



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RHO-KİNAZ (ROCK) İNHİBİTÖRLERİNİN MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

Burcu BAYEL SEÇİNTİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK

Gaziantep
2017

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RHO-KİNAZ (ROCK) İNHİBİTÖRLERİNİN MOLEKÜLER MODELLEME
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

Burcu BAYEL SEÇİNTİ

Tez Savunma Tarihi: 05.12.2017
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans / Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans / Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans / Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Doç. Dr. Hüseyin KAYA

Doç. Dr. Zafer ÇETİN

Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

05.12.2017

Burcu BAYEL SEÇİNTİ

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı danışman hocam ***Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK'a***

Aldığım dersler ışığında yaptığım bilimsel tez çalışmasına katkıları için ***Doç. Dr. Hüseyin KAYA'ya***

Tez çalışmam süresince her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını esirgemeyen canım arkadaşım ***Gizem TATAR'a***

Çalışmam sürecinde benden sevgilerini, fedakârlıklarını ve desteklerini esirgemeyen eşime, oğluma ve sevgili aileme

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Ayrıca, bu araştırmada yer alan hesaplamalı modelleme çalışmalarının büyük kısmı, TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi (TRUBA kaynaklarında) kullanılarak elde edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Rho/Rho-Kinaz Yolağı	4
2.1.1. ROCK'ın yapısı ve izoformları.....	5
2.1.2. ROCK inhibitörleri	6
2.2. Bilgisayara Dayalı Moleküler Modelleme Yöntemleri	7
2.2.1. Mekanik yöntemler	8
2.2.2. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı	11
2.2.3. Moleküler kenetleme (docking) yöntemi	11
2.2.3.1. Docking algoritması	13
2.2.3.2. Skorlama fonksiyonları.....	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Yapı-Analiz İşlemleri	16
3.1.1. Enzim yapılarının seçimi ve hazırlanması	16
3.1.2. Ligand yapılarının hazırlanması	17
3.2. Moleküller Docking Protokolü	17
4. BULGULAR.....	19
4.1. Yapı-Analiz Sonuçları	19
4.2. Docking Analiz Sonuçları	22
4.2.1. ROCKI'in docking sonuçları.....	23
4.2.2. ROCKII'nin docking sonuçları	28
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
KAYNAKLAR	36

EKLER	40
ROCKI ve ROCKII enziminin 156 adet ligand arasındaki etkileşim analizi sonucunda AutoDock programıyla hesaplanan bağlanma enerjisi (ΔG) ve K_i değerleri.....	40
ÖZGEÇMİŞ	44



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Rho-Kinaz yolağı ve bu yolakta görev alan enzimler	5
Şekil 2.2 ROCK enziminin rol oynadığı hastalıklar	5
Şekil 2.3 ROCKI ve ROCKII'nin yapısına ait fonksiyonel bölgelerinin gösterimi	6
Şekil 2.4 Doking yöntemlerinin atıf sayılarına göre dağılımı	12
Şekil 2.5 Genetik algoritma	13
Şekil 2.6 Doking işlemi sırasında ligand ve protein yapıları arasındaki etkileşimlerin tasvir edilmesi	14
Şekil 4.1 5BML ve 4WOT arasındaki sekans analizinin gösterimi.....	19
Şekil 4.2 Minimizasyon öncesi ROCKI (A) ve ROCKII (B) için eklenen su molekülerinin gösterimi	20
Şekil 4.3 5BML (A) ve 4WOT (B) için enerji minimizasyonu öncesi ve sonrasındaki konformasyonlarının üst üste çakıştırılması	21
Şekil 4.4 DFT sonucunda 156 adet ligand için elde edilen enerji değerleri	22
Şekil 4.5 ROCKI (A) ve ROCKII (B) için yapılan yüzey analizlerinin gösterimi	23
Şekil 4.6 ROCKI (pdb kodu:2ETR) ile Y27632 arasındaki etkileşim analizi.....	23
Şekil 4.7 5BML ile 156 adet ligandın çakıştırılması	24
Şekil 4.8 5BML ile en iyi afinite gösteren 10 ligand yapısı arasındaki etkileşim analizinin 2B gösterimi.....	27
Şekil 4.9 5BML ile 30 nolu ligandın doking sonrası 2B ve ligandın RMSD görüntüsü	28
Şekil 4.10 ROCKII (pdb kodu: 2H9V) ile Y27632 arasındaki etkileşim analizi	28
Şekil 4.11 4WOT ile 156 adet ligandın çakıştırılması.....	29

Şekil 4.12 4WOT ile en iyi afinite gösteren 10 ligand yapısı arasındaki etkileşim analizinin 2B gösterimi	32
Şekil 4.13 4WOT ile 157 nolu ligandın doking sonrası 2B ve ligandın RMSD görüntüsü	33



SEMBOLLER LİSTESİ

$\text{\AA}$	Angstrom
cal	Kalori
E	Enerji
kcal	Kilokalori
K_i	İnhibasyon Sabiti
M	Molar
mol	Molekül
nM	Nanomolar
T	Sıcaklık
V	Hız
ΔG	Bağlanma Enerjisi
π	π
kB	Boltzmann Sabiti
Φ	Bükülme Açısı
θ	Eğilme Açısı
ϵ	Epsilon
r	İki Atom Arası Mesafe
U	Potansiyel Enerji

KISALTMALAR LİSTESİ

ADT	AutoDock Tools
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartik asit
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
BLAST	Basic Local Alignment Sequence Tool
B3LYP	Becke'nin üç parametrelili deęişim fonksiyonu (B3) ile Lee-Zang-Parr Korelasyon Fonskiyonel (LYP)
C	Karbon
DFT	Yoğunluk Fonskiyoneli Kuramı (Density Functional Theory)
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
H	Hidrojen
Ile	İzolösin
K	Kelvin
Leu	Lösin
Lys	Lizin
MD	Moleküler Dinamik
Met	Metionin
N	Azot
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
O	Oksijen
PDB	Protein Veri Bankası
R	Evrensel Gaz Sabiti
RMSD	Root Mean Square Deviation
ROCK	Rho kinaz
VMD	Virtual Molecular Dynamics

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Patofizyolojik hastalıklarda ROCK inhibitörlerinin etkisi	7
Tablo 4.1 Seçilen proteinlerin pdb kodu ve özellikleri.....	19
Tablo 4.2 Seçilen proteinlerin RMSD değerleri	21
Tablo 4.4 5BML ile en iyi bağlanma enerjisine sahip 10 ligand yapısı arasındaki etkileşim analizi sonucunda hesaplanan ΔG ve K_i değerleri	24
Tablo 4.5 2ETR-Y27632'nin etkileşim bölgesine göre en uyumlu bulunan ligandlara ait bağlanma enerjisi ve bağlanma affinite değerleri	25
Tablo 4.6 Doking öncesi ve sonrası oluşan ligand yapılarına ait hesaplanan en iyi 10 RMSD değerleri.....	27
Tablo 4.7 4WOT ile en iyi bağlanma enerjisine sahip 10 ligand yapısı arasındaki etkileşim analizi sonucunda hesaplanan ΔG ve K_i değerleri	29
Tablo 4.8 2H9V-Y27632'nin etkileşim bölgesine göre en uyumlu bulunan ligandlara ait bağlanma enerjisi ve bağlanma affinite değerleri	30
Tablo 4.9 Doking öncesi ve sonrası oluşan ligand yapılarına ait hesaplanan en iyi 10 RMSD değerleri.....	32

ÖZET

RHO-KİNAZ (ROCK) İNHİBİTÖRLERİNİN MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

Burcu BAYEL SEÇİNTİ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK

Aralık 2017, 57 sayfa

Rho-kinaz (ROCK), serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesi olup yaklaşık 160 kDa ağırlığındadır. Bu enzimin ROCKI ve ROCKII olmak üzere iki izoformu bulunmakta olup, her iki enzimde tüm hücrelerde eksprese edilmektedir. ROCKI'in akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste, ROCKII'nin ise beyin ve kas hücrelerinde daha fazla eksprese edildiği bilinmektedir. Rho ile etkileşerek aktive olan ROCK, düz kas kasılması, hücre büyümesi, adezyonu, migrasyonu, motilitesi, gen ekspresyonu ve apoptozu de içeren birçok farklı hücresel fonksiyonlarda etkili olmaktadır. Bu etkileri ile kanser hücrelerinin invazyon ve metastatik aktivitelerini düzenlemektedir. ROCK inhibitörleri ile bu hücresel fonksiyonların azaltıldığı ve kanser hücrelerinde metastazın baskılandığı gösterilmiştir. Bu çalışma ile ROCKI ve ROCKII enzimlerine karşı deneysel çalışmalar sonucunda terapötik potansiyel gösteren 156 adet inhibitör yapının moleküler doking çalışması ile atomik seviyede etkileşim mekanizmalarının belirlenmesini amaçlanmıştır. Bu analiz sonucunda, her iki enzime özgü etkileşim bölgeleri belirlenmiş olup, ROCKI için Val90, Lys105, Val137, Asp160, Asp202, ROCKII için ise Arg100, Ala119, Lys121, Ala213 ve Asp218 aminoasitlerinin daha yaygın etkileşimde bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, enzimlerin belirlenen etkileşim bölgesine yönelik daha etkin ve spesifik ROCK inhibitörlerinin geliştirilmesiyle ROCK'ın görev aldığı hastalıkların tedavi edilmesine imkan sağlanabilecektir.

Anahtar Sözcükler: inhibitör, kanser, metastaz, moleküler doking, ROCK

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MOLECULAR MODELING METHOD OF RHO-KINASE (ROCK) INHIBITORS

Burcu BAYEL SEÇİNTİ

Department of Medical Biology

Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK

December 2017, 57 Pages

Rho-kinase (ROCK) is a member of the serine / threonine protein kinase family and is approximately 160 kDa in weight. This enzyme has two isoforms, ROCKI and ROCKII, which are excreted in all cells in both enzymes. It is known that ROCKI is excreted more in the lung, liver, spleen, kidney and testicular, and ROCKII in the brain and muscle cells. ROCK, which interacts with Rho, is active in many different cellular functions, including smooth muscle contraction, cell growth, adhesion, migration, motility, gene expression, and apoptosis. These effects regulate the invasion and metastatic activities of cancer cells. ROCK inhibitors have been shown to reduce these cellular functions and suppress metastasis in cancer cells. This study aimed to determine the mechanism of interaction at the atomic level by the molecular docking study of 156 inhibitor constructs showing therapeutic potential as a result of experimental studies against ROCKI and ROCKII enzymes. As a result of this analysis, both enzyme-specific interaction regions were determined and it was observed that amino acids Arg100, Ala119, Lys121, Ala213 and Asp218 were more commonly interacted with Val90, Lys105, Val137, Asp160, Asp202 and ROCKII for ROCKI. With this information, it will be possible to treat diseases for which ROCK is involved by developing more effective and specific ROCK inhibitors for the determined interaction region of the enzymes.

Key words: inhibitor, cancer, metastasis, molecular docking, ROCK

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan proteomunun % 2'sini oluşturan protein kinaz ailesi, en geniş enzim ailelerinden biridir ve insan genomunda 518 protein kinazın kodlanmış olduğu bilinmektedir. Protein kinazlar, katalitik özelliklerine göre serin/treonin ve tirozin kinazlar olarak sınıflandırılırlar [1,2]. Bu kinazların katalitik domain kısımları birbiriyle benzerlik göstermekte olup geleneksel protein kinazlar (Conventional Protein Kinases, CDK) ailesi olarak adlandırılırlar. Bu aileye ait protein kinazlar, insan genomunda 500 gen ile ifade edilmekte olup en geniş protein kinaz enzim ailesidir [3,4]. Protein substratlarının tersinir fosforilasyonundan sorumlu bu kinazlar, ATP'nin γ -fosfatının, serin, treonin ve tirozin residuelelerin OH grubuna transfer ederek protein fosforilasyonunda görev alırlar. Bu sayede proteinlerin aktif ya da inaktif olmasıyla vücudumuzdaki birçok mekanizmanın regüle edilmesinde kilit rol oynarlar. Protein kinaz işlevinin düzensizliği birçok patofizyolojik süreçte (onkoloji, nöroloji, immunoloji, kardiyoloji, bulaşıcı hastalıklar) etkili olduğundan, ilaçla tedavi için önemli hedefler haline gelmektedir. 1950'li yıllarda E. Krebs ve E. Fisher'in fosforilasyonu göstermesinden itibaren hücre uyarı iletiminde en önemli işleve sahip yapılardan olan protein kinazların inhibitörü olarak ortaya konan ilk ilaç kronik miyeloid lösemi tedavisinde kullanılan imatinib olmuştur. Bu kinaz aktivitesinin düzenlenmesi ile patofizyolojik hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde önemli terapötik strateji olarak ilaç endüstrisi tarafından tanınmaktadır [4–8].

Rho kinaz (ROCK), serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesi olup, birçok çalışmada ROCK'ın yüksek seviyede eksprese olması ile kanser hücrelerinde metastaz gelişiminin artmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu da ROCK'ın moleküler hedef olarak öne çıkmasını sağlamıştır [9–11]. Bu nedenle ROCK için birçok inhibitör geliştirilmiş olup klinikte kullanılmaktadır. Ancak kullanılan bu inhibitörlerin bir çoğunluğu ROCK izoformları için spesifik değildir.

Bu tezin amacı, ROCK'ın ROCKI ve ROCKII izoformlarına karşı terapötik potansiyel gösteren bileşiklerin moleküler modelleme yöntemleri ile incelenerek enzim-inhibitör bağlanma motifleri diğer bir deyişle etkileşim mekanizmalarının aydınlatılması hedeflenmektedir. Bu sayede, elde edilen bilgiler doğrultusunda, daha spesifik ve etkili

ROCK inhibitörlerinin belirlenmesi ile görev aldığı hastalıkların tedavi edilmesine imkan sağlanabilecektir.

