T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIK2 AKTİVASYONUNU AKTİVATÖR LKB1 KİNAZDAN AYIRMAYA YÖNELİK İN SİLİCO BİR ALLOSTERİK İNHİBİTÖR TARAMASI

KORKUT FURKAN ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIK2 AKTİVASYONUNU AKTİVATÖR LKB1 KİNAZDAN AYIRMAYA YÖNELİK İN SİLİCO BİR ALLOSTERİK İNHİBİTÖR TARAMASI

KORKUT FURKAN ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. FERRUH ÖZCAN
II. DANIŞMANI
DOÇ. DR. VİLDAN ENİSOĞLU ATALAY

GEBZE
2022

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

AN IN SILICO SEARCH FOR AN ALLOSTERIC INHIBITOR THAT UNCOUPLE SIK2 ACTIVITY FROM ITS UPSTREAM KINASE LKB1

KORKUT FURKAN ŞAHİN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETİCS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. FERRUH ÖZCAN

II. THESIS SUPERVISOR

ASSOC. PROF. DR. VİLDAN ENİSOĞLU ATALAY

GEBZE

2022

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/01/2022 tarih ve 2022/4 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/01/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Korkut Furkan Şahin'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE
(II. TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Vildan ENİSOĞLU ATALAY

ÜYE : Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE : Doç. Dr. Emel SERDAROĞLU KAŞIKÇI

ÜYE : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ÖZBİL

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
……/……/…… tarih ve ……/…….. sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu çalışmada Endoplazmik retikulum spesifik bir stres kinaz olan Tuzla İndüklenebilir Kinaz 2'nin (SIK2) Karaciğer Kinaz B1 (LKB1) aracılı aktivasyonunda gerekli olduğu düşünülen Ubiquitin ilişikli domeyn (UBA)'nın kinaz domeyni ile olan ilişkisi docking ve moleküler dinamik modelleme ile incelenmesi ve ardından bu etkileşimi bozmaya yönelik özgün inhibitör adayların belirlenmesi hedeflenmiştir.

Adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) ailesi alt grubu olan SIK'lar, organizmada enerji dengesinde rol oynayan glukonegenez, glukoz alımı, lipit metabolizması gibi kritik rollere sahiptirler. Başta SIK2 olmak üzere aile üyelerinin kanser, depresyon, ömelanin sentezi, kemik oluşumu ve inflamasyon yanıtı oluşumu gibi farklı birçok görevini bildirmiştir. SIK üyelerinin üç boyutu yapısı henüz aydınlatılmamış olması literatürde bir boşluk yarattığı gibi günümüzde henüz bilinmeyen rollerin araştırılması ve tedavi amaçlı inhibitör çalışmalarının yapılmasını da önemli ölçüde engellemektedir.

Çalışmamızda homoloji modelleme ile SIK2 için geliştirilmiş modeller, doğrulama sonrası UBA-kinaz domeynler arası ilişkinin incelenmesi amacıyla mutant ve aday inhibitör ligand kenetli versiyonlar ile Moleküler Dinamik (MD) simülasyon uygulanmıştır. SIK2'nin UBA domeyni ile kinaz lobülü arasındaki arasındaki etkileşimin bozmaya yönelik olarak tasarlanan peptit inhibitörlerle elde edilen düşük bağlanma afinitelerinin üstesinden gelmek amacıyla ZINC15 veri tabanında uygun bileşiklere taranmış ve kenetleme çalışması ile gelecek çalışmalara ön veri sağlayacak bazı düşük ve orta düzeyde afiniteye sahip moleküler yapılara dikkat çekilmiştir. SIK2'nin enzimatik aktivitesinin uyarılması için gerekli olan LKB1 fosforilasyonunda UBA-kinaz etkileşiminin sınırlı gerçekleştiği gösterilmiş, görsel tarama çalışmasıyla domeynler arasındaki etkileşim arayüzünü kompetetif allosterik inhibitör tasarımı için temel yapısal bilgiler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tuzla İndüklenebilir Kinazlar (SIK), Protein Modelleme, Moleküler Dinamik Simülasyon, Ubikuitin İlişikli Domeyn (UBA), Obezite.

SUMMARY

In this study, the relation of Ubiquitin-associated domain (UBA) with the kinase domain, which is claimed to be required for the Liver Kinase B1 (LKB1)-mediated activation of Salt Inducible Kinase 2 (SIK2), an Endoplasmic reticulum stress kinase, was investigated by docking and molecular dynamics (MD) modeling. Consequently, it was aimed to identify specific inhibitor candidates to disrupt this interaction.

SIKs, a subgroup of the adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) family, have critical roles such as gluconeogenesis, glucose uptake, and lipid metabolism, which play a role in energy balance in the organism. Moreover, studies have also shown many different roles of SIK2, such as depression, eumelanin synthesis, bone formation, and inflammatory response. The fact that the three-dimensional structure of SIK members has not yet been known significantly hinders the investigation of unknown roles and the conduct of therapeutic inhibitor studies.

In our study, models developed for SIK2 with homology modeling and MD simulation were applied with mutant and candidate inhibitor ligand-docking versions to examine the relationship between UBA-kinase domains after validation. In order to overcome the low binding affinities obtained with peptide inhibitors designed to disrupt the interaction between domains, attention was paid to some moderate affinity molecules that were searched in the ZINC15 database and will provide preliminary data for future studies. It has been shown that the UBA-kinase interaction is limited in LKB1 phosphorylation, and basic structural information for the design of competitive allosteric inhibitors has been obtained by visual screening study of the interaction interface between the domains.

Key Words: Salt Inducible Kinases (SIK), Protein Modeling, Molecular Dynamic Simulation, Ubiquitin Associated (UBA) Domain, Obesity.

TEŞEKKÜR

Başta gerek lisans gerekse yüksek lisans eğitimimde, akademik hayatımda bana fırsatlar tanıyan, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Prof. Ferruh ÖZCAN hocama,

Dün olduğu gibi bugün de beni gerek akademik gerekse sosyal anlamda destekleyen, çalışmanın her basamağında bana yol gösteren eş danışmanım Doç. Vildan ENİSOĞLU ATALAY hocama,

Eğitimim sürecinde daima yanımda yer alan, bir arada olmaktan derin mutluluk duyduğum, bana birçok kazanım sağlayan, başta Mehmet Soner TÜRKÜNER olmak üzere tüm geçmiş dönem ve günümüz MIND Lab çalışma arkadaşlarıma,

Moleküler Dinamik simülasyon çalışmalarında benden yardımını esirgemeyen, destekleriyle çalışmayı olgunlaştıran Devran KARAGÖZ'e,

Uzun yıllardır bana inanarak akademik hayatımı destekleyen, beni ben yapan aileme, dostlarıma ve tüm hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. TUZLA İNDÜKLENEBİLİR KİNAZLAR	3
2.1. SIK Genleri ve Evrimsel Korunumu	3
2.2. SIK Domeynleri ve İşlevleri	4
2.2.1. SIK UBA Domeyni	6
2.3. SIK Yukarı ve Aşağı Akışları	6
2.4. Mikrotübül Affinite Regülasyon Kinaz 1	10
2.5. SIK İnhibitör Tasarım Çalışmaları ve Kısıtlılıklar	11
3. MATERYAL-METOT	15
2.1. Kullanılan Yazılımlar	15
3.1.1. Hizalama Çalışması NCBI	16
3.1.2. Homoloji Modelleme SWISS-MODEL	16
3.1.3. Modellerin Doğruluğunun Ölçülmesi ProSA	17
3.1.4 Domeyn Etkileşimlerinin İncelenmesi	18
3.1.5 Mutant ve Ligand Kenetlenmeli Model Geliştirilmesi	18
3.1.6. Moleküler Dinamik Simülasyonları Gromacs	19
3.1.6.1. RMSD	20
3.1.6.2. RMSF	21
3.1.7. Protein – Ligand Kenetlenme AutoDock Vina	21
3.1.8. Yardımcı Programlar	22
3.1.8.1. Discovery Studio	22

3.1.8.2. Chimera 22
3.1.8.3. PyMol 23
3.1.8.4. VMD 23
4. SONUÇLAR 24
4.1. NCBI Hizalama Çalışması Sonuçları 24
4.2. Homoloji Modelleme Sonuçları 24
4.3. Model Doğruluğunun Ölçülmesi 29
4.4. Domeyn Etkileşimlerinin İncelenmesi 31
4.5. Mutant ve Ligand Kenetlenmeli Model Geliştirilmesi 35
4.6. Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları 36
4.7. İnhibitör Tasarımı 42
5. TARTIŞMA 46

KAYNAKLAR 50
ÖZGEÇMİŞ 57
EKLER 58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
3D	:	Üç Boyutlu
Å	:	Angstrom
AKT	:	Protein Kinaz B
AMP	:	Adenozin monofosfat
AMPK	:	AMP ile Aktive Edilen Kinaz
ATP	:	Adenozin trifosfat
BLAST	:	Temel Lokal Hizalama Araştırma Aracı
cAMP	:	siklik Adenozin monofosfat
CaMK	:	Ca / Kalmodulin Bağımlı Kinazlar
CREB	:	siklik AMP-Cevap Elemanı Bağlanma Proteini
CRTC	:	CREB-Regülasyon Transkripsiyonel Ko-aktivatör
ERK	:	Ekstrasellüler Sinyal Regülasyon Kinaz
FDA	:	Gıda ve İlaç İdaresi
FOXO	:	Çatalbaşlı kutu ailesi – O sınıfı
GMQE	:	Küresel Model Kalite Tahmini
GSK3	:	Glikojen Sentaz Kinaz 3
HDAC	:	Sınıf 2a Histon Deaçetilaz
IC50	:	İnhibitör Kosantrasyon 50
IL-10	:	Interlökin 10
IL-12	:	Interlökin 12
IL-33	:	Interlökin 33
K	:	Kelvin
Ki	:	İnhibitör Konsantrasyonu
KA	:	Kinaz İlişikli domeyn
KO	:	Knock-out
LKB1	:	Karaciğer Kinaz B1
LCK	:	Lenfosit Spesifik Protein Tirozin Kinaz
MAPK	:	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MARK	:	Mikrotübül Affinite Regülasyon Kinazlar

MD	:	Moleküler Dinamik
MEF2	:	Miyosit Güçlendirici Faktör 2
MELK	:	Maternal Embiryonik Zipper Kinaz
NCBI	:	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NF-κB	:	Nükleer faktör kappa B
NMR	:	Nükleer Manyetik Rezonans
SIK	:	Tuzla İndüklenebilir Kinaz
PDB	:	Protein Veri Tabanı
PGE2	:	Prostaglandin E2
PI3K	:	Fosfoinosit 3 Kinaz
PKA	:	Protein kinaz A
PTH	:	Parathormon
PTH1R	:	Parathormon 1 Reseptörü
QMEAN	:	Kantitatif Model Enerji Analizi
RMSD	:	Sapmanın Karekök Ortalaması
RMSF	:	Dalgalanmanın Karekök Ortalaması
SAV	:	Skafold Protein Salvador
TNF	:	Tümör Nekrosis Faktör
UBA	:	Ubiquitin ilişikli domeyn
YAP	:	Yes İlişikli Protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	SIK ailesi üyelerinde domeyn yerleşimi ve fosforilasyon alanları.	4
2.2:	AMPK ailesi üyelerinin aktivasyon alanları hizalama çalışması.	5
2.3:	Bazı SIK inhibitörleri.	12
2.4:	SIK ve diğer bazı AMPK ailesi üyeleri Kapı-tutucu bölge benzerliği.	13
3.1:	İş akış grafiği.	15
4.1:	BLAST programı SIK2 – MARK ailesi sekans benzerlik analizi.	24
4.2:	SWIS-MODEL model veri tabanında mevcut SIK2 modelleri	25
4.3:	SWISS-MODEL veri tabanlarında tanımlı MARK1 deneysel modelleri.	25
4.4:	Modelleme şablon olacak MARK1 yapıları ve SIK2 hizalama çalışması	26
4.5:	SIK2 homoloji modelleme, Model I.	27
4.6:	SIK2 homoloji modelleme, Model II.	28
4.7:	Chimera programı ile SIK2 homoloji modelleri çakıştırma çalışması.	29
4.8:	ProSA programı Model I kalite analiz sonuçları.	30
4.9:	ProSA programı Model II kalite analiz sonuçları.	31
4.10:	Model I domeynler arası oluşmuş H bağları.	32
4.11:	Model I domeynler arası oluşmuş H bağları ve uzunlukları.	32
4.12:	Model II domeynler arası oluşmuş H bağları.	33
4.13:	Model II domeynler arası oluşmuş H bağları ve uzunlukları.	33
4.14:	Modellerde domeynler arası etkileşimde görev aldığı gösterilmiş bazı aminoasitler alanin ile değiştirilmiş mutant model.	34
4.15:	Tripeptid yapılı ligand tasarımı ve kenetlenme çalışması.	35
4.16:	MD simülasyonu Model I RMSD analiz sonuçları	37
4.17:	MD simülasyonu Model I RMSF analiz sonuçları.	38
4.18:	MD simülasyonu Model II RMSD analiz sonuçları.	39
4.19:	MD simülasyonu Model II RMSF analiz sonuçları.	40
4.20:	Model I MD simülasyon kinaz-UBA domeynler arası H bağı grafiği.	41
4.21:	Model II MD simülasyon kinaz-UBA domeynler arası H bağı grafiği.	42

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
3.1:	Başlıca kuvvet alanlarının kullanım amacı ve geliştiricileri.	19
4.1:	Model I ve Model II ligand kenetlenme bağlanma affinitesi ve IC50 değeri.	35
4.2:	Aday moleküllerin bağlanma affiniteleri, hesaplanan IC50 değerleri ve farmakokinetik özellikleri.	43

1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Yaşamın ana bileşini olan proteinlerin yapıları ve işlevleri arasındaki ilişkinin anlaşılması moleküler biyolojinin en temel sorularından biridir. Deneysel yöntemler, proteinlerin organizmadaki işlevlerini görmekte altın standart olmasına karşın maliyetli ve uzun zaman alan metotlardır. Günümüzün gelişen teknolojisine rağmen deneysel metotların sınırlılıkları mevcuttur, her yapı ve hedefe uygulanamamaktadır. Tüm bu zorluklar deneysel metotlara alternatif olacak yöntem arayışlarını başlatmıştır.

Son yüzyılda hayatın her alanında yer alan bilgi ve işlem çalışmaları, biyolojinin deneysel kısıtlılıklarına alternatif sağlamıştır. Gelişen teknolojiyle birlikte büyük verilerin işlenmesi, veri bankalarının entegrasyonu çalışmaları hızlandırmış ve başarı oranını yükseltmiştir. Bilgisayar tabanlı araştırma yöntemleri ile elde edilen sonuçların deneysel sonuçlarla desteklenmesi çalışmaların başarısı perçinlemekte ve bir adım öteye taşımaktadır.

Yapısal biyolojinin ilgi alanına giren proteinlerin katlanma – fonksiyon ilişkisi; başta epigenetik, farmakoloji, tıbbi genetik, fizyoloji gibi birçok alanla ilişkilidir. Proteinlerin üç boyutlu (3D) yapılarının bilinmesi; yapının detayları, işlevi, farmakolojik olarak hedeflenmesi, protein – protein etkileşiminin gösterilmesi gibi birçok farklı alan ve işlemde son derece önem arz etmektedir.

Tuzla İndüklenebilir Kinazlar (SIK1-3), AMP ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) kinaz ailesine ait bir alt guruptur. SIK ailesi üyeleri diğer AMPK gibi N-terminal uç yerleşimli kinaz domeyni ve bitişik Ubiquitin ilişikli domeyni (UBA) taşır ve katalitik aktivite gösterebilmesi için Karaciğer Kinaz B1 (LKB1) tarafından aktivasyon bölgelerinden fosforlanmalıdır. Henüz deneysel olarak ubikitin bağlanma yetisi doğrulanmayan SIK ailesine ait UBA domeynleri bu fosforlanmada rol oynayarak SIK aktivitesinin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. SIK ailesi üyelerinin 3D kimyasal yapıları bugüne kadar çözülememiştir.

Bu çalışmada başta kanser ve obezite olmak üzere bugüne kadar birçok hastalıkla ilişkilendirilmiş SIK2 için homoloji modelleme yöntemi ile geliştirilen modeller üzerinden UBA domeyni ile kinaz domeyni etkileşiminin SIK2

konformasyonu ve katalitik fonksiyonu üzerine etkisinin kenetlenme ve moleküler dinamik modellemeler ile atomik ölçekte incelenmesi amaçlanmıştır.

SIK ailesi gerek üç boyutlu yapıları bilinmemesiyle gerekse fizyolojik önemine karşın bu kinaza spesifik mevcut inhibitörlerin birçok kinaz inhibitöründe olduğu gibi sadece molekülün ATP bağlanma cebini hedef alması kaçınılmaz olarak farklı türden kinazlarında paralelinde inhibisyonuna neden olarak tehlikeli bir yan etki kaynağı oluştrumaktadır. Çalışmamız sonucunda elde edilen SIK2 nin homoloji modellenmesi ile UBA ve N-kinaz domeynleri arasındaki etkileşim ara yüzünün tanımlanması ve ardından bu etkileşimi komptetive olarak bozabilecek peptit veya inorganik yapıda moleküllerin taranarak bağlanma enerjileri ve kinetik özeliklerini oluşturan parametrelerin belirlenerek inhibitör çalışmaları için en uygun moleküler yapının önerilmesi amaçlanmıştır.

2. TUZLA İNDÜKLENEBİLİR KİNAZLAR

Tuzla İndüklenebilir Kinazlar (SIK), Adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) kinaz ailesine ait serin/treonin kinaz tipli bir alt guruptur. AMPK ailesi üyeleri evrimsel süreçte korunmuş, hücrede Adenozin trifosfat (ATP) üretimi ve tüketimine göre hücre enerji dengesinin başlıca düzenleyicileridir [Sakamoto ve ark., 2018]. Bu nedenle AMPK üyeleri en çok çalışılan kinaz gruplarından biridir.

1999 yılında Wang ve arkadaşları yüksek tuzlu diyetle ile beslenen deneysel sıçan modeli adrenal korteksinde ilk SIK türünü tanımlanmıştır [Wang et al., 1999]. Bu yapı SIK1 olarak adlandırılmıştır ve ilerleyen yıllarda ailenin diğer iki üyesi olan SIK2 ve SIK3 genomun düzeyinde yapılan homoloji taramalarında ortaya çıkarılmıştır. SIK üyeleri tüm dokularda ifade edilmesine karşın SIK1 böbrek, SIK2 adipoz ve SIK3 beyin dokularında diğer dokulara nazaran yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür. SIK2 ve SIK3 devamlı olarak ifade edilirken, SIK1 yüksek tuz alımı, hücre depolarizasyonu, glukagon sinyali, sirkadiyen düzen ile uyarım sonucu ifade edilir [Wein et al., 2018].

Yapılan çalışmalar SIK ailesi üyelerinin başta lipit metabolizması, enerji dengesi, hücre döngüsünün düzenlenmesi, glukoneogenez, hücrede insülin cevabı gibi birçok fizyolojik rolü olduğunu göstermiştir. Ayrıca SIK kinaz aktivitelerinin farklı hastalıklarda arttığı ya da azaldığı bildirilmiştir. Bu hastalıklar arasında depresyon, kanser ve obezite başta gelmektedir.

