaçların afinite hesaplamasında yalnız Autodock 4 tercih edilmiştir. Docking işlemi, Autodock 4 için Autodock Tools programı kullanılarak 5 basamakta gerçekleştirilmektedir. Bu basamaklar:

- Hedef proteinin hazırlanması
- Ligandın hazırlanması
- Grid Map'ın hazırlanması
- Docking parametrelerinin ayarlanması
- Autodock ve Autogrid'in yürütülmesi

Autodock Vina için ilk iki basamak ortaktır. Kalan işlem ise konfigürasyon dosyası (grid alan bilgileri, Exhaustiveness) hazırlanarak yürütülmüştür. Autodock tools programındaki tüm basamakların yürütülmesi için gerekli kodlara sahip olan pyrx programı kolaylığı nedeniyle tercih edilmiştir.

5.4.2.1. Hedef Proteinin Hazırlanması

MD Simülasyon ile *in vivo* şartların taklit edilmesi sonucu doğal yapı ve davranışı kazandırılmış olan normal ve polimorfik protein yapılar Docking işlemi için bir dizi işleminden geçirilmelidir. Autodock Tools programı yardımıyla yapının etrafındaki sular uzaklaştırılmış, polar olmayan hidrojen atomları kaldırılmış ve protein Kolman ve Gasteiger yükü ile yüklenmiştir. Katalitik merkezdeki Ca atomları +1 yük ile yüklenmiştir. 71. ve 292. rezidüler esnek olarak seçilmiştir.

5.4.2.2. Ligandın Hazırlanması

Tüm ligandlar işleme alınmadan önce hidrojenleri Marvin Sketch yazılımı ile eklenmiştir. Tüm ligandlar mmff94 (Merck Molecular Force Field) kuvvet alanı (Force Field) ve “*steepest descent*” optimizasyon algoritması ile her bir ligand için toplam 100000 adım(step) minimizasyon işlemi yapılmıştır. Ligandlar ADT programı

kullanılarak gasteiger ile yüklenmiş, “*dedect root*” komutu kök tespit edilmiş, amid bağları dışındaki tüm bağlar serbest olarak ayarlanmıştır.

5.4.2.3. Grid Map’ın Hazırlanması

Grid hedefin katalitik bölgesi merkez alınarak proteindeki katalitik aktiviteden sorumlu tüm atomları kapsayacak şekilde ve ligandın bu merkezdeki dönüş açılarını kısıtlamayacak hacimde hesaplanmıştır. ADT programında sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılarak .gpf dosyası oluşturulmuştur.

Grid->Macromolecule->Choose...

Grid->SetMap Types->ChooseLigand...

Grid Box...(39 Å³ (Angstrom) küp, grid hacmi için uygulama yapılmıştır.)

File->CloseSaving Current

Grid->Output->SaveGPF... (“Grid.dpf” formatında kaydedilmiştir.)

5.4.2.4. Docking Parametrelerinin Ayarlanması

Sistemin nasıl yürütüleceği ile ilgili ADT yazılımı ile aşağıdaki prosedür takip edilmiştir.

Docking->Macromolecule->Setfilename... (hedef protein seçilmiştir.)

Docking->Ligand->Choose...(ligan seçilmiştir.)

Docking->Search Parameters->GeneticAlgorithm... (Docking işleminin yürütülmesi için Genetik algoritma tercih edilmiştir. Tüm ayarlar varsayılan olarak bırakılmıştır.)

Docking->Docking Parameters... (Tüm ayarlar varsayılan olarak bırakılmıştır.)

Docking->Output->LamarckianGA... (“Dock.dpf” formatında kaydedilmiştir.)

5.4.2.5. Autodock ve Autogrid'in Yürütülmesi

Masaüstü bilgisayarda aşağıdaki komut ile docking işlemi yürütülmüştür.

```
Autogrid4 -p Grid.gpf -lGrid.glg &  
Autodock4 -p Dock.dpf -lDock.dlg &
```

5.4.2.6. Autodock Vina Konfigürasyon Dosyası (Grid Alan Bilgileri, Exhaustiveness) Hazırlanması

AutoDock Vina'da docking işlemi için PON1 Enziminin aktif merkezi hedef alınarak ortalama 19 Å (Angstrom), grid hacmi için uygulama yapılmıştır. Exhaustiveness 4 olarak ayarlanmıştır.

6. BULGULAR

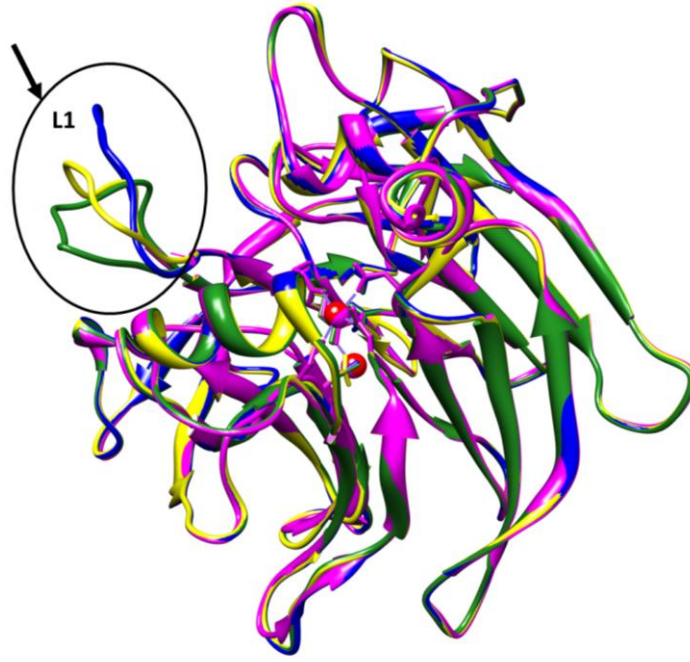
6.1. Homoloji Modelleme

MODELLER homoloji modelleme yazılımı ile 3SRE protein yapısı kalıp olarak alınarak her bir polimorfik yapı için (Normal, (M/L) 55, (Q/R) 192) 20 insan PON1 model elde edilmiş ve “Mol Probity Score”a göre en iyi yapı tercih edilmiştir. Skorlar tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 5. Proteinlerin yapı kalitesi istatistikleri.

	3SRE-Normal	3SRE-M/L55	3SRE-Q/R192
Kötü dönüş açıları:	1.67%	1.28%	0.96%
Ramachandran uyumsuzluğu:	0.00%	0.00%	0.00%
Ramachandran uyumu:	96.12%	96.32%	96.60%
C β sapmaları >0.25Å:	0	1	0
MolProbity skoru:	2.60	2.59	2.40
Kötü bağ yapmış rezidüler:	0.00%	0.00%	0.00%
Yanlış açılı rezidüler:	0.00%	0.00%	0.28%

Tablo 5’te MolProbity skoru, atom çakışmaları, dönüş açıları ve ramachandran değerlendirmelerinin X-RAY yapının çözünürlüğü ile normalize edilmiş kombinasyonu ile elde edilmiş tek bir değerdir. Skorun düşüklüğü ile yapının kalitesi ters orantılıdır. 1 değeri en kaliteli yapıyı, 100 değeri en kötü kalitedeki yapıyı temsil etmektedir. Ramachandran uyumunda %98 ve üzeri ideal olarak kabul edilir. %92 üzeri kabul edilebilir değerlerdir. Kötü dönüş açıları için %1’in altı ideal olarak kabul edilir.

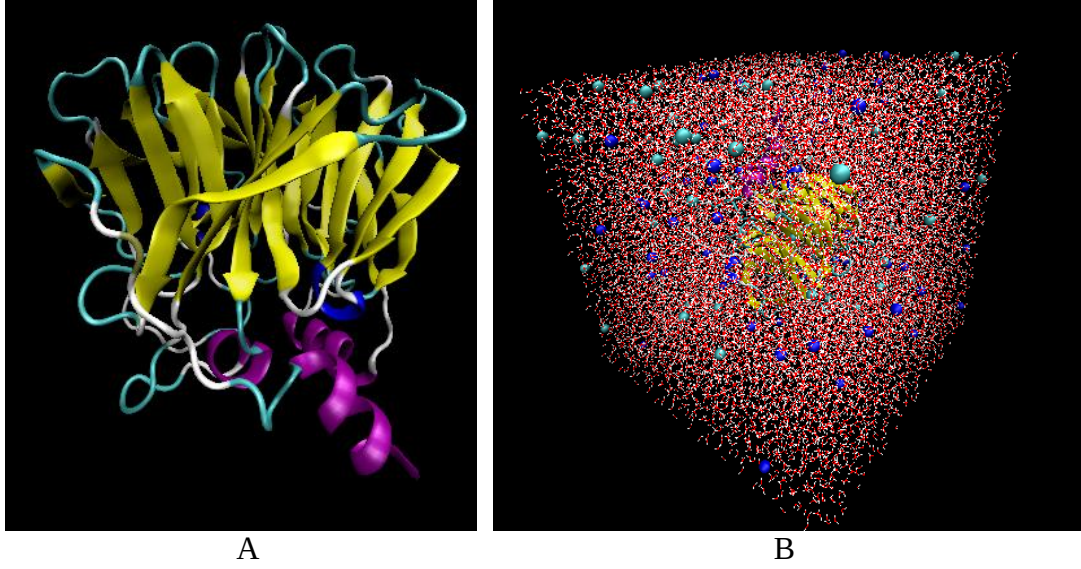


Şekil 26. Homoloji modelleme ile üretilmiş PON1 normal(mavi), (M/L) 55(yeşil), (Q/R) 192(sarı) yapılar ile 3SRE pdb kodlu rePON1-G2E6(pembe) hizalandırılmış görüntü. L1: düğüm bölgesi.

Şekil 26’da PDB.org sitesinden elde edilen yaklaşık %84 amino asit uyumuna sahip 3SRE kodlu tavşan-insan hibrit rePON1-G2E6 yapı ve homoloji modelleme ile elde edilen %100 insan PON1 , (M/L) 55 ve (Q/R) 192 polimorfik yapıları *Chimera* yazılımı ile hizalandırıldı. L1 düğüm bölgesi aşırı esnek olduğundan hizalamada en büyük sapma bu bölgede gerçekleşti. Diğer bölgelerde ise mükemmel yakın uyum görüldü.

6.2. Moleküler Dinamik Simulasyon

Gromacs moleküler dinamik yazılımı ile protein yapı, su ve iyonlardan oluşan bir sistem oluşturulmuştur. Bu sistemin görünümü Şekil 27’de gösterilmiştir. Şekilde A kısmında sarı renkli kısım beta katlamalı yapıları; mor kısımlar ise alfa sarmal yapıları göstermektedir. Şeklin B kısmında kırmızı beyaz noktalar su moleküllerini, açık mavi büyük noktalar Cl^{-1} iyonunu, koyu mavi büyük noktalar Na^{+1} iyonunu, ortadaki sarı yapı ise protein yapıyı göstermektedir.



Şekil 27. A. Protein yapısı ve B. SPC su modeli eklenmiş, Na^{+1} ve Cl^{-1} ile nötralize edilmiş sistemin görüntüsü.

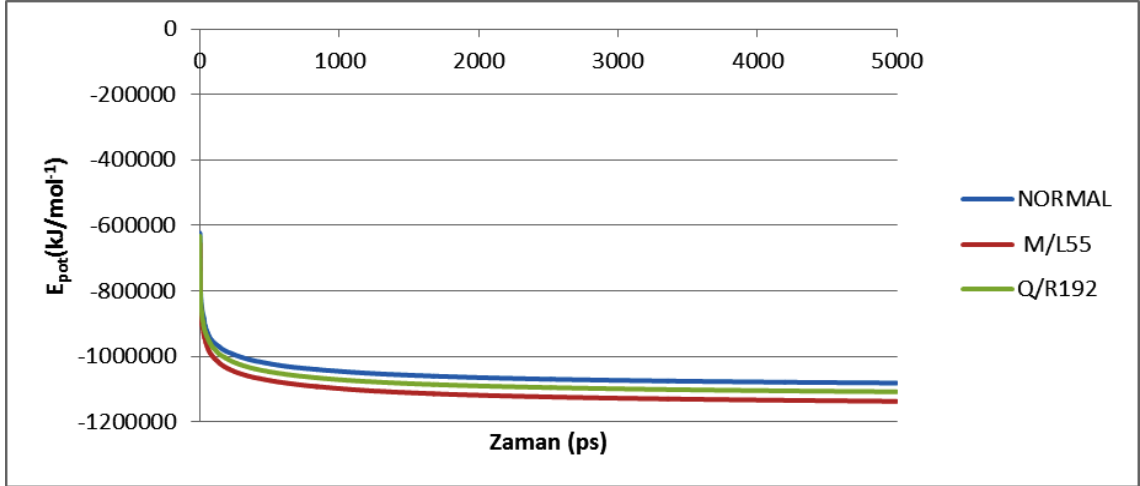
Tablo 6’da her bir polimorfik yapının bulunduğu sistem için molekül içerikleri gösterilmiştir. Sistemler ortalama 18-19 bin su molekülü içerirken buna uyumlu olarak ta ortalama 70 Na^{+1} iyonu, 56 Cl^{-1} içermektedir. Proteinlerin ortalama molekül kütleleri 39, 75 iken kalsiyum atomu proteinin kofaktörü olarak her bir sistemde 2 tanedir.

Tablo 6. MD sistemin moleküler içeriği.

Molekül	3SRE-Normal (Molekül sayısı)	3SRE-M/L 55 (Molekül sayısı)	3SRE-Q/R 192 (Molekül sayısı)
Su	18132	19131	18602
Sodyum	69	71	70
Klor	54	57	56
Kalsiyum	2	2	2
Protein (kDa)	39, 74	39, 75	39, 76

6.2.1. Enerji Minimizasyonu

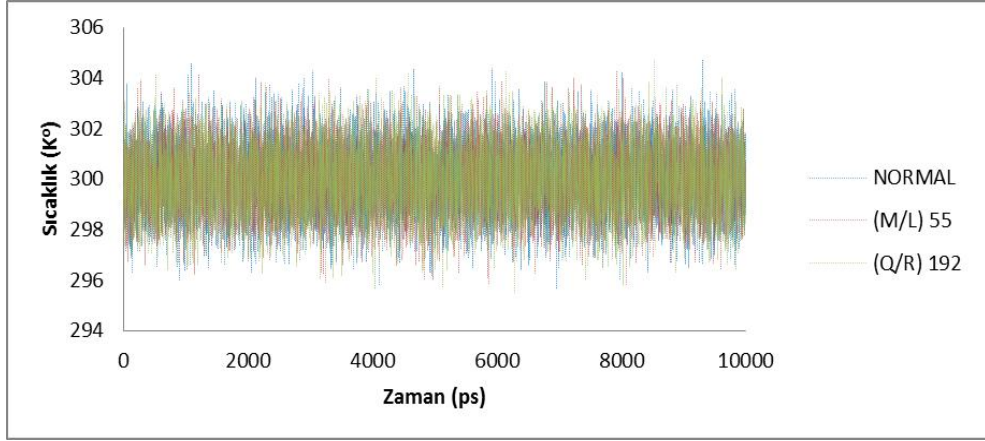
Su ve iyonlar eklendikten sonra tüm sistem GROMACS moleküler dinamik yazılımı ile minimize edilmiştir. Minimizasyon eğrisi şekil 28’de gösterilmiştir. Şekilde proteinlerin toplam enerjileri ilk 100 ps’de hızla azalırken sonraki zamanlarda daha yavaş azalıp yatay bir seyir izlemişlerdir.



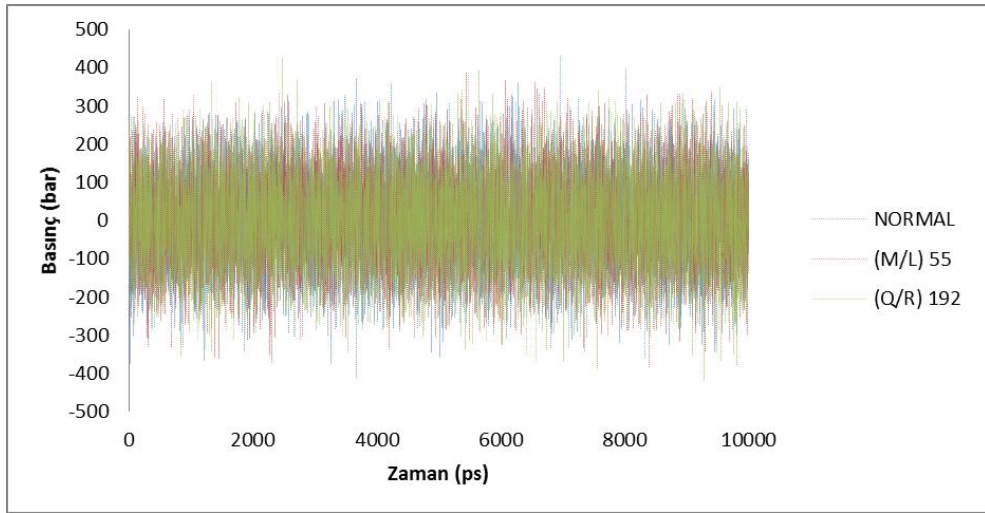
Şekil 28. Mimizasyon eğrisi.

