

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IRE1-JNK Yolağı
Protein-Protein ve Protein-Ligand Etkileşimlerinin
Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemiyle Araştırılması

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Zekeriya DÜZGÜN

DANIŞMAN
Doç. Dr. Zuhal EROĞLU

İZMİR
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IRE1-JNK Yolağı
Protein-Protein ve Protein-Ligand Etkileşimlerinin
Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemiyle Araştırılması

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Zekeriya DÜZGÜN

DANIŞMAN
Doç. Dr. Zuhal EROĞLU

İZMİR
2019

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan
(Danışman)

: Doç. Dr. Zuhale EROĞLU



Üye

: Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ



Üye

: Prof. Dr. Cenk SELÇUKİ



Üye

: Doç. Dr. Ebru ALP



Üye

: Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ



Doktora Tezinin kabul edildiği tarih

03.01.2019

ÖNSÖZ

Moleküler modelleme ve hesaplamalı yapısal biyoloji alanında kendimi geliştirme serüveninde karşıma çıkan her zorlukta daha fazla motive olarak ve daha fazla öğrenerek heyecanlı yolculuğuma devam etmeyi başarmamda geçmişten gelen birikim ve deneyimlerimin yadsınamaz bir yeri vardır. Bu zorlu multi disiplinler öğrenme sürecinde attığım her adımda ufuğun aslında ne kadar uzakta olduğunu daha iyi anlıyorum. Zorlu ve bir o kadar da heyecan verici yeni ve Tıbbi Biyoloji için sıradışı hesaplamalı yapısal biyolojik bilimler yaklaşımını benimseyip kendimi daha ileriye götürmemde motivasyonumu hep daha yukarıya taşıyan Sevgili Danışmanım Doç. Dr. Zuhal Eroğlu'nun payı çok büyüktür. Ayrıca Tıbbi Biyoloji bölümü içindeki tüm hocalarım ve arkadaşlarım, deneysel çalışmalar yerine bölüm için çok sıradışı olan hesaplamalı yaklaşımı tercih etmemde beni hep destekleyerek başarılı olacağıma olan inançlarını bana göstererek moral ve motivasyonumu sürekli yüksek tutarak çalışmalarımın tamamlanmasında büyük paya sahip oldular.

Hesaplamalı yapısal biyoloji Türkiye'de çok yeni fakat çok hızlı ilerleyen ve ilerledikçe daha fazla ilgi çeken bir bilim dalı olarak araştırmalarda daha fazla kendine yer bulmaktadır. Dünyada hızla gelişip yaygınlaşan bu alanı doktora tezimde kullanarak Tıbbi Biyoloji'de bu alanın kullanılıp yaygınlaşmasında gelecekte rolü olabilecek yenilikçi insanlar arasında yer almayı hedefleyerek motivasyon ve çalışma azmimi hep yüksek tutmaya, böylece ülkem için hep en iyisini yapmak yolunda tüm enerjimi harcamaya devam edeceğim.

Zorlu ama bir o kadar da heyecan verici bu bilim yolculuğunda katkılarını esirgemeyen herkese ve özellikle bu süreçte tüm sıkıntılarıma katlanıp sevgi ve saygısını eksik etmeyerek beni yalnız bırakmayan Sevgili Eşim Havva DÜZGÜN'e çok teşekkür ederim.

İzmir, Ocak 2019

Zekeriya DÜZGÜN

Özet

IRE1-JNK Yolağı Protein-Protein ve Protein-Ligand Etkileşimlerinin Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemiyle Araştırılması

IRE1-JNK yolağı Endoplazmik Retikulum (ER) stresine karşı hücrenin yanıt verdiği en güçlü sinyal yolağıdır. Hipoksi gibi koşullarda aşırı ER stresine bağlı olarak bu yolak üzerinden apoptotik mekanizma tetiklenerek hücre ölümü meydana gelmektedir. Kardiyovasküler hastalıklarda hücreler aşırı ER stresine maruz kalabilmekte ve apoptoza bağlı hücre ve doku kaybı meydana gelebilmektedir. Kardiyovasküler hastalıklarda etkili Statin, ACE inhibitörleri, Anti-Aritmik ilaçlar ve Flavonoid'lerin IRE1-JNK yolağı üzerindeki IRE1, ASK1 ve JNK1 ile etkileşimi tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca IRE1-JNK yolağının en önemli başlatıcı ya da durdurucu faktörü olan BİP-IRE1LD bağlanması bilinmesine karşın bağlanmanın moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda kardiyovasküler hastalıklarda etkili etken maddeler ve Flavonoid'lerin kendi etkileri dışında IRE1-JNK yolağının inhibisyonunda rol oynayıp oynamadıklarını belirlemek amacıyla IRE1, ASK1 ve JNK1 ile etkileşimleri moleküler kenetleme, moleküler dinamik simülasyon ve serbest enerji hesaplamalarıyla araştırıldı. Ayrıca BİP'in konformasyonel dinamiği ve BİP-IRE1LD etkileşiminin moleküler mekanizmasını aydınlatmak hedefiyle moleküler dinamik simülasyon ve serbest enerji hesaplamaları yapıldı. Olası BİP-IRE1LD bağlanma paternlerini belirlemek amacıyla iri taneli model ve kübik oryantasyonda moleküler dinamik simülasyonlar gerçekleştirildi. Yaptığımız çalışmada BİP'in yüksek esneklikteki SBD α alt domaininin kısa süreli burkulması ve tekrar eski durumuna dönmesi sonucu serbest enerji yüzeyinde minima meydana geldiği gözlemlendi. Bağlanma konformasyonu bilinen farklı büyüklük ve esneklikte olan Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-ubikuitin kompleksi (2MWS), ubikuitin-USP2 kompleksi (2HD5), kimerik SDZ CHI621'in fab fragmenti (1MIM) ve Sil1-BİP komplekslerinin (3QML) bağlanma paternini iri taneli kübik oryantasyon yaklaşımı ile doğru tahmin etmek için istatistiksel olarak ROC eğrisi ile hesaplandığında F-değeri ve doğruluğu (ACC) 0,88 olarak ölçüldü. AUROC değeri ise 0,94 olarak belirlendi. BİP-IRELD etkileşiminin olası bağlanma paternleri taneli kübik oryantasyon yaklaşımı ile araştırıldığında, IRE1LD'in 4. bölgesi içinde yer alan düzensiz domainin BİP-NBDII β açık formunun kapalı forma göre daha yüksek afinite ile bağlandığı ayrıca BİP-SBD α alt domainin bağlanmada direkt rol oynadığı gözlemlendi. IRE1, ASK1 ve JNK1 ile kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan etken maddeler ile Flavonoid'lerin etkileşimlerinin araştırıldığı bu çalışmada proteinlerin fosforilasyonunun inhibisyonunda Statinler'in en etkili moleküller olabileceği gözlemlendi. Ayrıca yaptığımız Umbrella Örnekleme Serbest Enerji Hesaplamalarında Statin'lerden Atorvastatin ve Pitavastatin ile Flavonoid'lerden

Norizalpin, Chrysin ve Luteolin'in yüksek ortalama kuvvet potansiyelleri ile IRE1-JNK yolağının inhibisyonunda güçlü aday moleküller olabileceği gösterildi. Yaptığımız bu çalışmalar ile belirlenen BİP-IRE1LD bağlanma paterninin BİP ve IRE1LD hedefli ileri teröpatik çalışmalara ışık tutacağı, İri taneli kübik oryantasyon yaklaşımının hızlı ve kolay kullanımı için algoritmalar yazılarak yüksek esneklikteki protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanımının faydalı olabileceği ve IRE1-JNK yolağı etken madde etkileşimleri sonucu elde edilen veriler ışığında Statinler üzerinden geliştirilerek etken türev maddelerin ER stresi kaynaklı apoptozun önlenmesinde etkili olabileceğine inanmaktayız.

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

Anahtar Kelimeler

Moleküler Dinamik Simülasyon; Endoplazmik Retikulum Stresi; Katlanmamış Protein Tepkisi; Kardiyovasküler hastalıklar, Statinler; Flavonoidler

Abstract

Investigation of Protein-Protein and Protein-Ligand Interactions in IRE1-JNK Pathway by Molecular Dynamic Simulation Method

The IRE1-JNK pathway is the strongest signaling pathway to respond to ER stress in the cell. Due to excessive ER stress in some conditions such as hypoxia, cell death occurs by initiating the apoptotic mechanism via this pathway. In cardiovascular diseases, cells may be exposed to excessive ER stress. Therefore, cells and tissue loss may occur due to apoptosis. The interaction of statins, ACE inhibitors, anti-arrhythmic drugs and flavonoids that effective in cardiovascular diseases with IRE1, ASK1 and JNK1 on the IRE1-JNK pathway is not fully known. In addition, binding of BiP-IRE1LD complex that is most important initiating or stopping factor of the IRE1-JNK pathway is known, but the molecular mechanism of the binding is not fully elucidated. In our study, the interactions of IRE1, ASK1 and JNK1 with the small molecule drugs and flavonoids were investigated by "molecular docking", "molecular dynamics simulation" and "free energy calculations" to determine whether these drugs and flavonoids could play a role or not in the inhibition of the IRE1-JNK pathway in cardiovascular diseases. In addition, molecular dynamic simulation and free energy calculations were performed to elucidate the conformational dynamics of BiP and molecular mechanism of BiP-IRE1LD binding interaction. In the coarse-grained model and cubic orientations, Molecular dynamic simulations were carried out to determine possible BiP-IRE1LD binding patterns. In our study, short term bending of highly flexible SBD α subdomain and returning to the old state was observed that there was a minima on the free energy surface of BiP. Whether correctly predicted the binding pattern of the four different protein complexes that are Ddi1 ubiquitin-like (UBL) domain-ubiquitin complex (2MWS), ubiquitin-USP2 complex (2HD5), fab fragment (1MIM) of chimeric SDZ CHI621 and Sil1-BiP complexes (3QML) known with their binding conformation by coarse-grained cubic orientation approach were statistically measured with F-value and accuracy (ACC) and calculated as 0,88. AUROC value was determined as 0.94. When the possible binding patterns of the BiP-IRELD interaction were investigated by the coarse-grained cubic orientation approach, the disordered domain of the IRE1LD IV. region was bound to the BiP-NBDII β open form with a higher free energy difference in comparison with closed form, in addition BiP-SBD α sub-domain played a direct role to the binding of IRE1LD. In the study of the interaction of small molecule drugs and Flavonoids that are effective in cardiovascular diseases with IRE1, ASK1 and JNK1, it was observed that Statins could be the most effective molecules in the inhibition of phosphorylation of these proteins. Furthermore, free energy calculations by umbrella sampling were shown that Norizalpine,

Chrysin, Luteolin from flavonoids and Atorvastatin, Pitavastatin from Statins could be strong candidate molecules in the inhibition of IRE1-JNK pathway with high potential of mean force. The BiP-IRE1LD binding pattern determined by these studies will shed light on BiP and IRE1LD-targeted therapeutic studies. It may be useful to write algorithms for rapid and easy use of coarse-grained cubic orientation approach to determination of high flexible protein-protein interactions. In the light of the data that we have obtained from result of small molecule interactions with the IRE1-JNK pathway, the molecules to be derived from Statins could be thought effective in preventing severe ER stress induced apoptosis.

The numerical calculations reported in this paper were partially performed at TUBITAK ULAKBIM, High Performance and Grid Computing Center (TRUBA resources).

Key words

Molecular Dynamic Simulation; Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response; Cardiovascular diseases, Statins; Flavonoids

İçindekiler

BÖLÜM I	1
1.1. Giriş	1
1.2. Genel Bilgiler	2
1.2.1. IRE1-JNK Yolağı	2
1.2.1.1. IRE1 Üzerinden Apoptoz Sinyal Yolağı	3
1.2.1.2. BİP (İmmünoglobulin Ağır Zincir Bağlayıcı Protein) Proteinini	4
1.2.1.2.1. BİP'in Fonksiyon ve Yapısı	4
1.2.1.2.2. BİP-IRE1 Etkileşimi	5
1.2.1.3. IRE1 (İnositole Gereksinim Duyan Enzim 1) Proteinini	6
1.2.1.4. ASK1 (Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1) Proteinini	7
1.2.1.5. JNK1 (C-Jun N-Terminal Kinaz 1) Proteinini	8
1.2.2. Kardiyak İlaçlar	10
1.2.2.1. Statinler	10
1.2.2.2. ACE İnhibitörleri	11
1.2.2.3. Antiaritmik İlaçlar	11
1.2.2.4. Flavonoidler	11
1.2.3. Protein-Protein ve Protein-Ligand Etkileşimine Hesaplamalı Yaklaşım	12
1.2.3.1. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyon	13
1.2.3.1.1. Moleküler Etkileşimler	14
1.2.3.1.1.1. Bağlı Atomlar Arası Etkileşimler	14
1.2.3.1.1.2. Bağlı Olmayan Atomlar Arası Etkileşimler	14
1.2.3.1.1.3. Elektrostatik Etkileşimler	15
1.2.3.1.1.4. Lennard-Jones Potansiyeli ve Van Der Waals Etki Alanı	15
1.2.3.1.2. Sistem Tasarımı İçin Gerekli Topluluklar (Ensembles)	16
1.2.3.1.3. Kuvvet Alanları	17
1.2.3.1.4. Periyodik Sınır Koşulları	21
1.2.3.1.5. Termostat ve Barostatlar	22
1.2.3.1.6. Moleküler Dinamik Simülasyonunun Ana Adımları	23
1.2.3.1.6.1. Sistem Hazırlığı	23
1.2.3.1.6.2. Minimizasyon / Gevşeme	23
1.2.3.1.6.3. Dengeleme	23
1.2.3.1.6.4. Üretim	24
1.2.3.2. Sanal Tarama ile Protein-Ligand Etkileşiminin Belirlenmesi	24
1.2.3.3. Serbest Enerji Hesaplamaları	25
1.2.3.3.1. Umbrella Örnekleme	26
1.2.3.3.2. MM/PBSA	27
BÖLÜM II	29
2.1. Gereç ve Yöntem	29
2.1.1. Protein-Protein Etkileşimleri	29
2.1.1.1. CG-MMPBSA Kübik Eksende Oryantasyon Simülasyonları	29
2.1.1.1.1. Validasyon Seti	29
2.1.1.1.2. Validasyon Çalışmasında Kullanılan Protein Kompleksleri	30
2.1.1.1.2.1. Ddi1 Ubikuitin Benzeri (UBL) Domaini-Ubikuitin (Ub) Kompleksi (2MWS)	30
2.1.1.1.2.2. Ubikuitin-USP2 Kompleksi (2HD5)	31
2.1.1.1.2.3. Kimerik SDZ CHI621'in Fab Fragmenti (1MIM)	33
2.1.1.1.2.4. Sil1-Bip Kompleksi (3QML)	35

2.1.1.1.3.	Validasyon Çalışma Sistemi	36
2.1.1.1.4.	Homoloji Modelleme.....	36
2.1.1.1.5.	Altı Eksenli Kübik Oryantasyonların Hazırlanması	37
2.1.1.1.6.	CG Modellerin Hazırlanması ve Simülasyonu	38
2.1.1.1.6.1.	Moleküler Dinamik Simülasyon	38
2.1.1.1.7.	Serbest Enerji Hesaplamaları.....	39
2.1.1.1.8.	İstatistiksel Analiz	39
2.1.1.1.9.	İri Taneli Yapıdan Tüm Atomik Yapıya Dönüşüm.....	40
2.1.1.2.	BİP-IRE1LD Etkileşiminin CG-MMPBSA Kübik Eksen Oryantasyon Simülasyonları.....	40
2.1.1.2.1.	BİP ve IRE1LD'nin Yeniden Yapılandırılması	40
2.1.1.2.2.	IRE1LD Model Validasyonu.....	44
2.1.1.2.3.	BİP Proteinini İçin Normal Mod Analizi	44
2.1.1.2.4.	BİP-IRE1LD Oryantasyonları ve Açık, Kapalı Konformasyonlarının Hazırlanması	44
2.1.1.2.5.	BİP/IRE1LD Açık ve Kapalı Oryantasyonlarının Kübik Ekseninde Hazırlanması ve Simülasyonu	46
2.1.1.2.6.	BİP/IRE1LD Açık ve Kapalı Oryantasyonlarının NBD-IIβ Ekseninde Hazırlanması ve Simülasyonu	48
2.1.1.2.7.	Coarse Grained Sistemin Hazırlanması	50
2.1.1.2.8.	Moleküler Dinamik Simülasyon	50
2.1.1.2.9.	BİP Proteinini Serbest Enerji Yüzeyi Alanı Hesaplanması	51
2.1.1.2.10.	MD Trajectory Analizi	51
2.1.1.2.11.	BİP-IRE1LD Oryantasyonlarının Serbest Enerji Hesaplamaları	51
2.1.1.2.12.	İri Tanecikli Yapıdan Tüm Atomik Yapıya Dönüşüm ve Vakum Ortamında MD Simülasyonu.....	52
2.1.2.	Protein-Ligand Etkileşimleri.....	52
2.1.2.1.	Kardiyovasküler Sistem Üzerinde Etkili İlaçlar ve Bazı Flavonoidlerin IRE1-JNK Yolağı Üzerindeki IRE1, ASK1 VE JNK1 Proteinleri ile Etkileşimlerinin Moleküler Kenetleme, Moleküler Dinamik ve Serbest Enerji Metoduyla Araştırılması	52
2.1.2.1.1.	Proteinlerin Yapılandırılması	53
2.1.2.1.2.	Çalışmada Kullanılan Etken Maddeler	53
2.1.2.1.3.	Moleküler Kenetleme (Docking).....	59
2.1.2.1.4.	MD Simülasyon İçin Etken Maddelerin Topolojilerinin Oluşturulması	60
2.1.2.1.5.	Enzim Ligand Komplekslerinin MD Simülasyonu	60
2.1.2.1.6.	Enzim Ligand Komplekslerinin Serbest Enerji Hesaplamaları	61
2.1.2.1.6.1.	IC ₅₀ 'den ΔG'ye Dönüşüm Hesaplamaları.....	61
2.1.2.1.6.2.	MM/PBSA Yöntemi ile Serbest Enerji Hesaplamaları.....	61
2.1.2.1.6.3.	Yönlendirmeli Moleküler Dinamik Simülasyon (Steered Molecular Dynamic Simulation).....	62
2.1.2.1.6.3.1.	Molekülleri Proteinden Çekme İşlemi	63
2.1.2.1.6.4.	Umbrella Örnekleme Yöntemi ile Serbest Enerji Hesaplamaları	64

BÖLÜM III..... 65

3.1	Bulgular	65
3.1.1.	Protein- Protein Etkileşimleri	65
3.1.1.1.	CG-MM/PBSA Kübik Ekseninde Oryantasyon Simülasyonları	65
3.1.1.1.1.	Test Seti	65
3.1.1.1.1.1.	Ddi1 Ubikuitin Benzeri (UBL) Domaini-Ubikuitin Kompleksi (2MWS).....	65
3.1.1.1.1.1.1.	Moleküler Dinamik Simülasyon	65
3.1.1.1.1.1.2.	Serbest Enerji Hesaplamaları.....	67
3.1.1.1.1.2.	Ubikuitin-USP2 Kompleksi (2HD5)	68
3.1.1.1.1.2.1.	Moleküler Dinamik Simülasyon	69

3.1.1.1.1.2.2.	Serbest Enerji Hesaplamaları.....	70
3.1.1.1.1.3.	Kimerik SDZ CHI621'in Fab Fragmenti (1MIM).....	73
3.1.1.1.1.3.1.	Moleküler Dinamik Simülasyon	73
3.1.1.1.1.3.2.	Serbest Enerji Hesaplamaları.....	73
3.1.1.1.1.4.	Sil1-BİP Kompleksi (3QML).....	77
3.1.1.1.1.4.1.	Moleküler Dinamik Simülasyon	77
3.1.1.1.1.4.2.	Serbest Enerji Hesaplamaları.....	77
3.1.1.1.1.5.	İri Taneli Kübik Oryantasyon Simülasyonlarının ROC Analizi	80
3.1.1.2.	BİP-IRE1 Etkileşiminin İri Taneli (CG) Kübik ve NBDIIβ Eksende Oryantasyon Simülasyonları ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları	81
3.1.1.2.1.	BİP-IRE1LD Oryantasyonlarının İri Taneli Moleküler Dinamik Simülasyonları.....	81
3.1.1.2.1.1.	Homoloji Modelleme ve Validasyon	81
3.1.1.2.1.2.	BİP MD Simülasyonu ve Konformasyonel Analizi.....	83
3.1.1.2.2.	BİP/IRE1LD Oryantasyonlarının Kübik Eksende İri Taneli Simülasyonu ve Mm/Pbsa Serbest Enerji Hesaplamaları.....	87
3.1.1.2.2.1.	Serbest Enerji Hesaplamaları	87
3.1.1.2.3.	BİP/IRE1LD Açık ve Kapalı Oryantasyonlarının Kübik Eksende İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları.....	92
3.1.1.2.3.1.	BİP/IRE1LD Açık Oryantasyonlarının Kübik Eksende İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları	92
3.1.1.2.3.2.	BİP/IRE1LD Kapalı Oryantasyonlarının Kübik Eksende İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları.....	95
3.1.1.2.4.	BİP/IRE1LD Açık ve Kapalı Oryantasyonlarının NBD-IIβ Ekseninde İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları.....	97
3.1.1.2.4.1.	BİP/IRE1LD Açık Oryantasyonlarının NBD-IIβ Ekseninde İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları	97
3.1.1.2.4.2.	BİP/IRE1LD Kapalı Oryantasyonlarının NBD-IIβ Ekseninde İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları	101
3.1.2.	Protein-Ligand Etkileşimleri.....	106
3.1.2.1.	IRE1, ASK1 VE JNK1 Proteinleri ile Etkileşimlerinin Moleküler Kenetleme Hesaplamaları.....	106
3.1.2.2.	Enzim Ligand Komplekslerinin Serbest Enerji Hesaplamaları	116
3.1.2.2.1.	MM/PBSA Hesaplamaları	116
3.1.2.2.2.	Umbrella Örnekleme Hesaplamaları	118
BÖLÜM VI.....		123
4.1	Tartışma	123
BÖLÜM V.....		145
5.1	Sonuç ve Öneriler.....	145
BÖLÜM VI.....		147
6.1	Kaynaklar.....	147
Teşekkür.....		160
Özgeçmiş		162

Şekil Dizini

Şekil 1. IRE1-JNK yolu şematik görünümü (Coelho & Domingos, 2014).....	3
Şekil 2. BİP proteini ve alt domainleri	5
Şekil 3. (A) IRE1 luminal domaini “cartoon” görünümü ve (b) aminoasit sekansı (Zhou vd., 2006)	7
Şekil 4. (A) ASK1 ve inhibitörü Staurosporin kompleksinin “cartoon” gösterimi ve (B) ASK1 aminoasit sekansı.....	8
Şekil 5. (A) JNK1 ve SCH772984 inhibitör kompleksinin “cartoon” gösterimi ile (B) JNK1 aminoasit sekansı.....	9
Şekil 6. Amino asitlerin iri taneli gösterimi (Farklı renkler etkileşim türünü temsil etmektedir) (Monticelli vd., 2008).	21
Şekil 7. (A) Periyodik sınır koşullarına göre partiküllerin hareketi, (B) Birim zaman sonraki partiküllerin yeni konumu.....	21
Şekil 8. İki proteinin kübik eksene göre oryantasyonlarının şematik gösterimi	29
Şekil 9. (A)2MWS pdb kodlu Ddi1UBL-Ub’nin biyoaktif bağlanma paterni, (B) Ubikitin ve (C) Ddi1UBL’nin “cartoon” olarak şematik görünümü	30
Şekil 10. 2MWS pdb kodlu Ddi1UBL-Ub kompleksinin aminoasit sekansı. A zinciri ubikitin’i temsil ederken B zinciri Ddi1UBL’yu temsil etmektedir.	31
Şekil 11. (A) Ubikitin, (B) USP2 ve (C) 2HD5) pdb kodlu Ubikuitin-USP2 kompleksinin biyoaktif bağlanma paterni’nin “cartoon” formatta şematik görünümü	32
Şekil 12. 2HD5 pdb kodlu Ubikuitin-USP2 kompleksinin aminoasit sekansı. A zinciri USP2’yi temsil ederken B zinciri ubikuitin’i temsil etmektedir.	33
Şekil 13. (A) 1MIM pdb kodlu Kimerik SDZ CHI621’in Fab fragmentinin biyoaktif dimer formu, (B) her domainin hidrofobik bölümlerinin gösterimi ve (C) aminoasit sekansı .	34
Şekil 14. (A, B) 3QML kodlu Sil1-Bip kompleksinin her bir domaininin hidrofobik yüzey alanının görünümü ile (C) biyoaktif bağlanma paterninin “cartoon” formatta gösterimi	35
Şekil 15. 3QML kodlu Sil1-Bip kompleksinin aminoasit sekansı	36
Şekil 16. Validasyon setindeki dimer yapıların kübik oryantasyona göre dizilimi.....	37
Şekil 17. BİP_NBD-IIβ değiştirilmiş (açık), 5e84 ve 6ASY sekanslarının hizalanmış görüntüsü	41
Şekil 18. BİP-NBD-IIB açık ve kapalı yapılarının hizandıktan sonraki açılma farkı.....	42
Şekil 19. BİP-NBD-IIB açık ve kapalı konformasyonlarının farklı yönlerden gösterimi.....	43
Şekil 20. (A) IRE1LD proteinin cartoon biçiminde yapılandırılmış, (B) yapılandırılmamış görüntüsü.....	43

Şekil 21. BİP ve IRE1LD'nin altı eksenle kübik oryantasyonun şematik gösterimi	45
Şekil 22. BİP ve IRE1LD'nin altı eksenle kübik oryantasyona göre dizilimi sonucu konformasyonel görünümü	45
Şekil 23. BİP ve IRE1LD'nin her bir oryantasyonunun uzaklıklarının gösterimi (kapalı form)	46
Şekil 24. BİP-NBD-IIB-kapalı /IRE1LD oryantasyonları simülasyon öncesi pozisyonları	47
Şekil 25. BİP-NBD-IIB-açık /IRE1LD oryantasyonları simülasyon öncesi pozisyonları	48
Şekil 26. BİP-NBDIIβ ekseninde IRE1LD oryantasyonlarının şematize görünümü	49
Şekil 27. BİP/IRE1LD açık ve kapalı oryantasyonlar.....	50
Şekil 28. IRE1 katalitik merkezindeki Norizalpinin çekilme görüntüsü.	64
Şekil 29. Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-Ubikuitin kompleksinin 5 µs'lik CG-MD simülasyonu sonunda oluşan bağlanma paternleri	67
Şekil 30. Ortalama 5 Å mesafede yerleştirilmiş Ubikuitin-USP2 kompleksi oryantasyonların simülasyonu sonucu oluşan bağlanma paternleri	69
Şekil 31. Ortalama 15 Å mesafede yerleştirilmiş Ubikuitin-USP2 kompleksi oryantasyonların simülasyonu sonucu oluşan bağlanma paternleri	70
Şekil 32. Ortalama 5 Å mesafede yerleştirilmiş kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmenti dimerinin oryantasyonların simülasyonu sonucu oluşan bağlanma paternleri.....	75
Şekil 33. Ortalama 5 Å mesafede yerleştirilmiş Sil1-Bip kompleksi oryantasyonların simülasyonu sonucu oluşan bağlanma paternleri	78
Şekil 34. A-IRE1LD referans yapı (kırmızı) ve homolojik olarak modellenmiş yeni modeli (mavi) B- IRE1LD modellenmiş ve referans yapının aminoasit sekansı.....	82
Şekil 35. Prody'ye göre yapı temelli BİP dinamiğinin oklar ile gösterimi	85
Şekil 36. BİP-NBD-IIB açık ve kapalı yapıları hizalandığında TYR 209 rezidüsünün konformasyonel değişimi.....	86
Şekil 37. BİP NBDIIβ açık ve kapalı formu hizalandığında 209-217 arası rezidülerin konformasyonel görünümü	86
Şekil 38. 2 µs'lik Coarse Grained simülasyon sonunda farklı oryantasyonlardaki BİP-IRE1 komplekslerinin son durumu	87
Şekil 39. 6. oryantasyonun bağlanma paterni (mavi: BİP, kırmızı: IRE1LD)	89
Şekil 40. CG-AA dönüşümü sonrası 10 ns'lik vakum ortamında MD simülasyon sonunda IRE1'in açılma değişimi ve BİP-Sil1 protein kompleksinin görünümü	89
Şekil 41. 10 ns'lik vakum ortamında MD simülasyon sonunda BİP-IRE1LD kompleksi ile 3QML BİP-Sil1 kompleksinin BİP proteinine göre hizalanmasından sonraki pozisyonlarının çeşitli açılardan görünümü (yeşil: Sil1, kırmızı: BİP, mavi: IRE1LD)	90

Şekil 42. 4. oryantasyonun 2. tekrarının 5µs CG-MD simülasyonu sonunda oluşan bağlanma paterni.....	91
Şekil 43. BİP-IRE1LD (NBDIIβ-açık) kübik oryantasyonlarının 5µs'lik CG-MD simülasyonu sonunda meydana getirdikleri bağlanma paternleri.....	93
Şekil 44. BİP-IRE1LD (NBDIIβ-açık) kübik oryantasyonları içinde 6. oryantasyonun 5µs CG-MD simülasyonu sonunda oluşan bağlanma paterni.	94
Şekil 45. BİP-IRE1LD (NBDIIβ-açık) kübik oryantasyonları içinde 6. oryantasyonun 3. tekrarının 5µs'lik CG-MD simülasyonu sonunda oluşan bağlanma paterni.....	94
Şekil 46. BİP-IRE1LD (NBDIIβ-kapalı) kübik oryantasyonlarının 5µs CG-MD simülasyonu sonunda meydana getirdikleri bağlanma paternleri.....	96
Şekil 47. BİP-IRE1LD oryantasyonlarının NBDIIb-açık ekseninde 5µs'lik CG-MD simülasyonu sonunda meydana getirdikleri bağlanma paternleri.....	99
Şekil 48. NBDIIA-açık eksenli BİP-IRE1LD 6. oryantasyonunun bağlanma paterni.....	100
Şekil 49. NBDIIβ-açık eksenli BİP-IRE1LD 8. oryantasyonunun bağlanma paterni.....	100
Şekil 50. BİP-IRE1LD oryantasyonlarının NBDIIb-kapalı ekseninde 5µs CG-MD simülasyonu sonunda meydana getirdikleri bağlanma paternleri.....	103

Grafik Dizini

Grafik 1. rcsb.org veri bankasında biyomlekül sayılarının yıla göre artış grafiğı (rcsb.org)	13
Grafik 2. Kuvvet alanının potansiyel enerji terimleri. Grafiklerde sırayla soldan sağı; bağı, aç, dihedral, uygunsuzluk, vdW ve elektrostatik etkileşimleri şematik olarak gösterilmiştir (Y. Wang & McCammon, 2012).....	16
Grafik 3. Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-Ubikuitin kompleksinin 5 µs'lik CG-MD simülasyonu sonunda MM/PBSA serbest enerji değışimleri	68
Grafik 4. 2MWS oryantasyonlarının son 1 µs'deki ortalama toplam mm/pbsa serbest enerji değışimi	68
Grafik 5. Ubikuitin-USP2 kompleksinin kübik oryantasyonlarının 5 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimleri.....	72
Grafik 6. Ubikuitin-USP2 kompleksinin 5 Å mesafede yerleştirilen kübik oryantasyonlarının son 1 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimleri ortalaması	72
Grafik 7. Ubikuitin-USP2 kompleksinin 15 Å mesafede yerleştirilen kübik oryantasyonlarının son 1 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimleri ortalaması.	73
Grafik 8. Kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmenti dimerinin kübik oryantasyonlarının 5 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimleri.	76
Grafik 9. Kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmenti dimerinin kübik oryantasyonlarının son 1 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimleri ortalaması.	76
Grafik 10. Sil1-Bip kompleksinin kübik oryantasyonlarının 5 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimleri.....	79
Grafik 11. Sil1-BİP kompleksinin kübik oryantasyonlarının son 1 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimleri ortalaması.....	79
Grafik 12. İri taneli kübik oryantasyon validasyon setinin minimum toplam serbest enerjileri ROC eğrisi	80
Grafik 13. Her Protein Kompleksi İçin Ayrı Ayrı Roc Değerleri	81
Grafik 14. A- IRE1LD'in homoloji modelinin (A) Ramachandran ve (B) QMEAN grafiğı.....	83
Grafik 15. BİP'in 100 ns boyunca Tüm Atomik MD Simülasyon'unun RMSD ve mesafe grafiğı	84
Grafik 16. BİP'in 100 ns boyunca tüm atomik MD simülasyonunun RMSD-mesafe grafiğı...	84
Grafik 17. BİP proteinin 100 ns boyunca konformasyonel geçişinin serbest enerji yüzey haritası	85
Grafik 18. 2 µs'lik Coarse Grained simülasyon boyunca BİP-IRE1 kompleksinin toplam serbest enerji değışimi	88
Grafik 19. BİP-IRE1 oryantasyonlarının son 500 ns'deki entropik, elektrostatik, Van Der Waals enerjileri ile bunların toplamı olan bağlanma enerjileri ortalamaları	88
Grafik 20. 4. ve 6. oryantasyonların altı bağımsız tekrarının 5 µs CG-MD simülasyonu boyunca MM/PBSA Toplam Serbest Enerji Değışimi	91
Grafik 21. BİP-IRE1LD NBDIIa-açık kübik oryantasyonlarının 5µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimi.....	92
Grafik 22. BİP-IRE1LD NBDIIb-kapalı kübik oryantasyonlarının 5µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değışimi	96
Grafik 23. BİP-IRE1LD oryantasyonlarının NBDIIβ-açık ekseninde 5µs boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değışimi	98

Grafik 24. BİP-IRE1LD oryantasyonlarının NBDIIβ-kapalı ekseninde 5μs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimi	102
Grafik 25. BİP-IRE1LD kübik eksenli oryantasyon simülasyonlarının enerji değişim ortalamaları toplamı	104
Grafik 26. BİP-IRE1LD kübik eksenli oryantasyonların enerji ortalamaları	104
Grafik 27. NBDIIβ eksenli açık ve kapalı BİP-IRELD oryantasyon simülasyonlarının enerji değişim ortalamaları toplamı	105
Grafik 28. BİP-IRE1LD NBDIIβ eksenli oryantasyon simülasyonlarının enerji değişim ortalamaları.....	105
Grafik 29. Etken maddelerin etkinliklerine göre tüm proteinler üzerinde toplamda elde ettikleri normalize skorların grafiği (düşük değer daha iyi)	114
Grafik 30. Etken maddelerin etkinliklerine göre IRE1 üzerinde elde ettikleri normalize skorların grafiği (düşük değer daha iyi).....	115
Grafik 31. Etken maddelerin etkinliklerine göre ASK1 üzerinde elde ettikleri normalize skorların grafiği (düşük değer daha iyi).....	115
Grafik 32. Etken maddelerin etkinliklerine göre JNK1 üzerinde elde ettikleri normalize skorların grafiği (düşük değer daha iyi).....	116
Grafik 33. IRE1-ligand etkileşimleri MM/PBSA Bağlanma Serbest Enerjileri	117
Grafik 34. ASK1-ligand etkileşimleri MM/PBSA bağlanma serbest enerjileri	118
Grafik 35. JNK1-ligand etkileşimleri MM/PBSA bağlanma serbest enerjileri.....	118
Grafik 36. IRE1-etken madde etkileşimlerinin ortalama kuvvet potansiyelleri	119
Grafik 37. IRE1-etken madde etkileşimlerinin PMF ortalamaları	120
Grafik 38. ASK1-Etken Madde Etkileşimlerinin ortalama kuvvet potansiyelleri	120
Grafik 39. ASK1-Etken Madde Etkileşimlerinin PMF ortalamaları	121
Grafik 40. JNK1-Etken Madde Etkileşimlerinin ortalama kuvvet potansiyelleri	122
Grafik 41. JNK1-Etken Madde Etkileşimlerinin PMF ortalamaları	122

Tablo Dizini

Tablo 1. Flavonoidlerin HMDB kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü	54
Tablo 2. Statinlerin HMDB kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü	55
Tablo 3. Ace inhibitörlerinin HMDB kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü	56
Tablo 4. Antiaritmik ilaçların HMDB kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü	57
Tablo 5. Enzim İnhibitörlerinin PubChem CID kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü	58
Tablo 6. IRE1LD referans yapı ve homoloji modelinin molprobitiy skoruna göre karşılaştırılmalı analizi	82
Tablo 7. BİP referans yapı ve refine edilmiş modeli molprobitiy skoruna göre karşılaştırılmalı analizi	82
Tablo 8. Flavonoidler	107
Tablo 9. Statinler	108
Tablo 10. Antiaritmik ilaçlar	109
Tablo 11. Ace İnhibitörleri	110
Tablo 12. Doğal İnhibitörler.....	111
Tablo 13. Moleküler Kenetleme Algoritma Skorlarının Normalize Tablosu (düşük değer daha iyi)...	112

Kısaltmalar

ACC	: Doğruluk
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ACE-I	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri
AIP1	: ASK1 Etkileşimli Protein-1
ASK1	: Apoptoz Sinyalini Regüle Eden Kinaz 1
ATF6	: Transkripsiyon Faktör 6 Aktifleştirici
AUROC	: Area Under Receiver Operating Characteristic
Bip	: Bağlanan İmmünglobulin Protein
CAPRI	: Critical Assessment Of Prediction Of Interactions
CG	: Coarse Grained
CHOP	: C/EBP-Homolog Protein
COM	: Kütle Merkezi
EGCG	: Epi Gallo Kateşin Gallat
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: ER ile İlişkili Protein Degradasyonu
ERAD	: ER İlişkili Bozulma
EVb	: Empirical Valence Bond
HSP70	: Isı Şoku Proteini 70
IFD	: İndüklenmiş Fit Yerleştirme
IL-2	: İnterlökin-2
IRE1	: İnositole Gereksinim Duyan Enzim 1
IRE1NLD	: IRE1 Luminal Domaini
JNK	: Janus N Terminal Kinazı
KKH	: Koroner Kalp Hastası

LIE	: Doğrusal Etkileşim Enerjisi
LINCS	: Linear Constraint Solver
LJ	: Lennard-Jones
MD	: Moleküler Dinamik
MKKK	: MAPK Kinaz Kinaz
MM/PBSA	: Moleküler Mekanik/Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı
MTTK	: Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein
NBD	: Nükleotid Bağlayıcı Domain
NEF	: Nükleotit Değişirme Faktörleri
NEF	: Nükleotid Değişim Faktörü
Nmwiz	: Normal Mode Wizard
PBC	: Periyodik Sınır Koşulları
PCA	: Temel Bileşen Analizi
PERK	: PKR Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz
PMF	: Ortalama Kuvvet Potansiyeli
PPE	: Protein-Protein Etkileşim
QM/MM	: Kuantum Mekanik/ Moleküler Mekanik
QPLD	: Kuantum Polarize Edilmiş Ligand Yerleştirme
Reaxff	: Reactive Force Field
RIDD	: IRE1'e Bağlı Bozulma
RMSD	: Kök Ortalamasının Kare Sapması
Rnase	: Ribonükleaz
ROC:	: Receiver Operating Characteristic
RWFF	: Reactive Force Field For Water
Sbd α	: Substrat Bağlama Domaini

SMD	: Yönlendirmeli Moleküler Dinamik Simülasyonlar
Steep	: Steepest Descent
TRAF2	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptör İlişkili Faktör 2
TRX	: Tiorredoksin
UBL	: Ubikuitin Benzeri
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı
US	: Umbrella Örnekleme
USP2	: Ubikuitin Spesifik Proteaz-2
Vdw	: Van Der Waals
WHAM	: Ağırlıklandırılmış Histogram Analiz Metodu
XBP1	: X-Box Bağlayıcı Protein 1

Simgeler

ΔG	: Delta G
μs	: Mikro Saniye
$\text{\AA}$	: Angstrom
$^{\circ}C$	: Santigrat derece
fs	: Fempto saniye
$^{\circ}K$	: Kelvin derece
mM	: Mili Molar
nM	: Nano molar
ns	: Nano saniye
ps	: Piko saniye
T	: Sıcaklık
ζ	: Reaksiyon koordinatı

BÖLÜM I

1.1. Giriş

Endoplazmik retikulum (ER) stresine karşı hücrenin en güçlü sinyal yanıtı olan IRE1-JNK yolağı, protein katlanmasına yardımcı olan şaperon ve düzeltilemeyen proteinlerin yıkımından sorumlu ER ilişkili bozulma (ERAD) aktivasyonu ile Proteostasisin düzenlenmesinde oldukça önemli role sahiptir. Bununla birlikte ER stresi koşullarında JNK (Janus N Terminal Kinaz) fosforilasyonunu takip eden pro-apoptotik sürecin başlatıcısı rolünü üstlenir. Hipoksi ve glikoz yetersizliği gibi çok farklı koşullarda hücre şiddetli ER stresine bağlı olarak apoptoza sürüklenebilmektedir. Bu durum sinir sisteminde nörodejenerasyon, kardiyovasküler sistemde kardiyak hücre kaybına ve pek çok hastalığın oluşumuna neden olabilmektedir.

Kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan etken maddelerin bilinen etkileri yanında diğer faydalı ya da zararlı yan etkileri önemli bir araştırma konusudur. Statinler, ACE inhibitörleri ve anti-aritmik ilaçların bilinen etkileri dışında ER stresi ve özellikle IRE1-JNK yolağı üzerindeki potansiyel etkileri belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca kardiyovasküler hastalıklarda olumlu etkileri gösterilmiş Flavonoid grubu moleküllerin IRE1-JNK yolağı üzerindeki etkileşimi tam olarak gösterilememiştir.

IRE1-JNK sinyal yolağının en önemli mekanik başlatıcısı, BİP'in (Bağlanan İmmünglobulin Protein) IRE1 (İnositole Gereksinim Duyan Enzim 1)'den ayrılmasıdır. Ayrılma sürecinden sonra IRE1 önce dimerize sonra oligomerize olarak IRE1 sitoplazmik domaininde oto fosforilasyon meydana gelerek yolağın aktivasyonu başlatılmış olur. BİP-IRE1 bağlanması immünopresipitasyon, floresan rezonans enerji transferi (FRET) gibi metodlarla ortaya çıkarılmasına karşın bağlanma paterni ve bağlanmanın moleküler mekanizması henüz aydınlatılamamıştır.

Protein-protein etkileşimlerinin moleküler mekanizması günümüzde cryo-elektron mikroskopisi gibi çok pahalı ve uygulaması zor yöntemlerle gösterilebilirken moleküler dinamik simülasyon yaklaşımı protein-protein ve protein-ligand etkileşimlerinde hesaplama, zaman maliyetlerinin düşmesi ve algoritmaların gelişmesiyle güçlü bir alternatif olarak görülmektedir. Esnek protein-protein etkileşimlerinde mevcut moleküler kenetleme algoritmaları bazı durumlarda yeterli olmayabildiğinden protein-protein etkileşimlerinde yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda BİP'in olası konformasyonel durumlarını, BİP-IRE1 etkileşiminin bağlanma paternlerini ve IRE1-JNK yolağı üzerindeki IRE1, ASK1 ve JNK1'in kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan etken maddeler ile Flavonoid'lerin moleküler etkileşimini araştırmak için moleküler

dinamik simülasyon ve serbest enerji hesaplamaları gerçekleştirerek BİP hedefli farmasötik çalışmalara rehberlik etmeyi, IRE1-JNK yolağının blokajında ve ER stresi kaynaklı apoptozun önlenmesinde etkili olabilecek molekül türevlerinin sentezlenmesi ve geliştirilmesi süreçlerine ışık tutmayı hedeflemekteyiz.

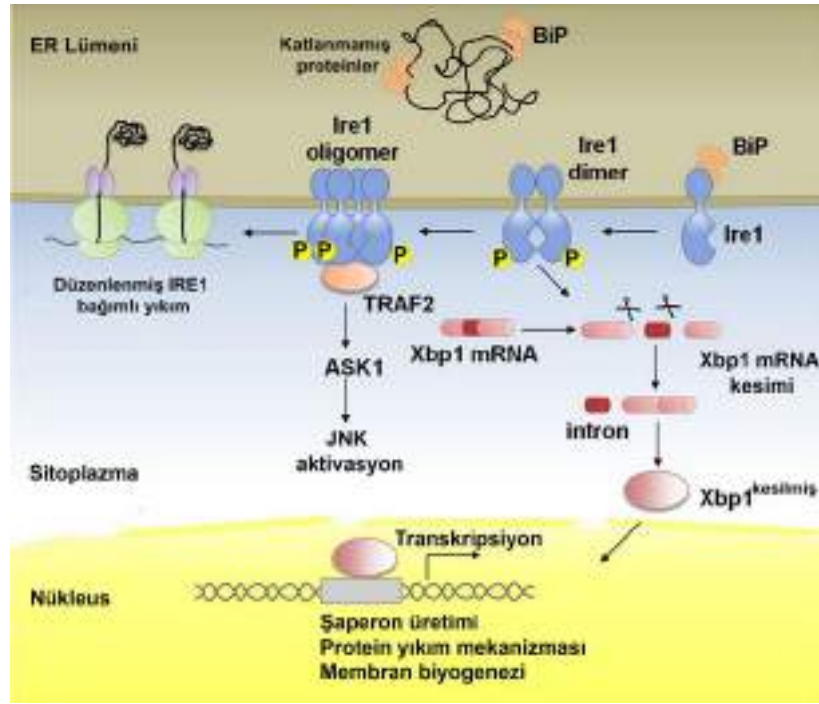
BİP-IRE1 etkileşimini doğru şekilde belirlemek amacıyla mevcut moleküler kenetleme yaklaşımlarının yetersiz kalması ve kullanım zorluğu nedeniyle yeni bir yaklaşımın geliştirilmesiyle ve esnek yapıdaki proteinlerin birbiriyle etkileşimlerinin araştırılmasıyla alternatif açıklamalar getirilebileneceğine inanıyoruz.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. IRE1-JNK Yolağı

Ökaryotik hücrelerde ER (Endoplazmik Retikulum) ribozomlarından sentezlenip ER lümenine geçen proteinler endojen ve eksojen kaynaklı etmenlerle katlanmamış veya hatalı katlanan protein birikimleri ile Endoplazmik Retikulumda stres oluştururlar. Ancak hücreler ER stresinin olumsuz etkilerinden kurtulmak için katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak bilinen üç farklı sinyal yolağını aktive ederler. Bu sinyal yolları içinde IRE1 (İnositol gereksinim duyan enzim 1), PERK (PKR benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz) ve ATF6 (Transkripsiyon Faktör 6'yı aktive eden) ya kıyasla evrimsel süreçte en iyi korunmuş olan sinyal yolağıdır. Ökaryotik hücreler IRE1 sinyal yolağında IRE1 α ve IRE1 β olmak üzere yapısal benzerliğe sahip ancak fonksiyel farklılığı olan iki IRE proteini içerir. IRE1 α bütün hücrelerde ve dokularda eksprese edilirken, IRE1 β spesifik olarak intestinal epitelyumda ifade edilir. IRE1 α 'nın RNAz domaini konformasyonel değişikliğe uğrayarak aktif hale gelir ve çerçeve kayması ile oluşan lösün farmuar içeren XBP1 (X-box bağlayıcı protein 1) transkripsiyon faktörünü ifade etmek için mRNA'dan 26 nükleotidlik intron bölgesini çıkarır. IRE1 β ise 28S rRNA kesilmesine ve translasyonel azalmaya aracılık eder (Kadowaki & Nishitoh, 2013). XBP1 sırayla protein katlanması, kalite kontrol, protein sekresyonu ve ERAD (ER ile ilişkili protein degradasyonu) ile bağlantılı UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu yukarı regüle ederek stresi azaltmaya çalışır. Şekil 1'de görüldüğü üzere IRE1 α ayrıca TRAF2 (tümör nekroz faktörü reseptör ilişkili faktör 2) ile etkileşime girerek JNK (janus N terminal kinaz) yolağını aktive eder. ER stresi ile gerçekleşen bu aktivasyon, ASK1 (apoptoz sinyalini regüle eden kinaz1) - JNK sinyalizasyon yolunda bir dönüştürücü olan AIP1 (ASK1 etkileşimli protein-1) varlığında meydana gelir. IRE1 sinyal yolağının aktivasyonu ER'de bulunan bir şaperon proteini olan BiP'in (bağlanan immünglobulin protein) IRE1'in luminal domaininden ayrılmasıyla tetiklenir. Ayrılan BiP ve oligomerize IRE1, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler ile etkileşerek

katlanmaya yardımcı olurlar. Dimerize ve oligomerize olan IRE1 otofosforile olarak RNaz domainini aktive eder (Bravo vd., 2013; Kadowaki & Nishitoh, 2013). IRE1 α 'nın RNaz domaini aynı zamanda spesifik sekans ve ikincil yapıyı içeren bir işlev olarak bilinen "düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozulma (RIDD)" veya RIDD'ın direkt endonükleolitik kesme reaksiyonunu düzenler. RIDD'nin XBP1 mRNA birleştirmesine karşı yanıtı, RNaz aktivitesinin varlığını düşündürmektedir (Hetz & Papa, 2018).



Şekil 1. IRE1-JNK yolu şematik görünümü (Coelho & Domingos, 2014)

1.2.1.1. IRE1 Üzerinden Apoptoz Sinyal Yolu

IRE1 α , apoptozu tetiklemek için gerekli ve yeterliyen PERK ve ATF6 apoptoz aktivasyonunda gerekli olmayarak PERK üzerinden CHOP (C/EBP-homolog protein) genlerinin aktivasyonu ile de apoptoz tetiklenebilir (Y. Chen & Brandizzi, 2013). Hücre IRE1 α üzerinden XBP1 aktivasyonu ile protein katlanması ve kalite kontrol ile ilgili genlerin aktivasyonu ile ER stresiyle baş etmeye çalışırken, uzun süreli ER stresi meydana geldiğinde IRE1 α sitozolik domaini TRAF2 ile etkileşime girerek IRE1-TRAF2 kompleksini oluşturur. Bu kompleks, ASK1'in fosforillenmesini, fosforile ASK1 de JNK1'in fosforillenmesini tetikleyerek JNK yolunun aktivasyonuna yol açar. Bunun yanında çeşitli proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri IRE1 α 'nın RNaz/kinaz aktivitesini yukarı regüle eder. Bu da XBP1 mRNA'sının kesilerek XBP1 transkripsiyon faktörü olarak hedef genlerin aktivasyonuna, JNK fosforilasyonuna ve apoptozu neden olur. Prokaspaz-12'den TRAF2'nin ayrılması, kaspaz-12'nin kümelenmesini ve aktivasyonunu sağlar. Aktif kaspaz -12, kaspaz -9'u aktive eder ve kaspaz -9 da kaspaz -3'ü

aktive ederek hücreyi apoptoza sürükler (Kadowaki & Nishitoh, 2013; C. Y. Liu & Kaufman, 2003). Ayrıca IRE1, mitokondride dolaylı olarak BAX ve BAK ile IRE1 aracılı sitokrom c salınımıyla, ER'de ise doğrudan etkileşim içindedir (Scully & Tabas, 2011).

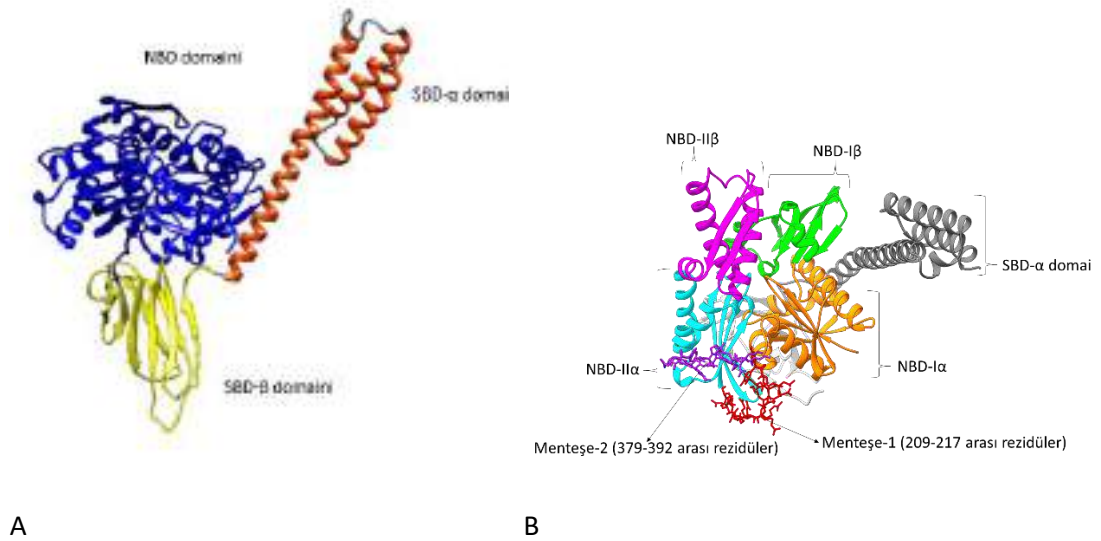
1.2.1.2. BiP (İmmünoglobulin Ağır Zincir Bağlayıcı Protein) Proteini

İmmünoglobulin ağır zincir bağlayıcı protein (BiP), ısı şoku protein (HSP70) ailesi içinde yer alan HSPA5 alt grubu üyesidir. ER lümeninde hidrofobik rezidüer ile etkileşime girip peptitleri seçici olarak bağlayarak işlev gören bir ATP bağımlı şaperon proteindir (Lewy, Grabowski, & Bloom, 2017). BiP'nin başlangıçta öncü-B hücrelerinin immünoglobulin ağır zincirlerine bağlandığı bulunmuştur. BiP, ER üzerindeki ribozomlarda yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması ve yeni sentezlenen polipeptitlerin translokasyonlarında rol oynar ve ayrıca ER stresi olmayan hücrelerde PERK, IRE1 ve ATF6'yı bağlayarak aktivasyonlarını inhibe eder. ER stresinde ve yanlış katlanmış protein birikiminde, BiP bu proteinlerden salınarak aktive olur. BiP'in bir ısı şoku protein olup olmadığı tartışmalı bir konudur. Bunun nedeni rezidü dizisi karşılaştırmalarında HSP70 ile aralarında %60 yapısal homoloji benzerliğinin bulunmasıdır. Homolojik benzerlik ağırlıklı olarak ATP bağlama bölgesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca BiP'in ısı şoku durumlarından etkilenmemesi de bunu desteklemektedir. BiP'in en güçlü kimyasal indükleyicileri, kalsiyum iyonoforu A23187; N-bağı protein glikosilasyonunu bloke eden tunicamisin; ve ATPaz pompasını inhibe eden thapsigargin (Tg)'dir (Lee, 2005). Son in-vitro çalışmalar, BiP'in antiapoptotik mekanizma içerdiğini, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklarda apoptozdan kaçınmada önemli rol oynayabileceğini göstermiştir (Lee, 2005). BiP proteinin atomik düzeyde yapısal incelenmesi ve konformasyonel analizi ayrıca çeşitli küçük moleküller ile etkileşimleri son yıllarda moleküler dinamik (MD) simülasyon yöntemleriyle araştırılmaya başlanmıştır. MD simülasyonlar daha çok HSP70 proteinleri üzerinde odaklansa da BiP etkileşimleri üzerine MD simülasyon ve serbest enerji hesaplamaları yaygınlaşmaya başlamıştır. Örneğin yapılan bir çalışmada Epi Gallo Kateşin Gallat (EGCG) Flavonoidinin BiP (GRP78)'i ATP'ye karşı yarışmalı olarak inhibe ettiği MD simülasyon yöntemiyle gösterilmiştir (Gurusinghe, Mishra, & Mishra, 2018).

1.2.1.2.1. BiP'in Fonksiyon ve Yapısı

BiP proteini, karboks terminalinde substrat bağlama domaini (SBD α ve β) ve amino terminalinde nükleotid bağlayıcı domain (NBD) olmak üzere iki fonksiyonel domaine sahiptir. NBD'de ATP hidrolizi gerçekleşerek BiP aktif hale gelirken, SBD'ye peptit yapıdaki substrat bağlanması ile yanlış katlanmış proteinlerin düzeltilmesine yardımcı olacak konformasyonel değişiklikler meydana gelir. Bunun yanında BiP'in şaperon aktivitesi j-proteini (HSP40) ve

nükleotit değiştirme faktörleri (NEF) tarafından regüle edilerek kolaylaştırılmaktadır. BiP'te ATP hidrolizi gerçekleştikten sonra NEF, ATP'nin BiP'e geri dönüşünü hızlandırmaktadır. J-proteininin ise BiP'in ATP hidrolizini kolaylaştırdığı gösterilmiştir. NBD, ATP'nin bağlandığı katalitik bölgenin orta iç bölgesinde kalan iki büyük lob (NBD-I ve II) ve bu loblar da iki alt domaninden (NBD- α ve β) oluşur. [şekil 2]. Yapılan alışmalar, BiP'e ATP bağlanması, NBD ve SBD arasında etkileşim meydana getirdiğini ve bunun da SBD'de peptit substratının bağlanması ve salınmasını hızlandıran hızlı yapısal değişikliklere yol açtığını göstermektedir. BiP'in aktivitesi, ATP ile indüklenen bu allosterik etkileşim ile ilişkilidir. (Yang vd., 2017).



şekil 2. BiP proteini ve alt domainleri

1.2.1.2.2. BiP-IRE1 Etkileşimi

BiP-IRE1 etkileşiminde İRE1'in protein katlanmasındaki rolü tartışmalı olmasına karşın çeşitli modeller önerilmiştir. Birinci modele göre BiP, İRE1'e bağlanarak İRE1'in deaktivasyonunu sağlamaktadır. ER stresi durumunda BiP, İRE1'den ayrılarak katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerle etkileşime girerek katlanmalarına yardımcı olur. İRE1 ise önce dimerize olarak otofosforile olur daha sonra oligomerizasyon meydana gelir. Yapılan immünopresipitasyon deneyleriyle normal koşullarda İRE1'in BiP'e bağlı olduğu ancak ER stresi koşullarında BiP'in İRE1'den ayrıldığının gösterilmesiyle birinci model desteklenmiştir. Diğer bir modelde ise proteinin yeniden katlanmasında İRE1'inde rol oynadığını önerir. Buna göre; katlanmamış proteinler İRE1'in lümainal domainine bağlanır ve İRE1 oligomerize olarak yolağın aşağı regülasyonunu aktive eder. Bu modelin önerilmesinin en sağlam dayanağı İRE1 lümainal domaininin peptit bağlayıcı oluğa sahip olabileceğine ilişkin deneysel çalışmalardır. İn-vitro mutagenез deneyleri göstermiştir ki oluğu meydana getiren rezidüler sinyalizasyon

için gereklidir. Son yıllardaki çalışmalar önceki iki modeli de destekleyen hibrit bir modeli önermektedir. Bu modele göre BiP ve IRE1, katlanmamış proteinlere bağlanarak yeniden düzenlenmelerinde rol oynar. BiP IRE1'den ayrılarak katlanmamış proteinler ile etkileşime girerken IRE1 ise önce dimerize sonra oligomerize olarak protein katlanmasına yardımcı olur. Aynı zamanda da otofosforilasyon ile aktive olarak sinyal kaskatı başlar. Yapılan çalışmalar sinyal iletim mekanizmasının bir çok yönünü ortaya koymasına karşın BiP-IRE1 etkileşiminin tutarlı bir modeli tam olarak ortaya konamamıştır (Pincus vd., 2010). BiP-IRE1 etkileşiminin atomik konfigürasyonunu gösteren deneysel bir çalışma ile elde edilmesinin zorluğu nedeniyle literatürde henüz yer almamaktadır. IRE1'in deaktivasyon kinetiğinin belirlenmesinde BiP'in rolünü araştırmak için yapılan bir çalışmada in-siliko modeller oluşturulsa da bağlanma kinetiği belirlenememiştir (Pincus vd., 2010).

1.2.1.3. IRE1 (İnositol Gereksinim Duyan Enzim 1) Proteinini

IRE1 sitoplazmada ER lümeninde UPR'de görev alan üç transmembran 'sensör' proteinlerinden biridir. IRE1, N-terminal lümen domaininde tek geçişli transmembran domain ve Ser/Thr protein kinaz domaini ile endoribonükleaz (RNase) domainini oluşturan C-terminal sitoplazmik domaininden oluşur. IRE1'in ER luminal domaini ER'de Hsp70 şaperon BiP'e bağlanarak inaktif monomerik durumda tutulur. ER'de yanlış katlanmış protein birikiminin BiP 'in salınmasına ve luminal domainin oligomerizasyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Sitoplazmik dimerizasyon kinaz alt domaini trans otofosforilasyonunu kolaylaştırır, bu da RNaz bölgesinin aktivasyonu ile sonuçlanır. IRE1'in endonükleaz domaini, Xbp1 mRNA'dan 26 nükleotidi ekstrakte eder. Yeniden düzenlenmiş olan Xbp1, UPR hedef genlerinin ekspresyonunu yukarı regüle eden transkripsiyon proteinini kodlar. IRE1 aktivitesi katlanmamış protein yolağının ne kadar ve ne şiddette devam edeceğini belirlemektedir (Ali vd., 2011).

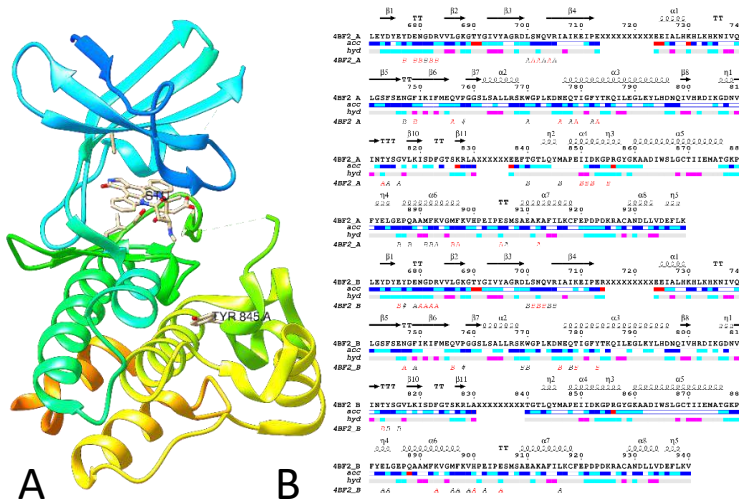
Zhou ve ark. yaptıkları çalışmada insan IRE1 luminal domainin (IRE1LD) X ışını kristalografisi ile yapısını belirlemişlerdir. Bu yapıya göre üçgen bir görünüme sahip olan domainde üç yapısal motif öne çıkmıştır [Şekil 3A]. Amino terminal ucu N motifi olarak isimlendirilirken bu motif beş anti paralel levhanın bir araya gelmesi ile varil görünümü sergilemektedir. Karboksiterminal taraftaki motif ise C motifi olarak isimlendirilir. Bu motif de varil katlanma içermekte ve birbirine doğru üçlü antiparalel tabaka oluşturmaktadır. Ortada yer alan motif ise M olarak adlandırılıp yapıyı boydan boya kat eden antiparalel levhalardan meydana gelmektedir. Bu üç motifin tümü, belirgin bir ayırım olmaksızın birbirlerine sıkıca sarılır (Zhou vd., 2006). Şekil 3B'de IRE1 aminoasit sekansı ve sekansa karşılık gelen sekonder yapının

[illegible]

Maruf Ali ve ark tarafından insan IRE1 α 'nın sitoplazmik domaini (rezidü 547-977) böcek hücrelerinde eksprese edilmiş, kromatografik olarak saflaştırılarak, defosforile edilerek Mg²⁺-ADP içeren bir tamponda buhar difüzyonu ile kristalleştirilmiştir. İnsan IRE1 α sitoplazmik domaini, N-terminal β -tabaka lobu ve α -sarmal C-terminal lobu arasındaki yarıktaki ATP-bağlanma domaininin maya IRE1'e çok benzer genel yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. İnsan IRE1 maya'dan farklı olarak karboksiterminal domaininde ek bir helikal domaine sahip olup Xbp1 mRNA'sının kesiminde rol oynayan endoribonükleaz aktivitesi gösterir (Ali vd., 2011). Günümüzde IRE1'in küçük molekül inhibisyonu ile ilgili çalışmalarda hesaplamalı biyolojiden daha fazla yararlanılmaya başlanmıştır. Cross ve arkadaşları yaptıkları çalışmada deneysel ve moleküler dinamik simülasyon yaklaşımı ile IRE1'in kofaktör bağlanmamış apo durumunu ve 4q8c molekülü ile stabil bağlantısını göstermişlerdir (Cross vd., 2012).

MAPK Kinaz Kinaz (MKKK) kinaz ailesinin bir üyesi olan ASK1, endoplazmik retikulum stresi gibi stres uyarıcıları tarafından aktive edilir. ASK1'in JNK ve p38'i fosforile ederek JNK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. İnsan ASK1 hem amino hem de karboksi terminallerinde merkezi serin/treonin kinaz domaini ve sarmal bobin domaininden oluşan 1,374 rezidü içeren bir polipeptittir. Şekil 4A'da ASK1 ve inhibitörü olan Staurosporin kompleksi gösterilmiştir.

Sinyalizomda ASK1, karboksiterminal ve aminoterminal sargılı bobin domaini içeren etkileşimlerle oligomerize edilir. ASK1 aktivasyonu Thr845 rezidüsü üzerindeki fosforilasyon ile gerçekleşir (Singh vd., 2013). ASK1, ASK1 sinyalizomunu içerisinde yer alan çok sayıda proteinle etkileşime girer. Normal koşullarda ASK1, karboksi terminal ucundaki sarmal bobin domaini ile homodimer oluşturur. Amino terminal domaini, tioredoksin (TRX) ile bağlanarak ASK1'i inhibe eder. ASK1'in nörodejenerasyon ve kardiyovasküler gibi hastalıklarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Bunkoczi vd., 2007). Literatürde ASK1'in hesapsal biyoloji ile incelenmesinde protein-protein etkileşimlerinde daha çok küçük molekül inhibitörleriyle bağlanma mekanizmaları üzerinde odaklanılmıştır. Okamoto ve ark. kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel teröpatik hedef olan ASK1'in aday olabilecek inhibitörlerini sanal tarama yöntemiyle araştırmışlardır (Okamoto vd., 2011). Şekil 4B'de ASK1 aminoasit sekansı ve sekansa karşılık gelen sekonder yapının şematik gösterimi verilmiştir. X ile gösterilen harfler 4BF2 kodlu X-RAY protein yapının kayıp rezidülerini ifade etmektedir (Singh vd., 2013).



Şekil 4. (A) ASK1 ve inhibitörü Staurosporin kompleksinin “cartoon” gösterimi ve (B) ASK1 aminoasit sekansı

1.2.1.5. JNK1 (C-Jun N-Terminal Kinaz 1) Proteinini

Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) süper ailesinin bir üyesi olan c-Jun N-terminal protein kinazı (JNK), JNK1-2-3 olarak adlandırılan üç izoforma sahiptir. JNK, çeşitli hücre dışı uyarılara yanıt olarak bir MAP kinaz kaskatı aracılığıyla sıralı olarak protein fosforilasyonu ile aktive olur. JNK1'in üç boyutlu şematize görünümü ile SCH772984 inhibitörü Şekil 5A'da gösterilmiştir. JNK için iki MAP kinaz tanımlanmıştır. JNK, gen ekspresyonundan apoptoza kadar birçok hücrel aktivitenin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. JNK, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra Bcl-2 ailesinin üyeleri gibi diğer faktörlerin aktivitelerini

insan hastalıklarının patofizyolojisinde rol oynadığını göstermiştir (Minamino & Kitakaze, 2010). Hipoksiya ve iskemik stres; ER stres yolunda, disülfid bağ oluşumu ve ER'de yeni sentezlenen proteinlerin N-glikosilasyonu gibi protein modifikasyon süreçlerinin bozulmasından dolayı, indükleyici faktör olarak dikkat çekmektedir. JNK/p38 MAP kinaz yolağı, preapoptotik dönem boyunca inflamasyonun indüksiyonunda rol oynamaktadır (Gotoh, Endo, & Oike, 2011). Yapılan bir çalışmada JNK susturulmuş fibroblastlarda mitokondriyal apoptozun başlatılmasının yetersiz olduğu böylece JNK'nin bu süreçte önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir. JNK1 / 2 / 3'ün yukarı regülasyonunda ASK susturulmuş ve H₂O₂ ve TNF- α ile indüklenen hücrelerde apoptotik ölümlerin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir. Bu gözlemlerle tutarlı olarak, JNK1 inhibisyonunun kardiyak miyositleri iskemiye bağlı apoptozdan koruduğu, JNK2 inhibisyonunun ise hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, H9C2 miyositlerinde JNK'nin inhibisyonunun, stres ile uyarılan apoptosisi bloke ederken, yetişkin kardiyak miyositlerin negatif yönde JNK eksprese eden adenovirüs ile enfekte edilmesiyle H₂O₂ ile indüklenen apoptozu antagonize ettiği gösterilmiştir. Paradoksal olarak, MEKK1 baskılanmış embriyonik kök hücrelerde (MEKK1, MKK4 ve MKK7'nin doğrudan yukarı yönlü aktivatörü), kardiyak miyositlere farklılaştırılmış oksidatif strese bağlı apoptoz göstermiştir ki, MEKK1- /- fareler, aşırı basınç yükselmesinden sonra daha fazla kardiyak apoptoza maruz kalmaktadır. Bu nedenle, her iki etkinin literatürde genel hakimiyetinin in vivo olarak direkt kalpte gösterilmemiş olmasına rağmen, JNK sinyalleşmesinin hem pro- hem de antiapoptotik etkilere sahip olduğu görülmektedir (Kaiser vd., 2005).

1.2.2. Kardiyak İlaçlar

Dünya genelinde milyonlarca koroner kalp (KKH) hastası çok uzun süreler kardiyovasküler ilaçlar kullanmaktadır. Bu ilaç gruplarını Statinler, ACE inhibitörleri, antiaritmik ilaçlar oluştururken Flavonoid bazlı tedavi yaklaşımları da son yıllarda artmaktadır. Dünyada en çok kullanılan ve en yüksek harcama kalemini oluşturan bu ilaç gruplarının uzun vadeli faydalı ya da zararlı etkileri ile ilgili çalışmalar yeterli düzeyde değildir. (McCullough vd., 2012; Rossello, Pocock, & Julian, 2015).

1.2.2.1. Statinler

3-hidroksi-3-metil glutaril koenzim A redüktaz inhibitörleri olarak bilinen Statinler, yaygın olarak kardiyovasküler hastalıklarının tedavisinde kullanılan etkinliği iyi bilinen ilaçlardır. Statinler kolesterol sentezini azaltarak düşük yoğunluklu lipoproteinlerin alımını arttırırlar. (Wood, Igbavboa, Muller, & Eckert, 2013). Son yıllarda Statinlerin koroner kalp hastalıkları (KKH) üzerindeki yararlı etkilerinin, plazma kolesterol seviyelerini düşürme yetenekleri ile

sınırlı olmadığı, bunun yanında plak trombojenitesinin azaltılması, hücrel proliferasyon ve göçün önlenmesi dahil ateroskleroz üzerinde çeşitli pleiotropik etkiler sergiledikleri ve apoptozu baskıladıkları gösterilmiştir (Hasegawa vd., 2003).

1.2.2.2. ACE İnhibitörleri

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), anjiyotensin I'ın anjiyotensin II'ye dönüştürerek kan basıncının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin (ACE-I) mekanizması tam olarak bilinmemesine karşın, anjiyotensin dönüştürücü enzim ile yarışmalı olarak ACE'yi inhibe ettiği ve Renin-anjiyotensin sistemine müdahale ederek kan basıncını düşürdüğü bilinmektedir (Herman & Bhimji, 2018; López-Sendón vd., 2004; Ruschitzka & Taddei, 2012). ACE inhibitörleri ve reseptör etkileşimi araştırmalarında son yıllarda hesaplamalı biyolojiden daha fazla yararlanılmaya başlanılmıştır. Yapılan bir çalışmada hesaplamalı moleküler kenetleme yaklaşımı ile mevcut ACE inhibitörlerinin reseptör bağlanma aktivitelerinin deneysel verilerle yüksek koralasyon gösterdiği diğer bir çalışmada ise yeni ACE inhibitörü aday taramalarının yapıldığı belirtilmiştir. (Jia, Wu, Yan, & Gui, 2015; Politi, Durdagi, Moutevelis-Minakakis, Kokotos, & Mavromoustakos, 2010).

1.2.2.3. Antiaritmik İlaçlar

Genellikle K^+ veya Na^+ kanallarını bloke eden ajanlar Antiaritmik ilaçlar olarak adlandırılmaktadır. Günümüzde geliştirilen ilaçların çoğu, kanal yapı veya dinamiğini değiştiren iyon kanalları üzerinde etkilidir. Bu tür ajanlar Singh-Vaughan Williams sınıflamasına göre dört sınıfa ayrılmıştır: Bu sınıflar sıralanacak olursa Sınıf-I içinde Na^+ kanal blokerleri, Sınıf-II içinde beta-adrenoseptör antagonistleri, Sınıf-III içinde K^+ kanallarını baskın olarak bloke eden ilaçlar ve Sınıf IV içinde Dihidropiridin olmayan L-tipi Ca^{2+} kanal blokörleri yer alır (Dan vd., 2018).

