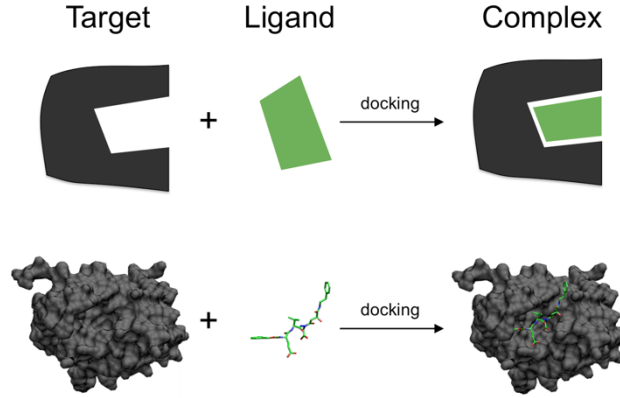


Moleküler Docking

Moleküler docking, yapı temelli ilaç tasarımı yaygın biçimde başvurulan bir yaklaşımdır. Protein hedefinin üç boyutlu yapısının (3B) mevcut olduğu durumlarda özellikle tercih edilen bu yöntem, 1980'li yılların başından itibaren etkin şekilde kullanılmaktadır. Moleküler docking işleminin temel amacı, moleküllerin olası bağlanma modlarını belirlemek ve bu modlara ait bağlanma enerjilerini tahmin ederek moleküler tanıma mekanizmalarını anlamak ve öngörmektir. Moleküler docking, başlangıçta küçük moleküller ile hedef makromoleküller (proteinler) arasındaki etkileşimleri incelemek amacıyla geliştirilmiş olsa da, son yıllarda protein-protein ve nükleik asit (DNA ve RNA) ve ligand etkileşimlerini kapsayan docking çalışmaları da yaygınlaşmıştır (Stanzione vd., 2021) (Şekil 1).



Şekil 1. Moleküler docking işlemi

Moleküler docking; bağlanma modu tahmini, sanal tarama ve bağlanma afinitesinin öngörülmesi olmak üzere üç temel amacı kapsamaktadır (Jain ve Nicholls, 2008). Başarılı bir docking metodolojisinin, reseptörün bağlanma bölgesinde ko-ligandın pozisyonunu belirli bir tolerans sınırı içinde doğru biçimde yeniden üretebilmesi ve buna eşlik eden fizikokimyasal etkileşimleri güvenilir şekilde tahmin edebilmesi gerekmektedir. Ayrıca, geniş bileşik kütüphanelerinin taranması sırasında yöntemin güçlü bağlanan ligandları zayıf etkileşim gösteren moleküllerden ayırt edebilmesi ve bu bileşikler veri tabanındaki en uygun adaylar arasında doğru biçimde sıralayabilmesi beklenmektedir (Kolb ve Irwin, 2009).

Moleküler Docking Çalışması İçin Gereklilikler:

Moleküler docking işlemi için öncelikle hedef proteinin 3B yapısının mevcut olması gerekmektedir. Proteinlerin 3B yapıları genellikle Protein Data Bank (PDB) adlı veri tabanında depolanmaktadır. Bu veri tabanı üzerinden hedef protein araştırılarak en uygun kristal yapı seçilir. Ancak PDB'de yer alan protein yapıları bazı yapısal eksiklikler içerebilmektedir. Çoğunlukla hidrojen atomları, kısmi yükler, yan zincirler ve/veya bazı döngü (loop) bölgeleri eksik durumdadır. Bu nedenle docking işlemine geçilmeden önce bu eksikliklerin giderilmesi ve protein yapısının docking için uygun hâle getirilmesi gerekmektedir.

Protein yapısı hazırlandıktan sonra, yapının içerisinde bulunan ko-ligandın ilgili proteine karşı yeniden docking işlemine tabi tutulması (redocking) ile yöntemin geçerliliği doğrulanmalıdır. Redocking sonrasında, ko-ligandın deneysel pozisyonu ile elde edilen yeni docking pozu üst üste karşılaştırılarak RMSD (ortalama karekök sapması) değeri hesaplanır ve bu değer genellikle 2.0 Å'nın altında olması beklenir.

Moleküler docking sürecinin bir diğer temel bileşeni ise docking yapılacak ligandlardır. Ligand yapıları, protein yapılarında olduğu gibi veri tabanlarından temin edilebilir veya manuel olarak çizilebilir; çoğunlukla 1B ya da 2B formatlarda ve işlenmemiş halde sunulmaktadır. Bu nedenle ligandların ön hazırlık aşamasından geçirilerek 3B yapılara dönüştürülmesi, uygun şekilde

standardize edilmesi ve sanal tarama çalışmalarında kullanılmaya hazır hâle getirilmesi gerekmektedir.

Bu eğitim kapsamında protein, ko-ligand ve ligand hazırlıkları gerçekleştirilecek; ardından ilgili protein ile ko-ligand için redocking işlemi uygulanacak ve sonrasında seçilen ligandların docking çalışmaları yürütülecektir.

Uygulamalı Eğitim Basamakları:

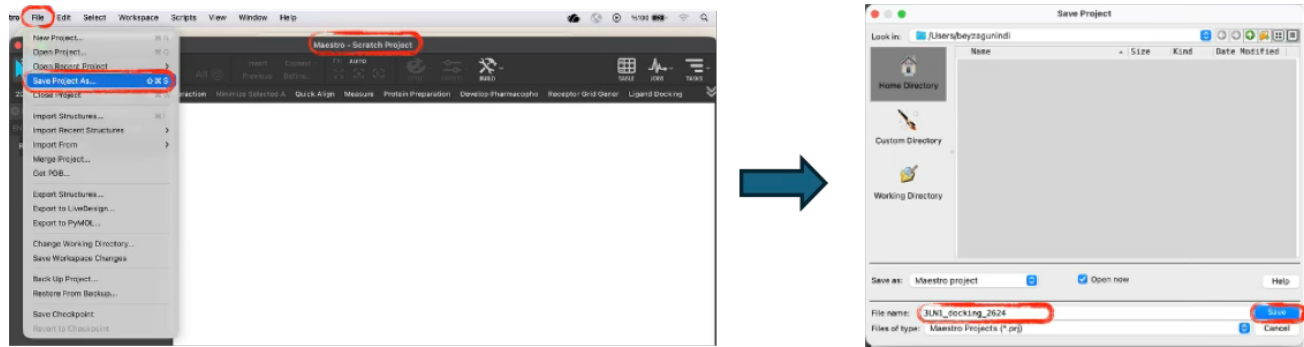
1) Maestro'nun Açılması:

Console açılarak terminale **source /etc/bashrc && maestro -SGL** komutu yazılır.

2) Proje Yaratılması ve Dosyaların Çekilmesi

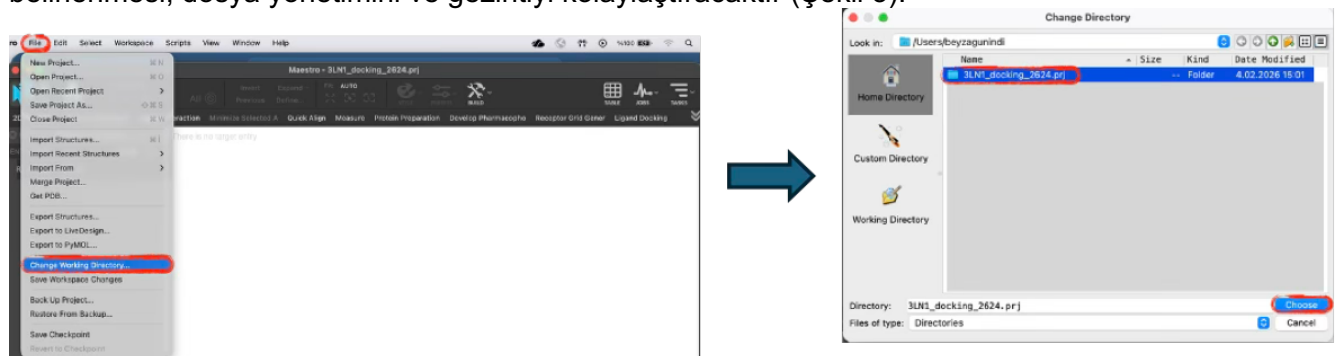
Her hafta için ilgili hafta ismi ile kendinize yeni Maestro projesi oluşturunuz.

Her Maestro oturumu varsayılan bir **Scratch Projesi** ile başlar ve bu proje otomatik olarak kaydedilmez. Bu nedenle Maestro oturumunu başlattıktan sonra **File** → **Save Project As** seçeneği kullanarak projenin kaydedilmesi gerekmektedir. Bu işlemden sonra projede gerçekleştirilen tüm değişiklikler otomatik olarak kaydedilecektir (Şekil 2).