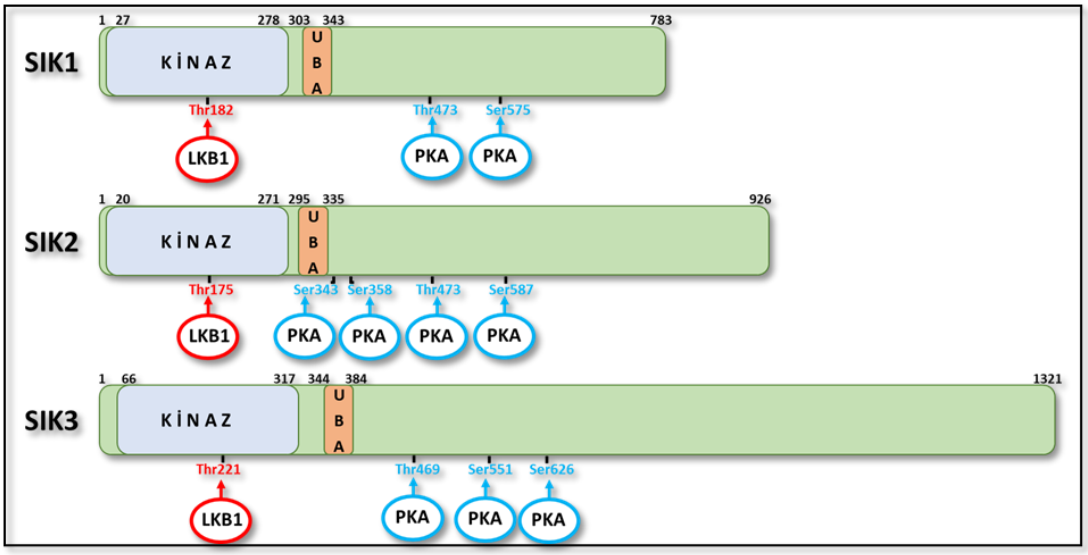
2.1. SIK Genleri ve Evrimsel Korunumu

Organizmada önemli metabolik rollere sahip diğer AMPK üyeleri gibi SIK ailesi de evrimsel süreçte korunmuştur. Çalışmalar, model organizma *C. elegans*'ın yalnızca SIK2 ortologu olan KIN-29 genini taşıdığını göstermiştir [Lanjuin ve Sengupta, 2002]. İlerleyen yıllarda Okamoto ve arkadaşları bir diğer model organizma olan *Drosophila melanogaster* meyve sineğinde SIK2 ve SIK3 genlerinin her ikisinin de bulunduğunu göstermiştir [Okamoto ve ark., 2004]. Buna karşın balıklar ve daha gelişmiş canlılar SIK'nin üç izoformunu da taşımaktadır.

SIK2 ve SIK3 genleri tüm canlılarda aynı kromozomda ve birbirine yakın yer alırken SIK1 farklı bir kromozomda bulunmaktadır. İnsan genomunda SIK2 ve SIK3 11. kromozomda, SIK1 ise 21. kromozomda yer alır. Bu durum omurgalı evriminde SIK2 ve SIK3'ün beraber korunduğunu düşündürmektedir.

2.2. SIK Domeynleri ve İşlevleri

SIK ailesi üyeleri diğer AMPK üyelerinde benzer şekilde N-terminal uç yerleşimli kinaz domeyni ve bitişik UBA domeynine sahiptirler (Şekil 2.1).



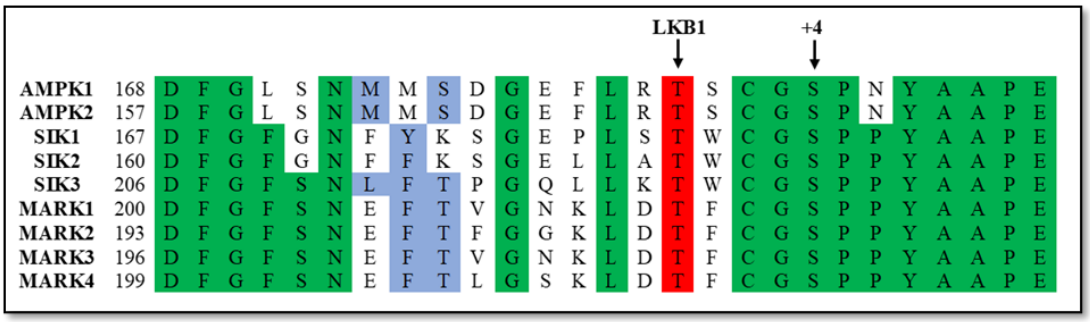
Şekil 2.1: SIK ailesi üyelerinde domeyn yerleşimi ve fosforilasyon alanları. N-terminalden sırasıyla kinaz domeyni (gri), UBA domeyni (turuncu) ve noktasal fosforilasyon alanları.

AMPK ailesi üyelerinin çoğu gibi SIK üyeleri de katalitik aktivite gösterebilmesi için Karaciğer Kinaz B1 (LKB1) tarafından aktivasyon bölgelerinden fosforlanmaya ihtiyaç duyar. Aktivasyon alanında bulunan, LKB1 tarafından fosforlanan treonin kalıntısı SIK üyelerinde sırasıyla Thr182, Thr175 ve Thr221 konumunda bulunur (Şekil 2.2). Bu kalıntıların alanin aminoasidi ile değiştirilmesi kinaz aktivasyonunu engellemekte olup bu yöntem knock-in fare modellerinde kinaz-inaktif canlılar geliştirmek için sıkça kullanılmaktadır [Lizcano ve ark., 2004].

SIK üyeleri katalitik kinaz domeynde bulunan fosforlanma alanları dışında C-terminale yakın yerleşimli birden çok fosforlanabilen farklı serin ve treonin

kalıntılarına da sahiptir (Şekil 2.1). Bu alanlar SIK1'de Thr473 ve Ser575 olmak üzere iki adet, SIK2'de Ser343, Ser358, Thr484 ve Ser587 olmak üzere dört adet ve SIK3'te Thr469, Ser551 ve Ser626 olmak üzere üç adet olarak tanımlanmıştır. Çalışmalar bu alanlarında başta Protein kinaz A (PKA) olmak üzere farklı kinazlar tarafından fosforlanabildiğini göstermiştir (Şekil 2.1).

Hücrenin fizyolojik ya da farmakolojik olarak uyarılması sonucu artan ikincil haberci yapısı siklik Adenozin monofosfat (cAMP), SIK üyelerinin PKA tarafından fosforlanmasını ve böylece inaktif olmasını sağlar. SIK aktivitesinin ortadan kalkmasıyla SIK aktivitesinin ortadan kalkmasıyla SIK substratlarının ilişkili fosfotazların aktivitesi sonucu mevcut fosforlarını kaybederek defosforile olurlar ve aşağı akışta yer alan yolaklarda farklı işlevler üstlenir. Fosforlanan SIK üyelerinin 14-3-3 proteine bağlandığı gösterilmiş ve bu bağlanmanın inaktivasyon için gerekli öngörülmüştür [Berggreen ve ark., 2012], [Sonntag ve ark., 2018].



Şekil 2.2: AMPK ailesi üyelerinin aktivasyon alanları hizalama çalışması. Katalitik aktivite için gerekli olan LKB1-Treonin fosforilasyonu (kırmızı), hizalama sonrası birebir uyum gösteren kalıntılar (yeşil), evrimsel korunmuş kalıntılar (mavi) ile gösterilmiştir. Otofosforilasyonda görev alan serin kalıntıları +4 ile işaretlenmiştir.

Öte yandan 2008 yılında SIK1 ve SIK2 için aktivasyon alanı içerisinde treonin kalıntısından 4 birim uzakta serin kalıntısının otofosforillenme ile aktivite gösterdiği bulunmuştur [Hashimoto ve ark., 2008]. Evrimsel olarak korunmuş aktivasyon alanında TxxxS motifi aynı zamanda birçok AMPK üyesinde bulunur (Şekil 2.2). Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) fosforillemesiyle gerçekleşen bu otofosforilasyon, SIK'ler için pozitif bir geri besleme mekanizmasına fırsat sağladığı düşünülmektedir.

2.2.1. SIK UBA Domeyni

Tüm insan genomu tarandığında UBA domeynini kodlayan genlere sahip SIK ailesi de dahil olmak üzere yalnız on AMPK kinaz bulunur. SIK ailesi üyeleri ubikuitin bağlanması için gerekli hidrofobik arayüzü oluşturacak aminoasit kalıntılarını taşımalarına karşın UBA domeynlerinin poli-ubikuitin veya diğer ubikuitin yapılarıyla etkileşime girmediği gösterilmiştir [Jaleel ve ark., 2006]. Bu durum SIK UBA domeynlerinin görevlerini merak konusu haline getirmiştir. Önceki çalışmalar elde ettikleri veriler ışığında UBA domeyninin, SIK aktivitesi için şart olan LKB1 fosforlamasında konformasyonel bir değişiklik için görev aldığı iddia etmiştir [Jaleel ve ark., 2006]. Bugüne kadar UBA domeyninin LKB1-SIK ilişkisinde nasıl bir rol aldığı deneysel olarak gösterilememiştir.

2.3. SIK Yukarı ve Aşağı Akışları

SIK ailesi üyelerinin kinaz aktiviteleriyle fosforladığı ve sahip olduğu diğer rollere göre daha çok çalışılmış başlıca başlıca iki substratı vardır. LKB1 tarafından fosforlanarak aktive hale gelen SIK, bu iki substrata fosforlar ve bir dizi aşağı akış sonucu farklı metabolik olayları düzenler.

Siklik AMP-cevap-elemanı bağlanma proteini (CREB)-regülasyon transkripsiyonel ko-aktivatörler (CRTC1, CRTC2 ve CRTC3), SIK tarafından fosforlandığında 14-3-3 proteinine bağlanma eğilimi gösterir ve CREB'ni aktivite etmek üzere nukleusa geçemezler. Böylece nukleusta bulunan ve bir dizi transkripsiyonla belirli gen ifadelerini başlatacak olan CREB inaktif olur. SIK'nin PKA tarafından veya spesifik inhibitörlerle aktivitesinin engellendiği durumlarda CRTC fosforlanmasının düştüğü, nukleusa translokasyonunun gerçekleştirdiği ve CREB bağımlı transkripsiyonun arttığı gösterilmiştir [Altarejos ve Montminy, 2011; Clark ve ark., 2012; Luo ve ark., 2012; Henriksson ve ark., 2015; Sonntag ve ark., 2017; Sonntag ve ark., 2018]. PKA, SIK ailesi üyelerini fosforlayarak dolaylı kontrol sağlayabildiği gibi doğrudan CREB'ine fosfor bağlayarak da CREB bağımlı gen ifadesini artırabilir [Darling ve Cohen, 2021].

SIK ailesi üyelerinin bir diğer substratı olan sınıf 2a histon deaçetilaz (HDAC4/5/7/9)'ları fosforlaması onların 14-3-3 proteinine bağlanmasını sağlar ve

böylece HDAC'lar nukleusa transloke olamazlar. SIK'lerin inaktif olduğu durumlarda HDAC'lar nukleusa göç ederek miyosit güçlendirici faktör 2 (MEF2) ile etkileşir ve MEF2 ile ilişikli gen ifadelerini baskılar [Chan ve ark., 2003; Berdeaux ve ark., 2007; Finsterwald ve ark., 2013; Henriksson ve ark., 2015].

CRTC-CREB ekseni ve HDAC-MEF2 yolağı SIK üyelerinin en erken keşfedilen görevleridir. Bu iki yolakta SIK benzer etki göstererek proteinleri fosforlar ve onların nukleusa geçişini engelleyerek bazı gen ifadelerini sağlar ya da engeller. Tüm bunlara rağmen bu yolaklarda aydınlatılmamış harici substratlar ve etkileşimler mevcut olabilir.

Henriksson ve arkadaşları, 2015 yılında SIK2'nin Ser358 aminoasit kalıntısından PKA tarafından fosforlanmasıyla sağlanan regülasyonun adipoz hücrelerde CRTC, HDAC üzerinden hücrenin glukoz alımında görev aldığı göstermiştir [Henriksson et al., 2015].

Bugüne kadar yapılan çalışmalar SIK2'nin farklı fizyolojik süreçlerde rol aldığını göstermiştir. En erken keşiflerden biri SIK2'nin obez veya insülin direncine sahip bireylerde ekspresyonun düştüğüdür (Sall ve ark., 2016). Bu ve benzeri sonuçlar SIK ailesi ve özellikle SIK2'nin metabolizmada önemli rollere sahip olduğu göstermiş, buna ek olarak ilerleyen yıllarda farklı bir yolakta görevleri aydınlatılmıştır.

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin ana bileşenlerinden biri olan makrofajların düzenleyicilerinden biri de SIK üyeleridir. PKA tarafından fosforlanarak inaktif edilen SIK2, CRTC'yi fosforlayamaz ve nukleusa transloke olan CRTC, CREB ile birlikte interlökin 10 (IL-10) gibi anti-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonuna fırsat verir [Clark ve ark., 2012], [MacKenzie ve ark., 2013]. Bu sürecin düzenlenmesinde prostaglandin E2 (PGE2), cAMP artırarak PKA üzerinden rol oynar. Yine inaktif SIK etkisiyle serbest kalan HDAC, sitozolden nukleusa geçerek transkripsiyon faktörü nükleer faktör-kappa B (NF-κB) 'ye bağlanır ve tümör nekrosis faktör (TNF) ile interlökin12 (IL-12) DNA üzerinde bulunan başlatıcı bölgelere bağlanmasını engeller. Böylece NF-κB tarafından gen ifadesi sağlanan pro-inflamatuar gen ifadeleri baskılanır [Luan ve ark., 2014].

Makrofajlara benzer şekilde mast hücreleri deri, sindirim ve solunum kanallarında yer alan enfeksiyon durumunda sitokin ve kemokin salgılayan doğuştan gelen bağışıklık sistemleri elemanlarıdır. Darling ve arkadaşları SIK2/3 çift knock-out (KO) fare modelinde mast hücrelerinin aktivasyonun için gereken interlökin 33

(IL-33)'ün önemli ölçüde azaldığını, buna göre mast hücrelerinde SIK aktivitesinin gerekli olduğu bildirilmiştir [Darling ve ark. 2021]. İlginç bir şekilde SIK2 KO canlılarda SIK3 ifadesi büyük oranda artmıştır. Bu durum SIK2 ve SIK3 için birbirlerini kompanse ettiği fikrini destekler.

Kemik oluşum ve onarım mekanizmaları parathormon (PTH) ve bir G protein kenetli reseptör yapısında olan parathormon reseptörü (PTH1R) tarafından düzenlenir. PTH1R'ünün uyarılmasıyla kemik oluşumunu artırmakta ve PTH1R agonistleri osteoporoz gibi kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar PTH'nin PKA üzerinden SIK2 fosforilasyonuna yol açtığı ve inaktif hale gelen SIK'nin CREB-CRTC ve HDAC-MEF2 yolaklarıyla kemik oluşumunda inhibitör etkiye sahip sklerostin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir [Wein ve ark., 2016]. Bu sonuçlar ışığında SIK2 inhibitörlerinin kemik hastalıklarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan hippokampüs araştırmaları, depresyon ve nöronal sağ kalımda CREB-bağımlı gen ifadelerinin önemini gözler önüne sermektedir. Fare depresyon modellerinde hippokampüsde SIK2 aktivitesinin arttığı ve CRTC-CREB sinyali üzerinden oluşan antidepresan aktivitenin baskılandığı gösterilmiştir [Jiang ve ark., 2019]. Bu doğrultuda SIK aday inhibitörü ARN-3236'nın aynı deney modellerinde antidepresan etkisi kanıtlanmıştır, ancak farmakokinetik özellikleri yüksek yan etkiye yol açmaktadır [Liu ve ark., 2020].

Ciltte bulunan melanosit hücreleri, güneşten gelen ve hücrede DNA hasarı yaratan ultraviyole ışıklara karşı cilt kanserinden koruyucu ömelanin salgılar. Başta SIK2 olmak üzere SIK ailesi üyeleri melanosit hücrelerinde yüksek oranda ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalar SIK2'nin CREB-bağımlı gen ifadelerini baskılayarak hücrede melanin üretimini sınırladığını gösterilmiştir. Ek olarak SIK inhibitörlerinin ciltte güneş kaynaklı hasar ve kanser oluşumunu azalttığı bildirilmiştir [Horike et al., 2010].

Organizmada açlık-tokluk dengesi pankreastan salınan insülin ve glukagon kontrolünde gerçekleşen glukoneogenez ile tamamlanır. Karaciğer hücreleri hepatositlerde glukoneogenez gen ifadesinin düzenleyicilerinden biri de SIK üyeleridir. Beslenme durumunda artan insülin sinyali ile SIK'ler, CRTC ve HDAC yolakları üzerinden glukonegenez için gerekli enzimlerin transkripsiyonu azaltır. Açlık durumunda ise glukagon sinyaliyle hücre içi cAMP artar, PKA aktife olarak SIK'leri fosforlar ve inaktivasyonlarına sebep olur. Böylece SIK, CRTC ve HDAC

üzerinden FOXO ailesi gibi transkripsiyon faktörlerini baskılayamaz, glukoneogenez ile glukoz üretimi gerçekleşir [Sakamoto et al., 2018], [Haeusler et al.., 2010]. SIK inhibitörü uygulanmış hepatosit hücrelerinde glukonegenezin ve glikoz üretiminin arttığı gösterilmiş, inhibitörlerin hipoglisemi tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Ek olarak adipoz dokularda insülin sinyali sonrası protein kinaz B (AKT)'nin SIK2'yi fosforlayarak inaktive ettiği ve yine glukoneogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir [Dentin et al., 2007]. SIK inhibitörü adipoz dokuda SIK aktivitesi baskılandığında hücre glukoz alımından sorumlu GLUT4 ekspresyonu azalmazken glikoz alımı düşmüştür [Henriksson et al., 2015]. Bu sonuçlar lipojenik genler ve adipoz dokuda SIK2 aktivitesini kanıtlayarak metabolizmada önemli rolünü vurgulamıştır.

Başta SIK2 olmak üzere SIK ailesi üyelerinin birçok kanser türünde aşırı ifade edilerek kanser progresyonunda rol aldığı gösterilmiştir [Chen et al., 2019]. Bilinen birçok kanser belirteciyle etkileşen SIK2'nin, hücrede apoptozu baskıladığı ve hücre döngüsünde hücreyi G1 fazında tutarak aşırı büyümesine yol açtığı bildirilmiştir [Gao et al., 2020].

Miranda ve arkadaşları, SIK2'nin, hücre sağ kalımı ve bölünmesindeki rolüyle kanserde aktif olan, fosfoinosit 3 kinaz (PI3K) - protein kinaz B (AKT) yolağında PI3K'nin düzenleyici alt birimi olan p85 fosforladığı ve over kanserinde yolağın aşırı aktif olmasını sağladığını göstermiştir [Miranda et al., 2016].