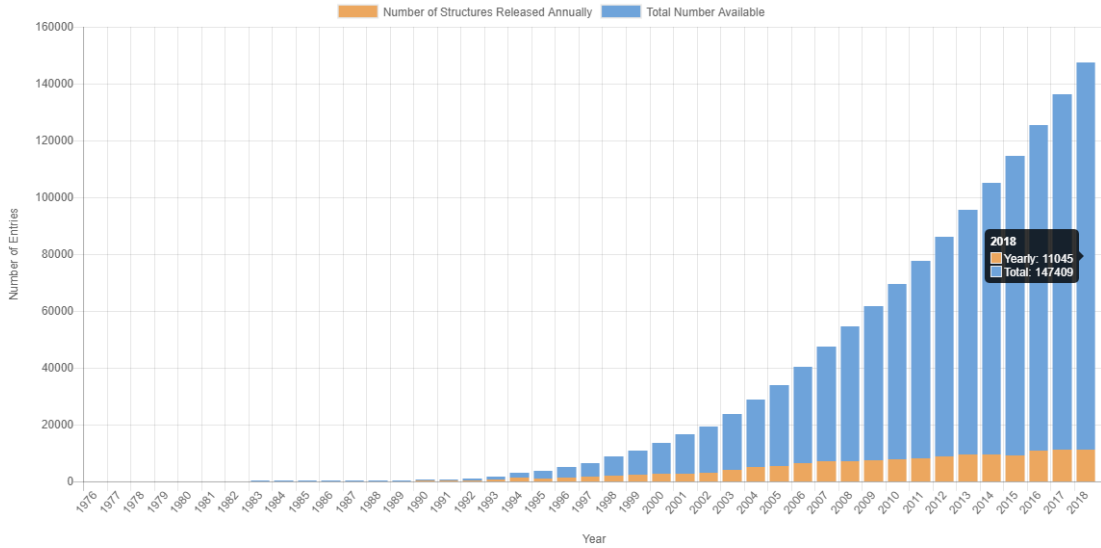
1.2.2.4. Flavonoidler

Flavonoidler, polifenolik yapıya sahip bitki sekonder metabolitleridir. Bitkilerde bakteri plağı oluşumuna karşı savunmada rol aldıkları düşünülmektedir. Flavonoidler meyveler, sebzeler ve çay gibi bitkilerde bol miktarda bulunur; bu nedenle diyet flavonoidleri olarak adlandırılırlar. Kanseri, alzheimer hastalığı, ateroskleroz gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili biyokimyasal ve antioksidan etkileri vardır. Hücrel enzimleri modüle edebilme yetenekleri ve güçlü antioksidan özellikleri nedeniyle ilaç sanayinde ve kozmetik uygulamalarda türevleri sıklıkla kullanılmaktadır. (Panche, Diwan, & Chandra, 2016).

1.2.3. Protein-Protein ve Protein-Ligand Etkileşimine Hesaplamalı Yaklaşım

Günümüzde makromoleküler yapıların görüntülenmesi ve çeşitli hesaplama araçları ile karşılaştırmalı analizleri biyolojinin anlaşılmasında önemli bir noktaya gelmiştir. 50'li yılların başlangıcından itibaren hem protein hem de nükleik asit dünyasında, makromoleküler ve moleküler yapılar hakkındaki bilgiler artarak devam etmektedir. Günümüzde, protein veri bankasında (rcsb.org) 120.000'den fazla protein, 7.000'den fazla protein-nükleik asit, tek başına veya kompleksi olmak üzere 140.000'den fazla molekülün yapı bilgisi kaydedilmiştir [Grafik 1]. Bu derece büyük ve sürekli genişleyen bilgi sayesinde membranlar, misel yapılar ve ribozomlar gibi büyük moleküllerin inşası, enzimatik etkileşimlerin nasıl meydana geldiği ve nasıl etkileşime girdiği gibi temel biyo aktivitelerin anlaşılması kolaylaşmakta ve birçok hesaplamalı analiz araçları ile incelenmeye devam edilmektedir. Protein-protein ve protein-ligand etkileşim çalışmaları modern hesaplamalı yapısal biyolojide büyüyen ve hızla popülerleşen alanlardan biridir. Deneylerden elde edilen üç boyutlu biyomoleküler yapıların basit konformasyonel analizi ile başarılı çalışmalar ortaya çıkmıştır. Deneysel olarak elde edilen üç boyutlu biyomoleküler yapıların pdb.org veri bankasında depolanması, bu biyomoleküllerin içerdiği her bir atomun konum bilgisini içeren dosya formatına dönüştürülmesine bağlıdır. Bu dosya formatı pdb uzantılıdır ve hesaplamalı yaklaşımlarda bu dosya kullanılmak zorundadır. Veri bankasında çok fazla biyomolekül bilgisi depolanmasına karşın bu bilgi biyolojik sistemlere kıyasla çok küçük bir kısmı oluşturmaktadır. Özellikle protein-protein komplekslerin XRAY olarak elde edilmesi son derece zor olduğundan çok fazla eksik yapı bulunmaktadır. Veri bankasındaki bu boşluğu doldurmak için araştırma grupları protein-protein etkileşim (PPE) tahminleri için çeşitli algoritmalar ve server'lar geliştirmiş ve geliştirmeye devam etmektedirler. Hatta iki yılda bir düzenlenen CAPRI (Critical Assessment of Prediction of Interactions) olarak bilinen PPE etkinliği düzenlenmektedir. Proteinler esnek biyomoleküller olduğundan bu esneklikleri onlara bir takım dinamik özellikler kazandırmaktadır. Proteinler bu dinamik özelliklerini konformasyonel değişiklikler yaparak sergilerler. Buna ilaveten allosterik aktiviteleri de bu dinamik özellikleri ile ortaya çıkmaktadır (Hospital, Goñi, Orozco, & Gelpi, 2015). Hesaplama algoritmalarındaki iyileştirmeler, hesaplama kaynaklarının gücünün artması ve bu kaynaklara ulaşımın kolaylaşp yaygınlaşması, hesaplamalı yaklaşımların popülaritesini hızla arttırmaktadır. Martin Karplus, Michael Levitt ve Arieh Warshel, biyomoleküler etkileşimlerin tahmininde kullanılan güçlü algoritmalara ortam hazırladıkları için 2013'te Nobel-kimya ödülü alarak bu ilginin günümüzde katlanarak artmasına yardımcı olmuşlardır. Hesaplamalı bir yaklaşım olan moleküler dinamik (MD) simulasyon günümüzde, proteinlerin yapısal dinamiklerini atomik

çözünürlükte nano, mikro, hatta milisaniye zaman ölçeklerinde dahi araştırmamıza izin vermektedir. Bu yöntem bilim yapısal biyoloji alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ode, Nakashima, Kitamura, Sugiura, & Sato, 2012).



Grafik 1. rcsb.org veri bankasında biyomekül sayılarının yıla göre artış grafiği (rcsb.org)

1.2.3.1. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyon

Bu yöntem bilim, Newton'un hareket denklemlerini çözümleyerek, moleküler sistemdeki atom hareketlerini hesaplamamızı sağlar. Günümüzde biyomoleküllerdeki atomik yer değiştirme hareketlerinden konformasyonel değişimler ve moleküller arası etkileşime kadar piko-mili saniye aralığında dinamik davranışları analiz edip anlamamızda önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır. MD simülasyon yaklaşımında, atomlar genellikle sabit yüklü küreler, atomlar arası bağlar ise üzerine harmonik kuvvet uygulanan yaylar olarak varsayılır. Bu sistemde atomların yapabileceği bağ sayısından bağ açısına, oluşturacağı dihedral geometrisine, kısmi yüklere ve atomlar arası bağ çeşidi ve özelliğine, atomlar arası etkileşim türlerine kadar birçok parametre, deneysel ve kuantum mekanik hesaplamalar ile elde edilerek “kuvvet alanı” olarak adlandırılan dosyalarda muhafaza edilmekte ve biyomoleküllerin simülasyonunda bu veriler kullanılmaktadır. Literatürde AMBER, CHARMM ve GROMOS kuvvet alan çalışmalarına sıklıkla rastlanmaktadır. MD simülasyonların ilk uygulamaları 70’li yılların sonlarında başlamıştır. Hesaplama kaynaklarının çok zayıf olması nedeniyle ilk dönemlerde kendine literatürde çok fazla yer bulamayan yaklaşım, son dönemde hızlı donanımsal ve yazılımsal gelişmeler ile birlikte günümüzde atomik çözünürlükte etkileşim hesaplamalarında altın standart haline gelmiştir. MD simülasyonlarda biyomoleküler etkileşimlerin hesapsal doğruluğu kuvvet alanına bağlıdır. İlk zamanlardaki ciddi parametrik hatalar giderilerek doğru dihedral açıları, elektrostatik,

Lennard-Jones potansiyel fonksiyonları gibi veriler çok daha sağlıklı analizlerin üretilmesine imkân tanımıştır. Son çalışmalar, kuvvet alanların en son sürümlerinin mükemmel olmasa da, deneysel verilerle yüksek düzeyde tutarlı sonuçlar verdiğini göstermektedir (Ode vd., 2012). MD simülasyonun yürütülmesinde birçok kritik öneme sahip parametre vardır. Bunlardan bazıları; moleküler etkileşimleri belirleyen algoritmaları oluşturan denklemler, sistem tasarımı için gerekli gruplar, potansiyel fonksiyonlar, kuvvet alanları, periyodik sınır koşulları, termostat ve barostatlardır (Hospital vd., 2015).

1.2.3.1.1. Moleküler Etkileşimler

Atomlar ve moleküller arasında etkileşimler iki ana grupta toplanmaktadır. Bunlar bağlı ve bağlı olmayan gruplar olarak adlandırılırlar. Bağlı ve bağlı olmayan bu etkileşimlerin MD simülasyonda kullanılabilir olabilmesi için gerekli parametreler, kuantum mekanik hesaplamaları, nükleer manyetik rezonans deneyleri ve temel fizik yasaları sonucu elde edilmiştir.

1.2.3.1.1.1. Bağlı Atomlar Arası Etkileşimler

Temel kimyadan da iyi bilindiği üzere bir veya daha fazla ortak elektrona sahip atomlar aralarında bağ oluştururlar. Eğer bağ yapan atomlar metalse bu bağ metalik; eğer metal sınıfı dışındaki atomlar bağ yapmışsa kovalent bağ olarak sınıflandırılır. Klasik moleküler mekanikte bu atomlar arasındaki bağların harmonik gerilimi, üç atomlu yapıda atomlar arasındaki açının daralıp genişlemesi, dört atomlu yapıda ise dihedral olarak adlandırılan düzlemlerin açısı kuvvet alanları vasıtasıyla parametrize edilmiştir [Grafik 2] (Allen, 2004).

1.2.3.1.1.2. Bağlı Olmayan Atomlar Arası Etkileşimler

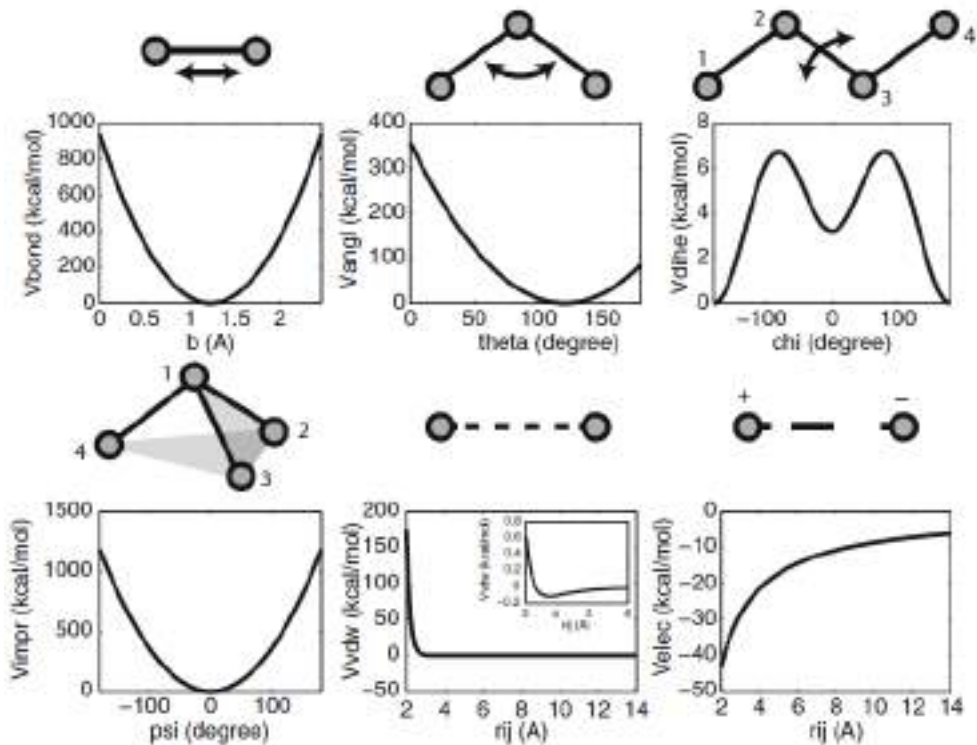
Bağlı etkileşimler dışında kalan ve sistemin potansiyel enerjisini oluşturan tüm etkileşimler bağlı olmayan etkileşimlerdir. Bu etkileşimler genellikle polar ve non polar etkileşimlerdir. MD simülasyonunda polar etkileşimleri temsilen elektrostatik-coulomb ve non-polar etkileşimleri temsilen Lennard-Jones potansiyeli hesaba katılmaktadır. Klasik MD kuvvet alanlarında bu etkileşimler fikse edilerek hesaplama hızında avantaj sağlar. Buna karşın dipol ve multipol yük hesaplamalarında kuantum mekanik hesaplamalara göre sapmalar ortaya çıkmaktadır. Günümüzde bu problemi çözmek için geliştirilmiş Amoeba ve Druid gibi polarize kuvvet alanları gittikçe yaygınlaşmaktadır (Braun vd., 2018).

1.2.3.1.1.3. Elektrostatik Etkileşimler

Elektrostatik etkileşimler anyonlar ve katyonlar arasında gerçekleşmektedir. Grafik 2’de de gösterildiği gibi yüklerin büyüklüğüne ve zıtlığına göre itme ve çekme eylemi gerçekleşmektedir. Bu etkileşimlerde yüklü atomlar arası mesafe arttıkça ki mesafeyi R olarak varsayarsak etki kuvveti $1/R^2$ oranında azalır. Tuz köprüleri, dipolar etkileşimler, katyon- π etkileşimleri ve hidrojen bağları bu etkileşimler arasında yer almaktadır (Leach, 2001).

1.2.3.1.1.4. Lennard-Jones Potansiyeli ve Van Der Waals Etki Alanı

Van Der Waals etki alanı atom gruplarının elektron bulutları arasındaki etkileşimlerini ifade eder. Çekimler çok kısa mesafeli ve zayıf olmasına karşın proteinler gibi büyük ölçekli atom grupları arasında çok büyük yüzey alanlarını oluşturduğundan toplam potansiyel enerjinin %70’ini oluşturabilmektedir. Van Der Waals etki alanı protein-protein etkileşimlerinde son derece önemli bir yere sahiptirler. Bu tip çok kısa mesafeli etkileşimler en iyi olarak Lennard-Jones tarafından açıklanmıştır. Lennard-Jones modeli; dik bir itme ve yumuşak bir çekme dönemini açıklar [Grafik 2]. Bu model hesapsal basitliği ve görece doğruluğu sebebiyle birçok güncel kuvvet alanında kullanılmaktadır. Lennard-Jones potansiyeli, $V(r)=4\epsilon[(\sigma/r)^{12}-(\sigma/r)^6]$ şeklinde ifade edilmektedir. Denklemden V, iki atom arasındaki potansiyeli; ϵ , iki atomun birbirini çekme gücünü; σ , iki atom arası potansiyelin sıfır olduğu mesafeyi; r ise her iki parçacık arasındaki ayrılma mesafesini belirtmektedir. (“Lennard-Jones Potential - Chemistry LibreTexts”, y.y.).



Grafik 2. Kuvvet alanının potansiyel enerji terimleri. Grafiklerde sırayla soldan sağa; bağ, açı, dihedral, uygunsuzluk, vdW ve elektrostatik etkileşimleri şematik olarak gösterilmiştir (Y. Wang & McCammon, 2012).

Yukarıdaki şekilde gösterilen atom tipleri: bağ için C–O, açı için CA–C–O, dihedral için CA–C–N–CA, uygunsuzluk için C–CA–N–O olarak gösterilmiş ve karşılık gelen enerji değerleri CHARMM kuvvet alanına göre belirtilmiştir (Y. Wang & McCammon, 2012).

1.2.3.1.2. Sistem Tasarımı İçin Gerekli Topluluklar (Ensembles)

MD Simülasyon sisteminin oluşturulmasında makro durumları belirleyen, yapılacak işin niteliğine göre birtakım etkenler kullanılmaktadır. Bu etkenler; basınç (P), hacim (V), enerji (E), partikül sayısı (N), kimyasal potansiyel (μ), ve sıcaklık (T) olarak tanımlanmıştır. Bunların hepsi toplulukları (ensemble) oluşturmaktadır. Mikro durumlar ise momenta (p) ve pozisyon (r) olarak tanımlanmıştır. Termodinamik topluluklar aynı makroskopik durumu oluşturan mikroskopik durumların koleksiyonudur. Termodinamik toplulukların başlıcaları; büyük kanonik (sabit μ , P, T), mikrokanonik (sabit N, V, E), kanonik (sabit N, V, T) ve izotermal-izobarik topluluktur (sabit N, P, T). Kanonik ve izotermal-izobarik topluluklar MD simülasyonlarda en sık kullanılan termodinamik topluluklardır (Cuendet, y.y.).

Büyük kanonik topluluk, termodinamik dengedeki mekanik parçacık sisteminin olası durumlarını temsil eder. Sistemin enerjisi ve partiküller bir rezervuar vasıtası ile değişkenlik gösterebileceğinden toplam enerji ve parçacık sayısı değişkenlik gösterebilir ancak şekil, hacim ve diğer koordinatlar sabittir. Büyük kanonik topluluğun termodinamik değişkenleri; mutlak sıcaklık (T) ve kimyasal potansiyel (μ) ve hacimdir (sembol: V) ve topluluğun sabitleri olduklarından μVT topluluğu olarak da adlandırılırlar. Mikrokanonik toplulukta sistemin enerjisi veya parçacıkları izole olduğundan değiştirilemez, sistemin bileşimi, enerjisi ve hacmi tüm olası durumlarda aynıdır. Bu nedenle sistem enerjisi zamana bağlı olarak bilinebilir. Makroskopik değişkenler ise toplam parçacık sayısı (N), hacim (V) ve toplam enerjidir (E) ve topluluğun sabitleri olduklarından NVE topluluğu olarak da adlandırılırlar. MD simülasyonlarında denge fazının oluşturulmasında en çok kullanılan NVT topluluğu olarak ta adlandırılan kanonik toplulukta sistem sabit bir sıcaklıkta termal denge olup sistem varsayımsal bir ısı banyosu içinde ısı alışverişi yapar. Bundan kaynaklı olarak toplam enerji değişkenlik gösterir ve bu toplulukta başlıca termodinamik değişken sıcaklıktır (T). Bunun yanında parçacık sayısı (N) ve hacim (V) de bu topluluğun diğer değişkenleridir. İzotermik-izobarik toplulukta sabit basınç ve sıcaklık uygulanır bunun yanında partikül sayısı sabittir. MD simülasyonlarda NPT topluluğu olarak ta adlandırılan bu toplulukta kimyasal reaksiyonlar

sabit basınç altında gerçekleştiği için üretim aşamasında en sık kullanılan topluluktur (Gibbs, 1902; Leach, 2001).

1.2.3.1.3. Kuvvet Alanları

Kuvvet alanı, sistem enerjisinin partikül koordinatlarına göre durumlarını açıklayan matematiksel ifadeler bütünlüğüdür. Moleküler sistemlerde, intra ve inter biyomoleküler kuvvetlerin nispeten basit dört bileşenli görüntüleri yorumlanmaktadır. Bu inter ve intra biyomoleküler kuvvetler için gerekli parametreler; yarı-deneysel kuantum mekanik hesaplamalar, X-ışını, elektron kırınımı, NMR, kızıl ötesi, nötron spektroskopisi, vb. gibi deneysel çalışmalardan elde edilir. Enerjetik sapmalar, açı ve bağların referans değerlerinden sapmasıyla ortaya çıkmaktadır. Moleküller, basit harmonik kuvvetler tarafından bir arada tutulan atomlar olarak tanımlanan basitleştirilmiş modellerdir. Bununla birlikte sistemin karmaşıklığı kuvvet alanlarına göre farklılık göstermesidir. Örneğin karbon atomuna bağlı hidrojen bağları dahil edilmeyen modeller united atom modeli olarak isimlendirilirken, yapılarına göre 4 atom başına bir referans tanecik olacak şekilde toplam tanecik sayısında azaltılmaya gidilen model ise iri taneli model olarak tanımlanmıştır. Tipik bir kuvvet alanı aşağıdaki şekilde formüle edilmektedir.

$$U = \sum_{\text{bonds}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsions}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)]$$

$$+ \sum_{\text{improper}} V_{imp} + \sum_{\text{LJ}} 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{\text{elec}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

İlk dört terim, dihedral, bağ gerilimi, açı bükülmesi ve uygunsuz burulmaları hesaba katarak toplam enerjiye intra-moleküler veya yerel katkıları ifade ederken son iki terim kolombik-elektrostatik etkileşimler ile itici-van der Waals etkileşimlerini ifade eder. Van Der Waals etkileşimleri ile kuvvet alanlarında Lennard-Jones potansiyeli ifade edilmektedir (González, 2011).

Yukarıdaki denklemde gösterildiği gibi, bağların esnekliği ve gerilimi ve açı bükülmeleri genellikle basit bir harmonik fonksiyonla temsil edilir. Bu denklemdeki yay sabiti terimi raman saçılımı ve kızılötesi spektroskopi deneylerinden elde edilirken, r_0 terimi X ışını kırınım deneylerinden elde edilir. Açı bükülmelerinde bazı durumlarda trigonometrik potansiyel tercih edilebilmektedir. Bağ gerilimi ve açı bükülmelerinde harmonik fonksiyon kullanılmasının olumsuz yanı bağların kırılmaz olarak varsayılmasıdır. Bu yüzden simülasyonların kısıtlayıcı en büyük faktörü budur ve biyokimyasal reaksiyonlar MD simülasyonlarda gösterilemez. Harmonik potansiyele alternatif olarak mers potansiyeli gibi

farklı algoritmalar kullanılabilse de büyük hesapsal yük bindireceğinden sıklıkla basit harmonik potansiyel tercih edilmektedir. Bağ gerilmeleri ve açi bükülmeleri, torsiyonel hareketler bağ gerilim hareketlerine göre yüzlerce kat daha yavaş gerçekleşir. Rotasyonel hareketlerden kaynaklanan ana konformasyonel değişikliklerde torsiyonel hareketler önemlidir. Torsiyonel parametreler genellikle kuantum mekanik hesaplamalarından elde edilir ve vibrasyonel spektra deneyleri ile validasyonları yapılabilir. Aromatik halka ve karbonil gruplardaki sp² hibritleşmelerinin düzlemselliğini belirtmede normal torsiyonel terimler yetersiz kalmaktadır. Bu tür uygun olmayan burulma durumları için aşağıdaki ifade kullanılmaktadır (González, 2011).

$$U_{imp} = \sum_{improper} \frac{k_{imp}}{2} [1 + \cos(2\omega - \pi)]$$

Farklı moleküllere ait iki atomun elektron bulutları arasındaki itme ve çekme kuvvetleri Van Der Waals kuvvetleri olarak adlandırılır. Bu etkileşimleri temsil etmek için 12-6 Lennard-Jones (LJ) potansiyeli sıklıkla kullanılmaktadır. Kuvvet alanı denklemlerindeki son terim elektrostatik etkileşimleri tanımlamaktadır. Ab-initio kuantum kimyası yöntemleri ile etkileşimlerin elektronik yoğunlukları çok başarılı şekilde hesaplanırken, MD kuvvet alanlarında ifade edilecek düzeyde sadeleştirilmesi gerekmektedir. Çözüm olarak her çekirdeğe kısmi bir yük verilmektedir. Verilen bu kısmi yüklerin toplam enerjiye katkıları Coulomb yasasına göre hesaplanır. Küçük moleküllerde bu kısmi yükler deneysel termodinamik verilerden elde edilebiliyorken büyük moleküllerin kısmi yükleri deneysel olarak elde edilemediğinden kısmi yükler kuvvet alanlarına göre farklılıklar göstermektedir. Bu problemin çözümünde Amoeba ve Druid gibi polarize kuvvet alanları geliştirilmiştir, fakat bu tür kuvvet alanlarının hesaplamaları yüksek maliyetlidir. MD simülasyonlarında genellikle belli bir kesme değeri kullanılmaktadır. Çoğu durumda atomlar arasındaki Van der Waals ve elektrostatik olan intramoleküler etkileşimlerde atomlar arasındaki bağlar 3'ten fazla (<1-4) ifade edilmektedir. 1-2 ve 1-3 çiftleri ihmal edilirken 1-4 etkileşimleri (üç kovalent bağ ile bağlı) nadir olarak hesaba katılır veya ölçeklendirme vektörünün dahil edilmesiyle ihmal edilir (González, 2011).

Amber, Gromos, Charmm gibi klasik kuvvet alanları günümüzde çok yaygın kullanılmasına karşın polarize kuvvet alanları hesaplama gücünün de artmasıyla kullanım alanları artmaya başlamıştır. Çevrenin değişken dielektriklerine karşı moleküler cevap oluşturulma gerekliliği, polarize kuvvet alanlarının geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Hidrofobik iç çevrenin su ile temasında dış yüzeyin dielektriği çok farklı olduğundan proteinlerin katlanma modellerinde bu etki kritik öneme sahiptir. (Lopes, Guvench, MacKerell, & Jr., 2015).

Klasik kuvvet alanları kimsayal reaksiyonları belirlemede yetersiz kalmaktadır. Kimyasal reaksiyonların modellenmesinde Ab-initio kuantum mekanik yöntemler en güvenilir metodolojiler olarak öne çıksa da sistemin büyüklüğü son derece sınırlı kalmaktadır. Ayrıca simülasyon uzunluğu pikosaniyeler seviyesindedir. Bu kısıtlama protein-ligand etkileşimleri gibi biyomoleküler durumları modellemede büyük engel teşkil etmektedir. MM-QM gibi multi ölçekli yaklaşımlar da kısmen probleme çözüm getirmektedir. Günümüzde geliştirilmeye devam eden RWFF (Reactive force field for water), ReaxFF (Reactive force field) ve EVB (Empirical valence bond) göreceli olarak çok daha hızlı ve kabul edilir düzeyde deneysel verilerle uyumlu reaktif kuvvet alanlarıdır (Hofmann, Kuleshova, & D'Aguanno, 2007; Senftle vd., 2016; Warshel & Florián, 2004).

Protein-protein etkileşimleri, fosfolipid misel modelleri, protein-membran etkileşimleri ve protein katlanması gibi çok fazla partikül içeren, mikro ve mili saniyelerde gerçekleşen sistemlerin tam atomik simülasyonlarının makul süreler içinde yürütülmesi günümüz bilgisayar gücü ile bile çok zordur. Yüksek hesaplama maliyetinin azaltılmasında bazı araştırma grupları iri taneli modeller olarak adlandırılan birtakım çözümler önermiştir. Go modeli protein katlanma simülasyonları için uzun zaman önce tasarlanmış bir model olarak ortaya çıkmıştır. Bu modelde her aminoasit tek bir boncuk olarak temsil edilir ve aminoasitler arasında basit çekici ve itici kuvvetler ile bağlı olmayan etkileşimlerin doğal konfigürasyonu elde edilmeye çalışılır. Bu son derece basitleştirilmiş model ile katlanma yollarının ve katlanma termodinamiğinin doğal yapı ile benzerlik göstermesi, başarılı çalışmaların ortaya çıkmasını sağlamıştır. Proteinin enerji yüzeyi ile deneysel enerji yüzeyi benzerlik gösterir. Günümüzde geliştirilen tek boncuklu modeller (her rezidü tek bir boncuk tarafından temsil edilir) go modelinden geliştirilmiş daha karmaşık fonksiyonlara sahip modelleridir. Bir diğer modelde rezidünün yan zincirine ikinci bir boncuk eklemek suretiyle lokal etkileşimlerin özgüllüğünün arttırılması hedeflenmiştir. Bahar ve Jernigan tarafından geliştirilen bu iki boncuklu model, referans konfigürasyonundan bağımsız olmasına karşın enerji terimi çok karmaşıktır (Bahar & Jernigan, 1997). Zacharias, modele bir boncuk daha ekleyerek yan zincirlerin daha kompleks olmasını sağlamış ve protein-protein bağlanma ve etkileşim modellerinde bu modeli kullanmıştır (Zacharias, 2003). İki ve üç boncuklu modellerin kompleksliliğini artırmak amacıyla daha fazla boncuklu modeller literatürde önerilmiş ve dört boncuklu yaklaşımlar ortaya atılmıştır. Bunlardan birinde yan zincir tek bir boncukla temsil edilirken kalan üç boncuk omurgayı temsil etmektedir. Bu metodoloji ile hidrojen bağları tanımlanarak proteinde ikincil yapıların konformasyonu daha doğru tahmin edilebilmektedir (Tozzini, 2005; Voegler Smith & Hall, 2001). Altı boncuklu başka bir modelde hidrojen bağları

basitleştirilmişken hidrofobik etkileşimler daha fazla dikkate alınmıştır. De-novo protein yapılarının belirlenmesinde Monte-Carlo metodu kullanılmaktadır (Irbäck, Samuelsson, Sjunnesson, & Wallin, 2003; Tozzini, 2005).

Günümüzde iri taneli modeller içinde en yaygın kullanıma sahip olanı Marrink ve arkadaşları tarafından geliştirilen MARTINI'dir. Ekip ilk çalışmalarını lipid ve sürfaktan moleküllerinin iri taneli modellenmesi üzerinde yapmışlardır (Siewert J. Marrink, Alex H. de Vries, & Mark, 2003). Daha sonraki yıllarda etkileşim matriksini genişleterek fosfolipid, kolesterol gibi membran bileşenlerinin parametrelerini geliştirerek kuvvet alanı geliştirmeyi başarmışlar ve bir yıl sonra da bu kuvvet alanına protein parametrelerini ekleyerek günümüzün en popüler iri taneli (Coarse Grained) kuvvet alanını literatüre kazandırmışlardır (Monticelli vd., 2008; Siewert J. Marrink, H. Jelger Risselada, Serge Yefimov, D. Peter Tieleman, & Vriest†, 2007). Bu model de daha önce anlatılan 4 boncuklu modeller ile benzerlik göstermektedir. Buna karşın bu modelde halkasal yapılar gibi bazı özel yapılarda farklı haritalama tercih edilmektedir. Modelde yüklü (Q), polar (P), apolar (C) ve yüklü olmayan (N) şeklinde dört etkileşim türü hesaba katılmıştır. Atomik etkileşimlerin daha doğru hesaplanabilmesi için alt tiplere tercih edilmiştir. Toplam 18 adet alt tip vardır. Bu alt tipler harfler ile sembolize edilmiştir. Buna göre d: donör, a: alıcı, da: her ikisi, O: yok polarite derecesine göre 1: düşük polarite, 5: yüksek polarite olarak ifade edilir. Bu modele göre aminoasitlerin iri taneli gösterimi ve etkileşim türü şekil 6'da gösterilmiştir (Siewert J. Marrink vd., 2007).

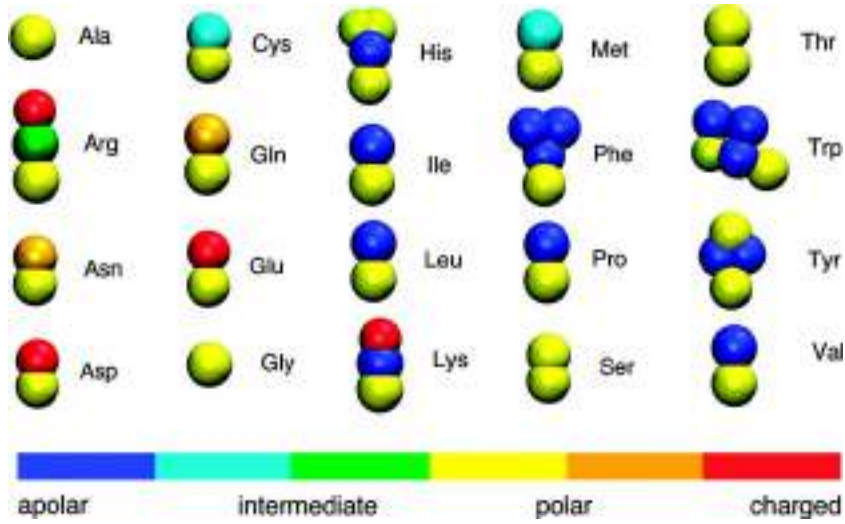
Martini modelinde bağlı olmayan etkileşimlerde kaydırılmış Lennard-Jones (LJ) 12-6 $U_{LJ}(r) = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right]$ potansiyel enerji fonksiyonu tercih edilmektedir. Apolar ve yüklü partiküller arasındaki etkileşimlerde hidrasyon kabuklarını daha iyi muhafaza edebilmeleri için istisna olarak itme aralığı $\sigma = 0.62$ nm olarak tercih edilir. Lennard-Jones etkileşimlerine ilave olarak yüklü gruplar için relatif dielektrik sabiti $\epsilon_r = 15$ olan kaydırılmış

$$U_{cl}(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r}$$

Coulombic Potansiyel Enerji fonksiyonu kullanılır. Bağlı etkileşimler, aşağıdaki potansiyel enerji fonksiyonları ile formüle edilmiştir. Bağlı alanlar arası i, j, k ve l ile; denge mesafesi d_b ile açı ϕ_a ve dihedral açıları ψ_d ve ψ_{id} ile; kuvvet sabitleri K ile ifade edilmiştir (Monticelli vd., 2008).

$$V_b = \frac{1}{2} K_b (d_{ij} - d_b)^2, \quad V_a = \frac{1}{2} K_a [\cos(\phi_{ijk}) - \cos(\phi_a)]^2$$

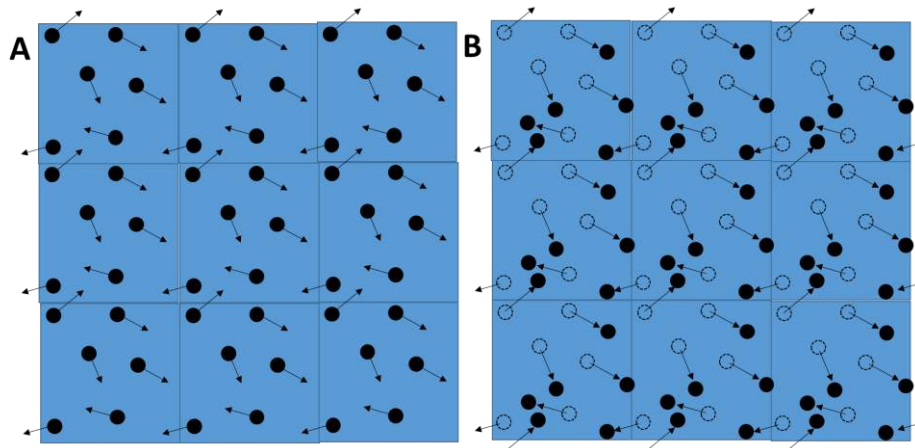
$$V_d = K_d [1 + \cos(n\psi_{ijkl} - \psi_d)], \quad V_{id} = K_{id} (\psi_{ijk} - \psi_{id})^2$$



Şekil 6. Amino asitlerin iri taneli gösterimi (Farklı renkler etkileşim türünü temsil etmektedir) (Monticelli vd., 2008).

1.2.3.1.4. Periyodik Sınır Koşulları

Gerçek hayatta biyolojik sistemlerin büyüklükleri nano ölçekte devasadır ve günümüz teknolojisi ile bu devasa sistemleri modellemek imkansızdır. Periyodik sınır koşulları (PBC), küçük MD sistemlerde ortaya çıkan sınırlılık probleminden kaçınmak için sistemi sonsuz büyüklükteymiş gibi gösterir. Örneğin kübik bir MD sisteminde, sistem her kübün kopyası kübün yüzeyine komşu olacak şekilde farz edilir ve böylece bir molekül kübün bir yüzeyinden çıktığı anda karşıt yüzden tekrar sisteme girer. Böylelikle sistemdeki toplam partikül sayısı değişmeksizin küp sonsuz büyüklükteymiş gibi davranır [Şekil 7]. Bu sistemde partikülün hızını, ivmesini ve yönünü değiştirecek bir yüzey olmadığından sistemin toplam enerjisi çok daha doğru şekilde hesaplanır (Leach, 2001).



Şekil 7. (A) Periyodik sınır koşullarına göre partiküllerin hareketi, (B) Birim zaman sonraki partiküllerin yeni konumu

1.2.3.1.5. Termostat ve Barostatlar

MD simülasyonlarında sistemin gerçek laboratuvar koşullarına benzetimi için, belirli sıcaklık ve basınç değerlerinin sistem içindeki tüm atomlara uygulanarak termodinamik uyum ve hesaplanabilirlikleri sağlanmaktadır. MD simülasyonda sıcaklık genel olarak aşağıdaki teoreme göre çözümlenmektedir (Braun vd., 2018).

$$\frac{3}{2}Nk_B T = \left\langle \sum_{i=1}^N \frac{1}{2}m_i v_i^2 \right\rangle$$

Formülasyonda gösterilen açılı braketler (< ve >) sıcaklığın zamana bağlı bir ortalama olarak ifade edildiğini göstermektedir. Örneğin, MD simülasyonunda bir anın sıcaklığı hesaplandığında sıcaklık ortalaması gösterilmiş olacaktır. Termostat algoritmaları, genel olarak Newton hareket denklemlerinin farklı varyantları ile çalışmaktadır. Termostatlar rastgelelik ilkesine göre deterministik ya da stokastik olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca sistemin ne kadarına etki edip etmediğine göre global ya da lokal olarak isimlendirilir. Velocity Rescaling, Berendsen, Andersen, Langevin ve Nosé-Hoover gibi birçok popüler termostat algoritmaları geliştirilmiştir. Sistemin denge aşamasına getirilme sürecinde daha çok Berendsen ya da Velocity Rescaling kullanılırken, üretim simülasyonlarında termodinamik doğruluğu nedeniyle Nosé-Hoover kullanılmaktadır (Braun vd., 2018).

DeneySEL çalışmalar laboratuvarlarda genel olarak atmosferik koşullarda gerçekleşmektedir. MD simülasyonlarda bu tip bir ortamın benzetiminde barostat algoritmaları kullanılmaktadır. Barostat algoritmalarının kullanıldığı MD simülasyonlarda geçerli topluluklara izotermal-izobarik topluluklar adı verilmektedir. Bu tür sistemler tıpkı bir piston vasıtasıyla sıkıştırılmış gibi varsayılmaktadır. Termostatlara benzer olarak barostatlarda da zamana bağlı bir ortalama değer ifade edilmektedir. Anlık basınç değeri, sürekli dalgalanan değer zamana bağlı ortalaması olarak hesaplanmaktadır. Andersen, Berendsen, Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein (MTTK) ve Parrinello-Rahman literatürde kullanılan barostatlardan bazılarıdır. Sıcaklık algoritmasından farklı olarak denge aşamasında dahi sıklıkla Parrinello-Rahman barostat tercih edilmektedir. Berendsen algoritması sistemi çok hızlı dengeye getirmesine karşın termodinamik olarak uygunsuzluğu nedeniyle tercih edilmemektedir. Parrinello-Rahman barostat algoritması Andersen'in genişletilmiş bir versiyonudur. Andersen'den farklı olarak simülasyon kübünün şekil ve hacminin anizotropik ölçeklendirilmesini desteklemektedir (Braun vd., 2018).

1.2.3.1.6. Moleküler Dinamik Simülasyonunun Ana Adımları

MD simülasyonlarda ana adımlar çalışılan sistemin zorlukları ve belirlenen farklı durumlara göre çeşitlilik gösterse de genel olarak dört adımdan oluşmaktadır ve bu adımlar simülasyonun gerçekleştirildiği GROMACS, AMBER, NAMD gibi yazılımlara göre değişkenlik göstermemektedir. Bu adımlar sırayla probleme göre sistemin içereceği protein, membran, ligand gibi molekül parametrelerinin kuvvet alanına göre belirlenmesi ve sistemin çözücü ve iyon çeşitliliği ve miktarının ayarlandığı sistem hazırlığı evresi; bu moleküllerin atomlarının bir biriyle çarpışmasını düzeltmek ve sistemi termodinamik olarak rahatlatmak yani potansiyel enerjiyi en aza indirmek için minimizasyon evresi; sistemin izobarik-izotermal yani sıcaklık ve basınç yönünden dengeye getirildiği ve moleküllerin termodinamik olarak kararlı duruma getirildiği dengeleme evresi ve son olarak problemin çözümüne dönük molekül etkileşimlerinden elde edilen çıktılarının olduğu en uzun basamak olan üretim evresinden oluşmaktadır (Allen, 2004).

1.2.3.1.6.1. Sistem Hazırlığı

Sistem hazırlığı, kullanılacak uygun simülasyon yazılımına göre moleküllerin başlangıç yapısı, içerdiği çözücü, iyon cinsi ve miktarı, uygulanacak kuvvet alanı ve parametre seçimi gibi kritik işlemleri içermektedir. Hazırlık genel anlamda iki kısma ayrılabilir. Bunlardan ilki moleküler başlangıç konfigürasyonunun hazırlanması diğeri ise seçilecek uygun kuvvet alanıdır. Örneğin sistem eğer lipid içeriyorsa charmm36 genellikle tercih edilirken, salt protein simülasyonlarında ff99SB-ildn ya da en güncel amber kuvvet alanı olan ff14SB kullanılmaktadır (Petrović, Wang, & Strodel, 2018). MD simülasyon aşamalarının en hassas ve önemli kısmını bu aşama oluşturmaktadır. Bu adımda yapılacak bir hata tüm sonuçları olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Braun vd., 2018).

1.2.3.1.6.2. Minimizasyon / Gevşeme

Minimizasyon adımı temel amaç sistemin toplam potansiyel enerjisinin Lokal Minimum'a indirgenmesidir. Böylelikle atomlar arasında bağlar arası mesafeden dihedral açılara ve rotamerlerin konformasyonuna, atomik çakışmalara kadar sistem konformasyonel olarak kuvvet alanının öngördüğü şekilde ideal hale getirilir. Sıklıkla bu işlem için dik-iniş (Steepest-Descent) algoritması kullanılır (Braun vd., 2018).

1.2.3.1.6.3. Dengeleme

Simülasyonun gerçek anlamda başlatıldığı aşama dengeleme aşamasıdır. İlk hızlar Maxwell-Boltzmann dağılımına uygun olarak belirlendikten sonra seçilen termodinamik topluluğa

(NVT, NVE, NPT) göre simülasyon başlatılır ve bu şartlara uygun analizler için veriler toplanmaya başlanır. Sistemdeki atomların başlangıç hızlarının doğru dağıtılması kinetik ve potansiyel enerjinin doğru hesaplanması için yeterli olmamakta bunun yanında sisteme sıcaklık girişi veya çıkışının olması gerekmektedir. Bunun için nihayetinde NVE topluluğu kullanılacaksa dahi denge aşamasında termostat kullanılması zorunludur. Dengeleme aşamasında basınç ve sıcaklığın yanında sistemin kinetik ve potansiyel enerji değişimi de izlenebilir. Bu parametrelerdeki dalgalanmaların azalarak stabil hale gelmesi sistemin dengeye getirilmesinde önemli bir işaret sayılabilir. Bunun yanında moleküllerin zamana bağlı kök ortalamasının kare sapması (RMSD) ve biyomolekül-su molekülleri arası hidrojen bağ oluşumu da incelenerek sistemin denge halinde olup olmadığına bakılır. Genel olarak gözlemlenen değişkenlerde hala sistemik bir eğilim devam ediyorsa dengelemenin tamamlanmadığı anlaşılmalıdır (Braun vd., 2018; Leach, 2001).

1.2.3.1.6.4. Üretim

Dengeleme aşaması başarı ile tamamlandıktan sonraki aşamada artık kullanılabilir veri elde edilebilmektedir. Literatür için kullanılabilir ve saklanabilir veri bu aşamada elde edilebildiği için üretim aşaması olarak adlandırılmaktadır. Bazı çalışmalarda kullanıcılar üretim aşamasının ilk verilerini göz ardı ederek daha dengeli simülasyon verisi elde etmeyi amaçlamaktadırlar. Atom hızlarının yeniden atanması ve ölçeklendirilmesi işlemi kesinlikle bu aşamada tekrarlanmamalıdır. Hesaplama kaynaklarının en fazla tüketildiği en uzun aşama üretim aşamasıdır. Her MD simülasyonun sistem başlangıcı, farklı hız ve momentum vektörü ile başladığından üretim aşamalarının birkaç kez en baştan tekrarlanıp karşılaştırılmaları veri güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır (Braun vd., 2018; Frenkel & Smit, y.y.).

1.2.3.2. Sanal Tarama ile Protein-Ligand Etkileşiminin Belirlenmesi

Günümüzde ilaç geliştirmede küçük moleküllerin hedeflediği makromolekülün katalitik merkezine konformasyonel değişiklikler yapıp yerleştirerek skorlama yapan hesaplamalı yaklaşımlar rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşımların çoğu iki yolla basitleştirilmiştir. Birincisi; konformasyonel kısıtlanma uygulaması olup esneklik sınırlandırılarak hesaplama maliyeti çok büyük oranda düşürülmektedir. Bunun yanında küçük moleküller de tam esnek yapıda değildir. Örneğin bu moleküllerde bağlara belirli bir açı verilerek dönüşün sadece o açıda gerçekleşmesi sağlanır. Böylelikle konformasyon çeşitliliğinin sonlu hesaplanabilir hale gelmesiyle etkin konformasyon taraması gerçekleştirilir. Genellikle makromolekül tamamen katı kabul edilip küçük molekül ligandlarda ise belirli açı katları şeklinde esneklik tanımlanmaktadır. İkinci yaklaşım ise genellikle ampirik bağlanma enerjisine dayalı

basitleştirilmiş skorlama fonksiyonları ve konformasyon arayışında oluşan etkileşime göre bağlanmanın otomatik olarak hızlı bir şekilde skorlanması prensibine dayanır. Bu yaklaşım ile yüksek hız için büyük kısıtlamalar yapılması ve sonucun deneysel verilerden uzaklaşabilme riski nedeniyle, araştırmacılar elde edilen skorlara göre aday olabilecek moleküllerin validasyonu için moleküler dinamik simülasyon ve serbest enerji hesaplamalarını da yapmaktadır (Forli vd., 2016). AutoDock, Dock, Glide, Gold, Igemdock gibi yazılımlar günümüzde ilaç keşfinde ve araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tip yazılımlar konformasyonel tarama yapmak için çeşitli yaklaşımlar kullanmaktadır. Bu yaklaşımlara; tüm serbestlik derecelerini dikkate alarak aktif merkeze ligandları yerleştiren sistematik yöntemler; dönebilen bağların torsiyonel dönüşlerini stokastik olarak Monte-Carlo ve evrimsel seçilim prensibine göre araştıran genetik algoritmalar ve molekülün enerji yüzey alanını araştırmak için moleküler dinamik simülasyon ve enerji minimizasyonu gerçekleştiren metodlar örnek verilebilir. Oluşan konformasyonların doğru şekilde skorlanması için ise yine birtakım yaklaşımlar geliştirilmiştir. Günümüzde yaygın kullanılan skorlama fonksiyonlarından önemli olanları; moleküller arası elektrostatik, Van Der Waals ve hidrojen bağlarını hatta entropi ve çözünme katkılarını da hesaba katan kuvvet alanı temelli yaklaşımlar; hidrofobik temaslar, hidrojen bağ sayısı gibi moleküller arası etkileşim türlerinin kaç kere gerçekleştiğine göre hesap yapan ampirik skorlama fonksiyonu; moleküller arası etkileşimleri istatistiksel olarak değerlendiren bilgiye dayalı fonksiyonlar ve hatta bu tip fonksiyonların iki veya daha fazlasını kombine eden yaklaşımlardır (Lionta, Spyrou, Vassilatis, & Cournia, 2014). Sanal tarama yaklaşımında en önemli amaç çok fazla sayıdaki aday molekülün makromolekül ile etkileşimi sonucu anlamlı etki potansiyeline sahip az sayıda molekülü filtrelemektir. Hata oranını azaltmak için üç veya daha fazla farklı skorlama ve konformasyonel tarama algoritmalarına sahip moleküler kenetleme yazılımları, paralel yürütülmekte ve bu yazılımların elde ettiği sonuçlar üzerinde genellikle konsensüs oluşmuş moleküller tercih edilerek bundan sonraki aşamada spektroskopik deneysel analizler ya da absöüt serbest enerji hesaplamaları ile validasyon çalışmaları yapılmaktadır.

1.2.3.3. Serbest Enerji Hesaplamaları

Serbest enerji, termodinamikte en önemli değer olarak kabul edilmektedir. Serbest enerji genellikle Helmholtz (A) ve Gibbs fonksiyonu (G) olarak ifade edilir. Gibbs fonksiyonu NPT topluluğu içeren sistemlerde kullanılırken Helmholtz fonksiyonu daha çok basıncın ihmal edildiği NVT topluluklarında tercih edilmektedir. MD simülasyonlarda serbest enerji hesaplamalarında genellikle Gibbs fonksiyonu kullanılmaktadır. Gibbs serbest enerjisi $G=H-TS$ olarak ya da daha açık ifade ile $G=U+PV-TS$ olarak formüle edilir. Bu denklemde H,

joule cinsinden entalpiyi; T kelvin cinsinden sıcaklığı; S, joule/kelvin cinsinden entropiyi; U, joule cinsinden iç enerjiyi; P, pascal cinsinden basıncı; V, m³ cinsinden hacmi temsil etmektedir (Leach, 2001). MD simülasyonlarda serbest enerji hesaplamaları ile protein-protein ya da protein ligand etkileşimlerinde konformasyonel geçişlerin ve bağlanma sonucu oluşan son durumların termodinamik olarak uygunlukları gösterilebilmektedir. Termodinamiğin ikinci yasasına uygun olarak sistem sürekli olarak entropisini artırma eğiliminde olduğundan, gibbs serbest enerji denkleminde de hareketle protein-protein ve protein-ligand etkileşimlerinde negatif G değerinin gerçekleşebilme eğilimi ifade edilmektedir. Eğer bu negatif değer daha yüksek olursa bu durum etkileşimin daha kararlı olduğunu bize ifade eder (Leach, 2001). MD simülasyonlarda serbest enerji hesaplamalarında çeşitli metodolojiler geliştirilmiştir. Bu metodlar; son durum okuma, absolüt kantitatif okuma olarak iki sınıfa ayrılabilir. Son durum okuması gerçekleştiren moleküler mekanik/Poisson-Boltzmann yüzey alanı (MM/PBSA) ve doğrusal etkileşim enerjisi (LIE) metodları kantitatif ölçümlerde başarılı olamamalarına karşın kıyaslamalı ölçümlerde oldukça başarılı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (Genheden & Ryde, 2015; Wickstrom, Gallicchio, & Levy, 2012). Absolüt kantitatif okuma gerçekleştirebilen metodlar arasında “*Thermodynamic Integration, Free Energy Perturbation* ve *Potential Of Mean Force*” sayılabilir (Chodera vd., 2011). Bu tür ölçüm metodolojilerine genel olarak simyasal (alchemical) ölçüm metodları da denmektedir. Bunun nedeni fiziksel etkileşimin serbest enerjisini hesaplamak için bu metodolojilerde fiziksel olmayan argümanların kullanılmasıdır.

1.2.3.3.1. Umbrella Örnekleme

Günümüzde serbest enerji hesaplamalarında, sistem enerjisinin Lokal Minimum’dan Global Minimum’a sürüklenmesinde enerji bariyerinin aşılması önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde Umbrella örnekleme, konformasyonel değişiklikler ve bağlanma-ayrılma etkileşimleri gibi durumların sonucunda ortaya çıkan serbest enerji değişimlerinin araştırılmasında güçlü ve rutin bir metodoloji olarak kullanılmaktadır. Umbrella örnekleme (US) metodunda, bir reaksiyon koordinatı belirlenerek bu koordinat boyunca ek bir harmonik potansiyel (E_{bias}) enerjisi eklenerek enerji bariyerinin aşılması hedeflenir. Çalışılan biyolojik konuya göre bu kuvvet; mesafe, dihedral ya da açı ile sınırlandırılabilir. Reaksiyon koordinatı (ζ) boyunca belirli noktalarda sistem tekrar simüle edilerek pencere açılmış olur. Genellikle eşit açı ya da mesafede bölümlenen bu pencerelerin belirli bir harmonik kuvvet sabiti ile simülasyonda her pencere için ayrı ayrı enerji verileri toplanmakta ve bunların dağılımları histogramlar üzerinde üst üste binmektedir. Bu pencerelerdeki sistemin enerjisi şu şekilde tanımlanır: $E_{US}=E_{sys}+E_{bias}$, $E_{bias}=k/2(\zeta-\zeta_{th})^2$. Bu denklemde; E_{US} ; Umbrella örnekleme

enerjisini, E_{sys} ; sistemin enerjisini, E_{bias} ise harmonik potansiyel enerjiyi temsil etmektedir. ζ ; sistemin sınırlanan değişkenin değerini, k ; harmonik potansiyelin kuvvet sabitini, ζ_{th} ise belirli penceredeki sınırlandırılmış değişkenin sabit değeridir. Her pencere için ζ_{th} değeri farklılık göstermektedir (Ziada, Braka, Diharce, Aci-Sèche, & Bonnet, 2018). Umbrella örneklemede her bir pencereden elde edilen enerji verileri ağırlıklandırılmış Histogram Analiz Metodu (WHAM) yardımı ile E_{bias} enerjisi çıkarılıp kombine edilerek Ortalama Kuvvet Potansiyeli (PMF) elde edilmektedir MD sistemde reaksiyon koordinatı boyunca oluşan PMF farkı serbest enerji değişimi olarak ilişkilendirilebilir (Kumar, Rosenberg, Bouzida, Swendsen, & Kollman, 1992).

1.2.3.3.2. MM/PBSA

Absolüt ligand-reseptör bağlanma affinitelerinin hesaplanması, protein-protein ve protein ligand etkileşimlerinin analizinde yüksek doğrulukta güvenilir metod olmasına karşın, son durum okumasını gerçekleştiren MM/PBSA metodolojisi hesapsal olarak yüksek verimde çalışması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler Mekanik/Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı (MM/PBSA), örtülü çözülme modeli (implicit solvent) serbest enerji hesaplamalarında kullanılan bir metottur. Ayrıca protein-ligand ve protein-protein etkileşimlerinde başarıyla uygulanmaktadır (F. Chen vd., 2016; Genheden & Ryde, 2015). Bu metod ile gerçekleştirilen protein-protein bağlanma çalışmalarında ZDOCK gibi popüler moleküler kenetleme araçlarından daha iyi performans sergilediği ve Termodinamik İntegration, FEP gibi yöntemlere göre çok daha az hesaplama maliyeti sebebiyle günümüzde ön plana çıkmıştır (F. Chen vd., 2016). MM/PBSA, Umbrella örnekleme ve Termodinamik İntegration gibi metodlara kıyasla daha az güvenilir olmasına karşın düşük hesaplama maliyeti ve bağıl serbest enerji kıyaslamalarındaki başarısı nedeniyle dikkat çekmeyi başarmıştır. Hesaplama maliyetinin çok daha düşük olmasının nedeni sadece ilk ve son durumların okunarak hesaba katılmasıdır. Bu şekilde hesaplama hızı çok yüksek olmasına karşın kantitatif ölçüm için uygun bir yöntem olmayıp aynı sistemde farklı ligandların bağlanma serbest enerjilerinin birbirine kıyaslamalı ölçümünde oldukça başarılıdır. MM/PBSA'da reseptör ve ligand kompleksinin bağlanma serbest enerjisinin ölçümünde aşağıdaki formülasyon kullanılmaktadır (T. Hou, Wang, Li, & Wang, 2011).

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{internal} + \Delta E_{electrostatic} + \Delta E_{vdw}$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{SA}$$

Denklemdede ΔE_{MM} ; gaz fazı MM enerjisindeki değışikliğini, ΔG_{sol} ; çözünme serbest enerjisini, $-T\Delta S$ ise Konformasyonel Entropiyi ifade etmektedir. ΔE_{MM} ifadesi, $\Delta E_{internal}$, $\Delta E_{electrostatic}$, ve ΔE_{vdw} enerjilerini içermektedir. ΔG_{solv} ifadesi, elektrostatik çözünme enerji ortalaması ($\Delta G_{PB/GB}$) ve elektrostatik olmayan çözünme enerji ortalamasını içermektedir (ΔG_{SA}). Polar katkı Poisson–Boltzmann modeli ile hesaplanırken polar olmayan katkı ise Solvent Erişilebilir Yüzey Alanı Metodu (SASA) ile hesaplanmaktadır. Konformasyonel entropi değışikliğı ($-T\Delta S$) ise MD simülasyonlardan elde edilen konformasyonel enstantanelerin normal mod analizi ile hesaplanmaktadır (T. Hou vd., 2011).

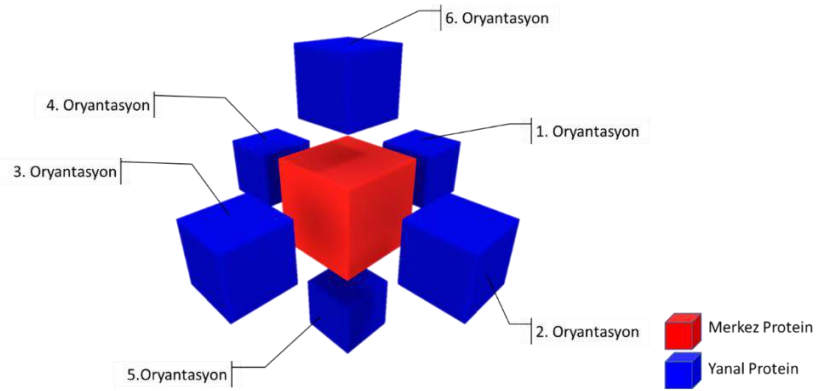
BÖLÜM II

2.1. Gereç ve Yöntem

2.1.1. Protein-Protein Etkileşimleri

2.1.1.1. CG-MMPBSA Kübik Eksende Oryantasyon Simülasyonları

Çalışmamızda bu yeni yaklaşıma göre, protein kompleksinde molekül ağırlığı daha büyük olan protein merkezde ve küçük olan protein kübik eksene göre merkezdeki proteinin çevresinde olacak şekilde 6 farklı oryantasyon oluşturuldu [Şekil 8]. Proteinler martini kuvvet alanına göre coarse-grained (CG) olarak modellenerek her bir oryantasyon ayrı ayrı en az ikişer mikrosaniye simüle edildi. Simülasyon sonunda her bir oryantasyondaki protein-protein etkileşimlerinin serbest enerjilerinin simülasyon boyunca değişimi MM/PBSA metoduna göre hesaplandı.



Şekil 8. İki proteinin kübik eksene göre oryantasyonlarının şematik gösterimi

2.1.1.1.1. Validasyon Seti

BİP-IRE1LD etkileşimini araştırmak için geliştirdiğimiz iri taneli kübik oryantasyon metodolojinin validasyonu için konformasyonu bilinen 2MWS, 2HD5, 1MIM ve 3QML kodlu dört farklı boyuttaki protein kompleksi tercih edildi (Mikol, 1996; Nowicka vd., 2015; Renatus vd., 2006; Yan, Li, & Sha, 2011). Bu kompleksleri tercih etmemizin sebebi; her biri farklı boyutta olduğundan boyut farkının ve 1MIM gibi yüksek esneklikteki proteinlerin esnekliğinin yaklaşımımızdaki etkisini gözlemektir. Her bir kompleks için kübik eksende altı farklı oryantasyon için ayrı ayrı 5'er mikrosaniye (μ s) simülasyon gerçekleştirildi. Ayrıca protein dimerlerinin doğal yapıları da 5 μ s boyunca simüle edildi. Her simülasyon için 5 μ s boyunca gerçekleşen protein-protein etkileşimlerinin serbest enerji değişimleri MM/PBSA metoduna göre hesaplandı. Tüm simülasyonlar iki kez daha tekrarlandı. Doğal form ve kübik eksende yerleştirilmiş 6 farklı konformasyon, dört protein kompleksi üzerinde olmak üzere

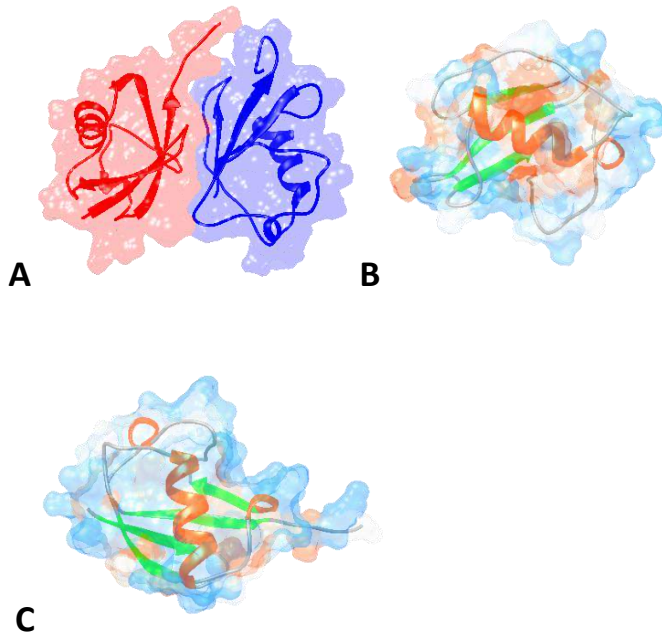
28 farklı oryantasyonda tekrarlarıyla beraber toplamda 420 μ s'lik simülasyon gerçekleştirilmiş oldu.

2.1.1.1.2. Validasyon Çalışmasında Kullanılan Protein Kompleksleri

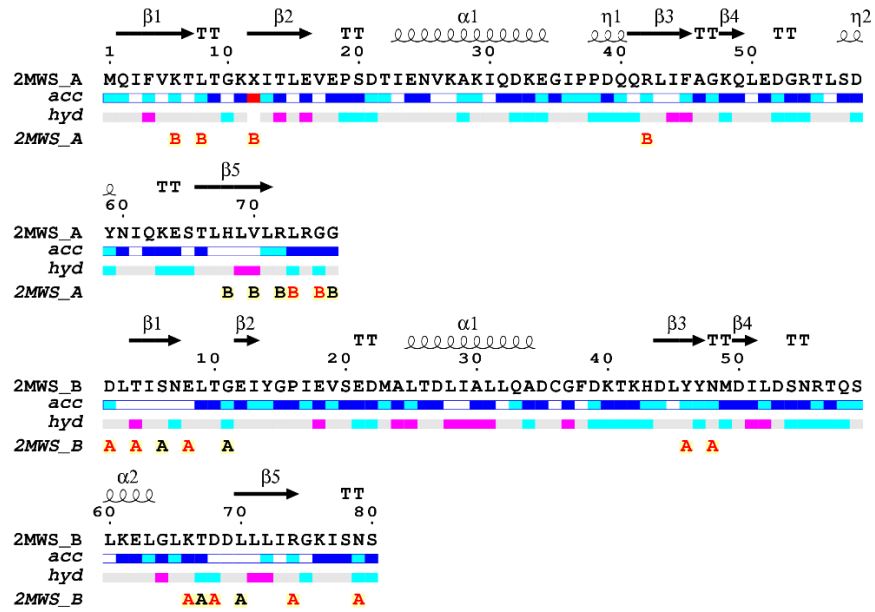
BİP-IRE1LD bağlanma etkileşimlerini araştırmak için geliştirdiğimiz kübik oryantasyon yaklaşımının doğruluğunu test etmek amacıyla aşağıdaki bağlanma paterni bilinen farklı büyüklüklerde 4 protein kompleksi ile validasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

2.1.1.1.2.1. Ddi1 Ubikuitin Benzeri (UBL) Domaini-Ubikuitin (Ub) Kompleksi (2MWS)

DNA hasarı indüklenebilir 1 proteini (Ddi1), proteazomal degradasyon için poliubikuitinlenmiş substratları hedefleyen mekik proteinleri ailesine ait bir proteindir. Bu protein tipik UBL-reseptörleri ile etkileşime girmemesine karşın beklenmedik bir şekilde, ubikuitin'i hidroforik etkileşim ve zıt yüklü rezidülerini tuz köprüleri ile bağlar (Nowicka vd., 2015). Şekil 9A'da gösterildiği gibi Ddi1UBL-Ub'in doğal bağlanma konformasyonu beta tabakaların yüz yüze gelmesiyle meydana gelirken helikal yapılar bağlanmaya katılmayarak zıt yönlerde kalmaktadır. Hidroforik yüzeyleri dikkate alındığında Şekil 9B ve C'de gösterildiği üzere turuncu renk yüksek hidroforikliği, mavi renk ise hidrofilik özelliği temsil ettiğinden ubikuitinin yüzeyinde daha fazla hidroforik alan yer alırken Ddi1UBL'nin ise daha hidrofilik olduğu görüldü. Şekil 10'da görüldüğü gibi 2MWS A ve B zinciri yüksek homolojik benzerliğe sahip olmasına karşın amino asit sekansları farklılık göstermektedir.



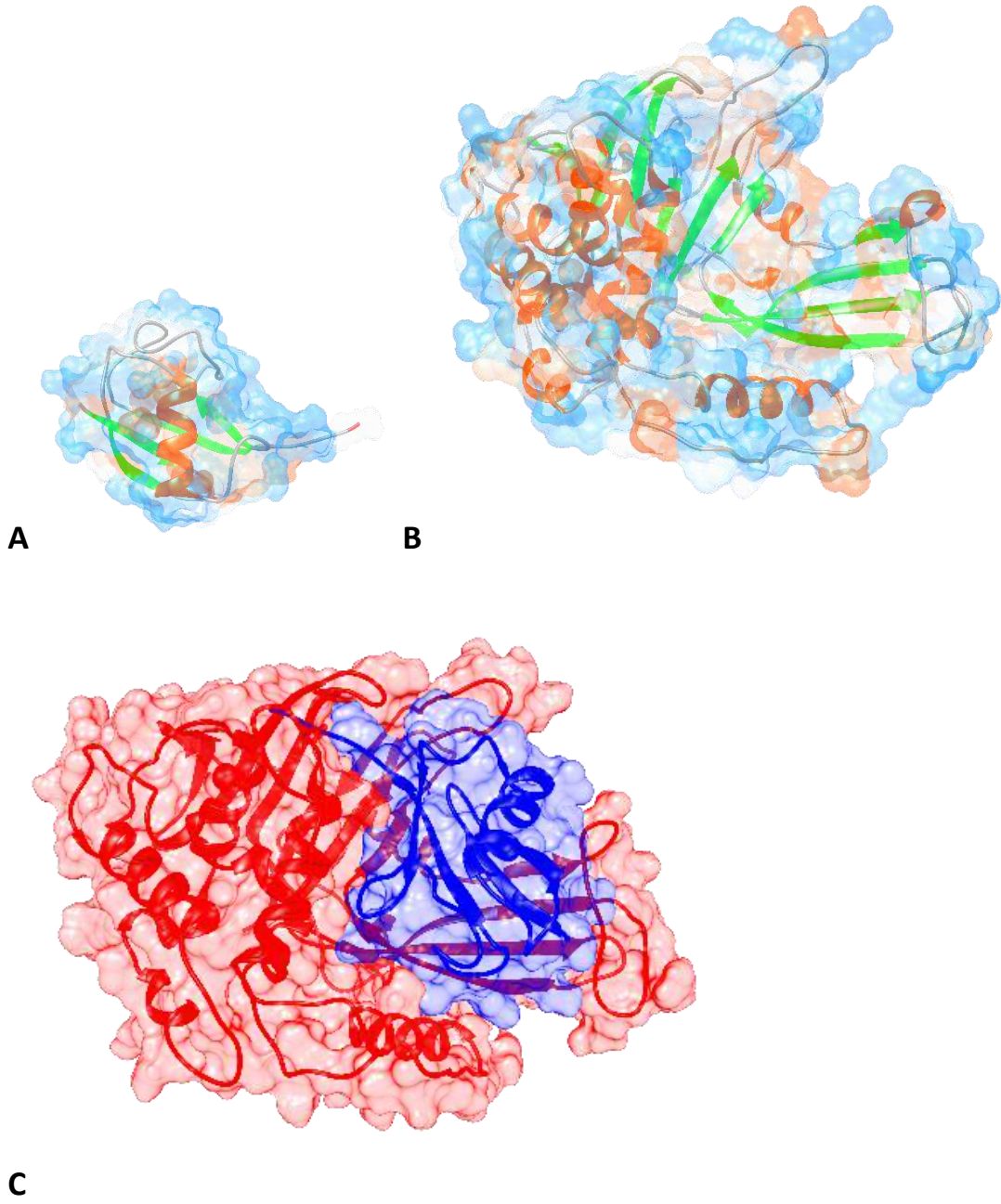
Şekil 9. (A)2MWS 2mws kodlu Ddi1UBL-Ub'nin biyoaktif bağlanma paterni, (B) Ubikitin ve (C) Ddi1UBL'nin "cartoon" olarak şematik görünümü



Şekil 10. 2MWS pdb kodlu Ddi1UBL-Ub kompleksinin aminoasit sekansı. A zinciri ubiquitin'i temsil ederken B zinciri Ddi1UBL'yu temsil etmektedir.

2.1.1.1.2.2. Ubikuitin-USP2 Kompleksi (2HD5)

Ubikuitin uzaklaştırıcı proteazlar protein ubikuitinasyonunu tersine çevirirler ve hedef proteini proteozom yıkımından kurtarırlar. Ubikuitin spesifik proteaz-2 (USP2) bir sistein proteazıdır ve ubikuitin spesifik proteaz ailesinin bir üyesidir. Prostat kanserinde aşırı eksprese olur ve bunun sonucunda bazı agresif prostat kanserlerinin habisliğine bağlı olan yağ asidi sentazını stabilize eder. USP2, ubikuitin ile kovalent olmayan bir kompleks oluşturur. Ubikuitin, USP2 ile iki bölgesiyle etkileşime girer (Renatus vd., 2006). Şekil 11C'de gösterildiği gibi USP2-Ub'in doğal bağlanma konformasyonu, USP2'nin sol el gibi Ub'yi hidrofobik yüzey ağırlıklı avuç içinde kavraması şeklindedir. Hidrofobik yüzeyleri dikkate alındığında Şekil 11A ve B de gösterildiği üzere turuncu renk yüksek hidrofobik özelliği mavi renk ise hidrofilik özelliği temsil etmektedir.

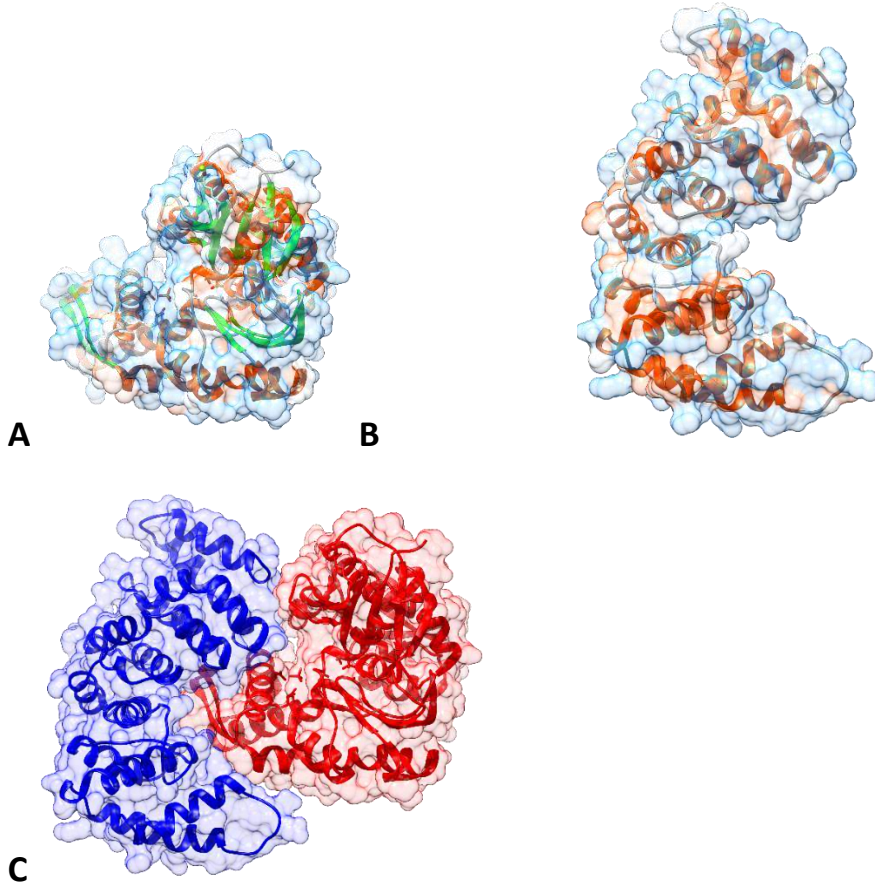


Şekil 11. (A) Ubikuitin, (B) USP2 ve (C 2HD5) pdb kodlu Ubikuitin-USP2 kompleksinin biyoaktif bağlanma paterni'nin "cartoon" formatta şematik görünümü

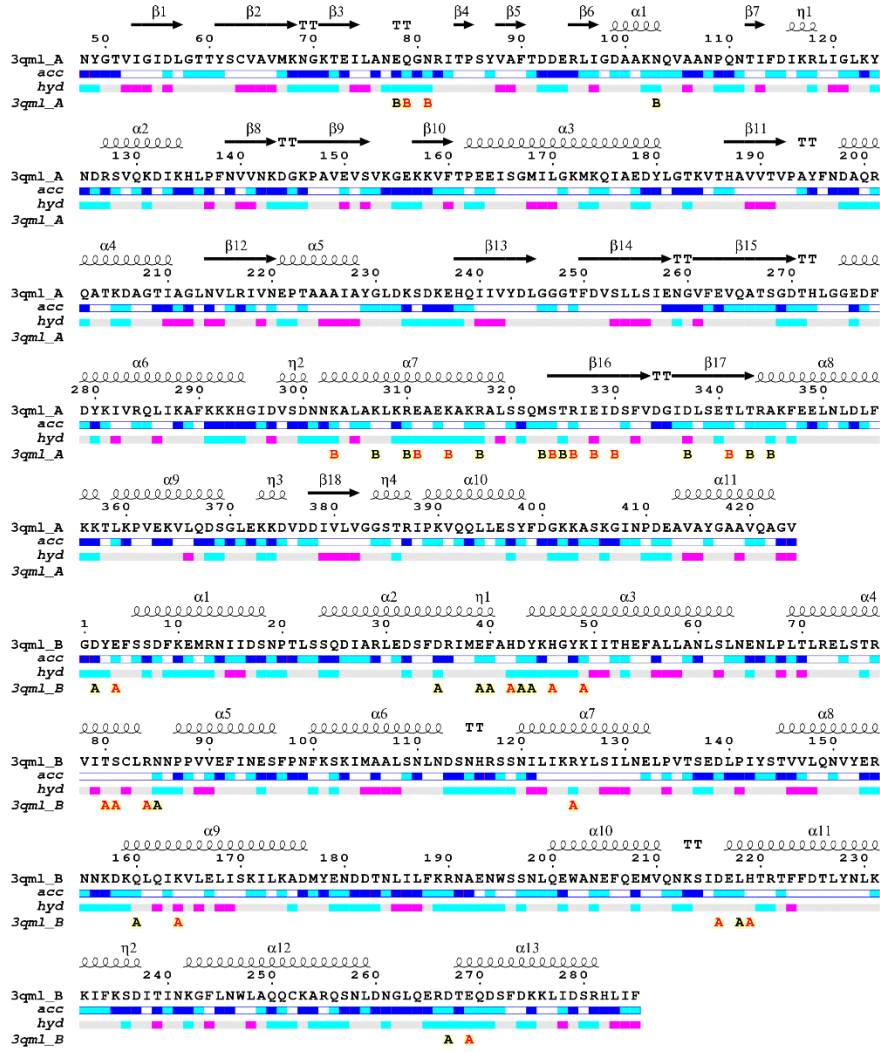
Ubikuitin-USP2 kompleksinin aminoasit sekansı kayıp rezidü içermemekle beraber USP2 13 alfa helikal, 20 beta plakadan oluşmakta; B zincirini oluşturan ubikuitin ise 5 beta plaka, 2 alfa helikal yapıdan meydana gelmektedir [Şekil 12].