Şekil 2. Proje yaratılması

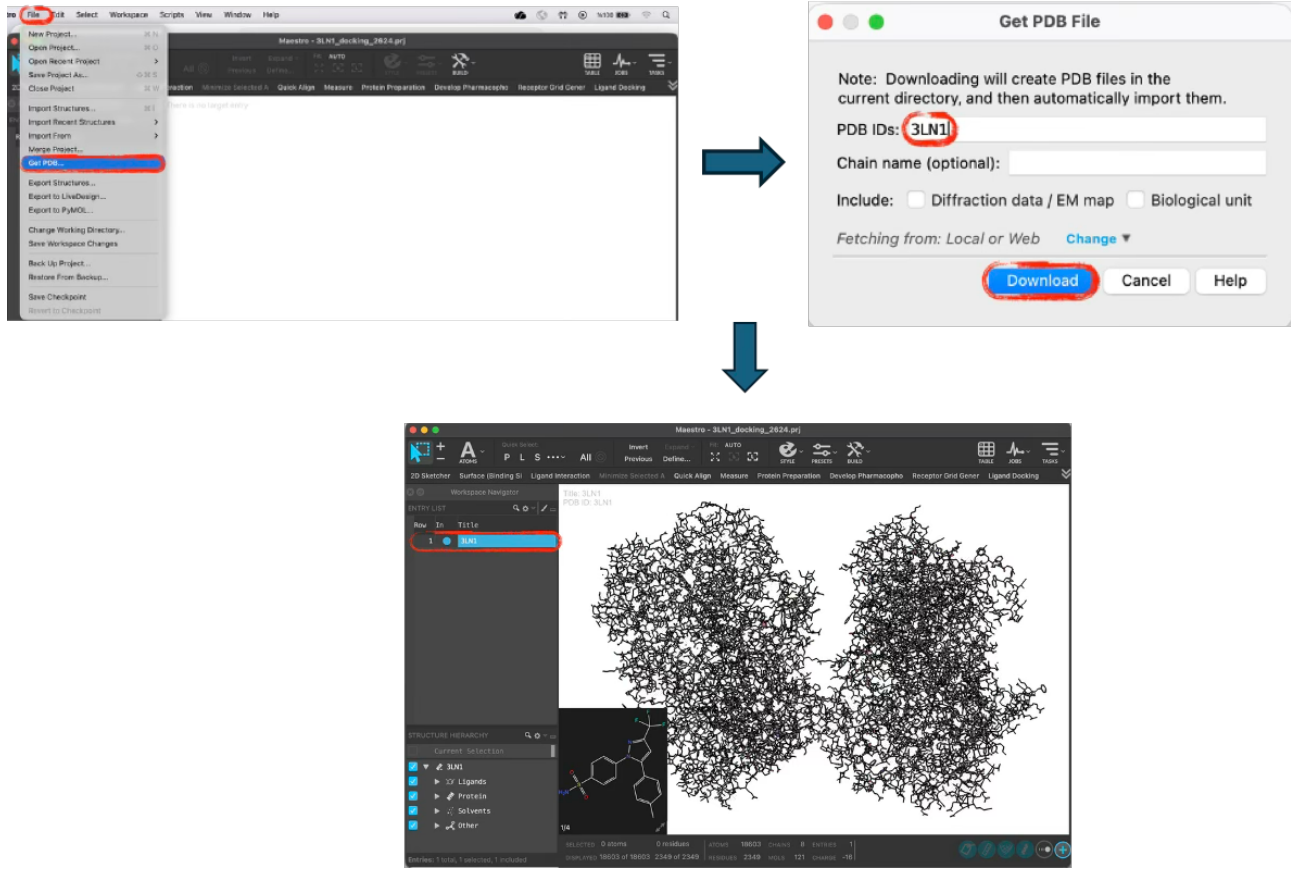
Projeyi kaydettikten sonra **File** → **Change Working Directory** seçeneği kullanılarak proje dizinin belirlenmesi, dosya yönetimini ve gezintiyi kolaylaştıracaktır (Şekil 3).



Şekil 3. Çalışma dizini değiştirme

3) Proteinin PDB'den çekilmesi

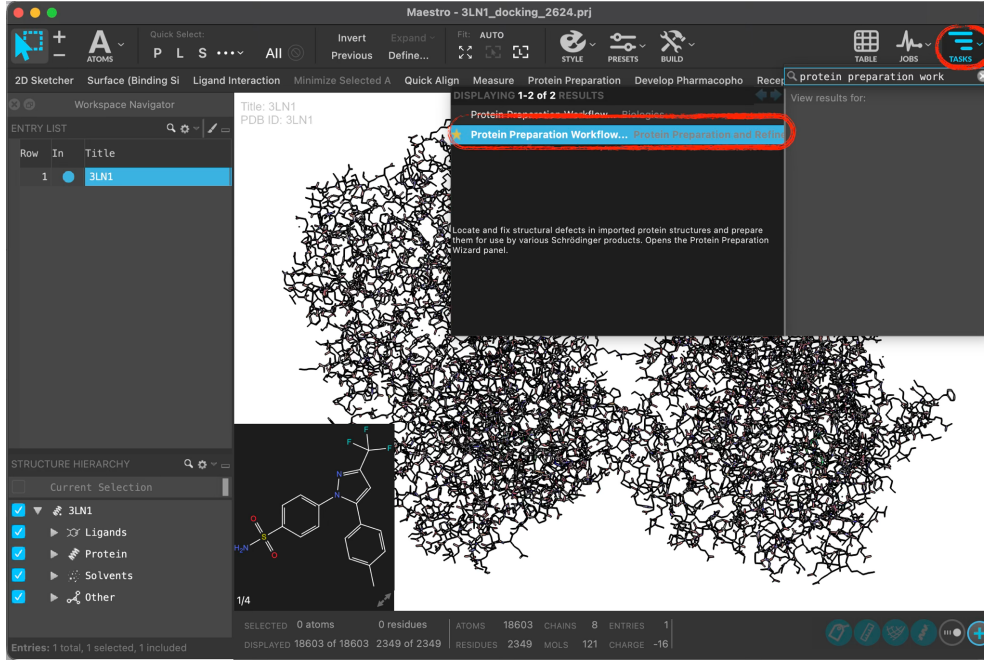
Proje kaydedilip çalışma dizini belirlendikten sonra, **File** menüsünden **Get PDB** seçeneğine tıklanarak çalışılacak proteine ait PDB kodu girilir ve ilgili protein yapısı Protein Data Bank'tan indirilir (Şekil 4).