6.2.2. Dengeleme Aşaması

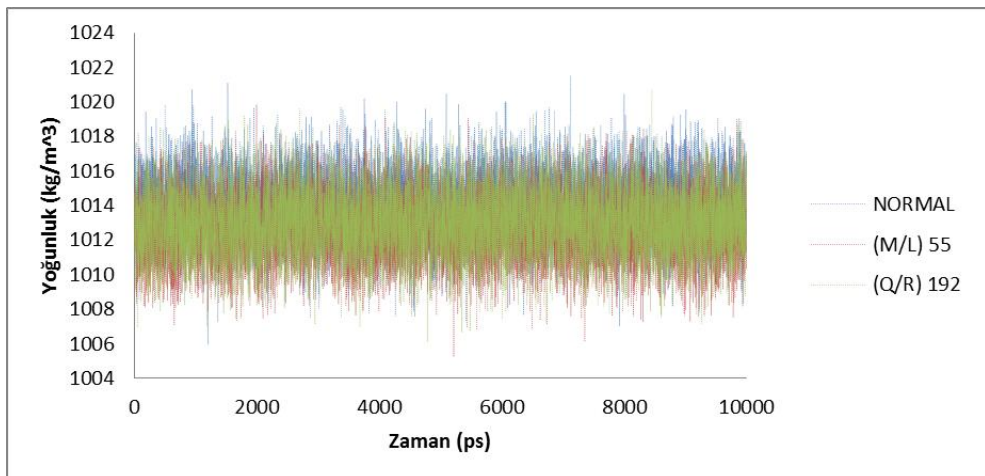
Enerji minimizasyon işleminden sonra sistemin *in vitro* laboratuvar koşullarına getirilmesi için dengeleme aşaması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada sıcaklık basınç ve yoğunluğun normal koşullara getirilmiş olması gerekmektedir. Normal, (M/L) 55, (Q/R) 192 yapılar için sıcaklık basınç ve yoğunluk ve ortalamaları gösteren grafikler ve tablo aşağıdadır. Şekil 29-31’de sırayla sıcaklık, basınç ve yoğunluk grafikleri gösterilmiştir. Sıcaklık her üç sistem için de ortalama 300 K° düzeylerindeyken basınç ortalama 1.023 bar, yoğunluk ise ortalama 1013 Kg/m³ seviyelerinde seyretmiştir. Tüm bu değerler her üç sistemin de laboratuvar koşullarına uygun koşullara sahip olduğunu göstermektedir. sıcaklık ve basınç her üç sistemde de hemen hemen aynı seviyelerdeyken. PON1 normal yapının bulunduğu sistem 1014 Kg/m³ ile en yoğunken (M/L) 55 polimorfik yapının bulunduğu sistem 1012, 68 Kg/m³ ile en az yoğundur.



Şekil 29. Denge fazında sıcaklık değişimi.



Şekil 30. Denge fazında basınç değişimi.



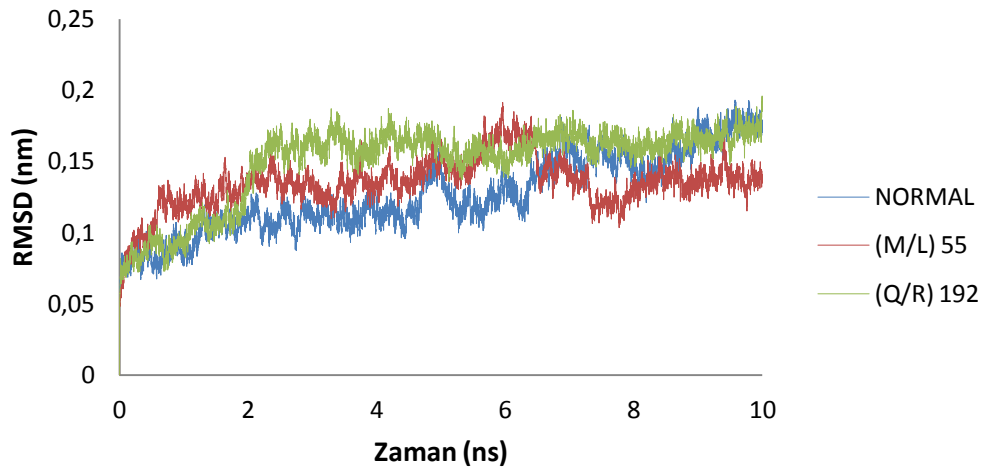
Şekil 31. Denge fazında yoğunluk değişimi.

Tablo 7. Şekil 29-31'e göre 10 ns'lik simülasyondaki ortalama sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerleri.

	Ortalama değerler		
	NORMAL	M/L 55	Q/R 192
Sıcaklık (K°)	299.987	299.983	299.984
Basınç (bar)	1.02192	1.0232	1.02427
Yoğunluk (kg/m ³)	1014.04	1012.68	1013.06

6.2.3. Tam Moleküler Dinamik Simülasyonda RMSD, RMSF Ve Rg

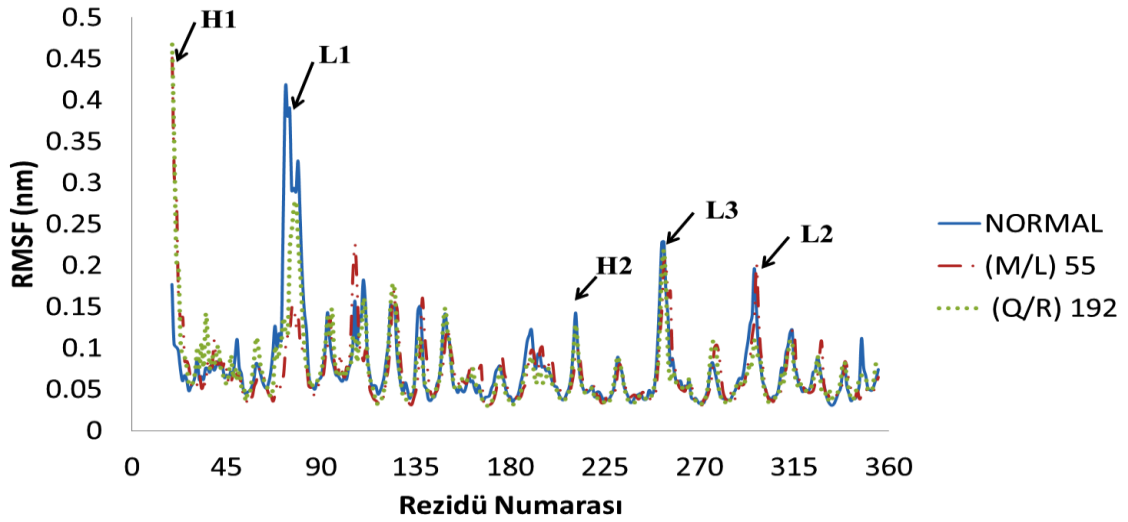
Moleküler dinamik simülasyonlarından sonra en sık RMSD (Root mean square deviation) ve RMSF (Root mean square fluctuation) değerleri analiz edilmektedir. RMSD sistemin stabilitesi ve protein yapının sağlıklı olduğunun bir ölçüsüdür. RMSD değeri ortalama sabit bir değere ulaşmış ve çok fazla kayma göstermiyorsa bu sistemin stabil hale geldiğini gösterir. RMSD değeri genellikle proteinin alfa karbon yapılarındaki konuma göre kayma hesap edilerek bulunur. Bu çalışmada da bu yöntem kullanılmıştır. 10 ns'lik RMSD grafiği Şekil 32'de gösterilmiştir.



Şekil 32. RMSD değişim grafiği.

Bir proteinin en karakterisitik özelliği belli bir esnekliğe sahip olmasıdır. Moleküler dinamik simülasyonları ile bu esneklik gözlemlenirken rezidü başına esnekliği grafiksel olarak göstermek için RMSF eğrisi kullanılmaktadır. RMSF eğrisi protein üzerindeki her bir rezidünün MD simülasyon boyunca yapı içerisindeki hareketliliğini ifade etmektedir. Şekil 33'de her bir rezidüye ait RMSF değeri

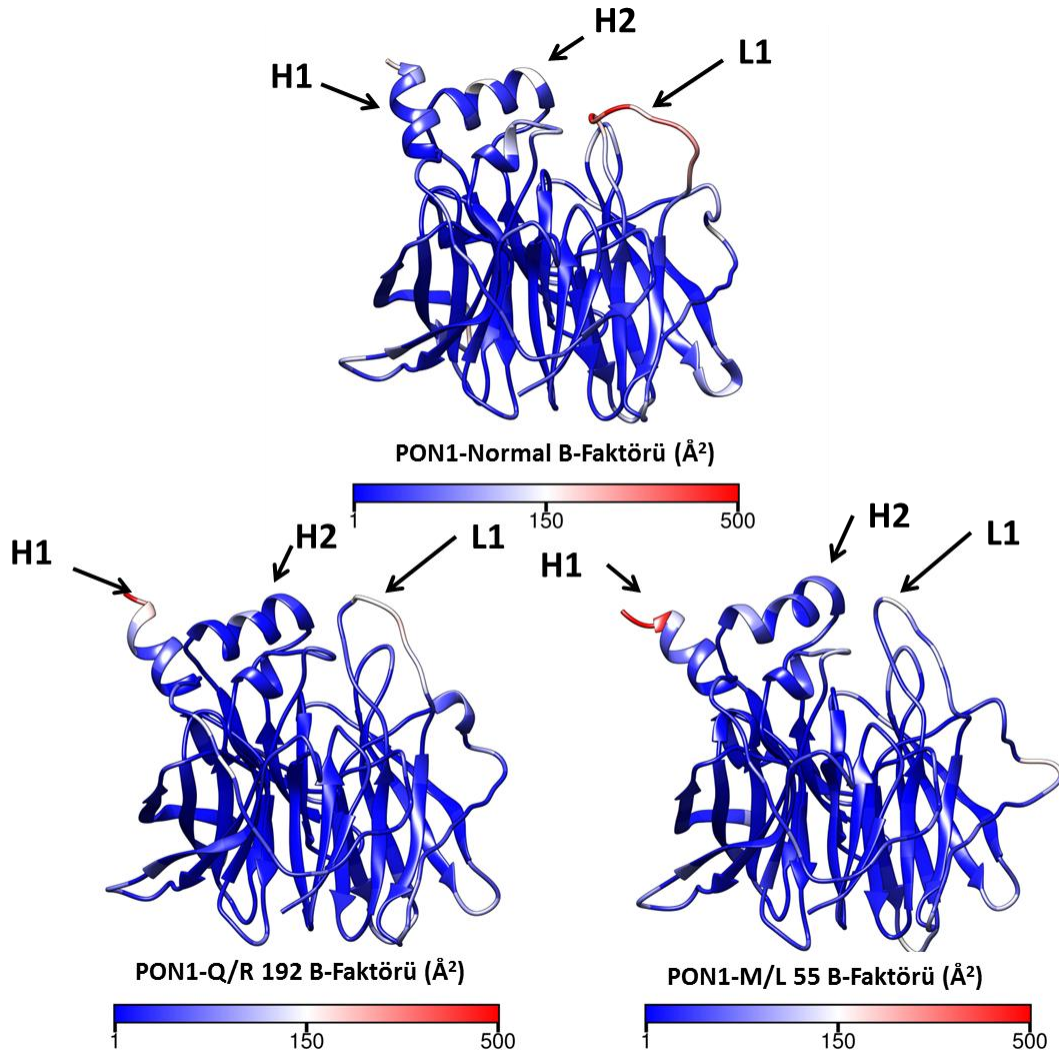
gösterilmiştir. L1, L2 ve L3 ile ifade edilen bölgeler protein yapıları üzerindeki düğüm bölgelerini temsil ederken H1 ve H2 helikal yapıları temsil etmektedir. En esnek bölge protein yapıların N-terminal ucundaki H1 iken L1 bölgesi ikinci en esnek bölgeyi temsil etmektedir. L1 bölgesi aynı zamanda aktif merkeze yakındır.



Şekil 33. RMSF değişim grafiği.

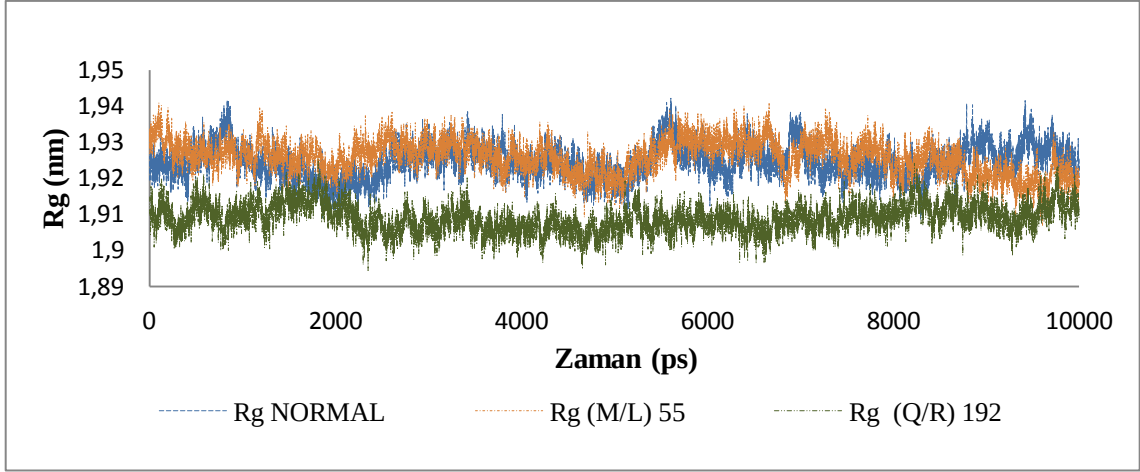
B-faktörü bir protein yapı içindeki atomların yer değiştirmesini ifade eder. Eğer protein yapı içinde esnek bölgeler varsa bu bölgede atomların yer değiştirme aralığı daha fazla olacaktır. *Chimera* gibi çeşitli programlar ile B-faktörüne göre protein yapıları renklendirilebilmektedir. Mavi renkli alanlar protein yapının sabit olduğunu kırmızı bölgeler ise esnek olduğunu göstermektedir. B-faktörü değeri 60'a kadar ortalama bir Angstron'luk yer değiştirmeyi ifade ederken daha yüksek değerler esnekliğin daha fazla olduğunu göstermektedir. Şekil 34

Şekil 34'de PON1 ve polimorfik yapılarının esnekliği B-faktör cinsinden gösterilmektedir. Şekilde L1 düğüm bölgesi 70-80 rezidü aralığını göstermektedir. PON1-normal yapıda kırmızı renkle en esnek bölgeyken Q/R 192 ve M/L 55 polimorfik yapılarında H1 helikal bölgeler en esnek bölgeler olarak kırmızı renk almışlardır. Her üç yapıda da H2 helikal bölge diğer esnek bölge olarak göze çarpmaktadır.



Şekil 34. PON1 yapıların RMSF özelliklerinin B-faktörü diyagramı ile gösterimi.