2.1.1.1.2.4. Sil1-Bip Kompleksi (3QML)

Sil1, ökaryotik hücrelerde ER'de BİP için bir NEF (nükleotid değişim faktörü) olarak işlev görür. Sil1, Bip'in ATPase alanı ile doğrudan etkileşerek ADP salımını BİP'den katalize edebilir. Sil1-BİP kompleks yapısında Sil1 molekülü, BİP ATPase alanının lob IIb'sini bağlayan bir 'kelepçe' olarak işlev görür (Yan vd., 2011). BİP ağırlıklı hidrofilik yüzey alanı ile 18 beta, 11 alfa sekonder motife sahipken Sil1 13 alfa sekonder motife sahiptir ve hiç beta motif içermez. Ayrıca BİP'e göre daha fazla hidrofobik yüzey alanına sahiptir [Şekil 14]. BİP-Sil1 aminoasit dizisi şekil 15'te gösterilmiştir.



Şekil 14. (A, B) 3QML kodlu Sil1-Bip kompleksinin her bir domaininin hidrofobik yüzey alanının görünümü ile (C) biyoaktif bağlanma paterninin “cartoon” formatta gösterimi



Şekil 15. 3QML kodlu Sil1-Bip kompleksinin aminoasit sekansı

2.1.1.1.3. Validasyon Çalışma Sistemi

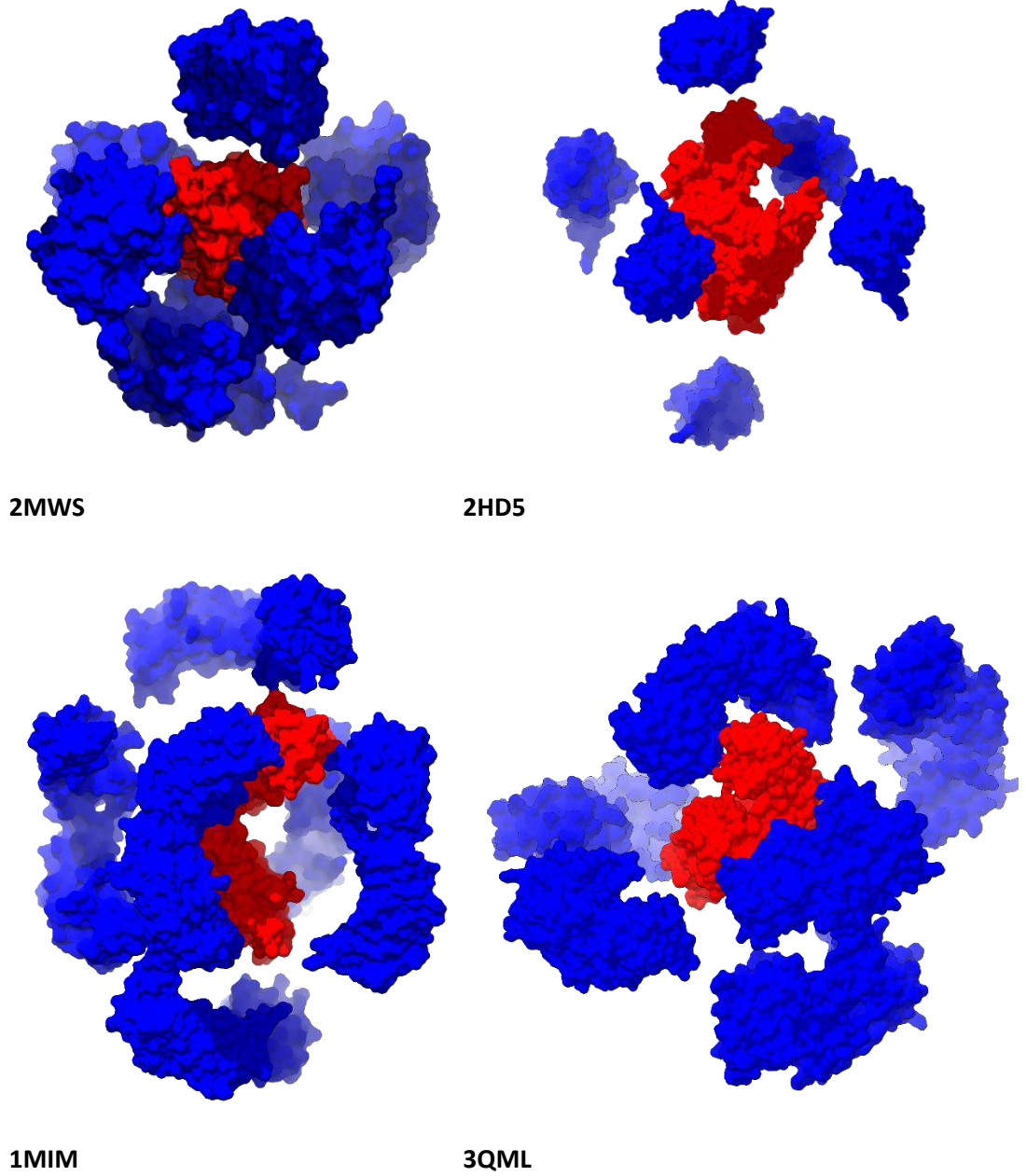
Tüm moleküler dinamik simülasyonlar HP Z640 iş istasyonu ve Tübitak TRUBA bilgisayar kümelerinde gerçekleştirildi. Protein-protein etkileşimleri Coarse Grained çözünürlükte simüle edildi. Coarse Grained sistem CHARMM-GUI(CHARMM-GUI.org) web sunucusunda martini maker aracı ile oluşturuldu.

2.1.1.1.4. Homoloji Modelleme

Validasyon çalışmasında kullanılan 4 kompleksten sadece 2HD5 kodlu protein dimerindeki ubiquitin karboksil terminal hidrolaz domainindeki 324-335 arası ve 394-399 arası kayıp rezidülerinin bulunması nedeniyle, homolojik yeniden modelleme için Chimera yazılımı içinde yer alan MODELLER (Andre Sali) programı kullanıldı. Diğer komplekslerde protein bütünlüğünü etkileyen kayıp rezidüler bulunmadığından homoloji modellemeye gerek duyulmadı.

2.1.1.1.5. Altı Eksenli Kübik Oryantasyonların Hazırlanması

Chimera yazılımı aracılığı ile her dört protein kompleksi için merkezde en büyük moleküler ağırlığa sahip protein ortalama 5 Å - 15 Å mesafede, doğal dimer yapıda etkileşime giren yüzeyi merkeze dönük olacak şekilde ağırlığı daha düşük olan proteinler kübik eksene göre 6 farklı oryantasyonda yerleştirildi [Şekil 16]. Her bir oryantasyon PDB formatında kaydedilerek tüm atomik modellerden CG modele dönüşümünün yapılacağı CHARM-GUI internet sunucusuna gönderildi.



Şekil 16. Validasyon setindeki dimer yapıların kübik oryantasyona göre dizilimi

2.1.1.1.6. CG Modellerin Hazırlanması ve Simülasyonu

CG modellerin hazırlanmasında MARTINI modeli tercih edildi. Martini-CG modellerinin hazırlanması için CHARMM-GUI internet sunucusunda yer alan Input Generator>Martini Maker> Martini Solution Maker aracı seçilerek yönergeler takip edildi. İlk sekmede yer alan dört farklı Martini Modeli seçeneğinden Elnedyn modeli polarize modele göre hızlı olması ve simülasyon sonunda proteinin sekonder yapısının stabil kalması nedeniyle tercih edildi. Tüm-atomik yapıdaki oryantasyon, sunucuya yüklendikten sonra 5 aşamada modelleme gerçekleştirildi. Aşamalar sırayla PDB Bilgisi, CHARMM PDB, çözücü, PBC ve Denge-Dinamik olarak sıralandı. İlk aşamada tüm proteinler seçilerek PDB manipülasyon seçenekleri içinden sadece terminal uçların yüklü olması tercih edildi. CHARMM PDB aşamasında içi su dolu kübik simülasyon sisteminin boyutu protein boyutuna sığdırıldı ve köşelerden proteine en yakın mesafe 12 Å olarak ayarlandı. Sistem içine 150 mM NaCl eklendi. İyon yerleştirme metodu olarak "Distance" seçildi. Çözücü aşamasında sistemin hacmi ve içerdiği iyon kontrol edildikten sonra PBC aşamasına geçildi. PBC aşamasında NPT Ensemble sıcaklığı 300 Kelvin olarak tercih edildi. Denge-Dinamik aşamasında ise CG model ve simülasyon için gerekli parametreleri içeren tüm dosyalar "Charmm-gui.tgz" olarak bilgisayara indirilip moleküler dinamik simülasyon için Tübitak-Ulakbim TRUBA sunucularına gönderildi.

2.1.1.1.6.1. Moleküler Dinamik Simülasyon

Tüm simülasyonlar GROMACS yazılımı ile yürütüldü. CG-Moleküler Dinamik Simülasyonu için gerekli tüm parametreler CHARMM-GUI sunucusundan alındı. CHARMM-GUI parametrelerine göre simülasyon toplam 4 kısımdan oluşmaktadır. İlk iki aşama atomlar arası uzaklık ve açılar optimum seviyeye getirildiği minimizasyon; üçüncü aşama sistemin enerjetik olarak denge konumuna getirildiği dengeleme; dördüncü aşama ise sistemin dengede olduğu ve verilerin toplanacağı üretim aşamasıdır. Birinci minimizasyon kısmında entegratör olarak "Steepest Descent" (steep) algoritması kullanıldı. Entegrasyon için zaman aralığı adımı 20 fs, komşu atom aramada kesim şeması olarak "Verlet", tüm yön periyodik sınır koşulları, sıcaklık eşleştirme algoritması için stokastik olarak hızı yeniden ölçeklendiren "V-Rescale", basınç eşleştirme algoritması olarak "İzotropik Berendsen" tercih edildi. Toplam simülasyon adımı 30,000 yapıldı. 1. ve 2. aşamadaki yumuşak geçişli minimizasyon için serbest enerji aktif olarak ayarlandı. İkinci minimizasyon aşamasında birinci aşamadan farklı olarak sadece serbest enerji kapatıldı diğer parametreler değiştirilmedi. Üçüncü aşamada sistemin dengeye getirilmesi için Newton'un hareket denklemlerini birleştiren Stokastik Leap-Frog Entegratörü kullanıldı. Entegrasyon için zaman aralığı adımı 20 fs, komşu atom aramada

kesim şeması olarak “Verlet”, tüm yön periyodik sınır koşulları, sıcaklık eşleştirme algoritması için stokastik olarak hızı yeniden ölçeklendiren “V-Rescale”, basınç eşleştirme algoritması olarak “İzotropik Berendsen” tercih edildi. Toplam simülasyon adımı 50,000 yapıldı. Bu kısma kadarki tüm simülasyonlarda atomik kısıtlama, üretim kısmında ise sadece atomlar arası bağlar için kısıtlama algoritması LINCS kullanıldı. Dördüncü adım olan üretim kısmında dengeleme kısmından farklı olarak basınç eşleştirme algoritması olan izotropik Parrinello-Rahman tercih edildi. Toplam simülasyon adımı olarak 250 milyon ayarlandı. Toplam üretim simülasyonu 5,000 nanosaniye (ns) sürdü.

2.1.1.1.7. Serbest Enerji Hesaplamaları

Her üç protein dimeri için Moleküler Mekanik Poisson Boltzmann Yüzey Alanı (MM / PBSA) yöntemini kullanarak MD yörüngesinin enstantanelerinden bağlanma serbest enerji hesaplamaları gerçekleştirildi (Kollman ve ark. 2000).

Dimer oryantasyonları ve doğal dimer bağlanma serbest enerjilerinin hesaplanmaları, Kumari ve arkadaşları tarafından geliştirilen g_mmpbsa aracı kullanılarak, toplam enerji hesabı için 5 µs boyunca; entropik etkileşimin hesaplanması için ise son 500 ns'deki MD simülasyonu ile analiz edildi. MM / PBSA hesaplamalarında, desolvasyonun kutupsal bileşeni, PB modelleriyle hesaplandı. Izgara boyutu 0,5 Å'ya ayarlandı. PB hesaplamasında kullanılan proteinlerin kısmi yükleri, kuvvet alanı parametrelerinden alındı. Vakum elektrostatik hesaplamada çözünen dielektrik sabiti 2, çözücü dielektrik sabiti ise 80 olarak ayarlandı. G_mmpbsa serbest enerji hesabı, vdW, elektrostatik, polar ve apolar enerjiler de dahil olmak üzere birkaç enerji bileşenini içerir. Bağlanma enerjisi, aşağıdaki denkleme dayanarak hesaplandı: $G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{psolv} + \Delta G_{npsolv} - T\Delta S$. ΔE_{MM} , Van Der Waals ve elektrostatik etkileşimlerin toplamıdır. Entropi Katkısı ($T\Delta S$)'nın olduğu ve olmadığı iki hesaplama biçimi kullanıldı. Pahalı hesaplama maliyeti nedeniyle, entropi terimi (TDS) bağlanma enerjisi hesaplamalarına dahil edilmedi.

2.1.1.1.8. İstatistiksel Analiz

İri taneli Kübik oryantasyon yaklaşımının validasyonunun istatistiksel ölçümü için ROC (receiver operating characteristic) eğrisi çizildi. Eğrinin çizilebilmesi için eşik (cut-off) değerleri olarak 0, -1000, -1500, -2000, -2500, -3000, -3500 kJ/mol değerleri belirlendi. 1. oryantasyon ve doğal formun minimum serbest enerjisi eğer eşik değerin altındaysa gerçek pozitif, üstündeyse yanlış pozitif; 2-6 arası oryantasyonlarda minimum serbest enerji eşik değerin altındaysa yanlış negatif, üstündeyse gerçek negatif olarak değerlendirilerek hesaplama gerçekleştirildi. Her protein için ayrı ayrı yapılan değerlendirmede eşik değer olarak

oryantasyonların Toplam Serbest Enerjilerinin birbirine göre durumları ele alındı. Eğer 1. oryantasyonun veya doğal formun toplam serbest enerjisi diğer oryantasyonlardan düşükse gerçek pozitif, yüksekse yanlış pozitif, 2-6 oryantasyonların Toplam Serbest Enerjisi 1. oryantasyondan düşükse yanlış negatif, yüksekse gerçek pozitif olarak hesaplamalar gerçekleştirildi.

2.1.1.1.9. İri Taneli Yapıdan Tüm Atomik Yapıya Dönüşüm

CG simülasyon ve serbest enerji hesaplamalarından sonra son enstantanelerin atomik etkileşimlerinin analizi ve gösterimi için yapıların, iri tanecikli yapıdan tüm atomik yapıya dönüştürülmesi gerçekleştirildi. Bunun için CHARMM-GUI internet sunucusunda yer alan Input Generator>Martini Maker> Martini to All-Atom Converter aracı kullanıldı. Sistem tipi solüsyon seçildi. PDB manipülasyon seçeneklerinde “Terminal Group Patching” kutusu işaretlendi. Bileşen yapı seçeneklerinde Na iyonu tercih edildi. PME FFT için otomatik olarak ızgara bilgisi oluşturuldu. Kuvvet alanı seçeneklerinden Charmm36m tercih edilerek Gromacs kutusu işaretlendi. Tüm atomik simülasyon için gerekli tüm dosyalar Gromacs formatında elde edildi.

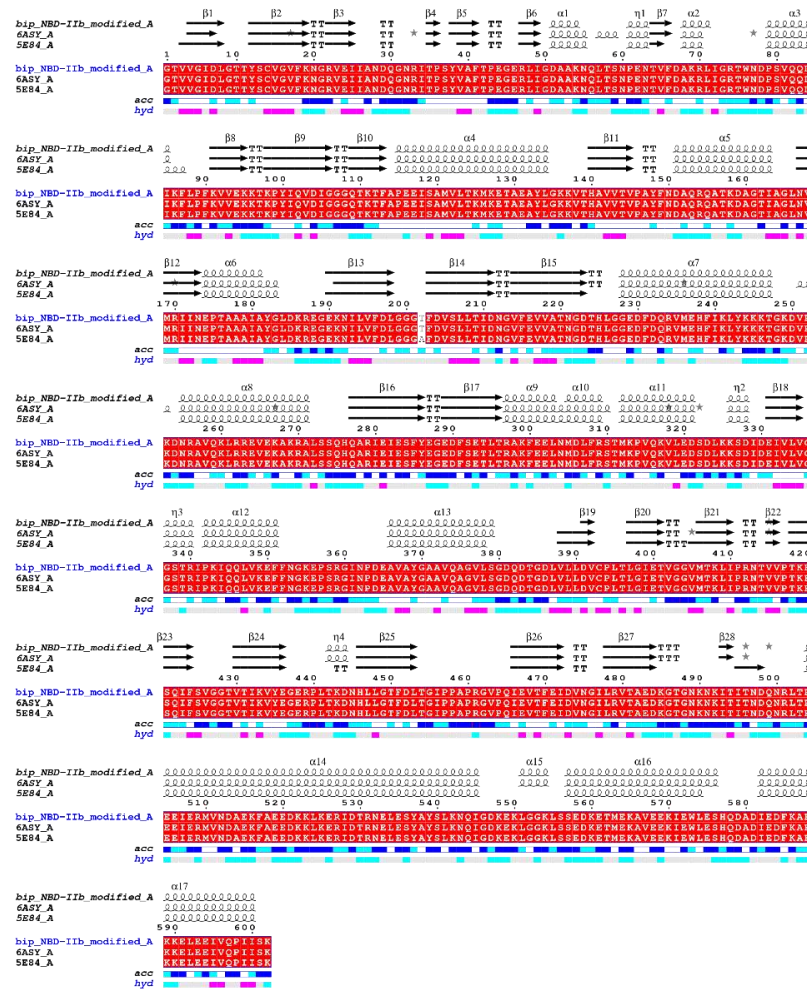
2.1.1.2. BİP-IRE1LD Etkileşiminin CG-MMPBSA Kübik Eksen Oryantasyon Simülasyonları

2.1.1.2.1. BİP ve IRE1LD’nin Yeniden Yapılandırılması

BİP proteini için PDB.org (rcsb.org) veri sunucusundan 5e84 kodlu yapı tercih edildi (Yang, Nune, Zong, Zhou, & Liu, 2015). 5e84 içindeki 7 eş protein yapıdan Molprobit skora göre en yüksek skora sahip b Chain tercih edildi (skorlar tablo 7’de gösterildi). 5e84_b’de 427. residü olan THR, pdb dosyasında isim olarak GLU girildiği için tekrar THR olarak düzeltildi. THR-428, VAL-429, val-433, LYS-576, LEU-579, LYS-582 residülerinde kayıp atomlar Chimera Rotamer aracı ile Dunbrack Rotamer Library metoduna göre tamamlandı (Dunbrack & Karplus, 1993). İnsan ve maya IRE1 dimerizasyon domainlerinin yüksek benzerliğinden dolayı; IRE1 maya 2be1 luminal domaini referans olarak alınarak 103-124 no’lu residüler ve 2HZ6 kodlu insan IRE1 luminal domaini referans kabul edilerek 38-42, 58-62, 83-87 no’lu residüler modeller homoloji modelleme aracıyla yeniden modellendi (Credle, Finer-Moore, Papa, Stroud, & Walter, 2005; Webb & Sali, 2014; Zhou vd., 2006). 308-378 arasındaki disordered domain için de-novo yapı tahmini I-Tasser ile gerçekleştirildi (Y. Zhang, 2008). İnsan IRE1 aminoasit sekansı Uniprot’tan (75460) temin edildi (The UniProt Consortium, 2017).

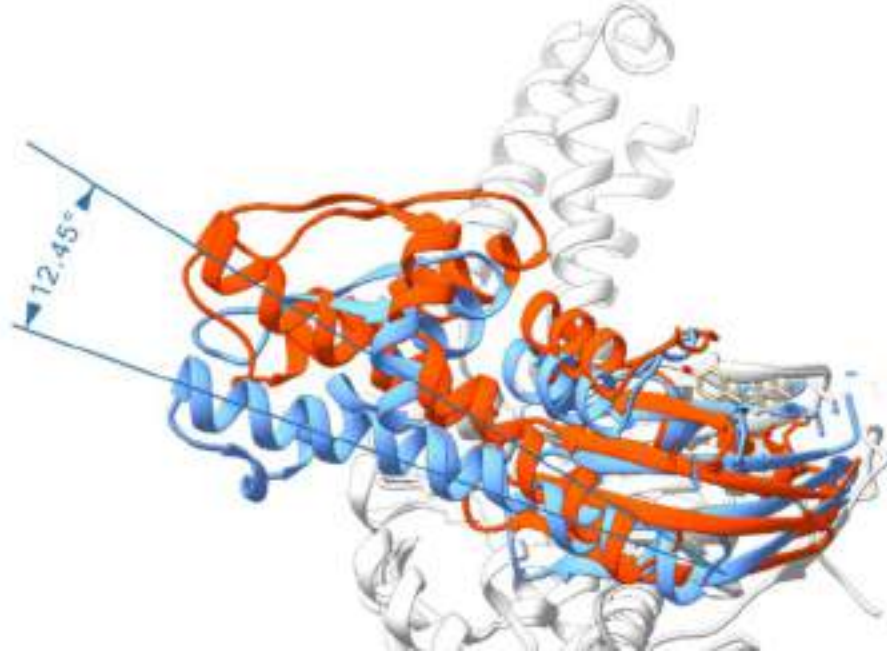
Açık ve kapalı konformasyonlara sahip olan BİP NBD domainindeki kapalı olan NBD-IIB alt domaini açık konformasyon ile değiştirildi. Açık konformasyonlu 3IUC kodlu BİP NBD domaini ve kapalı 6ASY, Chimera yazılımı ile açıldı (Pettersen vd., 2004; Wisniewska vd., 2010; Yang

vd., 2017). NBD-IIB dışındaki tüm rezidüler seçilerek hizalandı. 6ASY’de 1-4 arası rezidüler 3IUC’ye göre boşta kaldığından silindi. Rezidü numaraları iki yapı için de aynı olacak ve 1’den başlayacak şekilde tekrar numaralandı. 6ASY’de 1-378 arası rezidüler silindi. İki yapı kombine edilip tek bir yapı olarak ve Chain kodları aynı olacak şekilde tekrar isimlendirildi. Elde edilen PDB dosyasının otomatik optimizasyonu için VMD programı ile açılıp PDB formatında BİP-NBDIIβ-açık olarak kaydedildi. Şekil 17’de BİP’in NBDIIβ domaini modifiye edilmiş (açık form) aminoasit sekansı ile 6ASY ve 5E84 pdb kodlu proteinlerin aminoasit sekansı karşılaştırmalı olarak gösterildi (Yang vd., 2017, 2015). Endscript programına göre 5e84 ve 6ASY arasında ortalama özdeşlik %99.83, ortalama benzerlik %99.92 ve RMS 1.2 iken oluşan farklılık ise 5e84’te NBD domaininin ATP bağlanma bölgesindeki ATP-ADP dönüşümünde 229. aminoasit pozisyonunda tireonin yerine alaninin yer almasından kaynaklandı. BİP_NBD-IIβ değiştirilmiş (açık) ile 6ASY arasındaki ortalama özdeşlik ve benzerlik %100’dür. Şekil 19’da BİP proteininin NBD-IIB kapalı ve açık konformasyonlarının üst ve yanlardan görünümü “cartoon” formatta ve konformasyonel değişikliğine uğrayan NBD II-A ve II-B sarı renkte gösterilmektedir.



Şekil 17. BİP_NBD-IIβ değiştirilmiş (açık), 5e84 ve 6ASY sekanslarının hizalanmış görüntüsü

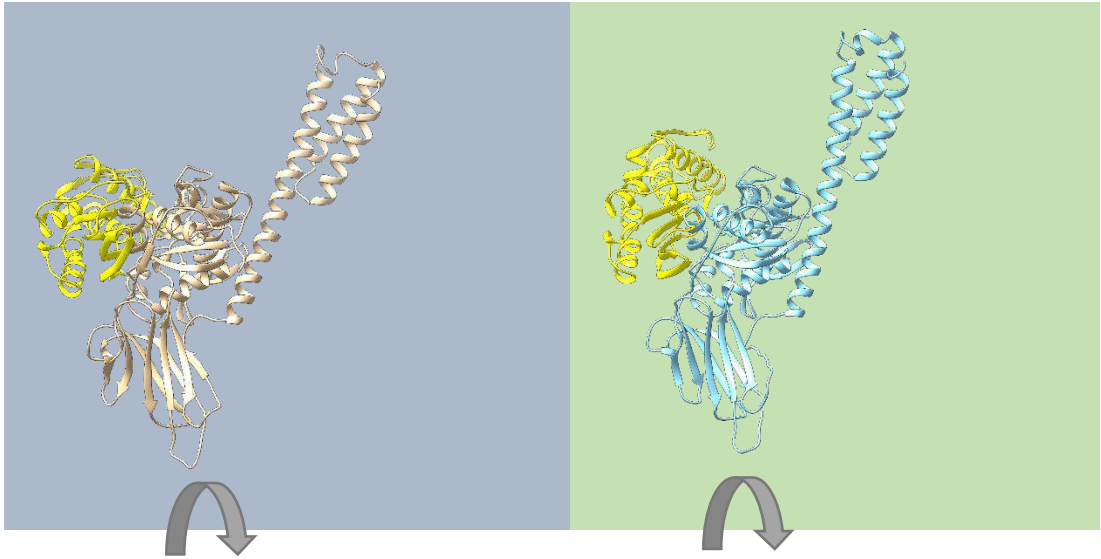
BİP-NBD-IIB açık ve kapalı yapıları hizalandığında NBD-IIA ve NBD-IIB alt domaini içeren yapılar arasında açısal olarak $12,45^\circ$ 'lik fark oluşmaktadır [Şekil 18]. Bu açının oluşmasının nedeni ATP hidrolizi sonucu açığa çıkan enerji ile BİP NBD domaininde meydana gelen konformasyonel değişikliklerdir.

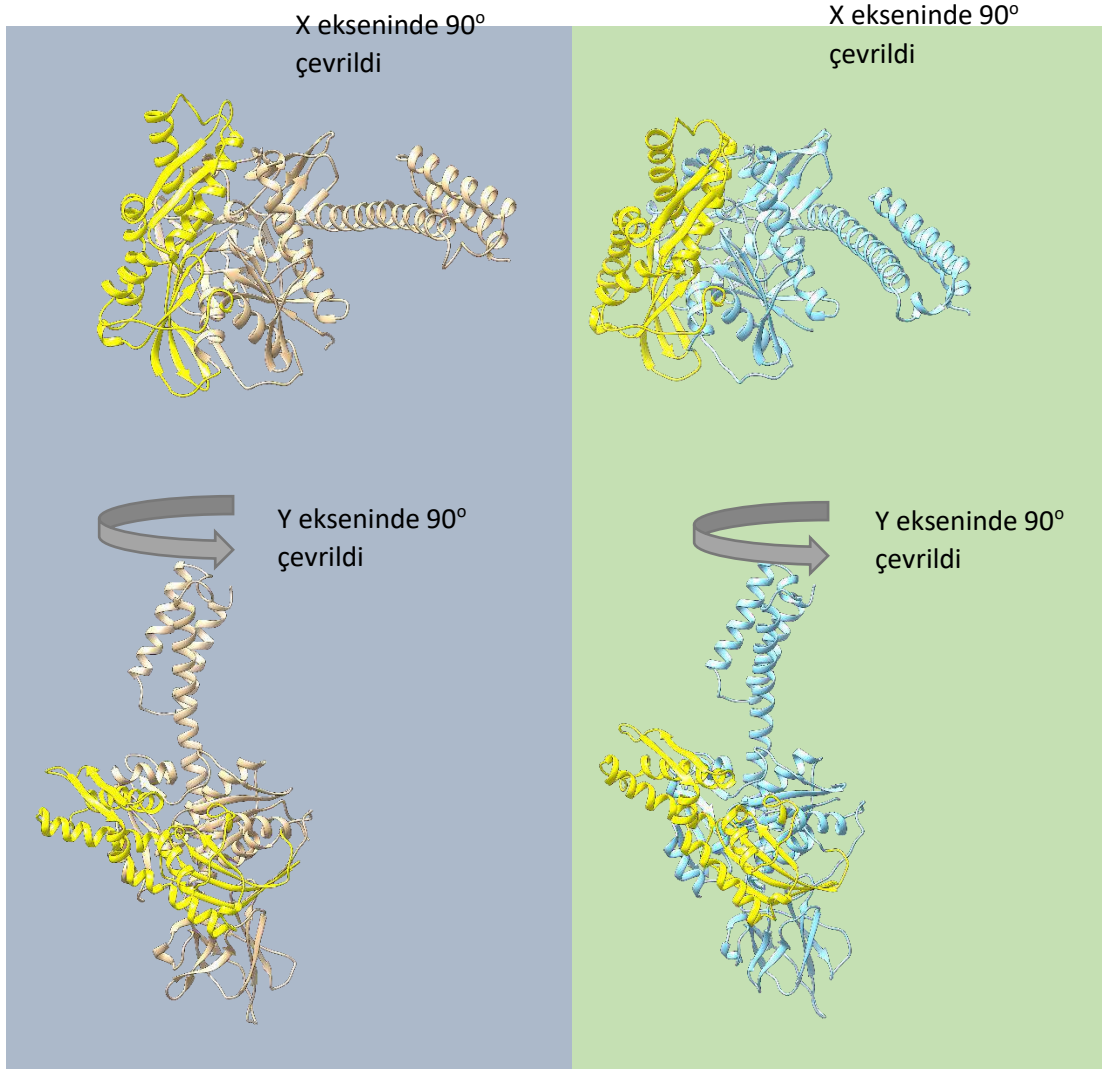


Şekil 18. BİP-NBD-IIB açık ve kapalı yapılarının hizandıktan sonraki açısal farkı

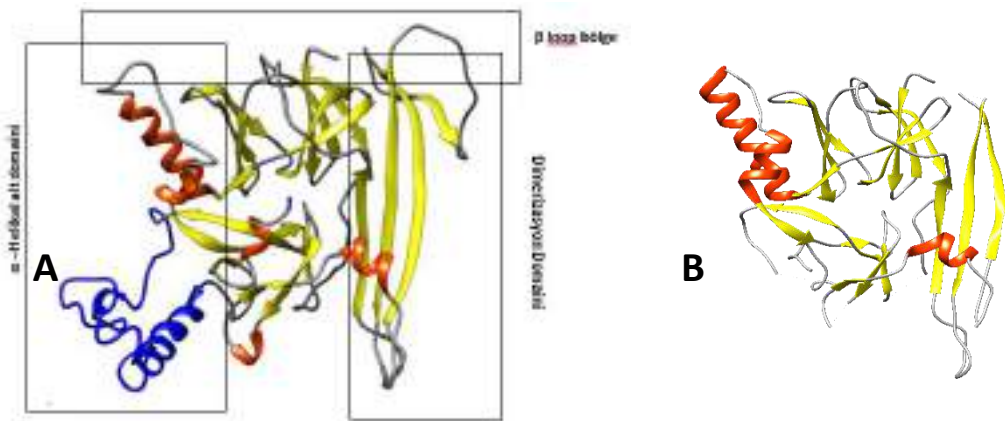
BİP-NBD-IIB kapalı

BİP-NBD-IIB açık





Şekil 19. BİP-NBD-IIB açık ve kapalı konformasyonlarının farklı yönlerden gösterimi.



Şekil 20. (A) IRE1LD proteinin cartoon biçiminde yapılandırılmış, (B) yapılandırılmamış görüntüsü

Şekil 20A'da 2hz6 pdb kodlu IRE1LD proteininin kayıp rezidülerinin homoloji modelleme metodu ile yeniden yapılandırılmış hali "cartoon" formatta şematize edildi. Sarı renk beta

sekonder motifleri, turuncu renk alfa helikal motifleri, mavi renk ise çok esnek olmasından dolayı “disordered” domaini göstermektedir. Şekil 20B’de ise 2hz6 pdb kodlu IRE1LD proteininin yapılandırılmadan önceki hali şematize edildi.

2.1.1.2.2. IRE1LD Model Validasyonu

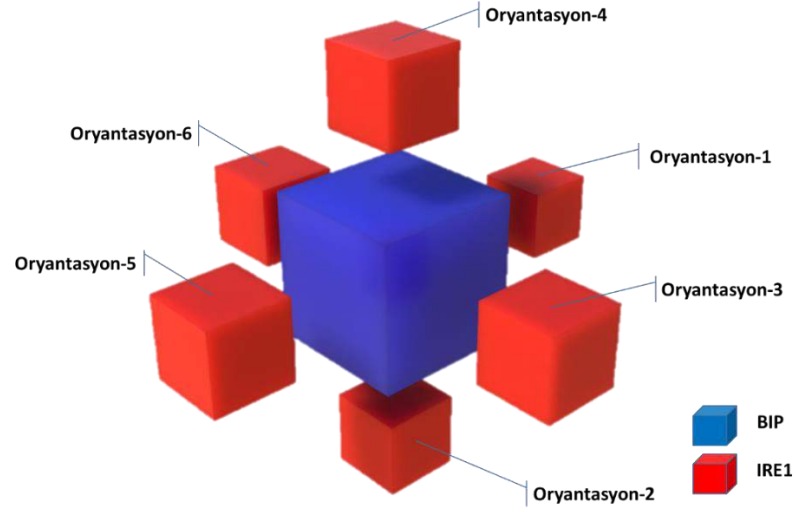
Gromacs 5.1.4 moleküler dinamik yazılımı daha önce belirtildiği koşullarda 200 ns boyunca IRE1LD dimerizasyonunun simülasyonu gerçekleştirildi. Protein yapısal kalitesinin ölçümü için Molprobitry Skor kullanıldı. Dimer formda 200 ns simüle edilen IRE1LD homoloji modeli Mol Probitry Server ile valide edildi. MD simülasyon ile 5,000 adım Stepest Descent enerji minimizasyonu gerçekleştirildi.

2.1.1.2.3. BİP Proteinini İçin Normal Mod Analizi

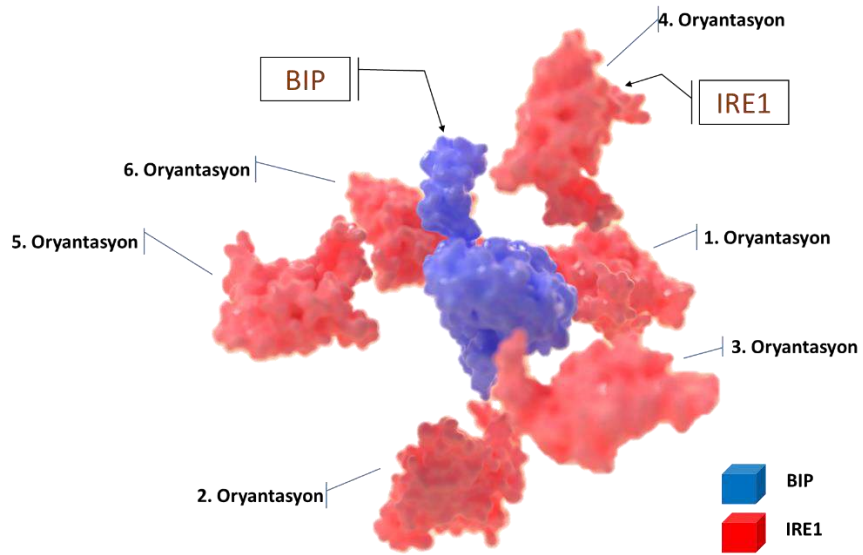
BİP dinamiğinin yapı temelli analizi için Prody aracı kullanıldı (Bakan, Meireles, & Bahar, 2011). Normal Mode Wizard (NMWiz) aracı ile ise Temel Bileşen Analizinin (PCA) grafiksel gösterimi yapıldı.

2.1.1.2.4. BİP-IRE1LD Oryantasyonları ve Açık, Kapalı Konformasyonlarının Hazırlanması

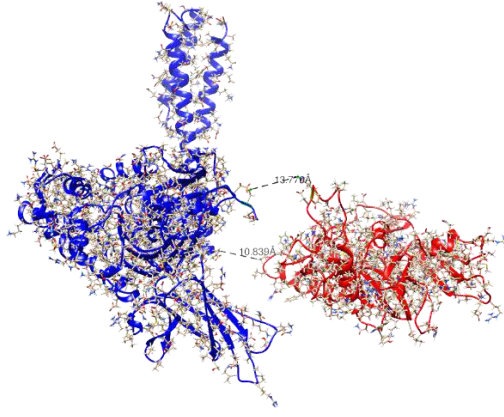
BİP merkezde olmak üzere Şekil 21 ve 22’de görüldüğü gibi kübik eksene göre IRE1LD (IRE1LD luminal domaini) proteini BİP’in çevresine 10-15 Å mesafe olacak şekilde yerleştirildi. BİP’e bağlanmada rolü olduğu düşünülen 5. Bölge BİP proteinine dönük olarak yerleştirildi. Şekil 23 belirtilen her bir BİP-IRE1LD oryantasyonları ayrı ayrı en az 2 µs olacak şekilde iri taneli (Coarse Grained) çözünürlükte simüle edildi. BİP’in açık ve kapalı konformasyonu için iki ayrı oryantasyon kümesi hazırlandı. Bunun için sadece merkezdeki BİP proteinlerinin NBDIIβ açık ve kapalı formlarının yeri değiştirildi ancak IRE1LD proteinlerinin konumları değiştirilmedi. Ayrıca açık ve kapalı konformasyonların simülasyonu için ilave olarak iki oryantasyon daha eklenerek toplam 8 oryantasyonun [Şekil 24,25], 5 µs uzunlukta 3 tekrarlı simülasyonları yapıldı



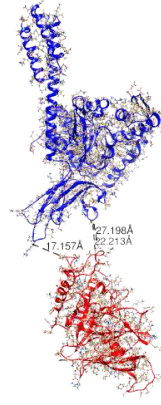
Şekil 21. BİP ve IRE1LD'nin altı eksenle kübik oryantasyonun şematik gösterimi



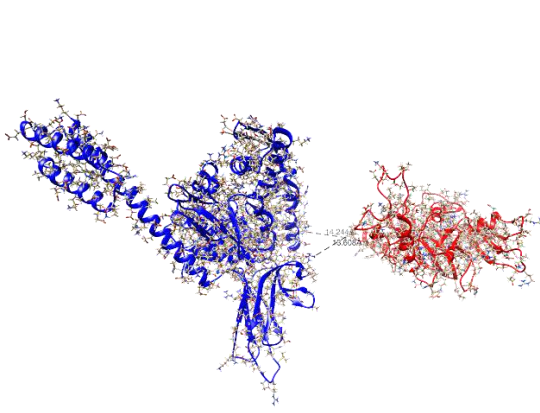
Şekil 22. BİP ve IRE1LD'nin altı eksenle kübik oryantasyona göre dizilimi sonucu konformasyonel görünümü



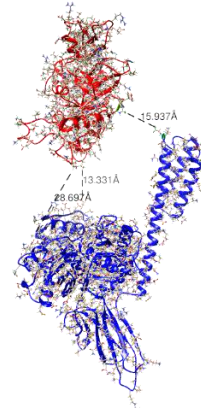
1. Oryantasyon



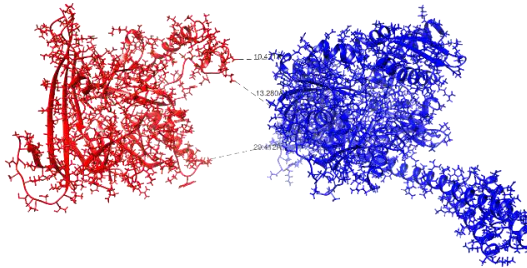
2. Oryantasyon



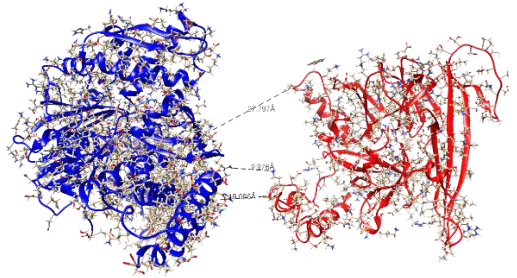
3. Oryantasyon



4. Oryantasyon



5. Oryantasyon



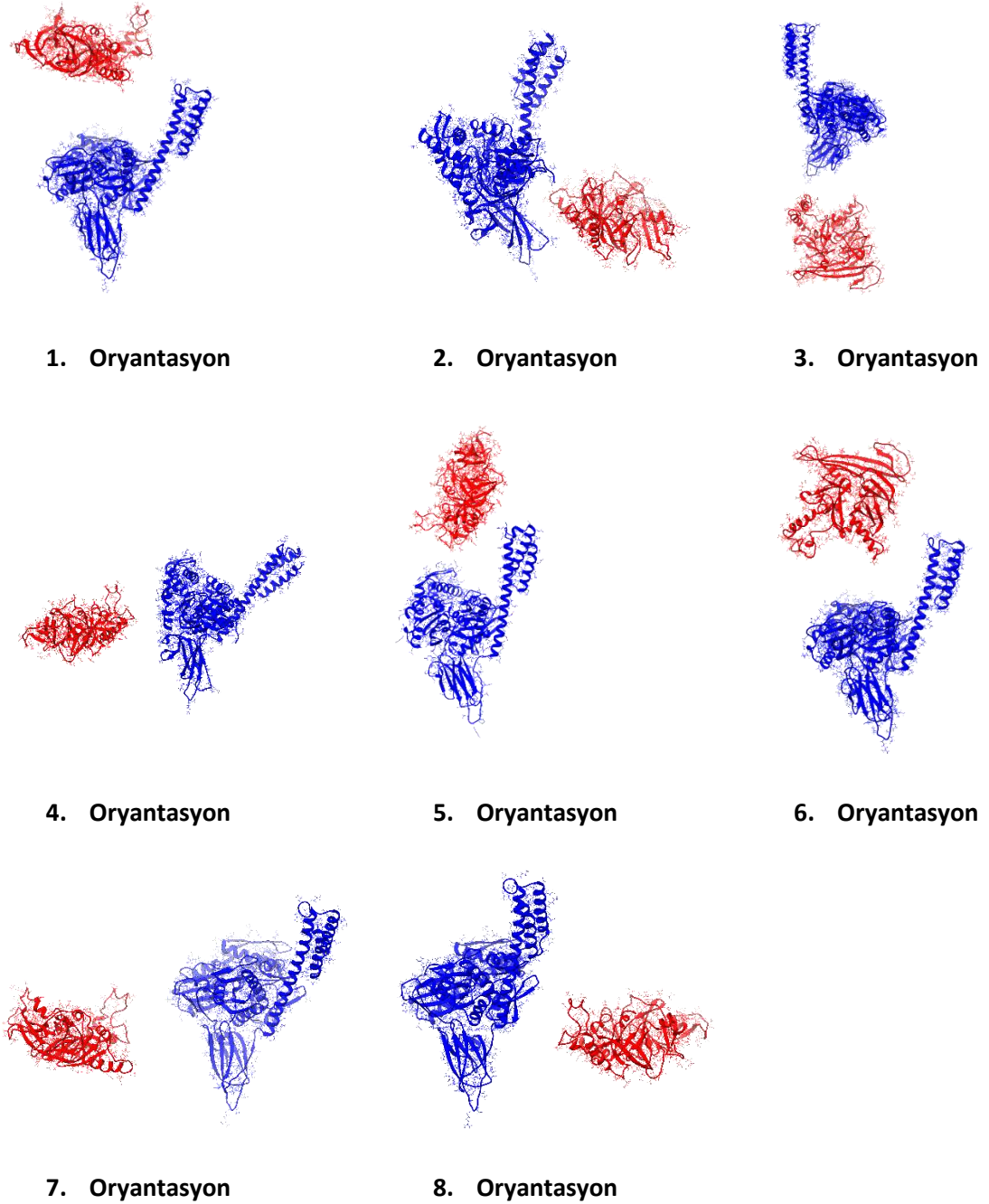
6. Oryantasyon

Şekil 23. BİP ve IRE1LD'nin her bir oryantasyonunun uzaklıklarının gösterimi (kapalı form)

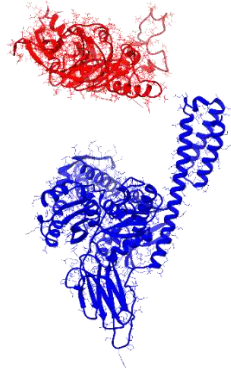
2.1.1.2.5. BİP/IRE1LD Açık ve Kapalı Oryantasyonlarının Kübik Ekseninde Hazırlanması ve Simülasyonu

Önceki 6'lı kübik oryantasyon çalışmasından farklı olarak 4. oryantasyondaki IRE1LD'nin farklı yüzeylerinin NBDIIβ ile etkileşimlerinin de gözlenmesi amacıyla kübik olarak farklı

eksenlerinin BİP'e dönük konformasyonlarının belirlenmesi için 1. ve 6. olmak üzere iki yeni oryantasyon ilave edildi diğer oryantasyonların pozisyonlarında değişiklik yapılmadı. Oryantasyon isimleri yeni eklemeler nedeniyle 1→2, 2→3, 3→4, 4→5, 5→7, 6→8 olarak değiştirildi.



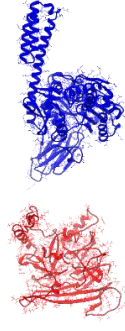
Şekil 24. BİP-NBD-IIB-kapalı /IRE1LD oryantasyonları simülasyon öncesi pozisyonları



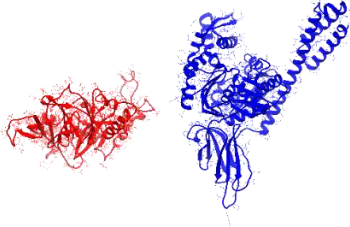
1. Oryantasyon



2. Oryantasyon



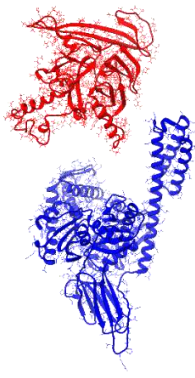
3. Oryantasyon



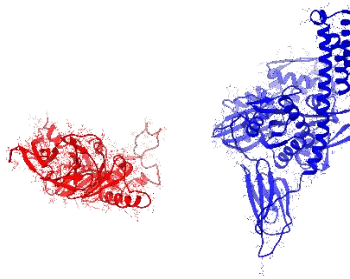
4. Oryantasyon



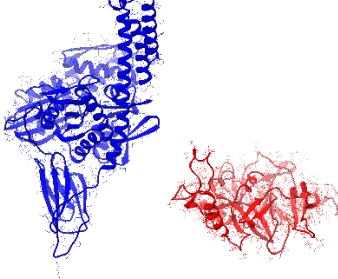
5. Oryantasyon



6. Oryantasyon



7. Oryantasyon



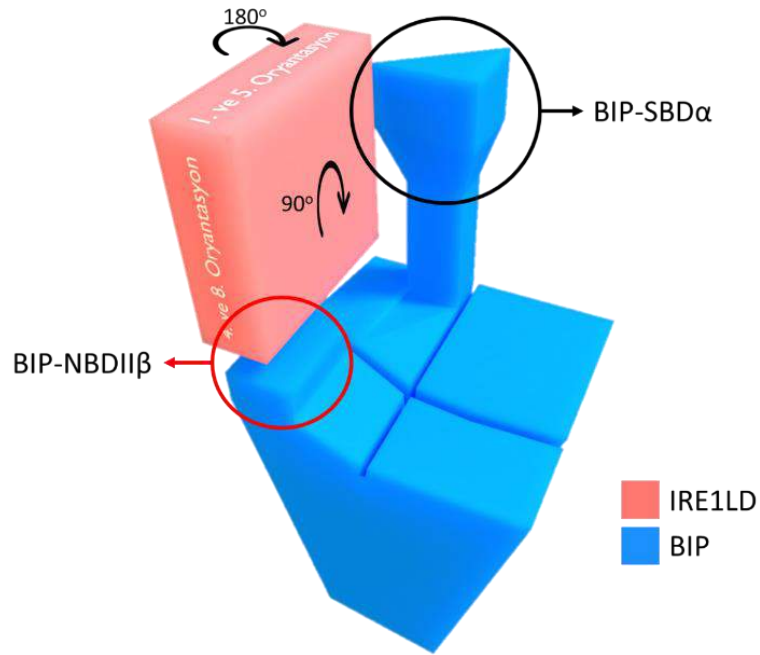
8. Oryantasyon

Şekil 25. BİP-NBD-IIB-açık /IRE1LD oryantasyonları simülasyon öncesi pozisyonları

2.1.1.2.6. BİP/IRE1LD Açık ve Kapalı Oryantasyonlarının NBD-IIβ Ekseninde Hazırlanması ve Simülasyonu

IRE1LD'in BİP NBD-IIB ekseninde IRE1LD dikdörtgen prizma gibi düşünülerek IRE1'in dar yüzleri NBD-IIB domainine bakacak şekilde y ekseninde her oryantasyon için 90° çevirilerek 4 yüz oryante edildi. Ayrıca z ekseninde 180° çevrilerek simetrik görünümleri de oryante

edilerek toplam 8 oryantasyon elde edildi. Aynı işlem NBD-IIB/açık ve kapalı konformasyonlar için de ayrı ayrı gerçekleştirildi [Şekil 26].

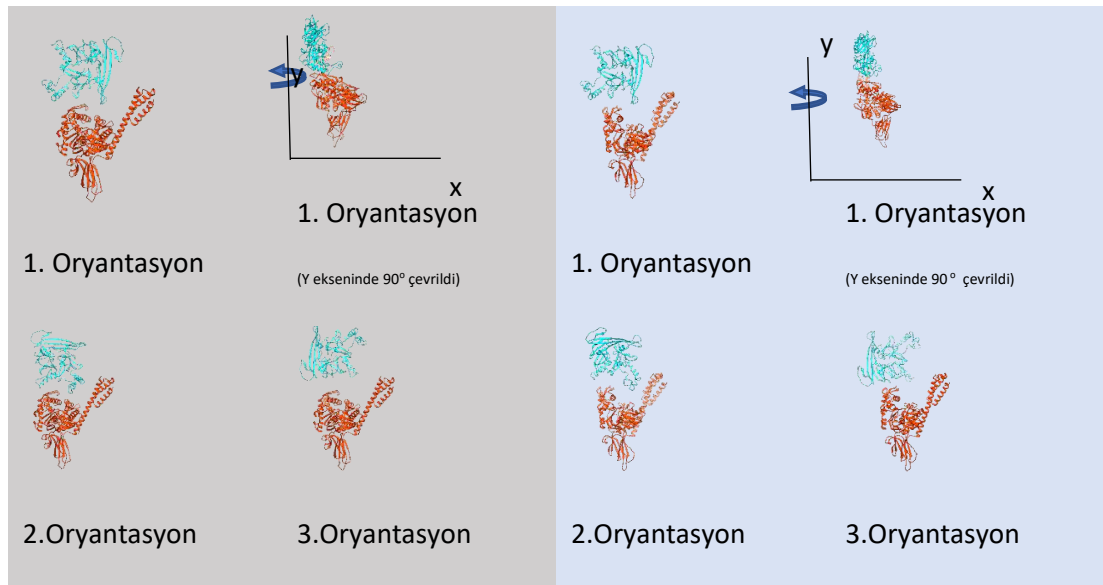


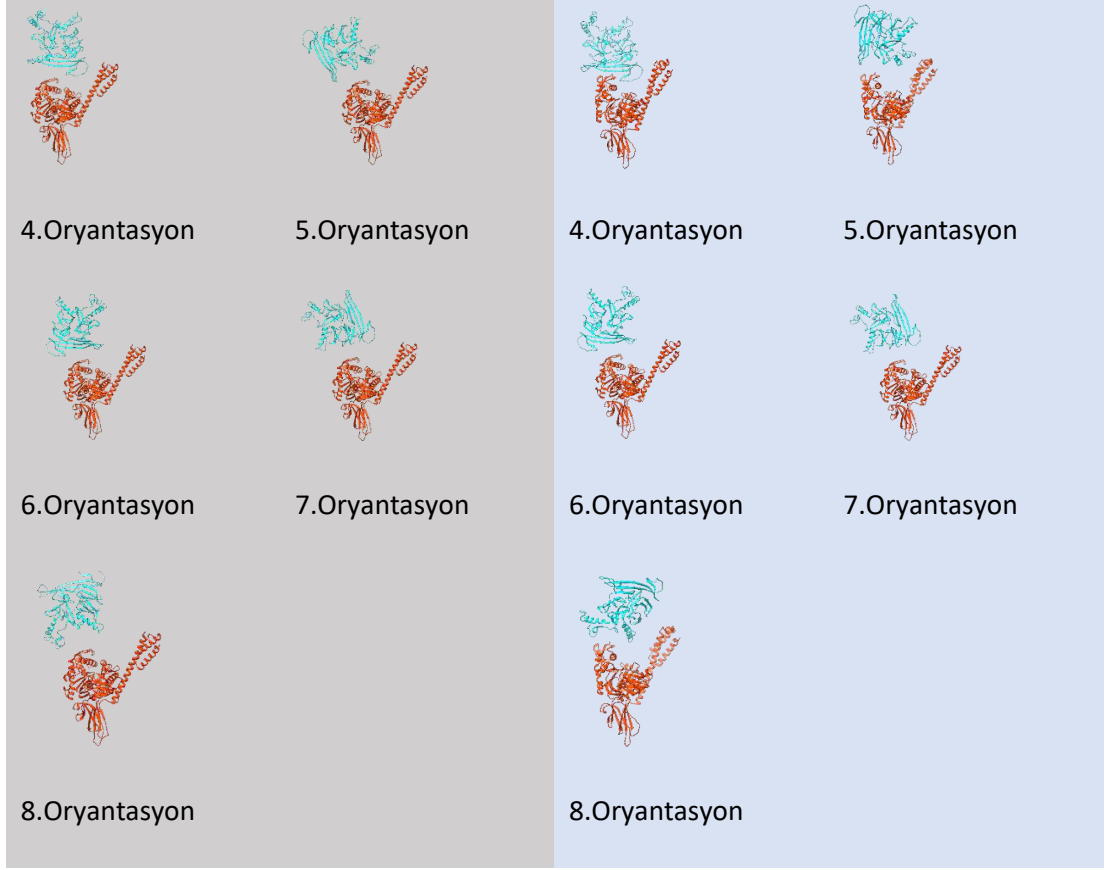
Şekil 26. BİP-NBDIIβ ekseninde IRE1LD oryantasyonlarının şematize görünümü

Her bir oryantasyonun konumlandırılmış hali şekil 27’de gösterildi. BİP bütün oryantasyonlarda sabitken IRELD, BİP-NBDIIβ üzerinde olacak şekilde konumlandırıldı.

BİP NBD-IIB kapalı oryantasyonlar

BİP NBD-IIB açık oryantasyonlar





Şekil 27. BİP/IRE1LD açık ve kapalı oryantasyonlar

2.1.1.2.7. Coarse Grained Sistemin Hazırlanması

Coarse-Grained MD simülasyonu iki minimizasyon; bir dengeleme ve prodüksiyon aşamasından oluşmaktadır. Coarse Grained MD simülasyonunu gerçekleştirmek için proteinlerin Tüm Atomik Çözünürlükten Coarse Grained çözünürlüğe dönüştürülmesi gerekmektedir. Bunun için CHARMM-GUI server kullanıldı (charmm-gui.org). Elnedyn Martini kuvvet alanı tercih edildi. Model/Domain seçme sekmesinde tüm domainler seçildi. PDB manipülasyon sekmesinde terminal uçlar yüklü olarak tercih edildi. Su sisteminin boyut seçenekleri diktörtgen olarak, sistemde en yakın mesafeler 14 Å ve NaCl iyon konsantrasyonu 0,15 M olarak tercih edildi. Periodik Boundary koşulları sekmesinde sıcaklık 300 K° tercih edildi. Elde edilen Coarse Grained modellerin simülasyonu TRUBA sunucularında ya da HP-Z640 iş istasyonunda yürütüldü.

2.1.1.2.8. Moleküler Dinamik Simülasyon

IRE1 yapı refine işlemi ve BİP SBDα mobilite validasyonu için Tüm Atomik MD ve IRE1-BİP etkileşimi için Coarse Grained MD simülasyonları GROMACS 5.1.4 yazılım paketi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu simülasyonda Tüm Atomik MD simülasyonlarda kuvvet alanı olarak

ffamber99.ildn star, su modeli olarak tip3p, Coarse Grained MD simülasyonlar için ise Martini22 kuvvet alanı ve Martini su modeli, protein stabilitesi için Elnedyn22 elastik network model 0,9 nm cutoff ve elastik bağ güç sabiti olarak 500kjoule/mol kullanıldı. 20 fs zaman adımı ayarlandı. Coarse Grained modellerin oluşturulması için Charmm-Gui server tercih edildi.

Tüm atomik simülasyonlara 0,15 M NaCl eklenerek sistem nötralize hale getirildi. Uzun dönem elektrostatik etkileşimler için Particle Mash Ewald algoritması kullanıldı. Wander Waals etkileşimleri Lennard Jones potansiyelinde tanımlandığı gibi 10 Å cut-off mesafe uygulandı. Enerji ve basınç için Dispersion Correction uygulandı. Sistem için box yapı tercih edildi. 2 fs zaman adımı ayarlandı. 5,000 adım Stepest Descent minimizasyon uygulamasından sonra 100 ps NVE ve 100 ps NPT Equilibration gerçekleştirildi. NVE Ensemble'da 300 K'de V-Rescale termostat algoritması NPT Ensemble'da ilave olarak 1 bar basınçta Berendsen Termostat Algoritması kullanıldı. MD üretim aşamasında 300 K'de Noose Hover Termostat ve 1 atmosfer basınçta Perinello Rahman Barostat Algoritması tercih edildi.

2.1.1.2.9. BİP Proteini Serbest Enerji Yüzeyi Alanı Hesaplanması

Öncelikle BİP proteininin 100 ns boyunca Tüm Atomik Simülasyonu yapıldı. Simülasyon boyunca proteindeki konformasyonel değişikliği gözlemek için RMSD analizi gerçekleştirildi. αSBD domaininde konformasyonel değişiklikte rol oynadığı düşünülen 113-579, 113-581, 113-578 ve 114-582. rezidüler arasındaki 100 ns boyunca gerçekleşen mesafe değişimleri hesaplandı ve RMSD-mesafe grafiği elde edildi. BİP'in NBD domaini ve SBD domaini arasındaki serbest enerji etkileşimi 100 ns boyunca MM/PBSA metoduna göre hesaplandı. RMSD, mesafe ve enerji değişkenlerini içeren üç boyutlu matris grafiği elde edildi.

2.1.1.2.10. MD Trajectory Analizi

MD simülasyon boyunca konformasyonel değişimleri belirlemek amacıyla Gromacs yazılım araçları ile yapılar arasındaki RMSD ve RMSF analizleri yapılarak imajlar ve yapısal gösterimler VMD ve Chimera ile hazırlandı.

2.1.1.2.11. BİP-IRE1LD Oryantasyonlarının Serbest Enerji Hesaplamaları

Her bir oryantasyonun MD simülasyon sistemi üzerinde Serbest Bağlanma Enerji Hesaplamaları, moleküler Mekanik Poisson Boltzmann Yüzey Alanı (MM/PBSA) yöntemi kullanılarak MD yörüngesinin enstantanelerinden elde edildi (Kollman ve ark. 2000). BİP ve IRE1LD oryantasyonlarının bağlanma serbest enerjileri, Kumari ve ark. tarafından geliştirilen g_mmpbsa aracı kullanılarak, Entropik Enerji hesaplamalarında son 500 ns; Total Enerji

hesaplamalarında ise 2,000 ns'lik MD simülasyonlardan 10 ns aralıklarla anlık görüntüler alınarak analiz edildi. MM/PBSA hesaplamalarında, desolvasyonun kutupsal bileşeni, PB modelleriyle hesaplandı. Izgara boyutu 0,5 Å'ya ayarlandı. PB Hesaplamasında kullanılan proteinlerin kısmi yükleri, kuvvet alanı parametrelerinden alındı. Vakum Elektrostatik Hesaplamada çözünen dielektrik sabiti 2 olarak, çözücü dielektrik sabiti ise 80 olarak ayarlandı. VdW, elektrostatik, polar ve apolar enerjiler de dahil olmak üzere birkaç enerji bileşenini içeren G_mmpbsa, bağ enerjilerini değerlendirmek için kullanıldı ve her rezidünün bağ enerjisine verdiği enerji katkısı hesaplandı. Bağlanma enerjisi, $bG_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{psolv} + \Delta G_{npsolv} - T\Delta S$ denkleminde göre hesaplandı. ΔE_{MM} , Van Der Waals ve elektrostatik etkileşimlerin toplamıdır. Bu çalışmada entropi katkısı (TΔS)'nın olduğu ve olmadığı şeklinde iki hesaplama yapılarak, bağlayıcı enerjiyle karşılaştırılabilir olduğundan rezidü katkısını değerlendirmek için her bir rezidünün ΔE_{MM} katkısı kullanıldı. Pahalı hesaplama maliyeti nedeniyle, Entropi terimi (TDS) bağlanma enerjisi hesaplamalarına dâhil edilmedi.

2.1.1.2.12. İri Tanecikli Yapıdan Tüm Atomik Yapıya Dönüşüm ve Vakum Ortamında MD Simülasyonu

BİP-IRE1LD oryantasyonlarının CG simülasyon ve serbest enerji hesaplamalarından sonra en düşük enerjili oryantasyonun atomik etkileşimlerinin analizi ve gösterimi için yapıların iri tanecikli yapıdan tüm atomik yapıya dönüştürülmesi gerçekleştirildi. Bunun için CHARMM-GUI internet sunucusunda yer alan Input Generator>Martini Maker> Martini to All-Atom Converter aracı kullanıldı. Bu serverda sistem tipi solüsyon seçildi, PDB manipülasyon seçeneklerinden "Terminal group patching" ve bileşen yapı seçeneklerinden Na iyonu tercih edildi. PME FFT için otomatik olarak ızgara bilgisi, kuvvet alanı seçeneklerinden Charmm36m tercih edilerek Gromacs kutusu işaretlendi. Tüm atomik simülasyon için gerekli tüm dosyalar Gromacs formatında elde edildi. Charmm-Gui protokolüne göre MD simülasyon 10 ns uzunluğunda susuz olarak vakum ortamında gerçekleştirildi. Bu protokole göre önce 5,000 adımlık dik iniş algoritmasına (Steepest Descent) göre minimizasyon daha sonra 25,000 adımlık dengeleme gerçekleştirildi, dengeleme fazında sıcaklık eşleştirme algoritması olarak Nose-Hoover tercih edildi. Sıcaklık 300K'e ayarlandı.

2.1.2. Protein-Ligand Etkileşimleri

2.1.2.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerinde Etkili İlaçlar ve Bazı Flavonoidlerin IRE1-JNK Yolağı Üzerindeki IRE1, ASK1 VE JNK1 Proteinleri ile Etkileşimlerinin Moleküler Kenetleme, Moleküler Dinamik ve Serbest Enerji Metoduyla Araştırılması

Bu çalışmamızda kardiyovasküler sistem üzerinde etkili olan Statinler, ACE inhibitörleri, Aritmi ilaçları ve Flavonoidlere ait toplam 43 etken maddenin IRE1, ASK1, JNK enzimleri ile etkileşimleri ve enzim inhibitörleri ile karşılaştırılmaları, moleküler docking, moleküler dinamik simülasyon ve serbest enerji metodları kullanılarak araştırıldı.

Moleküler Docking (moleküler kenetleme) hesaplamaları, Autodock4, Autodock Vina, iGEMDOCK ve GOLD olmak üzere dört farklı hesaplama algoritması kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir ilaç grubunda en yüksek afiniteye sahip molekül için Moleküler Dinamik Simülasyon işlemleri GROMACS 5.1.4, serbest enerji hesaplamaları ise g_mmpbsa aracı ile MM/PBSA metoduna göre hesaplandı. Moleküler docking hesaplamalarından elde edilen yüksek affiniteli ligandlar için MM/PBSA (Poisson-Boltzmann surface area) ve Umbrella örnekleme metodları serbest enerji hesaplamalarında kullanıldı.

2.1.2.1.1. Proteinlerin Yapılandırılması

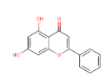
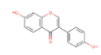
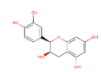
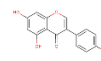
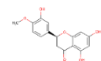
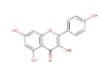
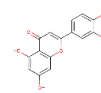
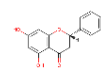
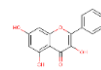
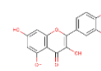
Proteinlerdeki kayıp rezidülerin tekrar yapılandırılması amacıyla sırayla 4U6R, 4BF2 ve 4QTD PDB kodlu insan IRE1, ASK1, JNK1 enzimlerinin XRAY kristalografik yapıları protein databanktan (rcsb.org) temin edilerek homoloji modellemeleri yapıldı (Chaikuad vd., 2014; Harrington vd., 2015; Singh vd., 2013). 4U6R kodlu IRE1 proteininde loop bölgelerinde kayıp rezidüler olmadığı için homoloji modellemeye gerek duyulmadı. IRE1'den sitoplazmik ken domaini çıkarılarak sadece kinaz domaini bırakıldı. 4BF2 kodlu ASK1 proteininde 714-723 ve 831-836. rezidüleri ile 4QTD kodlu JNK1 proteininde 176-178. kayıp rezidüleri MODELLER programı kullanılarak eklendi.

MODELLER programında ASK1 (4bf2) proteini referans alınarak uniprot Q99683 kodlu insan ASK1 aminoasit sekansına göre homoloji modelleme gerçekleştirildi. JNK1 (4qtd) proteini ise Uniprot P45983 (The UniProt Consortium, 2017) kodlu insan aminoasit sekansına göre modellendi. Elde edilen her bir yapı için 50 model içinden en iyi skora (z-skor) sahip model tercih edildi.

2.1.2.1.2. Çalışmada Kullanılan Etken Maddeler

Çalışmada kullanılan etken maddeler 4 grup altında toplandı. İlaçların 2 boyutlu yapı dosyaları sdf formatında İnsan Metabolom Veri Tabanından (<http://www.hmdb.ca>) temin edildi (Wishart vd., 2018). Veri tabanında bulunmayan etken maddeler ve doğal inhibitörler Pubchem'den alındı (S. Kim vd., 2016). Bu etken maddeler Tablo 1-5'te gösterildi.

Tablo 1. Flavonoidlerin HMDB kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü

Gruplar	Molekül ismi	HMDB ID	Kimyasal Formülü	Moleküler ağırlığı (g/mol)	İki boyutlu yapısı
Flavonoidler	Apigenin	HMDB02124	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.2369	
	Catechin	HMDB02780	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.2681	
	Chrysin	HMDB36619	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.2375	
	Daidzein	HMDB03312	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.241	
	Epicatechin	HMDB01871	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.2681	
	Genistein	HMDB03217	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	
	Hesperetin	HMDB05782	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.2788	
	Kaempferol	HMDB05801	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.2363	
	Luteolin	HMDB05800	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.2363	
	Naringenin	HMDB02670	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.2528	
	Norizalpinin	HMDB29521	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.2369	
	Quercetin	HMDB05794	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.2357	

Taxifolin

PubChem
CID:439533

C₁₅H₁₂O₇

304.254



Tablo 2. Statinlerin HMDB kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü

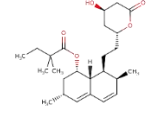
Gruplar	Molekül ismi	HMDB ID	Kimyasal Formülü	Moleküler ağırlığı (g/mol)	İki boyutlu yapısı
Statinler	Atorvastatin	HMDB05006	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	558.6398	
	Cerivastatin	PubChem CID: 446156	C ₂₆ H ₃₄ FN ₂ O ₅	459.558	
	Fluvastatin	HMDB15227	C ₂₄ H ₂₆ FN ₂ O ₄	411.4659	
	Lovastatin	HMDB14372	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404.5396	
	Pitavastatin	HMDB41991	C ₂₅ H ₂₄ FN ₂ O ₄	421.4608	
	Pravastatin	HMDB05022	C ₂₃ H ₃₆ O ₇	424.5277	
	Rosuvastatin	HMDB15230	C ₂₂ H ₂₈ FN ₃ O ₆ S	481.538	

Simvastatin

HMDB14779

C₂₅H₃₈O₅

418.5662

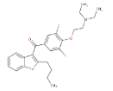
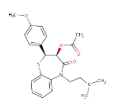
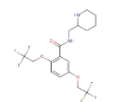
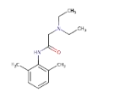
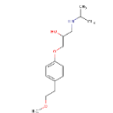
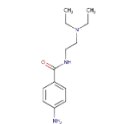
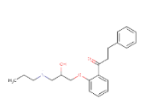
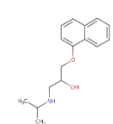
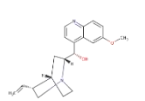
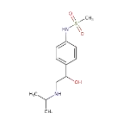


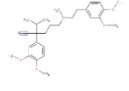
Tablo 3. Ace inhibitörlerinin HMDB kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü

Gruplar	Molekül ismi	HMDB ID	Kimyasal Formülü	Moleküler ağırlığı (g/mol)	İki boyutlu yapısı
Ace inhibitörleri	Benazepril	HMDB14682	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	424.4895	
	Captopril	PubChem CID: 44093	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₃ S	217.283	
	Cilazapril	HMDB15433	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₅	417.4986	
	Enalapril	HMDB14722	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	376.4467	
	Fosinopril	HMDB14635	C ₃₀ H ₄₆ N ₂ O ₇ P	563.6625	
	İmidapril	HMDB41907	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₆	405.4449	
	Lisinopril	HMDB01938	C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₅	405.4879	
	Perindopril	HMDB14928	C ₁₉ H ₃₂ N ₂ O ₅	368.4678	
	Quinapril	HMDB15019	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₅	438.5161	
	Ramipril	HMDB14324	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₅	416.5106	
	Trandolapril	HMDB14660	C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O ₅	430.5372	

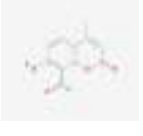
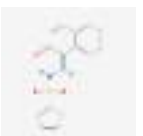
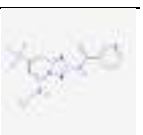
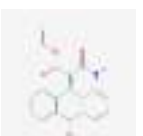
Zofenopril

PubChem
CID: 92400C₂₂H₂₃NO₄S 429.549**Tablo 4.** Antiaritmik ilaçların HMDB kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü

Gruplar	Molekül ismi	HMDB ID	Kimyasal Formülü	Moleküler ağırlığı (g/mol)	İki boyutlu yapısı
Antiaritmik ilaçlar	Amiodarone	HMDB15250	C ₂₅ H ₂₉ I ₂ NO ₃	645.3116	
	Diltiazem	HMDB14487	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	414.518	
	Flecainide	HMDB15326	C ₁₇ H ₂₀ F ₆ N ₂ O ₃	414.3427	
	Lidocaine	HMDB14426	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	234.3373	
	Metoprolol	HMDB01932	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259.3434	
	Procainamide	HMDB15169	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O	235.3253	
	Propafenone	HMDB15313	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	341.444	
	Propranolol	HMDB01849	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259.3434	
	Quinidine	HMDB15044	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.4168	
	Sotalol	HMDB14632	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272.364	

Verapamil	HMDB14799	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	454.6016	
-----------	-----------	---	----------	---

Tablo 5. Enzim İnhibitörlerinin PubChem CID kodu, kimyasal formülü, molekül ağırlıkları ve iki boyutlu görünümü

Gruplar	Molekül ismi	PubChem CID	Kimyasal Formülü	Moleküler ağırlığı (g/mol)	İki boyutlu yapısı
Enzim İnhibitörleri	4u8C	12934390	C ₁₁ H ₈ O ₄	204.181	
	IRE1				
	GSK2850163	73291790	C ₂₄ H ₂₉ Cl ₂ N ₃ O	446.416	
	STF-083010	6537512	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃ S ₂	317.377	
	MSC_2032964A	25214468	C ₁₆ H ₁₃ F ₃ N ₆ O	362.316	
	ASK1				
	NQDI-1	5522952	C ₁₉ H ₁₃ NO ₄	319.316	
	Staurosporine	44259	C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₃	466.541	
	JNK1				
	JNK_Inhibitor_V	11422035	C ₂₀ H ₁₆ N ₆ S	372.45	
	SCH772984	24866313	C ₃₃ H ₃₃ N ₉ O ₂	587.688	



2.1.2.1.3. Moleküler Kenetleme (Docking)

Yukarıda belirtilen 43 etken madde ve proteinlerin doğal inhibitörlerinin affinitelerinin hesaplamasında 4 farklı moleküler kenetleme algoritması kullanıldı. Moleküler kenetleme öncesi tüm etken madde ve inhibitörlerin enerji minimizasyonu Open Babel yazılımı ile gerçekleştirildi (O'Boyle vd., 2011). Enerji minimizasyon algoritması olarak "Ghemical" tercih edildi. Her bir molekül için 50,000 adım minimizasyon işlemi gerçekleştirildi ve daha sonra moleküller mol2 formatında kaydedilerek moleküler kenetleme işlemine geçildi.

Autodock Vina ile yapılan hesaplamada işlemlerin otomatik yürütülmesi için pyrx yazılımı kullanıldı (Dallakyan & Olson, 2015; Trott & Olson, 2010). Bunun için "Vina Wizard" sekmesinde Vina çalıştırma modu olarak "lokal " segmenti, IRE1 (4u6r), ASK1 (4bf2) ve JNK1 (4qtd) proteinleri ayrı ayrı seçildi (Chaikuad vd., 2014; Credle vd., 2005; Singh vd., 2013). Her protein için moleküller ayrı ayrı yüklenerek hesaplama işlemine geçildi. Hesaplama işleminde "Exhaustiveness" 40 olarak ayarlandı. IRE1 ve ASK1'in Grid hacmi 17, JNK1'in ise 20 Å³ (Angström küp) olarak ayarlanarak proteinlerin katalitik merkezi hedeflendi.