Hippo-YAP yolağı ilk olarak *Drosophila melanogaster* meyve sineğinde tanımlanmış; hücre bölünmesi, organ boyutu, organ gelişiminde aktif bir hücre sinyal yolağıdır. Yes ilişikli protein (YAP) birçok kanser türünde aşırı ifade edilirken kontak inhibisyonu bozarak hücre bölünmesi ve metastaza neden olmaktadır. [Zeng ve Hong, 2008], [Gumbiner ve Kim, 2014]. Yapılan çalışmalar Drosophila sineğinde SIK2'nin, Hippo-YAP yolağının ana düzenleyicisi olan skafold protein Salvador (SAV)'ı fosforlayarak veya doğrudan YAP üzerinden, Hippo-YAP yolağını aktive ettiğini göstermiştir [Wehr et al., 2013]. Ayrıca Hippo-Yap yolu ile PI3K-AKT yolunun birbirleriyle etkileştiği, SIK2'nin her iki yoldaki rolüyle tümör gelişimine katkısı gözler önüne serilmiştir.

SIK üyeleri CRTC-CREB ve PKA-HDAC yolakları ile hücrede metabolizma ve inflamasyon yanıtı üzerinde kontrol sağlar. Bu yollar aynı zamanda kanserde SIK ile birlikte aşırı aktif olarak kanser hücrelerinin yüksek enerji ihtiyacını karşılamada görev alır.

Birçok çalışma SIK üyelerinin kanserde onkogen rolüne sahip olduğunu göstermesine karşın Zohrap ve arkadaşları meme kanserinde mitojen aktive protein kinaz (MAPK) – ekstrasellüler sinyal regülasyon kinaz (ERK) ve PI3K-AKT yolaklarının paralel inhibisyonunu düzenlemesiyle özellikle SIK2'nin tümör baskılayıcı olduğunu iddia etmiştir [Zohrap et al., 2018]. Tüm çalışmalar ele alındığında SIK2 tümör oluşumunda, kanser türü ve genetik temellere göre, tümör baskılayıcı veya onkogen olabilir. SIK-kanser ilişkisi daha fazla çalışmaya ihtiyaç duymaktadır.

Kanserin oluşum ve gelişim süreci tam olarak aydınlatılamadığından günümüzde tedavi metotları moleküler seviyede kanserde aktif protein tanımlanması ve hedeflenerek baskılanması üzerinden çalışır. Bu bağlamda SIK ailesi üyeleri için tanımlanmış inhibitörler kanser tedavisi için alternatif sağlayacaktır. Ancak bu inhibitörlerin düşük spesifiteleri, hedeflenmeyen kinaz inhibisyonlarıyla, daha fazla araştırma ve farklı metotlara ihtiyacı artırmaktadır.

Başta SIK2 olmak üzere SIK aile üyelerinin aydınlatılmamış birçok fizyolojik görevlerinin olması muhtemeldir. Üç boyutlu yapısal modelleri bilinmeyen SIK'ler, gerek inhibisyon gerekse henüz aydınlatılmamış rollerinin araştırılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duymaktadır.

2.4. Mikrotübül Affinite Regülasyon Kinaz 1

Hücrenin iskelet yapıları; bölünme, sentez, taşıma ve protein trafiği gibi temel hücre fonksiyonlarında görev almaktadır. Yapısal destek görevlerine ek olarak sıkı bağlantılar ile hücre sinyalizasyonu ve haberleşmesine role sahiptir [Matsuuchi ve Naus, 2013]. Aktin, intermediate filamentler ile birlikte hücreyi "inşa eden" mikrotübüller; α-tubulin ve β-tubulinlerden oluşur, mitoz, hücre polarizasyonu, organel taşınması, hücre farklılaşması ve hücre ölümünde kritik rol oynarlar [Tang et al., 2013], [Etienne-Manneville 2010], [Su et al., 2012], [Drewes et al., 1995].

Mikrotübüllerin düzenleyicileriden biri olan Mikrotübül Affinite Regülasyon Kinazlar (MARK) ailesi, ilk olarak beyinde tau proteinin fosforlanmasında keşfedilmiştir [Drewes, 1997]. İlerleyen yıllarda bu fosforilasyonun aşırı halini Alzheimer hastalığı ile bağlantısı ortaya çıkartılmıştır [Timm et al., 2006].

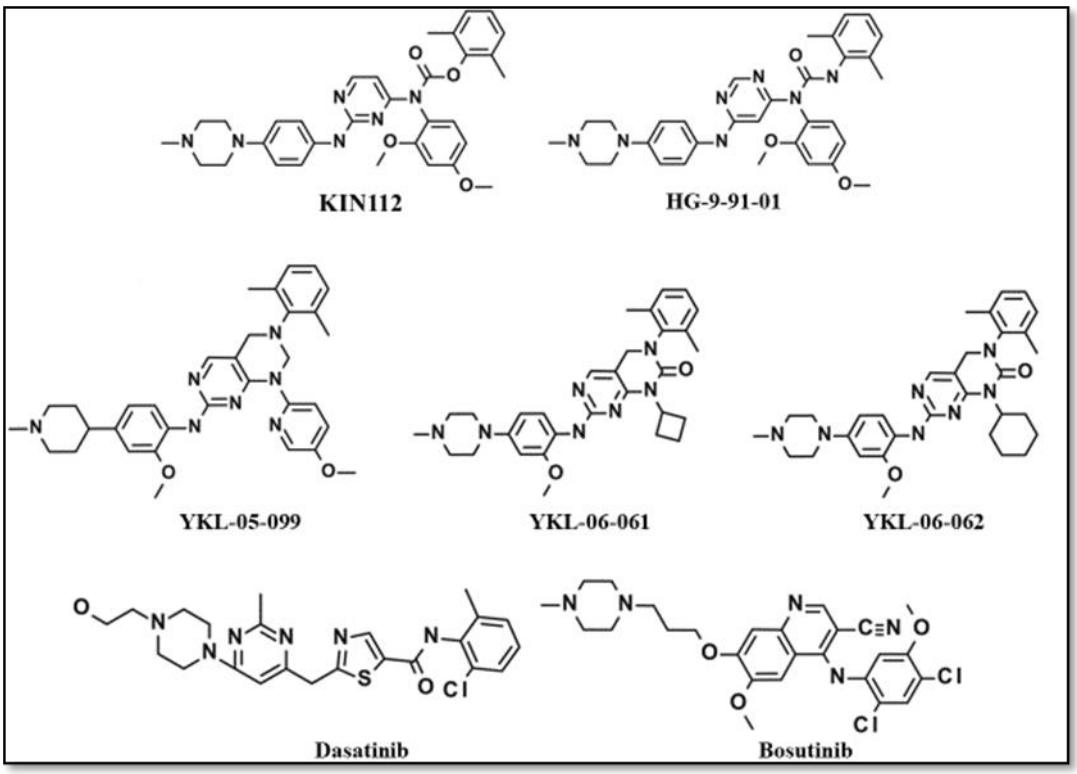
MARK ailesi, AMPK kinaz ailesi alt grubu olan Ca / Kalmodulin Bağımlı Kinazlar (CaMK) ‘a dahildir. Organizmada yaygın bulunan MARK’lar, Ca bağlı kalmodulin tarafından aktive olarak farklı substratları fosforlar [Marx et al., 2010]. Dört üyesi bulunan MARK ailesi (MARK1-4) alternatif uçbirletirme (splicing) sonucu birçok izoform yapı oluşturur [Braun ve Schulman, 1995]. MARK’lar diğer AMPK ailesi üyelerine benzer şekilde yapılarında N-terminale yakın katalitik aktiviteye sahip kinaz domeyni, kinaz domeyne yakın UBA domeyni ve diğer AMPK üyelerinden farklı olarak C-terminale yakın kinaz ilişikli (KA) domeyni taşır [Web 1, 2021]. UBA domeyninin konformasyonel değişiklikle enzim aktivitesine katkı sağladığı düşünülmekte olup KA domeyninin ise hücrede membran yapısında yer alan fosfolipidlerle etkileştiği, bu sayede lokalizasyon bağımlı kinaz düzenlemesinde görev alabileceği gösterilmiştir [Moravcevic et al., 2010]. Çalışmalar neredeyse tüm AMPK üyelerinde olduğu gibi, Maternal Embiryonik Zipper Kinaz (MELK) dışında, MARK ailesi üyelerinde de LKB1 fosforilasyonunun kinaz aktive için gerekli olduğunu göstermiştir. MARK ailesi üyeleri (MARK1-4) sırasıyla Thr215, Thr208, Thr211 ve Thr214 alanlarından LKB1 tarafından fosforlanmaktadır (Şekil 1.2). Ayrıca tüm domeynlere dağılmış şekilde, farklı kinazlar tarafından fosforlanan birçok fosforilasyon alnı tanımlanmıştır [Uniprot MARK1-4]. Çalışmalar KA domeyninin kinaz domeyn üzerine katlanarak yeni bir arayüz oluşturduğunu, böyle otoinhibisyon yoluyla kendi katalitik aktivitesini düzenlediğini göstermiştir [Emptage et al., 2017], [Emptage et al., 2018].

2.5. SIK İnhibitör Tasarım Çalışmaları ve Kısıtlılıklar

AMPK ailesi üyeleri yaygın fizyolojik rolleri ile uzun yıllardır farmakolojik hedef halindedir ve bu yapılar için bugüne kadar onlarca inhibitör tasarımı yapılmıştır. SIK ailesi üyelerinin fizyolojik önemini ortaya koydukça SIK hedefli farmakoloji çalışmaları yıllar içinde hızla yükselmiştir. Özellikle kanser ve metabolik hastalıklarda bozulmuş SIK aktivitesinin düzeltilmesinin bu hastalıklara tedavi olanağı sağlayacağı fikri hakimdir. Bu amaçla son yıllarda SIK ailesi üyelerine spesifik inhibitör çalışmaları yapılmaktadır (Şekil 2.3).

Web tabanlı, ücretsiz, ticari olan bileşik tarama veri tabanı ZINC15 veri tabanında SIK2 için tarama yapıldığında 32 farklı potensiyel inhibitör yapısı

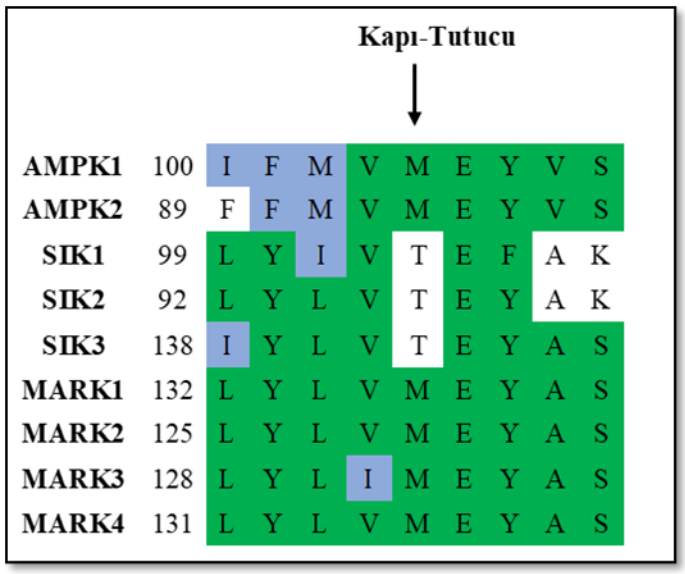
listelenmektedir [Web 2, 2021], [Web 3, 2021], [Sterling ve Irwin, 2015]. Bu inhibitörlerin çoğu AMPK ailesi üyeleri için geliştirilmiş ve yapısal benzerliği nedeniyle SIK üyelerinde de etki göstermesi öngörülmektedir. İnhibitörlerin çoğu türevlendirme metodu ile birbirlerinden veya bazı temel kimyasal iskeletler yapılarından türetilmiştir. Ancak bu inhibitörlerin seçiciliği düşüktür, bu nedenle klinik kullanıma uygun değildirler.



Şekil 2.3: Bazı SIK inhibitörleri.

SIK spesifik inhibitör, HG-9-91-01, diğer inhibitörlerden farklı olarak ATP bağlanma bölgesine yakın yer alan hidrofobik bir cep yaratan kapı-tutucu bölgedeki diğer AMPK ailesi üyelerinde bulunmayan treonin yapısını hedefler (Şekil 2.4) [Darling ve Cohen, 2021]. Deneysel olarak treonin yapısının mutasyona uğratılması HG-9-91-01 inhibisyon etkisini ortadan kaldırmaktadır, bu nedenle HG-9-91-01'in diğer inhibitör yapılarla kombinasyon şeklinde kullanılması önerilmektedir [Fogarty et al., 2010]. Bu yüksek seçicilik ve inhibisyon başarısına karşın farmakokinetik özellikleri in vivo kullanımına uygun değildir. Yaygın kullanım amacıyla iyileştirilmiş HG-9-91-01 analogları; YKL-05-099, YKL-06-061 ve YKL-06-062 geliştirme aşamasındadır.

Bir diğer potansiyel SIK inhibitörleri ise günümüzde kronik miyeloid lösemi gibi kanser türlerinde klinik kullanıma giren dasatinib ve bosutinib, AMPK üyelerinde benzerlik gösteren kapı tutucu alanı hedefler.



Şekil. 2.4: SIK ve diğer bazı AMPK ailesi üyeleri Kapı-tutucu bölge benzerliği.

Bu inhibitörlerin çoğunun kinaz enzimlerin ATP bağlanma bölgelerine kenetlenerek alan işgali ve yarışımlı inhibisyon sağlamasıdır. Düşük seçicilik, lipofilisite ve moleküler büyüklük ile sorunlar mevcut inhibitörlerin SIK için yeterliliğine engeldir. Ek olarak tüm inhibitörler her bir SIK üyesi için aynı etkiye sahip değildir, mutant ya da izoform yapılarda etkisi bilinmemektedir. Bu bağlamda çalışmamızda uygulanan LKB1 kaynaklı SIK2 aktivasyonunu UBA ve kinaz domeynleri arasındaki arayüzde allosterik olarak inhibe edebilecek öncül bir peptit veya inorganik bir molekül tanımlanması bu alandaki konvansiyonel yaklaşımlar yanında dikkat çekici bir uygulama olacaktır.

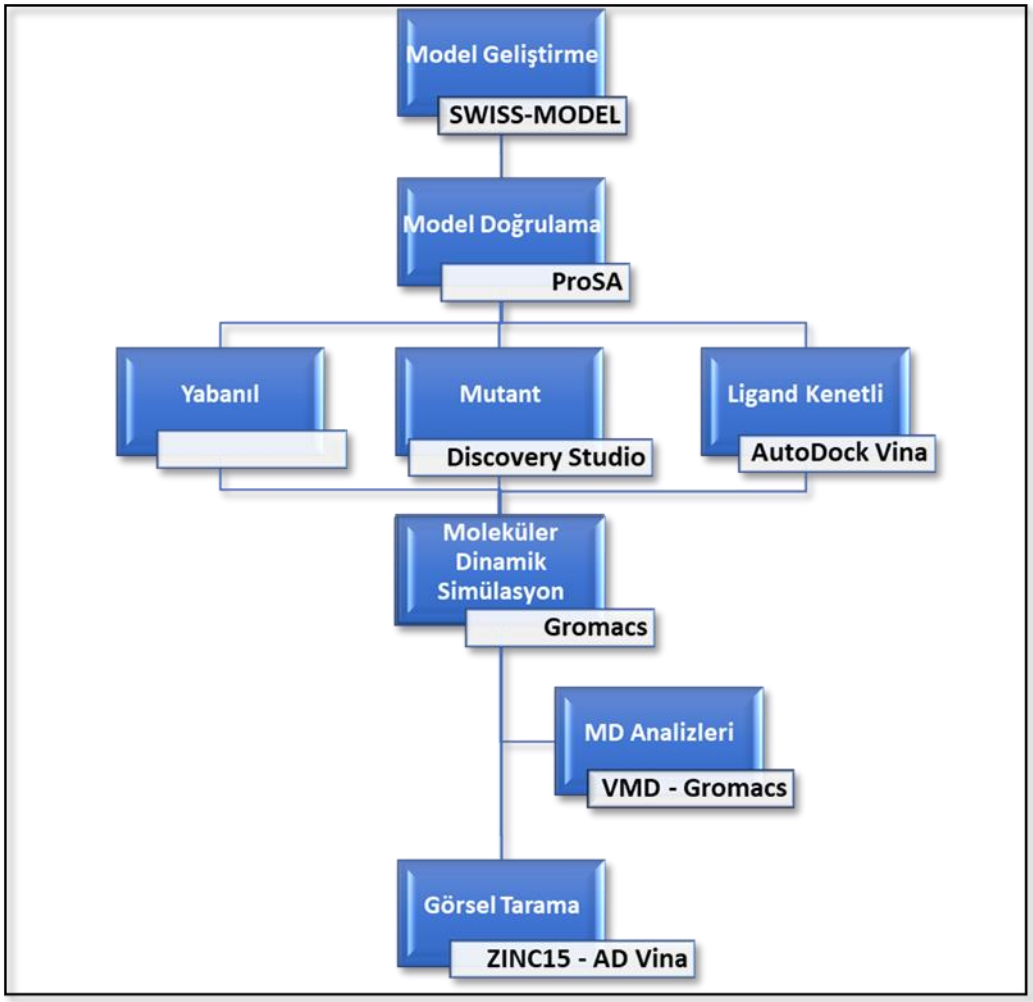
Çalışmamızda henüz kristal yapısı çözümlenmeyen SIK2 için homoloji modelleme, UBA-kinaz domeyn etkileşiminin moleküler karakterizasyonu için ise kenetleme ve moleküler dinamik modellemelere başvurulacaktrır. Ardından fiziko kimyasal ölçekte karakterize edilen domeynler arasındaki etkileşimi yok etmeye yönelik kompetetive karakterde allosterik inhibisyon metodu uygulanacaktır. Geliştirilmesi hedeflenen aday inhibitör veya öncül molekül yaklaşım önemi her geçen gün anlaşılan SIK ailesi başta olmak üzere AMPK kinaz ailesinindiğer

üyelerinin ilişkli biyolojik fonksiyonlarının inhibisyonunda ATP bağlanma bölgesindeki hidrofobik cebi hedef alan konvansiyonel kinaz inhibitörlerine alternatif sağlayacaktır.

3. MATERYAL ve METOTLAR

3.1. Kullanılan Programlar

Çalışmamızda homoloji modelleme metodu ile geliştirilen SIK2 modellerine doğrulama işlemiyle teyit edilecek ve oluşturulacak mutant ile ligand kenetli versiyonlarıyla birlikte moleküler dinamik (MD) simülasyon uygulanacaktır. Simülasyon analizleri sonrası görsel tarama metot ve programlarıyla domeynler arası etkileşimin yok edilmesi amacıyla aday inhibitör çalışması yapılması, gelecek çalışmalar için ön veri oluşturulması amaçlanmaktadır. Tüm işlem basamakları Şekil. 3.1.1'de gösterilmiştir.



Şekil. 3.1: İş akış grafiği.

3.1.1. Hizalama Çalışması NCBI

Protein modellemenin ilk basamağı olan şablon seçimi için Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından geliştirilen Temel Lokal Hizalama Araştırma Aracı (BLAST) arayüzü üzerinden arama yapılmıştır. SIK2'nin amino asit sekansı UniProt (uniprot.org) (Erişim Kodu Q9H0K1) üzerinden FASTA formatında alınarak BLAST Protein-Protein hizalama aracında veri tabanları üzerinden sekans benzerliği tarama gerçekleştirildi [Web 4, 2021].

