

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

ALZHEİMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNE YÖNELİK YENİ ÖNDER
BİLEŞİKLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Gözde Yalçın

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. İlkay YILDIZ

Aralık

2018

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Gözde Yalçın

İmzası



ONAY

Prof. Dr. İlkey YILDIZ danışmanlığında Gözde Yalçın tarafından hazırlanan bu çalışma 20/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Tijen ÖNKOL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Bilgehan DOĞRU

İmza:

Üye: Prof. Dr. İlkey YILDIZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Serap YILMAZ

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Alzheimer Hastalığının Tedavisine Yönelik Yeni Önder Bileşiklerin Geliştirilmesi

Gözde Yalçın

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. İlkay Yıldız

Bu tez kapsamında, *in silico* ortamda Alzheimer Hastalığının tedavisine yönelik çalışmalarda bulunularak; yeni önder bir bileşiğin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedefe ulaşmak için, Discovery Studio Client 3.5 (DSC) paket programı kullanılarak Glikojen Sentaz Kinaz 3 β (GSK-3 β) ve Asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile farmakofor analiz çalışmaları yürütülerek hipotezler geliştirilmiştir. Bu hipotezleri oluşturmak için HipHop ve 3D QSAR Farmakofor Geliştirme olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Her iki metodla elde edilen hipotezler istatistiksel olarak incelenmiş ve ileri çalışmalar için uygun olan hipotez(ler) seçilmiştir. Seçilen tüm hipotezler ile ligand farmakofor çakıştırma yöntemi kullanılarak test serisi ile uyumuna bakılmıştır. Ayrıca, GSK-3 β enzim inhibitörleri üzerinden 3D QSAR Farmakofor Geliştirme Yöntemi ile geliştirilmiş hipotezlerden bir tanesi (hipotez 1) DSC içerisinde bulunan DrugLikeDiverse veritabanı ile taranmış ve ilaç benzeri moleküllerin uyumu kontrol edilmiştir. Buna göre, veritabanındaki 3930 molekülün hipotez 1 ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Daha sonra, bu moleküllerin *in silico* ortamda ADME/Tox (Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, İtrah ve Toksisite) özellikleri incelenmiş ve bu sayı 20'ye düşürülmüştür. Tüm analiz sonuçlarının bir arada değerlendirilmesine göre ENA99104 bileşik çoklu hedefe yönelik yeni ilaç adayı molekül olarak seçilmiştir. Son olarak ENA99104 bileşiği moleküler doking ve moleküler dinamik simülasyonuna alınmıştır. ENA99104'ün Asetilkolinesteraz ve GSK-3 β enzimleri üzerindeki inhibe edici özelliği sebebiyle Alzheimer Hastalığı için yeni önder bir bileşik olabileceği hesaplamalı olarak gösterilmiştir.

2018, 204 sayfa

Keywords: Alzheimer Hastalığı, Asetil kolinesteraz, GlikojenSentez Kinaz 3 β , Çoklu Hedefe Yönelik İlaç Adayı Molekül Geliştirme

ABSTRACT

PhD Thesis

Development of New Lead Compounds Intended to Treatment of Alzheimer's Disease

Gözde Yalçın

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Ilkay Yildiz

It is aimed to develop a new leading compound, by the studies about the treatment of Alzheimer's disease on *in silico* environment within the scope of this thesis. For this purpose hypothesis has been developed by carrying out pharmacophore analysis studies with glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) and acetylcholinesterase enzyme inhibitors by Discovery Studio Client 3.5 (DSC) package. Two different methods which are HipHop and 3D QSAR Pharmacophore Generation were used to generate these hypotheses. Hypotheses were examined statistically and the suitable hypotheses were chosen for further studies. Ligand Pharmacophore studies were implemented for all hypothesis to understand the fitting of the test set. Also hypothesis 1 which is generated by 3D QSAR Pharmacophore Generation Method with GSK-3 β enzyme inhibitors was chosen for next step of the study. 3930 molecules which were fitted to this hypothesis were found DrugLikeDiverse database of DSC. The number of molecules was decreased to 20 by their ADME/Tox (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicology) properties on *in silico* environment. ENA99104 was chosen as a multi target drug candidate molecule by the consideration of the whole analysis results. Finally molecular docking studies and molecular dynamics simulations were implemented with ENA99104 molecule. It was shown that ENA99104 could be a new lead compound for Alzheimer's disease because of its feature about the inhibition of acetyl cholinesterase and GSK-3 β .

2018, 204 pages

Keywords: Alzheimer Disease, Acetyl cholinesterase, Glycogen Synthase Kinase 3 β , Multi Target Drug Design

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamı yürüttüğüm yıllar sadece akademik değil kişisel anlamda da pek çok sorunla boğuştuğum yıllar oldu. Gerçek kötülüğü gördüğüm ve tanıdığım bu yıllarda aslında hayatımda olan tek bir insan dahi eksik olsa hem bu tez hem de bugün bu tezi kaleme alan Gözde Yalçın asla olmazdı. Bu nedenle öncelikle bir bakışıyla bütün günüme neşe katan ismini hatırlayamadığım bütün güzel insanlara teşekkür ederim.

Biyoteknoloji Enstitüsü'ne benim için ikinci bir ev ve aile olduğu, her zaman arkamda durduğu için, bu hayatta taşımaktan onur duyduğum yegâne kimlik olan Biyoteknoloji Enstitüsü kartını verdiği için sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Ancak özellikle Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a beni kendi evlatlarından ayırmadığını bildiğim için ve Prof Dr. Hilal Özdağ'a sorunlarımı kendi başına gelmişçesine dert edinip bir abla şevkatiyle çözüm üretmeye çalıştığı, tatlı sert çizgisiyle bir öğretmenden çok klavuzla dönüştüğü için sonsuz teşekkür ederim. Hiçbir zaman bilimsel bir grubun üyesi olamayacağım derken; beni grubunun fahri üyesi ilan ederek güzel enerjisinden nasiplenmeme müsaade eden Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na teşekkürlerimi sunuyorum. Doç. Dr. Erkan Yılmaz' a ise makale saatlerimizle her şeye rağmen içimdeki bilim ateşini körüklediği ve iyi bir araştırmacı olmamdaki örnek kişiliği nedeniyle teşekkür ederken; Klingoncamı geliştirmemdeki katkıları nedeniyle Dr. Öğretim Üyesi Doruk Engin'e teşekkürlerimi de atlamamam gerekir.

Danışman olmak; elbetteki bilimsel katkı sağlamak, bir öğrenciyi akademik anlamda yetiştirmektir. Ancak bunların yanı sıra yeri geldiğinde bir arkadaş yeri geldiğinde bir abla olarak sorunlarımı dinleyen, eşsiz yemek sohbetlerimizle hayatımı güzelleştiren danışman hocam Prof. Dr. İlky Yıldız'a sonsuz teşekkür ederim.

Dostlarım... İyi ki varsınız. Bir kişinin dostluğun anlamını öğrenmesi için önce düşmesi gerekiyormuş, düştüm... Ama çıkarırım, dostlarım vardı. Bu yıllarda her zaman yanımda olan Aydos, Eker, Islakoğlu, Polat, Korkmaz, Demirci ve Tercan ailesi üyesi dostlarıma, Senem Noyan'a, Müge Yasemin'e, Funda Demirsoy'a, Muhammet Oğuzhan Yalçın'a, Aysun Aydoğdu'ya, Ezel Çilek'e, başta Rukiye Avarisli olmak üzere Rize'yi güzelleştiren küçük dostlarıma sonsuz teşekkürler...

Belki bir film repliği ama “herkesin istediği zaman çıkıp, istediği zaman dönebileceği bir kapısı olmalı”. Bana bu kapıyı bütün varlığıyla hissettiren canım ailem, sizi çok zdm. Affınıza sığınarak bu tezi hazırlarken yaşadığım bütün zorluklarda sııcacık kollarıyla sarıp sarmalayan annem Ayşe YALÇIN ve babam Sefa YALÇIN’a ölümsüz bir teşekkür sunuyorum. Son olarak en güzel hediyem, tosbağam, marmelatım, can şenliğim, kardeşim Gökçe YALÇIN iyiki varsın. Sen olmasan boğulurdum...



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
SEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	7
2.1. AMİLOİD-BETA PEPTİDLERİNİN OLUŞUMU VE BİRİKİMİ	7
2.2. TAU HİPERFOSFORİLASYONU	10
2.3. KAN-BEYİN BARIYERİ TRANSPORT PROTEİNLERİNİN KONSANTRASYONUNDA YAŞANAN DEĞİŞİMLER.....	12
2.4. ALZHEİMERLİ BEYİNLERDE ABNORMAL DAĞILIM GÖSTEREN DİĞER RESEPTÖRLER	13
2.4.1. ASETİLKOLİN RESEPTÖRLERİ.....	13
2.4.2. DOPAMİNERJİK RESEPTÖRLER	14
2.5. AMİLOİD BETA OLUŞUMU İLE TAU HİPERFOSFORİLASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ	15
2.5.1. GSK-3 İZOFORMLARI VE ETKİN OLDUĞU MEKANİZMALAR.....	15
2.6. BİLGİSAYAR DESTEKLİ İLAÇ ETKEN MADDE GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI	

2.6.1. MOLEKÜLER MODELLEME.....	17
2.6.1.1. Simülasyon.....	17
2.6.1.1.1. Monte Carlo	17
2.6.1.1.2. Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi	18
2.6.1.1.3. Moleküler Dinamik.....	18
2.6.2. MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI.....	18
2.6.3. HESAPLAMALI ÇALIŞMALAR VASITASIYLA GELİŞTİRİLEN İLAÇLARA ÖRNEKLER.....	19
2.7. ALZHEİMER İÇİN YÜRÜTÜLMÜŞ İLAÇ ETKEN MADDE GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI	19
2.7.1. PREKLİNİK ÇALIŞMALARI TAMAMLANAN İLAÇ MOLEKÜLLERİ.....	20
2.7.1.1. Beta Sekretaz İnhibitörleri	20
2.7.1.2. Asetilkolin Esteraz inhibitörleri.....	22
2.7.1.3. GSK-3 Proteini ve Klinik Olarak Kullanılan İnhibitörleri	24
2.7.1.3.1. Klinik olarak kullanılan GSK-3 İnhibitörlerine örnekler.....	25
2.8. ÇOKLU HEDEFE YÖNELİK İLAÇ ETKEN MADDE GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI	31
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	<u>33</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>34</u>
4.1. MATERYAL	34
4.1.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILACAK LİGANDLARIN BELİRLENMESİ	34
4.1.1.1. Asetilkolin esteraz İnhibitörleri	35
4.1.1.2. Glikojen Sentaz Kinaz 3β İnhibitörleri.....	40

4.1.2. MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARINDA KULLANILACAK RESEPTÖRLERİN BELİRLENMESİ	45
4.1.2.1. Asetilkolinesteraz Reseptörleri ve 4EY7'nin 3D yapısı	45
4.1.2.2. Glikojen Sentaz Kinaz 3β Reseptörleri ve 1Q41'in 3D yapısı	47
4.2. YÖNTEM	49
4.2.1. LİGANT TABANLI İLAÇ TASARIMI	49
4.2.1.1. 3D QSAR Farmakofor Modelleme	50
4.2.1.2. HipHop Metodu ile Farmakofor Analizi.....	58
4.2.1.3. 3D Veritabanları ile Tespit Edilen Farmakofora Uygun Bileşiklerin Belirlenmesi 65	
4.2.1.4. ADME-Toksikoloji Tahminleri	65
4.2.2. HEDEF TABANLI İLAÇ TASARIMI.....	66
4.2.2.1. Moleküler Doking Çalışması	66
4.2.2.1.1. Moleküler Doking için gerekli bağlanma küresinin belirlenmesi	66
4.2.2.2. Moleküler Dinamik Simülasyonları.....	68
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>69</u>
5.1. 3D QSAR FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI	69
5.1.1. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRLERİYLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI	69
5.1.2. GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ 3 BETA İNHİBİTÖRLERİYLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI	78
5.2. HİPHOP METODU İLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI.....	87
5.2.1. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRLERİYLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI	87

5.2.2. GSK-3 β İNHİBİTÖRLERİYLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI	89
5.3. SEÇİLEN HİPOTEZLERİN TEST SERİLERİNDEKİ MOLEKÜLLERLE ÇAKIŞTIRILMA SONUÇLARI	92
5.3.1. HİPHOP METODU İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN FARMAKOFOR ANALİZ ÇALIŞMASINDA SEÇİLEN HİPOTEZLERİN TEST SERİLERİ İLE ÇAKIŞTIRILMASI	92
5.3.1.1. Asetilkolinesteraz İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Test Serisinin Karşılaştırılması	92
5.3.1.2. Asetilkolinesteraz İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Glikojen Sentaz Kinaz 3 β İnhibitörlerinin Karşılaştırılması	95
5.3.1.3. Glikojen Sentaz Kinaz 3 β İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Test Serisinin Karşılaştırılması	99
5.3.1.4. Glikojen Sentaz Kinaz 3 β İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin Karşılaştırılması	102
5.3.2. 3D QSAR FARMAKOFOR GELİŞTİRME METODUYLA GELİŞTİRİLEN FARMAKOFORLARIN TEST SERİLERİ İLE ÇAKIŞTIRILMASI	104
5.3.2.1. Asetilkolinesteraz İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Test Serisindeki Moleküllerin Karşılaştırılması	104
5.3.2.2. Asetilkolinesteraz İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile GSK-3 β inhibitörlerinin Karşılaştırılması	106
5.3.2.3. GSK-3 β İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Test Serisindeki Moleküllerin Karşılaştırılması	110
5.3.2.4. GSK-3 β İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin Karşılaştırılması	112
5.4. SEÇİLEN FARMAKOFORA UYGUN LİGANDLARIN TARANMASI VE ADME-TOKSİKOLOJİ ANALİZİ	114

5.5. MOLEKÜLER DOKİNG ÇALIŞMASI SONUÇLARI	118
5.6. MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARINA AİT SONUÇLAR.....	120
5.6.1. GSK-3BETA İLE YÜRÜTÜLEN SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI.....	120
5.6.2. ASETİLKOLİNESTERAZ İLE YÜRÜTÜLEN SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI	122
5.6.3. ELDE EDİLEN BÜTÜN FARMAKOFOR MODELLERİYLE ENA99104 MOLEKÜLÜNÜN ÇAKIŞTIRILMASI	124
5.6.4. ELDE EDİLEN BÜTÜN FARMAKOFOR MODELLERİYLE ENA99104 MOLEKÜLÜNÜN DOKİNG SONUCU ELDE EDİLEN KONFORMASYON İLE KARŞILAŞTIRILMASI	127
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	130
6.1. TARTIŞMA.....	130
6.1.1. FARMAKOFOR MODELLEME SONUCU ELDE EDİLEN VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	130
6.1.2. ADME-TOKSİKOLOJİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	130
6.1.3. MOLEKÜLER DOKİNG VE MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	131
6.1.4. ELDE EDİLEN BÜTÜN FARMAKOFOR MODELLERİYLE ENA99104 MOLEKÜLÜNÜN ÇAKIŞTIRILMASINA DAİR SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	131
6.2. SONUÇ.....	132
<u>7. KAYNAKLAR</u>	133
<u>8. EKLER.....</u>	144
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	165
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	170

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İlaç geliştirme basamakları (1,2).....	2
Şekil 1.2. Farklı ilaç etki modellerinin reseptör aktivitesi üzerindeki etkisi (3,4)	3
Şekil 1.3. Yıllara göre demanslı hasta sayısı (Milyonlar), Turuncu renk gelir düzeyi yüksek ülkeleri, mor renk gelir düzeyi düşük ve orta ülkeleri göstermektedir.....	4
Şekil 2.1. APP prosesi ile amiloid- β proteinlerinin oluşması (25).....	8
Şekil 2.2. APP proteinin kesimiyle A β 40 ve A β 42 oluşumu (34).....	9
Şekil 2.3. A β plaklarını içeren bölgeler (ISF, CSF)	10
Şekil 2.4. Tau hiperfosforilasyon mekanizması	11
Şekil 2.5. A β proteinlerinin kapiler endotelyumda transportunda görevli yapılar (42)	12
Şekil 2.6. Asetilkolinesteraz etki mekanizması (46)	14
Şekil 2.7. GSK-3 izoformları.....	15
Şekil 2.8. Glikojen Sentez Kinaz 3 β ve Alzheimer Patolojisi.....	16
Şekil 2.9. GSK-3 etkileşim bölgeleri.....	24
Şekil 2.10. 2015-2017 yılları arasında farklı alanlardan FDA başvurularına ait pasta diyagramı (73)	31
Şekil 2.11. RAGE bağımlı NF-K β aktivasyonu (75).	32
Şekil 4.1. Çalışmada yürütülen basamaklara dair iş akış şeması.....	34
Şekil 4.2. BindingDB veritabanında yürütülen Asetilkolinesteraz inhibitörleri taraması sonucu.....	35
Şekil 4.3. BindingDB veritabanında yapılan Glikojen Sentez Kinaz 3 β inhibitörleri taraması sonucu	40

Şekil 4.4. 3D yapıların tespitinde kullanılan RSCB PDB protein veri bankası.....	45
Şekil 4.5. Gri baloncuk yapı aktif bölge içerisindeki donepezil molekülünü, sarı işaretli rezidüer aktif bölgeyi oluşturan aminoasitleri göstermektedir.	47
Şekil 4.6. Gri baloncuk yapı aktif bölge içerisindeki indirubin molekülünü (Corey-Pauling-Koltun moleküler gösterimi), sarı işaretli rezidüer aktif bölgeyi oluşturan aminoasitleri göstermektedir.	49
Şekil 5.1. Birinci hipotezin korelasyon grafiği.....	70
Şekil 5.2. Farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi.	71
Şekil 5.3. Hipotez 1'e çalışma setinin çakıştırılması.....	72
Şekil 5.4. Hipotez 1'e çalışma setinin çakıştırılması.....	73
Şekil 5.5. Altıncı hipotezin korelasyon verileri.....	74
Şekil 5.6. Hipotez 6 farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi.	75
Şekil 5.7. Hipotez 6'yla çalışma setinin çakıştırılması.....	76
Şekil 5.8. Hipotez 6'yla çalışma setinin çakıştırılması.....	77
Şekil 5.9. Birinci hipotezin korelasyon grafiği.....	79
Şekil 5.10. Farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi	80
Şekil 5.11. Hipotez 1'e çalışma setinin çakıştırılması	81
Şekil 5.12. Hipotez 1'e çalışma setinin çakıştırılması	82
Şekil 5.13. Yedinci hipotezin korelasyon grafiği	82
Şekil 5.14. Farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi.	84
Şekil 5.15. Hipotez 7'ye çalışma setinin çakıştırılması.....	85
Şekil 5.16. Hipotez 7'ye çalışma setinin çakıştırılması.....	86

Şekil 5.17. Hipotez 1 için farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi	88
Şekil 5.18. Çalışma seti ile hipotez 1'in çakıştırılması.....	88
Şekil 5.19. Hipotez 1 için farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi	90
Şekil 5.20. Çalışma Seti ile hipotez 1'in çakıştırılması.....	91
Şekil 5.21. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez 1 ile test serisindeki bileşiklerin çakıştırılması	92
Şekil 5.22. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez 1 ile test serisindeki bileşiklerin çakıştırılması	93
Şekil 5.23. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile GSK-3 β inhibitörlerinin çakıştırılması	95
Şekil 5.24. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile GSK-3 β inhibitörlerinin çakıştırılması-2.kısım	96
Şekil 5.25. GSK-3 β inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile test serisindeki bileşiklerin çakıştırılması	99
Şekil 5.26. . GSK-3 β inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile test serisindeki bileşiklerin çakıştırılması 2. Kısım	100
Şekil 5.27. GSK-3 β inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile asetilkolinesteraz inhibitörlerinin çakıştırılması.....	102
Şekil 5.28. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile asetilkolinesteraz inhibitörlerinin çakıştırılması	104
Şekil 5.29. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotezin GSK-3 β inhibitörleriyle çakıştırılması	106
Şekil 5.30. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotezin GSK-3 β inhibitörleriyle çakıştırılması	107

Şekil 5.31. GSK-3 β inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotezin GSK-3 β inhibitörleriyle karşılaştırılması	110
Şekil 5.32. GSK-3 β inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotezin asetilkolinesteraz inhibitörleriyle karşılaştırılması.....	112
Şekil 5.33. İnsan intestinal sistem absorpsiyonu ve Kan-Beyin Bariyeri geçişini gösteren grafik.....	117
Şekil 5.34. Moleküler Docking Simülasyonları için seçilen bileşik, ENA99104'ün 3D gösterimi.....	118
Şekil 5.35. ENA99104 molekülünün asetilkolinesteraz enzimi bağlanma paketi içerisindeki konumu. Turuncu çizgiler π - π etkileşimlerini göstermektedir.	119
Şekil 5.36. ENA99104 molekülünün GSK-3 β enziminin aktif bölgesi ile etkileşimi. Yeşil kesikli çizgiler hidrojen bağlarını göstermektedir.	119
Şekil 5.37. GSK-3 β ve ENA99104 kompleksi. Kahverengi α heliks ve β tabaka yapıları içeren yapı GSK-3 β enzimini, kırmızı noktalar TIP3P su moleküllerini ifade etmektedir.	120
Şekil 5.38. 20 ns içerisinde GSK-3 β ve ENA99104 kompleksine ait RMSD eğrisi.....	121
Şekil 5.39. GSK-3 β ve ENA99104 kompleksinin 20 ns'lik simülasyon sonrasındaki bağlanma profili.....	121
Şekil 5.40. Asetilkolinesteraz ve ENA99104 kompleksi	122
Şekil 5.41. 20 ns içerisinde Asetilkolinesteraz ve ENA99104 kompleksine ait RMSD eğrisi.	123
Şekil 5.42. Asetilkolinesteraz ve ENA99104 kompleksinin 20 ns'lik simülasyon sonrasındaki bağlanma profili	123
Şekil 5.43. Elde edilen bütün farmakoforlar ile ENA99104 molekülünün karşılaştırılması..	125

Şekil 5.44. Elde edilen bütün farmakoforlar ile ENA99104 molekülünün doking sonuçlarının karşılaştırılması 128



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Alzheimer Hastalığı ve demansın Avrupa’da 2008 yılındaki maliyeti	5
Çizelge 2.1. Klinik denemeleri süren BACE-1 inhibitörleri (küçük moleküller)	21
Çizelge 2.2. Asetilkolinesteraz inhibitörleri (12,68).	22
Çizelge 2.3. GSK-3 inhibitörleri ve etki mekanizmaları	26
Çizelge 4.1. Farmakofor analiz çalışmalarında kullanılmak üzere BindingDB veritabanından seçilen Asetilkolinesteraz inhibitörleri	35
Çizelge 4.2. Farmakofor analiz çalışmalarında kullanılmak üzere BindingDB veritabanından seçilen Glikojen Sentaz Kinaz 3 β inhibitörleri	40
Çizelge 4.3. Protein Veri Bankasında bulunan Asetilkolin esteraz enzimleri	46
Çizelge 4.4. Protein Veri Bankasında bulunan Glikojen Sentaz Kinaz 3 β enzimleri	47
Çizelge 4.5. 3D QSAR Farmakofor oluşturmada çalışma seti olarak kullanılan Asetilkolin esteraz inhibitörleri ve biyolojik etkileri	50
Çizelge 4.6. 3D QSAR Farmakofor analizinde seçilen hipotez ile karşılaştırılmada test set olarak kullanılan asetilkolin esteraz inhibitörleri ve biyolojik etkileri	53
Çizelge 4.7. 3D QSAR Farmakofor oluşturmada çalışma seti olarak kullanılan Glikojen Sentaz Kinaz 3 β inhibitörleri ve biyolojik etkileri	54
Çizelge 4.8. 3D QSAR Farmakofor analizinde seçilen hipotez ile karşılaştırılmada test set olarak kullanılan Glikojen Sentaz Kinaz 3 β inhibitörleri ve biyolojik etkileri	56
Çizelge 4.9. Hiphop metodu ile hipotez oluşturmada çalışma seti olarak kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörleri ve biyolojik aktiviteleri (IC ₅₀ nM)	59
Çizelge 4.10. Elde edilen hipotezin karşılaştırılması için test seti olarak kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörleri ve biyolojik aktiviteleri (IC ₅₀ nM)	59

Çizelge 4.11. Hiphop metodu ile hipotez oluşturma da çalışma seti olarak kullanılan Glikojen Sentaz Kinaz 3 β inhibitörleri ve biyolojik aktiviteleri (IC ₅₀ nM)	61
Çizelge 4.12. Elde edilen hipotezin karşılaştırılması için test seti olarak kullanılan Glikojen Sentaz Kinaz 3 β inhibitörleri ve biyolojik aktiviteleri (IC ₅₀ nM)	62
Çizelge 4.13 CDOCKER metodu ile docking protokolünün oturtulması için asetilkolinesteraz ile yürütülmüş RMSD hesaplama sonuçları (referans donepezil)	67
Çizelge 4.14. LigandFit metodu ile docking protokolünün oturtulması için GlikojenSentaz Kinaz 3 β ile yürütülmüş RMSD hesaplama sonuçları (referans indirubin)	67
Çizelge 5.1. Hipotezlere ait istatistiksel sonuçlar.....	69
Çizelge 5.2. Hipotez 1 için Deneysel ve Hesaplanan IC ₅₀ (nM) değerleri.....	70
Çizelge 5.3. Hipotez 6 için deneysel ve hesaplanan IC ₅₀ (nM) değerleri.....	74
Çizelge 5.4. Hipotezlere ait istatistiksel sonuçlar.....	78
Çizelge 5.5. Hipotez 1 için Deneysel ve Hesaplanan IC ₅₀ (nM) değerleri.....	79
Çizelge 5.6. Hipotez 7 için Deneysel ve Hesaplanan IC ₅₀ (nM) değerleri.....	83
Çizelge 5.7. Hipotezlere ait istatistiksel sonuçlar.....	87
Çizelge 5.8. Hipotezlere ait istatistiksel sonuçlar.....	89
Çizelge 5.9.HipHop temelli asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in test serisiyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler	94
Çizelge 5.10. HipHop temelli asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in GSK-3 β inhibitörleriyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler	97
Çizelge 5.11. HipHop temelli GSK-3 β inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in test serisindeki moleküllerle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler	101
Çizelge 5.12. HipHop temelli GSK-3 β inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in asetilkolinesteraz inhibitörleriyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler.....	103

Çizelge 5.13. 3D QSAR temelli asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in asetilkolinesteraz inhibitörleriyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler.....	105
Çizelge 5.14. 3D QSAR temelli asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in GSK-3 β inhibitörleriyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler	108
Çizelge 5.15. 3D QSAR temelli GSK-3 β inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in test serisi moleküllerle karşılaştırılması kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler	111
Çizelge 5.16. 3D QSAR temelli GSK-3 β inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in asetilkolinesteraz inhibitörleriyle karşılaştırılması kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler	113
Çizelge 5.17. En iyi moleküler özelliklere sahip 20 molekül.....	114
Çizelge 5.18. Seçilen 20 bileşiğe ait ADME tahminlemesi	115
Çizelge 5.19. Seçilen 3 bileşik için karsinojenlik ve mutajenlik analizi sonuçları	117
Çizelge 5.20. GSK-3 β ve Asetilkolinesteraz enzimleriyle ENA99104 molekülünün doking sonuçları	118
Çizelge 5.21. ENA99104 Molekülünün bütün hipotezlerle karşılaştırılmasına ait istatistiksel veriler.....	126
Çizelge 5.22. ENA99104 Molekülünün docking sonuçlarıyla bütün hipotezlerin karşılaştırılmasına ait istatistiksel veriler	129

SİMGELER DİZİNİ

nM	nanomolar
FDA	Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda Dairesi
GSK	Glikojen Sentaz Kinaz
DSC	Discovery Studio Client 3.5
HTS	Yüksek Hızda Aktivite Tarama
RAGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri için Reseptör
NMDA	N-metil D-aspartat
APP	Amiloid Prekürsör Proteini
A β	Amiloid Beta
CTF	C Terminal Fragmenti
AICD	APP intraselüler domaini
PS1-2	Presenilin 1 veya 2
Nct	nikastrin
Aph-1	anteryör yutak defektif 1
FOs	Fibriler oligomerler
CSF	Serebrospinal Sıvı
MAP	Mikrotübül Bağlantılı Protein
Cdk	Siklin Bağımlı Kinaz
PI3K	Fosfoinositol 3-kinaz
LRP1	Lipoprotein Reseptör Bağlantılı Protein 1
AChE	Asetilkolinesteraz
BACE1	Beta Sekretaz 1
GPCR	G protein-bağlı reseptörler
D1/D2	Dopaminerjik reseptör 1/2

RCAN	Kalsinörin 1 regülatör proteini
VDAC1	Voltaj bağımlı iyon kanalı 1
MD	Moleküler Dinamik
PKA	Protein Kinaz A
PP2A	Protein Fosfataz 2A
AEP	Asparajil endopeptidaz
NF-KB	Nekroz Faktör-Kappa B
3D	3 Boyutlu
QSAR	Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri
ADME	Absorbsiyon(Biyoyararlanım), Dağılım, Metabolizma, Ekskresyon
IC ₅₀	Inhibisyon Konsantrasyonu
ABNR	Adopted Bases
HBA	Hidrojen Bağı Akseptörü (Alicısı)
HBD	Hidrojen Bağı Donörü
HBV	Hidrofobiklik
RA	Halkalı Aromatik

1. GİRİŞ

İlaç geliştirme çalışmalarının temelini hedef hastalığın etiyolojisi, patogenezi oluşturur. Uzun yıllar süren bu çalışmalar vasıtasıyla ilacın hangi amaca daha uygun olacağına karar verilir. İlaç geliştirmede hastalığın nedeninin elemine edilmesi üzerine çalışılabileceği gibi, hastalık nedeni ile bozulan fonksiyonların düzeltilmesi, hastalık ile birlikte gelişen komplikasyonların önlenmesi ve semptomların azaltılması da hedeflenebilir.

Rasyonel ilaç geliştirme çalışmaları hastalıkları meydana getiren mekanizmaların tespit edilmesi ve klinik olarak kullanılan ilaçların farmakolojik etkilerinin anlaşılması ile yürütülen bir tarama işlemi ile gerçekleşmektedir. Bu tarama ile çoğu zaman 10binden fazla bileşikten yalnızca bir tanesi ilaç molekülü olarak hastaya ulaşmaktadır. İlaç geliştirme çalışmalarında ilk aşama “keşif” aşamasıdır. Bu safhada moleküler biyoloji, biyokimya, medisinal kimya, süper bilgisayar hesaplamaları, moleküler modelleme gibi bilim dalları büyük rol oynamaktadır. Moleküler biyoloji, biyoteknoloji, biyokimya çalışmaları ile hastalıklara yol açan mekanizmalarda görev alan protein yapılar tespit edilerek ilaç hedefi olarak kullanılması sağlanır. Ayrıca yine aynı bilim dalları vasıtasıyla yeni laboratuvar teknikleri ve hayvan modelleri geliştirilerek ikinci safha olan “preklinik dönem” çalışmaları için de büyük kolaylıklar sağlanmıştır. Preklinik dönem yani “klinik öncesi dönem” keşif basamağında seçilen kimyasal bileşiklerin (potansiyel yeni ilaç molekülleri) insanlarda denenmeden önce değerlendirilmesi aşamasıdır. Akut ve kronik toksisite, karaciğer gibi spesifik organlara etki, mutajenisite, karsinogenisite araştırmaları bu basamak çerçevesinde yürütülmektedir. Hayvanlarla yürütülen bu testlerde ilaç molekülün farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri araştırılır. Son basamak olan klinik faza geçilmeden önce klinik öncesi fazı geçen moleküllerle önce FDA'ya (Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda Dairesi) "Araştırılan Yeni İlaç" başvurusu yapılarak ilgili bilgilendirmenin yapılması gerekmektedir. Ardından klinik aşamaya geçilir. Bu basamakta farklı sayılarda hasta örnekleriyle gerçekleştirilen 4 fazdan oluşmaktadır. Bu süreci tamamlayan bir ilaç molekülü için FDA'dan alınan izinle birlikte T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'na “ilaç başvurusunda” bulunulur (1). Üçüncü klinik fazda alınan onayla birlikte yeni doz ve formülasyon geliştirilmesi için çalışmalara devam edilir. İlaç geliştirme çalışmalarına yönelik diyagram Şekil 1.1'de verilmiştir.

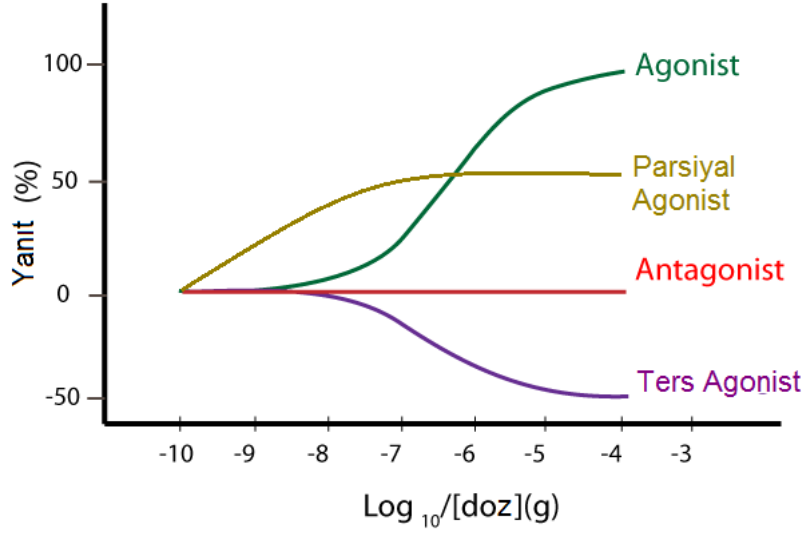


Şekil 1.1. İlaç geliştirme basamakları (1,2)

İlaçlar proteinleri modüle ediş biçimlerine göre sınıflara ayrılırlar. Hastalıklarda bazı proteinler fazla üretilerek sayıca artış göstermekte iken bazı proteinlerin sentezi düşmekte ve sayısı azalmaktadır. Bu nedenle ilaç hedefi olarak seçilen protein sayıca artıyorsa ilgili proteinin aktivitesi durdurularak etkisiz hale getirilmesi ya da proteinin aktivitesinde negatif bir etki oluşturularak sayıca artışın avantaja dönüştürülmesi amaçlanmaktadır. İlaç hedefi olarak seçilen protein de sayıca bir azalma gözleniyor ise ilgili proteinin aktivitesini arttırarak eksikliğin kompanse edilmesi hedeflenmektedir.

Hücrelerdeki bu protein yapıları yani reseptörlere bağlanarak hücrede bir tepki oluşturan yani aktivasyonu sağlayan moleküller “agonist” sınıfındadır. Agonist moleküller çoğu zaman o proteinle hücre içerisinde doğal olarak etkileşen moleküller taklit edilerek tasarlanmaktadır. Örneğin dopaminerjik reseptörlere bağlanarak doğal yoldan aktive eden dopamin bu reseptörlerin doğal agonisti olan bir nörotransmitterdir. “Antagonist” sınıfı moleküller ise bir reseptöre bağlanarak o reseptörün eyleme geçmesini engellerler. Temel prensip agonist bağlanma bölgesinin reseptörün aktifleşmesine yol açmayacak bir molekülle kapatılarak agonist bağlanmasının engellenmesidir. Reseptöre bağlanarak reseptörde agonistine ters bir etki yaratan, negatif aktiviteye yol açan moleküller ise “ters-agonist” sınıfını oluşturmaktadır. Benzodiazepin reseptörler için geliştirilen bazı β -karbolin türevleri ters agonist moleküllere örnektir (3) (Şekil 1.2). Bir de reseptöre bağlanıp zayıf bir etki oluşturan bu sayede reseptörün aktivitesinin kontrollü bir biçimde artmasını sağlayan “parşiyal agonist” moleküller sınıfı mevcuttur. Son olarak “yarışmalı (kompetitif) antagonistler” sınıfındaki moleküller antagonistler gibi reseptörün agonist bağlanma bölgesini kapatarak aktifleşmesini engellerler ancak ortamda agonist konsantrasyonu arttığında agonistlerin bağlanarak reseptörleri aktifleştirmesine müsaade ederler. Bu sayede

reseptör aktivitesi kontrollü bir biçimde durdurulmuş olur (3,4). Örneğin otonom sinir sistemindeki sürekli aktif haldeki adreno reseptörler ile kolino reseptörlerde antagonistler fonksiyonda büyük değişikliğe yol açmaktadır, bu nedenle daha çok yarışmalı antagonistler tercih edilmektedir.



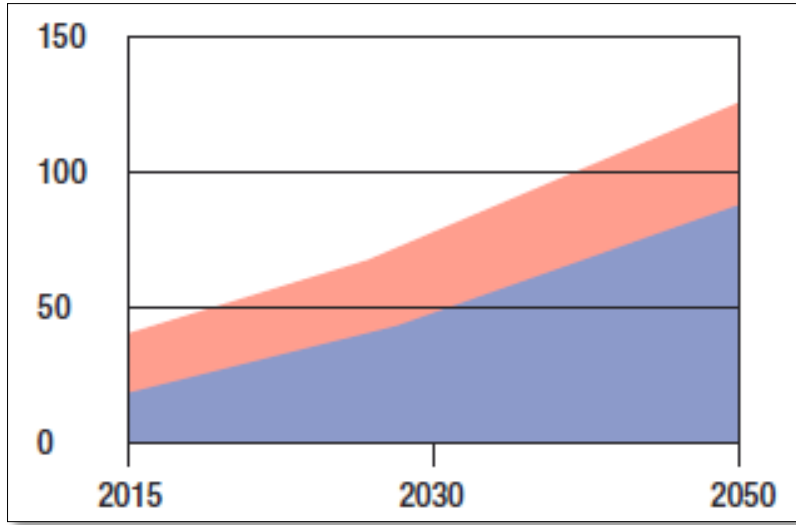
Şekil 1.2. Farklı ilaç etki modellerinin reseptör aktivitesi üzerindeki etkisi (3,4)

İlaç geliştirme süreci oldukça uzun bir süreçtir ancak bu sürecin en önemli kısmı olası ilaç moleküllerinin keşfedilmesidir. Günümüzde milyarlarca küçük ilaç molekülü bulunmaktadır. Bunlar arasında hedef proteinle en spesifik etkileşimi sağlayan moleküllerin tespit edilmesi deneysel yollarla çok da mümkün değildir. Bu nedenle bilgisayar ortamında gerçekleştirilen hesaplamalarla bu molekülleri deneysel çalışmalara yönlendirecek sayıya düşürmek büyük önem taşımaktadır. Bilgisayar destekli ilaç geliştirme araçları; hedef yapıların validasyonu, yüksek hızda aktivite tarama (HTS), önder bileşiklerin optimizasyonu, farmakolojik potansiyel ile fizikokimyasal ve farmakokinetik parametreler arasındaki dengeyi sağlamak gibi bütün ilaç geliştirme basamaklarında karar verme sürecine katkıda bulunmaktadır (5). Bu tezde de hesaplamalı çalışmaların yürütülmesinin nedeni ilgili katkıdır. Bu kapsamda farmakofor geliştirme ve moleküler doking çalışmaları yürütülmüştür.

Kanser, metabolik, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar gibi kompleks hastalıkların tedavisi için tamamıyla etkin ilaçlar henüz keşfedilememiş, bu nedenle ilaç etken madde

geliştirme çalışmalarında bu hastalıklar vazgeçilmez hedefler olarak kalmıştır. Bunlardan en önemlisi de Alzheimer hastalığıdır.

Demans; nöronların geri dönüşümsüz olarak kaybıyla gelişen nörolojik bir hastalıktır. Alzheimer ise demansın en sık görülen formudur. Hafıza kaybı ve bilişsel kabiliyetlerde gerilemeye yol açar ve özellikle 65 yaş üstü popülasyon için ciddi bir tehlike arz etmektedir. 2015 yılında tüm dünyada 46 milyon demans hastası yaşadığı tespit edilmiştir. Bu rakamın sadece bu yıl içerisinde yaklaşık 10 milyon daha artacağı ve 2030'da 74.7 milyona, 2050'de 131.5 milyona ulaşabileceği öngörülmektedir (Şekil 1.3) (6,7).



Şekil 1.3. Yıllara göre demanslı hasta sayısı (Milyonlar), Turuncu renk gelir düzeyi yüksek ülkeleri, mor renk gelir düzeyi düşük ve orta ülkeleri göstermektedir.

Türkiye genel nüfus sayımı verilerine göre 65 yaş üstü popülasyon oranı 1945'de %3.3 iken; 2000'de %5.7 olarak tespit edilmiştir ve bu oranın 2050'de %20'ye yaklaşacağı düşünülmektedir (8). Bu artış yaşlanmanın beraberinde getireceği Alzheimer gibi hastalıkların görülme sıklığının da artacağı anlamına gelmektedir.

Alzheimer ekonomik boyutu yönünden de son derece ciddi bir hastalıktır. Avrupa Alzheimer Derneği'nin 2008 verilerine göre ülkemizin de içinde bulunduğu Avrupa ülkelerinde demansa ayrılan bütçe 177.2 milyar avro olarak belirlenmiştir (Çizelge 1.1) (9). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre sadece 2015 yılında tüm dünyada demanslı hasta bakım giderleri; hasta, hasta yakını ve toplumsal bilgilendirme giderleri ve sosyal iyileştirme için harcanan maliyet 818 milyar Amerikan Dolarına ulaşmıştır ve bu rakamın

2030 yılıyla beraber 2 trilyona çıkacağı öngörülmektedir (6). Bu rakamlar pek çok ülke ekonomisinden bile büyüktür.

Çizelge 1.1. Alzheimer Hastalığı ve demansın Avrupa’da 2008 yılındaki maliyeti

	Direkt Maliyet (medikal ve sosyal hizmetler)	Bilgilendirme giderleri	Total Maliyet
EU27 (Avrupa Birliği Ülkeleri)	71.7	88.6	160.3
EU27+Aday ülkeler+ EAA(Avrupa Ekonomi Bölgesi) Ülkeleri+ İsviçre	76.3	91.2	167.5
Avrupa (Türkiye Dahil)	80.6	96.6	177.2

Hastalığa yol açan pek çok moleküler mekanizma tespit edilmiştir. Özellikle beyinde; amiloid β proteininin birikimi ile oluşan senil plaklar ve tau proteininin hiperfosforilasyonu ile gelişen yumak yapıları Alzheimer’da görülen temel nörolopatolojik belirteçlerdir. Bu proteinlerin birikimi ile sinir hücrelerinde ölüm gerçekleşir ve beyinde geri dönüşümsüz hasarlar meydana gelir. Ayrıca RAGE (İleri Glikasyon Son Ürünleri için Reseptör) düzeyinde artış, alzheimer hastalığı olan bireylerde sinirsel sinyal iletiminde görevli asetil kolin gibi bazı önemli kimyasalların eksikliği (Kolinerjik Hipotez) ve NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörlerinin aktivasyonunda artış da diğer nöropatolojik belirteçlerdir.

Tez çalışması kapsamında ele alınan GSK3 β bir serin/threonin kinaz reseptörüdür ve hem Wnt yolağında hem de apoptozis de etkin bir role sahiptir (10,11). GSK3 β ’nın Alzheimer mekanizmaları üzerindeki etkisi incelenmiş, özellikle Amiloid Prekürsör Proteini (APP) prosesinde önemli bir rolü olduğu tespit edilmiştir. GSK3 β inhibisyonu ile APP kesiminde azalma gözlenmiştir (11). GSK3 β inhibisyonu amiloid β düzeyinde düşüş sağladığından çalışmamızda ele alınan nihai proteinlerden biridir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar aşağıdaki maddelerle ifade edilebilir:

1. Alzheimer hastalığına ilişkin mekanizmaların tespiti

2. İlgili mekanizmalarda görevli proteinlerin tespiti ve 3 boyutlu yapılarının araştırılması
3. Daha önceden yürütülmüş çalışmalar ve farklı veritabanları taranarak ilgili proteinler için geliştirilmiş inhibitörlerin tespit edilmesi
4. Bulunan inhibitörlerle farklı farmakofor modellerinin geliştirilmesi
5. Farklı veritabanları taranarak seçilen farmakofor modellerine uygun bileşiklerin belirlenmesi
6. Seçilen bileşiklerle ADME-Tox analizlerinin yapılması
7. Moleküler dinamik simülasyonları kullanılarak tespit edilen olası önder bileşiklerin ilaç-reseptör etkileşimlerinin değerlendirilmesi



2. KURAMSAL TEMELLER

Alzheimer Hastalığı pek çok mekanizmada meydana gelen aksamalar ile ortaya çıkar ve bazı nöropatolojik belirteçler ile kendini göstermektedir. Bunlar intranöronal nörofibriller yumaklar ve ektranöronal senil (yaşlanmaya bağlı) plaklardır. Senil plaklar daha ziyade β -amiloid peptidlerinin bileşimiyle meydana gelirken; nörofibriler yumaklar ise hiperfosforile Tau proteinlerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (12,13). İlaç etken madde geliştirme çalışmalarının yürütüldüğü mekanizmaları daha detaylı olarak inceleyecek olursak:

2.1. AMİLOİD-BETA PEPTİDLERİNİN OLUŞUMU VE BİRİKİMİ

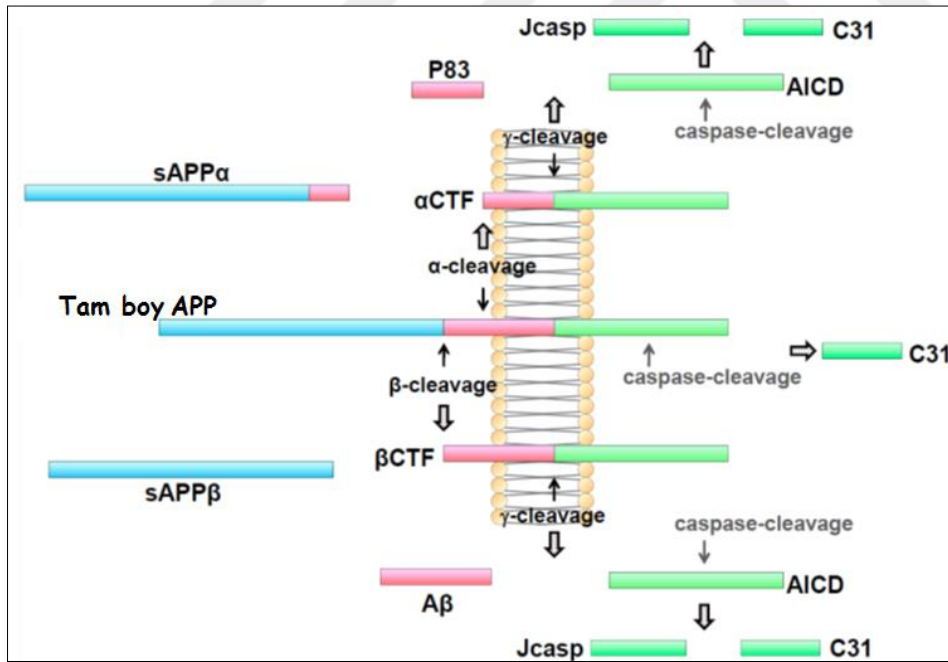
Amiloid β ($A\beta$) 36-43 aminoasitlik bir peptiddir. Normal fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte bazı hayvan deneyleri $A\beta$ yoksunluğu fizyolojik fonksiyonda kayba yol açmamaktadır (14,15). Bunların yanı sıra $A\beta$ 'nin kinaz enzimlerinin aktivasyonu (16,17), oksidatif strese karşı koruma (18,19), kolesterol transferinin düzenlenmesi (20,21), transkripsiyon faktörlüğü (22) gibi görevlerde bulunduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra son çalışmalarda $A\beta$ 'nin fare modellerinde hastalıklarla mücadele de patojenlere saldırı da görev aldığı da tespit edilmiştir (23).

$A\beta$ peptidi APP'nin (amiloid öncül proteininin) β ve γ sekretazlar vasıtasıyla kesilmesi ile oluşmaktadır (Şekil 2.1). Şekil 2.1' de "Tam Boy APP" şeklinde belirtilen; kesim öncesi APP proteindir. APP geni insanda 21. kromozomda bulunup ve alternatif splicing mekanizmasıyla oluşan 3 farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar APP695, APP751, APP770 proteinleridir ve APP751 ile APP 770 dokuların pek çoğunda eksprese edilirken APP695 ise daha çok sinir dokularında eksprese edilmektedir (24). Ancak Alzheimer Hastalığına sahip beyinlerde yapılan incelemelerde APP751 ve APP770 izoformlarının daha da arttığı, aynı zamanda amiloid- β peptid($A\beta$) birikiminin de arttığı tespit edilmiştir (25).

Tam Boy APP proteini tek geçişli, tip 1 transmembran proteindir. Endoplazmik retikulumda üretilir ve golgiye gönderilir. Bu nedenle nöronlarda en yüksek APP konsantrasyonu bu bölgelerde bulunur ve $A\beta$ üretimi buralarda gerçekleştirilir. APP aynı zamanda veziküller yardımıyla hücre yüzeyine de transfer edilebilir. Buralarda α

sekretazlar tarafından kesilerek büyük bir çözünebilir molekül olan sAPP α üretilir (24) (Şekil 2.1). Araştırmalar A β 'nin toksik özelliğine karşılık sAPP α 'nın nöroprotektif bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (26,27).

α ve β kesimler sonrası APP'nin karboksi ucunda meydana gelen fragmanlar (α CTF, β CTF) membrana bağlı olarak kalır ve daha sonrasında γ sekretazlar tarafından kesilir. α CTF ve β CTF'nin fonksiyonu tam olarak tespit edilmiş olmamasına rağmen β CTF sitotoksik özelliği ve nöronal ölümdaki görevi tespit edilmiştir (24). Bu sitotoksik etkinin γ sekretaz ve kaspaz kesimiyle oluşan final ürünleri (APP intraselüler domaini (AICD), C31, Jcasp) vasıtasıyla da gerçekleşmiş olabileceği öngörülmektedir (24). γ sekretazların aktivitesi 4 ayrı integral membran proteini (Presenilin 1 veya 2 (PS1-2), nikastrin (Nct), anteryör yutak defektif 1 (Aph-1), presenilin uyarıcı 2 (Pen2)) ile kompleks halindeyken görülür (28,29). Doğal olmayan aspartil proteazlardan olan γ sekretazın da Presenilin 1-2 katalitik komponentini oluşturur (29). γ sekretaz APP'yi intra-membran bölgesinden keser ve p83 ve A β oluşturur. P83 hızlıca degrades olan ve önemli bir fonksiyonu olmadığı düşünülen bir parçadır (24).

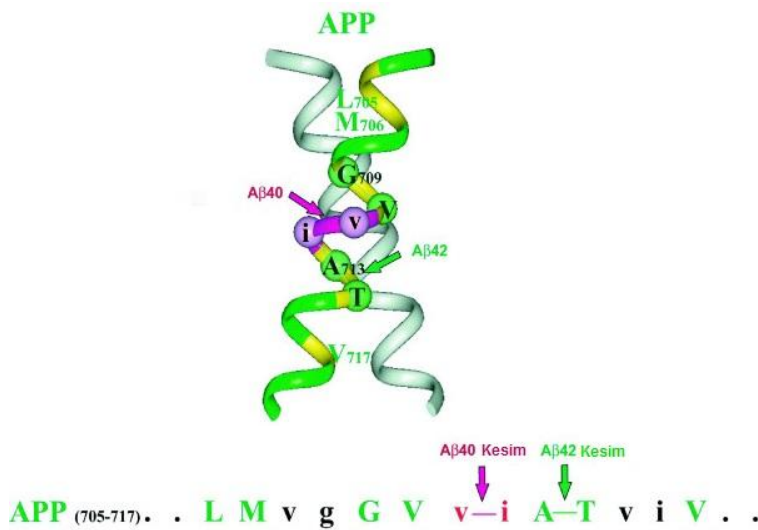


Şekil 2.1. APP prosesi ile amiloid- β proteinlerinin oluşması (25)

Amiloid- β proteinlerinin oligomerik formları oldukça nörotoksik bulunarak Alzheimer patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca amiloid oligomerlerin hücre membranlarına

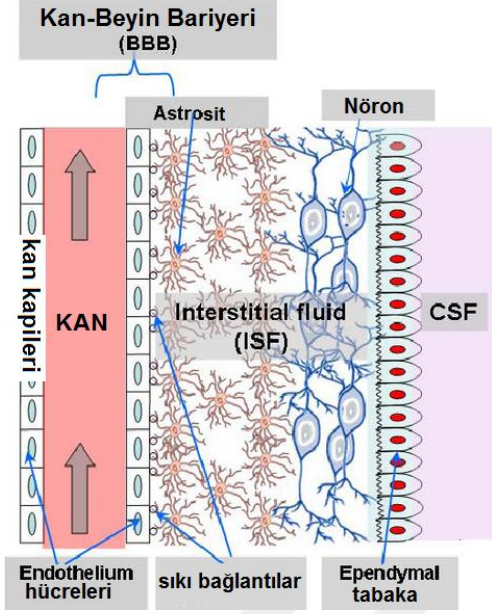
penetrasyon kabiliyeti vasıtasıyla Alzheimer patolojisinde hücre-hücre iletişimde de önemli bir rolü olduğu tespit edilmiştir (30,31). Amiloid oligomerlere ait yapının aydınlatılması hastalık içerisindeki patolojik rollerinin aydınlatılması ve terapötik ajanların geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Bu terapötik ajanlar vasıtasıyla oligomerler bloke edilerek hücre içine geçişleri engellenip, hücreler arası birikimleri önleneceği gibi oluşturdukları toksik sekonder yapının dağıtılması ya da endojen çözünebilir Amiloid- β peptitlerinin polimerizasyonunun önlenmesi de sağlanabilir (32). Hâlihazırda yürütülen deneysel çalışmalarda amiloid- β ($A\beta$) proteinindeki instabilite nedeniyle oldukça zorlanılmaktadır. Bu nedenle amiloid- β peptitleri yapısal sınıflara ayrılmıştır. Bunlar; fibriler oligomerler (FOs) ve prefibriler oligomerlerdir (PFOs) (32). Fibriler oligomerler düşük stabilite göstermesine rağmen prefibriler oligomerlerin stabilitesinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir (22).

$A\beta$ 'nin C terminalinden γ sekretazlar tarafından düzensiz kesimi ile $A\beta_{42}$ (42 amino asit uzunluğunda), $A\beta_{40}$ (40 amino asit uzunluğunda) olmak üzere iki major $A\beta$ izoformu meydana gelmektedir. İki izoform arasındaki tek fark $A\beta_{42}$ 'nin C terminalde sahip olduğu fazladan 2 aminoasittir (Şekil 2.2). Omurilik sıvısındaki $A\beta_{40}$ konsantrasyonu $A\beta_{42}$ 'den pek çok kat daha fazla bulunmuştur (33). $A\beta_{42}$ Alzheimerlı beyinlerde amiloid plaklarının major komponenti olmasına rağmen $A\beta_{40}$ sadece bir grup amiloid plak yapısında gözlenmiştir. Bu bulgular ışığında $A\beta_{42}$ birikiminin $A\beta_{40}$ birikimine de öncü olabileceği düşünülmektedir (33).



Şekil 2.2. APP proteinin kesimiyle $A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$ oluşumu (34)

A β ' nın plazmada, serebrospinal sıvıda (CSF) ve beyin interstisyel sıvısında (ISF) (Şekil 2.3) daha çok çözünebilir A β 40 formunda görülmektedir (35). Amiloid plaklar hem A β 40 hem de A β 42 peptidlerini içerirken vasküler amiloid genellikle daha kısa olan A β 40' ı içerir (36).



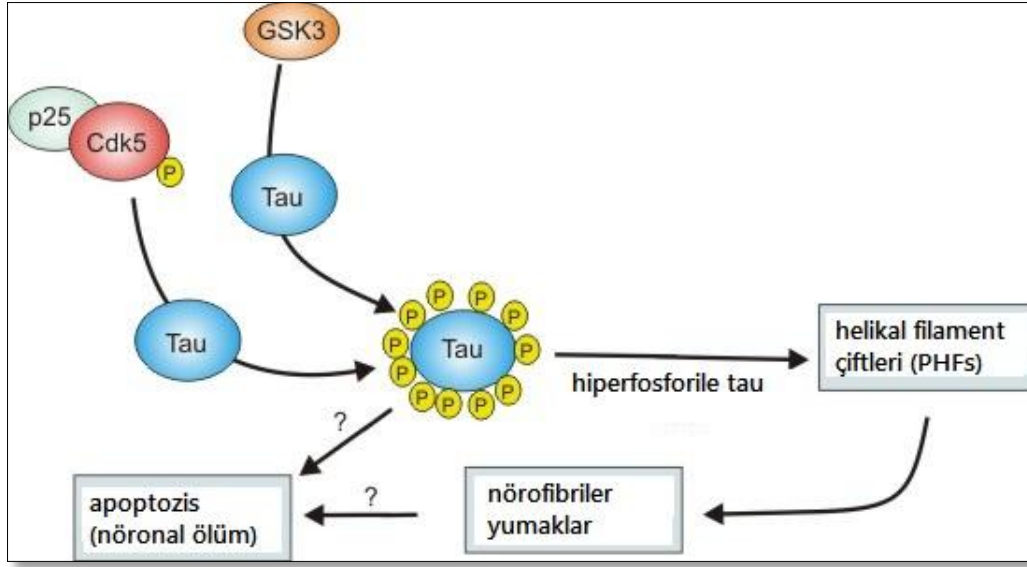
Şekil 2.3. A β plaklarını içeren bölgeler (ISF, CSF)

Total A β seviyelerindeki ya da hem A β 40 hem de A β 42 için ayrı ayrı ölçülen konsantrasyonlardaki (önceleri serebrovasküler plaklarda daha sonra ise nöritik plaklarda konsantrasyon daha yüksektir) herhangi bir artış ailesel ve sporadik Alzheimer hastalığının her ikisi için de belirlenmiş bir patojenezdir (37). A β 42 hidrofobik doğası sebebiyle en amiloidojenik formdaki peptiddir.

2.2. TAU HİPERFOSFORİLASYONU

Tau en büyük mikrotübül bağlantılı proteindir (MAP). Normal bir yetişkin beyinde kromozom 17 üzerindeki bir gen bölgesinden kodlanan 6 farklı, alternatif splay ürünleri bulunmaktadır (38). Alzheimerlı beyinlerde hem sitozolde hem de helikal filament çiftlerinde bütün bu 6 izoform da hiperfosforile haldedir ve nörofibriler yumaklar oluştururlar. Normal haldeki tau proteini çözünebilirken; hiperfosforile tau proteini oligomeriktir, çözünmez. Alzheimerlı beyinlerdeki tau miktarının sağlıklı beyinlere göre 4-5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiş; bu fazlalığın hiper fosforile tau miktarında ki artıştan kaynaklandığı ortaya konmuştur (38). Hiperfosforile tau proteininin normal

proteinlere göre dönüşüm hızı daha yavaş bulunmuş; buna neden olarak da kalsiyum ile aktive edilen nötral proteazlara karşı gösterilen direnç olduğu tespit edilmiştir (38). Tau proteininin biyolojik aktivasyonu fosforilasyon derecesi ile düzenlenir (39). Sağlıklı bireylerde de geçici hiperfosforilasyonlar gözlenebilir, kış uykusuna yatan hayvanlarda gözlenen tau hiperfosforilasyonu bu duruma örnek gösterilmektedir (38). Ancak bu geçici hiperfosforilasyon patolojik değildir; nöronların apoptozise girmesini engeller. Şekil 2.4’de tau hiperfosforilasyonuna ait mekanizma verilmiştir. Buna göre tau proteini bazı protein kinazlar(GSK3 β ve siklin bağımlı protein kinaz 5(Cdk5) tarafından fosforlanmaktadır.



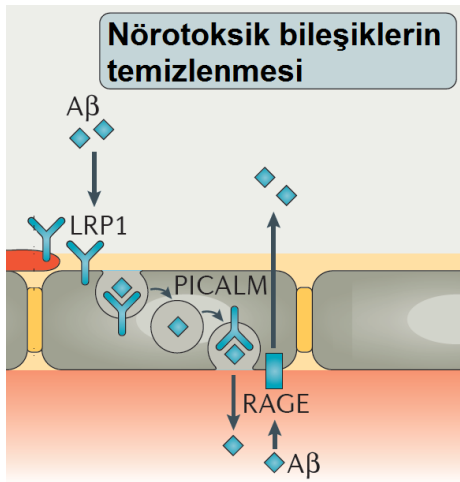
Şekil 2.4. Tau hiperfosforilasyon mekanizması

Hiperfosforile tau ile normal tau arasındaki kinetik çalışmaları Ser199/Ser202/Thr205, Thr212, Thr231/Ser235, Ser262/Ser356 ve Ser 422 rezidülerinin kritik fosforilasyon bölgeleri olduğunu ortaya koymuştur (39,40). Ayrıca Thr231, Ser396 ve Ser422 rezidülerinin de tau proteininin agregasyonunda önemli olduğu; prolince zengin bölgelerde gözlenen fosforilasyonun küçük, C-terminaldeki kuyruk bölgesinde gerçekleştirilen fosforilasyonun ise büyük ölçüde agregasyonu uyardığı da aynı çalışma ile tespit edilmiştir (39). Çözünabilir A β proteini insülin reseptörlerine bağlanır ve fonksiyonuna müdahale eder. A β bu reseptörü bloke ettiğinde fosfoinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt aktive olmaz. Akt GSK3 β 'yı inhibe etmekle görevlidir. Ancak Akt aktivasyonu gerçekleşmezse GSK3 β inhibe edilemez ve aktivitesi artar bu sayede tau hiperfosforilasyonu gerçekleşir. Cdk bir diğer kinaz proteindir. Alzheimerlı hastalarda Cdk aktivitesinde artış vardır. Cdk farklı

proteinlerle (p25, p35, p39) kompleks oluşturarak enzimatik aktivitesini gösterir. P25/Cdk kompleksi tau hiperfosforilasyonunda etkin kinaz kompleksidir (39). Son dönemlerdeki *in vivo* çalışmalara göre; Cdk5 inhibisyonunun beyindeki A β düzeyini düşürdüğü tespit edilmiş, ancak Cdk5'in inhibisyonunun GSK3 β aktivasyonuna yol açarak tau hiperfosforilasyonunu arttırdığı da ortaya konmuştur (39).

2.3. KAN-BEYİN BARIYERİ TRANSPORT PROTEİNLERİNİN KONSANTRASYONUNDA YAŞANAN DEĞİŞİMLER

Alzheimerlı beyinlerde yoğun olduğu tespit edilen reseptörlerden birisi de İleri Glikasyon Son Ürünleri için reseptörlerdir (RAGE). Bu reseptörlerin ligandları lipidler ve A β gibi ileri glikasyon son ürünleridir. Bu ligandlar protein ve lipidlere glikozun non-enzimatik bir biçimde eklenmesi ile oluşurlar (41). RAGE proteini 3 immüoglobülin benzeri bölgeden oluşmaktadır. V tipi bir immüoglobülin bölgesi vasıtasıyla ligand bağlanma bölgesi oluşturulur. C tipi kısım ise transmembran bir yapı ve sitoplazmik bir kuyruk oluşturur, bu sayede intraselüler sinyallerin alınması sağlanır. RAGE sinyalizasyonundaki artışın kronik inflamasyonun bir göstergesi olduğuna dair bulgular vardır aynı zamanda RAGE-ligand etkileşmelerinin oksidatif stresin artışıyla sonuçlanan hücre sinyalini tetiklediği de bilinmektedir. Bütün bunlar Alzheimerlı beyinlerde nöronlarda, mikroglia ve astrositlerde, beyindeki endotelial hücrelerde patolojik hasar oluşumuna yol açmakta, bu nedenle A β birikimi artmaktadır (Şekil 2.5) (42). Aynı zamanda RAGE'lerin proteolitik parçalanması ile oluşan "çözünbilir RAGE'lerin" A β 'nın kan-beyin bariyerini geçmesinde etkili olduğu da bilinmektedir.



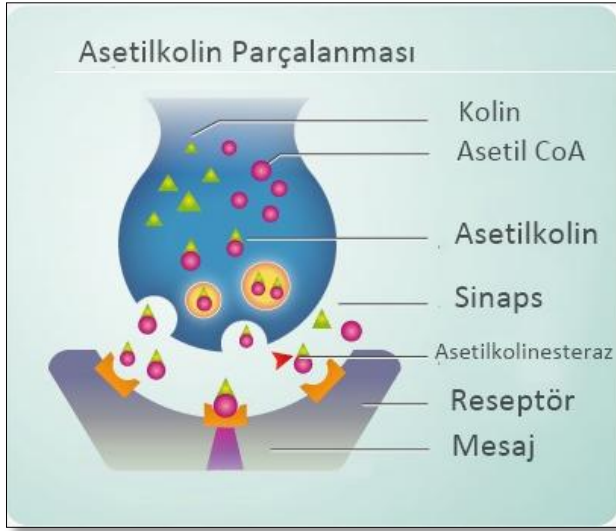
Şekil 2.5. A β proteinlerinin kapiler endoteliumda transportunda görevli yapılar (42)

LRP1 (Lipoprotein Reseptör Bağlı Protein 1) oldukça büyük bir tip 1 transmembran proteindir. 4,525 amino asitli bir protein olmasının yanı sıra, birbirine non-kovalent biçimde bağlı büyük (515 kDa) bir N-terminal ekstraselüler alt ünite ile 85 kDa bir C-terminal transmembran alt üniteden oluşur. A β proteininin boşaltılması heparan sülfat proteoglikan gibi bir A β -bağlayıcı protein vasıtasıyla gerçekleştirilir (30). Hem oligomerik hem de yumak halindeki A β proteini LRP1 için zayıf bir ligandır. LRP1 de A β transportu bazen de proteinin β -sekretaz, α -sekretaz ve γ -sekretaz tarafından kesilmesi vasıtasıyla gerçekleşir. Kesim işlemi sonucu oluşan LRP1'in intraselüler bölgesi transkripsiyonu regüle eder ve pek çok genin ekspresyonunu etkiler. Regüle edilen proteinlere interferon- γ ve APP de dâhildir. LRP1 bu şekilde de A β düzeyini etkilemektedir. Ayrıca Qianfeng ve ark. (31) tarafından farelerle yürütülen bir çalışma da alzheimerlı beyinlerde RAGE proteininin miktarında artış gözlenirken, LRP1 proteininin miktarında düşüş gözlenmektedir (Şekil 2.5).

2.4. ALZHEİMERLI BEYİNLERDE ABNORMAL DAĞILIM GÖSTEREN DİĞER RESEPTÖRLER

2.4.1. ASETİLKOLİN RESEPTÖRLERİ

Alzheimerda olduğu gibi pek çok nörodejeneratif hastalıkta da abnormal dağılıma sahip bir diğer reseptör grubu asetilkolin reseptörleridir. Alzheimerın erken evrelerinde bile azalma gösteren nikotinik ve muskarinik asetilkolin reseptörleri ile artış gösteren asetilkolinesteraz reseptörleri bunlardan bazılarıdır (43,44). Kolinerjik hipoteze göre nörotransmitter asetilkolin seviyelerindeki düşüş ve asetilkolin parçalanmasında anahtar görevi gören asetilkolinesteraz enzimi düzeyindeki artış Alzheimer'a yol açmaktadır (45). Asetilkolin (ACh) bir nöronun salınarak diğerine ait postsinaptik membrandaki reseptöre bağlanarak sinyal transferini sağlayan moleküldür. Bir çeşit serin proteaz olan asetilkolinesteraz (AChE) ise nöromusküler bağlantılarda ve kolinerjik beyin sinapslarında bulunur ve ACh'yi asetil ve koline parçalayarak sinyal iletimini durdurur (Şekil 2.6) (7).



Şekil 2.6. Asetilkolinesteraz etki mekanizması (46)

AChE'nin yoğun olduğu kolinerjik terminallerde A β birikiminin yoğun olduğu gözlenmiştir. Ayrıca son yıllarda AChE-A β kompleksinin A β 'ya bağımlı intraselüler Ca⁺² dereglasyonuna ve hipokampal nöronlarda mitokondriyal disfonksiyona yol açtığı ve bu durumun tek başına A β 'dan daha büyük bir hasara yol açtığı tespit edilmiştir (43). Aynı zamanda Alzheimer modeli farelerle yürütülen bir çalışmada BACE1 inhibisyonuyla A β seviyesi, hipokampal nöronlarda kolinerjik regülasyon sağlanarak hafıza kaybının gerilemesi sağlanmıştır (47).

2.4.2. DOPAMİNERJİK RESEPTÖRLER

Alzheimer ile ilişkisi tespit edilen bir diğer reseptör grubu ise dopaminerjik reseptörlerdir. Metabotropik G protein-bağılı reseptörler (GPCR) grubuna ait olup nörolojik proseslerde, kavrama ve öğrenme gibi yetilerde görevlidir. D1 benzeri ve D2 benzeri olmak üzere iki gruba ayrılırlar. D1 ve D2 öğrenme ve hafıza proseslerinde daha etkin olmakla beraber primer fonksiyonu prefrontal korteks de gösterdiği tespit edilmiştir (48). Son dönemlerde yürütülen çalışmalar D1 ve D2 reseptörlerinin cAMP/PKA sinyal yolağı vasıtasıyla sinaptik plastisite ve bilişsel fonksiyon kaybına yol açtığını ortaya çıkarmıştır (49). Dopaminerjik reseptör D2 agonisti Rotigotine ile yürütülen bir çalışmada; ilgili ilaç molekülünün Alzheimerlı bireylerin kortikal nöronlarda, motor kortekste ve bazal önbeyin kolinerjik nöronlarında D2-benzeri reseptörlerin ekspresyonundaki azalmayla ilişkili dopaminerjik iletimde bozulmaları etkilediği ortaya konmuştur (50). Son yıllarda yürütülen

çalışmalarda da dopamin D1 ve D2 reseptör agonistlerinin nöronlar için nöroprotektif bir etkisi olduğu ve terapötik önemleri tespit edilmiştir (50).

2.5. AMİLOİD BETA OLUŞUMU İLE TAU HİPERFOSFORİLYASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ

Alzheimerlı beyinlerde A β plaklarından çok tau hiperfosforilasyonu hafıza kaybı gibi fonksiyonların yitirilmesi ile ilişkilendirilmiş ancak bu iki mekanizmanın da birbirleri üstünde etkin olabilecekleri düşünülmüştür. Tau birikimi lokal bir nörodejenerasyona sebep olurken A β plaklarının spesifik bir bölgeyi pek çok bölge de hasara yol açtığı bu hususta da tau ile etkileştiği tespit edilmiştir (51). Zhuohao ve ark. (52) yabancı farelerde tau patolojisini indüklemek için tau proteinini intraserebral olarak enjekte etmiş ardından tau ekspresyonunun da endojen düzeylerindeki artışla birlikte amiloid kaskadın da aktive olduğu tespit edilmiştir. Aynı yöntemle A β proteini enjekte edildiğinde ise amiloid kaskat indüklenmesine rağmen tau proteini ve hiperfosforilasyon düzeyinde hiçbir değişiklik gözlenmemiştir (52).

Tau hiperfosforilasyonu ile A β birikimi arasındaki ilişki üzerine araştırmalar 2 proteini işaret etmektedir. Bunlardan birisi sıklıkla bahsi geçen GSK3 β proteini diğeri ise kalsinörin 1 düzenleyici proteinidir (RCAN1) (39). Buna göre A β peptitleri RCAN1 transkripsiyonunu ve GSK3 β seviyelerini arttırmaktadır. Bu şekilde bir çeşit tau protein fosfatazı olan kalsinörin seviyesi düşer ve tau hiperfosforilasyonu artar (13).

2.5.1. GSK-3 İZOFORMLARI VE ETKİN OLDUĞU MEKANİZMALAR

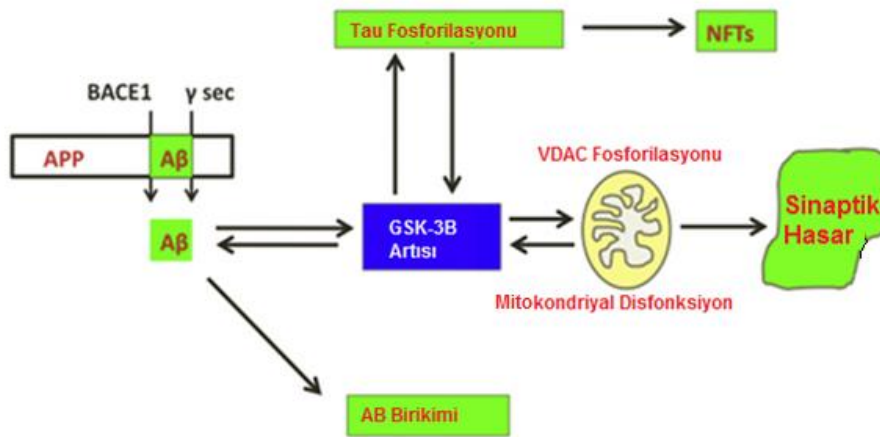
GSK-3 proteininin memelilerde yüksek homoloji gösteren iki izoformu vardır: GSK-3 alfa (GSK-3 α) ve GSK-3 beta (GSK-3 β) (Şekil 2.7) (53). Her iki izoform da beyinde yaygın olarak bulunmakla birlikte özellikle beta izoformu tüm beyin bölgelerinde bulunmaktadır.



Şekil 2.7. GSK-3 izoformları

Yürütülen pek çok çalışma GSK-3 α 'nın GSK-3 β yokluğunu kompanse edemediğini ortaya koymuştur böylece her iki izoformun farklı mekanizmaları etkilediği de anlaşılmıştır (54). Her iki izoform da temel de aktif olmalarına rağmen Akt proteini tarafından Ser21 (GSK-3 α) ya da Ser 9 (GSK-3 β) residülerinden fosforlanarak inaktive edilir. GSK3 β 'nın keşfedildiği günden itibaren büyüme, farklılaşma, embriyonik gelişim, apoptozis ve inflamatuvar yanıt gibi hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde görevli olduğu bilinmektedir. GSK3 α 'nın ise daha ziyade glikoz/glikojen homeostazında görevli olduğu, GSK3 β 'nın ise bu görevde sadece küçük bir katkısı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca GSK3 α 'nın merkezi sinir sisteminde düzenleyici bir rolü olduğu da tespit edilmiştir(54).

Son dönemde yürütülen çalışmalar hem Amiloid β patojenezinde hem tau hiperfosforilasyonunda hem de mitokondrial fonksiyon kaybının yaşandığı durumlarda GSK-3 β aktivitesinin arttığını göstermektedir (55,56). GSK-3 tau proteininin pek çok bölgesinin modifiye edilmesinde görevli temel tau kinazlardan biridir (56). Ly ve ark. tarafından yürütülen çalışmada GSK-3 β 'nin APP prosesindeki rolü incelenmiş ve GSK-3 β inhibisyonu ile APP kesiminde azalma gözlenmiştir; bir sonraki aşamada ise bu durum BACE1 seviyesindeki düşüşle açıklanmıştır (11). Ayrıca yine son çalışmalarda Alzheimer'lı dokularda voltaj bağımlı iyon kanalı 1 (VDAC1)'in heksokinazlardan ayrıldığı ve bu nedenle glukoz metabolizmasında yıkıma yol açtığı tespit edilmiştir. GSK-3 β 'nin aynı zamanda VDAC1'i fosforlayarak heksokinazlarla ayrılmasından da sorumlu olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.8) (55).



Şekil 2.8. Glikojen Sentez Kinaz 3 β ve Alzheimer Patolojisi

2.6. BİLGİSAYAR DESTEKLİ İLAÇ ETKEN MADDE GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

2.6.1. MOLEKÜLER MODELLEME

Teorik metodlarla bilgisayar üzerinde moleküllerin özelliklerinin ve davranışlarının hesaplanması ve simüle edilmesidir. Bahsi geçen moleküler özellikleri:

- Atomik pozisyonları (Atomların kartezyan koordinatları, bağ uzunlukları, bağ açıları ve dihedral açıları)
- Moleküler yüzeyleri (Atom pozisyonları ve atom yarıçaplarına bağlı olarak)
- Enerjileri (atomik mesafelerin, atom tipleri, bağ düzenlenmelerinden türetilmiş)dir.