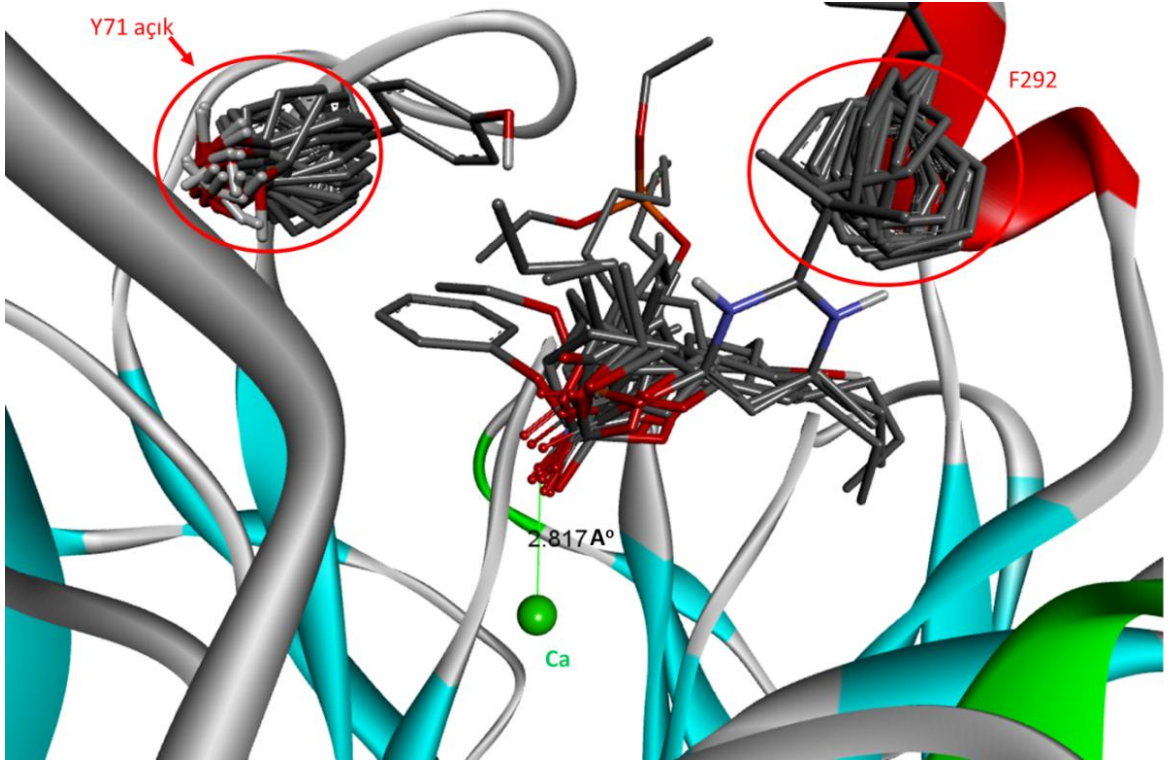
Dönme yarıçapı (R_g), MD çalışmalarında yapının kararlı konformasyona ulaşip ulaşmadığını göstermektedir. Protein eğer iyi katlanmışsa R_g değeri belli bir sabit değerde kalmaktadır. Sapmanın fazla olması proteinin konformasyon değiştirdiğini ya da bozulmaya başladığını göstermektedir. Çalışmada her bir polimorfik yapı için R_g değerleri Şekil 35’de gösterilmiştir.



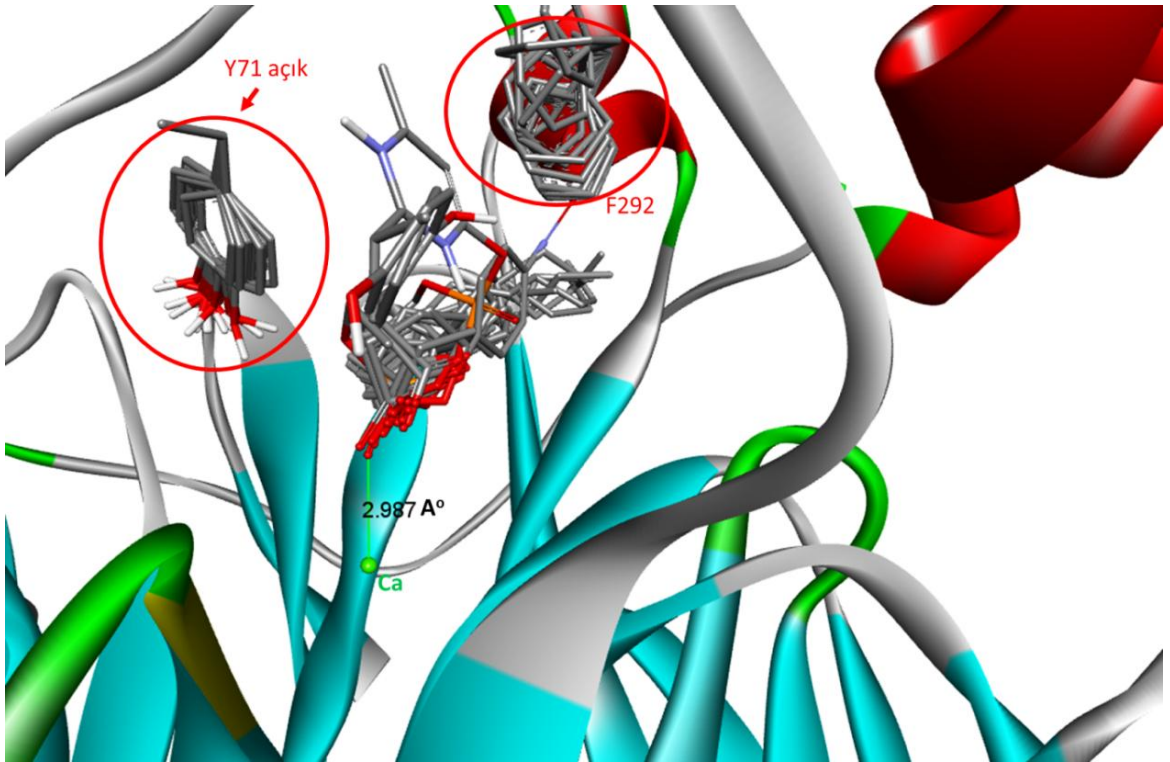
Şekil 35. Dönme yarıçapının zamana göre değişimi.

6.2.4. Moleküler Docking

10 ns'lik moleküler dinamik simülasyonundan sonra 9. ns'den itibaren 0, 1 ns'lik zamanlardaki her bir proteinin polimorfik yapıları olmak üzere toplam 33 yapı üzerinde Autodock 4.2 ile docking işlemi gerçekleştirilmiştir. Önce PON1'in kendi subsbstratları ile docking işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 36-38'de tüm substratların sırayla PON1-normal, M/L 55 Q/R 192 polimorfik yapıları ile hangi konformasyonda etkileşime girdikleri gösterilmiştir. PON1-normal ve M/L 55 polimorfik yapılarda her bir substrat için Y71 rezidüsü açık konformasyon oluşturduğu görülürken Q/R 192 polimorfik yapıda kapalı konformasyon gösterdi. Şekil 38'e bakıldığında Y71'in kapalı formunun substratların afinitiesine olumlu etki yaptığı görüldü. F292 rezidüsü ise *moleküler docking* işleminde esnek bırakıldığı için grafikler üzerinde gösterildi. Aktif merkezin dışında kalarak substratlarla etkileşimde olmadığı görüldü.



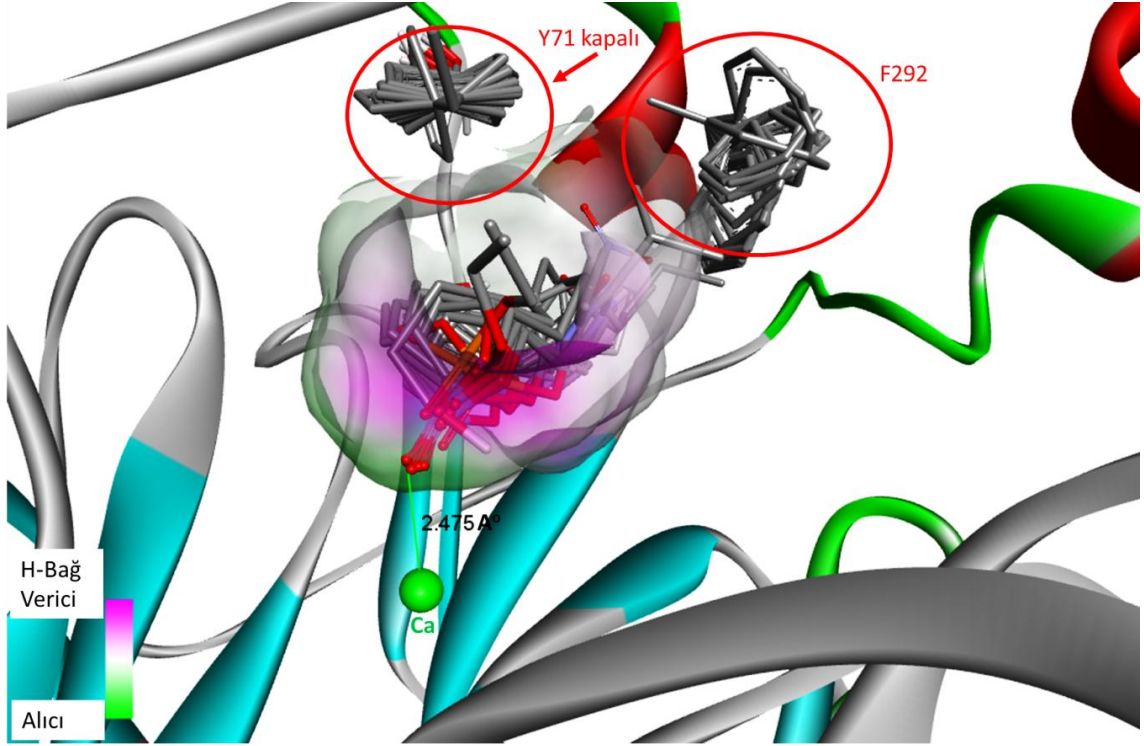
Şekil 36. 18 substratın PON1 normal yapı üzerindeki konformasyonları



Şekil 37. 18 substratın PON1 M/L55 polimorfik yapı üzerindeki konformasyonları

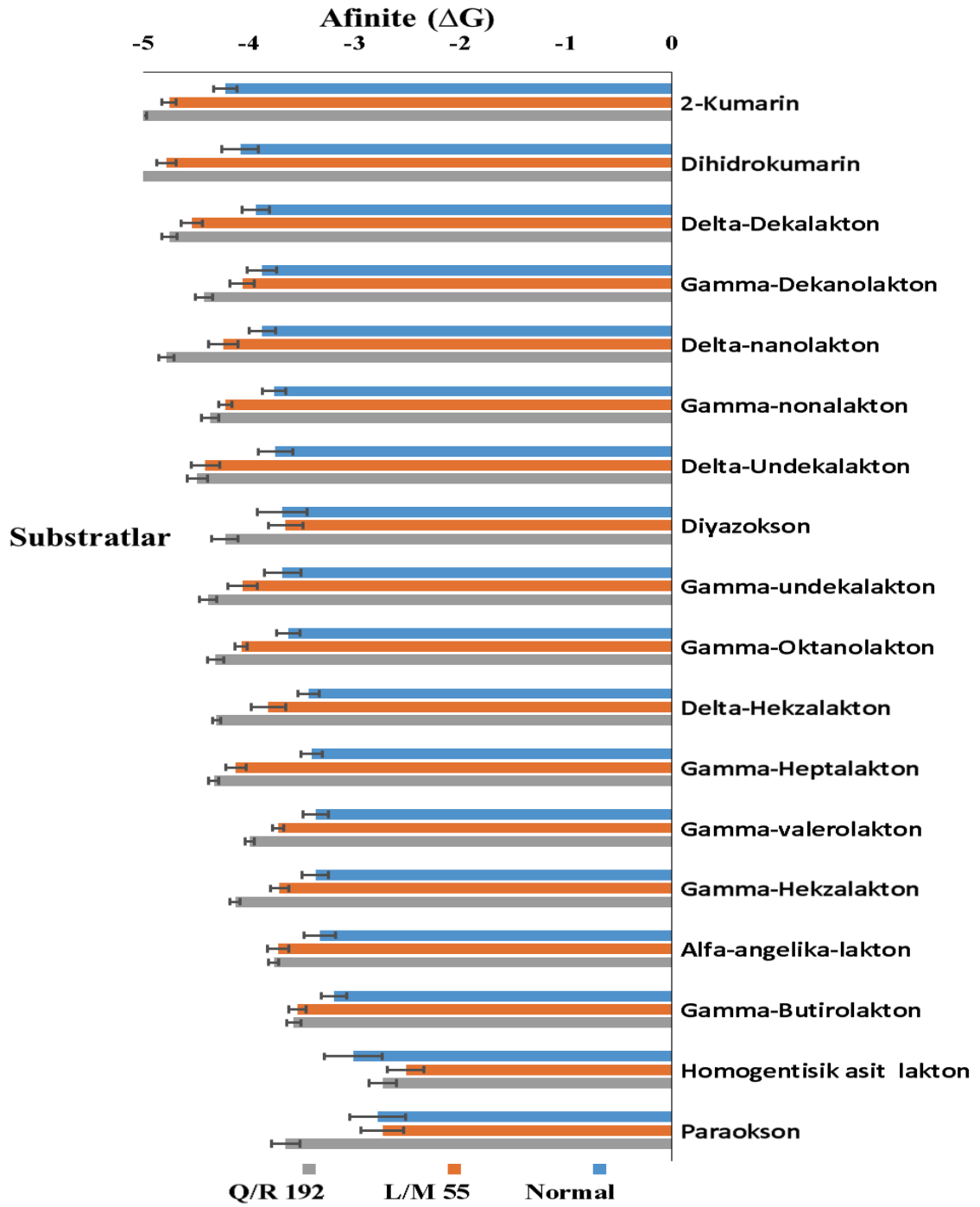
Tablo 8. Tüm substratların afinite değerleri (Ortalama $\pm$ S.E.) (n=11).

Ligand	PON1-Normal	PON1-L/M 55	PON1-Q/R 192
2-Kumarin	-4.23 $\pm$ 0.11 -4, 26 (-4, 72: -3, 3)	-5.04 $\pm$ 0.07 -4, 74 (-5, 1: -4, 39)	-4.76 $\pm$ 0.07 -5, 02 (-5, 42: -4, 69)
Alfa-Angelica-lakton	-3.33 $\pm$ 0.15 -3, 41 (-4, 34: -2, 17)	-3.77 $\pm$ 0.05 -3, 62 (-4, 38: -3, 27)	-3.73 $\pm$ 0.1 -3, 79 (-4, 12: -3, 52)
Delta-Dekalakton	-3.94 $\pm$ 0.13 -3, 94 (-4, 61: -2, 91)	-4.76 $\pm$ 0.07 -4, 51 (-4, 99: -3, 73)	-4.54 $\pm$ 0.1 -4, 74 (-5, 29: -4, 4)
Delta-Hekzalakton	-3.44 $\pm$ 0.1 -3, 51 (-3, 38: -2, 58)	-4.31 $\pm$ 0.04 -3, 9 (-4, 79: -2, 62)	-3.82 $\pm$ 0.16 -4.3 (-4, 54: -4.14)
Delta-nanolakton	-3.88 $\pm$ 0.12 -3, 95 (-4, 47: -2, 77)	-4.79 $\pm$ 0.07 -4, 39 (-4, 71: -3, 34)	-4.25 $\pm$ 0.14 -4.91 (-5.07: -4.35)
Delta-Undekalakton	-3.75 $\pm$ 0.16 -3, 95 (-4, 34: -2, 36)	-4.49 $\pm$ 0.09 -4, 57 (-4, 92: -3, 19)	-4.42 $\pm$ 0.14 -4.44 (-5.07: -4.06)
Diyazokson	-3.69 $\pm$ 0.24 -3, 81 (-4, 76: -1, 47)	-4.23 $\pm$ 0.12 -3, 59 (-4, 99: -2, 99)	-3.66 $\pm$ 0.16 -4.01 (-5.11: -3.84)
Dihidrookumarin	-4.09 $\pm$ 0.17 -3, 94 (-4, 61: -2, 91)	-5.2 $\pm$ 0.13 -4, 93 (-5, 12: -4, 2)	-4.79 $\pm$ 0.09 -5.31 (-5.73: -3.93)
Gamma-Butirolakton	-3.2 $\pm$ 0.12 -3, 21 (-3, 90: -2, 33)	-3.58 $\pm$ 0.07 -3, 45 (-4, 2: -3, 23)	-3.54 $\pm$ 0.08 -3.51 (-3.91: -3.18)
Gamma-Dekanolakton	-3.88 $\pm$ 0.14 -4, 10 (-4, 40: -2, 62)	-4.43 $\pm$ 0.08 -4, 24 (-4, 49: -3, 25)	-4.07 $\pm$ 0.12 -4.45 (-4.81: -3.76)
Gamma-Heptalakton	-3.41 $\pm$ 0.1 -3, 46 (-4, 86: -2, 48)	-4.33 $\pm$ 0.05 -4, 09 (-4, 79: -3, 57)	-4.13 $\pm$ 0.1 -4.38 (-4.56: -4.02)
Gamma-Hekzalakton	-3.37 $\pm$ 0.13 -3, 50 (-3, 98: -2, 37)	-4.13 $\pm$ 0.05 -3, 74 (-4, 23: -3, 2)	-3.71 $\pm$ 0.09 -4.11 (-4.43: -3.91)
Gamma-Nonalakton	-3.77 $\pm$ 0.11 -3, 84 (-4, 21: -2, 87)	-4.37 $\pm$ 0.08 -4, 22 (-4, 6: -3, 74)	-4.23 $\pm$ 0.07 -4.43 (-4.99: -3.93)
Gamma-Oktanolakton	-3.63 $\pm$ 0.11 -3, 70 (-4, 12: -2, 77)	-4.32 $\pm$ 0.08 -4, 18 (-4, 28: -3, 69)	-4.08 $\pm$ 0.06 -4.31 (-4.75: -3.86)
Gamma-undekalakton	-3.68 $\pm$ 0.17 -3, 82 (-4, 25: -2, 02)	-4.39 $\pm$ 0.08 -4, 25 (-4, 67: -3, 26)	-4.07 $\pm$ 0.14 -4.25 (-4.86: -4)
Gamma-valerolakton	-3.37 $\pm$ 0.12 -3, 32 (-4, 14: -2, 40)	-4 $\pm$ 0.05 -3, 74 (-4, 04: -3, 41)	-3.73 $\pm$ 0.05 -4.01 (-4.3: -3.78)
Homogentisik asit lakton	-3.02 $\pm$ 0.28 -3, 34 (-4, 52: -0, 78)	-2.74 $\pm$ 0.13 -2, 48 (-3, 54: -1, 73)	-2.52 $\pm$ 0.17 -2.62 (-3.62: -2.09)
Paraokson	-2.79 $\pm$ 0.27 -3, 00 (-3, 93: -0, 51)	-3.66 $\pm$ 0.13 -2, 86 (-3, 91: -1, 95)	-2.74 $\pm$ 0.2 -3.54 (-4.48: -3.05)