Şekil 4. PDB'den 3LN1 kodlu proteinin çekilmesi

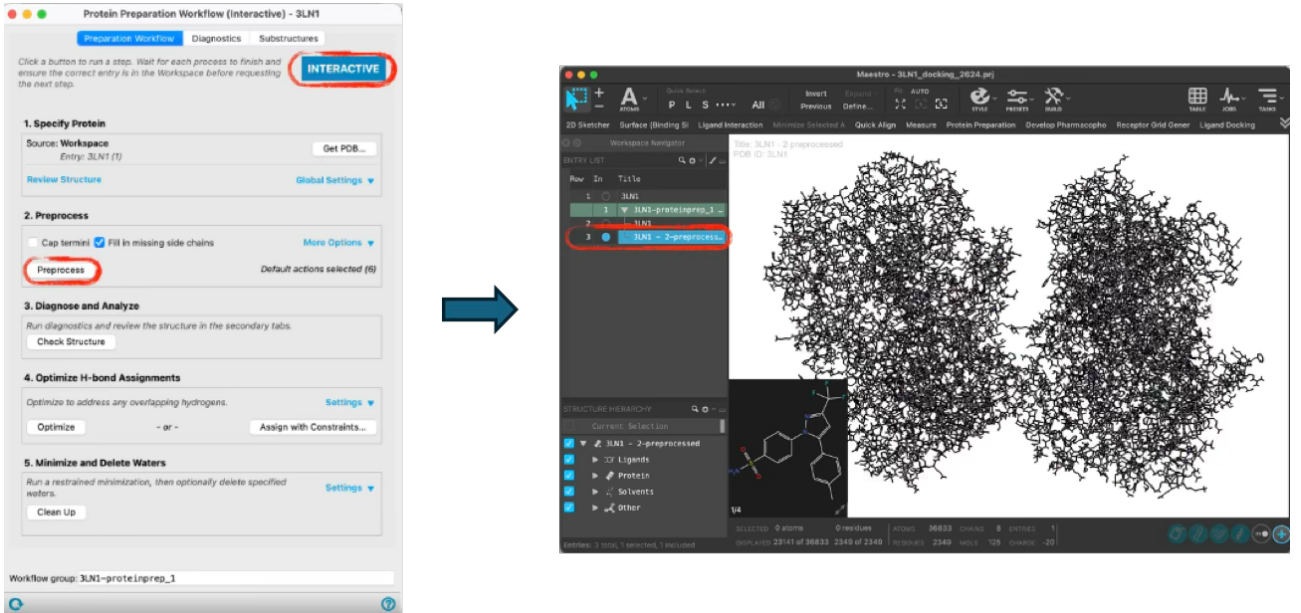
4) Proteinin hazırlanması

Yukarıda da belirtildiği üzere, tipik bir PDB yapı dosyası çoğunlukla yalnızca ağır atomları içerir; bunun yanı sıra su molekülleri, kofaktörler ve metal iyonları gibi ek bileşenler bulunabilir. Ancak bu yapılar genellikle bağ düzeni, topoloji veya formal atomik yükler hakkında bilgi içermez. Ayrıca X-ışını kristalografi analizinin $-O$ ile $-NH_2$ grupları arasındaki farkı ayırt edememesinden kaynaklı olarak terminal amid grupları hatalı yönlendirilmiş olabilir. Bununla birlikte iyonizasyon ve tautomerik durumlar da çoğu zaman atanmamış durumdadır. Bu nedenlerle, PDB'den elde edilen protein yapısının docking çalışmaları öncesinde hazırlanması gerekmektedir. Bu işlem, **Protein Preparation Workflow Panel** aracılığıyla gerçekleştirilir. Panele erişmek için **Tasks** düğmesine tıklanarak **Protein Preparation and Refinement** → **Protein Preparation Workflow** yolu izlenir (Şekil 5).



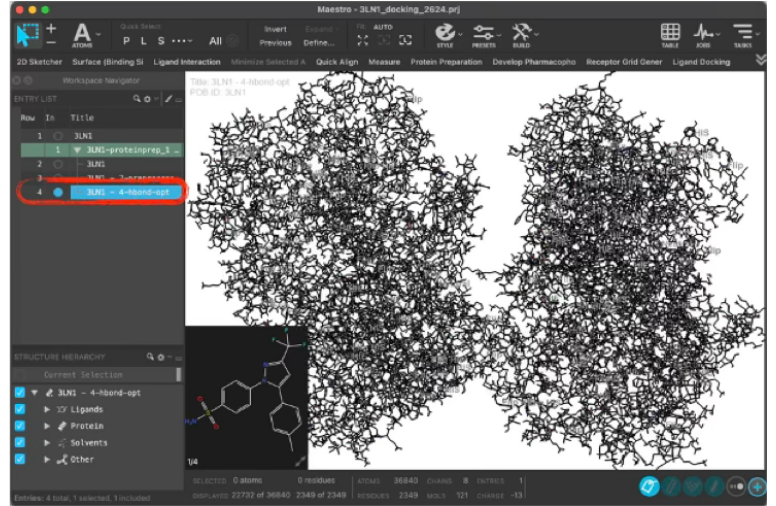
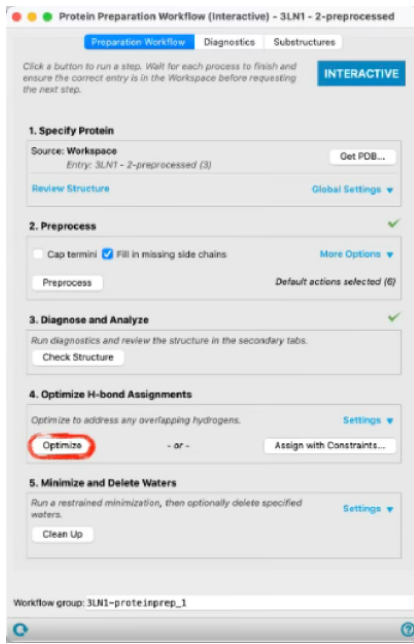
Şekil 5. Protein hazırlanması için gerekli modülün açılması

Protein Preparation Workflow paneli açıldıktan sonra **Interactive** seçeneğine tıklanmalıdır. İnteraktif modda protein hazırlama işlemi, proteinin adım adım düzenlenmesine olanak tanır; her aşamada elde edilen sonuçların incelenmesini sağlar ve karşılaşılan olası sorunlara yönelik uygun çözümlerin belirlenmesine imkân verir. Interactive seçeneği seçildikten sonra ikinci adımda yer alan **Preprocess** aşaması ile işleme başlanır. Bu aşamada protein yapısına hidrojen atomları eklenir, bağ düzenleri düzeltilir ve amino asit kalıntılarının iyonizasyon ile tautomerik durumları düzenlenir (Şekil 6).



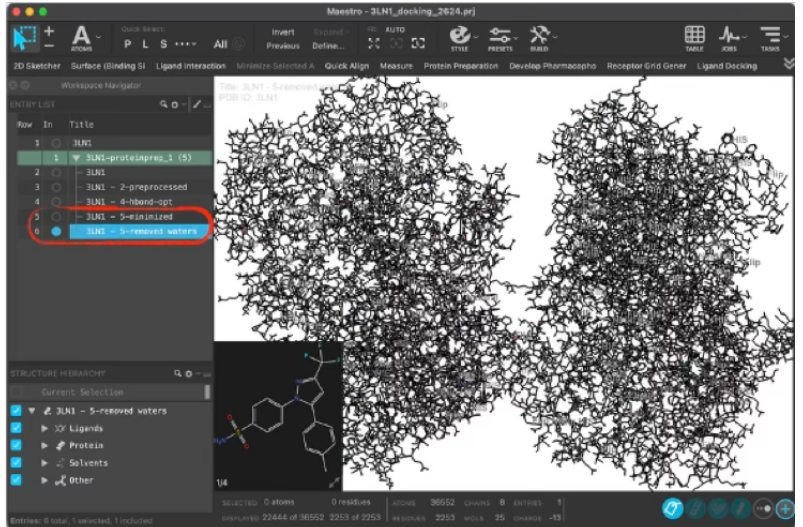
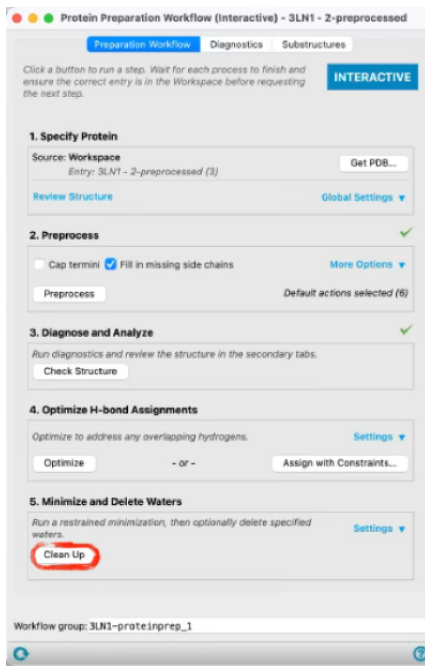
Şekil 6. Protein hazırlanması 'preprocess' basamağı

Preprocess aşaması tamamlandıktan sonra dördüncü basamakta yer alan **Optimize H-bond Assignments** işlemi başlatılır. Bu adımda hidrojen bağları optimize edilip yeniden düzenlenirken, olası hidrojen atomu çakışmaları giderilir ve protein yapısının en uygun geometrik forma getirilmesi amaçlanır (Şekil 7).



Şekil 7. Protein hazırlanması 'optimization basamağı

Optimizasyon aşaması tamamlandıktan sonra beşinci basamakta yer alan **Minimization and Delete Waters** işlemi başlatılır. Bu adımda hidrojen bağları enerji minimizasyonuna tabi tutulur ve aktif bölgeden 5 Å'dan daha uzakta bulunan su molekülleri yapıdan uzaklaştırılır (Şekil 8).