Bu tez çalışmasında kullanılan yeni bir teknoloji olan moleküler modelleme çalışmaları, mevcut ilaçlara ve hastalıklara ait birikmiş bilgileri diğer sahalardaki disiplinler arası girdilerle birlikte kullanarak ilaç araştırma ve geliştirme sürecini hızlandırmaktadır [12–14]. Son zamanlarda deneysel ve hesaplamalı modelleme çalışmalarının bir arada kullanımı, ilaç tasarımlarında ve keşiflerinde oldukça yaygınlaşmıştır. İlaç tasarımındaki gerçekçi yaklaşımlar, ligand yapısına dayalı, hedef yapısına dayalı ve hedef-ligand tabanlı tasarım olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Ligand yapısına dayalı tasarım içerisinde farmakofor analizi ve nicel yapı-etki ilişkileri yer almaktadır. Hedef yapısına dayalı tasarım da ise kenetlenme (docking) ve de-novo tasarım (parçaya dayalı tasarım) yöntemleri önemli yer tutmaktadır. Hedef-ligand tabanlı tasarım ise her iki yaklaşımın birlikte kullanılmasıdır. Van Linden ve arkadaşları tarafından birçok kinaz-ligand etkileşiminin aydınlatılmasına yönelik docking ve farmakofor analizleri yapılmıştır [15]. Yapılan bir çalışmada, cAMP bağlı serin-treonin kinaz enzimine karşı farklı docking teknikleri uygulanarak izokinolin sülfonamid türevli inhibitörler yapıları incelenmiştir [16]. Ayrıca bir diğer çalışmada ise, tirozin kinaz inhibitörlerinin genistein, staurosporin ve tyrphostin ile olan inhibisyon kinetikleri ve docking çalışmaları ile analiz edilmiştir [17].

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışması, hesaplamalı moleküler modelleme temelinde iki aşamadan oluşmaktadır. Çalışmanın ilk aşamasında, hedef enzim yapısı ile kullanılacak ligand yapılarının yapı analizleri, ikinci aşamasında ise enzim-ligand etkileşimleri için moleküler docking işlemi uygulanmıştır. Bu doğrultuda, klinik öncesi ve sonrası ROCKI ve ROCKII için etkin bulunan 156 adet ligand yapısı literatür bilgisine dayalı olarak seçilmiştir [18]. Seçilen bu yapılar, Gaussian 9.0 programı kullanılarak, kuantum mekaniği altında atomik ve elektronik seviyede optimize edilmiştir. Hedef enzim yapıları için ise, aminoasit bilgileri doğrultusunda protein data bankasında (PDB) mevcut olan en iyi çözünürlüğe sahip kristal yapılar belirlenmiştir. Belirlenen bu yapılar NAMD 2.12 [19] programı ile enerji minimizasyonları yapılarak optimize edilmiştir. Bunun sonucunda 156 adet ligand ve hedef enzimlerin gerekli yapı analizleri tamamlanmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise yapı analizleri tamamlanan enzimler ve ligand yapılarının, AutoDock 4.2 [20] programı vasıtasıyla docking yöntemi kullanarak yapı temelli ilaç tasarımı yapılmıştır. Kullanılan bu hesapsal yöntemler ile ilgili ayrıntılı

bilgiler Bölüm 3’te Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmiş olup, elde edilen sonuçlar ise Bölüm 4’teki Bulgular kısmında verilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

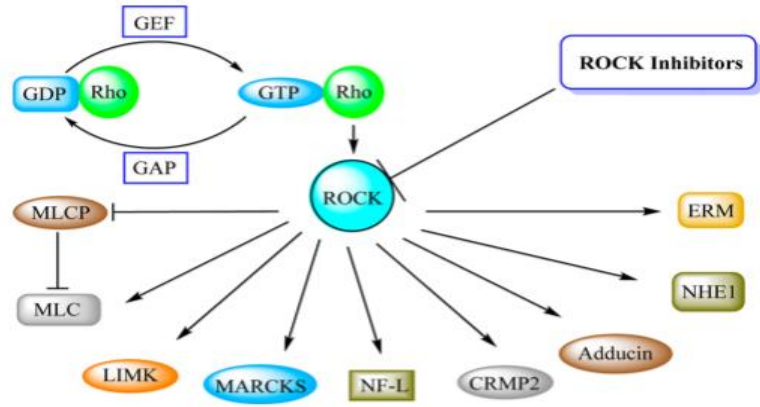
2.1. Rho/Rho-Kinaz Yolağı

Rho, başlıca aktin hücre iskeletinin organizasyonunun düzenlenmesinde, hücre göçü, hücre adezyonu ve sitokinez gibi çok çeşitli hücresel olayın kontrolünde rol oynar. Rho'nun, aktini yeniden şekillenmesinde ve farklı yönlerinin düzenlenmesindeki rolü, ilk olarak fibroblast büyüme faktörü uyarısına yanıt çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Daha sonraki çalışmalar ise, Rho ailesi üyelerinin fibroblastlarla sınırlı kalmadığını, bütün ökaryot hücre tiplerinde aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde benzer rol aldıklarını göstermiştir [21,22]. Bu yüzden Rho ailesi üyeleri, hücre dışı sinyaller ile hücre şekli, hareketi ve değişikliklerini ilişkilendiren aktin hücre iskeletinin genel düzenleyicileri olarak görev yaptıkları gözlemlenmiştir [22,23].

Rho aktivitesi protein ve bazı faktörler yardımıyla kontrol edilir.

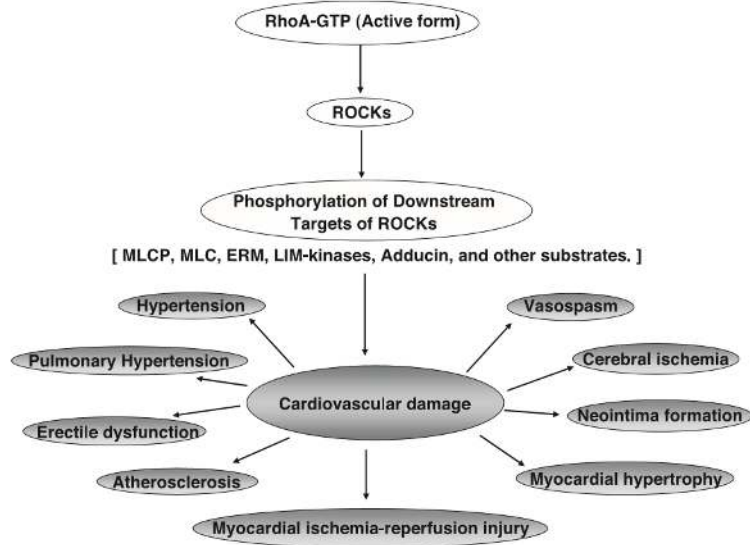
- 1. GTPaz aktive edici proteinler (GAP):** İntrinsik GTPaz aktivitesini artırarak Rho'yu inaktive ederler.
- 2. Rho-spesifik guanin nükleotid değiş-tokuş faktörleri (GEF):** GDP'nin disosiyasyonunu hızlandırarak Rho'yu aktive eder [24,25].

GEF ile aktif forma gelen Rho, Rho-kinaz(ROCK) ile etkileşerek ROCK'ın aktif hale gelmesini sağlar. Aktive olan ROCK enzimi, addusin, ezrin-radiksin-moesin (ERM) proteinlerini, LIM kinaz, miyozin hafif zincir fostataz (MLCP) ve Na/H değiştirici (exchanger) (NHE) 1'in serin-treonin fosforilasyonu ile hücre kontraksiyonunu düzenler [26] (Şekil 2.1). Aynı zamanda miyozin hafif zincir fosfatazlarını da fosforilleyerek inhibe eder. Sonuçta miyozin hafif zincir fosforilasyonundaki artış, miyozini aktive ederek, aktin miyozin flamanlarının yapılanmasına yol açar [27]. Bu da stres liflerinin, fokal adezyonların, adherens bağlantıların ve sitokinezin oluşumu gibi hücre iskeleti değişikliklerine neden olur.



Şekil 2.1 Rho-Kinaz yolağı ve bu yolakta görev alan enzimler [18]

Ayrıca; ROCK'ın, vazospastik anjina, iskemik inme, hipertansiyon ve koroner arter spazmları ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol oynadığı gösterilmiş olup bu enziminde meydana gelen fonksiyon bozukluğu vücudumuzdaki birçok hastalığa neden olmaktadır [26,28,29] (Şekil 2.2).

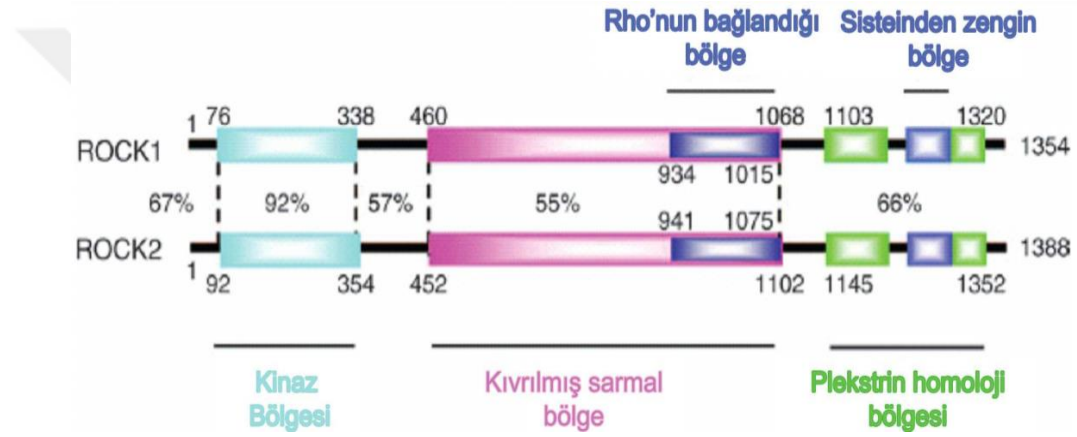


Şekil 2.2 ROCK enziminin rol oynadığı hastalıklar [26]

2.1.1. ROCK'ın yapısı ve izoformları

ROCK'lar 1996 yılında, Rho'nun ilk efektörleri olarak keşif edilmiş olup, ROCKI ve ROCKII olmak üzere iki izoforma sahiptir [30–32]. Bu iki izoform, kinaz bölgesinde yaklaşık %92, tüm bölgeler için ise % 65 aminoasit dizi benzerliği göstermektedir [33]. Bu izoformlar arasındaki katalitik domainlerindeki benzerlikleri ne kadar yüksek olsa da

ROCKI'in akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste ROCKII'nin ise beyin ve kas hücrelerinde daha fazla eksprese olması bu izoformların vücutta farklı fonksiyonlarda görev aldığını göstermektedir. Bu da bu iki izoforma karşı geliştirilecek inhibitörlerin spesifik oluşturmalarını gerektiğini desteklemektedir [34,35]. ROCK, N-terminalinde kinaz bölgesi (katalitik bölge), bu bölgenin ardından kuramsal olarak kıvrılmış sarmal bölge (coiled-coil) ve C-terminalde Rho'nun bağlandığı bölge (RB) ve plekstrin homoloji (PH) bölgelerini içermektedir (Şekil 2.3). Kinaz bölgesi ATP bağlanma bölgesini içermekte olup enzimin katalitik aktivitesi için önemli role sahiptir. Ayrıca ATP konumuna bağlanmak için yarışan yeni nesil inhibitörlerin hedef bağlanma bölgesidir [36].



Şekil 2.3 ROCKI ve ROCKII'nin yapısına ait fonksiyonel bölgelerinin gösterimi [37]

2.1.2. ROCK inhibitörleri

ROCK enziminin fazla eksprese olduğu durumlarda aktivitesini engellemek için çeşitli farmakolojik ajanlar tasarlanmıştır. Bunlar, izokinolin, 4-aminopiridin, indazoller, amino ve üre türevleri olmak üzere 4 grupta incelenmektedir. İzokinolin türevli olan fasudil ve Y-27632 ilk keşif edilen küçük molekülü ROCK inhibitörleridir. Hidroksifasudil, ripasudil, Wf-536, RKI1447, SAR407899, H1152P ise bilenen diğer önemli ROCK inhibitörleridir. 1995 yılında fasudil, Japonya'da serebral vazospazmı tedavi etmek amacıyla onaylanmış olup ve klinikte kullanılmaktadır. 2014 yılında ise ripasudil göz hastalıklarının (özellikle glokom) tedavisi için onaylanmıştır. Ayrıca bu inhibitörlerin astım [35], kanser [36], erektil disfonksiyon [37], glokom [38], insülin direnci [39], böbrek yetmezliği [40], nöronal dejenerasyon [30] ve osteoporoz [38] gibi çeşitli patolojik durumların tedavisinde yüksek potansiyel gösterir (Tablo 2.1). Bu inhibitörlerle

birlikte tedavi potansiyeline sahip 170 den fazla ROCK inhibitörü olduğu düşünülmektedir [26]. Şuan piyasada var olan ve ROCK enziminin görev aldığı hastalıkların tedavisinde kullanılan bu inhibitörler, daha sonra yapılabilecek seçimli inhibitörleri geliştirme çalışmaları için yol gösterici olacaktır.

Tablo 2.1 Patofizyolojik hastalıklarda ROCK inhibitörlerinin etkisi

Kardiyovasküler Hastalıklar	Bileşik (Ligand)	Farmakolojik Etkiler
Yüksek Tansiyon	Y27632 Fasudil SAR4077899	Tansiyonun düzenlenmesi Tansiyonun düzenlenmesi Tansiyonun düzenlenmesi
Diyabet	Fasudil	Diyabet gelişiminin önlenmesi
Ateroskleroz	Fasudil	Arteriosklerotik regresyon koroner lezyonlar
Miyokardiyal enfarktüs (MI)	Fasudil	Sol ventrikül baskılanması (LV) boşluk genişlemesi ve disfonksiyon
Kalp yetmezliği	Fasudil	Periferik vasküler direncin artması ve bozulmuş vazodilatasyon periferik vaskülatür
Glokom	Fasudil Ripasudil AMA0076	Göz içi basıncın azaltılması (IOP) Göz içi basıncın azaltılması (IOP) Göz içi basıncın azaltılması (IOP)
Nörolojik Hastalıklar	Bileşik (Ligand)	Farmakolojik Etkiler
Omurilik yaralanması(SCI)	Y27632 Fasudil	Akson rejenerasyonunun uyarılması ve arka bacak fonksiyonunun iyileştirilmesi Nörolojik iyileşme
Alzheimer hastalığı(AD)	Y27632 Hidroksifasudil Fasudil	AD prevalansının azaltılması Mekansal öğrenimin geliştirilmesi ve çalışma belleği Aβ kaynaklı hipokampal nörodejenerasyona karşı koruma
İnme	Fasudil	Nörolojik fonksiyonların iyileşmesi
Onkoloji Hastalıklar	Bileşik (Ligand)	Farmakolojik Etkiler
	Y27632 RKI1447 Wf536	Tümör büyümesinin inhibisyonu, progresyon ve metastaz

2.2. Bilgisayara Dayalı Moleküler Modelleme Yöntemleri

Modelleme çalışmaları, deneysel bir sistemi veya sonuçlarını anlamak; planlanan bir deneyden türetilcek olan bilginin optimizasyonunu sağlamak veya bilimsel bir probleme teorik veya yapısal bilginin uygulanması amacıyla yürütülmektedir. Moleküler modellemenin amacı, bir molekülün kimyasal ve fiziksel özellikleri arasındaki temel ilişkiyi, kimyasal ve üç boyutlu (3B) yapısını anlamaktır. Bu anlayışla mevcut özellikler; moleküllerin kimyasal, katalitik veya biyolojik fonksiyonlarıyla ilişkilendirilmesine ve en önemlisi değişen fonksiyona ait moleküllerin rasyonel olarak tasarlanmasına olanak sağlamaktadır. Kimyasal yapı ve fonksiyon arasındaki bu bağlantı, moleküler biyoloji, protein bilimi, ilaç tasarımı, kimyasal kataliz veya materyal ve polimer bilimi gibi birçok

bilimsel çaba için hayati önem taşımaktadır [38]. Bu alanda kullanılan birçok moleküler modelleme metotları ve uygulamaları mevcuttur. Yapı oluşturma, yapının görüntülenmesi, konformasyon analizleri, moleküler benzetim (simülasyon), biyoaktif konformasyonların türevlendirilmesi, moleküler süperpozisyon ve karşılaştırma, farmakoforik kalıpların türevlendirilmesi, reseptör haritalandırılması, biyolojik aktivitelerin tahmini, moleküler etkileşimler, moleküler özelliklerin hesaplanması, enerji hesapları gibi alanlarda moleküler modellemeye dayanarak faydalanılmaktadır. Bu tez çalışması için yararlandığımız moleküler modelleme teknikleri aşağıda açıklanmıştır.