İlk teorik hesaplamalar Heitler ve London (57) tarafından 1927 yılında quantum mekanik temellere dayalı olarak hidrojen atomları arasındaki bağın bağlanma özelliklerinin formülize edilmesinde kullanılmıştır. 1940'larda bilgisayar ile karmaşık atomik sistemlerin dalga fonksiyonlu çözümü ve 1950'lerde İngiltere'de semi-empirik atomik orbital hesaplamalarının bilgisayar yardımıyla yürütülmesi moleküler modellemenin temelini oluşturmuştur (58).

2.6.1.1. Simülasyon

Doğadaki nesnelere simüle edebilmek için hareketlerini bir denklemle ifade etmek isteriz. Bu denklem bize o nesnenin zaman içinde konumunun nasıl değiştiği ile ilgili bilgi verir. Bu denklem; ilk konum, ilk hız, kütle, çevresel etmenler'e bağlıdır.

Simülasyon teknikleri güçlü bilgisayarların gelişmesiyle bağlantılı bir şekilde gelişmektedir. Özellikle deneysel çalışmaların yetersiz kalması ve teorik hesaplamaların gerekliliği simülasyon alanında gelişmelerin artmasının nedenidir. Şu anda yaygın şekilde kullanılan teknikler; Monte Carlo, Moleküler Dinamik ve Yoğunluk Fonksiyonel Teorisidir.

2.6.1.1.1. Monte Carlo

Rastgele üretilen sayılardan faydalanılarak istatistiksel simülasyonlar Monte Carlo metoduyla yapılır. Monte-Carlo Nicholas Constantine Metropolis (1915-1999) tarafından

bulunmuştur ve Atom bombasının geliştirildiği Los Alamos Ulusal Laboratuvarında, bombanın patlamasından sonra dağılan nötronlara karşı kalkan modellemek için Stanislaw Ulam tarafından günümüze taşınmıştır (59,60).

Monte Carlo yönteminin uygulanma sebebi analitik olarak türetilmesi çok zor veya imkansız olan bazı dağılımların empirik olarak istenilen bilginin elde edilmesine olanak vermesidir. Bir nevi rastgele değerleri kullanarak istenen değeri keşfetmeye yarayan yaklaşımdır.

2.6.1.1.2. Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi

Newtonian dinamik; bir partikül ya da küçük bir parçacığın dinamiği üzerine çalışmaktadır. Kuantum mekanik ise madde ve ışığın atom ve atomaltı seviyelerde incelenmesidir. Simülasyonda kuantum mekanik hesaplamalar gerektiğinde kullanılan yöntem yoğunluk fonksiyonel teoridir. N elektronlu sistemlerin temel hal enerjilerinin hesaplanmasında kullanılan bir yöntemdir. Elektronların buldukları konumdaki potansiyel enerjilerinin hesaplanmasının yanı sıra birbirlerine uyguladıkları itme kuvvetinden kaynaklanan enerjinin de hesaplanmasını sağlayan yöntemdir.

2.6.1.1.3. Moleküler Dinamik

Makromoleküller ve daha büyük sistemlerin fizyolojik ortamda simüle edilmesi ve zaman içerisindeki değişimlerinin incelenmesidir. MD (moleküler dinamik) hesaplamalarında, atomik yük ve van der Waals etkileşimleri force-field'ler (kuvvet alanları) yardımıyla hesaplanır.

Force field (Kuvvet Alanı): Sistemdeki partiküllerin potansiyel enerjilerini tanımlamak için kullanılan matematiksel fonksiyonların parametreleri ve formudur. Moleküllerin daha önceden belirlenmiş atomik yük, açı ve dihedral açı gibi parametreleridir.

2.6.2. MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI

Çok parçacıklı sistemlerin simülasyonunda ise ilk konumların elde edilmesinde X-ray kristalografisi veya NMR yöntemleri kullanılır. Bu simülasyonda parçacıkların ilk hızları bilinemez, ancak parçacıklar belirli hız dağılımlarına (Maxwell -Boltzmann) uygun olarak dağıtılır. Gazların izotropik olma özelliği temel alınarak moleküllerin her yöne eşit oranda

dağılım göstermesini sağlayan fonksiyondur. Böylece parçacık hareketleri kısıtlanmadan simüle edilebilir. Daha sonra belirlenmiş çevresel koşullar altındaki hareketleri ve enerjileri hesaplanır.

2.6.3. HESAPLAMALI ÇALIŞMALAR VASITASIYLA GELİŞTİRİLEN İLAÇLARA ÖRNEKLER

Günümüzde sıklıkla kullanılan pekçok moleküler modelleme ürünü ilaç molekülleri vardır: Ticari adı TEVETEN® olan Eprosartan etken maddesi ile anhipertansif etki gösteren ilaç molekülü moleküler modelleme metoduyla geliştirilmiştir (61,62). Çalışmada hedefe dayalı ilaç geliştirme yöntemi kullanılarak angiotensin 2 reseptörüne antagonist etki gösteren bir molekül üzerinde çalışılmış ve uzun klinik deneyler sonrasında ticarileştirilmiştir.

Aynı şekilde migren tedavisinde kullanılan 5HT1 reseptörü agonisti Zolmitriptan ilaç etken maddesi de ZOMIG® ticari adıyla kullanılan bir moleküler modelleme ürünüdür (63).

2.7. ALZHEİMER İÇİN YÜRÜTÜLMÜŞ İLAÇ ETKEN MADDE GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

A β peptidlerinin oluşumunda prekürsör görev gören APP proteininin intramembran bölgesinin postranslasyonel modifikasyonlara uğramış olduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalığında hedef noktalardan birisi bu proteininin ilgili modifikasyonlara uğramasını ve olgunlaşmasını engellemektir. Bunlardan birisi APP proteininin glikozilasyonunda görevli cAMP bağımlı protein kinaz A'nın (PKA) inhibisyonudur. Bunun için bilinen 2 selektif cAMP bağımlı protein kinaz inhibitörü; H89 ve PK1 kullanılmıştır (64). Çalışmaya göre her iki inhibitör eklenmesi durumunda da hücrelerde A β oluşumunda azalma gözlenmiş bunun yanı sıra her iki inhibitör de hücrelerde sitotoksositeye yol açmamış, MTT hücre yaşam testi sonucuna göre de hücre yaşayabilirliğinde azalma gözlenmemiştir (64).

Bir diğer ilaç etken madde geliştirme stratejisi ise A β mekanizmasında APP'nin kesimi üzerine çalışmalardır, bu noktada Notch, voltaj kapılı sodyum kanalı altünitelerinin kesimi gibi selektif inhibitörlerin geliştirilmesi (alternatif substratları etkilemeksizin) son derece önemlidir (65).

Tau hiperfosforilasyon mekanizmasında proteazlar gibi bir diğer görevli grup da fosfatazlardır. En önemli protein fosfataz ise PP2A'dır. Bu nedenle PP2A'da bir ilaç etken madde geliştirme hedefi haline gelmiştir. Günümüzde alzheimer ilacı olarak kullanılan N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti memantinin oksalik asit ile indüklenmiş PP2A inhibisyonu vasıtasıyla hippocampal lamel kültüründe tau hiperfosforilasyonunu engellediği görülmüştür (39). PP2A'nın durdurulması için bir diğer yaklaşım ise Asparajil endopeptidazların (AEP) inhibisyonudur (38).

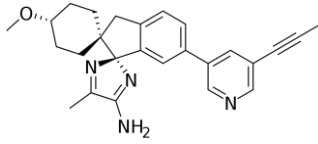
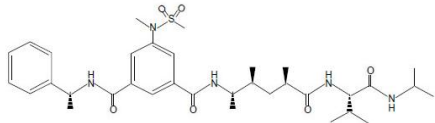
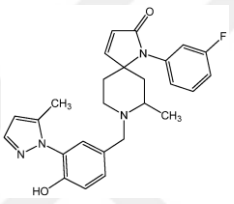
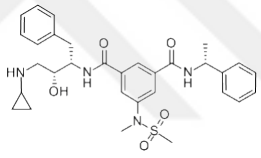
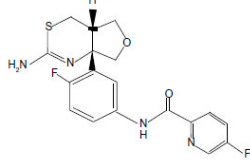
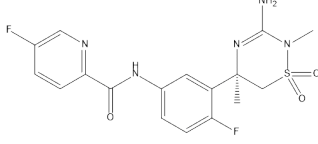
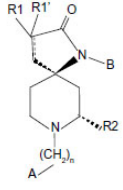
Son yıllarda, İleri Glikasyon Son Ürünleri için Reseptörleri de (RAGE) dikkat çekmiştir. A β oluşumunda ve tau hiperfosforilasyonunda etkili ilaçlardan ziyade RAGE inhibitörleri A β 'nın kan-beyin bariyerini aşmasını ve A β 'nın beyinde birikimini engellemektedir. Üzerinde yoğun olarak çalışılmış 2 tane RAGE inhibitörü (TTP488, FPS-ZM1) bulunmakdadır (38). Bunlardan RAGE antagonisti TTP488; reseptörün A β ile etkileşimini keserek beyindeki birikimi önlemektedir. İnsan denekler üzerindeki çalışmaları sonucunda düşük dozlarında herhangi bir yan etki gözlenmezken; 12 aylık tedavinin uygulandığı küçük bir grupta A β ve tau biyobelirteçlerinde bir değişim gözlenmemiştir (38). Yüksek doz uygulamasının yapıldığı grupta ise nasıl geliştiği bilinmeyen bir yan etki gözlenmiş bilişsel gerileme yeniden ortaya çıkmıştır (38). Aynı şekilde FPS-ZM1 ise model organizmalarla çalışılmaktadır. Bu molekülün de V tipi bölgeye bağlanarak hem A β bağlanmasını hem de RAGE aktivasyonunu önlediği tespit edilmiştir.

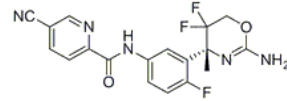
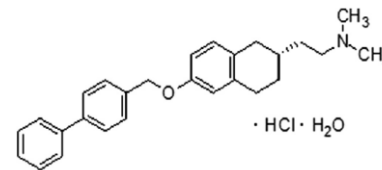
2.7.1. PREKLİNİK ÇALIŞMALAR TAMAMLANAN İLAÇ MOLEKÜLLERİ

2.7.1.1. Beta Sekretaz İnhibitörleri

APP kesim mekanizmasında görevli bir diğer proteaz enzimi ise β sekretaz ve özellikle BACE1'dir. β sekretazlar aktif bölgesindeki kısıtlayıcılıktan ötürü inhibitör geliştirilmesi zor bir reseptördür, ancak düşük farmakokinetik ve farmasötik özelliklere sahip birtakım küçük moleküller mevcuttur (29,66). Farklı fazlarda klinik denemeleri süren pek çok BACE1 inhibitörü bulunmaktadır (Çizelge 2.1) (67). Eli Lilly İlaç Firması ilk oral non-peptidik BACE1 inhibitörünü (LY2811376) geliştirmiş, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri de son derece memnun edici bulunmuştur (67). Günümüzde Merck'in MK-8931'i en ileri fazdaki (2/3) ilaç molekülü iken AstraZeneca, Eisai ve Pfizer'e ait diğer ilaçların faz 1 veya 2 çalışmaları sürmektedir (67).

Çizelge 2.1. Klinik denemeleri süren BACE-1 inhibitörleri (küçük moleküller)

Firma	İlaç	Kimyasal Formül	Faz
AstraZeneca/Lilly	AZD3293		Faz 2/3
CoMentis	CTS-21166		Faz 1
Eisai/Biogen Idec	E2609		Faz 2
High Point	HPP854		Faz 1
Lilly	LY2886721		Faz 2
Merck	MK-8931		Faz 2/3
Pfizer	PF-05297909		Faz 1

Roche	RG7129		Faz 1
Takeda	TAK-070		Faz 1

2.7.1.2. Asetilkolin Esteraz inhibitörleri

Günümüzde etkin olarak kullanılan Alzheimer ilaçlarının pek çoğu (donepezil, galantamin, rivastigmin, takrin) asetilkolinesteraz reseptör inhibitörleridir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Asetilkolinesteraz inhibitörleri (12,68).

İlaç Molekülü	Yan Etki
Takrin	FDA onayına sahiptir. Bilişsel fonksiyon kaybı ve davranış bozukluklarını düzelttiği tespit edilmiş olmasına rağmen hastalarda transaminaz seviyelerini yükselttiği bu nedenle de karaciğer üzerinde bazı yan etkileri olabileceği tespit edilmiştir.
Donepezil	FDA onayına sahiptir. Takrin'deki dezavantajların giderilmesi amaçlanmıştır. Piperidin taşıyan bir moleküldür. Asetilkolinesteraz selektivitesi; bütirikolinesteraza göre yüksektir. Kısa ve uzun süreli uygulamalarında bilişsel faaliyetlerin düzeltilmesinde oldukça faydalı olduğu, aynı zamanda tipik kolinerjik ilaçlara göre tolere edilebilirliği yüksek, yan etkisi düşük bir ilaç olduğu tespit edilmiştir.
Rivastigmin	Prekilink çalışmaları merkezi sinir sistemine büyük bir selektivite göstermiştir. Bilişsel faaliyetleri arttırdığının tespiti üzerine faz 3 klinik çalışmalarına kadar ilerletilmiştir. Bu çalışmalara göre 612 mg/gün dozunda günlük

	aktivitelerin, bilişsel faaliyetlerin ve davranışların düzenlenmesi sağlanmıştır.
Galantamin	Alzheimer tedavisinde onaylı son ilaçtır. Kompetitif allosterik AChE inhibitörü olmasının yanı sıra; nikotinik asetilkolinesterazların (nAChE) allosterik modülatörüdür. Son derece elverişli farmakokinetik özellikler göstermiştir. Göreceli olarak kısa bir yarı-ömür, yüksek biyoyararlanım gösterir, kolayca kontrol altına alınabilecek yan etkileri vardır.
Metrifonat	Preklinik çalışmalarda bilişsel performansda gelişme gözlenmiştir. Klinik çalışmalarına geçilmiş bu aşamada da günlük faaliyetlerde ve davranışlarda düzelme gözlenmiştir. Ayrıca ilaç bütün klinik çalışmalarda iyi tolere edilmiş belirgin bir laboratuvar anormalliği gözlenmemiştir.
Fenserin	Klinik olarak da test edilmiş ilaç molekülü asetilkolinesteraza bütirkolinesteraza göre 50 kat daha fazla afinite gösterir. Takrin ve Fizostigmine göre bilişsel faaliyetlerde daha yüksek bir iyileşme gözlenmiş ve bunlara göre daha az toksik bulunmuştur. Yarı ömrünün 8 saati geçtiği aynı zamanda %100 oral biyoyararlanımı olduğu tespit edilmiştir.
Ganstigmin	Yeni nesil AChE inhibitörlerindedir. Bütirkolinesterazlara da selektivitesi yüksektir. Faz 2 klinik deneylerde de karşılaşılan yan etkiler çalışmaların durdurulmasına yol açmıştır.

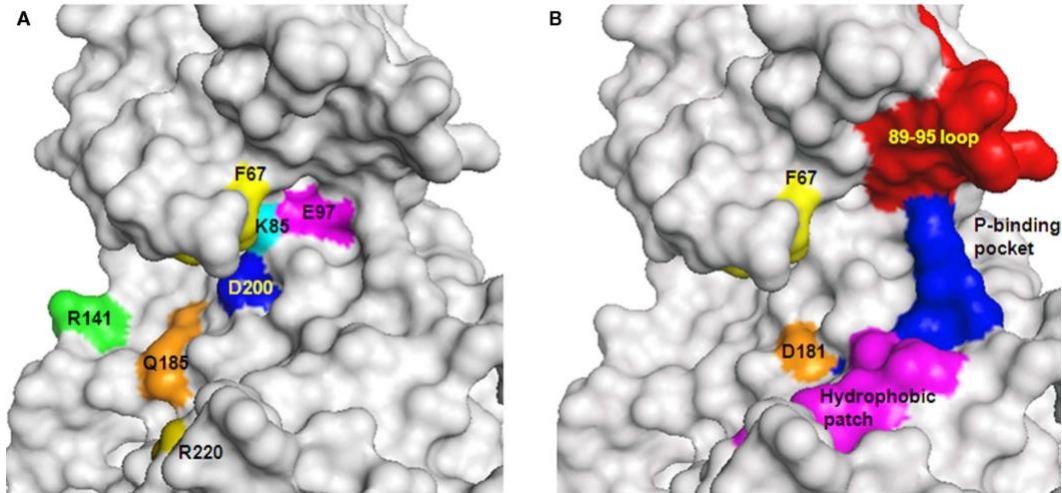
AChE inhibitörlerinin etki mekanizması tam anlaşılammış olmasına rağmen; APP işlenmesi sürecini negatif etkilediğine ve bu kanalla etki gösterdiğine yönelik bulgular tespit edilmiştir (12). Özellikle Takrin'in APP işlenmesinde görevli olduğu tespit edilir

iken metrifonat, fizostigmin gibi bazı inhibitörlerin sAPP üretiminde etkin olmadığı gözlenmiştir (12).

2.7.1.3. GSK-3 Proteini ve Klinik Olarak Kullanılan İnhibitörleri

GSK-3 proteini de diğer protein kinazlar gibi; ATP bağlanmasından sorumludur. Diğerlerine göre daha küçük bir N-terminal lob ve daha büyük küresel C-Terminal bölgesini içeren, korunmuş bir katalitik domainin bi-lobal bir mimari ile katlanmasından oluşur (Şekil 2.9) (69). C-terminal domaini korunmuş bir aktivasyon ilmeği içerir ve bu ilmek kinaz aktivitesi için oldukça önemlidir. Tirosin residüleri bu aktivasyon ilmeğinde bulunmaktadır ve GSK-3 aktivasyonu bir çeşit şaperon bağımlı oto fosforilasyon olayıdır (69).

GSK-3 aktivitesi ayrıca katalitik domain dışı bölgeden de regüle edilebilmektedir. N-terminal uçta yüksek oranda korunmuş bir RPRTTSF motifi bulunur ve bu motif serin de bir fosforilasyon olduğunda bir oto-inhibitor pseudosubstrat gibi çalışır (69). GSK-3β'nın C-terminalinde bulunan bir başka bölge (Thr 390) de şimdilerde inhibitör bölge olarak tespit edilmiştir (70). Bazı örneklerde GSK-3 aktivitesinin düzenleyici proteinlerle etkileşimi ile de düzenlendiği görülmüştür. GSK-3 ve presenilin proteininin etkileşimi vasıtasıyla amiloid β üretiminin düzenlenmesi buna bir örnektir (71).



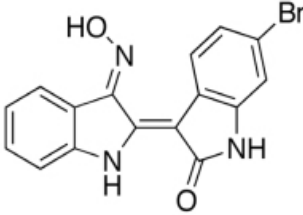
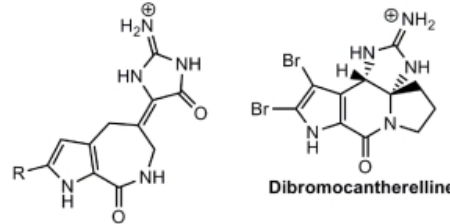
Şekil 2.9. GSK-3 etkileşim bölgeleri. A) ATP ve ATP-bağlanma bölgesi inhibitörlerinin etkileştiği residüler. B) Substratlarla etkileşen residüler(sarı, kırmızı), Fosfat bağlanma bölgesi (mavi), pseudosubstratlarla etkileşen bölge (turuncu), inhibitör moleküllerle etkileşmesi öngörülen hidrofobik alan (pembe)

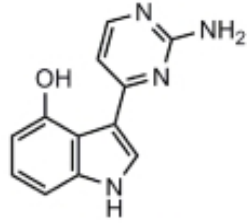
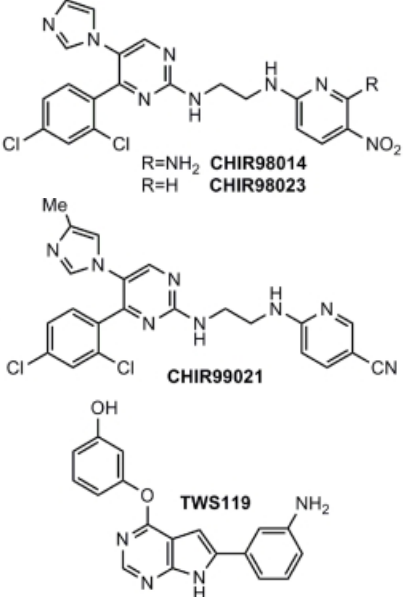
2.7.1.3.1. Klinik olarak kullanılan GSK-3 İnhibitörlerine örnekler

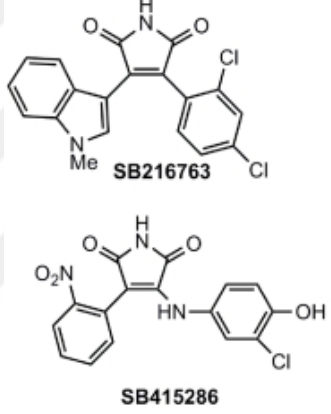
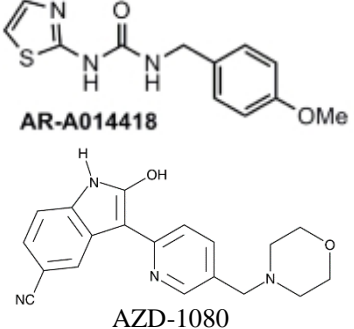
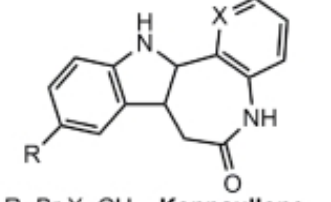
GSK-3 hücre siklusu için temel teşkil eden proteinlerden biri olduğu için inhibisyonunun sağlıklı hücrelerde verdiği zarar yüksek olabilmektedir. Çizelge 2.3’de (69) pek çok farklı fazlarda GSK-3 inhibitörleri verilmiştir. Bunlardan en bilineni lityumdur. Lityum özellikle hedef spesifitesi düşük olduğu için kötü yan etkileri olmuş ve yüksek toksisite göstermiştir. 2006 yılında klinik deney aşamasına gelen AZD-1080 (AstraZeneca) ve NP-12/Tideglusib (Noscra) isimli ilaç molekülleri bulunmaktadır. Ancak AZD-1080 araştırmaları nefrotoksik özelliği nedeniyle faz 1 klinik denemeleri esnasında durdurulmuştur (69).

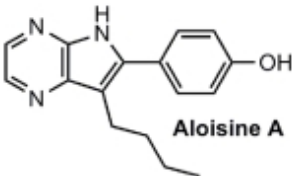
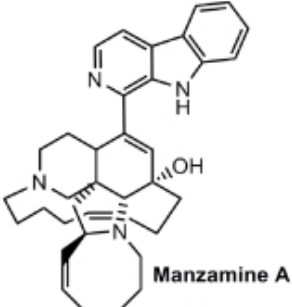
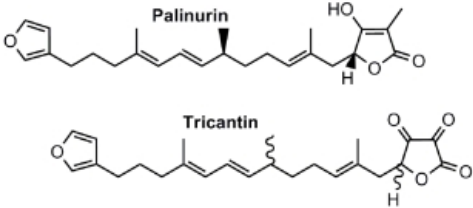
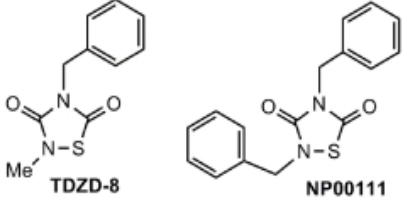


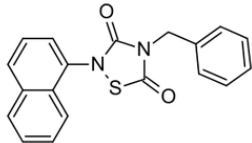
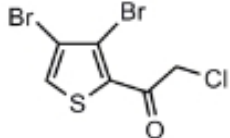
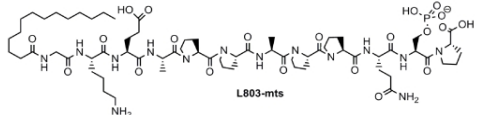
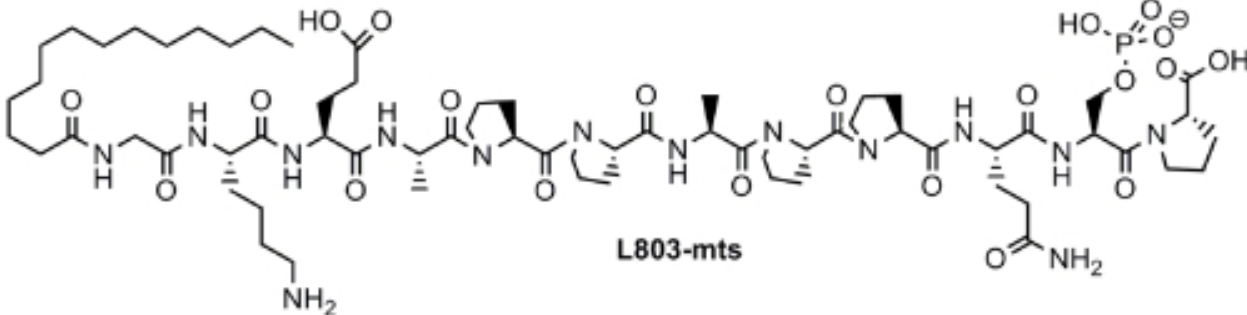
Çizelge 2.3. GSK-3 inhibitörleri ve etki mekanizmaları

Tip	Kaynak	İnhibitör	Açık Formül	İnhibisyon Potansiyeli (IC ₅₀)	Biyolojik Aktivite	İlaç Geliştirme Aşaması
Kasyonlar	İnorganik Atom	Lityum		2 mM	Duygu durumu dengeleyici, nöroprotektif, Alzheimer modellerinde terapötik etki (tau ve amyloid)	Bipolar bozuklukta referans ilaç, Alzheimer için umut verici sonuçlar
		Çinko		15 µM	Antidepresan	-
		Tungstat		İndirekt inhibisyon	tau hiperfosforilasyonunda gerileme	Pre-klinik
ATP-yarışmalı	Deniz canlıları	İndirubinler 6-BIO	 <p>6-bromoindirubin-3'-oxime (6-BIO)</p>	5-50 nM 1.5 µM	Nöroprotektif, akson formasyonu, düşük tau hiperfosforilasyonu	Pre-klinik
		Himentialdisin Dibromokantrellin	 <p>R=Br Himentialdisine R=H Debromohimentialdisine</p>	10 nM 3 µM	tau hiperfosforilasyonunda gerileme, nöroprotektif	Pre-klinik

		Meridyenler	 <p>Meridianine A</p>		tau hiperfosforilasyonunda gerileme	-
Organik Sentez	Aminopirimidinler	CT98014 CT98023 CT99021 TWS119	 <p>R=NH₂ CHIR98014 R=H CHIR98023</p> <p>CHIR99021</p> <p>TWS119</p>	0.6-7 nM	<p>Doğal nöron gelişimini uyarır, Embriyonik kök hücrelerin yenilenmesini destekler, düşük tau hiperfosforilasyonu.</p> <p>Nöronal farklılaşmayı uyarır, Embriyonik kök hücrelerin yenilenmesini destekler.</p>	-

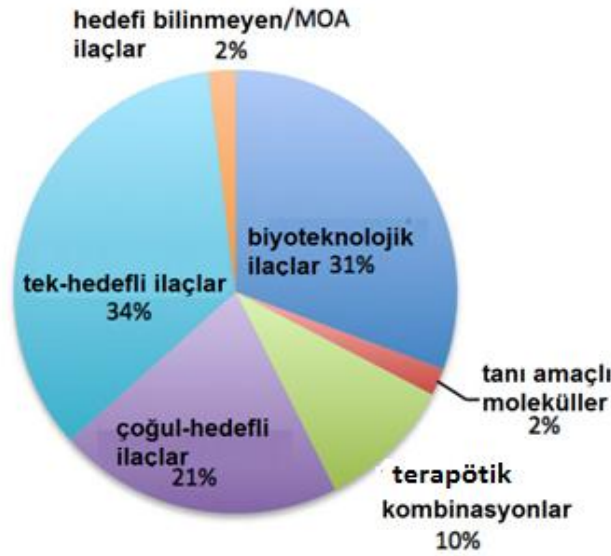
		<p>Arilindolmalemid SB-216763 SB-415286</p>	 <p>SB216763 SB415286</p>	<p>34 nM 77 nM</p>	<p>Nöroprotektif, Alzheimer Hastası ve şizofren modellerinde törapötik etki</p>	<p>Pre-klinik</p>
		<p>Thiazoller AR-A014418 AZD-1080</p>	 <p>AR-A014418 AZD-1080</p>	<p>104 nM n.r.</p>	<p>Nöroprotektif, antidepresif ve anti-manik aktivite, Alzheimer Hastası ve ALS modellerinde terapötik etki</p>	<p>- Faz 1 Klinik Faz sonrası geri çekildi</p>
		<p>Paullonlar Kenpaullon Alsterpaullon Kazpaullon</p>	 <p>R=Br X=CH Kenpaullone R=NO₂ X=CH Alsterpaullone R=CN X=N Cazpaullone</p>	<p>4-80 nM</p>	<p>nöroprotektif, tau hiperfosforilasyonunu ve amyloid β üretimini düşürür.</p>	<p>Pre-klinik</p>

		Aloisinler	 <p>Aloisine A</p>	0.5-1.5 μ M	Hücre çoğalmasını bloke eder.	-
ATP-yarışmasız	Deniz Canlıları	Manzaminler Manzamin A	 <p>Manzamine A</p>	1.5 μ M	tau hiperfosforilasyonunda gerileme,	-
		Furanoseskiterpenler Palinurin Trikantın	 <p>Palinurin Trikantın</p>	4.5 μ M 7.5 μ M	tau hiperfosforilasyonunda gerileme,	-
	Organik Sentez	Thiadiazolidindoller TDZD-8 NP00111 NP031115 NP031112(tideglusib)	 <p>TDZD-8 NP00111</p>	2 μ M 2 μ M 4 μ M n. r.	nöroprotektif, tau hiperfosforilasyonunun ve amyloid β üretimini düşürür, antidepresan, lokomotor aktiviteyi etkiler, omurilik hasarı sonrası doku yenilenmesi	Alzheimer için Faz 2b

			<p>Tideglusib</p> 			
	Halometilketonlar HMK-32		 <p>HMK-32</p>	1.5 μ M	tau hiperfosforilasyonunda gerileme, nöroprotektif	-
Peptidler	L803-mts		 <p>L803-mts</p>	40 μ M	Nöroprotektif, antidepresif aktivite, akson morfojenezi	Pre-klinik
	L803-mts	 <p>L803-mts</p>				

2.8. ÇOKLU HEDEFE YÖNELİK İLAÇ ETKEN MADDE GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

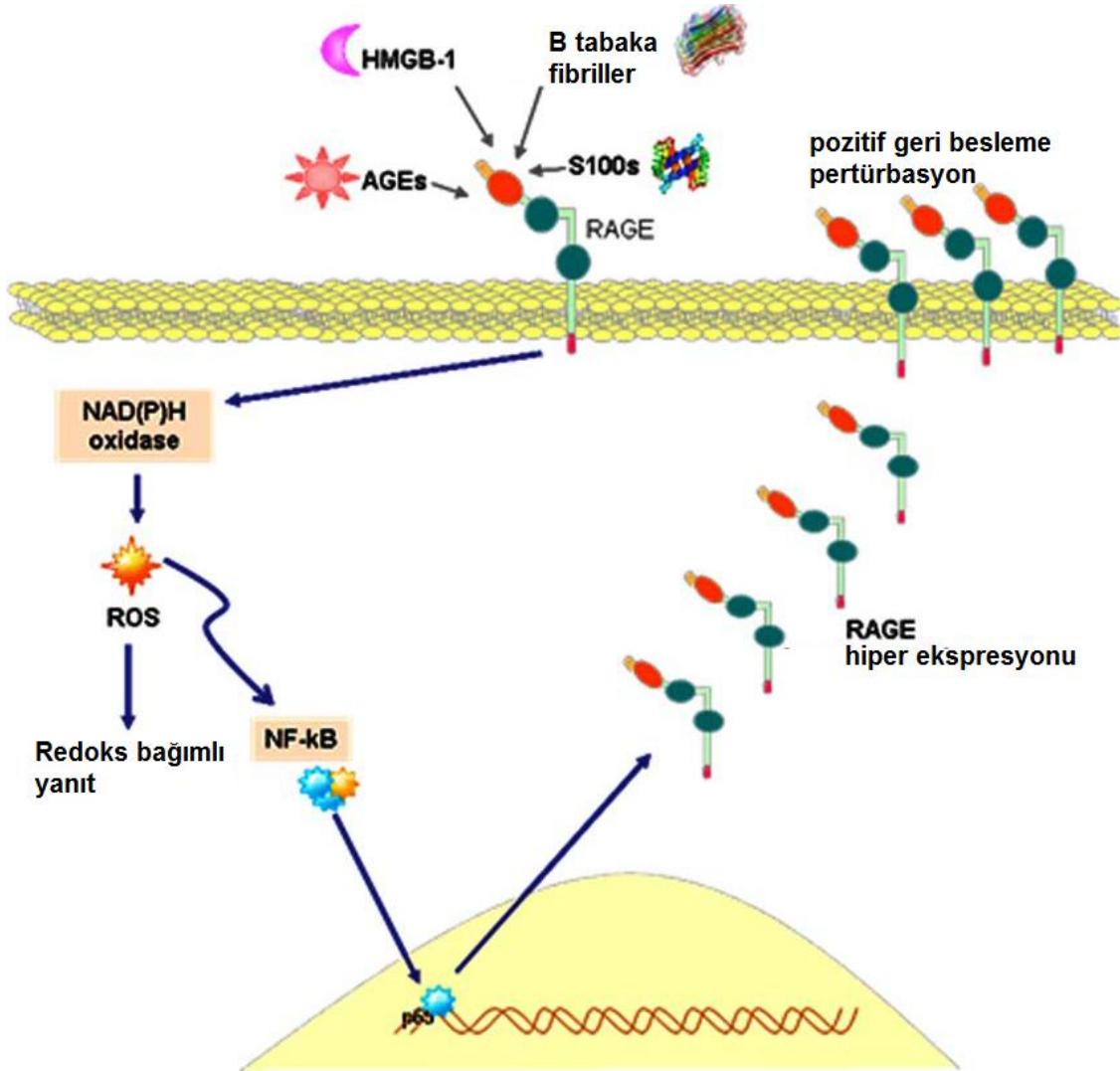
Yüksek Hızda Aktivite Tarama (HTS), rasyonel ilaç geliştirme alanlarındaki hatırı sayılır gelişmelere ve ilaç geliştirme alanında sarf edilen büyük efora rağmen ortaya başarıyla konan ilaç molekülünde büyük bir artış gözlenmemiştir. Klinik denemeler ve biyolojik sistemlerdeki yeni gelişmeler tek-hedefli ilaç geliştirmede her zaman istenilen etkiyi göstermemektedir. Bunun nedeni de hastalığa yol açan tek bir mekanizma kapatıldığında organizma diğer yollarla hastalığı yeniden ortaya çıkarmakta, ilaç molekülünü etkisiz hale getirmektedir (72). Böylece özellikle kanser, metabolik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve Alzheimer gibi kompleks hastalıklar için çoklu hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmaları büyük önem kazanmaktadır. 2000 yılında ilk çoklu hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmaları başladığından bu yana yeni ilaç etken madde geliştirme alanında sıcak gündem oluşturmaktadır. Öyle ki 2015-2017 yılları arasında piyasaya çıkan FDA onaylı ilaçların %21'i çoklu hedefe yönelik ilaç molekülleridir (Şekil 2.10) (73).



Şekil 2.10. 2015-2017 yılları arasında farklı alanlardan FDA başvurularına ait pasta diyagramı (73)

Alzheimer hastalığı için de bazı çoklu hedefe yönelik ilaç etken madde geliştirme çalışmaları yürütülmüş, Cui ve ark. (74) hem A β agregasyonunu önleyen hem de RAGE proteinini inhibe eden bir molekül geliştirmeyi hedeflemiştir. Bunun için Çin'e özgü tıbbi

bitkilerden *Cistanche*, *Epimedium*, *Acorus gramineus*, *Poria*, *Astragalus*, *Rhodiola*, *Polygala*, *Gynostemma*, *Tianma*, *Angelica*, *Sophora*, *Rehmannia*, *Cnidium fruit*, *Alpinia oxyphylla Miqand* ve *Ligustrum lucidum* ile yürütülen çalışmada Matrine molekülü yeni bir ilaç adayı olarak tespit edilmiştir. Matrine'nin A β 42' nin yol açtığı nörotoksisiteyi ve A β 42 agregasyonunu önlediği aynı zamanda RAGE'in aşırı ekprese edildiği SH-SY5Y hücre hatlarında A β 'nın indüklediği RAGE-NF- κ B sinyalizasyonunda (Şekil 2.11) da zayıflamaya yol açarak RAGE aktivasyonunu düşürdüğü tespit edilmiştir (74).



Şekil 2.11. RAGE bağımlı NF-Kb aktivasyonu (75).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

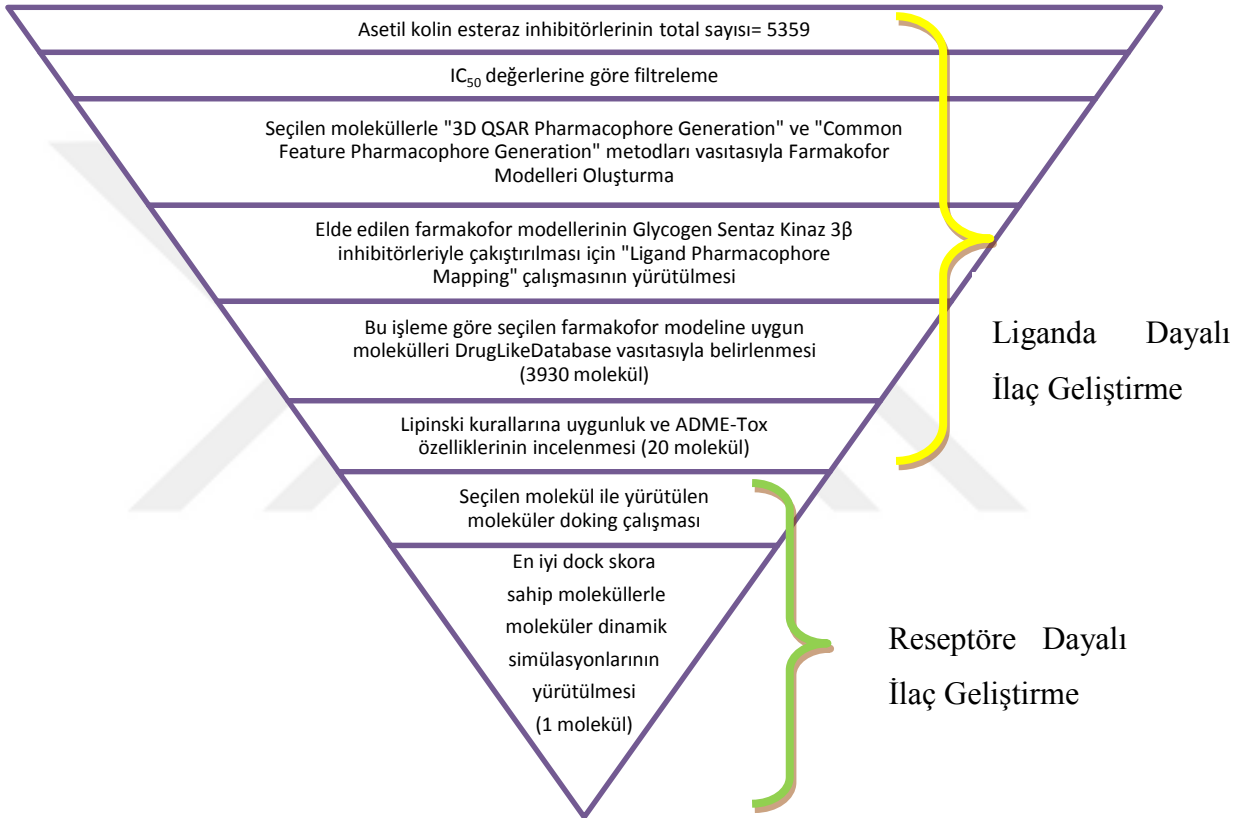
Alzheimer Hastalığı pek çok mekanizmanın bir araya gelmesiyle meydana gelmektedir. Hali hazırda klinik olarak kullanılan ilaç molekülleri tek bir reseptöre özgü olarak tasarlanmıştır. Ayrıca bu ilaç molekülleri sadece basit, semptomatik, kısa dönemli bir tedavi sağlamaktadır. 3D farmakofor geliştirme çalışmaları ve bununla beraber yürütülen moleküler dinamik simülasyonları yeni önder bileşiklerin geliştirilmesi sürecini büyük ölçüde hızlandırmakta ve çok yönlü bir çalışma yapılmasına olanak sağlamaktadır. Bu tez ile Alzheimer Hastalığıyla ilişkili birçok reseptörün fonksiyonlarını regüle eden yeni önder ilaç etken maddesi olabilecek moleküllerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bilgisayar destekli ilaç geliştirme çalışmaları sayesinde milyonlarca molekül çok kısa bir zamanda taranarak yeni önder ilaç moleküllerinin keşfedilmesi mümkündür. Sıcaklık, pH, çözünürlük, membran özellikleri gibi pek çok parametre kullanılarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar öncesi; ilacın hücre içine alınması, reseptörlerle bağlanma afiniteleri, itrahi ve hatta toksisitesi üzerine önemli bir durum tespiti yapılması sağlanmaktadır.

Bu tez kapsamında özellikle ülkemiz populasyonunda hızla artış gösteren Alzheimer hastalığına yönelik çalışmalarda bulunularak; hem Glikojen Sentaz Kinaz 3 β hem de asetilkolin esteraz enzimleri üzerinde etkili, kimyasal olarak sentezlenebilir, *in vitro* ve *in vivo* deneylere uygun, patentlenebilir bir ilaç adayı molekülün geliştirilmesinin sağlanması amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında izlenen basamaklar aşağıdaki iş-akış şemasında verilmiştir. Bu yöntemle asetil kolin esteraz inhibitörleriyle geliştirilen farmakofor modellerinin Glikojen Sentaz Kinaz-3 β inhibitörleriyle örtüşmesi test edilmiş; aynı akış şemasında Glikojen Sentaz Kinaz-3 β inhibitörleriyle geliştirilen farmakofor modellerinin asetilkolin esteraz inhibitörleriyle test edilmesi ile de elde edilen tüm farmakofor modellerinin başarısı tartışılmıştır.



Şekil 4.1. Çalışmada yürütülen basamaklara dair iş akış şeması

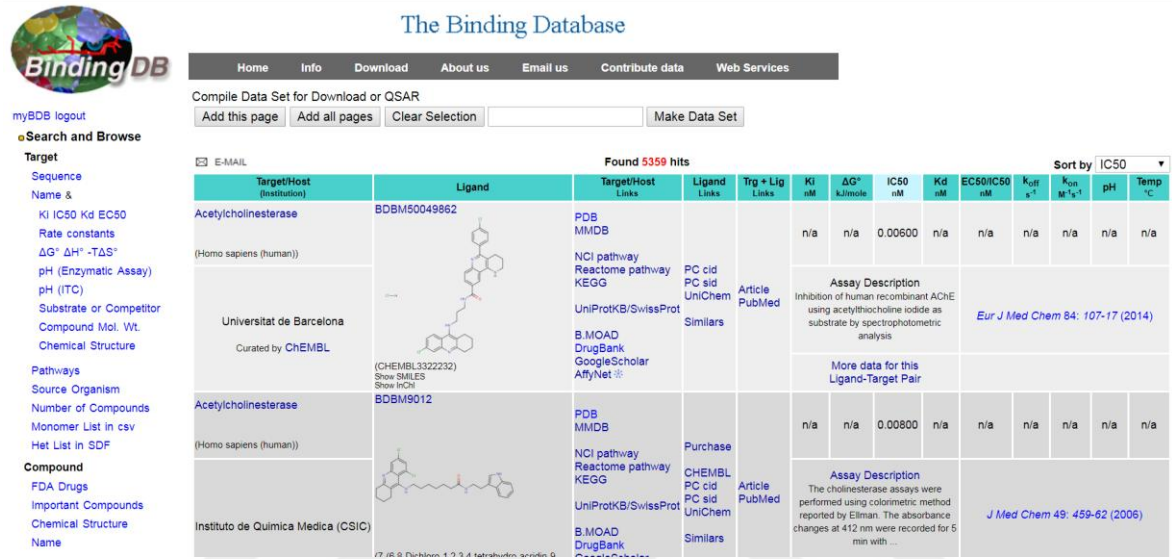
4.1. MATERYAL

4.1.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILACAK LİGANDLARIN BELİRLENMESİ

Çalışmada kullanılacak ligandların belirlenmesi için BindingDB (76) veri tabanı kullanılmıştır. Veritabanında öncelikle asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden moleküller ardından ise Glikojen Sentaz Kinaz-3 β enzimini inhibe eden moleküller tespit edilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3).

4.1.1.1. Asetilkolin esteraz İnhibitörleri

BindingDB veritabanında yürütülen tarama sonucu 5359 adet molekül tespit edilmiş (Şekil 4.2), bu moleküllerin IC₅₀ verilerine göre sıralaması yapılarak en düşük IC₅₀ değerlerine sahip moleküllerle HipHop, farklı özellikte IC₅₀ değerlerine sahip moleküllerle de 3D QSAR yöntemleriyle farmakofor geliştirme çalışmaları yürütülmüştür.

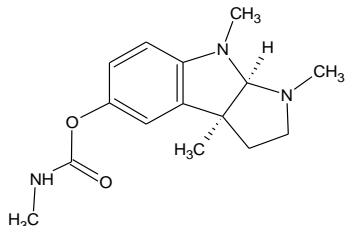


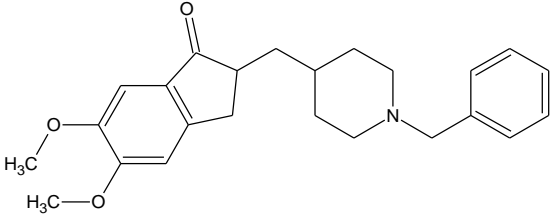
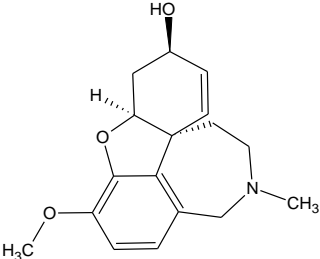
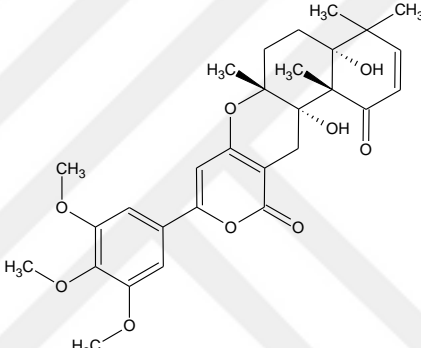
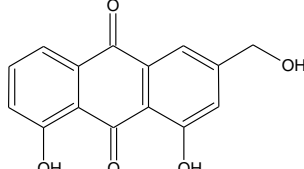
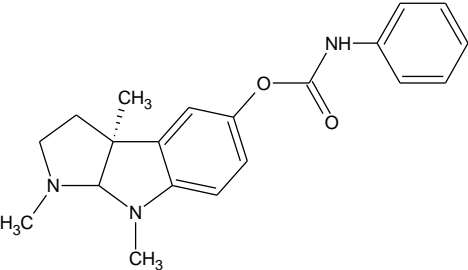
Target/Host (Institution)	Ligand	Target/Host Links	Ligand Links	Trp + Lig Links	Ki nM	ΔG° kJ/mole	IC50 nM	Kd nM	EC50/IC50 nM	Koff s ⁻¹	KOn M ⁻¹ s ⁻¹	pH	Temp °C
Acetylcholinesterase (Homo sapiens (human)) Universitat de Barcelona Curated by ChEMBL	BDBM50049862 (CHEMBL332232) Show SMILES Show InChI	PDB MMDB NCI pathway Reactome pathway KEGG UniProtKB/SwissProt B.MOAD DrugBank Google Scholar AffyNet	PC cid PC sid UniChem Similar	Article PubMed	n/a	n/a	0.00600	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Acetylcholinesterase (Homo sapiens (human)) Instituto de Quimica Medica (CSIC)	BDBM9012 (CHEMBL332232) Show SMILES Show InChI	PDB MMDB NCI pathway Reactome pathway KEGG UniProtKB/SwissProt B.MOAD DrugBank	Purchase CHEMBL PC cid PC sid UniChem Similar	Article PubMed	n/a	n/a	0.00800	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

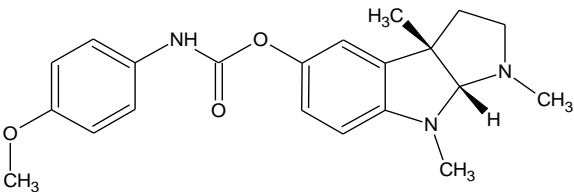
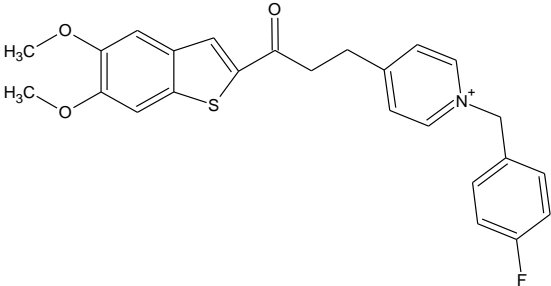
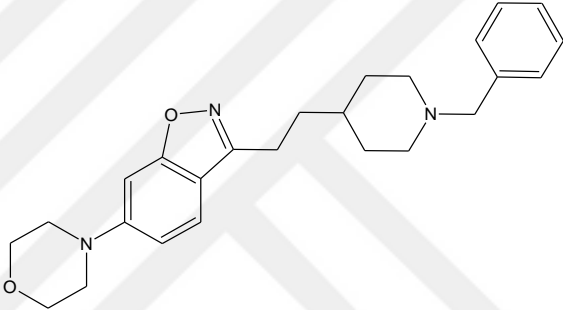
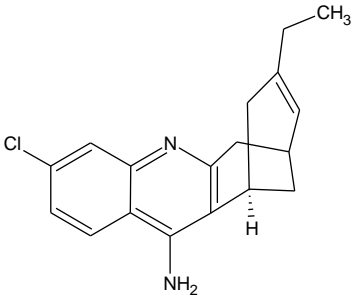
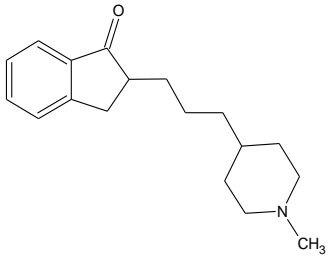
Şekil 4.2. BindingDB veritabanında yürütülen Asetilkolinesteraz inhibitörleri taraması sonucu

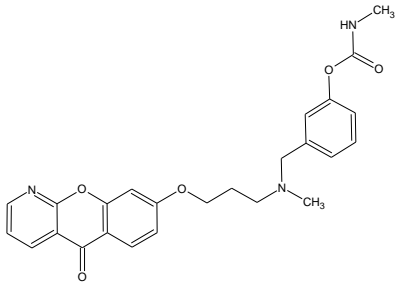
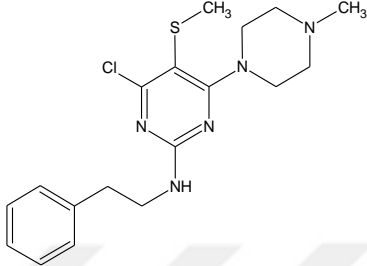
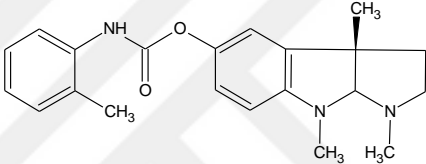
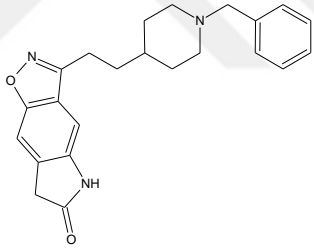
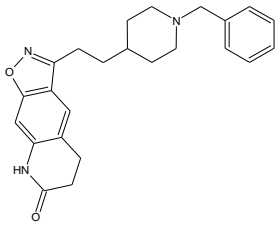
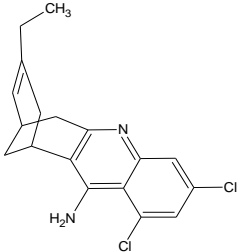
Veritabanında yürütülen tarama sonucu IC₅₀ değerlerine göre seçilen inhibitör moleküller ve IC₅₀ değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

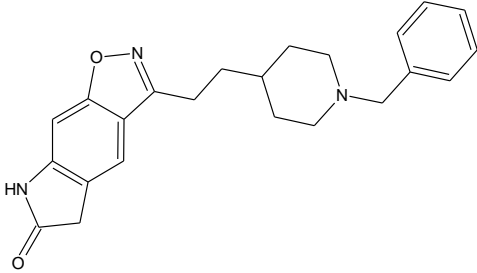
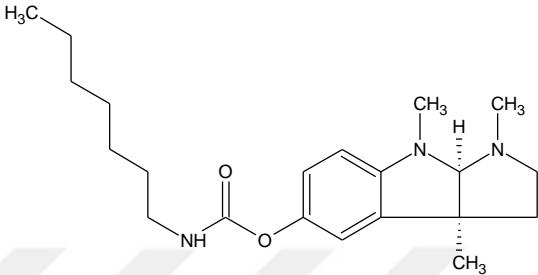
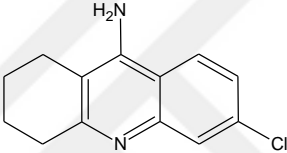
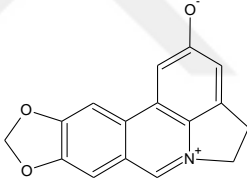
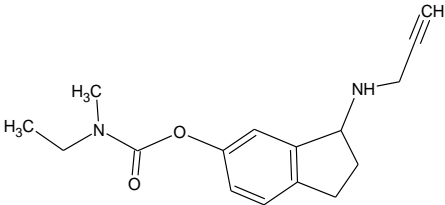
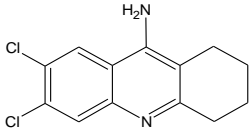
Çizelge 4.1. Farmakofor analiz çalışmalarında kullanılmak üzere BindingDB veritabanından seçilen Asetilkolinesteraz inhibitörleri

Bileşik	IC ₅₀ (nM)	Bileşiğin Açık Formülü
Fizostigmin	0.43	

Donepezil	8	
Galantamin	530	
Territrem	6	
Aloemodin	18	
Fenserin	22	

BDBM50014107	230	
BDBM50117612	2.6	
CHEMBL93936	0.809	
Huprineks	0.32	
CHEMBL263322	1.5	

CHEMBL131827	1.1	
BDBM50028685	0.72	
Tolserin	10	
BDBM50032163	0.95	
BDBM50032164	0.57	
BDBM50094630	1.39	

Ikopezil	0.33	
Eptastigmin	22	
CHEMBL486698	1.8	
Ungeremin	0.038	
Ladostigil	920	
Takrin	470	

4.1.1.2. Glikojen Sentaz Kinaz 3β İnhibitörleri

BindingDB veritabanında yürütülen tarama sonucu 4930 adet molekül tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

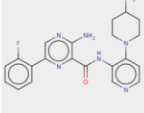
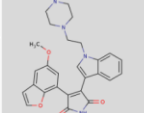
The Binding Database

Home Info Download About us Email us Contribute data Web Services

Compile Data Set for Download or QSAR

Add this page Add all pages Clear Selection Make Data Set

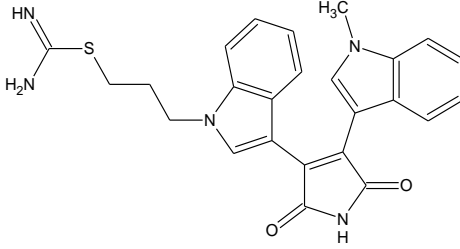
E-MAIL Found 4930 hits Sort by IC50

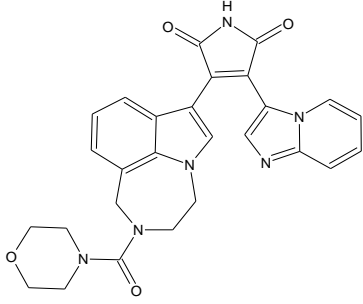
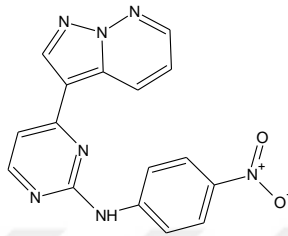
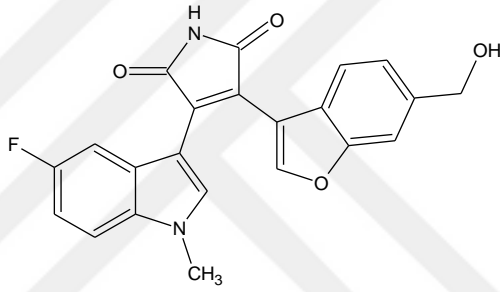
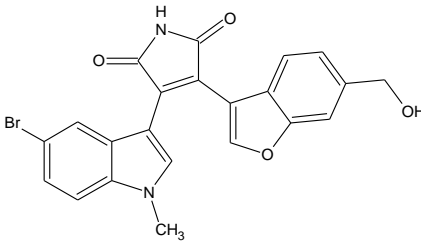
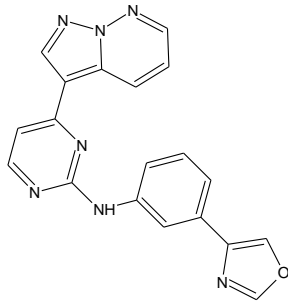
Target/Host (Institution)	Ligand	Target/Host Links	Ligand Links	Trg + Lig Links	Ki nM	ΔG° kJ/mole	IC50 nM	Kd nM	EC50/IC50 nM	Koff s ⁻¹	Kcon M ⁻¹ s ⁻¹	pH	Temp °C
Glycogen synthase kinase-3 (Homo sapiens (human))	BDBM251572  (US9452998, Table 4 Compound 2) Show SMILES Show InChI	PDB MMDB NCI pathway Reactome pathway KEGG UniProtKB/SwissProt	PC cid UniChem	US Patent	n/a	n/a	0.100	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
NOVARTIS AG US Patent		B.MOAD DrugBank GoogleScholar AtfyNet											
Glycogen synthase kinase-3 (Homo sapiens (human))	BDBM50293306  (3-(5-methoxybenzofuran-7-yl)-4-(1-(2-(4-	PDB MMDB NCI pathway Reactome pathway KEGG UniProtKB/SwissProt	CHEMBL PC cid UniChem	Article PubMed	n/a	n/a	0.140	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Sterling Road Curated by ChEMBL		B.MOAD DrugBank GoogleScholar	Similar										

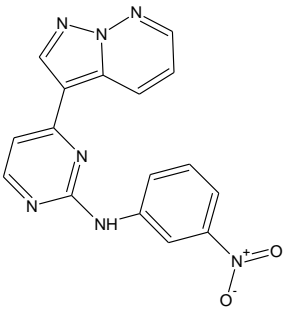
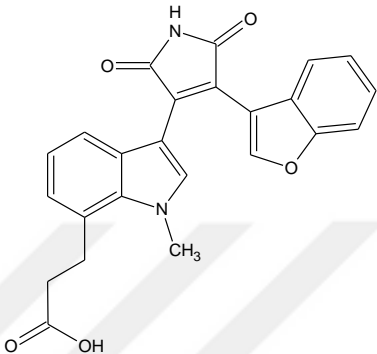
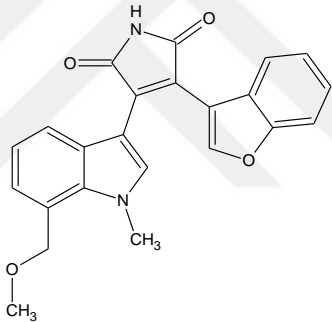
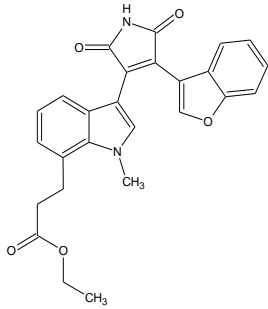
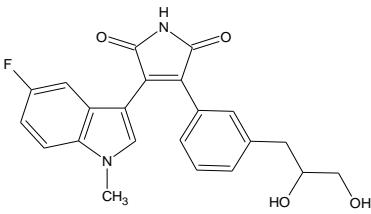
Şekil 4.3. BindingDB veritabanında yapılan Glikojen Sentaz Kinaz 3β inhibitörleri taraması sonucu

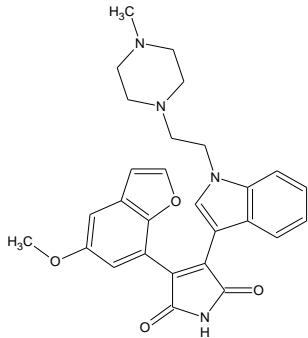
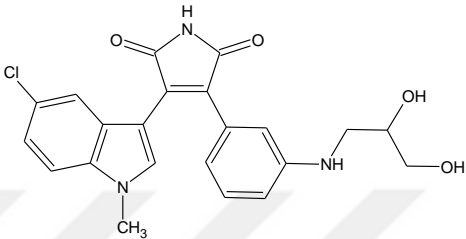
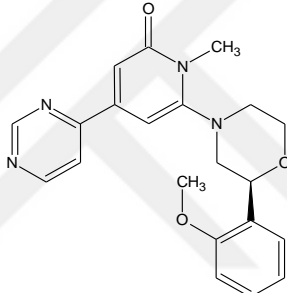
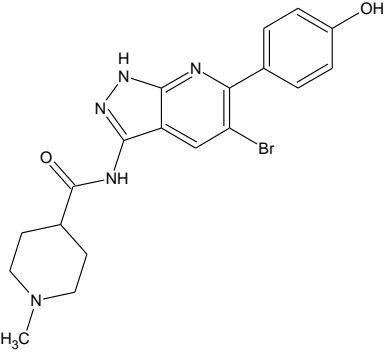
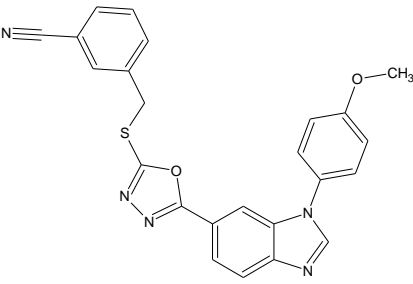
Veritabanında yapılan tarama sonucu IC₅₀ değerlerine göre seçilen inhibitör moleküller ve IC₅₀ değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

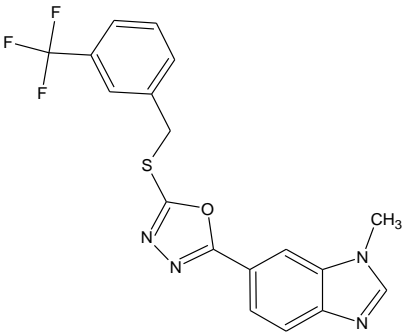
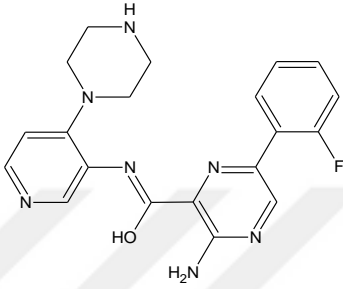
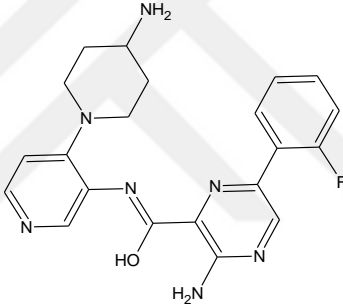
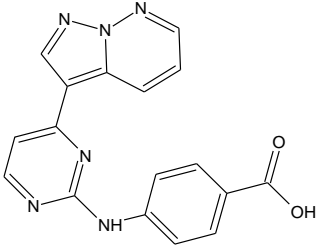
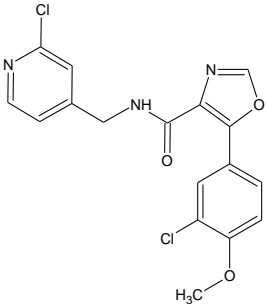
Çizelge 4.2. Farmakofor analiz çalışmalarında kullanılmak üzere BindingDB veritabanından seçilen Glikojen Sentaz Kinaz 3β inhibitörleri

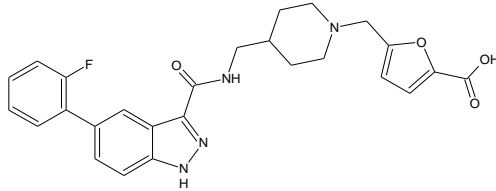
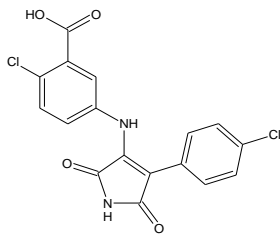
Compound	IC ₅₀ (nM)	Açık Formül
BDBM3175	2.80	

BDBM50150698	1.3	
BDBM50293152	5	
BDBM50267461	0.35	
BDBM50267607	0.51	
BDBM50293155	8.0	

BDBM50293153	2	
BDBM50267802	1.2	
BDBM50267760	0.23	
BDBM50267801	10	
BDBM50312998	1.8	

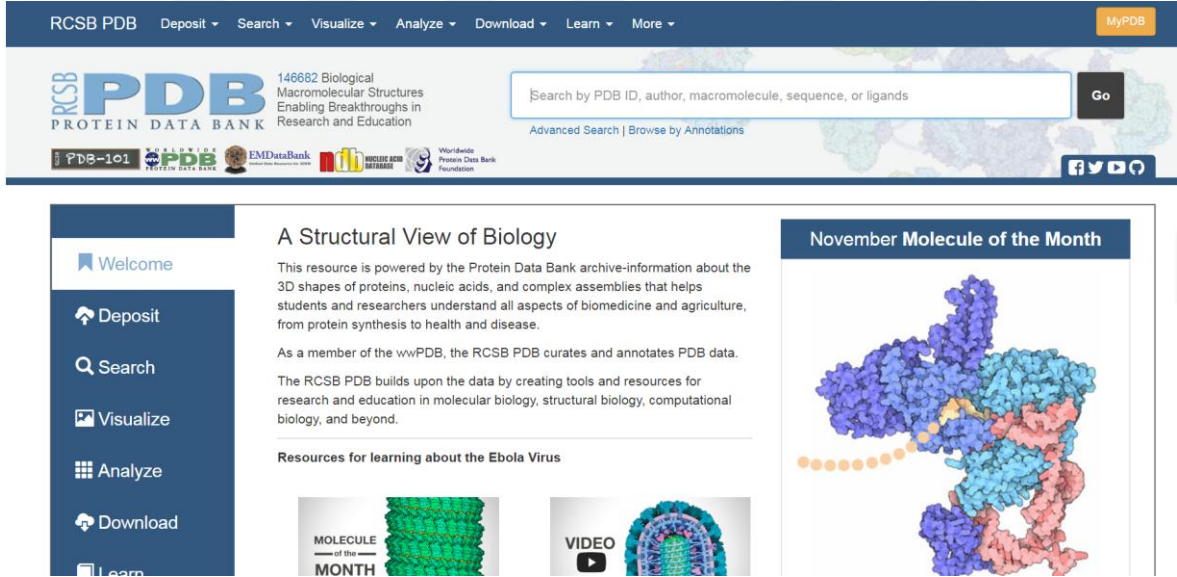
BDBM50293306	0.14	
BDBM50312996	0.4	
BDBM50337557	6.1	
BDBM8359	1	
BDBM31587	2.3	

BDBM31588	9.4	
BDBM251576	0.2	
BDBM251572	0.1	
BDBM50293157	50	
BDBM50026830	20	

BDBM186203	20	
BDBM8272	109	

4.1.2. MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARINDA KULLANILACAK RESEPTÖRLERİN BELİRLENMESİ

İlgili reseptörlerin tespiti için RCSB protein veritabanı (77) (Şekil 4.4) kullanılarak reseptörlerin aktif yöreleri, içerdikleri inhibitör moleküller ve X-ray çözünürlükleri incelenerek en uygun 3D protein yapıları seçilmiştir.



The screenshot displays the RCSB PDB website interface. At the top, there is a navigation menu with options: Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, Learn, and More. A search bar is prominently featured with the text 'Search by PDB ID, author, macromolecule, sequence, or ligands'. Below the search bar, there are logos for various databases and organizations, including PDB-101, FDB, EMDataBank, and the Worldwide Protein Data Bank Foundation. The main content area includes a 'Welcome' message, a 'Deposit' button, and a 'Search' button. A featured section titled 'A Structural View of Biology' provides information about the Protein Data Bank archive and its role in advancing research in molecular biology. To the right, there is a 'November Molecule of the Month' section featuring a 3D protein structure model.

Şekil 4.4. 3D yapıların tespitinde kullanılan RCSB PDB protein veri bankası

4.1.2.1. Asetilkolinesteraz Reseptörleri ve 4EY7'nin 3D yapısı

Asetilkolinesteraz proteini için veritabanında bulunan protein yapılarının bazıları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Reseptörün biri katalitik bölgede diğeri periferel bölgede olmak üzere

iki adet aktif bölgesi bulunmaktadır. Reseptörlere bağlanan inhibitörlerin etki bölgesi de açıklama kısmında belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Protein Veri Bankasında bulunan Asetilkolin esteraz enzimleri

RSCB Erişim Kodu	Çözünürlük (Å)	Açıklama
5HF6 (78)	2.3	Reseptör organofosfat zehirlenmelerinde kullanılan bir inhibitör olan paraokson ile kompleks halindedir.
4M0E (79)	2	Doğal bir ürün olan dihidrotaşinon molekülü reseptörün peripheral aktif bölgesine tutunmuş halde kristallendirilmiştir.
4M0F (79)	2.3	Territrem reseptörün katalitik aktif bölgesine tutunmuş halde kristallendirilmiştir.
4EY7 (80)	2.3509	Reseptör klinik olarak kullanımı bulunan donepezil molekülüyle kristallendirilmiştir.

Çözünürlük değerleri birbirine çok yakın olduğundan inhibitör moleküller üzerinden inceleme yapılmış, literatürde daha önceden yürütülen pek çok çalışmada (81,82) 4EY7'nin kullanılmış olması nedeniyle Asetilkolinesteraz proteini için 4EY7 kodlu 3D yapısı tercih edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5.Gri baloncuk yapı aktif bölge içerisindeki donepezil molekülünü, sarı işaretli rezidüer aktif bölgeyi oluşturan aminoasitleri göstermektedir.

4.1.2.2. Glikojen Sentaz Kinaz 3 β Reseptörleri ve 1Q41'in 3D yapısı

Glikojen Sentaz Kinaz 3 β enzimi daha önce de bahsedildiği üzere hem ATP bağlanma bölgesi üzerinden hem de bu bölgeye komşu hidrofobik bir bölge olan inhibitör bağlanma bölgesi üzerinden etkileşmektedir (Şekil 2.9). RSCB Protein veritabanından alınan 3D yapılar inhibitör özellikleri, bağlanma bölgeleri, kristallendirilme çözünürlükleri ve GSK-3 β 'ya ait fasta sekansı (UniProtKB-P49841) ile yürütülen karşılaştırma üzerinden değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4).

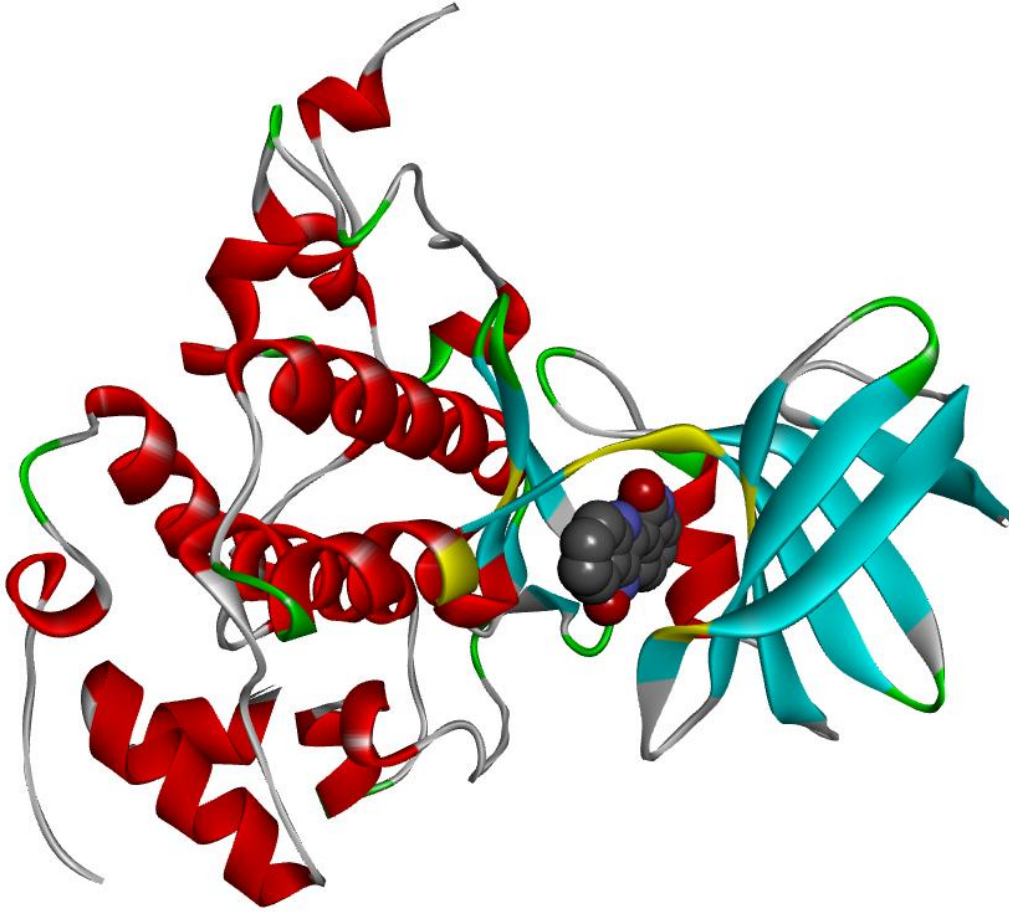
Çizelge 4.4. Protein Veri Bankasında bulunan Glikojen Sentaz Kinaz 3 β enzimleri

RSCB Erişim Kodu	Çözünürlük (Å)	İnhibitör	Bağlanma Paketi	Fasta Sekansı ile Örtüşme (%)
1O6L (83)	1.6	AMP-Pnp	ATP bağlanma bölgesi	24.93

		Yarışmalı inhibitör		
1Q41 (84)	2.1	İndurubin-3-monoksim	İnhibitör bağlanma bölgesi GSK-3 β 'yı fosforile ederken tau proteinin fosforilasyonuna engel olur.	98.82
1Q5K (85)	1.94	AR-A014418 Antagonist	İnhibitör bağlanma bölgesi	98.57
1H8F (86)	2.8	HEPES Protein çözücü solvent (inhibitör değil)	-	99.15

Fasta sekansı ile örtüşme Chimera (87) moleküler modelleme programı vasıtasıyla Needleman-Wasch Algoritması temel alınarak incelenmiştir. Aminoasit sekans dizisi ile en çok örtüşen 1H8F kodlu yapı olmasına rağmen hem çözünürlüğü düşük olduğu için hem de temel alınacak bir bağlanma paketini bünyesinde taşımadığı için seçilmemiştir. Bu nedenle 1Q41 kodlu 3D yapı seçilmiştir. Ayrıca GSK-3 β inhibitörleri incelendiğinde ATP-yarışmasız inhibitörlerin daha iyi bir terapötik etki yarattığı tespit edilmiş (69), bunun nedeni olarak da:

- 1) ATP bağlanma bölgesi dışından gerçekleşen bağlanmanın kinaz reseptörlerine selektiviteyi arttırdığı gözlenmiştir.
- 2) Yarışmasız inhibitörlerin IC₅₀ değerleri daha düşük bulunmuştur.
- 3) Alzheimer gibi kronik hastalıklar için daha uygun olduğu tespit edilmiştir (69).