Autodock4 ile yapılan hesaplamada pyrx uygulamasında her protein için "Autodock Wizard" sekmesi seçilerek autogrid sekmesine geçildi. Proteinlerin katalitik merkezi hedeflenip grid boşluğu 0,375 Å olarak ayarlandı. Daha sonra Autodock sekmesine geçilerek Lamarckian Genetik Algoritması (GA) seçilerek yürütme sayısı 10, tekil popülasyon sayısı ise 150 olarak belirlendi. Maksimum enerji değerlendirme sayısı 250,000, maksimum jenerasyon sayısı 27,000, atlama oranı 0,8 olarak ayarlandı (Morris vd., 2009).

iGEMDOCK v2.1 ile yapılan hesaplamada protein seçilip ligand bağlama bölgesinin hazırla butonuna basılarak protein ligand etkileşiminin hesaplanacağı alan belirlendi. Bağlanma bölgesi boyutu 8 Å olarak ayarlandı. "Generic Evolutionary Method" (GE) ile popülasyon boyutu 200, jenerasyon 80 ve çözüm sayısı 3 olarak komutlandı. Her bir protein için minimize edilmiş tüm etken maddeler ve inhibitörler seçilerek hesaplamaları yapıldı (Hsu, Chen, Lin, & Yang, 2011).

GOLD v5 ile yapılan kenetleme hesaplamalarında Hermes yazılımı içinde yer alan "GOLD Docking Wizard" aracı çalıştırılarak önce protein seçildi, hidrojen ekle butonu ile proteine hidrojen eklenmesi sağlandı. Su molekülleri ve diğer rezidü dışı atomlar silindi. Ligand ekstrakte edilerek bağlanma bölgesinin otomatik tanımlanması, "Cavity Detection" kutusu işaretlenerek yazılımın proteinin katalitik merkezini ve boyutunu otomatik tanımlaması ve proteinin tamamen rijid yapıda olması tercih edildi. Daha önce minimize edilen ligandlar eklenerek uygunluk fonksiyonu olarak farklı doğrulama test setlerine göre hem poz tahmini hem de sanal tarama deneyleri için en yüksek ortalama başarı oranlarını vermesi nedeniyle "CHEMPLP" (Piecewise Linear Potential) seçildi. Ligand esnekliği "Full Flexible" olarak tercih edildi. Genetik algoritma parametreleri varsayılan olarak seçilerek hesaplama yapıldı (Jones, Willett, Glen, Leach, & Taylor, 1997).

2.1.2.1.4. MD Simülasyon İçin Etken Maddelerin Topolojilerinin Oluşturulması

Daha önce GOLD moleküler kenetleme yazılımı ile elde edilen protein-ligand komplekslerinden ligandlar Chimera yazılımı ile ekstrakte edildi (Jones vd., 1997; Pettersen vd., 2004). Chimera yazılım aracı olan Dock-Prep ile hidrojen eklenerek ligandlar nötralize edildi. Bağ hatalarına karşı Steepest Descent algoritmasına göre minimizasyon yapıldı. Moleküller mol2 formatında kaydedildikten sonra ACPYPE ligand topoloji oluşturma yazılımı ile AMBER kuvvet alanına uygun olarak ligand topolojileri elde edildi. ACPYPE yazılımı Sousa da Silva & Vranken tarafından geliştirilen Ambertools yazılım paketi içindeki yarı ampirik sqm aracı ile QM olarak organik moleküllerin topolojileri hesaplandı (Sousa da Silva & Vranken, 2012). ACPYPE.py modülünün çalışması için ligandın toplam yükünün "0" olması ve bağ hatalarına karşı enerji minimizasyonu gerekmektedir ancak çalışmaması durumunda PDB formatında kaydedilip Antechamber aracı ile mol2 formatına dönüştürülerek tekrar denir. Nötralizasyon hatası durumları genellikle N'un 4 bağ yapıyor gibi görünüp H atomu bağlamasından kaynaklanmaktadır.

2.1.2.1.5. Enzim Ligand Komplekslerinin MD Simülasyonu

Tüm simülasyonlar periyodik sınır koşullarında (PBC) GROMACS 5.1.4 yazılımı ile "Leap Frog" entegrasyonu kullanılarak 2 fs zaman adımı ile gerçekleştirildi. Sistem "Rhombic Dodecahedron" biçiminde, protein-ligand kompleksinin köşesi ve küp uzaklığı 1 nm olacak şekilde "TIP3P" su modeli kullanılarak hazırlandı. Sistem 0,15 mM Na-Cl ile nötralize edildi.

MD simülasyonu 4 aşamada gerçekleşti. Bu aşamalar enerji minimizasyonu, NVT, NPT ve MD üretim kısımlarından meydana gelmektedir. İlk aşamada 50,000 adım Steepest Descent algoritmasına göre enerji minimizasyonu yapıldı. Maksimum kuvvet farkı 10 kJ/mol/nm

olarak uygulandı. NVT aşamasında LINCS kısıtlama algoritması ile 1,000 kJ/mol kuvvetinde tüm bağlar ve atomik pozisyonlar sabitlenerek 300 ps simülasyon 2 fs aralıklı olarak gerçekleştirildi. Basınç Eşleştirme Algoritması off olarak ayarlandı. NPT aşamasında LINCS Kısıtlama Algoritması ile sadece bağlar sabitlendi, atomik pozisyonlar serbest bırakıldı. Cut-off şeması olarak Verlet, sıcaklık eşleştirme algoritması olarak Nose-Hoover algoritması kullanıldı ve sıcaklık 300 K'e ayarlandı. Basınç eşleştirme algoritması olarak izotermal sıkıştırılabilirliğe sahip Perinello-Rahman algoritması tercih edildi ve basınç 1 atmosfere ayarlandı. NPT aşamasından farklı olarak kısıtlama algoritması kaldırıldı ve 50 ns'lik Moleküler Dinamik Simülasyon gerçekleştirildi. Geniş aralıklı elektrostatik algoritma olarak "Particle-mesh-Ewald" kullanıldı. Van Der Waals ve kısa süreli elektrostatik etkileşimler ise 10 Å'da kesildi.

2.1.2.1.6. Enzim Ligand Komplekslerinin Serbest Enerji Hesaplamaları

Enzim ligand etkileşimlerinin serbest enerjileri kalitatif olarak MM/PBSA ve kantitatif olarak da Umbrella örnekleme metodlarına göre hesaplandı.

2.1.2.1.6.1. IC₅₀'den ΔG'ye Dönüşüm Hesaplamaları

Serbest enerji hesaplamalarında yarışmalı enzim inhibisyonunun IC₅₀ değerlerinin ΔG'ye dönüşümü için Geschwindner ve arkadaşları tarafından daha önce bahsedilmiş olan K_i değeri IC₅₀ değeri ile eşit varsayılarak $\Delta G \approx RT \ln IC_{50}$ formülasyonuna göre hesaplamaları gerçekleştirildi (Geschwindner, Ulander, & Johansson, 2015). Denklemden R; gaz sabiti= $1.9872036(11) \times 10^{-3} \text{ kcal K}^{-1}\text{mol}^{-1}$, T; kelvin cinsinden sıcaklık, ln; e tabanında logaritma, IC₅₀; maksimal inhibitör konsantrasyonunun yarısını simgelemektedir.

2.1.2.1.6.2. MM/PBSA Yöntemi ile Serbest Enerji Hesaplamaları

Her bir ilaç grubunda en yüksek affiniteye sahip molekül için Kumari ve ark. tarafından geliştirilen, GROMACS ve APBS paketlerinden gerekli tüm alt yordamları içeren g_mmpbsa aracı ile MD simülasyon sistemi üzerinde Moleküler Mekanik Poisson Boltzmann Yüzey Alanı (MM/PBSA) yöntemi kullanılarak MD yörüngesinin enstantanelerinden gerçekleştirilen bağlanma serbest enerji hesaplamaları End Point olarak gerçekleştirildi (Kumari, Kumar, Lynn, & Lynn, 2014). Bağlanma serbest enerjileri, entropik katkısı da içerecek şekilde 50 ns'lik Tüm Atomik MD simülasyonların son 10 ns'si baz alınarak 100 ps aralıklarla toplam 100 enstantane görüntüsü hesaplanarak analiz edildi. MM/PBSA hesaplamalarında, desolvasyonun kutupsal bileşeni, PB modelleriyle hesaplandı. Izgara boyutu 0,5 Å'ya ayarlandı. PB hesaplamasında kullanılan proteinlerin kısmi yükleri, kuvvet alanı

parametrelerinden alındı. Vakum elektrostatik hesaplamada çözünen dielektrik sabiti 1, vakum elektrostatik hesaplamada çözücü dielektrik sabiti ise 80 olarak ayarlandı. Polar olmayan katkının tahmin edilmesi için Çözücü-Erişilebilir Yüzey Alanı (SASA) seçildi. G_{mmpbsa} serbest enerji hesabı; vdW, elektrostatik, polar ve apolar enerjiler de dahil olmak üzere birkaç enerji bileşenini içermektedir. G_{kompleks} , protein-ligand kompleksinin, G_{protein} ve G_{ligand} ise sırasıyla ayrıştırılan protein ve ligandın toplam enerjisidir. Her bir G_{kompleks} , G_{protein} ve G_{ligand} 'ın serbest enerjisi şu şekilde hesaplanır: $G_{\text{kompleks}} = \langle E_{\text{MM}} \rangle + \langle G_{\text{solvasyon}} \rangle$. E_{MM} , vakum ortamında ortalama moleküler mekaniğin potansiyel enerjisinin temsildir ve $G_{\text{solvasyon}}$, solvasyonun serbest enerjisidir. Moleküler mekaniğin potansiyel enerjisi vakum ortamında $E_{\text{MM}} = E_{\text{bağlı}} + E_{\text{bağlı olmayan}} = E_{\text{bağlı}} + (E_{\text{vdW}} + E_{\text{elek}})$ formülüyle hesaplanır. $E_{\text{bağlı}}$ formülü bağ, aç, dihedral ve hatalı etkileşimlerden oluşan bağlanma etkileşimlerini, $E_{\text{bağlı olmayan}}$, sırasıyla Coulomb ve Lennard-Jones (LJ) potansiyel fonksiyonları kullanılarak modellenen elektrostatik (E_{elec}) ve Van Der Waals (E_{vdW}) etkileşimlerini içermektedir. Solvasyonun serbest enerjisi ($G_{\text{solvasyon}}$), elektrostatik solvatsız serbest enerjinin (G_{polar}) ve apolar solvasyon serbest enerjisinin (G_{nonpolar}) toplamı olarak belirlenir ($G_{\text{solvasyon}} = G_{\text{polar}} + G_{\text{nonpolar}}$). G_{polar} ve G_{nonpolar} , sırasıyla serbest çözünme enerjisine karşı elektrostatik ve elektrostatik olmayan katkılardır. G_{polar} , Poisson – Boltzmann (PB) denklemi ve Çözücü Erişilebilir Yüzey Alanı (SASA) çözülerek belirlenir (Sousa da Silva & Vranken, 2012). Bağlanma serbest enerjisi aşağıdaki denklemlere dayanarak hesaplanır.

$$\Delta G_{\text{bağlanma}} = G_{\text{kompleks}} - (G_{\text{protein}} + G_{\text{ligand}})$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{Elektrostatik}} + \Delta E_{\text{vdW}}$$

$$\Delta G_{\text{Bağlanma, sıvı}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{Bağlanma, solv}} - T\Delta S$$

$$\Delta G_{\text{Bağlanma, solv}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{non-polar}}$$

2.1.2.1.6.3. Yönlendirmeli Moleküler Dinamik Simülasyon (Steered Molecular Dynamic Simulation)

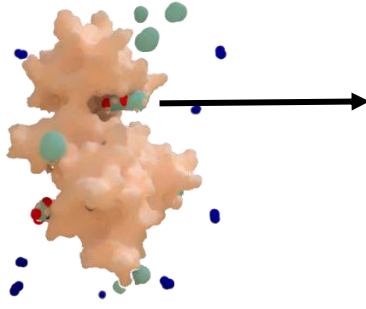
Yönlendirmeli moleküler dinamik simülasyonlar (SMD), serbest enerji değişimlerini hesaplamak için kullanılan yöntemlerden biridir. SMD, moleküler dinamik simülasyon uygulanan sistemin yapısında bir değişikliğe neden olmak için çekme kuvveti kullanır. Bu yöntemde belirlenmiş atomlar belirli bir koordinatta hareket ettirilerek örneklenebilir. Teorik olarak, simülasyon sırasında değişim kendiliğinden oluşabilir ancak bunun gözlemlenmesi için çok uzun süre beklemek zorunda kalınabilir. SMD yöntemi, sistem

enerjisinin nasıl değiştiğinin anlaşılması için işlemi hızlandırmaktadır. Atom gruplarına kuvvet uygulandığında ve bir koordinat boyunca hareket oluştuğunda, sistemin potansiyel enerjisi hesaplanır. Hesaplamalarda Ortalama Kuvvet Potansiyeli (PMF), serbest enerji değişimini göstermektedir (Isralewitz, Gao, & Schulten, 2001).

2.1.2.1.6.3.1. Molekülleri Proteinden Çekme İşlemi

Proteinler ile etkileşime giren moleküller onları ya inhibe etmekte ya da kofaktör görevi görerek aktivitelerini arttırmaktadır. Moleküler dinamik simülasyonla bu sürecin mili saniyeler içinde gerçekleşmesi ve belirli bir enerji bariyerini aşmasının gözlenmesi çok yüksek hesaplama maliyeti gerektirmektedir. Bu duruma alternatif olarak proteinin aktif merkezine yerleştirilmiş bir moleküle bir itme kuvveti uygulayarak çekmek, benzer serbest enerji farkının oluşmasına katkı sağlamaktadır. Bu çekme işleminde molekülün merkezden uzaklaştırılmasının doğal yapısına uygun olması için harmonik potansiyel kullanılmaktadır.

Çalışmamızda Moleküler Kenetleme (docking) hesaplamalarından her protein için elde edilen yüksek affiniteli 5 etken madde (IRE1 için Amiodarone, Atorvastatin, Norizalpinin, Propafenone ve Zofenopril; ASK1 için Amiodarone, Atorvastatin, Pitavastatin, Chrysin ve Fosinopril; JNK1 için Amiodarone, Atorvastatin, Pitavastatin, Luteolin ve Fosinopril) ve kinaz inhibitörünün (IRE1 için Sülfanomid; ASK1 için Staurosporine; JNK1 için SCH772984 ve SP600125) IRE1, ASK1, JNK1 protein komplekleri üzerinde Yönlendirmeli Moleküler Dinamik Simülasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem için tüm ligand moleküllerinin topolojik parametreleri yarı kantitatif Anthechamber yazılım aracı ile elde edildi. Sistem için Amber99SB-ildn kuvvet alanı, TIP3P su modeli ile beraber kullanıldı. 50,000 adım Steepest Descent enerji minimizasyonunu takiben 300 ps NVT, 1,000 ps NPT simülasyonu gerçekleştirildi. Sistem denge konumuna getirildikten sonra 800 ps'lik Yönlendirmeli Moleküler Dinamik Simülasyonu (SMD) yapıldı. Molekülleri, proteinlerin katalitik merkezinden uzaklaştırmak amacıyla $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ kuvvet uygulayarak 5 nm/ns hızda Harmonik Bias Kuvveti uygulandı. Şekil 28'de molekülleri proteinden çekme işlemine örnek olarak Norizalpinin IRE1 proteininin kinaz domaininin aktif merkezinden çekilmesinin anlık görüntüsü gösterildi. Açık ve koyu mavi noktalar Na ve Cl iyonlarını göstermektedir.



Şekil 28. IRE1 katalitik merkezindeki Norisalpinin çekilme görüntüsü.

2.1.2.1.6.4. Umbrella Örnekleme Yöntemi ile Serbest Enerji Hesaplamaları

Klasik MD simülasyonu kullanılarak iki molekülün ayrışmasının anlaşılması hesaplama açısından zaman alan bir işlemdir. Yönlendirmeli Moleküler Dinamik (SMD) Simülasyonlarında bu işlemi hızlandırmak için bir dış kuvvet uygulanmaktadır. SMD simülasyonları, çeşitli sistemlerde başarıyla uygulanmıştır (Park & Schulten, 2004). Diğer yöntem Kumar ve arkadaşları tarafından önerilen Ağırlıklandırılmış Histogram Analiz Yöntemi (WHAM) 'dir (Kumar vd., 1992). Son yıllarda, WHAM yöntemi, ligand bağlanma serbest enerjisini hesaplamak için etkili bir şekilde uygulanmaktadır (Hub, de Groot, & van der Spoel, 2010; John D. Chodera, William C. Swope, Jed W. Pitera, Chaok Seok, & Dill, 2006). Bu araştırmada açık çözücü (Explicit solvent) içinde reseptör ve ligand ilişkisini irdelemek için reseptör ve ligand atomları üzerinde Harmonik Mesafe Kısıtlama Algoritmasına dayalı bir dizi Umbrella Örnekleme Simülasyonları gerçekleştirildi. GOLD ile gerçekleştirilen moleküler kenetleme hesaplamalarından elde edilen protein ligand kompleksleri, SMD veya kütle merkezi (COM) çekme simülasyonu için kullanıldı. Kutunun boyutları, uzay düzleminde y yönünde çekişe uyum sağlamak için yeterli alan sağlamak üzere değiştirildi. Tüm SMD simülasyonları, ff99SB-ildn (Lindorff-Larsen vd., 2010) kuvvet alanı parametreleri kullanılarak GROMACS 5.1.4 (Pronk vd., 2013) 'te gerçekleştirildi. Çekme simülasyonundan önce, her sistemin MD simülasyonu yapılarak NVT ve NPT gruplarında 300 ve 1,000ps'lik simülasyonlar gerçekleştirilerek sistem dengeye getirildi. Seçilen ligandı proteinden uzaklaştırmak için kütle merkezleri belirlenerek (Center of Mass, COM) Çekme Simülasyonu gerçekleştirildi. Her sistem için COM çekme simülasyon süresi, referans grubu ile çekilen grup arasındaki hedef çekme mesafesine bağlı olarak 800 ps sürdü. Tüm simülasyonlar için $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ harmonik kuvvet sabiti ve 0.005 nm/ps çekme hızı kullanıldı. Tüm reaksiyon koordinatı boyunca $0,2 \text{ nm}$ aralıklı ortalama 20-25 Umbrella penceresi üzerinde her pencere için 10 ns'lik MD simülasyonları yapıldı. Her bir

örnekleme pencerelerinden elde edilen “Biased” olasılık dağılımları ortalama kuvvet potansiyelini (Potential of Mean Force) vermek için daha önce Hub ve arkadaşları tarafından da kullanılan Ağırlıklı Histogram Analizi yöntemi (WHAM) kullanılarak kombine edildi (Hub vd., 2010). İstatistiksel hatanın doğru hesaplanabilmesi için “*Bootstrapping*” 100 olarak ayarlandı. Her bir reseptör-ligand kompleksi için iki Umbrella Örnekleme Simülasyonu yapıldı ve hesaplanan PMF'deki istatistiksel belirsizlikler iki grubun Umbrella Örnekleme Simülasyonundan elde edilen sonuçların standart sapması ile belirlendi. Tek bir reseptör-ligand kompleksinin PMF'sini hesaplamak için kullanılan toplam simülasyon süresi ~0,6-1 μ s'dir.

BÖLÜM III

3.1 Bulgular

3.1.1. Protein- Protein Etkileşimleri

3.1.1.1. CG-MM/PBSA Kübik Eksende Oryantasyon Simülasyonları

3.1.1.1.1. Test Seti

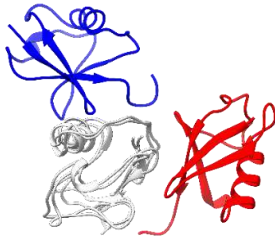
Yapılan 5'er μ s'lik MD simülasyonlar ve iki bağımsız tekrarlarından sonra her oryantasyon için bağlanma paternleri oluştu (Şekil 29). Bağlanma şekli protein kompleksinin kararlılığı hakkında bilgi vermediğinden simülasyon boyunca gerçekleşen serbest enerji değişimi MM/PBSA metodolojisine göre hesaplandı. Oluşan paternler ve serbest enerji değişimleri protein komplekslerinin doğal formları ile karşılaştırılarak analiz edildi. Yapılan analizlerin sonucunda 2HD5 ,1MIM ve 3QML pdb kodlu protein komplekslerinin doğal formlarının en düşük serbest enerjiye sahip olduğu, her bir oryantasyonun simülasyonu sonunda ise doğal forma yakın konformasyona sahip olan oryantasyonun doğal forma yakınlık derecesine göre düşük serbest enerjilerine sahip olduğu gözlemlendi. 2MWS kodlu protein kompleksinin doğal formunun CG simülasyonu sonunda hesaplanan serbest enerji, beklentinin dışında kalarak diğer oryantasyonların serbest enerjileri ile benzer düzeyde olduğu hesaplandı. Tüm simülasyonların serbest enerjileri incelendiğinde doğal formların serbest enerjilerinin 2,000 kJ/mol'ün altında olduğu, doğal forma yakın 1. oryantasyonun da benzer enerji düzeyine sahip olması nedeniyle 2,000 kJ/mol eşik değeri olarak kabul edilerek grafiklerde kırmızı çizgi ile belirtildi.

3.1.1.1.1.1. Ddi1 Ubikuitin Benzeri (UBL) Domaini-Ubikuitin Kompleksi (2MWS)

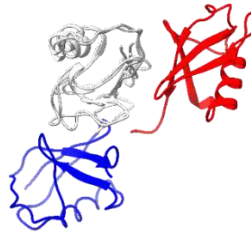
3.1.1.1.1.1.1. Moleküler Dinamik Simülasyon

Proteinler 2mws b alt domainine göre hizalandığında oryantasyonlarının 5 μ s'lik simülasyonu sonunda a alt domainlerinin birbirine göre durumları Şekil 29'da gösterildi. CG-MD

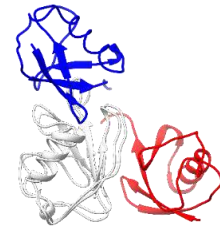
simülasyonunda doğal formun 5 μ s'lik simülasyonu sonunda belirgin konformasyonel değişim gözlenmezken, 5 Å uzaklıkta yerleştirilmiş olan 1. oryantasyonun doğal form konformasyonu ile uyumlu olmadığı gözlemlendi. Bunun yanında 1. oryantasyona göre 90° açıyla farklı konumlandırılmış 4. oryantasyonun 5 μ s CG-MD simülasyon sonunda doğal forma çok yakın şekilde etkileşime girdiği gözlemlendi. 3, 5. ve 6. oryantasyonda Şekil.29'daki protein konumları, proteinlerin daha net görünebilmesi için doğal forma göre x ekseninde 90° döndürüldü. Doğal formun 5 μ s'lik simülasyonu sonrasında, son ve ilk yapı arasındaki RMSD değeri Dali Serverda (Holm & Laakso, 2016) 3,4 Å olarak hesaplandı. Diğer oryantasyonların RMSD değerleri, iri taneden tüm atomik yapıya geçişte Charmm-GUI server kullandı ancak dönüşüm esnasında oluşan rezidüel farklılıklar nedeniyle net olarak hesap edilemedi.



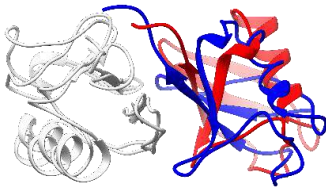
1.Oryantasyon



2.Oryantasyon



3.Oryantasyon



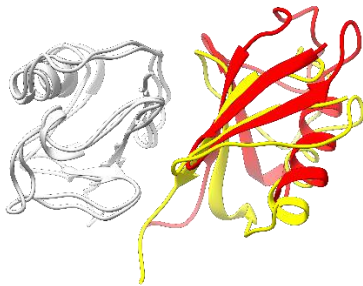
4.Oryantasyon



5.Oryantasyon



6.Oryantasyon



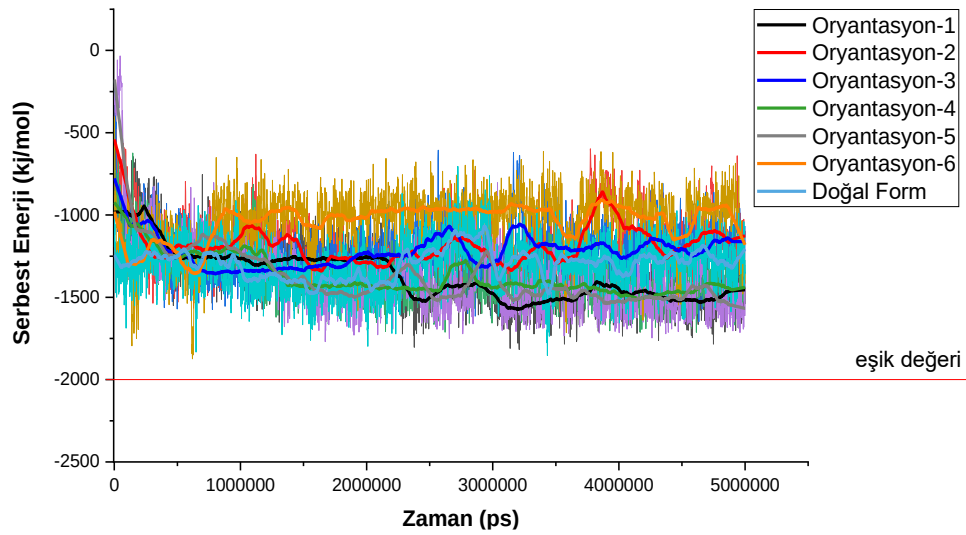
Doğal Form (RMSD: 3.4)

Şekil 29. Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-Ubikuitin kompleksinin 5 μ s'lik CG-MD simülasyonu sonunda oluşan bağlanma paternleri

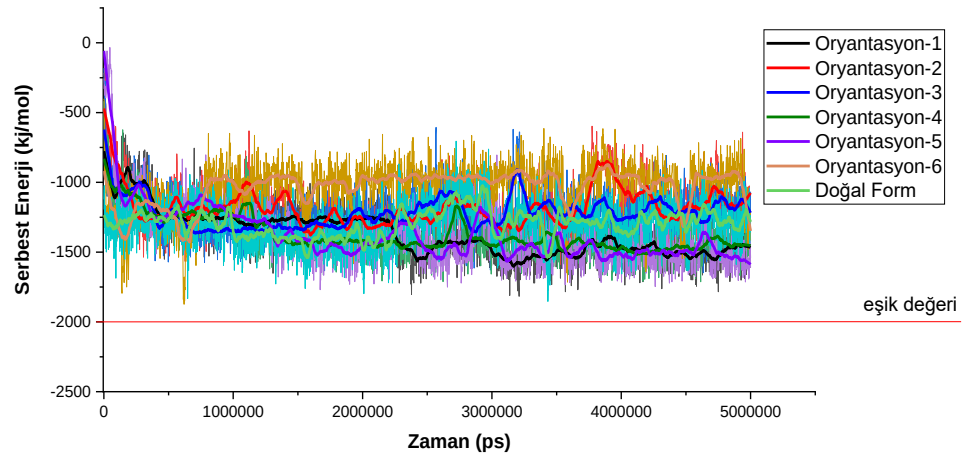
3.1.1.1.1.2. Serbest Enerji Hesaplamaları

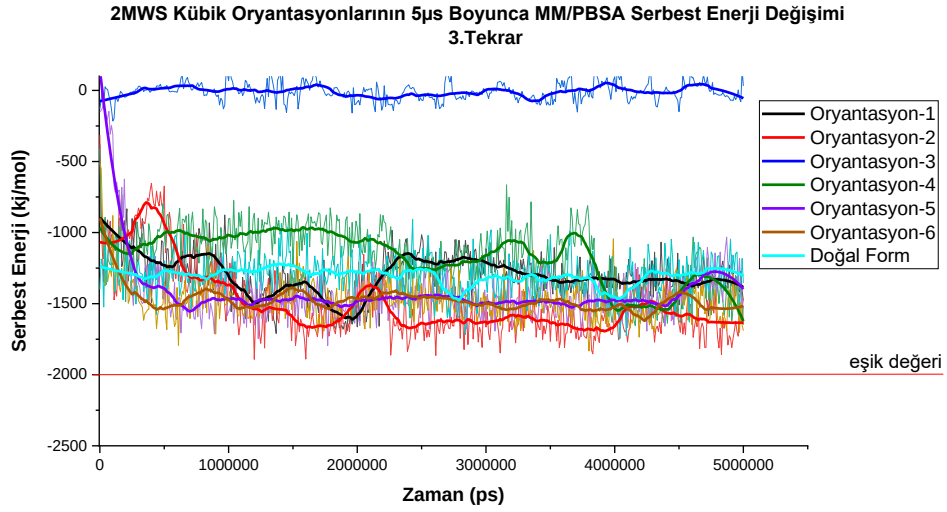
Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-Ubikuitin kompleksinin kübik oryantasyonlarının 5 μ s'lik CG-MD simülasyonu ve iki bağımsız tekrarı sonunda protein etkileşimlerinin simülasyon boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimleri hesaplandı. Tüm oryantasyonlar ve doğal formun 5 μ s boyunca gerçekleştirdiği serbest enerji değişimi incelendiğinde 2,000 kJ/mol değerinin altına inmediği ve enerji değişiminin doğal form da dahil olmak üzere genellikle 1,000-1,500 kJ/mol değerlerinde seyrettiği gözlemlendi [Grafik 3].

2MWS Kübik Oryantasyonlarının 5 μ s Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi

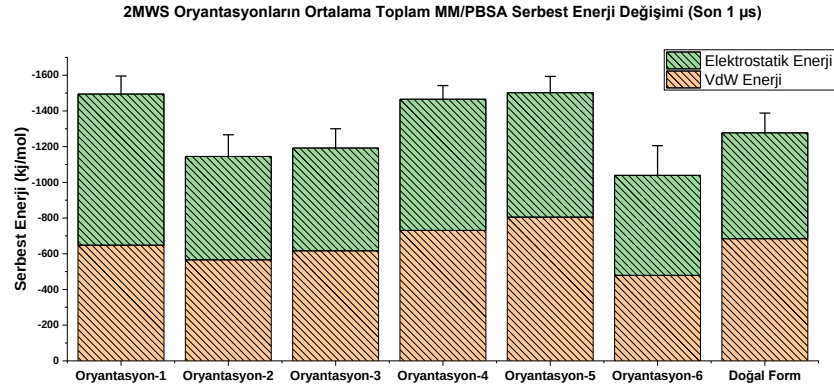


**2MWS Kübik Oryantasyonlarının 5 μ s Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
2.Tekrar**





Grafik 3. Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-Ubikuitin kompleksinin 5 µs'lık CG-MD simülasyonu sonunda MM/PBSA serbest enerji değişimleri



Grafik 4. 2MWS oryantasyonlarının son 1 µs'deki ortalama toplam mm/pbsa serbest enerji değişimi

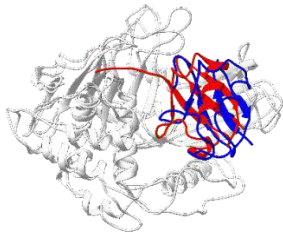
2MWS kübik oryantasyon simülasyonlarının son 1 µs'i incelendiğinde herhangi bir oryantasyon ve doğal formun serbest enerjisinde belirgin bir ayrışma gözlenmedi [Grafik 4]. Ubikuitin dimerlerini içeren 2PE9, 2PEA, 2XK5, 3M3J, 5KHY, 1AAR, 3AUL, 3NS8, 2MBO, 2MBQ ve 2MWS arasında bağlanma konformasyonu bakımından uyum göstermemesi ubikuitinin çoklu bağlanma bölgesine sahip olduğunu sergilediğinden bu çalışmada da oryantasyonların simülasyonu sonunda serbest enerji farkları hesaplandığında aralarında belirgin bir fark gözlenemedi. Bunun dışında protein dimerlerinin küçük boyutta olması da yeterli Yüzey Alanı Etkileşimi (VdW) nin olmamasının etken olabileceği sonucuna varıldı.

3.1.1.1.1.2. Ubikuitin-USP2 Kompleksi (2HD5)

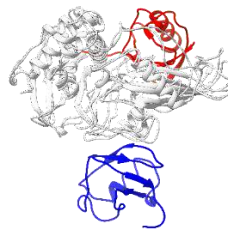
Ubikuitin-USP2 kompleksinin 5 Å ve 15 Å mesafede yerleştirilmiş 6 farklı kübik oryantasyonları ve doğal formunun 5 µs'lik simülasyonu ve MM/PBSA serbest enerji hesaplamaları iki bağımsız tekrarla beraber gerçekleştirildi.

3.1.1.1.2.1. Moleküler Dinamik Simülasyon

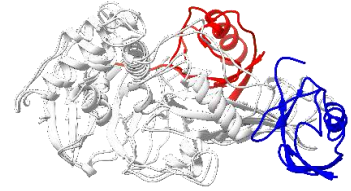
Ubikuitin-USP2 kompleksinin 5 Å ve 15 Å mesafede yerleştirilmiş 6 farklı kübik oryantasyonları ve doğal formunun 5 µs'lik simülasyonu sonunda bağlanma paternleri oluştu, bağlanmanın gerçekleşmemesi durumunda ise simülasyon tekrarlandı. 5 Å mesafede yerleştirilen 1. oryantasyon ile doğal yapı kıyaslandığında 2.7 Å RMSD, 15 Å mesafede ise 4.4 Å luk RMSD sapması oluşturduğu belirlendi [Şekil 30,31].



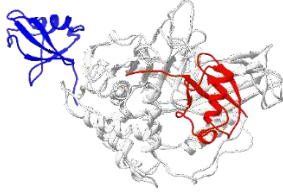
1.Oryantasyon (RMSD :2.7)



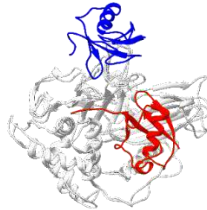
2.Oryantasyon



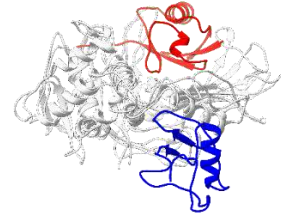
3.Oryantasyon



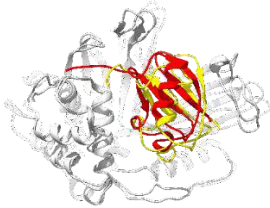
4.Oryantasyon



5.Oryantasyon



6.Oryantasyon

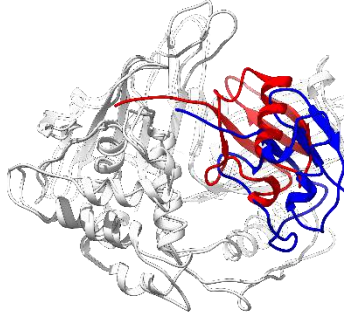


Doğal Form (RMSD: 2.9)

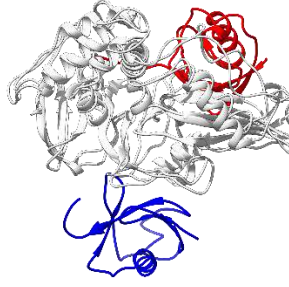
Şekil 30. Ortalama 5 Å mesafede yerleştirilmiş Ubikuitin-USP2 kompleksi oryantasyonların simülasyonu sonucu oluşan bağlanma paternleri

Şekil 30'da 2.,3. ve 6. oryantasyon proteinleri daha net görünebilmesi için x eksenine göre 90° döndürüldü. 1. oryantasyon dışındaki diğer oryantasyonlarda konformasyonel benzerlik oluşmadığından RMSD değerleri hesaplanamadı. Doğal formun 2.9 olan RMSD değerinin 1.

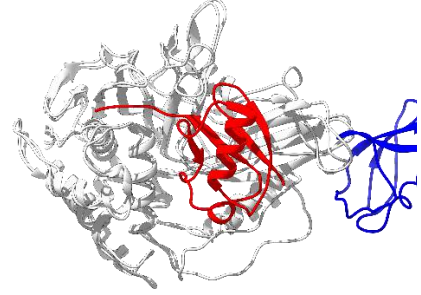
oryantasyondan (RMSD:2.7) daha yüksek çıkmış olmasının nedeninin 1. oryantasyonda iri taneden tüm atomik yapıya dönüşüm sırasında oluşan rezidüel farklılıklardan kaynaklanabileceği değerlendirilmesi yapıldı.



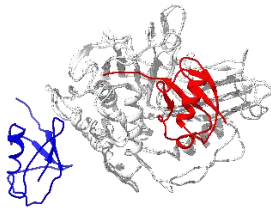
1.Oryantasyon (RMSD: 4.4)



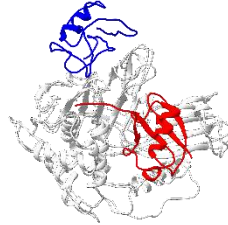
2.Oryantasyon



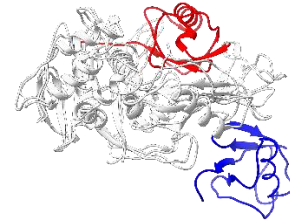
3.Oryantasyon



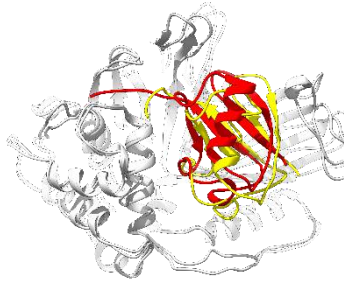
4.Oryantasyon



5.Oryantasyon



6.Oryantasyon



Doğal Form (RMSD: 2.9)

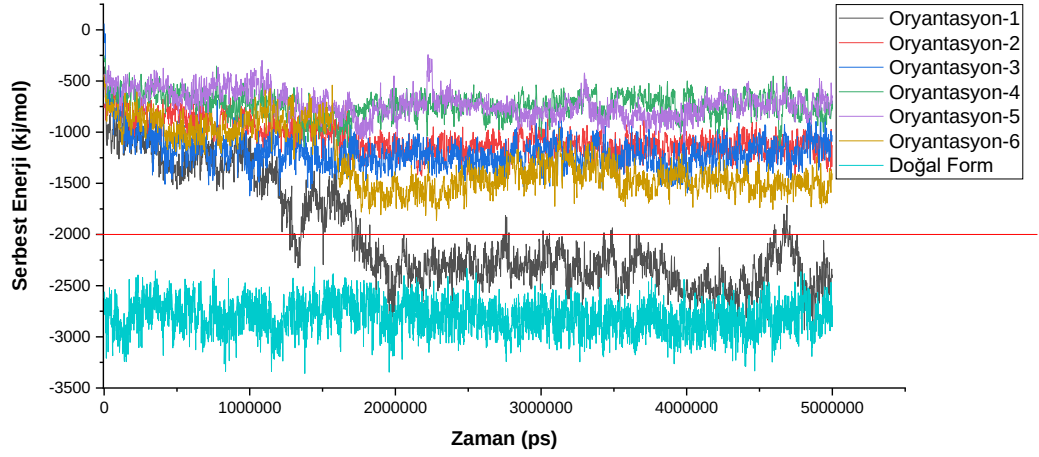
Şekil 31. Ortalama 15 Å mesafede yerleştirilmiş Ubikuitin-USP2 kompleksi oryantasyonların simülasyonu sonucu oluşan bağlanma paternleri

Şekil 31’de 2. ve 6. oryantasyonlardaki proteinler yukardakine benzer nedenlerle x eksenine göre 90° döndürüldü. 1. oryantasyonda yaklaşık 15 Å mesafede yerleştirilen ubikuitin, simülasyon sonunda USP2 tarafından avuç içi şeklinde kavrar formda içeri çekilerek konformasyonel benzerlik 4.4 Å luk RMSD değerine ulaştığı belirlendi.

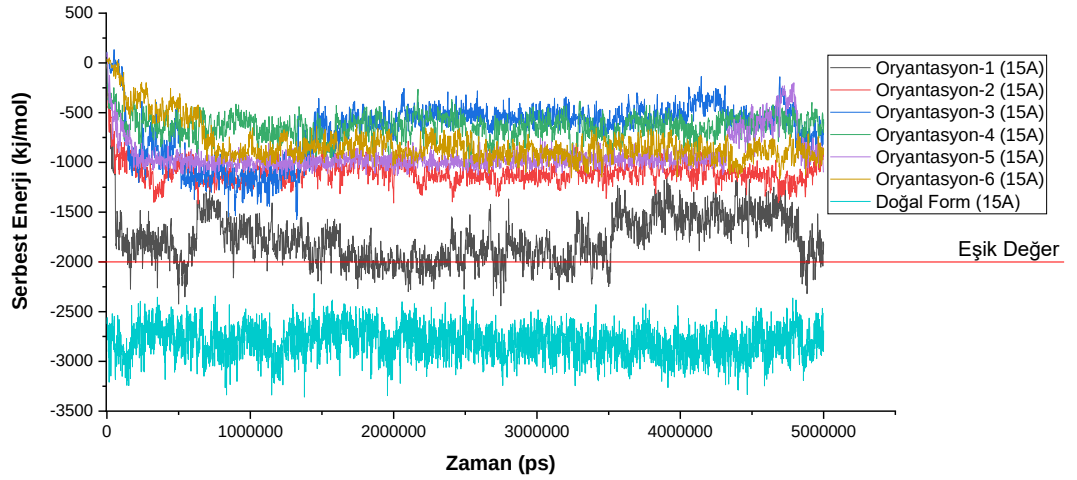
3.1.1.1.2.2. Serbest Enerji Hesaplamaları

Ubikuitin-USP2 kompleksinin 5 Å ve 15 Å mesafede yerleştirilmiş 6 farklı kübik oryantasyon ile doğal formun 5 µs'lik simülasyonu sonunda, hesaplanan doğal formun MM/PBSA serbest enerji değişimi 3,000 kJ/mol iken buna en yakın değerin 1. oryantasyonda yaklaşık -2500 kJ/mol olduğu gözlemlendi [Grafik 5].

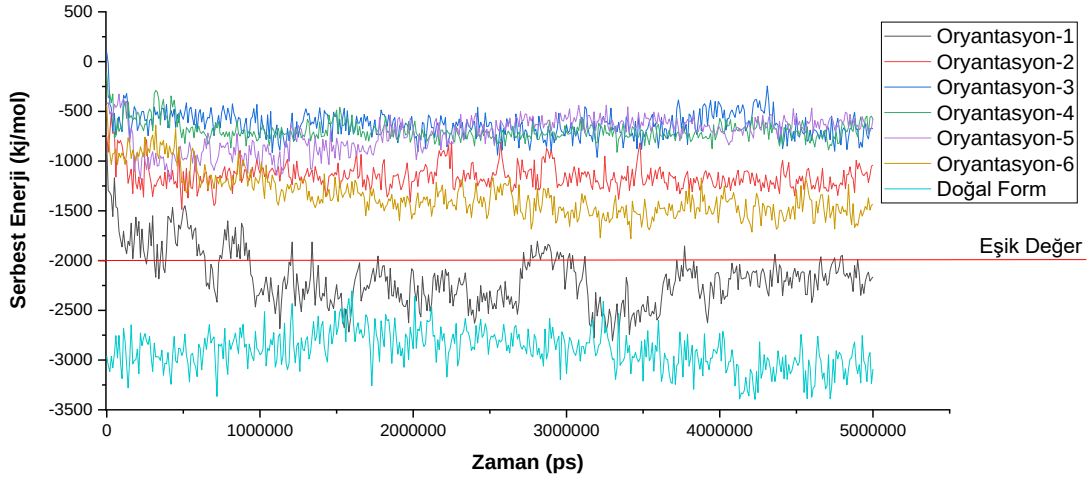
2HD5 Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi



**2HD5 Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi (15 Å)
2. Tekrar**



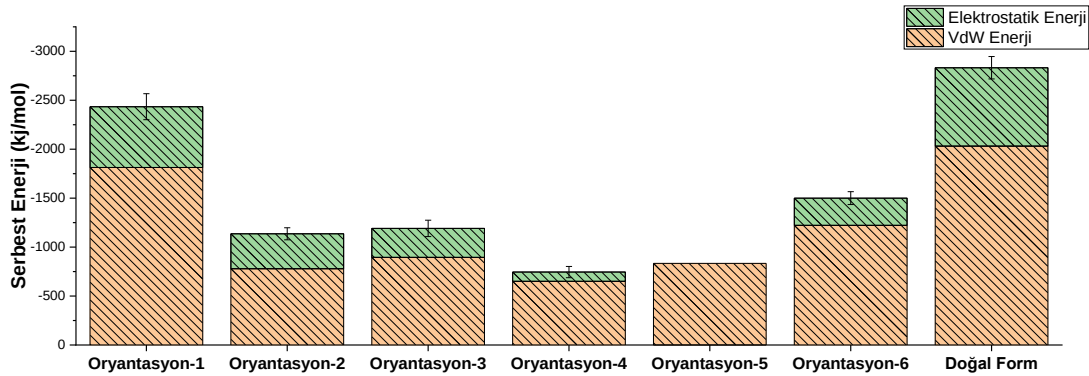
2HD5 Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi 3. Tekrar



Grafik 5. Ubikuitin-USP2 kompleksinin kübik oryantasyonlarının 5 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimleri

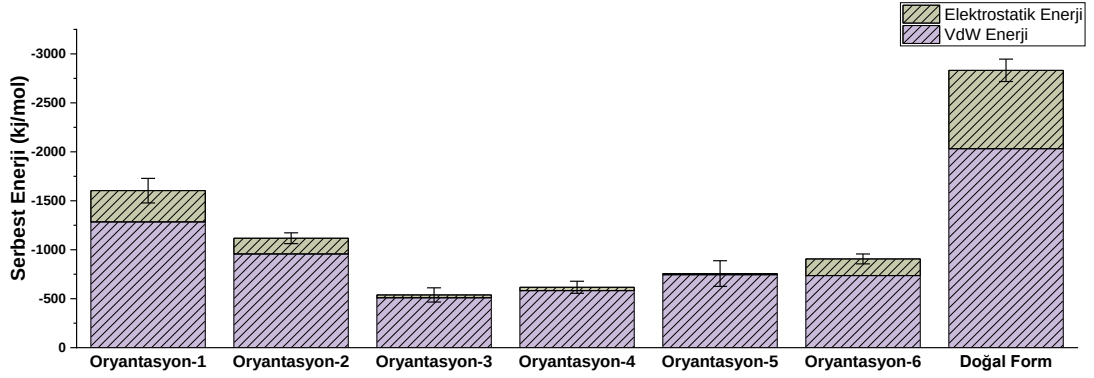
5 Å mesafede yerleştirilen 1. oryantasyonda ubikuitinin USP2 üzerinde konformasyonel hareketi 2 µs sürdü ve bu süre boyunca serbest enerji değeri sürekli azalış göstererek 2,500 kJ/mol değerine kadar indi [Grafik 5]. Kalan 3 µs boyunca belirgin bir konformasyonel değişim gözlenmezken belirgin bir serbest enerji farkı oluşmadı. 15 Å mesafede yerleştirilen 1. oryantasyonda ubikuitinin USP2 üzerinde avuç içine kavrar şekilde konformasyonel hareketi yine gözlenirken buna karşın serbest enerjide hızlı bir düşüşün ardından yatay bir seyir izlediği gözlemlendi ve maksimum serbest enerji değişimi 2,000 kJ/mol olarak gerçekleşti. 5 Å mesafede yerleşimde Son 1 µs boyunca toplam MM/PBSA serbest enerji değişimleri incelendiğinde 1. Oryantasyonun belirgin farkla diğer oryantasyonlardan daha fazla serbest enerji farkı oluşturduğu gözlemlendi [Grafik 6]. 15 Å mesafede yerleşimde ise önceki kadar olmasa da en düşük serbest enerji 1. Oryantasyona ait olarak ölçüldü [Grafik 7].

2HD5 Oryantasyonların Ortalama Toplam MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi (5Å) (Son 1 µs)



Grafik 6. Ubikuitin-USP2 kompleksinin 5 Å mesafede yerleştirilen kübik oryantasyonlarının son 1 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimleri ortalaması

2HD5 Oryantasyonlarının Ortalama Toplam MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi (15 Å) (Son 1 µs)



Grafik 7. Ubikuitin-USP2 kompleksinin 15 Å mesafede yerleştirilen kübik oryantasyonlarının son 1 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimleri ortalaması.

Bu yedi oryantasyonun son 1 µs'leri incelendiğinde 5 Å ile 15 Å mesafede yerleştirilen ubikuitinin serbest enerjileri arasındaki fark 1,000 kJ/mol'a yakın hesaplandı.

3.1.1.1.1.3. Kimerik SDZ CHI621'in Fab Fragmenti (1MIM)

Kimerik SDZ CHI621 Fab dimerinin 5 Å mesafede yerleştirilmiş 6 farklı kübik oryantasyon ve doğal formun 5 µs'lik simülasyonu ve MM/PBSA serbest enerji hesaplamaları iki bağımsız tekrar yapılarak gerçekleştirildi.

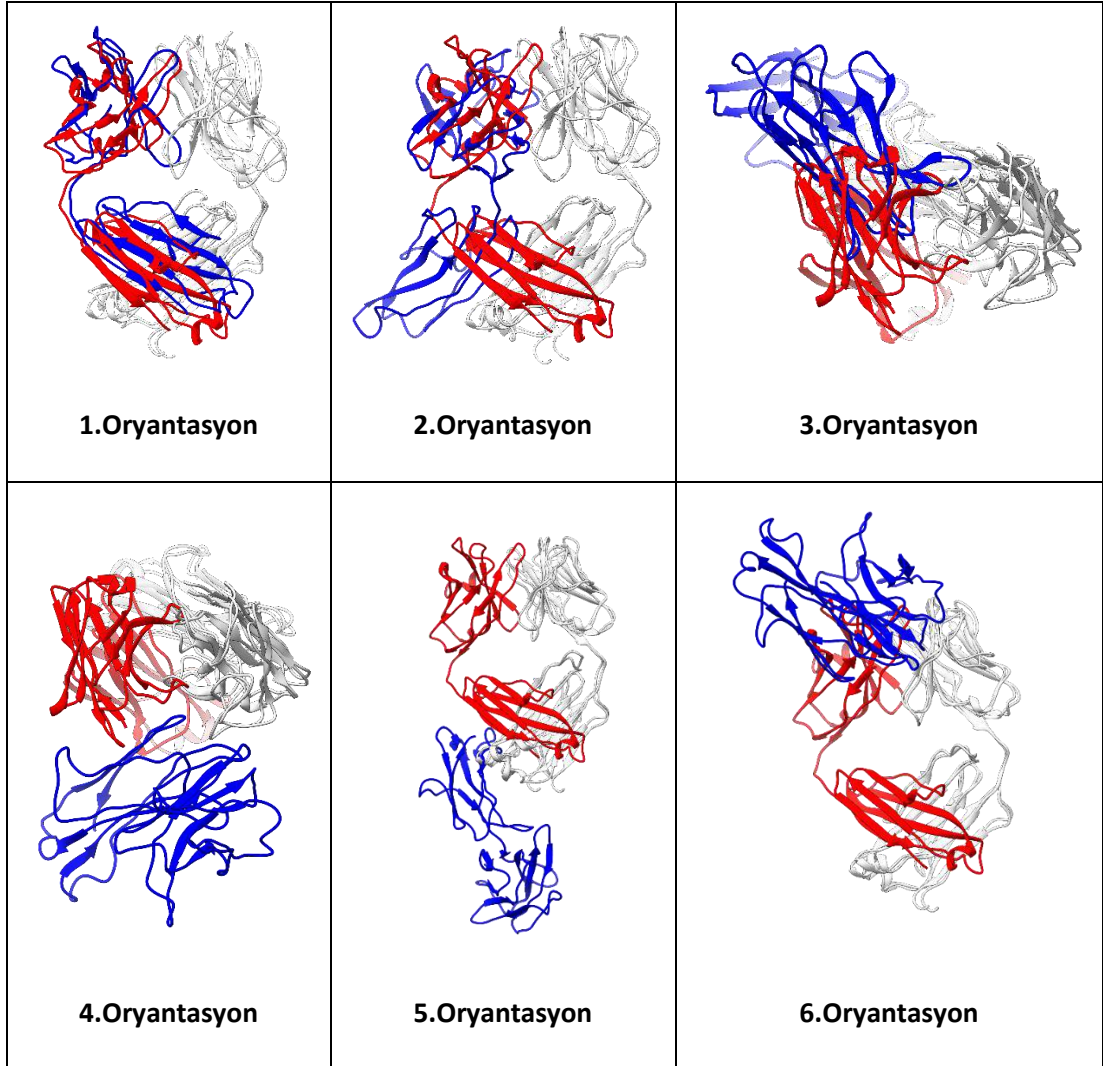
3.1.1.1.1.3.1. Moleküler Dinamik Simülasyon

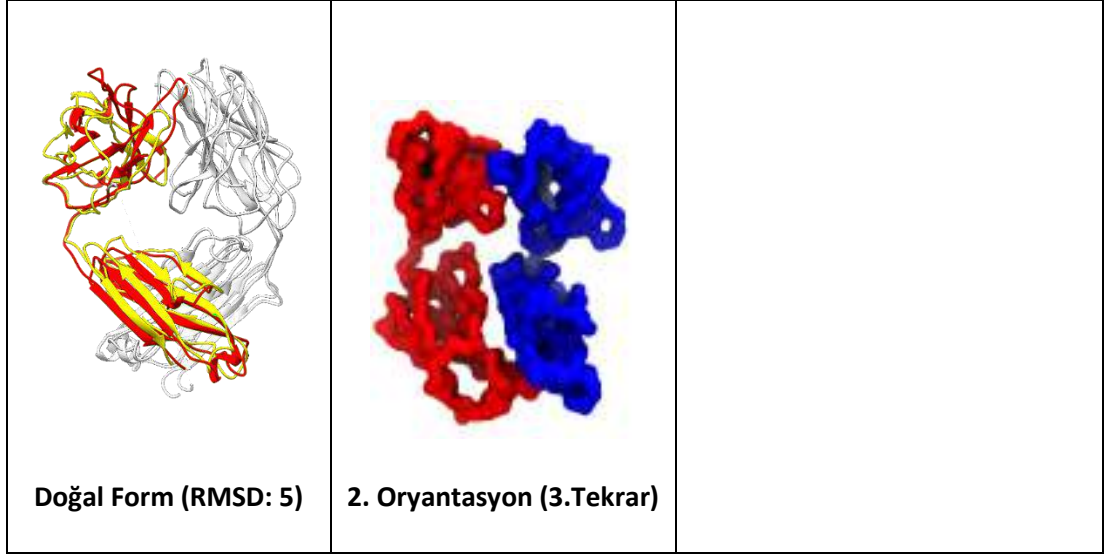
Kimerik SDZ CHI621 Fab dimerinin 5 Å mesafede yerleştirilmiş 6 farklı kübik oryantasyonlarının 5 µs'lik iri taneli simülasyonları ve iki bağımsız tekrarı sonunda çeşitli bağlanma paternleri meydana geldi. Doğal formun İri Taneli Simülasyonu boyunca kısmi konformasyonel değişim meydana gelerek simülasyon sonunda 5 Å RMSD farkı meydana geldi. 5 Å mesafede yerleştirilen 1. oryantasyonun 5 µs'lik iri taneli simülasyonu sonunda doğal forma yakın bir bağlanma paterni oluşturduğu gözlemlendi. İri taneden tüm atomik yapıya dönüşüm sırasında oluşan rezidüel farklılıklar nedeniyle sağlıklı RMSD değeri hesaplanamadı. Şekil 32'de görüldüğü gibi kırmızı rankle belirtilmiş olan domain doğal yapıyı temsil ederken mavi renkle gösterilen yapının simülasyonu sonunda domainin konformasyonel olarak değişmiş halini göstermektedir. 1. oryantasyonun doğal yapıya nazaran daha sıkı kenetlendiği gözlenirken diğer konformasyonlarda zayıf bir bağlanma gözlemlendi.

3.1.1.1.1.3.2. Serbest Enerji Hesaplamaları

Kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmentinin tüm simülasyonlarının MM/PBSA toplam serbest enerjileri ayrı ayrı hesaplandı. Doğal formun en düşük -2862,66 kJ/mol enerjiye sahip olduğu

hesaplanırken diğer en düşük değer 1. oryantasyonda -3016 kJ/mol olarak hesaplandı. Buna karşın diğer oryantasyonlarda belirgin bir enerji düşüşü gözlenmezken 2. oryantasyondan 6. oryantasyona kadar sırayla en düşük değerler -1560.35, -1552.666, -482.186, -838.788 ve -635.386 kJ/mol olarak hesaplandı. Simülasyon ve serbest enerji hesaplamaları bağımsız olarak tekrarlandığında sonuçlarda önemli değişikliklerin olmadığı gözlemlendi. 1. oryantasyon ve doğal formun tekrar en düşük toplam serbest enerjiye sahip olduğu gözlenmesine karşın 3. tekrarda 2. oryantasyonun -2307 kJ/mol ile 1,25 μ s'den itibaren yaklaşık 1,5 μ s'ye kadar hızlı bir düşüş göstererek doğal forma yakın serbest enerji değerine yaklaştığı belirlendi [Grafik 8]. Konformasyonel bağlanma incelendiğinde iki dimerin birbirine paralel amiloid bağlanmalara benzer şekilde bağlandığı görüldü (Şekil 32). Grafik 9 da görüleceği gibi son 1 μ s'deki serbest enerji değişimi en yüksek 1. Oryantasyonda gözlemlendi.

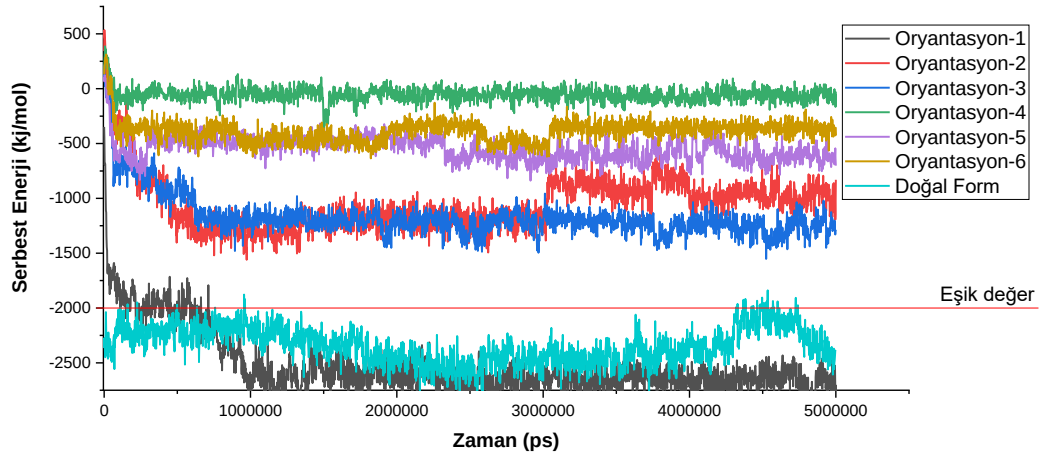




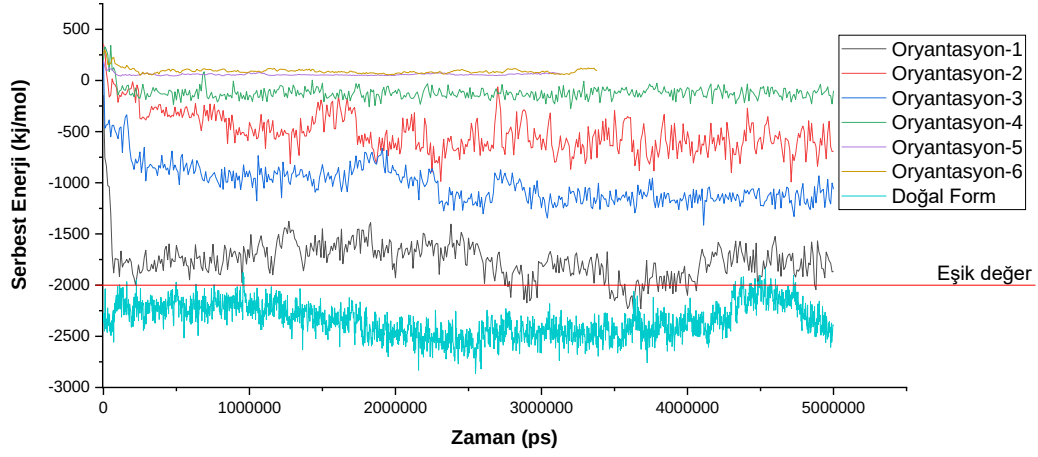
Şekil 32. Ortalama 5 Å mesafede yerleştirilmiş kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmenti dimerinin oryantasyonların simülasyonu sonucu oluşan bağlanma paternleri

Proteinlerin daha net görünebilmesi için 3. ve 4. oryantasyonda şekil 32'deki protein konumları doğal forma göre x ekseninde 90° döndürüldü.

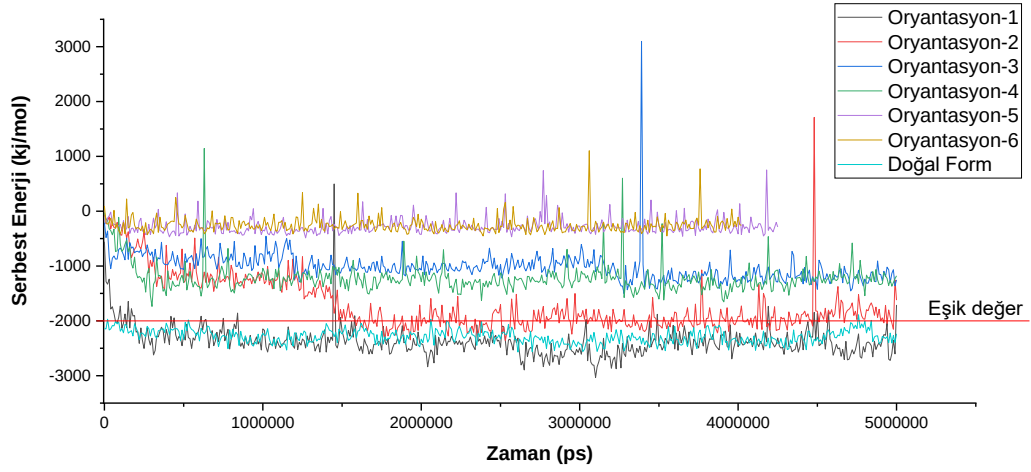
1MIM Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi



1MIM Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
2. Tekrar

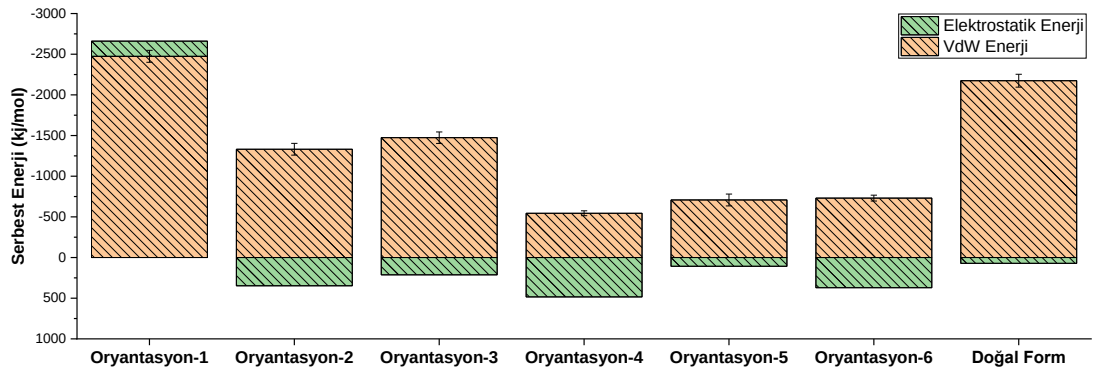


1MIM Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
3. Tekrar



Grafik 8. Kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmenti dimerinin kübik oryantasyonlarının 5 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimleri.

1MIM Oryantasyonların Ortalama Toplam MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi (son 1 us)



Grafik 9. Kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmenti dimerinin kübik oryantasyonlarının son 1 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimleri ortalaması.

3.1.1.1.1.4. Sil1-BİP Kompleksi (3QML)

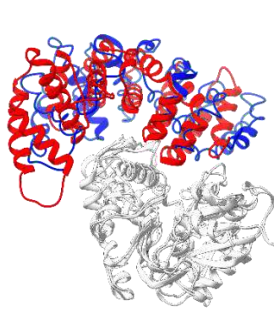
Sil1-BİP kompleksinin 5 Å mesafede yerleştirilmiş 6 farklı kübik oryantasyon ve doğal formun 5 µs'lik simülasyonları ve MM/PBSA serbest enerji hesaplamaları iki bağımsız tekrar yapılarak gerçekleştirildi.

3.1.1.1.1.4.1. Moleküler Dinamik Simülasyon

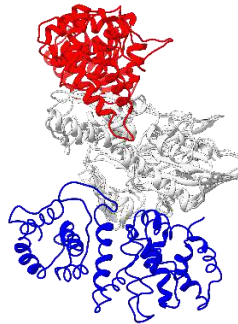
Tüm oryantasyonların 5 µs'lik MD simülasyonları sonunda çeşitli bağlanma paternleri oluştu. Doğal formun RMSD değeri simülasyon sonunda 2,8 Å iken buna en yakın değer 4 Å ile 1. oryantasyonda gözlemlendi [Şekil 33]. Diğer bağlanma paternlerinin benzerliği doğal yapıdan çok uzakta olduğundan RMSD değerleri hesaplanamadı.

3.1.1.1.1.4.2. Serbest Enerji Hesaplamaları

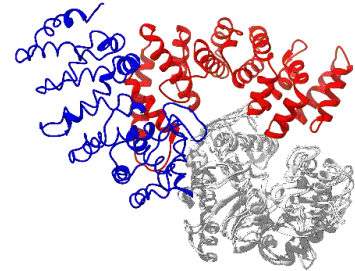
Tüm iri taneli simülasyonların sonucunda doğal formun toplam MM/PBSA serbest enerjisi tüm oryantasyonlar içinde en düşük enerji olan -3246.5 kJ/mol olarak hesaplanırken bu değere en yakın değer olarak 3. tekrarda 1. oryantasyonun toplam MM/PBSA serbest enerjisi -2959,19 kJ/mol olarak bulundu. Bununla birlikte diğer oryantasyonlarda genellikle -1500 kJ/mol değerinin altına geçilmezken istisnai olarak 2. tekrardaki 2. oryantasyonun -2684 kJ/mol en düşük değere kadar ulaştığı gözlemlendi. Yaklaşık 2.8 µs'ye kadar -1500 kJ/mol değerlerinde izlerken aniden 100-150 ns içinde -2000 kJ/mol değerlerine kadar dramatik bir düşüş meydana gelerek devamında yavaş bir şekilde -2500 kJ/mol'e doğru aşağı yönlü seyri gözlemlendi [Grafik 10]. Son 1 µs'deki toplam serbest enerji değişimi incelendiğinde en yüksek toplam serbest enerji değişimi 1. Oryantasyonda gözlemlendi [Grafik 11].



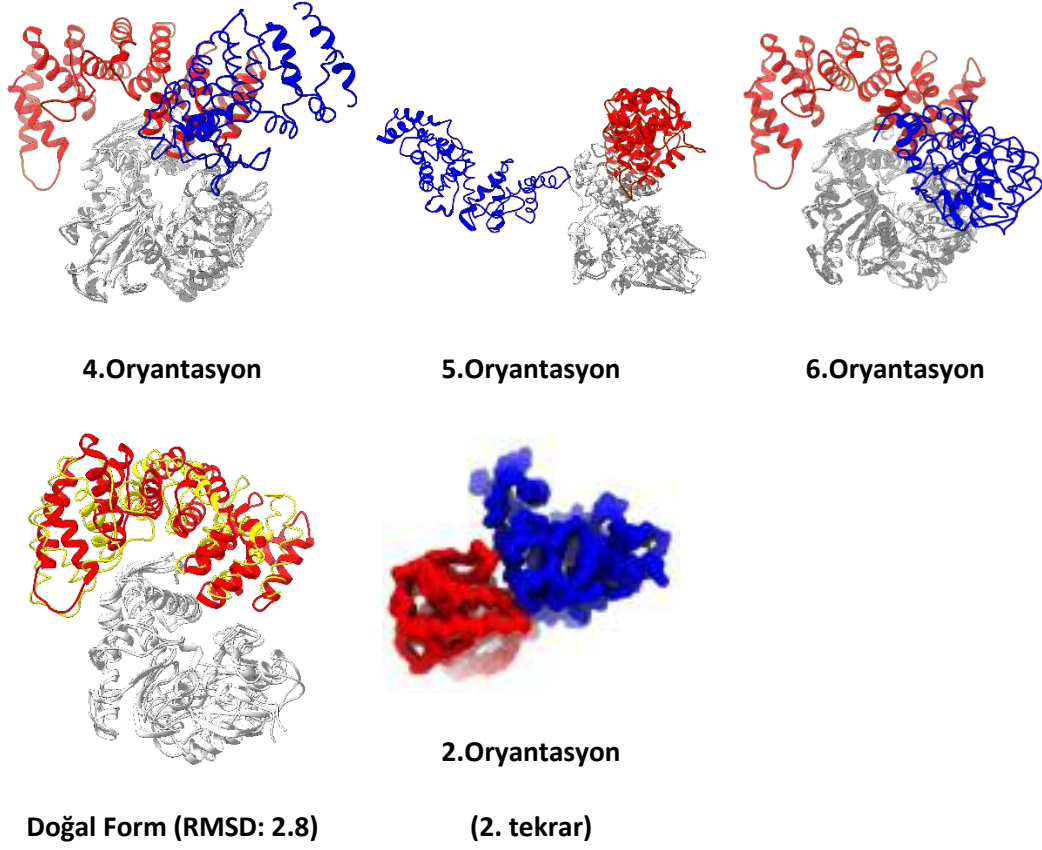
1.Oryantasyon (RMSD: 4.2)



2.Oryantasyon



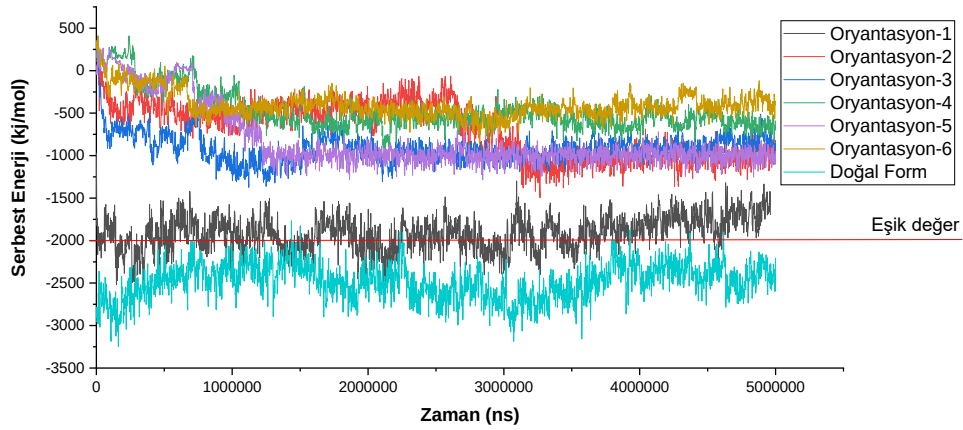
3.Oryantasyon



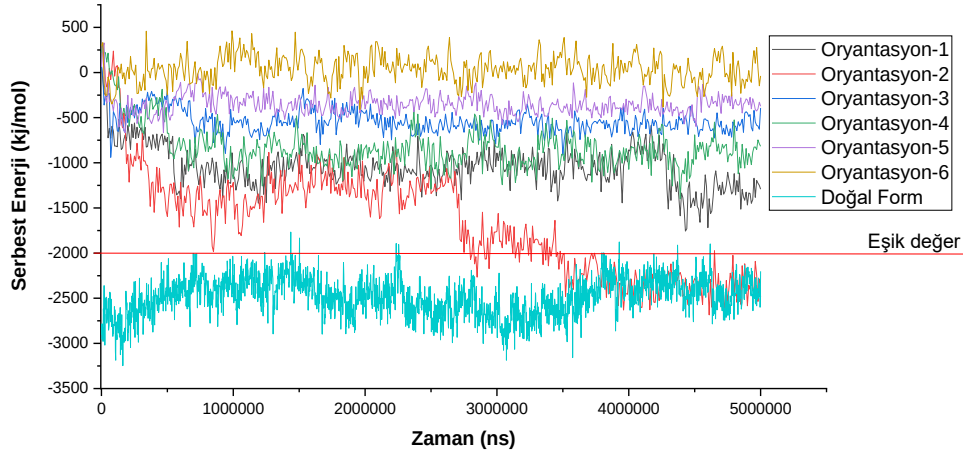
Şekil 33. Ortalama 5 Å mesafede yerleştirilmiş Sil1-Bip kompleksi oryantasyonlarının simülasyonu sonucu oluşan bağlanma paternleri

Şekil 33’de gri renkli BİP doğal BİP yapısı ile hizalanarak sil1 proteinlerinin birbirine göre konumları görüntülendi. Kırmızı renkli sil1 doğal yapıyı, mavi renkli sil1 ise simülasyon sonunda oluşan paterni göstermektedir. Sarı renkli sil1 doğal formun simülasyonu sonucu konumunu temsil etmektedir. son 1

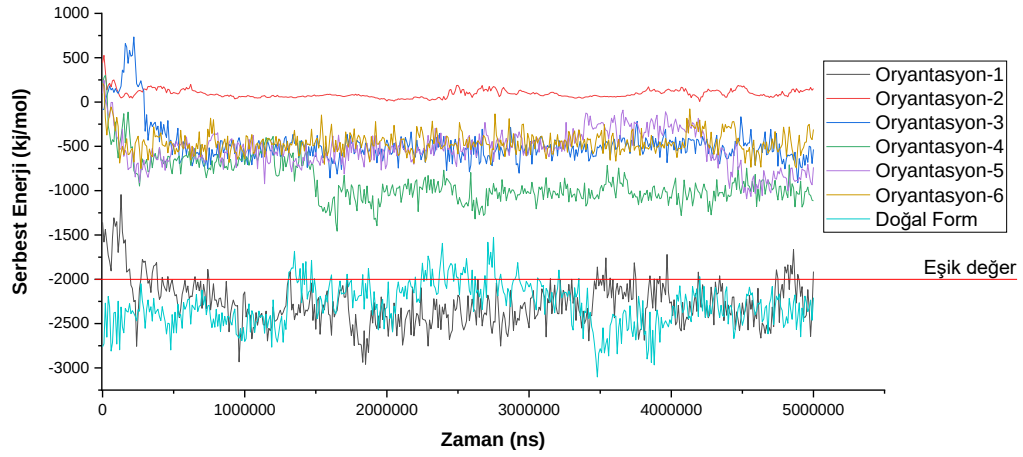
3QML Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi



3QML Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
2. Tekrar

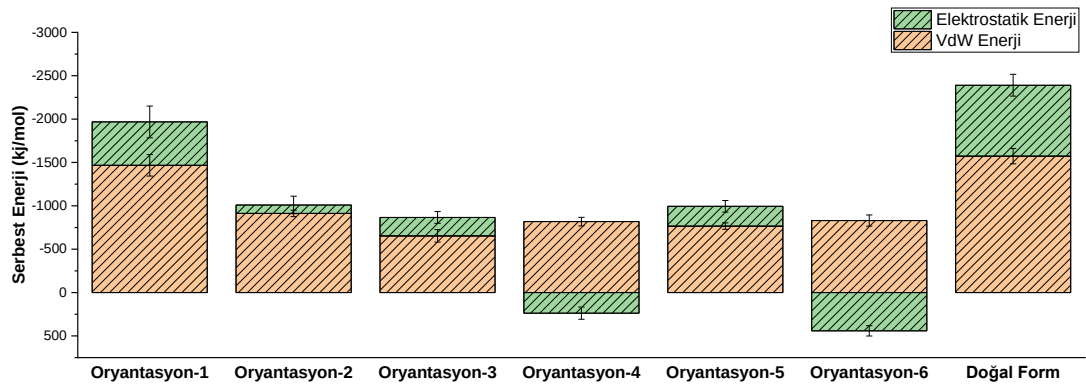


3QML Kübik Oryantasyonlarının 5µs Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
3. Tekrar



Grafik 10. Sil1-Bip kompleksinin kübik oryantasyonlarının 5 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimleri

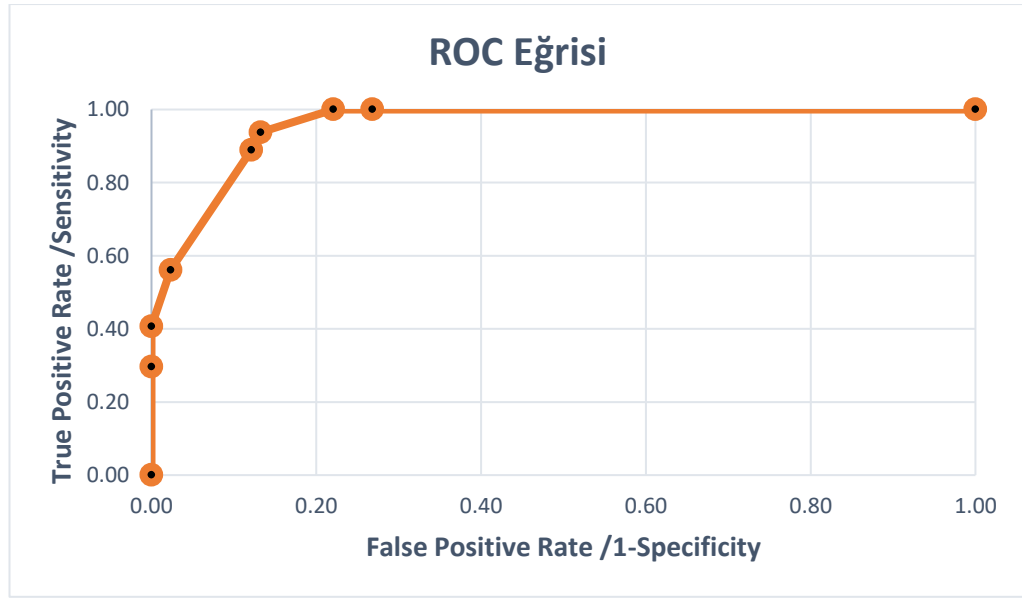
3QML Oryantasyonlarının Ortalama Toplam MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi (son 1 us)



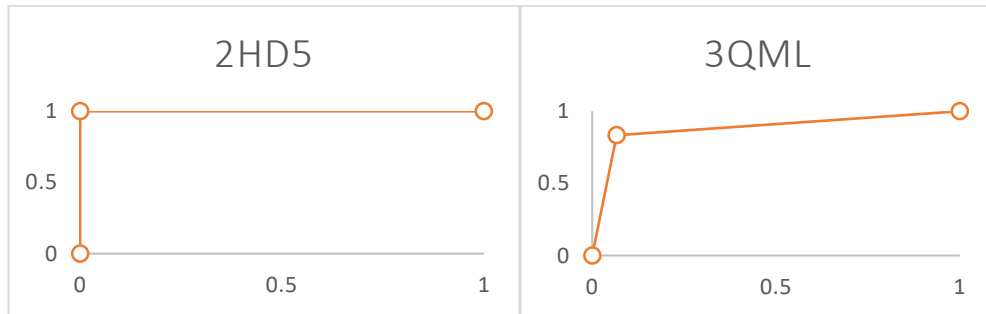
Grafik 11. Sil1-BİP kompleksinin kübik oryantasyonlarının son 1 µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimleri ortalaması

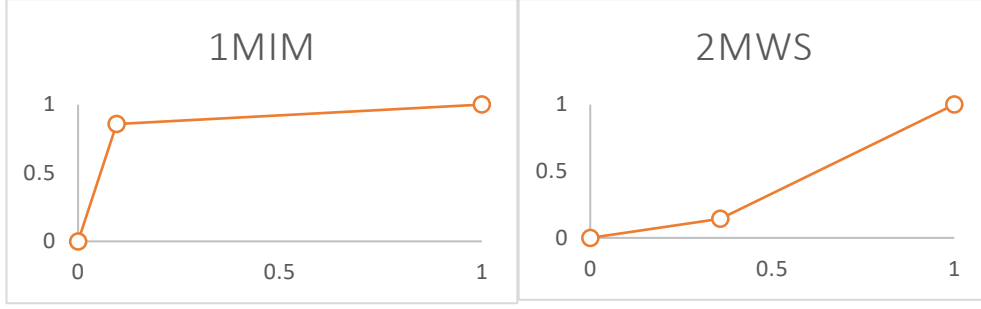
3.1.1.1.1.5. İri Taneli Kübik Oryantasyon Simülasyonlarının ROC Analizi

Dört protein kompleksinin 0, -1000, -1500, -2000, -2500, -3000, -3500 kJ/mol olarak belirlenen eşik değerlere göre ROC eğrisi çizildiğinde Grafik 12 elde edildi. Bu grafiğe göre yaklaşım için optimum değer olarak -2000 kJ/mol belirlendi. Bu değere göre F-değeri ve doğruluk (ACC) 0.88 olarak ölçüldü. ROC eğrisi altında kalan alanın ölçüsü AUROC yaklaşık değeri ise 0,94 olarak belirlendi. Her protein kompleksi ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise 2HD5'in F-değeri: 1.00, doğruluğu (ACC): 1; 3QML'in F-değeri: 0.88, doğruluğu (ACC): 0.9; 1MIM'in F-değeri: 0.88, doğruluğu (ACC): 0.89; 2MWS'in F-değeri: 0.23, doğruluğu (ACC): 0.48 olarak hesaplandı [Grafik 13].