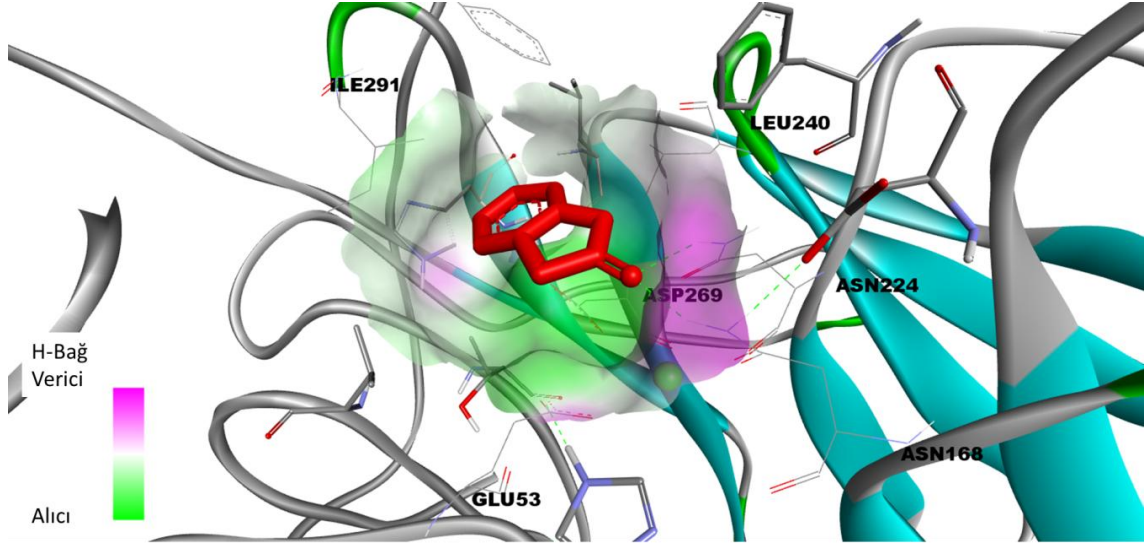


Şekil 38. 18 substratın PON1 Q/R 192 polimorfik yapı üzerindeki konformasyonları

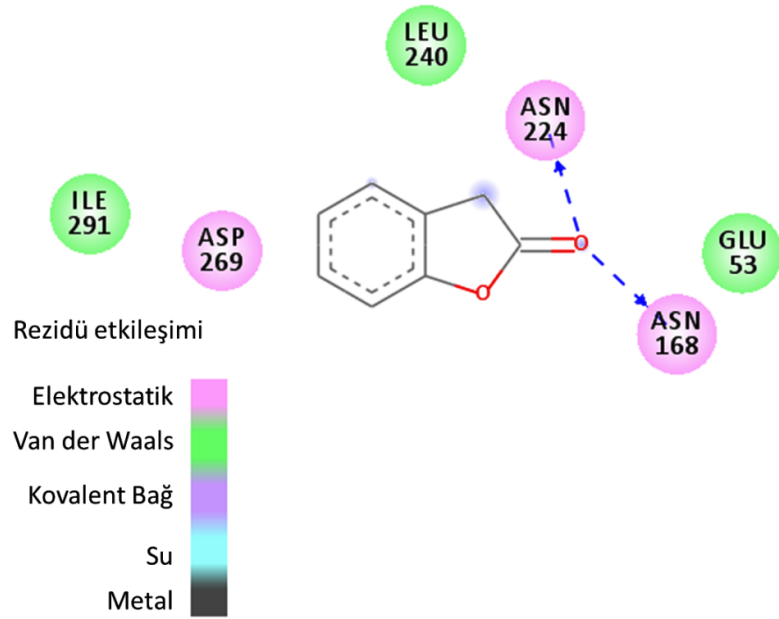
Şekil 39’da tüm substratların afinite değerleri polimorfik yapılara göre afinitelerine göre sıralanarak gösterildi. Şekil 40-45’te PON1 ve polimorfik yapıları ile en yüksek afinite gösteren substratların protein yapılar üzerindeki konformasyonları ve hangi aminoasit ile etkileşime girdikleri gösterildi. Şekil 46’da lipid düşürücü ilaçlar afinitelerine göre her bir polimorfik yapı için sıralanarak gösterildi. Şekil 47-52’de PON1 ve polimorfik yapıları ile en yüksek afinite gösteren lipid düşürücü ilaçların protein yapılar üzerindeki konformasyonları ve hangi aminoasit ile etkileşime girdikleri gösterildi.



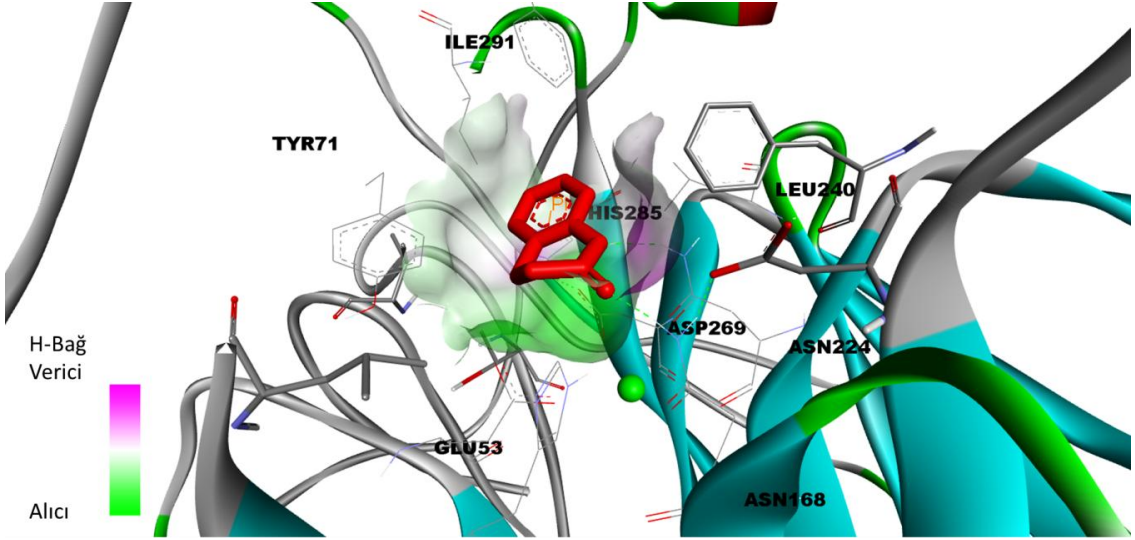
Şekil 39. Substratların Normal, L/M 55 ve Q/R 192 PON1 polimorfik yapılarına afiniteleri



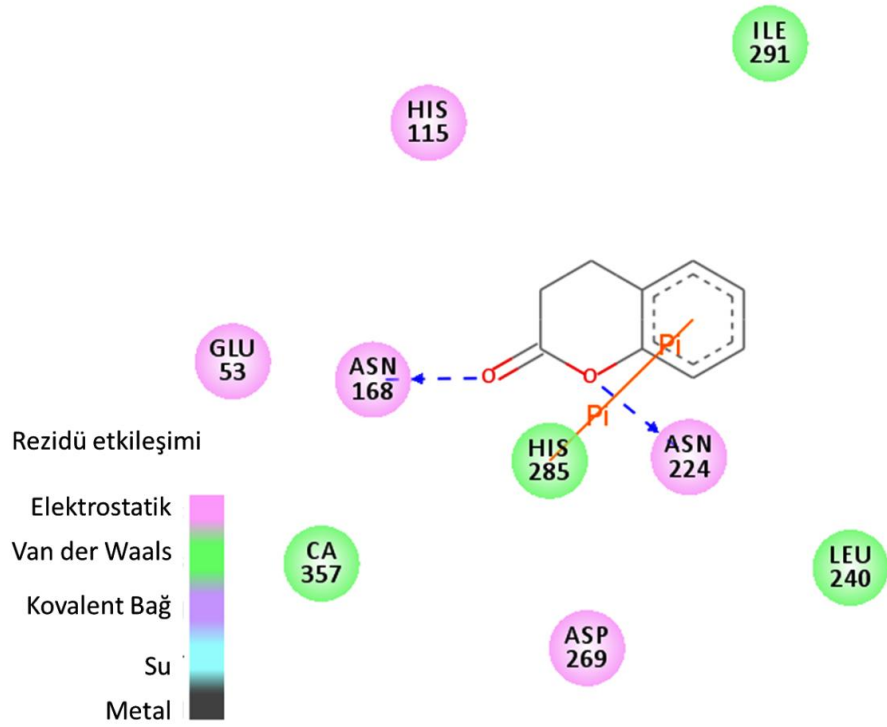
Şekil 40. Normal PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen 2-kumarinin konformasyonu.



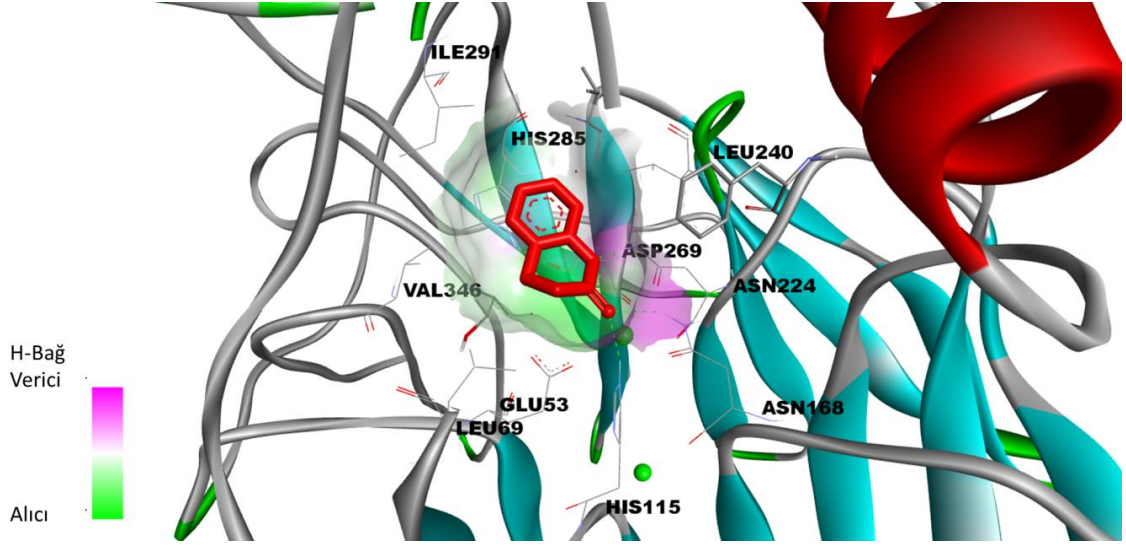
Şekil 41. Normal PON1'in aktif merkezindeki 2-kumarinin aminoasit etkileşimi.



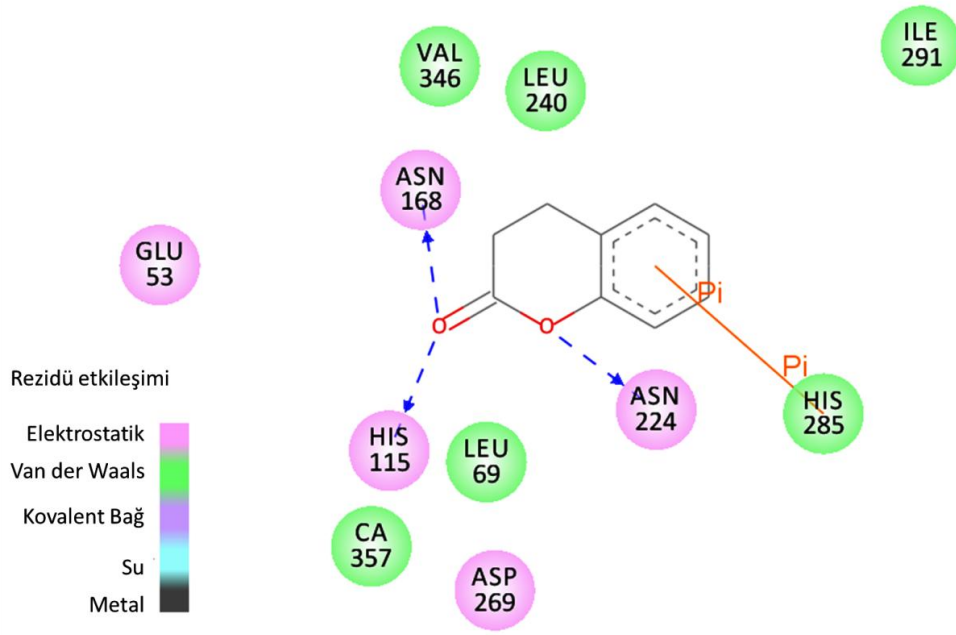
Şekil 42. M/L 55 PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen dihidrokumarinin konformasyonu.



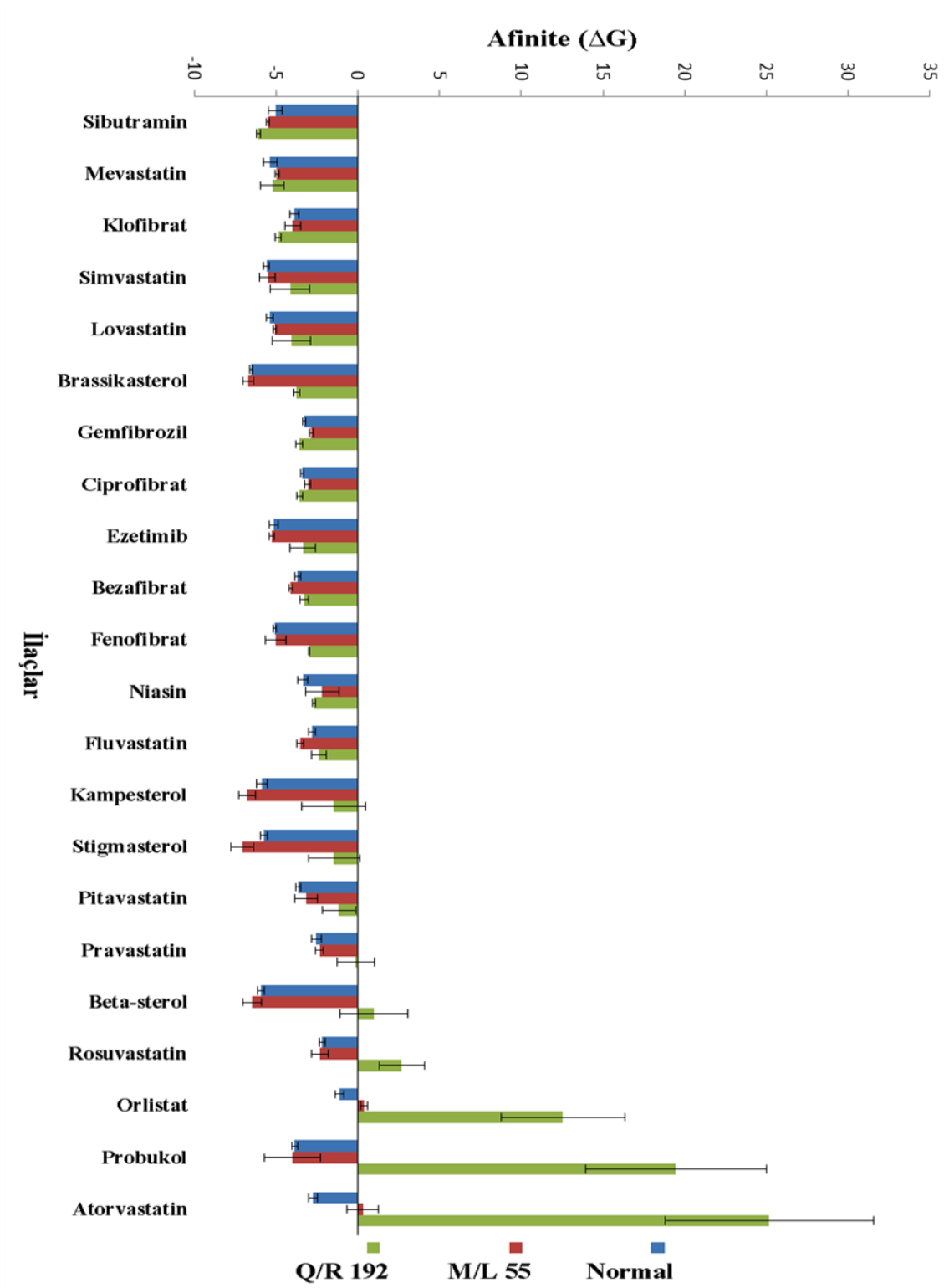
Şekil 43. M/L 55 PON1'in aktif merkezindeki dihidrokumarinin aminoasit etkileşimi.