BLAST programı her bir benzerlik araştırması için Skor (Score), Beklenti (Expect) ve Tutarlılık (Pozitives) verilerini hesaplamıştır. Skor puanlaması iki farklı protein yapısı eşleşmelerini tanımlar. Beklenti puanı, 0 ile 1 arasında, belirli bir nokta tahmin ölçeğidir ve skorun artmasıyla katlanarak azalır [Web 5, 2021]. Tutarlılık, iki protein için bire bir örtüşmelerin sayı ve toplam amino asit sayısına oranını içerir.

3.1.2. Homoloji Modelleme SWISS-MODEL

SWISS-MODEL (SIB, Biozentrum) son yıllarda en yaygın kullanılan ücretsiz erişimli web tabanlı homoloji modelleme programıdır. Birçok protein veri tabanı ile ilişikli olan SWISS-MODEL, homo ve hetero yapılı proteinleri için katlanma modelleri geliştirmektedir.

SWISS-MODEL homoloji modelleme yaparken ProMod3 yöntemini kullanır [Studer et al., 2021]. Yöntem amino asit dizisinde her biri kalıntının konumunu bulmak için öncelikle şablon konumlarını kullanılır. Şablon ile hedef sekans arasında uyumluluk olmadığında Monte Carlo gibi istatistiksel yöntemlere başvurur. Son olarak benzer olmayan yan zincir ya da alanlarda SwissModel veritabanları taranarak rotamer kitaplığından uygun pozisyon seçilir [Web 6, 2021]. Sistem konumlandırma sonrası potansiyel hataları engellemek için enerji minimizasyonu yapar. Tüm bu süreçte ProMod3 hesaplamaları gerçekleştirmek için OpenMM kitaplığını [Eastman et al., 2017] ve CHARMM22/CMAP [Mackerell et al., 2004] kuvvet alanını kullanır.

SWISS-MODEL geliştirilen modellerde potensiyel hataları ve model doğruluğunu ölçmek için Kantitatif Model Enerji Analizi (QMEAN) ve Küresel Model Kalite Tahmini (GMQE) olmak üzere iki farklı puanlama sistemi sağlar. QMEAN skoru, yapı için genel bir kalite ölçütü olup benzer boyutlu deneysel olarak

kanıtlanmış proteinleri hedef protein ile karşılaştırarak tutarlılık sağlamaktadır. Skorun sıfıra yakın olması başarılı olarak ifade edilir (Waterhouse et al., 2018). GMQE skorunda hedef-şablon hizalama sonuçları ve şablon yapısını sentezleyen bir kalite ölçütüdür. 0 ile 1 aralığında bir değer alan GMQE, 1'e yaklaştıkça daha başarılı olarak tanımlanmaktadır. GMQE modelleme tamamlanmadan program tarafından hesaplanabilir, böylece modelleme öncesi bir ölçüt olarak kullanılabilmektedir [Web 6, 2021].

SwissModel programı şablon seçilimi içinde öncelikle kendi ve bağlı olduğu protein veritabanlarından sekans benzerliği ile tarama yapar ve adayları listeleyerek seçim ile model geliştirir. Listelenen tüm şablon adayları, nükleer manyetik rezonans (NMR) veya X ışını kristilografi metotlarıyla kanıtlanmış, makale olarak yayınlanmış çalışma ürünleridir.

3.1.3. Modellerin Doğruluğunun Ölçülmesi ProSA

Modelleme yaklaşımıyla geliştirilen protein yapılarında potansiyel hataların belirlenmesi ve model kalitesinin artırılması için model doğruluğunun ölçülmesi önemlidir. Protein yapılarının iyileştirilmesi ve doğrulanmasında sıklıkla kullanılan web tabanlı Protein Stucture Analyses (ProSA) programı, modelleri doğrularken X ışını kristalografisi, NMR gibi deneysel verileri kullanır ve tüm protein yapısını tarayarak her bir aminoasit kalıntısı için doğruluk hesaplaması yapmaktadır [Wiederstein ve Sipple, 2007].

Program protein yapısının tamamı için genel bir kalite ölçütü olan Z puanı üretir. Hesaplanan Z puanı protein veri bankalarında mevcut deneysel NMR ve X ışını krsitalografi verileri gösteren tabloya yerleştirilir [Web 7, 2021].

Program tarafından sağlanan bir diğer tablo "Doğal Proteinde Kalıntı Kalite Puanlama", her bir amino asit kalıntısı için kalite ölçüsünü gösterirken pozitif değerler sıklıkla ilgili bölgede hata ya da sorunu tanımlamaktadır. Çizgi ile ifade edilen kalite, "merkez amino asit kalıntısı, n", devamındaki n+20 aminoasidin kalite puanı ve n+40 puan ortalaması ile mukayese edilerek düzleştirilmiş şekilde gösterilir. Bu hesaplama sonucu elde edilen n+40 kalın çizgi ile n+10 ince çizgiyle ifade edilmiştir [Web 7, 2021], [Sipple, 1993].

3.1.4. Domeyn Etkileşimlerinin İncelenmesi

Protein Veri Tabanı (PDB), başlangıçta Brookhaven Ulusal Laboratuvarı bünyesinde arşiv olarak 1971 yılında kurulmuş, günümüzde web tabanlı kristal yapılı makromoleküllerin listelendiği bir protein veri bankasıdır [Web 8, 2021], [Berman et al., 2000]. 2021 yılında 50. Yılına ulaşan PDB, 175.000'den fazla deneysel olarak geliştirilmiş üç boyutlu protein yapısını barındırarak tüm biyoloji alanlarına hizmet etmektedir [Burley ve Berman, 2021].

Homoloji modelleme için hizalama çalışmasıyla sırasıyla 6C9D ve 2HAK PDB ID kodlu şablon yapılarımız, evrensel protein dosya formatı olan .pdb formatında indirilerek makromolekül görüntüleme programları ile incelenerek, domeynler arası etkileşimler listelenmiştir.

3.1.5. Mutant ve Ligand Kenetlenmeli Model Geliştirilmesi

Geliştirdiğimiz SIK2 homoloji modellerde, UBA domeyninin belli aminoasitlerinin kinaz domeyni ile daha anlamlı kimyasal etkileşim kurduğu görülmüştür. Bunun üzerine ilgili aminoasit kalıntılarının değiştirilmesi yoluyla mutant versiyonların yaratılması, böylece etkileşimin engellenmesi amaçlanmıştır. Literatürde yer bulan, deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanın alanin aminoasidi ile değiştirme metotuyla model I ve model II'de UBA domeyni içinde yer alan bazı aminoasit kalıntıları değiştirilmiştir. Geliştirilen mutant SIK2 modelleri ileriki adımlarda kullanılmıştır.

Mutasyon yaratılmış modellere ek olarak yine UBA - kinaz domeynleri arasında bulunan kimyasal etkileşimin kırılması amacıyla ilgili bölge hedefli ligand tasarımı ve kenetlenme çalışması yapılmıştır. Hedef bölgede aktif etkileşen aminoasit kalıntılarını içeren ligand tasarımının alanın gerek sterik gerekse lipofilisite özelliklerine daha uyumlu olacağı düşünülmektedir. Söz konusu bölge için mevcut aminoasitleri içeren bir tripeptit tasarımı seçilmiştir. Geliştirilen ligand AutoDock Vina programı ile model I ve model II yapılarına kenetlenmiş, etkileşimin baskılanması amaçlanmıştır.

3.1.6. Moleküler Dinamik Simülasyonları Gromacs

Moleküler dinamik (MD) simülasyonları, bileşikleri oluşturan atomların molekül içi ve moleküler arası fiziksel hareketlerini taklit eden bir hesaplama metodudur. Son yıllarda başta proteinler olmak üzere biyomoleküller ve etkileşimleri için sıklıkla kullanılan moleküler dinamik simülasyonlarının ilk biyolojik uygulamaları McCammon ve arkadaşları tarafından 1977 yılında yapılmıştır [McCammon et al., 1977]. Günümüzde MD simülasyoları; ilaç dizaynı, protein modelleme, protein-protein, protein-ligand etkileşimleri gibi sayısız alanda altın standart konumundadır.

MD simülasyonları, yapının potansiyel enerjisini Shrödinger denkleminin çözülmesi yerine Newton yaklaşımıyla kuvvet etkileşimlerini esas alarak hesaplar [Erdoğan, 2020]. Bu tip hesaplamalar için yıllar içinde farklı birçok, basit ampirik enerji fonksiyonu kümesi olan, kuvvet alanları geliştirilmiştir. Günümüzde yaygın kullanılan başlıca kuvvet alanları ve kullanım amaçları Tablo 3.1'de listelenmiştir [Web 9, 2021].

Tablo 3.1: Başlıca kuvvet alanlarının kullanım amacı ve geliştiricileri.

Kuvvet Alanı		Kullanım Amacı	Geliştiren
AMBER	Assisted Model Building and Energy Refinement	Biyomoleküller için Moleküler Mekanik (MM) hesaplama paketi ve program seti	Cornell vd, 1995
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics	Genel kullanıma uygun MM hesaplama ve analiz özellikli program paketi	MacKerell vd., 1998
GROMOS	GROningen MOlecular Simulation	Biyomoleküller için geniş kullanımlı simülasyon paketi	Oostenbrink vd., 2004
OPLS	Optimized Potential for Liquid Simulations	Yoğun faz simülasyon için özel geliştirilmiş hesaplama paketi	Jorgensen vd., 1996

Kuvvet alanları farklı özellikler içerse de temelde aynı enerji hesaplamasına sahiptir. Bu hesaplama bağ yapan atomların açıları-bağ gücü gibi bağ enerjilerini ve Van der Waals gibi bağ olmayan enerji türlerinin genel toplamıdır.

Formül 3.1'de verildiği üzere Newton'un hareket yasasının sayısal çözülmesi, MD 'de moleküllerin zamana bağlı hareketinin hesaplanmasına fırsat verir. Formülde ilk konumu $\boldsymbol{r_a}$ olan her bir atom için üzerine uygulanan F kuvveti, kuvvet alanı ile hesaplanır [Erdoğan, 2020]. Hesaplanan ivme a de dahil ettiğinde, r_α konumu her t zamanında v hızıyla değişir ve yeni konum U (r_α) olur. Belirlenen simülasyon süreci boyunca her atom için hesaplama tekrarlanarak atomun hareket eğilimi simüle edilir. Verlet metodu bu hesaplama yöntemlerinden biridir ve zamanın ileri-geri dönüşümlülüğü, alan koruma gibi özellikleri hesaplamaya dahil eder [Verlet, 1967].

$$Fa = -\nabla aU = m_a a_a = m_a \frac{dv_a}{dt} = m_a \frac{d^2 r_a}{dt^2} \tag{3.1}$$

$$-\frac{dU}{dr_a} = m_a \frac{d^2 r_a}{dt^2} \tag{3.2}$$

Groningen MAchine for Chemical Simulation (GROMACS) 1990'lı yıllarda Hollanda'da bulunan Groningen Üniversitesi tarafından geliştirilmiş, son yıllarda en yaygın kullanılan ücretsiz MD programdır [Van Der Spoel et al., 2005], [Bekker et al., 1993]. Başta biyomoleküller olmak üzere geniş bir kullanım alanı olan Gromacs, açık kaynaklı olması sebebiyle her geçen gün geliştirilmektedir [Abraham et al., 2015].

Gromacs programı MD verilerini belli dosya formatlarında işler ve simülasyon sonrası analiz için farklı araçlara sahiptir. En temel iki MD simülasyon analizi Sapmanın Karekök Ortalaması (RMSD) ve Dalgalanmanın Karekök Ortalaması (RMSF)'dir.

3.1.6.1. RMSD

RMSD, yapının referans yapı olan ilk konumdan sapma miktarını ölçme yoluyla kantitatif veriler oluşturur. RMSD yapıları karşılaştırma için en iyi yöntemdir.

3.1.6.2. RMSF

RMSF protein yapılarda aminoasit dizisini oluşturan her bir kalıntı için zamana göre ortalama konumundan sapma miktarı hesabıdır. RMSD hesaplamasında toplam yapının hareketi incelenirken RMSF alt birimlerin harekete katılımını göstermektedir.

3.1.7. Protein – Ligand Kenetlenme AutoDock Vina

En yaygın kullanılan hesaplamalı kimya metotlarından biri olan moleküler kenetlenmede, makromoleküller (reseptör) ile küçük moleküllerin (ligand) bağlanma eğilimleri simüle edilmektedir. Bu simülasyon ile iki yapının etkileşimleri ve bağlanma enerjileri tahmin edilebilir, veriler kimya ve biyoloji alanlarında deneysel çalışmalara alternatif olabilecek düşük maliyetli, hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlamaktadır [Trott ve Olson, 2009].

Moleküler kenetlenme biyolojide enzim-substrat, enzim-inhibitör, protein-inhibitör, protein-protein, protein-DNA gibi farklı birçok yapının etkileşimlerinin tahmini için kullanılır. Özellikle inhibitör çalışmaları hastalıkların tedavisi veya araştırılması amacıyla proteinlere spesifik tasarımda günümüzde altın standarttır.

Kenetlenme çalışmalarında sıklıkla reseptör yapısının bağları ve temel iskelet yapısı sabit tutulurken ligand yapısı en uygun konformasyonel şekil ile hedef bölgeye mümkün olan en iyi bağlanma biçimiyle kenetlenir. Bu tip kenetlenme simülasyonu, rijit kenetlenme olarak bilinmektedir. Bazı çalışmalarda reseptör yapısındaki belli bir bölge ya da sınırlı sayıdaki aminoasit kalıntısı yine ideal bağlanma konformasyonun taklidi için görece serbest bırakılır ve deneysel çalışmalara daha yakın bir sonuç amaçlanır. İlgili alanda geliştirilmiş bu hareketli reseptör – ligand yaklaşımı esnek kenetlenme olarak tanımlanır.

Temelinde kuvvet alanlarında makromoleküllerin enerji değişimini hedefe alan MD simülasyonundan farklı olarak kenetlenme çalışmaları, ideal bağlanma konformasyonu, bağlanmanın serbest enerjisi tahmin eder, potansiyel kimyasal etkileşimlere odaklanır.

Monte Carlo algoritması ile çalışan AutoDock Vina (The Scripps Research Institute), günümüzde en yaygın kullanılan açık kaynaklı moleküler kenetlenme ve

sanal tarama programıdır [Sabe et al., 2021]. AutoDock Vina ayrıca PyMol, LIGANN, PyRx gibi farklı birçok programla eşgüdümlü çalışabilir, böylece daha geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Çalışmamızda geliştirilen SIK2 modellerinde UBA ile N-Kinaz domeynlerinin etkileşimini kompetetif olarak ortadan kadırmak amacıyla AutoDock Vina programı ile peptit veya inorganik yapıya sahip ligand moleküller ile kenetlenme simülasyonu yapılmıştır. Bu simülasyonlar ile aday inhibitörlerin hedef bölgeye bağlanma biçimleri ve bağlanma enerjileri hesaplanarak, gelecekte SIK2'yi hedef alan ilaç geliştirme çalışmalarda kullanılabilecek öncü molekül ve muhtemel türevleri hakkında bir veri kaynağı oluşturulması hedeflenmiştir.

3.1.8. Yardımcı Programlar

Çalışmamız sürecinde gerek modellerin görselleştirilmesi gerekse verilerin analizi amacıyla kullanılan birçok farklı program kullanılmıştır.

3.1.8.1. Discovery Studio

Discovery Studio (Biovia) modelleme çalışmalarında görselleştirme ve analiz amaçlı kullanılan, ticari bir programdır. Hesaplamalı çalışmalarda kullanılan birçok araca sahip olan Discovery Studio ticari versiyonunda molekül dizaynı, homoloji modelleme, MD, X-ışını kristalografi çalışmaları için analiz hizmeti sağlar [Web 10, 2021].

3.1.8.2. Chimera

Kaliforniya Üniversitesi San Francisco (UCSF) tarafından geliştirilen Chimera; moleküllerin yaratılması, görüntülenmesi, analizi gibi birçok araca sahip akademik kullanıcılar için ücretsiz kullanılabilen Python tabanlı, açık kaynaklı bir programdır [Petterson et al., 2004]. MD, homoloji modelleme, kristalografi gibi hesaplamalı metotların analizi, görselleştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

3.1.8.3. PyMol

Python tabanlı, ücretsiz molekül görselleştirme programı PyMol (Schrödinger), veri analiz ve MD simülasyonlarının video haline getirilmesinde öne çıkmaktadır. Temel araçların ücretsiz olmasına karşın ticari versiyonu da bulunan PyMol, en yaygın kullanılan görselleştirme araçlarından biridir [Web 11, 2021].

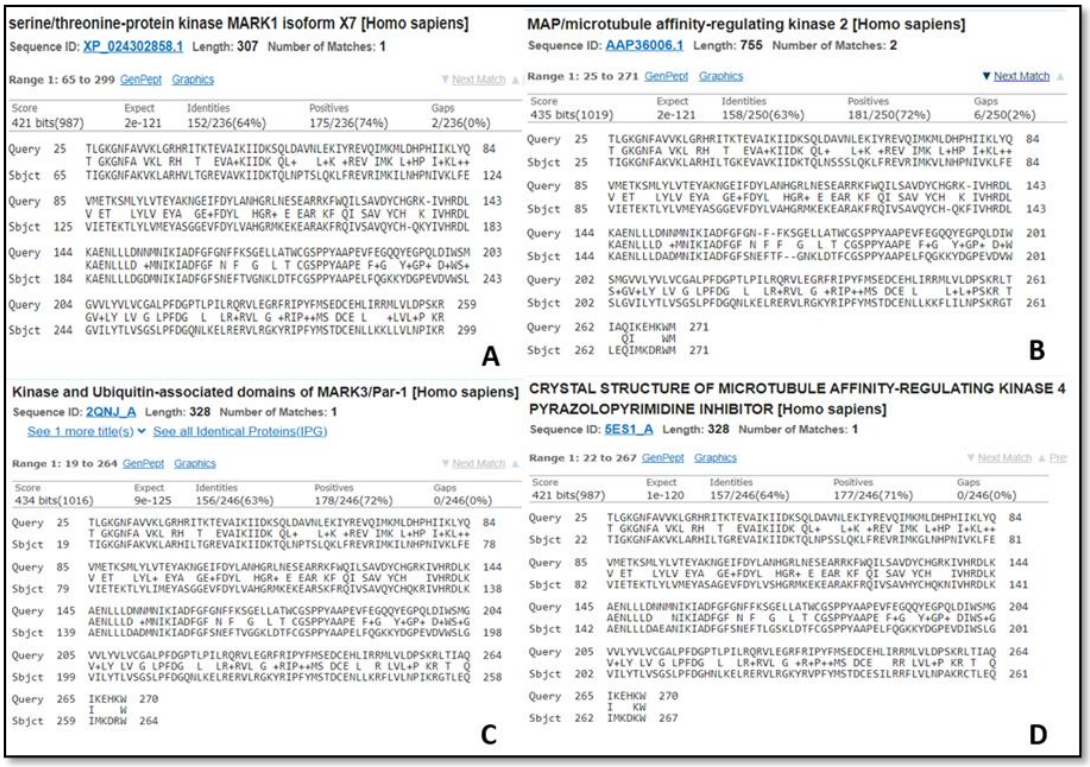
3.1.8.4. VMD

Illinois Üniversitesi tarafından geliştirilen, ücretsiz MD görselleştirme ve analiz programı VMD, Python taban desteğiyle ek araç kullanıma fırsat verir [Humphrey et al., 1996]. Ücretsiz ve web tabanlı erişimiyle yaygın kullanılan program simülasyon verilerini video film kaydı yapabilmesiyle öne çıkmaktadır.