Grafik 12. İri taneli kübik oryantasyon validasyon setinin minimum toplam serbest enerjileri ROC eğrisi





Grafik 13. Her Protein Kompleksi İçin Ayrı Ayrı Roc Değerleri

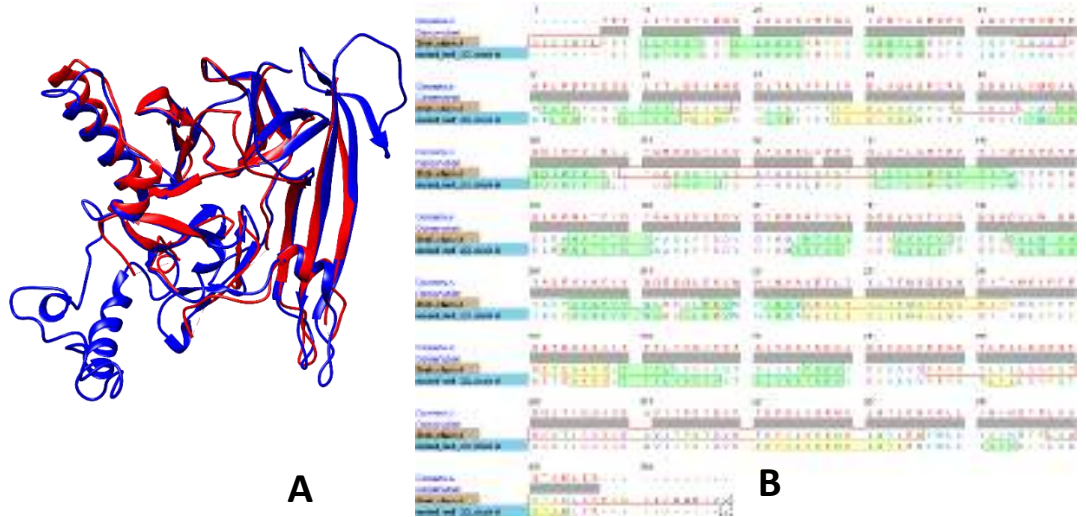
3.1.1.2. BİP-IRE1 Etkileşiminin İri Taneli (CG) Kübik ve NBDIIβ Eksende Oryantasyon Simülasyonları ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları

BİP-IRE1 etkileşimlerinin simülasyonundan önce 5e84 PDB kodlu BİP proteini üzerindeki eksik atomlar ve 2HZ6 kodlu IRE1LD'deki kayıp rezidüleri yeniden yapılandırıldıktan sonra BİP'in tüm atomik MD simülasyonu ve konformasyonel analizleri gerçekleştirildi. Daha sonra BİP-IRE1LD etkileşiminin NBDIIβ ve kübik eksenli oryantasyonlarının 2-5 µs'lik CG simülasyonları gerçekleştirildi ve bağlanma paternlerinin MM/PBSA serbest enerji değişimleri hesaplandı.

3.1.1.2.1. BİP-IRE1LD Oryantasyonlarının İri Taneli Moleküler Dinamik Simülasyonları

3.1.1.2.1.1. Homoloji Modelleme ve Validasyon

BİP ve IRE1 proteinleri üzerindeki kayıp atom ve rezidüleri yeniden yapılandırılarak simülasyona hazır hale getirildi. Ramachandran Plot'a göre rezidüleri %99,1 kabul edilebilir, %94,5 favori bölgede yer aldı [Grafik 14]. Referans yapıda ise bu değerler %96,7 kabul edilebilir, %79,3 favori olarak gösterildi [Tablo 6]. MD simülasyon'da 6 eş BİP (HSPA5) proteinin yapısal kalitesine göre b zinciri tercih edildi. Eksik rezidüye sahip olmadığı için homoloji modellemeye gerek duyulmadı. Buna karşın 428, 429, 433, 576, 579 ve 582. rezidülerdeki eksik atomlar Dunbrack Rotamer Library ile tamamlandı. Şekil 34A'da görüleceği üzere kırmızı renkli yapı PDB.org'tan temin edilen 2HZ6 kodlu proteini temsil ederken mavi renkli yapı homoloji modelleme sonrası elde edilen eksiksiz IRE1LD proteinini temsil etti. Tablo 6 ve 7'de IRE1LD ve BİP'in referans yapılarının homoloji modelleme sonrası oluşturulan modeller ile kıyaslamalı yapısal analizi gösterildi.



Şekil 34. A-IRE1LD referans yapı (kırmızı) ve homolojik olarak modellenmiş yeni modeli (mavi) B- IRE1LD modellenmiş ve referans yapının aminoasit sekansı

Tablo 6. IRE1LD referans yapı ve homoloji modelinin molprobitiy skoruna göre karşılaştırılmalı analizi

		REFERENCE STRUCTURE (2HZ6)		HOMOLOGY MODEL OF IRE1 LUMINAL DOMAIN	
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	41.95		0.18	
Protein Geometry	Poor rotamers	20	12.20%	7	2.34%
	Favored rotamers	131	79.88%	278	92.98%
	Ramachandran outliers	8	3.32%	3	0.86%
	Ramachandran favored	191	79.25%	329	94.54%
	MolProbity score*	3.67		1.22	
	C β deviations >0.25Å	0	0.00%	2	0.61%
	Bad bonds:	0 / 1859	0.00%	0 / 2824	0.00%
Peptide Omegas	Bad angles:	3 / 2555	0.12%	16 / 3847	0.42%
	Cis Prolines:	1 / 14	7.14%	1/21	4.76%
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	12	5.24%	1 / 328	0.30%
	CA Geometry outliers	2	0.87%	2 / 349	0.57%

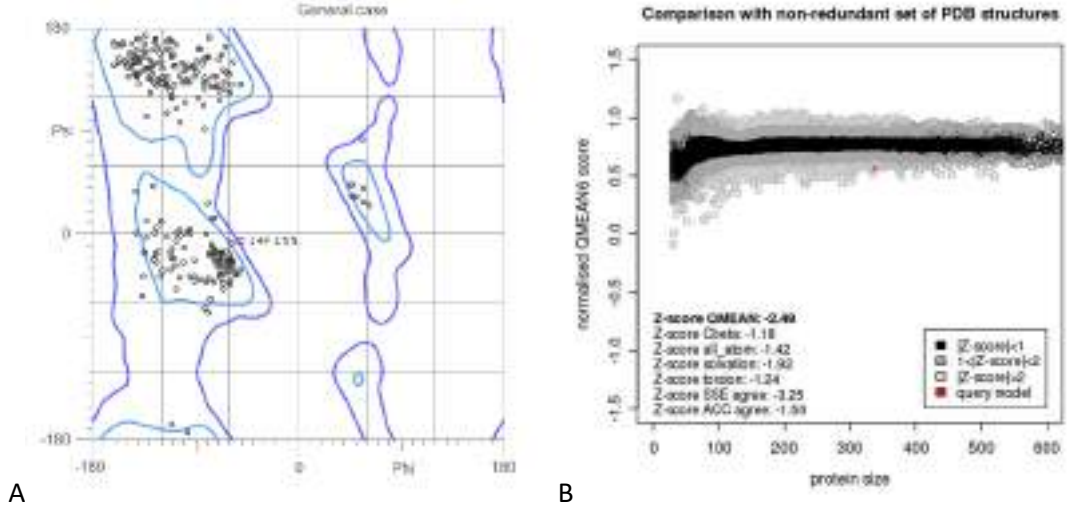
* MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution. Lower is better

Tablo 7. BİP referans yapı ve refine edilmiş modeli molprobitiy skoruna göre karşılaştırılmalı analizi

		REFERENCE STRUCTURE CHAINS (5E84)													
		A		B		C		D		E		F		MODEL	
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	3.5		2.98		3.19		3.73		3.84		4.26		0.11	
Protein Geometry	Poor rotamers	18	3.50%	21	4.11%	23	4.50%	20	3.91%	18	3.53%	20	3.91%	14	2.94%
	Favored rotamers	457	88.74%	450	88.06%	449	87.87%	444	86.89%	451	88.43%	451	88.26%	432	90.76%
	Ramachandran outliers	9	1.49%	3	0.50%	6	0.99%	9	1.49%	6	0.99%	8	1.32%	5	0.83%
	Ramachandran favored	566	93.71%	569	94.21%	562	93.05%	561	92.88%	560	92.72%	564	93.38%	580	96.03%
	MolProbity score*	1.97		1.95		2.05		2.06		2.05		2.09		1.17	
	Cβ deviations >0.25Å	2	0.36%	0	0.00%	0	0.00%	4	0.72%	0	0.00%	1	0.18%	2	0.36%
	Bad bonds:	7/4777	0.15%	3/4767	0.06%	1/4767	0.02%	4/4767	0.08%	1/4763	0.02%	3/4767	0.06%	0 / 4787	0.00%
	Bad angles:	10/6446	0.16%	6/6432	0.09%	4/6432	0.06%	15 / 6432	0.23%	4/6428	0.06%	10/6432	0.16%	28 / 6457	0.43%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	1/23	4.35%	1/23	4.35%	1/23	4.35%	1/23	4.35%	1/23	4.35%	1/23	4.35%	1/23	4.35%
	Twisted Peptides:	1 / 605	0.17%	13	2.16%	3 / 605	0.50%	2 / 605	0.33%	13	2.16%	3 / 605	0.50%	2 / 605	0.33%
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	15	2.49%	3	0.50%	14	2.33%	18	2.99%	3	0.50%	11	1.83%		
	CA Geometry outliers	3	0.50%			4	0.66%	4	0.66%			5	0.83%		

^ MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution. Lower is better

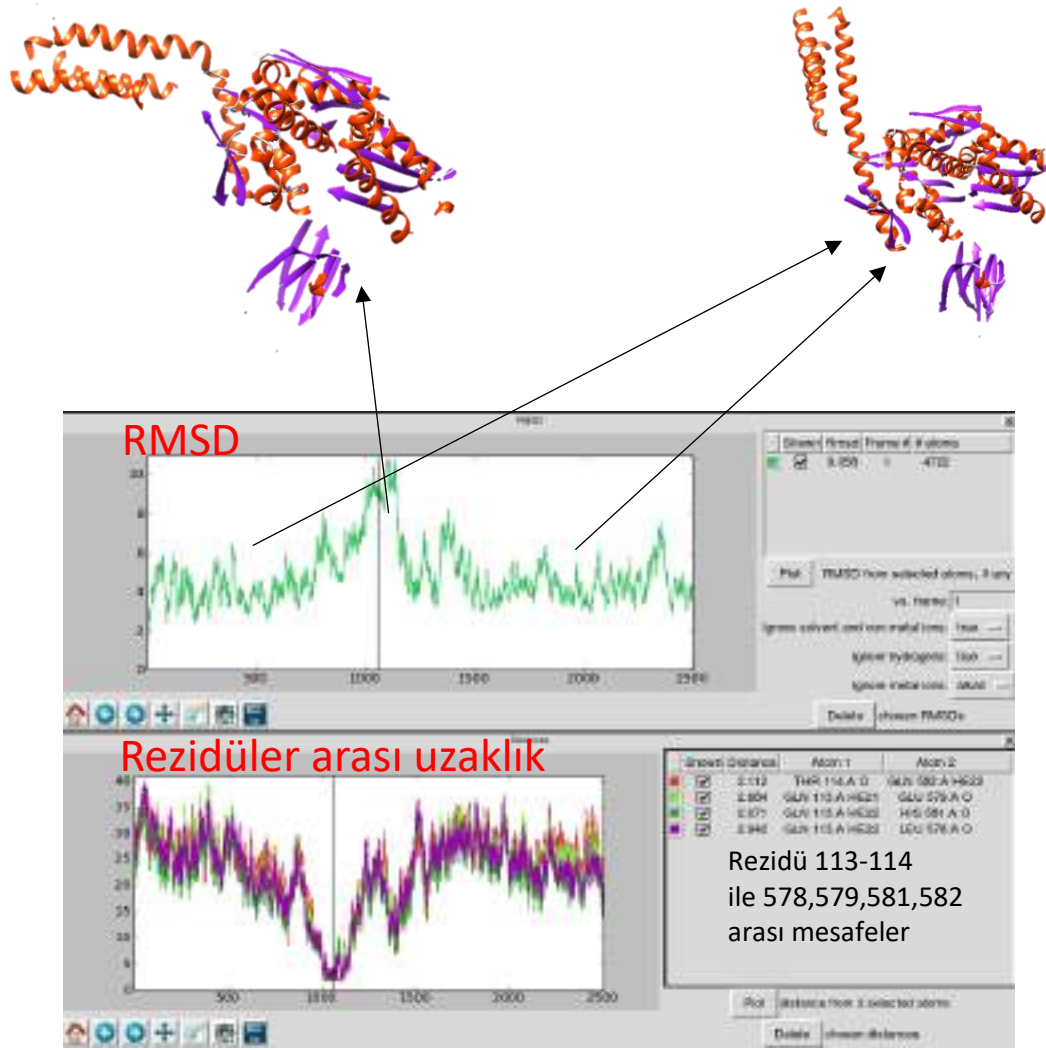
* MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution. Lower is better



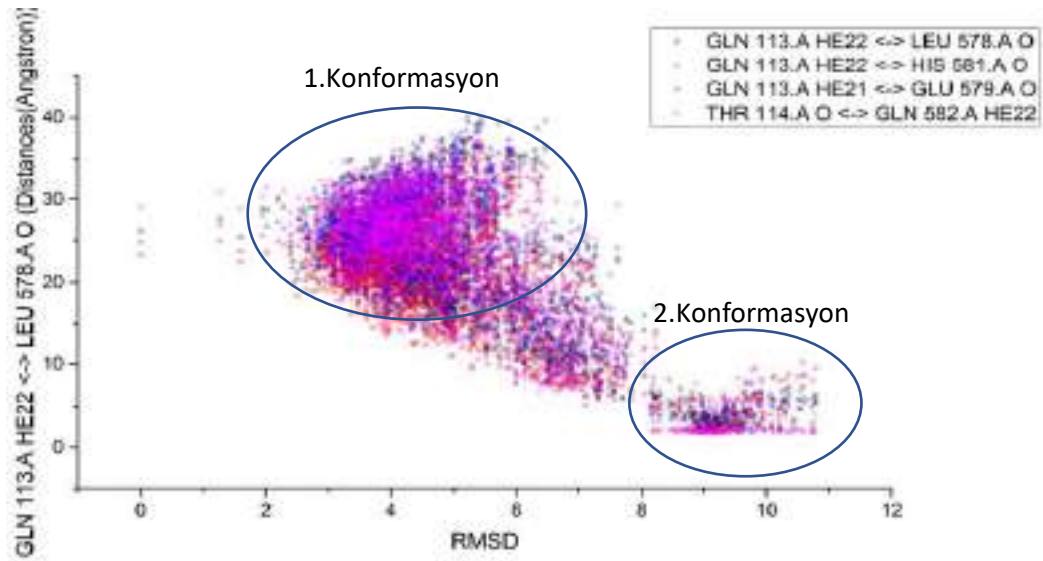
Grafik 14. A- IRE1LD'in homoloji modelinin (A) Ramachandran ve (B) QMEAN grafiği

3.1.1.2.1.2. BİP MD Simülasyonu ve Konformasyonel Analizi

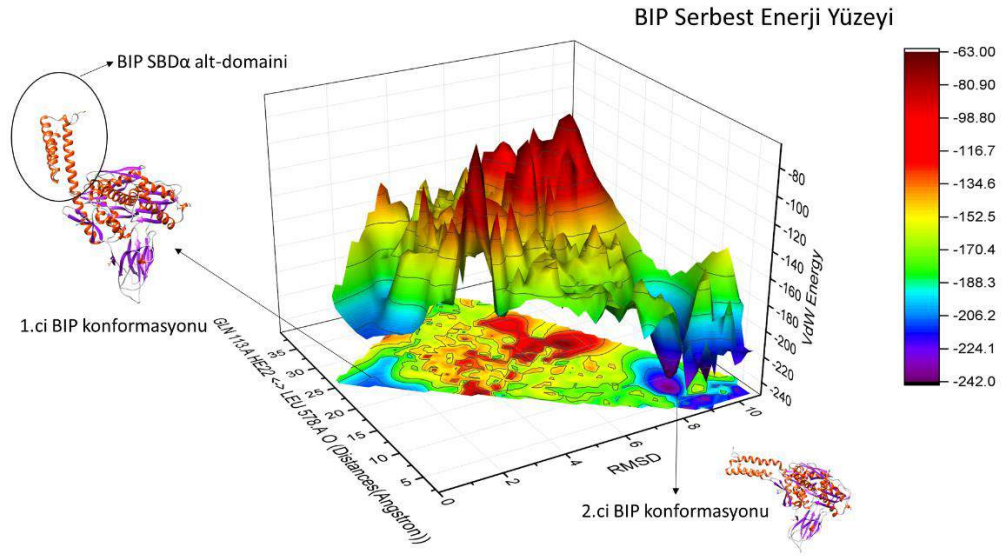
BİP proteininin 100 ns'lik Tüm Atomik MD Simülasyonu sonucu meydana gelen konformasyonel değişikliklerin analizi yapıldı. Grafik 15'te görüldüğü üzere yaklaşık 40. ns'de RMSD değerinin 6 Å arttığı ve RMSD değerinin tekrar hızla düştüğü gözlemlendi. Bu değişikliğin nedeni BİP-SBDα domainin yaklaşık 90° bükülerek tekrar eski haline gelmesi olarak yorumlandı. Bu hareket CG simülasyonlarda ve BİP'in farklı tüm atomik simülasyonlarında farklı zaman aralıklarında tekrarlandı. BİP-SBDα domaininde bükülme meydana geldiğinde 113. ve 114. rezidüleri ile 578., 579., 581., 582. rezidüleri arasındaki mesafenin 3 Å seviyelerine kadar düştüğü ve 113-579., 113-581., 113-578. ve 114-582. rezidüleri arasında hidrojen bağı oluştuğu gözlemlendi. Bununla birlikte proteinin toplam konformasyonel RMSD değerinin ise ortalama 4 Å seviyelerinden 10 Å seviyelerinin üzerine çıktığı görüldü. RMSD ve 4 farklı rezidünün GLN 113 ile THR 114 arası mesafelerinin birbirine göre durumları grafikte gösterildiğinde BİP'in 100 ns boyunca meydana gelen konformasyonel geçişi belirlendi [Grafik 16]. Grafikte her bir nokta, MD simülasyonda 40 ps'lik zaman dilimini ifade etmektedir. Grafığe bakıldığında BİP'in zamanın büyük kısmını 1. konformasyonda geçirdiği 2. konformasyonda ise kısa süreli kaldığı gözlemlendi. BİP'in 100 ns MD simülasyonunun MM/PBSA toplam serbest enerjisi hesaplandığında VdW enerjisinin bükülme esnasında hızla düştüğü belirlendi. Mesafe, RMSD ve VdW enerjisi beraber Grafik 17'te gösterildiğinde BİP'in iki konformasyonunun düşük enerjiye sahip olduğu görüldü. Grafikte mavi alan düşük, kırmızı alan ise yüksek serbest enerjiyi temsil etmektedir.



Grafik 15. BİP'in 100 ns boyunca Tüm Atomik MD Simülasyon'unun RMSD ve mesafe grafiği

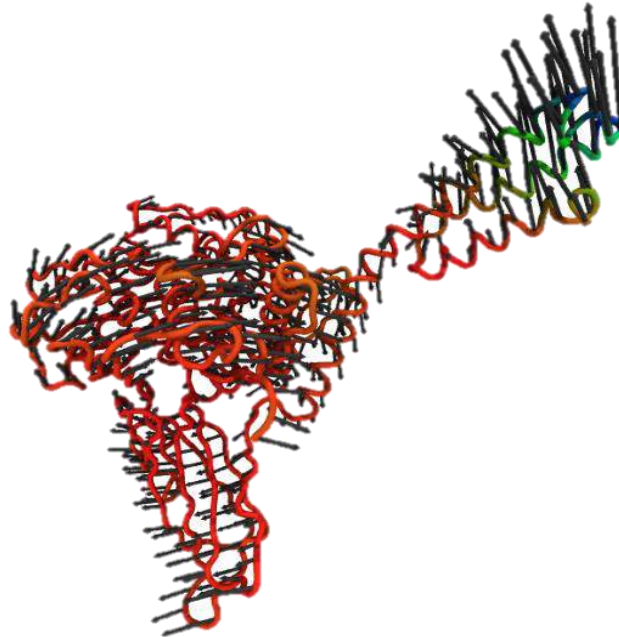


Grafik 16. BİP'in 100 ns boyunca tüm atomik MD simülasyonunun RMSD-mesafe grafiği



Grafik 17. BİP proteinin 100 ns boyunca konformasyonel geçişinin serbest enerji yüzey haritası

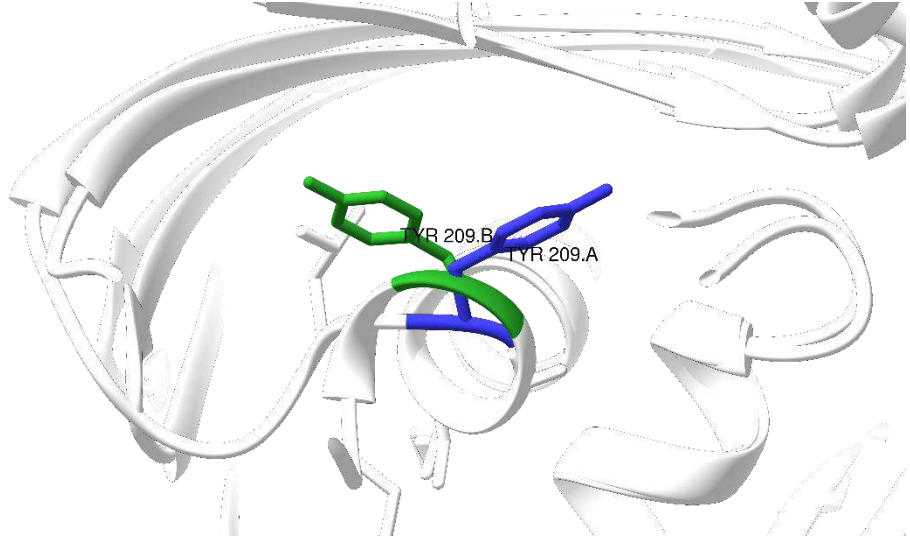
Haritada koyu mavi renkteki iki bölgede düşük enerji gözlenirken bu bölgeler BİP proteinin iki farklı konformasyonel durumu ile uyumludur.



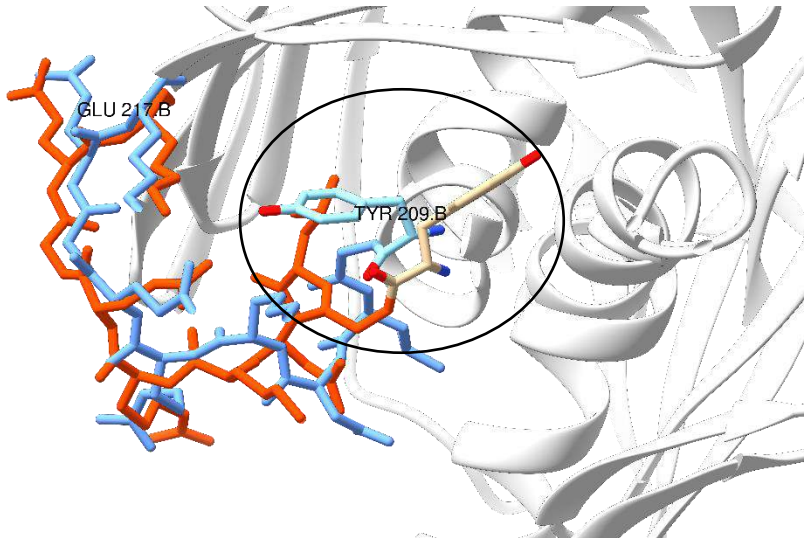
Şekil 35. Prody'ye göre yapı temelli BİP dinamiğinin oklar ile gösterimi

BİP dinamiğinin yapı temelli analizi için Prody aracı kullanıldı (Bakan vd., 2011). Normal Mode Wizard (NMWiz) aracı ile temel bileşen analizinin (PCA) grafiksel gösterimi yapıldı. Şekil 35'de görüldüğü üzere kırmızıdan maviye doğru proteinin konformasyonel hareketliliğine göre renk

skalası oluşturularak en hareketli bölgelerde daha uzun oklar ile gösterim gerçekleştirildi. α SBD domaini, BiP'te en çok konformasyonel değişime uğrayan bölge olarak dikkat çekti.



Şekil 36. BiP-NBD-IIB açık(PDB:3IUC) ve kapalı(PDB:6ASY) yapıları hizalandığında TYR 209 rezidüsünün konformasyonel değişimi



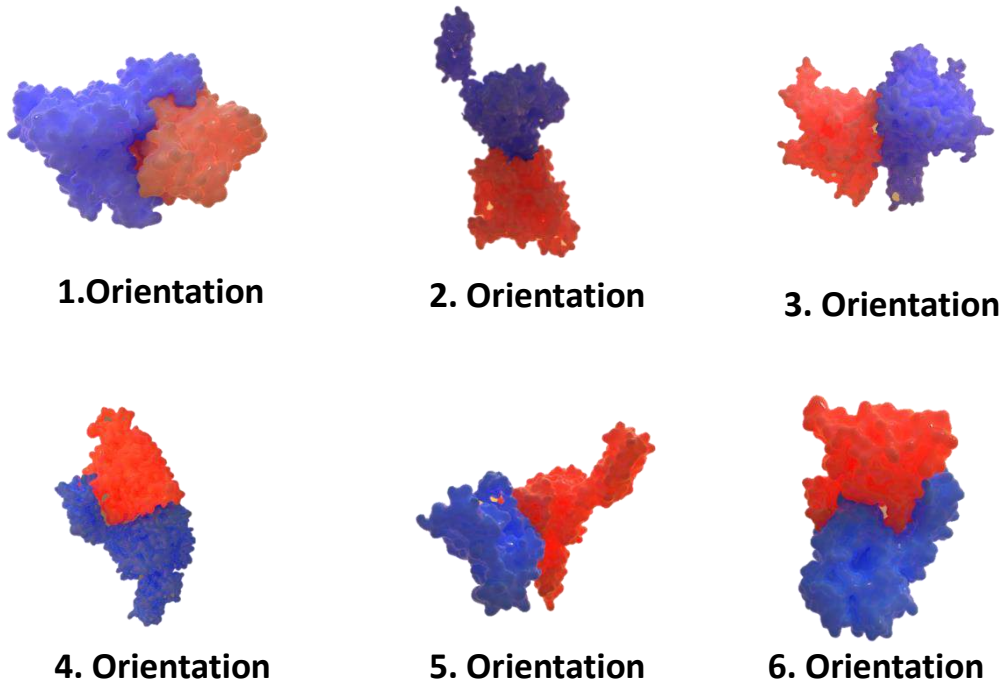
Şekil 37. BiP NBDIIβ açık ve kapalı formu hizalandığında 209-217 arası rezidülerin konformasyonel görünümü

6ASY kodlu BiP proteinine göre 209-217 arası rezidüler hizalandığında bu rezidüler arasındaki RMSD değeri 2,226 Å, 28-208 arası rezidüler hizalandığında 0,558 Å, 218-392 arası rezidüler hizalandığında ise 0,585 Å olarak hesaplandı. Bu duruma bakıldığında BiP NBDIIβ kapalı formdan (6ASY) açık forma (3IUC) konformasyonel geçişte diğer rezidülere kıyasla 209-217 arası rezidülerde önemli konformasyonel değişiklik oluşturduğu gözlemlendi[Şekil 37]. Ayrıca Şekil 36'da görüleceği üzere 209. TYR rezidüsünde neredeyse 180° lik dönüş olduğu görüldü.

BİP'te menteşe rolü gören 209-217 arası rezidülerde 209. rezidünün dramatik açılma sonucu bükülme meydana geldiği ve BİP NBDIIβ domainindeki bu bükülme sonucu açıldığı gözlemlendi.

3.1.1.2.2. BİP/IRE1LD Oryantasyonlarının Kübik Eksende İri Taneli Simülasyonu ve Mm/Pbsa Serbest Enerji Hesaplamaları

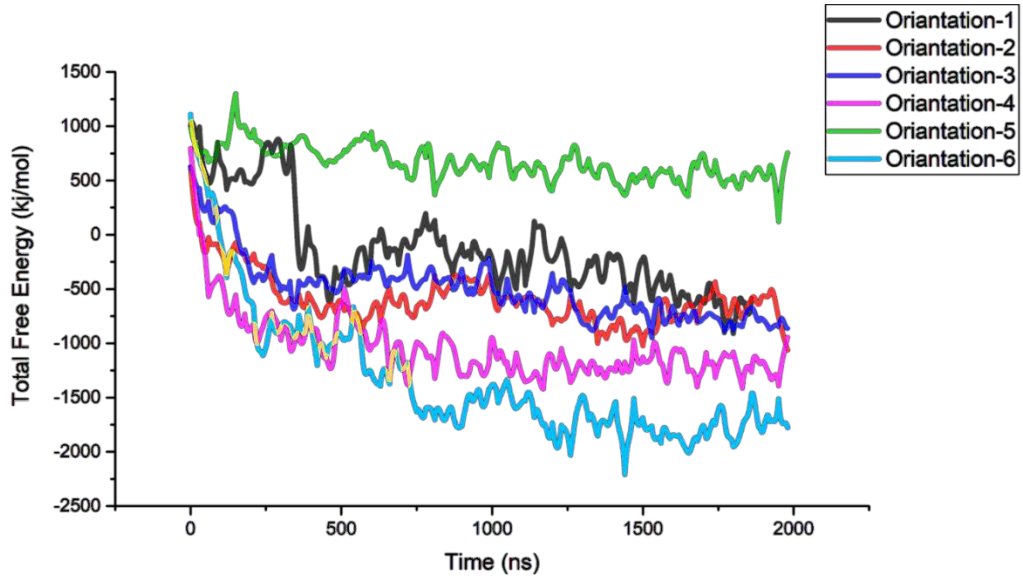
BİP merkezde olacak şekilde IRE1LD kübik eksende BİP'in etrafında IRE1LD 4. bölge BİP'e dönük olacak şekilde oryante edildi. Her bir oryantasyonun 2 μ s boyunca iri taneli simülasyonu gerçekleştirildi. Simülasyon sonunda bağlanma paternleri Şekil 38'de gösterildi.



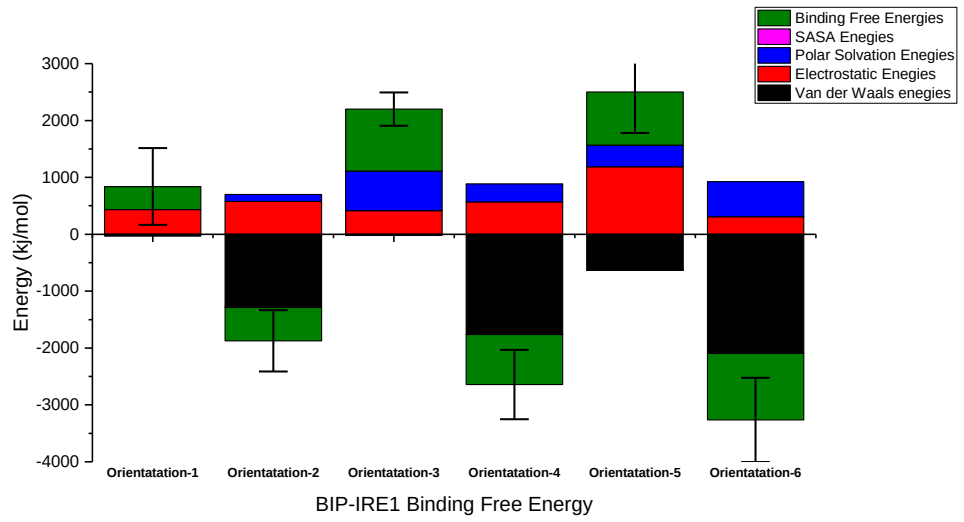
Şekil 38. 2 μ s'lik Coarse Grained simülasyon sonunda farklı oryantasyonlardaki BİP-IRE1 komplekslerinin son durumu

3.1.1.2.2.1. Serbest Enerji Hesaplamaları

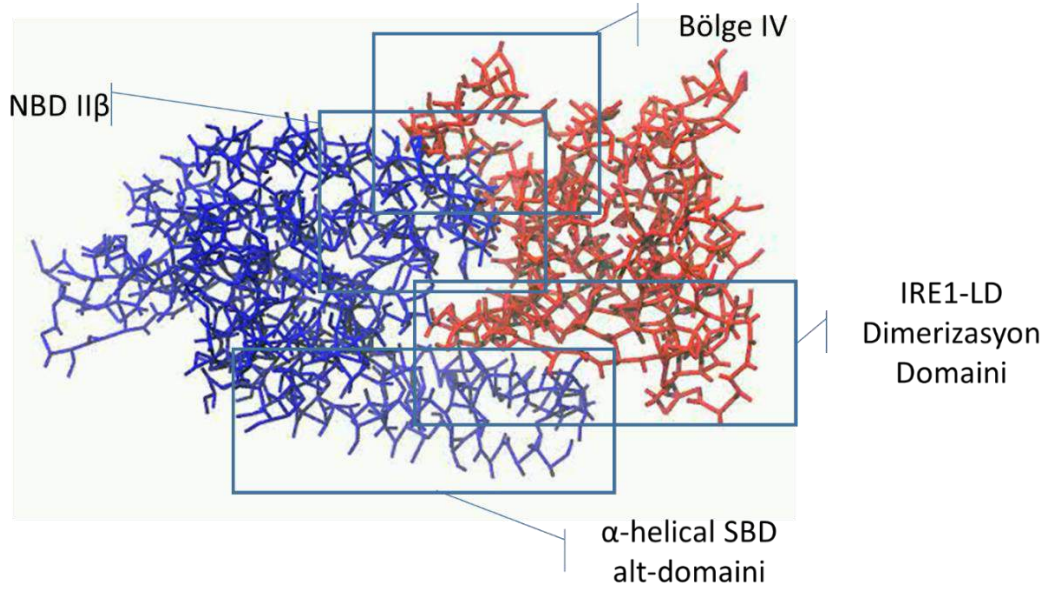
Her bir oryantasyonun 2 μ s'lik iri taneli MD simülasyonu boyunca MM/PBSA toplam serbest enerji değişimi Grafik 18'da gösterildi. 6. oryantasyon, -2,000 kJ/mol toplam serbest enerjisi ile en düşük değere sahip olarak diğer oryantasyonlardan belirgin şekilde ayrılırken bu değeri -1250 kJ/mol ile 4. oryantasyon takip etti. MM/PBSA serbest enerjisine polar ve apolar çözücü etkisi de dahil edildiğinde sonuçlarda değişiklik gözlenmedi (Grafik 19).



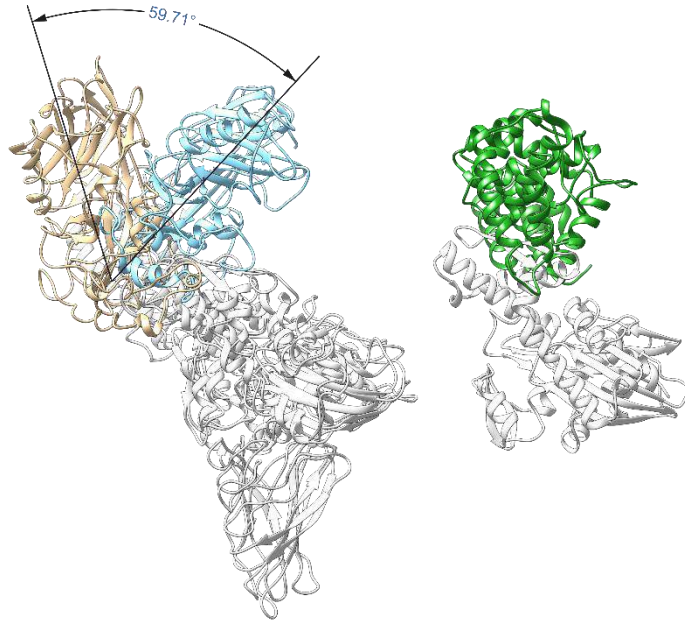
Grafik 18. 2 μ s'lik Coarse Grained simülasyon boyunca BİP-IRE1 kompleksinin toplam serbest enerji değişimi



Grafik 19. BİP-IRE1 oryantasyonlarının son 500 ns'deki entropik, elektrostatik, Van Der Waals enerjileri ile bunların toplamı olan bağlanma enerjileri ortalamaları



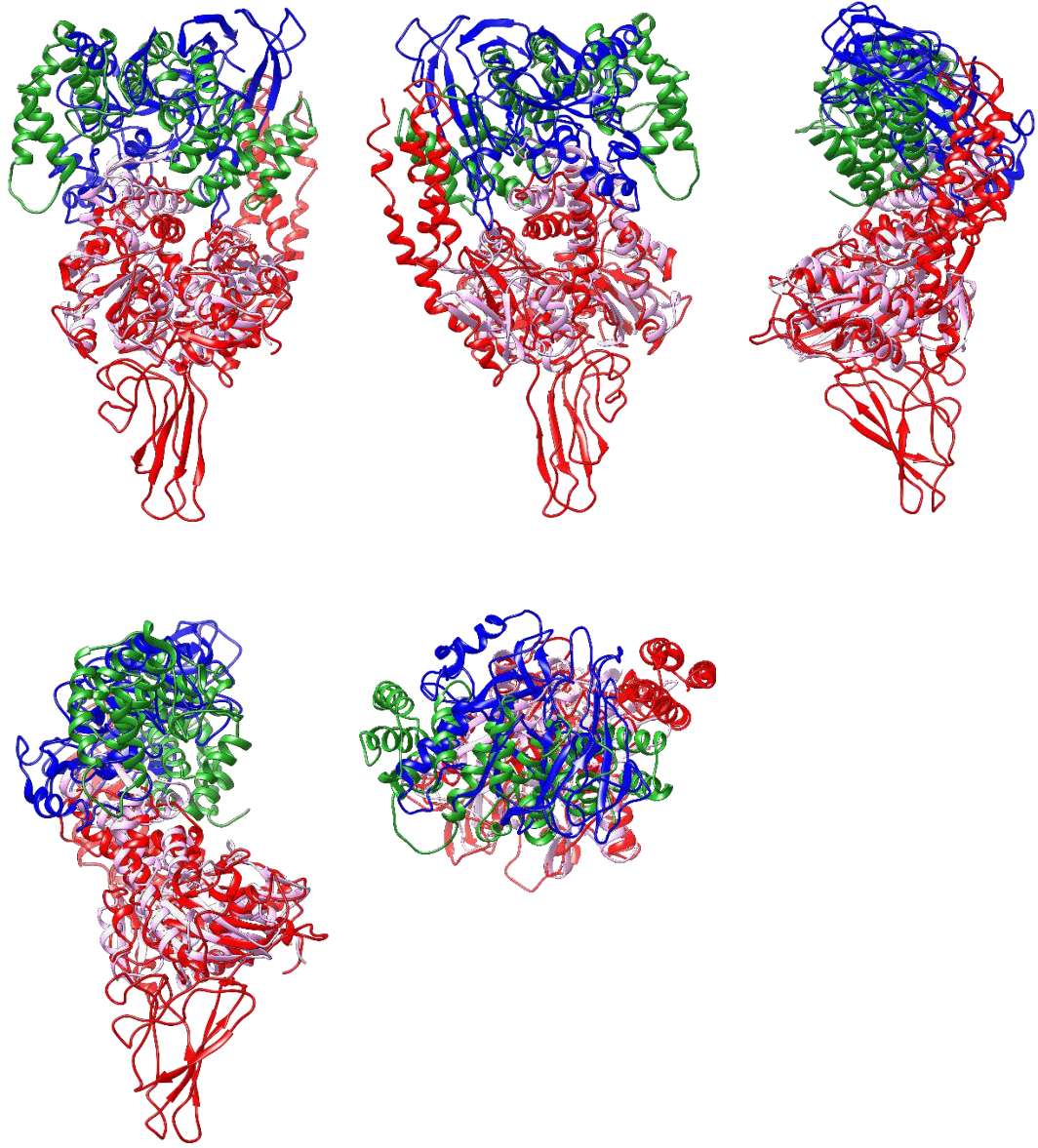
Şekil 39. 6. oryantasyonun bağlanma paterni (mavi: BİP, kırmızı: IRE1LD)



Şekil 40. CG-AA dönüşümü sonrası 10 ns'lik vakum ortamında MD simülasyon sonunda IRE1'in açısal değişimi ve BİP-Sil1 protein kompleksinin görünümü

6. oryantasyonda BİP'in (mavi) IRE1LD (kırmızı) ile etkileşiminde α helikal SBD alt domainin bükülerek IRE1LD'e bağlandığı, NBDIIβ alt domainin ise 4. bölge ile etkileşime girdiği gözlemlendi [Şekil 39]. Simülasyon sonunda oluşan iri taneli kompleksin iri taneli modelden Tüm Atomik Modele dönüşümü gerçekleştirildikten sonra 10 ns'lik Tüm Atomik MD Simülasyonu gerçekleştirildiğinde IRE1LD'in 59,71°'lik hareketle saat yönünde açısal hareket ettiği gözlemlendi [Şekil 40]. Oluşan yeni patern BİP-Sil1 kompleksi ile hizalandığında bağlanma biçimlerinin Sil1

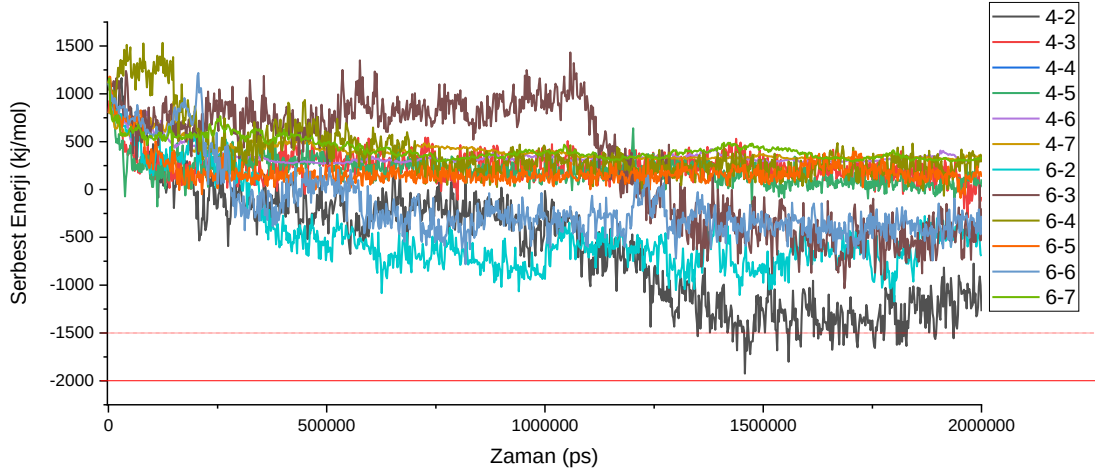
ile benzer olduğu belirlendi. Bağlanmada BİP NBDIIβ ile SBDα domainin direk rol oynadığı görüldü.



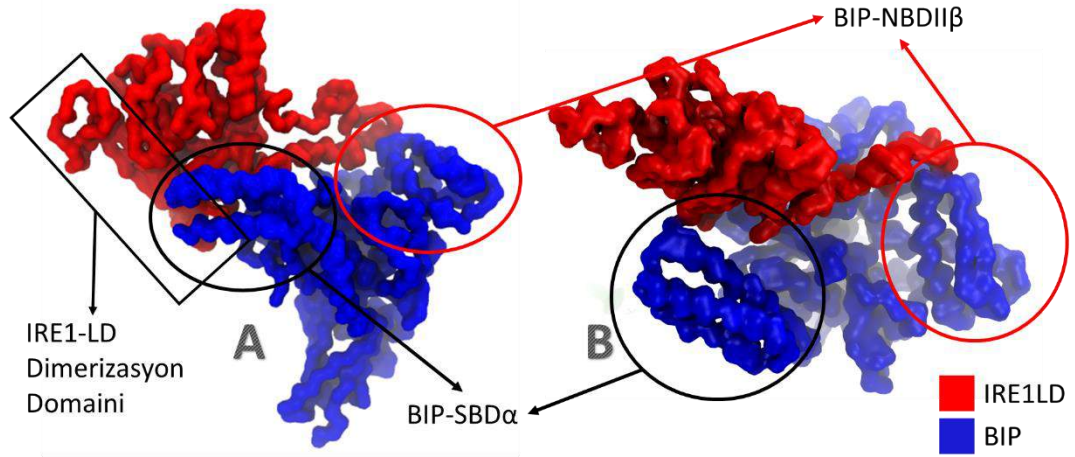
Şekil 41. 10 ns'lik vakum ortamında MD simülasyon sonunda BİP-IRE1LD kompleksi ile 3QML BİP-Sil1 kompleksinin BİP proteinine göre hizalanmasından sonraki pozisyonlarının çeşitli açılardan görünümü (yeşil: Sil1, kırmızı: BİP, mavi: IRE1LD)

BİP-IRE1LD bağlanması farklı açılardan BİP-IRE1LD kompleksi ile kıyaslanarak bakıldığında da benzerlik net olarak gözlemlendi (Şekil 41). 4. ve 6. oryantasyonların altı bağımsız tekrarının 5 µs CG-MD simülasyonu boyunca MM/PBSA Toplam Serbest Enerji Değişimi hesaplandığında en fazla serbest enerji değişimi 4. oryantasyonun 2. tekrarında gözlemlendi [Grafik 20].

4. ve 6. Oryantasyonun 5µs İri Taneli Simülasyonları boyunca MM/PBSA Toplam Serbest Enerjileri



Grafik 20. 4. ve 6. oryantasyonların altı bağımsız tekrarının 5 µs CG-MD simülasyonu boyunca MM/PBSA Toplam Serbest Enerji Değişimi

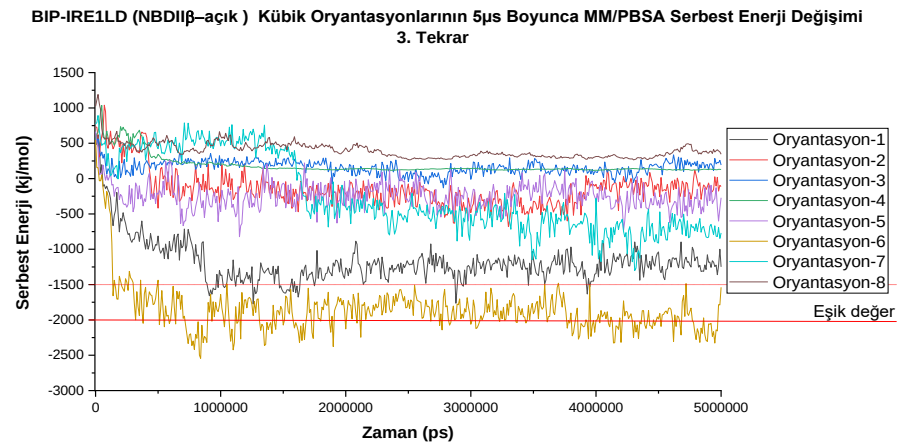
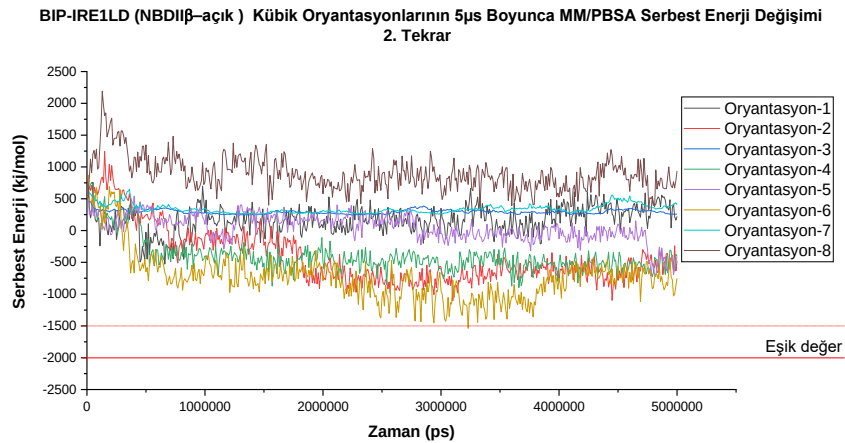
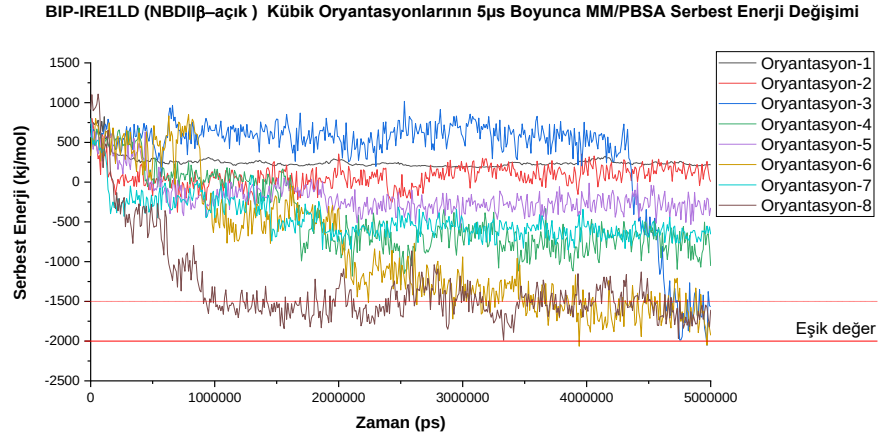


Şekil 42. 4. oryantasyonun 2. tekrarının 5µs CG-MD simülasyonu sonunda oluşan bağlanma paterni

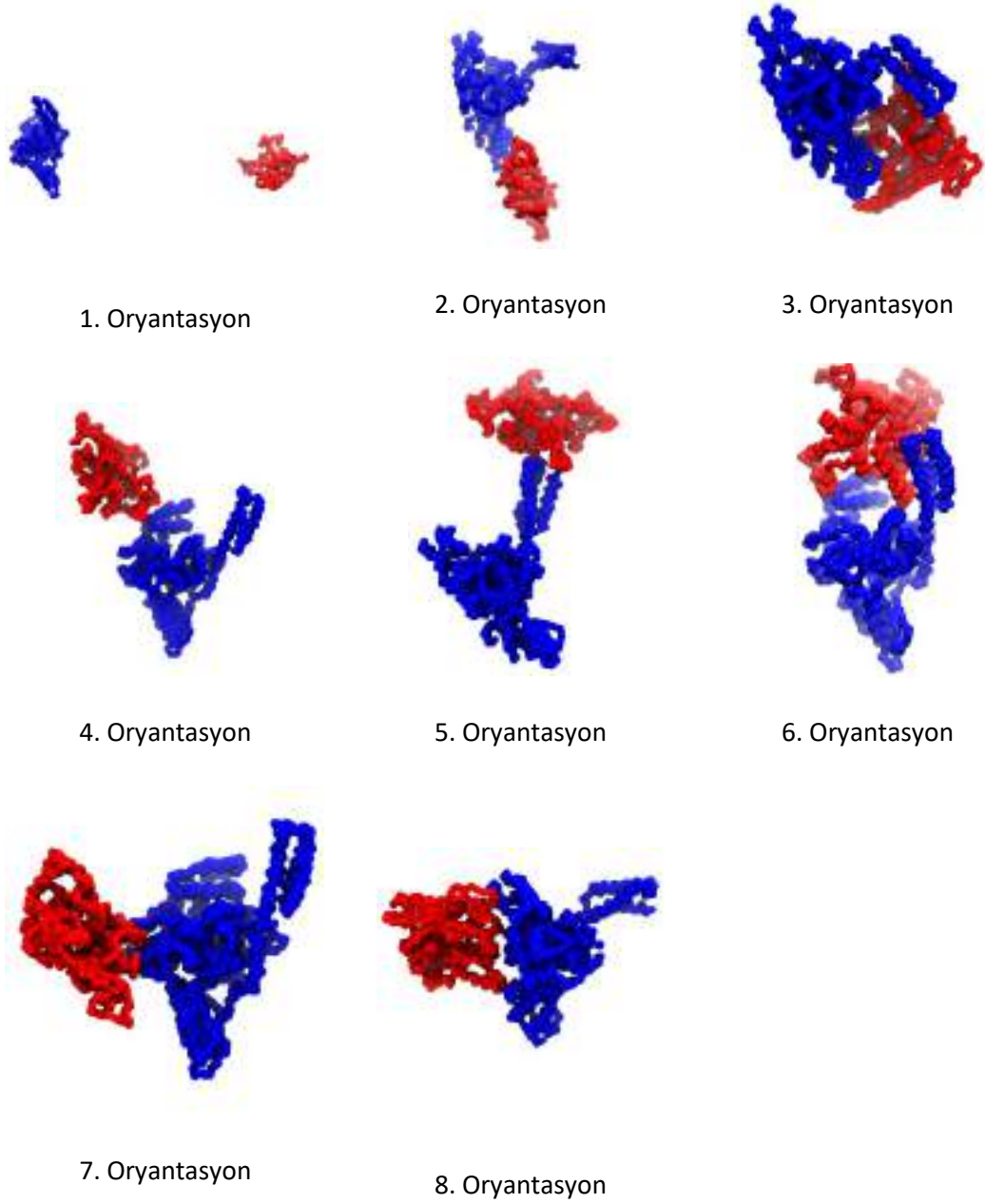
Oryantasyonların simülasyonu sonucunda etkili olduğu görülen 4. ve 6. oryantasyonlarının simülasyonu ve MM/PBSA serbest enerji hesaplaması 6 kez bağımsız olarak tekrarlandığında -1,500 kJ/mol enerji eşik değerinin sadece 4. oryantasyonun 2. tekrarında kısmen aşıldığı gözlemlendi. Oryantasyonun simülasyonu sonucunda oluşan bağlanma paternine bakıldığında IRE1LD dimerizasyon domaini etkileşime girmezken BİP-SBDα ve BİP-NBDIIβ domainlerinin zayıf etkileşimde olduğu belirlendi [Şekil 42]. BİP-IRE1LD NBDIIa-açık kübik oryantasyonlarının 5µs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimi incelendiğinde eşik değeri 3. tekrardaki 6. oryantasyonun geçtiği gözlemlendi [Grafik 21].

3.1.1.2.3. BİP/IRE1LD Açık ve Kapalı Oryantasyonlarının Kübik Eksende İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları

3.1.1.2.3.1. BİP/IRE1LD Açık Oryantasyonlarının Kübik Eksende İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları



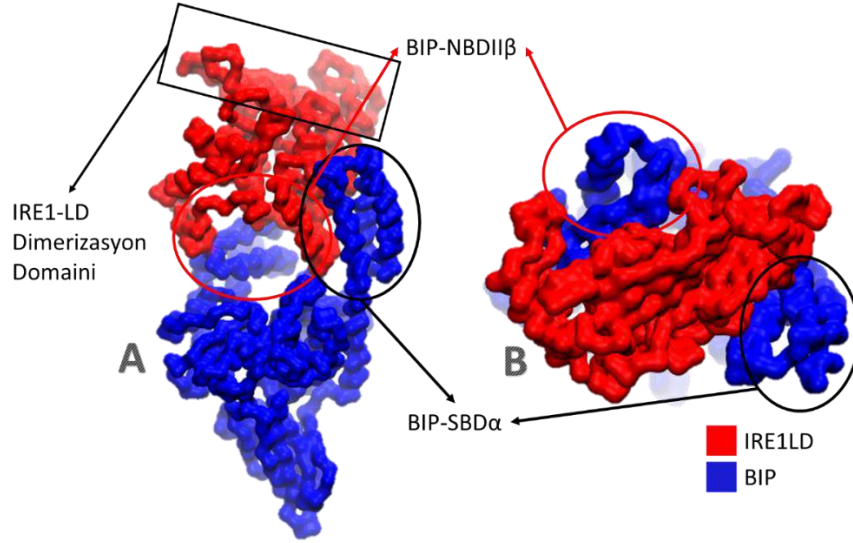
Grafik 21. BİP-IRE1LD NBDİİa-açık kübik oryantasyonlarının 5μs boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimi



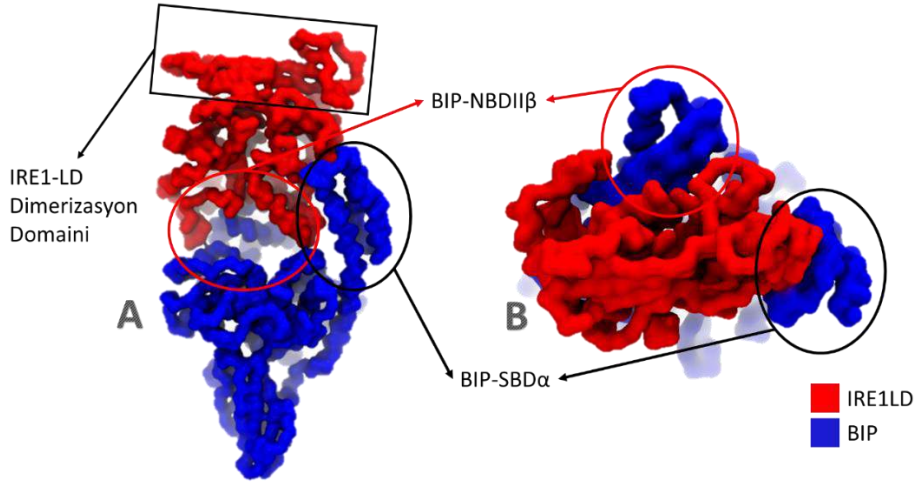
Şekil 43. BİP-IRE1LD (NBDIIβ- açık) kübik oryantasyonlarının 5µs'lik CG-MD simülasyonu sonunda meydana getirdikleri bağlanma paternleri

BİP-NBDIIβ domaini açık konformasyonu ile IRE1LD önceki oryantasyonlardaki gibi 8 farklı konumda kübik ekseninde hizalandığında ve oryantasyonlar 5µs'lik CG-MD simülasyon sonunda bağlanma paternleri şekil 43'de görüldüğü gibi meydana geldi. 5µs CG-MD simülasyonları boyunca meydana gelen MM/PBSA Toplam Serbest Enerji Değişimi hesaplandığında, sadece 6. oryantasyonun 1. ve 3. tekrarda eşik değer olan -2,000 kJ/mol değerini aştığı, 6. oryantasyonun 2. tekrarda -1,500 kJ/mol değerine en çok yaklaşan oryantasyon olduğu gözlemlendi. 8. oryantasyonun sadece 1. tekrarında eşik değere yaklaştığı, 3. oryantasyonun 1. tekrardaki serbest enerjisinin ise 4,5 µs'nin son 250 ns'si içinde hızla

düşerek eşik değere ulaştığı belirlendi. Şekil 44 ve 45'te görüldüğü gibi bağlanma paterni, IRE1LD'in BİP-SBD α ve BİP-NBDII β alt domainleri arasında yüksek esneklikteki 4. bölge BİP-NBDII β ile bağlanarak meydana geldi. Dimerizasyon domainin ise dışarda kaldığı gözlemlendi



Şekil 44. BİP-IRE1LD (NBDII β -açık) kübik oryantasyonları içinde 6. oryantasyonun 5 μ s CG-MD simülasyonu sonunda oluşan bağlanma paterni.



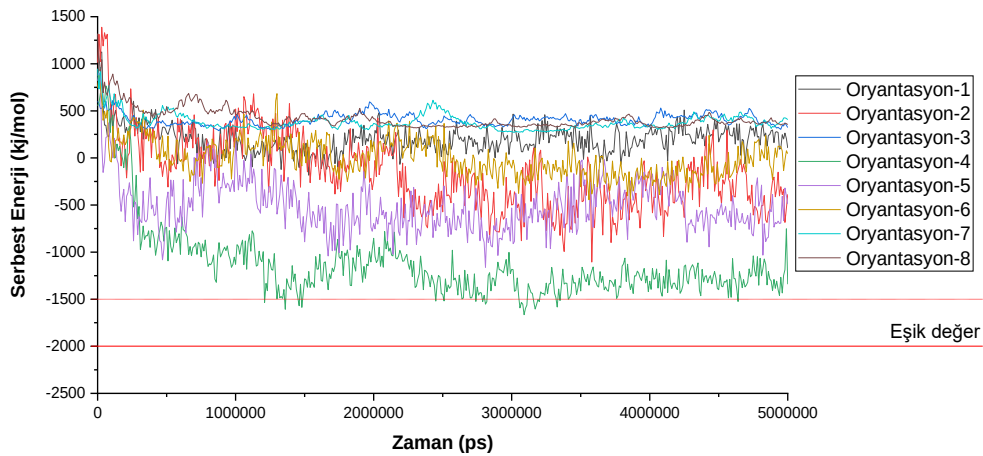
Şekil 45. BİP-IRE1LD (NBDII β -açık) kübik oryantasyonları içinde 6. oryantasyonun 3. tekrarının 5 μ s'lik CG-MD simülasyonu sonunda oluşan bağlanma paterni.

Tekrarlarıyla beraber tüm oryantasyonların Toplam Serbest Enerji Değişimleri incelendiğinde 6. oryantasyonun hem en düşük MM/PBSA Toplam Serbest Enerjiye sahip olduğu hem de bunu 3. tekrarda da benzer bağlanma paterni ile tekrarladığı gözlemlendi.

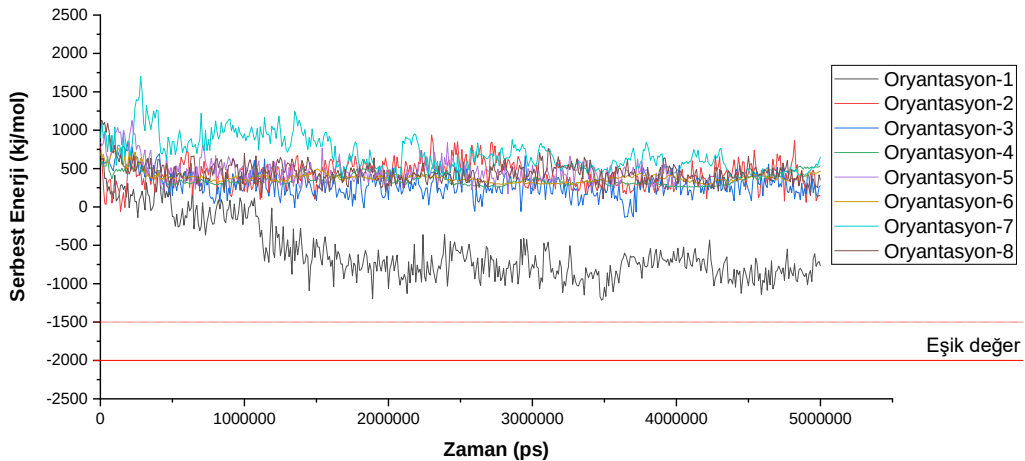
3.1.1.2.3.2. BİP/IRE1LD Kapalı Oryantasyonlarının Kübik Eksende İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları

BİP-NBDII β domaininin kapalı konformasyonu, IRE1LD açık konformasyonun oryantasyonları ile aynı konumda olacak şekilde kübik eksende hizalandıktan sonra oryantasyonların 5 μ s'lik CG-MD simülasyonu sonunda bağlanma paternleri Şekil 46'de görüldüğü gibi meydana geldi. Açık oryantasyonlarda genellikle bağlanma paternleri meydana gelmesine karşın kapalı konformasyonlu oryantasyonlarda 3., 7. ve 8. oryantasyonlarda bağlanma meydana gelmedi. Kapalı konformasyonlu oryantasyonlarda hiçbir simülasyonda eşik değer olan -2,000 kJ/mol'lük değere yaklaşmazken 3. tekrardaki ilk simülasyonlardan 4. oryantasyon ile 8. oryantasyonun toplam serbest enerjisi -1,500 kJ/mol'e yaklaştığı belirlendi [Grafik 22]. Açık konformasyonlu oryantasyonlarda 6. oryantasyon en düşük MM/PBSA toplam enerjisiyle dikkat çekerken kapalı konformasyonlu oryantasyonların simülasyonlarının MM/PBSA toplam serbest enerjisinin en düşük -500 kJ/mol'e kadar düştüğü gözlemlendi.

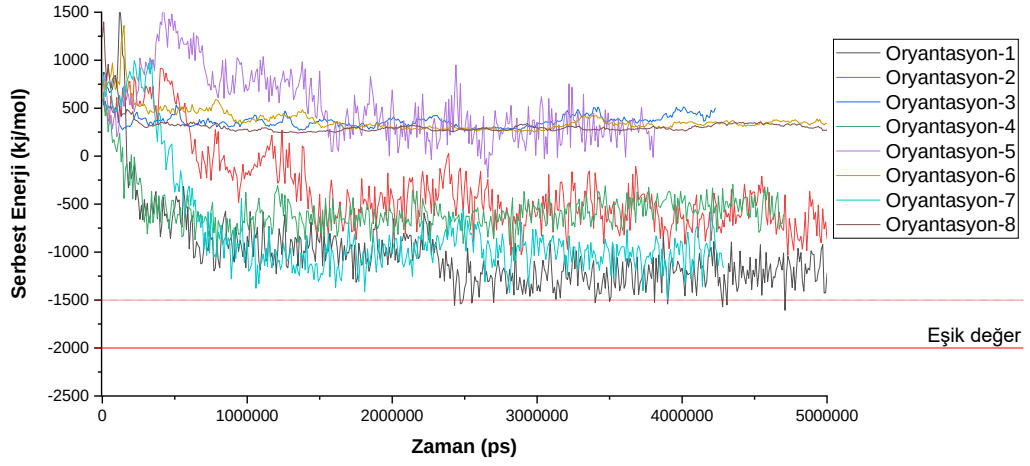
BİP-IRE1LD (NBDII β -kapalı) Kübik Oryantasyonlarının 5 μ s Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi



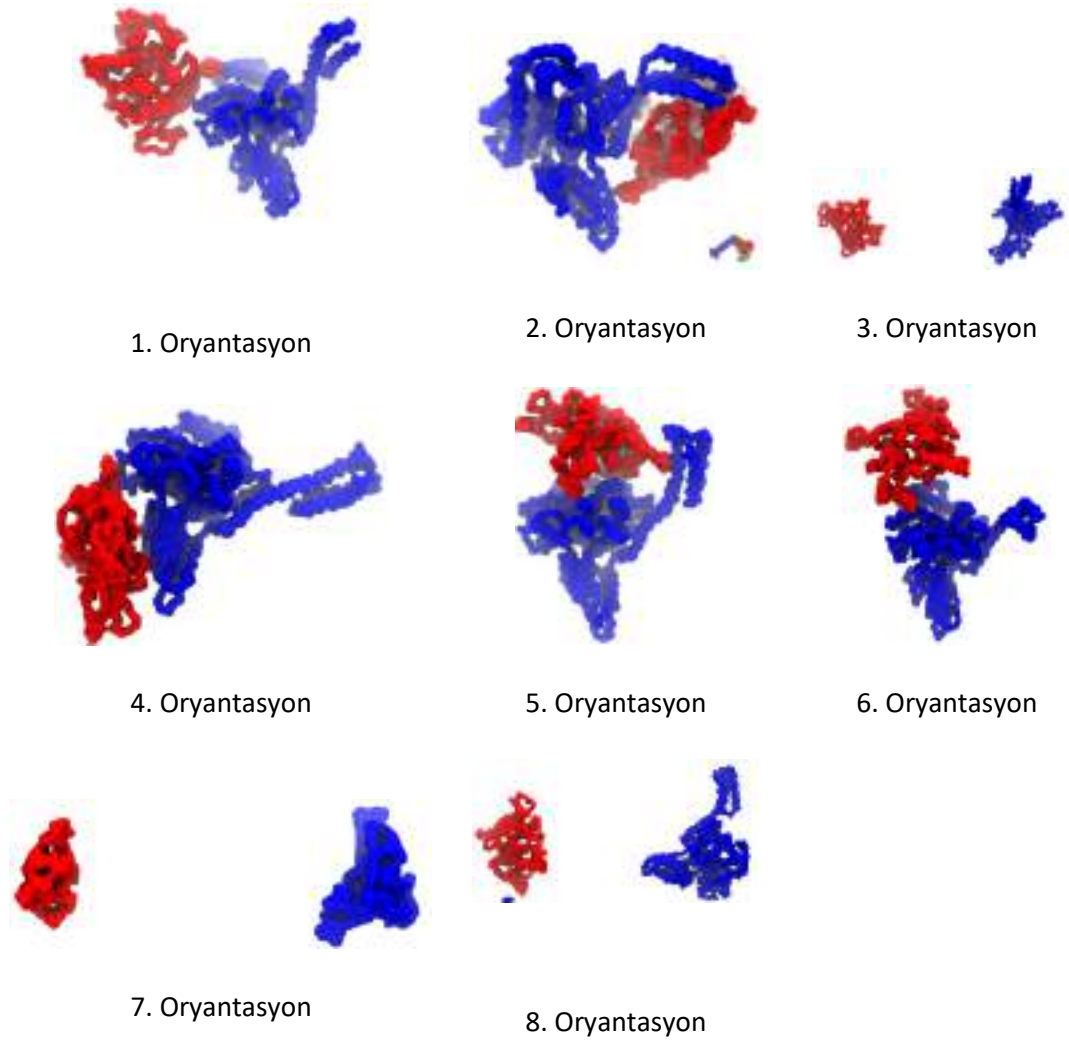
BİP-IRE1LD (NBDII β -kapalı) Kübik Oryantasyonlarının 5 μ s Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
2. Tekrar



BİP-IRE1LD (NBDII β -kapalı) Kübik Oryantasyonlarının 5 μ s Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
3. Tekrar



Grafik 22. BİP-IRE1LD NBDII β -kapalı kübik oryantasyonlarının 5 μ s boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimi



Şekil 46. BİP-IRE1LD (NBDII β -kapalı) kübik oryantasyonlarının 5 μ s CG-MD simülasyonu sonunda meydana getirdikleri bağlanma paternleri

NBDII β -kapalı kübik oryantasyonlarının CG-MD simülasyonları sonucunda 1. oryantasyonda bağlanma, dimerizasyon domainin NBDII β ile etkileşimi şeklinde gerçekleşirken, 2. oryantasyonda BİP-SBD α ile SBD β 'nin IRE1LD ile, 4. oryantasyonda ise IRE1LD geniş yüzeyinin SBD β ile etkileşime girdiği belirlendi. 5. oryantasyonda BİP NBD üst yüzeyi IRE1LD ile bağlanırken, 6. oryantasyonda NBDII β direk olarak IRE1LD 'in 4. bölgesi ile bağlanma paterni oluşturdu [Şekil 46]. 3., 7. ve 8. oryantasyonlarda herhangi bir bağlanma paterni meydana gelmedi.