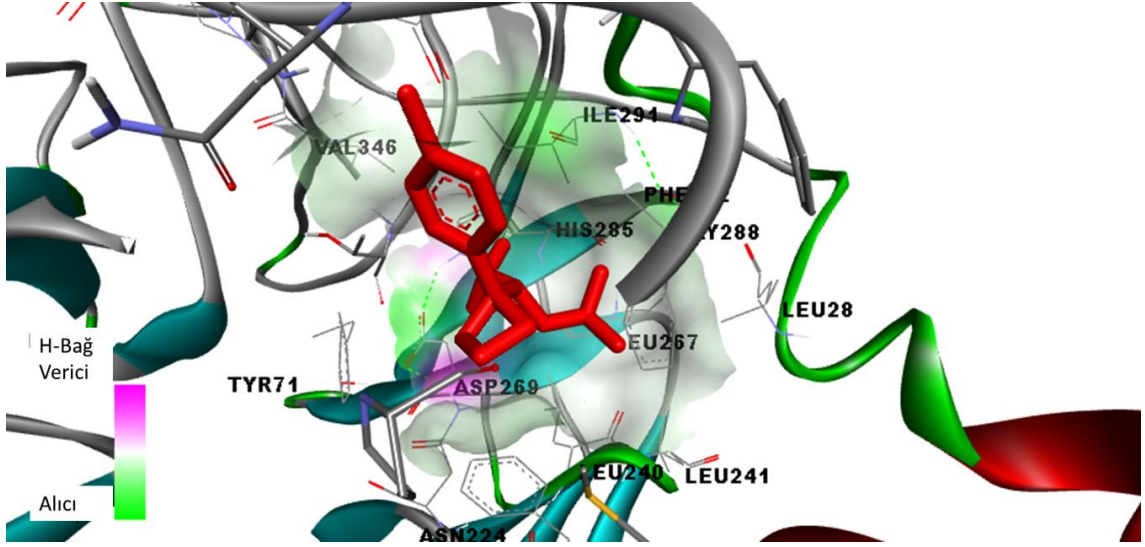
Şekil 44. Q/R192 PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen dihidrokumarinin konformasyonu.



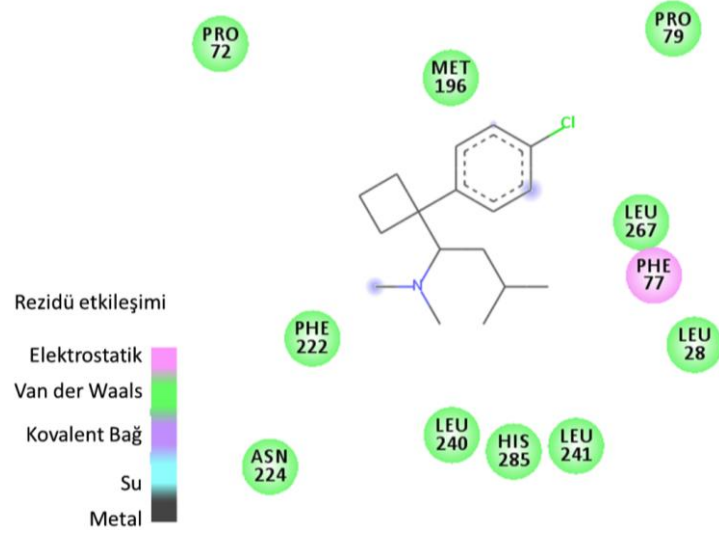
Şekil 45. Q/R 192 PON1'in aktif merkezindeki dihidrokumarinin aminoasit etkileşimi.



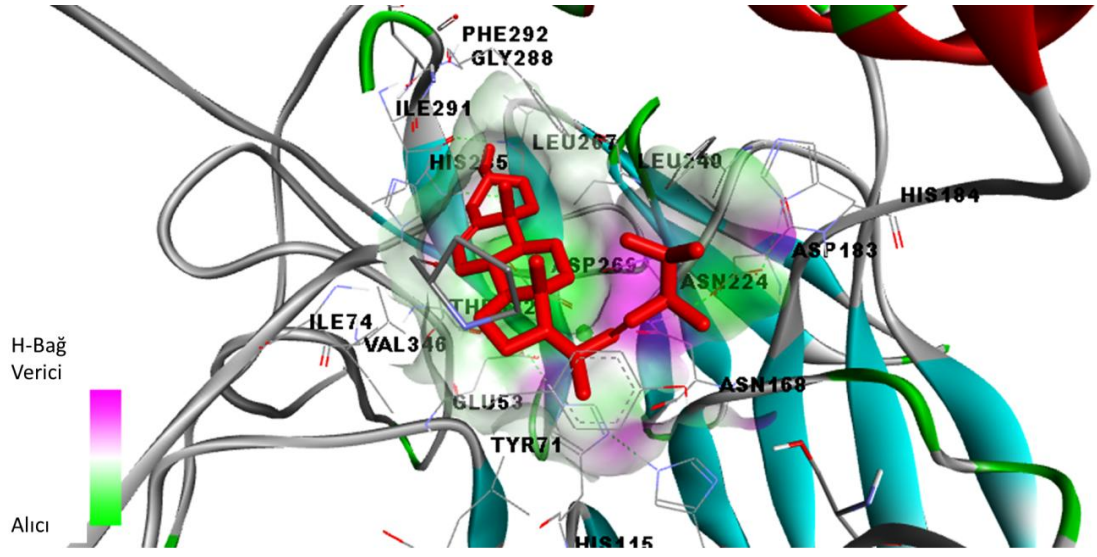
Şekil 46. Lipid düşürücü ilaçların PON1 ve polimorfik yapılarına afinite değerleri.



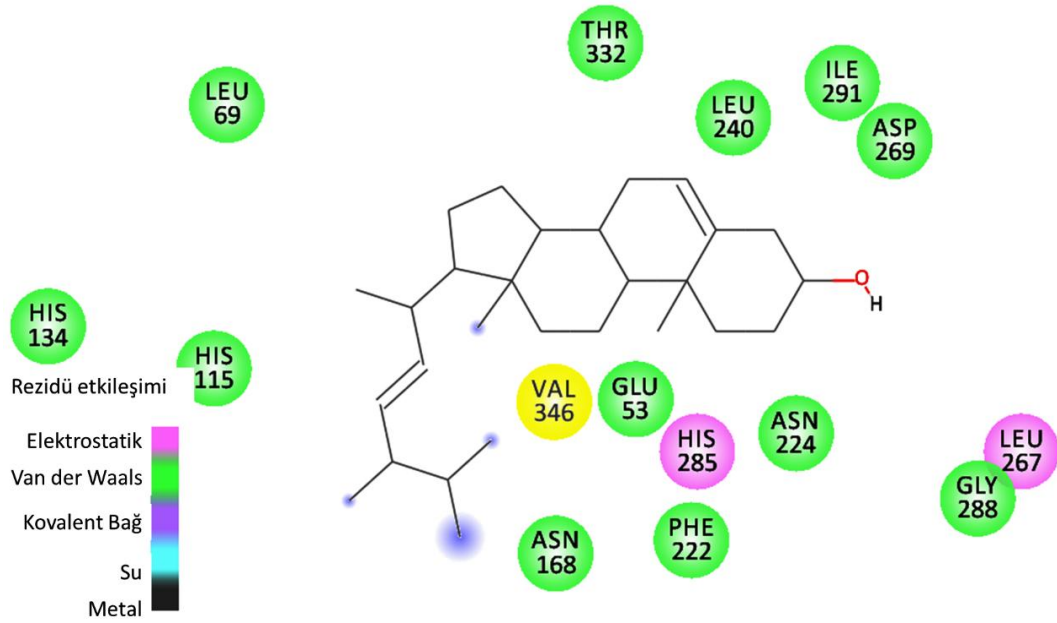
Şekil 47. Q/R 192 PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen sibutraminin konformasyonu.



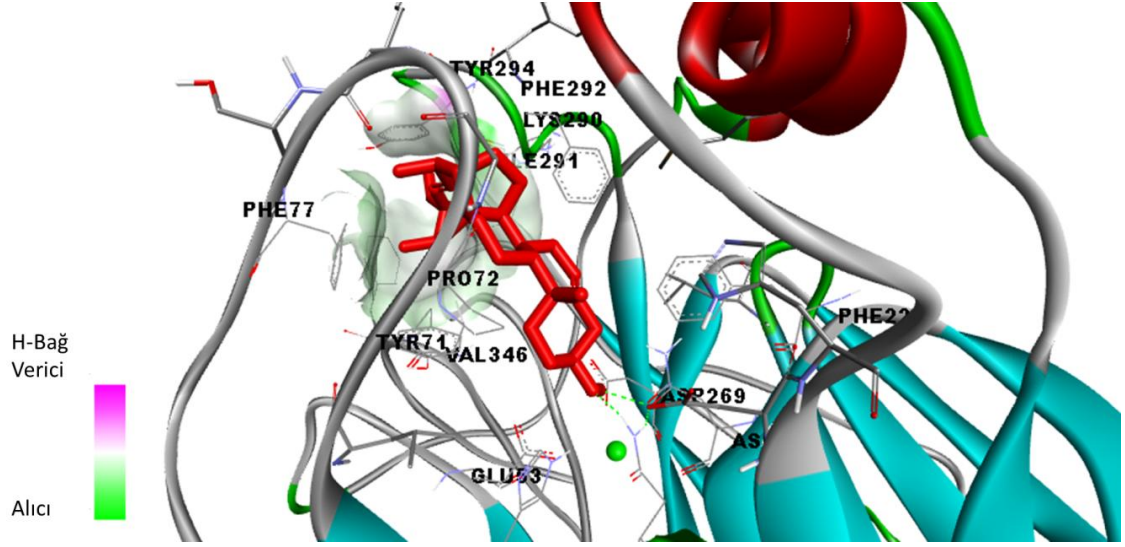
Şekil 48. Q/R 192 PON1'in aktif merkezindeki sibutraminin aminoasit etkileşimi



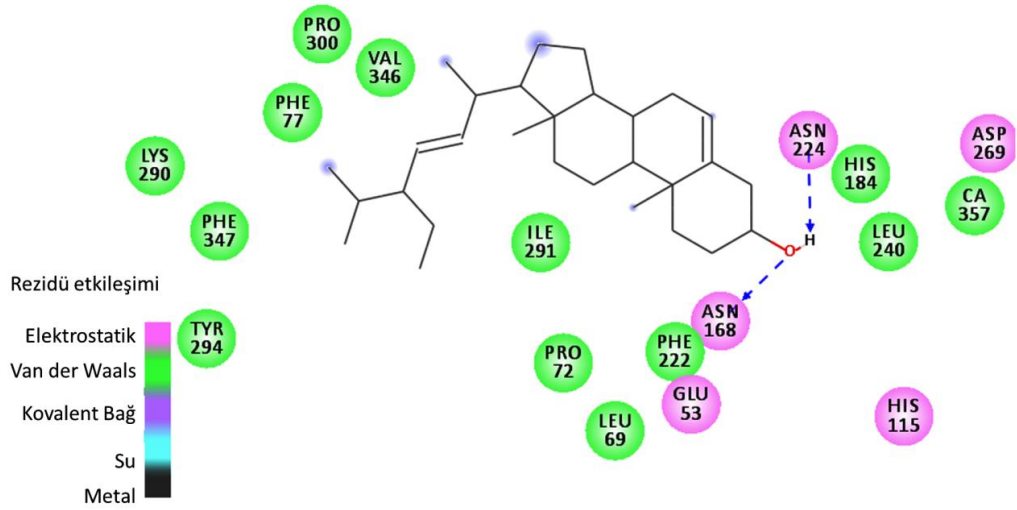
Şekil 49. Normal PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen brassikasterol konformasyonu.



Şekil 50. Normal PON1'in aktif merkezindeki brassikasterolun aminoasit etkileşimi.



Şekil 51. M/L 55 PON1'in aktif merkezindeki kırmızı yapıda gösterilen stigmaterol konformasyonu.



Şekil 52. M/L 55 PON1'in aktif merkezindeki stigmaterol'ün aminoasit etkileşimi.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, deneysel çalışmalar öncesi araştırmalara yön veren, zaman ve paradan tasarruf kazandırması yönü ile son yıllarda yaygın olarak kullanılan *in siliko* (bilgisayar destekli çalışmalar) metodlar uygulanarak lipid düşürücü ilaçların PON1 enzimine olan afiniteleri değerlendirildi. PON1 enzimin substratların ve lipid düşürücü ilaçların afiniteleri karşılaştırıldı.

Son yıllarda yaygın kullanım alanı bulan *in siliko* çalışmalar; 1) kimyasal gerektirmediği için araştırmacıların kimyasalların oluşturabileceği zararlı etkilere maruz kalmaması, 2) yüklü bir bütçe gerektirmemesi, 3) deneysel çalışmalar ile uzun süre zaman kaybının azaltılması, 4) canlılar üzerinde uygulama yapılmaması, 5) deneysel çalışmalara hazırlık niteliğinde ön çalışma olması gibi avantajlara sahiptir. Tüm bu avantajlara karşın *in siliko* yöntemlerin güvenilirliği hala tartışma konusudur. Örneğin *in siliko* yöntemlerden biri olan *moleküler docking* metodu ile Anti-HIV ilaç geliştirilmesi gibi bir çok önemli başarı hikayesine karşın özellikle 14'den fazla torsiyonu (dönüş açısı) olan ve bazı ligand türlerinde başarı oranı düşebilmektedir . Günümüzde *moleküler docking* metodları ve moleküler dinamik simülasyonları beraber yürütülerek çok daha doğru sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.

Afinite belirlemede kullanılan *moleküler docking* metoduna geçmeden önce PON1 enziminin polimorfik yapıları da göz önüne alınarak üç boyutlu moleküler yapısı oluşturuldu. İnsan PON1 enziminin X-RAY kristalografik yapısı ortaya çıkarılmadığından aynı enzimatik aktiviteye sahip amino asit düzeyinde %83, 66 benzerliğe sahip insan-tavşan hibrit X-RAY kristal yapı'dan (PDB kod: 3SRE) homoloji modelleme yapılarak %100 insan PON1, M/L 55 ve Q/R 192 polimorfik yapılar elde edildi. Bu yapıları, 10 ns'lik moleküler dinamik simülasyonu uygulanarak laboratuvar koşullarındaki doğal konformasyon ve davranışları kazandırıldı. Serum PON1 enzimi ve (M/L) 55, (Q/R) 192 polimorfik yapıların moleküler dinamik simülasyon ile karakteristik özellikleri incelendi. Laboratuvar koşullarındaki davranışlara sahip yapıların 9. ns'den sonraki 100 ps'lik zamanlardaki protein yapıların konformasyonları üzerinde önce kendi substratları ile *moleküler docking* işlemi

gerçekleştirildi. Doğal substratların amino asit etkileşimleri ve kalsiyumun rolü hakkında veriler elde edilmesinin yanında afinite değerleri ile başka araştırmacılara ait deneysel veriler karşılaştırıldı. Her bir polimorfik yapı için daha önceki deneysel çalışmalar (6, 44) göz önüne alınarak substrat afiniteleri ile en iyi korelasyona sahip 4 protein yapı seçildi. Katalitik yapısı, kendi substratları (şekil 39) ve lipid düşürücü ilaçlar (şekil 46) ile hangi amino asit düzeyinde etkileşimde olduğu detaylı olarak irdelenerek afinite değerleri rapor edildi.