Şekil 4.6. Gri baloncuk yapı aktif bölge içerisindeki indirubin molekülünü (Corey-Pauling-Koltun moleküler gösterimi), sarı işaretli rezidüler aktif bölgeyi oluşturan aminoasitleri göstermektedir.

4.2. YÖNTEM

İlaç adayı moleküllerin keşfi noktasında 2 farklı yöntem izlenmektedir:

4.2.1. LİGANT TABANLI İLAÇ TASARIMI

Etki gösteren moleküllerin yapısından reseptör yapısının yorumlanmasına dayalı ilaç etken madde tasarımıdır. Temeli farmakofor analizine dayanır.

Farmakofor: ilaç molekülünün reseptör ile en iyi şekilde etkileştiği, biyolojik aktiviteyi sağlayan bölgesidir.

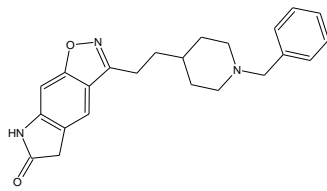
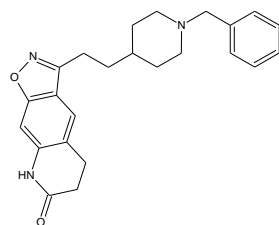
Çalışmamız kapsamında Discovery Studio Client 3.5 (DSC) (88) programı içerisindeki “3D QSAR Pharmacophore Generation” modülüyle IC_{50} değerleri kullanılarak, “Common

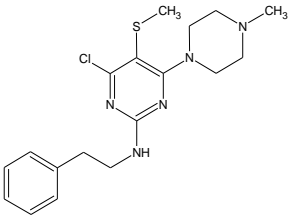
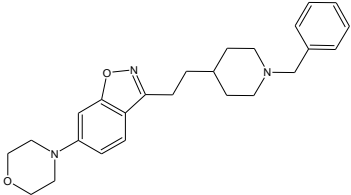
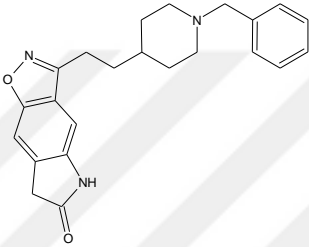
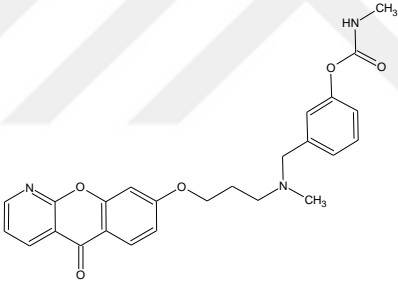
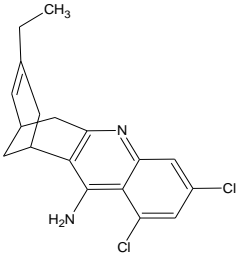
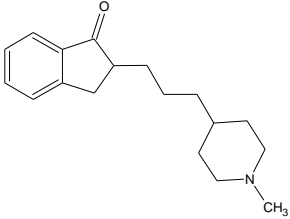
Features Pharmacophore Generation” modülüyle de HipHop metodu vasıtasıyla farmakofor modelleri geliştirilmiştir.

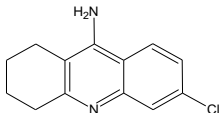
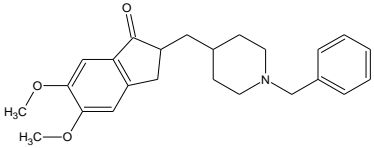
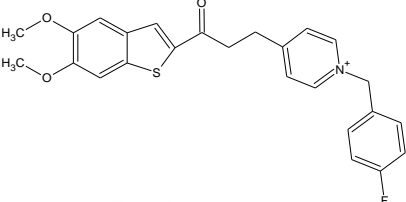
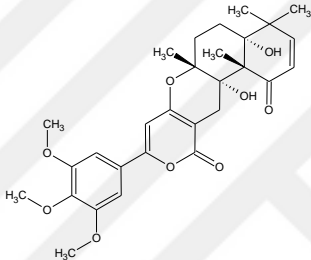
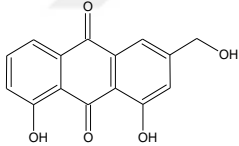
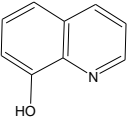
4.2.1.1. 3D QSAR Farmakofor Modelleme

IC₅₀ değerleri literatürde de belirtildiği üzere (89–92) 3D QSAR farmakofor modelleme çalışmalarının temelini oluşturmaktadır. Moleküllerin 2 boyutlu yapıları ACD/ChemSketch 5.11 programı (93) vasıtasıyla çizilirken, 3 boyutlu yapıları ise DSC programı vasıtasıyla oluşturulup “H” atomları eklenmiştir. Çizilmiş yapılar DSC'deki "clean geometry" opsiyonu ile fiğlendikten sonra optimizasyon protokolü için DSC içerisinde yer alan Adopted Basis set Newton Raphson (ABNR) metodu ve CHARMM force field kullanılmıştır. Ardından yine aynı programın “simulation” protokolü ile küçük bir moleküler dinamik uygulanarak minimizasyon işlemi tamamlanmıştır. Çalışma setindeki moleküller vasıtasıyla farmakofor modelleri oluşturulmuş, test setindeki moleküllerle de farmakofor test edilmiştir. “Test” ve “çalışma” seti içerisindeki moleküller **Hata! Başvuru aynağı bulunamadı.** ve Çizelge 4.8’da verilmiştir.

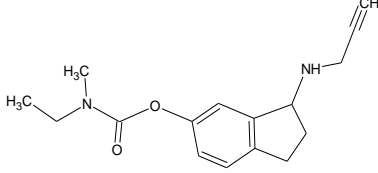
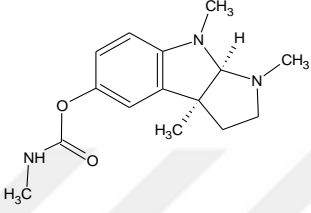
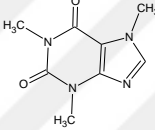
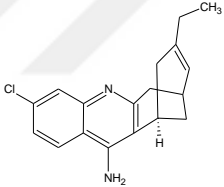
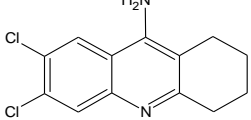
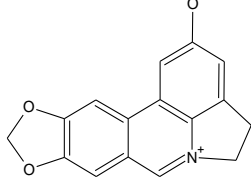
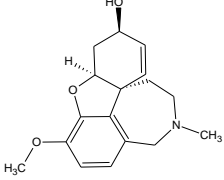
Çizelge 4.5. 3D QSAR Farmakofor oluşturmada çalışma seti olarak kullanılan Asetilkolin esteraz inhibitörleri ve biyolojik etkileri

Bileşikler	Molekülün Açık Formülü	IC ₅₀ (nM)
İkopezil		0.33
BDBM50032164		0.57

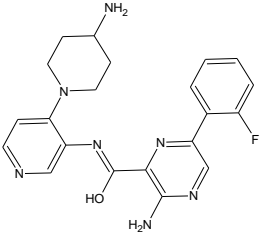
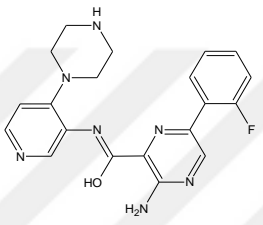
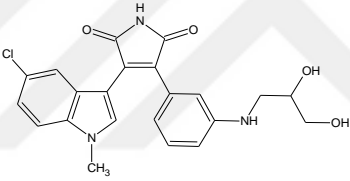
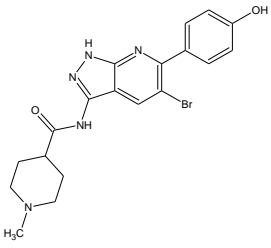
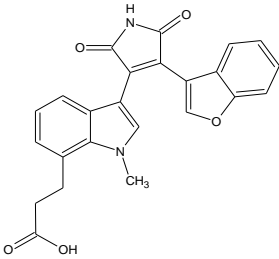
BDBM50028685		0.72
CHEMBL93936		0.809
BDBM50032163		0.95
CHEMBL131827		1.1
BDBM50094630		1.39
CHEMBL263322		1.5

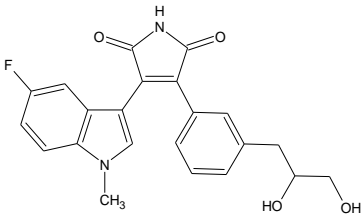
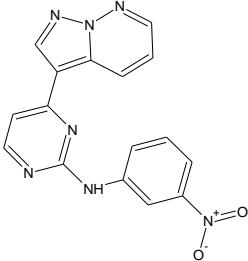
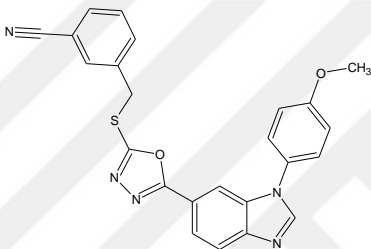
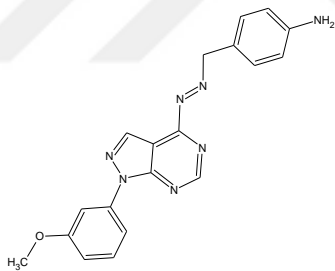
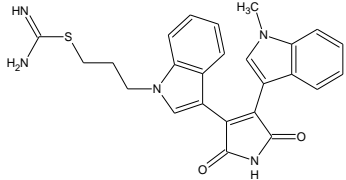
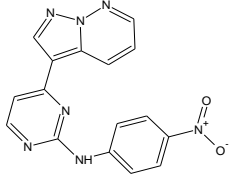
CHEMBL486698		1.8
Donepezil		8
BDBM50117612		2.6
Territrem		6
Aloemodin		18
Oksikinolin		230

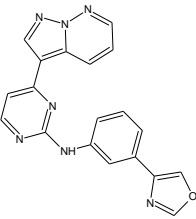
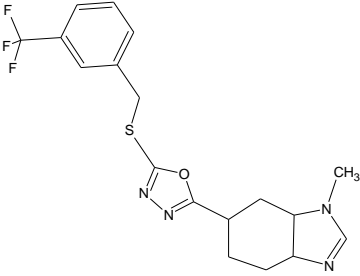
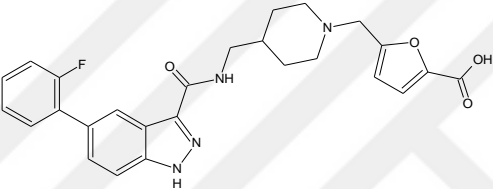
Çizelge 4.6. 3D QSAR Farmakofor analizinde seçilen hipotez ile karşılaştırılmada test set olarak kullanılan asetilkolin esteraz inhibitörleri ve biyolojik etkileri

Bileşikler	Molekülün Açık Formülü	IC ₅₀ (nM)
Ladostigil		920
Fizostigmin		0.43
Kafein		7250
Huprineks		0.32
Takrin		470
Ungeremin		0.038
Galantamin		530

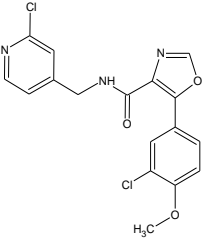
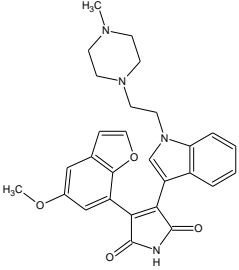
Çizelge 4.7. 3D QSAR Farmakofor oluşturmada çalışma seti olarak kullanılan Glikojen Sentaz Kinaz 3β inhibitörleri ve biyolojik etkileri

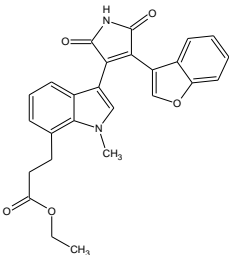
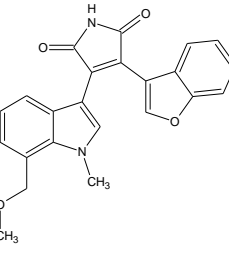
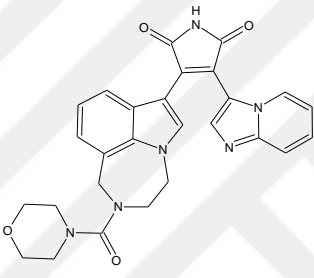
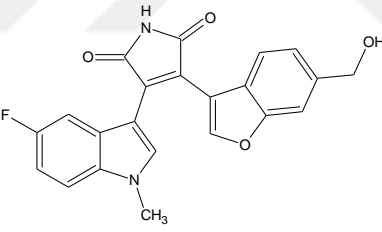
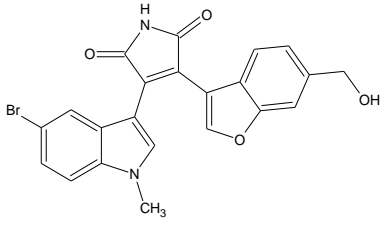
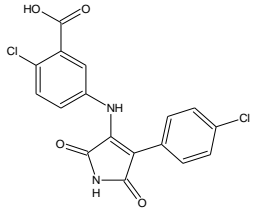
Bileşikler	Molekülün Açık Formülü	IC ₅₀ (nM)
BDBM251572		0.1
BDBM251576		0.2
BDBM50312996		0.4
BDBM8359		1
BDBM50267802		1.2

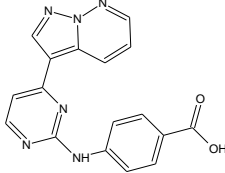
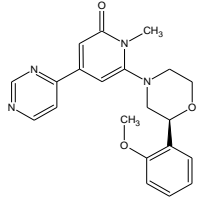
BDBM50312998		1.8
BDBM50293153		2
BDBM31587		2.3
BDBM8686		2.51
BDBM3175		2.80
BDBM50293152		5

BDBM50293155		8.0
BDBM31588		9.40
BDBM186203		20

Çizelge 4.8. 3D QSAR Farmakofor analizinde seçilen hipotez ile karşılaştırılmada test set olarak kullanılan Glikojen Sentaz Kinaz 3 β inhibitörleri ve biyolojik etkileri

Bileşikler	Molekülün Açık Formülü	IC ₅₀ (nM)
BDBM50026830		20
BDBM50293306		0.14

BDBM50267801		10
BDBM50267760		0.23
BDBM50150698		1.3
BDBM50267461		0.35
BDBM50267607		0.51
BDBM8272		109

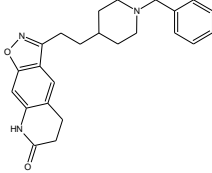
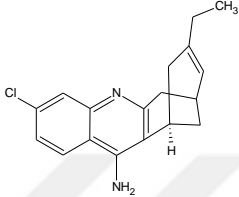
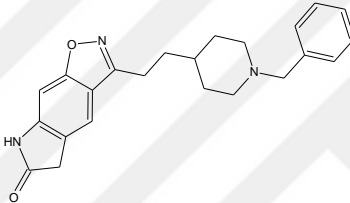
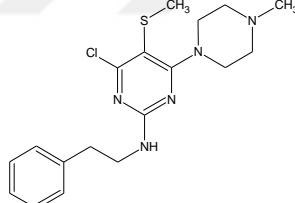
BDBM50293157		50
BDBM50337557		6.1

Ligandların aktivite değerlerinin yanı sıra “Uncert” değerleri de tümü için 2 olarak girilmiştir. Protokolde konformasyon oluşturma metodu olarak “BEST” seçilirken, hidrojen bağı akseptörü (HBA), hidrojen bağı donörü (HBD), hidrofobiklik (HBY), pozitif iyonize olma (PI), halkalı aromatik yapı (RA) özellikleri de farmakofor modellerinde aranan özellikler olarak seçilmiştir.

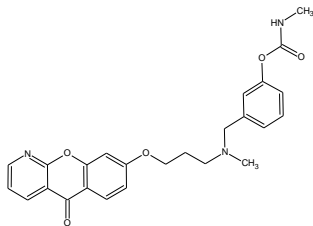
4.2.1.2. HipHop Metodu ile Farmakofor Analizi

Moleküllerin 2 boyutlu yapıları ACD/ChemSketch 5.11 programı (93) vasıtasıyla çizilirken, 3 boyutlu yapıları ise DSC programı vasıtasıyla oluşturulup “H” atomları eklenmiştir. Çizilmiş yapılar DSC'deki "clean geometry" opsiyonu ile fikslelendikten sonra optimizasyon protokolü için DSC içerisinde yer alan Adopted Basis set Newton Raphson (ABNR) metodu ve CHARMM force field kullanılmıştır. Ardından yine aynı programın “simulation” protokolü ile küçük bir moleküler dinamik uygulanarak minimizasyon işlemi tamamlanmıştır. Hipotez oluşturma çalışmalarında; asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri için en etkili BDBM50032164, Huprineks, İkopezil ve BDBM50028685 bileşikleri (Çizelge 4.9), GSK-3 β enzim inhibitörleri için ise BDBM50267607, BDBM50267760, BDBM50293306, BDBM50312996 ve BDBM251576 kodlu bileşikler (Çizelge 4.11) çalışma seti olarak değerlendirilmiştir. Her iki enzim için seçilen hipotezler Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.12 de gösterilen test setindeki moleküller ile karşılaştırılmıştır.

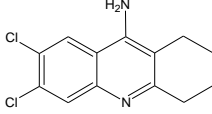
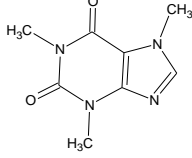
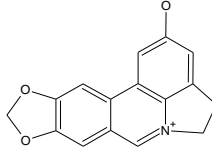
Çizelge 4.9. Hiphop metodu ile hipotez oluşturmada çalışma seti olarak kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörleri ve biyolojik aktiviteleri (IC₅₀ nM)

Bileşikler	Molekülün Açık Formülü	IC ₅₀ (nM)
BDBM50032164		0.57
Huprineks		0.32
İkopezil		0.33
BDBM50028685		0.72

Çizelge 4.10. Elde edilen hipotezin karşılaştırılması için test seti olarak kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörleri ve biyolojik aktiviteleri (IC₅₀ nM)

Bileşikler	Molekülün Açık Formülü	IC ₅₀ (nM)
CHEMBL131827		1.1

BDBM50032163		0.95
Ladostigil		920
Fizostigmin		0.43
Galantamin		530
CHEMBL486698		1.8
CHEMBL263322		1.5
BDBM50094630		1.39

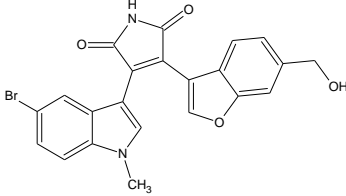
Takrin		470
Kafein		7250
Ungeremin		0.038

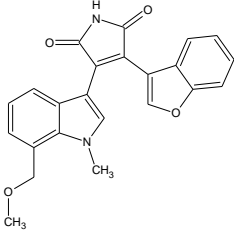
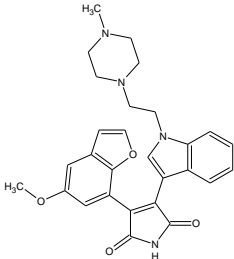
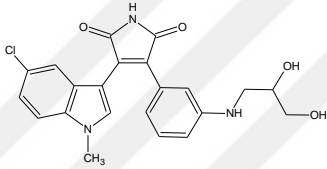
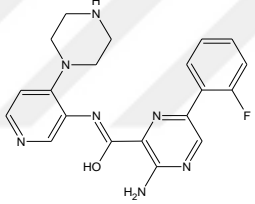
Çalışma setindeki bileşikler içerisinde ikopezil referans bileşik olarak seçilmiş ve bu bileşiğin “MaxOmitFeat” değeri 0, “Principal” değeri 2 olarak girilmiştir. Diğer bileşiklerin ise “MaxOmitFeat” değerleri 2, “Principal” değerleri 1 olarak girilmiştir.

Konformer oluşturma metodu olarak “BEST” seçilmiş, enerji değeri 0-20 kcal/mol’lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için önerilen 255 değeri verilerek HipHop farmakofor modelleme işlemi uygulanmıştır.

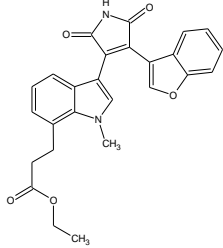
Farmakofor hipotezinin oluşturulması HBA, HBD, HBY, RA özellikleri kullanılmıştır.

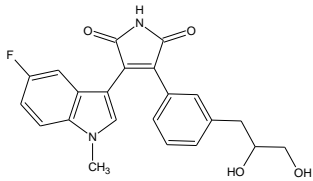
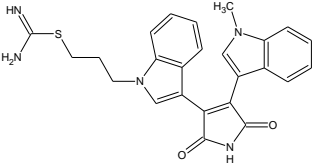
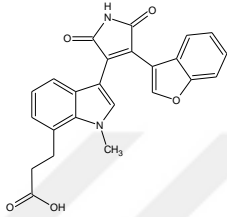
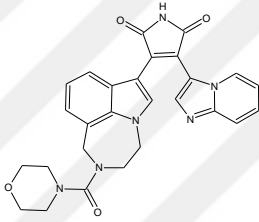
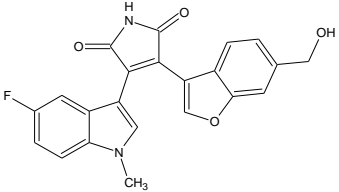
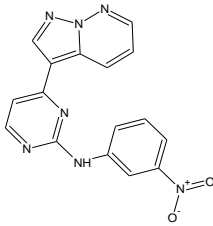
Çizelge 4.11. HipHop metodu ile hipotez oluşturma da çalışma seti olarak kullanılan Glikojen Sentaz Kinaz 3β inhibitörleri ve biyolojik aktiviteleri (IC₅₀ nM)

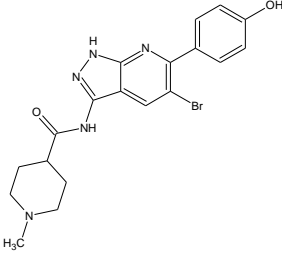
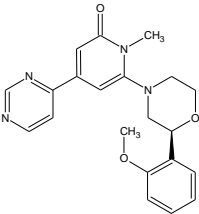
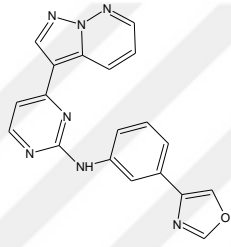
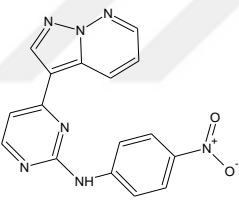
Bileşikler	Molekülün Açık Formülü	IC ₅₀ (nM)
BDBM50267607		0.51

BDBM50267760		0.23
BDBM50293306		0.14
BDBM50312996		0.4
BDBM251576		0.2

Çizelge 4.12. Elde edilen hipotezin karşılaştırılması için test seti olarak kullanılan Glikojen Sentaz Kinaz 3 β inhibitörleri ve biyolojik aktiviteleri (IC₅₀ nM)

Bileşikler	Molekülün Açık Formülü	IC ₅₀ (nM)
BDBM50267801		10

BDBM50312998		1.8
BDBM3175		2.80
BDBM50267802		1.2
BDBM50150698		1.3
BDBM50267461		0.35
BDBM50293153		2

BDBM8359		1
BDBM50337557		6.1
BDBM50293155		8.0
BDBM50293152		5.0

Çalışma seti içerisinde BDBM50293306 referans bileşik olarak seçilmiş ve bu bileşiğin “MaxOmitFeat” değeri 0, “Principal” değeri 2 olarak girilmiştir. Diğer bileşiklerin ise “MaxOmitFeat” değerleri 2, “Principal” değerleri 1 olarak girilmiştir.

Konformer oluşturma metodu olarak “BEST” seçilmiş, enerji değeri 0-20 kcal/mol’lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için önerilen 255 değeri verilerek HipHop farmakofor modelleme işlemi uygulanmıştır.

Farmakofor hipotezinin oluşturulması için hidrojen bağı akseptörü (HBA), hidrojen bağı donörü (HBD), hidrofobiklik (HBY), halkalı aromatik yapı (RA) özellikleri kullanılmıştır.

4.2.1.3. 3D Veritabanları ile Tespit Edilen Farmakofora Uygun Bileşiklerin Belirlenmesi

DSC paket programı altında “Search 3D Database” protokolüyle yürütülen araştırma da DrugLikeDiverse veritabanında taramalar yapılmıştır. Bu taramalar bir önceki basamakta en iyi istatistiksel sonuçları gösteren farmakofor modeliyle gerçekleştirilmiştir ve “best” araştırma metoduyla uygulanmıştır. Bu modele uygun olarak sonuç veren moleküller ADME-Toksikoloji tahminlemesine alınmıştır.

4.2.1.4. ADME-Toksikoloji Tahminleri

ADME (Absorbsiyon (Biyoyararlanım), Dağılım, Metabolizma, Atılım (İtrah)) özellikleri ilacın klinik özellik kazanması için oldukça önemlidir. Bir ilacın ilaç özelliği kazanabilmesi için öncelikle Lipinski kurallarını sağlaması gerekmektedir. Lipinski kuralları:

- 1) 5’den fazla hidrojen bağı donörüne sahip olmamalı
- 2) Artan hidrojen bağı sayısı molekülün sulu fazdan lipid bilayer membrana pasit taşıma ile geçişini düşürmektedir. Bu nedenle molekülün 10’dan fazla hidrojen bağı akseptörüne sahip olmamalı
- 3) 500 dalton’dan küçük moleküler ağırlığa sahip olmalı. Artan moleküler ağırlık intestinal epitelyum yüzeyinde bileşik konsantrasyonunu düşürerek absorpsiyonu düşürür.
- 4) Oktanol-su dağılım katsayısı (logP) 5’den büyük olmamalı. Ayrıca artan logP değeri suda çözünürlüğü düşürerek absorpsiyona da engel olur.
- 5) Polar yüzey alanı (PSA) absorpsiyon ve dağılımda bir diğer belirleyici faktördür.

Yapısal özellikler bir molekülün farmakokinetik ve toksikolojik niteliği açısından fizikokimyasal ve biyokimyasal özelliklerin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Çalışmamız kapsamında yürütülen ADME-Toksikoloji analizleri DSC paket programı altındaki “ADME Descriptor” protokolü vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Böylece moleküler ağırlık, AlogP, aromatik halka sayısı, H-bağı alıcısı sayısı, H-bağı donörü sayısı, moleküler polar yüzey alanı, suda çözünürlük, insan intestinal sisteminde emilim, kan-beyin

bariyerinden geçiş, plazma proteinlerine bağlanma ve hepatotoksisite, CYP2D6 inhibisyonu özelliklerinin yanı sıra mutajenite ve karsinojenite de araştırılmıştır.

4.2.2. HEDEF TABANLI İLAÇ TASARIMI

4.2.2.1. Moleküler Doking Çalışması

Moleküller arası (ligand ve reseptör) bağlanma afinitesinin hesaplamalı analizini sağlayan yöntemdir. Ligand-protein sistemindeki en iyi konformasyonun tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Moleküler doking pek çok program vasıtasıyla uygulanabilir. AutoDock Vina, BetaDock, MS-DOCK, PythDock gibi yazılımlar bu programlara örnektir.

Çalışmamızda hem farmakofor modelleme de kullanılan inhibitör molekülleriyle hem de ADME-Toksikoloji tahminleri sonrası en başarılı bulunan bir molekülle moleküler doking çalışmaları yürütülmüştür. Reseptör yapısı olarak farmakofor modelleme çalışmalarında da kullanılan 4EY7 (Asetilkolinesteraz) ve 1Q41 (Glikojen Sentaz Kinaz 3 β) kodlu 3D yapılar kullanılmıştır.

Reseptör yapıları doking için Discovery Studio 3.5 Client (DSC) programı vasıtasıyla hazırlanmıştır. Reseptör içerisindeki bütün heteroatomlar (su molekülleri, ligandlar vb) çıkarılmıştır. Optimizasyon protokolünde DSC içerisinde yer alan “Adopted Basis set Newton Raphson (ABNR)” metodu ve “CHARMm force field” kullanılmıştır.

Doking çalışmasında kullanılacak ligand öncelikle ChemDraw programında çizilerek “mol” formatında kayıt edilmiş, daha sonra Discovery Studio 3.5 Client programı vasıtasıyla liganda minimizasyon işlemi uygulanmıştır.

RMSD hesaplaması için de Discovery Studio 3.5 Client programının CDOCKER ve LigandFit modülleri vasıtasıyla docking işlemi gerçekleştirilmiştir. X-ray formatından alınan ligand ile docking sonrası elde edilen konformasyonlar arasında RMSD değerleri hesaplanarak en uygun doking protokolü oturtulmaya çalışılmıştır.

4.2.2.1.1. Moleküler Doking için gerekli bağlanma küresinin belirlenmesi

CDOCKER ve LigandFit protokolleri her iki reseptör-ligand kompleksleri için denenmiş Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14’da elde edilen RMSD değerleri en iyi protokollerde elde edilmiştir. Buna göre asetilkolinesteraz enzimi (4EY7) için CDOCKER protokolü ile en iyi

RMSD değerleri alınmıştır (Çizelge 4.13). RMSD değerleri hesaplanırken asetilkolinesteraz inhibitörü olan donepezil referans olarak kullanılmıştır. Ayrıca bağlanma küresinin X,Y,Z koordinatları sırasıyla -14.108, -43.833, 27.67 olarak belirlenirken, küre çapı 9.4664 olarak tespit edilmiştir. GlikojenSentaz Kinaz 3 β enzimi(1Q41) için ise LigandFit protokolü uygun bulunmuştur (Çizelge 4.14). RMSD değerleri hesaplanırken Glikojen Sentaz Kinaz 3 β inhibitörü olan indirubin molekülü referans olarak kullanılmıştır. Ayrıca bağlanma küresinin X,Y,Z koordinatları sırasıyla 39.584, 6.727, 35.551 olarak belirlenirken, grid boşluğu 0.5x0.5x0.5, grid açısı 90x90x90 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13 CDOCKER metodu ile docking protokolünün oturtulması için asetilkolinesteraz ile yürütölmüş RMSD hesaplama sonuçları (referans donepezil)

Bağlanma Modu	RMSD (Å)
1	1.675
2	1.675
3	1.987
4	0.765
5	0.765
6	0.790
7	1.350
8	1.350
9	2.090
10	2.878

Çizelge 4.14. LigandFit metodu ile docking protokolünün oturtulması için GlikojenSentaz Kinaz 3 β ile yürütölmüş RMSD hesaplama sonuçları (referans indirubin)

Bağlanma Modu	RMSD (Å)
1	2.4215
2	2.4215
3	2.4215
4	2.4215
5	2.4215
6	2.4215
7	2.4215
8	2.4215
9	2.4215
10	2.4396

4.2.2.2. Moleküler Dinamik Simülasyonları

Seçilen moleküle ait en iyi doking konformasyonu moleküler dinamik simülasyonuna alınmıştır. Her iki reseptör için de (asetilkolinesteraz, GSK-3 β) protein-ligand kompleksleri AMBER14 (94) Moleküler Dinamik paketindeki “LEAP” modülü vasıtasıyla AMBER 14SB ve AMBER Gaff etki alanları (force field) kullanılarak hazırlanmıştır. Ayrıca protonasyon, iyon ilavesi ve solvent eklenme işlemi de burada gerçekleştirilmiştir. Kompleks sistemler TIP3 su molekülleriyle (implisit) dolu oktohedral bir kutunun içerisine alınmış şekildedir. Su molekülleri arasındaki boşluk 0.4 Å olarak ayarlanmıştır. Ardından AMBER14 içerisindeki “PMEMD” modülü vasıtasıyla ısıtılarak simülasyona hazırlanmıştır. Simülasyonlar TÜBİTAK TR-Grid alt yapısındaki süper bilgisayarlar vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Sistem 20 nanosaniye için 1bar basınç ve 298,15 K sıcaklık altında simülasyona alınmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. 3D QSAR FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI

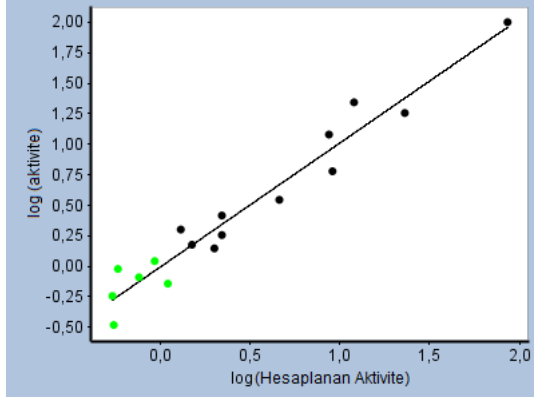
5.1.1. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRLERİYLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI

Çizelge 4.5’ de verilen 15 bileşik ile yürütülen 3D QSAR farmakofor modelleme çalışmalarından elde edilen 10 hipoteze ait sonuçlar Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Hipotezlere ait istatistiksel sonuçlar

	Maksimum Uyum	Total Cost	RMS	Korelasyon Katsayısı
Hipotez 1	6.27215	68.3648	0.49236	0.972942
Hipotez 2	5.76253	76.5072	1.09618	0.857063
Hipotez 3	5.62923	79.2344	1.14015	0.846711
Hipotez 4	4.86244	82.204	1.21616	0.823887
Hipotez 5	4.13492	83.0196	1.31245	0.790121
Hipotez 6	5.26357	83.0768	1.29487	0.796759
Hipotez 7	4.25536	83.7348	1.35567	0.773715
Hipotez 8	4.19038	83.7763	1.35136	0.775492
Hipotez 9	4.0956	83.9938	1.35149	0.775613
Hipotez 10	4.03481	84.1234	1.3509	0.775944

Hipotezler içerisinde özellikle korelasyon verileri ve maksimum uyum üzerinden yürütülen incelemede Hipotez 1 ve Hipotez 6 ileri çalışmalar için seçilmiştir. Hipotez 1’e ait korelasyon grafiği Şekil 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.1. Birinci hipotezin korelasyon grafiği.

Çizelge 5.2’de Hipotez 1’e ait deneysel ve hesaplanan IC_{50} değerleri verilmiştir. Deneysel sonuçlarına göre hata oranı oldukça düşük olduğundan farmakofor modeline duyulan güven artmaktadır.

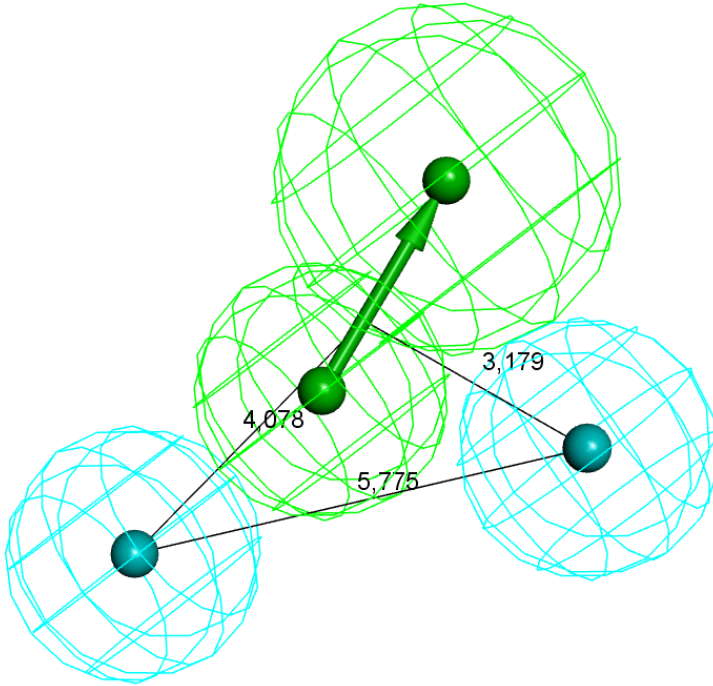
Çizelge 5.2. Hipotez 1 için Deneysel ve Hesaplanan IC_{50} (nM) değerleri

	Maksimum Uyum	Hesaplanan IC_{50}	Deneysel IC_{50}	Hata Oranı
İkopezil	6.21	0.55	0.33	+1.7
BDBM50032164	6.21	0.54	0.57	-1.1
BDBM50028685	5.89	1.1	0.72	+1.6
CHEMBL93936	6.07	0.76	0.81	-1.1
BDBM50032163	6.18	0.58	0.95	-1.6
CHEMBL131827	5.98	0.93	1.1	-1.2
BDBM50094630	5.65	2	1.4	+1.4
CHEMBL263322	5.78	1.5	1.5	-1
CHEMBL486698	5.61	2.2	1.8	+1.2
Donepezil	5.84	1.3	2	-1.6

BDBM50117612	5.60	2.2	2.6	-1.2
Territrem	5.29	4.6	3.5	+1.3
Aloeemodin	4.99	9.1	6	+1.5
Fenserin	5.01	8.7	12	-1.4
Oksikinolin	4.58	23	18	+1.3

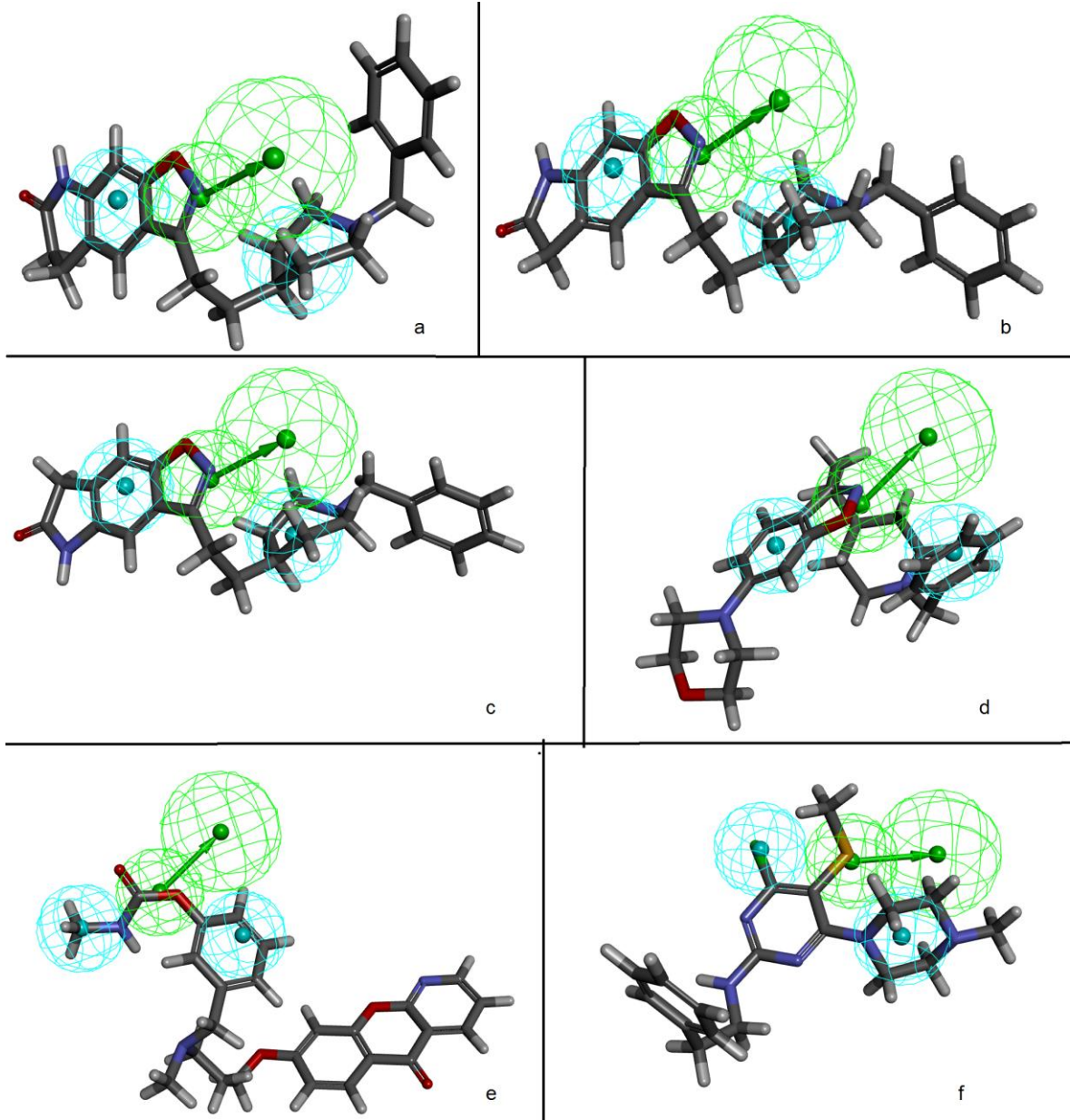
Korelasyon grafiğinde yeşil noktalar aktif molekülleri gösterirken, siyah noktalar kısmen aktif molekülleri göstermektedir. Noktaların lineer doğruya yakın olması hesaplanan farmakofor modellerinin başarısını göstermektedir.

Hipotez 1'e ait farmakofor modeli Şekil 5.2'deki gibidir. Farmakofor modelinde ortaya çıkan özellikler arası mesafe farmakoforun reseptör içerisindeki yerleşiminin anlaşılması açısından oldukça önemlidir.

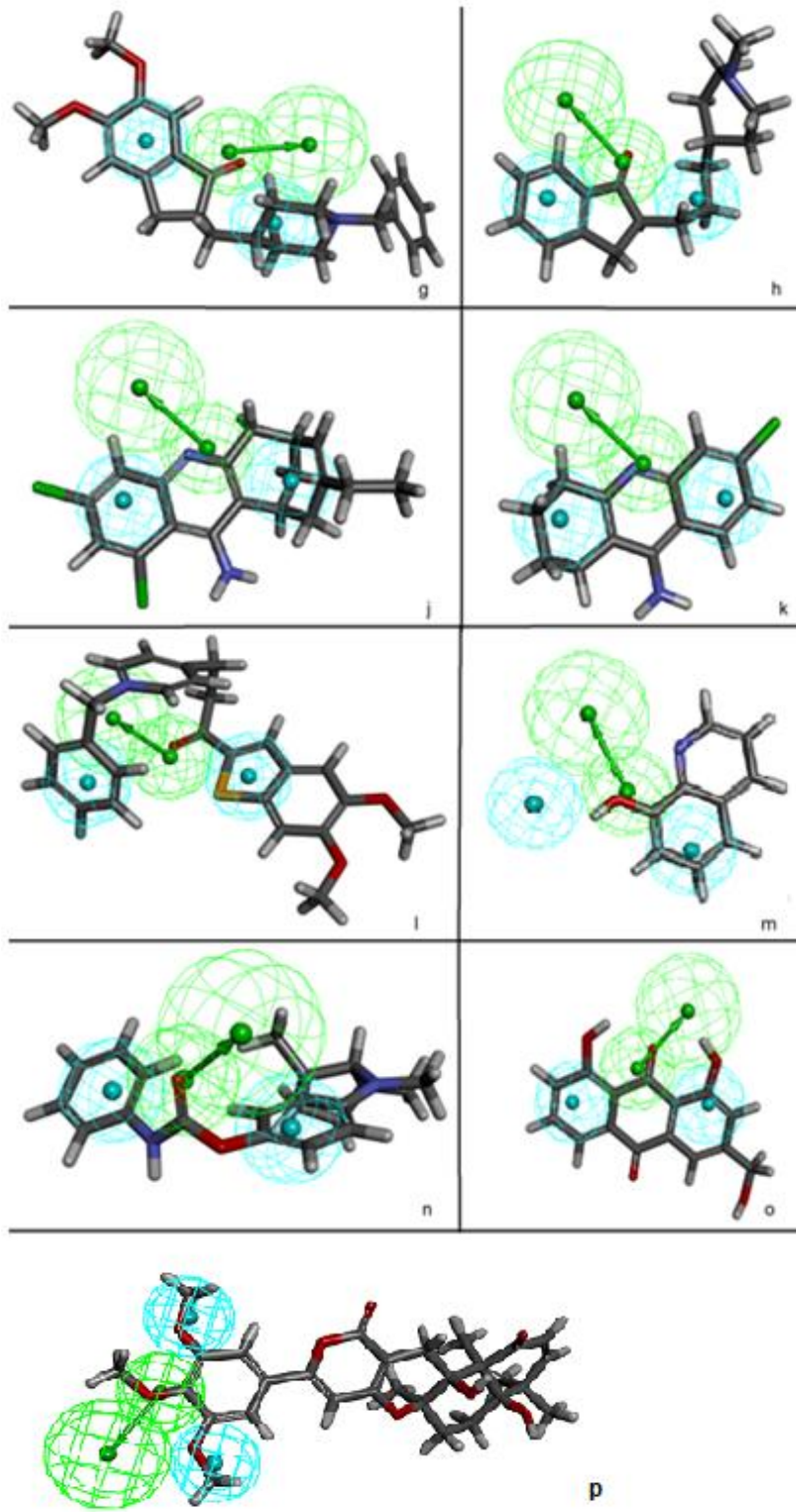


Şekil 5.2. Farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi. Yeşil toplardan oluşan modeller Hidrojen bağı akseptörü (HBA), mavi top hidrofobik göstermektedir.

Şekil 5.3 ve Şekil 5.4’de çalışma setindeki moleküllerin hipotez 1 ile birlikte görüntüleri verilmiştir. Bu şekillerde hipotezin moleküllerle uyumunu incelemek mümkündür. Farmakofor modellerindeki hidrojen bağı akseptörleri –O, -N, -S atomları donörleri ise bu atomlara bağlı olan –H atomlarıdır. Öte yandan özellikle halkalı yapılar hem hidrofobiklik için hem de halkalı aromatik (turuncu) özellik için etkinlik göstermektedir. Böylece farmakofor hipotezinde halkalı yapılarda hidrofobiklik (mavi) gözlenirken, –O, -N ve –S atomlarında ise hidrojen bağı akseptör (yeşil) farmakofor özelliği tespit edilmektedir.

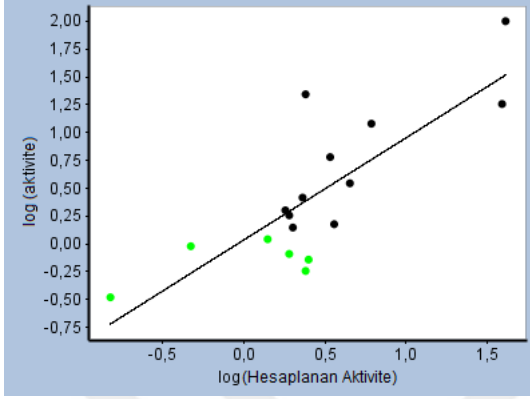


Şekil 5.3. Hipotez 1’e çalışma setinin karşılaştırılması a) BDBM50032164, b) ikopezil, c) BDBM50032163, d) ChEMBL93936, e) ChEMBL131827, f) BDBM50028685



Şekil 5.4. Hipotez 1'e çalışma setinin çakıştırılması g) donepezil, h) CHEMBL263322, j) BDBM50094630, k) CHEMBL486698, l) BDBM50117612, m) oksikinolin, n)Fenserin, o) Aloemodin, p) territrem

Hipotez 1’de noktalar grafiğe paralel etrafında uzanmasına rağmen Hipotez 6’da daha dağınık bir yapı göndermektedir. Hipotez 6’ nın (Şekil 5.5) bu özelliğe rağmen en başarılı hipotezlerden biri seçilmesinin nedeni ise maksimum uyum oranının artış göstermesidir Çizelge 5.3.



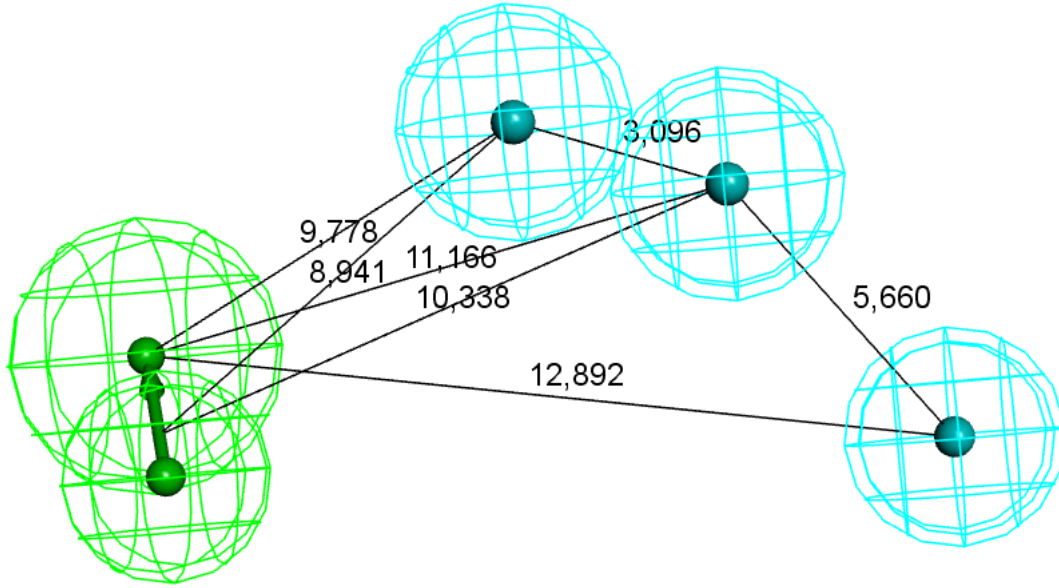
Şekil 5.5. Altıncı hipotezin korelasyon verileri

Çizelge 5.3. Hipotez 6 için deneysel ve hesaplanan IC_{50} (nM) değerleri

	Maksimum Uyum	Hesaplanan IC_{50}	Deneysel IC_{50}	Hata Oranı
İkopezil	5.01	0.15	0.33	-2.2
BDBM50032164	3.80	2.4	0.57	+4.2
BDBM50028685	3.78	2.5	0.72	+3.5
CHEMBL93936	3.90	1.9	0.81	+2.4
BDBM50032163	4.51	0.47	0.95	-2
CHEMBL131827	4.04	1.4	1.1	+1.3
BDBM50094630	3.89	2	1.4	+1.4
CHEMBL263322	3.63	3.6	1.5	+2.4
CHEMBL486698	3.91	1.9	1.8	+1

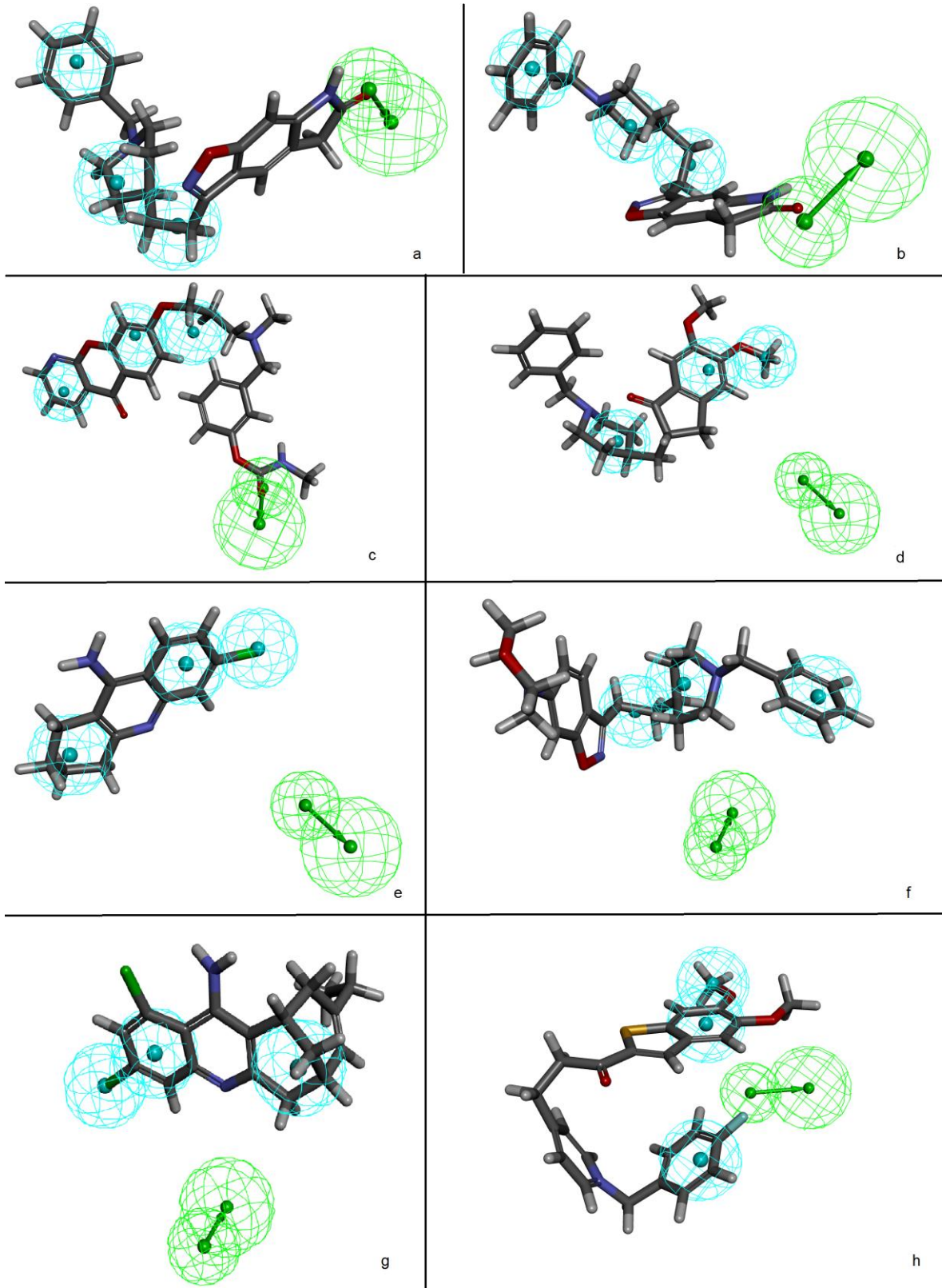
Donepezil	3.94	1.8	2	-11
BDBM50117612	3.82	2.3	2.6	-1.1
Territrem	3.66	3.4	6	-1.8
Aloeemodin	2.59	39	18	+2.2
Fenserin	3.81	2.4	22	-9.2
Oksikinolin	2.57	41	100	-2.4

Hipotez 6'ya ait farmokofor modeli.Şekil 5.6'daki gibidir.

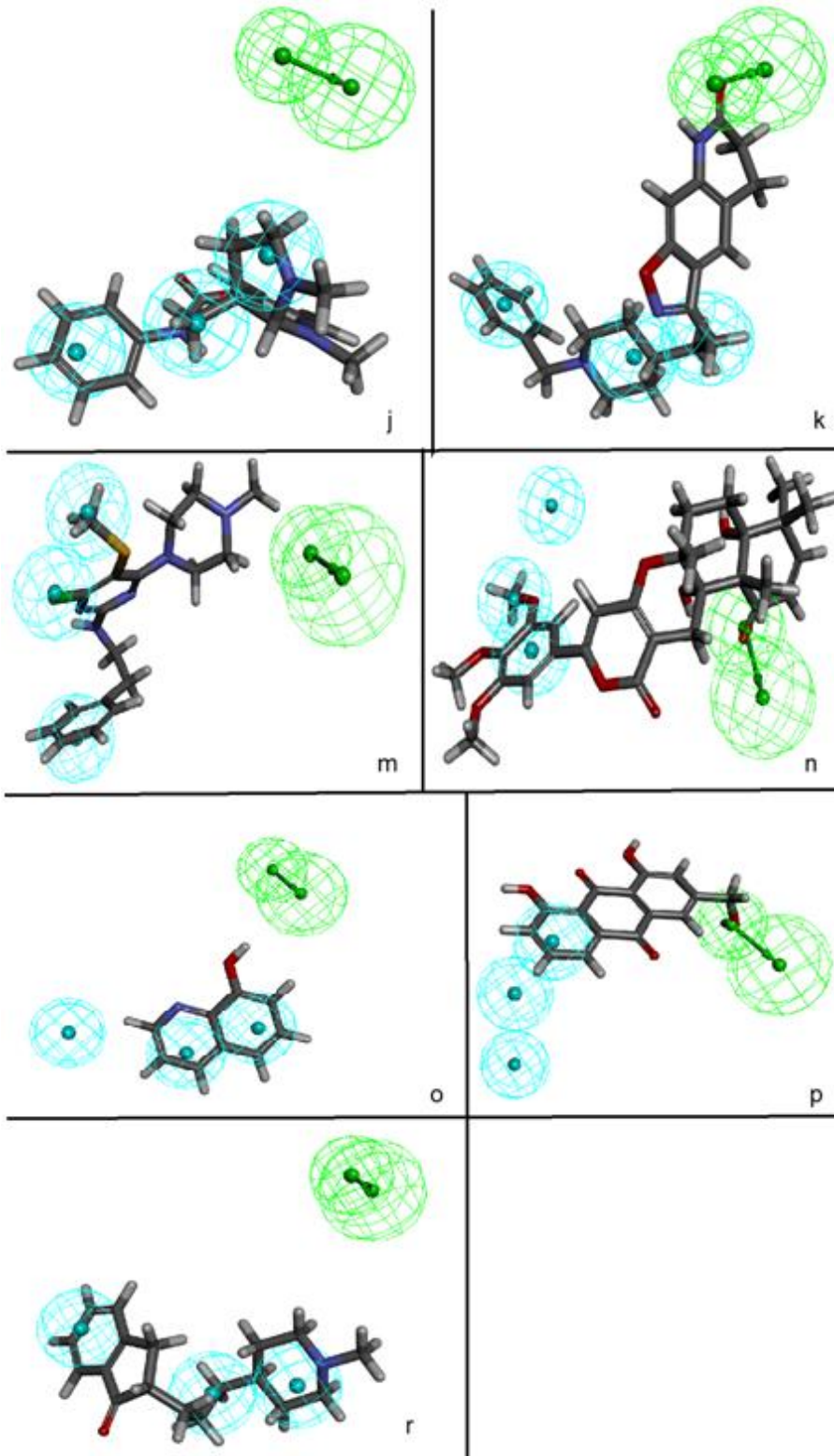


Şekil 5.6. Hipotez 6 farmokofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi. Yeşil toplardan oluşan modeller Hidrojen bağı akseptörü (HBA), mavi top hidrofobik göstermektedir.

3 Hidrofobik, 1 tane de hidrojen bağı akseptör özelliği içeren farmakofor da çalışma setinden pek çok molekülün farmakofora tam oturmadığı tespit edilmiştir (Şekil 5.7c-h).



Şekil 5.7. Hipotez 6'yla çalışma setinin karşılaştırılması a) İkopezil, b) BDBM50032163, c) CHEMBL131827, d) donepezil, e) CHEMBL486698, f) CHEMBL93936, g) BDBM50094630, h) BDBM50117612



Şekil 5.8. Hipotez 6'yla çalışma setinin karşılaştırılması. j) fenserin CHEMBL486698, k) BDBM50032164, m) BDBM50028685, n) Territrem, o) Oksikinolin p) Aloemodin, r) CHEMBL263322

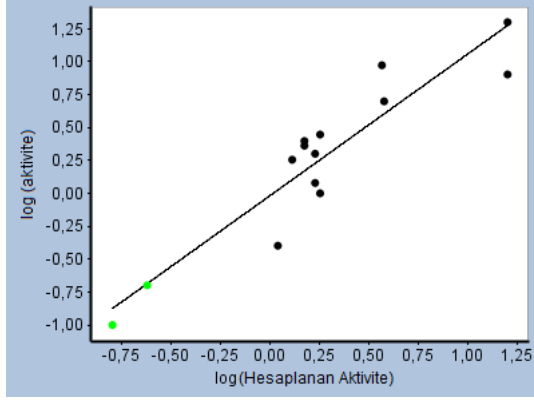
5.1.2. GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ 3 BETA İNHİBİTÖRLERİYLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI

Çizelge 4.8’ da verilen 14 bileşik ile yürütülen 3D QSAR farmakofor modelleme çalışmalarından elde edilen 10 hipoteze ait sonuçlar Çizelge 5.4’de verilmiştir.

Çizelge 5.4. Hipotezlere ait istatistiksel sonuçlar

	Maksimum Uyum	Total Cost	RMS	Korelasyon Katsayısı
Hipotez 1	6.8243	63.5146	0.767167	0.929452
Hipotez 2	6.64274	63.7633	0.804519	0.920781
Hipotez 3	6.90013	65.5846	0.940303	0.889283
Hipotez 4	5.37583	65.9437	0.980195	0.878468
Hipotez 5	6.30191	66.5883	1.03868	0.861732
Hipotez 6	6.22884	66.7638	0.978929	0.880614
Hipotez 7	7.99333	67.0636	1.07456	0.850819
Hipotez 8	6.20677	67.1015	1.07535	0.85073
Hipotez 9	5.98124	67.3858	1.09575	0.844331
Hipotez 10	5.63221	67.7621	1.11476	0.83873

Hipotezler içerisinde özellikle korelasyon verileri ve maksimum uyum üzerinden yürütülen incelemede hipotez 1 ve hipotez 7 ileri çalışmalar için seçilmiştir. Hipotez 1’e ait korelasyon grafiği Şekil 5.9’ da verilmiştir. Şekil 5.9’ da görüldüğü üzere her biri bir molekülü temsil eden noktalar doğru etrafında doğruya paralel olarak uzanmaktadır.



Şekil 5.9. Birinci hipotezin korelasyon grafiği

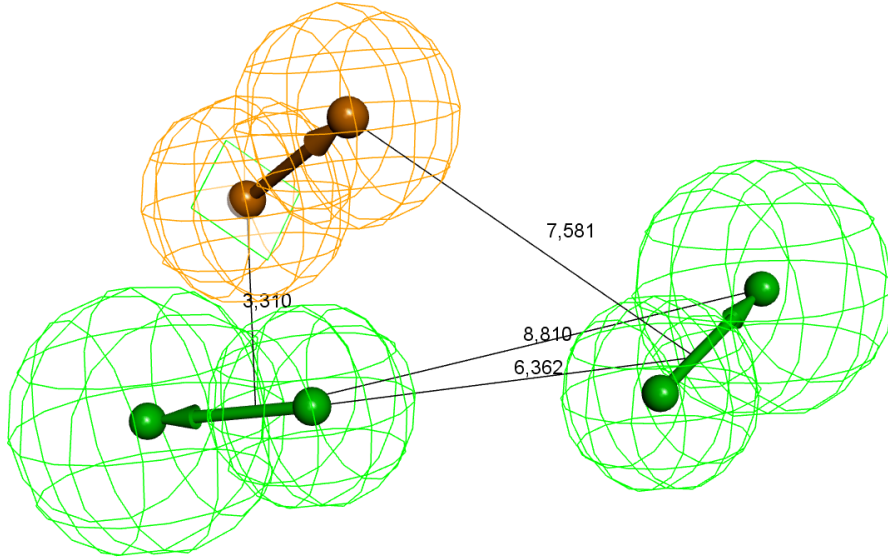
Korelasyon grafiğinde yeşil noktalar aktif molekülleri gösterirken, siyah noktalar kısmen aktif molekülleri göstermektedir. Noktaların lineer doğruya yakın olması hesaplanan farmakofor modellerinin başarısını göstermektedir. Çizelge 5.5'te görüldüğü üzere hata oranında çok büyük sapmalar yaşanmamıştır. Bu durum deneysel verilerle hesaplama sonuçlarının örtüşüğünü göstermektedir.

Çizelge 5.5. Hipotez 1 için Deneysel ve Hesaplanan IC₅₀ (nM) değerleri

	Maksimum Uyum	Hesaplanan IC ₅₀	Deneysel IC ₅₀	Hata Oranı
BDBM251572	6.49	0.16	0.1	+1.6
BDBM251576	6.32	0.24	0.2	+1.2
BDBM50312996	5.68	1.1	0.4	+2.7
BDBM8359	5.45	1.8	1	+1.8
BDBM50267802	5.48	1.7	1.2	+1.4
BDBM50312998	5.58	1.3	1.8	-1.4
BDBM50293153	5.48	1.7	2	-1.2
BDBM31587	5.53	1.5	2.3	-1.5
BDBM8686	5.52	1.5	2.5	-1.6

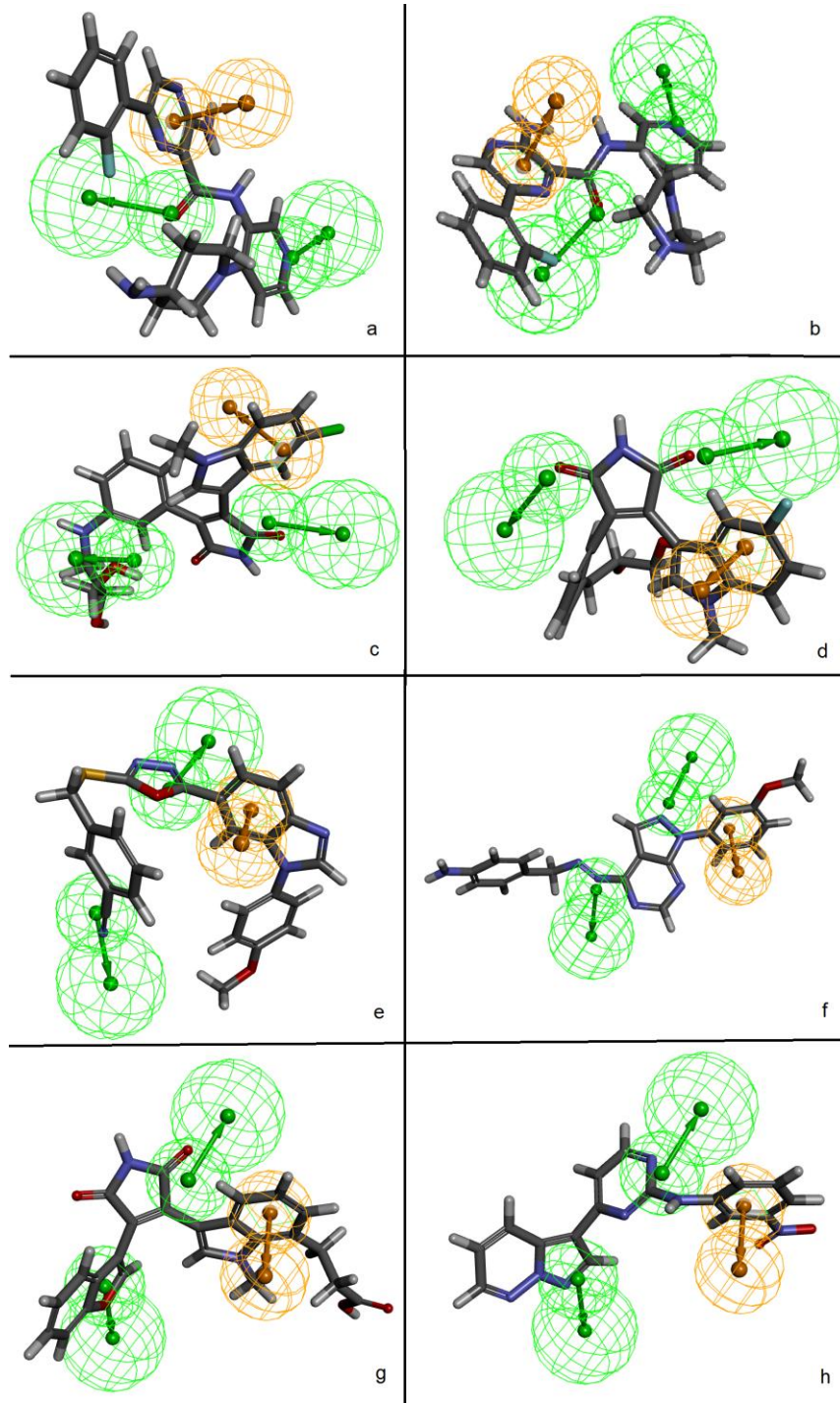
BDBM3175	5.46	1.8	2.8	-1.6
BDBM50293152	5.13	3.8	5	-1.3
BDBM50293155	4.50	16	8	+2
BDBM31588	5.14	3.7	9.4	-2.6
BDBM186203	4.50	16	20	-1.2

Hipotez 1'e ait farmakofor modeli Şekil 5.10'deki gibidir. Farmakofor modelinde ortaya çıkan özellikler arası mesafe farmakoforun reseptör içerisindeki yerleşiminin anlaşılması açısından oldukça önemlidir.

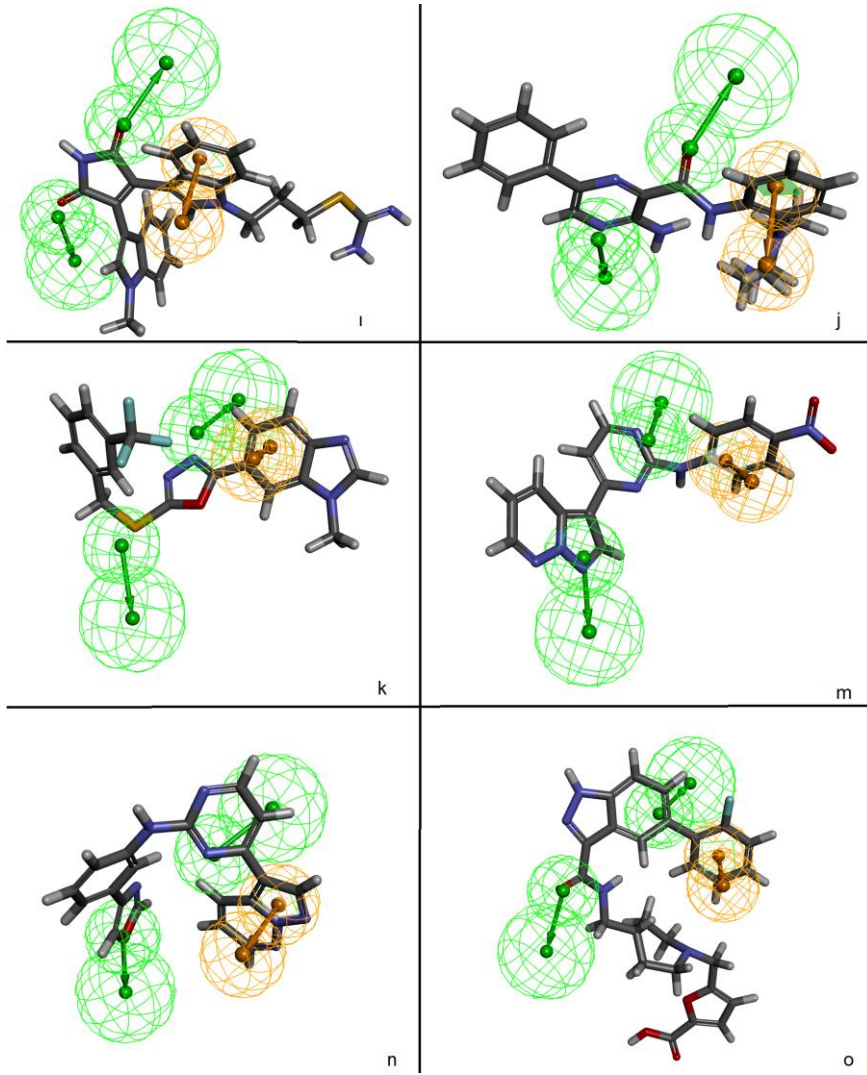


Şekil 5.10. Farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi. Yeşil toplardan oluşan modeller Hidrojen bağı akseptörü (HBA), turuncu toplar ise halkalı aromatik (RA) yapıları göstermektedir.

Şekil 5.11 ve Şekil 5.12'de ise çalışma setindeki moleküller hipotez 1'in üstüne oturtulmuştur. Farmakofor modellerinde halkalı aromatik yapılar ise benzen halkası gibi bağları arasında tek, çift dönüşümünü mümkün kılan yapılardır. Farmakofor hipotezinde piperazin, benzen ve indol (sırasıyla) halkalarında halkalı aromatik (turuncu) özellik gözlenirken, -O, -N ve -S atomlarında ise hidrojen bağı akseptör (yeşil) farmakofor özelliği tespit edilmektedir.

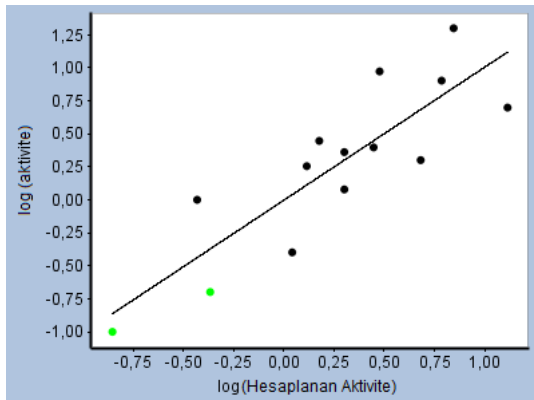


Şekil 5.11.Hipotez 1'e çalıma setinin çakıştırılması a) BDBM251572, b) BDBM251576, c) BDBM50312996, d) BDBM8359, e) BDBM50267802, f) BDBM50312998, g) BDBM50293153, h) BDBM31587



Şekil 5.12. Hipotez 1'e çalışma setinin çakıştırılması ı) BDBM8686 j) BDBM3175 k) BDBM50293152 m) BDBM50293155 n) BDBM31588 o) BDBM186203

Maximum uyum verileri incelendiğinde ileri çalışmalar için seçilen bir diğer hipotez ise hipotez 7'dir (Şekil 5.13).



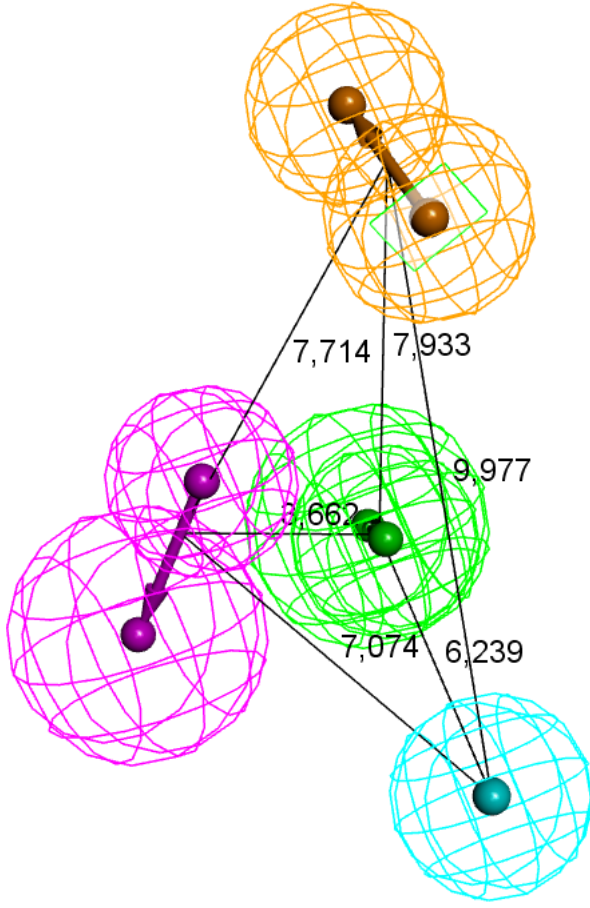
Şekil 5.13. Yedinci hipotezin korelasyon grafiği

Yedinci hipotez incelendiğinde hata oranlarının hipotez 1 kadar başarılı olmadığı gözlenmektedir (Çizelge 5.6). Ancak maksimum uyum ve korelasyon katsayısı değerleri nedeniyle ileri çalışmalara alınmıştır.