2.2.1. Mekanik yöntemler

Fiziksel, kimyasal, biyolojik vs. sistemlerin davranışlarını ve özelliklerini bilgisayar teknolojileri yardımıyla anlamamızı kolaylaştırmak için kullanılan birçok yöntem (simülasyon) mekanik kurallar temelinde kurulmuştur. Mekanik yöntemler, moleküler ve kuantum mekanik olmak üzere iki çeşittir.

Moleküler mekanik, klasik mekaniğin moleküllere uygulanmasıyla yapılan hesapsal yöntemleri içerir. Ayrıca moleküler mekanik metotlar elektronları ve orbitalleri hesaba katmadığı için kuantum mekanik yöntemlere göre daha hızlı gerçekleştirir. Bu nedenle çok parçacıklı makromoleküllerin (örneğin proteinler gibi) hesaplamaları için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu makromoleküllerin bilgisayara dayalı konformasyon analizleri için modelleme ve simülasyon yöntemleri bu moleküler mekanik temelinde uygulanmaktadır. Ayrıca ilaç tasarımı için kullanılan kenetlenme (docking) tekniği de moleküler mekaniğe dayanır. En yaygın kullanılan simülasyon teknikleri Monte Carlo ve Moleküler Dinamik simülasyon teknikleridir.

Moleküler dinamik, çok parçacıktan oluşan sistemlerin (proteinlerin) özelliklerini belirlemede kullanılan deterministik bir yaklaşımdır. Deterministik metot, dikkate alınan sistemin başlangıç koşullarının bilinmesi ile birlikte bir sonraki adım için sistemin zamana bağlı davranışlarının incelenmesidir. Süreklilik söz konusudur. Bu yöntemde, Hamilton'a bağlı olarak moleküllerin Newton hareket denklemini kullanarak, moleküllerin hareketlerinin zamana bağlı değişiminin bilgisayar ortamında modellenmesidir [36].

Parçacık Hamilton (H), klasik olarak, Kinetik ve Potansiyel enerji toplamaları şeklinde tanımlanmıştır.

$$H(\{p_i, r_i\}) = K(p_i) + U(r_i) = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} + U(\{r_i\})$$

Hamilton içerisinde yer alan etkileşme potansiyel enerjisi ise (kuantum hesaplamaları ya da deneysel veriler sonucunda elde edilebilen) çeşitli parametreler kullanılarak aşağıdaki şekilde bilgisayar programları tarafından hesaplanmaktadır.

$$U = \sum_{bonds} \frac{k_n^l}{2} (l_n - l_{n,0})^2 + \sum_{angles} \frac{k_n^\theta}{2} (\theta_n - \theta_{n,0})^2 + \sum_{improper} \frac{k_n^\theta}{2} (\xi_n - \xi_{n,0})^2 \\ + \sum_{torsions} K_{\varphi_n} [1 + \cos(m_n \varphi_n - \delta_n)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4 \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4 \pi \varepsilon_0 r_{ij}} \right)$$

Bu moleküler simülasyon tekniklerinin kullanıldığı birçok paket program mevcuttur. Bu programlardan bazıları, GROMACS, CHARMM, AMBER ve NAMD, vs.dir.

Monte Carlo simülasyon tekniği ise, stokastik bir yaklaşım içermektedir. Mekanik oluşturulan tüm hareketler ve diğer karar verme mekanizmaları tamamen gelişmiş güzel bir şekilde gerçekleşmektedir. Zincir temsili içeren protein modelleri için en büyük problem veya kısıtlayıcı unsur, zincir bölgelerinin hareketlerinin tanımlanması gerekmektedir. Bunu gerçeğe yakın bir şekilde tasvir etmek oldukça zordur. Diğer taraftan, gerçekleştirilen bir hareketin kabul edilip edilmemesi Metropolis algoritmasına göre belirlenmektedir. Her bir Monte Carlo zaman adımında kısıtlı sayıda atom veya aminoasidin hareket etmesine müsaade edildiği için, kinetik sonuçların deneysel verilerle kıyaslanması pek mümkün olamamaktadır.

Bir diğer mekanik yöntem çeşidi olan kuantum mekanik ise, moleküler mekanik yöntemin aksine incelenen yapının elektronlarını da göz önüne aldığı için daha detaylı ve uzun süren bir yöntemdir. Kuantum mekaniğine göre, elektronlar tanecik değildir. Elektronlar dalgaya benzer bir karaktere sahiptirler. Bu nedenle, daha çok küçük moleküllerin (ligandların) hesaplamalarında kullanılmaktadır [36]. Kuantum mekanik hesaplamaları, yarı deneysel (yarı-ampirik), ab-initio ve fonksiyonel yoğunluk yöntemi (DFT) olmak üzere 3 farklı yöntemle ayrılmış olup kuantum mekaniği elektronların özelliklerini tanımlamak için Schrödinger denklemi kullanılmaktadır.

Kuantum mekaniğinin temeli olan Schrödinger denklemi;

$$H\psi = E\psi$$

Bu eşitlikte; H, Hamilton operatörü; E, sistemin toplam enerjisi; ψ , dalga fonksiyonunu göstermekte olup, Hamilton operatörü sistemin toplam enerji operatörüdür [39]. E ve Ψ denklemin çözümünden elde edilmektedir. Moleküler sistemin Hamilton operatörü, elektronların ve çekirdeklerin kinetik enerji operatörleri, molekülde yer alan tüm yüklü tanecikler arasındaki elektrostatik etkileşimler, çekirdeklerin ve elektronların spin ve orbital hareketlerin kaynaklanan manyetik momentler arasındaki etkileşimleri içermektedir. Bu sebeple, moleküler orbital hesaplamaları yapılırken moleküle ait olan Hamilton operatörünün tamamı kullanılmamaktadır. Çekirdeklere ait olan kinetik enerji operatörleri ihmal edilmekte olup manyetik etkileşimlerin olmadığı kabul edilmektedir. Sonuç olarak, molekülün elektronik enerjisi E'ye karşılık gelen Hamilton operatörü;

$$H = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla^2 - \sum_{\mu=1}^N \sum_{i=1}^n (Z_{\mu} / r_{\mu i}) + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 1 / r_{ij}$$

şeklini almaktadır. Bu eşitlikte i ve j altlıkları n tane elektron için, μ ise N tane çekirdek için kullanılmıştır. Yukardaki formülde birinci terim elektronların kinetik enerjisini, ikinci terim çekirdekler ile elektronlar arasındaki Coulomb çekme enerjisini, üçüncü terim ise elektronlar arasındaki itme enerjisini ifade etmektedir. Schrödinger denkleminin en sondaki terimi olan elektron-elektron etkileşimlerini çözmek çok zordur. Bu nedenle, yarı-ampirik yöntemler ile molekül özelliklerin deneysel değerlere yakın sonuçlar vereceği parametreler kullanarak Schrödinger eşitliğini çözmeye çalışılmaktadır. Bunun için, Schrödinger eşitliğinin yaklaşık çözümünü elde etmek için her sisteme uygun parametrelerin kullanılmasını gerekmektedir. Yarı-ampirik bazı yöntemler şunlardır: CNDO, INDO, MINDO, ZINDO, AM1(Austin Model), PM3 (Parametric Method). Bir diğer kuantum mekanik yöntem olan ab-initio yöntemi, birçok matematiksel yaklaşım kullanır. Bu yaklaşımdan biri, Hartree-Fock (HF) yaklaşımı, elektron-elektron etkileşimleri için ortalama potansiyel temel alarak molekül frekanslarının hesaplanması ve molekül geometrisinin tayini için en uygundur. Son zamanlarda, moleküler sistemlerin geometrisi ve elektron yapılarının araştırılmasında genellikle DFT metodunda yararlanılmaktadır [40]. Bu yöntem elektron yoğunluğuna ait genel bazı fonksiyoneller ile elektron korelasyonunu modellemektedir. Ayrıca DFT’de temel prensip, molekülün

toplam elektronik enerjisinin, toplam elektronik yoğunluğu ile bağlantılı oluşudur. Bunlardan en yaygın olanları, B3LYP, BP86, LDA, vs. gibidir.

Bu kuantum mekanik hesaplamalar için kullanılan paket programlarından bazıları Mopac, Ampac, Hyperchem, Spartan, Gaussian vs. dir. Gaussian bu hesaplamalar için en sık kullanılan paket programıdır. Bu program, moleküllerin 3B şekli oluşturularak, moleküllerin geometrisi ve enerjisi (geometri optimizasyonu ile), moleküllerin bağ açıları, bağ uzunlukları ve dipol momentleri hesaplanmaktadır. Bu sayede, molekülün tek ve iki boyutlu (2B) konformasyon analizi ve optimizasyon hesabı yapılabilir.

2.2.2. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı

Farmasötik araştırmalarında kullanılan moleküler modelleme tekniklerine bilgisayar yardımcı ilaç tasarımı (Computer Assisted Drug Design (CADD)) veya bilgisayar yardımcı moleküler tasarım (Computer Assisted Molecular Design (CAMD)) adı verilmektedir. Bu teknik, farmakokinetik ve farmakodinamik olarak iki şekilde incelenmektedir.

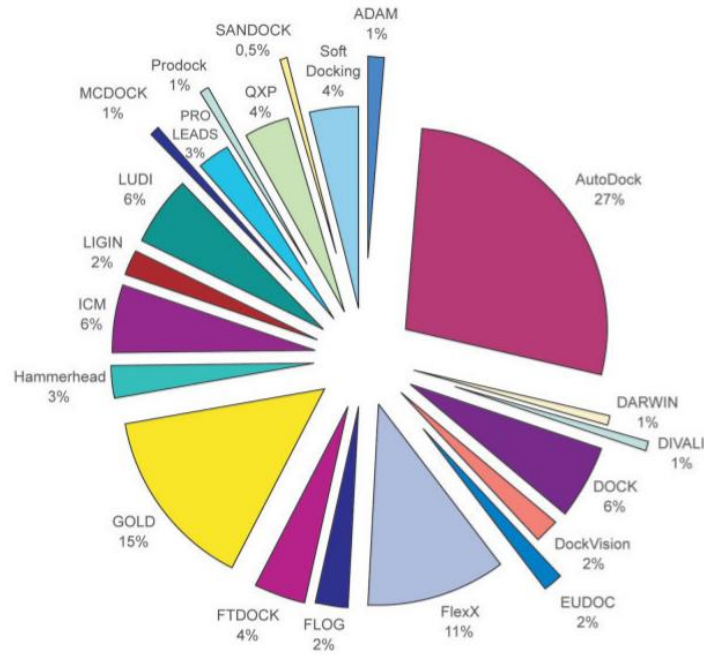
Farmakokinetik analizde, tasarlanan kimyasal yapıların, vücutta **Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon ve Toksikite (ADMETok)** analizleri yapılarak incelenmesine dayanmaktadır. Farmokodinamik analizler ise, ligand yapısına dayalı tasarım (farmakofor ve QSAR) , hedef yapısına dayalı tasarım (docking) ve fragmana dayalı tasarım olmak üzere üç ayrı şekilde yapılmaktadır. Farmakofor ve QSAR yaklaşımı, ilaç reseptör hedefinin net bir yapısı mevcut değilse ve de reseptöre bağlanan birden çok ligand biliniyorsa, reseptörün yapısı kendisine bağlanan yapılara dayalı olarak çıkartılabilir. Bu yaklaşım reseptör haritalama (farmakofor) adı verilmektedir. Moleküler docking yaklaşımında ise; 3B yapı, kristalografi, NMR çalışmalarıyla (protein data bankasındaki mevcut yapı bilgisi) veya in-siliko olarak elde edilen hedef makromolekül yapı ile ilaç ya da ilaç adaylarının birbirine nasıl uyum gösterdiğini araştırmaktadır.

2.2.3. Moleküler kenetleme (docking) yöntemi

Hedef reseptör yapılarının belirli olduğu durumlarda veya in-siliko olarak oluşturulmuş 3B makromoleküler yapılar varlığında, tasarlanan ligandların bu yapılarla olan etkileşimlerini, birbirine olan tercihi yönelmelerini, reseptörlerdeki kavite uyumunu incelemek için “**yapısal-tabanlı ilaç tasarımı**” olarak bilinen moleküler docking yöntemi

kullanılmaktadır. Bu yöntem, proteinlerin aktif bölgesine ligand yapısının bağlanma sırasındaki etkileşimleri ve hareketleri incelenerek, ligand yapıların protein hedeflerine karşı afinitesini ve biyolojik aktivitesini önceden tahmin edebilmesine olanak sağlamaktadır. X-ışını kristalografi ve NMR gibi deneysel yöntemlerle elde edilen proteinlerin 3B kristal yapıları global ölçekte kullanılan en büyük protein veri bankasından (PDB) temin edilmektedir. Deneysel yöntemlerle aydınlatılamayan protein yapıları için ise, in-siliko yöntemlerle (homoloji modelleme, ab-initio, threading) 3B yapı tahminleri yapılmaktadır.