4. SONUÇLAR

4.1. NCBI Hizalama Çalışması Sonuçları

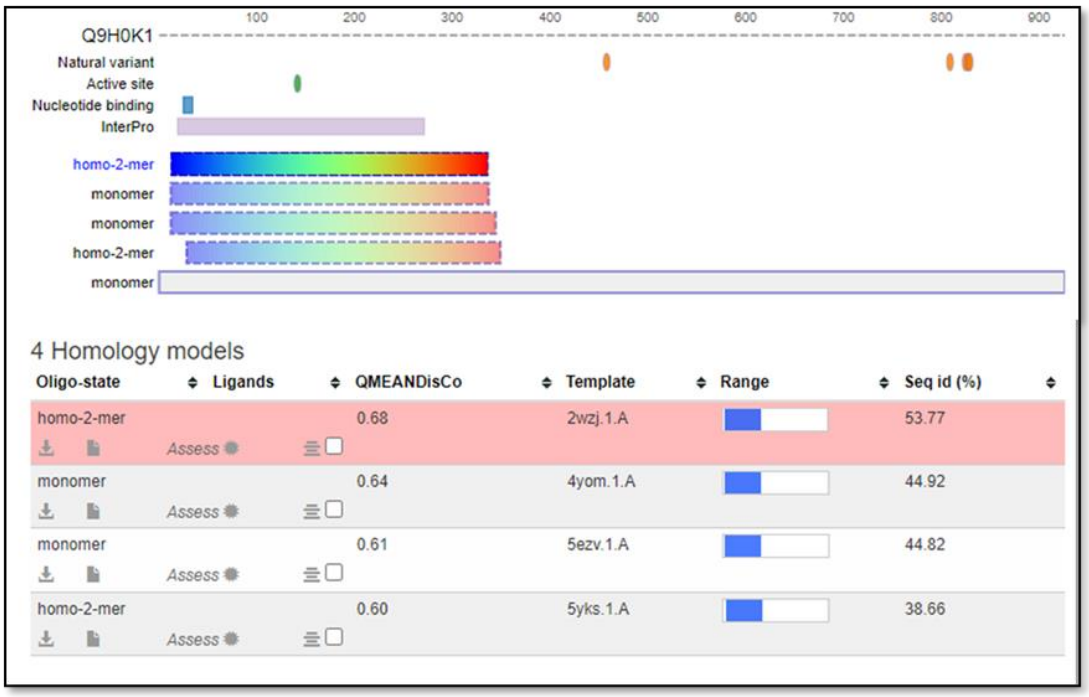
NCBI tarafından ücretsiz erişilen BLAST Protein aracı ile SIK2 sekans benzerlik taraması sonucu MARK ailesi üyeleri sırasıyla %74, %72, %72 ve %71 benzerlik ile liste başı gelmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: BLAST programı SIK2 – MARK ailesi sekans benzerlik analizi. Sırasıyla **A**, MARK1 benzerlik oranı %74; **B,** MARK2 benzerlik oranı %72; **C**, MARK3 benzerlik oranı %72; **D**, MARK4 benzerlik oranı %71.

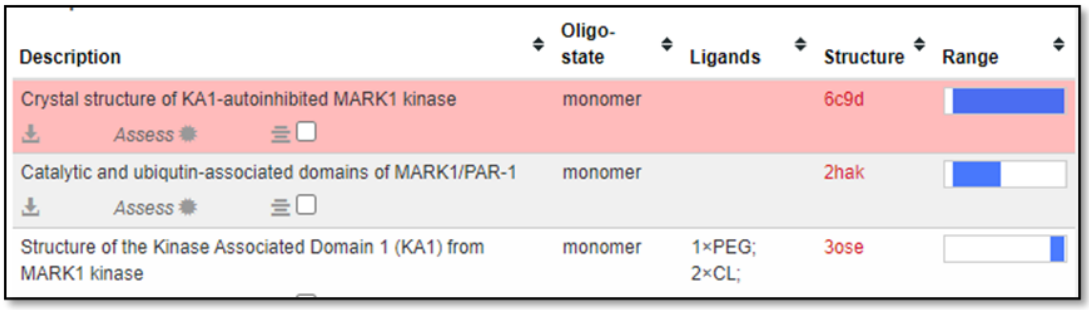
4.2. Homoloji Modelleme Sonuçları

SWISS-MODEL üzerinden geliştirilen SIK2 için model taraması yapıldığında Şekil 3.2 görüldüğü üzere bugüne kadar geliştirilmiş dört farklı modelleme sonucu listelenmektedir. Bu modellerin şablonları sırasıyla 2wzj.1.A (MARK2), 4yom.1.A (SAD), 5ezv.1.A (AMPK) ve 5yks.1.A (SNRK) üç boyutlu protein yapılarıdır.



Şekil 4.2: SWIS-MODEL model veri tabanında mevcut SIK2 modelleri.

Çalışmamızda NCBI BLAST protein aracıyla SIK2 ile yüksek oranda sekans benzerliği bulunduğu keşfedilen MARK1 şablonları kullanılmıştır. SWISSMODEL veri tabanlarında MARK1 ait üçboyutlu protein verileri Şekil 4.3'de listelenmiştir.

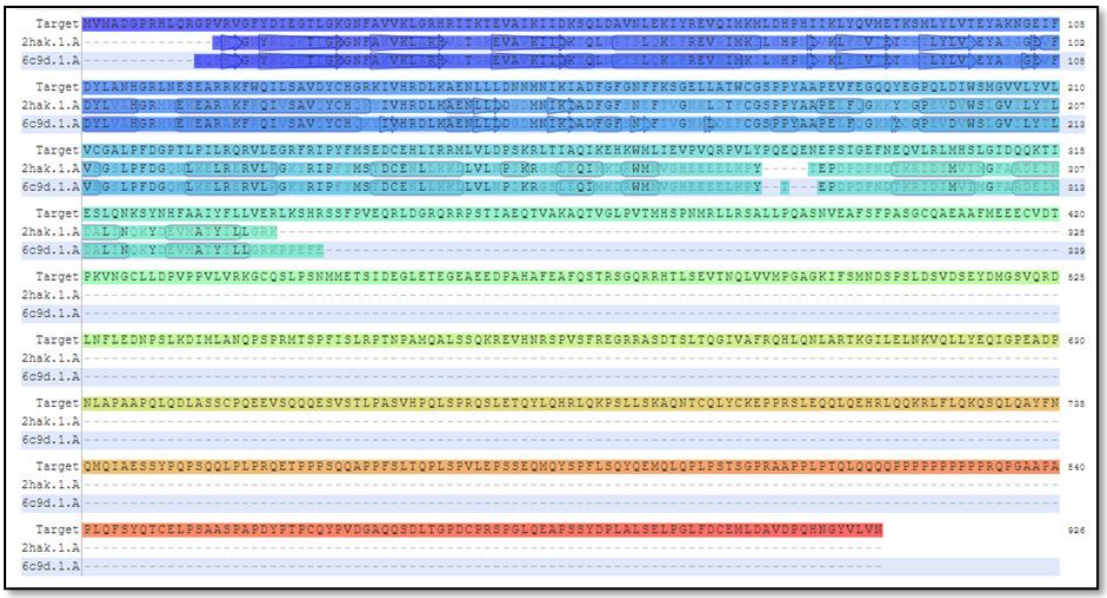


Şekil 4.3: SWISS-MODEL veritabanlarında tanımlı MARK1 deneysel modelleri.

6C9D PDB kodlu yapı, Emptage ve arkadaşı tarafından X-ışını kristalografi metoduyla elde edilmiş bir MARK1 yapısıdır [Emptage et al, 2018]. 2.6 Angstrom (Å) çözünürlüğe sahip yapı ve MARK1'in kinaz, UBA ve KA domeynlerini içerir. Yapının ligand içermemesine ek olarak KA domeyni ile otoinhibe olması dikkat çekicidir. Bir diğer model olan SWISS-MODEL kodu 2HAK, 2006 yılında yine X-

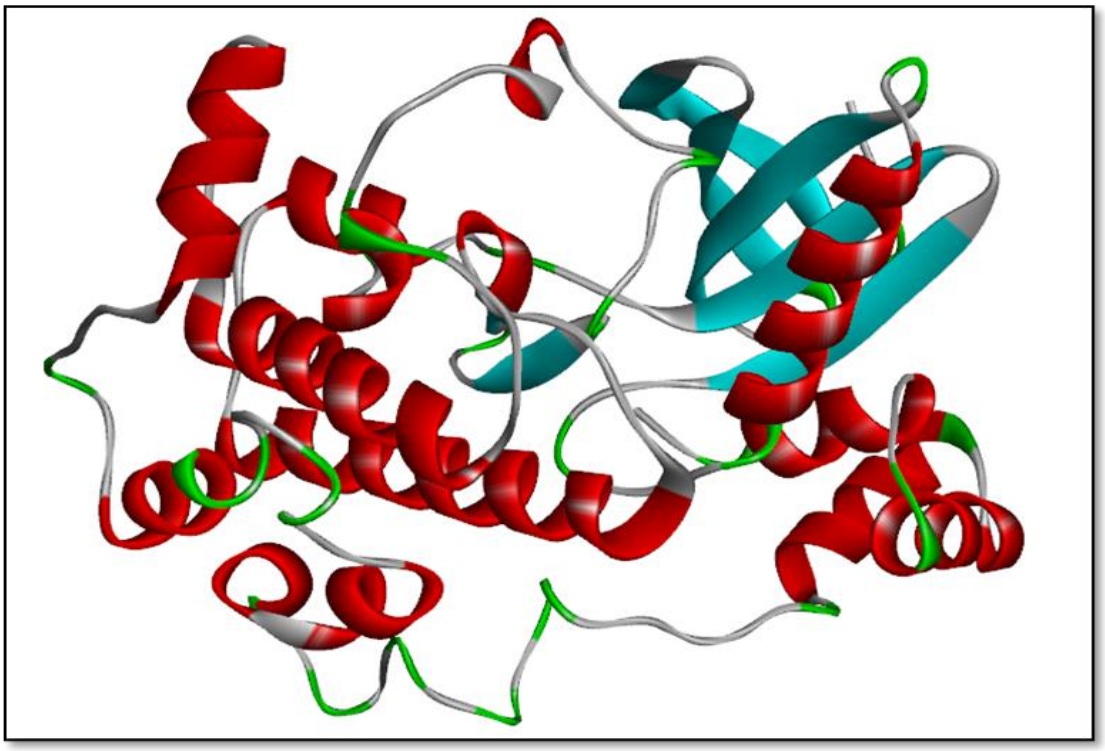
ışını yöntemiyle geliştirilmiştir [Marx et al., 2006]. 2.5 Å çözünürlüğe sahip model MARK1'in yalnızca kinaz ve UBA domeynlerini içinde barındırır. Son olarak üçüncü MARK1 yapısı olan 3OSE, 2010 yılında Moravcevic ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [Moravcevic et al., 2010]. 1.7 Å gibi yüksek çözünürlük değerine sahip model, gerek yalnız UBA domeynini içermesi gerekse ligand içeriğiyle genel modellemelere uygun değildir.

SIK2 homoloji modelleme için mevcut MARK1 şablon yapılarından 6c9d ve 2hak kristal yapıları seçilmiştir. Seçilen şablon protein yapıları ligand veya mutasyon içermediği için modellemeye elverişli yapıdadır. SWISS-MODEL programı modellemede ikinci basamak olarak ilgili şablonlar için hedeflenen protein ile hizalama çalışma yapmıştır (Şekil 4.4).



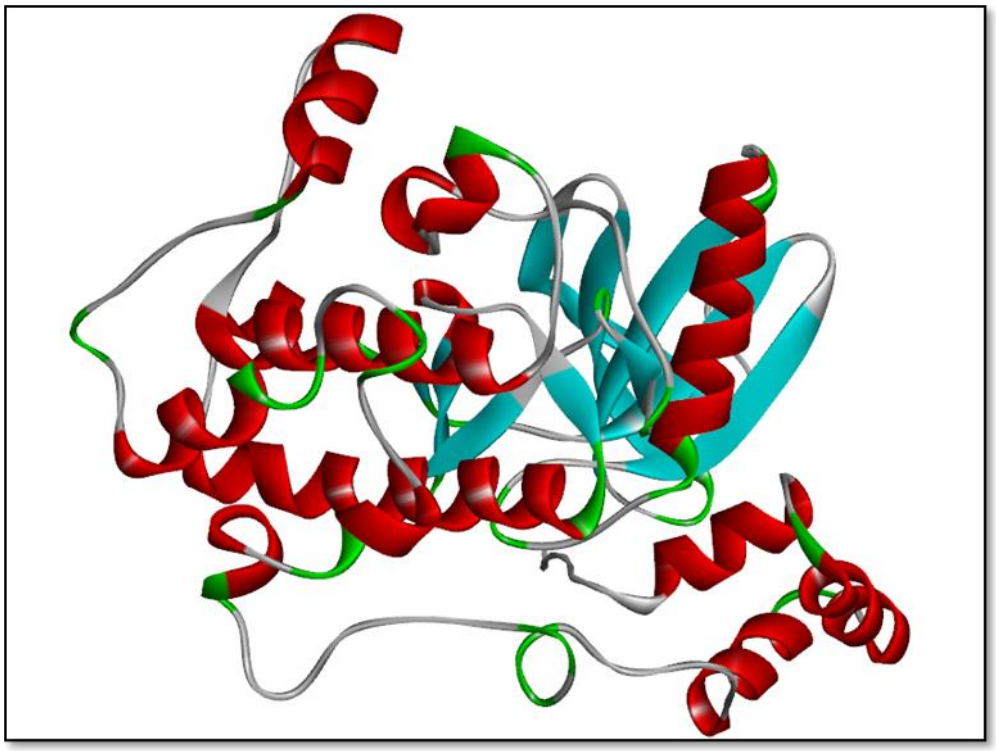
Şekil 4.4: Modelleme şablon olacak MARK1 yapıları ve SIK2 hizalama çalışması.

6c9d şablonuyla geliştirilen Model I, monomer yapılı ve -1.89 QMEAN skoruna sahiptir (Ekler B, Şekil 4.5). Model SIK2 amino asit dizisinde 13-341 alanı içerir ve böylece kinaz ve UBA domeynlerini kapsar.



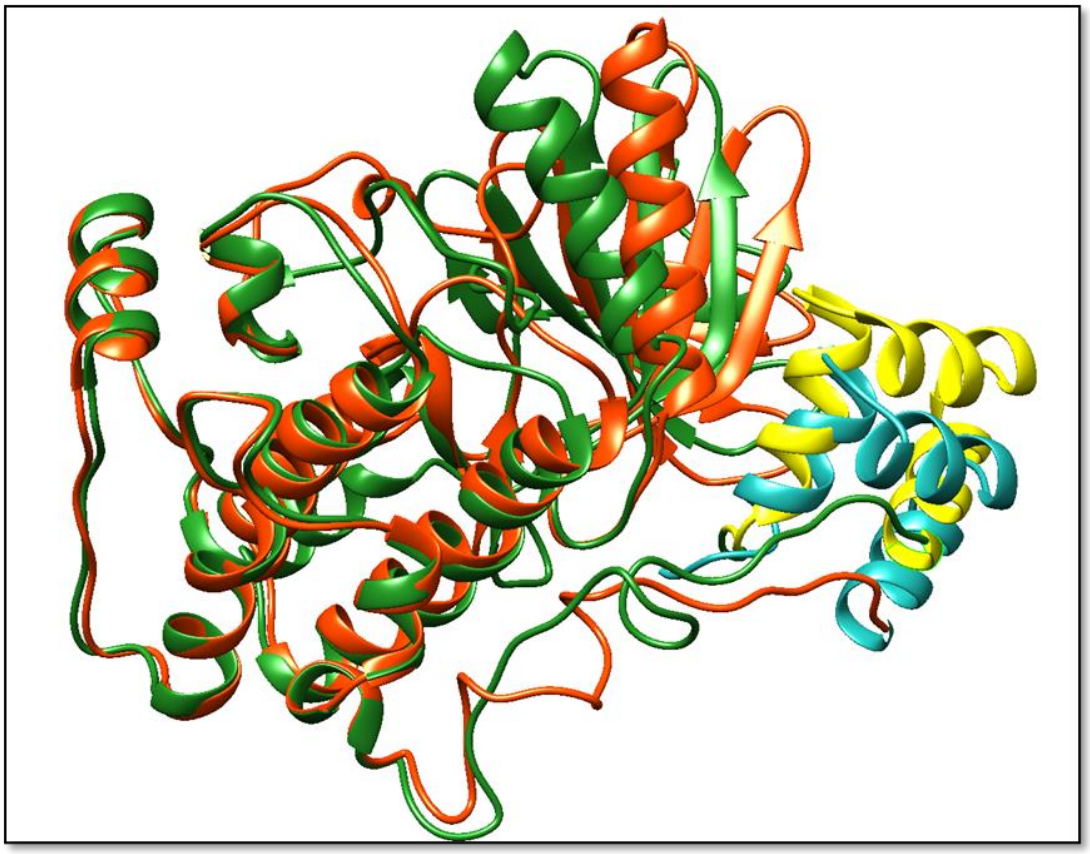
Şekil 4.5: SIK2 homoloji modelleme, Model I.

Bir diğer SIK2 katlanma modeli 2hak MARK1 yapısı ile oluşturulan Model II'dir. Monomer protein yapısına sahip Model II, SIK2 kinaz ve UBA domeynlerini kapsayacak şekilde 15-336 bölgesi için katlanma modeli sağlar (Şekil 3.2.5). Model II, -1.87 QMEAN ve 0.15 GMQE değerlerine sahiptir (Ekler B).



Şekil 4.6: SIK2 homoloji modelleme, Model II.

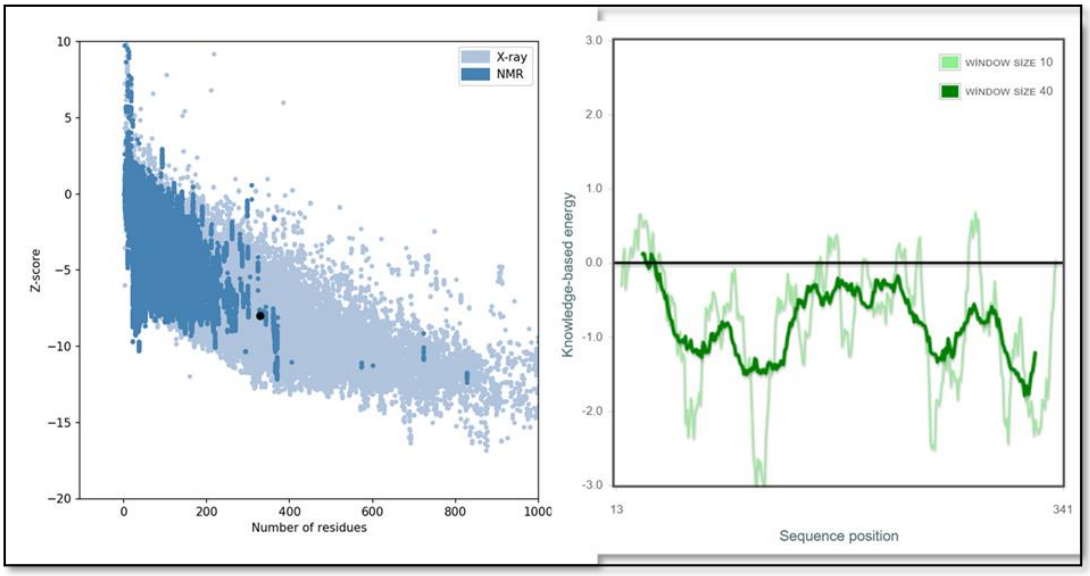
Geliştirilen modeller yapısal farklılıkların daha iyi anlaşılması için Chimera (UCSF) programı ile üst üstte çakıştırılarak UBA-kinaz domeyn etkileşimi incelenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Chimera (UCSF) programı ile SIK2 homoloji modelleri çakıştırma çalışması. Model I yeşil, Model I UBA domeyni sarı ile ifade edilirken Model II turuncu, Model II UBA domeyni mavi ile işaretlenmiştir.