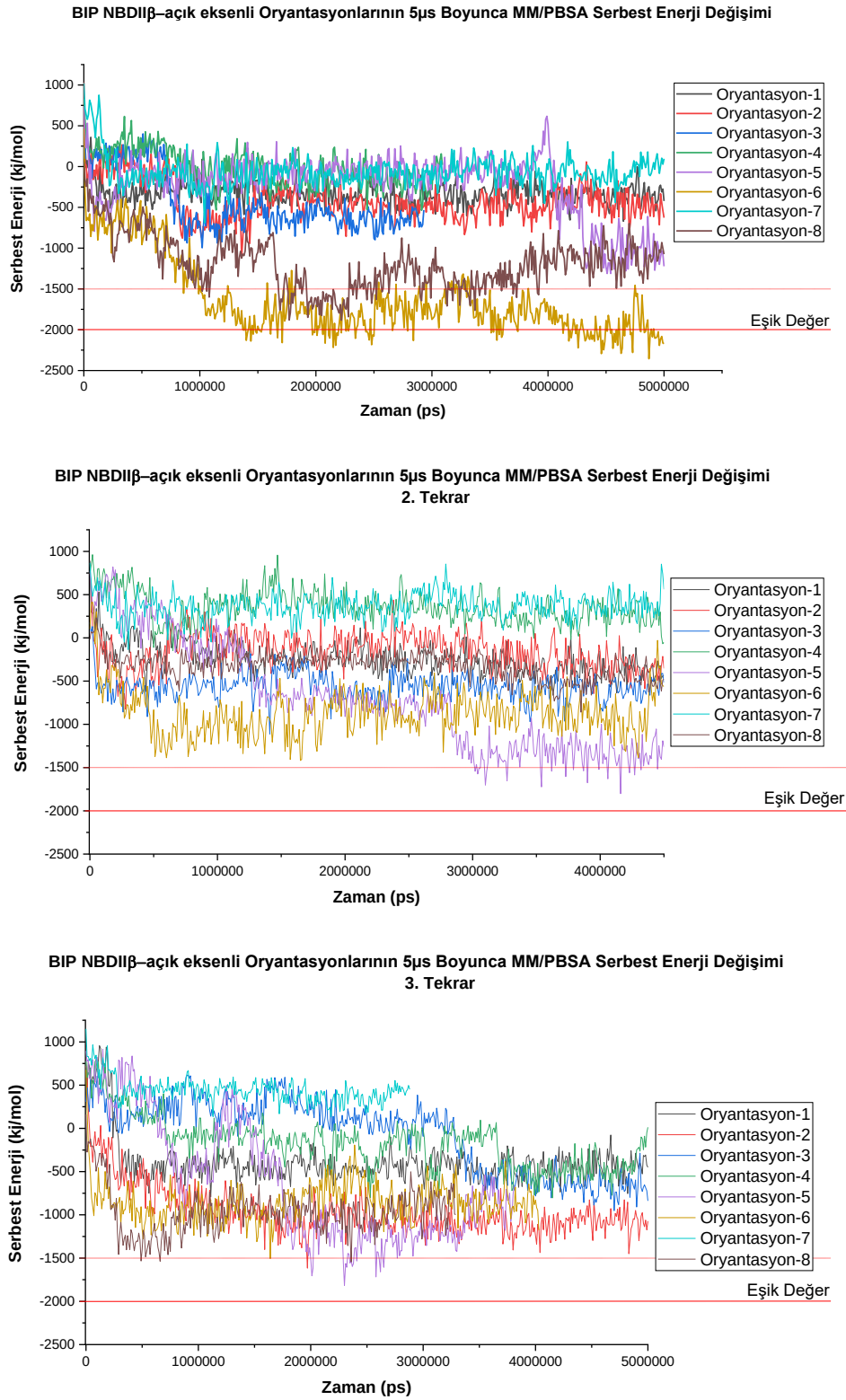
3.1.1.2.4. BİP/IRE1LD Açık ve Kapalı Oryantasyonlarının NBD-II β Ekseninde İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları

BİP/IRE1LD açık ve kapalı oryantasyonların kübik ekseninde iri taneli MD simülasyonları yapıldıktan sonra en iyi etkileşimin BİP-NBDII β açık konformasyonun 6. oryantasyonunda meydana geldiği ve bu sonucun 3.tekrarda da aynı olduğu görüldü. BİP-NBDII β alt domaininin açık ve kapalı konformasyonlarının bu bağlanmada etkili olup olmadığını araştırmak için IRE1LD'in 4 farklı yüzü ve 180° çevrilerek toplam 8 farklı oryantasyonu BİP-NBDII β 'nin açık ve kapalı konformasyonlarına dönük olacak şekilde konumlandırılıp 5 μ s'lik CG-MD simülasyonları gerçekleştirildi. Simülasyonların sonunda MM/PBSA Toplam Serbest Enerjileri incelendiğinde NBD-II β açık konformasyonunun olduğu grubun toplamda daha düşük serbest enerjiye sahip olduğu ve 8. oryantasyonun en fazla serbest enerji farkının NBD-II β açık ve kapalı konformasyonlar arasında olduğu belirlendi.

3.1.1.2.4.1. BİP/IRE1LD Açık Oryantasyonlarının NBD-II β Ekseninde İri Taneli Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları

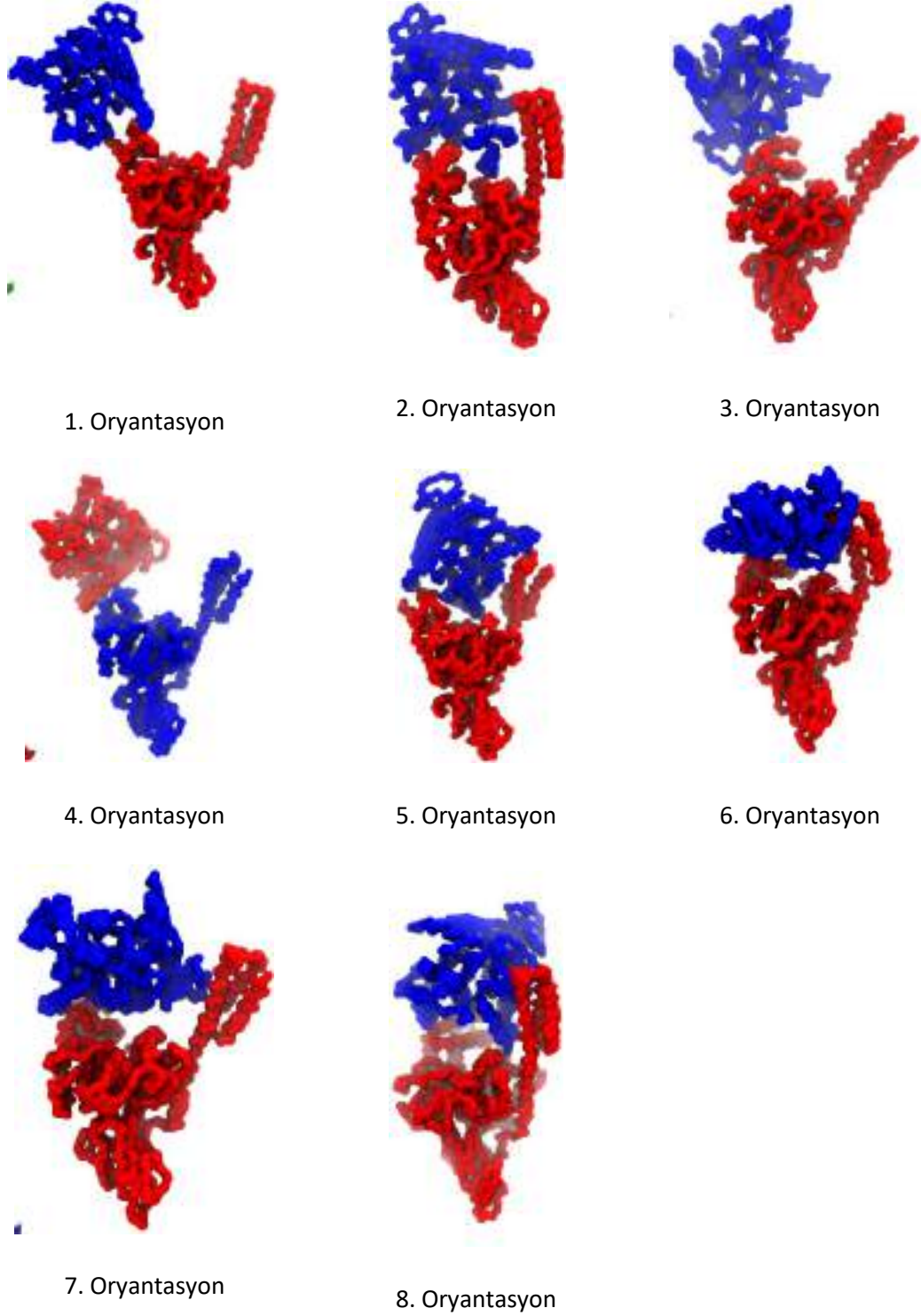
BİP/IRE1LD NBD-II β (açık) ekseninde oryantasyonlarının 5 μ s'lik CG-MD simülasyonu sonunda bağlanma paternleri Şekil 47'da görüldüğü gibi gerçekleşti. NBD-II β ile etkileşim bütün oryantasyonlarda meydana gelmesine karşın bağlanma sonunda en düşük MM/PBSA toplam serbest enerjisi 6. oryantasyonda gerçekleşti. -1,500 kJ/mol değerini aşan oryantasyonların 5., 6. ve 8. oryantasyonlar olduğu belirlendi. En düşük Toplam Serbest Enerjiye sahip olan 6. oryantasyonun bağlanma paterni incelendiğinde IRE1LD'in NBDII β ve SBD α ile doğrudan etkileşimde olduğu IRE1LD'in ise yatay konumda NBD ile bağlanma meydana getirdiği gözlemlendi. Şekil 48'de görüldüğü gibi 6. oryantasyonun MD simülasyonu sonunda IRE1LD'in BİP-SBD α ve BİP-NBDII β alt domainleri arasında kalarak yatay şekilde yerleştiği gözlemlendi. 8. oryantasyonun MD Simülasyonu sonundaki etkileşimi incelendiğinde ise tıpkı Şekil 44 ve 45'te gözlemlendiği gibi IRE1LD'in BİP-SBD α ve BİP-NBDII β alt domainleri arasında kalacak şekilde

ve IRE1LD yüksek esneklikteki 4. bölgesi BİP-NBDIIβ'ye kenetlenerek ve IRE1LD dimerizasyon domaini dışarıda kalacak şekilde bağlanma paterni olduğu gözlemlendi (Şekil 49).

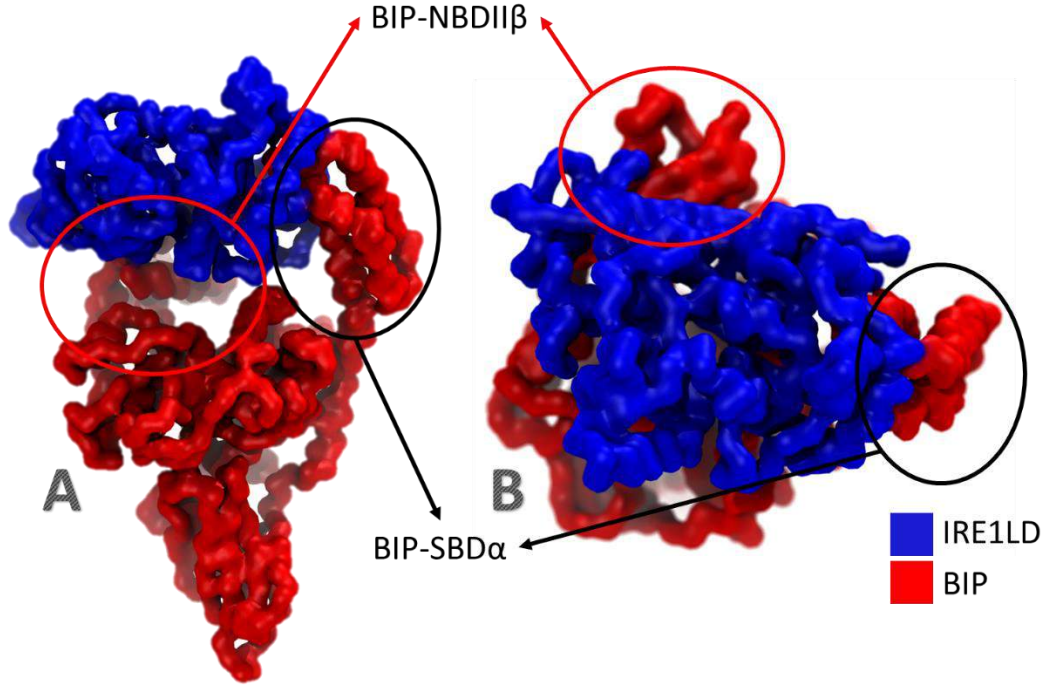


Grafik 23. BİP-IRE1LD oryantasyonlarının NBDIIβ-açık ekseninde 5µs boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi

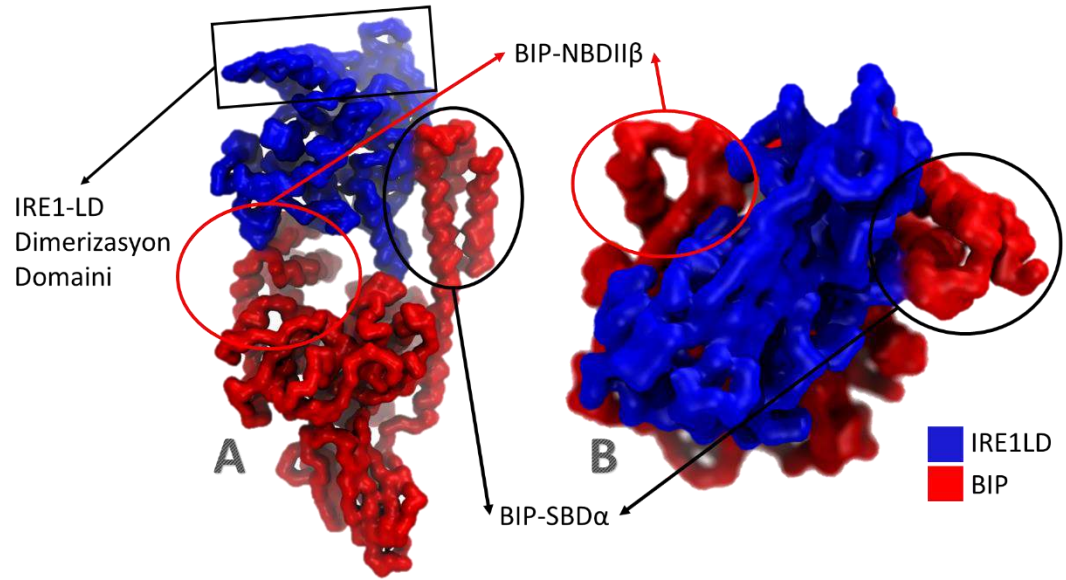
Grafik 23'teki BiP-IRE1LD oryantasyonlarının NBDII β -açık ekseninde 5 μ s boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimi incelendiğinde sadece 1. tekrardaki 6. oryantasyonun eşik değeri geçtiği gözlemlendi.



Şekil 47. BiP-IRE1LD oryantasyonlarının NBDII β -açık ekseninde 5 μ s'lik CG-MD simülasyonu sonunda meydana getirdikleri bağlanma paternleri



Şekil 48. NBDIIA-açık eksenli BİP-IRE1LD 6. oryantasyonunun bağlanma paterni



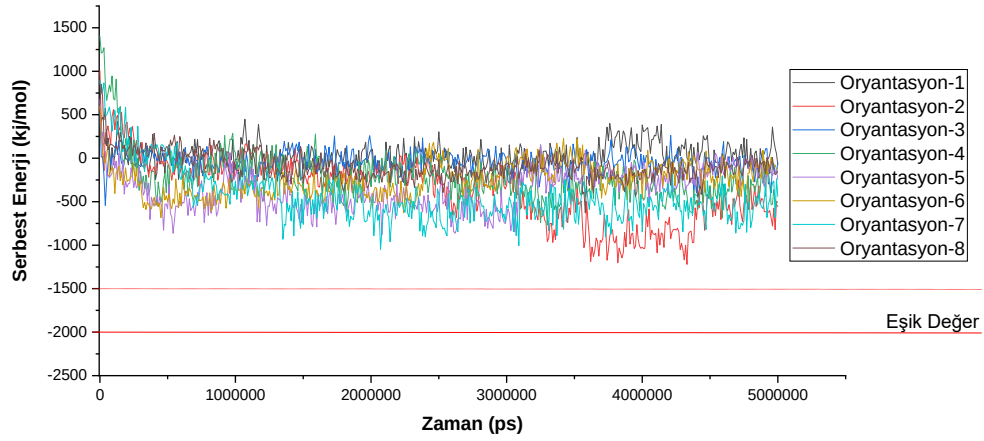
Şekil 49. NBDIIβ-açık eksenli BİP-IRE1LD 8. oryantasyonunun bağlanma paterni

3.1.1.2.4.2. BİP/IRE1LD Kapalı Oryantasyonlarının NBD-IIB Ekseninde İri Taneli

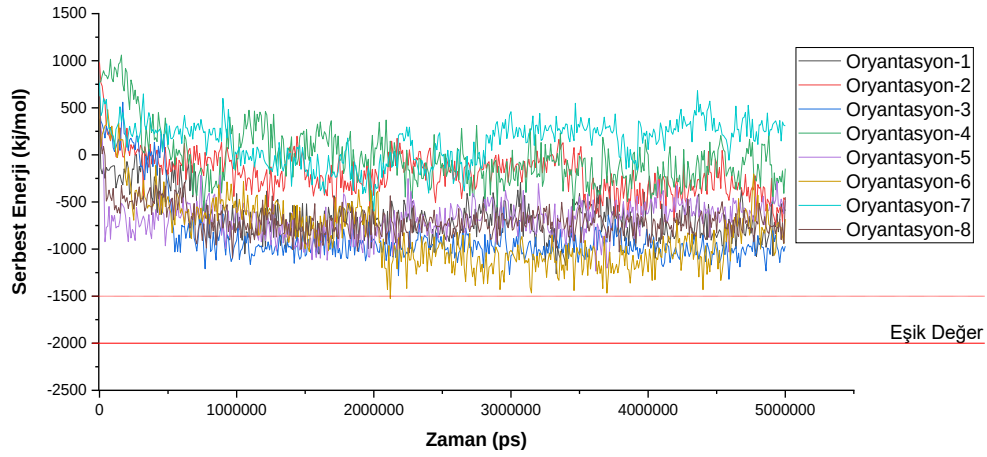
Simülasyonu ve MM/PBSA Serbest Enerji Hesaplamaları

BİP/IRE1LD NBD-IIβ (kapalı) ekseninde oryantasyonlarının 5μs'lik CG-MD simülasyonu sonunda bağlanma paternleri Şekil 50'de görüldüğü gibi gerçekleşti. İlk üç oryantasyondaki bağlanma paternleri, NBD-IIβ (açık) eksenindeki oryantasyonlar ile benzer paternler oluşturmaya karşın son beş oryantasyonda benzerlik görülmedi. NBD-IIβ kapalı konformasyonlu oryantasyonların MM/PBSA Toplam Serbest Enerji Değişimleri, BİP/IRE1LD NBD-IIβ (açık) eksen oryantasyonlarının Toplam Serbest Enerji Değişimleri ile kıyaslandığında kapalı formların daha düşük toplam serbest enerji değişimine sahip oldukları görüldü [Grafik 24,27]. Oryantasyonların NBD-IIB ekseninde tek tek kıyaslamalı Serbest Enerji değişimleri incelendiğinde sadece 1. ve 7. oryantasyonlarda açık formun kapalı forma göre daha düşük serbest enerji değerleri gözlendi [Grafik 28]. BİP-IRE1LD kübik eksenli oryantasyon simülasyonlarının enerji değişim ortalamaları toplamı açık ve kapalı form için değerlendirildiğinde açık formun toplam serbest enerji değişiminin kapalı forma göre çok fazla olduğu görüldü [Grafik 25]. BİP-IRE1LD kübik eksenli oryantasyonların enerji ortalamaları ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise özellikle 6. oryantasyonda açık ve kapalı form arasında çok yüksek enerji farkı gözlendi [Grafik 26].

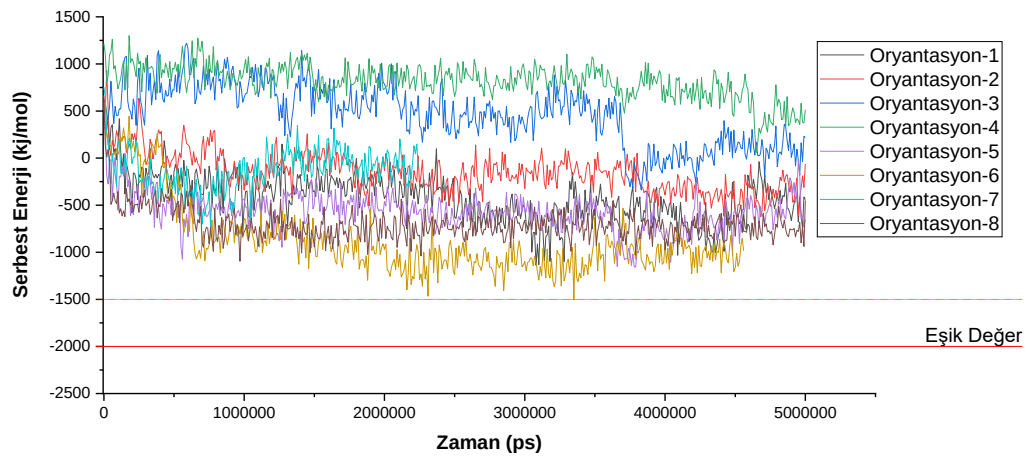
BIP NBDII β -kapalı eksenli Oryantasyonlarının 5 μ s Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi



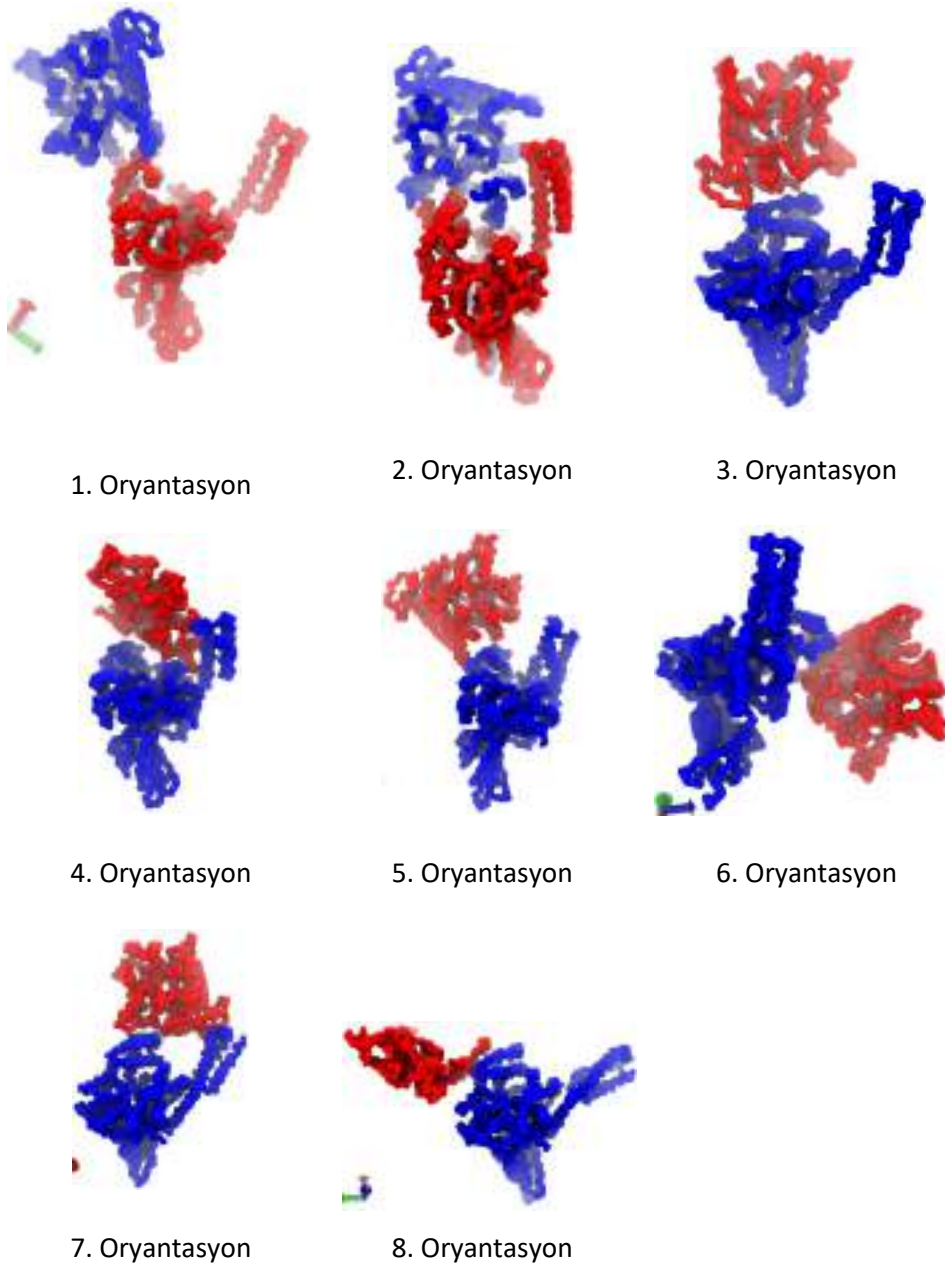
**BIP NBDII β -kapalı eksenli Oryantasyonlarının 5 μ s Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
2. Tekrar**



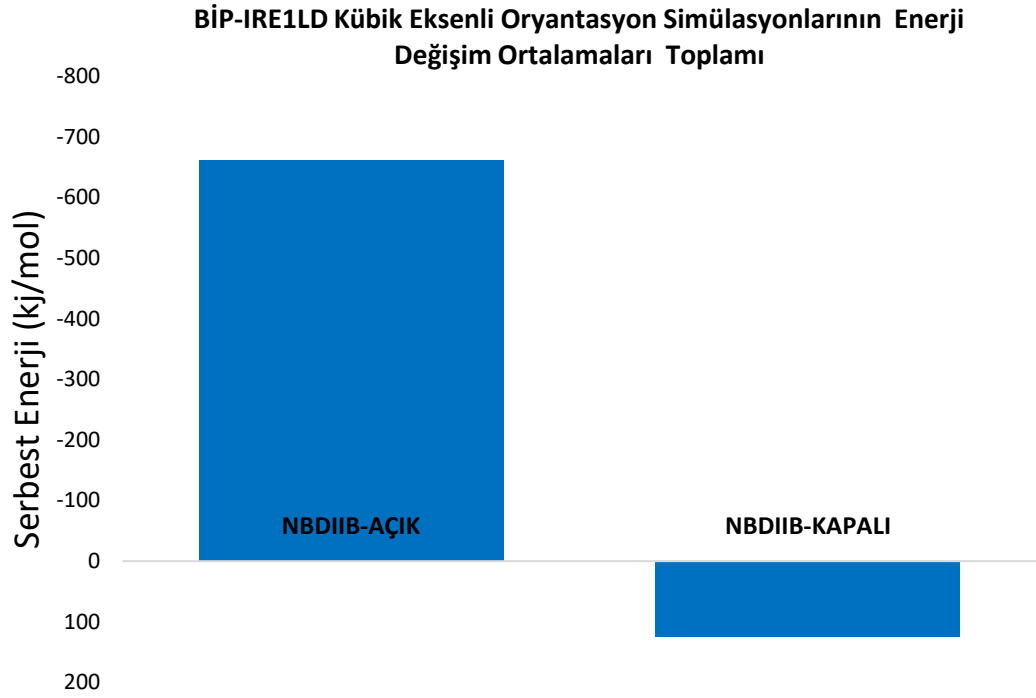
**BIP NBDII β -kapalı eksenli Oryantasyonlarının 5 μ s Boyunca MM/PBSA Serbest Enerji Değişimi
3. Tekrar**



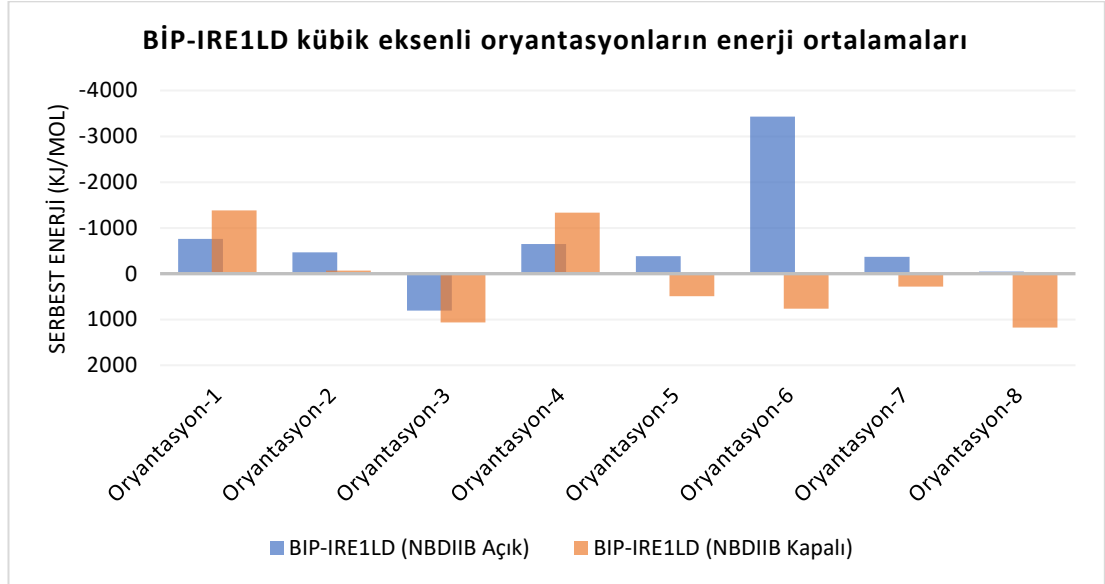
Grafik 24. BİP-IRE1LD oryantasyonlarının NBDII β -kapalı ekseninde 5 μ s boyunca MM/PBSA serbest enerji değişimi



Şekil 50. BiP-IRE1LD oryantasyonlarının NBD1b-kapalı ekseninde 5µs CG-MD simülasyonu sonunda meydana getirdikleri bağlanma paternleri

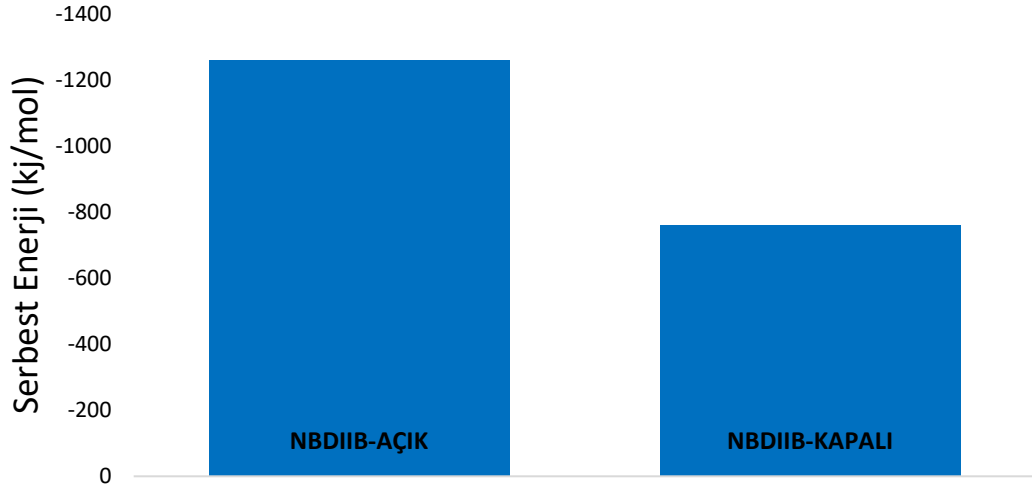


Grafik 25. BİP-IRE1LD kübik eksenli oryantasyon simülasyonlarının enerji değişim ortalamaları toplamı

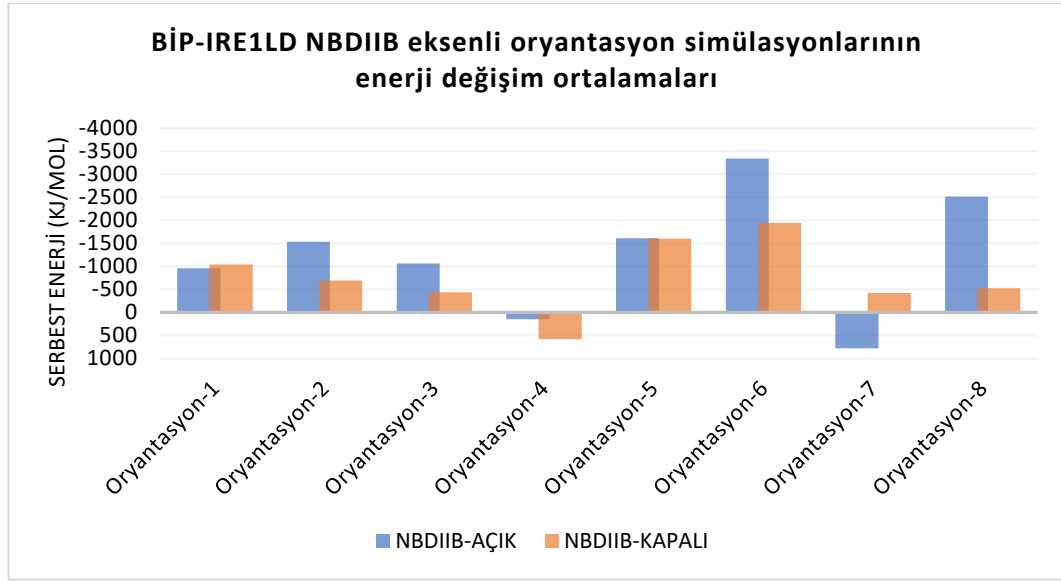


Grafik 26. BİP-IRE1LD kübik eksenli oryantasyonların enerji ortalamaları

**NBDIIB Eksenli Açık ve kapalı BİP-IRELD Oryantasyon
Simülasyonlarının Enerji Değişim Ortalamaları Toplamı**



Grafik 27. NBDIİβ eksenli açık ve kapalı BİP-IRELD oryantasyon simülasyonlarının enerji değişim ortalamaları toplamı



Grafik 28. BİP-IRE1LD NBDIİβ eksenli oryantasyon simülasyonlarının enerji değişim ortalamaları

3.1.2. Protein-Ligand Etkileşimleri

ER' da hatalı katlanan veya katlanmamış proteinlere karşı oluşturulan yanlış katlanmış protein (UPR) cevabında en önemli sinyal yolağı olan IRE1-JNK yolağı üzerinde kritik role sahip IRE1, ASK1 ve JNK1 proteinlerinin kardiyovasküler hastalıklarda etkin ilaçlar ile etkileşimi Moleküler Kenetleme ve Serbest Enerji hesaplama yaklaşımları ile araştırıldı. Moleküler Kenetleme yaklaşımlarında proteinlerin katalitik merkezleri ile ligandların etkileşimleri Autodock Vina, Autodock 4, IgemDOCK ve GOLD yazılımları kullanılarak hesaplandı. Bu çalışmada her bir kenetleme algoritması kendine özgü bir skor değerine sahip olduğu için skorların toplanması veya ortalamalarının alınması istatistiksel olarak mümkün görülmedi. Bunun yerine sıralamaya göre puan verilerek normalizasyon yapıldı. Molekülün sıralamadaki yeri puan olarak hesaplandı. Örneğin Autodock Vina'da JNK1 proteinine karşı en iyi skora sahip olan SCH772984 inhibitörü 1 puan alarak 1. sırada, en kötü skora sahip Captopril 58 puan alarak son sırada yer aldı. Tüm moleküller algoritma ve proteine göre yeniden puanlanarak hesaplamaları gerçekleştirildi. Proteinlerin doğal inhibitörlerinin pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada inhibitörler en iyi skoru alırken inhibitörleri Statin grubu ilaçlar takip etti. Serbest enerji hesaplamalarında etken maddeler ve Flavonoidler gruplandırıldığında her grup için en iyi skora sahip moleküller tercih edildi. MM/PBSA ve Umbrella Örnekleme yaklaşımlarının kullanıldığı Serbest Enerji hesaplamalarında da Statin grubu üyesi Atorvastatin'in IRE1'e karşı MM/PBSA yaklaşımında doğal inhibitöründen sonra en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip olduğu, ASK1 ve JNK1'e karşı ise Pitavastatin'in Umbrella Örnekleme yaklaşımında inhibitörden sonra en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip olduğu görüldü.

3.1.2.1. IRE1, ASK1 VE JNK1 Proteinleri ile Etkileşimlerinin Moleküler Kenetleme Hesaplamaları

Flavonoidler, Statinler, Antiaritmik ilaçlar, Ace İnhibitörleri ve Doğal inhibitörlerin IRE1-JNK sinyal yolağı üzerindeki önemli proteinleri olan IRE1, ASK1 ve JNK1 ile etkileşimleri Autodock Vina, Autodock 4, IgemDOCK ve GOLD algoritmaları kullanılarak hesaplandı. Flavonoid grubu ile proteinlerin etkileşimleri incelendiğinde Autodock Vina'ya göre genellikle moleküllerin benzer skorlara sahip olduğu görülürken Quercetin, Catechin ve Epicatechin'in kısmen daha düşük değerler aldığı görüldü. Autodock 4'e göre moleküllerin IRE1 ile etkileşimde diğer proteinlere göre belirgin derecede düşük değerler aldığı gözlenirken, ASK1 ve JNK1 ile etkileşim değerlerinin ise birbirine çok yakın olduğu görüldü. IGEMDOCK'a göre yine Autodock 4'te de görüldüğü gibi IRE1 ile etkileşim sonucu elde edilen skorların diğer

proteinlere göre kısmen düşük olduğu gözlemlendi. Chrysin ile IRE1 ve ASK1 etkileşimleri programın hata vermesi nedeniyle hesaplanamadı. GOLD-CHEMPLP algoritmasına göre ise IGEMDOCK ve Autodock 4'ten farklı olarak JNK1'in belirgin düzeyde diğer proteinlerden daha düşük skora sahip olduğu gözlemlendi. Normalize sonuçlara göre tüm algoritmalar değerlendirildiğinde IRE1 ile etkileşimde Norizalpin'in en düşük değerle en iyi skora sahip olurken, ASK1'de Chrysin, JNK1'de ise Luteolin en iyi skorlara sahip moleküller olarak öne çıktı [Tablo 8]. Tüm algoritma ve proteinlerin genel ortalamasına bakıldığında ise Flavonoid grubu içinde Luteolin'in en iyi normalize skora sahip molekül olduğu belirlendi.

Tablo 8. Flavonoidler

	Autodock Vina			AUTODOCK-4			IGEMDOCK			GOLD-CHEMPLP- SCORE		
Ligandlar	IRE			ASK								
	IRE1	ASK1	JNK1	1	1	JNK 1	IRE-1	ASK-1	JNK-1	IRE1	ASK1	JNK1
Norizalpinin_mmff94_E=63.68	-8.6	-8.4	-9.0	-7.8	-7.4	-6.7	-92.4	-91.5	-90.7	55.0	59.5	46.4
Chrysin_mmff94_E=160.19	-8.5	-8.5	-9.0	-7.7	-6.9	-7.6			-82.2	54.2	56.5	50.9
Hesperetin_mmff94_E=54.15	-8.3	-8.5	-9.2	-7.2	-7.4	-7.4	-89.7	-107.9	-97.6	61.7	60.6	56.2
Daidzein_mmff94_E=42.94	-8.2	-8.9	-8.4	-6.4	-7.9	-7.5	-82.4	-90.6	-83.8	55.7	63.5	48.4
Genistein_mmff94_E=35.83	-8.2	-8.8	-8.9	-6.8	-7.6	-7.4	-85.1	-92.9	-87.8	52.8	63.6	48.1
Luteolin_mmff94_E=18.18	-8.2	-8.6	-9.3	-6.9	-7.6	-7.6	-90.9	-99.2	-93.8	62.2	61.5	61.1
Taxifolin_mmff94_E=63.87	-8.1	-8.4	-8.7	-6.5	-7.2	-7.1	-91.8	-98.6	-98.3	61.7	64.4	52.8
Apigenin_mmff94_E=20.75	-8.0	-8.4	-9.1	-6.5	-7.3	-7.4	-86.4	-91.0	-91.9	57.5	61.8	59.6
Kaempferol_mmff94_E=52.57	-8.0	-8.5	-9.0	-6.4	-7.3	-6.9	-90.1	-95.5	-96.7	59.3	61.0	54.6
Naringenin_mmff94_E=35.49	-8.0	-8.4	-9.0	-7.0	-7.4	-7.4	-87.4	-91.8	-92.5	58.3	62.2	53.6
Quercetin_mmff94_E=54.39	-7.9	-8.2	-8.9	-6.5	-7.4	-7.2	-97.2	-98.1	-100.3	63.0	64.0	53.5
Catechin_mmff94_E=51.98	-7.7	-7.7	-8.9	-6.3	-6.9	-7.0	-89.0	-100.5	-92.4	60.3	64.1	52.5
Epicatechin_mmff94_E=51.91	-7.6	-8.0	-8.6	-6.6	-7.4	-7.5	-91.5	-103.3	-95.9	62.9	61.4	55.8

Tablo 9. Statinler

Ligandlar	Autodock Vina			AUTODOCK-4			IGEMDOCK			GOLD-CHEMPLP-SCORE		
	IRE1	ASK1	JNK1	IRE 1	ASK 1	JNK 1	IRE-1	ASK-1	JNK-1	IRE1	ASK1	JNK1
Atorvastatin_mmff94_E=36.48	-7.8	-7.5	-9.5	-6.9	-8.8	-8.7	-130.1	-152.6	-147.6	89.6	95.1	67.1
Cerivastatin_mmff94_E=38.32	-7.3	-7.8	-8.1	-5.1	-6.1	-6.6	-117.1	-125.5	-126.7	65.5	81.8	71.0
Fluvastatin_mmff94_E=20.56	-7.8	-8.1	-9.2	-6.1	-7.3	-8.1	-105.5	-122.4	-119.3	75.1	82.3	74.6
Lovastatin_mmff94_E=18.92	-7.8	-8.3	-8.9	-8.1	-8.8	-9.4	-95.7	-98.2	-107.0	58.2	63.1	44.5
Pitavastatin_mmff94_E=60.38	-7.6	-9.2	-9.8	-6.9	-8.1	-8.3	-114.8	-127.0	-117.7	70.4	84.4	70.3
Pravastatin_mmff94_E=-9.58	-7.6	-7.9	-8.0	-6.0	-7.3	-7.2	-113.4	-118.5	-120.9	74.9	64.0	51.1
Rosuvastatin_mmff94_E=-108.08	-7.7	-8.4	-8.9	-6.3	-7.7	-6.2	-118.4	-105.5	-123.1	73.0	71.3	58.0
Simvastatin_mmff94_E=28.56	-8.3	-8.7	-8.6	-8.1	-8.9	-9.5	-99.6	-113.4	-108.0	60.5	63.0	52.1

Statin grubu moleküllerin tüm algoritmaların protein-ligand etkileşimleri incelendiğinde Autodock Vina'da JNK1 ile kenetlenme skorlarının diğer proteinlere göre belirgin düzeyde iyi olduğu görülürken, ASK1 ikinci, IRE1 ise üçüncü sırada yer aldı. Kenetlemede, Simvastatin'in IRE1 ile Pitavastatinin ise ASK1 ve JNK1 ile en iyi skora sahip moleküller olduğu hesaplandı. Autodock 4 ile yapılan hesaplamalarda IRE1 ile olan etkileşimler en kötü skoru alırken, ASK1 ve JNK1'in molekül etkileşimleri genellikle benzer skorlara sahip olduğu belirlendi. Molekül düzeyde bakıldığında Simvastatin ve Lovastatinin IRE1 ile etkileşimde -8.1 ile en iyi skora sahip moleküller olduğu görülürken, Simvastatin ASK1 ile etkileşimde -8.9, JNK1 ile etkileşimde ise -9.5 puan ile en iyi skora sahip molekül olarak değerlendirildi. IGEMDOCK ile yapılan hesaplamalarda IRE1 ile etkileşimlerde genellikle en kötü skorlar ölçülürken ASK1 ve JNK1 ile olan etkileşimlerde genellikle benzer sonuçlar elde edildi. IRE1'de -130.1, ASK1'de -152.6 ve JNK1'de -147.6 puan alan Atorvastatin en iyi skora sahip molekül olarak öne çıktı. GOLD-CHEMPLP algoritması ile yapılan çalışmada JNK1 ile olan etkileşimler en kötü skorlara sahipken, Pravastatin, Rosuvastatin ve Simvastatin dışındaki tüm moleküllerin ASK1 ile etkileşimlerinde en iyi skorlar elde edildi. Atorvastatin, IRE1 ve ASK1 ile kenetlenmede 89.6 ve 95.1 puan ile en iyi skoru alırken, JNK1 ile etkileşimde Fluvastatin'in 74.6 puan ile en iyi skora sahip molekül olduğu hesaplandı [Tablo 9].

Tablo 10. Antiaritmik ilaçlar

	Autodock Vina			AUTODOCK-4			IGEMDOCK			GOLD-CHEMPLP-SCORE		
Ligandlar	IRE1	ASK1	JNK1	IRE 1	ASK 1	JNK 1	IRE-1	ASK-1	JNK-1	IRE1	ASK1	JNK1
Amiodarone_mmff94_E=93.37	-8.6	-7.3	-8.6	-8.6	-7.5	-8.5	-108.8	-100.9	-114.5	78.4	78.2	64.2
Diltiazem_mmff94_E=101.92	-7.8	-6.0	-5.5	-7.2	-6.9	-7.0	-105.7	-93.1	-110.5	70.4	42.9	49.7
Flecainide_mmff94_E=100.66	-7.8	-8.3	-8.8	-6.2	-6.2	-6.2	-110.1	-103.9	-107.1	62.9	71.3	65.3
Lidocaine_mmff94_E=63.68	-6.9	-6.6	-6.6	-5.0	-5.2	-5.6	-77.3	-83.8	-75.5	54.9	52.8	38.6
Metoprolol_mmff94_E=77.27	-7.7	-7.2	-7.7	-7.1	-5.6	-6.0	-90.7	-85.1	-83.6	64.6	63.3	56.0
Procainamide_mmff94_E=20.13	-6.9	-6.2	-6.7	-5.3	-4.9	-5.2	-76.3	-80.9	-77.2	51.0	53.0	43.3
Propafenone_mmff94_E=97.08	-8.1	-7.5	-8.1	-7.5	-5.8	-6.4	-115.5	-102.1	-98.8	85.0	78.7	59.6
Propranolol_mmff94_E=77.27	-7.7	-7.2	-7.6	-6.8	-5.8	-5.4	-91.3	-87.2	-89.3	63.9	64.5	53.5
Quinidine_mmff94_E=115.28	-8.6	-8.1	-8.4	-7.1	-6.9	-7.8	-93.0	-93.7	-96.2	66.6	59.3	61.1
Sotalol_mmff94_E=-7.66	-6.5	-6.5	-6.5	-6.5	-5.8	-5.7	-82.8	-89.8	-81.8	48.1	53.1	43.5
Verapamil_mmff94_E=136.49	-7.0	-7.0	-7.8	-6.4	-6.7	-6.8	-94.5	-104.6	-121.6	73.9	59.6	76.5

Antiaritmik ilaçların ASK1, JNK1 ve IRE1 ile etkileşimleri her bir algoritma için ayrı ayrı incelendiğinde Autodock Vina'da protein bazında genellikle benzer sonuçların alındığı gözlemlendi. IRE1 ile etkileşimde Quinidine ve Amiodarone -8.6 ile en iyi skora sahip olurken, ASK1 ve JNK1 ile etkileşimde Flecainide -8.3 ve -8.8 ile en iyi skora sahip moleküller olarak hesaplandı. Autodock 4 ile yapılan çalışmada Amiodarone, IRE1'de -8.6, ASK1'de -7.3, JNK1'de ise -8.6 puan ile en iyi skora sahip olması nedeniyle diğer moleküllerden belirgin şekilde ayrıldı. IGEMDOCK ile yapılan çalışmada Propafenone IRE1 etkileşiminde -115.5 puanı hesaplanarak en iyi skor elde edildi. ASK1 ve JNK1 ile etkileşimde Verapamil sırayla -104.6 ve -121.6 ile en iyi skora sahip molekül olarak hesaplandı. GOLD-CHEMPLP ile hesaplamada JNK1 ile etkileşim de genel olarak en düşük skorlar elde edilmesine karşın Verapamil-JNK1 etkileşiminde 76.5 puan ile diğer proteinlere göre en iyi skor olduğu belirlendi. Propafenone, IRE1 ile etkileşimde 85 puan ile diğer moleküllere göre belirgin düzeyde iyi skora sahipken ASK1 ile etkileşimde 78.7 puan ile en yüksek skoru elde etti [Tablo 10].

Tablo 11. Ace İnhibitörleri

Ligandlar	Autodock Vina			AUTODOCK-4			IGEMDOCK			GOLD-CHEMPLP-SCORE		
	IRE1	ASK1	JNK1	IRE 1	ASK 1	JNK 1	IRE-1	ASK-1	JNK-1	IRE1	ASK1	JNK1
Benazepril_mmff94_E=114.03	-8.6	-7.9	-9.0	-6.3	-6.4	-7.9	-113.7	-107.4	-114.8	82.1	75.4	57.5
Captopril_mmff94_E=2.65	-6.0	-5.3	-5.4	-5.1	-4.9	-5.6	-69.8	-78.0	-63.8	43.4	44.4	36.9
Cilazapril_mmff94_E=143.51	-9.0	-7.7	-8.8	-6.3	-6.1	-6.5	-106.5	-99.5	-101.6	75.9	63.0	53.4
Enalapril_mmff94_E=94.54	-7.5	-7.4	-8.1	-5.3	-5.4	-6.7	-102.2	-96.9	-104.1	66.9	63.3	58.1
Fosinopril_mmff94_E=268.51	-8.5	-7.8	-8.8	-6.5	-7.8	-8.8	-112.5	-119.0	-118.8	82.7	89.8	79.8
İmidapril_mmff94_E=12.11	-7.7	-7.7	-8.2	-5.8	-5.4	-6.5	-111.6	-92.2	-116.2	75.7	66.7	56.4
Lisinopril_mmff94_E=76.39	-7.9	-7.4	-7.9	-6.4	-4.6	-6.1	-125.4	-120.9	-112.7	72.6	72.8	54.1
Perindopril_mmff94_E=87.70	-7.9	-6.5	-7.2	-7.0	-5.2	-6.2	-103.9	-104.0	-97.4	71.0	57.6	45.8
Quinapril_mmff94_E=112.60	-9.1	-8.2	-9.7	-6.9	-6.7	-7.7	-118.3	-109.5	-108.5	79.1	68.1	62.6
Ramipril_mmff94_E=110.58	-8.7	-8.1	-8.1	-7.1	-5.6	-7.2	-114.2	-105.2	-112.8	75.6	74.5	56.3
Trandolapril_mmff94_E=111.63	-8.9	-8.1	-8.1	-7.0	-6.2	-7.5	-116.0	-105.8	-107.4	81.8	69.2	64.4
Zofenopril_mmff94_E=56.20	-9.0	-7.9	-8.4	-8.4	-7.2	-8.0	-116.3	-113.8	-108.3	77.2	91.7	58.4

Ace İnhibitörlerinin ASK1, JNK1 ve IRE1 ile kenetlenmesi ve skortlaması için kullanılan algoritmalar teker teker incelendiğinde, Autodock Vina ile yapılan hesaplamada Quinapril-IRE1 kenetlenmesi ile -9.1, Quinapril-ASK1 kenetlenmesi ile -8.2, Quinapril-JNK1 kenetlenmesi ile ise -9.7 skorları en iyi skorlar olarak değerlendirildi. Autodock 4 ile yapılan protein ligand kenetleme hesaplamalarında genel olarak kötü skorlar alınmakla beraber Zofenopril IRE1 ile etkileşiminde -8.4 puan ile en iyi skora sahip oldu. ASK1 ile etkileşimde Fosinopril -7.8 ile en iyi skora sahipken yine Fosinopril JNK1 ile etkileşiminde -8.8 değeriyle en iyi skora sahip molekül olarak belirlendi. IGEMDOCK ile yapılan hesaplamalarda her molekül için protein başına benzer skorlar alındı. Lisinopril'in IRE1 ile etkileşimi sonucu -125.4, ASK1 ile etkileşimi sonucu ise -120.9 puanı ile en yüksek skorlar elde edildi. JNK1 ile kenetlenme etkileşimlerinde -118.8 puanı ile Fosinopril en yüksek skora sahip molekül olduğu gözlemlendi. GOLD-CHEMPLP skoru kullanılan çalışmada IRE1 etkileşimlerinin genel olarak belirgin düzeyde daha iyi olduğu belirlendi. Buna karşın JNK1 ile etkileşimlerin tamamında en kötü skorlar elde edildi. Fosinopril, IRE1 ve JNK1 ile sırayla 82.7 ve 79.8 puanı ile etkileşimde en iyi skorlara sahip olurken, ASK1 etkileşiminde Zofenopril'in 91.7 puan ile en yüksek skora sahip molekül olduğu belirlendi. Captopril ise tüm proteinlerde ve her bir algoritmada ayrı ayrı en kötü skorlara sahip molekül olarak dikkat çekti [Tablo 11].

Tablo 12. Doğal İnhibitörler

Ligandlar	Autodock Vina			AUTODOCK-4			IGEMDOCK			GOLD-CHEMPLP-SCORE		
	IRE1	ASK1	JNK1	IRE 1	ASK 1	JNK 1	IRE-1	ASK-1	JNK-1	IRE1	ASK1	JNK1
ASK1_inhibitor_MSC_2032964A_mmff94_E=32.53	-8.8	-8.8	-9.1	-8.1	-6.6		-135.7	-125.3	-104.1	65.3	72.5	48.8
ASK1_inhibitor_NQDI_1_mmff94_E=45.12	-7.9	-9.1	-9.6	-7.3	-7.9	-8.5	111.4	-94.7	-98.9	51.9	65.3	57.8
ASK1_inhibitor_Staurosporine-1.pdb							121.7	-131.5	-127.1	41.0	84.6	56.2
IRE1_inhibitor_4u8C_mmff94_E=52.12	-6.1	-6.3	-7.5	-6.3	-6.3	-6.3	128.5	-108.9	-78.5	41.7	47.9	36.6
IRE1_inhibitor_GSK2850163_mmff94_E=-22.12	-8.0	-8.5	-9.2	-10.8	-8.5	-9.1	-84.1	-75.5	-109.7	69.0	69.1	60.4
IRE1_inhibitor_STF-083010_mmff94_E=35.96	-7.5	-7.9	-9.1	-7.9	-7.9	-8.4	134.0	-109.7	-88.0	53.7	61.0	57.8
JNK1_inhibitor_JNK_Inhibitor_V_mmff94_E=-36.70	-8.5	-9.7	10.1	-9.7	-8.5	-9.0	134.0	-108.8	-114.2	73.8	76.4	75.3
JNK1_inhibitor_SCH772984_mmff94_E=130.53	10.4	-9.3	11.1	-11.8	-10.4	-10.2	130.1	-144.6	-150.2	82.2	94.2	90.2
JNK1_inhibitor_SP600125_mmff94_E=76.04	-6.8	-7.7	-9.3	-6.5	-6.8	-7.4	-86.8	-75.4	-80.6	50.0	57.9	39.6

Skorların validasyonunda protein inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmada genelde ortalama olarak en iyi skorlar elde edildi. Algoritmalar ayrı ayrı incelendiğinde Autodock Vina ile yapılan çalışmada SCH772984 IRE1 ve JNK1 ile etkileşimde sırayla -10.4 ve -11.1 değerleriyle en iyi skorlara sahipken, ASK1 ile etkileşimde JNK inhibitör V'in en iyi skora sahip molekül olduğu hesaplandı. IRE1 inhibitörü 4u8C ise tüm proteinlerde en kötü skoru elde etti. Autodock 4 ile yapılan hesaplamalarda her molekül için protein başına benzer skorlar elde edildi. SCH772984, IRE1, ASK1 ve JNK1 ile olan etkileşimlerinde sırayla -11.8, -10.4 ve -10.2 puanı ile üç proteinde de en iyi skorlara sahip molekül olarak hesaplandı. IRE1 inhibitörü 4u8C her üç proteinde de -6.3 puanı ile en kötü skora sahip molekül olarak gözlendi. IGEMDOCK ile yapılan kenetleme hesaplamaları incelendiğinde ASK1 inhibitorü MSC-2032964A, IRE1 ile kenetlendiğinde en iyi skor olan -135.7 puanı ölçüldü. ASK1 ve JNK1 ile olan etkileşimlerde SCH772984 için sırayla -144.6 ve -150.2 puanları en iyi skorlar olarak ölçüldü. SP600125, her üç proteinde de en düşük skorlara sahip molekül olarak hesaplandı. GOLD-CHEMPLP algoritması ile yapılan hesaplamalarda SCH772984 molekülü IRE1, ASK1 ve JNK1'de sırayla 82.2, 94.2 ve 90.2 puanları ile üç proteinde de en yüksek skorlara sahip molekül olduğu gözlendi. Buna karşın 4u8C molekülü ise her üç proteinde de en düşük skorlara sahip molekül olarak hesaplandı [Tablo 12].

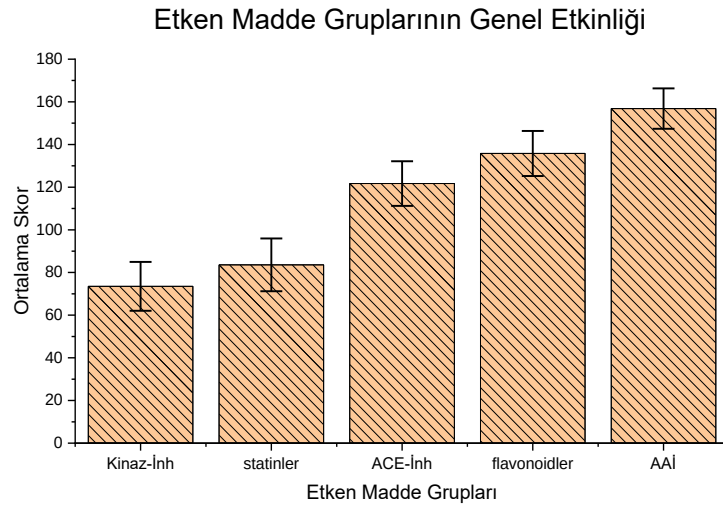
Tablo 13. Moleküler Kenetleme Algoritma Skorlarının Normalize Tablosu (düşük değer daha iyi)

	GOLD-CHEMPLP-																
	Autodock Vina			AUTODOCK-4				IGEMDOCK		SCORE			TOPLAM SKOR				
				ASK	JNK	IRE-											
Ligandlar	IRE1	ASK1	JNK1	IRE 1	1	1	1	ASK-1	JNK-1	IRE1	ASK1	JNK1	IRE1	ASK1	JNK1	ORT	
JNK1_inhibitor_SCH772984	3	3	1	5	1	2	6	2	1	4	2	1	18	8	5	10	
ASK1_inhibitor_Staurosporine-1								7	6	51	7	32	51	14	38	34	
JNK1_inhibitor_JNK_inhibitor_V	5	1	6	10	9	8	29	21	18	13	15	5	57	46	37	47	
IRE1_inhibitor_GSK2850163	6	16	14	4	10	7	19	58	23	26	24	21	55	108	65	76	
ASK1_inhibitor_NQDI_1	24	5	9	9	14	14	38	42	34	54	27	27	125	88	84	99	
IRE1_inhibitor_STF-083010	7	31	18	6	13	15	50	18	49	30	44	28	93	106	110	103	
ASK1_inhibitor_MSC_2032964A	19	7	16	43	39	58	20	10	31	42	20	48	124	76	153	118	
JNK1_inhibitor_SP600125	33	39	12	30	36	30	56	59	55	55	51	56	174	185	153	171	
IRE1_inhibitor_4u8c	52	54	51	50	41	46	57	20	56	57	57	60	216	172	213	200	
Atorvastatin	38	43	10	28	5	12	4	1	3	3	1	10	73	50	35	53	
Pitavastatin	47	4	7	29	11	16	13	8	14	24	8	8	113	31	45	63	
Fluvastatin	39	29	15	49	26	17	25	11	12	17	9	6	130	75	50	85	
Simvastatin	22	9	34	11	3	4	30	16	26	39	39	44	102	67	108	92	
Rosuvastatin	44	21	26	47	17	47	7	25	9	20	22	26	118	85	108	104	
Lovastatin	37	22	27	12	6	6	33	38	29	44	37	53	126	103	115	115	
Cerivastatin	51	37	43	56	45	42	9	9	7	29	10	7	145	101	99	115	
Pravastatin	49	34	46	51	29	34	16	14	11	18	31	45	134	108	136	126	
Fosinopril	20	36	31	34	16	11	17	13	13	7	5	3	78	70	58	69	
Zofenopril	9	32	39	8	30	18	10	15	25	12	4	24	39	81	106	75	
Quinapril	8	24	8	27	38	21	8	19	24	10	25	15	53	106	68	76	
Trandolapril	11	26	41	24	42	25	11	24	27	9	23	12	55	115	105	92	
Benazepril	16	33	23	44	40	19	15	23	16	8	16	29	83	112	87	94	
Ramipril	13	27	42	22	50	32	14	26	19	16	18	31	65	121	124	103	
Lisinopril	36	44	47	40	58	50	5	12	20	21	19	37	102	133	154	130	
Cilazapril	10	38	32	46	44	43	23	34	32	14	38	41	93	154	148	132	
İmidapril	43	41	40	52	52	44	18	46	15	15	26	30	128	165	129	141	
Enalapril	50	45	45	53	51	40	28	40	30	27	36	25	158	172	140	157	
Perindopril	35	52	52	25	53	49	26	28	39	22	52	52	108	185	192	162	
Captopril	58	58	58	57	57	53	59	57	59	60	59	59	234	231	229	231	
Luteolin	25	11	11	26	18	22	42	35	43	36	42	18	129	106	94	110	
Hesperetin	23	14	13	17	25	31	45	22	38	38	47	33	123	108	115	115	

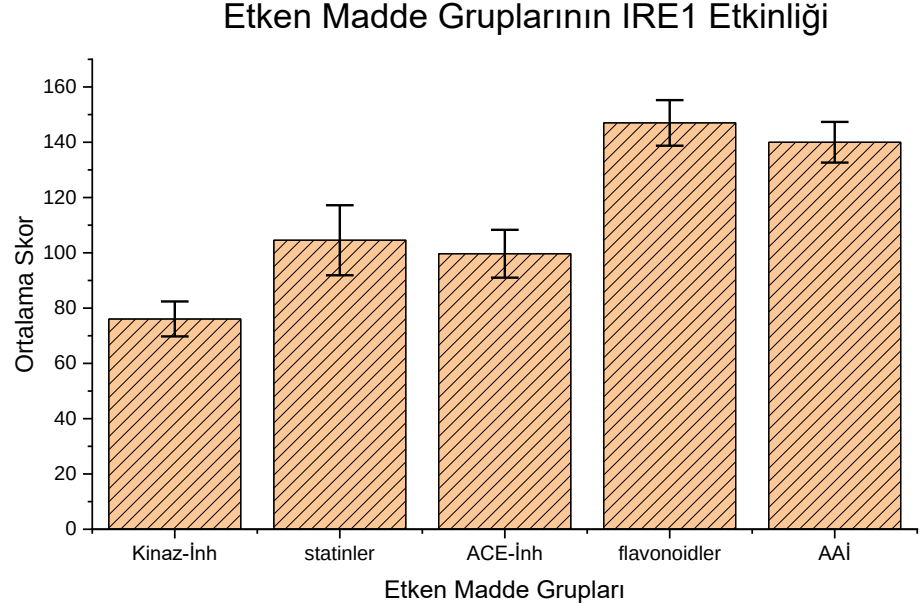
Quercetin	34	25	28	35	22	33	32	39	33	33	32	39	134	118	133	128
Taxifolin	28	18	33	38	31	35	39	37	36	37	29	42	142	115	146	134
Naringenin	30	19	22	23	23	28	48	47	44	43	40	38	144	129	132	135
Apigenin	31	20	17	37	27	29	49	49	46	45	41	23	162	137	115	138
Norizalpinin	18	17	21	14	24	41	37	48	47	47	49	51	116	138	160	138
Epicatechin	48	30	35	33	21	24	40	30	42	34	43	35	155	124	136	138
Genistein	27	8	25	32	19	27	51	45	50	52	33	50	162	105	152	140
Kaempferol	32	15	20	42	28	38	44	41	40	41	45	36	159	129	134	141
Daidzein	26	6	37	41	15	26	53	50	51	46	34	49	166	105	163	145
Chrysin	21	13	19	15	33	23	60	60	53	50	53	46	146	159	141	149
Catechin	42	40	29	45	34	37	46	33	45	40	30	43	173	137	154	155
Amiodarone	15	46	36	7	20	13	22	32	17	11	14	13	55	112	79	82
Propafenone	29	42	44	16	47	45	12	31	35	6	13	22	63	133	146	114
Quinidine	17	28	38	21	32	20	36	43	41	28	50	17	102	153	116	124
Flecainide	41	23	30	48	43	48	21	29	28	35	21	11	145	116	117	126
Verapamil	53	50	48	39	37	39	35	27	10	19	48	4	146	162	101	136
Diltiazem	40	56	57	18	35	36	24	44	22	23	60	47	105	195	162	154
Metoprolol	45	48	49	19	49	51	43	54	52	31	35	34	138	186	186	170
Propranolol	46	49	50	31	48	55	41	52	48	32	28	40	150	177	193	173
Sotalol	56	53	55	36	46	52	52	51	54	58	54	54	202	204	215	207
Lidocaine	54	51	54	58	54	54	54	55	58	48	56	58	214	216	224	218
Procainamide	55	55	53	54	56	56	55	56	57	56	55	55	220	222	221	221

Her bir kenetleme algoritmasının puanlama sistemi farklı olduğundan skorlar etkinlik sıralamasına göre yeniden normalize edildi. Yeni skorlara göre Tablo 13'te görüldüğü gibi koyu mavi renkli puanlar yüksek skoru, kırmızı renkli puanlar ise düşük skoru temsil etmektedir. Normalizasyondan sonra her protein için toplam skor hesaplanıp sıralama yapıldığında JNK1 inhibitörü olan SCH772984 en iyi skora sahip molekül olarak en ön sırada yer aldı. Genel olarak inhibitörler en düşük değerleri almalarına karşın iyi bilinen bir JNK1 inhibitörü olan SP600125 ile laboratuvarlarda sık tercih edilen IRE1 inhibitörü 4u8c protein etkileşiminin en kötü skorlara sahip olduğu gözlemlendi. İnhibitörlerden sonra Statin grubu moleküllerin proteinler ile kenetlenmede en etkin ajanlar olduğu kenetleme çalışmaları ile gösterildi. Buna karşın Antiaritmik ilaçların ise genellikle en kötü skorları aldığı gözlemlendi [Tablo 13]. Etkin madde gruplarının IRE1, ASK1 ve JNK1 üzerinde toplam etkinliği normalize skorlara göre değerlendirildiğinde kinaz inhibitörleri 73,51 puan ile en yüksek skora sahip olduğu

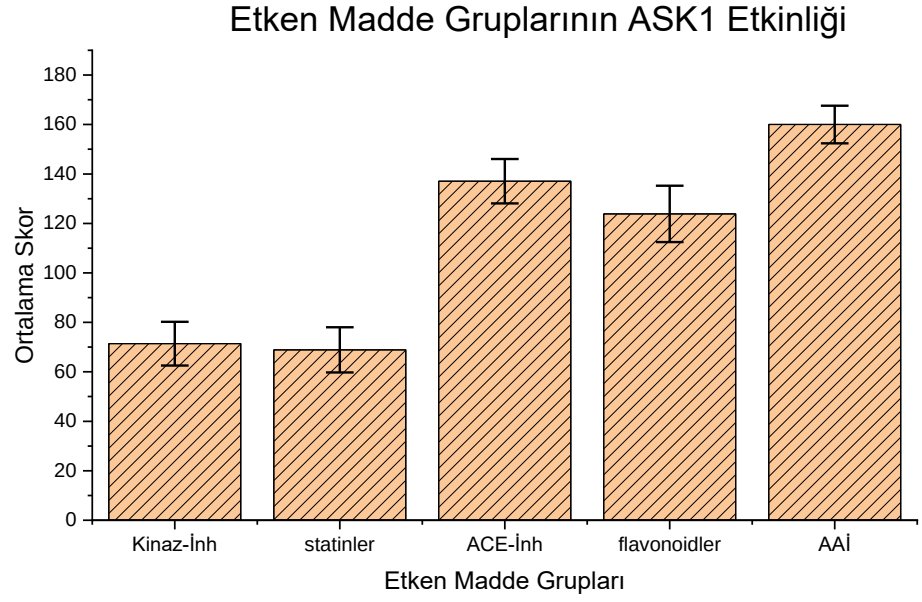
gözlendi. Statinlerin ise 83,59 puan ile inhibitörlerden sonra en yüksek skoru alan ikinci grubu oluşturdu. ACE inhibitörleri 121,69 puanla üçüncü sırada yer alırken onu Flavonoidler ve Antiaritmik ilaçlar takip etti [Grafik 29]. Etkin maddelerin etkinliklerine göre IRE1 üzerinde elde ettikleri normalize skorların grafiği incelendiğinde Kinaz inhibitörleri 76.08 puanı ile en yüksek skor elde edildi. ACE inhibitörlerinin 100 puanla ikinci en iyi skora sahip olduğu görülürken Statinlerin ise 104.56 ile üçüncü en iyi skora sahip etken maddeler olduğu gözlendi. Flavonoid ve Antiaritmik ilaçların ise 147 ve 140 ile oldukça kötü değerlere sahip olduğu belirlendi [Grafik 30]. ASK1 etken madde etkileşimlerinin normalize skor grafiği incelendiğinde ilginç bir şekilde Statin grubu etken maddelerin 68.9 ile en yüksek skora sahip olduğu görüldü. Kinaz inhibitörlerinin ise 71.4 ile çok az farkla ikinci sırada yer aldığı, ACE inhibitörleri, Flavonoidler ve Antiaritmik ilaçların ise sırayla 137, 124 ve 160 ile Statinlere kıyasla oldukça kötü değerlere sahip olduğu belirlendi [Grafik 31]. JNK1 ile etken madde etkileşiminden elde edilen skorlar kıyaslandığında Kinaz inhibitörleri 73.1 ile en iyi skora sahipken, Statinler 77.3 puanla ikinci en iyi skora sahip grubu oluşturdu. ACE inhibitörleri, Flavonoid'ler ve Antiaritmik ilaçların ise sırayla 128.3, 135.8 ve 156.9 puanla diğer proteinlerde olduğu gibi Statin grubuna kıyasla kötü skorlara sahip oldukları görüldü [Grafik 32].