Günümüzde doking çalışmaları için birçok program mevcut olup, bu programlar birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar ise, bir doking pozu belirlemede kullanılan algoritma ve skorlama fonksiyonlarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Şekil 2.4’de literatürde yer alan doking programlarını ve atıf sayılarını göstermektedir. En çok kullanılan programlar ise AutoDock, GOLD, FlexX’ dir.



Şekil 2.4 Doking yöntemlerinin atıf sayılarına göre dağılımı [41]

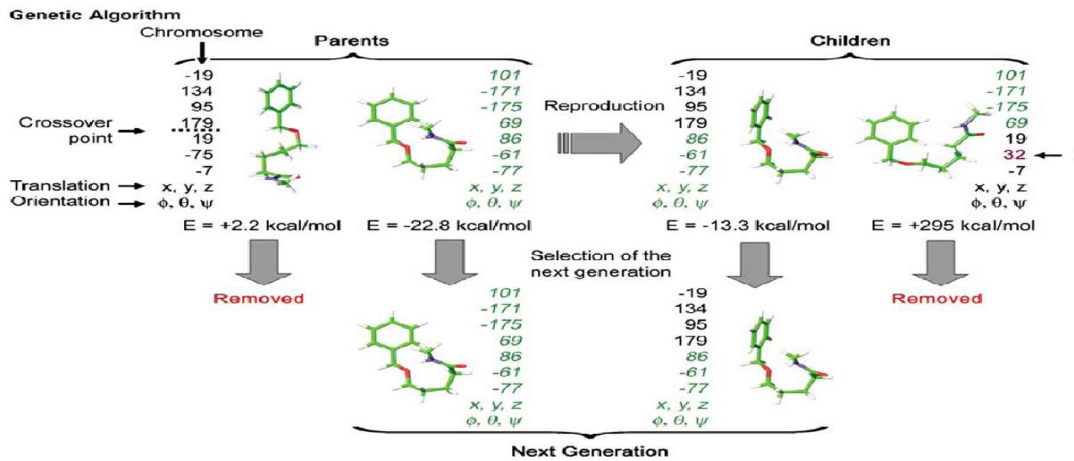
Docking programının algoritması, ligandı hedeflenen bölgeye esnekliği hesaplanarak yerleştirilmesine dikkat ederek hesaplamalar yapmaktır. Docking algoritmalarında, ligand yapının esnekliği üç temel kategoride gerçekleştirilmektedir.

- Sistemik metotlar (artan yapı, konformasyonel tarama)
- Rastgele veya olasılıklı metotlar (Monte Carlo, genetik algoritmalar)
- Simülasyon yöntemleri (moleküler dinamik, enerji optimizasyonu)

2.2.3.1. Docking algoritması

Docking işlemi için kullanılan sistemik metoda, hedef makromolekölün aktif bölgesine ligand genellikle artan yapıda yerleştirilmektedir. Bir molekülde tüm serbestlik derecelerini bulmaya çalışmaktadır. Artan yapıda yerleştirme, önceden bölümlerin ayrılmış bir ligandın bölümlerini hedef bölgeye docking yapılması ve bu bölümlerin hidrojen bağı ile bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Sistemik tarama için başka bir yöntem de önceden hazırlanmış konformasyon veri tabanlarının kullanılmasıdır. Bu yaklaşımda, veri tabanında bulunan konformasyonlar önceden hesaplandığı için docking prosedürü ligand yapının esnemez bir şekilde hedef bölgeye yerleştirmesiyle indirgenmiş olmaktadır.

Rastgele veya olası metoda ise, ligandın yapısal konformasyonunda değişiklikler yaparak (translasyon, oryantasyon) ve bu değişiklikler sonucu her bir konformasyonun enerji değerleri hesaplanarak önceden tanımlanmış bir olasılık fonksiyonuyla değerlendirilir. Sıklıkla kullanılan rastgele metotlar ise, Monte Carlo tarama ve Genetik algoritmadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Genetik algoritma [42]

2.2.3.2. Skarlama fonksiyonları

Skarlama, bir ligandın pozlama ve sıralamasını içermektedir. Pozlama skor fonksiyonu ligand ile aktif bölge arasındaki uyumluluğu göstermektedir. Sıralama skor fonksiyonu ise bağlanma enerjileri tahmininin içermekte olup, hedef yapı ve ligand arasındaki etkileşimleri tahmin etmede algoritmalar skarlama fonksiyonlarından yararlanmaktadır.

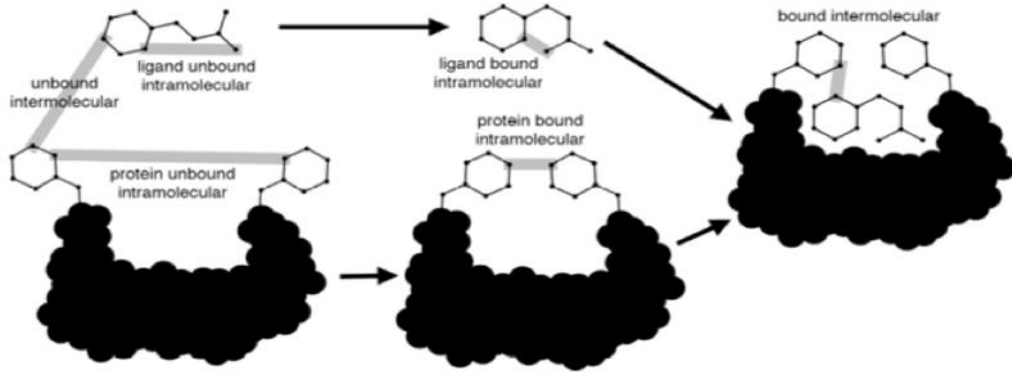
Üç farklı skarlama fonksiyonu;

- Kuvvet alanı temelli
- Ampirik
- Bilgi temelli (Knowledge-based) şeklindedir.

Birçok doking yöntemi, ligand-protein etkileşimleri için temel fonksiyonel formları tanımlayan ampirik serbest enerji kuvveti alanları ve moleküler mekanik kuvvet alanı ile birlikte semi-ampirik serbest enerji kuvveti alanları şeklinde kullanılmaktadır. Doking yöntemi için en çok tercih edilen AutoDock programı bu semi-ampirik skarlama fonksiyonu ile enerji hesaplamalarını yapmaktadır.

$$\Delta G = (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L}) + (V_{bound}^{P-P} - V_{unbound}^{P-P}) + (V_{bound}^{P-L} - V_{unbound}^{P-L} + \Delta S_{conf})$$

Bu hesaplama iki adımdan oluşmaktadır. Birinci adımda; ligand ve proteinin bağısız (unbonded) durumlarındaki intramoleküler enerjileri hesaplanmaktadır. İkinci aşamada ise; ligand ve proteinin birbiriyle bağlı durumdaki (bonded) intermoleküler enerjileri hesaplanmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Doking işlemi sırasında ligand ve protein yapıları arasındaki etkileşimlerin tasvir edilmesi [20]

Bağlanma serbest enerji formülündeki her bir enerjik terim ise aşağıdaki formül kısmında gösterilmiştir. Formül sırayla Lennard-Jones, hidrojen bağ, elektrostatik, çözünürlüğün enerjik katkısından oluşmaktadır.

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2)}$$

Bağlanma serbest enerji değeri (ΔG) hesaplandıktan sonra aşağıdaki formül ile bağlanma afinitesi (K_i , inhibasyon sabiti) bulunmaktadır. Bir molekül için tahmin edilen iyi bir bağlanma afinitesi, o molekülün potansiyel olarak iyi bir bağlanıcı olduğunu göstermektedir [43]. Küçük moleküllü ilaç adaylarının protein hedeflerine karşı bağlanma afinitesinin serbest enerji değerine göre hesaplanması aşağıdaki formülle yapılmaktadır. ($T= 298.15K$)

$$\Delta G = RT \ln K_i$$

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, ROCK'ın ROCKI ve ROCKII izoformlarına karşı terapötik potansiyel gösteren bileşiklerin incelenerek enzim-inhibitör bağlanma motifleri diğer bir deyişle etkileşim mekanizmalarının moleküler modelleme teknikleri kullanarak aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla kullandığımız yöntemlerin çalışma prensipleri aşağıdaki kısımda ayrıntılı olarak açıklanmış olup elde edilen sonuçlar ise Bölüm 4'te Bulgular kısmında verilmiştir.

Bu tez çalışması 2 aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. İlk aşamada; ROCK izoform yapılarının ve ligandların gerekli parametreler ve yöntemler doğrultusunda **yapı-analiz işlemleri** yapılmıştır.
2. İkinci aşamada; analizleri yapılan ROCK izoformları ile 156 adet ligand moleküllerinin etkileşim mekanizmasının aydınlatılması için **Docking işlemi** uygulanmıştır.

3.1. Yapı-Analiz İşlemleri

Docking yöntemi, **yapı-temelli ilaç tasarım** amaçlı uygulandığından, öncelikle hedef makromolekül yapının 3B yapı bilgisine ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle öncelikle bu çalışmada hedef olarak belirlenen ROCKI ve ROCKII için 3B yapı ve optimizasyon analizleri yapılmıştır. Bu çalışma için kullanılan 156 adet ligand için ise, gerekli çizim işlemleri ve optimizasyon analizleri uygulanmıştır. Yapılan analizlerin ayrıntıları aşağıda açıklanmıştır.

3.1.1. Enzim yapılarının seçimi ve hazırlanması

İnsan ROCKI proteini 1354 aminoasit (NCBI sekans kodu: NP_005397.1), ROCKII proteini ise 1388 aminoasit (NCBI sekans kodu: NP_004841.2) uzunluğundadır. Bu proteinlerin kinaz domain bölgesi, ATP bağlanma bölgesini içermekte olup enzimin katalitik aktivitesi için önemli role sahiptir. Aynı zamanda ATP konumuna bağlanmak için yarışan yeni nesil inhibitörlerin hedef bağlanma bölgesidir. Bu nedenle bu çalışma bu proteinlerin katalitik aktivitesinden sorumlu olan ve ilaç molekülleri için hedef bölge olan katalitik domain kısımlarına yönelik yapısal analizler yapılmıştır. Bu amaçla

öncelikle ROCKI'in 76-338 aminoasit aralığı, ROCKII'nin 92-354 aminoasit aralığındaki katalitik bölgelerinin BLAST (Basic Local Alignment Sekans Tool) aracılığıyla çoklu sekans benzerlik analizleri yapılmıştır. Bu analiz doğrultusunda her iki proteinin kinaz domain kısmının insan türüne ait kristal yapılarının mevcut olduğu gözlenmiş olup, Protein Data Bankasından ROCKI için PDB kodlu 5BML, ROCKII için ise PDB kodlu 4WOT kristal yapıları seçilmiştir. Seçilen bu kristal yapılarını en düşük enerjili konformasyonlarına getirmek için NAMD programı ile enerji minimizasyon analizleri yapılmıştır.

3.1.2. Ligand yapılarının hazırlanması

Öncelikle, Yangbo Feng ve arkadaşları [18] tarafından hazırlanmış derleme yayınında, deneysel çalışmalar sonucunda etkin bulunan 156 adet ligand GaussView programı aracılığıyla çizilmiştir. Çizilen bu yapılar için, Gaussian 9.0 paket programı vasıtasıyla, kuantum mekaniği yöntemleri kullanılarak optimizasyon işlemleri yapılmıştır. Bu işlem için öncelikle, ligandlar semi-ampirik yöntemin PM3 metodu seçilerek **.com** dosya formatında kaydedilip optimizasyonları yapılmıştır. Ardından, DFT yönteminin B3LYP/6-31G* temel seti seçilerek hem optimizasyon hem de frekans hesaplamaları yapılarak yapılar en kararlı hale getirilen ligandlar **.pdb** dosya formatına çevrilerek doking işlemine hazırlanmıştır.

3.2. Moleküller Doking Protokolü

Bir önceki aşamada hazırlanmış olan enzim ile ligand yapıların etkileşim mekanizmasının aydınlatılması için doking işlemi yapılmıştır. Bu tez çalışmasında, enzim ve ligand arasındaki etkileşimleri incelemek ve etkileşme sürecinde hareket eden esnek bölgelerin ve ligandın pozisyonunu hesaplamak için AutoDock Tools (ADT) programı tercih edilmiştir.

ADT, iki ana program içermektedir. Bunlardan birincisi, üç boyutlu grid yapısının ön hesaplamalarının yapılması için kullanılan **AutoGrid** programı, diğeri ise ligandın hedef proteine doking işlemlerini sağlayan **AutoDock** programıdır.

Bu programın çalışma protokolü;

- Enerji minimizasyon analizi yapılan ROCKI ve ROCKII proteinlerinden eklenen su molekülleri çıkartılıp **.pdb** uzantılı dosya formatında kaydedilip AutoGrid programına yüklenmiştir. Bu programda bu yapılar için Kollman yükleri tanımlanıp **.pdbqt** dosya formatına dönüştürülmüştür.
- Çizim ve optimizasyon analizleri yapılan 156 adet ligand yapıları da **.pdb** uzantılı dosya formatında kaydedilip aynı şekilde **.pdbqt** formatına getirilmiştir.
- Hazırlanan **.pdbqt** dosyaları bir arada açıldıktan sonra bu yapılar arasındaki karakteristik bağlanma olasılıkların hesaplanması için grid bölgesi **AutoGrid programı** ile belirlenmiştir. Bu bölge hedef yapının x,y,z Kartezyen koordinatlarına göre **126,126,126** olarak grid kutusu, bu noktalar arası boşluk (grid space) **0.375 Å** belirlenmiştir. Bu parametreler doğrultusunda oluşturulan grid bölgesi **.gpf** (grid parameter file) formatında kaydedilmiştir.
- Ardından, doking hesaplamaları için gerekli olan arama algoritması Lamarkian Genetik Algoritma (LGA) seçilip, bu algoritmaya ait parametreler ve her bir ligand için **100** çalışma adımında doking hesaplamaların temelini oluşturan **.dpf** (docking parameter file) formatında kaydedilmiştir.
- Gerekli tüm hazırlık dosyaları tamamlandıktan sonra doking işlemi uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda her bir olası konformasyon durum için bağlanma serbest enerjisi (ΔG) ve bağlanma ilgisi (afinitesi) hesaplanarak oluşan sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın analiz sonuçları Bölüm 4'te verilmiştir.