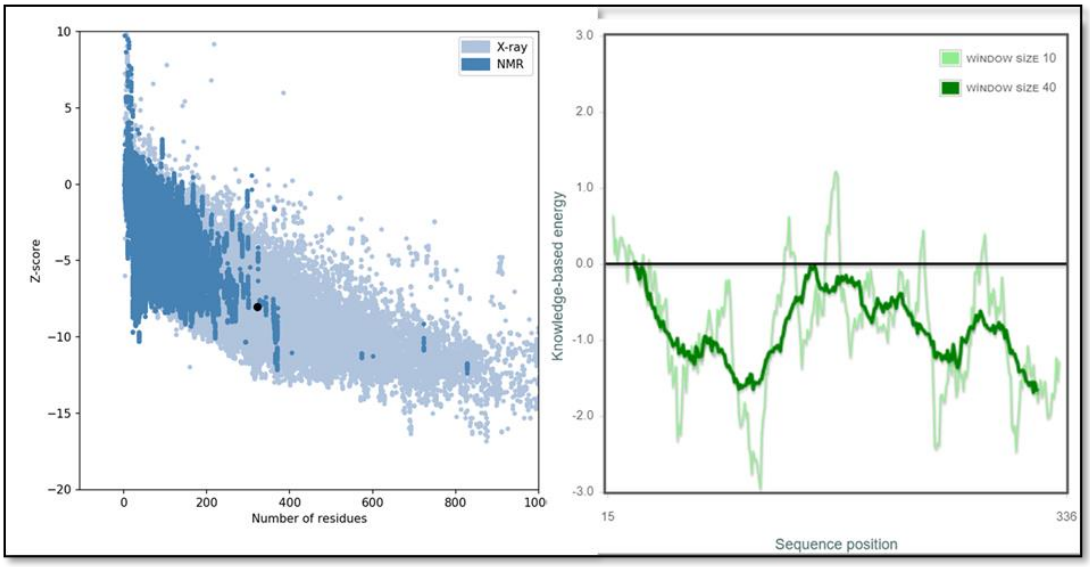
4.3. Model Doğruluğunun Ölçülmesi

Geliştirilen modellerdeki potansiyel hataların keşfi ve model kalitesinin ölçülmesi için ProSA programı ile onaylanması yapıldı. Program tarafından model için hesaplanan, genel bir kalite ölçütü olan, Z skoru sırasıyla Model I ve Model II için Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 sol panellerinde görülmektedir.



Şekil. 4.8: ProSA programı Model I doğruluk analizi sonuçları. Sol panelde siyah nokta Z puanını ifade etmektedir. Sağ panelde kalın çizgi n+40 ince çizgi n+10 ortalamasını göstermektedir.

Model I için ProSA kalite analizi sonucu hesaplanan Z puanı -7.98 olup NMR ve X ışını kristalografi verileri üzerinde siyah nokta ile işaretlenmiştir (Şekil 4.8 sol panel). Şekil 4.8 sağ panelde her bir aminoasit kalıntısı için n+40 kalın bir çizgi ile n+10 ortalama kalite değeri ince bir çizgi ile gösterilmiştir. n+40 verisi daha genel bir kalite ölçütü olduğu için Model I için yalnızca başlıca aminoasitlerde sıfır değerinin üzerine çıkarak potansiyel hataya işaret eder. Bölgesel değerlendirilmek istendiğinde n+10 verisi yaklaşık 15 ile 40 ve 370 ile 390 numaralı aminoasit kalıntıları arasında kalan bölgelerde sıfır değerine sahip orta çizgiyi aşarak potansiyel yerel katlanma hatalarını vurgular.



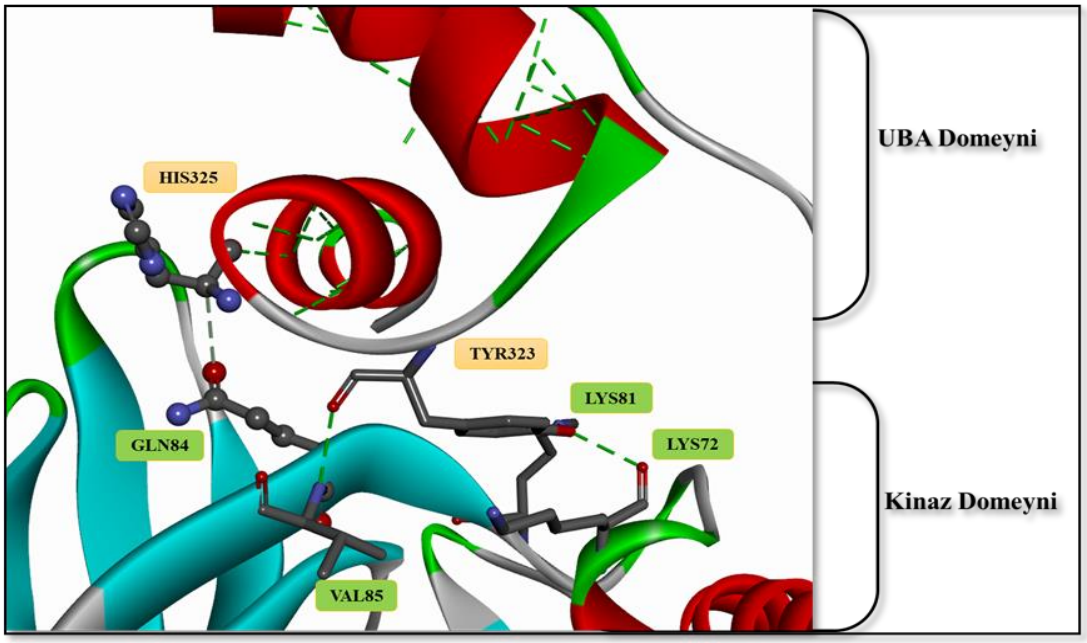
Şekil. 4.9: ProSA programı Model II doğruluk analizi sonuçları. . Sol panelde siyah nokta Z puanını ifade etmektedir. Sağ panelde kalın çizgi n+40 ince çizgi n+10 ortalamasını göstermektedir.

ProSA programı tarafından Model II kalite analizi sonucu hesaplanan Z puanı -8.03'tür. Olası katlanma hatalarına işaret eden Şekil 4.9 sağ panelde, kalın çizgi sıfırı hiç aşmayarak yapının tutarlılığını teyit etmiştir. n+10 verilerine bakıldığında Model I ile tutarlı şekilde N-terminal uçta yer alan birkaç kalıntıya ek olarak yaklaşık 160 – 175 arası ve yine 290 civarında potansiyel hata olabileceğini bildirilmiştir.

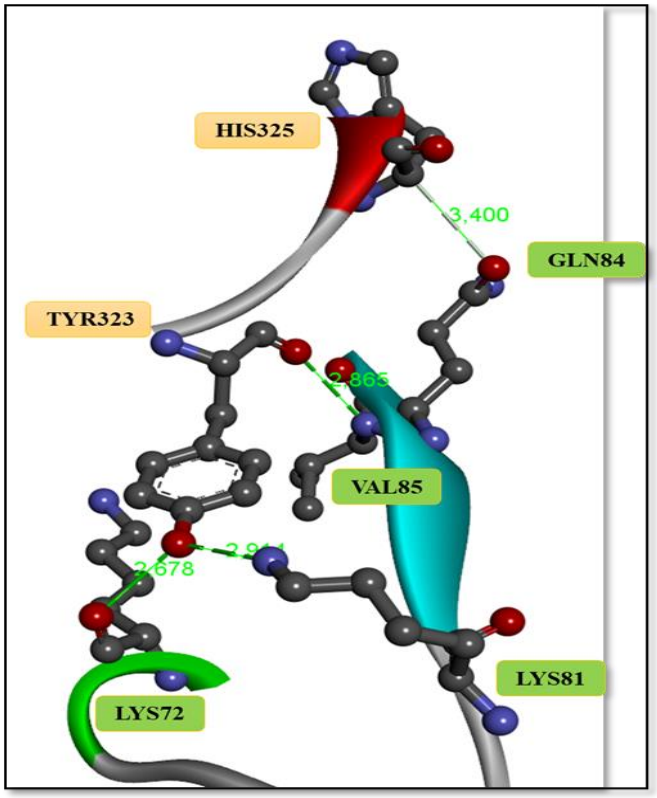
4.4. Domeyn Etkileşimlerinin İncelenmesi

Discovery Studio programı ile açılan Model I domeynler arası etkileşimleri ve bağ uzunları açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.10).

Model I UBA domeyn ile N uçtaki kinaz domeyninin Tyr323–Lys72, Tyr323–Lys81, Tyr323–Val85 ve His325–Gln84 aminoasitleri arasında olmak üzere 4 farklı Hidrojen (H) bağı sırasıyla 2.678 Å, 2.944 Å, 2.865 Å, 3.4 Å bağ uzunluklarına sahiptirler (Şekil 4.11).

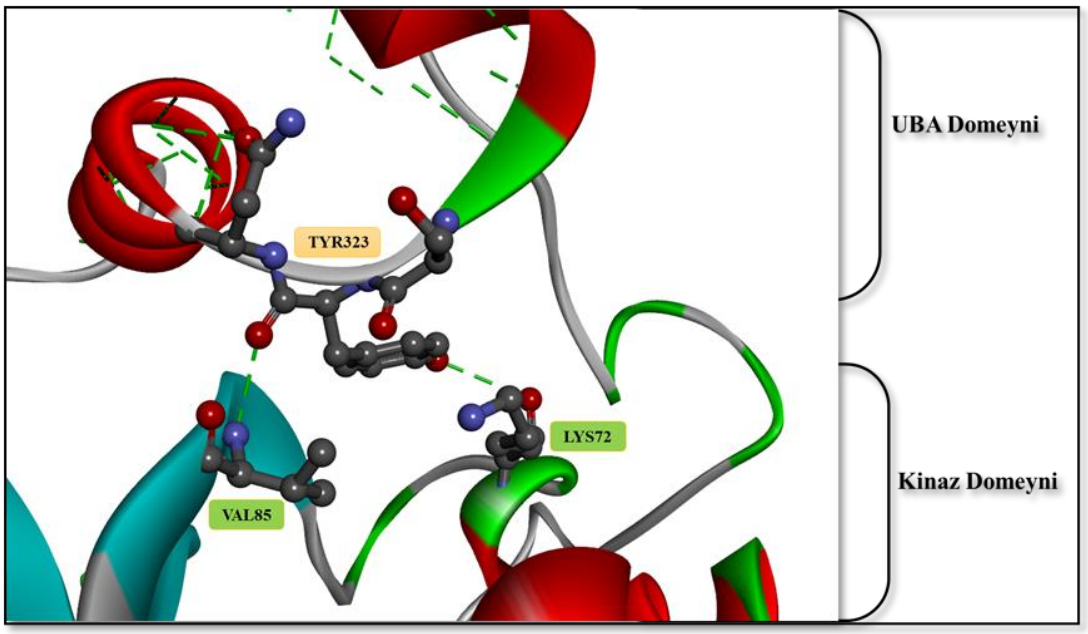


Şekil 4.10: Model I domeynler arası oluşmuş H bağları. UBA domeyni aminoasitleri sarı ile işaretlenmiş, kinaz domeyni aminoasitleri yeşil ile işaretlenmiş.

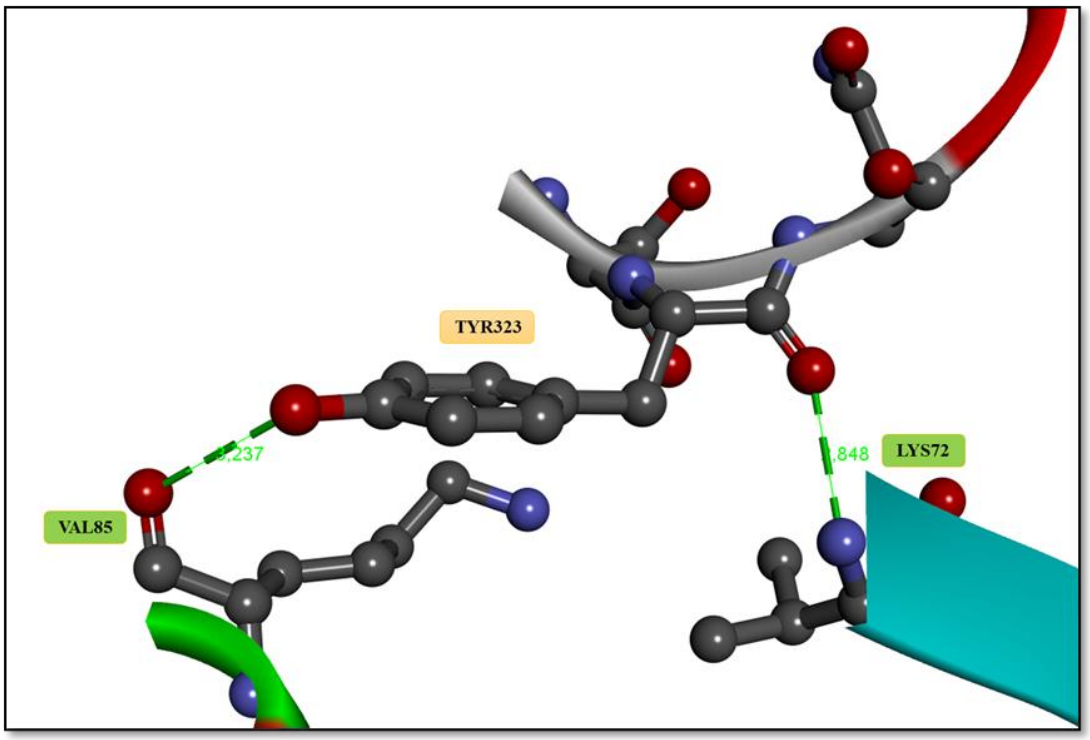


Şekil 4.11: Model I domeynler arası oluşmuş H bağları ve uzunlukları. UBA domeyni aminoasitleri sarı ile işaretlenmiş, kinaz domeyni aminoasitleri yeşil ile işaretlenmiş.

Benzer şekilde Model II için UBA-kinaz domeynlerinin Tyr323–Lys72 ve Thr323–Val85 aminoasitleri arasında oluşan ve Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verilen iki H bağı sırasıyla 2.848 Å, 3.237 Å uzunluğundadır.



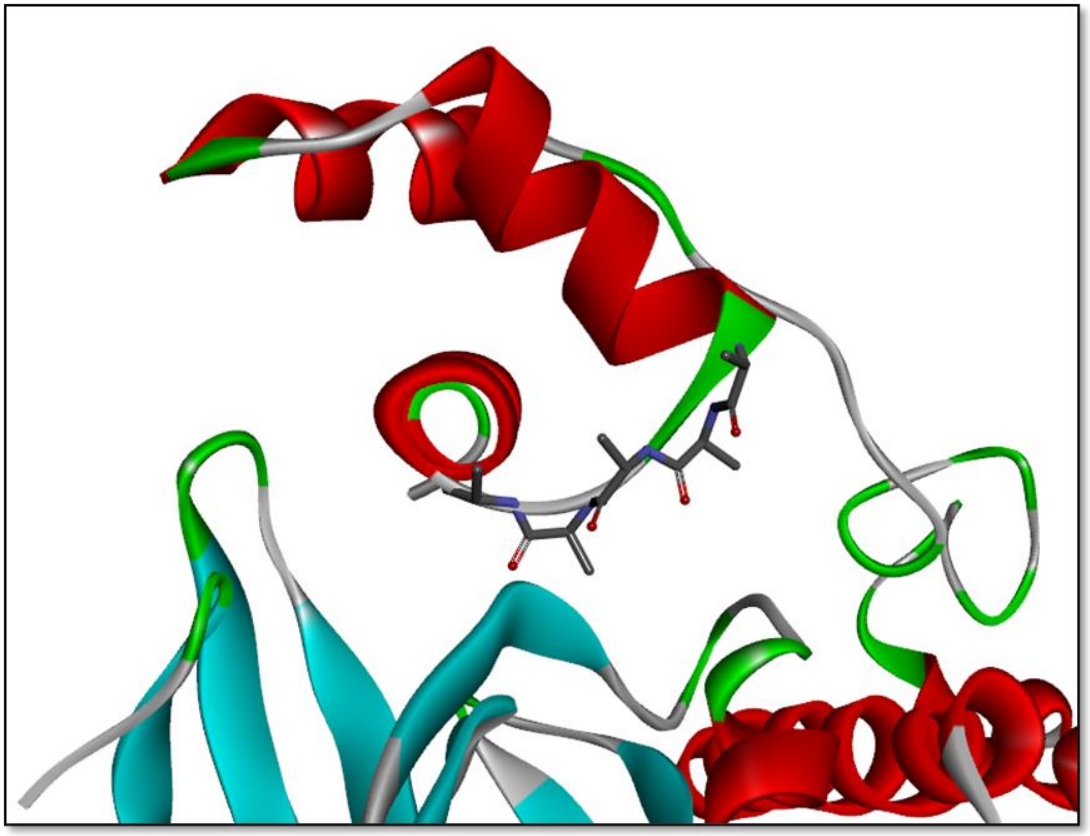
Şekil 4.12: Model II domeynler arası oluşmuş H bağları. UBA domeyni aminoasitleri sarı ile işaretlenmiş, kinaz domeyni aminoasitleri yeşil ile işaretlenmiş.



Şekil 4.13: Model II domeynler arası oluşmuş H bağları ve uzunlukları. UBA domeyni aminoasitleri sarı ile işaretlenmiş, kinaz domeyni aminoasitleri yeşil ile işaretlenmiş.

4.5. Mutant ve Ligand Kenetlenmeli Model Geliştirilmesi

Yukarıda Şekil 4.10-13'te verilen UBA ve kinaz domeynleri arasındaki mevcut güçlü kimyasal etkileşimin kırılması amacıyla etkileştiği gösterilmiş Asn320, Lys321, Ser322, Thr323, Asn324 ve His325 kalıntıları alanin ile değiştirilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Modellerde domeynler arası etkileşimde görev aldığı gösterilmiş bazı aminoasitler alanin ile değiştirilmiş mutant model. Değiştirilmiş aminoasitler çubuk formunda görülmektedir.