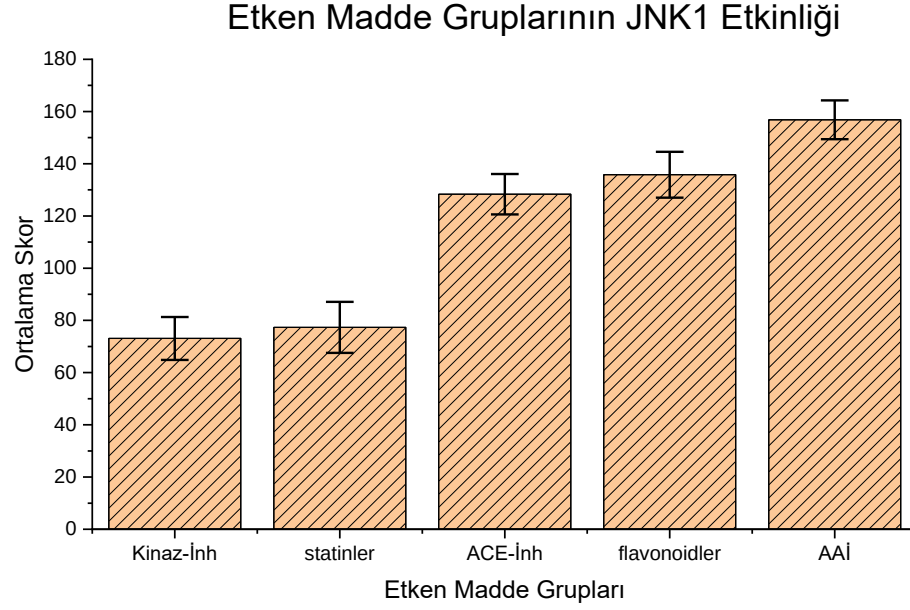
Grafik 29. Etkin maddelerin etkinliklerine göre tüm proteinler üzerinde toplamda elde ettikleri normalize skorların grafiği (düşük değer daha iyi)



Grafik 30. Etken maddelerin etkinliklerine göre IRE1 üzerinde elde ettikleri normalize skorların grafiği (düşük değer daha iyi)



Grafik 31. Etken maddelerin etkinliklerine göre ASK1 üzerinde elde ettikleri normalize skorların grafiği (düşük değer daha iyi)



Grafik 32. Etken maddelerin etkinliklerine göre JNK1 üzerinde elde ettikleri normalize skorların grafiği (düşük değer daha iyi)

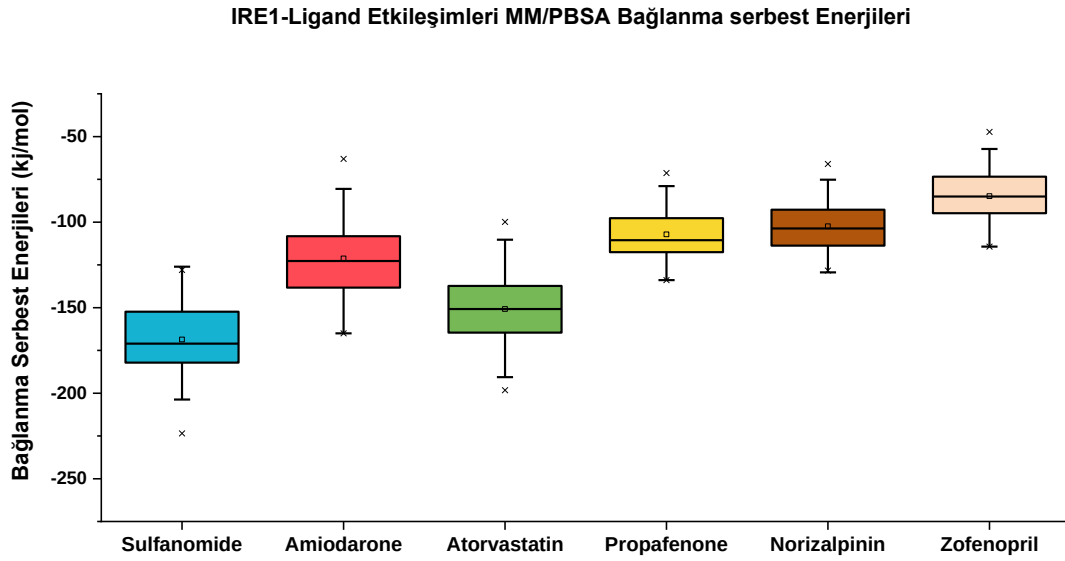
3.1.2.2. Enzim Ligand Komplekslerinin Serbest Enerji Hesaplamaları

Etken maddeler Statin, Flavonoid, Antiaritmik ilaçlar, ACE inhibitörleri ve Kinaz inhibitörleri olarak sınıflandırıldıktan sonra moleküler kenetleme hesaplamaları sonucu elde edilen normalize skorları değerlendirilerek proteine özgü her gruba ait en yüksek skora sahip moleküllerin Serbest Enerji hesaplamaları yapıldı. Aynı grup içinde en yüksek skorlara yakın değerlere sahip iki molekül olduğuunda ikisi de tercih edildi. Buna göre IRE1-ligand etkileşimlerinde Kinaz İnhibitörün'den; Sulfonomide, Flavonoid'lerden; Norizalpin'in, Antiaritmik Ajanlar'dan; Amiodarone ve Propafenone, ACE inhibitör'lerinden; Zofenopril ve Statinler'den; Atorvastatin tercih edildi. ASK1-ligand etkileşimlerinde Kinaz İnhibitör'lerinden; Staurosporine, Flavonoid'lerden; Chrysin, Antiaritmik Ajanlar'dan; Amiodarone, ACE İnhibitör'lerinden; Fosinopril ve Statin'lerden; Atorvastatin ve Pitavastatin tercih edildi. JNK1-ligand etkileşimlerinde Kinaz İnhibitör'lerinden; SP600125, Flavonoid'lerden; Luteolin, Antiaritmik Ajan'lardan; Amiodarone, ACE İnhibitör'lerinden; Fosinopril ve Statin'lerden de Atorvastatin ve Pitavastatin tercih edildi.

3.1.2.2.1. MM/PBSA Hesaplamaları

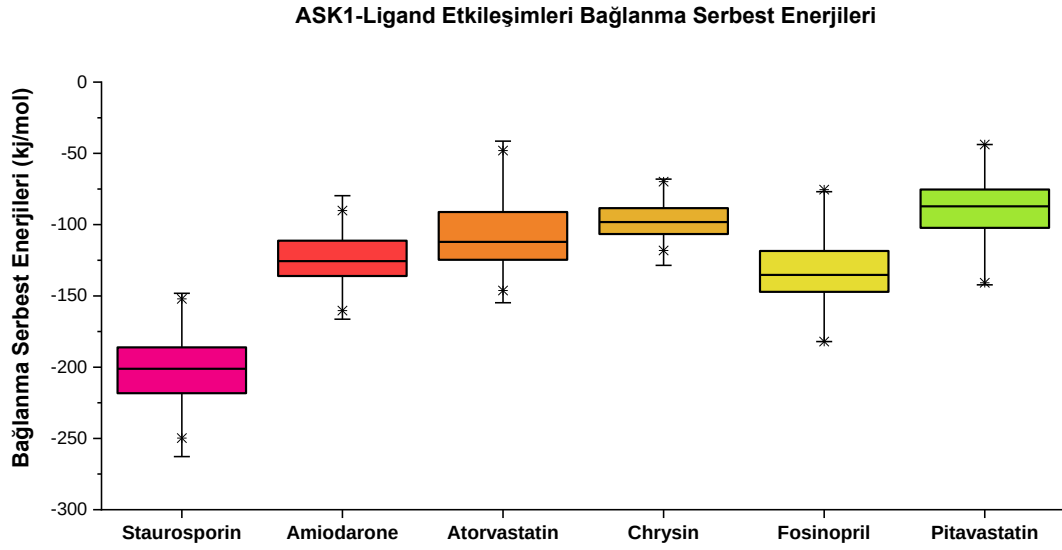
IRE1 ligand etkileşimlerinde her bir grup için seçilen moleküllerin MM/PBSA Bağlanma Serbest Enerjileri hesaplandığında Kinaz İnhibitörü ajanlarından Sülfanomid'in -167.7 kJ/mol ile en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip molekül olarak hesaplanırken, Sülfanomid'i

-150,8 kJ/mol ile Atorvastatin takip etti. Zofenopril -84.8 kJ/mol ile en yüksek bağlanma serbest enerjisine sahip molekül olarak hesaplandı [Grafik 33].

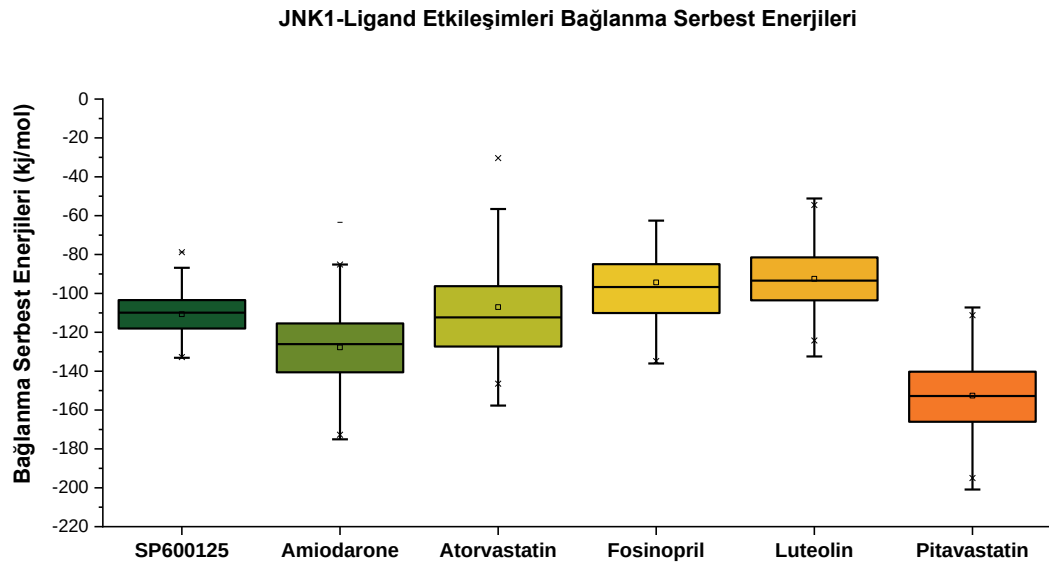


Grafik 33. IRE1-ligand etkileşimleri MM/PBSA Bağlanma Serbest Enerjileri

ASK1 ligand etkileşimlerinde her grup için seçilen etken maddelerin MM/PBSA Bağlanma Serbest Enerjileri hesaplandığında Staurosporin inhibitörünün -200,1 kJ/mol değeri ile en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip molekül olduğu hesaplandı. ACE İnhibitörü olan Fosinopril ise -132,3 kJ/mol ile ikinci en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip molekül oldu. Statin grubu içinde Pitavastatin -88,1 kJ/mol ile en yüksek bağlanma serbest enerjisine sahipken Atorvastatin ile etkileşim değeri -107,3 kJ/mol olarak hesaplandı [Grafik 34]. JNK1 ligand etkileşimlerinde ise Pitavastatin -152.6 kJ/mol ile en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip olurken Luteolin, Fosinopril, Atorvastatin ve Amiodarone sırayla -92.5 -94.8 -107 ve -127.8 kJ/mol değerlerine sahip olduğu belirlendi. JNK1 inhibitörü SP600125 ile etkileşimde ise -110,7 kJ/mol ile beklenenden daha kötü bağlanma serbest enerjisine sahip olduğu gözlemlendi [Grafik 35].



Grafik 34. ASK1-ligand etkileşimleri MM/PBSA bağlanma serbest enerjileri

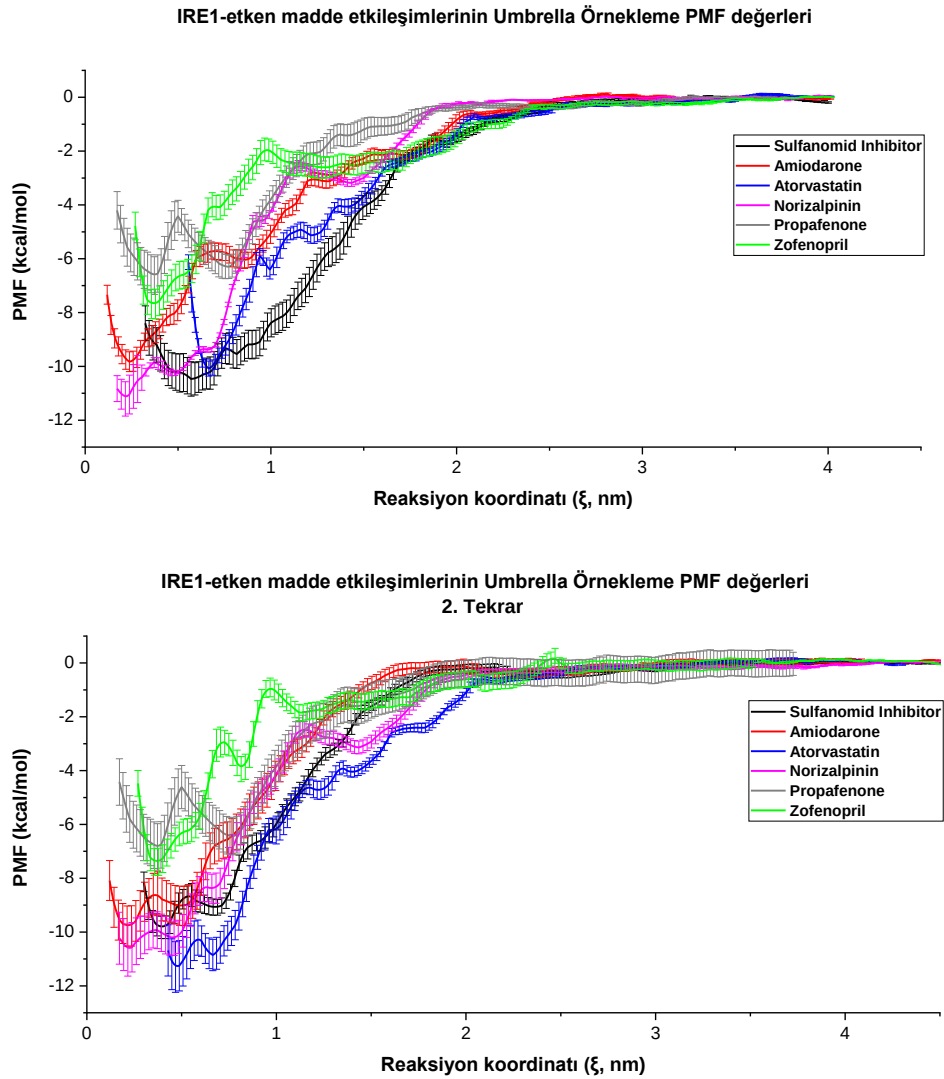


Grafik 35. JNK1-ligand etkileşimleri MM/PBSA bağlanma serbest enerjileri

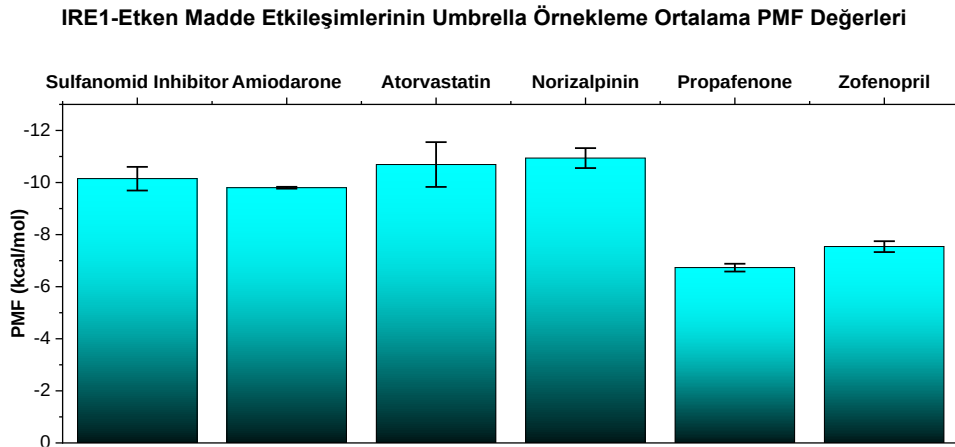
3.1.2.2.2. Umbrella Örnekleme Hesaplamaları

Moleküler kenetleme hesaplamalarından sonra normalize edilen etken madde skorları incelenerek her bir grup için proteinlere karşı en iyi skoru alan moleküller seçilerek protein etken madde etkileşimlerinin Bağlanma Serbest Enerjileri, Ortalama Kuvvet Potansiyeli (PMF) cinsinden Umbrella Örnekleme yaklaşımına göre hesaplandı. IRE1 etken madde etkileşimlerinin Ortalama Kuvvet Potansiyelleri incelendiğinde Sülfanomid inhibitör, Amiodarone, Atorvastatin ve Norizalpinin sırayla -10.2, -9.8, -10.7 ve -10.9 kcal/mol ile yakın değerler aldığı gözlemlendi. Buna karşın Propafenon ve Zofenoprilin ortalama kuvvet potansiyeli

sırayla -6.7 ve -7.54 kcal/mol olarak hesaplanarak daha kötü değerlere sahip oldukları gözlemlendi [Grafik 36-37].

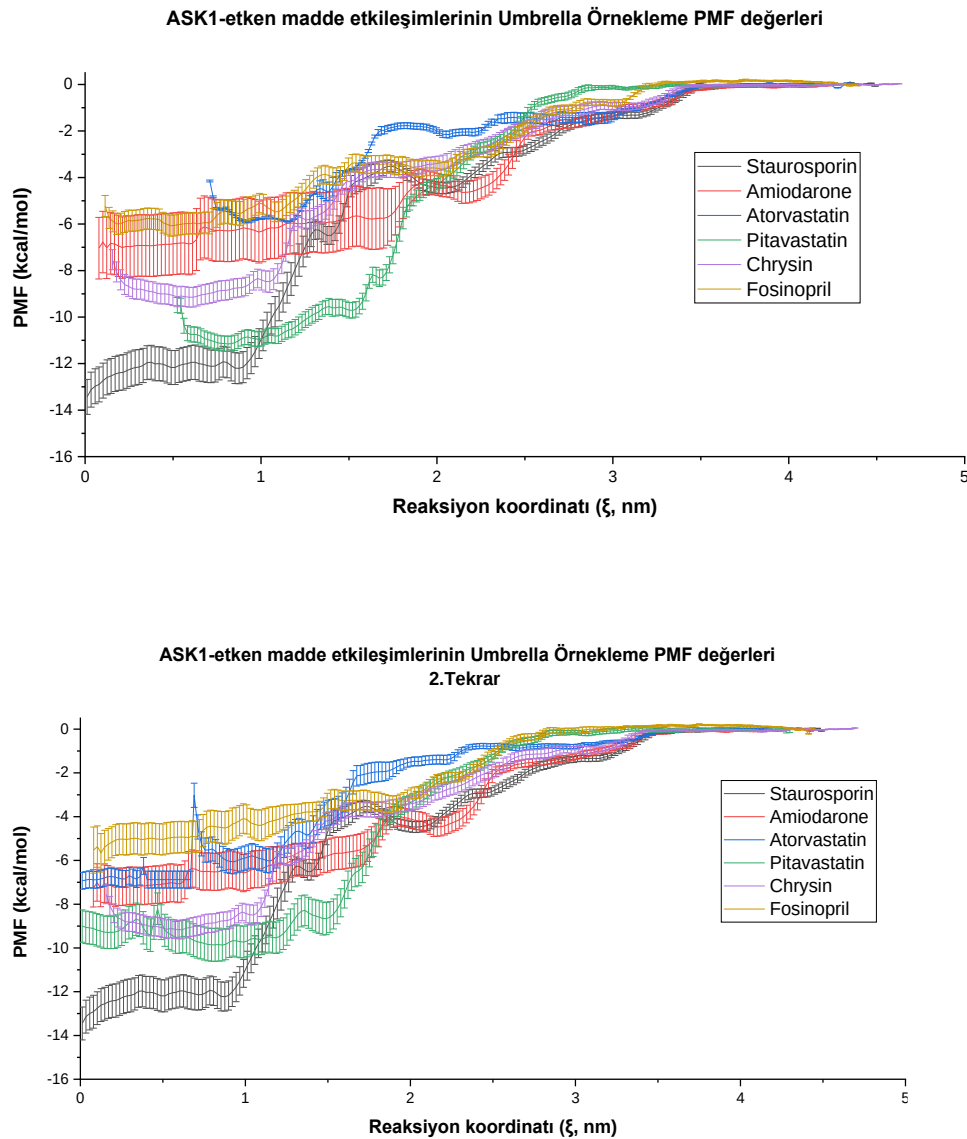


Grafik 36. IRE1-etken madde etkileşimlerinin ortalama kuvvet potansiyelleri



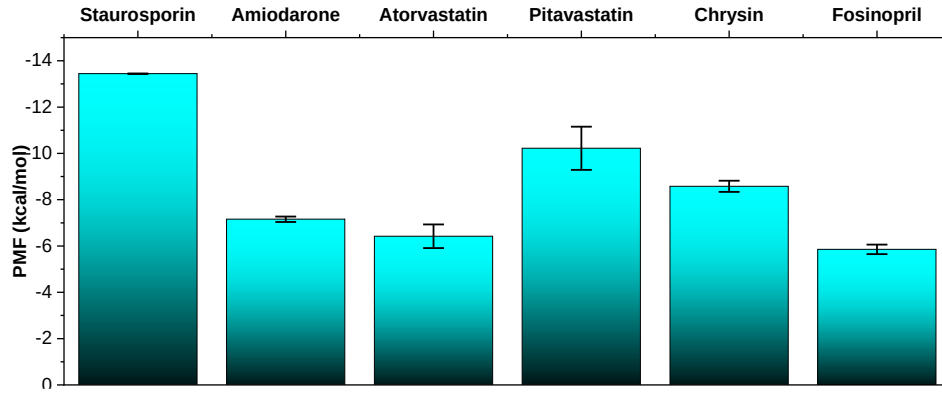
Grafik 37. IRE1-etken madde etkileşimlerinin PMF ortalamaları

ASK1 etken madde etkileşimleri, Umbrella Potansiyeli ve yapılan tekrara göre incelendiğinde her iki hesaplamada da ASK1 inhibitörü Staurosporinin -13.4 ve -13.5 kcal/mol ile en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip olduğu görüldü. İnhibitör dışında en düşük bağlanma enerjisi Pitavastatin ile etkileşimi ortalama -10.2 kcal/mol olarak diğer bir Statin grubu molekülü olan Atorvastatin'in PMF değeri ise ortalama -6.9 kcal/mol olarak hesaplandı. Diğer molekülden Amiodarone, Chrysin ve Fosinopril'in ortalama PMF değerleri ise sırayla -7, -8.3 ve -6 kcal/mol olarak hesaplandı [Grafik 38-39].



Grafik 38. ASK1-Etken Madde Etkileşimlerinin ortalama kuvvet potansiyelleri

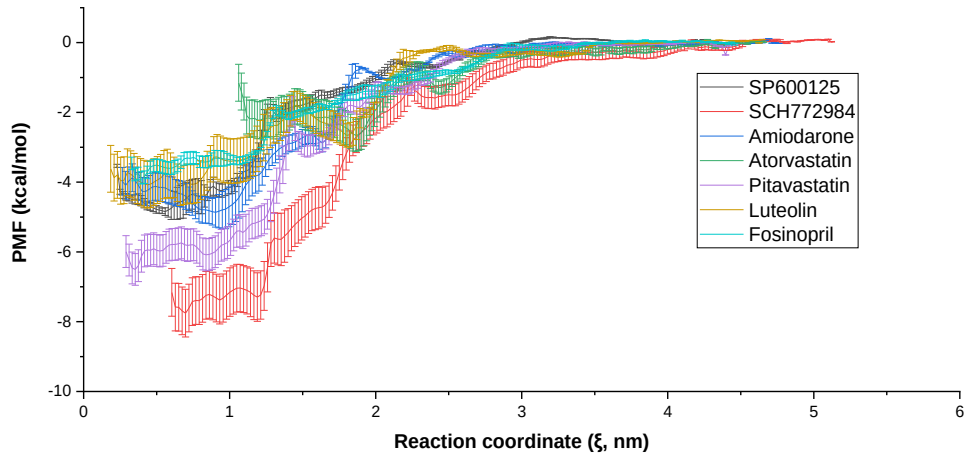
ASK1-Etken Madde Etkileşimlerinin Umbrella Örnekleme Ortalama PMF Değerleri



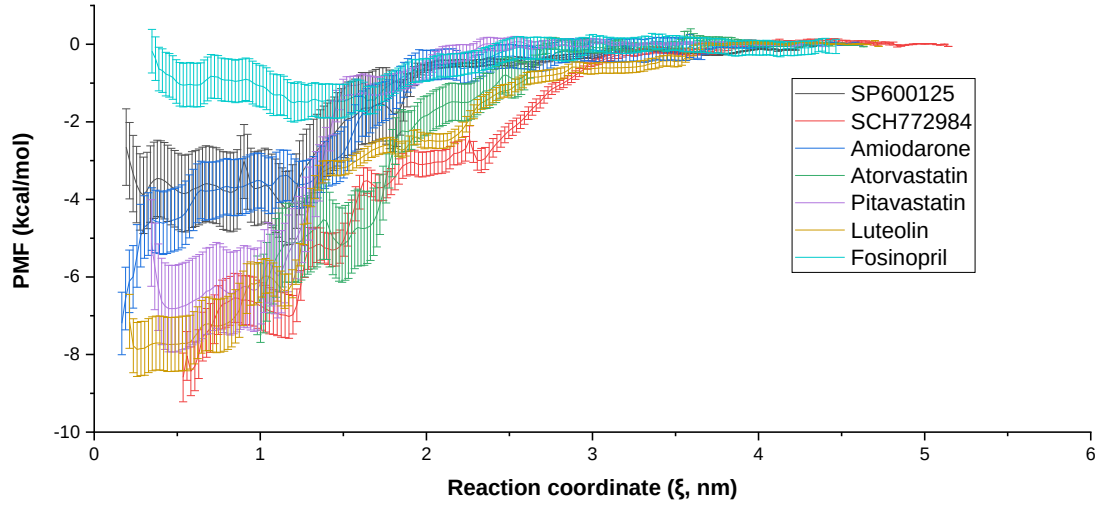
Grafik 39. ASK1-Etken Madde Etkileşimlerinin PMF ortalamaları

JNK1 etken madde etkileşimleri, Umbrella Potansiyeli ve yapılan tekrara göre incelendiğinde JNK1 inhibitörü olan SCH772984'in ortalama serbest enerji değişimi -8.2 kcal/mol ile en düşük değere ulaşılırken inhibitör dışında en düşük PMF değeri -7.6 kcal/mol ile Luteolin-JNK1 etkileşiminde meydana geldi. Diğer moleküllerden Amiodarone, Atorvastatin, Simvastatin ve Fosinopril'in ortalama PMF değerleri sırayla -5.8, -5.7, -6,7 ve -3,2 kcal/mol olarak hesaplandı [Grafik 40-41].

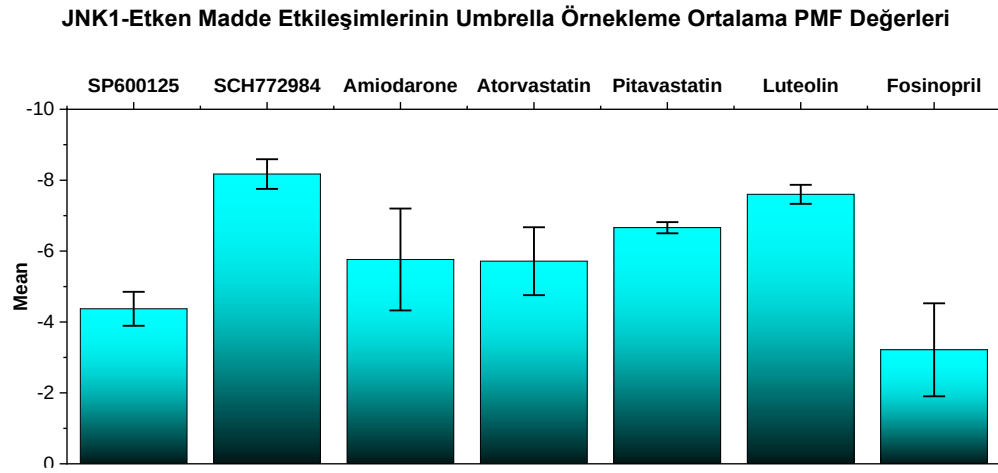
JNK1-etken madde etkileşimlerinin Umbrella Örnekleme PMF değerleri



**JNK1-etken madde etkileşimlerinin Umbrella Örneklem PMF değerleri
2.Tekrar**



Grafik 40. JNK1-Etken Madde Etkileşimlerinin ortalama kuvvet potansiyelleri



Grafik 41. JNK1-Etken Madde Etkileşimlerinin PMF ortalamaları

BÖLÜM VI

4.1 Tartışma

IRE1-JNK yolağı ER stresine karşı katlanmamış veya yanlış katlanmış protein cevabı oluşturmada en önemli sinyal yolağıdır. BİP'in bu sinyal yolağında IRE1LD'e bağlı halde kalarak sinyalizasyonu önlediği bilinmektedir. Bununla birlikte bu yolağın aktivasyonu sonucunda JNK1 fosforilasyonu ile hücre apoptoz mekanizmaları aktif hale gelebilmekte ve kardiyak hücrelerde iskemi gibi patolojilerde şiddetli ER stresi koşullarında apoptoz sonucu hücre hatta doku kaybı meydana gelebilmektedir (Tabas & Ron, 2011). Yapılan çalışmalar ile bu yolağın doğrudan BİP üzerinden veya IRE1-JNK yolağı üzerinden protein fosforilasyonunun blokajında apoptozun azaldığı gösterildi (L. Chen vd., 2014; Sun vd., 2006).

Çalışmamız protein-protein ve protein-ligand etkileşimlerinin araştırılması olarak iki kısımdan oluşturuldu. Protein-protein etkileşiminin araştırıldığı ilk kısımda, IRE1 luminal domaine bağlı halde IRE1-JNK yolağını pasif halde tutan BİP'in bu bağlanmadaki moleküler mekanizması ve konformasyonel analizi, moleküler dinamik simülasyon ve MM/PBSA serbest enerji hesaplama metodu ile araştırılması hedeflendi. Protein-protein etkileşim hesaplamaları için yüksek hesaplama maliyetine gereksinim duyulması ve hesaplamaların çok uzun sürmesi nedeniyle sadece BİP-IRELD etkileşimi ve BİP'in konformasyonel analizi gerçekleştirilebildi. Protein-ligand etkileşimlerinin araştırıldığı ikinci kısımda ise kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan Statinler, ACE inhibitörleri, Antiaritmik ilaçlar ve bazı Flavonoidlerin IRE1-JNK yolağı üzerindeki IRE1, ASK1 ve JNK1 proteinleri ile moleküler etkileşimleri ve bu proteinlerin doğal inhibitörleri, moleküler kenetleme, moleküler dinamik simülasyon ve serbest enerji hesaplama yöntemleri ışığında araştırılması ayrıca bu moleküllerin IRE1-JNK yolağının blokajında etkili olup olamayacakları analiz edilerek ilaçların kendi etkilerinin dışında ER stresi kaynaklı apoptozun azaltılmasında rolü olup olamayacakları konusuna öncü olunması amaçlandı.

Protein-protein bağlanmasının hesaplamalı biyolojik yöntemler ile araştırılmasında günümüzde genellikle kenetleme algoritmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu algoritmalar içinde HADDOCK, Cluspro, Pydock, Zdock ve Swarmdock gibi algoritmalar tercih edilmekte ve CAPRI'de performansları sınanmaktadır (Lensink vd., 2016). Çalışmamızda bu beş algoritma kullanılarak BİP-IRELD etkileşimleri araştırıldığında, bu algoritmaların protein yapılarını genellikle rijite yakın kısmi esneklikte kabul ederek hesaplama yapması nedeniyle ve algoritma sonuçları arasında tutarlılık bulunamadığından dolayı elde ettiğimiz verilerin çok güvenilir olamayacağı düşüncesine varıldı. BİP'in allosterik bir yapıya ve IRE1LD'in esnek dördüncü bölgeye sahip olması, protein-protein etkileşim çalışmalarında protein esnekliğini

de göz önünde bulundurmamızı zorunlu hale getirdi. Yukarıda bahsedilen algoritmalar içerisinde HADDOCK algoritması protein-protein etkileşimlerine kısmi esneklik sağlayabilmektedir. Fakat bu özelliğin başarılı olarak kullanılabilmesi için en az uzmanlık seviyesinde kullanım yetkisi gerekmektedir, o yüzden bu çalışmada bu algoritmanın basit arayüzü kullanıldı (Cyril Dominguez, Rolf Boelens, & Bonvin*, 2003). Protein-protein etkileşimlerinin yüksek esneklikte analizi için ileri işlemci gücüne ihtiyaç duyulması yanında yanlış pozitif sonuç alma olasılığı da dramatik olarak artmaktadır. Marze ve arkadaşları geliştirdikleri yeni Monte Carlo-plus minimizasyon algoritması ile bu probleme yanıt olarak Rosettadock 4.0 'ı geliştirmişlerdir. Bu metodolojide protein yapıları iri taneli olarak modellenerek hesaplama maliyeti düşürülmüş ve altı boyutlu skorlama fonksiyonu kullanılmıştır. Araştırma ekibi farklı esneklikte 88 proteini bu metodoloji ile analiz ettiklerinde rijit yapılarda %77 başarı sağlamalarına karşın yüksek esneklikteki protein etkileşimlerinde %31 başarı yakalayabilmişlerdir (Marze, Roy Burman, Sheffler, & Gray, 2018). Yüksek esneklikte konformasyonel tarama kabiliyetindeki bu azalma ve hesaplama maliyetindeki dramatik artış araştırma ekiplerini protein esnekliğini sınırlama yönünde zorlamaktadır. Fakat protein esnekliğinin sınırlanması rijit yapılarda yüksek başarımda çalışmasına karşılık esnek proteinlerde başarı yerini hayal kırıklığı yaratabilmektedir. Ciemny ve ekibi protein-peptid etkileşimlerinde bu problemin çözümünde yeni bir çözüm önerisi sunmuşlardır. HADDOCK gibi bazı güçlü algoritmalarda lokalizasyonun önceden tanımlanması gerekirken bu çözüm önerisine göre önceden bir lokalizasyon belirlemek gerekmemektedir. CABS-dock olarak adlandırılan bu yaklaşımda peptid tamamen esnek olarak ele alınırken reseptörde ise sadece omurgada küçük dalgalanmalara müsaade edilmiştir. Bununla birlikte gelişmiş seçeneklerde reseptörün belirli domaininde esneklik sağlanabilmektedir. Ayrıca CABS-dock algoritmasının en önemli özelliği protein ve peptid yapıları için önerdikleri iri taneli modelleme yaklaşımıdır (Ciemny, Kurcinski, Kozak, Kolinski, & Kmiecik, 2017). Bu yaklaşım ile protein etkileşimleri ile oluşan serbest enerji yüzey alanı tüm atomik modellere göre daha pürüzsüz olabilmekte ve enerji geçişleri daha kolay meydana gelerek global minimuma bir diğer deyişle genellikle doğal bağlanma formuna daha kolay ulaşılabilir (Kmiecik vd., 2016). Araştırmamızda bu protein-protein etkileşim yaklaşımında iri taneli modelleme tercih edilerek ve serbest enerji geçişlerinde yumuşamadan faydalanarak doğal formu yakalamada avantaj elde edilmesi planlandı. Ayrıca iri taneli modelleme tercih edilmesinde bir diğer önemli neden ise hesaplama maliyetinin önemli ölçüde düşürülmesi oldu. Bu yaklaşım için kullandığımız MD simülasyon yazılımı Gromacs olması nedeniyle bu yazılım için en uygun ve en yaygın kullanılan iri taneli model olan MARTİNİ yaklaşımı tercih edildi (Monticelli vd., 2008). MARTİNİ modeli ile protein-protein etkileşimlerinde oldukça başarılı sonuçlar alınmasına ve binlerce yayının

literatüre kazandırılmasına karşın araştırmacılar iri taneli modelleme yaklaşımlarında yanlış protein agregasyonu gibi önemli bir problem ile yüz yüze kalabilmektedirler (Javanainen, Martinez-Seara, & Vattulainen, 2017). Protein agregasyonu oluşma nedenleri arasında sistem hacminin çok fazla olması nedeniyle termodinamik denge uyumsuzlukları, tüm atomik simülasyonlara göre uzun simülasyon zamanı ve çok fazla eksik rezidüyle sahip proteinlerin yanlış modellenmesi gösterilebilir. Çalışmamızda BİP proteininin eksik rezidüye sahip olmamasına karşın IRELD'de proteinin beş farklı bölgesinde homoloji modelleme gerçekleştirildi. Dört bölge çoğunlukla loop motifleri içerdiğinden önem arz etmezken 308-378 arasındaki disordered domain için de-novo yapı tahmini, fragment tabanlı en iyi yapı tahmini yapan I-TASSER aracı ile gerçekleştirildi (Y. Zhang, 2008). Kimata ve Carrara gruplarına göre IRE1 4. bölgesi içinde yer alan bu bölge, yüksek esnekliği nedeniyle Zhang ve ekibinin elde ettiği insan IRE1LD X-RAY kristalografisinde belirlenememiştir (Carrara vd., 2015; Kimata, Oikawa, Shimizu, Ishiwata-Kimata, & Kohno, 2004; Zhou vd., 2006). Bu çalışmada da homoloji modelleme sonrası elde edilen protein yapısının stabilitesinin test edilmesi için 100 ns'lik tüm atomik MD simülasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra simülasyon analiz edilerek protein stabilitesi valide edildi. Ayrıca deneysel verilerle de uyumlu olarak modellenen disordered yapıdaki 4. bölgenin yüksek esneklikte olduğu gözlemlendi. Zhou ve arkadaşları insan IRE1LD'nin XRAY kristal yapısını elde ettikleri çalışmalarındaki hipotezlerinde bu yüksek esneklikteki disordered domainin BİP'e bağlanmada rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (Zhou vd., 2006). Carrara ve arkadaşları da 2. ve 4. bölgenin bağlanmada önemli rol oynayabileceğini öngörmüşlerdir (Carrara vd., 2015). Kimata ve ekibi maya hücrelerinde yaptıkları çalışmada diğer iki gruptan farklı olarak IRE1LD'nin membrana uzanan peptid zincirinin bağlanmada rol aldığını vurgulamışlardır. İnsan ve maya IRE1LD yapılarının dimerizasyon domaininin olduğu bölgede yüksek homolojik benzerliğe sahip olamamalarına karşın diğer bölgelerde bu benzerlik görülememektedir. Bunun yanında iki yapı arasındaki rezidüel benzerlik %17 seviyelerindedir. Araştırmamızda dimerizasyon domainindeki yüksek benzerlik nedeniyle insan IRE1LD dimerizasyon domaini üzerindeki kayıp rezidüleri maya referans alınarak tamamlama yoluna gidildi. Disordered domain dışında kalan üç kısım, ikincil yapılar içinde esnek dönüşleri içerdiğinden problem oluşturmadı. Fakat disordered domaini içeren 4. bölge maya IRE1LD'de olmadığından homoloji modelleme yerine ab-initio de-novo modelleme yoluna gidildi. Araştırma grupları arasında IRE1LD'nin BİP'e bağlanma bölgesi konusunda meydana gelen bu çelişkinin ana nedeni olarak yüksek esneklikteki bu 4. bölgenin iki protein yapıda da farklı motiflere sahip olması olarak düşünülebilir. Yaptığımız çalışmada insan IRE1LD protein yapısı kullanıldığından yüksek esneklikteki 4. bölgenin BİP ile

bağlanmasındaki rolü kabul edilerek 4. bölge BİP'e dönük olacak şekilde BİP-IRE1LD kübik oryantasyonları hazırlandı.

Çalışmamızda protein-protein etkileşimlerinin araştırılmasında gözlemlenen ikinci önemli noktanın yüksek esneklik potansiyelinin BİP SBD α domaininde olduğu belirlenmesi oldu. Birbirinden bağımsız yapılan tüm atomik ve iri taneli simülasyonlarda bu domainin ilginç bir şekilde sürekli esnek olarak hareket etmediği sadece belli asimetrik zaman periyotlarında hızlı bir şekilde bükülme gerçekleştirip tekrar eski haline döndüğü gözlemlendi. Preissler ve arkadaşları elde ettikleri 5o4p kodlu BİP XRAY kristal yapısında SBD α domaini içindeki 549-654 arası rezidüleri yüksek esneklik nedeni ile dahil etmemişlerdir (Javanainen vd., 2017). Yaptığımız çalışmada ise hizalanma sonrası bükülmenin 553. rezidüden itibaren gerçekleştiği belirlendi. Bu durumda SBD α domainin belli bir konformasyonda stabil kalmadığı ve belli bir hareketliliğe sahip olduğu gösterilmesi nedeniyle çalışmamız deneysel olarak desteklenmiş oldu. Eğer bu domain sürekli olarak hareketli bir karaktere sahip olsaydı XRAY kristal yapılarıdaki esnek rezidülerin elde edilmesindeki büyük zorluktan dolayı 5e84 kodlu yapıdaki gibi tüm yapı elde edilemeyecekti. Bu durumun da bu domaindeki hareketliliğinin ortam şartlarına göre yarı stabil olduğunu yani hareketliliğin sürekli olarak devam etmediğinin gösterilmesi çalışmamızı destekledi.

BİP-IRE1LD etkileşiminde IRE1LD'in disordered domaini ve BİP'in SBD α domainin yüksek esneklikte olması ve bağlanmada potansiyel rol oynayabilecekleri düşüncesi ile güncel docking algoritmaları yerine MD simülasyon tabanlı protein-protein etkileşimlerinin araştırılması tercih edildi. Protein-protein etkileşimlerinde MD simülasyon genellikle tahmin yerine validasyon amaçlı kullanılmaktadır. Tahmin amaçlı kullanılmamasının ana nedeni çok yüksek hesaplama maliyetidir. Buna karşın Abriata ve arkadaşları Nature'da yayınladıkları makalede farklı tuz konsantrasyonlarındaki non-kovalent ubiquitin dimerizasyonlarını 600 ns gibi oldukça uzun periyotta MD simülasyonlarını gerçekleştirdiklerini açıklamışlar ve simülasyon sonucunda tüm simülasyonlarda agregat oluşumunu gözlemişlerdir (Abriata & Dal Peraro, 2015). Protein-protein bağlanmalarında etkileşimi büyük oranda hidrofobik yüzey etkileşimleri belirlediğinden tüm atomik simülasyon yerine daha basite indirgenmiş iri taneli modellerin simülasyonları tercih edilebilir. Baaden ve Marrink bu konuda yazdıkları derlemede çok büyük ölçekli iri taneli simülasyonlarda protein agregat oluşumu üzerinde durmuşlardır. Ayrıca serbest enerji veya PMF hesaplamaları ile etkileşimlerin sınıflandırılabilirliğini göstermişlerdir (Baaden & Marrink, 2013). Bu sınıflandırma ile bu etkileşimin doğru bağlanma olup olmadığını valide edebilmemiz mümkün olabilmektedir. Validasyon için kullanılan serbest enerji hesaplama metodları içinde End Point okuma

gerçekleştirilen MM/PBSA ve LIE gibi yöntemlerde daha az hesaplama maliyeti gereksinimi doğmasına karşın sonuç kantitatif olmaktan uzaktır. Yani elde edilen sonuç, deneysel veriden uzaktır. Fakat elde edilen sonuçlar birbiri ile kıyaslandığında en düşük değerin doğal forma yakınlığı ile başarılı olabildiği sergilendi. Chen ve arkadaşları da 46 protein-protein kompleksinin etkileşimini MM/PBSA yaklaşımına göre araştırmışlar ve bu yaklaşımın ZDOCK skorundan daha iyi çalıştığını göstermişlerdir (F. Chen vd., 2016). Yaptığımız çalışmada etkileşimin MM/PBSA serbest enerjisini hesaplamada Chen ve arkadaşlarından farklı olarak tüm atomik model yerine iri taneli model tercih edildi. Böylece hesaplama doğruluğundan çok fazla feragat etmeden yüzlerce kat daha hızlı ve daha az maliyetli hesaplama başarıldı. Patel ve Ytreberg kullandığımız metodolojiye benzer şekilde iri taneli modeller kullanarak MD simülasyonlar gerçekleştirmiş ve bağlanma serbest enerjilerini hesaplamışlardır (Patel & Ytreberg, 2018). Klasik tüm atomik simülasyona göre çok hızlı olan metodolojide genel konsept, yaptığımız çalışma ile benzerlik gösterse de önemli farklılıklar içermektedir. Ekip iri taneli kuvvet alanı olarak MARTİNİ yerine SIRAH kullanmayı tercih etmiştir. Darre ve arkadaşları tarafında geliştirilen bu yeni model, kırmızı şarap yapımında kullanılan “syrah”dan esinlenilerek MARTİNİ modeline de ince bir gönderme yapılarak isimlendirilmiştir. Gelişim kronolojisinde MARTİNİ’nin arkasından takip eden bu model, algoritma olarak MARTİNİ ile önemli farklılıklara sahiptir. MARTİNİ modelinde haritalama stratejisi 4 atomun tek atom olarak varsayılması ve bazı halkasal karmaşık yapılarda detaylandırma üzerine kurulu iken SIRAH modelinde karmaşık bir modelleme tercih edilmektedir. Örneğin su molekülü için karşılaştırma yapılacak olursa MARTİNİ modelinde 4 su molekülü bir molekül olarak haritalanırken SIRAH modelinde 11 su molekülü her biri kısmi yük taşıyan dört adet bağlantıya sahip bir boncuk olarak haritalanmaktadır. WT4 olarak isimlendirdikleri bu su modeli ile dielektrik geçirgenlik potansiyeli, iyonik kuvvet ve osmotik basınç gibi değerler korunmaya çalışılmaktadır. Protein haritasına baktığımızda ise yine MARTİNİ modelinde fonksiyonel gruplar dışında amino asitlerde 4 atomun bir atom olarak farz edildiği basite indirgenmiş haritalama tercih edilirken, SIRAH modelinde peptid bağlarında oksijen, azot ve alfa karbonun pozisyonunun korunduğu düşük granüler haritalama tercih edilerek yan zincirlerde ise daha düşük detay derecesinde modelleme ile genel bir kural belirlemek yerine her amino asit için özel bir haritalama tercih edilmektedir. Ekibin tercih ettiği bu strateji sayesinde hidrojen bağı benzeri etkileşimler ihmal edilmediğinden proteinin üç boyutlu yapısı sekonder yapıların stabil kalabilmesi sayesinde bozulmamaktadır (Darré vd., 2015). MARTİNİ kuvvet alanında hidrojen bağları ihmal edildiğinden bunun yerine elastik network yaklaşım ile stabilite korunmaya çalışılmaktadır. SIRAH modelinde tercih edilen bu detay sayesinde protein katlanma simülasyonları MARTİNİ’den çok daha başarılı şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

MARTINI modelindeki hidrojen bağı oluşturmama eksikliği protein stabilitesi yönünden büyük bir problem olarak ortaya çıksa da Marrink ve ekibi bu problemin üstesinden geliştirdikleri Elnedyn elastik network modeli ile gelmişlerdir (Periole, Cavalli, Marrink, & Ceruso, 2009). SIRAH modeli daha çok protein katlanma simülasyonlarında başarı ile uygulanırken protein-protein etkileşimlerinde iki model de başarılı sonuçlar vermektedir. Çalışmamızda protein-protein etkileşimlerinde yüksek performansa ve SIRAH ile benzer başarıma sahip olması yanında GROMACS MD simülasyon yazılımı ile tam uyumlu ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle MARTİNİ modeli tercih edildi.

Patel ve Ytreberg'un protein-protein etkileşiminde kullandıkları SIRAH modeli ile gerçekleştirdikleri MD simülasyonda bağlanma serbest enerjisini hesaplamak için Umbrella Örneklemeye kullanmışlardır (Patel & Ytreberg, 2018). Bizim yaptığımız çalışmada Umbrella Örneklemeye yerine MM/PBSA yaklaşımı tercih edildi. Umbrella Örneklemeye, absöüt bağlanma enerjisini hesaplamada MM/PBSA yaklaşımına göre çok daha üstün olmasına karşın en az 20 kat daha fazla hesaplama maliyetine ihtiyaç duymaktadır. Bunun nedeni reaksiyon koordinatındaki her pencere için ayrı ayrı simülasyon yapılması gerekliliğidir. MM/PBSA'da ise tek bir simülasyon ile end-point okuma gerçekleştirilebilmektedir. Umbrella Örneklemeye güçlü bir metod olmasına karşın karşılaştırmalı yaklaşımda MM/PBSA ile benzer başarıya sahiptir (Brice & Dominy, 2011). Ayrıca çalışmamızda kullandığımız BİP ve IRE1LD yüksek esnekliğe sahip olduğundan Umbrella Örneklemeye için gerekli olan proteinleri birbirinden uzaklaştırmak için kullanılan steered MD uygulanmasında problemler ortaya çıkabilmektedir. Yüksek hesaplama maliyeti, yüksek esneklikte proteinlerin etkileşimlerinde uygulama zorluğu ve karşılaştırmalı serbest enerji hesaplamalarında MM/PBSA yaklaşımı ile benzer başarıma sahip olması nedeniyle çalışmamızda Umbrella Örneklemeye yerine MM/PBSA yaklaşımı tercih edildi.

MARTİNİ modeli ve MM/PBSA yaklaşımını kullandığımız protein-protein etkileşimi çalışmamızda MD simülasyonda agregat oluşturma yeteneğinden faydalanılarak birbirinden 5 Å - 15 Å uzaklıkta yerleştirilen proteinlerin bağlanma konformasyonları ve bu konformasyonların serbest enerji hesaplamaları yürütüldü. Protein-protein etkileşimlerinde bağlanmada VdW etkileşimlerinin rolü %70 civarındadır (Nilofer, Sukhwal, Mohanapriya, & Kanguane, 2017). Buna karşın MD simülasyonlarda VdW etkileşimlerinde kesme algoritması uygulanmaktadır. Vdw çekme kuvveti çok yakın mesafede gerçekleştiğinden ve genellikle 1.4 Å değerinde kesme yapıldığından, çalışmamızda proteinler arası mesafe 5-15 Å arasında alındı. 15 Å üzeri aralıklı simülasyonlarda bağlanma çoğunlukla gözlenmedi. Doğru bağlanma paternini araştırmak için iki proteinden büyük olanı merkezde kabul edilerek diğer protein bu

merkeze 5 Å -15 Å mesafede belli oryantasyonlarda yerleştirildi. Bu oryantasyonları oluşturmak için proteinleri rastgele yerleştirmek yerine standardizasyon için proteinleri kübik olarak varsayılarak yerleşim kübik ekseninde gerçekleştirilmesine karar verildi. MD simülasyonlarının yüksek maliyetli olması ve kısa mesafede proteinlerin geniş bir yüzey aralığında bağlanma olasılığı nedeniyle kübik ekseninde altı farklı oryantasyonda dizilim yeterli bulundu. Literatürde bu dizilime benzer protein-protein etkileşim tahmin etme yaklaşımına rastlanmadı. Belli bir dizilime göre değil de rastgelelik esasına dayalı fiziksel tabanlı protein bağlanma ve ayrılma paternlerini araştırmak amacıyla Plattner ve arkadaşları Nature Chemistry’de bir çalışma yayınlamışlardır. Bu çalışmaya göre ekip konformasyonel bağlanma ilişkisi çok iyi bilinen Ribonükleaz Barnase ve onun inhibitörü Barstarın atomik çözünürlükte protein-protein birleşme ve ayrışma kinetiğini mikroskopik olarak uyarlamalı yüksek verimli MD simülasyonları ve bu simülasyonların sonucuna göre oluşturulmuş markov modellemelerini birleştirerek açıklamışlardır. Plattner ve arkadaşları yaptıkları bu çalışma ile mili saniye ölçeklerinde uyarlamalı MD simülasyonlar gerçekleştirerek deneysel olarak protein-protein bağlanma ve ayrışmalarında oluşabilecek tüm olası durumları yani ara bağlantıları, yanlış bağlanmaları, gevşek doğal bağlanma konformasyonuna yakın bağlanmaları ve sıkı sıkıya bağlı kristalografik durumları ve bu bağlantısal geçişlerde meydana gelen ayrışmaları ölçümleyebilmişlerdir. Bu çalışma bize iki proteinin bağlanmasında basit direkt bağlanma meydana gelmediğini, ara bağlanmalar ve ayrışmalar ile doğal forma doğru bir geçiş havzası meydana geldiğini net bir şekilde göstermesi açısından çok önemli bilgiler sundu. Plattner ve ekibin çalışma sistemine ve kullandıkları hesaplama kaynağına bakacak olursak çalışmanın rutine indirgenmesi günümüz teknolojisi ile çok zordur. Yaptıkları çalışmada randomize olarak ayrılmış durumda yerleştirilmiş 1892 farklı oryantasyonun tüm atomik MD simülasyonu 1 µs uzunlukta GPU tabanlı bilgisayar kümelerinde gerçekleştirilmiş ve bu simülasyonların 74 tanesinde doğal form meydana gelmiştir. Bununla birlikte 797 adet 200 ns uzunlukta doğal formun uyarlanabilir MD simülasyonu, 756 adet 200 ns uzunlukta randomize olarak ayrılmış oryantasyonlarda uyarlanabilir MD simülasyonu gerçekleştirilmiş, E73 mutant formunun gizli markov modeli için ise 1500 adet 200 ns’lik uzunlukta farklı meta durumlardaki simülasyonlar kullanılmışlardır (Plattner, Doerr, De Fabritiis, & Noé, 2017). Biz çalışmamızda yaklaşık bir milyon çekirdek saat gibi kayda değer bir hesaplama kaynağı kullanmamıza karşılık Plattner ve ekibinin bizden binlerce kat daha fazla hesaplama kaynağı kullandığı açıktır. Ekip günümüzdeki en yüksek çözünürlük olan tüm atomik simülasyonlar gerçekleştirdiği için yapılan binlerce simülasyona karşılık elde edilen doğal yapıların azlığı konformasyonel enerji yüzeyindeki bariyerlerin iri taneli modele göre daha büyük ve keskin olmasından kaynaklı olabilir. Buna karşın atomik ölçekte mili saniye düzeyinde deneysel

olarak uyumlu böyle bir çalışmanın yürütülmesi MD simülasyonların geleceğinin çok umut verici olduğunu göstermektedir. Yaptığımız çalışmada ayrılmış durumdaki proteinlerin simülasyon boyunca doğal form oluşturma olasılığının fazlalığı konformasyonel enerji yüzeyindeki bariyerlerin daha yumuşak olmasından kaynaklandığını düşündürmüştür (Kmiecik vd., 2016). Proteinleri kübik olarak düşünüp 5 Å -15 Å uzunlukta tüm olası oryantasyonları düşündüğümüzde 36 farklı simülasyon ile tüm konformasyonlar araştırılabilmektedir. Fakat eğer bu iki protein homolojik olarak yüksek benzerlikte ya da aynı protein yapısında ise 6 farklı oryantasyon ile tüm olası konformasyonlar araştırılabilmektedir. Yaptığımız validasyon çalışmasında hesaplama kaynaklarının kısıtlılığı nedeniyle, her protein kompleksi için 6 oryantasyonlu simülasyonları küçük proteinin tüm yüzleri yerine sadece biyoaktif yüzleri büyük proteine dönük olacak şekilde gerçekleştirildi. Bununla birlikte kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmenti homolojik olarak yüksek benzerlikte iki proteinden oluşan konformasyonları gösterilerek doğal forma yakın gerçekleşen bağlanma paternlerinin serbest enerjilerinin diğer bağlanma paternlerinden çok daha düşük olduğu gözlemlendi.

BİP-IRE1LD etkileşimini araştırmak için geliştirilen metodoloji, hesaplama maliyetinin düşüklüğü ve doğal formu tahmin etmede fizik tabanlı atomistik yaklaşımlara göre avantaja oluştursa da bazı eksikliklere ve dezavantajlara sahiptir. Yaklaşımdaki en büyük eksiklik proteinlerin birbirine göre konumları düzenlenirken merkezdeki proteinin çevresinde kübik olarak düzenlenmesinin yeterli olmayabileceğidir. Çünkü kübik olarak oryante edildikten sonra küçük proteinin ayrıca 90 derece açılarla kübik yüzü büyük proteine dönük olacak şekilde 4 kez döndürülerek her oryantasyon için ilave 3 simülasyon daha yapılması ve sonuçların incelenmesi gerekebilir. Bu durumda tüm olası oryantasyon simülasyonlarının sayısının 36 değil 144 olması gerekmektedir. Fakat proteinler arası uzaklıkta yeterli serbestlik derecesi olduğundan ve proteinler arası uzun mesafe etkileşimin proteinleri belli doğrultuda bağlanmaya iteceğinden simülasyon sayısının artırılmasına gerek duyulmayabilir. Buna rağmen tüm olası konformasyonların hesaplamalarının yapılması istenmesine rağmen hesaplama kaynağı ve zaman kısıtlılığı nedeniyle test etme imkânı bulunamadı. Çalışmamızdaki dezavantajların ilki; 5 µs'lik simülasyon uzunluğunun yanlış pozitif sonuç alınmasına sebep olabileceğidir. Validasyon setlerinde 5 µs uzunluğunda toplam 84 bağımsız iri taneli simülasyon yapılmasına karşın Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-Ubikuitin kompleksi oryantasyon simülasyonlarının aşağıda bahsedilen özel durumu göz ardı edildiğinde sadece iki yanlış pozitif sonuç elde edildi. Bu iki yanlış pozitif sonuçtan ilki; Kimerik SDZ CHI621'in Fab fragmentinin oryantasyonlarının simülasyonlarının 3. tekrarında 1 µs'den itibaren 2. oryantasyonda toplam serbest enerjide hızlı bir düşüş meydana gelerek doğal

formun serbest enerjisine yakın değerler elde edilmesidir. Diğer yanlış pozitif sonuç alınan çalışma ise Sil1-BiP kompleksi oryantasyon simülasyonlarının ikinci tekrarında 2. oryantasyonun toplam serbest enerjisinin 2,5 μ s'den itibaren hızla azalarak doğal formun serbest enerjine ulaşmasıdır. Protein-protein etkileşimi çalışmamızdaki bir diğer dezavantaj, diğer fizik tabanlı tüm atomik kenetleme yaklaşımlarına göre çalışmamız yüksek başarımlı ve performansa sahip olmasına karşın klasik protein-protein kenetleme algoritmalarına göre çok fazla hesaplama maliyeti olması ve zaman almasıdır. Bu durumun üstesinden gelmek ve 144 oryantasyonu da içeren tüm olası konformasyonel paternleri belirleyebilmek amacıyla, ileri çalışmalarda yaklaşımımızın geliştirilmesi ve bunun için öncelikle simülasyon sisteminde çok fazla hesaplama maliyeti oluşturan suyun çıkarılarak simülasyonların vakum ortamında gerçekleştirilip doğal formlar ile karşılaştırılması olacaktır. Su olmadığı için bağlanma paternleri daha hızlı oluşacağından simülasyon zamanlarını 5000 ns'den 500 ns'ye düşürülecek böylece simülasyon başına 100 kata kadar hesaplama maliyetinde azaltım hedeflenecektir. Ayrıca tek bir komutla 144 oryantasyonluk bütün sistemlerin giriş dosyalarını oluşturacak bir algoritma yazılması planlanmaktadır. Ayrıca bu oluşan oryantasyon sistemlerini bilgisayar kümelerinde eş zamanlı çalıştırıp analiz edecek bir bash scripti yazılması önceliklerimiz arasında olacaktır. Daha ileri çalışmalarda hedefimiz bu yaklaşımı server tabanlı olarak kullanıcı dostu arayüzü ile araştırmacılara sunmaktır.

Eksiklikleri ve avantajları irdelenen protein-protein etkileşiminde, iri taneli kübik oryantasyon yaklaşımıyla dört farklı protein kompleksinin doğal formlarıyla kıyaslanması test edilerek validasyonları gerçekleştirildi.

Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-Ubikuitin kompleksinin oryantasyon simülasyonlarında elde edilen sonuçlardan farklı olarak doğal form ile oryantasyonların simülasyonlarının toplam serbest enerji değişimleri arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Abriata ve arkadaşları ubikuitin dimerlerinin non-kovalent bağlanma ve ayrılma etkileşimlerini tüm atomik çözünürlükte simüle ettikleri çalışmalarında her bağımsız simülasyonda ubiquitin'in farklı agregatlarının oluştuğunu gözlemlemişler ve bunun kuvvet alanı optimizasyon eksikliğinden kaynaklandığını iddia etmişlerdir (Abriata & Dal Peraro, 2015). Farklı ubikuitin dimerlerinin XRAY kristalografileri incelendiğinde Ubikuitin dimerlerini içeren 2PE9, 2PEA, 2XK5, 3M3J, 5KHV, 1AAR, 3AUL, 3NS8, 2MBO, 2MBQ ve 2MWS kodlu dimer yapıları arasında bağlanma konformasyonu bakımından uyum gözlenmemesi ubikuitin'in çoklu bağlanma bölgesine sahip olduğunu göstermektedir. Çalıştığımız diğer protein komplekslerinden farklı olarak çoklu bağlanma paternlerinin olması kovalent ve non-kovalent bağlanabilme kabiliyetine sahip ubikuitin'in bağlanacağı proteine göre farklı bağlanma paterni gösterdiğini açıklamaktadır.

Ayrıca ubikuitinin birden fazla bağlanma paternine sahip olması onun poliubikuitinasyonunu da açıkladığından, çalışmamızda da ubikuitin ve ubikuitin benzeri proteinin etkileşiminde birden fazla doğal form oluşabileceğini net bir şekilde göstererek deneysel kristal yapıların neden birden fazla bağlanma konformasyonuna sahip olduğu gösterildi.

Ubikuitin-USP2 kompleksi oryantasyonlarının ve doğal formunun 5 Å ve 15 Å uzaklıkta iki grubun iri taneli simülasyonu sonunda elde edilen sonuçları irdelendiğinde doğal formun iri taneli MD simülasyonunun serbest enerji değişiminin en düşük değer olan -3000 kJ/mol değerine yaklaştığı gözlemlendi. Ona en yakın değer ise doğal forma göre 15 Å mesafe uzaklıkta yerleştirilen oryantasyonda -2500 kJ/mol değerinin altıyken 5 Å mesafede ise -2900 kJ/mol değerlerine kadar düştüğü gözlemlendi. Bu durum oryantasyonların ayarlanmasında doğal forma göre protein uzaklıkları arttıkça simülasyon sonunda oluşacak yeni bağlanma paterninin doğal forma benzerliğinin azalacağı yönünden önemlidir. Diğer önemli konu ise MM/PBSA serbest enerji hesaplamalarının doğal formu tahmin etmede başarılı oluşudur. Ubikuitin-USP2 kompleksinin tüm iri taneli simülasyonları incelendiğinde doğal bağlanma paternine yaklaştıkça serbest enerji değişiminde artışı net şekilde gözlemlendi. Diğer oryantasyonların iri taneli MD simülasyonlarının MM/PBSA serbest enerji değişimlerini incelediğimizde hiç birinin -2000 kJ/mol'ün altına inmediği gözlemlendi. Bu durumdan dolayı -2000 kJ/mol değeri eşik değer olarak kabul edilerek bu değer altına inen oryantasyon simülasyonları dikkate alındı.

Kimerik SDZ CHI621 Fab dimerinin kübik oryantasyonları ve doğal formunun iri taneli MD simülasyonlarının MM/PBSA toplam serbest enerji değişimleri incelendiğinde doğal formun serbest enerji değişimi -2862,66 kJ/mol olarak hesaplanırken 1. oryantasyonda bu değer -3016 kJ/mol olarak hesaplandı. Doğal forma göre proteinlerin 5 Å kadar birbirinden uzaklaştırıldığı 1. oryantasyonun simülasyon sonunda bağlanma paterninin benzerliğinin çok yakın olmasına karşın 1. oryantasyonda iki zincirden birinin diğerinin içine doğru bükülerek doğal formdan daha sıkı bağladığı gözlemlendi. Bunun haricindeki oryantasyonlarda -2000 kJ/mol olarak belirlenen eşik değere ulaşamazken 3. tekrardaki 2. oryantasyonda amiloid forma benzer şekilde bir bağlanma paterni oluşarak eşik değere yakın serbest enerji değerleri ölçüldü. Bundan da anlaşılacağı üzere daha öncede bahsedildiği gibi simülasyon uzunluğu arttıkça yanlış pozitif sonuç verebilme olasılığının arttığı görüldü. 1.2 µs'lere kadar toplam serbest enerji -1000 kJ/mol düzeylerinde seyrederken 1.5 µs'ye doğru hızlı düşüş ile eşik değere ulaşıldığının gözlenmesi simülasyon uzunluğunun yanlış pozitif sonuçlar elde edilmemesi amacıyla kısa tutulması gerektiğini gösterdi. Ayrıca validasyon setimizin en esnek yapısı olan fab fragment kompleksinin simülasyonu sonucu elde edilen veriler doğal formu

tahmin etmede protein esnekliğinin sonucu olumsuz etkilemediğini bize göstermesi açısından önemliydi.

BİP'in Sil1 ile bağlanma paterninin test edildiği 4. ve son validasyon çalışmalarında, üç tekrarlı kübik oryantasyonların simülasyonunda doğal formun iri taneli MD simülasyon sonucu olan -3000 kJ/mol'ün en yüksek serbest enerji değişimi olduğu gözlemlendi. Yine doğal forma göre 5 Å mesafede yerleştirilen 1. oryantasyonun serbest enerji değişimi -3000 kJ/mol'e yaklaşarak doğal forma yakın bağlanma paternleri elde edildi. Buna karşın 2. tekrarda 1. oryantasyonda bağlanma paternine rastlanmazken 2. oryantasyonun serbest enerji değişimi 2.5 μ s'den itibaren hızla artarak eşik değerinin altına ulaştı. Daha önce de belirtildiği gibi bu komplekste de simülasyon uzunluğundaki artışın yanlış pozitif sonuç vermesi açısından önemli bir dezavantaj olarak değerlendirildi. Bu yaklaşım, BİP-Sil1 etkileşim hesaplamalarında da doğru bağlanma paterninin yakalanması çalışmamızın ana başlığı olan BİP-IRELD etkileşiminin araştırılmasında bizi doğru şekilde yönlendirdiğini gösterdi.

İri taneli kübik oryantasyon yaklaşımı eksiklik ve dezavantajlarına rağmen 4'lü validasyon setinin 3'ünde çok başarılı şekilde doğru bağlanma paternini tahmin etmede bize rehberlik etti. Dört farklı protein kompleksinin tüm oryantasyonlarının ROC eğrisi incelendiğinde doğruluk ölçüsü -2000 kJ/mol'de 0,88 ile validasyon için çok iyi bir değer olarak hesaplandı. Bu durum da geliştirilen iri taneli kübik oryantasyon yaklaşımı, yanlış pozitif ve negatif durumların ayırıcı gücünün gösterilmesinde çok güçlü olduğunu gösterdi.

BİP-IRE1LD kübik oryantasyon çalışmamıza başlamadan önce 5e84 kodlu BİP ve 2hz6 kodlu IRE1LD'in yapısal eksikliklerini gidermemiz gerekti (Yang vd., 2015; Zhou vd., 2006). BİP proteininde bazı rezidülerin fonksiyonel gruplarında eksiklikler gözlemlendi ve bu eksiklikler Dunbreak ve arkadaşları tarafından geliştirilen rotamer kütüphanesi ile tamamlandı (Dunbrack & Karplus, 1993). IRE1LD'in ise daha önce bahsedildiği şekilde kayıp rezidüleri tekrar modellendi. Proteinlerin X-RAY kristal yapılarında "disordered" olarak tanımlanan proteinlerin düzensiz motifleri yüksek esneklikte olduklarından koordinatlarının belirlenmesi X-RAY kristalografi metoduyla mümkün olamayabilmektedir. Bunun yanında proteinlerin bu düzensiz domainleri genellikle bağlanmada ya da bazı katalitik aktivitelerde çok kritik öneme sahip olabilmektedir (Wright & Dyson, 2015). İki proteini yeniden yapılandırdıktan sonra yapısal validasyonu için molprobity skor kullanılmasının nedeni bu metodolojinin kötü rotamerlerden ramachandran grafiğine, kötü bağ ve açılardan cis prolin durumlarına göre bir çok yapısal durumu inceleyip yapının sağlamlığı ve stabilitesi konusunda doğru bilgi verebilmesidir (V. B. Chen vd., 2010). Yaptığımız çalışmada yeniden yapılandırma sonucunda

molprobit skora göre iki proteinde ilk durumlarına göre daha iyi skorlar alındı. Yeniden yapılandırılarda en çok zorlanılan kısım IRE1LD'in düzensiz 4. bölgesi oldu. Bu bölgenin yeniden modellenmesinde I-TASSER veri sunucusu içinde yer alan QUARK modülü kullanıldı. De-novo yapı tahmininde QUARK sunucusunu kullanılmasının gerekçesi ise homoloji modeli için referansı olmayan yapılar için özellikle geliştirilmiş olan QUARK veri sunucusun, CASP9 ve CASP10 deneylerinde serbest modelleme kategorisinde birinci olmasıdır (Xu & Zhang, 2012).

BİP'in yapısal analizinin gerçekleştirildiği çalışmamızda tüm atomik MD simülasyon sonucunda SBD α domaini genellikle stabil kalırken kısa bir süre için bükülme meydana getirdiği ve tekrar eski haline döndüğü gözlemlendi. Üstelik bu hareket iri taneli simülasyonda ve 6ASY kodlu BİP'i simüle ettiğimizde de gözlemlendi. Farklı kuvvet alanı ile ve farklı çalışma gruplarına ait BİP'in yapısında benzer bükülmenin gözlenmesi, bize bu durumun kuvvet alanı yada proteinin yanlış yapılandırılmasından kaynaklanmadığını gösterdi. Ayrıca BİP'in simülasyon boyunca RMSD değişimi, bükülme anında 113. ve 578. rezidülerin birbine göre konumları ve ayrıca SBD ve NBD domainlerinin simülasyon boyunca serbest enerji değişimi ile birlikte grafik üzerinde gösterildiğinde (grafik 15) iki konformasyonel durum daha net şekilde gözler önüne serildi. Serbest enerji yüzeyi, içerdikleri derin çukurlar, düzlükler ve tepeler ile proteinlerin konformasyonel geçişleri hakkında önemli bilgiler vermektedir. Konformasyonel faz uzayında protein molekülünün enerji yüzeyinin matematiksel gösterimi 80'lere kadar dayanmaktadır. Ooi ve arkadaşları henüz bilgisayarların yaygınlık kazanmadığı ve sadece özel laboratuvar ve kurumların bünyesinde bulundurabildiği dönemde yayınladıkları makalede küçük bir protein olan sığır pankreatik tripsin inhibitörünün dihedral açıları, ϕ s ve ψ s'in konformasyonel enerjilerini faz uzayında matematiksel olarak hesaplamayı başarmışlardır. Bu çalışma ile ortada en düşük global minimuma sahip iki boyutlu bir grafik elde edilmiş ve konformasyonel geçişlerin pürüzsüz bir yüzeyde ilerlediğini göstermişlerdir (Ooi & Nishikawa, 1981). Bu grafik çalışmamızda üç boyutlu olarak ele alınmış olsaydı ortada derin bir çukur olan huniye benzer bir şekil elde edilmiş olurdu. Bu şekilde derin bir çukurun varlığı, bu proteinin bir konformasyonel doğal formunun olduğunu, global minimum olarak adlandırılan derin çukurun dibinde proteinin en düşük enerjiye sahip stabil doğal formda olduğunu bize gösterecekti. Proteinlerin enerji yüzeylerinin belirlenmesinde üstte bahsedildiği gibi birçok değişken kullanılabilir. Biz yaptığımız çalışmada özellikle SBD α burkulmasının zamana bağlı enerjetik değişiminin gözlenmesi amacıyla RMSD, mesafe ve Van der Waals enerji terimlerini kullanıldı. Ayrıca iki minima arasında da yüksek tepelerin varlığı iki durum arasında konformasyonel geçişin termodinamik olarak çok kolay olmadığını göstermesi açısından önemliydi. Elde edilen enerji yüzey haritasında iki minimumun olması,

proteinin iki doğal stabil forma sahip olduğu izlenimi verse de VdW enerji terimi yerine toplam enerji kullanıldığında harita üzerinde iki yerine bir tane derin minimum bir tane de yüzeysel minima bölgesinin oluştuğunun gözlenmesi aslında BİP'in iki stabil konformasyonel duruma sahip olmadığını, asıl stabil durumunun SBD α 'nın doğrusal yapıda olduğunu, lokal minima bölgesinde gerçekleşen SBD α 'nın burkulduğu durumun bir geçiş konformasyonu olduğunu ifade etti.

BİP-SBD α alt domainin yüksek esnekliği Prody (Bakan vd., 2011) adlı yapısal dinamik analizi yazılımı ile de gösterildi. Prody ile BİP-SBD α 'nın 100 ns boyunca gözlenen konformasyonel hareketinin normal mod analizi gerçekleştirildiğinde hareketli rezidüleri oklar ile şematize edildiğinde uzun okların SBD α 'nın yüksek esnekliğe sahip olduğu görüldü. Bahar ve ekibi tarafından geliştirilen Prody'nın kullandığı "Anisotropic network" modeli ile yüksek korelasyonda deneysel uyumluluğa sahip olduğu gösterilmiştir (Meireles, Gur, Bakan, & Bahar, 2011).

BİP'in ATP ve ADP bağlı iki konformasyonunda ATP bağlı formda BİP -NBDII β kapalı konumda yer alırken ATP hidrolizi sonrası ADP bağlı formunda ise BİP -NBDII β 'da konformasyonel değişiklik meydana gelerek dışa doğru açılma oluşmaktadır (Macias vd., 2011). Bu iki açık ve kapalı formu birlikte incelendiğinde konformasyonel değişikliğin kaynağının 209-217 rezidüleri arasında kalan ve menteşe olarak adlandırılan loop motifinin olduğu gözlemlendi. Bizi bu sonuca iten durum ise bu iki protein rezidülerinin N-terminal uç tarafındaki rezidüler ile C-Terminal uç tarafındaki rezidüler hizalandığında 0.5 Å civarında yapısal benzerliğin bulunması oldu. Oysa iki protein için 209-217 arası rezidüleri hizalayıp RMSD değeri hesaplandığında 2 Å'nun üstünde bir sonuca ulaşıldı. Özellikle bu menteşe yapısının başında yer alan TYR 209'un değişken grubunun anahtar gibi dönüş gerçekleştirmesi ATP hidrolizini kolaylaştırıp NBDII β 'nın açılmasını sağlayan j domaini içeren HSP40 şaperonunun bu rezidünün farklı bir rotamerini oluşturmada rolü olup olmadığını düşündürdü. BİP'in açık ve kapalı konformasyonunu gösteren bir çok çalışma literatürde yer almasına rağmen menteşe bölgesinin bu konformasyonel açılmadaki rolünden bahsedilmemiştir (Wisniewska vd., 2010; Yan vd., 2011; Yang vd., 2015). Ayrıca Alderson ve arkadaşları allosterik hsp70 ve onun yardımcı şaperonu hsp40'ın yapısı ve bir birleriyle etkileşimi üzerinde yoğunlaştıkları derlemede HSP40 j domainin BİP-NBD 185-195 aralığındaki rezidüler ile değil BİP -SBD "linker" rezidü dizisi ile etkileşim kurduğu hipotetik model üzerinde durmuşlardır (Alderson, Kim, & Markley, 2016). BİP ile zayıf etkileşim kurduğu için kompleks olarak elde edilemeyen HSP40 j domainin literatürde genel olarak BİP -SBD linker domaini ile kompleks oluşturarak ATP hidrolizini teşvik ettiği düşünülmesine karşın Malinverni ve arkadaşlarının 2017'de

yayınladıkları makale bu ezberi bozmuştur. (Alderson vd., 2016; Jiang vd., 2007; Malinverni, Jost Lopez, De Los Rios, Hummer, & Barducci, 2017).