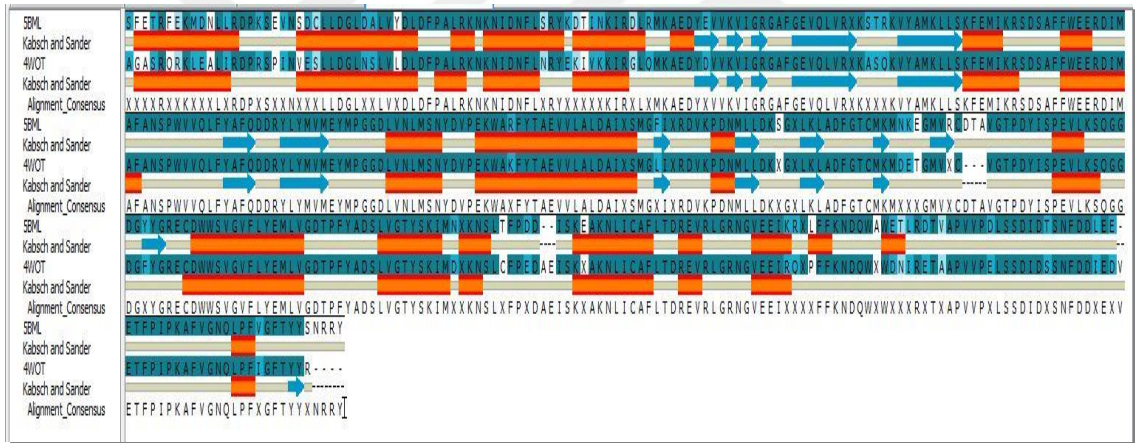
4. BULGULAR

4.1. Yapı-Analiz Sonuçları

Çalışmamızın 1.aşamasında enzimler ve ligandlar için yapılan yapı-analizlerinin sonuçları aşağıda verilmiştir.

Enzim yapıları için;

Hedef enzim yapılarımız olan ROCKI ve ROCKII'nin katalitik bölgelerinin aminoasit sekans bilgileri doğrultusunda, Protein Data Bankasındaki en iyi çözünürlüğe sahip olan kristal yapılar ROCKI için pdb kodu 5BML, ROCKII için ise pdb kodu 4WOT seçilmiştir (Tablo 4.1). Bu kristal yapıların BLAST yöntemi ile yapılan çoklu sekans hizalama analizine göre %92 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.1).

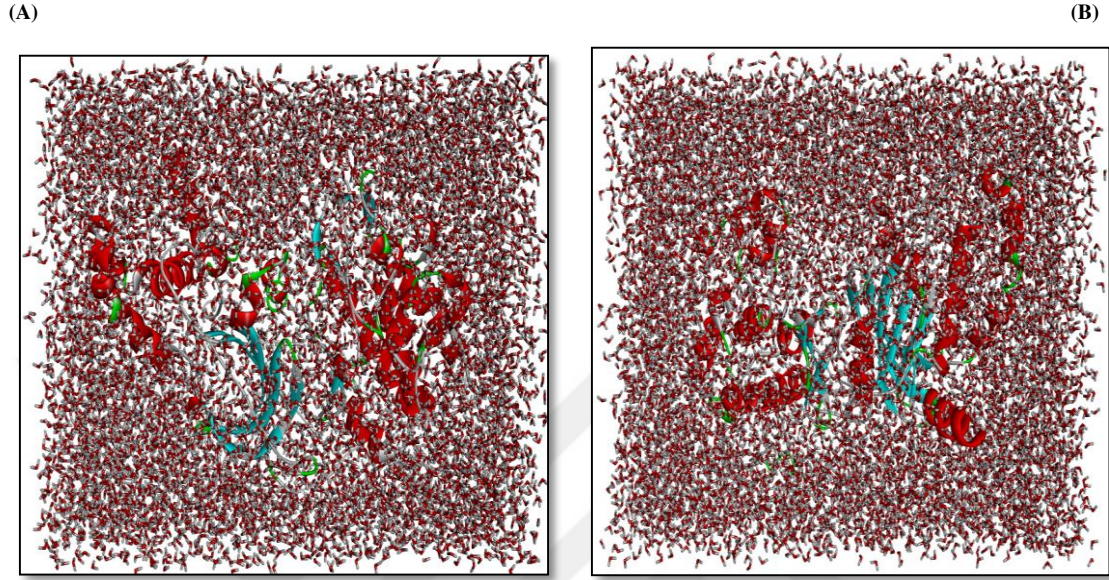


Şekil 4.1 5BML ve 4WOT arasındaki sekans analizinin gösterimi. Mavi renk: Beta-sheet, Turuncu renk: Alpha-helix ikincil yapılarını göstermektedir

Tablo 4.1 Seçilen proteinlerin pdb kodu ve özellikleri

PDB Kodu	Enzim Adı	Bulunduğu Organizma	Çözünürlük R(Å)	Aminoasit Sekans Uzunluğu	Keşif Yılı
5BML	ROCKI	Homo sapiens	2.95	6-415 aa arası	2015
4WOT	ROCKII	Homo sapiens	2.93	22-417 aa arası	2015

Seçilen bu yapılar için, NAMD programı ile enerji minimizasyonu analizi, ROCKI için 9671, ROCKII için ise 11018 tane su molekölü eklenerek 10000 çalışma adımı ile gerçekleştirilmiştir (şekil 4.2). Bu analiz sonucunda, en dūřuk enerji değerleri ROCKI için - **137797.0173 kcal/mol**, ROCKII için ise - **1540.5302 kcal/mol** hesaplanmıştır.



şekil 4.2 Minimizasyon öncesi ROCKI (A) ve ROCKII (B) için eklenen su molekölünün gösterimi

Bu yapıların minimizasyon öncesi ve sonrasındaki konformasyon değişimlerini saptamak amacıyla Virtual Molecular Dynamics (VMD) programı ile üştüşte çakıştırarak (şekil 4.3) Root Mean Square Deviation (RMSD) analizleri yapılmış olup; iskelet atomlarının ortalama RMSD değeri ROCKI için 0.602 Å, ROCKII için ise 0.575 Å olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

(A)



(B)



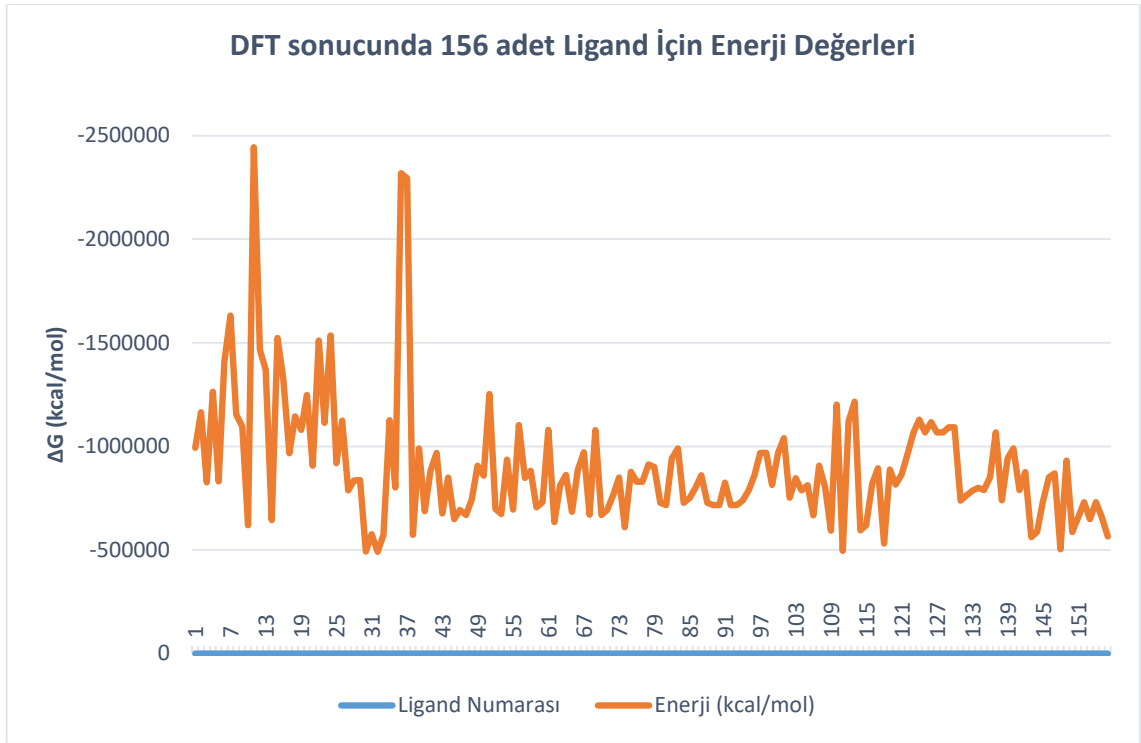
Şekil 4.3 (A) 5BML ve (B) 4WOT için enerji minimizasyonu öncesi ve sonrasındaki konformasyonlarının üst üste çakıştırılması

Tablo 4.2 Seçilen proteinlerin RMSD değerleri

	İskelet Atomlar		İskelet ve Yan Zincir	
	Ortalama RMSD	Toplam RMSD	Ortalama RMSD	Toplam RMSD
5BML	0,602	1,205	0,666	1,303
4WOT	0,575	1,15	0,683	1,36

Ligand yapıları için;

DFT yöntemiyle hem optimizasyon hem de frekans hesaplamaları yapılarak en kararlı hale getirilen 156 adet ligandın bağlanma enerji değerleri Şekil 4.4’de verilmiştir.



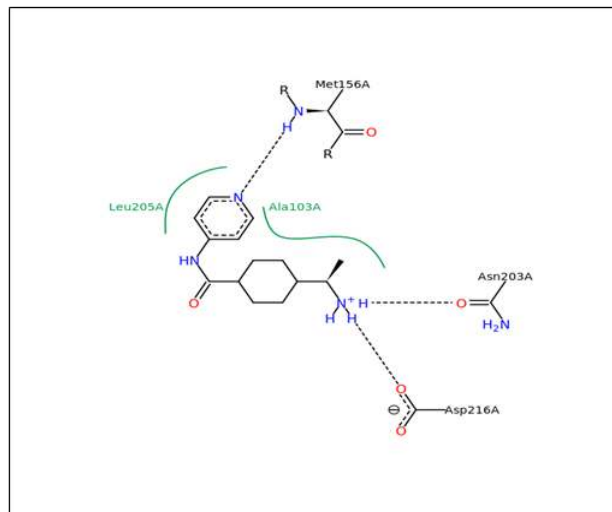
Şekil 4.4 DFT sonucunda 156 adet ligand için elde edilen enerji değerleri

4.2. Doking Analiz Sonuçları

Bu analize başlamadan önce Discovery Studio programı kullanılarak ile her iki enzim izoformunun yüzey analizleri yapılmıştır. Bu analize göre, ROCKI için yüzey alanı 2,613.92 Å² ve hacmi 4,944.91 Å³ bulunmuş olup 286 farmakofor özellik içerdiği gözlenmiştir. Bunlar sırasıyla 71 tanesi lipofilik, 68 tanesi H-alıcı ve 147 tanesi ise H-verici özellikleri bulundurmaktadır. ROCKII için ise yüzey alanı 4,574.63 Å² ve hacmi 10,935.6 Å³ bulunmuştur. Bu analiz sonucunda, yüzey alanın 427 farmakofor özellik içerdiği bunların 102 tanesi lipofilik, 59 tanesi H-alıcı ve 266 tanesi ise H-vericidir. Bu analizler Şekil 4.5'te verilmiştir.

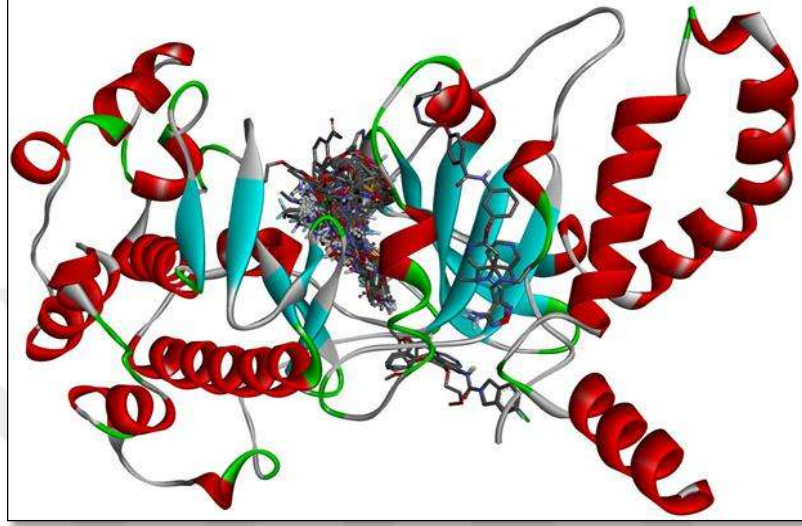
Yüzey analizinden sonra, hedef enzim ROCKI ve ROCKII ile 156 adet ligand yapılarının doking işlemi AutoDock programı ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu analizlerin sonuçları aşağıda verilmiştir.

ROCK'ın izoformları için spesifik inhibitör olarak kullanılan **Y-27632**'in ROCKI enzimi ile etkileşimi Jacobs ve arkadaşları tarafından deneysel analizlerle incelenmiş olup, bu inhibitör yapının ROCKI'in **Met156, Leu 205, Ala103, Asn203, Asp216** aminoasitleri ile uzak bağ etkileşimde bulunduğunu gözlemlemişlerdir [44] (Şekil 4.6).