Çizelge 5.6. Hipotez 7 için Deneysel ve Hesaplanan IC₅₀ (nM) değerleri

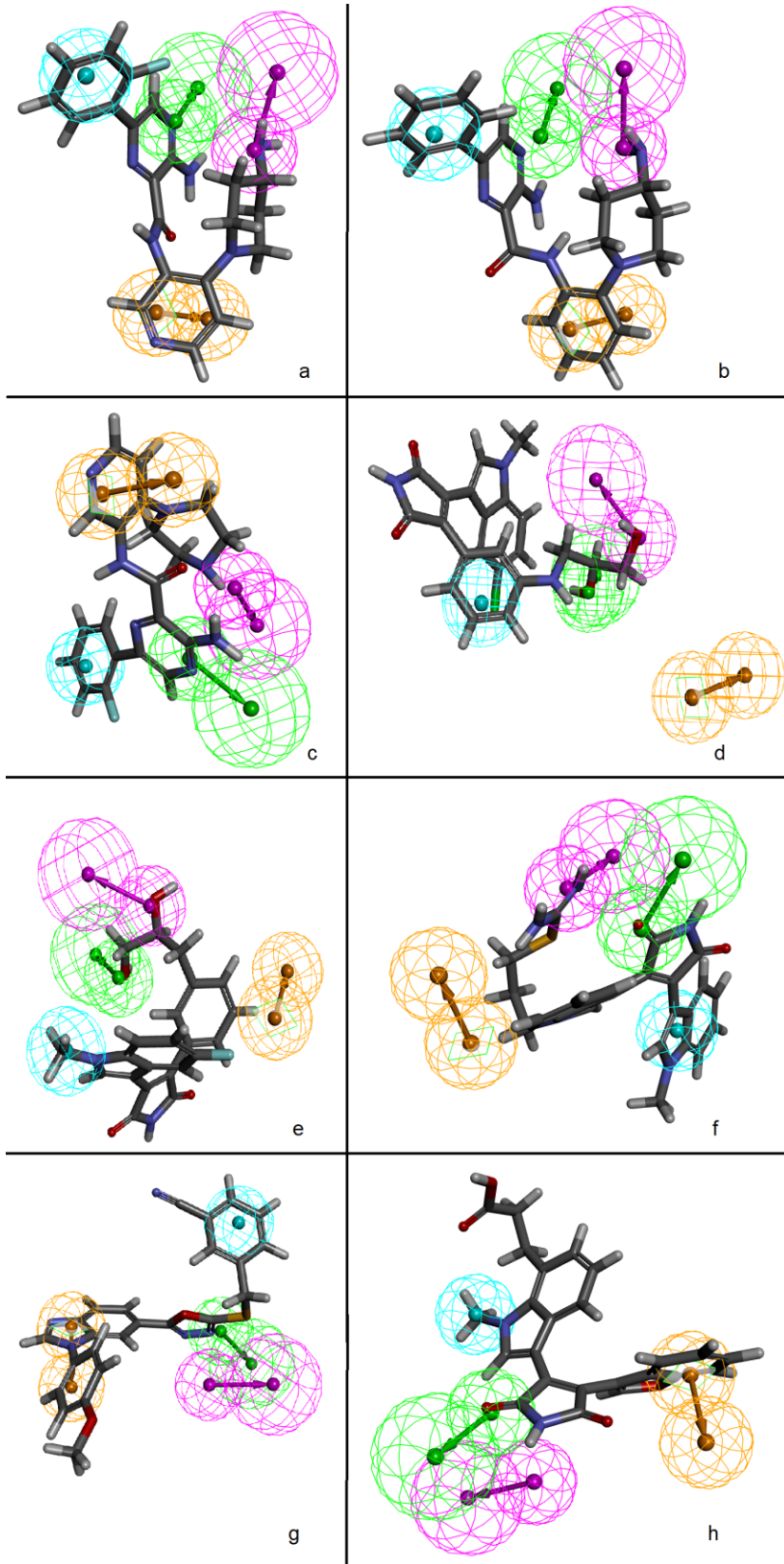
	Maksimum Uyum	Hesaplanan IC ₅₀	Deneysel IC ₅₀	Hata Oranı
BDBM251572	6.75	0.14	0.1	+1.4
BDBM251576	6.24	0.43	0.2	+2.2
BDBM50312996	5.84	1.1	0.4	+2.7
BDBM8359	6.31	0.37	1	-2.7
BDBM50267802	5.58	2	1.2	+1.7
BDBM50312998	5.78	1.3	1.8	-1.4
BDBM50293153	5.20	4.8	2	+2.4
BDBM31587	5.58	2	2.3	-1.2
BDBM8686	5.44	2.8	2.5	+1.1
BDBM3175	5.71	1.5	2.8	-1.9
BDBM50293152	4.75	13	5	+2.7
BDBM50293155	5.10	6.1	8	-1.3
BDBM31588	5.41	3	9.4	-3.2
BDBM186203	5.04	7	20	-2.9

Hipotez 7'ye ait farmakofor modelinde ortaya çıkan özellikler arası mesafe ise Şekil 5.14'de verilmiştir.

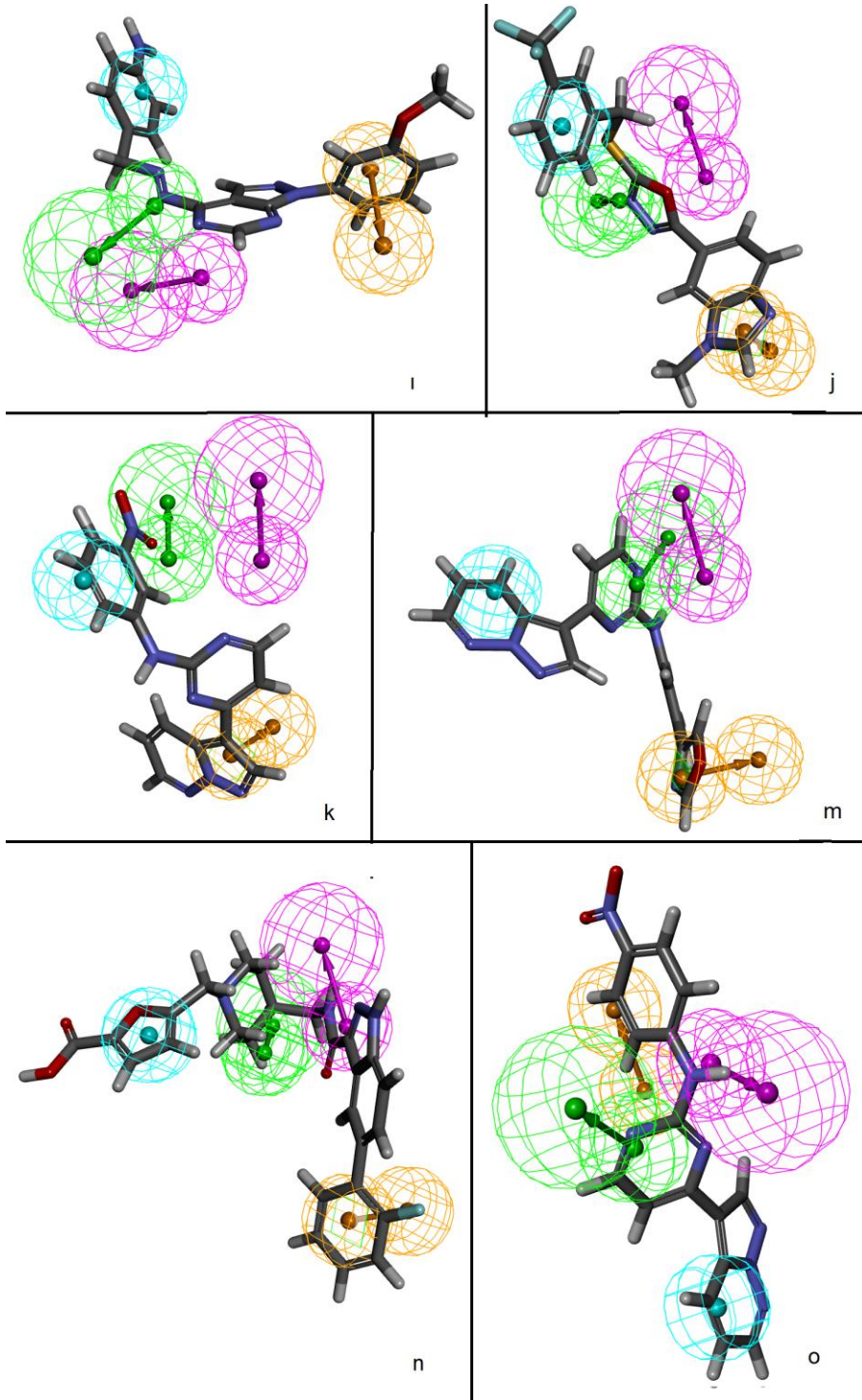


Şekil 5.14. Farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi. Yeşil toplardan oluşan modeller Hidrojen bağı akseptörü (HBA), turuncu toplar ise halkalı aromatik (RA), mavi top hidrofobik ve pembe toplar Hidrojen bağı donörü (HBD) yapıları göstermektedir.

Şekil 5.15 ve Şekil 5.16'da çalışma setindeki moleküller hipotez 1'in üstüne oturtulmuştur. Bu şekillerde hipotezin moleküllerle uyumunu incelemek mümkündür. Bu farmakofor hipotezinde özellikle halkalı yapılar hem hidrofobiklik için hem de halkalı aromatik (turuncu) özellik için etkinlik göstermektedir. -O, -N ve -S atomlarında hidrojen bağı akseptör (yeşil) farmakofor özelliği gösterilirken, bu moleküllere bağlı -H atomları da Hidrojen Bağı donörü (pembe) özelliği göstermektedir. Bu farmakofor modelinin hipotez 1 kadar etkin olmadığı moleküllerin çakışma düzeninden ortaya çıkmaktadır. Özellikle Şekil 5.15d'de seçildiği üzere halkalı aromatik özelliğe molekül oturmaktadır. Farmakofor modelinin kendi çalışma setine bile hipotez 1'deki kadar net oturmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.15. Hipotez 7'ye çalışma setinin çakıştırılması a) BDBM251572, b) BDBM251576, c) BDBM50312996, d) BDBM8359, e) BDBM50267802, f) BDBM50312998, g) BDBM50293153, h) BDBM31587



Şekil 5.16. Hipotez 7'ye çalışma setinin çakıştırılması ı) BDBM8686 j) BDBM3175 k) BDBM50293152 m) BDBM50293155 n) BDBM31588 o) BDBM186203

5.2. HİPHOP METODU İLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI

5.2.1. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRLERİYLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI

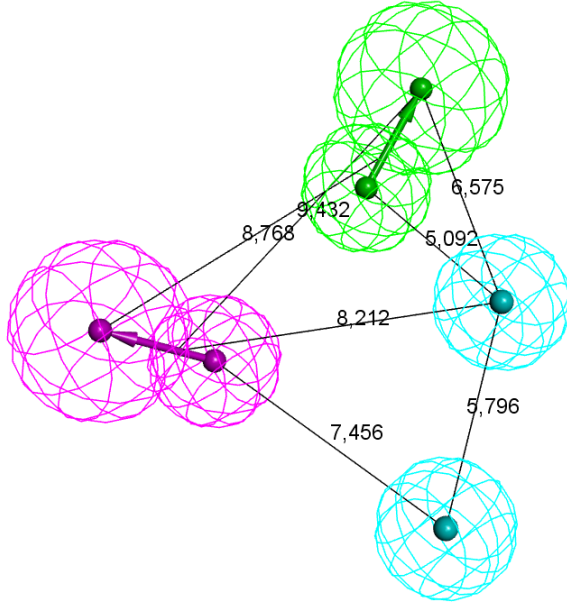
Çizelge 4.9’ de verilen 4 bileşik ile yürütülen HipHop farmakofor modelleme çalışmalarından elde edilen 10 hipoteze ait sonuçlar Çizelge 5.7’de verilmiştir. Direkt hit: Hipotezin tüm özelliklerini haritalamaktadır ve Direkt Hit 1 ise bu özelliği sağladığı manasına gelmektedir. Kısmi Hit: hipotezin kısmi olarak haritalandığına göstermektedir. Her numara aynı sıra ile Çizelge 4.9.’deki bir moleküle karşılık gelmektedir.

Çizelge 5.7. Hipotezlere ait istatistiksel sonuçlar

	Özellikler	Skor	Direk Hit	Kısmi Hit	Maksimum Uyum
Hipotez 1	HHDA	31.054	1111	0000	4
Hipotez 2	HHDA	30.973	1111	0000	4
Hipotez 3	RHHD	30.740	1111	0000	4
Hipotez 4	RHHD	30.310	1111	0000	4
Hipotez 5	RHHD	29.797	1111	0000	4
Hipotez 6	HHDA	29.638	1111	0000	4
Hipotez 7	RHHD	28.824	1111	0000	4
Hipotez 8	HHHA	28.565	1111	0000	4
Hipotez 9	RHHA	28.330	1101	0010	4
Hipotez 10	HHDA	28.318	1111	0000	4

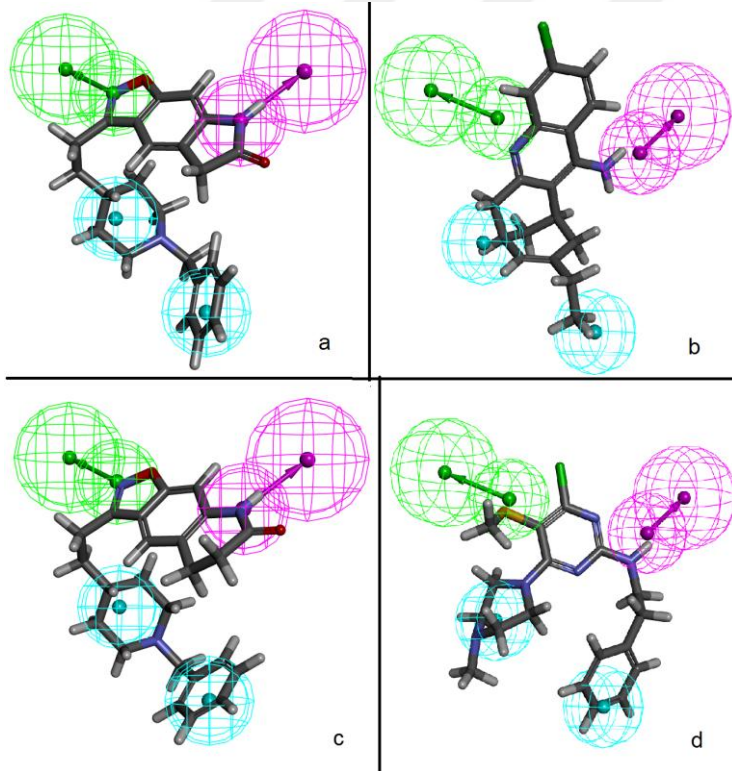
H, Hidrofobik; A, Hidrojen bağı alıcısı; R, Aromatik Halka ve D, Hidrojen Bağı donörü özelliğini ifade etmektedir.

Hipotezler 28.318– 31.054 skalasında değişen skorlar göstermektedir. 9. hipotez hariç bütün hipotezler bütün özellikleri içermektedir. Hem maksimum uyum değeri hem Direkt Hit değeri hem de skoru en yüksek olan hipotez 1 en uygun hipotez olarak seçilmiştir. Bu hipotezde 2 hidrofobik özellik, 1 hidrojen bağı donörü ve 1 hidrojen bağı akseptörü özelliği tanımlanmıştır. Seçilen hipotezde (Şekil 5.17) yeşil toplar hidrojen bağı alıcısı (akseptörü), mavi ile gösterilenler hidrofobik özellik, pembe toplar ise hidrojen bağı donörü özelliğini göstermektedir.



Şekil 5.17. Hipotez 1 için farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi

Şekil 5.18’de ise Hipotez 1 ile çalışma setindeki moleküller karşılaştırılmıştır. Bu şekillerde hipotezin moleküllerle uyumu incelenmiş, hipotezin bütün moleküllere oturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.18. Çalışma seti ile hipotez 1’in karşılaştırılması a) İkopezil (referans bileşik), b) Huprineks c) BDBM50032164, d) BDBM50028685

5.2.2. GSK-3B İNHİBİTÖRLERİYLE FARMAKOFOR MODELLEME SONUÇLARI

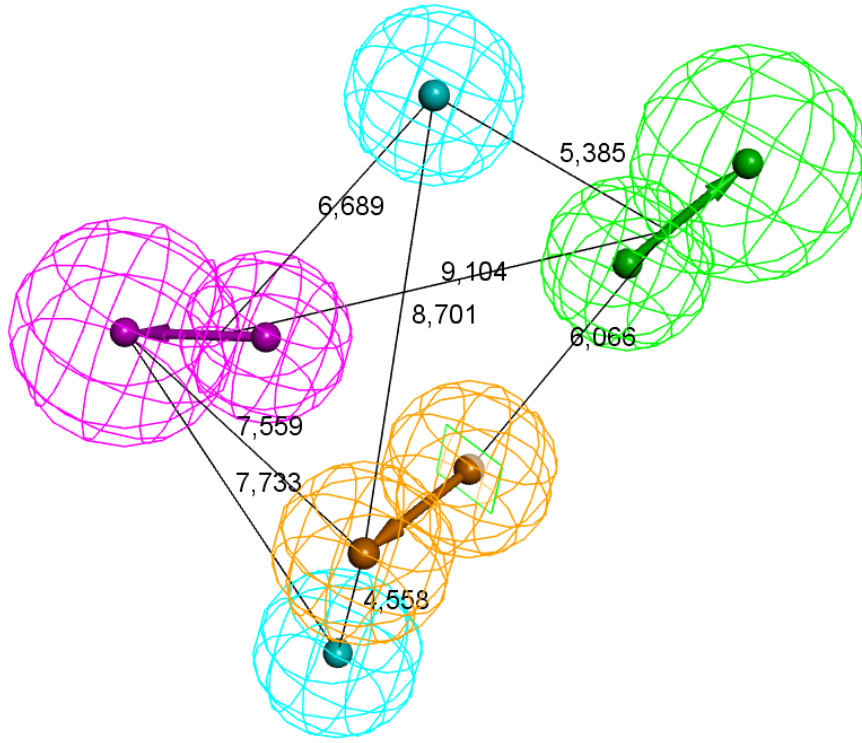
Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.’ de verilen 5 bileşik ile yürütülen Hiphop armakofor modelleme çalışmalarından elde edilen 10 hipoteze ait sonuçlar Şekil 5.8’de verilmiştir.

Çizelge 5.8. Hipotezlere ait istatistiksel sonuçlar.

	Özellikler	Skor	Direk Hit	Kısmi Hit	Maksimum Uyum
Hipotez 1	RHHDA	57.614	11111	00000	5
Hipotez 2	RHHDA	57.423	11111	00000	5
Hipotez 3	RHHDA	57.049	11111	00000	5
Hipotez 4	RRHDA	56.642	11101	00010	5
Hipotez 5	RRHDA	56.642	11101	00010	5
Hipotez 6	RRHDA	56.599	11101	00010	5
Hipotez 7	RHAAA	56.122	01111	10000	5
Hipotez 8	RHAAA	56.122	01111	10000	5
Hipotez 9	RHAAA	55.843	01111	10000	5
Hipotez 10	RRHDA	55.785	11101	00010	5

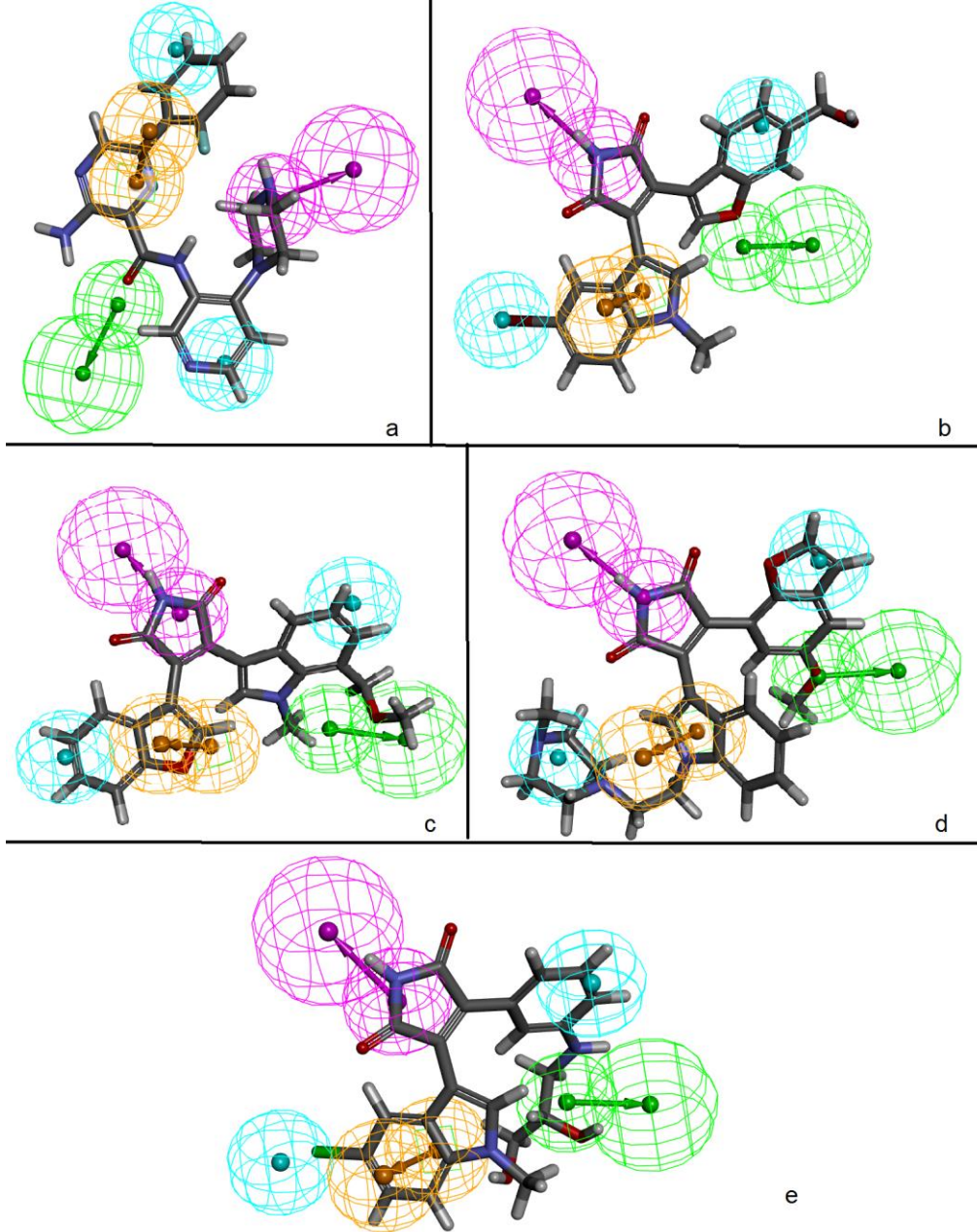
H, Hidrofobik; A, Hidrojen bağı alıcısı; R, Aromatik Halka ve D, Hidrojen Bağı donörü özelliğini ifade etmektedir.

Hipotezler 55.785– 57.614 skalasında değişen skorlar göstermektedir. Elde edilen 10 adet hipotezin her biri 5 adet özellik taşımaktadır. Maksimum uyum değeri, hem Direk Hit değeri hem de skoru en yüksek olan hipotez 1 en uygun hipotez olarak seçilmiştir. Bu hipotezde 2 Hidrofobik özellik, 1 Hidrojen bağı donörü, 1 hidrojen bağı akseptörü ve 1 halkalı aromatik özelliği tanımlanmıştır. Şekil 5.19’da Hipotez 1’deki farmakofor modeli özellikleri görülmektedir.



Şekil 5.19. Hipotez 1 için farmakofor modelindeki özelliklerin geometrik dizilimi

Şekil 5.20’ de hipotez 1 ile çalışma setinde yer alan moleküllerin uyumu verilmiştir. Buna göre hipotez 1 de yer alan özelliklerin hepsinin çalışma setinde yer alan moleküllerle oldukça uyumlu olduğu gözlenmiştir.



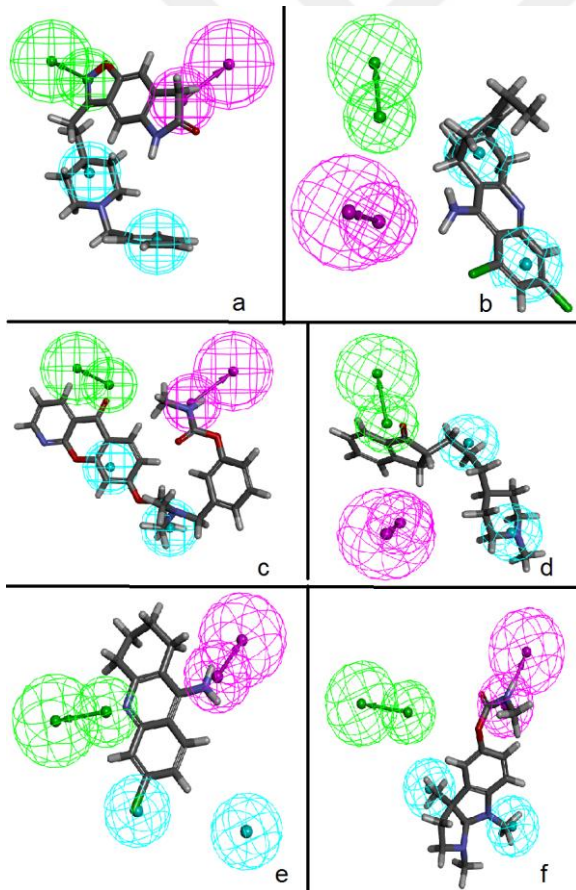
Şekil 5.20. Çalışma Seti ile hipotez 1’in karşılaştırılması a) gsk_68187361 b) BDBM50267607 c) BDBM50267760 d) BDBM50293306 (referans bileşik) e) BDBM50312996

5.3. SEÇİLEN HİPOTEZLERİN TEST SERİLERİNDEKİ MOLEKÜLLERLE ÇAKIŞTIRILMA SONUÇLARI

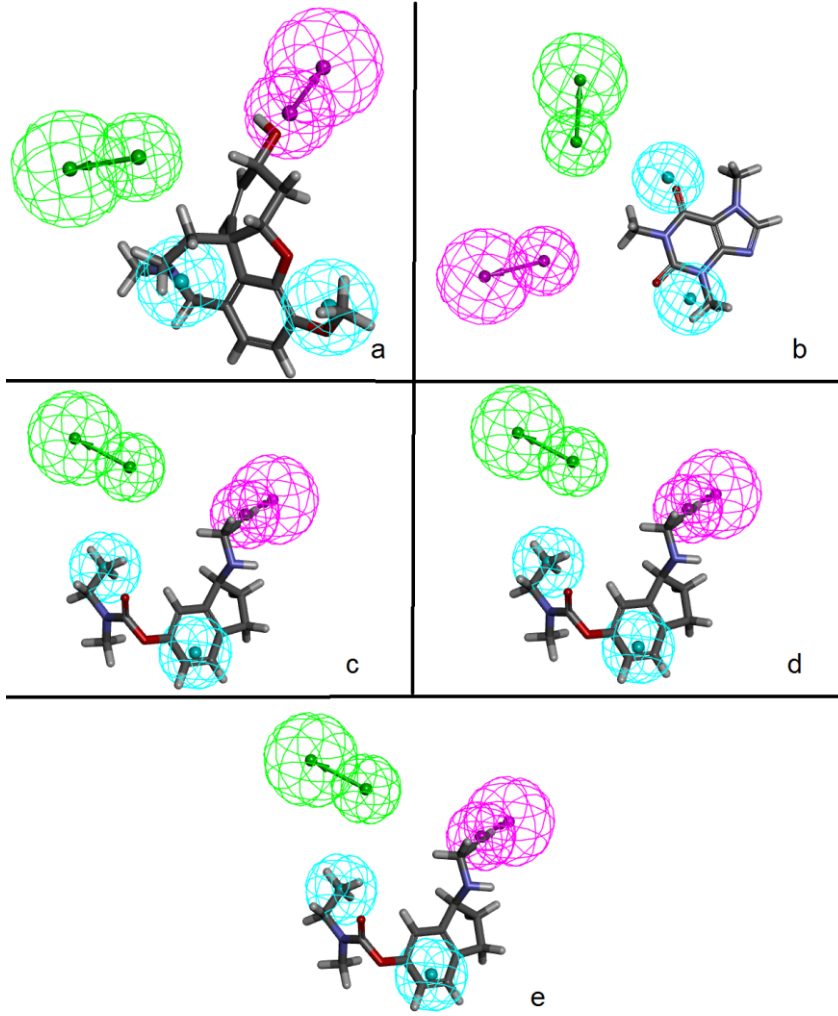
5.3.1. HİPHOP METODU İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN FARMAKOFOR ANALİZ ÇALIŞMASINDA SEÇİLEN HİPOTEZLERİN TEST SERİLERİ İLE ÇAKIŞTIRILMASI

5.3.1.1. Asetilkolinesteraz İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Test Serisinin Karşılaştırılması

Test serisi yine asetilkolinesteraz inhibitörlerinde oluşmaktadır. Farmakofor modelinin test serisindeki farklı moleküllerle doğrulanmasının nedeni farmakofor modelinin diğer inhibitörler için de uygun olup olmadığını anlamaktır. Şekil 5.21 ve Şekil 5.22’de ilgili çakışmaya dair resimler verilmiştir.



Şekil 5.21. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez 1 ile test serisindeki bileşiklerin karşılaştırılması a) BDBM50032163 b) BDBM50094630 c) ChEMBL131827 d) ChEMBL263322 e) ChEMBL486698 f) fizostigmin



Şekil 5.22. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez 1 ile test serisindeki bileşiklerin karşılaştırılması a) galantamin b) kafein c) ladostigil d) takrin e) ungeremin

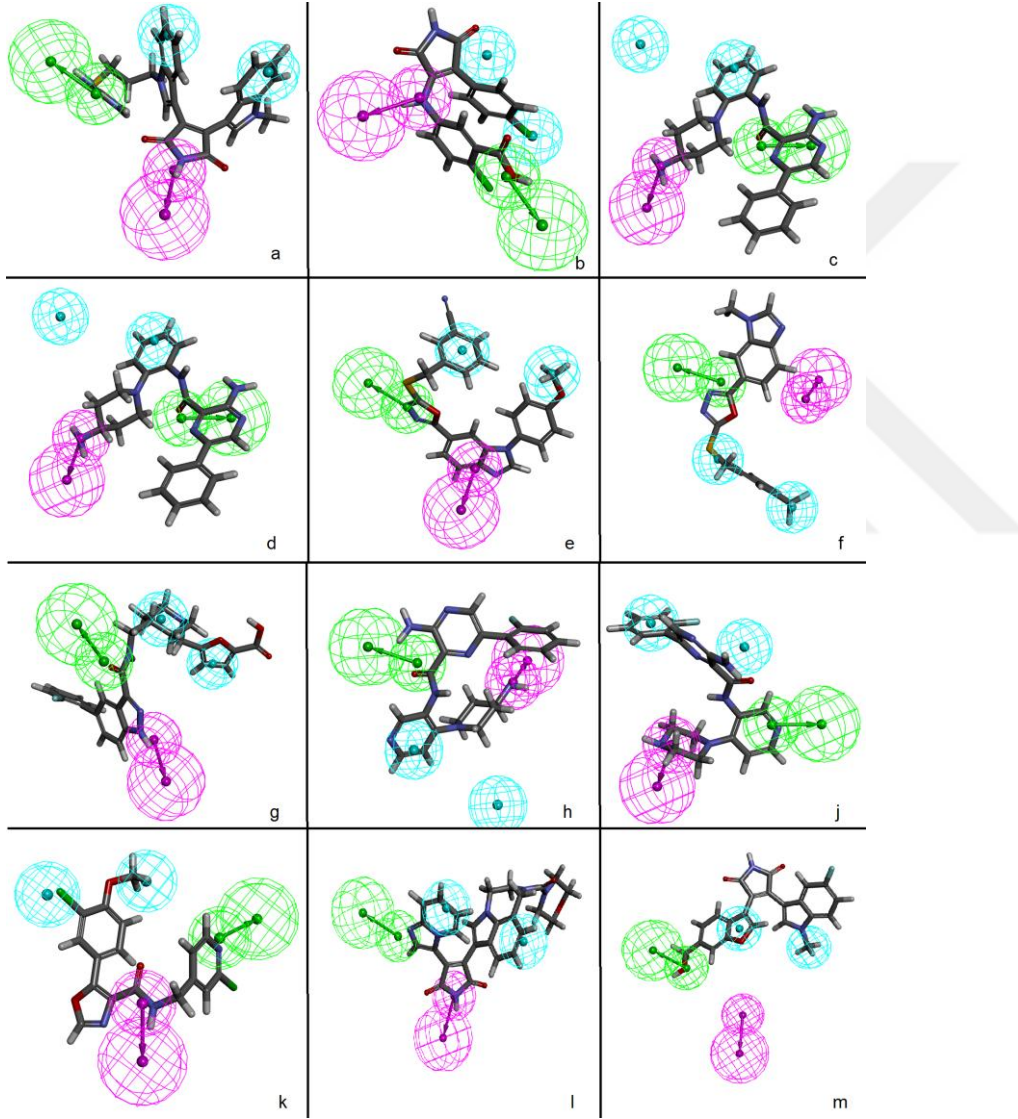
Şekillerde de görüldüğü üzere farmakofor modeli test serisindeki pek çok ligandla tam olarak örtüşmemektedir (Şekil 5.21b, e, f ve Şekil 5.22a-e). Aynı model çalışma serisindeki tüm molekülleriyle örtüşmezken (Şekil 5.18), diğer asetilkolinesteraz inhibitörleriyle örtüşmemesi hipotezin uyumunu sorgulamamıza yol açmıştır. Çizelge 5.9’ da test serisindeki bileşikler ile hipotezin ölçülmesi istatistiksel olarak incelenmiştir. Buna göre uyum değeri (3,0803) en yüksek molekül **CHEMBL131827** kodlu bileşiktir. Ancak genel maksimum uyum değeri incelendiğinde ortalama değeri yaklaşık 2 civarındadır. Bu durumda test serisiyle hipotezin uyumu düşüktür denilebilir.

Çizelge 5.9.HipHop temelli asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in test serisiyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler

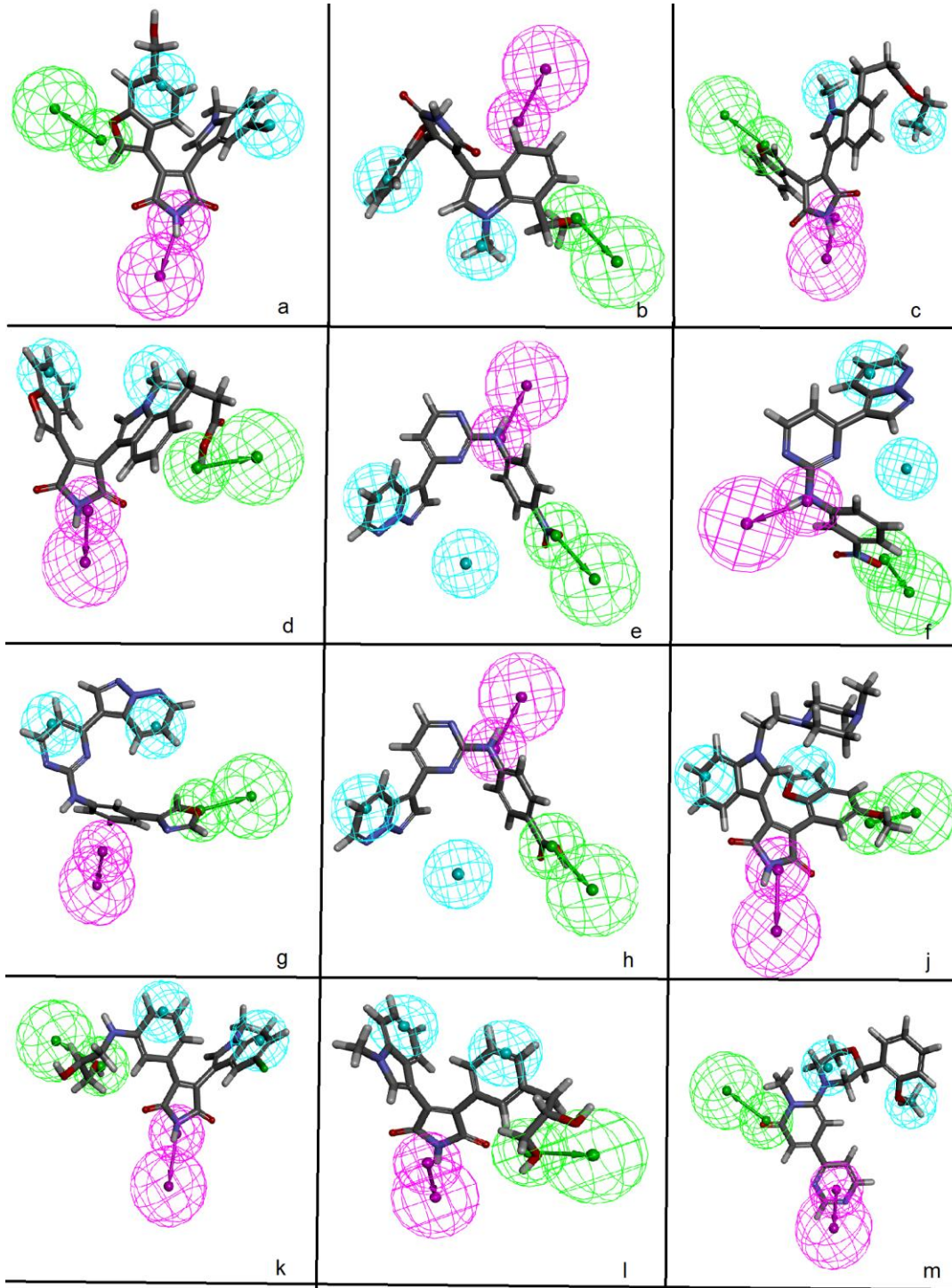
	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradienti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
CHEMBL131827	73,5486	28,237	32,6764	93,9858	49	24,6436	3,0803	'1111'	93,9858	28,0688	11,1377	5,52342
BDBM50032163	124,841	43,8508	29,5448	104,054	13	23,9359	2,99643	'1101'	104,054	27,867	9,32939	3,27972
Ladostigil	56,3413	38,4999	15,4629	68,0941	178	10,5661	2,99064	'1110'	68,0941	25,3192	10,4279	2,74543
Fizostigmin	63,0294	40,132	20,8657	84,5902	10	21,4461	2,79489	'1110'	84,5902	23,5344	7,17634	-0,49238
Galantamin	63,9197	43,6298	25,7679	107,229	1	36,3088	2,56325	'1110'	107,229	29,0085	1,68985	0,54677
CHEMBL486698	32,6783	20,3099	11,8849	46,9109	1	4,99889	2,36258	'1011'	46,9109	25,4215	0	8,68794
CHEMBL263322	48,5364	36,0907	26,5757	79,4426	56	17,6954	2,34493	'1101'	79,4426	27,4721	6,38461	-1,47593
BDBM50094630	50,3544	32,7672	22,0227	97,144	1	27,3419	2	'1100'	97,144	29,1295	2,78239e-14	9,41455
Takrin	36,4904	15,1112	12,3615	46,953	2	11,7194	1,99885	'1100'	46,953	24,4669	3,92444	5,88355
Kafein	27,6782	15,5357	12,3232	37,3681	1	3,53738	1,96518	'1100'	37,3681	28,5745	0	3,54406
Ungeremin	126,866	38,6176	18,5828	89,6896	1	13,5259	1,9226	'1100'	89,6896	28,0608	0	17,5221

5.3.1.2. Asetilkolinesteraz İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Glikojen Sentaz Kinaz 3 β İnhibitörlerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda amaç çoklu hedefe yönelik bir ilaç adayı molekülünün tespit edilmesi olduğu için farmakofor modelinin asetilkolinesteraz inhibitörlerinin yanı sıra Glikojen Sentaz Kinaz 3 β enzimini de inhibe etmesi gerekmektedir. Bu nedenle farmakofor modeli daha önceden belirtilen GSK-3 β inhibitörleriyle (Çizelge 4.2) de karşılaştırılmıştır (Şekil 5.23 ve Şekil 5.24). Büyük ölçüde örtüşme gösterdiği şekillerde görülmektedir.



Şekil 5.23. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile GSK-3 β inhibitörlerinin karşılaştırılması a) BDBM3175 b) BDBM8272 c) BDBM8359 d) BDBM8686 e) BDBM31587 f) BDBM31588 g) BDBM186203 h) BDBM251572 j) BDBM251576 k) BDBM50026830 l) BDBM50150698 m) BDBM50267461



Şekil 5.24. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile GSK-3 β inhibitörlerinin çakıştırılması-2.kısım a) BDBM50267607 b) BDBM50267760 c) BDBM50267801 d) BDBM50267802 e) BDBM50293152 f) BDBM50293153 g) BDBM50293155 h) B BDBM50293157 j) BDBM50293306 k) BDBM50312996 l) BDBM50312998 m) BDBM50337557

Çizelge 5.10. HipHop temelli asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in GSK-3 β inhibitörleriyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler

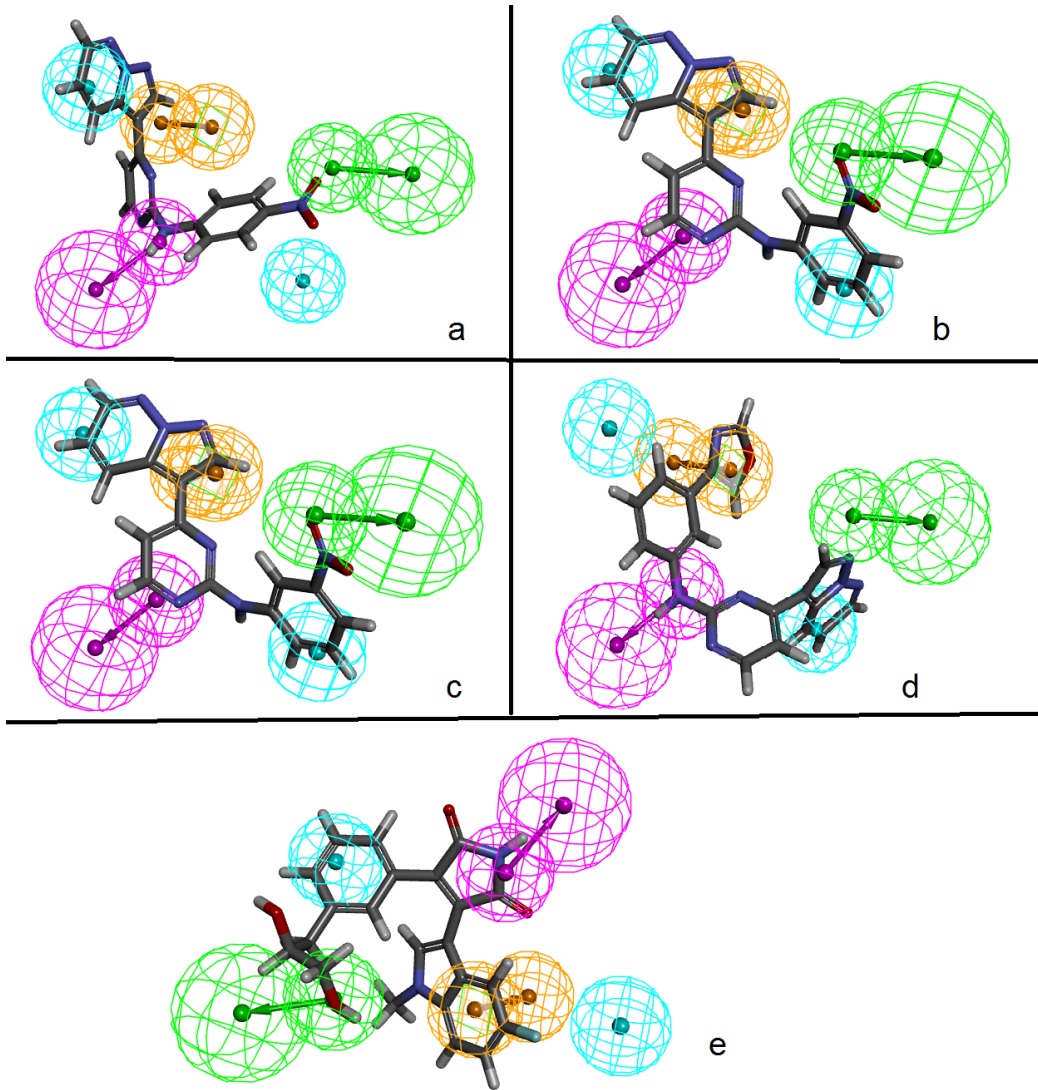
	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradianti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
BDBM3175	228,558	43,9338	26,3857	92,9389	171	18,6475	3,69422	'1111'	92,9389	27,6789	26,7575	-1,59099
BDBM50267801	238,446	53,6783	32,3682	108,878	99	16,962	3,67916	'1111'	108,878	34,921	29,82	0,05454
BDBM50312996	162,432	36,5269	18,5467	86,8069	159	21,6848	3,57744	'1111'	86,8069	20,3613	33,2275	4,63329
BDBM186203	115,455	52,5361	24,404	126,478	134	32,8886	3,5691	'1111'	126,478	27,8718	24,0791	11,7941
BDBM50267802	224,927	47,4506	25,1422	94,9579	82	14,1642	3,55568	'1111'	94,9579	30,2903	20,73	4,64935
BDBM50312998	149,981	38,3801	19,6852	88,4255	44	22,1198	3,49655	'1111'	88,4255	27,8106	25,2602	2,93868
BDBM50293306	221,156	54,6903	26,1651	122,2	13	35,0949	3,4354	'1111'	122,2	23,5533	12,7345	-0,06318
BDBM50026830	50,5779	22,9255	17,5019	63,6797	1	15,0402	3,36906	'1111'	63,6797	24,3007	7,70837	3,98697
BDBM50150698	234,685	54,616	36,7533	121,37	74	26,5245	3,14482	'1111'	121,37	30,9116	55,3582	-3,63259
BDBM50267607	220,847	35,288	28,2635	96,3953	7	17,6961	3,14402	'1111'	96,3953	36,1869	20,2343	3,92126

BDBM31587	120,451	29,7116	24,2782	95,3593	17	22,2191	2,98005	'1101'	95,3593	27,8559	21,2149	14,3363
BDBM50267461	206,494	40,11	23,2034	93,1562	15	16,7208	2,97459	'1101'	93,1562	33,0139	5,96205	3,5184
BDBM50337557	93,3284	25,1191	26,9798	79,0463	38	21,2775	2,96656	'1101'	79,0463	27,0012	8,46361	2,55604
BDBM50293155	106,984	25,7374	21,1774	87,7553	8	28,889	2,96043	'1101'	87,7553	31,9796	0,518306	7,41216
BDBM50293152	109,575	22,3163	13,3512	92,0563	4	39,2477	2,95233	'0111'	92,0563	27,1053	3,12531	5,72893
BDBM50293157	107,616	25,609	17,4256	83,2949	7	32,9425	2,94986	'0111'	83,2949	27,5079	3,20589	3,55568
BDBM50267760	222,115	44,3587	26,0177	95,9913	26	18,6216	2,94592	'1101'	95,9913	31,031	18,9815	0,93162
BDBM8272	80,1048	31,4829	16,8821	62,2634	9	13,8931	2,93156	'1011'	62,2634	20,9842	11,9198	-1,82484
BDBM50293153	108,147	24,8051	12,25	90,3639	8	31,8165	2,93117	'0111'	90,3639	26,4461	3,06948	11,11
BDBM8359	95,573	33,1959	26,2554	88,4305	33	23,886	2,90598	'1011'	88,4305	29,3563	16,2484	1,84203
BDBM251576	88,5687	28,3311	20,7111	78,5217	17	18,2836	2,85799	'0111'	78,5217	28,7984	7,16592	6,59073
BDBM251572	83,2228	22,099	28,9507	80,8716	29	22,715	2,84463	'1011'	80,8716	25,5399	2,70518	2,4897
BDBM31588	82,0836	29,0416	17,1299	80,862	12	18,3457	2,64624	'1101'	80,862	29,7943	4,95727	10,6051
BDBM8686	132,345	33,7309	17,7794	86,4674	85	17,7453	1,99818	'1001'	86,4674	26,8468	14,9455	12,7161

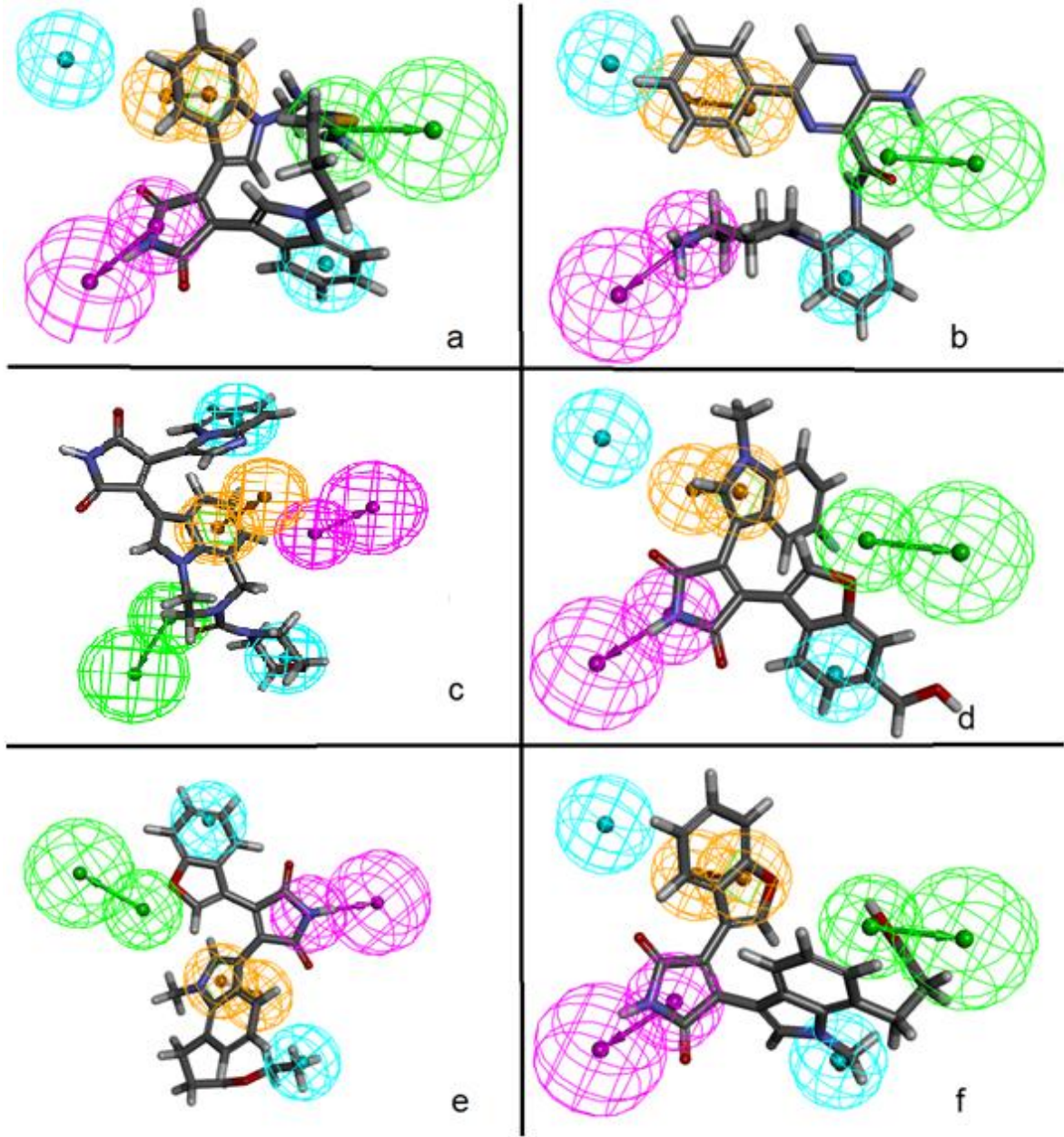
HipHop metoduyla geliştirilen farmakofor modeline GSK-3 β inhibitörlerinin uyumunun incelendiği Çizelge 5.10'da da görüldüğü üzere maksimum uyum değerleri yine istenilen noktaya ulaşmamıştır. İlgili farmakoforun hem asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hem GSK-3 β inhibitörleriyle uyumu yetersizdir. Bu nedenle 3D veritabanı taramalarına taşınmayacaktır.

5.3.1.3. Glikojen Sentaz Kinaz 3 β İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Test Serisinin Karşılaştırılması

Test serisi yine GSK-3 β inhibitörlerinden oluşmaktadır.



Şekil 5.25. GSK-3 β inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile test serisindeki bileşiklerin karşılaştırılması a) BDBM50293152 b) BDBM50293153 c) BDBM50293155 d) BDBM50312998 e) BDBM503375



Şekil 5.26. . GSK-3 β inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile test serisindeki bileşiklerin karşılaştırılması 2. Kısım a) BDBM3175 b) BDBM8359 c) BDBM50150698 d) BDBM50267461 e) BDBM50267801 f) BDBM50267802

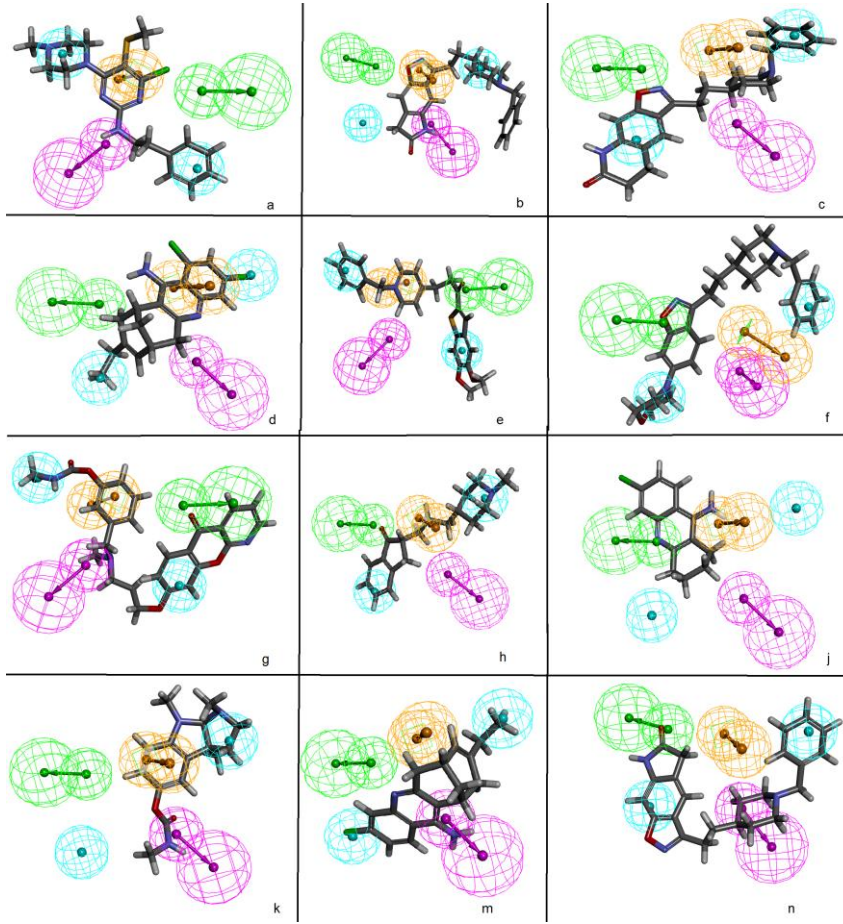
Şekil 5.25 ve Şekil 5.26'da da görüldüğü üzere farmakofor modelinde özellikle hidrofobik özelliğe oturmayan pek çok molekül bulunmaktadır. Test serisinde karşılaşılan bu durum istatistiksel verilerin incelenmesini gerektirmiştir. Bu nedenle Çizelge 5.11'de verilen sonuçlara ulaşılmıştır. Buna göre maksimum uyum verileri yaklaşık olarak 3 sklasında çıkmaktadır.

Çizelge 5.11. HipHop temelli GSK-3 β inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in test serisindeki moleküllerle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler

	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradienti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
BDBM50267801	221,849	53,6783	32,3682	108,878	63	16,962	3,97393	'11111'	108,878	34,921	13,223	0,05454
BDBM50312998	136,729	38,3801	19,6852	88,4255	111	22,1198	3,83019	'11011'	88,4255	27,8106	12,008	2,93868
BDBM3175	225,716	43,9338	26,3857	92,9389	95	18,6475	3,72675	'11011'	92,9389	27,6789	23,9159	-1,59099
BDBM50267802	220,36	47,4506	25,1422	94,9579	89	14,1642	3,52259	'11011'	94,9579	30,2903	16,1632	4,64935
BDBM50150698	196,27	54,616	36,7533	121,37	19	26,5245	3,44115	'11101'	121,37	30,9116	16,9434	-3,63259
BDBM50267461	208,098	40,11	23,2034	93,1562	17	16,7208	3,28534	'11011'	93,1562	33,0139	7,56623	3,5184
BDBM50293153	109,968	24,8051	12,25	90,3639	2	31,8165	3,25706	'11101'	90,3639	26,4461	4,89058	11,11
BDBM8359	97,9721	33,1959	26,2554	88,4305	33	23,886	2,99957	'11011'	88,4305	29,3563	18,6475	1,84203
BDBM50337557	93,1166	25,1191	26,9798	79,0463	15	21,2775	2,98553	'01101'	79,0463	27,0012	8,25183	2,55604
BDBM50293155	116,303	25,7374	21,1774	87,7553	1	28,889	2,9522	'11011'	87,7553	31,9796	9,83829	7,41216
BDBM50293152	106,581	22,3163	13,3512	92,0563	4	39,2477	2,65344	'00111'	92,0563	27,1053	0,130499	5,72893

5.3.1.4. Glikojen Sentaz Kinaz 3 β İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin Karşılaştırılması

Şekil 5.27’de Hiphop metoduyla GSK-3 β inhibitörleri kullanılarak geliştirilen ve seçilen hipotez 1 asetilkolinesteraz inhibitörleri ile karşılaştırılarak farmakoforun çoklu hedefe yönelik ilaç adayı moleküllerinin tasarımına götürecektir farmakofor olup olmayacağını anlaşılması üzerinde durulmuştur.



Şekil 5.27. GSK-3 β inhibitörleri ile HipHop metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile asetilkolinesteraz inhibitörlerinin karşılaştırılması a) BDBM50028685 b) BDBM50032163 c) BDBM50032164 d) BDBM50094630 e) BDBM50117612 f) ChEMBL93936 g) ChEMBL131827 h) ChEMBL263322 j) ChEMBL486698 k) fizostigmin m) huprineks n) ikopezil

Şekil 5.27’den de anlaşılacağı gibi farmakofor asetilkolin esteraz inhibitörleriyle de tam bir uyum göstermemiştir bu nedenle istatistiksel verileri incelenmiştir (Çizelge 5.12). Buna göre ise önceki hipotezlerde olduğu gibi istenilen maksimum uyum değerlerine ulaşamamıştır.

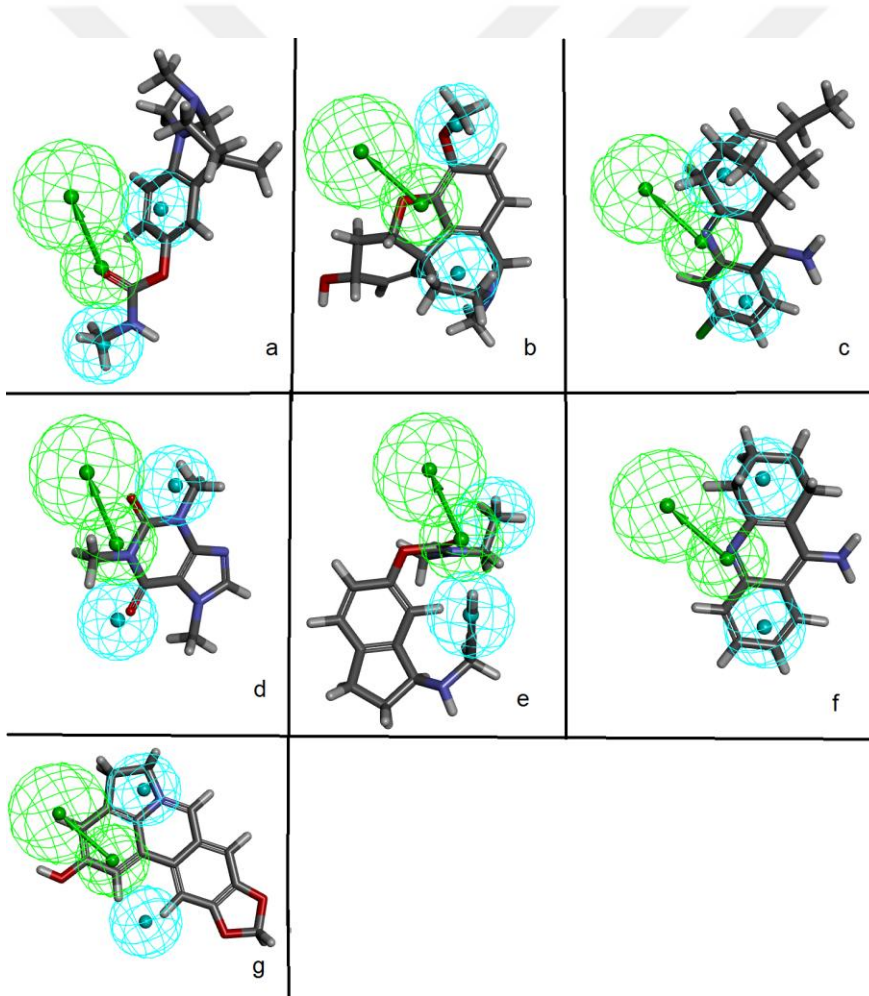
Çizelge 5.12. HipHop temelli GSK-3 β inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in asetilkolinesteraz inhibitörleriyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler

	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradienti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
BDBM50117612	166,659	37,3833	24,6304	100,817	64	28,9281	3,73293	'11101'	100,817	28,3626	26,2408	7,26762
CHEMBL131827	94,2002	28,237	32,6764	93,9858	228	24,6436	3,60484	'11101'	93,9858	28,0688	31,7893	5,52342
BDBM50028685	63,1386	29,0652	23,874	67,527	74	16,4317	3,0486	'11110'	67,527	23,9452	8,82737	-3,4081
CHEMBL93936	107,601	30,1177	42,3571	110,116	26	35,0397	2,85638	'01101'	110,116	27,9708	18,2036	-0,30373
BDBM50032163	126,629	43,8508	29,5448	104,054	11	23,9359	2,75844	'10110'	104,054	27,867	11,1175	3,27972
icopezil	125,663	42,0553	23,424	97,9391	8	24,4093	2,72368	'01101'	97,9391	24,0107	10,0443	5,24197
CHEMBL263322	50,1981	36,0907	26,5757	79,4426	91	17,6954	2,59374	'01101'	79,4426	27,4721	8,04626	-1,47593
physostigmine	76,2739	40,132	20,8657	84,5902	7	21,4461	2,52218	'10110'	84,5902	23,5344	20,4209	-0,49238
huprinex	38,53	24,0187	20,0276	95,3494	1	32,5609	2,33937	'01110'	95,3494	28,1736	0,176143	11,9562
BDBM50094630	51,2798	32,7672	22,0227	97,144	3	27,3419	2,20881	'11100'	97,144	29,1295	0,925449	9,41455
BDBM50032164	91,415	30,2664	33,036	96,272	5	30,2586	2,14974	'01101'	96,272	27,5643	6,91226	-1,71279
CHEMBL486698	36,5455	20,3099	11,8849	46,9109	2	4,99889	1,97865	'01001'	46,9109	25,4215	3,86726	8,68794

5.3.2. 3D QSAR FARMAKOFOR GELİŞTİRME METODUYLA GELİŞTİRİLEN FARMAKOFORLARIN TEST SERİLERİ İLE ÇAKIŞTIRILMASI

5.3.2.1. Asetilkolinesteraz İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Test Serisindeki Moleküllerin Karşılaştırılması

Çizelge 4.1’de IC₅₀ değerleri ile birlikte verilen asetilkolin esteraz inhibitörler ile yürütülen analiz sonucunda elde edilen farmakofor Şekil 5.28’deki gibi diğer asetilkolin esteraz inhibitörleriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca Çizelge 5.13’de de verildiği üzere elde edilen tüm hipotezler arasında en iyi maksimum uyum değerleri bu hipotezde tespit edilmiştir. Bu nedenle bu hipotez ilaç öncülü ligand tarama çalışmalarında ilgili veritabanlarında taramak için seçilmiştir.



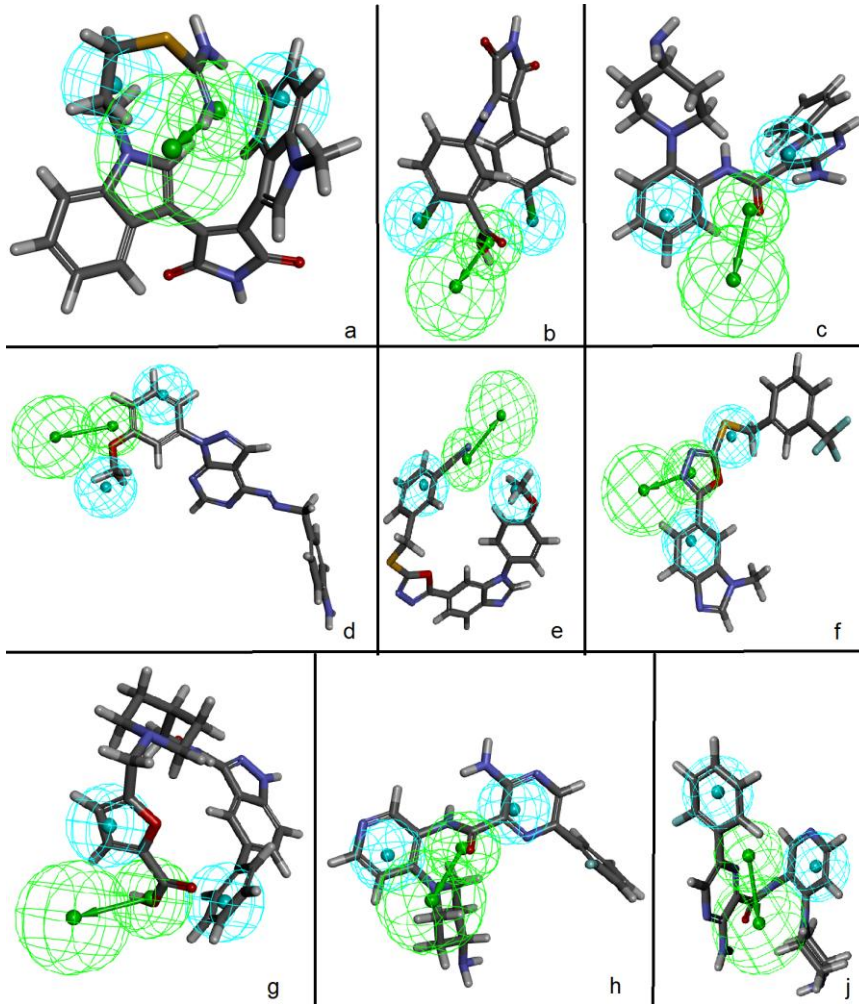
Şekil 5.28. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotez ile asetilkolinesteraz inhibitörlerinin karşılaştırılması a) Fizostigmin b) Galantamin c) Huprineks d) Kafein e) Ladostigil f) Takrin g) Ungeremin

Çizelge 5.13. 3D QSAR temelli asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in asetilkolinesteraz inhibitörleriyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler

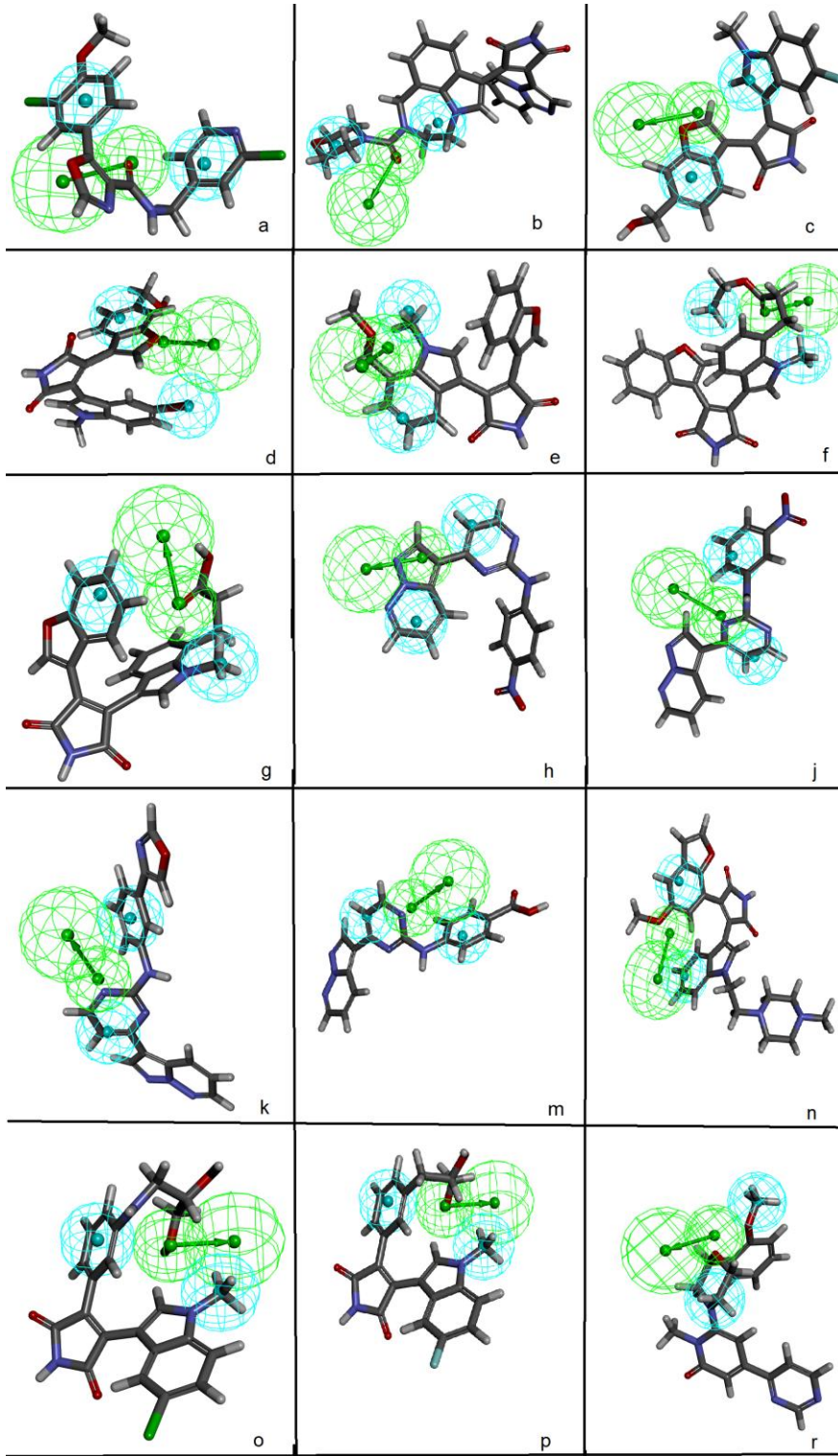
	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradienti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
Ladostigil	67,9162	38,4999	15,4629	68,0941	86	10,5661	6,25933	'111'	68,0941	25,3192	22,0029	2,74543
Fizostigmin	59,1143	40,132	20,8657	84,5902	6	21,4461	6,174	'111'	84,5902	23,5344	3,26126	-0,49238
Kafein	27,6782	15,5357	12,3232	37,3681	1	3,53738	6,08546	'111'	37,3681	28,5745	0	3,54406
Huprineks	38,6739	24,0187	20,0276	95,3494	1	32,5609	5,65583	'111'	95,3494	28,1736	0,3201	11,9562
Takrin	36,4904	15,1112	12,3615	46,953	2	11,7194	5,59163	'111'	46,953	24,4669	3,92444	5,88355
Galantamin	76,7632	43,6298	25,7679	107,229	6	36,3088	5,59143	'111'	107,229	29,0085	14,5334	0,54677
Ungeremin	126,866	38,6176	18,5828	89,6896	1	13,5259	4,01002	'011'	89,6896	28,0608	0	17,5221

5.3.2.2. Asetilkolinesteraz İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile GSK-3 β inhibitörlerinin Karşılaştırılması

İlgili farmakofor hem istatistiksel açıdan hem de ligandlarla farmakoforun çakıştırılmasındaki uyum açısından başarılı bulunmuş çoklu hedefe yönelik ilaç etken madde geliştirme çalışmaları için GSK-3 β inhibitörleriyle çakıştırılmıştır. Şekil 5.29 ve Şekil 5.30'da 24 adet GSK-3 β inhibitörüyle hipotez 1 de çakışmalar mevcuttur. Şekilde ilk defa farklı bir reseptör için geliştirilmiş farmakofor modeline diğer reseptörü inhibe eden moleküllerin oldukça başarıyla oturduğu görülmektedir. Ayrıca Çizelge 5.14'de görüldüğü üzere maksimum uyum yaklaşık 6'yı göstermektedir. Bu oldukça istenilen bir veridir.