Yapılan tüm bu çalışmanın basamakları aşağıda ayrıntılı bir şekilde tartışılmıştır.

7.1. Homoloji Modelleme

Bu çalışmada homoloji modellemeden faydalanılarak aynı enzimatik aktiviteye sahip rekombinant PON1 varyantı (insan serum paraoksonaz ile %83, 66 benzer) olan rePON1-G2E6'dan %100 insan serum PON1 protein yapısı ve (M/L) 55, (Q/R) 192 polimorfik yapıları elde edildi (138). Şekil 26'da homoloji modelleme aracı olan *MODELLER* ile üretilen normal ve polimorfik yapılar ve deneysel olarak elde edilen rePON1-G2E6 varyantı *Chimera* yazılımı ile “matchmaker” aracı kullanılarak hizalandırıldı. Hizalandırma sonucu PON1 normal yapı ile 0, 133 RMSD, PON1 (M/L) 55 ile 0, 155 RMSD ve PON1 (Q/R) 192 ile 0, 141 RMSD değerleri ölçüldü. Çok düşük RMSD değerleri, üretilen yapının deneysel G2E6 varyantı ile çok yüksek yapısal benzerliğe sahip olduğunu göstermektedir. 0'a yakın değer olması anlamlılığı oldukça artırmaktadır (140). En fazla sapma, PON1 enziminin katalitik bölgeye yakın L1 düğüm bölgesinde meydana geldi. Proteinin bu bölgesinde düğüm çok esnek bir yapıda olduğu için deneysel olarak elde edilmiş rePON1-G2E6 varyantında gösterilemeyerek kayıp residü olarak kalmıştır (141). *MODELLER* aracı %100 insan serum paraoksonaz proteini ve polimorfik yapılarını üretmekle kalmayıp bu kayıp residüleri de tamamlayarak büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca tablo 5'te de gösterildiği gibi %95'in üstünde “Ramachandran uyumu” değerleri üretilen yapıların yapısal kalitesinin de üst düzeyde olduğunu göstermektedir.

MODELLER en sık kullanılan, en güvenilir ve tam otomatize çalışan karşılaştırmalı homoloji modelleme programlarından biridir. Diğer homoloji modelleme yazılımlarına göre hızlı olması onu tüm genomun modellenmesi çalışmaları için kullanışlı hale getirmiştir. Bu avantajlarına rağmen çeşitli çakışma ya da kötü yan grup dizilimleri gösterebilmesi dezavantaj oluşturmaktadır (142).

Genetik, hücre ve moleküler biyoloji çalışmalarında protein yapıları ortaya çıkarmak için deneysel yöntemler uygulanmaktadır. Ancak, bu proteinlerin atomik yapıları ile ilgili bilgi eksikliği nedeniyle moleküler fonksiyon ve mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamaktadır. Biyomolekülleri atomik çözünürlükte elde etmeyi sağlayan güncel metodlar (X-ışını kristalografisi ve NMR spektroskopisi) fizyolojik koşullarda yüksek konsantrasyonda saf proteinlerin hazırlanmasına gereksinim duymaktadır. NMR spektroskopisi en fazla 15 kDa büyüklükteki proteinler için uygulanabilmektedir. Ancak biyolojik öneme sahip birçok protein daha büyük yapıya sahiptir. Homoloji modelleme ile farklı polimorfik ve mutasyona sahip proteinlerin yapıları ortaya çıkarılabilmektedir (143).

7.2. Moleküler Dinamik Simülasyon

PON1 enzimi ve polimorfik yapılarının homoloji modellemeleri oluşturulduktan sonra moleküler dinamik simülasyonları yapıldı. Paraoksonaz enzimin normal, M/L 55 ve Q/R 192 polimorfik yapıları üzerinde her biri için 10 ns'lik moleküler dinamik simülasyonlar gerçekleştirildi. Bu simülasyonlar ile proteine sistem içinde kendine özgü dinamik karakteri kazandırılarak konformasyonel değişiklikleri incelendi ve belli zaman aralıklarındaki protein konformasyonları üzerinde kendi substratları ve lipid düşürücü ilaçlar ile *moleküler docking* işlemleri gerçekleştirildi.

Bu çalışmada moleküler dinamik simülasyonda sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerlerinin ayarlanması için Parinello-Rahman metodu kullanıldı. Sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerleri tablo 7'da gösterilmişti. Tablo 7'da sıcaklığın ortalama 300 K⁰ (25 C⁰) ve basıncın 1 bar seviyelerinde olması simülasyonun laboratuvar koşullarına uygundur. Moleküler dinamik simülasyonun güvenilirlik ölçütlerinden birisi sistemin

yoğunluk değeridir. İçerisinde su, iyonlar ve proteinin yer aldığı bir sistemin yoğunluğu laboratuvar şartlarına uygun olarak 1000 kg/m^3 değerine yakın olması gerekmektedir (144). Yaptığımız çalışmada da her üç protein yapının yer aldığı sistemin yoğunluğu tablo 7’de gösterildiği gibi laboratuvar koşullarına çok yakındı. Sistemler arasındaki %1’in altındaki yoğunluk farklarının ise sistemler içerisindeki farklı sayıda ve türdeki atom sayıları ile ilişkili olabileceği öngörüldü (tablo 6). Bunun yanında sistemler arasındaki küçük sıcaklık ve basınç farklılıklarının da yoğunluk üzerine etkilidir (144).

Şekil 33’de 10 ns’lik periyod boyunca polimorfik yapılardaki her bir amino asidin konumsal değişimleri gösterilmiştir. Şekilde 70-80 aralığındaki amino asitler oldukça esnek olmalarının yanında enzimin aktif bölgesine çok yakın konumlanmışlardır. Bu durum enzim substrat etkileşimlerinde bu bölgenin konumunun etkinliğinin var olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Nitekim Xin Hu ve arkadaşlarının (21) paraoksonaz enzimi üzerinde yaptığı detaylı araştırmada bu bölgenin substrat seçici bir karaktere sahip olabileceğini ve özellikle 71. tirozin rezidüsünün enzim substrat komplekslerinde kapak vasifesi görebileceğini önermiştir.

Şekil 34’de insan PON1’e ait farklı polimorfik yapılarda her bir rezidünün konumsal değişimi B-faktörü değerine göre gösterilmiştir. B-faktörü değerinin yüksek olması proteininin o bölgesinin daha esnek bir yapıya sahip olduğunu ifade etmektedir. PON1-Normal yapıda L1 bölgesindeki 72-80 aralığındaki rezidülerde hareketlilik en fazla gözlenmişken polimorfik yapılarda nispeten daha az hareketlilik gözlenmiştir. Genel olarak simülasyon boyunca Şekil 33 ile uyumlu olarak en fazla hareketlilik L1 ve H1 bölgelerinde gerçekleşmiştir.

Molekül içi ve moleküller arası etkileşimleri tanımlamak için uygun bir enerji fonksiyonu seçimi, başarılı bir moleküler dinamik simülasyon için kritik öneme sahiptir. Enerji fonksiyonları genellikle çok fazla parametrik terimden meydana gelmektedir. Bu parametreler, esas olarak küçük moleküller ya da fragmentlerin deneysel ve kuantum mekanik çalışmaları ile elde edilir. Parametre ayarları ile ilişkili işlev grupları kuvvet alanı (force field) terimi ile ifade edilmiştir (145). Moleküler dinamik simülasyonlar için hayati öneme sahip kuvvet alanı parametreleri günümüzde kuantum mekanik

hesaplamaların yardımıyla daha yüksek doğrulukta çalışmakta ve geliştirilmeye devam etmektedir. AMBER (Enerji sadeleştirme Destekli Model Oluşturma) California Üniversitesi'nden, San Francisco'da Peter Kollman grubu tarafından geliştirilmiş biyomoleküllerin moleküler dinamik simülasyonları için oluşturulmuş kuvvet alanlarının bir ailesidir. AMBER ailesine ait çeşitli kuvvet alanlarının deneysel verilerle korelasyonu Hornak ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (146). Yapılan çalışmada deneysel NMR parametreleri ile ff99SB kuvvet alanı ile oluşturulan parametreler arasında lizozimde 0, 83, ubikitinde ise 0, 95 ile yüksek korelasyon gösterilmiştir (146).

Paraoksonazın polimorfik yapılarının moleküler dinamik simülasyonunda AMBER ailesine ait ff99SB-ILDN kuvvet alanı, yüksek hassasiyete sahip olduğu için tercih edildi. Günümüzde AMBER ailesine ait ff99SB-ILDN ve yaygın bir moleküler dinamik simülasyon ve analiz paketi olan CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) programına ait CHARMM22 kuvvet alanı en güvenilir kuvvet alanlarıdır (147).

7.3. Moleküler Docking

PON1'in farklı polimorfik yapılarının ilaçlar ve kendi doğal substratları ile olan afinitesinin tayininde en yaygın kullanıma sahip Autodock programı kullanıldı. PON1'in çeşitli substratları ile etkileşimleri docking metodu ile derinlemesine incelenmişken lipid düşürücü ilaçlar ile olan afinitesi ya da etkileşimine dair herhangi bir docking çalışması literatürde yer almamaktadır. Xin Hu ve arkadaşları (21) *moleküler docking*, MD simülasyon yöntemleri ve serbest enerji hesaplama metotlarından faydalananarak PON1 enzimi ve ester, lakton ve fosfotrioester gibi çeşitli substratları ile olan etkileşimlerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada tirozin 71 rezidüsünün substratların bağlanmasında önemli role sahip olabileceğini göstermiştir ayrıca substratın tanımlanmasını kolaylaştıran bir kapı işlevine sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmada da 71. Rezidü olan tirozin şekil 37-38'de da gösterildiği gibi kapı görevine sahip olduğu ancak substratlarla etkileşimde direkt (şekil 37-38) katalitik etkisinin olmadığı gözlemlendi. Ben-David ve arkadaşları (138) yaptıkları çalışmada, pH 4, 5'da elde edilmiş yapıda (PDB:1V04) 71. rezidü katalitik bölgeye

yakınken; pH 6, 5’da elde edilen yapıda (PDB:3SRE, 3SRG) 71. rezidünün aktif bölgenin dışında kaldığını göstermişlerdir. Yani farklı pH’da 71. rezidünün açık ya da kapalı konformasyon gösterdiği gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada 3SRE kaynaklı (nötr pH’da çalışan) yapılar kullandığımız için 71. rezidünün çoğunlukla açık konformasyon göstermiş olabilir. Şekil 36’da görüldüğü gibi çalıştığımız 19 substratın PON1 normal yapı üzerindeki tüm konformasyonlarında Y71 açık konformasyon göstermiştir. Şekil 37’de PON1 M/L 55 Y71 rezidüsü tamamen açık konformasyon göstermişken Şekil 38’de PON1 L/M 192 rezidüsü tamamen kapalı konformasyon göstermiştir. 55. Rezidü proteinin aktif bölgesine fazla yakın olmamasına karşın 192. rezidü aktif merkeze daha yakındır. Bu nedenle 192. rezidünün, aktif merkez ve L1 düğümünün konformasyonel yapısını etkileyebileceği ve Y71 rezidüsünün kapalı konformasyon sergilemesinde role sahip olabileceği düşünüldü. Yeung ve arkadaşlarının (148) PON1’in yapı ve aktivitesini incelediği çalışmalarında kalsiyumun katalitik aktivite hayati öneme sahip bir kofaktör olduğunu göstermişlerdir. Nitekim PON1’in farklı polimorfik yapıları üzerinde substratlarının *moleküler docking* yöntemiyle elde edilmiş konformasyonlarında şekil 36, 37 ve 38’de kalsiyumun lakton yapıdaki oksijeni kendine doğru çekerek enzim-substrat kompleksi oluşumunda önemli etkiye sahip olduğu görülmektedir. Q/R 192 polimorfik yapı daha daralmış bir aktif merkeze sahip olmasının yanında substratlarının oksijenleri katalitik kalsiyuma diğer polimorfik yapılara göre daha yakın yer aldı. Bunun sonucu olarak substratlarının bağlanma afinitelerinin daha yüksek olabileceği düşünüldü. Substratların ortalama afinite değerlerine baktığımızda Q/R 192 PON1’e bağlanma afiniteleri diğer yapılara göre daha yüksek görüldüğü şekil 39’da gösterilmiştir.

Paraoksonaz substratları deneysel olarak en geniş anlamda Draganov ve arkadaşları (139) tarafından 2005’te PON1, PON2 ve PON3 enzimleri ile yaptıkları çalışmada ele alınmıştır. Orgonafosfat, arilester ve lakton yapıdaki moleküllerin afiniteleri enzim ünitesi cinsinden göstermişlerdir. Draganov ve arkadaşlarının (139) çalışmasındaki spesifik aktivite değerleri ile bizim çalışmada bulduğumuz afinite değerleri arasındaki korelasyon bakıldı. 180 U/mg’den daha düşük spesifik aktiviteye sahip olan substratların spesifik aktivite değerleri ile bu çalışmada bulunan afinite değerleri arasında daha anlamlı korelasyon gözlemlendi. Buna göre 14 tane substratta

PON1 normal ile -0, 92, M/L 55 polimorfik yapı ile -0, 71 ve Q/R 192 ile -0, 86 sperarman korelasyon değerleri belirlendi. Genel olarak lakton yapıdaki substratlar ile yüksek korelasyon ortaya çıktı. Bir organofosfat bileşiği olan paraokson, deneysel çalışmada 1, 94 U/mg değeri ile en düşük afinite değerine sahip olması ile bizim yaptığımız *moleküler docking* çalışmasındaki ortalama -2, 79 Kcal/mol afinite değeri ile en düşük değere sahip olması bakımından uygunluk göstermektedir. Polimorfik yapılarda da paraokson afinite değerleri en düşük ilk üç değerler arasında yer almaktadır. 2-kumarin ve dihidrokumarin deneysel çalışmada en yüksek afiniteye sahip sırayla 4. ve 5. moleküllerdir. PON1 normal yapıda 2-kumarin -4, 23 Kcal/mol ile en yüksek, M/L 55 ve Q/R 192 polimorfik yapılarda dihidrokumarin sırayla -4, 79 Kcal/mol ve -5, 20 Kcal/mol ile en yüksek afinite değerine sahip molekül olarak bulundu. Yapılan moleküler docking çalışmasında paraokson, draganov ve arkadaşlarının (139) deneysel çalışması ile uyumlu görünürken 2-kumarin ve dihidrokumarinin bu yönüyle uygunluk göstermedi. Arilester yapı olan fenilasetat deneysel olarak yüksek afinite değerine sahipken bizim yaptığımız çalışmada docking sonucuna göre ortalamanın altında afinite değerine sahip olduğu görüldü. Ayrıca 175 U/mg değerine kadar anlamlı düzeyde korelasyon değerleri ortaya çıkarken bu değerlerin üzerindeki karşılaştırmalarda korelasyon gözlenmedi. Bu durum docking metodlarının güvenilirliği açısından günümüzde genel bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar docking metodları ile deneysel çalışmalar arasındaki korelasyonun 0, 5 düzeylerinde olduğunu göstermektedir (149). Buna karşın son yıllarda bilgisayar gücünün artışı ve bununla beraber *moleküler docking* işlemleri MD hesaplamalar ile beraber yürütülmeye başlamıştır. MD simülasyonla beraber yapılan *moleküler docking* işlemlerinde deneysel verilerle çok daha yüksek korelasyon değerlerine ulaşılmıştır(150). Bizde yaptığımız çalışmada MD simülasyon ve *Moleküler docking* metodunu birlikte kullanarak 14 substratta -0, 92'lere varan korelasyon değerlerine ulaştık. Korelasyonun tüm substratlarda özellikle fenil asetta olmaması ve özellikle lakton yapılarda yüksek olması metodun her substrat çeşidi için aynı güvenilirliğe sahip olmadığını bize gösterdi.

7.4. Lipid Düşürücü İlaçlar ve Paraoksonaz

Lipid düşürücü ilaçların PON1'in kendisi ve polimorfik yapılarına olan afinitesi şekil 46'da gösterilmişti. İlaçların paraoksonaz yapıları arasındaki karşılaştırılması yapıldığında genel olarak Q/R 192 polimorfizminde ilaçların afinitelerinin diğer paraoksonaz yapılardan daha düşük olduğu gözlemlendi. Aktif bölgenin kapağı konumunda bulunan Y71 rezidüsü, paraoksonazın diğer yapılarında açık konumdayken Q/R 192 polimorfik yapıda kapalı konumdadır. Bu durum da ilaçların afinitesinin daha düşük çıkmasına sebep olmuş olabilir. Diğer ilaçların aksine atorvastatin, probukol, orlistat, rosuvastatin ve betasterol, Q/R 192 polimorfik yapıda pozitif ΔG göstermiştir. Paraoksonazın diğer yapılarında da atorvastatin, probukol, orlistat, rosuvastatin ve pravastatinin PON1'e afinitelerinin düşük olduğu tespit edildi. Dolayısıyla bu ilaçlar paraoksonaz aktivitesi üzerine pek etkili olmayabilir. Bu da yüksek afiniteli ilaçların paraoksonaz aktivitesini azaltabileceğini, herhangi bir afiniteye sahip olmayan veya düşük afiniteli ilaçların ise paraoksonaz aktivitesini çok etkileyemeyebileceği sonucunu çıkarmaktadır.