23

Bizim yaptığımız doking analizlerine göre; 3, 157, 158, 124, 126 nolu ligand dışındaki 151 ligand yapısı ROCKI'in Y-27632 referans bileşiğine göre belirlenen etkileşim bölgesi ile etkileşim göstermiştir (Şekil 4.7). Ayrıca bu etkileşim bölgesinde bulunan aminoasitlere ek olarak, **Val90**, **Lys105**, **Val137**, **Asp160** ve **Asp202** aminoasitleri ile 151 adet ligand molekülü ile etkileşim bölgesinde yaygın olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7 5BML ile 156 adet ligandın çakıştırılması

Doking sonucunda oluşan her bir enzim-ligand (kompleks) yapısı için bağlanma serbest enerjileri (ΔG) ve bağlanma affinite (K_i) değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucu oluşan değerler ekler kısmında verilmiş olup en iyi bağlanma afinitesi gösteren 10 ligand yapısına ait ΔG ve K_i değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3 5BML ile en iyi bağlanma enerjisine sahip 10 ligand yapısı arasındaki etkileşim analizi sonucunda hesaplanan ΔG ve K_i değerleri

Ligand Numarası	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)
78	-12.99	0.30
47	-12.48	0.71
147	-12.03	1.52
150	-11.88	1.97
90	-11.76	2.38
1	-11.64	2.9
26	-11.51	3.67
144	-11.47	3.88
143	-11.39	4.49
149	-11.39	4.45

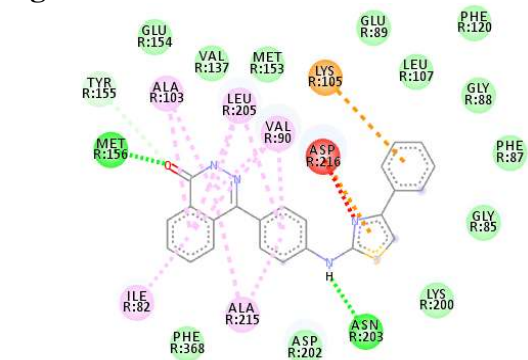
Buna göre ROCKI proteini için **78** nolu ligand yapısı **0.30 nM** bağlanma afinitesi değeri ile en iyi bağlayıcı olarak bulunmuş olup bu kompleks yapının serbest enerji değeri de - **12.99 kcal/mol** olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca yapılan toplam 156 ligandın doking analizleri sonucunda oluşan her bir kompleks yapı için etkileşim analizleri yapılmıştır. Bu analizler doğrultusunda, **17, 39, 73, 75, 76, 80, 82, 107, 115 ve 163** numaralı 2ETR-Y27632 kompleks yapısının etkileşim bölgesindeki aminoasitlerle ile birebir etkileşimde bulunmuş olup bu etkileşim analizlerinin 2B görüntüleri Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Bu kompleks yapılara ait bağlanma enerji ve K_i değerleri Tablo 4.4’de verilmiştir. Bu değerlere göre en iyi bağlanma enerjisi **163** numaralı ligand ile enzim arasında gözlemlenmiştir.

Tablo 4.4 2ETR-Y27632’nin etkileşim bölgesine göre en uyumlu bulunan ligandlara ait bağlanma enerjisi ve bağlanma affinite değerleri

Ligand Numarası	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)
163	-10.15	36.57
80	-9.88	57.42
17	-9.82	62.99
75	-9.8	66.09
76	-9.28	156.65
39	-9.26	163.01
115	-8.62	479.6
107	-8.38	718.49
73	-8.16	1040
82	-8.16	1050

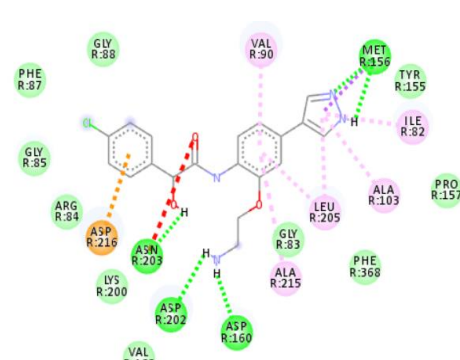
Ligand163



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Unfavorable Acceptor-Acceptor
- Pi-Cation
- Pi-Anion
- Pi-Alkyl

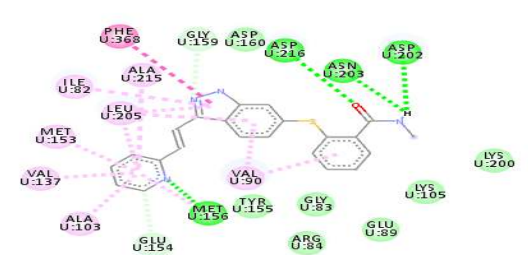
Ligand80



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Acceptor-Acceptor
- Pi-Anion
- Pi-Sigma
- Pi-Alkyl

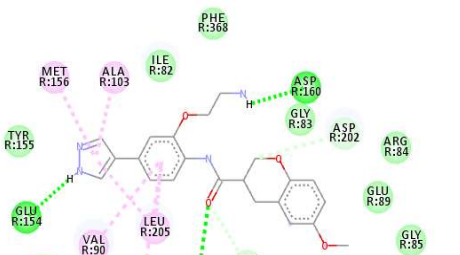
Ligand17



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Pi T-shaped
- Pi-Alkyl

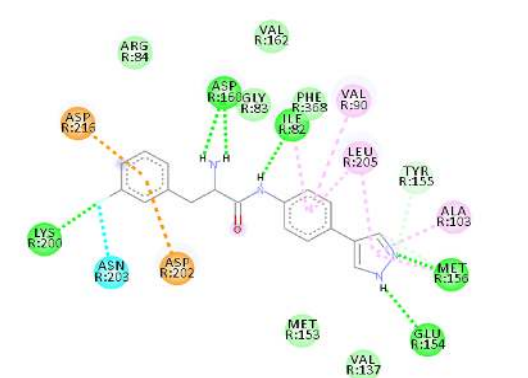
Ligand75



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Alkyl

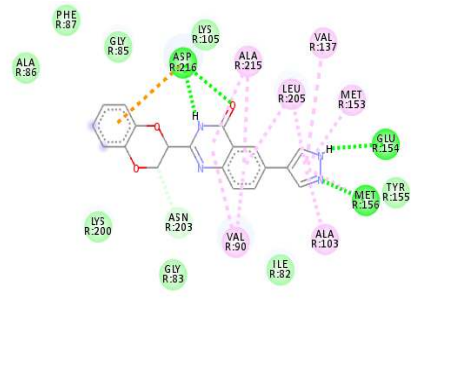
Ligand76



Interactions

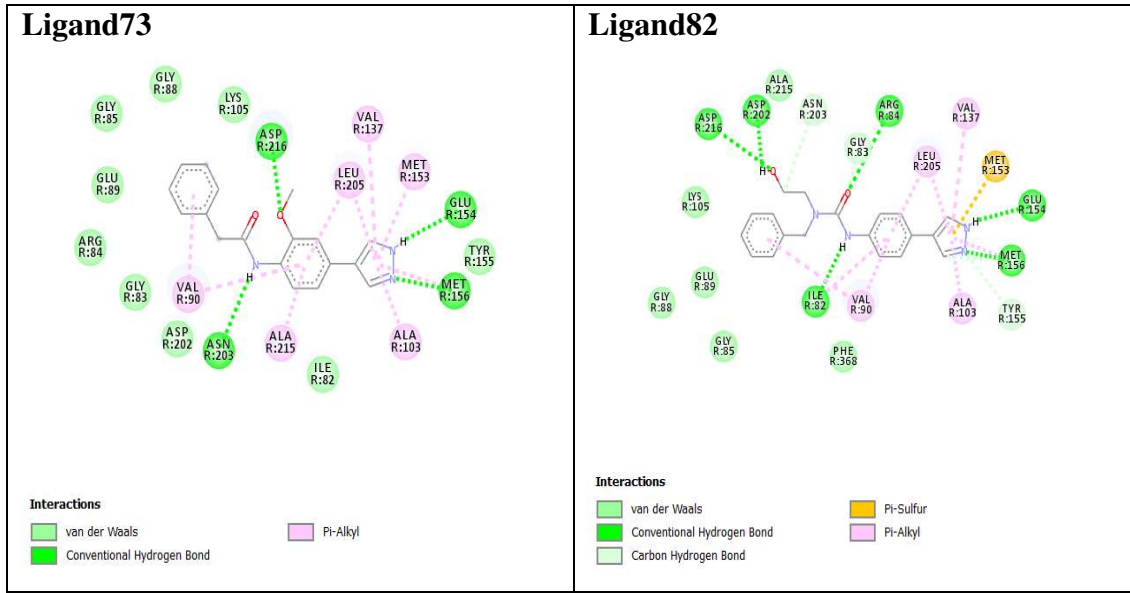
- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Halogen (Fluorine)
- Pi-Anion
- Pi-Alkyl

Ligand107



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Anion
- Pi-Alkyl

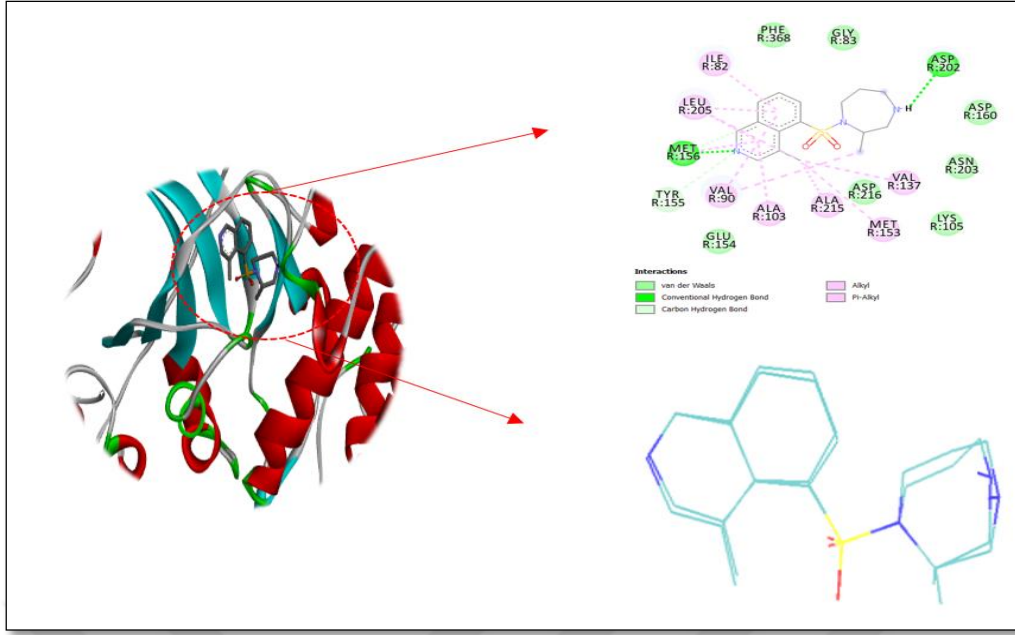


Şekil 4.8 5BML ile en iyi afinite gösteren 10 ligand yapısı arasındaki etkileşim analizinin 2B gösterimi

Bağlanma enerjisi ve bağlanma bölgesinin yanı sıra, toplam 156 adet ligand yapısı için doking sonrası konformasyon değişimlerini incelemek amacıyla RMSD (root mean square deviation) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.5). Bu analize göre en düşük RMSD değeri **30** numaralı liganda aittir. Bu ligand yapısı ROCKI enziminin yukardaki analizler sonucunda belirlenmiş olan bağlanma bölgesiyle etkileşimde olup bağlanma enerjisi **-9.38 kcal/mol** hesaplanmıştır. (Şekil 4.9).

Tablo 4.5 Doking öncesi ve sonrası oluşan ligand yapılarına ait hesaplanan en iyi 10 RMSD değerleri

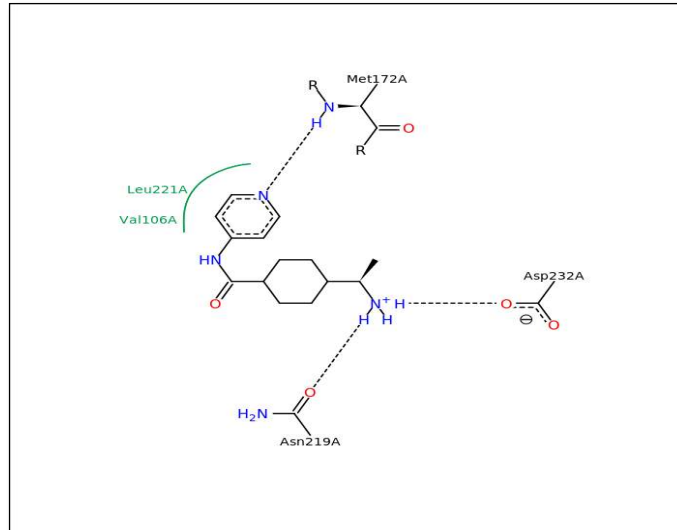
Ligand Numarası	Toplam RMSD Değeri
30	0.413
121	0.606
119	0.674
171	0.679
157	0.701
159	0.706
166	0.724
31	0.727
127-7	0.757
93	0.777



Şekil 4.9 5BML ile 30 nolu ligandın doking sonrası 2B ve ligandın RMSD görüntüsü

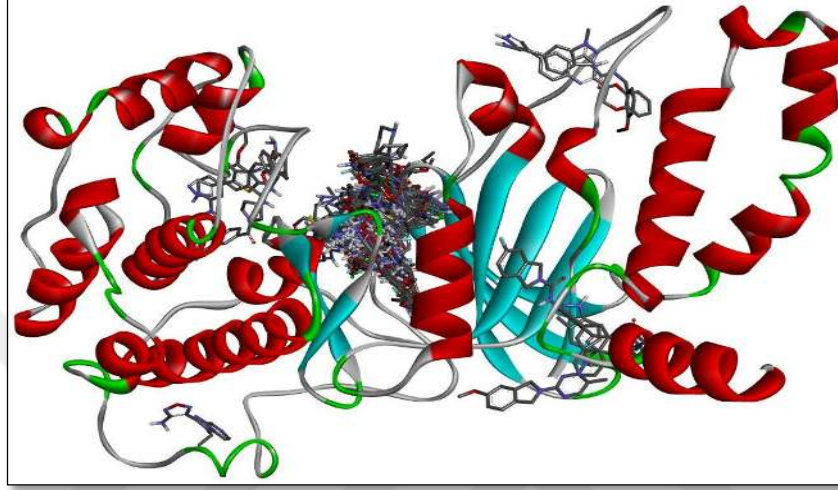
4.2.2. ROCKII'nin doking sonuçları

ROCK'ın izoformları için spesifik inhibitör olarak kullanılan Y-27632'in ROCKII enzimi ile etkileşimi Yamaguchi ve ekibi tarafından deneysel analizlerle incelenmiş olup, bu inhibitör yapının ROCKII'in **Met172**, **Leu221**, **Asp232**, **Asn219**, **Val106** aminoasitleri ile uzak bağ etkileşimde bulunduğunu gözlemlemişlerdir [45] (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 ROCKII (pdb kodu: 2H9V) ile Y27632 arasındaki etkileşim analizi

Bizim yaptığımız doking analizlerine göre; 98, 107, 110, 120, 121, 124, 153, 158, 159, 165 nolu ligand dışındaki 146 ligand yapısı ROCKII'ın Y-27632 referans bileşiğine göre belirlenen etkileşim bölgesi ile etkileşim göstermiştir (Şekil 4.11). Ayrıca bu etkileşim bölgesinde bulunan aminoasitlere ek olarak, **Arg100**, **Ala119**, **Lys121**, **Ala213** ve **Asp218** aminoasitleri ile 146 adet ligand molekülü ile etkileşim bölgesinde yaygın olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.11 4WOT ile 156 adet ligandın çakıştırılması

Doking sonucunda oluşan her bir kompleks yapısı için bağlanma serbest enerjileri (ΔG) ve bağlanma affinite (K_i) değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucu oluşan değerler ekler kısmında verilmiş olup en iyi bağlanma afinitesi gösteren 10 ligand yapısına ait ΔG ve K_i değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6 4WOT ile en iyi bağlanma enerjisine sahip 10 ligand yapısı arasındaki etkileşim analizi sonucunda hesaplanan ΔG ve K_i değerleri

Ligand Numarası	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)
1	-12.27	1.01
147	-12.23	1.09
24	-12.21	1.11
145	-12.06	1.45
47	-11.97	1.69
143	-11.72	2.55
150	-11.48	3.84
149	-11.47	3.88
148	-11.37	4.62
26	-11.36	4.75

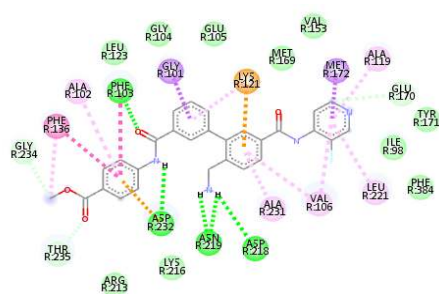
Bu analize göre ROCKII proteini için **1** nolu ligand yapısı **1.01 nM** bağlanma afinitesi değeri ile en iyi bağlayıcı olarak bulunmuş olup bu kompleks yapının serbest enerji değeri de **-12.27 kcal/mol** olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca yapılan toplam 156 ligandın doking analizleri sonucunda oluşan her bir kompleks yapı için etkileşim analizleri yapılmıştır. Bu analizler doğrultusunda, **23, 83, 112, 113, 114, 141, 144 ve 147** numaralı ligandlar 2H9V-Y27632 kompleks yapısının etkileşim bölgesindeki aminoasitlerle ile birebir etkileşimde bulunmuş olup bu etkileşim analizlerinin 2B görüntüleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Bu kompleks yapılara ait bağlanma enerji ve K_i değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Bu değerlere göre en iyi bağlanma enerjisi **147** numaralı ligand ile enzim arasında gözlemlenmiştir.