Malinverni ve arkadaşları yaptıkları çalışmada iri taneli moleküler dinamik simülasyon ile hsp40 j domaininin heliks II kısmı ile NBDIIA lobunun etkileşim içinde olduğunu göstermişlerdir. Bu literatür bilgisiyle bağlanma paterninin HSP70'in açık ve kapalı konformasyonlarında menteşe rolü olan bölge ile ilgili olması sonuçlarımızı destekledi (Malinverni vd., 2017).

Literatürü araştırdığımızda BİP'in küçük molekül inhibisyonları yada IRE1LD dışında başka proteinler ile etkileşimlerinin kristalografik yada moleküler dinamik simülasyon çalışmalarına rastlanmasına karşın BİP'in IRE1LD ile moleküler dinamik etkileşimini gösteren bir çalışmaya rastlanmadı (Bhattacharjee, Devi, & Mishra, 2015; Schuermann vd., 2008). Literatürde BİP'in IRE1LD ile etkileşiminin özellikle NBD domaini üzerinden gerçekleştiği bilinmesine rağmen bağlanmanın moleküler mekanizması ve nasıl gerçekleştiği anlaşılamamıştır (Carrara vd., 2015). Çalışmamızda BİP-IRE1LD'in kübik ve BİP NBDIIβ eksenli oryantasyonlarının iri taneli moleküler dinamik simülasyonlarının gerçekleştirilmesiyle literatürdeki bu konudaki eksikliğin giderilebileceği düşünüldü. Geliştirilen iri taneli kübik oryantasyon yaklaşımının daha önce gerçekleştirilen validasyon çalışmamızda başarılı olduğu gösterildikten sonra bu yaklaşım ile bağlanma paterni bilinmeyen BİP ve IRE1LD etkileşiminin araştırmasına karar verildi. Daha önce de bahsedildiği gibi IRE1LD'in düzensiz domaininin yer aldığı ve BİP bağlanmasında rolü olduğu düşünülen 4. bölge BİP proteinine dönük olacak şekilde kübik yerleşim yapılarak kübik oryantasyonları düzenlendi. Proteinler arası mesafeyi 5 Å yerine 10-15 Å olarak alınmasının nedeni protein etkileşiminde farklı bağlanma paterni oluşturma olasılığını artırmaktı. Böylece IRE1LD'in BİP'e dönük yüzünün ayrıca farklı açılardan bağlanabilmesine imkan tanınmış olundu. Çalışmaya başlanıldığında BİP'in SBDα domainini de içeren 5e84 kodlu kristal yapı mevcuttu. O dönemde başka bir alternatif olmadığından bu proteinin protein- protein etkileşimlerinde kullanılmasına karar verildi (Yang vd., 2015). İnsan IRE1LD yapısı olarak ise hala daha muadili ortaya çıkarılamamış olan 2hz6 kodlu kristal yapısı tercih edildi.

Carrara ve arkadaşları yaptıkları çalışmada BİP ATPaz domaininin IRE1LD'e bağlanmada rolünü immuno presipitasyon ve FRET deneyleri ile araştırmışlar ve ATP bağlı BİP'in IRE1LD'in 2-4 bölgesine bağlandığını göstermişlerdir. Grup, Kimata ve arkadaşlarının aksine IRE1LD 5. bölgenin bağlanmada önemli olmadığını yaptıkları in vitro mutagenез çalışmaları ile ortaya çıkarmışlardır (Carrara vd., 2015; Kimata vd., 2004). Ayrıca Zhou ve ekibi İnsan IRE1LD'in

kristal yapısını ortaya koydukları çalışmada 4. bölgenin yer aldığı yüksek esneklikteki C terminal uçtan Val-307'ye kadar olan kısmın BİP ile etkileşimde rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (Zhou vd., 2006). Bizim de bu çalışmalardan hareketle BİP-IRE1LD etkileşimlerinde olası bağlanma paternlerinin araştırması amacıyla daha önce valide edilen protein-protein kenetleme yaklaşımı ile iri taneli kübik oryantasyonlu moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirildi. Çalışmamızın başında BİP merkezde ve küp gibi düşünülerek IRE1LD'nin 4. bölgesi bu kübün her bir yüzüne dönük olacak şekilde 10 Å -15 Å uzaklıkta toplam altı oryantasyonu hizalanıp iri taneli ölçekte 2 µs boyunca moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirildi. Simülasyon sonunda tüm oryantasyonlarda bağlanma paternleri oluştu fakat bağlanma paternleri hangisinin doğru form olduğu hakkında bilgi vermediğinden bağlanmaların serbest enerjisi MM/PBSA metoduyla belirlendi. Oryantasyonların simülasyonu sonunda bağlanma serbest enerjileri hesaplandığında 6. oryantasyonun -2000 kJ/mol olan eşik değere yaklaşarak en düşük toplam serbest enerjisine sahip olduğu ve bağlanmanın özellikle BİP NBDIIβ ve SBDα alt domainleriyle IRE1LD'in direkt etkileşerek gerçekleştiğini gösterdi. Ayrıca 4. bölgenin içinde yer alan IRE1LD esnek disordered domainin de bağlanmada rol aldığı gösterilerek bağlanmanın Zhou ve Carrara'nın çalışmaları ile uyumlu olduğu sonucuna varıldı (Carrara vd., 2015; Zhou vd., 2006). 6. oryantasyonun MD simülasyonu sonunda elde edilen bağlanma paterni iri taneli modelden atomik çözünürlüğe dönüştürüldükten sonra vakum ortamında 10 ns simüle edildiğinde ilginç bir şekilde IRE1LD konumunun 59,71° açısal hareketle yer değiştirdiği ve Sil1'in bağlanma paternine benzer bir patern oluşturduğu gözlemlendi (Yan vd., 2011). Çalışmanın sulu değilde vakum ortamında gerçekleştirilmesinin nedeni protein kompleksinin konformasyonel değişikliğini daha hızlı gözlemlemektir.

Çalışmamızda etkili olan 4. ve 6. oryantasyon 6'şar kez tekrar edildiğinde en düşük toplam serbest enerjinin 4. oryantasyonun 2. tekrarında gözlemlendi fakat bu değer -1500 kJ/mol değerine ancak ulaşabilmişti. Wetzel ve arkadaşları 2017 sonlarında yaptıkları çalışmada ERdj4'ün j domaininin BİP'e bağlanarak ATP hidrolizini hızlandırdığını ve BİP'in hidroliz sonrası kapalı formdan açık forma geçerek IRE1 ile bağlanma afinitesinin arttığını göstermişlerdir (Amin-Wetzel vd., 2017). Ayrıca Jiang ve arkadaşları ATP hidrolizi sonrasında SBD ve NBD etkileşiminin Swain ve arkadaşlarının aksine bağlı kalmaya devam ettiğini belirtmişlerdir (Jiang vd., 2007; Swain vd., 2007). Yaptığımız çalışmada BİP kapalı form ile IRE1LD etkileşimi araştırıldı. Daha önce detaylı olarak anlatılan BİP'in açık ve kapalı formları dikkate alınarak çalışmamız her form için üç tekrarlı olacak şekilde dizayn edildi. Ayrıca önceki çalışmadaki en iyi bağlanma paternini gözeterek 6'lı kübik oryantasyona iki oryantasyon daha eklenip

simülasyon uzunluğu 5 μ s'ye çıkarıldı. Çalışma sonunda BİP'in açık ve kapalı formların IRE1LD ile bağlanma paternleri incelendiğinde kapalı formda bağlanmanın daha az gerçekleştiği gözlemlendi. Ayrıca tüm oryantasyonlar hesaba katılarak toplam serbest enerjileri göz önüne alındığında, toplam serbest enerjilerinin açık formun oluşturduğu bağlanma paternlerinden dramatik olarak daha düşük olduğu belirlendi. Bu bulgumuz Wetzel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki gibi neden açık formun IRE1LD'e bağlanmada daha yüksek afiniteli olduğunu açıklaması yönünden önemlidir (Amin-Wetzel vd., 2017). Ayrıca önceki iki kübik oryantasyon çalışmasında da etkili olduğu görülen BİP-NBDII β domaini merkez olarak kabul edilerek IRELD'in dört yüzü ayrı ayrı merkeze dönük olacak şekilde ve her yüzü 180° döndürülerek 8'li iri taneli oryantasyon simülasyonları gerçekleştirildi. Çalışma sonunda yine önceki çalışmalar ile uyumlu olarak en düşük toplam serbest enerjinin açık formundaki bağlanma paterninde olduğu gözlemlendi. Açık ve kapalı formların tüm oryantasyonlarının ortalama serbest enerjilerinin toplamı incelendiğinde ise yine açık formların toplam enerjisinin daha düşük olduğu gözlemlendi. Literatürde BİP'in ve bağlı bulunduğu HSP70 ailesinin başka proteinler ile bağlanma paternleri incelendiğinde NBDII β 'nin bağlanmada rol aldığı görüldü. Schuermann ve arkadaşları Hsp110: Hsc70 kompleksinin X-RAY kristal yapısını ortaya çıkarmışlardır. Kristal yapı incelendiğinde HSP110'nun SBD α domaininin NBDII β domaini ile birlikte HSC70 ile bağlanmasında rol aldığı net şekilde görülmektedir. Kristal yapıda HSP110'nun SBD α domaini içindeki 568-579 arası rezidüleri T278/Q279 ve HSC70'in NBDII β alt domaininin 289-304/307'ci heliks I rezidüleri ile 8 hidrojen bağı ve dört yük çifti ile kontak kurmaktadır. Ayrıca HSC70 NBDII β alt domaininin açık konformasyon rezidüleri D285 ve E283, pozitif yüklü Hsp110 NBD rezidüleri (K56/K110/R262) ile iyonik etkileşim oluşturmaktadır (Schuermann vd., 2008). Bir başka çalışmada Polier ve arkadaşları Sse1p-Hsp70 kompleks yapısının kristal yapısını aydınlatmışlar ve bu çalışmada Sse1p'nin üç sarmal bobin domaininin HSP70 NBDII β alt domaini ile kenetlendiğini göstermişlerdir (Polier, Dragovic, Hartl, & Bracher, 2008). Yan ve arkadaşları ise BİP'in, Sil1 ile oluşturduğu kompleksin kristal yapısını aydınlatmışlar çalışmada Sil1'in BİP ATPaz alanının IIB alt domainini kelepçe gibi kavrayarak bağladığını ve bu bağlanma ile IIB lobunda 13.5°'lik rotasyon meydana getirildiğini göstermişlerdir (Yan vd., 2011). Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki BİP ve onun üst ailesi HSP70'in NBDII β alt domainin diğer proteinler ile bağlanmada önemli role sahiptir. Ayrıca bu bağlanmanın stabilitesinde SBD α domainin de rol oynadığı görülmektedir.

Yapılan çalışmalar IRE1-JNK yolağının ileri derece ER stresi koşullarında hücreyi apoptoza sürüklediğini ve IRE1-JNK yolağına bağımlı apoptozun kardiyak sistemi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (Y. Chen & Brandizzi, 2013; Minamino & Kitakaze, 2010; Scull & Tabas,

2011). Bu bilgilerden hareketle, kardiyovasküler hastalıklarda etken madde olarak kullanılan ilaç ve bu tür hastalıklarda etkileri sıklıkla çalışılan Flavonoid türevi moleküllerin IRE1-JNK yolu üzerindeki IRE1, ASK1 ve JNK1 ile olan etkileşimleri moleküler kenetleme, moleküler dinamik simülasyon ve serbest enerji hesaplamaları ile araştırıldı. Günümüzde hesaplama kaynaklarının hızla artması, ucuz ve ulaşılabilir olmasının yanında algoritmalarında hızla gelişerek deneysel veriler ile yüksek derecede uyumlu hale getirilmesi ve bu yaklaşımların popülaritesinin hızla literatürde yayılması nedeniyle çalışmamızda protein-ligand etkileşimlerini belirlemede hesaplamalı biyolojiden yararlanılmasına karar verildi (Markowetz, 2017). Çalışmamızın başında protein-ligand etkileşimlerini belirlemede genel bir fikir vermesi amacıyla hızlı bir metod olan moleküler kenetleme yaklaşımları kullanıldı. Bu aşamada dört farklı algoritma kullanılmasının sebebi tüm algoritmaların normalize çıktılarının ortalamalarını alarak yanlış pozitif sonuçlarının oluşmasının azaltılmasıydı. Ayrıca elde edilen normalize sonuçların doğruluğunun test edilmesi amacıyla çalışmamızda doğal Kinaz İnhibitörleri de kullanıldı. Çalışma sonunda normalize değerler incelendiğinde Kinaz İnhibitör'lerinin en yüksek afiniteli moleküller olarak hesaplandığı görüldü. Bu da pozitif kontrolün doğru çalıştığını göstermesi açısından önemliydi. Sanal tarama olarak adlandırılan bu yaklaşımlar en iyi molekülün belirlenmesi amacıyla büyük ölçekteki protein ligand havuzlarının etkileşim hesaplamalarının hızlı ve düşük hesaplama maliyetle yapılmasına izin verdiği için sıklıkla tercih edilmektedir. Buna karşın hızlı ve efektif olmasının yanında yanlış pozitif sonuçlar üretebilmektedir (Lionta vd., 2014). Çalışmamızda Kinaz İnhibitörleri, Flavonoidler, Statinler, Anti-Aritmik İlaçlar ve ACE İnhibitörlerinin üç protein için ayrı ayrı moleküler kenetleme hesaplamaları yapıp normalize edilerek gruplandırıldıktan sonra etkinlikleri incelendiğinde Kinaz İnhibitör'lerinin en düşük skor ile en yüksek afiniteli moleküller olduğu belirlendi. Bu sonuçlar dört farklı algorithmadan elde edilen toplam normalize sonucun doğruluğunu gösterdi. Sonuçlar her protein için ayrı ayrı değerlendirildiğinde etkinliklerin IRE1'de ASK1 ve JNK1'den daha farklı olduğunu gözlemlendi. ve bunun nedeninin IRE1'in kinaz domaini olmasına karşın diğer proteinler gibi MAP kinaz ailesi içinde yer almaması ve katalitik merkezindeki rezidü yerleşiminin farklı olması olarak yorumlandı. Kinaz inhibitör'leri IRE1 ve JNK1'de en etkili moleküller olarak görülürken, ASK1 ile olan etkileşiminde ilginç bir şekilde çok az farkla Statin'lerin arkasında kaldığı saptandı. Statin'lerin genel etkinliği ve her protein için ayrı ayrı etkinlikleri incelendiğinde, ASK1 ve JNK1'de Kinaz İnhibitörleri kadar etkin oldukları, IRE1'de ise çok belirgin bir etkinliğe sahip olmadıkları belirlendi. Bu sonuçlardan hareketle Statin'lerin IRE1 yolu üzerinde JNK fosforilasyonunu azaltacağı ve apoptozu azaltmada rolü olabileceği gösterilmiş oldu. Literatüre bakıldığında Statinlerin kardiyak hücrelerde JNK1 fosforilasyonunu inhibe etmede,

apoptozu baskılamada rolü üzerine çalışmalara rastlanmaktadır. Zhang ve arkadaşları kardiyomiyositlerde Atorvastatin'in etkinliğini araştırdıkları çalışmada, hücreleri H₂O₂ (600 µM) ile muamele edip daha sonra farklı dozlarda Atorvastatin ilave etmişlerdir. Ekip Atorvastatin ile muamele edilmiş ve edilmemiş hücreleri kıyasladıklarında Atorvastatin ile muamele edilen hücrelerde H₂O₂ bağımlı apoptozun anlamlı düzeyde düştüğünü gözlemişlerdir (L. Zhang vd., 2015). Çalışmada ER stresinin rolüne değinmemelerine karşın oksidatif stresin ER stresi ile beraber meydana geldiği ve uzun dönem ER stresi ile aktive olan UPR'in apoptoz yollarını aktif hale getirdiği belirtilmektedir (Cao & Kaufman, 2014). Li ve arkadaşları abdominal aort anevrizması üzerine yaptıkları çalışmada Atorvastatin ve Simvastatin'in aort dokusu ve RAW 264.7 hücre hatları üzerinde etkilerini gözlemek amacıyla abdominal aort anevrizması modeli oluşturmuşlar ve apoptoz deneyleri yapmışlardır. Çalışma sonunda Atorvastatin ve Simvastatin ile muamele edilen doku ve hücrelerde ER stresi kaynaklı apoptozun anlamlı düzeyde azaldığını göstermişlerdir (Li vd., 2017). Malik ve arkadaşları Pitavastatin'in ratlarda iskemi-reperfüzyon üzerine etkilerini araştırdıkları in-vivo çalışmalarında, Pitavastatin ile muamele sonrası RAT'larda NF-κB protein ifadesi ve proapoptotik Bax ve Caspase-3 ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığını antiapoptotik Bcl-2'nin ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (Malik vd., 2011). Malik ve arkadaşları çalışmalarında ER stresi yollarına değinmemelerine karşın Tam ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada IRE1-JNK yolağının inhibisyonunda Pitavastatin'in ER stresi ve apoptozun azalmasında rolü olabileceğini düşündürdü (Dhanasekaran & Reddy, 2008; Tam, Mercado, Hoffmann, & Niwa, 2012). Düşüncemizi destekler şekilde Song ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ratlar üzerinde kalp yetmezliği modeli oluşturmuşlar ve bu modelleri Atorvastatin ile muamele ettiklerinde ER stresi yanıtını aşağı regüle ederek apoptozu azalttıklarını göstermişlerdir (Song vd., 2011). Yapılan moleküler kenetleme çalışmasında Statinlerin Kinaz İnhibitörleri ile benzer etkinlik göstermesi bize Statinlerin potent map kinaz inhibitörleri olabileceğini düşündürdü. Kibayashi ve arkadaşları da insan aortik endotel hücrelerinde C-reaktif protein ile map kinaz yolağını aktif ettikleri çalışmada, hücreleri Pitavastatin ile muamele ettiklerinde map kinaz protienleri JNK, p38 ve ERK'in fosforilasyonunun anlamlı düzeyde düştüğünü gözlemişlerdir (KIBAYASHI vd., 2005). Statinlerin ER stresi kaynaklı apoptozu azaltıcı etkileri üzerine çalışmalar olmasına karşın bunun tam tersini savunan çalışmalara da rastlanmaktadır. Liang ve arkadaşları Lovastatin'in makrofajlar üzerinde etkilerini araştırdıkları çalışmada Lovastatin'in JNK yolağını aktive ederek Rac1 ve Cdc42'nin ekspresyonunu arttırıp apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (Liang, Liu, & Zhou, 2006). Bir başka çalışmada Godoy ve arkadaşları Lipofilik Statin Atorvastatin ile hidrofilik Statin, Pravastatin'in kardiyak miyositler üzerindeki etkilerini araştırdıklarında, Atorvastatin'in

ERK1/2, AktSer473 ve mTOR sinyal yollarını inhibe ederek sağ kalımı azalttığı ve apoptozu arttırdığını, Pravastatin'in her hangi bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışma Atorvastatinin kinaz inhibisyonunu göstermesi açısından çalışmamız ile uyumlu iken apoptotik yolak üzerindeki etkileri konusundaki düşüncelerimiz ile çelişkili bulundu. Literatürdeki bu çelişkili duruma dikkat çeken Wood ve arkadaşları Statinlerin bcl-2 ailesi üyelerinin seviyelerini değiştirerek kanser hücrelerinde apoptozu teşvik ederken, kanser olmayan hücrelerde tam tersi olarak apoptozu engellediğini gösteren çalışmaları incelemişlerdir. Wood ve ekibi araştırmasında kanser hücrelerinde Statinlerin apoptoz teşvik edici özelliğininin yüksek doz uygulanmasından kaynaklandığını düşünmüşlerdir (Wood vd., 2013). Anti kardiyovasküler ilaçların IRE1 yolağı üzerine etkinlikleri ile ilgili hesaplamalı çalışmalara baktığımızda her hangi bir yayına rastlanılmamıştır. Bunun dışında bu etken maddeler ile ilgili diğer hesaplamalı çalışmalar incelendiğinde Medina ve arkadaşları Simvastatin ve Rosuvastatin'in HMG-CoA redüktazın katalitik merkezi üzerindeki etkilerini α -Asarone ile karşılaştırmalı olarak moleküler kenetleme yaklaşımı ile araştırmışlar α -asaron yapısından hareketle HMG-CoA redüktaz inhibitör aktivitesini geliştirmek için modifikasyonlar önermişlerdir (Medina-Franco vd., 2005). Başka bir çalışmada Wang ve arkadaşları Atorvastatin analoglarının HMG-CoA redüktaz üzerinde etkinliklerini göstermek amacıyla moleküler kenetleme ve moleküler dinamik hesaplamalar yapmışlardır (Z. Wang vd., 2014). Hou ve arkadaşları ise yaptıkları hesaplamalı ve deneysel çalışmada Flavonoid'lerin potent kinaz inhibitörü olabileceğini göstermişlerdir (D.-X. Hou & Kumamoto, 2010). Bizim yaptığımız çalışmada ise Flavonoid grubu etken maddelerin IRE1, ASK1 ve JNK1 üzerinde belirgin bir etkinliği olmadığı buna karşın Norizalpin'in ortalama kuvvet potansiyeli -12 kcal/mol'den düşük olması nedeniyle IRE1'e oldukça yüksek afinite gösterdiği belirlendi.

Moleküler kenetleme çalışmalarından sonra her grup için en iyi moleküller belirlendikten sonra etken maddelerin IRE1, ASK1 ve JNK1 üzerinde etkinlikleri daha güçlü bir metod olan MM/PBSA serbest enerji hesaplamaları ile araştırıldı. Protein-ligand komplekslerinin atomik moleküler dinamik simülasyonlarına dayanan bu yaklaşım moleküler kenetleme hesaplamalarının devamında kullanılması tavsiye edilmesine karşın termodinamik integrasyon ve Umbrella Örnekleme yaklaşımları kadar güvenilir değildir. Elde edilen değerler deneysel verilere göre çok yüksek olmasına karşın deneysel "ki" değerleri ile korelasyonları iyi seviyededir. Elde edilen serbest enerji hesaplama sonuçları değerlendirildiğinde IRE1 ve ASK1'de Sülfanomid ve Steurosporin kinaz inhibitörleri beklendiği gibi en düşük serbest enerji değerlerine sahip olurken, JNK1-sp600125 etkileşiminde kötü bir değer elde edildi. Bu sonuç moleküler kenetleme ve ileride bahsedeceğimiz Umbrella Örnekleme

hesaplamalarımızda da karşımıza çıktı. Bunun nedeni bu tür etkileşimlerinin yarışmalı değil yarışmasız inhibisyon olabileceğidir. Yarışmasız inhibisyonlarda genellikle protein ve etken madde arasında kovalent bağ meydana gelmekte ve protein tamamen işlevsiz hale gelebilmektedir. Bu tür yarışmasız inhibisyonlar QM/MM gibi multi ölçekli kuantum mekanik hesaplamalar ile gösterilebilmektedir (Lodola & De Vivo, 2012). Bunun yanında göreceli olarak daha küçük moleküllerin deneysel afiniteleri yüksek çıkabilmesine rağmen hesaplamalı yaklaşımlarda bu afiniteler genellikle daha düşük çıkabilmektedir (Carlson vd., 2008).

MM/PBSA ile etken madde-protein etkileşimlerini incelediğimizde IRE1 ile etkileşimde Atorvastatin, ASK1 ile etkileşimde Fosinopril ve JNK1 ile etkileşimde Pitavastatin en iyi afiniteye sahip moleküller olduğu gözlemlendi. Bu sonuç moleküler kenetleme hesaplamaları ile genel olarak tutarlı görünmesine karşın ASK1’de Statin etkinliğinin zayıf olması kenetleme hesaplamaları ile çelişki oluşturdu. Çalışmamızda ASK1’de Fosinopril göreceli olarak en yüksek afiniteli molekül olarak hesaplanmasına karşın literatürde bu molekülün Kinaz İnhibisyonu ya da ER stresi üzerine etkisi üzerine bir çalışmaya rastlanmadı. Yapılan MM/PBSA hesaplamalar Statin grubu etken maddelerin IRE1-JNK yolağının inhibisyonunda etkili olabileceğini gösterdi. Ayrıca diğer etken madde gruplarının proteinlere afinitelerinin düşük çıkmasının yanında yaptığımız literatür taramasında da Flavonoidler dışında herhangi bir ER stresinin azalmasına neden olduğu ya da Kinaz İnhibisyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. Flavonoidlerin kardiyo koruyuculuğu ile ilgili literatürde bir çok yayın yer almaktadır. Kim ve arkadaşları Biochanin A, Daidzein, Genistein, Luteolin, Quercetin ve Kaempferol’ün h9c2 kardiyak kas hücreleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada Flavonoid ile muamele sonucunda anti-apoptotik protein Bcl-2’nin ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde arttığını buna karşın proapoptotik Bax ve GRP78, XBP1, IRE1 gibi ER stresi proteinlerinin aşağı regüle olduğunu göstermişlerdir (D.-S. Kim vd., 2008, 2010). Yaptığımız moleküler kenetleme ve MM/PBSA serbest enerji çalışmalarında Flavonoidlerin çok fazla etkili olamadıkları buna karşın Umbrella Örneklemede Flavonoid’lerden Norizalpin’in (galangin) IRE1 üzerinde etkili olduğunu gözlemlendi.

MM/PBSA serbest enerji hesaplamalarından sonra literatürde en güvenilir yöntemlerden olan Umbrella Örnekleme hesaplamaları gerçekleştirildi. Umbrella Örnekleme ile protein-ligand etkileşimlerini tahmin etme yaklaşımı günümüzde en güçlü yaklaşımlar arasında yer almaktadır (Wu, 2010). Umbrella Örneklemenin en önemli avantajı lokal minima bariyerini aşarak global minimuma geçişin mümkün olabilmesidir. Umbrella Örnekleme ile Kinaz İnhibitör’lerinin afinitelerini hesapladığımızda IRE1’in inhibitörü olan Sülfanomid’in PMF değerini -10,15 kcal/mol olarak hesaplandı. Sülfanomid’in deneysel bağlanma serbest enerjisi

ise 13 nM olan IC50'den kcal/mol değerine dönüştürüldüğünde -10,76 kcal/mol olduğu bildirilmektedir (Harrington vd., 2015). JNK1 inhibitörü olan SCH772984'in PMF değeri -8.17 kcal/mol olarak hesaplandı. Sülfanomid'in deneysel bağlanma serbest enerjisi ise 1080 nM olan IC50'den kcal/mol değerine dönüştürüldüğünde ise -8.14 kcal/mol olduğu belirtilmektedir (Chaikuad vd., 2014). Elde edilen değerler ile deneysel IC50 verileri kcal/mol'e dönüştürüldüğünde değerlerin çok yakın olması validasyon açısından iyi görünmesine karşın, IC50-kcal/mol dönüşümünün yaklaşık değer vermesinde kullanıcı, pipetleme hataları, ortam basıncı ve sıcaklığı gibi deneysel koşulların tam bilinmemesi nedeniyle gerçek anlamda sapmalar oluşturabileceği göze alınmalıdır. Fakat bu sapmaların ortalama 1-2 kcal/mol kadar olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu gibi nedenlerden dolayı kantitatif değerler yerine bağıl değerler daha anlamlı olabilmektedir. Bizim çalışmamızda da inhibitörlerin bağlanma serbest enerjileri diğer etken maddeler ile kıyaslanarak analiz edildi. Bu nedenle bilinen kinaz inhibitörlerinin bağlanma serbest enerjisinin diğer etken maddelerden daha düşük olmasının çalışmamızda validasyon için gerekli ve yeterli olduğu düşünüldü. Kantitatif Umbrella örnekleme çalışmamızda deneysel veriler ile uyumlu sonuçlar alınmasına karşın bazı bilinen enzim inhibitörlerinin IC50 değerleri kcal/mol değerine dönüştürüldüğünde sapmalar gözlemlendi. Örneğin ASK1 inhibitörü olan Staurosporin'in PMF değerini -13.45 kcal/mol olarak hesaplandı, deneysel bağlanma serbest enerjisi ise 5.31 nM olan IC50'den kcal/mol değerine dönüştürüldüğünde -11,29 kcal/mol olduğu belirlendi (Vin vd., 2014). Bu hesaplamada yaklaşık 2 kcal'lık bir sapma görülmesine karşın Staurosporin'in diğer etken maddeler ile kıyaslandığında en düşük bağlanma serbest enerjisine sahip olmasının validasyon için yeterli olduğu düşüncesi oluştu. Buna karşın JNK inhibitörü olan SP600125'in 40 nM olan IC50 değerini kcal/mol'e dönüştürüldüğünde -10.09 kcal/mol değerine karşılık -4,37 kcal/mol değeri hesaplandı. Elde edilen bu çelişkili sonucun küçük molekül ağırlıklı etken maddelerin Umbrella Örnekleme hesaplamalarında hatalı hesaplamalara neden olabileceği şeklinde yorumlandı. Ligand pozlama hataları, ligandin proteinden uzaklaştırılmasında, protein konformasyonunda bozulmalar gibi hatalar PMF sonuçlarını önemli derecede etkileyebilmektedir. Bunun yanında daha az yüke sahip ligandların Umbrella Örneklemede daha kötü performansa sahip oldukları bilinmektedir (Brown, Shirts, & Mobley, 2010). Bu nedenle Sp600125'in aşırı yüke sahip olmaması Umbrella Örneklemede başarısız sonuç alınmasında etken olabileceği düşünüldü.

Etken maddelerin PMF değerleri incelendiğinde özellikle Statin ve Flavonoid grubun diğer gruplara göre daha etkili olduğu gözlemlendi. Statin grubu içinde Atorvastatin'in IRE1'de etkili , ASK1 ve JNK1'de ise etkisiz olduğu belirlendi. Buna karşın Pitavastatin'in ise ASK1'de en etkili

molekül olduğu JNK1’de ise ikinci etkili molekül olduğu gözlemlendi. MM/PBSA hesaplamalarında ise tam tersi şekilde Pitavastatin, JNK1’de etkili iken ASK1’de etkisiz olduğu saptandı. Literatür incelendiğinde ise daha önce de bahsedildiği gibi Statinlerin JNK inhibisyonunda rolü olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Fromigué, Hamidouche, & Marie, 2008; KIBAYASHI vd., 2005).

Umbrella Örneklemesi hesaplamalarımızda Flavonoid grubu içinde yer alan Norizalpinin’i IRE1’de en etkili molekül, Chrysin’in ASK1’de ikinci etkili molekül, Luteolin’in ise JNK1’de en etkili molekül olduğu gözlemlendi. Umbrella Örneklemesi hesaplamalarında Flavonoidler etkili gözlenmesine karşın moleküler kenetleme ve MM/PBSA hesaplamalarında etkili olmadığını belirledi. Literatürde Flavonoid’lerin JNK’ı inhibe ettiğini gösteren çalışmalara rastlanmaktadır (Schroeter, Spencer, Rice-Evans, & Williams, 2001). Ha ve arkadaşları mikrogliya hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada Chrysin’in JNK’yı inhibe ettiğini göstermişlerdir (Ha, Moon, & Kim, 2010). Ando ve arkadaşları ise adipositler ve makrofajlar üzerinde yaptıkları çalışmada Luteolin’in JNK fosforilasyonunu inhibe ederek makrofajlarda inflamatuvar mediatörlerin üretimini baskılandığını belirtmişlerdir (Ando vd., 2009). Yu ve arkadaşları rat kalbi üzerinde yaptıkları çalışmada Luteolin’in ROS tarafından aktive olmuş map kinaz yolağını ve dolayısıyla JNK fosforilasyonunu bloke ettiğini saptamışlardır (Yu, Li, Tian, Liu, & Shang, 2015). Norizalpin’in ise IRE1-JNK yolağının inhibisyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamızda Statin ve Flavonoid grubu dışındaki moleküllerden olan Amiodarone, Propafenone, Zofenopril ve Fosinopril’in PMF ölçümlerine göre etkin olmadıkları belirlendi. Bu moleküllerin IRE1-JNK yolağı ya da map kinaz enzimleri üzerine etkinlikleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

IRE1-JNK yolağı etken madde etkileşimlerini hesapladığımız çalışmaya geniş çerçeveden baktığımızda Statinlerin en dikkat çekici moleküller olduğunu gözlemlendi. Flavonoidler Umbrella Örneklemesinde daha etkili hesaplanmalarına karşın diğer yaklaşımlarda hiçbir etkinliğinin gözlenmemesi ve Statinlerin tüm yaklaşımlarda da genel anlamda etkili olmaları ayrıca literatürde de JNK inhibisyonu ile ilgili çalışmalara rastlanması ve Flavonoidlerin JNK inhibisyonu ile ilgili çalışmalarına rastlanmasına karşın bu inhibisyonun ROS ilişkili olması Statinleri Flavonoidlerin önüne taşımıştır. Atorvastatin ve Pitavastatin gibi Statinler üzerinden geliştirilebilecek yeni etken maddelerin IRE1-JNK yolağı gibi map kinaz yollarının blokajında etkili olabileceği düşüncesini doğurdu. Map kinaz yolağının inhibisyonu hücre proliferasyonunu olumsuz etkileyeceğinden kanser hücrelerinin çoğalmasının önlenmesinde etkili olurken kardiyak hücrelerde IRE1-JNK yolağının inhibisyonu ile ER stresi kaynaklı apoptoz sonucu hücre kaybının önüne geçilebilir (Dhillon, Hagan, Rath, & Kolch, 2007; Minamino, Komuro, & Kitakaze, 2010).

BÖLÜM V

5.1 Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda ER stresine bağlı olarak gelişen katlanmamış protein yanıtında en önemli rolü olan IRE1-JNK yolağında sinyal başlatmada etken BİP proteininin yapısal analizi, BİP ve IRE1LD etkileşimi ve kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan ilaç ve Flavonoid'lerin bu yolak üzerindeki IRE1, ASK1 ve JNK1 proteinleri ile etkileşimleri hesaplamalı biyolojik yaklaşımlardan olan moleküler dinamik simülasyon yöntemiyle coarse-grained ve atomik ölçekte araştırıldı.

Moleküler dinamik simülasyon yöntemiyle BİP'in konformasyonel yapısı incelendiğinde BİP SBD α alt domaininin çok yüksek esneklikte hareket ettiği ve kısa süreli burkulmalar meydana getirdiği gözlemlendi. Bu konformasyonel değişimde BİP, SBD ve NBD domainlerinin birbirine göre serbest enerji değişimleri incelendiğinde BİP'in iki farklı konformasyonel durumu gözlemlendi. Ayrıca BİP'in NBDII β açık ve kapalı konformasyonları karşılaştırıldığında TYR 209'un konformasyonel geçişte anahtar rol oynayabileceği belirlendi.

BİP ve IRE1LD etkileşimlerinin gözlenmesi amacıyla geleneksel protein-protein kenetleme algoritmaları kullanmak yerine yüksek esneklikte iki proteinin etkileşimine izin veren ve atomik simülasyonlara göre çok daha hızlı ve enerji bariyerlerini aşmada daha yumuşak geçiş yeteneğine sahip İri taneli kübik oryantasyon yaklaşımından faydalanıldı. Bu yaklaşımda iki protein kübik olarak varsayıp büyük olan protein merkeze yerleştirilerek küçük olan proteinin bağlanmada aktif olan kübik yüzü büyük proteinin kübik yüzüne dönük olacak şekilde 5 Å - 15 Å mesafede yerleştirilerek 5 μ s'lik simülasyonları gerçekleştirildi.

Geliştirdiğimiz iri taneli kübik oryantasyon yaklaşımının doğruluğunun test edilmesi amacıyla farklı büyüklük ve esneklikte olan Ddi1 ubikuitin benzeri (UBL) domaini-ubikuitin kompleksi (2MWS), ubikuitin-USP2 kompleksi (2HD5), kimerik SDZ CHI621'in fab fragmenti (1MIM) ve Sil1-BİP komplekslerinin (3QML) simülasyonları ile validasyonları yapıldı.

Çalışma sonunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi ROC eğrisi ile hesaplandığında F-değeri ve doğruluğu (ACC) 0.88, AUROC değeri ise 0.94 olarak ölçüldü. Elde edilen bu doğruluk oranı yeterli görülerek BİP-IRE1LD etkileşiminin araştırılmasına karar verildi. Bunun için BİP proteini merkezde, IRE1LD'yi BİP'in kübik yüzlerine 10 Å- 15 Å mesafede yerleştirilerek, IRE1LD ile etkileşimde etkin olduğu varsayılan yüzü BİP'e dönük olacak şekilde en az 2 μ s'lik moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirildi. Çalışma sonunda BİP'in NBDII β alt domaini açık konumdayken IRE1LD'in 4. bölge içindeki çok yüksek esneklikteki alt domainin diğer

bağlanma paternlerine göre daha yüksek affinite ile bağlandığı ayrıca bu bağlanmada BİP SBD α alt domaininin IRE1LD ile etkileşimde direkt olarak rol oynadığı gözlemlendi.

Kardiyovasküler hastalılarda kullanılan etken maddeler ve Flavonoid'lerin ER stresi kaynaklı apoptozda etkili IRE1-JNK yolağının blokajında rolü olup olamayacağı moleküler kenetleme ve serbest enerji hesaplamalarıyla araştırıldı. Dört farklı moleküler kenetleme algoritması Autodock 4, Autodock Vina, IgemDOCK ve GOLD kullanılan çalışmada Statinler en etkili etken maddeler olarak gözlenirken serbest enerji hesaplamalarında Statin grubu üyesi Atorvastatin'in IRE1'in inhibisyonunda ve Pitavastatin'in ise ASK1 ve JNK1'in inhibisyonunda etkili moleküller olduğu gözlemlendi. Flavonoid'ler moleküler kenetleme ve MM/PBSA serbest enerji hesaplamalarında etkili görünmezken kantitatif Umbrella Örnekleme hesaplamalarında en etkili moleküller olarak dikkat çekti. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullandığımız kinaz inhibitörlerinin en yüksek afiniteli moleküller olarak hesaplanması ve Statin ve Flavonoid grubunun JNK fosforilasyonunun blokajındaki rolü ile ilgili literatürdeki deneysel verilerin çalışmamızı desteklediği belirlendi.

Daha ileri çalışmalarda BİP NBD TYR 209 rezidüsünün öneminin araştırılması, in-vitro mutagenez oluşturulması, BİP-IRE1LD etkileşiminin belirlendiği iri taneli kübik oryantasyon yaklaşımının genel protein-protein etkileşimlerinin ortaya konması amacıyla algoritmaların geliştirilerek ve internet veri sunucusu ile kullanıcılara yardımcı olunması hedeflenmektedir.

IRE1-JNK yolağı etken madde etkileşimleri sonucu elde edilen veriler ışığında Statinler üzerinden geliştirilecek etken türev maddelerin ER stresi kaynaklı apoptozun önlenmesinde etkili olunabileceği düşünülmektedir.

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

BÖLÜM VI

6.1 Kaynaklar

- Abriata, L. A., & Dal Peraro, M. (2015). Assessing the potential of atomistic molecular dynamics simulations to probe reversible protein-protein recognition and binding. *Scientific reports*, 5, 10549. <https://doi.org/10.1038/srep10549>
- Alderson, T. R., Kim, J. H., & Markley, J. L. (2016). Dynamical Structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 Complexes. *Structure*, 24(7), 1014–1030. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2016.05.011>
- Ali, M. M. U., Bagratuni, T., Davenport, E. L., Nowak, P. R., Silva-Santisteban, M. C., Hardcastle, A., ... Pearl, L. H. (2011). Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *The EMBO journal*, 30(5), 894–905. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.18>
- Allen, M. P. (2004). *Introduction to Molecular Dynamics Simulation. Lecture Notes, Norbert Attig* (C. 23). Tarihinde adresinden erişildi <http://www.fz-juelich.de/nic-series/volume23>
- Amin-Wetzel, N., Saunders, R. A., Kamphuis, M. J., Rato, C., Preissler, S., Harding, H. P., & Ron, D. (2017). A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell*, 171(7), 1625–1637.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.040>
- Ando, C., Takahashi, N., Hirai, S., Nishimura, K., Lin, S., Uemura, T., ... Kawada, T. (2009). Luteolin, a food-derived flavonoid, suppresses adipocyte-dependent activation of macrophages by inhibiting JNK activation. *FEBS Letters*, 583(22), 3649–3654. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.045>
- Baaden, M., & Marrink, S. J. (2013). Coarse-grain modelling of protein–protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(6), 878–886. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2013.09.004>
- Bahar, I., & Jernigan, R. L. (1997). Inter-residue potentials in globular proteins and the dominance of highly specific hydrophilic interactions at close separation. *Journal of Molecular Biology*, 266(1), 195–214. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0758>
- Bakan, A., Meireles, L. M., & Bahar, I. (2011). ProDy: Protein Dynamics Inferred from Theory and Experiments. *Bioinformatics*, 27(11), 1575–1577. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr168>
- Bhattacharjee, R., Devi, A., & Mishra, S. (2015). Molecular docking and molecular dynamics studies reveal structural basis of inhibition and selectivity of inhibitors EGCG and OSU-03012 toward glucose regulated protein-78 (GRP78) overexpressed in glioblastoma. *Journal of Molecular Modeling*, 21(10), 272. <https://doi.org/10.1007/s00894-015-2801-3>
- Braun, E., Gilmer, J., Mayes, H. B., Mobley, D. L., Jacob, I., Prasad, S., & Zuckerman, D. M. (2018). *Best Practices for Foundations in Molecular Simulations : v1 . 0*. Tarihinde adresinden erişildi https://github.com/MobleyLab/basic_simulation_training/blob/master/paper/basic_training.pdf
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A. E., Torrealba, N., Paredes, F., ... Lavandero, S. (2013). Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and

- metabolic integration. *International review of cell and molecular biology*, 301, 215–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1>
- Brice, A. R., & Dominy, B. N. (2011). Analyzing the robustness of the MM/PBSA free energy calculation method: Application to DNA conformational transitions. *Journal of Computational Chemistry*, 32(7), 1431–1440. <https://doi.org/10.1002/jcc.21727>
- Brown, S., Shirts, M., & Mobley, D. (2010). Free-energy calculations in structure-based drug design.
- Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Müller, S., Sobott, F., ... Knapp, S. (2007). Structural and functional characterization of the human protein kinase ASK1. *Structure (London, England : 1993)*, 15(10), 1215–26. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.08.011>
- Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants & redox signaling*, 21(3), 396–413. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5851>
- Carlson, H. A., Smith, R. D., Khazanov, N. A., Kirchhoff, P. D., Dunbar, J. B., Benson, M. L., & Benson, M. L. (2008). Differences between high- and low-affinity complexes of enzymes and nonenzymes. *Journal of medicinal chemistry*, 51(20), 6432–41. <https://doi.org/10.1021/jm8006504>
- Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R., Kopp, M. C., Ali, M. M., Ali, M., ... Kaufman, R. (2015). Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein C_H 1 to initiate ER stress signaling. *eLife*, 4, 894–905. <https://doi.org/10.7554/eLife.03522>
- Chaikuad, A., M C Tacconi, E., Zimmer, J., Liang, Y., Gray, N. S., Tarsounas, M., & Knapp, S. (2014). A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics. *Nat.Chem.Biol.*, 10, 853–860. <https://doi.org/10.2210/PDB4QTD/PDB>
- Chen, F., Liu, H., Sun, H., Pan, P., Li, Y., Li, D., & Hou, T. (2016). Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 6. Capability to predict protein–protein binding free energies and re-rank binding poses generated by protein–protein docking. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(32), 22129–22139. <https://doi.org/10.1039/C6CP03670H>
- Chen, L., Xu, S., Liu, L., Wen, X., Xu, Y., Chen, J., & Teng, J. (2014). Cab45S inhibits the ER stress-induced IRE1-JNK pathway and apoptosis via GRP78/BiP. *Cell Death & Disease*, 5(5), e1219–e1219. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.193>
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(1), 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- Chen, Y., & Brandizzi, F. (2013). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in cell biology*, 23(11), 547–55. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.005>
- Chodera, J. D., Mobley, D. L., Shirts, M. R., Dixon, R. W., Branson, K., & Pande, V. S. (2011). Alchemical free energy methods for drug discovery: progress and challenges. *Current opinion in structural biology*, 21(2), 150–60. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.01.011>
- Ciemny, M. P., Kurcinski, M., Kozak, K. J., Kolinski, A., & Kmiecik, S. (2017). Highly Flexible Protein–Peptide Docking Using CABS-Dock. İçinde *Methods in molecular biology*

- (Clifton, N.J.) (C. 1561, ss. 69–94). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6798-8_6
- Coelho, D. S., & Domingos, P. M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Frontiers in Genetics*, 5, 76. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00076>
- Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., & Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 18773–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509487102>
- Cross, B. C. S., Bond, P. J., Sadowski, P. G., Jha, B. K., Zak, J., Goodman, J. M., ... Harding, H. P. (2012). The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), E869–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115623109>
- Cuendet, M. (y.y.). *Molecular Dynamics Simulation-Michel Cuendet-EMBL 2008 Molecular Dynamics Simulation A Short Introduction*. Tarihinde adresinden erişildi https://embnet.vital-it.ch/CoursEMBnet/Pages3D08/slides/MD_cours_opt.pdf
- Cyril Dominguez, Rolf Boelens, and, & Bonvin*, A. M. J. J. (2003). HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. <https://doi.org/10.1021/JA026939X>
- Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx (ss. 243–250). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19
- Dan, G.-A., Martinez-Rubio, A., Agewall, S., Boriani, G., Borggrefe, M., Gaita, F., ... Martinez, F. (2018). Antiarrhythmic drugs—clinical use and clinical decision making: a consensus document from the European Heart Rhythm Association (EHRA) and European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Cardiovascular Pharmacology, endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) and International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP). *EP Europace*, 20(5), 731–732an. <https://doi.org/10.1093/europace/eux373>
- Darré, L., Machado, M. R., Brandner, A. F., González, H. C., Ferreira, S., & Pantano, S. (2015). SIRAH: A Structurally Unbiased Coarse-Grained Force Field for Proteins with Aqueous Solvation and Long-Range Electrostatics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(2), 723–739. <https://doi.org/10.1021/ct5007746>
- Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27(48), 6245–6251. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.301>
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279–3290. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
- Dunbrack, R. L., & Karplus, M. (1993). Backbone-dependent Rotamer Library for Proteins Application to Side-chain Prediction. *Journal of Molecular Biology*, 230(2), 543–574. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1993.1170>
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F.,Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 11(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
- Frenkel, D., & Smit, B. (y.y.). *Understanding molecular simulation : from algorithms to applications*.

- Fromigué, O., Hamidouche, Z., & Marie, P. J. (2008). Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 cascade by atorvastatin reduces osteosarcoma cell invasion. *The Journal of biological chemistry*, 283(45), 30549–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801436200>
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(5), 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Geschwindner, S., Ulander, J., & Johansson, P. (2015). Ligand Binding Thermodynamics in Drug Discovery: Still a Hot Tip? *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(16), 6321–6335. <https://doi.org/10.1021/jm501511f>
- Gibbs, J. W. (1902). *Elementary Principles in Statistical Mechanics*. New York: Charles Scribner's Sons.
- González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *Collection SFN*, 12, 169–200. <https://doi.org/10.1051/sfn/201112009>
- Gotoh, T., Endo, M., & Oike, Y. (2011). Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases. *International journal of inflammation*, 2011, 259462. <https://doi.org/10.4061/2011/259462>
- Gurusinghe, K. R. D. S. N. S., Mishra, A., & Mishra, S. (2018). Glucose-regulated protein 78 substrate-binding domain alters its conformation upon EGCG inhibitor binding to nucleotide-binding domain: Molecular dynamics studies. *Scientific Reports*, 8(1), 5487. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22905-6>
- Ha, S. K., Moon, E., & Kim, S. Y. (2010). Chrysin suppresses LPS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF- κ B and JNK activations in microglia cells. *Neuroscience Letters*, 485(3), 143–147. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2010.08.064>
- Harrington, P. E., Biswas, K., Malwitz, D., Tasker, A. S., Mohr, C., Andrews, K. L., ... Lipford, J. R. (2015). Unfolded Protein Response in Cancer: IRE1 α Inhibition by Selective Kinase Ligands Does Not Impair Tumor Cell Viability. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(1), 68–72. <https://doi.org/10.1021/ml500315b>
- Hasegawa, H., Yamamoto, R., Takano, H., Mizukami, M., Asakawa, M., Nagai, T., & Komuro, I. (2003). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors prevent the development of cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 35(8), 953–60. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(03\)00180-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(03)00180-9)
- Herman, L. L., & Bhimji, S. S. (2018). *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors (ACEI)*. *StatPearls*. StatPearls Publishing. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28613705>
- Hetz, C., & Papa, F. R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular cell*, 69(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>
- Hofmann, D. W. M., Kuleshova, L., & D'Aguzzo, B. (2007). A new reactive potential for the molecular dynamics simulation of liquid water. *Chemical Physics Letters*, 448(1–3), 138–143. <https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2007.09.063>
- Holm, L., & Laakso, L. M. (2016). Dali server update. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W351–W355. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw357>
- Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and applications in bioinformatics and*

chemistry : AABC, 8, 37–47. <https://doi.org/10.2147/AABC.S70333>

- Hou, D.-X., & Kumamoto, T. (2010). Flavonoids as Protein Kinase Inhibitors for Cancer Chemoprevention: Direct Binding and Molecular Modeling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(5), 691–719. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2816>
- Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2011). Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(1), 69–82. <https://doi.org/10.1021/ci100275a>
- Hsu, K.-C., Chen, Y.-F., Lin, S.-R., & Yang, J.-M. (2011). iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis. *BMC Bioinformatics*, 12(Suppl 1), S33. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S33>
- Hub, J. S., de Groot, B. L., & van der Spoel, D. (2010). g_wham—A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(12), 3713–3720. <https://doi.org/10.1021/ct100494z>
- Irbäck, A., Samuelsson, B., Sjunnesson, F., & Wallin, S. (2003). Thermodynamics of α - and β -Structure Formation in Proteins. *Biophysical Journal*, 85(3), 1466–1473. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74579-2)
- Isralewitz, B., Gao, M., & Schulten, K. (2001). Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. *Current opinion in structural biology*, 11(2), 224–30. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297932>
- Javanainen, M., Martinez-Seara, H., & Vattulainen, I. (2017). Excessive aggregation of membrane proteins in the Martini model. *PloS one*, 12(11), e0187936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187936>
- Jia, J., Wu, Q., Yan, H., & Gui, Z. (2015). Purification and molecular docking study of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of ultrasonic-pretreated silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein. *Process Biochemistry*, 50(5), 876–883. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.12.030>
- Jiang, J., Maes, E. G., Taylor, A. B., Wang, L., Hinck, A. P., Lafer, E. M., & Sousa, R. (2007). Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Molecular cell*, 28(3), 422–33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.022>
- John D. Chodera, *,†, William C. Swope, ‡, Jed W. Pitera, ‡, Chaok Seok, § and, & Dill||, K. A. (2006). Use of the Weighted Histogram Analysis Method for the Analysis of Simulated and Parallel Tempering Simulations. <https://doi.org/10.1021/CT0502864>
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0897>
- Kadowaki, H., & Nishitoh, H. (2013). Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes*, 4(3), 306–33. <https://doi.org/10.3390/genes4030306>
- Kaiser, R. A., Liang, Q., Bueno, O., Huang, Y., Lackey, T., Klevitsky, R., ... Molkentin, J. D. (2005). Genetic inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *The Journal of biological chemistry*,

- Katari, S. K., Natarajan, P., Swargam, S., Kanipakam, H., Pasala, C., & Umamaheswari, A. (2016). Inhibitor design against JNK1 through e-pharmacophore modeling docking and molecular dynamics simulations. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 36(6), 558–571. <https://doi.org/10.3109/10799893.2016.1141955>
- KIBAYASHI, E., URAKAZE, M., KOBASHI, C., KISHIDA, M., TAKATA, M., SATO, A., ... KOBAYASHI, M. (2005). Inhibitory effect of pitavastatin (NK-104) on the C-reactive-protein-induced interleukin-8 production in human aortic endothelial cells. *Clinical Science*, 108(6), 515–521. <https://doi.org/10.1042/CS20040315>
- Kim, D.-S., Ha, K.-C., Kwon, D.-Y., Kim, M.-S., Kim, H.-R., Chae, S.-W., & Chae, H.-J. (2008). Kaempferol Protects Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Damage Through the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 30(2), 257–270. <https://doi.org/10.1080/08923970701812530>
- Kim, D.-S., Kwon, D.-Y., Kim, M.-S., Kim, H. K., Lee, Y. C., Park, S. J., ... Chae, H.-J. (2010). The involvement of endoplasmic reticulum stress in flavonoid-induced protection on cardiac cell death caused by ischaemia/reperfusion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(2), 197–204. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.02.0007>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., ... Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1202–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., & Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *The Journal of Cell Biology*, 167(3).
- Kmiecik, S., Gront, D., Kolinski, M., Wieteska, L., Dawid, A. E., & Kolinski, A. (2016). Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. *Chemical Reviews*, 116(14), 7898–7936. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00163>
- Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H., & Kollman, P. A. (1992). THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8), 1011–1021. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130812>
- Kumari, R., Kumar, R., Lynn, A., & Lynn, A. (2014). g_mmpbsa ?A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 1951–1962. <https://doi.org/10.1021/ci500020m>
- Leach, A. R. (2001). *Molecular modelling : principles and applications*. Prentice Hall. Tarihinde adresinden erişildi https://books.google.com.tr/books/about/Molecular_Modelling.html?id=kB7jsbV-uhkC&redir_esc=y
- Lee, A. S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, 35(4), 373–381. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2004.10.010>
- Lennard-Jones Potential - Chemistry LibreTexts. (y.y.). Tarihinde 26 Ağustos 2018, adresinden erişildi [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Physica](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Physica)

- Lensink, M. F., Velankar, S., Kryshchuk, A., Huang, S.-Y., Schneidman-Duhovny, D., Sali, A., ... Wodak, S. J. (2016). Prediction of homoprotein and heteroprotein complexes by protein docking and template-based modeling: A CASP-CAPRI experiment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 84, 323–348.
<https://doi.org/10.1002/prot.25007>
- Lewy, T. G., Grabowski, J. M., & Bloom, M. E. (2017). BiP: Master Regulator of the Unfolded Protein Response and Crucial Factor in Flavivirus Biology. *The Yale journal of biology and medicine*, 90(2), 291–300. Tarihinde adresinden erişildi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656015>
- Li, Y., Lu, G., Sun, D., Zuo, H., Wang, D. W., & Yan, J. (2017). Inhibition of endoplasmic reticulum stress signaling pathway: A new mechanism of statins to suppress the development of abdominal aortic aneurysm. *PLoS one*, 12(4), e0174821.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174821>
- Liang, S.-L., Liu, H., & Zhou, A. (2006). Lovastatin-induced apoptosis in macrophages through the Rac1/Cdc42/JNK pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(1), 651–6. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.1.651>
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*, 78(8), 1950–8. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>
- Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D. K., & Cournia, Z. (2014). Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(16), 1923–38.
<https://doi.org/10.2174/1568026614666140929124445>
- Liu, C. Y., & Kaufman, R. J. (2003). The unfolded protein response. *Journal of cell science*, 116(Pt 10), 1861–2. <https://doi.org/10.1242/jcs.00408>
- Liu, J., Minemoto, Y., & Lin, A. (2004). c-Jun N-terminal protein kinase 1 (JNK1), but not JNK2, is essential for tumor necrosis factor alpha-induced c-Jun kinase activation and apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 24(24), 10844–56.
<https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10844-10856.2004>
- Lodola, A., & De Vivo, M. (2012). The Increasing Role of QM/MM in Drug Discovery. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 87, 337–362.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398312-1.00011-1>
- Lopes, P. E. M., Guvench, O., MacKerell, A. D., & Jr. (2015). Current status of protein force fields for molecular dynamics simulations. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1215, 47–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1465-4_3
- López-Sendón, J., Swedberg, K., McMurray, J., Tamargo, J., Maggioni, A. P., Dargie, H., ... Pedersen, C. T. (2004). Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular diseaseThe Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 25(16), 1454–1470.
<https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.06.003>
- Macias, A. T., Williamson, D. S., Allen, N., Borgognoni, J., Clay, A., Daniels, Z., ... Massey, A. J. (2011). Adenosine-Derived Inhibitors of 78 kDa Glucose Regulated Protein (Grp78)

- ATPase: Insights into Isoform Selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(12), 4034–4041. <https://doi.org/10.1021/jm101625x>
- Madhavan, T., Chung, J. Y., Kothandan, G., Gadhe, C. G., & Cho, S. J. (2012). 3D-QSAR Studies of JNK1 Inhibitors Utilizing Various Alignment Methods. *Chemical Biology & Drug Design*, 79(1), 53–67. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01168.x>
- Malik, S., Sharma, A. K., Bharti, S., Nepal, S., Bhatia, J., Nag, T. C., ... Arya, D. S. (2011). In Vivo Cardioprotection by Pitavastatin From Ischemic-reperfusion Injury Through Suppression of IKK/NF- κ B and Upregulation of pAkt-e-NOS. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 58(2), 199–206. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31822002a6>
- Malinverni, D., Jost Lopez, A., De Los Rios, P., Hummer, G., & Barducci, A. (2017). Modeling Hsp70/Hsp40 interaction by multi-scale molecular simulations and coevolutionary sequence analysis. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.23471>
- Markowetz, F. (2017). All biology is computational biology. *PLOS Biology*, 15(3), e2002050. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002050>
- Marze, N. A., Roy Burman, S. S., Sheffler, W., & Gray, J. J. (2018). Efficient flexible backbone protein–protein docking for challenging targets. *Bioinformatics*, 34(20), 3461–3469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty355>
- McCullough, M. L., Peterson, J. J., Patel, R., Jacques, P. F., Shah, R., & Dwyer, J. T. (2012). Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *The American journal of clinical nutrition*, 95(2), 454–64. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.016634>
- Medina-Franco, J. L., López-Vallejo, F., Rodríguez-Morales, S., Castillo, R., Chamorro, G., & Tamariz, J. (2005). Molecular docking of the highly hypolipidemic agent α -asarone with the catalytic portion of HMG-CoA reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(4), 989–994. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2004.12.046>
- Meireles, L., Gur, M., Bakan, A., & Bahar, I. (2011). Pre-existing soft modes of motion uniquely defined by native contact topology facilitate ligand binding to proteins. *Protein Science*, 20(10), 1645–1658. <https://doi.org/10.1002/pro.711>
- Mikol, V. (1996). Structure of the fab fragment of SDZ CHI621: a chimeric antibody against CD25. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 52(Pt 3), 534–42. <https://doi.org/10.1107/S0907444996000704>
- Minamino, T., & Kitakaze, M. (2010). ER stress in cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(6), 1105–1110. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2009.10.026>
- Minamino, T., Komuro, I., & Kitakaze, M. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress As a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227819>
- Monticelli, L., Kandasamy, S. K., Periole, X., Larson, R. G., Tieleman, D. P., & Marrink, S.-J. (2008). The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(5), 819–834. <https://doi.org/10.1021/ct700324x>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785–91. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

- Nilofer, C., Sukhwai, A., Mohanapriya, A., & Kanguane, P. (2017). Protein-protein interfaces are vdW dominant with selective H-bonds and (or) electrostatics towards broad functional specificity. *Bioinformation*, 13(6), 164–173. <https://doi.org/10.6026/97320630013164>
- Nowicka, U., Zhang, D., Walker, O., Krutauz, D., Castañeda, C. A., Chaturvedi, A., ... Fushman, D. (2015). DNA-damage-inducible 1 protein (Ddi1) contains an uncharacteristic ubiquitin-like domain that binds ubiquitin. *Structure (London, England : 1993)*, 23(3), 542–557. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.01.010>
- O’Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Ode, H., Nakashima, M., Kitamura, S., Sugiura, W., & Sato, H. (2012). Molecular dynamics simulation in virus research. *Frontiers in microbiology*, 3, 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00258>
- Okamoto, M., Saito, N., Kojima, H., Okabe, T., Takeda, K., Ichijo, H., ... Nagano, T. (2011). Identification of novel ASK1 inhibitors using virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(1), 486–489. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2010.11.004>
- Ooi, T., & Nishikawa, K. (1981). Energy Surface of Protein Molecule in the Conformational Phase Space. *Journal of the Physical Society of Japan*, 50(1), 261–269. <https://doi.org/10.1143/JPSJ.50.261>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Park, S., & Schulten, K. (2004). Calculating potentials of mean force from steered molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, 120(13), 5946–5961. <https://doi.org/10.1063/1.1651473>
- Patel, J. S., & Ytreberg, F. M. (2018). Fast Calculation of Protein–Protein Binding Free Energies Using Umbrella Sampling with a Coarse-Grained Model. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14(2), 991–997. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00660>
- Periole, X., Cavalli, M., Marrink, S.-J., & Ceruso, M. A. (2009). Combining an Elastic Network With a Coarse-Grained Molecular Force Field: Structure, Dynamics, and Intermolecular Recognition. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(9), 2531–2543. <https://doi.org/10.1021/ct9002114>
- Petrović, D., Wang, X., & Strodel, B. (2018). How accurately do force fields represent protein side chain ensembles? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1002/prot.25525>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pincus, D., Chevalier, M. W., Aragón, T., van Anken, E., Vidal, S. E., El-Samad, H., & Walter, P. (2010). BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response. *PLoS Biology*, 8(7), e1000415. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000415>
- Plattner, N., Doerr, S., De Fabritiis, G., & Noé, F. (2017). Complete protein–protein

- association kinetics in atomic detail revealed by molecular dynamics simulations and Markov modelling. *Nature Chemistry*, 9(10), 1005–1011.
<https://doi.org/10.1038/nchem.2785>
- Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, F. U., & Bracher, A. (2008). Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell*, 133(6), 1068–79.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.022>
- Politi, A., Durdagi, S., Moutevelis-Minakakis, P., Kokotos, G., & Mavromoustakos, T. (2010). Development of accurate binding affinity predictions of novel renin inhibitors through molecular docking studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 29(3), 425–435. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2010.08.003>
- Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., ... Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7), 845–854.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>
- Renatus, M., Parrado, S. G., D'Arcy, A., Eidhoff, U., Gerhartz, B., Hassiepen, U., ... Kroemer, M. (2006). Structural Basis of Ubiquitin Recognition by the Deubiquitinating Protease USP2. *Structure*, 14(8), 1293–1302. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2006.06.012>
- Rossello, X., Pocock, S. J., & Julian, D. G. (2015). Long-Term Use of Cardiovascular Drugs: Challenges for Research and for Patient Care. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(11), 1273–1285. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2015.07.018>
- Ruschitzka, F., & Taddei, S. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitors: first-line agents in cardiovascular protection? *European Heart Journal*, 33(16), 1996–1998.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs108>
- Schroeter, H., Spencer, J. P., Rice-Evans, C., & Williams, R. J. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *The Biochemical journal*, 358(Pt 3), 547–557. <https://doi.org/10.1042/BJ3580547>
- Schuermann, J. P., Jiang, J., Cuellar, J., Llorca, O., Wang, L., Gimenez, L. E., ... Sousa, R. (2008). Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Molecular cell*, 31(2), 232–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.006>
- Scull, C. M., & Tabas, I. (2011). Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(12), 2792–7.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.224881>
- Senftle, T. P., Hong, S., Islam, M. M., Kylasa, S. B., Zheng, Y., Shin, Y. K., ... van Duin, A. C. T. (2016). The ReaxFF reactive force-field: development, applications and future directions. *npj Computational Materials*, 2(1), 15011.
<https://doi.org/10.1038/npjcompumats.2015.11>
- Siewert J. Marrink, *,†, H. Jelger Risselada, †, Serge Yefimov, ‡, D. Peter Tieleman, § and, & Vries†, A. H. de. (2007). The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. <https://doi.org/10.1021/JP071097F>
- Siewert J. Marrink, Alex H. de Vries, A., & Mark, A. E. (2003). Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations. <https://doi.org/10.1021/JP036508G>
- Singh, O., Shillings, A., Craggs, P., Wall, I., Rowland, P., Skarzynski, T., ... Smith, K. J. (2013). Crystal structures of ASK1-inhibitor complexes provide a platform for structure-based

- drug design. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 22(8), 1071–7. <https://doi.org/10.1002/pro.2298>
- Song, X. J., Yang, C. Y., Liu, B., Wei, Q., Korkor, M. T., Liu, J. Y., & Yang, P. (2011). Atorvastatin inhibits myocardial cell apoptosis in a rat model with post-myocardial infarction heart failure by downregulating ER stress response. *International journal of medical sciences*, 8(7), 564–72. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960749>
- Sousa da Silva, A. W., & Vranken, W. F. (2012). ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC research notes*, 5, 367. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>
- Sun, H.-Y., Wang, N.-P., Halkos, M., Kerendi, F., Kin, H., Guyton, R. A., ... Zhao, Z.-Q. (2006). Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis*, 11(9), 1583–1593. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-9037-8>
- Swain, J. F., Dinler, G., Sivendran, R., Montgomery, D. L., Stotz, M., & Gierasch, L. M. (2007). Hsp70 Chaperone Ligands Control Domain Association via an Allosteric Mechanism Mediated by the Interdomain Linker. *Molecular Cell*, 26(1), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.020>
- Tabas, I., & Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), 184–190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>
- Tam, A. B., Mercado, E. L., Hoffmann, A., & Niwa, M. (2012). ER Stress Activates NF-κB by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK. *PLoS ONE*, 7(10), e45078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045078>
- The UniProt Consortium. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, 45(D1), D158–D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
- Tozzini, V. (2005). Coarse-grained models for proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2005.02.005>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–61. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Vin, H., Ching, G., Ojeda, S. S., Adelmann, C. H., Chitsazzadeh, V., Dwyer, D. W., ... Tsai, K. Y. (2014). Sorafenib Suppresses JNK-Dependent Apoptosis through Inhibition of ZAK. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(1), 221–229. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0561>
- Voegler Smith, A., & Hall, C. K. (2001). alpha-helix formation: discontinuous molecular dynamics on an intermediate-resolution protein model. *Proteins*, 44(3), 344–60. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11455608>
- Wang, Y., & McCammon, J. A. (2012). Introduction to Molecular Dynamics: Theory and Applications in Biomolecular Modeling (ss. 3–30). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2146-7_1
- Wang, Z., Cheng, L., Kai, Z., Wu, F., Liu, Z., & Cai, M. (2014). Molecular modeling studies of atorvastatin analogues as HMGR inhibitors using 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(16), 3869–3876. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2014.06.055>

- Warshel, A., & Florián, J. (2004). The Empirical Valence Bond (EVB) Method. İçinde *Encyclopedia of Computational Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470845015.cu0002>
- Webb, B., & Sali, A. (2014). Protein Structure Modeling with MODELLER (ss. 1–15). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0366-5_1
- Wickstrom, L., Gallicchio, E., & Levy, R. M. (2012). The linear interaction energy method for the prediction of protein stability changes upon mutation. *Proteins*, 80(1), 111–25. <https://doi.org/10.1002/prot.23168>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., ... Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Wisniewska, M., Karlberg, T., Lehtiö, L., Johansson, I., Kotenyova, T., Moche, M., ... Metoz, F. (2010). Crystal Structures of the ATPase Domains of Four Human Hsp70 Isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008625>
- Wood, W. G., Igbavboa, U., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2013). Statins, Bcl-2, and apoptosis: cell death or cell protection? *Molecular neurobiology*, 48(2), 308–14. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8496-5>
- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(1), 18–29. <https://doi.org/10.1038/nrm3920>
- Wu, D. (2010). An efficient umbrella potential for the accurate calculation of free energies by molecular simulation. *The Journal of Chemical Physics*, 133(4), 044115. <https://doi.org/10.1063/1.3464330>
- Xu, D., & Zhang, Y. (2012). Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(7), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/prot.24065>
- Yan, M., Li, J., & Sha, B. (2011). Structural analysis of the Sil1–Bip complex reveals the mechanism for Sil1 to function as a nucleotide-exchange factor. *Biochemical Journal*, 438(3), 447–455. <https://doi.org/10.1042/BJ20110500>
- Yang, J., Nune, M., Zong, Y., Zhou, L., & Liu, Q. (2015). Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structure*, 23(12), 2191–2203. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.10.012>
- Yang, J., Zong, Y., Su, J., Li, H., Zhu, H., Columbus, L., ... Liu, Q. (2017). Conformation transitions of the polypeptide-binding pocket support an active substrate release from Hsp70s. *Nature Communications*, 8(1), 1201. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01310-z>
- Yu, D., Li, M., Tian, Y., Liu, J., & Shang, J. (2015). Luteolin inhibits ROS-activated MAPK pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Life Sciences*, 122, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.014>
- Zacharias, M. (2003). Protein-protein docking with a reduced protein model accounting for side-chain flexibility. *Protein Science*, 12(6), 1271–1282. <https://doi.org/10.1110/ps.0239303>

- Zhang, L., Cheng, L., Wang, Q., Zhou, D., Wu, Z., Shen, L., ... Zhu, J. (2015). Atorvastatin protects cardiomyocytes from oxidative stress by inhibiting LOX-1 expression and cardiomyocyte apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 47(3), 174–182. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu131>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zhou, J., Liu, C. Y., Back, S. H., Clark, R. L., Peisach, D., Xu, Z., & Kaufman, R. J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14343–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606480103>
- Ziada, S., Braka, A., Diharce, J., Aci-Sèche, S., & Bonnet, P. (2018). Enhanced Molecular Dynamics Methods Applied to Drug Design Projects (ss. 403–426). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7756-7_20

Teşekkür

Doktora eğitimim boyunca çalışmalarımda bana güvenip her türlü yardımını esirgemeyen asistanlık dönemi boyunca tüm tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, sorumluluk vererek bana güvenini daima derinden hissettiğim, karşılaştığım her türlü sorunun atlatılmasında bilgi ve deneyimleriyle yoluma ışık tutan sevgili danışmanım Doç. Dr. Zuhale EROĞLU'na

Çalışmalarım ve laboratuvarlarla ilgili her türlü sorumu sabırla dinleyip en akılcı çözümleri üreten, saygı değer hocam ve anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ'e

Projeler ve laboratuvar çalışmalarında başta yaptığım hatalara rağmen bana güvenip her türlü çalışmalara dahil eden ve büyük sorumluluk vererek daima güvenen sevgili hocam Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan bir an bile olsun çekinmeyen, güler yüzleri ile moral ve motivasyonumu hep yüksek tutan sevgili hocalarım Doç. Dr. Buket KOSOVA, Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI, Doç. Dr. Burçin KAYMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Nur SELVİ GÜNEL'e

Tezimle ilgili teknik problemleri dinleyip çözümlememde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Cenk SELÇUKİ'ye

Çalışmalarım boyunca her türlü ilgi ve destekleriyle yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Ebru ALP ve Dr. Öğr. Üyesi Egemen AKGÜN'e

Doktora eğitimim ve laboratuvar çalışmalarında bana rehber olarak yardımlarını esirgemeyen bölümümüzün güler yüzlü değerli araştırma görevlileri Dr. Araş. Gör. Aslı TETİK VARDARLI, Dr. Araş. Gör. Sunde YILMAZ SÜSLÜER ve Duygu DÖNDÜ AYGÜNEŞ'e

Dostluklarını her zaman derinden hissettiğim her türlü problemimde yardıma koşmaya hazır olan Öğretim Üyesi Yetiştirme Programındaki kader arkadaşlarım Araş. Gör. Bakiye GÖKER BAĞCA, Araş. Gör. Hale GÜLER KARA, Araş. Gör. Neslihan Pınar ÖZATEŞ, Araş. Gör. Ayca AŞIK ve Araş. Gör. Mesude ANGIN'a

Doktora sürecimin her aşamasında her konuda iyi ve kötü zamanda yanımda olup moralimi yüksek tutmamda büyük paya sahip sevgili arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Çağdaş AKTAN, Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe BALCI OKCANOĞLU, Dr. Besra ÖZMEN YELKEN, Dr. Çağla

KAYABAŞI, Dr. Ali Şahin KÜÇÜKARSLAN, Dr. Zeynep MUTLU, Özgün ÖZALP, Sezgi KIPÇAK, Buket ÖZEL ve Cansu ÇALIŞKAN'a

Her türlü işlerimizin aksamadan yürütülmesinde büyük emek veren anabilim dalımızın değerli teknisyeni Hale GÜNDÜZ ve sekreterleri Bahar BİLGİLİ ve Murat TUNCER ve Gökmen KAHRİMAN'a

Hesaplamalı çalışmalarımın yürütülmesinde hesaplama hizmetini eksiksiz sunan Tübitak TRUBA'ya ve hesaplamalarımın sorunsuz çalışmasında verdiği teknik destekten ötürü Sefa Arslan ve Feyza ERYOL'a

Doktora eğitimin süreci içinde tanıştığım ve hayatımı birleştirdiğim, her türlü manevi desteğini derinden hissettiğim, saygı ve sevgisini eksik etmeyen, tez sürecimde sabırla her türlü desteğini veren değerli eşim Havva DÜZGÜN'e

Doğumumdan bugüne kadar masraflı eğitim hayatımda ve hayatımın her anında koşulsuz maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, iyi ve kötü zamanlarımda hep yanımda olan Aileme,

Sonsuz Teşekkürler

Ocak 2019

Zekeriya DÜZGÜN

Özgeçmiş

1983 yılında Gümüşhane’de doğdum. 2004 yılında Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitime başladım ve 2008’de tamamladım. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında Yüksek lisansa başlayıp 2013 yılında mezun oldum. 2013 yılında Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji’de Öğretim Üyesi Yerleştirme programı kapsamında Araştırma görevlisi olarak atandım. Bu tarihten itibaren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında Doktora eğitime başladım. Yabancı dilim ingilizcedir.

E-mail: zduzgun@gmail.com