Bu çalışmada atorvastatin paraoksonaz aktivitesine etki edemeyeceği gözlenirken atorvastatinin paraoksonazı düşürdüğü ya da etkilemediğine ait bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Hatta birçok çalışmada PON-1 aktivitenini arttırdığı belirtilmiştir. Kural ve ark. (37) dislipidemik hastalarla yaptığı çalışmada atorvastatinin serum paraoksonaz aktivitesini ve HDL düzeyini anlamlı derecede arttırdığını bulmuşlardır. Abdin ve ark. (38) Mısırlı tip 2 diyabetli hastalarda atorvastatin tedavisinin paraoksonaz aktivitesini artırdığını gözlemlemişler ve paraoksonazın diyabetin ve diyabetik nöfropatinin tedavisinde yeni bir seçenek olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine Harangi ve ark. (151) atorvastatin tedavisinin PON1 aktivitesini artırdığını gözlemişlerdir. Oranje ve ark. (152) tip iki diyabetik hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada atorvastatinin LDL oksidaysonunu düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmalar atorvastatinin aterosklerotik hastalıkları önlemede önemli etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ancak Bergheanu ve ark. (153) kardiyovasküler hastalığı olan erkeklerde rosuvastatin ve atorvastatinin PON1 aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlar ve her iki ilacın da PON1 aktivitesini artırdığını, fakat rosuvastatinin atorvastatinden farklı

olarak doz bağımlı PON1 aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Bizim çalışmada ise rosuvastatinin PON1'a karşı afinitesini zayıf olduğu yani etki etmeyebileceği gözlemlendi. Rosuvastatinin PON1 aktivitesini düşürdüğüne dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma da kullanılan diğer bir ilaç olan orlistat PON1 normal yapıda çok az afinite gösterirken polimorfik yapılarda afinite göstermedi. Audikovszky ve ark. (86) yaptıkları çalışmada orlistatin paraoksonaz aktivitesini artırdığını göstermiştir.

Statinlerden simvastatin, lovastatin ve mevastatinin en yüksek afinite değerlerine sahip ilaçlar olarak bulundu. Bu ilaçların lakton yapılarına sahip olması bu sonucun oluşmasının muhtemel nedenidir. Bu benzerlik sayesinde yarışmalı inhibisyonla paraoksonaz aktivitelerinin azalması beklenen sonuçtur. Çalışmamızla uyumlu olarak Billecke ve ark. (44) yaptıkları çalışmada bu üç statin grubu ilacın PON1'e afinite gösterdiğini ve PON1 ile metabolize edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca Gouédard ve ark (59) pravastatin, fluvastatin ve simvastatin gibi statinlerin PON1 aktivitesini azalttığını ifade etmişlerdir. Diğer taraftan Tomas ve ark. (154) simvastatinin paraoksonaz aktivitesini artırdığını ve bu nedenle aktioksidan özelliğe sahip olabileceğini belirtmişlerdir.

Tüm ilaç grupları içerisinde en yüksek afinite, PON1-normal yapıda brassikasterolde, M/L 55 polimorfik yapıda stigmasterol, Q/R 192 polimorfik yapıda ise sibutraminde bulundu. Dolayısıyla bu ilaçlar PON1 aktivitesini düşürmede etili olabilirler. Fitosteroller fibrat türü ilaçlardan farklı olarak PON1 ve M/L 55 polimorfik yapıda yüksek afinite gösterdi. Q/R 192 polimorfik yapıda ise Y71 rezidüsü ve aktif merkezin dar yapısı ile beraber fitosterollerin nispeten büyük moleküller olması düşük aktivite göstermelerine sebep olmuş olabilir. Kimyasal yapı olarak kolesterole benzeyen fitosterollerin paraoksonaz enzimi aktivitesine etkileri yönünde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak kolesterol ile PON1 ilişkisini gösteren çelişkili çalışmalar ve paraoksonazın yer aldığı HDL ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızla uyumlu olarak Yi ve ark. (155) yaptıkları çalışmada yüksek kolesterol diyeti uygulanan farelerde serum PON1 aktivitesinin azaldığını göstermişler. Diğer taraftan Kim ve arkadaşları (156) yaptıkları çalışmada kolesterolün PON1 aktivitesini artırdığını bulmuşlardır. Sutherland ve ark. (157) plazma fitosterol seviyesi ve plazma HDL

kolesterol seviyesinin pozitif korelasyona sahip olduğunu, Zak ve ark. (158) da fitosterol tüketiminin HDL'deki kolesterol seviyesini artırdığını göstermiştir. Ayrıca fitosterollerden zengin besinlerle PON1 aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Fitosterollerden zengin argan yağı ve serum PON1 aktivitesi üzerine yapılan çalışmada PON1 aktivitesinin arttığı Cherki ve ark. (159)d tarafından gösterilmiştir.

Klofibrat, gemfibrozil, ciprofibrat ve bezafibrat düşük afinite değerleri gösterdi. Fenofibrat ise normal ve M/L 55 yapıda ortalamanın üzerinde, Q/R 192 polimorfik yapıda ise ortalamanın altında afinite gösterdi. Yeşilbursa ve ark. (160) fenofibratın PON1 aktivitesini artırdığını gözlemişlerdir. Bu sonuç ortalamanın üzerinde afinite değerlerine sahip normal ve M/L 55 yapıda bizim çalışmamız ile çelişmektedir. Macan ve ark. (161) gemfibrozilin PON1 aktivitesini anlamlı düzeyde düşürdüğünü bulmuşlardır. Paragh ve ark. (162) ciprofibratın, Durrington ve ark. (163) ise bezafibratın PON1 aktivitesini artırdığını belirtmişlerdir. Dullaart ve ark. (164) Tip 2 diyabetli hastalara bezafibrat ve simvastatin beraber verildiğinde HDL seviyesinin arttığını fakat PON1 aktivitesinin artmadığını ifade etmişlerdir. Yukarıda bahsedildiği gibi fibrat türü ilaçların genelde PON1 aktivitesini arttırması, bizim çalışmada bulunan düşük afinite değerleri ile uyumluluk göstermektedir.

Probukol Q/R 192 polimorfik yapıda afinite göstermezken normal ve M/L 55 polimorfik yapıda ortalamanın altında değerlere sahipti. Yi ve ark. (155) yaptıkları çalışmada yüksek kolesterol diyeti uygulanan farelerde probukol tedavisi ile PON1 aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Benzer şekilde Noto ve ark. (165) da probukol tedavisi ile PON1 aktivitesi/HDL-C düzeyinin anlamlı düzeyde arttığını göstermişlerdir. Ayrıca literatürde probukolun PON1 aktivitesini düşürdüğüne dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tüm bu sonuçlar da probukolun PON1'e düşük afinite göstermesi ile PON1 aktivitesi üzerine olumsuz etki etmeyeceği görüşümüzü desteklemektedir.

Ezetimib PON1'e afinitesi yüksek olan ilaçlar grupta yer aldı. Niasinin ise afinitesi düşük bulundu. Tang ve ark. (85) yaptığı çalışmada niasinin paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesine etki etmediğini fakat ezetimibin paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesini düşürdüğünü ifade etmişlerdir. Ezetimibin simvastatin ile beraber

uygulandığı bir çalışmada HDL düzeyinin arttırdığı fakat PON1 aktivitesinin anlamlı düzeyde artmadığı rapor edilmiştir (164). Bu sonuçlar yüksek afinite değerine sahip ezetimibin PON1 aktivitesi üzerine olumsuz etki edebileceği görüşümüzü desteklemektedir.

Sibutramin Q/R 192 polimorfik yapıda en yüksek afiniteye sahip bileşik olarak ölçüldü. Sibutraminin direk PON1 aktivitesi üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla beraber, James ve ark. (166) sibutraminin plazma HDL seviyesini anlamlı düzeyde artırdığını gözlemişlerdir. Sibutraminin direk PON1 üzerine etkisini gösteren çalışmaya rastlanmadığından deneysel çalışmalar ile bir kıyaslama yapılamadı.

Bu çalışmada bulunan bu *in siliko* sonuçların deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. *In siliko* moleküler docking yöntemi her ne kadar zaman ve paradan tasarruf sağlamışsa da güvenilirliği hala tartışma konusudur. Bu çalışmada kullanılan kullanılan Autodock 4 yazılımı ile PON1'in kendi substratları ile afinitesi ve diğer deneysel çalışmalar arasındaki korelasyon değerlendirdiğinde, Autodock yazılımının lakton yapılarda iyi çalışmasına karşın fenilasetat gibi bileşiklerde ve çok yüksek afiniteli bileşiklerde hata oranının yükseldiği gözlemlendi. Autodock, en yaygın kullanıma sahip programlardan biri olmasına karşın CDOCKER gibi daha güvenilir yazılımlar gelecekte tercih edilebilir. Günümüzde moleküler dinamik çalışmalarıyla beraber yürütülerek daha güvenilir sonuçlara ulaşılabilmektedir.

Lipid düşürücü ilaçların PON1 enzimine afinitelerinin *in siliko* olarak değerlendirildiği bu çalışmada en yüksek afiniteye sahip olan ilaçlar PON1 normal yapıda brassikasterol, Q/R 192 polimorfik yapıda sibutramin ve M/L 55 polimorfik yapıda stigmasterol iken; en düşük afiniteye sahip olan ilaçlar PON1 normal yapıda orlistat, Q/R 192 polimorfik yapıda atorvastatin ve M/L 55 polimorfik yapıda orlistat olarak ölçüldü. Yüksek afiniteye sahip ilaçlar HDL yapısında yer alan ve önemli bir antioksidan olan paraoksonaz enziminin aktivitesini düşürebilir. Bu nedenle bu ilaçların kullanılmasında HDL metabolizmasını etkileyebileceği göz önüne alınmalıdır.

8. KAYNAKLAR

1. Pahan K (2006). Lipid-lowering drugs. *Cell Mol Life Sci* 63: 1165-1178.
2. Wang R, Lu Y, Wang S (2003). Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J Med Chem* 46: 2287-2303.
3. Aldridge W (1953). The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organo-phosphorus compounds. *Biochem J* 53: 62.
4. Gupta N, Gill K, Singh S (2009). Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res* 130: 361-368.
5. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN (1996). The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33: 498-507.
6. Draganov DI, La Du BN (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: 78-88.
7. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, et al. (2005). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 38: 153-163.
8. Li HL, Liu DP, Liang CC (2003). Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med (Berl)* 81: 766-779.
9. Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K (2011). The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochem Med (Zagreb)* 21: 122-130.
10. Perla-Kajan J, Jakubowski H (2012). Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids* 43: 1405-1417.
11. Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M (2004). Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Bioph Res Co* 318: 680-683.
12. Mazur A (1946). An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem* 164: 271-289.
13. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 473-480.
14. Khersonsky O, Tawfik DS (2006). The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem* 281: 7649-7656.
15. Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, et al. (1991). Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 30: 10141-10149.

16. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, et al. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11: 412-419.
17. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, et al. (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 119-120: 379-388.
18. Schrader C, Rimbach G (2011). Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Curr Med Chem* 18: 5624-5643.
19. Sanan TT, Muthukrishnan S, Beck JM, Tao P, Hayes CJ, et al. (2010). Computational modeling of human paraoxonase 1: preparation of protein models, binding studies, and mechanistic insights. *J Phys Org Chem* 23: 357-369.
20. Aharoni A, Gaidukov L, Khersonsky O, Mc QGS, Roodveldt C, et al. (2005). The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nat Genet* 37: 73-76.
21. Hu X, Jiang X, Lenz DE, Cerasoli DM, Wallqvist A (2009). In silico analyses of substrate interactions with human serum paraoxonase 1. *Proteins* 75: 486-498.
22. Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, Crabb JW (1991). Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry* 30: 10133-10140.
23. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE (2009). Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol Appl Pharmacol* 235: 1-9.
24. Saadat M (2012). Paraoxonase 1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 36: e101-e103.
25. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, et al. (2005). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Bio Med* 38: 153-163.
26. Sema UYSAL SA, Rukiye HASGÜL, Ferah ARMUTCU, M. Ramazan YİĞİTOĞLU (2011). Çok Yönlü Bir Enzim: Paraoksonaz. *Yeni Tıp Dergisi* 28: 136-141.
27. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN (1993). Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 52: 598-608.
28. Macharia M, Hassan MS, Blackhurst D, Erasmus RT, Matsha TE (2012). The growing importance of PON1 in cardiovascular health: a review. *J Cardiovasc Med* 13: 443-453.
29. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A (2009). Adverse effects of statins - mechanisms and consequences. *Curr Drug Saf* 4: 209-228.

30. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 29: 1346-1348.
31. Asztalos BF, Horvath KV, McNamara JR, Roheim PS, Rubinstein JJ, et al. (2002). Comparing the effects of five different statins on the HDL subpopulation profiles of coronary heart disease patients. *Atherosclerosis* 164: 361-369.
32. Prueksaritanont T, Subramanian R, Fang X, Ma B, Qiu Y, et al. (2002). Glucuronidation of statins in animals and humans: a novel mechanism of statin lactonization. *Drug Metab Dispos* 30: 505-512.
33. Güleç S (2007). Efficacy of statins. *Arch Turk Soc Cardiol* 35: 8-14.
34. Jie Jack Li DSJ, Drago R. Sliskovic, Bruce D. Roth (2004). Chapter 9. Atorvastatin Calcium (Lipitor®). 113-122 p.
35. Drugs.com (2011) Atorvastatin Calcium.
36. Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, Sprecher DL, Schwartz SL, et al. (1995). Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 678-682.
37. Kural BV, Orem C, Uydu HA, Alver A, Orem A (2004). The effects of lipid-lowering therapy on paraoxonase activities and their relationships with the oxidant-antioxidant system in patients with dyslipidemia. *Coronary Artery Dis* 15: 277-283.
38. Abdin AA, Hassanien MA, Ibrahim EA, ABOU EL-NOEMAN SE-DA (2010). Modulating effect of atorvastatin on paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic Egyptian patients with or without nephropathy. *J Diabetes Complicat* 24: 325-333.
39. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A (2002). Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol J Pharmacol* 54: 661-671.
40. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A (2004). Effect of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase inhibitors (statins) on tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 121-127.
41. Alarcon J, Aguila S, Arancibia-Avila P, Fuentes O, Zamorano-Ponce E, et al. (2003). Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. *Z Naturforsch C* 58: 62-64.
42. Gunde-Cimerman N, Cimerman A (1995). *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Exp Mycol* 19: 1-6.

43. Liu J, Zhang J, Shi Y, Grimsgaard S, Alraek T, et al. (2006). Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*) for primary hyperlipidemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Chin Med* 1: 4.
44. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, et al. (2000). Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 28: 1335-1342.
45. Mukhtar RY, Reid J, Reckless JP (2005). Pitavastatin. *Int J Clin Pract* 59: 239-252.
46. Ota K, Suehiro T, Arii K, Ikeda Y, Kumon Y, et al. (2005). Effect of pitavastatin on transactivation of human serum paraoxonase 1 gene. *Metabolism* 54: 142-150.
47. Yoshino G, Kazumi T, Kasama T, Iwatani I, Iwai M, et al. (1986). Effect of CS-514, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on lipoprotein and apolipoprotein in plasma of hypercholesterolemic diabetics. *Diabetes Res Clin Pract* 2: 179-181.
48. Ridker PM (2003). Rosuvastatin in the primary prevention of cardiovascular disease among patients with low levels of low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein: rationale and design of the JUPITER trial. *Circulation* 108: 2292-2297.
49. Capuzzi DM, Morgan JM, Weiss RJ, Chitra RR, Hutchinson HG, et al. (2003). Beneficial effects of rosuvastatin alone and in combination with extended-release niacin in patients with a combined hyperlipidemia and low high-density lipoprotein cholesterol levels. *Am J Cardiol* 91: 1304-1310.
50. Istvan ES (2002). Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* 144: S27-32.
51. Schachter M (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 19(1):117-25.
52. Bergheanu SC, Van Tol A, Dallinga-Thie GM, Liem A, Dunselman PH, et al. (2007). Effect of rosuvastatin versus atorvastatin treatment on paraoxonase-1 activity in men with established cardiovascular disease and a low HDL-cholesterol. *Curr Med Res Opin* 23: 2235-2240.
53. (1992). Pravastatin, simvastatin, and lovastatin for lowering serum cholesterol concentrations. *Med Lett Drugs Ther* 34: 57-58.
54. Naderi S, Foody JM (2012). Ezetimibe and simvastatin for the prevention of cardiovascular events in predialysis chronic kidney disease patients: a review. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5: 165-169.
55. Pedersen TR (2010). Pleiotropic effects of statins: evidence against benefits beyond LDL-cholesterol lowering. *Am J Cardiovasc Drugs* 10 Suppl 1: 10-17.

56. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y (2003). Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 63: 945-956.
57. Harangi M, Seres I, Harangi J, Paragh G (2009). Benefits and difficulties in measuring HDL subfractions and human paraoxonase-1 activity during statin treatment. *Cardiovasc Drugs Ther* 23: 501-510.
58. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS (1998). Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 138: 271-280.
59. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y (2003). Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 63: 945-956.
60. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, et al. (2000). Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscl Thromb Vas* 20: 2113-2119.
61. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, et al. (1998). Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98: 2088-2093.
62. Lazarow PB, Shio H, Leroy-Houyet MA (1982). Specificity in the action of hypolipidemic drugs: increase of peroxisomal beta-oxidation largely dissociated from hepatomegaly and peroxisome proliferation in the rat. *J Lipid Res* 23: 317-326.
63. Rao MS, Subbarao V, Reddy JK (1986). Peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis: histochemical analysis of ciprofibrate-induced preneoplastic and neoplastic lesions for gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J Natl Cancer Inst* 77: 951-956.
64. Yüksel H (2001). Fibratlar Ne Zaman Kullanılmalı? *Türk Kardiyol Dern Arş* 29: 715-722.
65. (2000). Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease: the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. *Circulation* 102: 21-27.
66. Bruckert E, Labreuche J, Deplanque D, Touboul PJ, Amarenco P (2011). Fibrates effect on cardiovascular risk is greater in patients with high triglyceride levels or atherogenic dyslipidemia profile: a systematic review and meta-analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 57: 267-272.
67. Bruckert E, Dejager S, Chapman MJ (1993). Ciprofibrate therapy normalises the atherogenic low-density lipoprotein subspecies profile in combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 100: 91-102.

68. Grundy SM, Ahrens EH, Jr., Salen G, Schreiberman PH, Nestel PJ (1972). Mechanisms of action of clofibrate on cholesterol metabolism in patients with hyperlipidemia. *J Lipid Res* 13: 531-551.
69. Balfour JA, McTavish D, Heel RC (1990). Fenofibrate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs* 40: 260-290.
70. Roy A, Pahan K (2009). Gemfibrozil, stretching arms beyond lipid lowering. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 31: 339-351.
71. Betteridge DJ, Higgins MJ, Galton DJ (1976). Properties of sterol biosynthesis in human leukocytes: effects of gemfibrozil. *Proc R Soc Med* 69 Suppl 2: 104-106.
72. Macan M, Vrkic N, Vrdoljak AL, Radic B, Bradamante V (2010). Effects of high sucrose diet, gemfibrozil, and their combination on plasma paraoxonase 1 activity and lipid levels in rats. *Acta Biochim Pol* 57: 321-326.
73. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, et al. (2002). Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1329-1333.
74. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovacs P, Kakuk G, et al. (2001). Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 27: 604-610.
75. Paragh G, Seres I, Harangi M, Balogh Z, Illyes L, et al. (2003). The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes & Metabolism* 29: 613-618.
76. Turay J, Grniakova V, Valka J (2000). Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, C-III and E in subjects with combined familial hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. *Drugs Exp Clin Res* 26: 83-88.
77. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, et al. (1998). Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 138: 217-225.
78. Toshiro Akihisa WK, Toshitake Tamura (1991). Naturally occurring sterols and related compounds from plants; Patterson GW, editor: American Oil Chemists' Society.
79. Laraki L, Pelletier X, Mourot J, Debry G (1993). Effects of dietary phytosterols on liver lipids and lipid metabolism enzymes. *Ann Nutr Metab* 37: 129-133.
80. Van Heek M, France CF, Compton DS, McLeod RL, Yumibe NP, et al. (1997). In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 157-163.

81. Wai Hong Tang TV, Stanley Hazen, Eric Stanek, Edward Hulten, Allen Taylor, Cleveland Clinic (2012). Effect of niacin and ezetimibe on serum paraoxonase and arylesterase activities of HDL cholesterol JACC 59: 1497.
82. Mittendorfer B, Ostlund RE, Jr., Patterson BW, Klein S (2001). Orlistat inhibits dietary cholesterol absorption. *Obes Res* 9: 599-604.
83. A Y (2008). A Unique Antilipidemic Drug - Probucol. *J Atheroscler Thromb* 15: 304-305.
84. Payer J, Hainer V, Ondrejka P, Kajtor Z (2004). [Sibutramin in obesity treatment (multicenter, open, prospective 12-month-long study)]. *Vnitr Lek* 50: 825-829.
85. Tang WH, Villines T, Hazen S, Stanek E, Hulten E, et al. (2012). Effect of niacin and ezetimibe on serum paraoxonase and arylesterase activities of hdl cholesterol. *J Am Coll Cardiol* 59: E1497-E1497.
86. Audikovszky M, Pados G, Seres I, Harangi M, Fülöp P, et al. (2007). Orlistat increases serum paraoxonase activity in obese patients. *Nutr Metab Cardiovas* 17: 268-273.
87. Hong S-c, Zhao S-p, Wu Z-h (2006). Probucol up-regulates paraoxonase 1 expression in hepatocytes of hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharm* 47: 77-81.
88. Hou T, Xu X (2004). Recent development and application of virtual screening in drug discovery: an overview. *Curr Pharm Des* 10: 1011-1033.
89. Lyne PD (2002). Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov Today* 7: 1047-1055.
90. Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF, Jr., Brice MD, et al. (1977). The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. *Eur J Biochem* 80: 319-324.
91. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, et al. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242.
92. Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF, Jr., Brice MD, et al. (1978). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *Arch Biochem Biophys* 185: 584-591.
93. Cavasotto CN (2011). Homology models in docking and high-throughput docking. *Curr Top Med Chem* 11: 1528-1534.
94. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31: 3381-3385.
95. Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725-738.

96. Fiser A, Sali A (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* 374: 461-491.
97. Durrant JD, McCammon JA (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol* 9: 71.
98. McCammon JA, Gelin BR, Karplus M (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature* 267: 585-590.
99. Hansson T, Oostenbrink C, van Gunsteren W (2002). Molecular dynamics simulations. *Curr Opin Struct Biol* 12: 190-196.
100. Case DA, Cheatham TE, 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, et al. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 26: 1668-1688.
101. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, et al. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26: 1701-1718.
102. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, et al. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26: 1781-1802.
103. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, et al. (1983). Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comput Chem* 4: 187-217.
104. Makov G, Payne MC (1995). Periodic Boundary-Conditions in Ab-Initio Calculations. *Phys Rev B* 51: 4014-4022.
105. Krautler V, Van Gunsteren WF, Hunenberger PH (2001). A fast SHAKE: Algorithm to solve distance constraint equations for small molecules in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 22: 501-508.
106. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* 18: 1463-1472.
107. Chadi DJ (1994). Energy-Minimization Approach to the Atomic Geometry of Semiconductor Surfaces. *Surf Sci* 299: 311-318.
108. Payne MCT, M. P.; Allan, D. C.; Arias, T. A.; Joannopoulos, J. D. (1992). Iterative minimization techniques for ab initio total-energy calculations: molecular dynamics and conjugate gradients. *Rev Mod Phys* 64: 1045-1097.
109. D. van der Spoel EL, B. Hess, A. R. van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, K. A. Feenstra, R. van Drunen and H. J. C., Berendsen, H. J. (2010). Gromacs User Manual version 4.5.6.
110. Ponder JW, Case DA (2003). Force fields for protein simulations. *Adv Protein Chem* 66: 27-85.

111. Daura X, Mark AE, van Gunsteren WF (1998). Parametrization of aliphatic CH_n united atoms of GROMOS96 force field. *J Comput Chem* 19: 535-547.
112. Cino EA, Choy WY, Karttunen M (2012). Comparison of Secondary Structure Formation Using 10 Different Force Fields in Microsecond Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput* 8: 2725-2740.
113. Brown ID (2002). Topology and Chemistry. *Struct Chem* 13: 339-355.
114. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ (2006). Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins* 65: 15-26.
115. Brooijmans N, Kuntz ID (2003). Molecular recognition and docking algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32: 335-373.
116. Goodsell DS, Lauble H, Stout CD, Olson AJ (1993). Automated docking in crystallography: analysis of the substrates of aconitase. *Proteins* 17: 1-10.
117. Hart TN, Read RJ (1992). A multiple-start Monte Carlo docking method. *Proteins* 13: 206-222.
118. Di Nola A, Roccatano D, Berendsen HJ (1994). Molecular dynamics simulation of the docking of substrates to proteins. *Proteins* 19: 174-182.
119. Trosset JY, Scheraga HA (1998). Reaching the global minimum in docking simulations: a Monte Carlo energy minimization approach using Bezier splines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8011-8015.
120. Bohm HJ (1992). LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J Comput Aided Mol Des* 6: 593-606.
121. DeWitte RSS, E. I. (1996). SMOG: de novo design method based on simple, fast, and accurate free energy estimates. 1. Methodology and supporting evidence. *J Am Chem Soc* 118: 11733-11744.
122. Charifson PS, Corkery JJ, Murcko MA, Walters WP (1999). Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J Med Chem* 42: 5100-5109.
123. Wang R, Lai, L. & Wang, S. (2002). Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des* 16: 11-26.
124. Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem* 28: 1145-1152.
125. Trott O, Olson AJ (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31: 455-461.

126. Murphy KP (1999). Predicting Binding Energetics from Structure: Looking Beyond G. *Med Res Rev* 19: 333-339.
127. Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW (2002). A review of protein-small molecule docking methods. *J Comput Aided Mol Des* 16: 151-166.
128. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, et al. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30: 2785-2791.
129. Wolf LK (2009). New software and Websites for the Chemical Enterprise. *Chemical & Engineering News* 87: 31.
130. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605-1612.
131. <http://www.grid.org.tr/>.
132. Bolton EE, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH (2008). PubChem: integrated platform of small molecules and biological activities. *Annu Rep Comput Chem* 4: 217-241.
133. <http://www.rcsb.org/pdb/>.
134. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, et al. (2009). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66: 12-21.
135. <http://manual.gromacs.org/online/flow.html> (2013). GROMACS 4.6.1 Online Reference. Sweden: : The GROMACS development teams at the Royal Institute of Technology and Uppsala University.
136. Cino EA, Choy WY, Karttunen M (2012). Comparison of Secondary Structure Formation Using 10 Different Force Fields in Microsecond Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput* 8: 2725-2740.
137. Zielkiewicz J (2005). Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water. *J Chem Phys* 123.
138. Ben-David M, Elias M, Filippi JJ, Dunach E, Silman I, et al. (2012). Catalytic Versatility and Backups in Enzyme Active Sites: The Case of Serum Paraoxonase 1. *J Mol Biol* 418: 181-196.
139. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, et al. (2005). Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 46: 1239-1247.

140. Damm KL, Carlson HA (2006). Gaussian-weighted RMSD superposition of proteins: a structural comparison for flexible proteins and predicted protein structures. *Biophys J* 90: 4558.
141. Ben-David M, Elias M, Filippi JJ, Dunach E, Silman I, et al. (2012). Catalytic versatility and backups in enzyme active sites: the case of serum paraoxonase 1. *J Mol Biol* 418: 181-196.
142. Wallner B, Elofsson A (2005). All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs. *Protein Sci* 14: 1315-1327.
143. Ramachandran S, Dokholyan NV (2012). Homology Modeling: Generating Structural Models to Understand Protein Function and Mechanism. *Comput Model Biol Sys*: 97-116.
144. Levitt M, Sharon R (1988). Accurate simulation of protein dynamics in solution. *P Natl Acad Sci* 85: 7557-7561.
145. Adcock SA, McCammon JA (2006). Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem Rev* 106: 1589-1615.
146. Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, et al. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 65: 712-725.
147. Lindorff-Larsen K, Maragakis P, Piana S, Eastwood MP, Dror RO, et al. (2012). Systematic validation of protein force fields against experimental data. *PLoS One* 7: e32131.
148. Yeung DT, Josse D, Nicholson JD, Khanal A, McAndrew CW, et al. (2004). Structure/function analyses of human serum paraoxonase (HuPON1) mutants designed from a DFPase-like homology model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1702: 67-77.
149. Plewczynski D, Lazniewski M, von Grotthuss M, Rychlewski L, Ginalski K (2011). VoteDock: consensus docking method for prediction of protein-ligand interactions. *J Comput Chem* 32: 568-581.
150. Alonso H, Bliznyuk AA, Gready JE (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med Res Rev* 26: 531-568.
151. Harangi M, Seres I, Varga Z, Emri G, Szilvássy Z, et al. (2004). Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacol* 60: 685-691.
152. Oranje WA, Sels J-PJ, Rondas-Colbers GJ, Lemmens PJ, Wolffenbuttel BH (2001). Effect of atorvastatin on LDL oxidation and antioxidants in normocholesterolemic type 2 diabetic patients. *Clinica chimica acta* 311: 91-94.

153. Bergheanu S, Van Tol A, Dallinga-Thie G, Liem A, Dunselman P, et al. (2007). Effect of rosuvastatin versus atorvastatin treatment on paraoxonase-1 activity in men with established cardiovascular disease and a low HDL-cholesterol. *Curr Med Res Opin* 23: 2235-2240.
154. Tomás M, Sentí M, García-Faria F, Vila J, Torrents A, et al. (2000). Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscl Throm Vas* 20: 2113-2119.
155. Yi GH, Mo ZC, Ye YP, Long ZF, Shi JF, et al. (2008). Effects of probucol on paraoxonase 1 expression and oxidative stress in hyperlipidemic mice. *Cell Biol Int* 32: S19-S20.
156. Kim DS, Burt AA, Ranchalis JE, Richter RJ, Marshall JK, et al. (2012). Dietary cholesterol increases paraoxonase 1 enzyme activity. *J Lipid Res* 53: 2450-2458.
157. Sutherland W, Robertson M, Williamson S, Nye E (1991). Plasma noncholesterol sterols in male distance runners and sedentary men. *Eur J Appl Physiol Occup Phys* 63: 119-123.
158. Zak A, Zeman M, Vitkova D, Hrabak P, Tvrzicka E (1990). [Beta-sitosterol in the treatment of hypercholesterolemia]. *Cas Lek Cesk* 129: 1320-1323.
159. Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, et al. (2005). Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15: 352-360.
160. Yesilbursa D, Serdar A, Saltan Y, Serdar Z, Heper Y, et al. (2005). The effect of fenofibrate on serum paraoxonase activity and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia. *Kardiologia polska* 62: 526.
161. Macan M, Vrkić N, Lucić Vrdoljak A, Radić B, Bradamante V (2010). Effects of high sucrose diet, gemfibrozil, and their combination on plasma paraoxonase 1 activity and lipid levels in rats. *Acta Biochimica Polonica* 57: 321-326.
162. Paragh G, Seres I, Harangi M, Erdei A, Audikovszky M, et al. (2006). Ciprofibrate increases paraoxonase activity in patients with metabolic syndrome. *Brit J Clin Pharmacol* 61: 694-701.
163. Durrington P, Mackness M, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, et al. (1998). Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 138: 217.
164. Dullaart R, De Vries R, Voorbij H, Sluiter W, Van Tol A (2009). Serum paraoxonase-I activity is unaffected by short-term administration of simvastatin, bezafibrate, and their combination in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 39: 200-203.

165. Noto H, Kawamura M, Hashimoto Y, Satoh H, Hara M, et al. (2003). Modulation of HDL metabolism by probucol in complete cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis* 171: 131-136.
166. James WPT, Astrup A, Finer N, Hilsted J, Kopelman P, et al. (2000). Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: a randomised trial. *Lancet* 356: 2119-2125.

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : Düzgün Zekeriya
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 27.03.1983
Medeni hali : Bekar
Telefon : 05063722022
E-Posta : zduzgun@gmail.com
Yazışma adresi : Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece Mezun Olduğu Kurumun Adı Mezuniyet Yılı
Lisans : 3, 38-Dumlupınar Üniversitesi-2008
Lise : 78-Körfez Sağlık Meslek Lisesi-2001

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi Kurum Süre (Yıl -Yıl)

1. Arş. Gör. Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı 2013-halen

YABANCI DİL

İngilizce