Tablo 4.7 2H9V-Y27632’nin etkileşim bölgesine göre en uyumlu bulunan ligandlara ait bağlanma enerjisi ve bağlanma affinite değerleri

Ligand Numarası	(ΔG) (kcal/mol)	K_i (nanomolar)
147	-12.23	1.09
23	-10.52	19.35
141	-10.43	22.53
113	-10.42	23.08
114	-10.28	29.22
144	-10.16	35.84
112	-9.82	63.17
83	-8.35	760.33

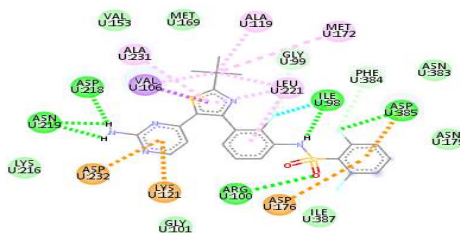
Ligand147



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Cation
- Pi-Anion
- Pi-Sigma
- Pi-Pi T-shaped
- Pi-Alkyl

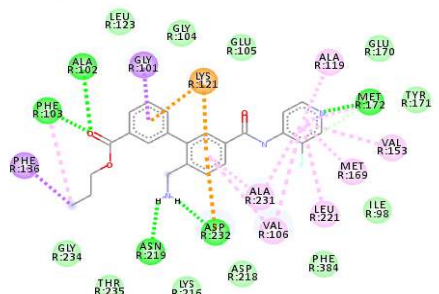
Ligand23



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Halogen (Fluorine)
- Pi-Cation
- Pi-Anion
- Pi-Sigma
- Alkyl
- Pi-Alkyl

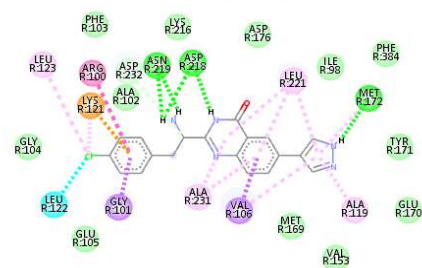
Ligand141



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Cation
- Pi-Anion
- Pi-Sigma
- Pi-Pi T-shaped
- Pi-Alkyl

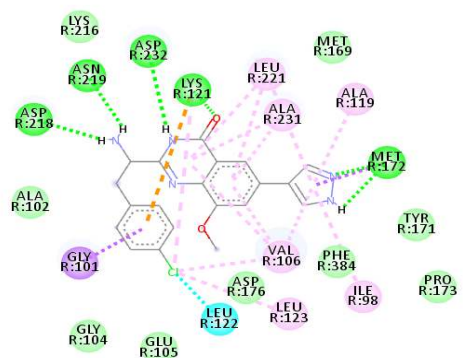
Ligand113



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Halogen (Cl, Br, I)
- Pi-Cation
- Pi-Sigma
- Amide-Pi Stacked
- Alkyl
- Pi-Alkyl

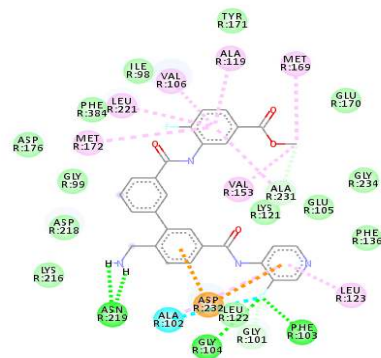
Ligand114



Interactions

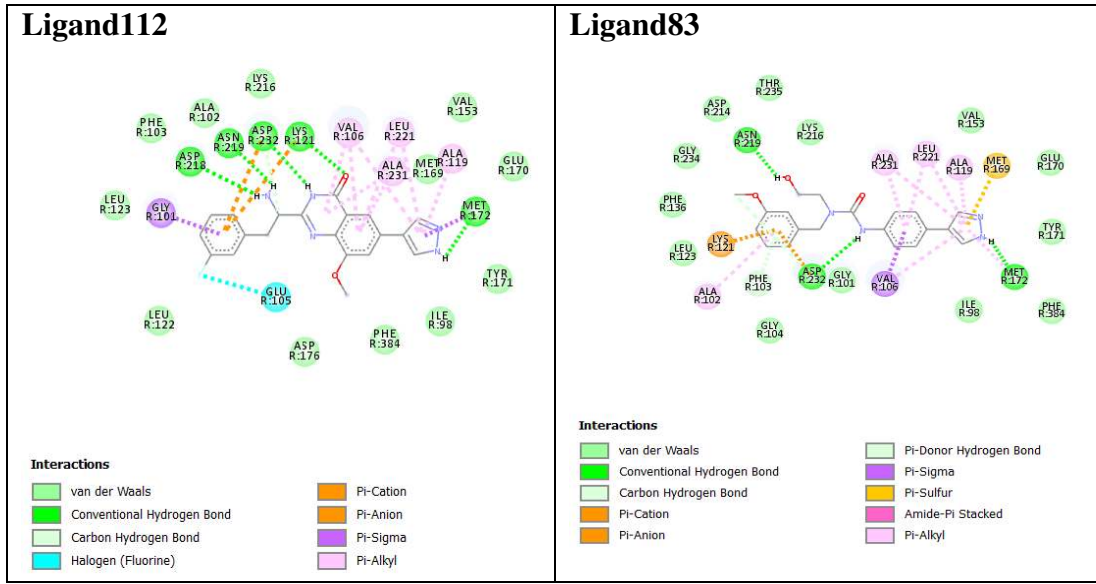
- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Halogen (Cl, Br, I)
- Pi-Cation
- Pi-Sigma
- Alkyl
- Pi-Alkyl

Ligand144



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Halogen (Fluorine)
- Pi-Cation
- Pi-Anion
- Alkyl
- Pi-Alkyl

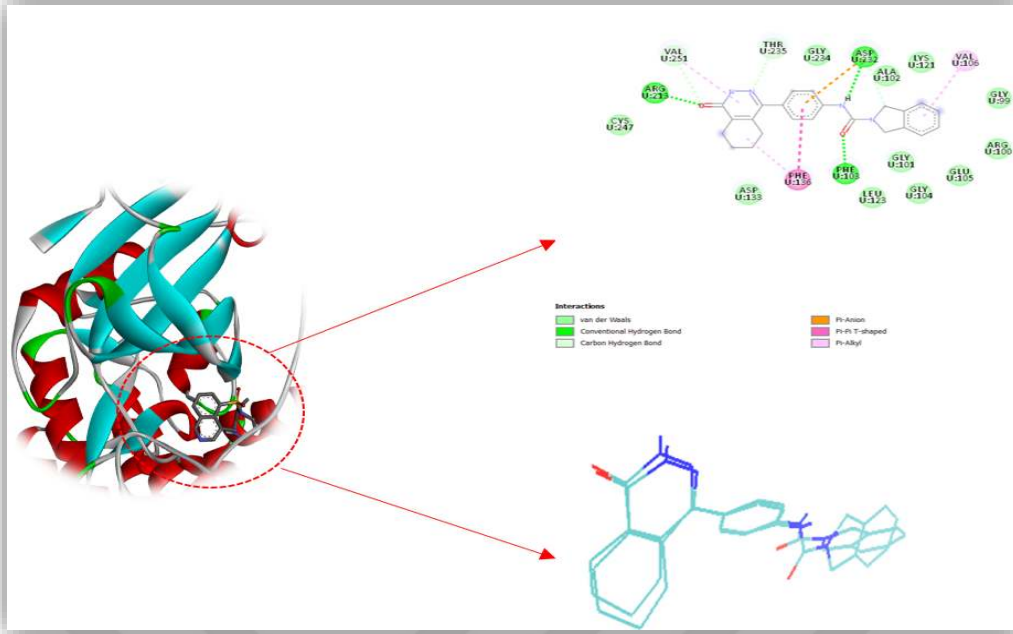


Şekil 4.12 4WOT ile en iyi afinite gösteren 10 ligand yapısı arasındaki etkileşim analizinin 2B gösterimi

Bağlanma enerjisi ve bağlanma bölgesinin yanı sıra, toplam 156 adet ligand yapısı için doking sonrası konformasyon değişimlerini incelemek amacıyla değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.8). Bu analize göre en düşük RMSD değeri **157** numaralı liganda aittir. Bu ligand yapısı ROCKII enziminin yukardaki analizler sonucunda belirlenmiş olan bağlanma bölgesiyle etkileşimde olup bağlanma enerjisi **-9.14 kcal/mol** hesaplanmıştır (Şekil 4.13).

Tablo 4.8 Doking öncesi ve sonrası oluşan ligand yapılarına ait hesaplanan en iyi 10 RMSD değerleri

Ligand Numarası	Toplam RMSD Değeri
157	0.565
107	0.69
131	0.696
124	0.91
93	0.971
87	1.001
54	1.02
96	1.034
171	1.049
32	1.063



Şekil 4.13 4WOT ile 157 nolu ligandın doking sonrası 2B ve ligandın RMSD görüntüsü

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, 156 adet ligand yapısı ROCK enziminin ROCKI ve ROCKII izoformları ile etkileşim analizleri hesaplamalı yöntemlerle incelenmiştir.

- ROCKI için 5BML ROCKII için ise 4WOT pdb kodlu kristal yapı tercih edilmiştir. Bu yapılar; ROCKI için 18 adet kristal yapı arasından, ROCKII için ise 2 adet kristal yapı arasından insan organizmasında olması, benzerliklerin %100 olması aynı zamanda en düşük çözünürlüğe sahip olma ait kriterler göz önüne alınarak belirlenmiştir.
- Bu kristal yapılar ile yapılan analizleri deneysel analizlerle karşılaştırmak amacıyla, ROCKI için 2ETR-Y27632, ROCKII için ise, 2H9V-Y27632 ait kristal yapılar kullanılmıştır.
- ROCKI için seçilen 5BML yapısı ile deneysel sonuçları karşılaştırmak için kullanılan 2ETR arasındaki sekans benzerliği %96.8, ROCKII için seçilen 4WOT yapısı ile deneysel sonuçları karşılaştırmak için kullanılan 2H9V arasındaki sekans benzerliği %94.7 bulunmuştur.
- Seçilen bu kristal yapılar 156 adet ligand yapısı ile AutoDock 4.2 programı ile etkileşim analizleri yapılmıştır. ROCKI için 151, ROCKII için ise 146 ligand yapı deneysel çalışmalar doğrultusunda bilinen bağlanma bölgeleri (2ETR-Y27632, 2H9V-Y27632) ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.7, Şekil 4.11).
- Doking analizi sonucunda oluşan kompleks yapılar için yapılan etkileşim analizleri sonucunda, ROCKI için belirlenen 151 ligandın 10 tanesi (**17, 39, 73, 75, 76, 80, 82, 107, 115, 163**), ROCKII için belirlenen 146 ligandın ise 8 tanesi (**147, 23, 141, 113, 114, 144, 112, 83**) deneysel çalışmalarda belirlenen aminoasitlerle birebir etkileşimde bulunmuştur. Ligand yapılarının farklı bulunması ROCKI ve ROCKII izoformlarının spesifik olduğunu göstermektedir.
- Doking analizi sonucunda oluşan enzim-ligand yapılar için hesaplanan bağlanma afinitesi ve ΔG değerlerine göre seçilen en iyi 10 ligandın etkileşim analizleri yapılmıştır. Bu yapılar arasından ROCKI için 78, 90 ve 144 yapıları ROCKII için 24, 145 ve 148 yapıları farklı bulunmuş olup bu izoform yapıları için spesifik olduğu öngörülmektedir.

- En iyi bağlanma affinitesi gösteren bu ligand yapıları ile enzim arasındaki etkileşim analizleri sonucunda, ROCKI için Ile82 ve Val90, ROCKII için ise Asp176 ve Ala231 aminoasitleri oldukça sık etkileşimde bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu aminoasitlerin, bu çalışmayla etkileşimde oldukça önemli role sahip oldukları öngörülmektedir.
- 156 adet ligand yapısı için doking sonrası konformasyon değişimlerini incelemek amacıyla RMSD değerleri hesaplanmıştır. ROCKI için 30, 31, 119, 121, 159, 166, 127-7 yapıları ROCKII için 32, 54, 87, 96, 107, 124, 131 yapıları farklı bulunmuştur.