Şekil 5.29. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotezin GSK-3 β inhibitörleriyle çakıştırılması a) BDBM3175 b) BDBM8272 c) BDBM8359 d) BDBM8686 e) BDBM31587 f) BDBM31588 g) BDBM186203 h) BDBM251572 j) BDBM251576



Şekil 5.30. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotezin GSK-3 β inhibitörleriyle karşılaştırılması a) BDBM50026830 b) BDBM50150698 c) BDBM50267461 d) BDBM50267607 e) BDBM50267760 f) BDBM50267801 g) BDBM50267802 h) BDBM50293152 j) BDBM50293153 k) BDBM50293155 m) BDBM50293157 n) BDBM50293306 o) BDBM50312996 p) BDBM50312998 r) BDBM50337557

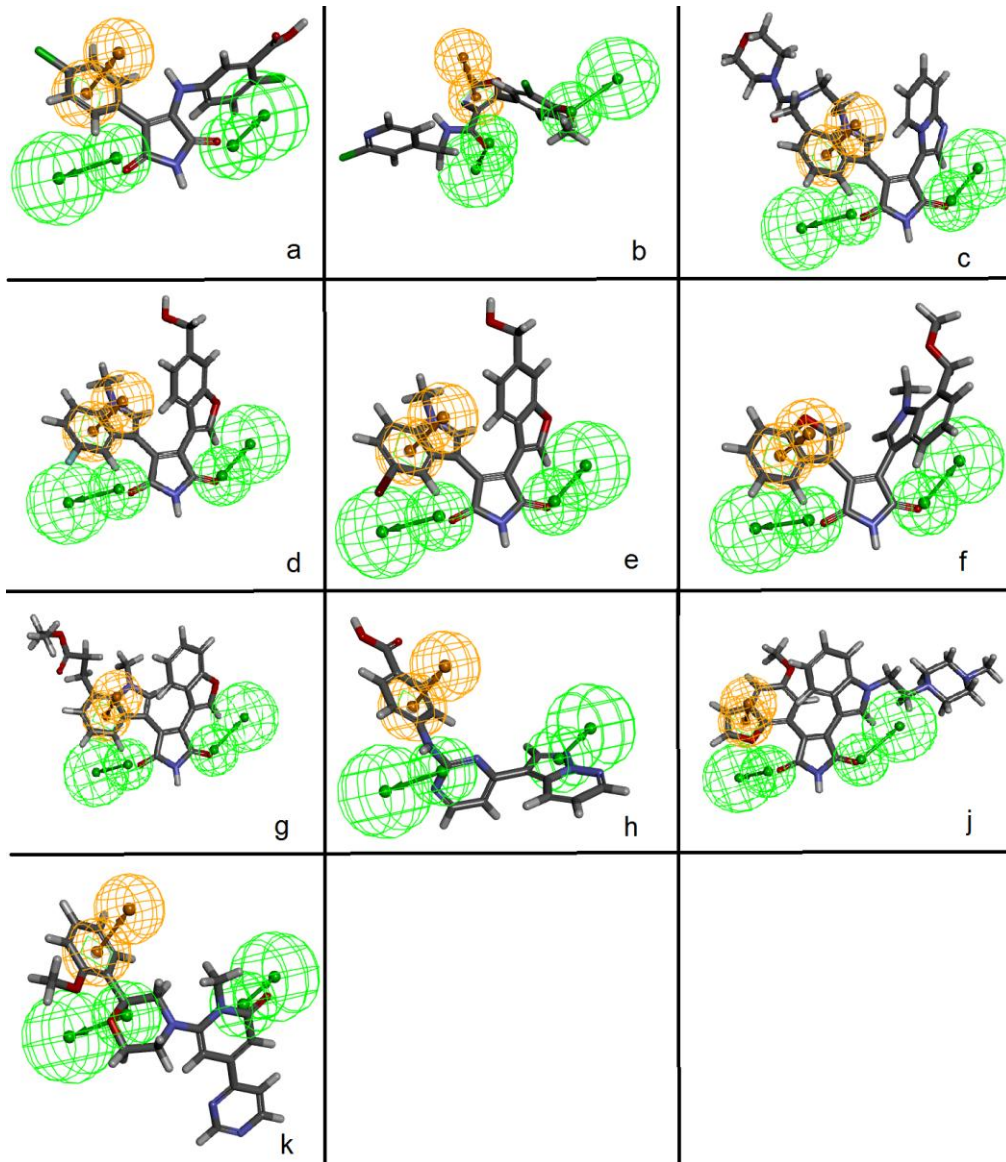
Çizelge 5.14. 3D QSAR temelli asetilkolinesteraz inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in GSK-3 β inhibitörleriyle kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler

	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradienti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
BDBM50267801	220,909	53,6783	32,3682	108,878	85	16,962	6,26285	'111'	108,878	34,921	12,2828	0,05454
BDBM50312996	152,823	36,5269	18,5467	86,8069	209	21,6848	6,26278	'111'	86,8069	20,3613	23,6185	4,63329
BDBM50312998	150,998	38,3801	19,6852	88,4255	46	22,1198	6,25804	'111'	88,4255	27,8106	26,2778	2,93868
BDBM50267802	229,986	47,4506	25,1422	94,9579	99	14,1642	6,22803	'111'	94,9579	30,2903	25,789	4,64935
BDBM50026830	44,1196	22,9255	17,5019	63,6797	1	15,0402	6,21623	'111'	63,6797	24,3007	1,25007	3,98697
BDBM186203	125,909	52,5361	24,404	126,478	130	32,8886	6,20772	'111'	126,478	27,8718	34,5336	11,7941
BDBM3175	234,162	43,9338	26,3857	92,9389	204	18,6475	6,15833	'111'	92,9389	27,6789	32,3616	-1,59099
BDBM8272	102,191	31,4829	16,8821	62,2634	9	13,8931	6,14728	'111'	62,2634	20,9842	34,0059	-1,82484
BDBM50150698	184,029	54,616	36,7533	121,37	12	26,5245	6,07801	'111'	121,37	30,9116	4,70229	-3,63259
BDBM50293153	111,368	24,8051	12,25	90,3639	6	31,8165	6,03566	'111'	90,3639	26,4461	6,2897	11,11
BDBM50267607	233,996	35,288	28,2635	96,3953	12	17,6961	5,78728	'111'	96,3953	36,1869	33,3835	3,92126

BDBM50293157	103,611	25,609	17,4256	83,2949	2	32,9425	5,72028	'111'	83,2949	27,5079	-0,79911	3,55568
BDBM50293155	109,579	25,7374	21,1774	87,7553	11	28,889	5,6881	'111'	87,7553	31,9796	3,11412	7,41216
BDBM31587	112,621	29,7116	24,2782	95,3593	83	22,2191	5,67147	'111'	95,3593	27,8559	13,3843	14,3363
BDBM50337557	98,2135	25,1191	26,9798	79,0463	34	21,2775	5,65601	'111'	79,0463	27,0012	13,3488	2,55604
BDBM31588	78,6129	29,0416	17,1299	80,862	27	18,3457	5,65004	'111'	80,862	29,7943	1,48661	10,6051
BDBM50267760	205,472	44,3587	26,0177	95,9913	5	18,6216	5,19994	'111'	95,9913	31,031	2,33797	0,93162
BDBM50293306	245,291	54,6903	26,1651	122,2	6	35,0949	5,1642	'111'	122,2	23,5533	36,869	-0,06318
BDBM50267461	224,161	40,11	23,2034	93,1562	6	16,7208	5,00145	'111'	93,1562	33,0139	23,6292	3,5184
BDBM8686	123,201	33,7309	17,7794	86,4674	69	17,7453	4,42353	'111'	86,4674	26,8468	5,80142	12,7161
BDBM50293152	107,963	22,3163	13,3512	92,0563	2	39,2477	4,37344	'111'	92,0563	27,1053	1,51242	5,72893
BDBM251576	99,8236	28,3311	20,7111	78,5217	8	18,2836	4,15615	'011'	78,5217	28,7984	18,4208	6,59073
BDBM251572	84,0377	22,099	28,9507	80,8716	45	22,715	4,12399	'110'	80,8716	25,5399	3,52016	2,4897
BDBM8359	83,2428	33,1959	26,2554	88,4305	6	23,886	4,09165	'110'	88,4305	29,3563	3,91822	1,84203

5.3.2.3. GSK-3 β İnhibitorlarıyla Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Test Serisindeki Moleküllerin Karşılaştırılması

Çizelge 4.2’de IC₅₀ değerleri verilen GSK-3 β inhibitörleri yine GSK-3 β inhibitörleriyle karşılaştırılarak güvenilirliği test edilmiştir (Şekil 5.31). Bir önceki hipotezde elde edilen başarı gözlenmesede yine moleküllerin farmakofora oldukça güzel oturduğu gözlenmektedir. Ayrıca sonuçlar istatistiksel verilerle de incelenmiştir (Çizelge 5.15).



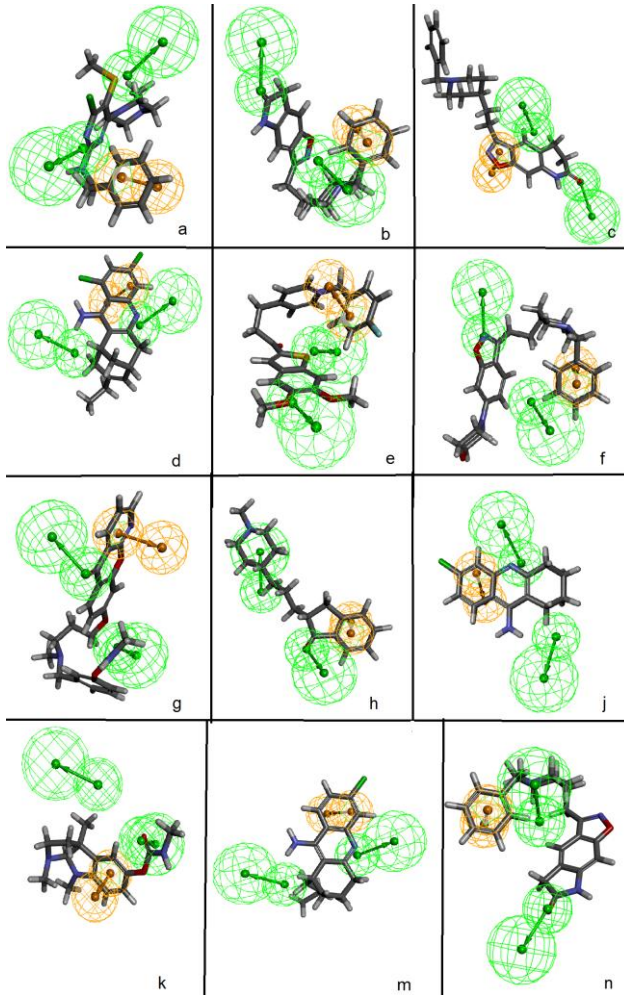
Şekil 5.31. GSK-3 β inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotezin GSK-3 β inhibitörleriyle karşılaştırılması a) BDBM8272 b) BDBM50026830 c) BDBM50150698 d) BDBM50267461 e) BDBM50267607 f) BDBM50267760 g) BDBM50267801 h) BDBM50293157 j) BDBM50293306 k) BDBM50337557 n) BDBM50293306 o) BDBM50312996 p) BDBM50312998 r) BDBM50337557

Çizelge 5.15. 3D QSAR temelli GSK-3 β inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in test serisi moleküllerle karşılaştırılması kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler

	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradienti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
BDBM50026830	52,2925	22,9255	17,5019	63,6797	128	15,0402	6,6248	'111'	63,6797	24,3007	9,42291	3,98697
BDBM50293306	219,308	54,6903	26,1651	122,2	2	35,0949	6,38931	'111'	122,2	23,5533	10,8865	-0,06318
BDBM50267801	232,43	53,6783	32,3682	108,878	14	16,962	6,24201	'111'	108,878	34,921	23,8046	0,05454
BDBM50267760	229,52	44,3587	26,0177	95,9913	1	18,6216	6,22576	'111'	95,9913	31,031	26,3855	0,93162
BDBM50150698	205,596	54,616	36,7533	121,37	73	26,5245	6,22199	'111'	121,37	30,9116	26,269	-3,63259
BDBM50267461	209,651	40,11	23,2034	93,1562	7	16,7208	6,21219	'111'	93,1562	33,0139	9,11914	3,5184
BDBM50267607	209,188	35,288	28,2635	96,3953	5	17,6961	6,21117	'111'	96,3953	36,1869	8,57568	3,92126
BDBM8272	77,8543	31,4829	16,8821	62,2634	3	13,8931	6,11389	'111'	62,2634	20,9842	9,66937	-1,82484
BDBM50293157	106,557	25,609	17,4256	83,2949	7	32,9425	5,62213	'111'	83,2949	27,5079	2,14662	3,55568
BDBM50337557	99,9366	25,1191	26,9798	79,0463	1	21,2775	5,56805	'111'	79,0463	27,0012	15,0718	2,55604

5.3.2.4. GSK-3 β İnhibitörleriyle Geliştirilmesi Sonucunda Seçilen Hipotez 1 ile Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin Karşılaştırılması

Bu hipotezde de test serisiyle maksimum uyum değerleri oldukça yüksek çıkmıştır. Hipotezin çoklu hedefe yönelik ilaç etken madde geliştirme çalışmalarında kullanılmak için uygunluğunu tespit etmek üzere asetilkolinesteraz inhibitörleriyle karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 5.32). Ayrıca Çizelge 5.16'da da bu karşılaştırmaya ait istatistiksel veriler bulunmaktadır. Bu çizelgeye göre maksimum uyum değerleri hem asetilkolinesteraz inhibitörleri hem de GSK-3 β inhibitörleri için en uyumlu sonuçlar bu hipoteze ait farmakoforda elde edilmiştir.



Şekil 5.32. GSK-3 β inhibitörleri ile 3D QSAR metodu kullanılarak geliştirilen hipotezin asetilkolinesteraz inhibitörleriyle karşılaştırılması a) BDBM50028685 b) BDBM50032163 c) BDBM50032164 d) BDBM50094630 e) BDBM50117612 f) ChEMBL93936 g) ChEMBL131827 h) ChEMBL263322 j) ChEMBL486698 k) fizostigmin n) huprineks o) ikopezil

Çizelge 5.16. 3D QSAR temelli GSK-3 β inhibitörleriyle hazırlanan Hipotez 1'in asetilkolinesteraz inhibitörleriyle karşılaştırılması kontrolü ile ilgili istatistiksel veriler

	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradianti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
CHEMBL131827	79,0135	28,237	32,6764	93,9858	126	24,6436	6,75954	'111'	93,9858	28,0688	16,6026	5,52342
BDBM50117612	173,05	37,3833	24,6304	100,817	110	28,9281	6,14356	'111'	100,817	28,3626	32,6321	7,26762
BDBM50028685	73,1317	29,0652	23,874	67,527	177	16,4317	5,24277	'111'	67,527	23,9452	18,8205	-3,4081
BDBM50032163	127,615	43,8508	29,5448	104,054	11	23,9359	4,51278	'101'	104,054	27,867	12,1033	3,27972
CHEMBL93936	109,9	30,1177	42,3571	110,116	16	35,0397	4,50959	'101'	110,116	27,9708	20,5024	-0,30373
CHEMBL263322	42,1518	36,0907	26,5757	79,4426	1	17,6954	4,48791	'011'	79,4426	27,4721	0	-1,47593
İkopezil	124,179	42,0553	23,424	97,9391	9	24,4093	4,48433	'101'	97,9391	24,0107	8,55982	5,24197
BDBM50032164	85,8524	30,2664	33,036	96,272	1	30,2586	4,46891	'101'	96,272	27,5643	1,34966	-1,71279
Fizostigmin	64,7689	40,132	20,8657	84,5902	7	21,4461	4,46853	'011'	84,5902	23,5344	8,91586	-0,49238
BDBM50094630	50,6375	32,7672	22,0227	97,144	2	27,3419	3,0953	'011'	97,144	29,1295	0,28305	9,41455
CHEMBL486698	36,5455	20,3099	11,8849	46,9109	2	4,99889	3,09321	'011'	46,9109	25,4215	3,86726	8,68794
Huprineks	38,6739	24,0187	20,0276	95,3494	1	32,5609	3,08775	'011'	95,3494	28,1736	0,3201	11,9562

5.4. SEÇİLEN FARMAKOFORA UYGUN LİGANDLARIN TARANMASI VE ADME-TOKSİKOLOJİ ANALİZİ

2 Hidrojen bağı alıcısı, bir tane de halkalı aromatik yapı içeren GSK-3 β inhibitörleri ile geliştirilen farmakofor (Şekil 5.10) hem GSK-3 β test serisiyle hem de asetilkolinesteraz inhibitörleriyle verdiği uyum nedeniyle veritabanında yürütülecek araştırma için seçilmiştir. DSC programına ait DrugLikeDiverse veritabanında ilgili farmakofor ile yürütülen çalışma sonucu bu farmakofora uyum gösteren 3930 adet molekül tespit edilmiştir (EK-1). İlgili moleküller arasındaki eleme ise ADME-Toksikoloji özelliklerine göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bileşiklerden ADME özelliklerini sağlayan en iyi 20 tanesi ve özellikleri Çizelge 5.17 ve Çizelge 5.18’de verilmiştir.

Çizelge 5.17. En iyi moleküler özelliklere sahip 20 molekül

	Bileşik	Moleküler Ağırlık	H-bağı Akseptör Sayısı	H-bağı Donörü Sayısı	Döndürülebilir Bağların Sayısı	Halkaların Sayısı	Halkalı Aromatiklerin Sayısı	Moleküler Polar Yüzey Alanı	Lipinski Kuralları
1	ENA833169	356,829	3	1	3	4	4	87,53	Uygun
2	CDI132241	400,514	4	0	4	4	3	96,12	Uygun
3	ENA623984	455,571	4	1	6	5	4	81,45	Uygun
4	CBG599807	370,487	2	0	2	5	3	33,2	Uygun
5	ASI290064	422,543	4	1	6	3	3	103,43	Uygun
6	ENA881608	411,537	4	0	7	3	2	64,42	Uygun
7	ENA373903	394,507	4	0	7	3	2	49,85	Uygun
8	UKR263840	419,339	4	0	5	3	3	78	Uygun
9	UKR1353805	368,56	5	2	6	3	1	109,54	Uygun
10	UKR403334	405,513	4	1	7	3	3	87,6	Uygun
11	CDI811327	437,939	4	2	6	4	3	67,66	Uygun
12	CNR13756	260,371	2	1	6	2	1	29,46	Uygun
13	UKR961802	433,882	6	1	9	2	2	83,09	Uygun
14	TIM405938	399,483	5	1	7	3	2	87,27	Uygun
15	VIT923177	413,311	3	1	6	3	3	59,81	Uygun

16	ENA99104	310,387	3	0	7	2	2	43,37	Uygun
17	CDI339313	379,479	5	2	4	4	3	97,14	Uygun
18	ENA462173	388,524	4	1	7	2	2	74,86	Uygun
19	CNR22181	310,39	2	2	7	2	2	58,2	Uygun
20	ASI108386	360,47	3	1	6	2	2	74,86	Uygun

Bileşikler daha önce bahsedilen Lipinski kurallarını sağlamaktadır. Ayrıca bileşiklere ait 3D yapılar EK-2’de verilmiştir. CBG599807 (5.237) ve ENA99104 (5.31) yüksek LogP değerleri nedeniyle en yüksek lipofilik özelliği göstermektedir. İnsan intestinal sisteminde absorpsiyon düzeyleri tüm moleküller için yüksektir. Öte yandan çözünürlük düzeyi en yüksek bileşikler CNR13756 ve CNR22181 molekülleridir. CYP2D6 klinik olarak kullanılan ilaçların % 25’nin metabolizması ve eliminasyonundan sorumludur. Bu nedenle ilaç molekülünün CYP2D6 enzimini inhibe etmemesi gerekmektedir. CDI811327 ve CDI811327 molekülleri dışındaki tüm moleküller CYP2D6’yı inhibe etmemektedir. Moleküllerin sadece 6 tanesi hepatotoksik özellik göstermiştir. Son olarak olası ilaç molekül hedefinin kan-beyin bariyerini geçmesi önemli olduğundan CBG599807 ve ENA99104 molekülleri üzerinde durulmuştur. Tüm özellikler değerlendirildiğinde ASI290064, ENA373903 ve ENA99104 moleküllerine toksisite analizi yürütülmesi düşünülmüştür (Çizelge 5.19).

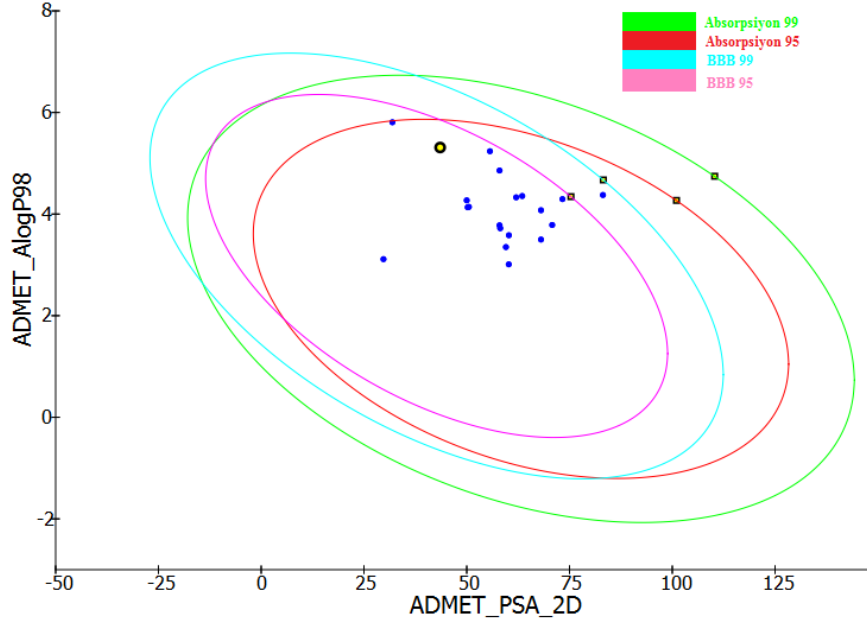
Çizelge 5.18. Seçilen 20 bileşiğe ait ADME tahminlemesi

	Bileşik	Uyum Değeri	Çözünürlük Düzeyi	Kan-Beyin Bariyeri Düzeyi	CYP2D6 Tahmini	Hepatotoksisite Tahmini	Absorpsiyon Düzeyi	Plazma Proteini Bağlanma Tahmini	ALogP	Polar Yüze Alanı_2D
1	ENA833169	6,62528	2	1	yanlış	doğru	0	doğru	3,778	57,981
2	CDI132241	6,58504	2	1	yanlış	doğru	0	doğru	3,721	58,145
3	ENA623984	6,57718	1	1	yanlış	doğru	0	doğru	5,237	55,65
4	CBG599807	6,39215	1	0	yanlış	doğru	0	doğru	5,807	31,914
5	ASI290064	6,37569	2	1	yanlış	yanlış	0	doğru	4,294	73,286
6	ENA881608	6,30318	2	1	yanlış	yanlış	0	doğru	4,355	63,493

7	ENA373903	6,2409	2	1	yanlış	yanlış	0	doğru	4,133	50,236
8	UKR263840	6,23826	2	1	yanlış	doğru	0	doğru	4,141	50,519
9	UKR1353805	6,21464	2	2	yanlış	yanlış	0	yanlış	3,35	59,53
10	UKR403334	6,20846	2	1	yanlış	doğru	0	doğru	4,329	62,025
11	CDI811327	6,18644	2	1	doğru	yanlış	0	doğru	4,27	49,999
12	CNR13756	6,16215	3	1	doğru	yanlış	0	doğru	3,112	29,745
13	UKR961802	6,14316	2	2	yanlış	yanlış	0	doğru	4,375	83,132
14	TIM405938	6,10799	2	1	yanlış	yanlış	0	doğru	3,583	60,253
15	VIT923177	6,08231	2	1	yanlış	yanlış	0	doğru	4,857	57,981
16	ENA99104	6,07684	2	0	yanlış	yanlış	0	doğru	5,31	43,531
17	CDI339313	6,07316	2	2	yanlış	yanlış	0	doğru	3,785	70,791
18	ENA462173	6,05558	2	1	yanlış	yanlış	0	doğru	4,075	68,065
19	CNR22181	6,02926	3	2	yanlış	yanlış	0	yanlış	3,01	60,222
20	ASI108386	6,00306	2	2	yanlış	yanlış	0	doğru	3,498	68,065

***AlogP**:n-octanol ile su arasındaki dağılım katsayısının logaritması. **Çözünürlük Düzeyi**: 0:aşırı düşük, 1:çok düşük, 2:düşük, 3:iyi. **Kan-Beyin Bariyer Geçiş Düzeyi**: 0:çok iyi, 1:iyi, 2:kısmen, 3:zayıf, 4:belirlenemedi. **İnsan intestinal sisteminde absorpsiyon**: 0:iyi, 1:kısmen, 2:zayıf, 3:çok zayıf.

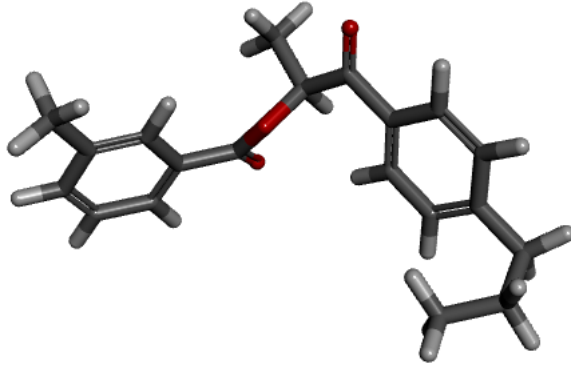
Çizelge 5.19’da çıkan sonuçlarla da belirlendiği üzere ENA99104 moleküler doking çalışmaları ve moleküler dinamik simülasyonları için seçilmiştir. (Şekil 5.34) Ayrıca ADME-plot grafiğine bakıldığında mavi noktaların her biri bir bileşiği temsil etmektedir. Sarı en büyük nokta ise ENA99104 molekülünü göstermektedir. Grafikte bütün özellikler vasıtasıyla çizilen dairelerin içinde kalması sebebiyle de bütün özellikler açısından oldukça başarılı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.33).



Şekil 5.33. İnsan intestinal sistem absorpsiyonu ve Kan-Beyin Bariyeri geçişini gösteren grafik

Çizelge 5.19. Seçilen 3 bileşik için karsinojenlik ve mutajenlik analizi sonuçları

Bileşik	TOPKAT		TOPKAT		TOPKAT		TOPKAT		AMES mutajenlik
	Dişi	Fare	Erkek	Fare	Dişi	Sıçan	Erkek	Sıçan	
	FDA		FDA		FDA		FDA		
ASI290064	Karsinojen	Fare	Multi-	Karsinojen	Karsinojen	Değil	Multi-	Karsinojen	Mutajen Değil
ENA373903	Karsinojen	Değil	Karsinojen	Değil	Karsinojen	Değil	Karsinojen	Değil	Mutajen Değil
ENA99104	Karsinojen	Değil	Karsinojen	Değil	Karsinojen	Değil	Karsinojen	Değil	Mutajen Değil



Şekil 5.34. Moleküler Docking Simülasyonları için seçilen bileşik, ENA99104'ün 3D gösterimi

5.5. MOLEKÜLER DOKING ÇALIŞMASI SONUÇLARI

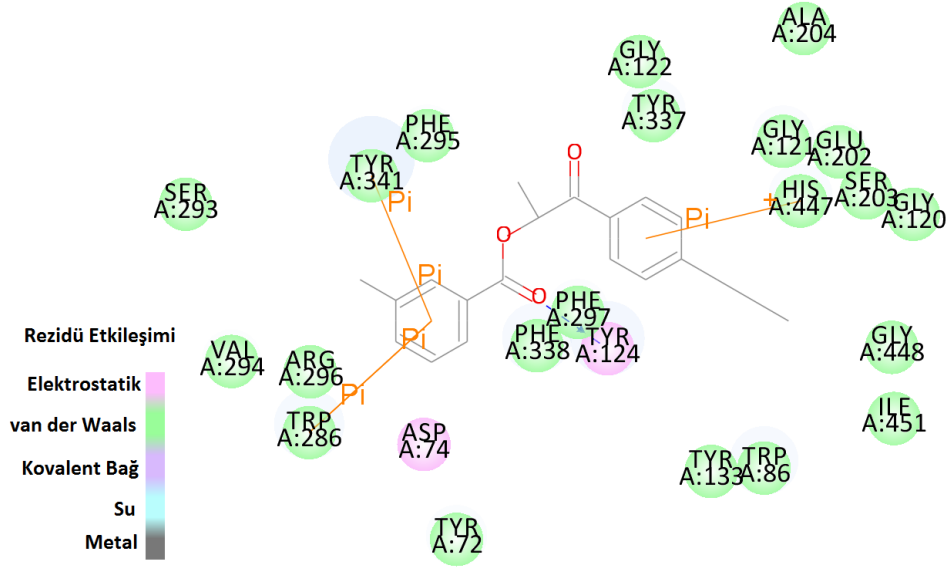
Yöntemde belirtilen protokol vasıtasıyla hazırlanan ligandların CDOCKER ve LigandFit metodlarıyla doking çalışması denenmiş, 4EY7 için CDOCKER metodu ve yöntemde belirtilen bağlanma küresi tespit edilmiştir. 1Q41 için ise LigandFit metoduyla en iyi RMSD değeri alınmış, belirlenen bağlanma küresi ile LigandFit protokolü uygulanmıştır. Tüm moleküllere ait sonuçlar 4EY7 ve 1Q41 için sırasıyla EK-3 ve EK-4'de verilmiştir. Çizelge 5.20' de ENA99104 molekülüne ait doking sonuçları verilmiştir. Şekil 5.35 ve Şekil 5.36'de ise ilgili ligandın bağlanma paketi içerisindeki konumları ve DSC tarafından belirlenmiş bağ yapıları gösterilmiştir.

Çizelge 5.20. GSK-3 β ve Asetilkolinesteraz enzimleriyle ENA99104 molekülünün doking sonuçları

Enzim	Bileşik	Bağlanma Modu	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	-CDOCKER Enerjisi (kcal/mol)	-CDOCKER Etkileşim Enerjisi (kcal/mol)	Doking Skoru
GSK-3 β (1Q42)	ENA99104	2	-20,1619	-	-	52,372
Asetilkolinesteraz (4EY7)	ENA99104	2	-24,1924	40,8546	45,1427	-

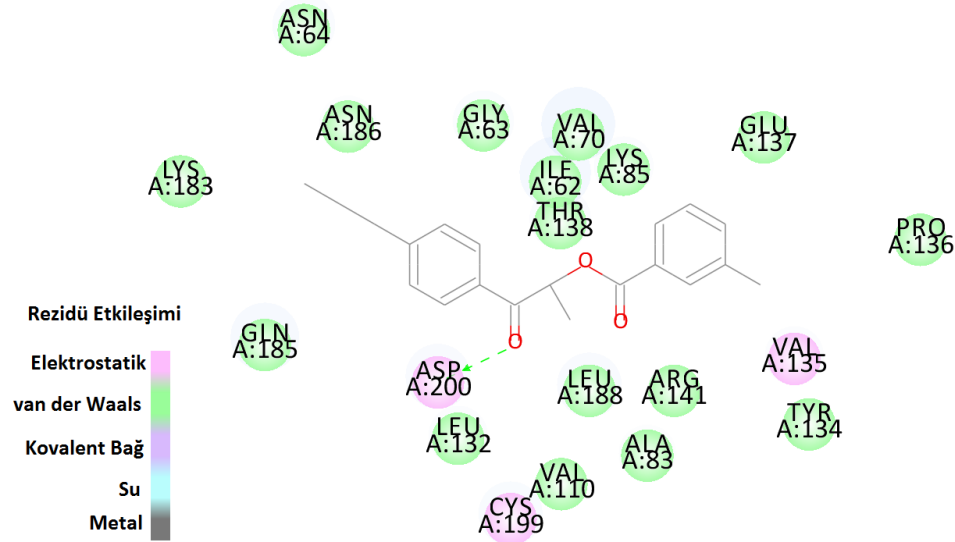
Şekil 5.35'de ENA99104'ün asetilkolin esteraz enziminin aktif bölgesi ile etkileşimi verilmiştir. Buna göre molekül TRP286, TYR341 ve HIS447 ile π - π etkileşimi gösterirken TYR124 ile H-bağı oluşturmaktadır. Reseptörün kendi ligandı olan donepezil de literatürde

(95,96) benzer etkileşimleri gösterdiğinden (EK-5) molekülün bağlanma bölgesindeki konumu uygun bulunmuştur.



Şekil 5.35. ENA99104 molekülünün asetilkolinesteraz enzimi bağlanma paketi içerisindeki konumu. Turuncu çizgiler π - π etkileşimlerini göstermektedir.

Şekil 5.36'da ise ENA99104 bileşiğinin GSK-3 β enziminin aktif yöresindeki etkileşimi verilmiştir. Referans bileşik olan indirubin ile benzer bir etkileşim (EK-6) göstermektedir (84,97).

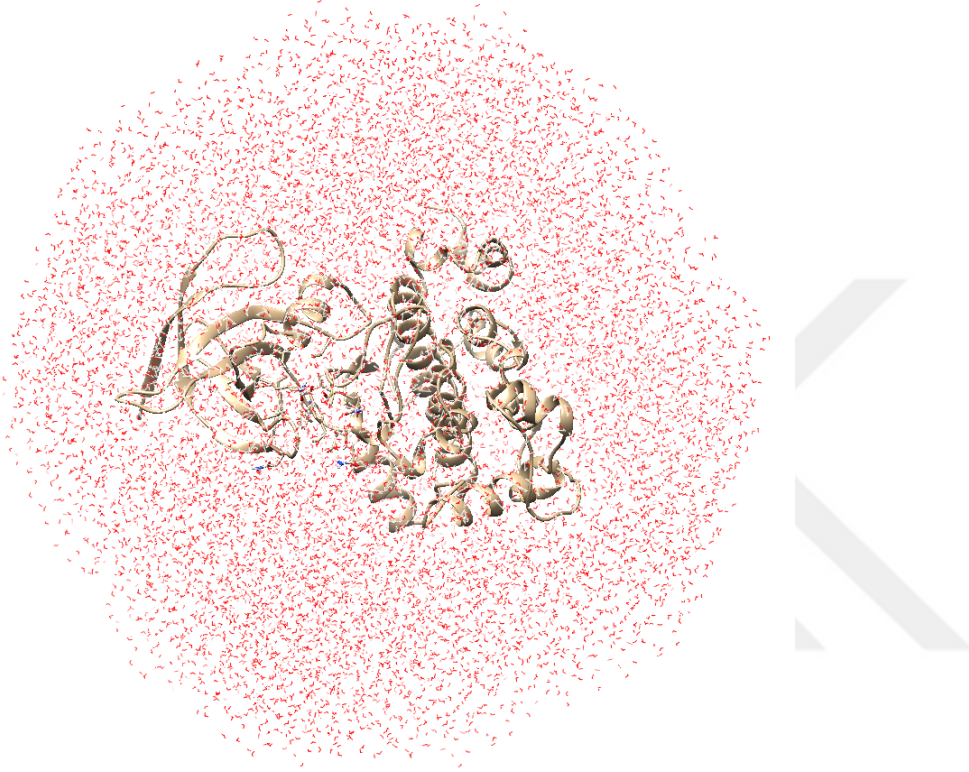


Şekil 5.36. ENA99104 molekülünün GSK-3 β enziminin aktif bölgesi ile etkileşimi. Yeşil kesikli çizgiler hidrojen bağlarını göstermektedir.

5.6. MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARINA AİT SONUÇLAR

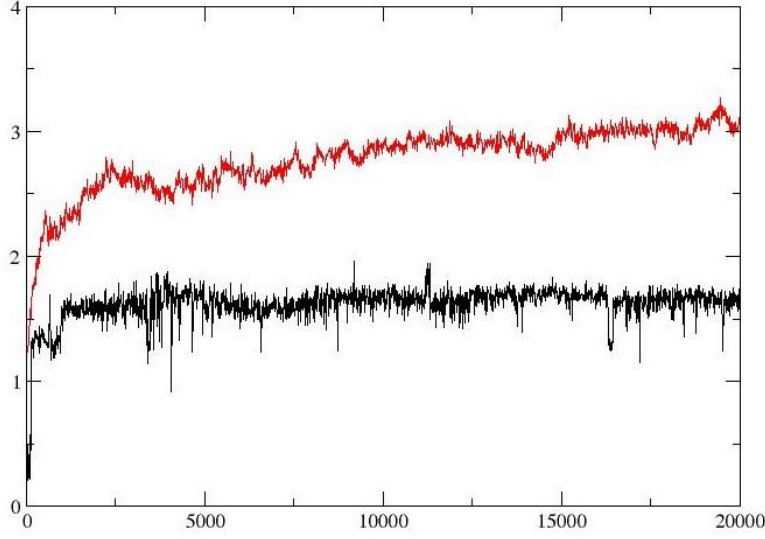
5.6.1. GSK-3BETA İLE YÜRÜTÜLEN SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI

Doking sonucunda alınan 2. konformasyonla birlikte yöntemde belirtildiği biçimde protein-ligand sisteminin başlangıç koordinatları oluşturulmuştur (Şekil 5.37).



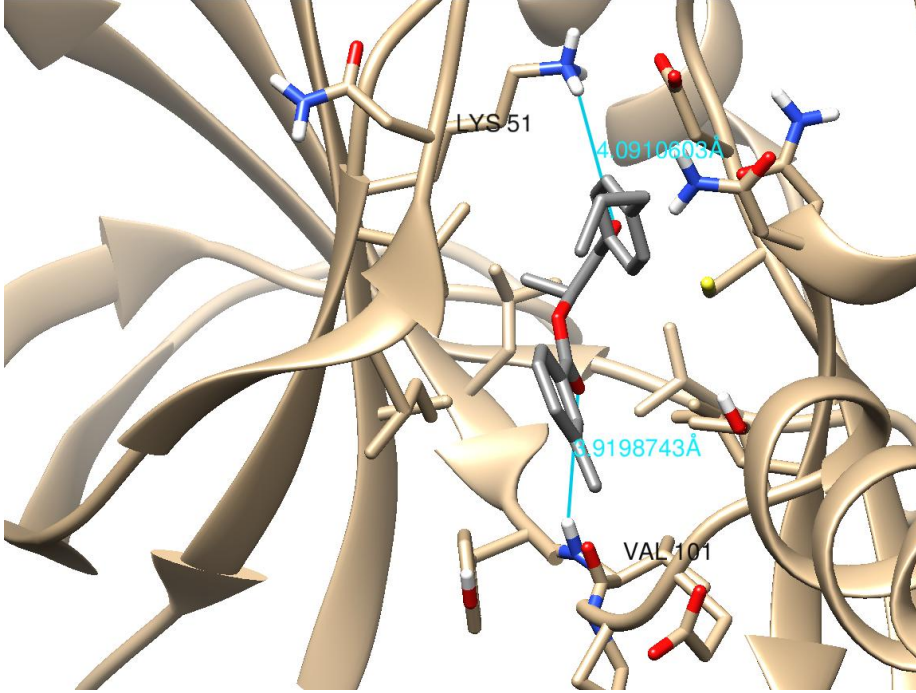
Şekil 5.37. GSK-3β ve ENA99104 kompleksi. Kahverengi α heliks ve β tabaka yapıları içeren yapı GSK-3β enzimini, kırmızı noktalar TIP3P su moleküllerini göstermektedir.

GSK-3β kompleksi pozitif yüklü çıktığı için implisit solvent içerisine gömülmeden önce Cl atomlarıyla yükü sıfırlanmıştır. Şekil 5.37'de oktahedral su kutusu içerisinde kompleks yapı bulunmaktadır. 20 ns'lik simülasyonun yeterli olup olmadığının tespiti için yürütülen RMSD hesaplamaları sonucunda Şekil 5.38'deki grafik elde edilmiştir. Buna göre ENA99104'ün (Siyah çizgi) 20 ns'lik simülasyon boyunca bağlanma paketi içerisindeki stabilitesini korurken, GSK-3β enziminin (kırmızı çizgi) tam anlamıyla stabil düzeye gelemediği gözlenmektedir. Özellikle 19.ns'de meydana gelen pik simülasyon süresinin bir süre daha uzatılabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.38. 20 ns içerisinde GSK-3 β ve ENA99104 kompleksine ait RMSD eğrisi. Kırmızı çizgi enzim yapısını, siyah çizgi ise ENA99104 'yı göstermektedir.

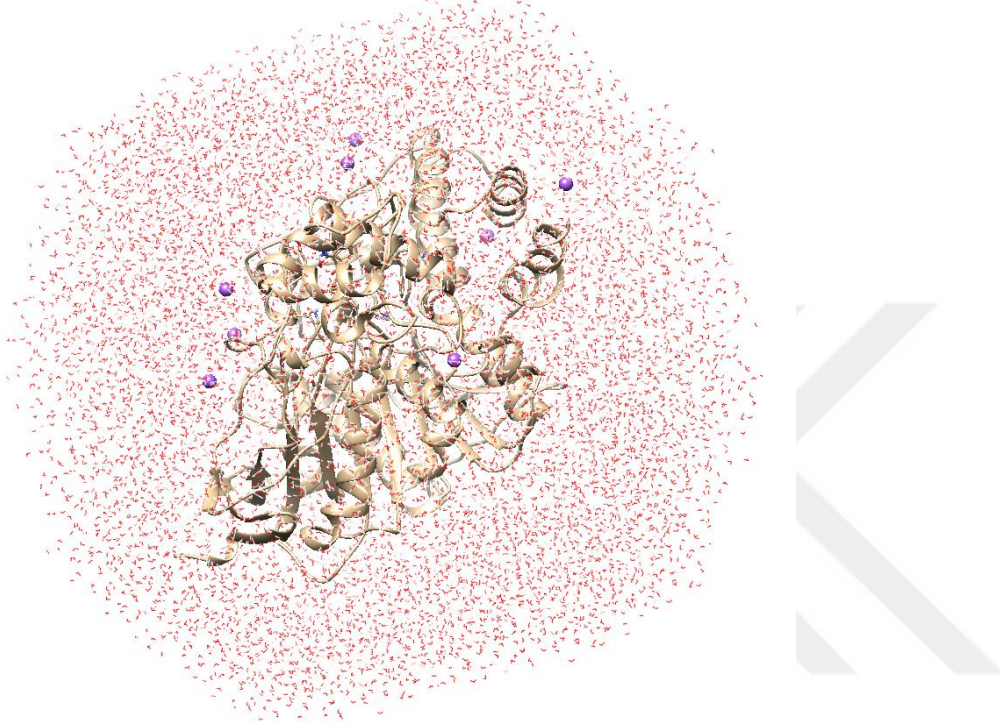
Şekil 5.39'da ise 20 ns'lik simülasyon sonunda ENA99104 molekülünün (gri) bağlanma paketi içerisindeki konumu gözlenmektedir. Buna göre molekülün LYS51 (4.09 Å) ve VAL101 (3.92 Å) rezidüleri ile hidrojen bağı yaptığı gözlenmektedir.



Şekil 5.39. GSK-3 β ve ENA99104 kompleksinin 20 ns'lik simülasyon sonrasındaki bağlanma profili

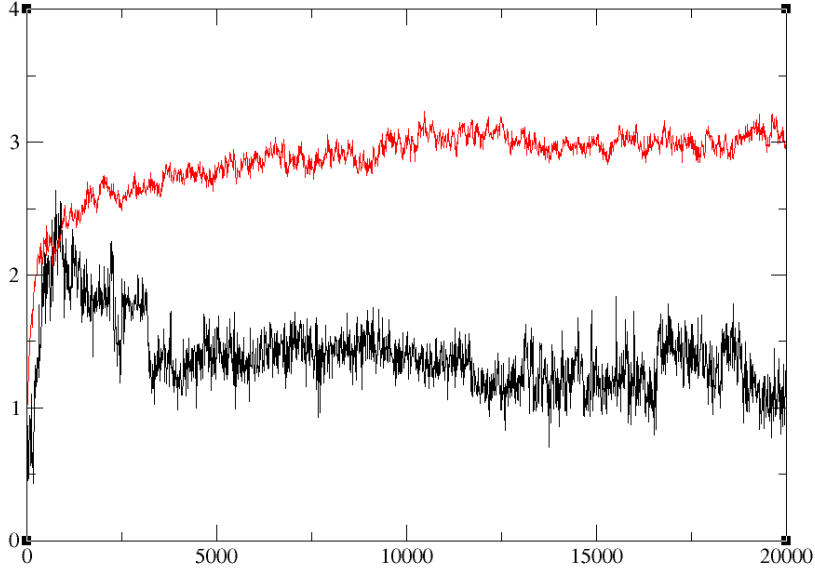
5.6.2. ASETİLKOLİNESTERAZ İLE YÜRÜTÜLEN SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI

Doking sonucunda alınan 2. konformasyonla birlikte yöntemde belirtildiği biçimde protein-ligand sisteminin başlangıç koordinatları oluşturulmuştur (Şekil 5.40).



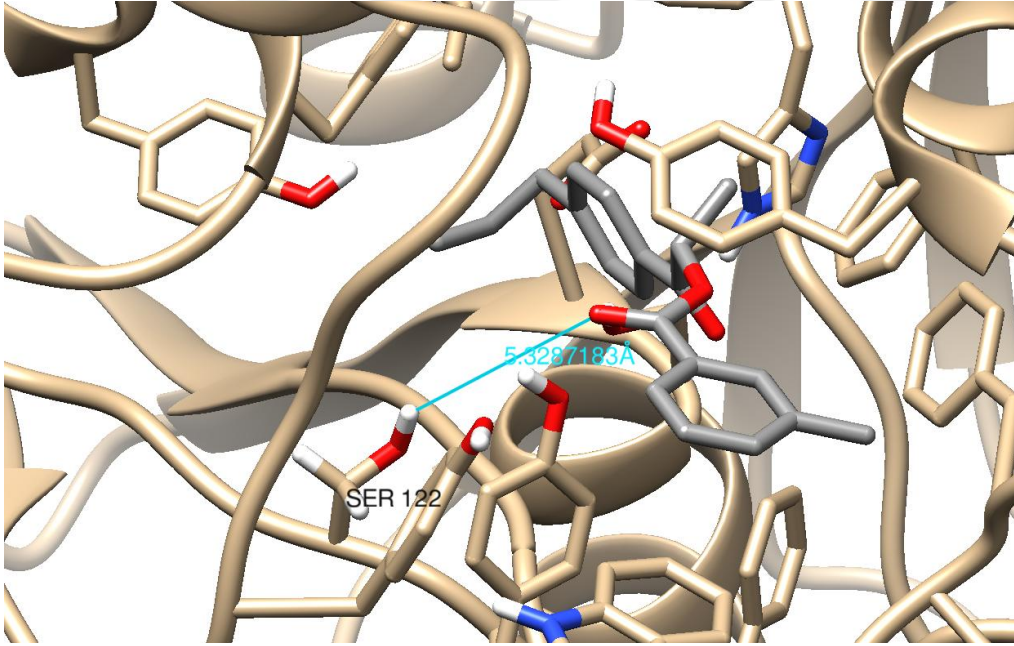
Şekil 5.40. Asetilkolinesteraz ve ENA99104 kompleksi. Kahverengi α heliks ve β tabaka yapıları içeren yapı asetilkolinesteraz enzimini, kırmızı noktalar TIP3P su moleküllerini göstermektedir. Mor büyük noktalar ise Na atomudur.

Asetilkolinesteraz ve ENA99104 kompleksi negatif yüklü çıktığı için implicit solvent içerisine gömülmeden önce Na atomlarıyla yükü sıfırlanmıştır. Şekil 5.40'da oktahedral su kutusu içerisinde kompleks yapı bulunmaktadır. 20 ns'lik simülasyonun yeterli olup olmadığının tespiti için yürütülen RMSD hesaplamaları sonucunda 'deki grafik elde edilmiştir. Buna göre ENA99104'ün (Siyah çizgi) stabilitesini henüz kazanamadığı görülürken, Asetilkolinesteraz enziminin (kırmızı çizgi) özellikle GSK-3 β enzimine göre daha stabil bir konuma geldiği gözlenmektedir (Şekil 5.41).



Şekil 5.41. 20 ns içerisinde Asetilkolinesteraz ve ENA99104 kompleksine ait RMSD eğrisi. Kırmızı çizgi enzim yapısını, siyah çizgi ise ENA99104 'yı göstermektedir.

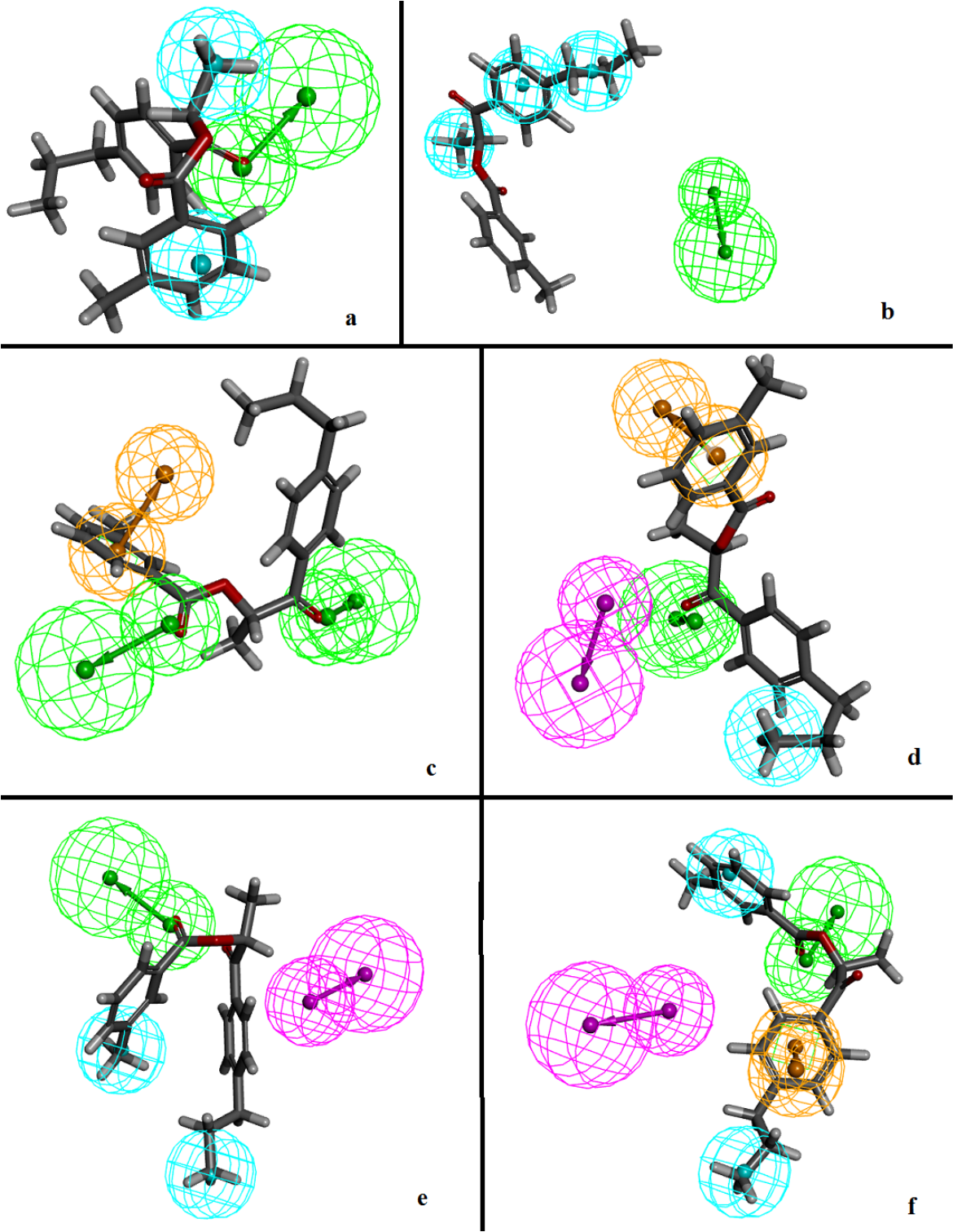
Şekil 5.42'de 20 ns'lik simülasyon sonunda ENA99104 molekülünün (gri) bağlanma paketi içerisindeki konumu gözlenmektedir. Buna göre molekülün –hidroksil grubunun SER122 (5.32 Å) rezidüsü ile hidrojen bağı yaptığı gözlenmektedir.



Şekil 5.42. Asetilkolinesteraz ve ENA99104 kompleksinin 20 ns'lik simülasyon sonrasındaki bağlanma profili

5.6.3. ELDE EDİLEN BÜTÜN FARMAKOFOR MODELLERİYLE ENA99104 MOLEKÜLÜNÜN ÇAKIŞTIRILMASI

Elde edilen diğer farmakofor modellerinin uyum değerleri düşük bulunmuş olmasına rağmen, oluşturulan bütün hipotezlerin ENA99104 molekülüne uyumlu olup olmadığı da incelemeye alınmıştır. Bu nedenle bu hipotezlerin uyumunun tartışılabilmesi için ligand farmakofor çakıştırma işlemi son olarak uygulanmıştır (Şekil 5.43). Seçilen hipotezler ile ENA99104 bileşiğinin karşılaştırılma çalışmasında “Ligand Pharmacophore Mapping” metodundan yararlanılmıştır. HipHop metodu ile geliştirilen farmakofor hipotezlerinde özellikle Hidrojen bağı donörü özelliği (pembe) molekül üzerinde çakışmamıştır (Çizelge 5.21). Bu özellikteki eksiklik parmprint verilerinden de anlaşılmaktadır (“11101”, “1101”). Hipotezlerin molekülle çakışmaması tek başına yeterli değildir. Bir diğer dikkat edilen nokta ise uyum değerleridir ve istatistiksel veriler incelendiğinde uyum değerlerinin oldukça düşük olduğu gözlenmektedir (Çizelge 5.21). ENA99104’ün tespitine temel oluşturan hipotez ile molekülün birebir örtüştüğü gözlenmiştir (Şekil 5.43c). Öte yandan aynı yöntemle geliştirilen (3D QSAR/GSK-3 β inhibitörleri) bir diğer hipotez olan Hipotez 7 ile de (Şekil 5.43d) yine hidrojen bağı donörü özelliği örtüşmemektedir. Buna rağmen uyum değeri oldukça yüksektir (5,76643). Asetilkolinesteraz inhibitörleri ve 3D QSAR metodu ile geliştirilen hipotez 1 ile ENA99104 oldukça güzel bir şekilde çakışmaktadır. Hidrofobik bölgeleri benzen halkası ve metil grubuyla örtüşürken; hidrojen bağı alıcısı özelliği ise –O atomuyla oldukça uyumlu bulunmuştur (Şekil 5.43a). Ayrıca uyum değeri de orijinal hipoteze oldukça yakındır (6,25669). Aynı metodla geliştirilen bir diğer hipotez olan hipotez 6 ise hidrofobik özellikleriyle oturmuş gibi görünse de Hidrojen bağı alıcısı (yeşil) özelliğinin çakışmadığı gözlenmiştir (Şekil 5.43b). Ayrıca uyum değeri de oldukça düşük bulunmuştur (3,94145).



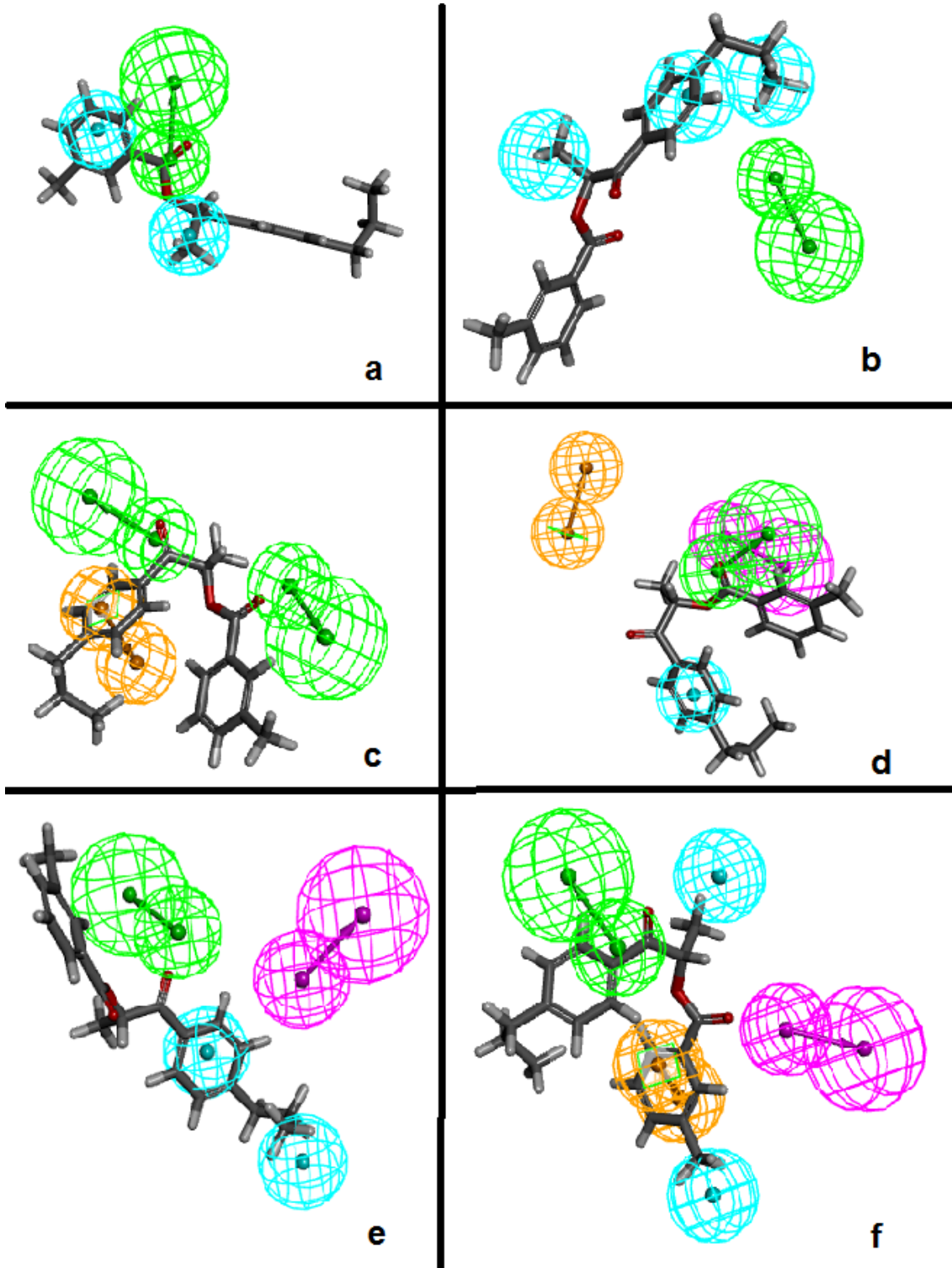
Şekil 5.43. Elde edilen bütün farmakoforlar ile ENA99104 molekülünün karşılaştırılması a) 3D-QSAR metodu asetil kolinesteraz enzimi çalışması Hipotez-1 b) 3D-QSAR metodu-asetilkolinesteraz enzimi çalışması Hipotez-6 c)3D-QSAR metodu GSK-3 β enzimi çalışması Hipotez-1 d) 3D-QSAR metodu GSK-3 β enzimi çalışması Hipotez-7 e)HipHop metodu Asetil kolinesteraz enzim çalışması f) HipHop metodu GSK-3 β enzim çalışması

Çizelge 5.21. ENA99104 Molekülünün bütün hipotezlerle karşılaştırılmasına ait istatistiksel veriler

	Absolut Enerji	Açı Enerjisi	Bağ Enerjisi	CHARMm Enerjisi	Konformasyon Numarası	Dihedral Enerji	Uyum Değeri	Pharmprint	Potansiyel Enerji	RMS Gradienti	Relatif Enerji	Van der Waals Enerjisi
Hiphop/GSK-3β	46,1721	20,8978	17,1154	48,73	82	9,10574	3,83781	'11101'	48,73	22,5209	14,5019	0,0813
HipHop/Asetil kolinesteraz	46,1368	20,8978	17,1154	48,73	73	9,10574	2,97149	'1101'	48,73	22,5209	14,4666	0,0813
3D QSAR/ GSK-3β/ Hipotez 1	44,1903	20,8978	17,1154	48,73	35	9,10574	6,68694	'111'	48,73	22,5209	12,5201	0,0813
3D QSAR/ GSK-3β/ Hipotez 7	59,0132	20,8978	17,1154	48,73	60	9,10574	5,76643	'1011'	48,73	22,5209	27,343	0,0813
3D QSAR/ Asetil kolin Esteraz/ Hipotez 1	63,0279	20,8978	17,1154	48,73	86	9,10574	6,25669	'111'	48,73	22,5209	31,3578	0,0813
3D QSAR/ Asetil kolin Esteraz/ Hipotez 6	33,8843	20,8978	17,1154	48,73	6	9,10574	3,94145	'0111'	48,73	22,5209	2,2142	0,0813

5.6.4. ELDE EDİLEN BÜTÜN FARMAKOFOR MODELLERİYLE ENA99104 MOLEKÜLÜNÜN DOKING SONUCU ELDE EDİLEN KONFORMASYON İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Farmakofor modelleriyle uyumun tespiti için bir diğer dikkat edilmesi gereken nokta da ENA99104'e ait doking sonuçlarının karşılaştırılmasıdır. Çünkü doking sonucunda elde edilen konformasyon ENA99104'ün bağlanma paketi içerisinde olması beklenen halidir. Bu noktada molekülün bu konformasyonu da farmakofor modeliyle karşılaştırılması üzerinde durulmuş; GSK-3 β ile elde edilen hipotezler ENA99104'ün GSK-3 β 'ya dokingi sonucu elde edilen konformasyonla, asetilkolinesteraz ile elde edilen hipotezler ENA99104'ün asetilkolinesteraza dokingi sonucu elde edilen konformasyonla karşılaştırılmıştır (Şekil 5.44). Hipotezler ile ENA99104 bileşiğinin moleküler doking sonucunda elde edilen konformasyonu ile karşılaştırılma çalışmasında "Ligand Pharmacophore Mapping" metodundan yararlanılmıştır. Hem Şekil 5.44 hem de istatistiksel veriler (Çizelge 5.22) incelendiğinde sonuçların ENA99104'ün doking öncesi konformasyonu ile yürütülen karşıtırmaya göre değişim gösterdiği gözlenmektedir. Ancak özellikle uyum değerleri incelendiğinde şaşırtıcı bir sonuçla karşılaşılmaktadır. Buna göre asetilkolin esteraz enzim inhibitörleriyle 3D-QSAR yöntemi kullanılarak geliştirilen hipotezin uyum değeri (5,61144), ENA99104'ün belirlendiği ana hipoteze (3D QSAR/GSK-3 β) ait uyum değerinden (5,47884) daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 5.22). Bu sonuç ile ENA99104 molekülünün her iki enzimle de etkileştiği ve çoklu hedefe yönelik ilaç adayı olabileceği bir kez daha ortaya konmuştur.



Şekil 5.44. Elde edilen bütün farmakoforlar ile ENA99104 molekülünün doking sonuçlarının karşılaştırılması a) 3D-QSAR metodu asetil kolinesteraz enzimi çalışması Hipotez-1 b) 3D-QSAR metodu-asetilkolinesteraz enzimi çalışması Hipotez-6 c)3D-QSAR metodu GSK-3 β enzimi çalışması Hipotez-1 d) 3D-QSAR metodu GSK-3 β enzimi çalışması Hipotez-7 e)HipHop metodu Asetil kolinesteraz enzim çalışması f) HipHop metodu GSK-3 β enzim çalışması

Çizelge 5.22. ENA99104 Molekülünün docking sonuçlarıyla bütün hipotezlerin karşılaştırılmasına ait istatistiksel veriler

	Absolut Enerji	Konformasyon Numarası	Uyum Değeri	Pharmprint
Hiphop/GSK-3 β	44,6183	1	0,907356	'11101'
HipHop/Asetil kolinesteraz	38,8526	1	1,02323	'1011'
3D QSAR/ GSK-3 β / Hipotez 1	44,6183	1	5,47884	'111'
3D QSAR/ GSK-3 β / Hipotez 7	44,6183	1	3,93402	'1010'
3D QSAR/ Asetil kolin Esteraz/ Hipotez 1	38,8526	1	5,61144	'111'
3D QSAR/ Asetil kolin Esteraz/ Hipotez 6	38,8526	1	3,63001	'0111'

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Çalışma kapsamında iki farklı yaklaşımla farmakofor modelleme çalışması yürütülmüş, ortaya çıkan modeller temel alınarak çoklu hedefe yönelik yeni bir Anti-alzheimer ilaç adayı molekülü geliştirilmesi hedeflenmiştir.

6.1.1. FARMAKOFOR MODELLEME SONUCU ELDE EDİLEN VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda en iyi hipotez GSK-3 β inhibitörleri ve 3D QSAR farmakofor geliştirme yöntemiyle elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen farmakofor hem çalışma setindeki moleküllerle hem de asetilkolinesteraz inhibitörleriyle karşılaştırılarak farmakoforun kontrolü sağlanmıştır.

Asetilkolinesteraz inhibitörleri ile oluşturulan farmakofor hem özellik açısından, hem geometrik açıdan küçük olması ve oldukça kompakt bir yapıyı temsil etmesine rağmen GSK-3 β inhibitörleriyle 3D QSAR metodu vasıtasıyla geliştirilen farmakofor daha yüksek bir maksimum uyum değeri göstermiştir. Öte yandan daha önce Asetilkolinesteraz inhibitörleriyle yürütülen çalışmalarda 2 hidrofobik, 1 hidrojen bağı donörü ve 1 halkalı aromatik özelliğe rastlanmış (98) olması asetilkolinesteraz inhibitörleriyle de daha geniş yapıda bir farmakofor modeli geliştirilebileceğini göstermiştir.

Daha önce GSK-3 β inhibitörleriyle yürütülen 3D QSAR çalışmasında da yine 2 Hidrojen bağı alıcısı bulunurken 2 tane de hidrofobik yapıya rastlanmıştır (43). Farmakofor modelinin geometrik yapısı göz önüne alındığında yerleşeceği bağlanma yöresi açısından benzer niteliklere sahip olduğu söylenebilmektedir. Çalışmamızda öne çıkan hipotez 1' de halkalı aromatik yapıları temsil eden özellik literatürdeki hidrofobik bölgeyi temsil etmektedir.

6.1.2. ADME-TOKSİKOLOJİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

DrugLikeDiverse Database vasıtasıyla bulunan 3930 molekül bulunmuştur. Ardından bu moleküller arasından da toksikoloji özellikleri (mutajenite, karsinojenite vb) üzerinden bir inceleme yürütülmüştür. Özellikle GSK-3 β enzimi için seçilen inhibitörlerin ATP

yarıřmasız olmasına dikkat edilerek bu moleküller üzerinden geliřtirilen farmakoforum olası toksisitesi dūřürülmüřtür. Bu durumun netleřtirilmesi için *in vitro* ve *in vivo* deneylerle desteklenmesi gerekmektedir.

ADME analizi sonrası moleköl sayısı 20'ye dūřürülmüřtür. Bulunan molekölün hem kanbeyin bariyerini geçecek kadar lipofilik hem de ağız yoluyla alınıp intestinal sistemde çözünecek kadar hidrofilik olması gerekmektedir (99).

Seçilen moleköl (ENA99104) ilgili veritabanlarında (E-molecules(100)) taranarak sentezlenebilirliği araştırılmıştır. Bu noktada farmakofor modeline %89 oranında benzeyen moleküllerin varlığı tespit edilmiş, ilgili molekölün sentezi için olası reaksiyonlar incelenmeye başlanmıştır.

6.1.3. MOLEKÜLER DOKİNG VE MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON SONUÇLARININ DEğERLENDİRİLMESİ

Moleküler doking sonuçları hem inhibitor moleküller hem de olası yeni önder bileşikler için literature uygundur. Buna parallel olarak yürütölen moleküler dinamik sonuçlarında da benzer ENA99104 bağlanma paketinin içerisinde olmasına rağmen moleküler doking sonuçları ve literatürle uyumazlıklar mevcuttur. Bunun nedeni simölasyon süresinin kısa tutulması olarak dūřünülmektedir. RMSD sonuçları incelendiğinde de; GSK-3 β ile bileşikten oluşan kompleksde enzimin, Asetilkolinesteraz ile ENA99104 kompleksinde ise molekölün henüz stabil hale gelmediği görölmektedir. Hem simölasyon süresinin uzatılması hem de inhibe edilmesi planlanan reseptörlerle aynı aileden gelen ve yüksek homoloji gösteren bazı diğer reseptörler (GSK-3 α) ile de moleküler doking ve simölasyon çalışmalarının yürütölmesi hedeflenmektedir.

6.1.4. ELDE EDİLEN BÜTÜN FARMAKOFOR MODELLERİYLE ENA99104 MOLEKÜLÜNÜN ÇAKIşTIRILMASINA DAİR SONUÇLARIN DEğERLENDİRİLMESİ

Tez çalışması sonucunda elde edilen bütün farmakofor modelleriyle ENA99104'ün birebir çakışması ve yüksek uyum değerleri vermesi beklenmemesine rağmen özellikle 3D QSAR/asetil kolinesteraz enzim inhibitörleriyle geliştirilen hipotez ile de ENA99104 molekölü büyük ölçüde örtüşmüş, ayrıca uyum değeri de oldukça yüksek bulunmuştur. Böylece molekölün çoklu hedefe yönelik özellik gösterebileceğine dair teorimiz büyük

ölçüde doğruluk kazanmıştır. Öte yandan özellikle HipHop modeliyle geliştirilen farmakofor hipotezleriyle yeni çalışmaların yürütülmesi ve bu farmakofor modellerine uygun moleküllerin tespit edilmesi de çalışmanın devamı için öngörülmektedir.

6.2. SONUÇ

Sonuç olarak moleküler modelleme çalışmaları hesaplamalı çalışmaların son basamağıdır. Molekülümüz (ENA99104) bu noktada başarılı görünse de farklı reseptörler kanalıyla pek çok yolağı da bloke edebileceği düşünüldüğünde hem farklı simülasyon çalışmalarının hem de deneysel çalışmaların yürütülmesi büyük önem arz etmektedir.

Özellikle GSK-3 β inhibisyonunun β katenin yolağını aktive ederek tümör oluşumuna yol açabileceğine dair çalışmalar vardır (99). Bu nedenle ATP-yarışmasız inhibitör geliştirme üstünde durulmuş olsa da molekülün *in vitro* ve *in vivo* deneylerde de başarı gösterdiğinin bilinmesi gerekmektedir.

Bundan sonraki aşamada yürütülmesi düşünülen çalışmalar:

- a) Özellikle HipHop metodu ile geliştirilen farmakofor modelleri ile yeni bir çalışma yürütülerek bu hipotezlere uygun moleküllerin tespiti üzerine çalışılacaktır.
- b) ENA99104 molekülüyle yürütülen moleküler dinamik simülasyonlarına devam edilecek böylelikle süreç içerisinde ligand-reseptör etkileşimlerinde önemli bir değişim olup olmayacağı gözlenecektir.
- c) ENA99104 molekülünün başarısının tespiti için özellikle GSK-3 α gibi hedef proteinlere homolojik açıdan benzer proteinlerle de moleküler doking çalışmaları ve moleküler dinamik simülasyonları yürütülecektir.
- d) ENA99104 molekülünün sentezine yönelik çalışmalar yürütülecek. Öncelikle sentez için olası reaksiyonlar incelenecek, ardından sentez protokolü oturtulacaktır.
- e) Saf olarak elde edilen ENA99104 molekülünün aktivite testleri hem GSK-3 β hem de asetil kolinesteraz enzimleri üzerinde yapılacaktır.
- f) Bundan başka, Alzheimer modeli hücre hatları ve normal sinir hücrelerinde *in vitro* deneylerin yürütülmesine çalışılacaktır.
- g) Son olarak özellikle uzun vadede tümör oluşumuna etkisinin incelenmesi için *in vivo* deneyler yürütülmesi de hedeflenmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. The ALBORADO Drug Discovery Institute. Collaborative drug discovery [Internet]. 2018 [cited 2018 Nov 25]. Available from: <https://cambridge-ddi.alzheimersresearchuk.org/ddi-cambridge/research/drug-discovery/>
2. Pfizer Türkiye. Yeni İlaç Geliştirme Süreci [Internet]. 2018 [cited 2018 Nov 25]. Available from: <https://www.pfizer.com.tr/arge/yeni-ilaç-geliştirme-süreci>
3. Pleuvry BJ. Receptors, agonists and antagonists. *Anaesth Intensive Care Med.* 2004;5(10):350–2.
4. Panesar K, Guzman F. Inverse Agonists: An Illustrated Tutorial [Internet]. 2018. [cited 2018 Nov 25]. Available from: <http://pharmacologycorner.com/inverse-agonists/>
5. Luque F, Luque, Javier F. *Frontiers in Computational Chemistry for Drug Discovery.* *Molecules* [Internet]. 2018;23(11):2872. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/11/2872>
6. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire A, Wu Y-T, Prina M. *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost And trends.* 2015;84.
7. J.K. D, S. S, A. G, A. D. Use of ligand-based pharmacophore modeling and docking approach to find novel acetylcholinesterase inhibitors for treating Alzheimer's. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2015;71:146–52. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L604303173%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.02.010>
8. TC. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü. 2000 GENEL NÜFUS SAYIMI: Nüfusun Sosyal ve Ekonomik Nitelikleri. Ankara; 2003.
9. Wimo Anders, Jönsson Linus, Gustavsson Innovus, Gustavsson Anders. Cost of illness and burden of dementia - The base option [Internet]. European Collaboration on Dementia. 2009 [cited 2015 Dec 3]. Available from: <http://www.alzheimer-europe.org/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Cost-of-dementia/Cost-of-illness-and-burden-of-dementia>

10. Pećina-Slaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell Int.* 2010;10:22.
11. Ly PTT, Wu Y, Zou H, Wang R, Zhou W, Kinoshita A, et al. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *J Clin Invest.* 2013;123(1):224–35.
12. RACCHI M. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol Res* [Internet]. 2004;50(4):441–51. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661804000908>
13. Lloret A, Fuchsberger T, Giraldo E, Viña J. Molecular mechanisms linking amyloid β toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015;83:186–91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584915000945>
14. Sadigh-Eteghad S, Talebi M, Farhoudi M, Golzari SEJ, Sabermarouf B, Mahmoudi J. Beta-amyloid exhibits antagonistic effects on alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in orchestrated manner. *J Med Hypotheses Ideas* [Internet]. 2014;8(2):49–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmhi.2014.01.001>
15. Luo Y, Bolon B, Damore MA, Fitzpatrick D, Liu H, Zhang J, et al. BACE1 (β -secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiol Dis.* 2003;14(1):81–8.
16. Tabaton M, Zhu X, Perry G, Smith MA, Giliberto L. Signaling Effect of Amyloid- β 42 on the Processing of A β PP. 2011;221(1):18–25.
17. Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, Ketterman AJ, Barr RK. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2004;1697(1):89–101.
18. Baruch-Suchodolsky R, Fischer B. A β 40, either Soluble or Aggregated, Is a Remarkably Potent Antioxidant in Cell-Free Oxidative Systems. *Biochemistry* [Internet]. 2009 May 26;48(20):4354–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi802361k>
19. Zou K, Gong J, Yanagisawa K, Michikawa M. A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced

- oxidative damage. *J Neurosci* [Internet]. 2002;22(12):4833–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077180>
20. Igbavboa U, Sun GY, Weisman GA, He Y, Wood WG. Amyloid β -protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes. *Neuroscience*. 2009;162(2):328–38.
 21. Yao Z-X, Papadopoulos V. Function of b-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J* [Internet]. 2002 Aug 21; Available from: <http://www.fasebj.org/content/early/2002/10/02/fj.02-0285fje.short>
 22. Maloney B, Lahiri DK. The Alzheimer's amyloid β -peptide ($A\beta$) binds a specific DNA $A\beta$ -interacting domain ($A\beta$ ID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: Characterizing a new regulatory motif. *Gene*. 2011;488(1):1–12.
 23. Kumar DKV, Choi SH, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, et al. Amyloid- β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* [Internet]. 2016 May 25;8(340):340ra72 LP-340ra72. Available from: <http://stm.sciencemag.org/content/8/340/340ra72.abstract>
 24. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011;4(1):3.
 25. M. Menéndez-González P. Pérez-Pinera M. Martínez-Rivera M.T. Calatayud B. Blázquez Menes. APP Processing and the APP-KPI Domain Involvement in the Amyloid Cascade. *Neurodegener Dis* [Internet]. 2005;2(6):277–83. Available from: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000092315>
 26. Christian Haass, Albert Y. Hung, Michael G. Schlossmacher, David B. Teplow, Dennis J. Selkoe. β -Amyloid Peptide and a 3-kDa Fragment Are Derived by Distinct Cellular Mechanisms. *Biol Chem*. 1993;3021–4.
 27. Haass C, Hung a Y, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ. Normal cellular processing of the β -amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid β peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;695:109–16.
 28. Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An Overview of APP

- Processing Enzymes and Products. 2010;1–12.
29. Wolfe MS. γ Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2012;120(SUPPL. 1):89–98.
 30. Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, et al. Small misfolded tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem*. 2013;288(3):1856–70.
 31. Kumar A, Pate KM, Moss MA, Dean DN, Rangachari V. Self-propagative replication of A β oligomers suggests potential transmissibility in Alzheimer disease. *PLoS One*. 2014;9(11):1–11.
 32. Breydo L, Kourouski D, Rasool S, Milton S, Wu JW, Uversky VN, et al. Structural differences between amyloid beta oligomers. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2016;477(4):700–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.122>
 33. Gu L, Guo Z. Alzheimer's AB42 and AB40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem*. 2013;126(3):305–11.
 34. Gorman PM, Kim S, Guo M, Melnyk RA, McLaurin J, Fraser PE, et al. Dimerization of the transmembrane domain of amyloid precursor proteins and familial Alzheimer's disease mutants. *BMC Neurosci*. 2008;9:1–11.
 35. Ghiso J, Frangione B. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(12):1539–51.
 36. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985;82(12):4245–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3159021> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC397973>
 37. Lue L-F, Kuo Y-M, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, et al. Soluble Amyloid B Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* [Internet]. 1999;155(3):853–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65184-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65184-X)
 38. Iqbal K, Gong C-X, Liu F. Microtubule-associated protein tau as a therapeutic target

- in Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2014;18(3):307–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24387228>
39. Gong C-X, Iqbal K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem*. 2008;15(23):2321–8.
 40. Buée L, Bussi ere T, Bu e-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders11These authors contributed equally to this work. *Brain Res Rev* [Internet]. 2000;33(1):95–130. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017300000199>
 41. Walker D, Lue LF, Paul G, Patel A, Sabbagh MN. Receptor for advanced glycation endproduct modulators: a new therapeutic target in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2015;24(3):393–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586103>
 42. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic B V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2018;14(3):133–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>
 43. Ambure P, Kar S, Roy K. Pharmacophore mapping-based virtual screening followed by molecular docking studies in search of potential acetylcholinesterase inhibitors as anti-Alzheimer's agents. *BioSystems* [Internet]. 2014;116(1):10–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2013.12.002>
 44. Kihara T, Shimohama S. Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2004;64:99–105.
 45. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease : a review of progress. 1999;137–47.
 46. Orkun Kesici. NOOTROPİK İLAÇLAR ve BEYİNDEKİ ŞAŞIRTICI ETKİSİ [Internet]. Sons of Chemistry. 2015 [cited 2015 Dec 8]. Available from: <http://sonsofchemistry.blogspot.com.tr/2015/07/nootropik-ilaclar-ve-beyin-uzerindeki.html>

47. Ohno M, Sametsky E a., Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, et al. BACE1 Deficiency Rescues Memory Deficits and Cholinergic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2004;41:27–33.
48. Yunqi X, Junqiang Y, Peng Z, Jiejie L, Huimin G, Ying X, et al. Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2012;97(1):1–13.
49. Hao J-R, Sun N, Lei L, Li X-Y, Yao B, Sun K, et al. L-Stepholidine rescues memory deficit and synaptic plasticity in models of Alzheimer's disease via activating dopamine D1 receptor/PKA signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2015 Nov;6:e1965.
50. Martorana A, Di Lorenzo F, Esposito Z, Lo Giudice T, Bernardi G, Caltagirone C, et al. Dopamine D₂-agonist rotigotine effects on cortical excitability and central cholinergic transmission in Alzheimer's disease patients. *Neuropharmacology* [Internet]. 2013;64:108–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390812003516>
51. Iaccarino L, Tammewar G, Ayakta N, Baker SL, Bejanin A, Boxer AL, et al. Local and distant relationships between amyloid, tau and neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *NeuroImage Clin* [Internet]. 2018;17(September 2017):452–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nicl.2017.09.016>
52. He Z, Guo JL, McBride JD, Narasimhan S, Kim H, Changolkar L, et al. Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat Med* [Internet]. 2018;24(1):29–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4443>
53. Sahin C, nal G, Aricioglu F. The involvement of Akt and GSK-3: Two pathways, two pathology. *J Marmara Univ Inst Heal Sci* [Internet]. 2014;4(1):1. Available from: <http://www.clinexphealthsci.com/sayilar/107/buyuk/51-571.pdf>
54. Lee H-C, Tsai J-N, Liao P-Y, Tsai W-Y, Lin K-Y, Chuang C-C, et al. Glycogen synthase kinase 3 α and 3 β have distinct functions during cardiogenesis of zebrafish embryo. *BMC Dev Biol* [Internet]. 2007;7(1):93. Available from: <http://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-213X-7-93>

55. Reddy PH. Amyloid beta-induced glycogen synthase kinase 3?? phosphorylated VDAC1 in Alzheimer's disease: Implications for synaptic dysfunction and neuronal damage. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2013;1832(12):1913–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.06.012>
56. Avila J, Wandosell F, Hernández F. Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2010 May 1;10(5):703–10. Available from: <https://doi.org/10.1586/ern.10.40>
57. Dirac PAM. Quantum Mechanics of Many-Electron Systems. *Proc R Soc London Ser A, Contain Pap a Math Phys Character* [Internet]. 1929;123(792):714–33. Available from: <http://www.jstor.org/stable/95222>
58. Smith SJ, Sutcliffe BT. The Development of Computational Chemistry in the United Kingdom. In: *Reviews in Computational Chemistry* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 271–316. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470125878.ch5>
59. Rosenberg E. The Beginning. It's Your DNA [Internet]. 2017;1–8. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/B9780128125021000019>
60. Ho S. Introduction to Monte Carlo. new jersey;
61. Weinstock J, Keenan RM, Samanen J, Hempel J, Finkelstein JA, Franz RG, et al. 1-(carboxybenzyl)imidazole-5-acrylic acids: potent and selective angiotensin II receptor antagonists. *J Med Chem*. 1991 Apr;34(4):1514–7.
62. Keenan RM, Weinstock J, Finkelstein JA, Franz RG, Gaitanopoulos DE, Girard GR, et al. Potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 2. 1-(Carboxybenzyl)imidazole-5-acrylic acids. *J Med Chem*. 1993 Jun;36(13):1880–92.
63. Glen RC, Martin GR, Hill AP, Hyde RM, Woollard PM, Salmon JA, et al. Computer-aided design and synthesis of 5-substituted tryptamines and their pharmacology at the 5-HT_{1D} receptor: discovery of compounds with potential anti-migraine properties. *J Med Chem*. 1995 Sep;38(18):3566–80.
64. Su Y, Ryder J, Ni B. Inhibition of A β production and APP maturation by a specific

- PKA inhibitor. *FEBS Lett.* 2003;546(2–3):407–10.
65. Huang Y, Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell* [Internet]. 2012;148(6):1204–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412002784>
 66. Singh S, Kushwah a. S, Singh R, Farswan M, Kaur R. Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16(12):1651–64.
 67. Vassar R. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 2014;6(9):89. Available from: <http://alzres.com/content/6/9/89>
 68. Cummings JL. Cholinesterase inhibitors: A new class of psychotropic compounds. *Am J Psychiatry.* 2000;157(January):4–15.
 69. Eldar-Finkelman H, Martinez A. GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2011;4(October):32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3204427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 70. Thornton TM, Pedraza-alva G, Deng B, Wood CD, Clements JL, Sabio G, et al. Phosphorylation by p38 MAPK as an Alternative Pathway for GSK3 β Inactivation. 2008;320(5876):667–70.
 71. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM-Y, Klein PS. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature* [Internet]. 2003 May 22;423:435. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01640>
 72. Lu JJ, Pan W, Hu YJ, Wang YT. Multi-target drugs: The trend of drug research and development. *PLoS One.* 2012;7(6).
 73. Ramsay RR, Popovic-Nikolic MR, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med* [Internet]. 2018;7(1):3. Available from: <https://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/s40169-017-0181-2>
 74. Cui L, Cai Y, Cheng W, Liu G, Zhao J, Cao H, et al. A Novel, Multi-Target Natural Drug Candidate, Matrine, Improves Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Transgenic Mice by Inhibiting A β Aggregation and Blocking the RAGE/A β Axis.