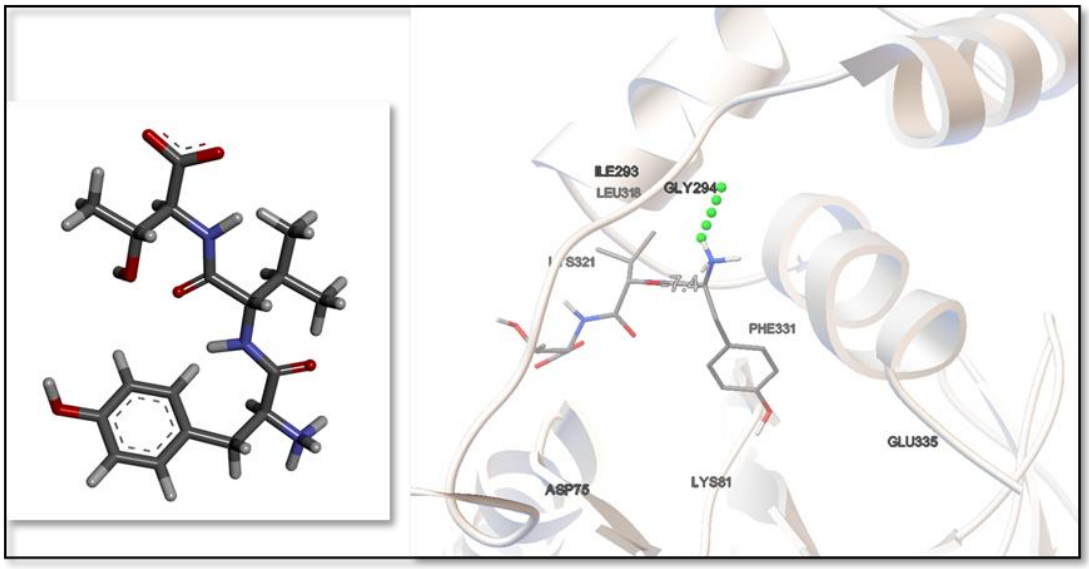
Benzer amaçla domeynler arası etkileşimi baskılayacak inhibitör ligand tasarımı yapılmıştır. Domeynlerin birbirlerine çok yakın olması nedeniyle hedeflenen alan sterik kısıtlamalara sahiptir. Bölgenin hidrofobik karakterli olması göz önüne alındığında her iki modelde ortak varlık gösteren tirozin-valin etkileşimini içerir şekilde öncelikle Tyr-Val-Thr (TVY) sıralı tripeptid yapılı olarak tasarlanmıştır (Şekil 4.15 sol panel). Farklı

kombinasyona sahip ligand tasarımları yapıldıysa da en başarılı kenetlenme (-7.4 kcal/mol ve -7.2 kcal/mol) tripeptid yapılı TVY ligandı ile sağlanmıştır. Autodock Vina programı ile simüle edilen kenetlenme ve hesaplanan bağlanma affinitesi puanı kullanılarak tripeptid yapılı ligand için İnhibitör Konsantrasyonu (Ki) değeri hesaplanmıştır. Ki hesaplamasında bağlanma affinitesi (ΔG), Ki = exp(ΔG/RT) formülünde yerine konularak hesaplanmıştır (R, evrensel gaz sabiti, 1.985×10^{-3} kcal mol^{-1} K^{-1} ; T sıcaklık (K), 298.15 K). Spesifik bağlanmanın %50 azaltılması için gerek inhibitör konsantrasyonu olan IC50 değeri, kenetleme çalışmamız gibi allosterik çalışmalarda Ki değerine eşittir [Haupt et al., 2015]. Model I ve Model II bağlanma affinitesi ve IC50 değerleri Tablo 4.1'de listelenmiştir.

Ligand yapısı UBA hedefli kenetlenmede bir H bağı oluşturmuş ve birçok aminoasit kalıntısıyla etkileşmiştir (Şekil 4.15 sağ panel).

Tablo 4.1: Model I ve Model II ligand kenetlenme bağlanma affinitesi ve hesaplanan IC50 değeri.

Model	Bağlanma Affinitesi (kcal/mol)	Hesaplanan IC50
Model I	-7,4	3,76 µM
Model II	-7,2	5,27 µM



Şekil 4.15 Tripeptid yapılı ligand tasarımı ve kenetlenme çalışması. Sol panelde sırasıyla tirozin, valin ve tireonin aminoasit kalıntılarını içermekte olan ligand yapısı görülmektedir. Sağ panelde SIK2 UBA hedefli kenetlenme çalışmasında ligand ve etkileştiği aminoasit kalıntıları görülmektedir.

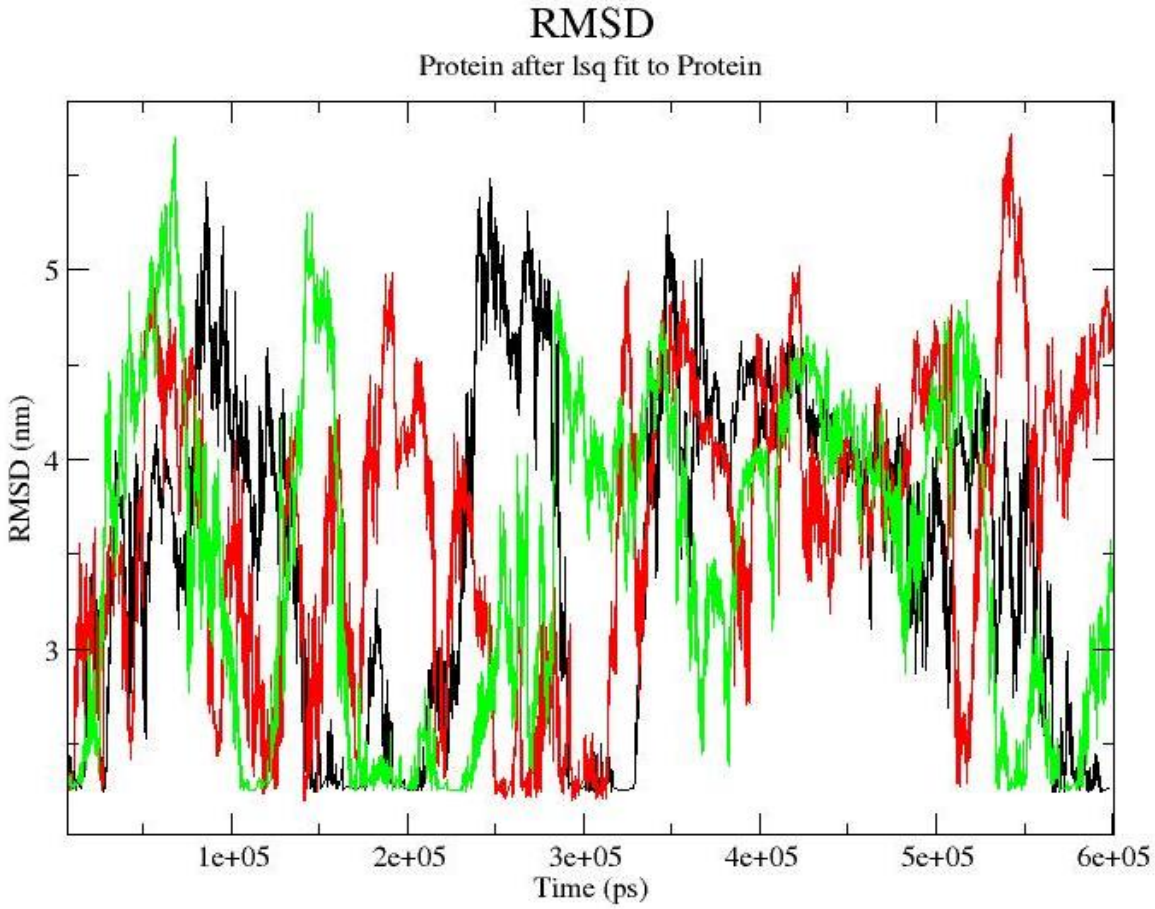
4.6. Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları

MD simülasyon verileri yine Gromacs programı ile işlenerek başta simülasyon sürecine dair genel biri bilgi veren Potensiyel Enerji, Sıcaklık, Basınç, Yoğunluk grafikleri hazırlanmış ve sırasıyla Ekler B.1.3-6'te verilmiştir.

MD simülasyon çalışmaları OPLS kuvvet alanın alt tiplerinden olan OPLS All Atom (OPLS-AA/L) alanı içerisinde 310˚Kelvin (K) sıcaklıkta 1 bar basınç altında simüle edilmiştir. Her iki model için model başına 200 nano saniye (ns) simülasyon öngörüldü. Ancak model I RMSD verilerinin yetersiz görülmesi nedeniyle ilgili model için simülasyon süresi 600 ns'ye çıkartıldı.

Temel MD analizlerinden biri olan RMSD yapının kimyasal olarak merkezi sayılan α karbonun zamana göre ilk konumundan uzaklığını ifade eder. RMSD grafiğindeki dalgalanma protein yapısının kararsız bir halde zamanla ilk halinden daha esnek ve görece açılmış haline işaret etmektedir.

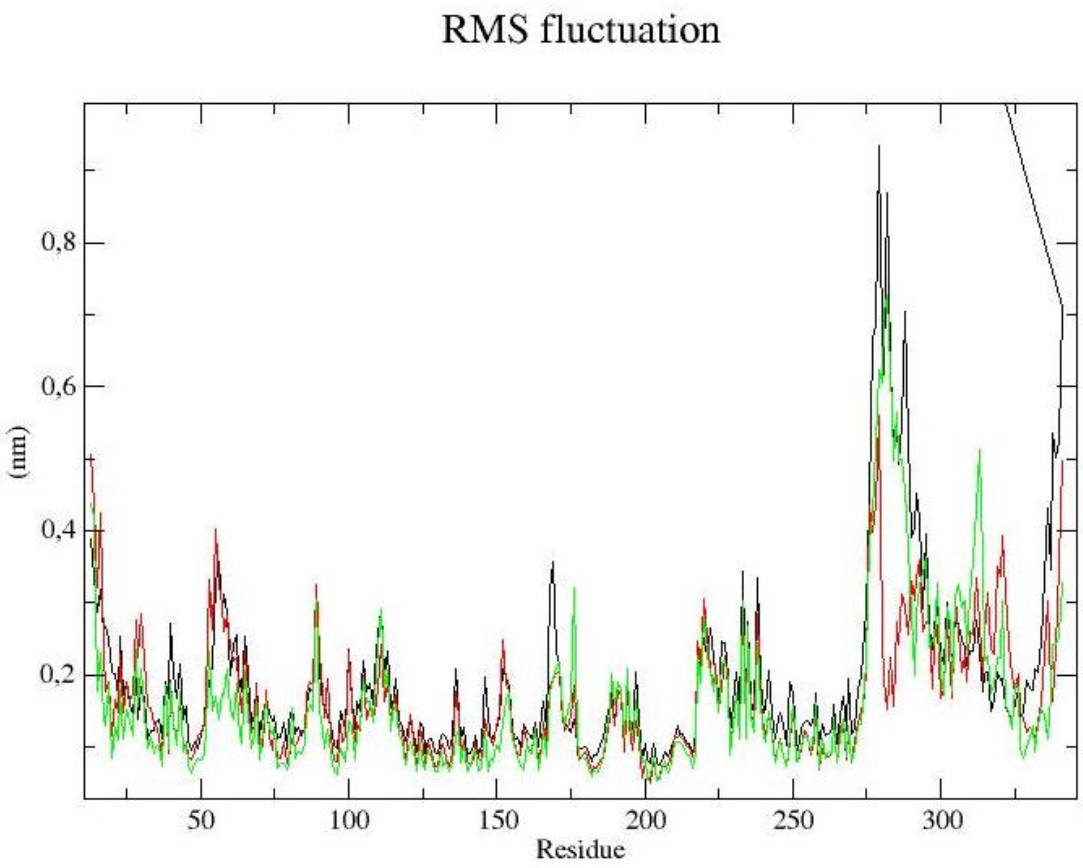
Model I RMSD grafiği olan Şekil 4.16 incelendiğinde simülasyon sürecinde her üç versiyonunda yüksek oranda hareket ettiği, özellikle ligand kenetli modelin zamana bağlı olarak farklı kalıplarda hareket ettiği görülmektedir. Her biri MD simülasyonu ayrı ayrı görselleştirme programlarında film halinde izlendiğinde RMSD grafiklerine yansıyan hareketin çoğunlukla domeynler dışında kalan alanlar bölgelerde kaynaklandığı görülmüştür. Bu fikri destekler şekilde tüm simülasyon sürecinde her bir aminoasit kalıntısının harekete katkısını irdeleyen RMSF grafiğinde domeynler arası kalan 270 – 295 bölgesi tüm yapının en hareketli bölgesi olmuştur (Şekil 4.17).



Şekil. 4.16: MD simülasyonu Model I RMSD analiz sonuçları. Yabanıl model siyah, mutant model yeşil ve ligand kenetli model kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

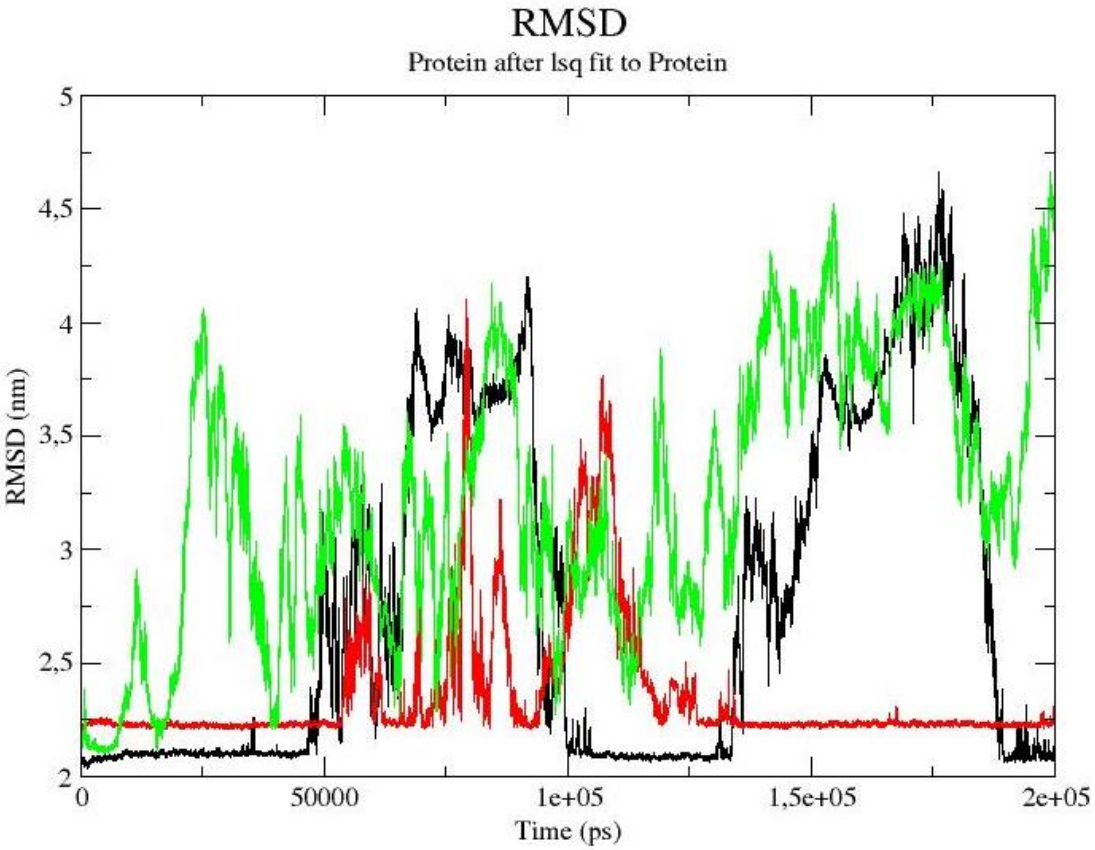
Yine model I RMSF grafiği incelendiğinde bazı aminoasit kalıntılarının alanin ile değiştirilmesiyle oluşturulmuş mutant modelde, mutasyon yaratılmış 320-325 aralığı yabanıl modele göre daha fazla hareket ederek istenildiği şekilde bölgede kimyasal etkileşimi zayıflatmıştır (Şekil 4.17 yeşil çizgi).

Ligand kenetli model gerek RMSD gerekse RMSF başarılı bir kenetlenme ile bölgeyi hareket serbestliği katmadığı, yabanıl model ile mukayese edildiğinde sınırlı değişime neden olduğu görülmüştür.



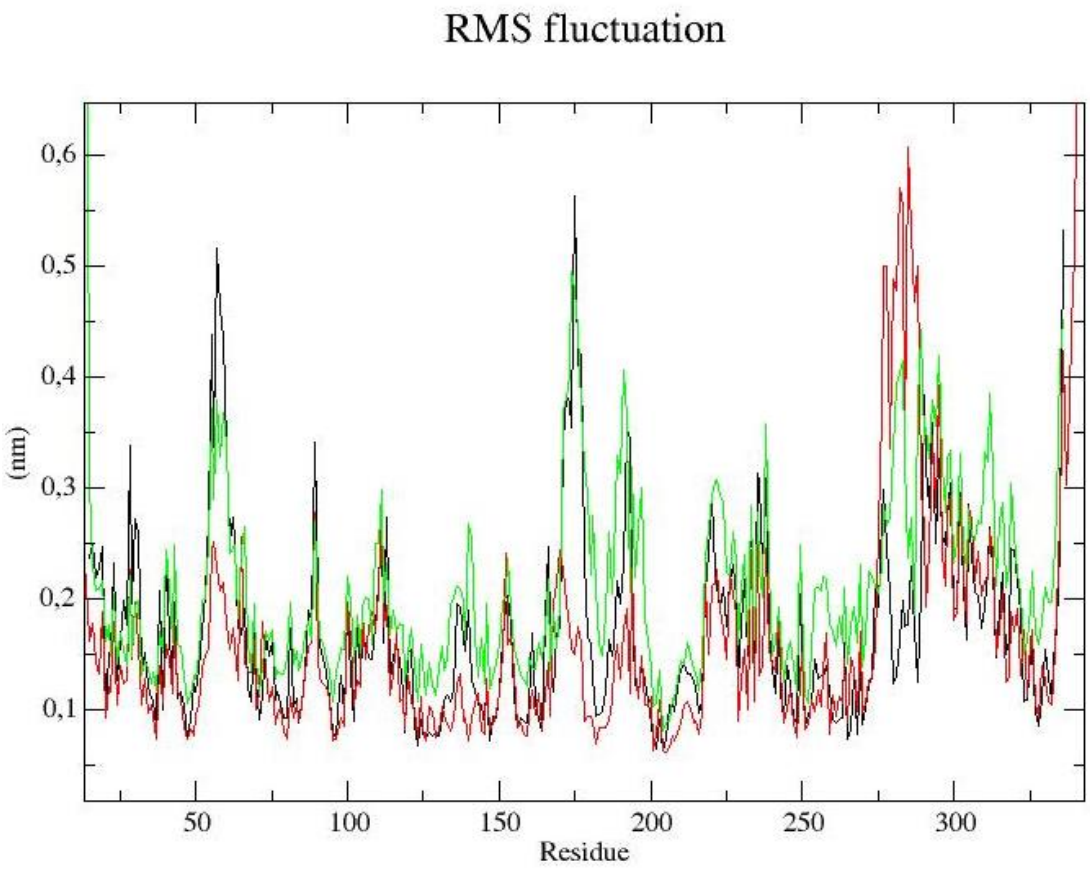
Şekil. 4.17: MD simülasyonu Model I RMSF analiz sonuçları. Yabanıl model siyah, mutant model yeşil ve ligand kenetli model kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

Model II RMSD grafiği model I ’e ait grafik ile mukayese ettiğinde daha az harekete işaret eden görece durgun çizgiler model II yapısının daha kararlı yapısına vurgu yapmaktadır. Şekil 4.18 RMSD grafiğinde modeller kendi arasında kıyaslandığında herhangi manipülasyon bulunmayan yabanıl modelin zamana bağlı hareketinin birbirini tekrarlayan paternde simülasyon sürecinde iki defa gerçekleştiği görülmektedir. Mutant model diğer iki yapıyla karşılaştırıldığında yapısal olarak daha kararsız ve daha hareketli izlenmektedir. Ligand kenetli model ise Model I RMSD grafiğine benzer şekilde çoğunlukla yabanıl modele benzer bir hareket eğilimi göstermiştir.