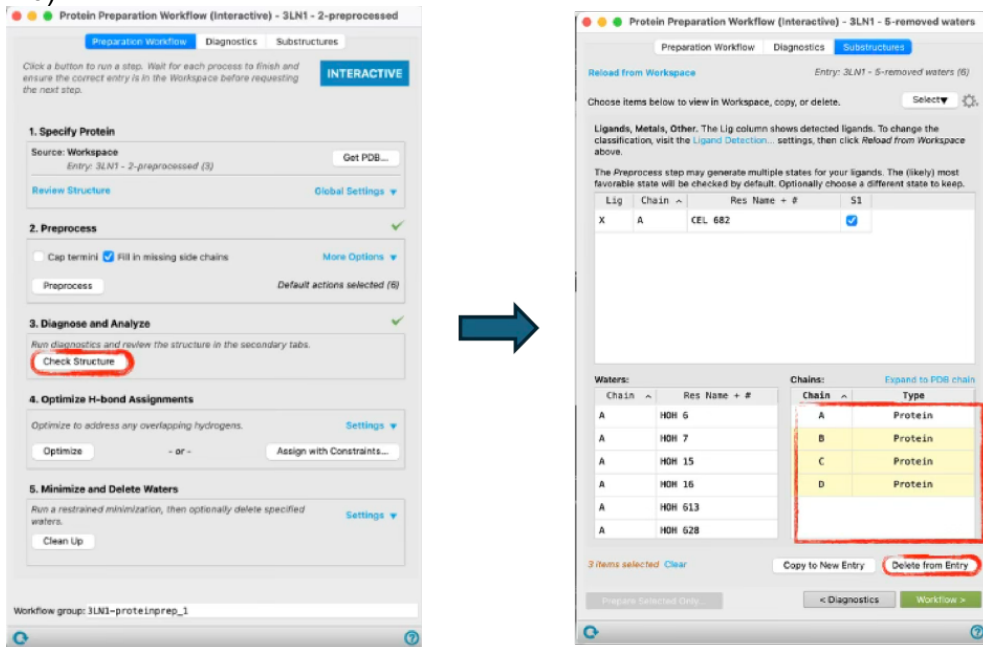
Şekil 8. Protein hazırlanması 'minimization basamağı

Minimizasyon aşaması tamamlandıktan sonra yeniden **Protein Preparation Workflow** panelinde üçüncü basamakta yer alan **Diagnose and Analyze** bölümüne geçilir. Bu adımda öncelikle protein yapısı içerisinde A zincirinde bulunan 'CEL682' ko-ligandı dışındaki tüm ligandlar silinir. Ardından yapıdaki tüm su molekülleri uzaklaştırılır (Şekil 9).



Şekil 9. Protein içerisinde bulunan istenmeyen ligand ve suların silinmesi

Bu işlemler de tamamlandıktan sonra homotetramer yapısındaki proteinin B, C ve D zincirleri de silinir (Şekil 10).



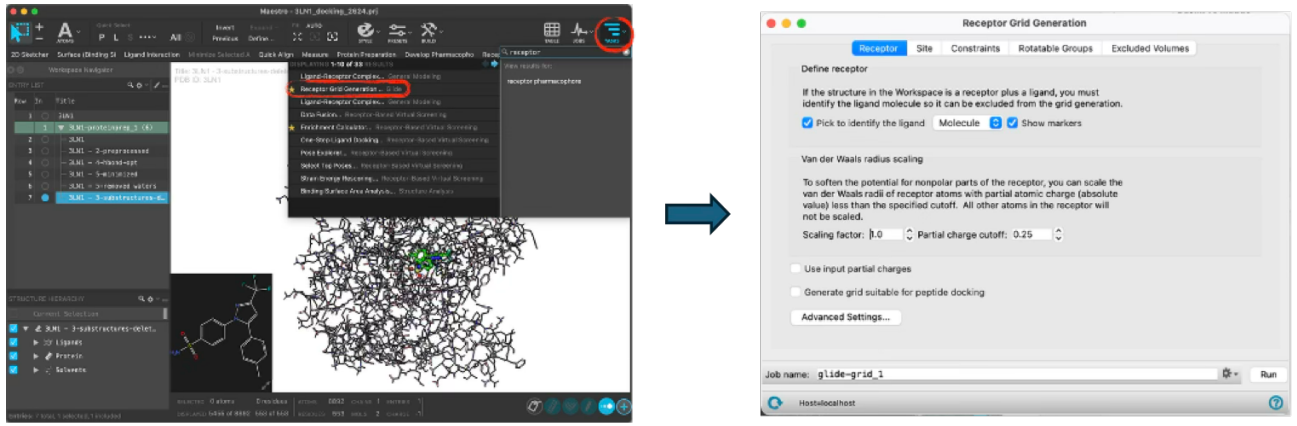
Şekil 10. Protein içerisinde bulunan istenmeyen zincirlerin silinmesi

Bu basamaktan sonra protein hazırlanma aşaması tamamlanmıştır.

Bugünkü çalışmanızda sizlere daha önceden hazırlanmış protein 3B yapısı verilecektir.

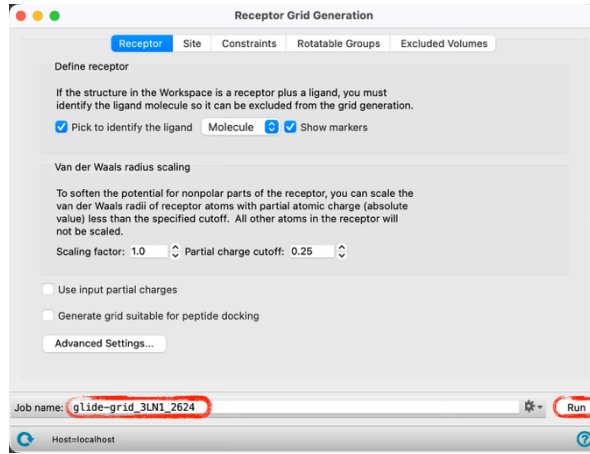
5) Reseptör gridinin hazırlanması

Docking işleminin gerçekleştirilebilmesi için aktif bölgenin önceden tanımlanması gerekmektedir. Bu amaçla Glide modülü içerisinde yer alan **Receptor Grid Generation** paneli kullanılır. Panele **Tasks** → **Receptor Grid Generation** yolu izlenerek erişilebilir. Bu panel aracılığıyla reseptör yapısında bulunan ko-ligandın koordinatları temel alınarak bir grid (ızgara) oluşturulur ve bu grid, docking yapılacak moleküller için aktif bölgenin sınırlarını belirler (Şekil 11).



Şekil 11. Reseptör Grid Generation paneli

Bu panel açıldıktan sonra protein yapısı içerisinde bulunan ligandın üzerine çift tıklanır. Bu işlemle birlikte ligandın etrafında grid (ızgara) alanı görünür hâle gelir (Şekil 12).



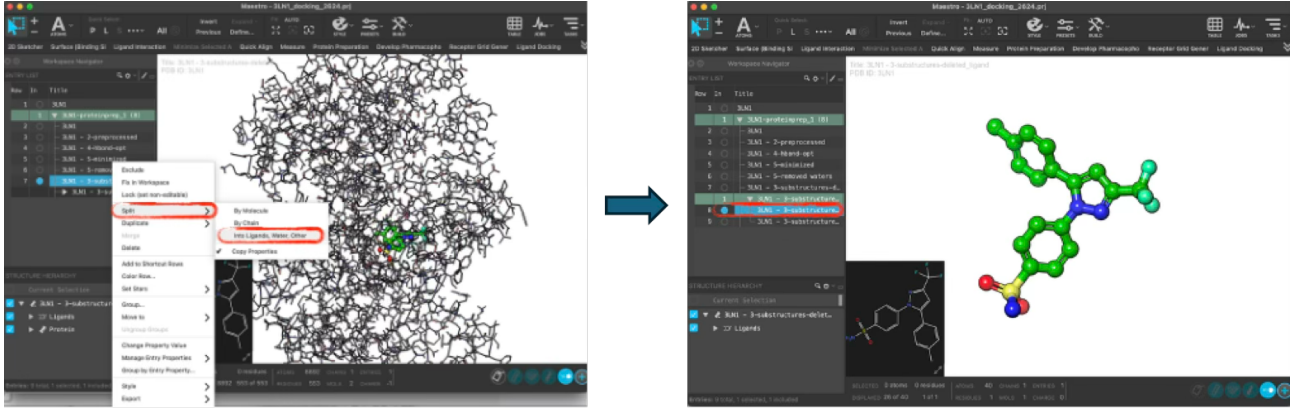
Şekil 12. Reseptör aktif bölge ızgarasının belirlenmesi ve zip dosyasının oluşturulması

Bu aşamadan sonra oluşturulan grid dosyası, çalışma dizinine **ZIP** formatında kaydedilerek docking işlemlerinde kullanılmaya hazır hâle getirilir. Böylece aktif bölgenin tanımlanması ve grid dosyasının oluşturulması süreci tamamlanmış olur.

Bugünkü çalışmanızda reseptör grid dosyası sizlere hazır olarak verilecektir.