- Mol Neurobiol. 2017;54(3):1939–52.
75. Tobón-Velasco JC, Cuevas E, Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as Mediator of NF- κ B Pathway Activation in Neuroinflammation and Oxidative Stress. *CNS Neurol Disord -Drug Targets*. 2014;13:1615–26.
 76. Chen X, Gilson ML and MK. BindingDB: A Web-Accessible Molecular Recognition Database [Internet]. Vol. 4, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2001. p. 719–25. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/65074/article>
 77. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235–42.
 78. Franklin MC, Rudolph MJ, Ginter C, Cassidy MS, Cheung J. Structures of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase reveal perturbations of the acyl loop and the dimer interface. *Proteins*. 2016 Sep;84(9):1246–56.
 79. Cheung J, Gary EN, Shiomi K, Rosenberry TL. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrem B show peripheral site flexibility. *ACS Med Chem Lett*. 2013 Nov;4(11):1091–6.
 80. Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EN, Love J, et al. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J Med Chem* [Internet]. 2012 Nov 26;55(22):10282–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm300871x>
 81. Ali MR, Sadoqi M, Moller SG, Boutajangout A, Mezei M. Assessing the binding of cholinesterase inhibitors by docking and molecular dynamics studies. *J Mol Graph Model*. 2017 Sep;76:36–42.
 82. Peauger L, Azzouz R, Gembus V, Tintas M-L, Sopkova-de Oliveira Santos J, Bohn P, et al. Donepezil-Based Central Acetylcholinesterase Inhibitors by Means of a “Bio-Oxidizable” Prodrug Strategy: Design, Synthesis, and in Vitro Biological Evaluation. *J Med Chem*. 2017 Jul;60(13):5909–26.
 83. Yang J, Cron P, Good VM, Thompson V, Hemmings BA, Barford D. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol*. 2002 Dec;9(12):940–4.

84. Bertrand JA, Thieffine S, Vulpetti A, Cristiani C, Valsasina B, Knapp S, et al. Structural characterization of the GSK-3 β active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors. *J Mol Biol.* 2003 Oct;333(2):393–407.
85. Bhat R, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormo M, Nilsson Y, et al. Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem.* 2003 Nov;278(46):45937–45.
86. Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, et al. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell.* 2001 Jun;105(6):721–32.
87. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12.
88. Accelrys Software Inc. Discovery Studio 3.5 Client. San Diego: Accelrys Inc.; 2012.
89. Mechanisms C. p-Amyloid Peptide and. *Biol Chem.* 1993;3021–4.
90. Bavi R, Kumar R, Choi L, Lee KW. Exploration of Novel Inhibitors for Bruton's Tyrosine Kinase by 3D QSAR Modeling and Molecular Dynamics Simulation. *PLoS One.* 2016;11(1):1–19.
91. Kouassi AF, Kone M, Keita M, Esmel A, Megnassan E, N'Guessan YT, et al. Computer-aided design of orally bioavailable pyrrolidine carboxamide inhibitors of enoyl-acyl carrier protein reductase of *Mycobacterium tuberculosis* with favorable pharmacokinetic profiles. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):29744–71.
92. Gao H. Predicting tyrosinase inhibition by 3D QSAR pharmacophore models and designing potential tyrosinase inhibitors from Traditional Chinese medicine database. *Phytomedicine* [Internet]. 2018;38(November 2016):145–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.11.012>
93. ACD/ChemSketch [Internet]. Toronto, On, Canada: Advanced Chemistry Development, Inc.; 2001. Available from: www.acdlabs.com
94. D.A. Case, V. Babin, J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden RE, Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry AK, T.S. Lee, S. LeGrand, T.

- Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg CS, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf X, Kollman W and PA. AMBER14. San Francisco: University of California; 2014.
95. Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EN, Love J, et al. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem*. 2012;55(22):10282–6.
 96. Rodrigues Simoes MC, Dias Viegas FP, Moreira MS, de Freitas Silva M, Riquiel MM, da Rosa PM, et al. Donepezil: an important prototype to the design of new drug candidates for Alzheimer's disease. *Mini Rev Med Chem*. 2014;14(1):2–19.
 97. Crisan L, Pacureanu L, Bora A, Avram S, Kurunczi L, Simon Z. QSAR study and molecular docking on indirubin inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3. *Cent Eur J Chem* [Internet]. 2013;11(1):63–77. Available from: <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0133-z>
 98. Gupta S, Mohan CG. 3D-pharmacophore model based virtual screening to identify dual-binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors. *Med Chem Res*. 2011;20(9):1422–30.
 99. Eldar-finkelman H, Martinez A. GSK-3 inhibitors : preclinical and clinical focus on CNS. 2011;4(October):1–18.
 100. e-molecules [Internet]. [cited 2018 Dec 7]. Available from: https://reaxys.emolecules.com/cgi-bin/rene/show_hitlist.cgi?h=434626116

244	UKR394993	0,38899	6,11706	301	ENA621317	0,436788	6,06673	358	CBG163691	0,487492	6,01903	415	ENA591092	0,535141	5,97853	472	CDI132502	0,590925	5,93547
245	CDI629471	0,389501	6,11649	302	ENA17461	0,437414	6,06611	359	ENA284796	0,488598	6,01805	416	UKR1069300	0,537789	5,97639	473	UKR245091	0,593277	5,93374
246	CDI432690	0,389527	6,11646	303	UKR1234107	0,438041	6,06548	360	UKR1282295	0,489074	6,01763	417	ENA498056	0,538888	5,97574	474	ASI134753	0,594607	5,93277
247	CDI354589	0,390004	6,11593	304	ENA45318	0,438377	6,06515	361	CDI251625	0,489489	6,01726	418	UKR1276273	0,541719	5,97323	475	ENA1004525	0,59601	5,93175
248	CAPO0311886	0,390135	6,11579	305	CAP00285037	0,441375	6,06219	362	LIF172331	0,49577	6,0163	419	CDI735746	0,542507	5,97259	476	VIT205078	0,598276	5,9301
249	CAPO5049015	0,390292	6,11561	306	ENA153723	0,443143	6,06046	363	CAP0391698	0,490591	6,01628	420	TIM259516	0,544098	5,97132	477	ENA852581	0,600043	5,92882
250	UKR282454	0,390399	6,11549	307	ENA139724	0,444324	6,0593	364	VIT349797	0,491048	6,01588	421	ENA290083	0,544407	5,97108	478	ENA689363	0,600902	5,9282
251	CBG562150	0,390725	6,11513	308	ENA499441	0,447929	6,05579	365	CBG436805	0,491585	6,0154	422	CBG408269	0,547635	5,96851	479	ENA816704	0,601288	5,92792
252	ENA1276049	0,391077	6,11474	309	ENA687546	0,448056	6,05567	366	UKR773352	0,49585	6,01165	423	CDI593455	0,548366	5,96793	480	VIT923083	0,603135	5,92659
253	IBS464459	0,392544	6,11311	310	CAP02578109	0,448138	6,05559	367	ENA1237125	0,498085	6,0097	424	IBS161059	0,548469	5,96785	481	CAP04955128	0,603857	5,92607
254	UKR3453	0,393288	6,11229	311	ENA462173	0,448151	6,05558	368	ENA980201	0,498318	6,00949	425	LIF124451	0,54963	5,96693	482	UKR323490	0,606222	5,92437
255	CBG199535	0,394229	6,11125	312	IBS143834	0,449694	6,05408	369	CBG678837	0,497472	6,00825	426	SPE182528	0,54992	5,9667	483	UKR504153	0,606821	5,92394
256	CDI4893	0,394331	6,11114	313	LIF337608	0,450886	6,05293	370	UKR1387771	0,500261	6,0078	427	LIF263155	0,55087	5,96595	484	ENA1096395	0,608491	5,92275
257	CBG706836	0,394507	6,11095	314	LIF209113	0,455746	6,04828	371	SPE74244	0,50098	6,00718	428	VIT1020528	0,551859	5,96517	485	NET20372	0,609163	5,92227
258	ENA1019300	0,396048	6,10925	315	CBG652823	0,456332	6,04772	372	ASI293510	0,50106	6,00711	429	CDI727753	0,553683	5,96374	486	ENA921753	0,609676	5,9219
259	ASI36702	0,396298	6,10898	316	UKR1161866	0,456658	6,04741	373	CDI1001648	0,50328	6,00519	430	VIT342268	0,553838	5,96362	487	UKR654287	0,610007	5,92166
260	ENA944349	0,3965	6,10876	317	UKR764600	0,457063	6,04702	374	UKR1009527	0,503298	6,00518	431	UKR1081216	0,555759	5,96211	488	CAP05043430	0,610118	5,92159
261	TIM405938	0,397202	6,10799	318	ENA324381	0,457471	6,04664	375	ENA274511	0,503686	6,00484	432	CAP00043863	0,557652	5,96064	489	CDI713226	0,613111	5,91946
262	UKR1242148	0,397686	6,10746	319	UKR560268	0,457867	6,04626	376	CBG49291	0,504498	6,00414	433	ASI313807	0,560438	5,95847	490	ENA838223	0,613398	5,91926
263	ENA272147	0,398456	6,10662	320	VIT924036	0,458777	6,0454	377	ASI108386	0,505758	6,00306	434	ENA1188972	0,560489	5,95843	491	UKR489459	0,614212	5,91868
264	LIF127522	0,403779	6,10086	321	ENA911988	0,459132	6,04506	378	LIF179806	0,506211	6,00267	435	UKR1325116	0,560831	5,95817	492	ASI286757	0,61741	5,91643
265	ENA184935	0,404093	6,10052	322	UKR1297400	0,459243	6,04496	379	UKR32653	0,506369	6,00253	436	OTA96557	0,561966	5,95729	493	CAP02896273	0,617625	5,91628
266	CDI719347	0,406199	6,09826	323	UKR1081786	0,459716	6,04451	380	ASI322298	0,506412	6,0025	437	SPE156081	0,563566	5,95606	494	ENA235541	0,61852	5,91565
267	UKR544542	0,406307	6,09815	324	CDI550524	0,461208	6,0431	381	UKR531995	0,507124	6,00189	438	CBG419470	0,564849	5,95507	495	ENA1156512	0,619209	5,91516
268	ENA46977	0,408674	6,09562	325	CDI707617	0,461366	6,04295	382	ENA105076	0,507282	6,00175	439	CDI625549	0,565778	5,95435	496	UKR975087	0,619307	5,91509
269	CDI438440	0,409161	6,09511	326	LIF10088	0,461769	6,04257	383	IBS415988	0,507612	6,00147	440	LIF56382	0,56615	5,95407	497	UKR1446548	0,620668	5,91414
270	CAP05946133	0,409279	6,09498	327	CBG72969	0,463495	6,04096	384	UKR166722	0,509727	5,99966	441	UKR764049	0,566744	5,95361	498	SPE138217	0,621201	5,91377
271	CDI509980	0,409358	6,0949	328	ENA19912	0,464093	6,04039	385	UKR159111	0,509813	5,99959	442	VIT374818	0,569072	5,95183	499	ASI158430	0,6219	5,91328
272	ENA344424	0,410688	6,09349	329	CAP03451783	0,464475	6,03978	386	UKR1380827	0,511625	5,99805	443	ANC7164	0,569959	5,95116	500	CDI545000	0,623784	5,91197
273	CDI952879	0,411275	6,09134	330	TIM438497	0,465632	6,03896	387	ENA801488	0,511763	5,99793	444	UKR267510	0,571742	5,9498	501	CAP02827474	0,624156	5,91171
274	UKR803207	0,41447	6,08951	331	CAP00234881	0,466922	6,03776	388	ENA847408	0,511895	5,99782	445	VIT967694	0,572839	5,94897	502	CBG433493	0,625624	5,91069
275	ASI141338	0,417049	6,08681	332	UKR576719	0,466942	6,03774	389	CDI928412	0,512334	5,99745	446	ENA643929	0,573159	5,94873	503	UKR1496211	0,626898	5,9098
276	CDI90628	0,418849	6,08494	333	ENA322	0,46746	6,03726	390	UKR108750	0,512504	5,9973	447	CAP01379373	0,573786	5,94825	504	UKR922181	0,627622	5,9093
277	SPE163451	0,419693	6,08407	334	UKR35326	0,467865	6,03688	391	UKR285898	0,512765	5,99708	448	UKR801445	0,574432	5,94776	505	ENA185094	0,628218	5,90889
278	ENA716979	0,420315	6,08342	335	ENA381373	0,467933	6,03682	392	CDI518293	0,512995	5,99689	449	ENA262666	0,574839	5,94745	506	CAP04276958	0,628907	5,90841
279	UKR1492998	0,420492	6,08324	336	ASI253335	0,468003	6,03675	393	ENA1231127	0,513237	5,99668	450	CAP00227280	0,577123	5,94573	507	UKR765887	0,630264	5,90748
280	CBG91227	0,420562	6,08317	337	ENA401589	0,468152	6,03661	394	ENA704900	0,513328	5,9966	451	UKR454926	0,577662	5,94533	508	CDI722988	0,631365	5,90672
281	LIF185784	0,420821	6,0829	338	ASI109019	0,469701	6,03518	395	UKR4916	0,514595	5,99553	452	SPE110520	0,578263	5,94487	509	VIT843954	0,631374	5,90671
282	VIT923177	0,421396	6,08231	339	ASI288069	0,470789	6,03408	396	TIM486333	0,519915	5,99107	453	UKR267644	0,5788	5,94447	510	ANCT7077	0,633842	5,90502
283	UKR696182	0,422645	6,08102	340	CBG217692	0,471003	6,03398	397	ENA1249759	0,52024	5,9908	454	UKR1051759	0,579241	5,94414	511	ENA281467	0,633957	5,90494
284	UKR1248772	0,424538	6,07908	341	CAP00198739	0,471329	6,03368	398	CDI508410	0,520674	5,99043	455	CBG570782	0,580176	5,94344	512	IBS575	0,63404	5,90488
285	MAY20361	0,426028	6,07756	342	ENA378378	0,471858	6,03319	399	UKR389696	0,523584	5,98801	456	UKR1507249	0,580687	5,94306	513	ENA436959	0,634421	5,90462
286	ENA99104	0,426734	6,07684	343	CAP02213813	0,471897	6,03315	400	CDI736528	0,524515	5,98724	457	ENA586057	0,581764	5,94225	514	ENA700155	0,637729	5,90236
287	ENA1167054	0,428948	6,0746	344	ENA1048309	0,472821	6,0323	401	ENA127436	0,524524	5,98723	458	CBG285711	0,582734	5,94153	515	CDI828292	0,63861	5,90176
288	IBS432164	0,429193	6,07435	345	ENA1222166	0,474872	6,03042	402	ENA945652	0,525211	5,98667	459	UKR1429006	0,582784	5,94149	516	ENA939762	0,639003	5,9015
289	CDI339313	0,430369	6,07316	346	UKR486089	0,474976	6,03033	403	UKR162677	0,525271	5,98662	460	CDI955998	0,583043	5,9413	517	CAP05925545	0,639558	5,90112
290	ENA900099	0,431095	6,07243	347	NET35504	0,475551	6,0298	404	ENA1090240	0,525747	5,98622	461	UKR169174	0,584402	5,94029	518	UKR266793	0,640864	5,90023
291	PHA116585	0,431441	6,07208	348	SPE123278	0,475594	6,02976	405	CBG219277	0,525879	5,98611	462	ENA819899	0,58513	5,93975	519	ASI297202	0,641473	5,89982
292	CDI105894	0,431629	6,07189	349	CNR22181	0,47615	6,02926	406	VIT352147	0,526113	5,98592	463	ENA311220	0,585282	5,93963	520	ENA363437	0,642517	5,89912
293	ENA301028	0,431645	6,07187	350	ENA312631	0,476425	6,02901	407	UKR968702	0,527751	5,98457	464	OTA21504	0,585441	5,93952	521	UKR864855	0,643778	5,89826
294	ENA687464	0,432324	6,07119	351	LIF294649	0,479201	6,02648	408	UKR407476	0,529608	5,98305	465	UKR1220629	0,585471	5,93949	522	UKR425705	0,645345	5,89721
295	UKR1365932	0,433039	6,07047	352	UKR921228	0,479666	6,02606	409	ASI54923	0,529711	5,98296	466	ENA461153	0,587025	5,93834	523	VIT239163	0,645937	5,89681
296	UKR544673	0,433686	6,06982	353	ENA101119	0,481908	6,02404	410	UKR1120062	0,529978	5,98274	467	UKR1096193	0,587474	5,93801	524	CDI21677	0,646074	5,89672
297	TIM431571	0,435137	6,06837	354															

529	UKR53126	0.647257	5.89592	586	UKR430317	0.71788	5.85095	643	CDI472294	0.780426	5.81467	700	ENA114469	0.855673	5.77469	757	VIT487184	0.939268	5.73421
530	CBG102035	0.648696	5.89496	587	ENA1211721	0.719992	5.84967	644	CBG587174	0.783114	5.81317	701	LAB43642	0.858636	5.77319	758	UKR1332209	0.939282	5.7342
531	CBG42677	0.651008	5.89341	588	UKR1229542	0.720115	5.8496	645	UKR94647	0.786045	5.81155	702	CBG397531	0.861585	5.7717	759	CAP03451691	0.93948	5.73411
532	OTA47044	0.651328	5.8932	589	ASI312038	0.722408	5.84822	646	SPE178569	0.787254	5.81088	703	CDI982567	0.861759	5.77161	760	UKR401130	0.939492	5.73411
533	CAP00189081	0.653306	5.89188	590	VIT1024538	0.72337	5.84764	647	ENA228469	0.787807	5.81058	704	ENA815934	0.86231	5.77134	761	CAP05987760	0.941405	5.733221
534	ENA1080238	0.653569	5.89171	591	CAP03390739	0.723537	5.84754	648	TIM11661	0.789902	5.80943	705	LIF172252	0.863127	5.77093	762	SPE187871	0.941535	5.73316
535	ENA656769	0.653681	5.89163	592	OTAP99933	0.724595	5.8469	649	ENA743620	0.790705	5.80899	706	UKR1137223	0.863886	5.77054	763	CDI638631	0.942997	5.73249
536	UKR974976	0.654327	5.89121	593	CAP00087641	0.724945	5.8467	650	UKR403634	0.791849	5.80836	707	ENA8830	0.864136	5.77042	764	CBG705731	0.94303	5.73247
537	UKR248935	0.656934	5.88948	594	OTA170473	0.724996	5.84666	651	UKR206257	0.792384	5.80806	708	CDI671645	0.865046	5.76996	765	CDI925915	0.9443	5.73189
538	CAP05919393	0.65789	5.88885	595	OTA63987	0.726053	5.84603	652	CDI637976	0.794029	5.80716	709	LIF32478	0.865515	5.76973	766	OTA40954	0.947471	5.73043
539	ENA912199	0.659821	5.88757	596	ENA613531	0.727254	5.84531	653	ENA1258517	0.795045	5.80661	710	ENA607822	0.867492	5.76873	767	OTA25834	0.950455	5.72907
540	CBG177204	0.661647	5.88637	597	UKR1120487	0.729827	5.84378	654	UKR142432	0.795469	5.80638	711	UKR1142430	0.868589	5.76819	768	UKR130638	0.956345	5.72639
541	CBG272692	0.664151	5.88473	598	ENA379910	0.729842	5.84377	655	UKR891898	0.795933	5.80612	712	CAP00047715	0.869311	5.76783	769	ENA881537	0.957733	5.72576
542	CDI538621	0.668505	5.8819	599	UKR790865	0.729956	5.8437	656	ASI253594	0.795967	5.8061	713	ENA1247609	0.86933	5.76782	770	CAP02810673	0.959084	5.72514
543	CDI176027	0.668612	5.88183	600	ENA901232	0.730909	5.84314	657	UKR267231	0.800905	5.80342	714	UKR406233	0.869818	5.76757	771	ENA599223	0.960646	5.72444
544	VIT169751	0.670389	5.88067	601	LIF330621	0.73147	5.8428	658	CDI566050	0.801168	5.80328	715	ENA243500	0.871576	5.76669	772	CDI1028279	0.967005	5.72441
545	CDI1002515	0.67191	5.87969	602	CDI42376	0.731731	5.84265	659	ENA194789	0.801524	5.80308	716	ENA649810	0.872399	5.76629	773	ENA669905	0.960774	5.72438
546	VIT125483	0.671984	5.87964	603	UKR799261	0.734249	5.84116	660	CDI585764	0.804976	5.80122	717	CBG56751	0.874601	5.76519	774	ASI165323	0.961464	5.72407
547	UKR811213	0.678289	5.87559	604	CDI510026	0.734313	5.84112	661	UKR1351202	0.805097	5.80115	718	CDI738799	0.879084	5.76297	775	CDI503113	0.962626	5.72354
548	ENA76277	0.679769	5.87464	605	MAY29031	0.735214	5.84059	662	ENA48729	0.80536	5.80101	719	UKR1522550	0.882405	5.76133	776	UKR1075222	0.963069	5.72334
549	TIM414992	0.681282	5.87367	606	UKR268424	0.73644	5.83986	663	CDI887874	0.805672	5.80084	720	CDI933503	0.882472	5.7613	777	ENA138941	0.963749	5.72304
550	ENA600149	0.681551	5.8735	607	CBG766632	0.738272	5.83878	664	UKR1395523	0.806582	5.80035	721	ENA721126	0.883833	5.76063	778	ENA133974	0.965065	5.72244
551	UKR325147	0.684984	5.87132	608	ENA34059	0.741159	5.83709	665	UKR359635	0.808021	5.79958	722	LIF154573	0.886119	5.75951	779	ENA106373	0.965925	5.72206
552	SPE183117	0.685382	5.87107	609	CBG565318	0.744713	5.83501	666	CAP02819531	0.809768	5.79864	723	CBG34783	0.887593	5.75879	780	CDI673943	0.966274	5.7219
553	ENA265555	0.686699	5.87023	610	CAP00573383	0.745007	5.83484	667	ENA85904	0.810173	5.79842	724	UKR939170	0.891445	5.75691	781	UKR1543262	0.96673	5.72169
554	UKR13348	0.687377	5.86981	611	CBG604186	0.745205	5.83472	668	UKR1345557	0.810826	5.79807	725	ENA1083656	0.892577	5.75635	782	ENA1018719	0.967273	5.72165
555	ENA261267	0.688165	5.86931	612	CDI740060	0.746796	5.8338	669	LIF212943	0.814238	5.79625	726	ENA630497	0.895409	5.75498	783	ENA480832	0.967366	5.72141
556	CDI566230	0.688744	5.86894	613	ENA978510	0.747527	5.83337	670	UKR33029	0.814784	5.79596	727	CAP02579430	0.898611	5.75343	784	CDI904370	0.970004	5.72023
557	CBG490499	0.690118	5.86808	614	UKR1366007	0.748166	5.833	671	UKR244533	0.81564	5.7955	728	ASI158495	0.898837	5.75332	785	CAP05923707	0.972119	5.71928
558	ENA761791	0.690357	5.86793	615	CBG543785	0.750059	5.8319	672	UKR70947	0.815742	5.79545	729	ENA602099	0.89885	5.75331	786	ENA1109804	0.972144	5.71927
559	IBS407449	0.690505	5.86783	616	ASI137384	0.750443	5.83168	673	CDI742751	0.817055	5.79475	730	CAP00195743	0.899174	5.75316	787	CBG170742	0.972328	5.71919
560	LIF46356	0.691337	5.86731	617	CDI589633	0.750657	5.83156	674	ENA196968	0.81714	5.7947	731	ENA371530	0.899304	5.75309	788	MAY7081	0.974981	5.718
561	ENA168582	0.69482	5.86513	618	ENA802632	0.751216	5.83124	675	ASI229899	0.821006	5.79265	732	ENA1030376	0.900537	5.7525	789	ENA413003	0.975299	5.71786
562	ENA523646	0.694947	5.86505	619	ENA511258	0.751545	5.83104	676	VIT442729	0.821873	5.7922	733	ENA142364	0.908042	5.74889	790	ANCI12951	0.976887	5.71716
563	CDI657253	0.696749	5.86392	620	ENA798488	0.752681	5.83039	677	ENA99596	0.823244	5.79147	734	LIF172301	0.908261	5.74879	791	CDI1025795	0.979725	5.7159
564	CAP01273257	0.696848	5.86386	621	LIF238378	0.75275	5.83035	678	OTA61144	0.825087	5.7905	735	CAP05042459	0.908322	5.74876	792	LIF168649	0.980042	5.71576
565	ENA937160	0.697032	5.86375	622	UKR1035826	0.756361	5.82827	679	CDI739025	0.825572	5.79024	736	CDI917553	0.91158	5.74721	793	CAP02578876	0.980682	5.71547
566	ENA1047613	0.69796	5.86317	623	CBG397215	0.75872	5.82692	680	SPE115069	0.829842	5.788	737	UKR1400086	0.913008	5.74653	794	UKR472140	0.984201	5.71392
567	ENA206105	0.699529	5.86219	624	CAP01993284	0.75893	5.8268	681	ENA859400	0.83167	5.78705	738	VIT1027733	0.913091	5.74649	795	ANCI1216	0.985128	5.71351
568	ENA978129	0.699879	5.86198	625	CDI123356	0.759119	5.82669	682	CBG539877	0.834278	5.78569	739	IBS173195	0.913688	5.7462	796	VIT996578	0.989651	5.71152
569	TIM426333	0.701614	5.8609	626	CDI436331	0.759794	5.8263	683	UKR158695	0.836028	5.78478	740	ENA798941	0.915	5.74558	797	CDI1023156	0.990392	5.71119
570	UKR1503806	0.702049	5.86063	627	CDI909969	0.760202	5.82607	684	CBG155967	0.836364	5.7846	741	UKR1409619	0.916291	5.74497	798	ENA275928	0.99198	5.7105
571	ENA320680	0.702133	5.86058	628	UKR23190	0.760269	5.82603	685	ENA124628	0.83668	5.78444	742	LIF172996	0.917112	5.74458	799	CDI6954	0.994642	5.70933
572	CAP05939203	0.703153	5.85995	629	UKR373341	0.765602	5.823	686	CDI582591	0.838528	5.78348	743	CAP01494678	0.91872	5.74382	800	UKR307743	0.995594	5.70892
573	ENA87022	0.703767	5.85957	630	ASI136988	0.766094	5.82272	687	UKR787059	0.838953	5.78326	744	MAY23250	0.91943	5.74348	801	CBG224171	0.99712	5.70825
574	ENA954053	0.705291	5.85863	631	UKR1120838	0.770521	5.82022	688	LIF54828	0.841092	5.78216	745	CAP00194019	0.925925	5.74042	802	LIF227068	0.997845	5.70794
575	UKR106020	0.707989	5.85697	632	UKR699589	0.770707	5.82011	689	ENA373024	0.842119	5.78163	746	ASI252023	0.927014	5.73991	803	VIT233406	0.99646	5.70715
576	ENA5199	0.709238	5.85621	633	CBG620758	0.77082	5.82005	690	UKR508248	0.842623	5.78137	747	UKR231924	0.927565	5.73966	804	OTA109543	0.999767	5.7071
577	UKR158413	0.709473	5.85606	634	ASI304118	0.771482	5.81967	691	CDI1022646	0.844234	5.78054	748	UKR22725	0.927662	5.73961	805	ENA506725	1.00059	5.70675
578	CAP00983758	0.709881	5.85581	635	ENA463702	0.772379	5.81917	692	UKR59224	0.844819	5.78024	749	UKR968645	0.928495	5.73922	806	ENA262656	1.00119	5.70648
579	CDI725378	0.710872	5.85521	636	ENA740248	0.773513	5.81853	693	VIT230414	0.846596	5.77932	750	CAP00231846	0.929406	5.73879	807	CDI783221	1.00751	5.70375
580	VIT24350	0.711428	5.85487	637	CDI1008614	0.773889	5.81832	694	TIM211092	0.846892	5.77917	751	UKR1333544	0.930315	5.73837	808	ANCI1268	1.00986	5.70274
581	CDI465103	0.711445	5.85486	638	ENA48073	0.775541	5.8174	695	UKR1026721	0.849973	5.7776	752	CAP05041512	0.932293	5.73745	809	CDI531337	1.01002	5.70267
582	ENA108184	0.713498	5.85361	639	LIF225840	0.7													

814	CDI934666	1,01617	5,70003	871	CDI837490	1,13367	5,65251	928	CAP00186049	1,23705	5,61461	985	ENA166314	1,33472	5,58161	1,042	OTA7450	1,46224	5,54198
815	CDI581890	1,01778	5,69935	872	CDI142450	1,13704	5,65122	929	ENA3130	1,24417	5,61212	986	SPE165085	1,34105	5,57956	1,043	UKR283487	1,46489	5,5412
816	ENA344234	1,02356	5,69689	873	CDI725975	1,13771	5,65097	930	OTA38821	1,24617	5,61142	987	UKR1206141	1,34355	5,57875	1,044	OTA39084	1,46698	5,54058
817	UKR1437719	1,02415	5,69663	874	CDI726308	1,13805	5,65084	931	ASI295425	1,24706	5,61111	988	ENA398332	1,34619	5,57789	1,045	CAP03433070	1,46998	5,53969
818	CAP03573841	1,02528	5,69594	875	ENA323371	1,1384	5,6507	932	CBG169343	1,24707	5,61111	989	CBG617899	1,34841	5,57718	1,046	ENA897885	1,4717	5,53918
819	CAP00329431	1,02657	5,69561	876	ENA595330	1,13937	5,65033	933	ENA168848	1,24942	5,61029	990	VIT200159	1,35067	5,57645	1,047	CAP05907925	1,47538	5,5381
820	CBG170176	1,02706	5,6954	877	CAP03443892	1,1415	5,64952	934	ENA68390	1,25012	5,61005	991	CAP03389146	1,35373	5,57547	1,048	ENA153009	1,47562	5,53802
821	ENA1264898	1,02836	5,69485	878	CAP03459690	1,14161	5,64948	935	ENA337790	1,25685	5,60772	992	CBG110442	1,35419	5,57532	1,049	VIT216683	1,47956	5,53687
822	CDI6970	1,0318	5,69341	879	ASI26377	1,14186	5,64939	936	LIF165218	1,25824	5,60724	993	CAP00139684	1,35439	5,57526	1,050	CAP05006769	1,48333	5,53576
823	CAP00454663	1,03351	5,69269	880	CBG86977	1,14491	5,64823	937	ENA1077131	1,25977	5,60671	994	UKR953039	1,35554	5,57489	1,051	ENA1170252	1,4837	5,53565
824	ENA165312	1,03876	5,69049	881	CAP01090991	1,14625	5,64772	938	CDI821633	1,26077	5,60637	995	ENA211467	1,36064	5,57326	1,052	ENA459284	1,48418	5,53551
825	CDI523395	1,04021	5,68988	882	ENA778233	1,1469	5,64747	939	UKR179717	1,26208	5,60591	996	PEK13263	1,36068	5,57324	1,053	CDI609437	1,48801	5,53439
826	LIF342636	1,04273	5,68883	883	ENA893875	1,14734	5,64731	940	CDI815192	1,26262	5,60573	997	IBS447171	1,36119	5,57308	1,054	ENA1047543	1,4908	5,53358
827	LIF309252	1,04389	5,68835	884	CDI471408	1,14905	5,64666	941	CAP02579104	1,26567	5,60468	998	ENA439006	1,36219	5,57276	1,055	PHA137639	1,49092	5,53354
828	IBS238349	1,0472	5,68697	885	ENA1205080	1,15375	5,64489	942	ENA687366	1,26585	5,60462	999	CAP03188746	1,36224	5,57275	1,056	ASI264156	1,49431	5,53256
829	UKR574365	1,04914	5,68617	886	UKR472862	1,15575	5,64414	943	ENA770099	1,26627	5,60447	1,000	ANC2834	1,36921	5,57053	1,057	PHA182480	1,50107	5,5306
830	UKR188437	1,04953	5,686	887	LIF169747	1,15646	5,64387	944	PHA223952	1,26845	5,60373	1,001	ENA1090999	1,37244	5,56951	1,058	CAP00191276	1,507	5,52889
831	ENA760607	1,05014	5,68575	888	ASI254662	1,16415	5,64099	945	CDI627826	1,26921	5,60347	1,002	ENA796044	1,37269	5,56943	1,059	UKR556058	1,50873	5,52839
832	CBG224804	1,05043	5,68563	889	LIF222831	1,16699	5,63993	946	ENA494380	1,2728	5,60224	1,003	ASI319530	1,37385	5,56906	1,060	TIM256552	1,50906	5,52829
833	ENA138106	1,05161	5,68514	890	CDI211118	1,17064	5,63858	947	CAP00482790	1,27313	5,60213	1,004	CBG151593	1,37473	5,56878	1,061	UKR227384	1,5121	5,52742
834	ENA874068	1,05538	5,68359	891	UKR691893	1,17127	5,63834	948	ENA1287876	1,27603	5,60114	1,005	ENA41862	1,37869	5,56753	1,062	UKR1462870	1,51336	5,52706
835	ASI168165	1,05649	5,68314	892	UKR4952220	1,17145	5,63827	949	IBS299187	1,27894	5,60015	1,006	PEK11894	1,38085	5,56685	1,063	ENA282720	1,51382	5,52692
836	CBG705960	1,05669	5,68305	893	UKR226938	1,17435	5,6372	950	ENA1073972	1,27911	5,60009	1,007	UKR1421449	1,38258	5,56631	1,064	ENA737694	1,51494	5,5266
837	CDI508377	1,06129	5,68117	894	CBG697229	1,17628	5,63649	951	UKR1417150	1,28573	5,59785	1,008	ENA547392	1,38263	5,56629	1,065	CDI718930	1,51596	5,52631
838	CAP01994803	1,06236	5,68073	895	CAP01966209	1,17972	5,63522	952	LIF120507	1,28621	5,59769	1,009	UKR1430262	1,38315	5,56613	1,066	ENA1062550	1,51849	5,52559
839	ENA89626	1,0664	5,67908	896	CAP00143636	1,18393	5,63367	953	UKR202765	1,28694	5,59744	1,010	CDI588766	1,38339	5,56606	1,067	ENA61928	1,51943	5,52532
840	CAP04954834	1,07042	5,67745	897	UKR1076411	1,18453	5,63346	954	CAP00249346	1,28806	5,59706	1,011	SPE199055	1,38384	5,56591	1,068	ENA215823	1,52131	5,52478
841	IBS234543	1,07288	5,67645	898	UKR923311	1,18462	5,63342	955	CBG518972	1,28916	5,59669	1,012	CAP00450292	1,3845	5,56571	1,069	ENA1258348	1,52296	5,52431
842	CBG143182	1,07567	5,67532	899	ENA804781	1,1859	5,63295	956	CBG198015	1,29066	5,59619	1,013	CAP05900471	1,3853	5,56546	1,070	ENA1281596	1,5233	5,52422
843	CAP01729941	1,07799	5,67439	900	CAP03443589	1,18636	5,63278	957	CBG506099	1,29893	5,59341	1,014	LIF248070	1,3916	5,56348	1,071	SPE70316	1,53121	5,52197
844	ENA678991	1,07963	5,67373	901	CDI1062678	1,18777	5,63227	958	ENA837278	1,29942	5,59325	1,015	UKR1186598	1,39354	5,56288	1,072	OTA18179	1,5376	5,52016
845	IBS380328	1,0799	5,67362	902	CBG287995	1,18866	5,63194	959	CAP00519690	1,30006	5,59304	1,016	ENA1054571	1,39678	5,56187	1,073	CDI1088097	1,53941	5,51964
846	UKR190743	1,0825	5,67257	903	CBG1915	1,18908	5,63179	960	UKR1291252	1,30038	5,59293	1,017	ASI93901	1,39797	5,5615	1,074	CAP05038763	1,54134	5,5191
847	CDI534317	1,08386	5,67203	904	CBG308003	1,18915	5,63176	961	ENA1158669	1,30081	5,59279	1,018	CAP04831952	1,40202	5,56025	1,075	CAP03466135	1,54162	5,51902
848	ENA852454	1,08856	5,67015	905	CAP03444835	1,193	5,63036	962	UKR1301257	1,30441	5,59159	1,019	ENA931723	1,4044	5,55951	1,076	ASI169742	1,54481	5,51812
849	CDI699670	1,09119	5,6691	906	UKR963220	1,19444	5,62984	963	ENA1045587	1,30599	5,59106	1,020	ENA648426	1,40734	5,5586	1,077	ENA431449	1,54663	5,51761
850	ENA793846	1,0925	5,66858	907	VIT1009036	1,19498	5,62964	964	ENA1164991	1,30655	5,59087	1,021	ASI36871	1,40926	5,55801	1,078	CBG659102	1,54882	5,517
851	UKR1425442	1,0941	5,66794	908	VIT452079	1,19546	5,62946	965	ENA1171835	1,30889	5,5901	1,022	LIF157229	1,40971	5,55787	1,079	CBG440982	1,55442	5,51543
852	UKR1147692	1,10161	5,66497	909	CDI313257	1,1971	5,62887	966	UKR193900	1,31034	5,58961	1,023	ENA771977	1,41114	5,55743	1,080	UKR1249134	1,56111	5,51357
853	UKR351160	1,10224	5,66472	910	ENA1138885	1,19743	5,62875	967	ENA280866	1,31067	5,58951	1,024	LIF157334	1,41331	5,55676	1,081	UKR20834	1,56419	5,51271
854	IBS414577	1,10317	5,66436	911	ENA656184	1,20266	5,62686	968	ASI37214	1,31241	5,58893	1,025	SPE96423	1,41558	5,55607	1,082	CAP0482874	1,56616	5,51216
855	CBG225732	1,10628	5,66313	912	UKR1216279	1,2028	5,62681	969	ENA843194	1,31361	5,58853	1,026	ENA1286967	1,42995	5,55168	1,083	CAP02579555	1,57246	5,51042
856	ENA1006558	1,10814	5,66241	913	UKR1060564	1,20345	5,62657	970	CAP00282379	1,31694	5,58744	1,027	UKR794722	1,43033	5,55156	1,084	LIF115738	1,5725	5,51041
857	OTA23740	1,10865	5,66221	914	CAP04806549	1,2041	5,62634	971	ENA278653	1,31728	5,58732	1,028	ENA482732	1,43456	5,55028	1,085	UKR930611	1,57639	5,50934
858	CAP03463074	1,11047	5,66149	915	ASI223611	1,20719	5,62522	972	ENA267501	1,32221	5,5857	1,029	UKR1213679	1,44055	5,54847	1,086	CAP05909330	1,57955	5,50847
859	ENA217841	1,11171	5,66101	916	ENA596621	1,2095	5,62439	973	CDI51032	1,32504	5,58477	1,030	ENA853357	1,44066	5,54844	1,087	ENA56645	1,58163	5,50789
860	UKR1169384	1,11247	5,66071	917	UKR1335096	1,21343	5,62299	974	CAP01992835	1,32512	5,58475	1,031	ENA1264201	1,44093	5,54836	1,088	OTA393	1,58444	5,50712
861	UKR1484732	1,1135	5,66031	918	CDI483845	1,21386	5,62283	975	CDI1065837	1,32608	5,58443	1,032	ENA866278	1,44215	5,54799	1,089	LIF169467	1,58501	5,50697
862	CDI58795	1,11447	5,65993	919	ENA207468	1,21607	5,62204	976	CDI747602	1,32632	5,58435	1,033	UKR1384700	1,44237	5,54792	1,090	ENA595145	1,58516	5,50693
863	ENA740141	1,11483	5,65979	920	CDI91640	1,21904	5,62098	977	ENA1236289	1,32643	5,58432	1,034	UKR592028	1,44512	5,5471	1,091	UKR1121998	1,58962	5,50571
864	IBS32181	1,1164	5,65918	921	CBG96653	1,22363	5,61935	978	CBG471595	1,32644	5,58431	1,035	LIF157354	1,44812	5,5462	1,092	CAP03397833	1,59657	5,50381
865	UKR499414	1,11798	5,65857	922	UKR269048	1,22432	5,61911	979	UKR1094386	1,328	5,5838	1,036	CDI482975	1,44978	5,5457	1,093	ASI258679	1,59912	5,50312
866	ENA437128	1,11839	5,65841	923	UKR955115	1,22696	5,61817	980	CAP03413430	1,32882	5,58354	1,037	UKR347099	1,4505	5,54548	1,094	ASI14452	1,59228	5,50307
867	CDI898896	1,1186	5,65833	924	CDI846466	1,22937	5,61732	981	TIM518										

1.099	OTA24919	1.61007	5.50016	1.156	ASI274920	1.76252	5.46087	1.213	CAP00245418	1.91733	5.4243	1.270	CBG491876	2.09913	5.38496	1.327	UKR311976	2.24686	5.35542
1.100	ENA30159	1.61543	5.49871	1.157	UKR1496513	1.76323	5.46069	1.214	ENA53437	1.92289	5.42305	1.271	ENA1027195	2.10059	5.38466	1.328	CAP05036754	2.26655	5.35163
1.101	ASI60849	1.61931	5.49767	1.158	UKR1490529	1.76434	5.46042	1.215	CDI706546	1.9247	5.42264	1.272	UKR970863	2.1008	5.38462	1.329	CDI707461	2.27712	5.34961
1.102	CDI38497	1.62049	5.49735	1.159	LIF311613	1.7696	5.45912	1.216	UKR864990	1.92632	5.42227	1.273	OTA41766	2.10554	5.38364	1.330	ENA902979	2.28263	5.34856
1.103	CDI1019492	1.62291	5.49671	1.160	CDI883210	1.7724	5.45844	1.217	CDI1023313	1.92803	5.42189	1.274	TIM87301	2.10788	5.38315	1.331	UKR1125156	2.28271	5.34855
1.104	ENA591643	1.62394	5.49643	1.161	CDI584624	1.77552	5.45768	1.218	ENA141937	1.93186	5.42102	1.275	CDI578664	2.10985	5.38275	1.332	ASI161318	2.28496	5.34812
1.105	ENA260482	1.6247	5.49623	1.162	ENA307122	1.77913	5.45679	1.219	ENA791294	1.9366	5.41996	1.276	ENA608980	2.11203	5.3823	1.333	CBG678180	2.28863	5.34742
1.106	CDI809522	1.62587	5.49591	1.163	CAP01992945	1.7817	5.45617	1.220	ENA117763	1.94082	5.41902	1.277	ENA205123	2.11431	5.38183	1.334	PHA106751	2.29373	5.34646
1.107	CDI1007506	1.6276	5.49545	1.164	CAP05863743	1.78189	5.45612	1.221	ENA241749	1.94083	5.41901	1.278	UKR1085429	2.11465	5.38176	1.335	UKR1363129	2.29403	5.3464
1.108	UKR143863	1.6282	5.49529	1.165	OTA93356	1.78571	5.45519	1.222	CDI898984	1.94273	5.41859	1.279	UKR1463459	2.11535	5.38162	1.336	UKR1120067	2.29728	5.34579
1.109	CDI982858	1.62936	5.49498	1.166	CAP02224249	1.78815	5.4546	1.223	CAP01694106	1.94432	5.41823	1.280	ASI109290	2.11657	5.38137	1.337	CAP04957518	2.30208	5.34488
1.110	VIT232851	1.6346	5.49359	1.167	CBG19433	1.79115	5.45387	1.224	CAP01791601	1.94441	5.41821	1.281	ENA152165	2.11782	5.38111	1.338	ENA974092	2.31117	5.34317
1.111	UKR674309	1.63867	5.49251	1.168	ASI48835	1.79159	5.45376	1.225	CBG643694	1.94444	5.41821	1.282	ENA265054	2.11802	5.38107	1.339	CBG518629	2.31207	5.343
1.112	CBG339394	1.64197	5.49164	1.169	ENA705398	1.79241	5.45356	1.226	IBS383335	1.95062	5.41683	1.283	UKR1105167	2.12451	5.37974	1.340	UKR804143	2.31309	5.34281
1.113	CBG116737	1.64296	5.49137	1.170	ENA293593	1.79444	5.45307	1.227	PHA141798	1.95413	5.41605	1.284	CBG699697	2.12862	5.3789	1.341	SPE140724	2.31365	5.3427
1.114	CDI743165	1.64469	5.49092	1.171	CAP02357195	1.79838	5.45212	1.228	ASI204450	1.95464	5.41593	1.285	UKR1460994	2.13196	5.37822	1.342	LIF10221	2.31792	5.3419
1.115	ENA538566	1.64624	5.49051	1.172	CBG644134	1.79942	5.45187	1.229	UKR671921	1.95775	5.41524	1.286	UKR1042249	2.13295	5.37802	1.343	UKR958256	2.32078	5.34137
1.116	CAP05863067	1.65255	5.48885	1.173	CAP00244463	1.80482	5.45057	1.230	TIM45236	1.96024	5.41469	1.287	UKR1020746	2.13622	5.37735	1.344	CBG352120	2.32363	5.34083
1.117	CAP00259584	1.65283	5.48877	1.174	CAP03435927	1.80897	5.44957	1.231	CAP01361614	1.96349	5.41397	1.288	CBG587567	2.14372	5.37583	1.345	UKR373841	2.32673	5.34025
1.118	OTA61546	1.65533	5.48812	1.175	CDI342299	1.81235	5.44876	1.232	ENA1229256	1.96903	5.41275	1.289	CDI767467	2.14512	5.37555	1.346	CAP04816166	2.32763	5.34009
1.119	IBS121546	1.65786	5.48745	1.176	ENA328502	1.81378	5.44842	1.233	OTA188883	1.97138	5.41223	1.290	CAP00679000	2.15104	5.37435	1.347	CDI691700	2.33033	5.33958
1.120	ENA210634	1.65981	5.48694	1.177	CAP03447609	1.81492	5.44814	1.234	LIF288718	1.97225	5.41204	1.291	ENA85396	2.15567	5.37342	1.348	ENA954498	2.3348	5.33875
1.121	CAP00726598	1.66691	5.48509	1.178	CAP00273140	1.81589	5.44791	1.235	CDI43873	1.97618	5.41117	1.292	UKR175904	2.15602	5.37335	1.349	ENA195244	2.33889	5.33799
1.122	IBS434580	1.667	5.48506	1.179	ENA1129988	1.81878	5.44722	1.236	ENA825488	1.97793	5.41079	1.293	OTA209531	2.15811	5.37293	1.350	CAP00185266	2.34224	5.33737
1.123	CBG506830	1.67406	5.48323	1.180	CDI911089	1.81992	5.44695	1.237	LIF179507	1.98438	5.40938	1.294	CDI440065	2.15834	5.37288	1.351	ENA1037962	2.34223	5.33737
1.124	CAP00314040	1.6793	5.48187	1.181	UKR1241467	1.82122	5.44664	1.238	ENA153690	1.98688	5.40883	1.295	UKR881884	2.16232	5.37208	1.352	ENA872856	2.34406	5.33703
1.125	ENA603210	1.68134	5.48134	1.182	ASI173090	1.82344	5.44611	1.239	UKR1008469	1.9898	5.40819	1.296	ENA210752	2.16275	5.37199	1.353	CDI625470	2.35052	5.33584
1.126	VIT456778	1.68444	5.48054	1.183	ENA485517	1.82579	5.44555	1.240	VIT104315	1.98997	5.40815	1.297	UKR1031510	2.16466	5.37161	1.354	UKR674188	2.3595	5.33418
1.127	CDI843912	1.68695	5.4799	1.184	CDI145269	1.83417	5.44356	1.241	ENA402554	1.992	5.40771	1.298	CAP0223446	2.17515	5.36951	1.355	ENA1026398	2.36122	5.33386
1.128	UKR1023188	1.69533	5.47775	1.185	IBS406145	1.83503	5.44336	1.242	ENA184599	1.99247	5.40761	1.299	UKR360224	2.17647	5.36925	1.356	CBG171062	2.36188	5.33374
1.129	UKR770996	1.69628	5.4775	1.186	OTA183689	1.83585	5.44316	1.243	ENA1269033	1.99393	5.40729	1.300	ENA992202	2.17874	5.36879	1.357	CDI1026082	2.36541	5.33309
1.130	VIT111654	1.70446	5.47541	1.187	ENA285874	1.83992	5.4422	1.244	UKR1338864	1.99498	5.40706	1.301	ANC6321	2.18095	5.36835	1.358	CDI466616	2.36583	5.33302
1.131	CBG98066	1.70632	5.47494	1.188	CAP00482810	1.84093	5.44196	1.245	ENA1108399	2.00495	5.4049	1.302	UKR1475977	2.18139	5.36827	1.359	ENA723900	2.36759	5.33269
1.132	CBG585356	1.70735	5.47468	1.189	CAP00392560	1.84122	5.44189	1.246	UKR908721	2.00664	5.40453	1.303	LIF11577	2.18291	5.36796	1.360	LIF341344	2.37969	5.33048
1.133	CAP03437529	1.70961	5.4741	1.190	ANC5908	1.84981	5.43987	1.247	ENA1196305	2.0097	5.40387	1.304	IBS346061	2.18302	5.36794	1.361	CAP01981599	2.3847	5.32957
1.134	UKR95477	1.70999	5.47401	1.191	PHA32332	1.85134	5.43951	1.248	ENA144998	2.01525	5.40267	1.305	ENA563420	2.18836	5.36688	1.362	CAP04814902	2.38863	5.32885
1.135	UKR515354	1.71254	5.47336	1.192	ASI240763	1.85183	5.4394	1.249	UKR236624	2.01809	5.40206	1.306	IBS336195	2.19039	5.36648	1.363	UKR835081	2.39421	5.32784
1.136	OTA35146	1.71954	5.47159	1.193	CDI417010	1.85375	5.43895	1.250	ENA231058	2.0201	5.40163	1.307	CAP00241718	2.19089	5.36638	1.364	ENA792267	2.40664	5.32559
1.137	LIF240385	1.72135	5.47113	1.194	UKR1271158	1.857	5.43819	1.251	ENA1141591	2.02137	5.40135	1.308	IBS222380	2.19254	5.36605	1.365	SPE187445	2.40823	5.3253
1.138	CAP00895469	1.72619	5.46991	1.195	UKR223664	1.86278	5.43684	1.252	CAP03418287	2.02541	5.40049	1.309	CDI985504	2.19812	5.36495	1.366	CAP05946670	2.42075	5.32305
1.139	CAP05045482	1.72799	5.46946	1.196	UKR836711	1.86541	5.43623	1.253	ENA140580	2.03343	5.39877	1.310	ENA54879	2.19914	5.36475	1.367	VIT439244	2.42102	5.323
1.140	CAP00232730	1.73299	5.4682	1.197	UKR1135935	1.86642	5.43599	1.254	ENA382165	2.03595	5.39823	1.311	ASI244103	2.20101	5.36438	1.368	CDI565075	2.42347	5.32256
1.141	ENA1046462	1.73331	5.46812	1.198	CBG218150	1.86959	5.43525	1.255	LIF329898	2.04171	5.39701	1.312	CAP00340083	2.20401	5.36379	1.369	CAP05909402	2.42419	5.32243
1.142	ENA748127	1.73354	5.46807	1.199	UKR689356	1.8734	5.43437	1.256	ASI192252	2.04485	5.39634	1.313	UKR1360235	2.20474	5.36364	1.370	ENA1005394	2.42656	5.32201
1.143	ENA736115	1.73542	5.4676	1.200	ENA1288863	1.87426	5.43417	1.257	CDI722501	2.04852	5.39556	1.314	UKR43188	2.20757	5.36308	1.371	CAP02810807	2.42787	5.32177
1.144	ENA1220366	1.73831	5.46687	1.201	ENA793908	1.87608	5.43375	1.258	UKR635699	2.05204	5.39481	1.315	CDI597957	2.20868	5.36287	1.372	UKR370999	2.42883	5.3216
1.145	UKR355145	1.73904	5.46669	1.202	UKR1282065	1.88258	5.43225	1.259	CAP03575879	2.05366	5.39447	1.316	CAP05036361	2.20973	5.36266	1.373	ASI132247	2.43177	5.32108
1.146	CDI94618	1.74137	5.46611	1.203	CAP03616803	1.88449	5.43181	1.260	CAP03617812	2.0563	5.39391	1.317	ENA696422	2.21631	5.36137	1.374	ENA437103	2.43484	5.32053
1.147	CBG501105	1.74295	5.46571	1.204	CAP00244469	1.88712	5.4312	1.261	UKR1464370	2.0581	5.39353	1.318	LIF58769	2.21707	5.36122	1.375	ENA110511	2.43552	5.32041
1.148	UKR1313779	1.74519	5.46516	1.205	CDI38736	1.8882	5.43095	1.262	IBS291990	2.06232	5.39264	1.319	CDI1015839	2.21743	5.36115	1.376	UKR1435517	2.43774	5.32001
1.149	CDI808216	1.74595	5.46497	1.206	CAP05873482	1.88911	5.43074	1.263	UKR427623	2.06504	5.39207	1.320	ASI193377	2.21809	5.36102	1.377	LIF39021	2.44313	5.31905
1.150	CBG134726	1.74741	5.46461	1.207	NET21413	1.88926	5.43071	1.264	UKR1280842	2.06705	5.39165	1.321	UKR44835	2.22399	5.35987	1.378	CDI898841	2.44363	5.31896
1.151	UKR97227																		

1.384	LIF15064	2,46772	5,3147	1.441	ENA180162	2,64973	5,2838	1.498	CBG692750	3,00506	5,22915	1.555	CAP01891052	3,2601	5,19377	1.612	ENA1218592	3,54135	5,15783
1.385	CBG47267	2,47066	5,31419	1.442	IBS208917	2,65994	5,28213	1.499	ENA1282810	3,01113	5,22827	1.556	UKR892665	3,26052	5,19371	1.613	CDI430618	3,54276	5,15766
1.386	ENA281201	2,4714	5,31406	1.443	ASII12528	2,66644	5,28107	1.500	UKR1333469	3,01228	5,2281	1.557	LIF118705	3,26363	5,1933	1.614	SPE196718	3,54409	5,1575
1.387	ASI161743	2,4752	5,31339	1.444	CBG40634	2,66878	5,28069	1.501	CAP00206838	3,01327	5,22796	1.558	CAP05938659	3,26475	5,19315	1.615	CBG43865	3,54979	5,1568
1.388	CAP05044556	2,47778	5,31294	1.445	TIM85779	2,67822	5,27915	1.502	CBG533128	3,02071	5,22689	1.559	ASII869030	3,27293	5,19206	1.616	CDI155654	3,55441	5,15623
1.389	CBG62046	2,48361	5,31192	1.446	CDI1020108	2,68212	5,27852	1.503	LIF345970	3,02232	5,22666	1.560	CAP00202399	3,27404	5,19192	1.617	CDI819489	3,56133	5,15539
1.390	CDI645336	2,49596	5,30976	1.447	CAP03134739	2,69266	5,27682	1.504	OTA170428	3,02559	5,22619	1.561	CAP01339458	3,283	5,19073	1.618	CAP04816943	3,56334	5,15514
1.391	ENA1095030	2,49606	5,30975	1.448	CAP00174255	2,70255	5,27523	1.505	ENA953097	3,03497	5,22485	1.562	MAY1566	3,28533	5,19042	1.619	ENA344411	3,57316	5,15395
1.392	UKR476288	2,49986	5,30908	1.449	CDI1021685	2,7092	5,27416	1.506	TOS16359	3,03557	5,22476	1.563	ENA902028	3,28894	5,18994	1.620	LIF337576	3,5818	5,1529
1.393	ASI300222	2,5	5,30906	1.450	ENA952323	2,71221	5,27368	1.507	ENA793507	3,04017	5,2241	1.564	ENA268451	3,29146	5,18961	1.621	CAP05988582	3,58319	5,15273
1.394	ENA837884	2,50032	5,309	1.451	CAP00585919	2,71281	5,27358	1.508	UKR485365	3,04205	5,22383	1.565	CAP03617489	3,30145	5,1883	1.622	UKR993994	3,58472	5,15254
1.395	ENA210722	2,50202	5,30871	1.452	CDI406726	2,72812	5,27114	1.509	IBS442086	3,04338	5,22364	1.566	CAP04276576	3,30295	5,1881	1.623	ENA888234	3,58482	5,15253
1.396	UKR469171	2,50214	5,30869	1.453	CAP00259385	2,74386	5,26864	1.510	TIM286466	3,04857	5,2229	1.567	MAY37936	3,30324	5,18806	1.624	CAP05927081	3,58663	5,15231
1.397	ENA1061147	2,5052	5,30816	1.454	CAP05988599	2,74429	5,26857	1.511	ENA164445	3,05138	5,2225	1.568	CBG448779	3,30586	5,18772	1.625	CAP00574745	3,58759	5,1522
1.398	UKR1015389	2,50704	5,30784	1.455	ENA1258025	2,75521	5,26685	1.512	CDI886046	3,05589	5,22186	1.569	IBS270992	3,30754	5,18749	1.626	CDI923679	3,59023	5,15188
1.399	ENA404092	2,50848	5,30759	1.456	CBG196467	2,77845	5,2632	1.513	ENA404739	3,06602	5,22042	1.570	ENA676240	3,31036	5,18712	1.627	ENA799415	3,59352	5,15148
1.400	VIT37851	2,51576	5,30633	1.457	ASII08665	2,78041	5,26289	1.514	CBG157961	3,06766	5,22019	1.571	ENA606850	3,31073	5,18708	1.628	CDI652977	3,59607	5,15117
1.401	CDI647365	2,51764	5,30601	1.458	CDI49866	2,78262	5,26255	1.515	CAP01619342	3,07051	5,21979	1.572	CAP01844311	3,31747	5,18619	1.629	UKR1205649	3,59626	5,15115
1.402	UKR247720	2,51934	5,30571	1.459	UKR953270	2,78646	5,26195	1.516	ENA207536	3,07186	5,2196	1.573	SPE175438	3,32695	5,18495	1.630	UKR1325616	3,59744	5,15101
1.403	UKR459439	2,51979	5,30564	1.460	CDI720678	2,79265	5,26098	1.517	ENA682370	3,0762	5,21898	1.574	ENA830678	3,32763	5,18487	1.631	UKR93514	3,59902	5,15082
1.404	CBG64858	2,52776	5,30426	1.461	SPE91528	2,79734	5,26025	1.518	UKR1230112	3,07998	5,21845	1.575	UKR1002247	3,34375	5,18277	1.632	CBG131966	3,60302	5,15033
1.405	CAP01846547	2,52964	5,30394	1.462	CDI44304	2,82597	5,25583	1.519	CAP05851836	3,09416	5,21646	1.576	ENA663407	3,35096	5,18183	1.633	ASI18715	3,6041	5,1502
1.406	ENA787774	2,53287	5,30339	1.463	CDI1019737	2,82617	5,2558	1.520	CAP01845070	3,09634	5,21615	1.577	CBG149755	3,35859	5,18084	1.634	NET17856	3,60753	5,14979
1.407	CAP00784466	2,53383	5,30322	1.464	ENA93672	2,82933	5,25532	1.521	ENA1235305	3,10121	5,21547	1.578	CDI885662	3,3608	5,18056	1.635	UKR304426	3,6096	5,14954
1.408	CDI12311	2,54564	5,3012	1.465	ENA302807	2,85108	5,25199	1.522	CDI793612	3,10157	5,21542	1.579	IBS448906	3,36311	5,18026	1.636	ENA1099689	3,6177	5,14857
1.409	UKR563360	2,54832	5,30075	1.466	CAP05040371	2,85119	5,25197	1.523	CAP03361226	3,10456	5,215	1.580	UKR823756	3,37022	5,17934	1.637	CAP04759701	3,61955	5,14834
1.410	CBG442935	2,55097	5,3003	1.467	CDI571174	2,85483	5,25142	1.524	ENA1003830	3,10707	5,21465	1.581	CDI1008709	3,372	5,17911	1.638	ENA823336	3,62702	5,14745
1.411	CAP02270662	2,553	5,29995	1.468	UKR992520	2,85796	5,25094	1.525	UKR1222854	3,10937	5,21433	1.582	CAP05923838	3,37503	5,17872	1.639	NET25476	3,63558	5,14643
1.412	CAP01068427	2,55455	5,29969	1.469	CDI1014982	2,86048	5,25056	1.526	IBS366470	3,11576	5,21344	1.583	ASI45818	3,38556	5,17737	1.640	ENA269035	3,63587	5,14639
1.413	CAP05049753	2,55763	5,29916	1.470	ENA749664	2,86913	5,24925	1.527	ENA471527	3,11984	5,21287	1.584	OTA12048	3,38876	5,17696	1.641	ENA814354	3,63821	5,14611
1.414	CBG222747	2,55983	5,29879	1.471	ANC10081	2,87895	5,24777	1.528	CDI490641	3,12616	5,21199	1.585	UKR509778	3,41834	5,17318	1.642	ENA94223	3,63869	5,14606
1.415	CDI999866	2,56081	5,29862	1.472	CDI903213	2,88296	5,24716	1.529	OTA128525	3,1338	5,21093	1.586	CAP01379016	3,41883	5,17312	1.643	LIF339041	3,65685	5,14389
1.416	CDI5982	2,56225	5,29838	1.473	CAP05037576	2,88404	5,247	1.530	ASII33414	3,13577	5,21066	1.587	ENA1214649	3,42225	5,17269	1.644	CAP03390107	3,66415	5,14303
1.417	CDI685470	2,56757	5,29748	1.474	CBG640165	2,88444	5,24694	1.531	CBG581092	3,13605	5,21062	1.588	CBG122822	3,42234	5,17268	1.645	CBG522815	3,66409	5,14303
1.418	CAP00748559	2,56914	5,29721	1.475	TIM416161	2,88821	5,24637	1.532	LIF226378	3,1443	5,20948	1.589	UKR1130680	3,43025	5,17167	1.646	ASI104193	3,66702	5,14269
1.419	ENA437539	2,57664	5,29595	1.476	MAY614	2,88887	5,24627	1.533	ASI310533	3,14703	5,2091	1.590	CDI745325	3,43273	5,17136	1.647	ENA1270194	3,66968	5,14237
1.420	ENA698396	2,5791	5,29553	1.477	CAP03005192	2,8943	5,24546	1.534	ENA457496	3,15683	5,20775	1.591	ENA1010864	3,43797	5,1707	1.648	CAP06067626	3,67428	5,14183
1.421	CAP01266723	2,58156	5,29512	1.478	UKR700478	2,8949	5,24537	1.535	UKR996087	3,15788	5,2076	1.592	ENA1217854	3,43857	5,17062	1.649	LIF281438	3,67733	5,14147
1.422	SPE85874	2,59097	5,29354	1.479	UKR1228519	2,90145	5,24439	1.536	LIF322726	3,15879	5,20748	1.593	CDI334987	3,43876	5,1706	1.650	UKR145726	3,6782	5,14136
1.423	UKR1022979	2,59234	5,29331	1.480	ENA903978	2,90725	5,24352	1.537	CAP05040141	3,16444	5,2067	1.594	UKR1283407	3,44055	5,17037	1.651	ENA954063	3,68837	5,14017
1.424	MAY13405	2,59426	5,29299	1.481	UKR286476	2,90946	5,24319	1.538	CAP01855336	3,16891	5,20609	1.595	CBG607613	3,44428	5,1699	1.652	CDI503414	3,69098	5,13986
1.425	CAP00234759	2,5944	5,29296	1.482	ENA204745	2,91138	5,2429	1.539	VIT196986	3,17627	5,20508	1.596	CDI490381	3,44965	5,16922	1.653	CAP03474945	3,69286	5,13964
1.426	UKR912707	2,6045	5,29127	1.483	CAP01891299	2,91478	5,24239	1.540	UKR1074482	3,18252	5,20423	1.597	CDI109007	3,46109	5,16779	1.654	CBG385382	3,70773	5,13789
1.427	CAP03401008	2,60505	5,29118	1.484	CBG213137	2,91639	5,24215	1.541	CAP00257608	3,1877	5,20352	1.598	CAP01332207	3,46211	5,16766	1.655	UKR793892	3,70903	5,13774
1.428	ENA1077792	2,60708	5,29085	1.485	UKR793838	2,9204	5,24156	1.542	CDI586234	3,18954	5,20327	1.599	ENA284404	3,46856	5,16685	1.656	ENA10082	3,70988	5,13764
1.429	PHA92141	2,61159	5,29009	1.486	UKR238282	2,92177	5,24135	1.543	UKR1025679	3,19035	5,20316	1.600	CDI427311	3,46901	5,1668	1.657	UKR852408	3,71227	5,13736
1.430	CAP00782435	2,61261	5,28993	1.487	CNR25732	2,93031	5,24009	1.544	UKR836279	3,19111	5,20306	1.601	IBS132556	3,47004	5,16667	1.658	LIF16207	3,74086	5,13403
1.431	LIF182686	2,61416	5,28967	1.488	CBG513539	2,93774	5,23899	1.545	ENA934593	3,19936	5,20194	1.602	UKR1298342	3,47296	5,1663	1.659	OTA21962	3,74549	5,13349
1.432	CAP00497840	2,6153	5,28948	1.489	UKR231941	2,94624	5,23773	1.546	UKR1386363	3,20777	5,2008	1.603	CAP05020253	3,47351	5,16623	1.660	CBG610922	3,74658	5,13337
1.433	CAP01972291	2,61692	5,28921	1.490	CAP02580026	2,95577	5,23633	1.547	IBS434044	3,20974	5,20053	1.604	ENA68686	3,48772	5,16446	1.661	LIF236041	3,76276	5,13149
1.434	SPE100621	2,61854	5,28894	1.491	UKR512657	2,96474	5,23501	1.548	CAP04934958	3,21554	5,19975	1.605	UKR137633	3,48779	5,16445	1.662	UKR782619	3,77654	5,12991
1.435	CAP01793441	2,62169	5,28842	1.492	ENA52306	2,96592	5,23484	1.549	CBG153204	3,21971	5,19918	1.606	ASI43636	3,49602	5,16343	1.663	CAP03042608	3,78584	