ROCKI ve ROCKII'in arasındaki katalitik domainlerindeki benzerlikleri ne kadar yüksek olsa da ROCKI'in ve ROCKII'nin farklı bölgelerde eksprese olması bu izoformların vücutta farklı fonksiyonlarda görev aldığını literatürde bilinmektedir. Bu gerçeğin moleküler seviyede izahı için aynı 156 adet ligandın ile enzim yapıları arasındaki Moleküler doking çalışmasını 1) Etkileşim bölgesine göre, 2) Bağlanma enerjisine göre ve 3) RMSD değerleri göre değerlendirmemiz sonucunda **etkileşim bölgelerine** göre analiz sonuçlarının diğer iki parametreye göre daha doğru ve tutarlı sonuçlar ortaya çıkardığını görmekteyiz. Çünkü etkileşen ligandların her bir izoforma göre özellikli olması demek her iki yapı ile etkileşim benzerliğinin ya çok düşük ya da hiç olmamasını gerektirmektedir. Diğer önemli bir kısım etkileşen **yüzey bölgelerindeki farmakofor özelliğinin, yüzey hacminin ve alanının** farklılığıdır. Bu sonuçlar doğrultusunda ilerde de-novo analizi ile ilaç tasarımı yapılarak daha özgün, spesifik ilaç moleküllerin tasarlanması sağlanarak bu alanda yapılacak deneysel çalışmalara ışık tutması öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Pawson T, Raina M, Nash P. Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS letters*. 2002; 513:2–10.
2. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990). 2002; 38 Suppl 5:S3-10.
3. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002; 27:514–520.
4. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* New York, NY. 2002; 298:1912–1934.
5. Çoban Z.D, Güran Ş. Hücre içi sinyal iletimi mekanizmalarının kanser tanı ve tedavisindeki rolü. *Cumhuriyet Med J* 2013; 35: 302-310
6. Brylinski M, Skolnick J. Comprehensive structural and functional characterization of the human kinome by protein structure modeling and ligand virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2010; 50:1839–1854.
7. Faivre S, Djelloul S, Raymond E. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. *Seminars in Oncology*. 2006; 33:407–420.
8. Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005; 315:971–979.
9. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS letters*. 1996; 392:189–193.
10. Takahashi N, Tuiki H, Saya H, Kaibuchi K. Localization of the gene coding for ROCK II/Rho kinase on human chromosome 2p24. *Genomics*. 1999; 55:235–237.
11. Yoshinaga K, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Mori M. Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility. *Annals of Surgical Oncology*. 2003; 10:582–587.
12. Carlson HA, McCammon JA. Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Molecular Pharmacology*. 2000; 57:213–218.
13. Street AG, Mayo SL. Computational protein design. *Structure* (London, England: 1993). 1999; 7:R105-109.
14. Veselovsky AV, Ivanov AS. Strategy of computer-aided drug design. *Current Drug Targets Infectious Disorders*. 2003; 3:33–40.

15. van Linden OPJ, Kooistra AJ, Leurs R, de Esch IJP, de Graaf C. KLIFS: a knowledge-based structural database to navigate kinase-ligand interaction space. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 57:249–277.
16. Godden JW, Stahura F, Bajorath J. Evaluation of docking strategies for virtual screening of compound databases: cAMP-dependent serine/threonine kinase as an example. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. 1998; 16:139–143, 165.
17. Rudrabhatla P, Rajasekharan R. Functional characterization of peanut serine/threonine/tyrosine protein kinase: molecular docking and inhibition kinetics with tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry*. 2004; 43:12123–12132.
18. Feng Y, LoGrasso PV, Defert O, Li R. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016; 59:2269–2300.
19. Nelson MT, Humphrey W, Gursoy A, Dalke A, Kalé LV, Skeel RD, Schulten K. NAMD: a Parallel, Object-Oriented Molecular Dynamics Program. *The International Journal of Supercomputer Applications and High Performance Computing*. 1996; 10:251–268.
20. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009; 30:2785–2791.
21. Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. *The Journal of Cell Biology*. 2001; 153:569–584.
22. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*. 2001; 81:153–208.
23. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002; 420:629–635.
24. Lai A, Frishman WH. Rho-kinase inhibition in the therapy of cardiovascular disease. *Cardiology in Review*. 2005; 13:285–292.
25. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001; 22:32–39.
26. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2006; 290:C661-668.
27. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *The Journal of Physiology*. 2000; 522 Pt 2:177–185.
28. Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, Kandabashi T, Egashira K, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovascular Research*. 1999; 43:1029–1039.

29. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997; 389:990–994.
30. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:29051–29054.
31. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *The EMBO Journal*. 1996; 15:1885–1893.
32. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *The EMBO Journal*. 1996; 15:2208–2216.
33. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005; 4:387–398.
34. Thumkeo D, Keel J, Ishizaki T, Hirose M, Nonomura K, Oshima H, Oshima M, Taketo MM, Narumiya S. Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23:5043–5055.
35. Fujisawa K, Fujita A, Ishizaki T, Saito Y, Narumiya S. Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271:23022–23028.
36. Zhu L, Yang Y, Lu X. The selectivity and promiscuity of brain-neuroregenerative inhibitors between ROCK1 and ROCK2 isoforms: An integration of SB-QSSR modelling, QM/MM analysis and in vitro kinase assay. *SAR and QSAR in environmental research*. 2016; 27:47–65.
37. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007; 50:17–24.
38. Cohen, N. C. *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design*. XIII Ed. Academic Press Inc, 1996.
39. Hanna MW. *Quantum Mechanics in Chemistry*, 3rd Ed. Benjamin:Cummings Pub. Co, Masachusetts,1980
40. Binkley JS, Pople JA, Hehre WJ. Self-consistent molecular orbital methods. 21. Small split-valence basis sets for first-row elements. *Journal of the American Chemical Society*. 1980; 102:939–947.
41. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*. 2006; 65:15–26.

42. Moitessier N, Englebienne P, Lee D, Lawandi J, Corbeil CR. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 153 Suppl 1:S7-26.
43. Kroemer RT. Structure-based drug design: docking and scoring. *Current Protein & Peptide Science*. 2007; 8:312–328.
44. Jacobs M, Hayakawa K, Swenson L, Bellon S, Fleming M, Taslimi P, Doran J. The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281:260–268.
45. Yamaguchi H, Miwa Y, Kasa M, Kitano K, Amano M, Kaibuchi K, Hakoshima T. Structural basis for induced-fit binding of Rho-kinase to the inhibitor Y-27632. *Journal of Biochemistry*. 2006; 140:305–311.



EKLER

ROCKI ve ROCKII enziminin 156 adet ligand arasındaki etkileşim analizi sonucunda AutoDock programıyla hesaplanan bağlanma enerjisi (ΔG) ve K_i değerleri

Ligand Numarası	ROCKI		ROCKII	
	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)
1	-11.64	2.9	-12.27	1.01
2	-8.20	967.85	-8	1370
3	-7.33	4260	-6.6	14560
4	-8.55	540.8	-8.12	1110
5	-9.23	172.43	-8.08	1200
6	-8.42	671.31	-8.21	963.19
7	-9.56	98.52	-10.31	27.89
8	-10.46	21.56	-10.3	28.27
9	-10.75	13.09	-10.3	27.99
10	-8.45	639.66	-8.02	1320
11	-8.43	664.09	-9.14	200.93
12	-8.96	271.6	-9.54	101.5
13	-9.83	62.68	-9.84	61.71
14	-7.29	4500	-6.86	9410
15	-10.20	33.6	-10.49	20.59
16	-8.34	770.68	-7.99	1390
17	-9.82	62.99	-8.97	266.34
18	-11.06	7.75	-10.86	11.02
19	-8.34	773.93	-8.35	755.98
20	-8.72	402.69	-8.79	361.96
21	-8.70	417.37	-9.39	131.35
23	-10.53	19.01	-10.52	19.35
24	-10.92	9.98	-12.21	1.11
25	-11.2	6.15	-10.73	13.75
26	-11.51	3.67	-11.36	4.75
27	-8.30	828.5	-8.49	596.29
28	-8.86	2310	-8.55	538.41
29	-9.04	475.23	-8.46	624.11
30	-9.38	133.93	-8.42	676.17
31	-9.11	211.18	-8.59	508.29
32	-10.38	24.61	-9.54	101.39
33	-8.77	369.84	-8.47	617.92
34	-9.73	74.04	-9.41	127.34
38	-7.92	1570	-8.37	737.02
39	-9.26	163.01	-8.96	268.48
40	-9.14	200.17	-8.94	280.42

	ROCKI		ROCKII	
Ligand Numarası	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)
41	-11.31	5.15	-9.87	58.15
42	-8.00	1370	-8.23	928.55
43	-8.76	378.03	-8.88	312.15
44	-10.24	31.26	-9.92	53.43
46	-10.9	10.22	-9.76	69.92
47	-12.48	0.71268	-11.97	1.69
49	-9.81	63.91	-9.37	135.64
51	-8.44	646.18	-8.3	826.25
52	-7.83	1810	-9.03	241.61
53	-9.76	69.85	-9.58	95.72
54	-9.43	122.26	-9.75	71.65
55	-9.15	196.58	-8.73	401.61
57	-7.78	1980	-8.1	1150
58	-7.85	1770	-8.33	779.36
59	-9.08	219.13	-9.47	114.36
60	-10.26	29.99	-10.07	41.67
61	-8.09	1180	-7.75	2090
62	-8.95	273.19	-9.22	175.76
63	-8.84	332.75	-8.86	321.07
65	-9.39	131.93	-9.06	227.96
66	-9.54	102.48	-9.77	69.03
67	-10.84	11.24	-9.67	82.15
69	-8.03	1290	-8.48	613.13
70	-8.92	290.15	-9.01	247.22
72	-9.56	98.14	-9.39	131.79
73	-8.16	1040	-7.79	1960
74	-9.68	80.33	-8.92	289.04
75	-9.8	66.09	-9.66	82.4
76	-9.28	156.65	-9.09	216.29
77	-10.67	15.06	-9.3	151.4
78	-12.99	0.30298	-11.26	5.61
79	-9.67	81.28	-9.21	176.44
80	-9.88	57.42	-9.51	107.4
81	-7.85	1760	-7.75	2080
82	-8.16	1050	-7.83	1810
83	-8.61	492.19	-8.35	760.33
84	-9.22	173.83	-8.91	296.25
85	-7.71	2220	-7.62	2600
87	-10.64	15.97	-10.19	34.2
88	-9.63	87.79	-8.94	279.23
89	-9.77	68.56	-9.22	175.58
90	-11.76	2.38	-10.69	14.65
91	-10.12	38	-9.42	124.3

	ROCKI		ROCKII	
Ligand Numarası	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)
92	-9.07	226.35	-8.62	481.58
93	-8.25	894.8	-8.12	1120
95	-9.37	134.73	-9.2	181.06
96	-9.88	57.41	-9.94	51.41
97	-8.74	393.9	-9.2	180
98	-10.01	45.76	-8.89	305.86
99	-8.46	634.1	-8.63	475.89
100	-9.22	174.36	-10.32	27.27
101	-8.8	353.76	-8.62	482.5
102	-8.82	342.01	-8.95	273.58
103	-9.4	129.69	-9.3	151.35
104	-10.22	32.46	-9.62	89.24
105	-9.15	197.17	-8.7	420.06
106	-9.37	135.18	-9.44	119.33
107	-8.38	718.49	-8.09	1180
108	-9.11	209.47	-8.37	733.99
109	-9.16	194.02	-8.71	409.82
110	-9.9	55.45	-9.07	225.49
111	-9.52	104.78	-9.64	85.43
112	-10.59	17.38	-9.82	63.17
113	-11.24	5.77	-10.42	23.08
114	-11.12	7.05	-10.28	29.22
115	-8.62	479.6	-8.49	593.83
116	-9.39	131.23	-9.86	59.1
117	-9.12	207.94	-9.31	150.36
118	-9.41	126.17	-9.13	204.55
119	-8.14	1070	-8.14	1070
120	-10.64	15.9	-11.5	3.75
121	-10.21	32.63	-9.72	74.77
122	-9.5	109.5	-8.1	1160
123	-11.26	5.62	-11.02	8.32
124	-6.84	9620	-6.47	18140
125	-9.72	74.7	-11.02	8.36
126	-11.05	7.89	-11.19	6.23
127-1	-9.33	145.35	-8.83	336.71
127-2	-9.95	50.69	-9.75	71.34
127-3	-10.51	19.91	-9.25	164.47
127-4	-9.45	117.38	-8.95	273.98
127-5	-10.76	12.98	-9.51	106.19
127-6	-10	46.76	-9.54	101.15
127-7	-9.68	80.87	-9.16	194.26
131	-8.45	635.06	-8.61	488.86
132	-8.36	745.09	-8.38	715.25

Ligand Numarası	ROCKI		ROCKII	
	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)	ΔG (kcal/mol)	K_i (nanomolar)
133	-8.91	292.6	-8.79	361.35
134	-9.67	81.63	-8.65	455.14
135	-8.45	638.44	-8.63	472.96
138	-10.3	27.99	-10.26	30.15
140	-11.28	5.38	-9.84	61.56
141	-11.24	5.77	-10.43	22.53
142	-10.68	14.84	-9.45	118.33
143	-11.39	4.49	-11.72	2.55
144	-11.47	3.88	-10.16	35.84
145	-11.26	5.6	-12.06	1.45
146	-10.98	8.91	-10.78	12.54
147	-12.03	1.52	-12.23	1.09
148	-11.29	5.3	-11.37	4.62
149	-11.39	4.45	-11.47	3.88
150	-11.88	1.97	-11.48	3.84
152	-10.35	25.93	-9.53	103.24
153	-9.91	54.07	-9.39	131.61
154	-10.62	16.36	-9.53	104.22
155	-10.14	37.08	-9.34	141.78
157	-9.53	103.3	-9.14	198.11
158	-9.5	109.57	-9.27	159.44
159	-9.89	56.59	-9.29	155.97
161	-9.18	187.47	-9.12	205.83
162	-9.47	113.54	-9.49	110.92
163	-10.15	36.57	-9.7	78.15
164	-10.57	17.79	-9.86	59.46
165	-8.31	805.95	-8.39	703.74
166	-9.35	140.21	-8.37	734.23
167	-10.48	20.85	-9.5	108.1
168	-9.26	162.48	-8.16	1040
169	-10.05	43.34	-8.78	365.87
170	-8.03	1300	-8.13	1110
171	-8.9	298.41	-8.6	495.68
172	-10.28	29.21	-10.49	20.32

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Gaziantep’ de doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep’ de tamamlayıp, 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi İstatistik Bölümü’nden bölüm üçüncüsü olarak mezun oldu. 2012 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Biyobilişim ve Hesaplamalı Biyoloji’de yüksek lisans eğitimine başladı.