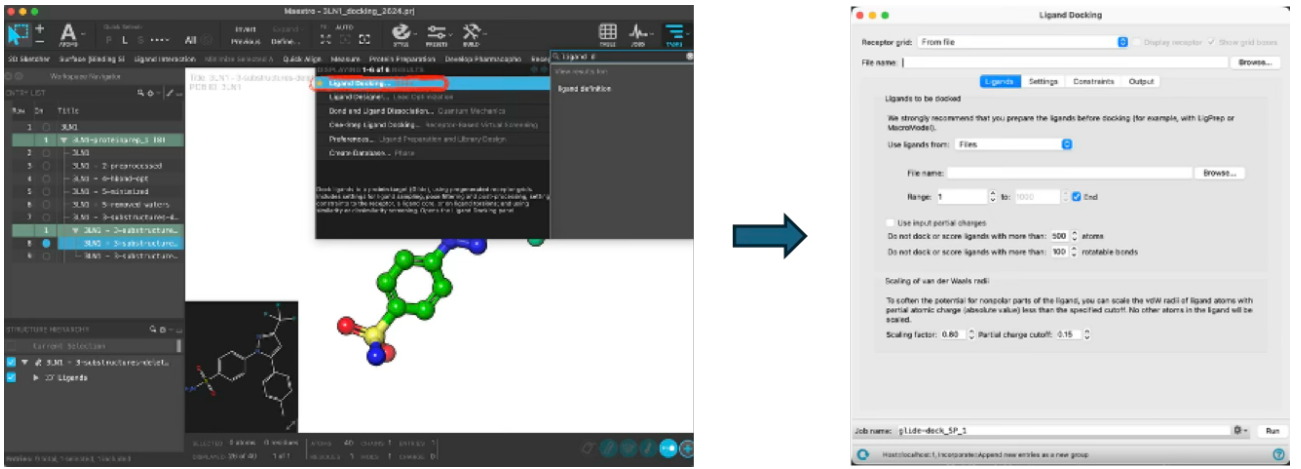
6) Redocking işlemi ile docking validasyonunun gerçekleştirilmesi

Docking yönteminin validasyonu amacıyla, protein yapısı içerisinde yer alan ko-ligandın ilgili protein ile yeniden docking işlemi gerçekleştirilir. Bu kapsamda öncelikle hazırlanmış protein yapısı üzerine sağ tıklanır ve **Split → Into Ligands, Water, Other** seçeneği kullanılarak yapı bileşenlerine ayrılır. Ardından bu bileşenlerden yalnızca ligand ekranda bırakılarak diğer yapılar gizlenir (Şekil 13).



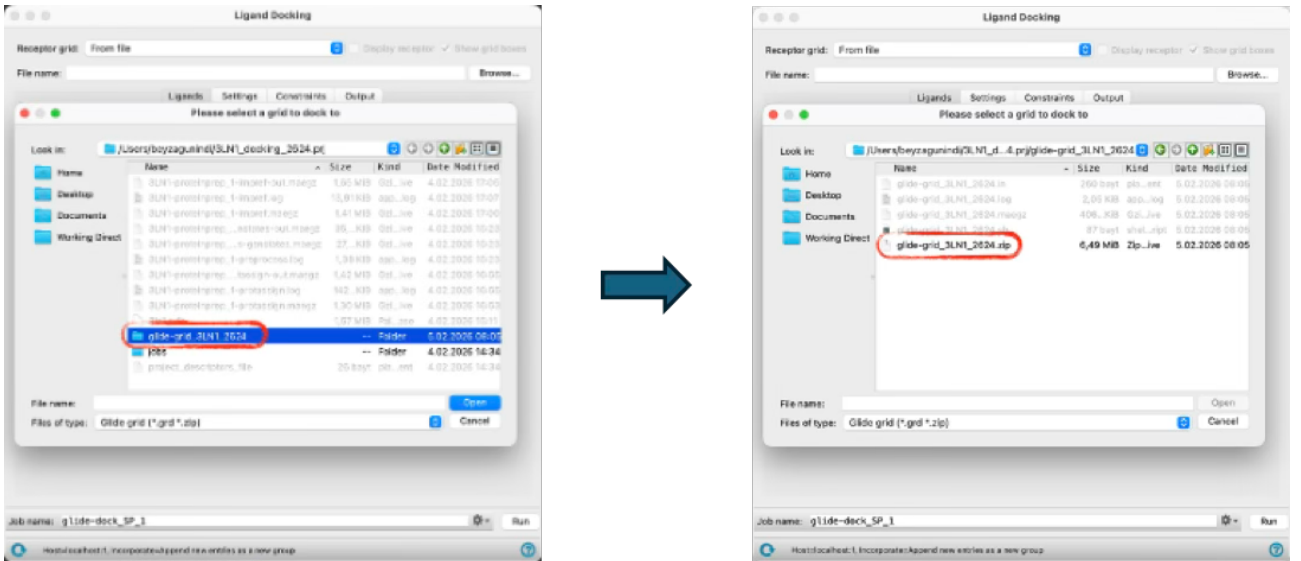
Şekil 13. Reseptörün split edilmesi

Yalnızca ligand yapı ekranda bırakıldıktan sonra docking işlemini başlatmak için **Tasks** → **Ligand Docking** paneline tıklanır (Şekil 14).



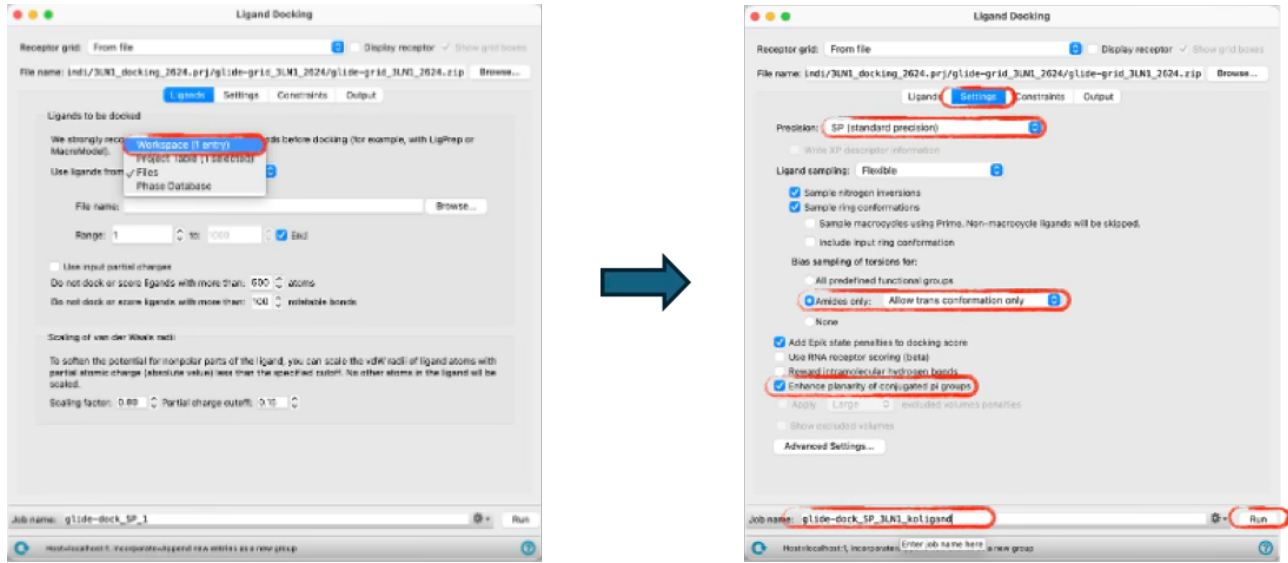
Şekil 14. Ligand docking panelinin açılması

Ligand Docking paneli açıldıktan sonra öncelikle daha önce tanımlanmış olan grid **ZIP** dosyası seçilerek sisteme tanımlanmalıdır (Şekil 15).



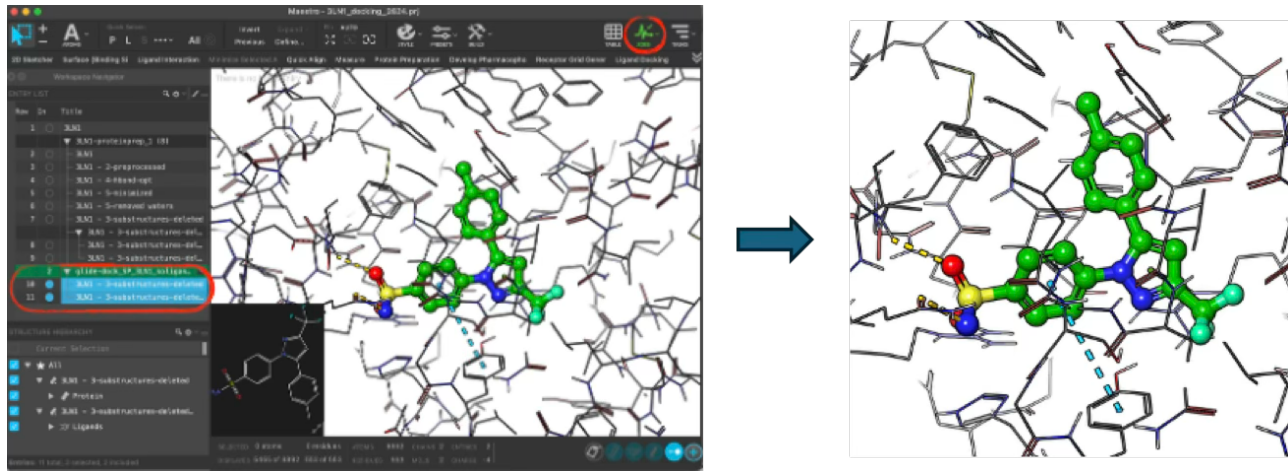
Şekil 15. Grid dosyasının seçilmesi

Grid dosyası seçildikten sonra, daha önce ekranda bırakılmış olan ligandın konumu referans olarak girilir. Ardından **Settings** bölümüne geçilerek aşağıdaki görselde gösterilen ayarlamalar yapılır, işleme uygun bir isim verilir ve **Run** komutuyla docking süreci başlatılır (Şekil 16).