1.669	CAP01340787	3,83254	5,12351	1.726	ENA619179	4,18031	5,08579	1.783	CAP05933860	4,49358	5,05441	1.840	CDI750472	4,9513	5,01228	1.897	PEK6887	5,47188	4,96886
1.670	CDI638419	3,8431	5,12232	1.727	CDI884843	4,18481	5,08532	1.784	PHA228790	4,49449	5,05432	1.841	ENA311749	4,97437	5,01026	1.898	ASI245584	5,47835	4,96835
1.671	ENA878352	3,85322	5,12118	1.728	ENA259923	4,18629	5,08517	1.785	CBG339533	4,49673	5,0541	1.842	ENA1044027	4,97537	5,01017	1.899	ENA397883	5,48027	4,9682
1.672	CDI500696	3,85337	5,12116	1.729	CAP04954141	4,1894	5,08485	1.786	ENA1150449	4,49836	5,05395	1.843	UKR977885	4,97813	5,00993	1.900	CAP05945144	5,49093	4,96735
1.673	CBG680176	3,85789	5,12065	1.730	CAP05895233	4,20169	5,08358	1.787	CAP05925991	4,50199	5,05236	1.844	UKR57333	4,99173	5,00875	1.901	CAP02810594	5,49482	4,96705
1.674	UKR927896	3,87258	5,119	1.731	CBG86129	4,20179	5,08357	1.788	CDI709739	4,51384	5,05245	1.845	ENA1051572	4,99949	5,00807	1.902	CAP00291421	5,49804	4,96679
1.675	CDI649108	3,87682	5,11852	1.732	ENA1040906	4,20422	5,08331	1.789	CBG190514	4,53265	5,05065	1.846	ENA735644	5,00147	5,0079	1.903	ENA75522	5,50567	4,96619
1.676	ENA1259446	3,88529	5,11758	1.733	ENA21099	4,20596	5,08314	1.790	CAP01844260	4,54202	5,04975	1.847	CAP03390129	5,00937	5,00722	1.904	IBS461791	5,52059	4,96501
1.677	CAP01729917	3,89377	5,11663	1.734	ENA1207408	4,21129	5,08258	1.791	UKR428161	4,54518	5,04945	1.848	CDI136461	5,02043	5,00626	1.905	LIF194123	5,55289	4,96248
1.678	CDI600742	3,90221	5,11569	1.735	ENA206134	4,21872	5,08182	1.792	IBS371824	4,55347	5,04866	1.849	CDI630615	5,02499	5,00586	1.906	ENA752233	5,57038	4,96112
1.679	CDI582470	3,90972	5,11485	1.736	CAP00346797	4,23117	5,08054	1.793	CDI119451	4,55955	5,04808	1.850	CDI601380	5,03506	5,005	1.907	CBG27652	5,5754	4,96072
1.680	CDI367688	3,92454	5,11321	1.737	CBG106964	4,24176	5,07945	1.794	CAP03422381	4,56262	5,04779	1.851	UKR1525222	5,04818	5,00386	1.908	VIT203574	5,57801	4,96052
1.681	UKR930986	3,92491	5,11317	1.738	CDI25785	4,24942	5,07867	1.795	ASI168763	4,57282	5,04682	1.852	IBS107783	5,05069	5,00365	1.909	CBG97941	5,58332	4,96011
1.682	CAP00801872	3,92578	5,11307	1.739	ENA1290207	4,26011	5,07758	1.796	ENA1281289	4,57821	5,0463	1.853	UKR509046	5,05977	5,00287	1.910	CAP03616734	5,5911	4,9595
1.683	CAP00049066	3,92704	5,11293	1.740	CAP05046205	4,2622	5,07737	1.797	ENA426985	4,60582	5,04369	1.854	ENA941019	5,06461	5,00245	1.911	UKR283892	5,5963	4,9591
1.684	PHA156537	3,92896	5,11272	1.741	OTA99647	4,27162	5,07641	1.798	PEK11648	4,60773	5,04351	1.855	ENA397082	5,07101	5,00191	1.912	CDI833258	5,61567	4,9576
1.685	IBS423577	3,94392	5,11107	1.742	CBG121775	4,27904	5,07565	1.799	LIF7677	4,62656	5,04174	1.856	CAP03435851	5,07171	5,00185	1.913	ENA495052	5,63197	4,95634
1.686	CAP02810390	3,95699	5,10963	1.743	ENA293261	4,28159	5,0754	1.800	LIF163795	4,6327	5,04117	1.857	LIF132270	5,07278	5,00175	1.914	CAP01218502	5,64242	4,95553
1.687	CBG569111	3,96127	5,10917	1.744	CNR15045	4,28769	5,07478	1.801	CAP04958286	4,635	5,04095	1.858	ENA595183	5,07405	5,00165	1.915	CAP00266469	5,65181	4,95481
1.688	OTA22306	3,97011	5,1082	1.745	CAP00200072	4,29397	5,07414	1.802	UKR1510919	4,65219	5,03934	1.859	ENA803025	5,07933	5,00119	1.916	TIM83613	5,6559	4,9545
1.689	ENA301901	3,97123	5,10807	1.746	ENA357169	4,29865	5,07367	1.803	SPE163139	4,66356	5,03828	1.860	CAP03473427	5,0999	4,99944	1.917	CDI703131	5,6646	4,95383
1.690	ENA8709	3,97422	5,10775	1.747	OTA38562	4,30193	5,07334	1.804	ENA1207008	4,67643	5,03709	1.861	SPE28204	5,10439	4,99906	1.918	CDI994115	5,67559	4,95299
1.691	ENA265368	3,97589	5,10757	1.748	ENA826631	4,3143	5,07209	1.805	CAP00258817	4,69926	5,03497	1.862	LIF127647	5,10589	4,99893	1.919	LIF11743	5,67575	4,95298
1.692	CAP05926351	3,98206	5,10689	1.749	CAP00784596	4,32075	5,07144	1.806	MAY21544	4,70117	5,03479	1.863	ASI65257	5,10663	4,99887	1.920	CDI143587	5,70933	4,95042
1.693	UKR1349126	3,98397	5,10668	1.750	PHA142791	4,32445	5,07107	1.807	CDI827387	4,71394	5,03362	1.864	CAP01994148	5,12678	4,99716	1.921	ASTI09907	5,71564	4,94994
1.694	UKR1349878	3,98801	5,10624	1.751	CAP00972761	4,32597	5,07092	1.808	CDI807856	4,72446	5,03265	1.865	CDI1009655	5,13069	4,99682	1.922	VIT924178	5,71716	4,94982
1.695	ASI211674	3,99424	5,10557	1.752	TIM525005	4,32725	5,07079	1.809	UKR1029697	4,74	5,03122	1.866	CBG511331	5,14753	4,9954	1.923	UKR552240	5,74007	4,94808
1.696	PHA198954	3,99446	5,10554	1.753	OTA161475	4,32944	5,07057	1.810	CDI843548	4,74368	5,03088	1.867	ENA304079	5,15558	4,99472	1.924	CBG99984	5,74347	4,94783
1.697	IBS383477	4,0073	5,10415	1.754	OTA35614	4,33886	5,06962	1.811	ENA1126321	4,74431	5,03083	1.868	CAP01327766	5,15867	4,99446	1.925	ENA308720	5,76403	4,94627
1.698	TIM274771	4,01274	5,10356	1.755	ENA215259	4,33954	5,06956	1.812	CAP01734439	4,752	5,03012	1.869	ASI194524	5,16765	4,99371	1.926	CAP04812377	5,77273	4,94562
1.699	ENA893629	4,01433	5,10339	1.756	UKR1376625	4,34848	5,06866	1.813	VIT845121	4,76048	5,02935	1.870	CBG660393	5,17273	4,99328	1.927	CAP03176820	5,78096	4,945
1.700	UKR1105141	4,02605	5,10212	1.757	CBG198080	4,35831	5,06768	1.814	CDI365886	4,76113	5,02929	1.871	ENA628055	5,1803	4,99264	1.928	CAP02305465	5,79255	4,94413
1.701	CDI5291	4,03057	5,10163	1.758	CDI755667	4,36124	5,06739	1.815	LIF179124	4,76592	5,02885	1.872	ENA404610	5,20336	4,99072	1.929	CDI1006324	5,80464	4,94322
1.702	UKR1332704	4,04458	5,10013	1.759	TIM477377	4,36386	5,06713	1.816	ENA70758	4,77649	5,02789	1.873	ENA101205	5,2092	4,99023	1.930	UKR841329	5,80552	4,94316
1.703	IBS399024	4,04723	5,09984	1.760	CAP03459135	4,36429	5,06709	1.817	ENA738089	4,78334	5,02727	1.874	CAP00264727	5,22675	4,98877	1.931	ENA331056	5,80612	4,94311
1.704	ASI11652	4,06278	5,09818	1.761	UKR171714	4,36451	5,06706	1.818	CAP03042676	4,78415	5,02719	1.875	OTA278992	5,23129	4,98839	1.932	LIF177357	5,81555	4,94241
1.705	UKR457983	4,06997	5,09741	1.762	CAP03437260	4,36602	5,06691	1.819	IBS261989	4,79648	5,02608	1.876	ENA295276	5,24179	4,98752	1.933	CDI601037	5,83775	4,94075
1.706	IBS119679	4,07055	5,09735	1.763	UKR576818	4,37353	5,06617	1.820	CDI693528	4,7972	5,02601	1.877	CAP00314213	5,24781	4,98702	1.934	CAP05923227	5,85201	4,9397
1.707	ASI296185	4,07761	5,09659	1.764	ENA1229793	4,37535	5,06599	1.821	CDI486225	4,83117	5,02295	1.878	ENA846121	5,24899	4,98692	1.935	UKR1488200	5,85631	4,93938
1.708	IBS376006	4,08601	5,0957	1.765	SPE16371	4,37561	5,06596	1.822	CDI707492	4,83111	5,02295	1.879	CAP03615133	5,2501	4,98683	1.936	ENA860483	5,86373	4,93883
1.709	CDI694390	4,09122	5,09515	1.766	CDI30709	4,39759	5,06379	1.823	CAP00010417	4,83659	5,02246	1.880	CAP02223645	5,26745	4,9854	1.937	UKR908087	5,87544	4,93796
1.710	VIT476462	4,0989	5,09433	1.767	SPE170834	4,40043	5,0635	1.824	IBS450790	4,83975	5,02218	1.881	PHA172884	5,26945	4,98523	1.938	ENA139247	5,88407	4,93732
1.711	ENA1260267	4,11099	5,09305	1.768	UKR345469	4,40324	5,06323	1.825	UKR143529	4,8401	5,02215	1.882	CAP00281035	5,27949	4,98441	1.939	CDI746041	5,88913	4,93695
1.712	CAP00198980	4,11283	5,09286	1.769	CDI128262	4,404	5,06315	1.826	UKR578275	4,84551	5,02166	1.883	SPE174132	5,29338	4,98327	1.940	CDI481523	5,89753	4,93633
1.713	OTAS5207	4,12091	5,09201	1.770	UKR287128	4,41426	5,06214	1.827	ASI310262	4,8481	5,02143	1.884	IBS405336	5,31716	4,98132	1.941	CAP00240916	5,91622	4,93496
1.714	CBG141825	4,12607	5,09146	1.771	CBG160422	4,41692	5,06188	1.828	CAP05046017	4,85057	5,02121	1.885	SPE176140	5,32875	4,98037	1.942	UKR1342986	5,92716	4,93415
1.715	ENA1127011	4,12863	5,09119	1.772	CAP02053038	4,43286	5,06032	1.829	CBG489213	4,85529	5,02079	1.886	CDI624736	5,34694	4,97889	1.943	VIT479887	5,93311	4,93732
1.716	ENA835481	4,14897	5,08906	1.773	UKR1213761	4,43835	5,05978	1.830	CAP02228292	4,85845	5,0205	1.887	VIT422900	5,36155	4,97771	1.944	CBG197708	5,93777	4,93338
1.717	OTAS86761	4,15233	5,08871	1.774	ASI259605	4,43875	5,05974	1.831	UKR1362850	4,86551	5,01987	1.888	CAP00234661	5,38075	4,97616	1.945	ASI235717	5,94947	4,93252
1.718	CAP02214507	4,1524	5,0887	1.775	CAP01848404	4,43968	5,05965	1.832	CAP00709862	4,87734	5,01882	1.889	LIF223616	5,38152	4,9761	1.946	ENA1046889	5,97249	4,93084
1.719	UKR1202573	4,15719	5,0882	1.776	CBG584522	4,44165	5,05946	1.833	CDI693633	4,88607	5,01804	1.890	CDI582486	5,39345	4,97513	1.947	UKR285314	5,9738	4,93075
1.720	UKR121287	4,16067	5,08784	1.777	CDI652623	4,45426	5,05822	1.834	CAP04631589	4,89011	5,01768	1.891	CAP03456340	5,39366	4,97512	1.948	CAP05939644		

1.954	CDI136405	6.03768	4.92613	2.011	CAP00215020	6.78763	4.87528	2.068	IBS193237	7.57527	4.8276	2.125	UKR210657	8.11404	4.79776	2.182	CAP05040733	9.26348	4.74023
1.955	CAP05045784	6.0386	4.92606	2.012	CAP03005888	6.79511	4.8748	2.069	UKR1494824	7.58223	4.8272	2.126	CBG147690	8.11934	4.79748	2.183	CBG101751	9.27382	4.73974
1.956	CAP03464597	6.03952	4.926	2.013	CBG160773	6.82444	4.87293	2.070	CAP01945793	7.58973	4.82677	2.127	UKR606624	8.13901	4.79643	2.184	ENA1178797	9.33449	4.73691
1.957	CAP03398242	6.05929	4.92458	2.014	CAP02320661	6.82752	4.87274	2.071	CAP00248204	7.60758	4.82575	2.128	CDI819044	8.18956	4.79374	2.185	UKR672055	9.33851	4.73672
1.958	CBG242109	6.09409	4.92209	2.015	CAP00194524	6.83967	4.87196	2.072	CBG1468666	7.61327	4.82543	2.129	CDI760966	8.22023	4.79212	2.186	CAP01216060	9.34251	4.73654
1.959	CDI485022	6.12396	4.91997	2.016	OTA114950	6.84825	4.87142	2.073	UKR1427604	7.61721	4.8252	2.130	UKR383195	8.22782	4.79172	2.187	PHA29591	9.35518	4.73595
1.960	CAP00227607	6.12405	4.91996	2.017	CAP05939215	6.87856	4.8695	2.074	SPE180503	7.62077	4.825	2.131	CAP05046406	8.27516	4.78922	2.188	CAP00189565	9.39337	4.73418
1.961	OTA70570	6.12598	4.91982	2.018	LIF63044	6.89156	4.86868	2.075	CAP01846619	7.62471	4.82478	2.132	ENA700088	8.28156	4.78889	2.189	CAP04559440	9.39939	4.7339
1.962	CAP01974394	6.14537	4.91845	2.019	LIF204441	6.89209	4.86865	2.076	CDI972921	7.65821	4.82287	2.133	CBG665035	8.32085	4.78683	2.190	CAP00198064	9.40011	4.73387
1.963	UKR434049	6.14685	4.91835	2.020	CAP00183531	6.90529	4.86782	2.077	CAP03132111	7.67562	4.82189	2.134	CAP00320308	8.33982	4.78584	2.191	ENA205202	9.40055	4.73385
1.964	UKR987384	6.15037	4.9181	2.021	CAP05044414	6.90669	4.86773	2.078	ENA111759	7.69073	4.82103	2.135	CAP03457134	8.34705	4.78547	2.192	ENA320808	9.42064	4.73292
1.965	CBG493281	6.15321	4.9179	2.022	ASI294524	6.90784	4.86766	2.079	OTA4394	7.69146	4.82099	2.136	CAP05987813	8.35092	4.78527	2.193	ENA739155	9.4211	4.7329
1.966	CDI839191	6.15787	4.91757	2.023	LIF154703	6.94399	4.86539	2.080	UKR1219284	7.69397	4.82085	2.137	ENA941066	8.38293	4.7836	2.194	PEK3136	9.44283	4.7319
1.967	ENAR15958	6.16102	4.91735	2.024	CAP02287130	6.98678	4.86272	2.081	CAP01328691	7.6941	4.82084	2.138	OTA189612	8.38462	4.78352	2.195	CBG661098	9.46779	4.73075
1.968	VIT366413	6.18846	4.91542	2.025	CDI738245	7.0161	4.8609	2.082	ENA806801	7.70538	4.82021	2.139	CAP05042372	8.38972	4.78325	2.196	CAP02084941	9.50597	4.729
1.969	LIF113305	6.19829	4.91473	2.026	CAP02220429	7.01953	4.86069	2.083	UKR1282165	7.70795	4.82006	2.140	CAP05923226	8.40931	4.78224	2.197	CDI728585	9.51278	4.72869
1.970	CDI64280	6.20511	4.91425	2.027	UKR1259514	7.02463	4.86038	2.084	UKR130915	7.72233	4.81925	2.141	CAP01993115	8.4238	4.78149	2.198	UKR801096	9.61668	4.72397
1.971	ENAS15840	6.21603	4.91349	2.028	UKR102590	7.04184	4.85931	2.085	ENA1101632	7.73656	4.81845	2.142	SPE159335	8.46029	4.77961	2.199	ENA1176095	9.63524	4.72314
1.972	OTA98195	6.21938	4.91325	2.029	CAP03174808	7.06303	4.85801	2.086	ENA728442	7.76037	4.81712	2.143	CAP02210333	8.46549	4.77935	2.200	CBG187535	9.64844	4.72254
1.973	CBG24744	6.2326	4.91233	2.030	ASI311667	7.07044	4.85755	2.087	UKR1333851	7.7617	4.81704	2.144	CBG17555	8.47612	4.7788	2.201	IBS442257	9.65726	4.72215
1.974	ENAS61790	6.24758	4.91129	2.031	CAP05931601	7.08121	4.85689	2.088	IBS297865	7.79493	4.81519	2.145	VIT14785	8.49095	4.77804	2.202	CDI943897	9.6851	4.7209
1.975	CDI609786	6.2513	4.91103	2.032	CDI937302	7.08126	4.85689	2.089	CBG57602	7.80789	4.81447	2.146	CAP00261521	8.5096	4.77709	2.203	CBG331091	9.6964	4.72039
1.976	CAP01379196	6.2628	4.91023	2.033	CAP03162631	7.10261	4.85558	2.090	CAP05045632	7.80968	4.81437	2.147	CDI6887	8.51006	4.77707	2.204	CAP04804761	9.70429	4.72004
1.977	CAP00262367	6.28332	4.90881	2.034	CAP03045511	7.10976	4.85515	2.091	UKR1240112	7.81331	4.81416	2.148	CAP03473835	8.5115	4.77699	2.205	CAP00301363	9.72386	4.71916
1.978	CAP01842737	6.28704	4.90855	2.035	ASI122520	7.11232	4.85499	2.092	CAP03465815	7.81558	4.81404	2.149	ENA690119	8.52524	4.77629	2.206	ENA631176	9.79388	4.71605
1.979	UKR444123	6.28753	4.90852	2.036	CAP01896761	7.12626	4.85414	2.093	LIF327788	7.83636	4.81289	2.150	UKR1022033	8.57456	4.77379	2.207	CAP00261171	9.81445	4.71513
1.980	IBS93923	6.28967	4.90837	2.037	ENA1172676	7.13856	4.85339	2.094	CAP00020039	7.83974	4.8127	2.151	CAP02572266	8.57922	4.77355	2.208	CAP00234721	9.82159	4.71482
1.981	CAP01845526	6.29329	4.90812	2.038	ASI306827	7.14555	4.85296	2.095	CAP00217658	7.84892	4.81219	2.152	CAP00261266	8.62604	4.77119	2.209	CAP00260103	9.84726	4.71368
1.982	CBG214413	6.29615	4.90792	2.039	CAP03459283	7.15714	4.85226	2.096	CAP01846931	7.85429	4.81189	2.153	ENA1096786	8.62842	4.77107	2.210	LIF324615	9.85708	4.71325
1.983	UKR1314014	6.32522	4.90592	2.040	CBG214922	7.16451	4.85181	2.097	IBS412191	7.86209	4.81146	2.154	UKR1432359	8.64138	4.77042	2.211	CDI500393	9.89293	4.71167
1.984	UKR282632	6.33768	4.90507	2.041	UKR1307771	7.18802	4.85039	2.098	IBS189112	7.86379	4.81137	2.155	CAP03465455	8.65693	4.76964	2.212	CAP03745125	9.99573	4.70719
1.985	CBG14715	6.33988	4.90492	2.042	CBG627240	7.19132	4.85019	2.099	CAP00264169	7.88378	4.81027	2.156	CBG23815	8.66344	4.76931	2.213	IBS357025	9.99636	4.70716
1.986	TIM495545	6.34743	4.9044	2.043	UKR463162	7.19616	4.8499	2.100	VIT357449	7.89113	4.80986	2.157	CAP00440630	8.67854	4.76855	2.214	CDI161049	10.0043	4.70681
1.987	ENA1260340	6.36111	4.90347	2.044	CBG363194	7.1999	4.84967	2.101	CAP03437802	7.89312	4.80975	2.158	CAP00440951	8.68008	4.76848	2.215	CNR1545	10.0149	4.70636
1.988	CDI450099	6.36459	4.90323	2.045	ENA1014264	7.22289	4.84829	2.102	CDI503780	7.91434	4.80859	2.159	TIM84173	8.7003	4.76747	2.216	UKR1227978	10.0363	4.70542
1.989	UKR1330930	6.38903	4.90157	2.046	OTA55707	7.23075	4.84782	2.103	LIF333673	7.91657	4.80846	2.160	PHA141863	8.74604	4.76519	2.217	CDI393291	10.0638	4.70424
1.990	CAP02566252	6.39947	4.90086	2.047	CDI843965	7.23823	4.84737	2.104	IBS130609	7.92243	4.80814	2.161	ASI88165	8.76484	4.76426	2.218	UKR1128938	10.0803	4.70353
1.991	SPE88488	6.39944	4.90086	2.048	IBS376079	7.24974	4.84668	2.105	LIF148004	7.9282	4.80783	2.162	CAP00668244	8.76746	4.76413	2.219	CDI78911	10.0891	4.70315
1.992	SPE6084	6.42957	4.89882	2.049	ENA238946	7.26545	4.84574	2.106	CAP01272604	7.94865	4.80671	2.163	OTA257023	8.81997	4.76153	2.220	CAP00008985	10.1438	4.7008
1.993	CAP00177462	6.43617	4.89837	2.050	CBG135722	7.27842	4.84496	2.107	ENA157790	7.95511	4.80635	2.164	CBG689360	8.82635	4.76122	2.221	ASI297919	10.1484	4.7006
1.994	CAP00079801	6.44262	4.89794	2.051	ENA1075190	7.29222	4.84414	2.108	CBG256324	7.95559	4.80633	2.165	CAP00007476	8.83183	4.76095	2.222	ASI285607	10.1968	4.69854
1.995	ENAR846169	6.44635	4.89769	2.052	CAP01614182	7.33937	4.84134	2.109	CAP02211069	7.9557	4.80632	2.166	CDI495746	8.89099	4.75805	2.223	UKR898473	10.2362	4.69686
1.996	UKR1004368	6.45627	4.89702	2.053	ENA751498	7.35482	4.84043	2.110	UKR140268	7.97273	4.80539	2.167	ENA767650	8.94845	4.75525	2.224	CDI583756	10.2544	4.69609
1.997	CAP02040525	6.45798	4.8969	2.054	CAP01891477	7.38213	4.83882	2.111	NET2805	7.98526	4.80471	2.168	CAP04815700	8.95113	4.75512	2.225	ENA665870	10.2592	4.69588
1.998	CBG566645	6.46151	4.89667	2.055	IBS140160	7.39437	4.8381	2.112	ENA631338	7.99318	4.80428	2.169	ENA162526	8.95471	4.75495	2.226	CAP05917633	10.2999	4.69417
1.999	CDI484583	6.46152	4.89667	2.056	CAP03361158	7.3992	4.83782	2.113	UKR766382	7.99349	4.80426	2.170	SPE118281	8.96358	4.75452	2.227	IBS472193	10.3135	4.69359
2.000	LIF175834	6.51141	4.89333	2.057	OTA14709	7.43442	4.83575	2.114	IBS434558	7.99498	4.80418	2.171	ASI306781	9.0087	4.75234	2.228	OTA9374	10.3288	4.69295
2.001	UKR848498	6.51423	4.89314	2.058	CBG683878	7.46452	4.834	2.115	ENA392474	7.9956	4.80415	2.172	CDI1000932	9.01352	4.75211	2.229	ENA768330	10.357	4.69176
2.002	ENA959948	6.57503	4.8891	2.059	CAP01379185	7.47657	4.8333	2.116	CBG451609	7.99909	4.80396	2.173	LIF183421	9.03292	4.75117	2.230	CAP03466437	10.3652	4.69142
2.003	ENAR80428	6.58421	4.8885	2.060	LIF217072	7.47707	4.83327	2.117	OTA43332	8.00247	4.80378	2.174	UKR380175	9.03512	4.75107	2.231	CAP02568469	10.3746	4.69103
2.004	CAP03361275	6.59059	4.88808	2.061	CDI169085	7.499	4.832	2.118	UKR1483084	8.01141	4.80329	2.175	UKR603097	9.10415	4.74776	2.232	UKR137836	10.3788	4.69085
2.005	CDI710842	6.63016	4.88548	2.062	ENA1213265	7.50488	4.83166	2.119	CDI613867	8.06019	4.80065	2.176	LIF0986	9					

2.239	CAP05914573	10,4389	4,68835	2.296	PHA170542	11,5548	4,64424	2.353	CAP00443372	12,6779	4,60395	2.410	ENA166319	14,0785	4,55844	2.467	CDI590635	15,9643	4,50385
2.240	UKR955246	10,4614	4,68741	2.297	IBS288888	11,5686	4,64372	2.354	CAP01186917	12,7219	4,60245	2.411	ENA819836	14,0791	4,55843	2.468	CAP02896396	15,9966	4,50297
2.241	IBS353603	10,47	4,68705	2.298	UKR433131	11,6037	4,6424	2.355	LIF323784	12,7311	4,60213	2.412	CAP05927113	14,0873	4,55817	2.469	CAP00038589	16,0123	4,50255
2.242	CBG626005	10,5377	4,68425	2.299	CAP00327620	11,6896	4,6392	2.356	CDI168338	12,7806	4,60045	2.413	CAP03750962	14,1375	4,55663	2.470	CBG396394	16,0555	4,50138
2.243	LIF126048	10,5529	4,68363	2.300	ENA1017146	11,6954	4,63899	2.357	CAP05945998	12,7852	4,60029	2.414	ENA437078	14,1377	4,55662	2.471	CDI510107	16,0099	4,50099
2.244	UKR1129266	10,5616	4,68327	2.301	UKR804292	11,7145	4,63827	2.358	CDI334755	12,7907	4,60011	2.415	SPE138053	14,1581	4,556	2.472	CAP03081686	16,1054	4,50003
2.245	LIF177843	10,5683	4,683	2.302	CAP01729252	11,722	4,638	2.359	CBG442144	12,8431	4,59833	2.416	CAP05944451	14,2178	4,55417	2.473	ASI98755	16,1161	4,49974
2.246	ENA1171395	10,5731	4,6828	2.303	CBG204680	11,7416	4,63727	2.360	CAP00240541	12,8658	4,59756	2.417	ENA948965	14,2737	4,55246	2.474	AS1240598	16,1463	4,49893
2.247	CBG686522	10,5757	4,68269	2.304	CBG372091	11,748	4,63704	2.361	CAP02244844	12,8797	4,5971	2.418	OTA130174	14,285	4,55212	2.475	ENA200664	16,1475	4,4989
2.248	CBG313353	10,5817	4,68245	2.305	ENA894531	11,7676	4,63631	2.362	CAP03453770	12,8927	4,59666	2.419	UKR891570	14,3035	4,55156	2.476	CAP05863641	16,2129	4,49714
2.249	LIF185691	10,6046	4,68151	2.306	ENA1082503	11,7691	4,63626	2.363	OTA27611	12,9024	4,59633	2.420	TOS6955	14,3096	4,55137	2.477	ENA605396	16,2189	4,49698
2.250	ASI263835	10,6654	4,67902	2.307	PHA44094	11,7791	4,63589	2.364	CAP02211402	12,9075	4,59616	2.421	CAP02580128	14,314	4,55124	2.478	LIF170132	16,2306	4,49667
2.251	CBG158191	10,6747	4,67864	2.308	SPE141812	11,8594	4,63294	2.365	PHA130959	12,9397	4,59508	2.422	UKR1150352	14,3862	4,54905	2.479	CAP03618656	16,2808	4,49532
2.252	ENA1211061	10,718	4,67689	2.309	IBS228678	11,864	4,63277	2.366	CAP03134621	12,9426	4,59498	2.423	CAP00235886	14,4443	4,5473	2.480	CAP00218639	16,355	4,49335
2.253	ASI55416	10,7224	4,67671	2.310	LIF221542	11,8726	4,63245	2.367	LIF126711	12,9552	4,59456	2.424	CAP01266681	14,5377	4,5445	2.481	CAP03437381	16,4048	4,49203
2.254	ENA348912	10,7268	4,67653	2.311	CAP05905541	11,8798	4,63219	2.368	CDI490900	12,9558	4,59453	2.425	CAP03474529	14,5381	4,54449	2.482	ENA135946	16,4089	4,49192
2.255	UKR963381	10,7502	4,67558	2.312	CAP00588345	11,8892	4,63185	2.369	ASI319861	12,9748	4,5939	2.426	UKR342729	14,5772	4,54333	2.483	ENA1080351	16,4252	4,49149
2.256	PHA211121	10,7859	4,67414	2.313	CBG625093	11,8976	4,63154	2.370	LIF174534	12,9784	4,59378	2.427	UKR943312	14,6208	4,54203	2.484	CNR5226	16,4437	4,491
2.257	UKR1509168	10,7977	4,67367	2.314	ENA473670	11,9192	4,63075	2.371	ENA1089695	13,0034	4,59294	2.428	CAP00076918	14,6676	4,54064	2.485	VIT144863	16,4775	4,49011
2.258	ENA1154647	10,8064	4,67332	2.315	UKR1267979	11,9195	4,63074	2.372	ENA984271	13,0098	4,59273	2.429	ENA747304	14,7315	4,53875	2.486	TIM38035	16,486	4,48988
2.259	VIT259238	10,83	4,67237	2.316	CBG398949	11,9713	4,62886	2.373	UKR369769	13,0219	4,59233	2.430	CAP02580421	14,7459	4,53833	2.487	CBG270219	16,5471	4,48828
2.260	UKR1319776	10,8311	4,67233	2.317	CAP00238269	11,9781	4,62861	2.374	ENA318232	13,0401	4,59172	2.431	CAP00263472	14,8078	4,53651	2.488	MAY57373	16,5567	4,48803
2.261	ENA633967	10,8606	4,67115	2.318	ENA844456	11,9793	4,62857	2.375	ENA957377	13,0457	4,59153	2.432	UKR935407	14,8139	4,53633	2.489	CAP02580236	16,5602	4,48794
2.262	ENA853303	10,8974	4,66968	2.319	ASI300890	11,991	4,62815	2.376	CDI150684	13,0716	4,59067	2.433	CDI696854	14,8452	4,53541	2.490	TIM371054	16,6839	4,4847
2.263	MAY26853	10,8973	4,66968	2.320	TIM78443	12,0281	4,6268	2.377	IBS98134	13,1107	4,58937	2.434	LIF327874	14,906	4,53364	2.491	UKR1325890	16,7947	4,48183
2.264	CAP01845302	10,9172	4,66889	2.321	CAP00263944	12,0621	4,62558	2.378	CAP00020643	13,1619	4,58768	2.435	CBG191351	14,9432	4,53256	2.492	ENA196854	16,8459	4,4805
2.265	CAP05041805	10,9212	4,66873	2.322	OTA50435	12,0905	4,62456	2.379	CAP00260711	13,1779	4,58715	2.436	CBG702476	14,9489	4,53239	2.493	VIT338134	16,8513	4,48037
2.266	CBG116028	10,9349	4,66818	2.323	CAP00263946	12,097	4,62432	2.380	UKR259540	13,1921	4,58669	2.437	UKR58845	14,9542	4,53224	2.494	LIF145827	16,9219	4,47855
2.267	CAP03748536	10,9399	4,66799	2.324	UKR1048671	12,1218	4,62343	2.381	CBG197607	13,2192	4,58579	2.438	UKR1146469	14,9695	4,53179	2.495	CAP05946448	16,949	4,47786
2.268	CAP00252078	10,982	4,66632	2.325	PHA164072	12,1269	4,62325	2.382	LIF58611	13,2226	4,58568	2.439	ENA1116684	14,9706	4,53176	2.496	UKR1092894	16,9574	4,47764
2.269	ENA987441	10,9917	4,66594	2.326	ASI5751	12,1361	4,62292	2.383	CBG180371	13,248	4,58485	2.440	VIT147845	14,9773	4,53157	2.497	IBS242703	16,9751	4,47719
2.270	UKR1512014	11,0073	4,66532	2.327	IBS253560	12,1413	4,62273	2.384	ASI194107	13,2874	4,58356	2.441	CAP05863625	14,9785	4,53153	2.498	CAP03437188	17,1131	4,47367
2.271	CAP05942964	11,0911	4,66202	2.328	UKR184523	12,1466	4,62255	2.385	ENA501965	13,3076	4,5829	2.442	LIF178011	14,9813	4,53145	2.499	UKR1365718	17,1256	4,47335
2.272	CAP00233938	11,0916	4,66201	2.329	LIF164583	12,1621	4,62199	2.386	UKR324652	13,3202	4,58249	2.443	CAP03459157	15,0105	4,5306	2.500	PHA182263	17,1538	4,47264
2.273	ENA1240556	11,1014	4,66162	2.330	CAP04934682	12,1767	4,62147	2.387	UKR1025117	13,3314	4,58212	2.444	CAP02064254	15,0571	4,52926	2.501	ENA1189795	17,2162	4,47106
2.274	UKR672747	11,1192	4,66093	2.331	CDI990959	12,1901	4,62099	2.388	CDI1052099	13,3578	4,58126	2.445	CBG677517	15,0875	4,52838	2.502	CBG683472	17,2256	4,47083
2.275	LIF314770	11,15	4,65972	2.332	PHA142519	12,2029	4,62054	2.389	CAP00442600	13,4614	4,57791	2.446	CAP03469513	15,1001	4,52802	2.503	ENA941130	17,2971	4,46903
2.276	CBG11692	11,1758	4,65872	2.333	CDI731280	12,2343	4,61942	2.390	CAP01326736	13,5114	4,5763	2.447	ENA658046	15,1862	4,52555	2.504	UKR521773	17,3488	4,46773
2.277	ENA1233261	11,179	4,6586	2.334	CAP01887289	12,2492	4,61889	2.391	VIT338474	13,5257	4,57584	2.448	UKR685542	15,1877	4,52551	2.505	UKR391243	17,3529	4,46763
2.278	LIF139871	11,1867	4,6583	2.335	CAP03444623	12,2645	4,61835	2.392	CDI879966	13,5476	4,57514	2.449	TIM88600	15,2319	4,52425	2.506	LIF164815	17,3964	4,46654
2.279	UKR1171991	11,1991	4,65782	2.336	CAP01253714	12,2802	4,61779	2.393	CAP01423538	13,5833	4,57399	2.450	CAP01207282	15,3501	4,52089	2.507	CAP05042079	17,4783	4,4645
2.280	LIF125033	11,2021	4,6577	2.337	LIF162623	12,3095	4,61676	2.394	UKR57758	13,6298	4,57251	2.451	CBG31595	15,4107	4,51918	2.508	PHA150158	17,498	4,46401
2.281	ENA1194549	11,2145	4,65722	2.338	ASI70420	12,3983	4,61364	2.395	CAP04958338	13,6762	4,57103	2.452	CAP00182436	15,4732	4,51742	2.509	CDI507408	17,5056	4,46382
2.282	IBS110846	11,229	4,65666	2.339	VIT451207	12,403	4,61347	2.396	UKR443335	13,6977	4,57035	2.453	CAP01833709	15,4991	4,51669	2.510	SPE91436	17,5321	4,46317
2.283	UKR51824	11,2445	4,65606	2.340	CBG407137	12,4242	4,61273	2.397	UKR320078	13,7354	4,56916	2.454	CDI325473	15,5126	4,51632	2.511	CDI11011921	17,5394	4,46298
2.284	UKR406032	11,2936	4,65417	2.341	ASI291936	12,458	4,61155	2.398	CAP03575702	13,7474	4,56878	2.455	ENA832078	15,529	4,51586	2.512	CDI865703	17,5874	4,4618
2.285	ASI321033	11,2951	4,65411	2.342	CDI257727	12,4802	4,61078	2.399	CDI521015	13,7582	4,56844	2.456	ENA765004	15,6183	4,51337	2.513	CAP00282539	17,5899	4,46174
2.286	ENA1240339	11,3533	4,65188	2.343	OTA63627	12,4807	4,61076	2.400	CAP00959444	13,7703	4,56806	2.457	UKR266028	15,6403	4,51275	2.514	CAP00201530	17,772	4,45726
2.287	ENA510598	11,3871	4,65059	2.344	ENA703144	12,4856	4,61059	2.401	CAP00793231	13,772	4,568	2.458	ENA273073	15,7299	4,51027	2.515	CBG57236	17,8196	4,4561
2.288	CAP00215025	11,4281	4,64903	2.345	ENA956582	12,5282	4,60911	2.402	CAP03134197	13,7769	4,56785	2.459	ENA76014	15,7551	4,50958	2.516	CDI594533	17,8591	4,45514
2.289	IBS43436	11,43	4,64895	2.346	ENA985823	12,6037	4,6065	2.403	CDI1012717	13,7838	4,56763	2.460	OTA438	15,7779	4,50895	2.517	CAP00257782	17,949	4,45296
2.290	ENA1084963	11,4304	4,64894	2.347	LIF181425	12,6141	4,60614	2.404	UKR1351776	13,8649	4,56508	2.461	CAP00257820	15,7848	4,50876	2.518	CAP03618165	18,0092	4,4515
2.291	ASI7																		

2.524	PHA118309	18,2852	4,4449	2.581	ENA982445	21,2745	4,37914	2.638	LAB29458	24,9759	4,30948	2.695	CAP00231827	28,6531	4,24983	2.752	UKR541462	33,517	4,18173
2.525	ENA1028782	18,324	4,44398	2.582	CAP00964036	21,2904	4,37882	2.639	UKR1031853	24,9773	4,30946	2.696	CAP00619498	28,793	4,24771	2.753	CDI702197	33,6103	4,18053
2.526	UKR1138728	18,3906	4,4424	2.583	PHA97242	21,4013	4,37656	2.640	CAP01847649	25,0656	4,30792	2.697	CAP00782429	28,8241	4,24724	2.754	ENA946339	33,6761	4,17968
2.527	CAP05987433	18,4295	4,44149	2.584	CAP00446173	21,4018	4,37655	2.641	CAP00432497	25,1044	4,30725	2.698	CAP02004174	28,9355	4,24557	2.755	CAP01847246	33,7843	4,17828
2.528	UKR24678	18,541	4,43887	2.585	CBG458139	21,4093	4,3764	2.642	CBG170014	25,2912	4,30403	2.699	CBG195980	28,9793	4,24491	2.756	CDI458249	34,0824	4,17447
2.529	CAP01729346	18,5587	4,43845	2.586	CAP00803422	21,4619	4,37533	2.643	CAP02219032	25,3173	4,30358	2.700	CAP02223362	28,9812	4,24488	2.757	CBG224634	34,1018	4,17422
2.530	CDI1004164	18,7293	4,43448	2.587	ENA344716	21,5023	4,37452	2.644	ENA351089	25,3962	4,30223	2.701	CAP05661891	28,9929	4,24471	2.758	OTA9680	34,1407	4,17373
2.531	CDI611920	18,7762	4,43339	2.588	CBG239335	21,6075	4,3724	2.645	CDI871069	25,4684	4,301	2.702	CAP05741607	29,0443	4,24394	2.759	CBG681781	34,1428	4,1737
2.532	CAP02829028	18,7865	4,43315	2.589	CBG186133	21,7313	4,36992	2.646	ENA1242937	25,427	4,30094	2.703	MAY26230	29,0685	4,24358	2.760	VIT208520	34,3592	4,17096
2.533	UKR499744	18,7996	4,43285	2.590	CBG550919	21,8195	4,36815	2.647	CAP00515395	25,4897	4,30063	2.704	VIT624646	29,1028	4,24307	2.761	ENA712716	34,4454	4,16987
2.534	ENA1018826	18,915	4,43019	2.591	ENA1205790	21,9416	4,36573	2.648	CAP01694330	25,7342	4,29649	2.705	CAP02578506	29,1321	4,24263	2.762	SPE174727	34,5521	4,16853
2.535	IBS420532	18,9276	4,4299	2.592	NET22824	22,0193	4,3642	2.649	CAP00189225	25,8033	4,29533	2.706	CDI394814	29,1832	4,24187	2.763	ENA631777	34,8464	4,16484
2.536	PHA21654	18,9437	4,42953	2.593	ENA503421	22,0692	4,36321	2.650	CDI760415	25,8955	4,29377	2.707	ENA273291	29,2334	4,24112	2.764	ENA811497	35,1744	4,16077
2.537	CAP01378983	18,9718	4,42889	2.594	LIF334007	22,098	4,36265	2.651	CAP00517682	25,9194	4,29337	2.708	CAP03747373	29,2455	4,24094	2.765	SPE174980	35,2613	4,1597
2.538	CDI23170	18,9787	4,42873	2.595	ENA132709	22,1909	4,36082	2.652	CBG696600	25,9684	4,29255	2.709	ENA1047975	29,2696	4,24058	2.766	CAP03746908	35,5956	4,1556
2.539	CAP03617927	19,0433	4,42726	2.596	CAP04825529	22,3888	4,35697	2.653	UKR1410287	25,9771	4,29241	2.710	CAP02811357	29,3989	4,23867	2.767	UKR1270424	35,6838	4,15453
2.540	CAP00266339	19,1024	4,42591	2.597	ASII82938	22,4435	4,35591	2.654	CBG416423	25,9866	4,29225	2.711	CAP01968136	29,4159	4,23842	2.768	UKR1306959	35,703	4,15429
2.541	CAP00258122	19,1833	4,42408	2.598	UKR881834	22,5003	4,35481	2.655	CAP02223894	26,0379	4,29139	2.712	CDI954081	29,5296	4,23674	2.769	ENA146589	35,7792	4,15337
2.542	CAP03615290	19,2925	4,42161	2.599	CAP02577984	22,5655	4,35356	2.656	CDI702232	26,0447	4,29128	2.713	MAY8693	29,6572	4,23487	2.770	CAP03545701	35,8021	4,15309
2.543	ENA606022	19,3361	4,42063	2.600	CAP05929968	22,6179	4,35255	2.657	UKR1432176	26,0737	4,2908	2.714	CAP04678310	29,7267	4,23385	2.771	UKR1329295	35,9557	4,15123
2.544	UKR1228123	19,3387	4,42057	2.601	CDI45992	22,6473	4,35198	2.658	NET29319	26,1281	4,28989	2.715	IBS6534	29,8822	4,23159	2.772	CAP05036967	35,9823	4,15091
2.545	CAP02899015	19,3718	4,41983	2.602	CBG393632	22,6525	4,35188	2.659	CDI590679	26,152	4,28949	2.716	CBG535804	29,886	4,23153	2.773	CNR31458	35,9943	4,15077
2.546	PHA241368	19,4424	4,41825	2.603	ENA664550	22,7154	4,35068	2.660	OTA17630	26,2333	4,28815	2.717	ASI295963	29,8967	4,23138	2.774	CDI354408	36,1694	4,14866
2.547	ASI157981	19,5421	4,41603	2.604	CDI1075367	22,7322	4,35036	2.661	CBG352717	26,2501	4,28787	2.718	CAP00210559	29,945	4,23068	2.775	CAP00765752	36,3199	4,14685
2.548	CAP03042624	19,563	4,41556	2.605	CAP00001511	22,7788	4,34947	2.662	CAP00193524	26,2983	4,28707	2.719	ASI306574	29,9636	4,23041	2.776	CDI353091	36,322	4,14683
2.549	CAP00977751	19,6401	4,41386	2.606	CAP00191795	22,8364	4,34837	2.663	CAP05039429	26,3418	4,28636	2.720	CAP03410576	29,9855	4,23009	2.777	LAB36216	36,6193	4,14329
2.550	CAP01656764	19,6652	4,41133	2.607	CAP01992814	22,9606	4,34602	2.664	CBG229711	26,418	4,2851	2.721	UKR1272912	30,3303	4,22512	2.778	LIF340343	36,9949	4,13886
2.551	CAP03457179	19,7307	4,41186	2.608	CNR5426	22,9655	4,34592	2.665	CAP00442013	26,5554	4,28285	2.722	CAP00227374	30,5236	4,22236	2.779	ENA660155	37,149	4,13705
2.552	IBS454930	19,8343	4,40958	2.609	ENA1002404	23,0671	4,34401	2.666	CDI747319	26,5665	4,28267	2.723	CAP00188167	30,6075	4,22117	2.780	CAP00202432	37,2558	4,13581
2.553	IBS399992	19,8433	4,40939	2.610	VIT415920	23,2134	4,34126	2.667	UKR326960	26,6137	4,2819	2.724	ENA815104	30,726	4,21949	2.781	CAP0361145	37,5912	4,13191
2.554	CBG455369	20,1486	4,40276	2.611	CDI876565	23,2571	4,34044	2.668	MAY11270	26,7234	4,28011	2.725	ENA669276	30,7504	4,21915	2.782	ENA674811	37,7504	4,13008
2.555	UKR689643	20,1524	4,40267	2.612	ENA265147	23,3089	4,33948	2.669	OTA98931	26,7264	4,28006	2.726	OTA106828	30,7603	4,21901	2.783	SPE116977	38,1706	4,12527
2.556	CDI510876	20,175	4,40219	2.613	CDI701157	23,3633	4,33847	2.670	CDI127196	26,8008	4,27885	2.727	CDI11837	30,8843	4,21726	2.784	CDI668389	38,643	4,11993
2.557	CAP01881211	20,1812	4,40205	2.614	CDI171225	23,4308	4,33721	2.671	CDI789540	26,8257	4,27845	2.728	ASI33015	30,8953	4,21711	2.785	OTA66733	38,7202	4,11906
2.558	PHA154008	20,2266	4,40108	2.615	OTA103927	23,5027	4,33588	2.672	IBS443630	26,9197	4,27693	2.729	PHA115196	31,0096	4,2155	2.786	ENA393559	38,9114	4,11692
2.559	UKR895536	20,2446	4,40069	2.616	ENA433243	23,6155	4,3338	2.673	CAP01326515	27,0659	4,27458	2.730	CDI265487	31,0523	4,21491	2.787	CDI799700	38,9141	4,11689
2.560	CAP02128186	20,3053	4,39939	2.617	CAP05912035	23,6663	4,33287	2.674	UKR307812	27,1422	4,27336	2.731	CAP00238271	31,0819	4,21449	2.788	ENA949922	39,0097	4,11583
2.561	IBS5788	20,3063	4,39937	2.618	CDI919448	23,7	4,33225	2.675	CAP05929854	27,2212	4,27209	2.732	CNR12799	31,1149	4,21403	2.789	CBG664301	39,5443	4,10992
2.562	PHA193695	20,3561	4,39831	2.619	CAP04956318	23,7612	4,33113	2.676	OTA279596	27,3592	4,2699	2.733	UKR837428	31,5509	4,20799	2.790	CAP00262645	39,5977	4,10933
2.563	CAP00194866	20,4032	4,3973	2.620	CAP00048919	23,8266	4,32994	2.677	CDI1017124	27,3606	4,26988	2.734	ASI37246	31,8626	4,20372	2.791	CAP02046896	39,6066	4,10923
2.564	TIM181329	20,4508	4,39629	2.621	CAP00263598	23,9003	4,3286	2.678	VIT263083	27,4543	4,26839	2.735	UKR829580	32,0178	4,20161	2.792	UKR1172038	39,7811	4,10732
2.565	CAP01729264	20,5027	4,39519	2.622	UKR1543105	24,0905	4,32515	2.679	CBG346058	27,5582	4,26675	2.736	UKR417901	32,0303	4,20144	2.793	CAP02579014	40,0176	4,10475
2.566	CDI817731	20,5167	4,39489	2.623	UKR125027	24,1058	4,32488	2.680	CAP02116134	27,5729	4,26652	2.737	CAP03002189	32,3056	4,19772	2.794	ENA746831	40,4524	4,10006
2.567	PHA232131	20,5396	4,39441	2.624	CAP05937708	24,1582	4,32394	2.681	CBG652513	27,6042	4,26602	2.738	CAP03615582	32,3229	4,19749	2.795	CDI18358	40,6541	4,0979
2.568	CAP04848118	20,5473	4,39425	2.625	OTA186078	24,2284	4,32267	2.682	CAP00195185	27,6171	4,26582	2.739	TIM455995	32,5989	4,1938	2.796	CAP03470440	40,6716	4,09771
2.569	CAP04800627	20,6392	4,39231	2.626	CDI49057	24,2452	4,32237	2.683	CAP03438990	27,6597	4,26515	2.740	CBG361688	32,6123	4,19362	2.797	IBS317687	40,7295	4,09709
2.570	ENA775945	20,6733	4,39159	2.627	CAP00232555	24,3002	4,32139	2.684	CDI548705	27,7137	4,26431	2.741	CBG674780	32,6787	4,19273	2.798	CAP03488573	41,1943	4,09216
2.571	CAP00302960	20,7471	4,39004	2.628	CAP01628614	24,3565	4,32039	2.685	ENA881003	27,7894	4,26312	2.742	ENA648919	32,8603	4,19033	2.799	CAP00335371	41,605	4,08785
2.572	LIF218624	20,7768	4,38942	2.629	LIF115065	24,4365	4,31896	2.686	CAP0008219	27,8161	4,2627	2.743	CAP03134203	32,9144	4,18961	2.800	CAP01089818	42,0085	4,08366
2.573	ENA356377	20,7868	4,38921	2.630	PHA213511	24,4563	4,31861	2.687	LIF318655	27,9918	4,25997	2.744	CAP00234015	32,9807	4,18874	2.801	CAP05921658	42,0255	4,08349
2.574	CAP00620597	20,8103	4,38872	2.631	CAP01845509	24,4977	4,31788	2.688	UKR1185304	28,0763	4,25866	2.745	UKR289869	33,0257	4,18815	2.802	CAP00448971	42,4221	4,07941
2.575	CDI400718	20,8274	4,38836	2.632	CAP02215330	24,5392	4,31714	2.689	CAP00265006	28,0782	4,25863	2							

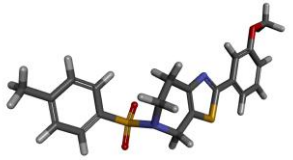
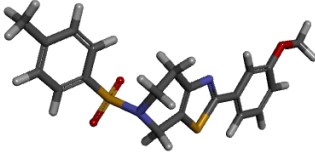
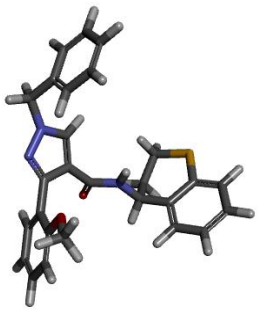
2.809	ENA1053131	43,0361	4,07317	2.866	OTA27249	54,2343	3,97273	2.923	CBG8141	65,6654	3,88966	2.980	ENA1147299	84,9965	3,7776	3.037	ENA1264992	120,868	3,62469
2.810	CAP01584448	43,0673	4,07285	2.867	CAP05007079	54,3418	3,97187	2.924	ASI13071	65,7677	3,88899	2.981	CAP03473666	85,3873	3,77561	3.038	CAP00183981	120,964	3,62434
2.811	CBG226678	43,1035	4,07249	2.868	UKR1409746	54,3786	3,97157	2.925	CDI336381	65,8971	3,88813	2.982	CBG70911	85,5857	3,7746	3.039	ENA645463	121,725	3,62162
2.812	CAP04133617	43,4234	4,06928	2.869	UKR1480049	54,6015	3,9698	2.926	CAP04800364	66,4442	3,88454	2.983	CAP02216883	86,5685	3,76964	3.040	CBG23552	122,407	3,61919
2.813	PEK5982	43,595	4,06756	2.870	PHA60846	54,8493	3,96783	2.927	CAP01299691	66,4955	3,88421	2.984	CAP03401810	87,3411	3,76578	3.041	CBG656257	122,647	3,61132
2.814	CBG695375	43,6979	4,06654	2.871	CAP03545516	55,0211	3,96647	2.928	CAP01424578	67,2238	3,87948	2.985	ASI316581	89,1983	3,75664	3.042	CAP04562288	125,028	3,60999
2.815	CBG55685	43,7495	4,06603	2.872	CAP00263081	55,0646	3,96613	2.929	ENA1000188	67,5749	3,87721	2.986	ENA660927	89,3035	3,75613	3.043	ENA986929	125,157	3,60955
2.816	ENA1280620	44,0862	4,0627	2.873	IBS438928	55,286	3,96438	2.930	CAP0175851	67,7217	3,87627	2.987	CDI352052	89,4735	3,75531	3.044	CAP05863550	125,313	3,609
2.817	IBS382965	44,1318	4,06225	2.874	CAP02143795	55,654	3,9615	2.931	UKR259659	68,098	3,87387	2.988	CBG152093	89,5416	3,75498	3.045	CAP01846882	125,911	3,60694
2.818	CAP00256918	44,5368	4,05828	2.875	CDI423537	56,0946	3,95808	2.932	CAP04934974	68,1345	3,87363	2.989	CBG26258	89,969	3,75291	3.046	CBG371549	126,542	3,60476
2.819	LIF160266	44,6354	4,05732	2.876	CAP00192840	56,1809	3,95741	2.933	CDI67244	68,3571	3,87222	2.990	ENA1111388	91,8568	3,74389	3.047	CAP02810686	128,358	3,59858
2.820	ENA875334	44,722	4,05648	2.877	UKR1525779	56,3225	3,95632	2.934	UKR440244	68,3836	3,87205	2.991	ENA216535	93,3348	3,73696	3.048	SPE96703	128,484	3,59815
2.821	CDI756430	44,834	4,05539	2.878	CAP00849854	56,4069	3,95567	2.935	ENA575496	68,6176	3,87056	2.992	CAP04485189	93,8917	3,73437	3.049	LAB63824	128,499	3,5981
2.822	CAP00315705	44,9442	4,05433	2.879	CAP00801921	56,4776	3,95512	2.936	CAP03433074	69,2941	3,8663	2.993	UKR1055872	95,5121	3,72694	3.050	CBG503469	129,054	3,59623
2.823	CDI674836	44,9991	4,0538	2.880	CAP01730025	56,6486	3,95381	2.937	ASI324315	70,018	3,86179	2.994	OTA63074	95,8325	3,72549	3.051	CBG407710	129,222	3,59566
2.824	IBS243101	45,1947	4,05191	2.881	CAP00662358	56,788	3,95274	2.938	UKR1018829	70,2387	3,86042	2.995	CAP02579670	96,2483	3,72361	3.052	VIT397162	129,786	3,59377
2.825	CAP00236327	45,2516	4,05137	2.882	ENA1048604	56,8788	3,95205	2.939	LIF20601	70,2598	3,86029	2.996	CAP05908292	96,6531	3,72178	3.053	CAP02004785	130,074	3,59281
2.826	CAP03437562	45,55	4,04851	2.883	PEK12547	57,2703	3,94907	2.940	UKR1212249	70,2969	3,86006	2.997	CAP03444658	96,6879	3,72163	3.054	CBG639943	130,47	3,59149
2.827	CAP02510439	45,8463	4,0457	2.884	ENA135339	57,3091	3,94878	2.941	CDI26212	70,8162	3,85687	2.998	CAP02810722	96,7029	3,72156	3.055	TIM233207	131,764	3,5872
2.828	ENA564780	46,3488	4,04096	2.885	CAP01816962	57,4884	3,94742	2.942	CAP03394158	70,8414	3,85671	2.999	CBG489180	96,7282	3,72145	3.056	CAP00260154	133,073	3,58291
2.829	ASI268749	46,5578	4,03901	2.886	ASI214806	58,1172	3,9427	2.943	CDI78166	71,3892	3,85337	3.000	UKR1490543	96,7877	3,72118	3.057	CAP00258467	133,738	3,58074
2.830	CDI412617	46,7418	4,03729	2.887	CAP00260249	58,1239	3,94265	2.944	SPE142572	71,5344	3,85248	3.001	CDI557746	96,9264	3,72056	3.058	CAP03437968	133,934	3,58011
2.831	CBG138141	46,7449	4,03727	2.888	CAP00855120	58,2046	3,94204	2.945	CAP02829878	72,603	3,84605	3.002	CAP03545409	97,813	3,7166	3.059	CBG502383	133,993	3,57992
2.832	CBG24007	46,9477	4,03539	2.889	ENA323388	58,2714	3,94154	2.946	IBS416495	72,8731	3,84443	3.003	CAP00259399	98,7597	3,71242	3.060	ENA394544	134,222	3,57918
2.833	CAP01729166	47,2716	4,0324	2.890	CAP03611710	58,4464	3,94024	2.947	CBG536816	72,9198	3,84415	3.004	UKR1503053	98,9985	3,71137	3.061	TIM493334	134,949	3,57683
2.834	ENA906959	47,3571	4,03161	2.891	PHA102868	58,5371	3,93957	2.948	ENA1144979	72,9375	3,84405	3.005	CDI637494	100,205	3,70611	3.062	CBG116338	135,641	3,57461
2.835	UKR483257	47,6479	4,02896	2.892	CAP01903090	58,8878	3,93697	2.949	CAP04935144	73,0501	3,84338	3.006	CAP05047159	100,55	3,70462	3.063	ENA923182	136,209	3,57279
2.836	CDI571259	47,7806	4,02775	2.893	CAP05044863	59,2138	3,93458	2.950	ENA214095	73,6744	3,83968	3.007	IBS39883	100,705	3,70395	3.064	ENA671079	136,263	3,57262
2.837	CDI469497	47,7861	4,0277	2.894	ENA474643	59,2469	3,93433	2.951	MAY46015	73,7964	3,83896	3.008	SPE142997	101,122	3,70216	3.065	CDI811909	136,296	3,57252
2.838	ENA210760	47,9266	4,02642	2.895	UKR1222386	59,5185	3,93235	2.952	CAP00153288	73,8057	3,83891	3.009	CBG158183	101,618	3,70003	3.066	CAP05923776	137,49	3,56873
2.839	UKR413789	47,9367	4,02633	2.896	CAP05943511	59,7076	3,93097	2.953	ENA761561	74,4454	3,83516	3.010	CAP01845869	102,546	3,69608	3.067	ENA304209	139,167	3,56346
2.840	CAP02810483	48,1688	4,02423	2.897	UKR1419675	60,0781	3,92828	2.954	PHA173801	74,5766	3,8344	3.011	CAP00527831	102,904	3,69457	3.068	CAP05987611	139,318	3,56299
2.841	CDI525430	48,5281	4,02101	2.898	IBS269939	60,2711	3,92689	2.955	CBG319547	74,7169	3,83358	3.012	CAP01212871	103,056	3,69393	3.069	IBS380402	139,837	3,56138
2.842	CBG281495	48,6323	4,02008	2.899	CBG137903	60,3339	3,92644	2.956	CAP04000594	74,9361	3,83231	3.013	CAP02053026	104,654	3,68725	3.070	CAP04841723	139,882	3,56124
2.843	LIF331301	49,1226	4,01572	2.900	CAP05007760	60,8887	3,92246	2.957	ENA826922	75,1896	3,83084	3.014	CAP01847473	104,983	3,68588	3.071	ENA407666	140,358	3,55976
2.844	CAP01274815	49,609	4,01144	2.901	CBG82823	61,1579	3,92055	2.958	ENA891751	75,8946	3,82679	3.015	CAP05941883	105,095	3,68542	3.072	ASI299842	141,572	3,55602
2.845	ENA1097451	49,9563	4,00841	2.902	CAP01971874	61,3568	3,91914	2.959	UKR1486962	76,023	3,82605	3.016	CAP00234915	105,355	3,68435	3.073	CDI866525	141,618	3,55588
2.846	CAP04541107	50,8836	4,00042	2.903	CAP04845648	61,3998	3,91883	2.960	UKR1223236	76,0922	3,82566	3.017	CAP02811185	106,487	3,6797	3.074	CAP03003704	141,698	3,55564
2.847	UKR1157243	51,1627	3,99805	2.904	CDI1090249	61,5	3,91812	2.961	CAP03438300	76,8387	3,82142	3.018	CBG303289	106,8	3,67843	3.075	CAP02579450	142,178	3,55417
2.848	ANC19107	51,1855	3,99785	2.905	CAP02810882	61,9658	3,91485	2.962	CAP05046168	76,8929	3,82111	3.019	UKR1274190	107,611	3,67514	3.076	CAP00201588	142,312	3,55376
2.849	ENA601616	51,2587	3,99723	2.906	UKR1533599	62,1951	3,91324	2.963	PHA199469	78,39	3,81274	3.020	CAP02580517	108,373	3,67208	3.077	OTA69582	142,886	3,55201
2.850	CDI560828	51,3281	3,99664	2.907	CAP01694119	62,4823	3,91124	2.964	CAP03617022	78,6857	3,8111	3.021	ENA754505	108,822	3,67028	3.078	ASI91242	143,308	3,55073
2.851	CBG133141	51,5913	3,99442	2.908	CAP03472616	62,5327	3,91089	2.965	UKR458122	78,9853	3,80945	3.022	CBG46052	109,254	3,66856	3.079	SPE159528	143,469	3,55024
2.852	LIF176162	51,5954	3,99439	2.909	CAP05775973	62,867	3,90858	2.966	UKR872799	79,471	3,80679	3.023	IBS382463	109,905	3,66598	3.080	UKR824239	144,386	3,54747
2.853	ENA899796	51,754	3,99306	2.910	IBS105807	62,9165	3,90824	2.967	CAP03617802	79,6227	3,80596	3.024	CDI596095	110,126	3,66511	3.081	CAP02571544	144,446	3,5473
2.854	LIF35039	51,7959	3,9927	2.911	CAP03459551	63,3257	3,90542	2.968	ASI180737	79,6422	3,80586	3.025	ENA421451	112,194	3,65703	3.082	CAP0006406	145,208	3,54501
2.855	UKR1235533	52,2108	3,98924	2.912	ASI234826	63,3272	3,90541	2.969	ENA371151	79,7908	3,80505	3.026	CBG133460	112,259	3,65678	3.083	OTA69595	145,758	3,54337
2.856	SPE173934	52,3816	3,98782	2.913	CAP00201885	64,0128	3,90073	2.970	UKR695467	79,7914	3,80504	3.027	CAP05987464	112,395	3,65625	3.084	CAP02156078	148,759	3,53452
2.857	CAP00078003	52,6004	3,98601	2.914	CBG204272	64,2216	3,89932	2.971	ASI13805	80,0757	3,8035	3.028	LAB36923	112,78	3,65477	3.085	CDI69355	149,088	3,53556
2.858	CAP01731985	52,714	3,98507	2.915	CBG450720	64,3741	3,89829	2.972	UKR801121	81,5543	3,79555	3.029	CBG47044	112,834	3,65456	3.086	CAP0501614	150,107	3,5306
2.859	OTA62660	52,8416	3,98402	2.916	ENA914305	64,4567	3,89773	2.973	IBS377964	81,7561	3,79448	3.030	CAP01250178	113,409	3,65235	3.087	CDI487729	150,275	3,53011
2.860	UKR399375	52,8608	3,98387	2.917	ENA1274657	64,6684	3,89631	2.974	LIF230303	82,1526	3,79238	3.0							

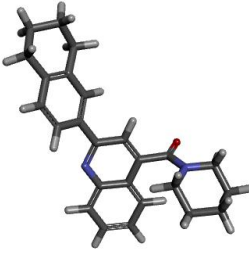
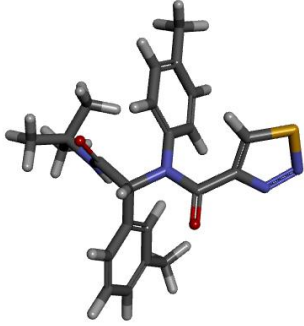
3.094	CAP00333042	155.231	3,51602	3.151	UKR1007181	201,268	3,40323	3.208	CAP03053250	249,155	3,31053	3.265	CAP05911114	315,812	3,20757	3.322	CAP00960343	432,478	3,07104
3.095	ENAI227020	155.591	3,51501	3.152	CDI63249	201,972	3,40171	3.209	UKR1409092	249,313	3,31025	3.266	CAP01657838	319,501	3,20253	3.323	CAP02210323	435,237	3,06827
3.096	CAP05946559	156,079	3,51366	3.153	CAP03138058	202,541	3,40049	3.210	UKR257919	249,403	3,31011	3.267	CAP05905023	319,496	3,20253	3.324	UKR1375617	435,718	3,06779
3.097	UKR1037467	157,123	3,51076	3.154	CAP05919885	202,817	3,39999	3.211	UKR708566	250,237	3,30865	3.268	NET17692	320,077	3,20175	3.325	CAP02810727	436,263	3,06725
3.098	LAB391143	157,738	3,50906	3.155	CAP02220686	203,999	3,39739	3.212	UKR1086124	250,243	3,30864	3.269	CAP05739869	321,548	3,19975	3.326	CBG211238	436,754	3,06676
3.099	ENA506958	157,925	3,50855	3.156	ASII0893	204,058	3,39725	3.213	CAP03455092	250,681	3,30788	3.270	CAP04839256	323,935	3,19654	3.327	ENA599898	443,009	3,06059
3.100	CDI872064	157,973	3,50842	3.157	CAP04954638	205,713	3,39374	3.214	CBG276558	250,795	3,30768	3.271	CBG86670	333,197	3,1843	3.328	CAP04815227	446,677	3,05701
3.101	UKR670812	161,218	3,49959	3.158	IBS93107	205,722	3,39372	3.215	CAP05046172	252,048	3,30552	3.272	VIT180698	335,398	3,18144	3.329	CAP03450030	448,657	3,05509
3.102	CAP03751209	162,259	3,49679	3.159	CAP00478791	205,971	3,39319	3.216	VIT464725	252,56	3,30464	3.273	CBG704368	342,714	3,17207	3.330	CNR8708	448,696	3,05505
3.103	CAP03415399	162,434	3,49632	3.160	TIM293791	206,343	3,39241	3.217	CAP04808180	253,999	3,30217	3.274	CBG662473	343,902	3,17057	3.331	CAP00234794	448,982	3,05477
3.104	CAP03449686	162,756	3,49546	3.161	CAP01890964	207,558	3,38986	3.218	CAP00139075	255,05	3,30037	3.275	CAP03617799	344,76	3,16948	3.332	CAP01992853	449,312	3,05445
3.105	CBG668399	163,376	3,49381	3.162	ENA892457	208,171	3,38858	3.219	CAP04935183	256,114	3,29857	3.276	CAP04841079	345,78	3,1682	3.333	IBS435913	453,566	3,05036
3.106	CAP02222088	163,683	3,493	3.163	CDI325661	208,383	3,38814	3.220	CAP01993505	256,12	3,29856	3.277	LIF55560	347,084	3,16657	3.334	CAP04569647	455,023	3,04897
3.107	CAP00976144	163,873	3,49249	3.164	CAP01637880	208,49	3,38791	3.221	TIM515560	256,855	3,29731	3.278	CAP00260986	347,521	3,16602	3.335	CAP05303729	461,137	3,04317
3.108	CAP00234157	164,469	3,49091	3.165	CBG579931	208,984	3,38689	3.222	CBG464938	258,611	3,29435	3.279	UKR1210006	348,128	3,16526	3.336	CAP03042552	463,709	3,04075
3.109	CNR5927	166,355	3,48596	3.166	CAP00688073	209,115	3,38661	3.223	CDI587130	259,169	3,29342	3.280	CAP01993547	348,283	3,16507	3.337	CAP05899642	463,757	3,04071
3.110	CAP02896368	167,465	3,48308	3.167	CAP05913924	209,557	3,3857	3.224	IBS97379	259,538	3,2928	3.281	OTA183462	349,159	3,16398	3.338	CAP00442194	464,57	3,03995
3.111	CAP03470314	169,112	3,47883	3.168	LIF21388	211,714	3,38125	3.225	CAP00007567	259,551	3,29278	3.282	ENA54095	350,956	3,16175	3.339	CAP03433565	466,152	3,03847
3.112	CAP00263494	169,427	3,47802	3.169	CAP00442223	211,73	3,38122	3.226	CAP01424226	260,294	3,29154	3.283	CAP05931463	352,966	3,15927	3.340	ENAI268372	466,899	3,03778
3.113	CAP03469334	169,715	3,47728	3.170	CBG691996	212,685	3,37926	3.227	CAP05946698	262,199	3,28837	3.284	CBG472049	356,748	3,15464	3.341	CAP00070895	467,917	3,03683
3.114	CAP03440387	170,853	3,47438	3.171	PHA186835	213,276	3,37806	3.228	CAP05987701	264,558	3,28448	3.285	CBG659407	358,561	3,15244	3.342	CBG83213	470,592	3,03436
3.115	ENA666034	171,102	3,47374	3.172	CAP02005450	213,304	3,378	3.229	MAY21667	268,693	3,27774	3.286	CAP00240974	361,659	3,1487	3.343	CAP00260627	470,888	3,03408
3.116	CBG80598	171,241	3,47339	3.173	CAP01657639	216,664	3,37121	3.230	CAP01730352	270,517	3,27481	3.287	CAP04801896	363,402	3,14661	3.344	VIT358006	471,611	3,03342
3.117	CAP00447954	171,705	3,47222	3.174	CAP00233489	217,472	3,3696	3.231	UKR1530937	270,605	3,27466	3.288	CAP00581692	366,13	3,14336	3.345	CAP00265799	474,061	3,03117
3.118	CAP02217368	172,142	3,47111	3.175	CBG463452	218,217	3,36811	3.232	CAP05036068	270,937	3,27413	3.289	CAP00315978	367,466	3,14178	3.346	CAP02215094	474,975	3,03033
3.119	UKR1412263	172,162	3,47106	3.176	CAP05042163	221,233	3,36215	3.233	CAP03616760	271,236	3,27365	3.290	CAP00687548	367,736	3,14146	3.347	CAP05940216	477,11	3,02838
3.120	ENAI095732	172,723	3,46965	3.177	LIF186868	224,262	3,35624	3.234	ASI271806	271,379	3,27342	3.291	CAP05875721	367,932	3,14123	3.348	LIF164591	482,511	3,02349
3.121	OTA93806	172,842	3,46935	3.178	ENAI285645	225,352	3,35414	3.235	CAP01845872	271,729	3,27286	3.292	CAP05044941	368,257	3,14085	3.349	CDI516987	483,315	3,02277
3.122	CAP05988254	175,083	3,46376	3.179	UKR1481191	225,397	3,35405	3.236	CAP00239182	271,945	3,27252	3.293	IBS304574	370,553	3,13815	3.350	CAP00011130	483,755	3,02237
3.123	CDI688079	177,915	3,45679	3.180	CAP04834838	226,156	3,35259	3.237	VIT126324	272,58	3,27151	3.294	CAP04803341	370,732	3,13794	3.351	CAP00255774	486,982	3,01949
3.124	CAP02811395	177,956	3,45669	3.181	CAP00058160	226,33	3,35226	3.238	CNR12354	272,8	3,27116	3.295	CBG85579	371,706	3,1368	3.352	CAP03153908	489,045	3,01765
3.125	CNR21976	179,578	3,45275	3.182	UKR809663	226,621	3,3517	3.239	CBG530886	273,721	3,26969	3.296	CAP04955322	372,886	3,13542	3.353	CAP01847876	490,473	3,01638
3.126	CAP01654586	180,039	3,45163	3.183	ENA249792	226,843	3,35128	3.240	ENAI170195	274,824	3,26795	3.297	NET32053	379,624	3,12765	3.354	ENAI061432	491,087	3,01584
3.127	CAP01287792	181,02	3,44927	3.184	CAP03503849	227,914	3,34923	3.241	UKR1052927	278,524	3,26214	3.298	CAP00074887	381,821	3,12514	3.355	CAP00008869	492,145	3,01491
3.128	CBG260695	181,079	3,44913	3.185	ENA301442	228,64	3,34785	3.242	CAP02133788	283,162	3,25496	3.299	CAP05041997	385,656	3,1208	3.356	CAP03615159	496,634	3,01096
3.129	CBG700825	181,431	3,44829	3.186	NET8761	230,071	3,34514	3.243	CAP03501423	285,286	3,25172	3.300	CAP03439318	386,036	3,12037	3.357	UKR457864	502,247	3,00608
3.130	LIF208870	181,606	3,44787	3.187	CAP03419354	231,423	3,34259	3.244	SPE182259	286,331	3,25013	3.301	CAP00201762	386,983	3,11931	3.358	CAP03391701	506,452	3,00246
3.131	CAP00218122	184,844	3,44019	3.188	CAP01844958	232,225	3,34109	3.245	LIF167164	287,219	3,24879	3.302	CDI675642	389,133	3,1169	3.359	ENA1066045	508,672	3,00056
3.132	UKR1243832	184,872	3,44013	3.189	ENAI41569	233,479	3,33875	3.246	UKR332092	288,468	3,2469	3.303	ENA423447	392,97	3,11264	3.360	CAP03036549	509,699	2,99969
3.133	CAP00494403	185,28	3,43917	3.190	SPE7459	233,909	3,33795	3.247	ENAI912723	288,505	3,24685	3.304	CBG82529	392,991	3,11262	3.361	CAP00641803	524,566	2,9872
3.134	CBG514261	185,398	3,4389	3.191	UKR1376814	234,034	3,33772	3.248	SPE151668	292,681	3,24061	3.305	UKR615629	394,57	3,11088	3.362	CAP00289712	525,368	2,98654
3.135	CAP03470315	187,232	3,43462	3.192	CAP03456744	234,314	3,3372	3.249	ENA607549	293,583	3,23927	3.306	CBG557700	397,834	3,1073	3.363	ENAI166829	525,957	2,98605
3.136	CAP03037898	187,592	3,43378	3.193	ENA612967	234,668	3,33655	3.250	CAP00157733	294,677	3,23765	3.307	CAP05895621	400,104	3,10483	3.364	CAP04955719	528,398	2,98404
3.137	IBS311676	188,142	3,43251	3.194	CAP00001779	235,268	3,33544	3.251	CAP00313088	295,026	3,23714	3.308	IBS53737	404,194	3,10041	3.365	CAP03745810	531,2	2,98174
3.138	CBG685034	188,205	3,43237	3.195	CAP01337890	236,707	3,33279	3.252	ENA668865	296,92	3,23436	3.309	CBG57861	407,673	3,09669	3.366	IBS234092	532,181	2,98094
3.139	CAP02573652	188,98	3,43058	3.196	CAP03436250	237,429	3,33147	3.253	CAP03043148	298,776	3,23165	3.310	CAP05946239	408,062	3,09627	3.367	ASI58599	533,225	2,98009
3.140	ENA259832	189,222	3,43003	3.197	CAP00075805	238,34	3,3298	3.254	UKR540127	302,227	3,22667	3.311	CAP05924022	408,717	3,09558	3.368	CBG637720	536,271	2,97769
3.141	CBG323321	190,225	3,42773	3.198	CDI826067	240,536	3,32582	3.255	CAP03445099	303,716	3,22453	3.312	CDI675552	408,899	3,09538	3.369	CBG171669	537,746	2,97642
3.142	CAP01847301	190,304	3,42755	3.199	CAP00075739	240,543	3,32581	3.256	CAP00186367	305,621	3,22182	3.313	ENA64034	412,211	3,09188	3.370	CAP00242518	539,195	2,97525
3.143	CAP03174733	190,782	3,42644	3.200	ENA394304	241,311	3,32442	3.257	CDI57442	306,494	3,22058	3.314	VIT121585	412,49	3,09159	3.371	CAP01995917	546,38	2,9695
3.144	CAP00079652	192,812	3,42187	3.201	CAP05863712	244,349	3,31899	3.258	CAP00009879	306,773	3,22018	3.315	CAP05987426	414,272	3,08971	3.372	CBG613991	552,67	2,96453
3.145	CBG642217	197,682	3,41103	3.202	CAP00694182	244,413													