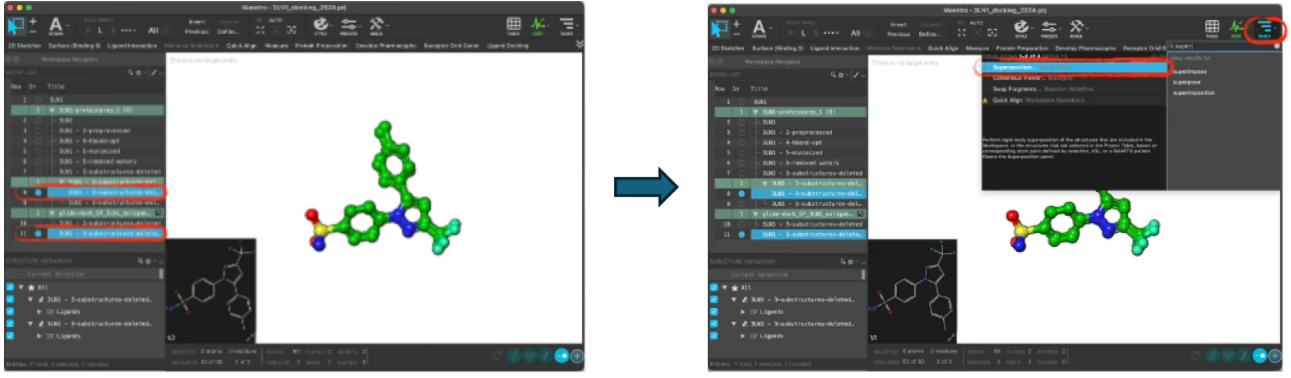
Şekil 16. Ligand docking işlemi için ligand seçimi ve gerekli ayarların yapılması

Docking işlemi tamamlandıktan sonra protein ve docking işlemi gerçekleştirilen ligand ekrana kaydolur (Şekil 17). Ligandın bağlantı modu ve yaptığı etkileşimler incelenir.



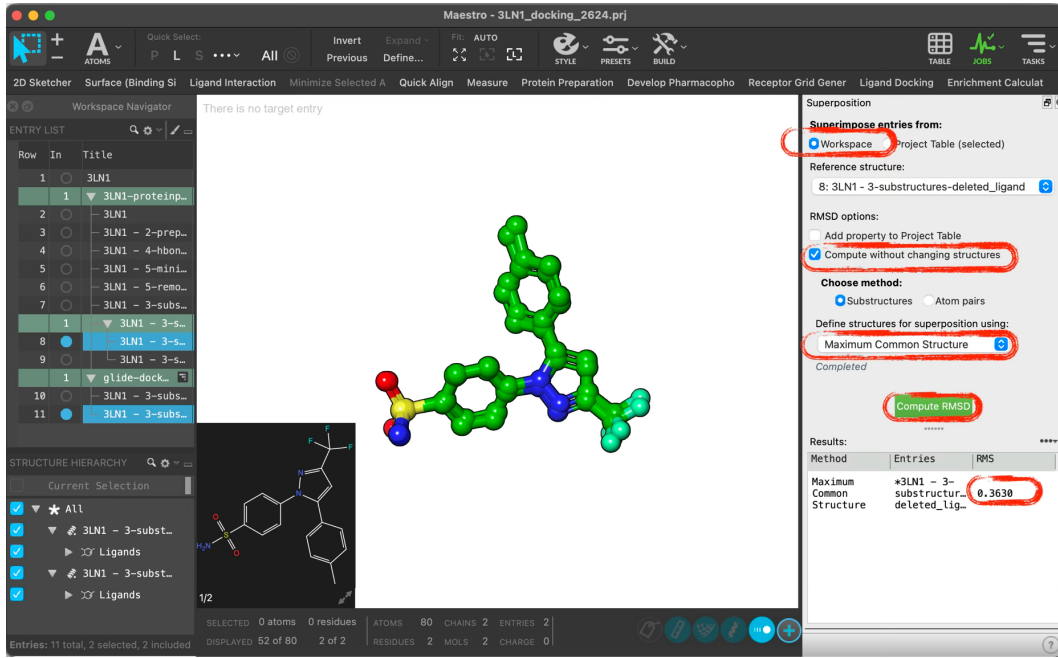
Şekil 17. Ligand docking işleminin tamamlanması ve ligandın bağlanma modunun incelenmesi

Bu aşamadan sonra ko-ligandın docking işlemi öncesindeki konformasyonu ile docking sonrasında elde edilen konformasyonları üst üste çakıştırılır. Bu iki yapı arasındaki farkın RMSD değeri ile ifade edilebilmesi için **Tasks** → **Superposition** paneli açılır (Şekil 18).



Şekil 18. Ligandların üst üste çakıştırılması ve aralarındaki farkın RMSD cinsinden ifade edilmesi

Aşağıda gösterildiği üzere **Compute without changing structures** ve **Maximum Common Structure** seçenekleri işaretlenir. Ardından **Compute RMSD** komutuna tıklanarak ko-ligand ile docking işlemi gerçekleştirilen ligandın konformasyonları arasındaki fark RMSD değeri cinsinden hesaplanır. RMSD değerinin mümkün olduğunca düşük olması, ligand konformasyonlarının birbirine yakınlığını göstermekte olup genellikle **2.0 Å'nın altında** olması beklenir. Bu çalışmada elde edilen RMSD değeri 0.3630 Å olduğundan, gerçekleştirilen docking işleminin valide olduğu ve bağlanma modu bilinmeyen ligandların değerlendirilmesinde güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Şekil 19).