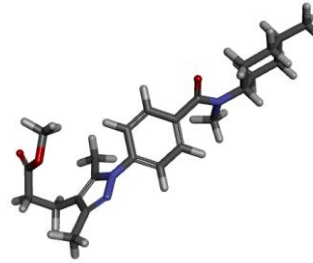
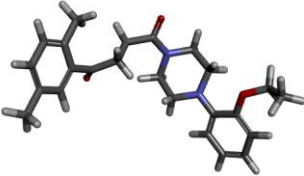
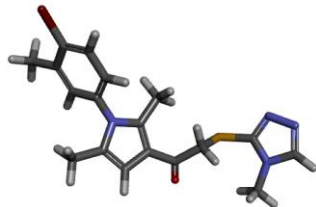
3.379	CAP00244134	566.362	2,95391	3.436	CAP00442545	794,783	2,80675	3.493	CAP00265642	1,091,38	2,66903	3.550	CAP01379519	1,521,89	2,52462	3.607	ENA1214987	2,543,33	2,3016
3.380	CAP00315833	568.798	2,95204	3.437	CAP03618268	796,807	2,80565	3.494	CAP01891676	1,106,28	2,66314	3.551	ENA955417	1,529,46	2,52246	3.608	CAP00183575	2,601,03	2,29185
3.381	CAP01438804	573,362	2,94857	3.438	ENA659781	806,533	2,80038	3.495	ENA804913	1,109,62	2,66183	3.552	CAP03004379	1,548,98	2,51695	3.609	OTA35038	2,620,95	2,28854
3.382	ENA1088625	575,648	2,94684	3.439	CAP00177517	806,568	2,80036	3.496	CAP01657741	1,117,17	2,65888	3.553	CAP02828420	1,563,54	2,51289	3.610	CAP05047044	2,628,08	2,28736
3.383	CAP05987524	577,305	2,94559	3.440	VIT106333	808,803	2,79916	3.497	CAP00443126	1,128,6	2,65446	3.554	IBS395163	1,585,04	2,50696	3.611	CAP04954412	2,647,75	2,28412
3.384	CAP03471199	578,924	2,94438	3.441	CAP05048126	809,078	2,79901	3.498	CAP02828806	1,146,53	2,64762	3.555	LIF174293	1,596,54	2,50382	3.612	UKR1434273	2,707,79	2,27439
3.385	LAB45219	579,259	2,94413	3.442	CAP03754626	813,172	2,79682	3.499	ENA290111	1,163,28	2,64131	3.556	ENA464542	1,616,36	2,49846	3.613	CAP00442082	2,729,62	2,2709
3.386	ENA1162134	580,251	2,94338	3.443	CAP05988085	813,411	2,79669	3.500	CAP04934937	1,166,76	2,64002	3.557	CAP03618578	1,631,79	2,49434	3.614	CAP01657780	2,732,63	2,27042
3.387	CAP00429824	589,59	2,93645	3.444	CAP02809461	826,748	2,78963	3.501	CAP03439519	1,193,78	2,63007	3.558	IBS6234	1,651,14	2,48922	3.615	CAP05038586	2,735,92	2,2699
3.388	CAP02224912	592,684	2,93418	3.445	CAP03617349	830,775	2,78752	3.502	IBS438017	1,202,75	2,62683	3.559	CBG278195	1,662,89	2,48614	3.616	UKR779592	2,737,81	2,2696
3.389	CAP01694426	595,811	2,93189	3.446	CAP03747289	831,143	2,78732	3.503	CAP05041129	1,202,93	2,62676	3.560	ENA1209343	1,666,59	2,48517	3.617	UKR1274280	2,851,57	2,25192
3.390	ENA1007992	603,184	2,92655	3.447	CAP05987980	834,251	2,7857	3.504	CAP00007130	1,203,06	2,62671	3.561	LIF311557	1,666,83	2,48511	3.618	CAP05940423	2,874,02	2,24851
3.391	CAP02909197	605,452	2,92492	3.448	CAP05038729	835,394	2,78511	3.505	ASI194361	1,228,27	2,61771	3.562	CAP03053595	1,681,06	2,48142	3.619	CBG165386	2,920,9	2,24148
3.392	CAP00272972	605,708	2,92474	3.449	TIM63877	854,113	2,77548	3.506	ENA1201320	1,230,59	2,61689	3.563	ENA1160605	1,707,39	2,47467	3.620	TIM510786	2,940,45	2,23859
3.393	CAP05006933	610,518	2,9213	3.450	CAP02003736	856,641	2,7742	3.507	CAP03504176	1,231,8	2,61646	3.564	CAP03439555	1,709,18	2,47421	3.621	CAP02566516	2,940,49	2,23858
3.394	CAP05926466	620,938	2,91395	3.451	CAP03153938	857,9	2,77356	3.508	CAP02824189	1,232,59	2,61618	3.565	CBG290848	1,720,58	2,47133	3.622	SPE6844	2,951,23	2,237
3.395	CAP00202190	625,938	2,91047	3.452	CAP00235884	880,056	2,76249	3.509	CAP03749112	1,234,51	2,61551	3.566	CAP03747047	1,785,2	2,45531	3.623	CAP02580215	2,954,62	2,2365
3.396	CAP04956129	629,913	2,90772	3.453	ENA187588	883,458	2,76081	3.510	UKR791264	1,238,86	2,61398	3.567	CAP00263461	1,786,12	2,45509	3.624	CDI894842	2,975,79	2,2334
3.397	CAP02828532	630,059	2,90762	3.454	CAP03393838	887,149	2,759	3.511	ENA1196868	1,243,81	2,61225	3.568	CDI850979	1,815,24	2,44807	3.625	CAP04797986	2,997,44	2,23025
3.398	CDI492643	651,313	2,89321	3.455	CAP03457626	890,311	2,75746	3.512	CAP00580864	1,244,84	2,61189	3.569	VIT124954	1,876,38	2,43368	3.626	LIF168783	3,006,97	2,22887
3.399	CDI313469	651,91	2,89281	3.456	CAP01847153	899,372	2,75306	3.513	CAP00688008	1,246,04	2,61147	3.570	CAP03462947	1,879,91	2,43286	3.627	CAP03466945	3,028,22	2,22581
3.400	CAP00444046	653,337	2,89186	3.457	CAP02219686	899,921	2,7528	3.514	UKR1292950	1,255,56	2,60816	3.571	CAP03617166	1,913,79	2,4251	3.628	CBG308598	3,033,12	2,22511
3.401	CBG195692	655,131	2,89067	3.458	CAP00005321	914,759	2,74569	3.515	CAP00768455	1,257,12	2,60762	3.572	CAP03043922	1,939,34	2,41935	3.629	ENA1157942	3,034,64	2,22489
3.402	UKR1392956	656,298	2,8899	3.459	CAP03440634	917,654	2,74432	3.516	CAP02211406	1,264,75	2,605	3.573	LIF163495	1,964,3	2,41379	3.630	CAP02135157	3,046,75	2,22316
3.403	CAP01425954	663,729	2,88501	3.460	CAP05937369	920,499	2,74298	3.517	CBG166583	1,275,48	2,60132	3.574	CAP03175320	1,972,68	2,41194	3.631	IBS126075	3,077	2,21887
3.404	CAP05046506	664,913	2,88423	3.461	LIF46835	922,322	2,74212	3.518	ASI163108	1,281,23	2,59937	3.575	CDI76033	1,975,34	2,41136	3.632	CAP03618232	3,078,41	2,21867
3.405	CAP05924142	665,891	2,8836	3.462	ENA599718	924,994	2,74086	3.519	CBG678575	1,283,05	2,59876	3.576	IBS443521	1,988,36	2,4085	3.633	CAP03617447	3,084,77	2,21778
3.406	CBG497641	668,604	2,88183	3.463	CAP01848477	926,091	2,74035	3.520	CAP00049657	1,289,92	2,59644	3.577	CAP03436702	2,016,55	2,40239	3.634	CAP05937862	3,108,33	2,21447
3.407	CBG202115	671,55	2,87992	3.464	CAP02810528	937,25	2,73514	3.521	CAP05036769	1,298,45	2,59358	3.578	ENA505119	2,024,09	2,40077	3.635	CAP03391455	3,113,07	2,21381
3.408	CAP03754300	674,875	2,87778	3.465	UKR1436403	939,119	2,73428	3.522	ENA312829	1,314,78	2,58815	3.579	CAP05905110	2,027,35	2,40007	3.636	CAP0491199	3,144,93	2,20939
3.409	CAP00236412	675,17	2,87759	3.466	CAP01334851	952,787	2,7328	3.523	CBG656749	1,316,36	2,58723	3.580	CAP03460938	2,027,69	2,4	3.637	LAB106326	3,157,73	2,20762
3.410	ENA229718	686,624	2,87028	3.467	CBG162190	955,087	2,72696	3.524	CNR11077	1,319,35	2,58664	3.581	ENA455223	2,064,76	2,39213	3.638	CAP03617370	3,190,24	2,20318
3.411	CAP04934779	689,74	2,86831	3.468	CAP05946032	959,046	2,72516	3.525	ASI205735	1,321,02	2,58609	3.582	CAP00005433	2,065,16	2,39205	3.639	CAP03748718	3,270,29	2,19241
3.412	ENA541339	691,708	2,86708	3.469	ENA325934	967,938	2,72115	3.526	LIF196665	1,345,63	2,57807	3.583	CAP00000514	2,069,59	2,39112	3.640	CAP04847540	3,275,1	2,19177
3.413	UKR605328	692,168	2,86679	3.470	CAP03176830	972,295	2,7192	3.527	ASI190001	1,349,03	2,57698	3.584	CDI123083	2,073,81	2,39023	3.641	CAP02226119	3,311,62	2,18696
3.414	CDI427045	695,336	2,86481	3.471	SPE172813	977,242	2,717	3.528	TIM470453	1,353,15	2,57565	3.585	CDI671245	2,102,99	2,38416	3.642	PEK6165	3,390,99	2,17667
3.415	CAP04792811	698,635	2,86275	3.472	CBG86316	983,849	2,71407	3.529	CAP05902392	1,359,29	2,57369	3.586	CAP05988239	2,111,05	2,3825	3.643	CAP02818895	3,409,24	2,17434
3.416	CAP00233345	705,411	2,85856	3.473	CAP02211112	990,038	2,71135	3.530	CAP04819125	1,368,36	2,5708	3.587	CAP05939856	2,173,37	2,36987	3.644	CAP03575058	3,412,55	2,17392
3.417	CAP05929435	706,145	2,85811	3.474	OTA46116	998,922	2,70747	3.531	CAP00202004	1,369,58	2,57041	3.588	CAP05042937	2,193,84	2,36579	3.645	CAP00263720	3,498,41	2,16313
3.418	CAP04824219	713,215	2,85378	3.475	CAP03749788	999,27	2,70732	3.532	UKR1380920	1,376,27	2,5683	3.589	CAP03575471	2,244,18	2,35594	3.646	CAP03437195	3,516,64	2,16087
3.419	CAP04830495	713,321	2,85371	3.476	CAP01482215	1,008,64	2,70326	3.533	CAP03883741	1,376,65	2,56818	3.590	LIF01910946	2,249	2,35501	3.647	CAP00531586	3,528,06	2,15946
3.420	CBG24095	728,114	2,84448	3.477	CBG650075	1,010,76	2,70235	3.534	CDI732918	1,382,55	2,56632	3.591	LIF93396	2,257,92	2,35329	3.648	CBG113889	3,566,22	2,15479
3.421	CAP04793044	735,221	2,84058	3.478	ENA848883	1,024,44	2,69651	3.535	CAP00231771	1,385,2	2,56549	3.592	CBG516143	2,274,28	2,35016	3.649	ASI161796	3,624,77	2,14772
3.422	CAP03453847	736,923	2,83958	3.479	CBG172124	1,025,36	2,69613	3.536	VIT415733	1,401,83	2,56031	3.593	OTA1228	2,282,35	2,34862	3.650	CAP03616677	3,624,74	2,14772
3.423	CAP01994913	737,799	2,83906	3.480	CAP03006055	1,031,76	2,69342	3.537	ASI298174	1,406,86	2,55875	3.594	CAP03616330	2,299,76	2,34532	3.651	SPE138420	3,655,1	2,1441
3.424	CBG16779	742,853	2,8361	3.481	CBG16540	1,033,71	2,6926	3.538	IBS440647	1,425,09	2,55316	3.595	CAP05898115	2,308,45	2,34368	3.652	CAP05038231	3,657,87	2,14377
3.425	CAP00430244	755,009	2,82905	3.482	CAP04954699	1,039,52	2,69017	3.539	CAP00188001	1,431,37	2,55125	3.596	CAP00192209	2,324,99	2,34058	3.653	CDI582069	3,659,31	2,1436
3.426	LIF196671	757,576	2,82757	3.483	UKR1377134	1,043,11	2,68867	3.540	CAP03038536	1,433,99	2,55045	3.597	CAP00446955	2,326,09	2,34037	3.654	CAP05987951	3,734,68	2,13475
3.427	CAP01863908	768,678	2,82126	3.484	CDI196216	1,049,82	2,68589	3.541	CAP05038699	1,434,43	2,55032	3.598	CAP05924689	2,352,77	2,33542	3.655	MAY9734	3,793,74	2,12793
3.428	CAP00013192	774,817	2,8178	3.485	CAP02216655	1,054,35	2,68401	3.542	CAP03545578	1,465,03	2,54115	3.599	CAP01847386	2,371,54	2,33197	3.656	CBG705750	3,805,53	2,12658
3.429	IBS456953	777,512	2,81629	3.486	CAP02563337	1,062,74	2,68057	3.543	ASI70001	1,479,24	2,53696	3.600	CAP0						

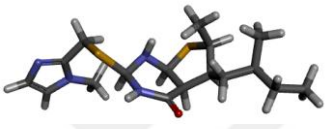
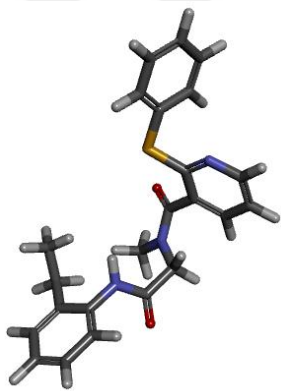
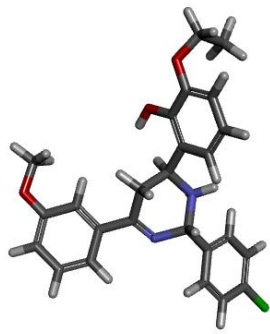
3.664	CDI714938	4.182,29	2,08559	3.721	CAP03135376	7.601,22	1,82612	3.778	OTA16851	15.905,9	1,50544	3.835	CBG177526	47.420,9	1,03103	3.892	CBG679710	147.468	0,538301
3.665	CBG579003	4.265,73	2,07701	3.722	CAP03044619	7.618,44	1,82513	3.779	CAP04454522	15.998,5	1,50292	3.836	CAP05862870	47.476,6	1,03052	3.893	ASI249262	150.392	0,529775
3.666	CAP04111414	4.378,88	2,06564	3.723	CNR20238	8.160	1,79531	3.780	CAP01952977	16.085,6	1,50056	3.837	ENA982149	49.828,6	1,00952	3.894	CAP04934829	151.979	0,525215
3.667	CAP01847825	4.398,74	2,06367	3.724	OTA79460	8.181,54	1,79416	3.781	CAP00235686	16.525,9	1,48884	3.838	CAP02885429	49.966,8	1,00832	3.895	CAP03455658	154.941	0,516834
3.668	CAP05037923	4.448,33	2,05888	3.725	CAP01968068	8.242,94	1,79092	3.782	CAP03545666	16.591	1,48713	3.839	CAP05922490	50.481,3	1,00387	3.896	CAP03457943	156.739	0,511824
3.669	CAP03455533	4.449,07	2,05873	3.726	CAP00174071	8.444,41	1,78043	3.783	CDI8336	16.914	1,47875	3.840	ENA1286336	50.803,6	1,00111	3.897	CAP02579169	160.820	0,500659
3.670	ASI47381	4.522,33	2,05164	3.727	CAP00190256	8.591,54	1,77293	3.784	CAP05905109	17.902,8	1,45408	3.841	CAP02225219	52.048,2	0,990594	3.898	CAP05945252	161.040	0,500067
3.671	CAP00486618	4.535,91	2,05034	3.728	CAP04069665	8.611	1,77195	3.785	CBG410762	18.413	1,44188	3.842	CAP03504258	52.341,5	0,988154	3.899	CAP03614925	164.746	0,490184
3.672	ENA245097	4.606,5	2,04363	3.729	CBG197415	8.617,65	1,77161	3.786	CAP01423373	18.807,7	1,43266	3.843	ENA611572	52.551	0,986419	3.900	CAP01564915	170.912	0,474227
3.673	CAP02828749	4.630,16	2,0414	3.730	UKR1078790	8.657,52	1,76961	3.787	CAP03754497	19.889,8	1,40837	3.844	CDI387797	52.815	0,984242	3.901	CAP00210236	175.919	0,461687
3.674	CAP01338353	4.798,17	2,02592	3.731	ENA936026	8.681,82	1,76839	3.788	CAP02809295	20.974,9	1,3853	3.845	CAP05873481	52.821,5	0,98419	3.902	CAP01328903	180.856	0,449667
3.675	ENA747477	4.837,95	2,02234	3.732	CAP03053032	8.721,38	1,76641	3.789	IBS413356	21.682,4	1,37089	3.846	CBG683677	52.878,7	0,983719	3.903	CAP05906423	182.022	0,446875
3.676	CAP00236962	4.909,91	2,01593	3.733	CAP03553195	8.781,12	1,76345	3.790	CAP04934980	22.413,4	1,35649	3.847	CAP00205432	55.835,6	0,960089	3.904	CDI441308	191.500	0,424831
3.677	CAP03545354	4.945,19	2,01282	3.734	OTA23946	8.825,64	1,76125	3.791	CAP00298680	22.572,8	1,35342	3.848	CAP05939391	58.587,5	0,939195	3.905	CAP01620912	201.022	0,403757
3.678	CAP00242473	4.971,13	2,01054	3.735	CAP05926013	8.861,55	1,75949	3.792	LIF208264	22.835	1,3484	3.849	CAP01848576	58.590,9	0,93917	3.906	CDI569826	202.226	0,401164
3.679	SPE4426	4.996,87	2,0083	3.736	CAP02579072	8.864,64	1,75934	3.793	CAP03418099	24.481,8	1,31816	3.850	ENA693861	60.186,1	0,927504	3.907	CAP02579241	202.616	0,400326
3.680	CAP03440225	5.060,18	2,00283	3.737	CAP05940872	8.912,1	1,75702	3.794	ENA406822	24.867,5	1,31137	3.851	CAP00480213	60.735,5	0,923558	3.908	CAP03439024	203.012	0,399479
3.681	CAP05946443	5.080,97	2,00105	3.738	ENA1210133	8.996,27	1,75294	3.795	CAP00266334	25.222,8	1,30521	3.852	ENA328575	61.127,7	0,920762	3.909	CAP00450663	209.875	0,385039
3.682	CAP04564985	5.084,91	2,00072	3.739	CAP00000600	9.023,26	1,75164	3.796	ENA936293	25.264,2	1,30449	3.853	CAP03472208	61.186,7	0,920343	3.910	CAP00738954	217.399	0,369743
3.683	CAP02189364	5.138,78	1,99614	3.740	CAP03747366	9.046,01	1,75054	3.797	ASI28750	25.357,6	1,30289	3.854	CAP00258427	62.064,7	0,914155	3.911	CDI453733	219.390	0,365784
3.684	CAP05941101	5.141,74	1,99589	3.741	CBG362617	9.375,57	1,735	3.798	CAP01846833	25.387,3	1,30238	3.855	CAP03459756	62.586,4	0,91052	3.912	CAP05741169	228.019	0,349029
3.685	CAP05860017	5.205,08	1,99057	3.742	UKR923191	9.435,22	1,73225	3.799	ENA913134	25.639,4	1,29809	3.856	CAP04823020	63.042,6	0,907366	3.913	CAP05892265	231.283	0,342857
3.686	ENA697390	5.227,19	1,98873	3.743	CAP05909601	9.634,82	1,72316	3.800	CAP05893329	25.918,1	1,2934	3.857	CAP05046471	63.654,4	0,903172	3.914	VIT949399	233.509	0,338695
3.687	SPE94950	5.232,12	1,98832	3.744	CAP03750265	9.709,77	1,71979	3.801	VIT964773	26.103,9	1,29029	3.858	CAP05006738	63.861,3	0,901762	3.915	CAP05945424	235.367	0,335255
3.688	CAP043039715	5.266,33	1,98549	3.745	CAP00634383	10.193	1,6987	3.802	CAP00233995	26.401,9	1,28536	3.859	CAP03615280	65.529	0,890567	3.916	ENA572206	245.170	0,317534
3.689	OTA48679	5.291,43	1,98343	3.746	CAP05883604	10.234,8	1,69692	3.803	CAP02828380	27.041,5	1,27497	3.860	CAP00234062	66.447,3	0,884523	3.917	LAB48699	248.007	0,312535
3.690	CAP05045570	5.293,01	1,9833	3.747	IBS317492	10.410,7	1,68952	3.804	CBG613307	27.574,3	1,2665	3.861	CAP04810650	67.647,3	0,876749	3.918	CAP03460963	254.743	0,300898
3.691	UKR1301778	5.412,72	1,97358	3.748	CAP00173460	10.686,6	1,67816	3.805	CAP05863582	28.057,3	1,25895	3.862	CNR11968	68.298,5	0,872589	3.919	CAP03430799	280.377	0,259258
3.692	CAP04807791	5.470,74	1,96895	3.749	CAP03751030	10.762,2	1,6751	3.806	IBS281700	28.413,7	1,25347	3.863	CAP00316632	68.352	0,872249	3.920	CAP03437316	310.835	0,214471
3.693	CDI1131999	5.472,58	1,96881	3.750	IBS13237	10.771,4	1,67473	3.807	CBG582396	29.743,6	1,23361	3.864	SPE191934	68.511	0,87124	3.921	CBG254982	328.958	0,189859
3.694	CAP05941616	5.474,24	1,96868	3.751	CAP04793003	11.007,1	1,66533	3.808	CAP04799096	30.254,8	1,22621	3.865	IBS391325	69.970,1	0,862087	3.922	ENA262825	339.018	0,176778
3.695	CAP03061209	5.631,57	1,95637	3.752	ENA753819	11.043,9	1,66388	3.809	CAP05862561	31.183,5	1,21307	3.866	CDI87858	71.052,6	0,85542	3.923	CAP00161456	380.679	0,126441
3.696	CAP01959017	5.637,97	1,95588	3.753	CAP03575217	11.546,8	1,64454	3.810	CAP02573304	31.839,7	1,20403	3.867	CAP03574299	71.320,5	0,853786	3.924	TIM5595	414.832	0,0891277
3.697	CAP01847393	5.659,69	1,95421	3.754	CAP02826827	11.703,4	1,63869	3.811	CAP02580216	32.263	1,1983	3.868	CAP04935042	72.718,4	0,845356	3.925	CAP00250935	416.059	0,0878446
3.698	CAP05739324	5.664,49	1,95384	3.755	CBG148090	11.893,1	1,6317	3.812	CAP03053121	32.643,5	1,1932	3.869	CAP00201877	73.223,8	0,842348	3.926	CAP01847079	431.025	0,0724973
3.699	CAP01678491	5.671,07	1,95333	3.756	LIF179271	11.899,4	1,63147	3.813	CAP03501576	32.913,7	1,18962	3.870	CAP05729728	75.398,3	0,829639	3.927	CAP02053106	434.402	0,0691083
3.700	CBG27312	5.722,47	1,94942	3.757	ENA455692	11.936,2	1,63013	3.814	CAP03502598	33.464,8	1,18241	3.871	CAP03618271	77.106,2	0,819911	3.928	CBG199700	443.397	0,0602074
3.701	CAP05918648	5.725,02	1,94922	3.758	CAP05940378	12.288,5	1,6175	3.815	CAP00188102	33.797,7	1,17811	3.872	CAP05851862	78.644,7	0,811331	3.929	CAP01845517	481.096	0,0247686
3.702	CAP03457300	5.842,03	1,94044	3.759	ENA760265	12.565,2	1,60783	3.816	CAP04816519	33.924,5	1,17649	3.873	UKR1225321	79.876,2	0,804583	3.930	CAP05934656	496.207	0,0113372
3.703	CAP05040389	5.850,86	1,93978	3.760	ENA925250	12.574,5	1,60751	3.817	CAP00440904	34.287,3	1,17187	3.874	CAP01130038	86.566,8	0,769649				
3.704	CDI600641	5.926,06	1,93423	3.761	ENA1229743	12.652,1	1,60484	3.818	CAP04829331	34.470,5	1,16955	3.875	CBG110486	87.992	0,762557				
3.705	MAY40691	6.122,9	1,92004	3.762	CBG540817	13.105	1,58956	3.819	UKR923160	34.601,1	1,16791	3.876	IBS340328	89.178,3	0,756741				
3.706	ENA287416	6.194,11	1,91502	3.763	CAP05918199	13.294	1,58334	3.820	CAP03468529	34.963,2	1,16339	3.877	CAP00274347	89.992,7	0,752793				
3.707	ANC19332	6.228,21	1,91264	3.764	CAP01680314	13.677,9	1,57098	3.821	CAP00180452	36.547,4	1,14414	3.878	ENA669485	92.613,2	0,740327				
3.708	CDI630790	6.300,4	1,90763	3.765	CAP00011409	13.818,9	1,56653	3.822	CAP00715575	36.707	1,14225	3.879	CAP03445813	93.447,4	0,736433				
3.709	CDI850350	6.367,64	1,90302	3.766	CAP00073634	13.970,8	1,56178	3.823	NET20383	37.185,3	1,13663	3.880	CAP00196552	94.266	0,732645				
3.710	CAP02223487	6.404,95	1,90048	3.767	CAP03750223	13.973,9	1,56168	3.824	CAP01823726	40.278,3	1,10193	3.881	CDI723285	94.281,6	0,732573				
3.711	ENA812513	6.442,26	1,89796	3.768	CAP02004670	14.486,3	1,54604	3.825	CAP01331546	40.355,7	1,10109	3.882	OTA134469	94.994,9	0,7293				
3.712	CAP01232407	6.479,98	1,89543	3.769	CAP02810770	14.668,8	1,5406	3.826	CAP00726240	40.906	1,09521	3.883	CAP00236221	96.001,5	0,724722				
3.713	ENA488591	6.489,6	1,89478	3.770	CAP03615577	14.696	1,5398	3.827	CAP00444315	41.488,3	1,08907	3.884	CAP01994843	99.964,1	0,707156				
3.714	CBG87975	6.520,46	1,89272	3.771	CAP05009440	14.769,3	1,53764	3.828	ENA508615	42.102,7	1,08269	3.885	CAP00257853	100.648	0,704194				
3.715	CAP04845790	7.159,82	1,8521	3.772	CAP02213621	14.810,3	1,53644	3.829	ENA1172478	43.115,4	1,07237	3.886	CAP03462300	112.269	0,65674				

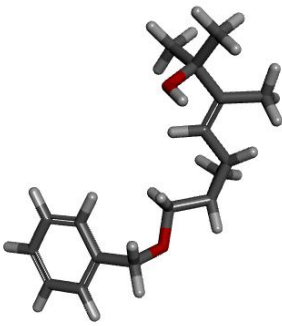
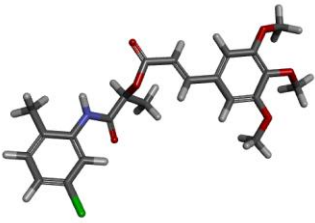
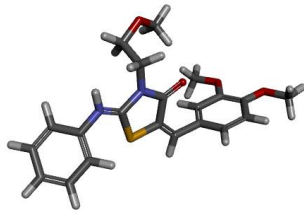
EK-2

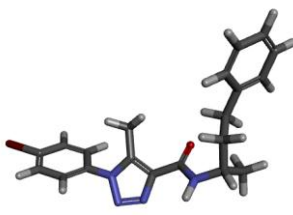
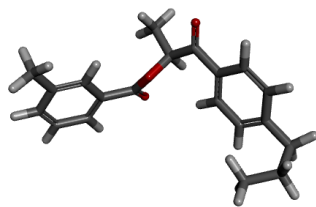
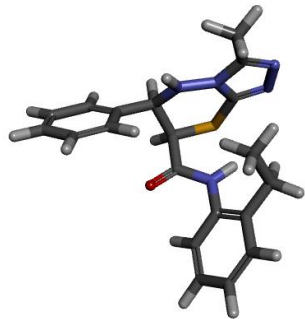
	Bileşik	3D Yapısı
1	ENA833169	
2	CDI132241	
3	ENA623984	

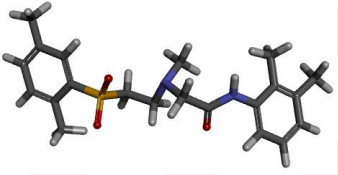
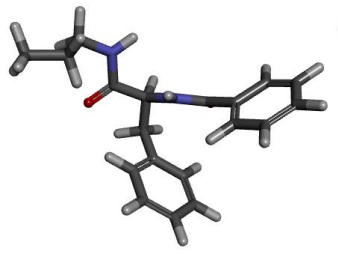
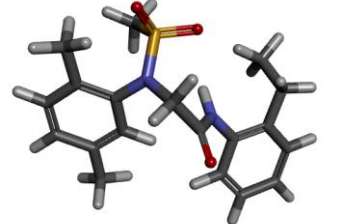
4	CBG599807	
5	ASI290064	

6	ENA881608	
7	ENA373903	
8	UKR263840	

9	UKR1353805	
10	UKR403334	
11	CDI811327	

12	CNR13756	
13	UKR961802	
14	TIM405938	

15	VIT923177	
16	ENA99104	
17	CDI339313	

18	ENA462173	
19	CNR22181	
20	ASI108386	

EK-3

	Mod	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	-CDOCKER Enerjisi (kcal/mol)	-CDOCKER Etkileşim Enerjisi (kcal/mol)
Donepezil	2	-25,9367	18,7042	53,1795
Fizostigmin	5	-17,1355	7,51695	39,9244
Huprineks	6	-18,6734	-7,33011	34,049
BDBM50117612	2	-34,1957	36,9766	56,5379
CHEMBL93936	2	-34,8692	32,4285	56,0543
CHEMBL131827	2	-27,9418	45,7384	59,3591
ikopezil	1	-24,6936	14,0706	50,3825
BDBM50028685	2	-22,5628	40,2029	45,9322
BDBM50032164	2	-26,2122	30,8256	51,6839
CHEMBL486698	6	-18,2117	15,4917	29,3167
CHEMBL263322	2	-23,1654	13,6593	40,4797
BDBM50032163	2	-26,0909	13,7097	51,5065
BDBM50094630	3	-27,0204	-10,0133	39,0267

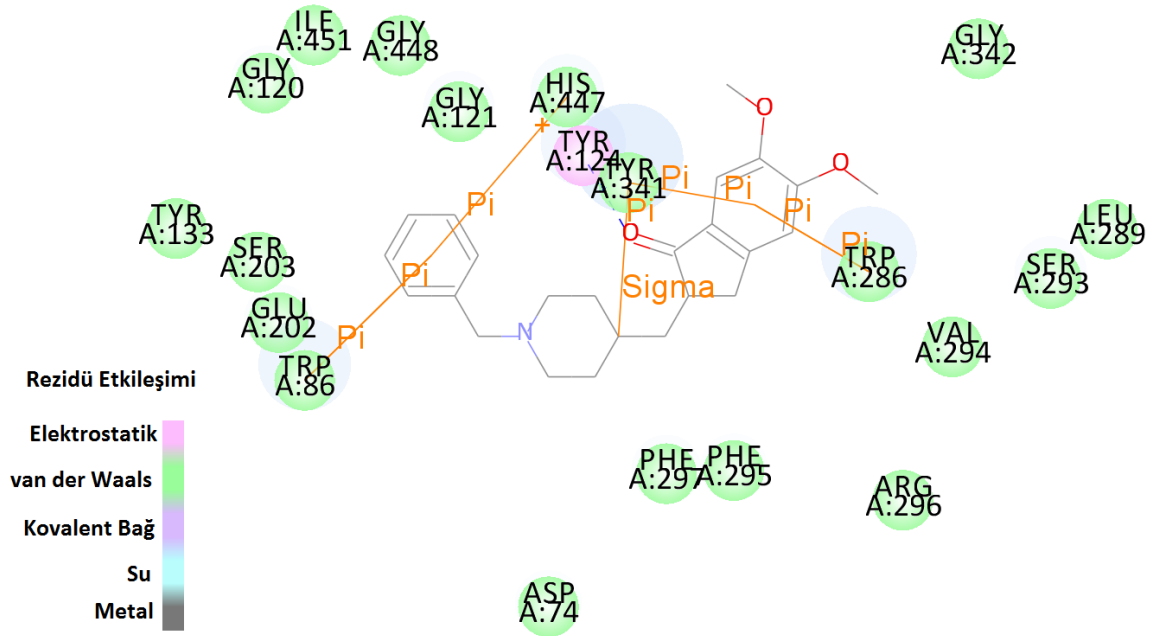
EK-4

	Mod	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Doking Skoru
BDBM3175	6	-24,4516	56,491
BDBM50150698	2	-8,87536	47,306
BDBM50293152	2	-25,3205	61,878
BDBM50267461	1	-16,8475	63,269
BDBM50267607	3	-33,8869	59,574
BDBM50293155	2	-21,1341	61,847
BDBM50293153	3	-21,8826	59,793
BDBM50267802	1	-19,1126	52,2
BDBM50267760	2	-29,2557	57,936
BDBM50267801	3	-29,9127	55,742
BDBM50312998	3	-17,5039	53,953
BDBM50312996	2	-22,9089	56,43
BDBM50337557	2	-18,2973	58,892
BDBM8359	4	-17,231	60,372
BDBM31587	3	-20,4722	66,211
BDBM31588	3	-15,0663	58,709

BDBM251576	1	-18,4082	59,779
BDBM251573	4	-17,231	60,372
BDBM251572	2	-16,4056	61,96
BDBM8686	2	-34,0697	57,433

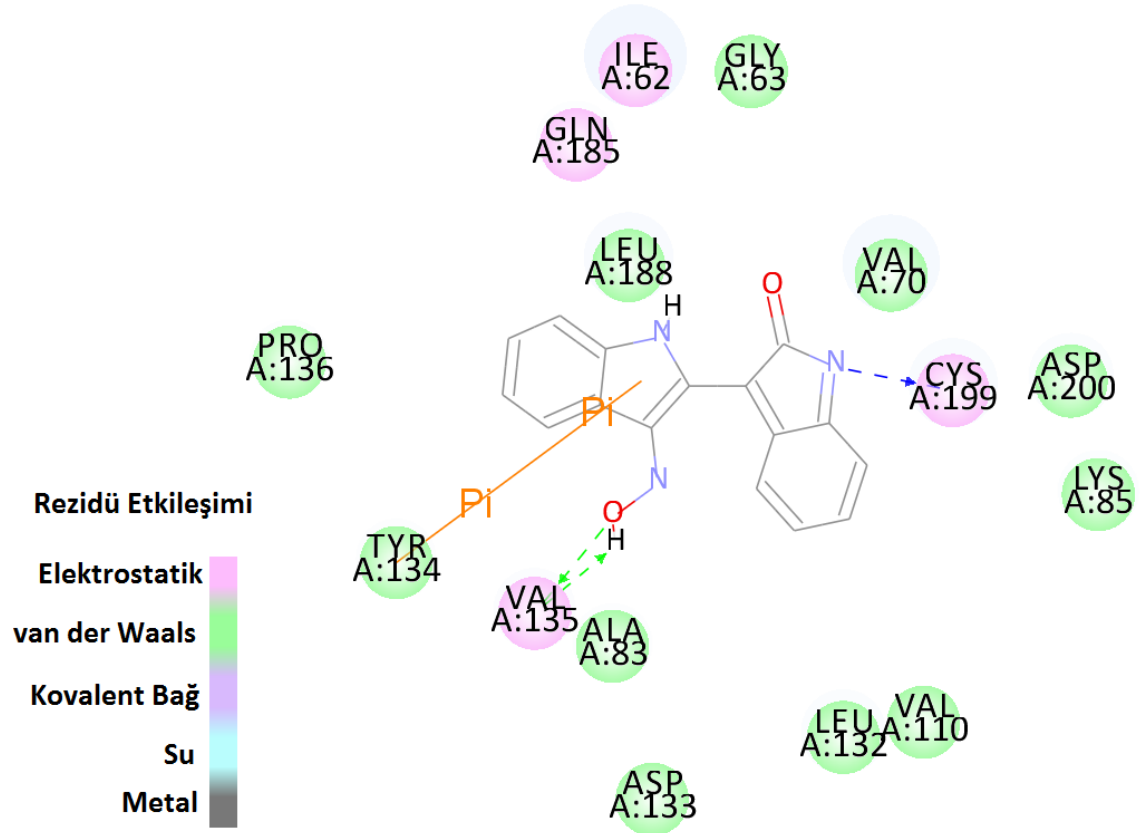
EK-5

4EY7 aktif yöresindeki Donepezil



EK-6

1Q41 aktif yoresindeki Indirubin



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gözde Yalçın

Doğum Yeri: Konya

Doğum Tarihi: 31.10.1988

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Konya Meram Anadolu Lisesi (2002-2006)

Lisans: Ege Üniversitesi-Mühendislik Fakültesi-Biyomühendislik Bölümü (2007-2011)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2011-2013)

Yayınlar ve Bildiriler

Gozde Yalcin, Serdar Burmaoglu, Ilkay Yildiz, Oztekin Algul: *Molecular docking studies on fluoro-substituted chalcones as potential DprE1 enzyme inhibitors*. Journal of Molecular Structure 07/2018;, DOI:10.1016/j.molstruc.2018.02.087

Turkan Toka Ozer, Alper Karagoz, **Gozde Yalcin**, Cenk A. Andac: *Determination of Antibiotic Resistance and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles for the Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Escherichia coli*. Jundishapur Journal of Microbiology 02/2018; In Press(In Press)., DOI:10.5812/jjm.57878

V.V. Aswathy, Sabiha Alper-Hayta, **Gözde Yalcin**, Y. Sheena Mary, C. Yohannan Panicker, P.J. Jojo, Fatma Kaynak-Onurdag, Stevan Armarković, Sanja J. Armarković, Ilkay Yildiz, C. Van Alsenoy: *Modification of benzoxazole derivative by bromine-spectroscopic,*

antibacterial and reactivity study using experimental and theoretical procedures.

DOI:10.1016/j.molstruc.2017.04.010

Selin Seda Timur, **Gözde Yalçın**, Özge Çevik, Cenk Andaç, R. Neslihan Gürsoy: *Molecular dynamics, thermodynamic, and mutational binding studies for tumor-specific LyP-1 in complex with p32.* Journal of biomolecular Structure & Dynamics 04/2017; 36(5):1-11., DOI:10.1080/07391102.2017.1313779

Vidya V. Menon, Egemen Foto, Y. Sheena Mary, Esin Karatas, C. Yohannan Panicker, **Gözde Yalcin**, Stevan Armaković, Sanja J. Armaković, C. Van Alsenoy, Ilkay Yildiz: *Vibrational spectroscopic analysis, molecular dynamics simulations and molecular docking study of 5-nitro-2-phenoxyethyl benzimidazole.* Journal of Molecular Structure 02/2017; 1129:86-97., DOI:10.1016/j.molstruc.2016.09.059

Alper Karagöz, Mahmut Sunnetcioglu, Mehmet Resat Ceylan, Yasemin Bayram, **Gozde Yalcin**, Nadir Kocak, Burak Suvak, Cenk A Andac: *Characterisation of drug resistance of nosocomial ESBL-producing E. Coli isolates obtained from a Turkish university hospital between 2009 and 2012 by pulsed field gel electrophoresis and antibiotic resistance tests.* Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive 03/2016; 24(1):24-31.

Muhammad Aasim, Khalid Mahmood Khawar, **Gozde Yalcin**, Allah Bakhsh: *Current Trends In Fenugreek Biotechnology And Approaches Towards Its Improvement.* American Journal of Social Issues and Humanities, 128–136.

Bildiriler

Posterler

Yalcin, G., Yildiz, I. (2018). Pharmacophore Generation Studies for the Discovery of Potential Glycogen Synthase Kinase 3 β Enzyme Inhibitors. In *The 43rd FEBS Congress*. Prague.

Yalçın Gözde, Yildiz Ilkay (2017). Protoberberine Alkoloids As A Drug Candidate For Alzheimer's Diseases. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017)

Yalçın Gözde, Yildiz Ilkay (2017). Molecular modelling studies on Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors for Alzheimer's Diseases. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS- 2017)

Yalçın Gözde, Yildiz Ilkay (2017). Pharmacophore Generation Studies for the Discovery of Potential BACE1 Enzyme Inhibitors. 3rd International Turkic World Conference on Chemical Sciences Technologies

Karataş Esin, Foto Egemen, Yalçın Gözde, Zülifdar Fatma, Ertan Bolelli Tuğba, Yildiz Lkay (2017). New Nitro-Benzoxazoles as Antitumor Agents Targeting hTopo II. 17th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry: Designing targeted and safer drugs

Gözde Yalçın, İlkey Yıldız: P-03.03.2-004 Molecular binding profile of protoberberine alkoloids on amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) as a drug candidate for Alzheimer's diseases. 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life; FEBS Journal. 2016. p. 1–6.

Yalçın G, Göbek A, Anıl DA, Burmaoğlu S, Algül Ö, Yıldız İ. PP-51 Molecular Docking Studies on Some Chalcone Derivatives as Possible Decaprenylphosphoryl-D-ribose oxidase (DprE1) Enzyme Inhibitors. 4th BAU Drug Des. Abstr. B. 2016. p. 155–6.

Gözde Yalçın, Cenk A. Andaç: LB-016 Inverse-agonistic mechanisms of thioridazine on Gi protein-coupled D2L dopamine receptors. 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life, Berlin, Germany; FEBS Journal. 2015. p. 1–2.

Yalçın G, Ataei S, Yıldız İ. PP – 84 Pharmacophore Generation Studies For The Discovery Of Potential Acetylcholinesterase. 3 th Int. BAU-DRUG Des. Symp. Nov. Methods Emerg. Targets Drug ABSTRACT B. 2015. p. 213–4.

Yalçın G, Andac CA. PP 51.Determination Of Binding Properties Of Butaclamol In Complex With A Membrane-Bound Human Gi-Coupled D2L Dopamine Receptor. 8th Eurasian Meet. Heterocycl. Chem. 2014. p. 239.

Yalçın G, Andac CA. P – 58 Investigation of Agonistic and Inverse-agonistic Effects on D2 Subtype Dopamine Receptors. 2 nd Int. BAU-DRUG Des. Symp. Nov. Methods Emerg. Targets Drug ABSTRACT B. 2014. p. 132.

Sözlü Sunumlar

YALCIN, G., ERSAN, R. H., ALGUL, O., & YILDIZ, I. (2018). DprE1-Benzimidazole Derivatives Interactions using Molecular Modelling. In Ramazan ALTUNDAŞ (Ed.), 6th Drug Chemistry Congress. Antalya. Retrieved from <http://ilackongresi.org/>

YALCIN, G., & YILDIZ, I. (2018). Computational Studies for Drug Design on Beta-secretase 1 Inhibition. In R. ALTUNDAŞ (Ed.), 6th Drug Chemistry Congress. Antalya. Retrieved from <http://ilackongresi.org/>

Yalcin, G., & Yildiz, I. (2018). Molecular Binding Profile of Protoberberine Alkaloids on Glycogen Synthase Kinase 3 β as a Drug Candidate for Alzheimer's Diseases. In M.

Karatas (Ed.), International Molecular Biology and Biotechnology Congress. Konya.
Retrieved from <http://www.molbiotech.gen.tr/>

Yalcin, G., & Yildiz, I. (2017). Molecular Docking Studies on Some Benzimidazole Derivatives as Possible Decaprenylphosphoryl-D-ribose oxidase Enzyme Inhibitors. In Ramazan ALTUNDAŞ (Ed.), 5th Drug Design Congress. Antalya.

Yalcin G, Andac CA. OP-3 Effect of spiperone binding on a membrane-bound human Gi-coupled D2L dopamine receptor. The 3rd International Conference of Organic Chemistry. 2014. p. 44.

Yalçın G, Andac CA. OP – 3 Homology Modelling and Explicit Solvent Molecular Dynamics of Stimulated Human Gi-coupled D2 Dopamine Receptor in a Membrane System. 2 nd Int. BAU- DRUG Des. Symp. Nov. Methods Emerg. Targets Drug ABSTRACT B. 2014. p. 44.

Yalçın G, Andac CA. ALA-SCAN mutational analysis on the agonist binding state of human Gi-coupled D2L dopamine receptor complex. Workshop and Summer School on Protein Structure, Function, and Dynamics, Antalya, TURKEY, 2014.

damaged nucleotide recognition and catalytic complex formation. To gain a deeper insight into the kinetic mechanism the structural model of the enzyme complex with DNA was created by molecular dynamics approach. Because no structure of human SMUG1 is available, we used the high sequence homology among hSMUG1 and xSMUG1 from *X. laevis* (PDB IDs 1OE4 and 1OE5) to obtain a structure of wild type hSMUG1 and its F98W and H239A mutant forms by homology modelling. To obtain model of hSMUG1–DNA complex the set of complexes of structurally homologous uracil–DNA glycosylases with DNA were analyzed. The structure of the hSMUG1–DNA complex was modeled using structural alignment of hSMUG1 with human thymine–DNA glycosylase TDG bound to DNA (PDB ID 5T2W) as it is the nearest homologue with available enzyme–DNA complex structure. The model structure of hSMUG1–DNA complex revealed new details of the mechanism of specific site recognition and allowed to understand more deeply the functional role of some active site amino acids in the key steps of DNA–substrate binding and catalysis. The work was funded by Russian Science Foundation grant 16-14-10038.

P.22-002-Tue
In silico assessment of cardiovascular adverse effects of drug-drug interactions

S. Ivanov, M. Semin, A. Lagunin, D. Filimonov, V. Poroikov
Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia

Adverse drug effects (ADEs) are one of the leading causes of death in developed countries and the main reason for drug recalls from the market. The ADEs associated with action on the cardiovascular system are the most dangerous and widespread. Treatment of human diseases often requires the intake of several drugs, which can lead to drug-drug interactions (DDIs) causing an increase in the frequency and severity of adverse effects. Evaluation of ADEs, as well as the effect of DDIs on their manifestation, is a non-trivial task and requires numerous experimental and clinical studies. To solve this problem, we developed a computational approach to assess the cardiovascular effects of DDIs. This approach includes: (I) creation of training sets including pairs of drugs showing synergistic and antagonistic effects on cardiovascular ADEs based on the analysis of FDA spontaneous reports; (II) prediction of interaction of individual drugs with human proteins and influence on expression of human genes based on structure-activity relationships; (III) identification of correlations between drug action on proteins and genes with appearance of ADEs, and calculation of interaction scores for each pair of drugs for each cardiovascular ADE; (IV) validation of developed approach based on the cross-validation procedure; (V) assessment of possible molecular mechanisms of synergy and antagonism based on pathway analysis of selected proteins and genes. The developed approach allows predicting the following effects of DDIs: myocardial infarction, ischemic stroke, ventricular tachyarrhythmia, cardiac failure and arterial hypertension. Validation of the approach showed its acceptable accuracy for the studied effects. For each ADE we identified possible mechanism of synergy and antagonism at the level of genes, proteins and signaling pathways. The study was supported by Russian Science Foundation grant 17-75-10168.

P.22-003-Wed
Pharmacophore generation studies for the discovery of potential glycogen synthase kinase 3 β enzyme inhibitors

G. Yalcin¹, I. Yildiz²
¹Ankara University Biotechnology Institute, Ankara, Turkey,
²Ankara University Faculty of Pharmacy, Ankara, Turkey

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) is a member of Ser/Thr protein kinase family. There are two GSK3 isoforms (GSK-3 α and GSK-3 β) in mammals that show 98% sequence identity within their kinase domain. Both GSK3 isoforms are highly expressed in the nervous system including brain and spinal cord. GSK3 has a critical role for regulation of neuronal functions, including neurotransmission, neurite out-growth, growth-cone dynamics, cytoskeletal dynamics, synaptic plasticity, endocytosis, apoptosis, and neurogenesis. Because of this the activity of this receptor has been linked with several human diseases as diabetes, cancer and Alzheimer's Diseases (AD). In the recent researches GSK-3 β activity is especially found linked to increased levels of A β production and A β deposits, tau hyperphosphorylation, and synaptic damage in AD patients. In this study, we have aimed to develop a novel pharmacophore model for discovering new lead GSK-3 β enzyme inhibitors. For this purpose, all 3D structures of GSK-3 β was taken from RSCB Protein Databank. Homology modeling was implemented for missing residues in first step. Molecular docking studies were applied for the choosing of best 3D structure for pharmacophore modeling studies. Discovery Studio 3.5 Client and AutoDock Vina v1.5.6 were used for this second step. Structure-Based Pharmacophore Modeling and 3D QSAR Pharmacophore Modeling were applied for improving of hypothesis and discovering of new lead GSK-3 β enzyme inhibitors by using Discovery Studio 3.5 Client. In our preliminary studies, 3D structures with PDB ID: 4PTE, 1O9U, 5K5N, 5HLP, 4ACC, 3GB2, 3F7Z, 1Q4I were found appropriate for the further studies and twenty molecules were chosen with their IC₅₀ values from the Zinc and BindingDB databases.

P.22-004-Mon
Computational approach to HIV resistance prediction to reverse transcriptase and protease inhibitors

O. Tarasova, I. Mayorov, D. Filimonov, V. Poroikov
V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

The problem of resistance to nucleoside-, non-nucleoside HIV reverse transcriptase (RT) inhibitors (NRTIs and NNRTIs) and protease inhibitors (PRIs) is important because these classes of drugs are included in most of highly active antiretroviral therapy (HAART) schemes. The aim of our study is the development of the computational approach to predict the resistance of the particular variant of HIV to NRTIs, NNRTIs and PRs using available data on relationships between the particular mutations in pol gene of HIV and the resistance of RT variant to NRTIs, NNRTIs and PRs. Our computational approach is based on PASS algorithm, which was earlier proposed to apply for prediction of HIV resistance. We propose to use the (1) descriptors as a set of pentapeptides of the amino acid sequence of reverse transcriptase and protease and (2) combined descriptors involving the pentapeptide and a chemical descriptor of a antiretroviral drug. We used over 3000 RT amino acid sequences and over 3400 PR sequences of HIV variants from HIV Drug Resistance Database to build models aiming at predicting the genotype-phenotype relationships providing the interpretation of the HIV variants



MOLECULAR BINDING PROFILE OF PROTOBERBERINE ALKALOIDS ON GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3 β AS a DRUG CANDIDATE FOR ALZHEIMER'S DISEASES

ALZHEİMER HASTALIĞINDA İLAÇ ADAYI OLARAK PROTOBERBERİN
ALKALOİTLERİNİN GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ 3 β İLE MOLEKÜLER BAĞLANMA
PROFİLLERİ

Gozde YALCIN^{1,*}, Ilkay YILDIZ²

¹Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara 06560 Turkey

²Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara
06560 Turkey

ABSTRACT

Objective: Protoberberine alkaloids such as berberine, palmatine, jatrorrhizine, columbamine, magnoflorine were found to prevent a progressive neurodegenerative disorder as experimentally, the mechanisms of them are not absolutely clear. In this study, we have aimed to elucidate the binding and affect mechanism of these alkaloids on the GSK-3 β .

Material and Method: Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) is a serine/threonine kinase which has essential roles in Alzheimer's Diseases (AD) processes. AD shows neuropathological markers as tau hyperphosphorylation and accumulation of amyloid β (A β) proteins. A β proteins are generated from sequential cleavages of amyloid precursor protein (APP). Recent studies show that inhibition of GSK-3 β causes to decrease in the cleavage of APP. Thus the accumulation of A β was prevented by this process. Due to the therapeutic benefit of the inhibition of GSK-3 β it has been a favoured target for scientists. Alkaloids are secondary metabolites which are produced by a large variety of organisms as plants with diverse structures. To explain the binding and the effect mechanism of GSK-3 β , molecular docking studies were applied on these natural products by using CDocker module of Discovery Studio 3.5 Client. Binding mechanism was identified by Hydrogen, π bindings between ligands and GSK-3 β .

Result and Discussion: It has established that some protoberberine alkaloids with attractive properties about inhibition of GSK-3 β . The molecules exhibited <-7.0 kcal/mol binding affinity values. Best docked results

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Gozde Yalcin
e-mail: gozdeyalcin@ankara.edu.tr

Submitted/Gönderilme: 23.07.2018 Accepted/Kabul: 10.10.2018

were detected with magnoflorine. In contrast with the other protoberberine alkaloids, magnoflorine has a compact structure. It could be more effective on binding affinity to receptor due to this reason.

Keywords: alzheimer's disease; glycogen synthase kinase 3 β ; molecular docking; protoberberine alkaloid

ÖZ

Amaç: Berberin, palmatin, yatrorrizin, kolumbamin, magnoflorin gibi protoberberin alkaloidlerin nörodejeneratif hastalıklardan koruduğu deneysel olarak tespit edilmiş olmasına rağmen; buna yol açan mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada, bu alkaloidlerin GSK-3 β ile bağlanma ve etki mekanizmalarını açığa kavuşturmak hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Glikojen Sentaz Kinaz 3 β (GSK-3 β) Alzheimer Hastalığına (AD) ait süreçlerde vazgeçilmez öneme sahip bir serin/treonin kinazdır. Alzheimer Hastalığı tau hiperfosforilasyonu ve amiloid β (A β) proteinlerin birikimi gibi nöropatolojik belirteçler göstermektedir. A β proteinleri Amiloid Öncül Protein (APP)'nin sekansal kesimi ile meydana gelmektedir. Son dönemlerdeki çalışmalar GSK-3 β inhibisyonunun APP kesiminde gerilemeye yol açtığını ortaya koymuştur. Böylece A β birikimi bu proses ile önlenmektedir. GSK-3 β inhibisyonunun terapötik önemi nedeniyle Bilim insanları için önemli bir hedef haline gelmiştir. Alkaloidler çeşitli yapıdaki büküler gibi pek çok organizma tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Alkaloidlerin GSK-3 β ile bağlanma ve etki mekanizmalarını açığa kavuşturmak amacıyla; bu doğal ürünlerle, Discovery Studio 3.5 Client programına ait CDOCKER modülü kullanılarak moleküler doking çalışmaları yürütülmüştür. GSK-3 β ile ligandlar arasındaki bağlanma mekanizması Hidrojen ve π bağları vasıtasıyla tespit edilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Dikkat çekici özellikleriyle bazı protoberberin alkaloidlerinin GSK-3 β inhibisyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Moleküller -7.0 kcal/mol'den küçük bir bağlanma afinitesi göstermiştir. En iyi doking sonuçları magnoflorinden elde edilmiştir. Diğer protoberberin alkaloidlerinin aksine magnoflorin daha kompakt bir yapıya sahiptir. Bu özelliğinin reseptöre bağlanma kapasitesinin artırılmasında etkili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: alzheimer hastalığı; glikojen sentaz kinaz 3 β ; moleküler doking; protoberberin alkaloidleri

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible, progressive neurodegenerative disease that causes memory lose and decreasing of cognitive skills. In most people with Alzheimer's, symptoms first appear in their mid-60s. Alzheimer's disease is currently ranked as the third leading cause of death for older people in the United States, just behind heart disease and cancer [1].

AD is very complex and just one drug is not being enough to treatment of disease. Current approaches mainly focus on increasing of mental function, managing of behavioral symptoms, and slow down certain problems, such as memory loss. It is getting importance to understand the underlying reasons of disease and developing new multi-target drug molecules.

AD has been caused by the troubles which evolve in several mechanisms and shows itself with some neuropathological markers as neurofibrillary tangles with tau hyperphosphorylation and accumulation of amyloid β (A β) proteins (Figure 1)[2].

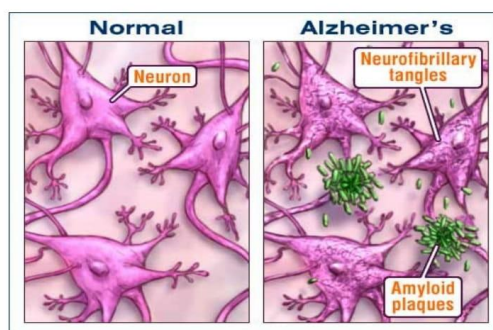


Figure 1. Neuropathological markers of AD [2]

Sequential proteolysis of amyloid precursor protein (APP) causes generation of A β proteins. APP is a transmembrane protein which is highly expressed in brain tissues and concentrated in the synapses of neurons. An α -secretase, β -secretase, and the intramembranous γ -secretase complex perform a sequential process to APP (Figure 2) [3].

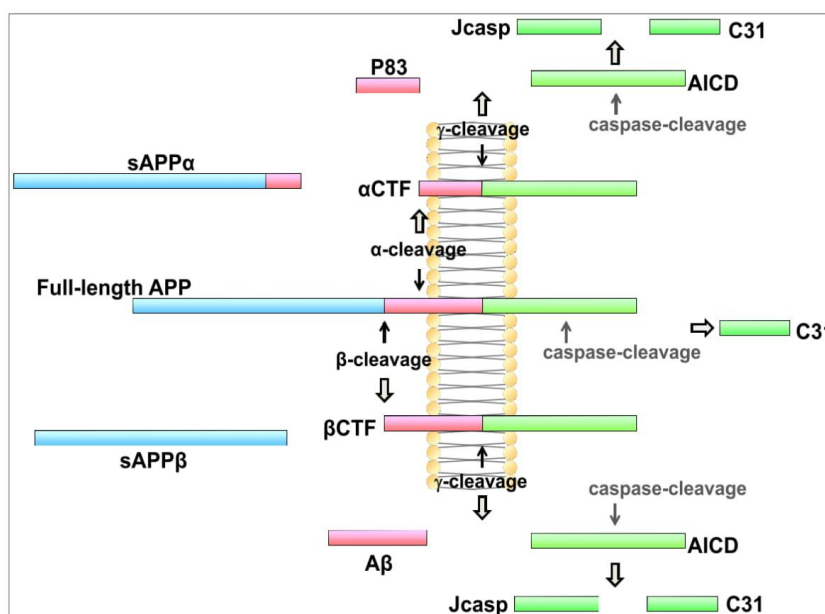


Figure 2. Generation of A β proteins by processing of APP [3]

β -secretase 1 (BACE1) is the key enzyme in the β -cleavage of APP protein (Figure 2). Inhibition of BACE1 prevents the generation of A β proteins. Glycogen Synthase Kinase 3 β is a proline-directed serin/threonine protein kinase which mediates glycogen metabolism. Ly et al. examined the effects of **GSK-3 β** -specific inhibition on AD neuropathology and found specific inhibition of **GSK-3 β** reduced BACE1-mediated cleavage of APP [4]. In the recent studies BACE1 inhibitor design was scrapped, due to the constraints of the active site [5]. As a result of this, drug design on **GSK-3 β** inhibition gain importance as a drug target.

The protoberberine alkaloids found in the Berberidaceae and Ranunculaceae families. Berberidaceae family which contains 18 genera of flowering plants commonly called the barberry family [6]. The protoberberine alkaloids found the several species such as *Berberis vulgaris* L., *B. aristata* DC., *B. crataegina* DC., *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt., *Hydrastis canadensis* L., *Xanthorhiza simplicissima*, Marshall *Phellodendron amurense* Rupr., *Coptis chinensis* Franch., *Tinospora cordifolia* (Thunb.) Miers, *Argemone mexicana* L. and *Eschscholzia californica* Cham. [7-10]. The species include trees, shrubs and perennial herbaceous plants. There are four *Berberis sp.* in Turkey. *B. crataegina* DC. and its hybrids are widespread and the fruits are often used as food [11].

The protoberberine alkaloids include a tetracyclic ring system, and they are derived from benzylisoquinolines through phenolic oxidation and coupling with the isoquinoline N-methyl group, which becomes the “berberine bridge” carbon [12]. The most commonly found protoberberines are: berberine, palmatine, jatrorrhizine, columbamine, magnoflorine. It was observed that protoberberine alkaloids show very important biological activities on different specific organic systems. Activities such as analgesic, anticonvulsant, anti-amnesic, narcotic, antiarrhythmic, antihemorrhagic, hypotensive, anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, antidiarrhetic, antiulcer [12]. In recent studies Protoberberine alkaloids were found to prevent a progressive neurodegenerative disorder as experimentally however the effect mechanism wasn't explained clearly [13].

In this study, we have aimed to elucidate the binding and affect mechanism of these alkaloids on the **GSK-3 β** . For this purpose, molecular docking studies were applied for these natural products by using CDocker [14] module of Discovery Studio 3.5 Client [15]. Binding mechanism was identified by Hydrogen, π interactions between ligands and **GSK-3 β** .

MATERIAL AND METHOD

The atomic coordinates of **GSK-3 β** from human have been deposited in the Protein Data Bank (www.rcsb.org; PDB accession no. 1H8F [16]) (Figure 3). **GSK-3 β** was co-crystallized with an inhibitor of receptor, EPE, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazine Ethanesulfonic Acid molecule. Binding pocket of **GSK-3 β** was defined with key residues like PHE67, PHE93, ARG96, ARG180, ASP200, ASN213, VAL214, TYR 216, LYS205 [16].

Receptor crystallized in dimer form (Figure 3A). Receptor was used in dimer form for docking protocol owing to binding pocket is in the outer surface of subunits (chain A or B) (Figure 3B-D). All the other heteroatom's except water molecules in active site (i.e., nonreceptor atoms such as redundant water molecules, ions, co-crystallized ligand, etc.,) were also removed (Figure 3E). For the preparation of receptor to docking hydrogens were added and their positions were optimized using the all atom CHARMM force field and Adopted Basis set Newton Raphson (ABNR) method available in Discovery Studio 3.5 Client [15] (Figure 3E). The binding sphere was selected around the inhibitor EPE using the binding site tools.

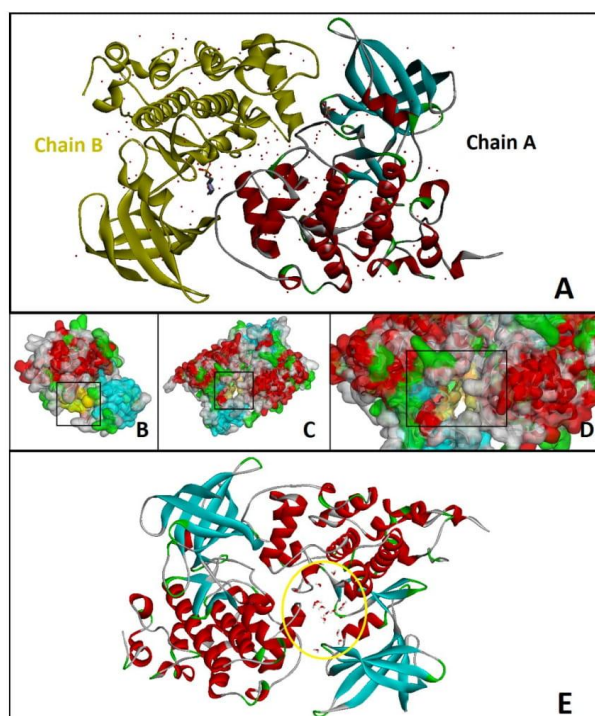


Figure 3. 3D structure of GSK-3 β . A) Whole structure with all heteroatoms. B) Active site in Chain A. Yellow labeled surface in black square show interested area. C-D) Active site (binding pocket) between two subunits. E) Form of GSK-3 β prepared to docking

All protoberberine alkaloids (Figure 4) were sketched; CHARMM forcefield parameterization was assigned to all atoms, and then minimized using the ABNR method. Molecular dynamics (MD) approach was used for conformational searches. The ligand was heated to a temperature of 700K and then annealed to 200K.

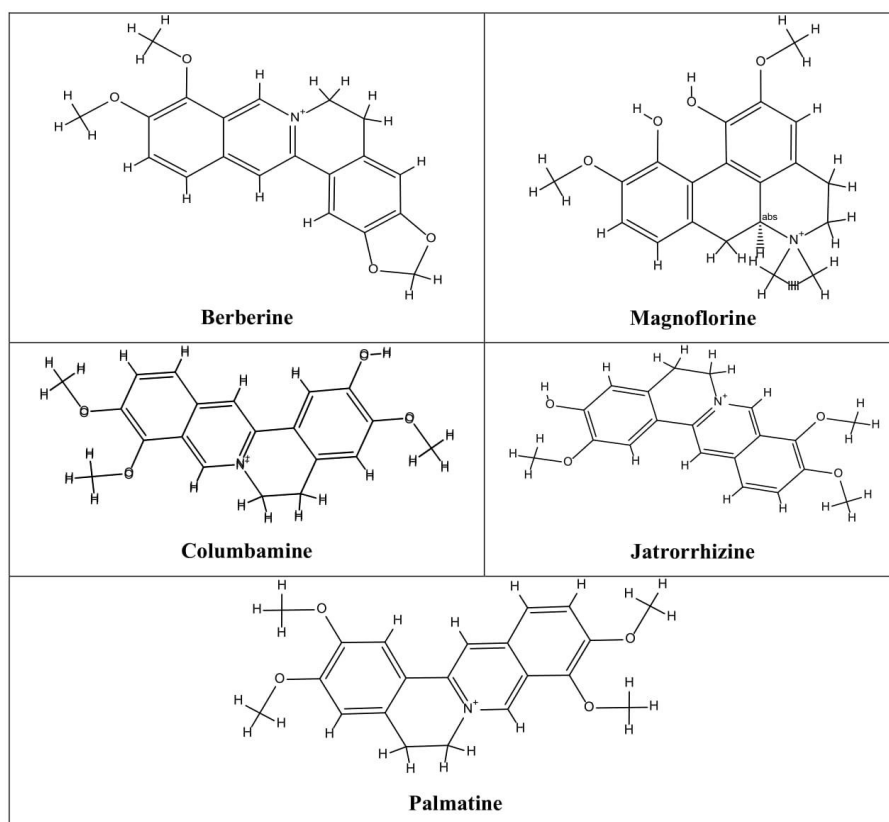


Figure 4. 2D structures of protoberberine alkaloids

CDOCKER [14] method was performed by using Discovery Studio 3.5 Client (DSC). EPE was firstly docked and RMSD values were calculated on the purpose of fixing a docking protocol and binding site.

RESULT AND DISCUSSION

EPE, known inhibitor of **GSK-3 β** , was firstly examined for the comparison between the inhibitor and protoberberine alkaloids by DSC. Docking sphere was chosen as 24,967, 15,929, 25,595 (X, Y, Z coordinates respectively) and 6,66201 radius value. CDOCKER, CHARMM based molecular docking method, was used as docking protocol. Also in situ ligand minimization was implemented by ABNR algorithm. Binding values of conformations were calculated with Generalized Born using Molecular Volume (GBMV), implicit solvent, model. RMSD values of EPE were given in Table 1.

Table 1. RMSD values EPE

Binding Mode	RMSD (Å)
1	0.0000
2	7.2757
3	7.2757
4	2.2958
5	2.8834
6	5.9871
7	1.4587
8	1.4588
9	1.4588
10	1.4588

The predicted conformation of docking result was same with crystal structure in reliable RMSD values (~3Å). Superposition of crystallized form and docking result of EPE was shown in Figure 5.

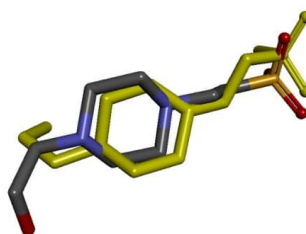


Figure 5. Superposition of crystallized form and docking result of EPE (RMSD value=1.4587 Å). Crystallized form was shown in yellow color.

EPE's docking profile in binding pocket was found similar with literature [16] (Figure 6).

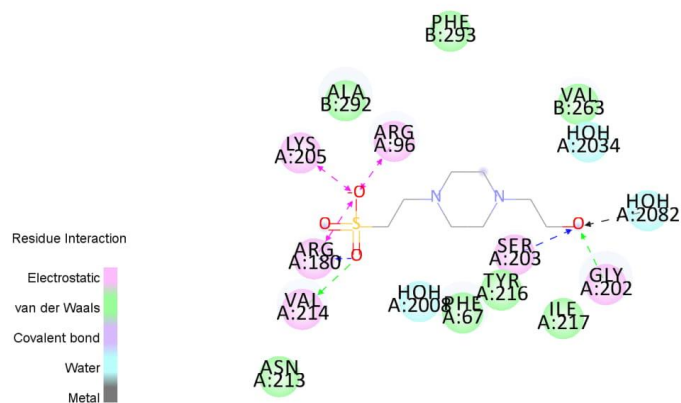


Figure 6. EPE's binding properties. Green, Blue and Pink discrete lines show hydrogen bonds.

Protoberberine alkaloids were also docked by the same protocol with same sphere attributes. CDOCKER results were given for each ligand in Table 2.

Table 2. Binding properties of protoberberine alkaloids

Compound	Binding mode	Binding Energy	-CDOCKER Interaction Energy
Berberine	5	-7,43364	26,4198
Magnoflorine	1	-18,2533	34,2943
Columbamine	7	-11,988	31,9855
Jatrorrhizine	1	-12,1812	31,8892
Palmatine	1	-10,6678	30,9308
EPE	9	-6,94096	33,3915

Magnoflorine was found most effective compound with its highest binding affinity and -CDOCKER Interaction Energy. Interaction between residues and magnoflorine was shown in Figure 7-9.

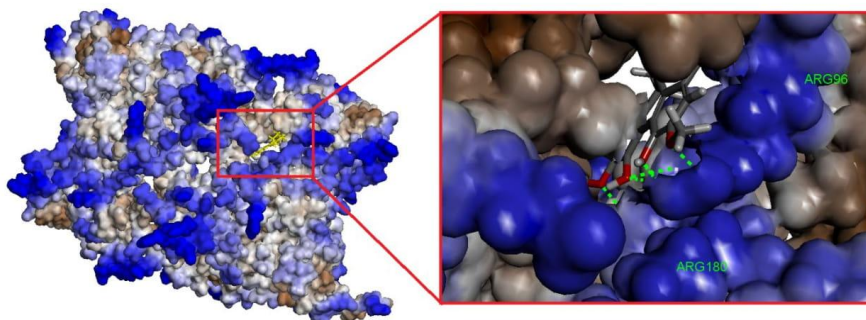


Figure 7. Molecular surface of **GSK-3 β** with magnoflorine. Hydrophobic structure of the binding pocket. Blue residues show especially hydrophilic residues. Interaction profile between ligand and residues were shown in red square. Green discrete lines show hydrogen bonds (with ARG96, ARG180).

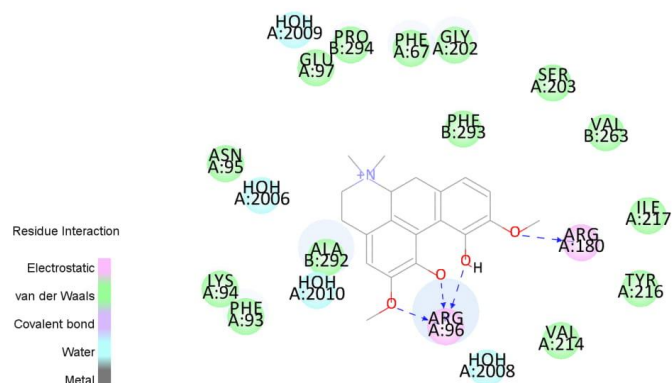


Figure 8. 2D demonstration of interaction profile of magnoflorine. Blue discrete lines show hydrogen bonds (with ARG96, ARG180).

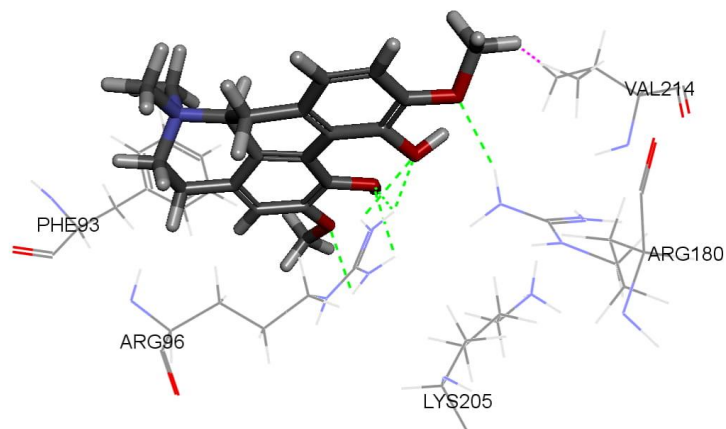


Figure 9. Interactions between magnoflorine was showed more detailed. Green discrete lines shows hydrogen bonds. Pink discrete lines shows the ‘‘bumps (close contacts)’’ between ligand and VAL214.

Interaction profiles of the other protoberberine alkaloids were given in Figure 10-11.

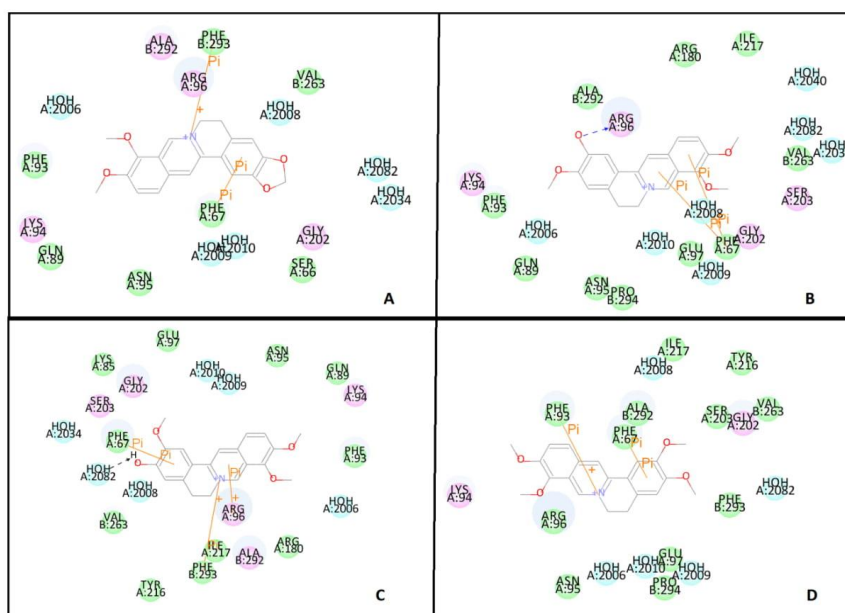


Figure 10. Protoberberine alkaloids in binding pocket. A) berberine b) columbamine c) jatrorrhizine d) palmatine. Blue discrete lines show hydrogen bonds, orange lines show π - π interactions.

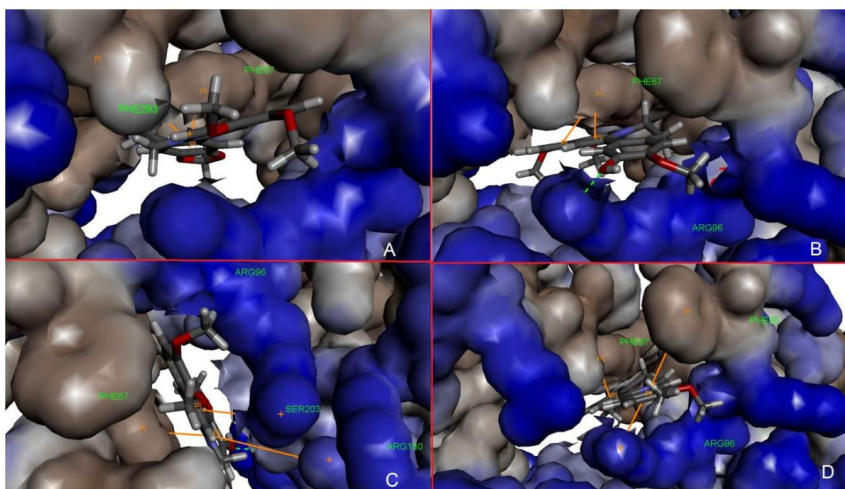


Figure 11. Protoberberine alkaloids in binding pocket with 3D structure of receptor. A) berberine b) columbamine c) jatrorrhizine d) palmatine. Green discrete lines show hydrogen bonds, orange lines show π - π interactions.

In this work, we have established some Protoberberine alkaloids with attractive properties about inhibition of **GSK-3 β** . The molecules exhibited <-7.0 kcal/mol binding affinity values.

Best docked results were detected with Magnoflorine. In contrast with the other protoberberine alkaloids, magnoflorine has a compact structure. It could be more effective on binding affinity to receptor due to this reason. Experimental studies between magnoflorine and **GSK-3 β** , couldn't find in the literature however magnoflorine was found to cross blood-brain barrier and it was found effective on the locomotor activity of mice [17]. It was thought that this effect could provide by the inhibition of **GSK-3 β** .

ARG96 and ARG180 were found essential for binding as literature [16]. Also PHE67, PHE93 and PHE293 residues which are in the binding pocket of **GSK-3 β** were found interacting with compounds as well. On the other hand water molecules weren't found effective on binding of compounds.

REFERENCES

1. National Institute of Aging. (2016). Alzheimer's Disease Fact Sheet. National Library of Medicine, Retrieved April 12, 2018, from <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>
2. Namrata, C. (2012). Case Study-Alzheimer's Disease. Biochemistry for Medics. Retrieved April 12, 2018, from <http://www.namrata.co/case-study-alzheimer-disease/>
3. Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. Mol. Brain, 4, 3. Retrieved April 12, 2018, from <http://www.molecularbrain.com/content/4/1/3>
4. Ly, P.T.T., Wu, Y., Zou, H., Wang, R., Zhou, W., Kinoshita, A., Zhang, M., Yang, Y., Cai, F., Woodgett, J., Song, W. (2013). Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. Journal of Clinical Investigation, 123, 224-235.
5. Singh, S., Kushwah, A.S., Singh, R., Fariswan, M., Kaur, R. (2012). Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 16, 1651-1664.
6. Grycová, L., Dostál, J., Marek, R. (2007). Quaternary protoberberine alkaloids. Phytochemistry, 68(2), 150-175.
7. Kamath, S., Skeels, M., Pai, A. (2009). Significant differences in alkaloid content of *Coptis chinensis* (Huanglian), from its related American species. Chinese Medical Journal, 4, 17.
8. Sarma, N.D., Koul, S., Khosa, R.L. (2009). Alkaloids from *Tinospora cordifolia miers*. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 1(1), 26-27.
9. He, S.M., Liang, Y.L., Cong, K., Chen, G., Zhao, X., Zhao, Q.M., Zhang, J.J., Wang, X., Dong, Y., Yang, J.L., Zhang, G.H., Qian, Z.L., Fan, W., Yang, S.C. (2018) Identification and Characterization of Genes Involved in Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis in *Coptis* Species. Frontiers in Plant Science, 9, 1-13.

10. Inbaraj, J.J., Kukielczak, B.M., Bilski, P., Sandvik, S.L., Chignell, C.F. (2011). Photochemistry and Photocytotoxicity of Alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis L.*). *Chemical Research in Toxicology*, 14(11), 1529-1534.
11. Sonmezdag, A.S., Kelebek, H., Selli, S. (2018). Volatile and key odourant compounds of Turkish *Berberis crataegina* fruit using GC-MS-Olfactometry. *Natural Product Research*, 32(7), 777-781.
12. Leitao da-Cunha, E.V., Fechine, I.M., Guedes, D.N., Barbosa-Filho, J.M., Sobral da Silva, M. (2005). Protoberberine Alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 62, 1-75.
13. Cai, Z., Wang, C., Yang, W. (2016). Role of berberine in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12, 2509-2520.
14. Wu, G., Robertson, D.H., Brooks, C.L., Vieth, M. (2003). Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER - A CHARMM based MD docking program. *Journal of Computational Chemistry*, 24, 1549-1562.
15. Accelrys Software Inc. Discovery Studio 3.5 Client. San Diego: Accelrys Inc.; 2012.
16. Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C., Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, 105, 721-732.
17. Kukula-Koch, W., Kruk-Słomka, M., Stepnik, K., Szalak, R., Biała, G. (2017). The evaluation of pro-cognitive and anti-amnesic properties of berberine and magnoflorine isolated from barberry species by Centrifugal Partition Chromatography (CPC), in relation to QSAR modelling. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2511.