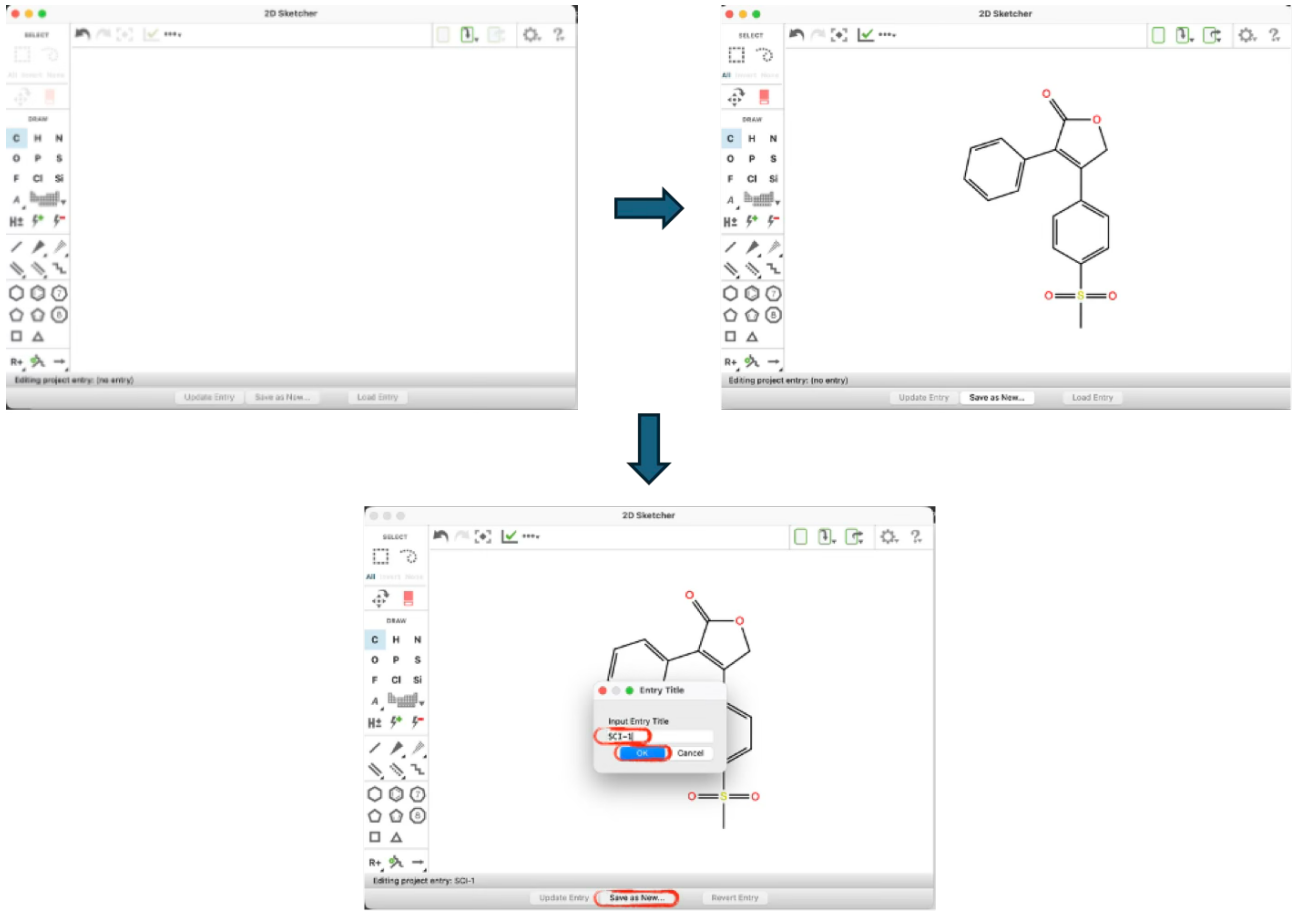


Şekil 19. Docking validasyonu ve RMSD değerinin yorumlanması

Bugünkü çalışmanızda validasyon işlemini gerçekleştirmeden doğrudan valide docking yöntemi ile docking çalışmanızı gerçekleştireceksiniz.

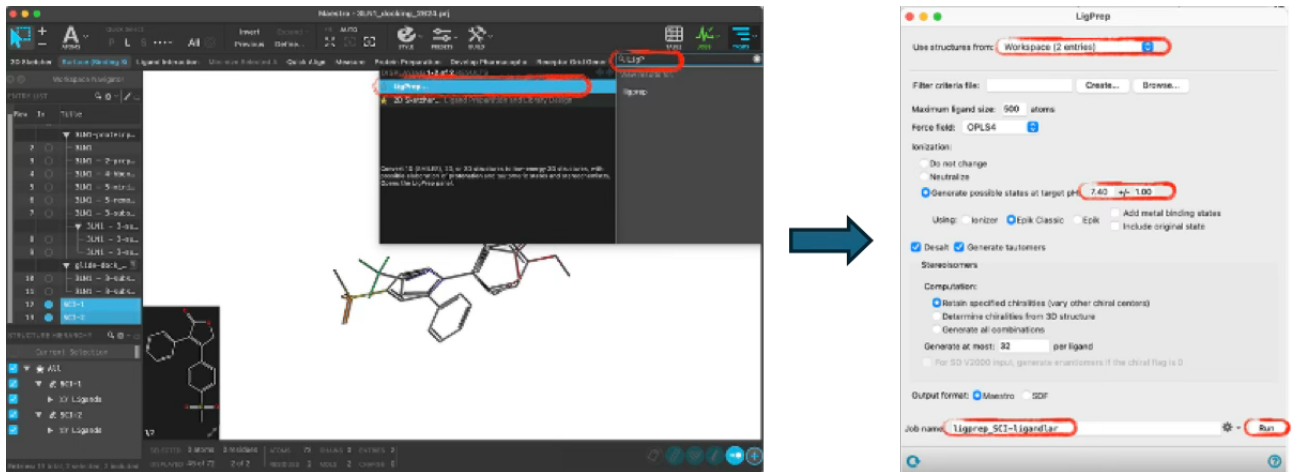
7) Docking işlemi gerçekleştirilecek ligandların 2D olarak çizilmesi ve hazırlanması

Docking işlemi için kullanılacak ligandları program içerisinde çizmek amacıyla **Edit → 2D Sketcher** aracı açılır. İlgili ligand yapısı çizildikten sonra **Save as New** seçeneğine tıklanır ve liganda uygun bir isim verilerek dosyaya kaydedilir (Şekil 20).



Şekil 20. Ligandların 2D olarak çizilmesi

Ligandlar çizildikten sonra docking çalışmalarında kullanılabilmesi için hazırlanmalıdır. Bu amaçla **Tasks** → **LigPrep** paneli açılır. Ligandlar 2B olarak çizildiğinde, fizyolojik pH koşullarında iyonlaşabilecek fonksiyonel gruplar genellikle iyonize durumda değildir; ayrıca mevcut kiralite merkezlerine ait stereoizomerler oluşturulmamış olabilir. Bununla birlikte tautomerizasyon gösterebilen fonksiyonel gruplara ait tautomer formları da çoğu zaman yer almaz. Bu nedenle LigPrep aşaması, ligandların uygun iyonizasyon, stereoizomer ve tautomerik durumlarda 3B yapılaraya dönüştürülerek doğru şekilde kullanılabilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Şekil 21).

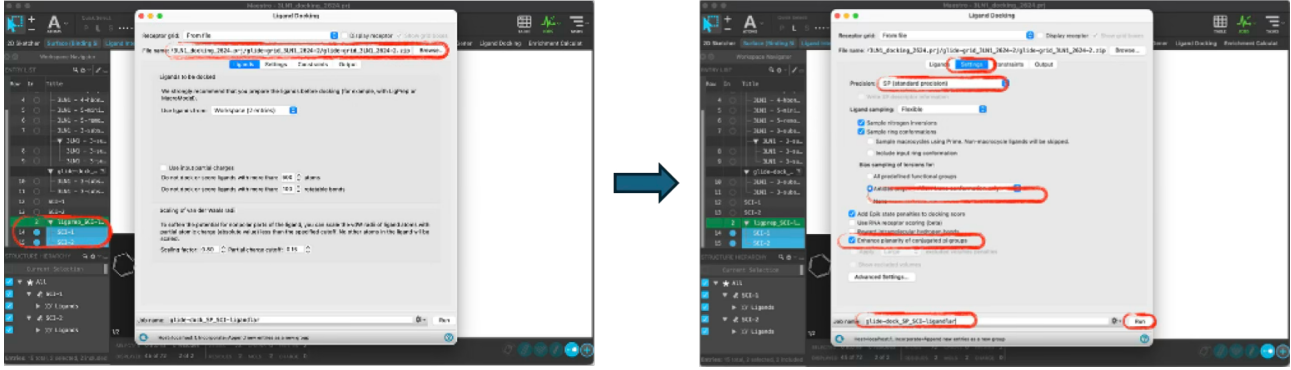


Şekil 21. Ligandların hazırlanması

Bugünkü çalışmanızda ligandlar size doğrudan çizilmiş bir şekilde verilmiştir.

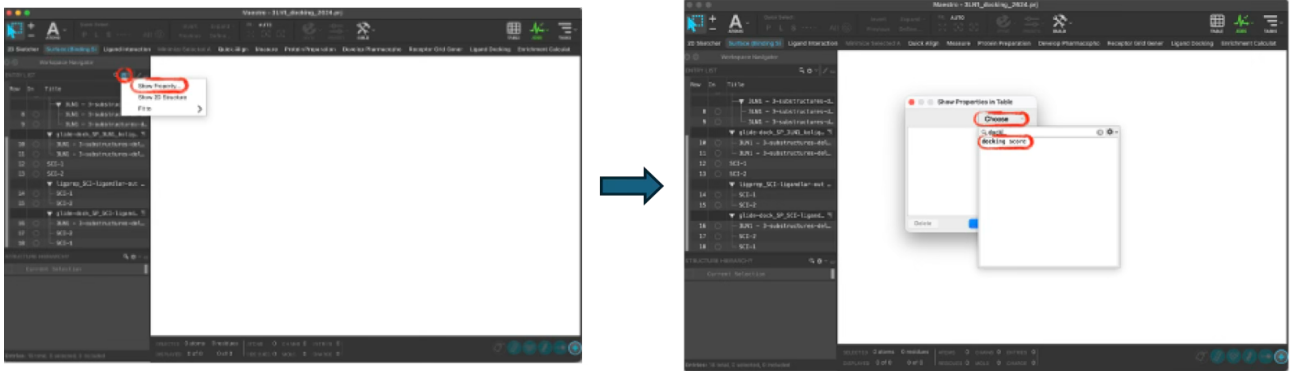
8) Hazırlanan ligandların docking işleminin gerçekleştirilmesi

Yukarıda gösterilen adımlarda öncelikle ligandların konumu belirlenir. Ardından fizyolojik koşulları temsil edecek şekilde pH değeri 7.4 ± 1.0 aralığında ayarlanır. İşleme uygun bir isim verildikten sonra Run komutu ile süreç başlatılır. İşlem tamamlandığında hazırlanan ligandlar proje dosyasına kaydedilir. Sonrasında bu ligandların docking çalışmaları gerçekleştirilmek üzere, redocking aşamasında açıklanan adımlar izlenerek docking işlemi uygulanır (Şekil 22).



Şekil 22. Ligandların docking işleminin gerçekleştirilmesi

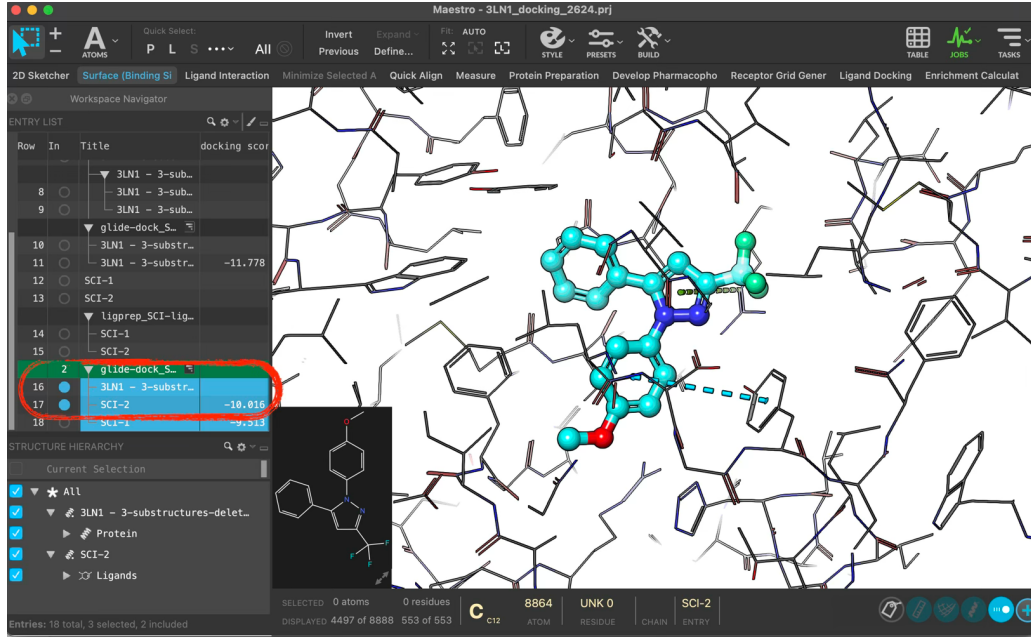
Docking işlemi tamamlandıktan sonra docking skorlarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu skorların görüntülenebilmesi için özellik olarak dosyaya eklenmesi gerekir. Bunun için aşağıda belirtilen adımlar izlenmelidir (Şekil 23).



Şekil 23. Docking skoru özelliğinin açılması

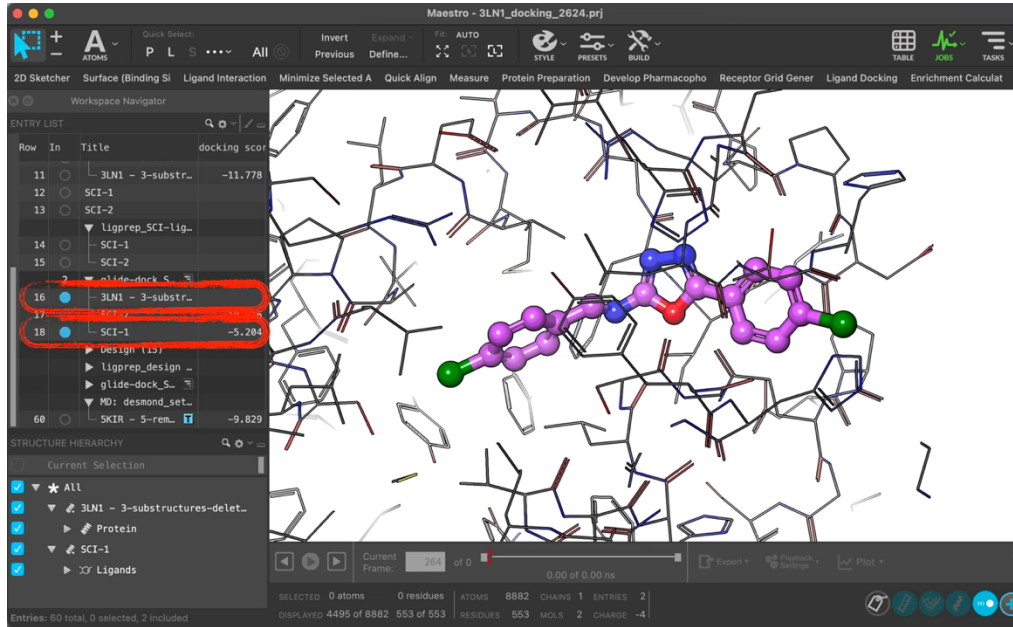
Sonuç: Docking sonuçlarının değerlendirilmesi, ligandların aktif bölgede gerçekleştirdiği moleküler etkileşimlerin ayrıntılı analizi ile docking skorlarının birlikte incelenmesiyle gerçekleştirilmektedir. Ligandların biyolojik aktiviteleri bilindiği durumlarda, docking skorları bu aktivitelerin yorumlanmasına anlamlı katkılar sunabilir. Ancak biyolojik aktiviteye ilişkin deneysel veri bulunmadığında, docking sonuçları tek başına biyolojik etki hakkında kesin çıkarımlar yapılmasına olanak sağlamamaktadır.

SCI-2 olarak adlandırılan ligandın bağlanma modu ve docking skoru aşağıda sunulmuştur. Şekilde mavi kesikli çizgiler π - π etkileşimlerini, yeşil kesikli çizgiler ise kation- π etkileşimlerini göstermektedir. Buna göre SCI-2 **Tyr341** amino asidi ile **π - π etkileşimi** yaparken, **Arg106** amino asiti ile **kation- π etkileşimi** yapmıştır. Docking skoru -10.016 kcal/mol bulunmuştur (Şekil 24).



Şekil 24. SCI-2 bağlantı modu ve docking skoru

SCI-1 olarak adlandırılan ligandın bağlanma modu ve docking skoru aşağıda sunulmuştur. Molekölün enzim aktif bölgesinde yalnızca hidrofobik etkileşimler yaptığı buna ekstra herhangi bir etkileşim yapmadığı gözlenmiştir. Docking skoru -5.204 kcal/mol bulunmuştur (Şekil 25).



Şekil 25. SCI-2 bağlantı modu ve docking skoru

İki molekülün COX-2 enzimine karşı biyolojik aktiviteleri literatürde rapor edilmiştir. SCI-1 kodlu bileşiğin IC_{50} değeri 4 μ M iken, SCI-2 kodlu bileşiğin IC_{50} değeri 3 nM olarak bildirilmiştir. Docking sonuçlarının karşılaştırılması, SCI-2 kodlu molekülün SCI-1'e kıyasla daha düşük bağlanma enerjisine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu doğrultuda, docking çalışmaları sonucunda elde edilen bağlanma modları ve docking skorları, iki molekül arasındaki biyolojik aktivite farkını destekler nitelikte bulunmuştur.

Bu derste sizlerden beklenen sizlere hazır olarak verilen protein, grid dosyası ve ligandları kullanarak bu docking işlemlerini tekrarlamak olacaktır. Docking işlemleri tamamlandıktan sonra;

- **Protein-ligand komplekslerinin ekran görüntüleri alınacak,**
- **Docking skorları,**
- **Ligandlarla protein arasındaki etkileşimler raporunuza eklenecektir.**

Bu işlemler tamamlandıktan sonra sizlere bireysel olarak verilen PDB kodlarınız ile Protein Data Bank üzerinden kendi proteininizi bulup ekran görüntüsü almalı, içerisinde bulunan ilaç molekülün ismini bulmalısınız. Bunları da raporunuza eklemelisiniz.

Son olarak grubunuza uygun Drive dosyası içerisinde (A1-PDB_proteinler, B1-PDB_proteinler veya C1-PDB_proteinler) kendi PDB kodunuzdaki hazırlanmış proteini indirip program içerisinde görselleştirip ekran görüntüsü almalı ve protein-ligand kompleksinin etkileşimlerini raporunuzda belirtmelisiniz.

Jain, A. N., Nicholls, A. 2008. "Recommendations for evaluation of computational methods", J Comput Aided Mol Des, 22, 133-9.

Kolb, P., Irwin, J. J. 2009. "Docking screens: right for the right reasons?", Curr Top Med Chem, 9, 755-70.

Stanzione, F., Giangreco, I., Cole, J. C. 2021. Chapter Four - Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *In*: WITTY, D. R., COX, B. (eds.) *Progress in Medicinal Chemistry*. Elsevier.