Şekil. 4.18: MD simülasyonu Model II RMSD analiz sonuçları. Yabanıl model siyah, mutant model yeşil ve ligand kenetli model kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

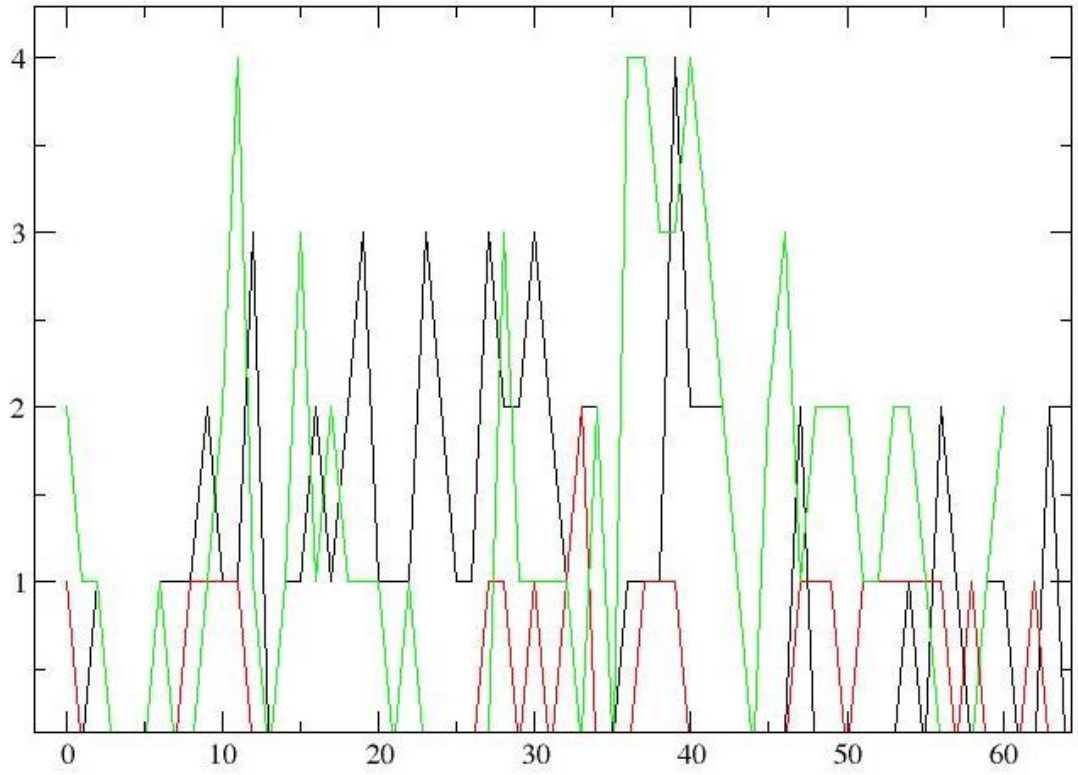
Şekil 4.19 RMSF grafiği incelendiğinde Model II'nin Model I'e göre daha az hareket eğiliminde olduğu tekrar görülmektedir. Model I'e benzer şekilde hareketli bölgelerin domeynler dışında kaldığı, mutant yapıda mutasyona uğratılan bölgenin diğer iki yapıdan ayrıldığı görülmektedir. Ligand kenetli modelde diğer iki yapıdan farklı olarak ve Model I'e benzer şekilde 280-295 bölgesinin hareketliliği dikkat çekicidir.



Şekil. 4.19: MD simülasyonu Model II RMSF analiz sonuçları. Yabanıl model siyah, mutant model yeşil ve ligand kenetli model kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

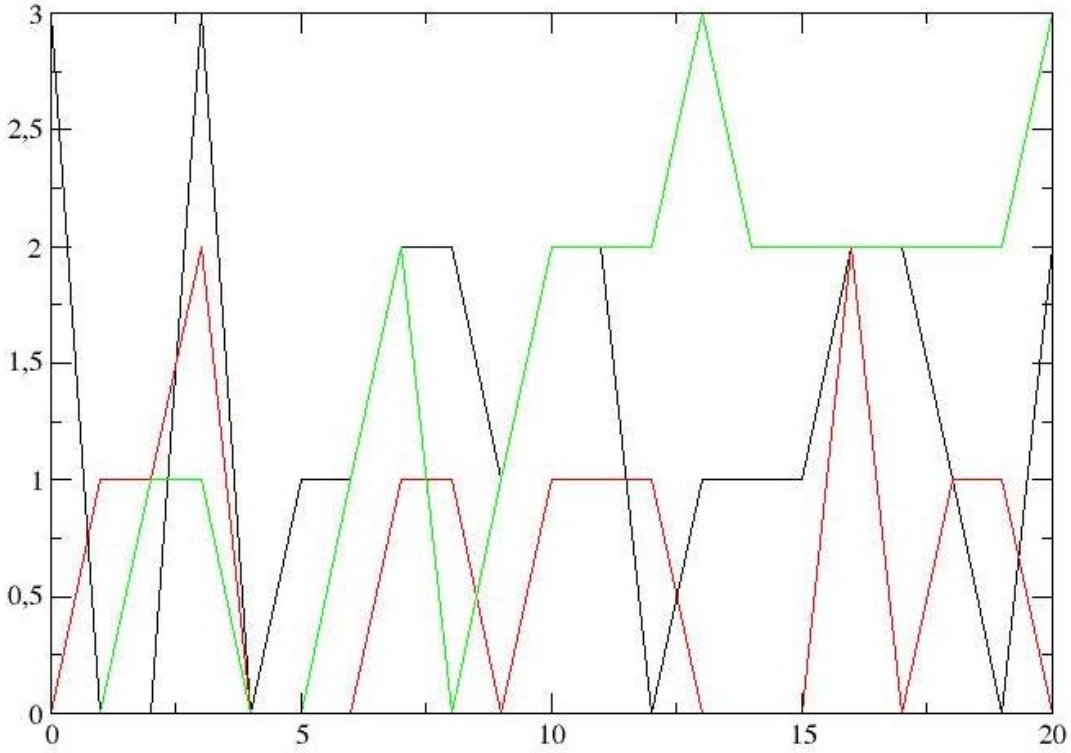
MD simülasyon verileri VMD programı ile analiz edilerek domeynler arası etkileşim ve geliştirilen mutant, ligand gibi yapılarının bu etkileşime etkisi incelemek amacıyla kinaz-UBA domeynleri arası H bağı grafikleri oluşmuştur (Şekil 4. 20, 21).

Model I MD simülasyonları domeynler arası H bağı bakımından incelendiğinde yabanıl versiyonun sahip olduğu 3 farklı H bağı simülasyon boyunca çoğunlukla varlığını sürürken, Şekil 4.20'de kırmızı ile gösterilmiş mutant bağ yapan amino asit kalıntılarının alanin ile değişimi sonucu H bağlarını kaybetmiş ve sınırlı zamanlar 1 H bağına sahip olmuştur. RMSD ve RMSF anali sonucuyla tutarlı şekilde ligand kenetli Model I yapısı, yabanıl versiyona ile benzer davranış sergilemiş ve simülasyon sürecinde domeynler arası çoklu H bağı taşımıştır.



Şekil. 4.20: Model I MD simülasyon kinaz-UBA domeynler arası H bağı grafiği. Yabanıl model siyah, mutant model kırmızı ve ligand kenetli model yeşil renk ile işaretlenmiştir.

Şekil 4.21'te gösterildiği üzere yabanıl Model II MD simülasyonu sahip olduğu 2 domeynler arası H bağını simülasyon süreci boyunca sıklıkla korurken, mutant versiyon beklenen ve Model I mutant versiyonuyla benzer şekilde görece az sayıda H bağı bulundurmaktadır. Peptid yapılı ligand kenetli Model II versiyonu ise hem Model I hem diğer verilerle tutarlı, yabanıl versiyonu benzer, sınırlığı inhibisyonla H bağlarını korumuştur.



Şekil. 4. 21: Model I MD simülasyon kinaz-UBA domeynler arası H bağı grafiği. Yabanıl model siyah, mutant model kırmızı ve ligand kenetli model yeşil renk ile işaretlenmiştir.

4.7. İnhibitör Tasarımı

MD simülasyon sonucunda tripeptid yapılı ligandın sınırlı başarısı, yeni ve daha başarılı ligand tasarımı arayışını başlatmıştır. Bilgisayar destekli ilaç geliştirme çalışmalarında sıkça kullanılan sanal tarama metodu veri bankalarından sağlanan çoklu aday molekülün kenetlenme çalışmasıyla puanlanmasının ve hedef bölge özelikleri doğrultusunda geliştirilmesini içerir.

ZINC15 kimyasal bileşik veri tabanı SIK2 UBA-kinaz domeynler arasını hedefleyecek şekilde bölge özellikleri olan ≤ 250 Dalton ve LogP ≤ 2 şeklinde sınırlandırıldığında 5 milyonun üzerinde aday molekül bulunmaktadır [Web 12, 2021]. Aday moleküller Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı olanlar şeklinde filtrelendiğinde yalnızca 275 aday molekül kalmaktadır. Bölgenin sterik ve elektrokimyasal özelliği düşünüldüğünde iyon, izomer ve aminoasit yapılı bileşikler listeden çıkartılmıştır, kalan 92 bileşiğin kimyasal yapısı Ekler B'de görülmektedir.

Aday moleküller AutoDock programı ile Model II'ye kenetlenmiş ve bağlanma affiniteleri tablo 4.2'de listelenmiştir. Bileşiklerin farmakokinetik özellikleri SWISS-ADME web tabanlı veri bankasından sağlanmış ve yüksek bağlanma affinitesi gösteren yapıların kimyasal özellikleri arasında korelasyon aranmıştır [Web 13, 2021].

Tablo 4.2: Aday moleküllerin bağlanma affiniteleri, hesaplanan IC50 değerleri ve farmakokinetik özellikleri. Csp3, sp^3 hibritleşmiş C atom sayısı / toplam atom sayısı. Log P, partisyon katsayısı, kimyasal yapılar için lipofilisite ölçütü. Log S, suda çözünürlük tahmini hesaplaması.

Molekül Adı	**Bağlanma Affinitesi (kcal/mol)**	**IC50**	**Molekül Ağırlığı**	**Csp3**	**LogP**	**LogS**
Kafein	-4,3	0,7 mM	194,19	0,38	-0,08	-1,48
Aspartat	-4,3	0,7 mM	133,1	0,5	-2,04	1,98
ZINC895040	-3,7	20 mM	180,16	1	-2,13	0,62
Oksiprolin	-4,4	0,6 mM	131,13	0,8	-1,66	1,41
Temodal	-4,8	0,3 mM	194,15	0,17	-0,84	-0,79
Ihd	-2,7	0.1 M	191,14	1	-1,09	-0,64
Fujiglukon	-4,1	1 mM	178,14	0,83	-1,88	0,4
Klavulanat	-4,7	0,4 mM	199,16	0,5	-0,67	-0,03
Teofilin	-4,7	0,4 mM	180,16	0,29	-0,19	-1,46
Vasc	-4,9	0,3 mM	176,12	0,5	-1,42	0,23
Ade	-4,9	0,3 mM	135,13	0	0,03	-1,43
Hidrazid	-5	0,2 mM	137,14	0	-0,35	-0,56
Mafenide	-5,3	0,1 mM	186,23	0,14	0,03	-0,8
Avc	-5	0,2 mM	172,2	0	-0,01	-0,85
5-fc	-4,5	0,5 mM	129,09	0	0,01	-0,51
Etiracetam	-4,7	0,4 mM	170,21	0,75	0,1	-0,48
Allopurinol	-4,7	0,4 mM	136,11	0	0,01	-0,93
ZINC100070937	-4,2	0,8 mM	133,12	0,8	-0,77	1,06
Carbaglu	-4,8	0,3 mM	190,15	0,5	-1,3	0,88
Glumin	-4,3	0,7 mM	146,14	0,6	-1,82	1,5
Akamprosat	-4,4	0,6 mM	181,21	0,8	-0,51	0,14
Carbachol	-3,8	20 mM	147,2	0,83	-2,37	2,58
Eflornithin	-4,4	0,6 mM	182,17	0,83	-0,83	1,2
Demser	-5,4	0,1 mM	195,22	0,3	-0,19	0,02
Metronidazol	-4,6	0,4 mM	171,15	0,5	-0,23	-1
Aminohipurat	-5,3	0,1 mM	194,19	0,11	0,08	-0,54

Tablo 4.2: Devam.

Zarontin	-4,6	0,4 mM	141,17	0,71	0,74	-0,89
Btc	-3,7	20 mM	161,22	0,86	-1,18	-0,59
ZINC6382803	-4,2	0,8 mM	167,19	0	0,11	-1,19
Dtic	-4,7	0,4 mM	182,18	0,33	0,04	-0,9
Kuvan	-5,6	50 nM	241,25	0,56	-1,43	-0,24
Ilopan	-4,6	0,4 mM	205,25	0,89	-0,27	-0,08
Asiklovir	-4,8	0,3 mM	225,2	0,38	-0,91	-0,41
Arac	-4,8	0,3 mM	243,22	0,56	-1,71	-0,14
Amilorid	-4,4	0,6 mM	229,63	0	-0,82	-0,99
Dilatrat Sr	-4,4	0,6 mM	236,14	1	-1,21	-1,87
Saproptein	-5,2	0,2 mM	241,25	0,56	-1,24	-0,24
Minoksidil	-5,5	90 nM	209,25	0,56	0,29	-2,15
Epivir	-4,7	0,4 mM	229,26	0,5	-0,47	-0,84
Stavudin	-4,9	0,3 mM	224,21	0,4	-0,03	-0,87
Sulbaktam	-4,8	0,3 mM	233,24	0,75	-0,33	-0,58
Droksidopa	-5,4	0,1 mM	213,19	0,22	-1,55	0,78
Mileran	-4,4	0,6 mM	246,3	1	0,52	-0,58
L-Dops	-5,3	0,1 mM	213,19	0,22	-1,58	0,78
Emtriva	-4,9	0,3 mM	247,25	0,5	0	-1,13
Asetazolamid	-4,5	0,5 mM	222,25	0,25	-0,62	-1,14
Videx	-5,5	90 nM	236,23	0,5	-0,23	-0,64
Karbidopa	-5,6	90 nM	226,23	0,3	-1,01	0,11
Ethambutol	-4	10 mM	204,31	1	0,6	-0,46
Hmm	-4,8	0,3 mM	210,28	0,67	0,94	-2,96
Misolin	-6	40 nM	218,25	0,33	0,97	-1,91
Zonegran	-6	40 nM	212,23	0,12	0,37	-1,65
Banzel	-6,6	10 nM	238,19	0,1	1,34	-2,03
Amd	-6,1	30 nM	211,21	0,3	-0,59	0,17
Kaptopril	-4,5	0,5 mM	217,29	0,78	0,62	-1,14
Robaksin	-5,4	0,1 mM	241,24	0,36	0,77	-1,52
Tindamax	-4,8	0,3 mM	247,27	0,62	0,07	-1,05
Butabarbital	-4,8	0,3 mM	212,25	0,7	1,01	-2
Meprobamat	-4,8	0,3 mM	218,25	0,78	0,73	-1,11
Felbatol	-5,5	90 nM	238,24	0,27	0,81	-1,5
Butalbital	-5	0,2 mM	224,26	0,55	1,2	-2,06
Nitrofurantion	-5,9	50 nM	238,16	0,12	-0,66	-1,04
Brivaracetam	-4,5	0,5 mM	212,29	0,82	1,04	-1,46
Sülfasetamid	-6	40 nM	214,24	0,12	0,84	-1,68
Makrobid	-5,8	60 nM	238,16	0,12	-0,64	-1,04
Tipirasil	-5,6	80 nM	242,66	0,44	0,61	-1,06
Sitrat	-4,4	0,6 mM	192,12	0,5	-1,51	0,38

Tablo 4.2: Devam.

Mannit	-4,4	0,6 mM	182,17	1	-2,23	1,31
Karnitor	-4	10 mM	162,21	0,86	-1,76	-0,05
Tekfider	-4,8	0,3 mM	144,13	0,33	0,48	-0,61
DMSA	-3,6	20 mM	182,22	0,5	-0,19	-0,81
Fosfomisin	-3,5	30 mM	138,06	1	-0,76	0,24
Sabril	-4,2	0,8 mM	129,16	0,5	-0,05	0,98
Hepin	-4,4	0,6 mM	131,17	0,83	-0,12	1,54
Listeda	-4,7	0,4 mM	157,21	0,88	0,27	0,58
Metakolin	-3,7	20 mM	160,23	0,88	-0,6	-0,95
Pralidoksim	-4,3	0,7 mM	137,16	0,14	-0,05	-1,72
Edrofonyum	-4,7	0,4 mM	166,24	0,4	-0,58	0,89
Gabapentin	-5,2	0,2 mM	171,24	0,89	0,79	-0,01
Amantadin	-4,9	0,3 mM	151,25	1	2,18	-2,31
Prokasil	-5	0,2 mM	170,23	0,43	1,57	-1,66
Rasagilin	-5,6	80 nM	171,24	0,33	2,28	-2,26
Lorzon	-5,3	0,1 mM	169,57	0	1,84	-2,62
Baklofen	-5,5	90 nM	213,66	0,3	1,28	-0,61
Akzon	-5,9	50 nM	248,3	0	1,55	-2,38
ZINC35024346	-5,1	0,2 mM	244,31	0,8	0,82	-1,31
Guanfasin	-6	40 nM	246,09	0,11	1,75	-2,74
Trinitrifenol	-5,1	0,2 mM	229,1	0	-0,66	-2,18
Vareniklin	-6,1	30 nM	211,26	0,38	1,62	-2,11
Frovatriptan	-6,3	20 nM	243,3	0,36	1,58	-2,37
Pindolol	-5,7	70 nM	248,32	0,43	1,94	-2,46
Milnakipran	-5,4	0,1 mM	246,35	0,53	2,01	-2,07

En yüksek bağlanma affinitesine sahip Banzel, Frovatripan, Vareniklin, Amd gibi yapılarının detaylı analizlerinde domeynler arası bölgede güçlü etkileşimlere sahip olduğu görülmüştür. Bu yapılar arasında ortak kimyasal özelliklerin belirlenmesi amacıyla yapılan korelasyon çalışmaları sonucunda 92 aday molekül arasında yer alan 53 bileşikte LogP değeri ile bağlanma affinitesi arasında %70 oranında doğru orantı bulunmuştur (Ekler B). Benzer şekilde LogS değeri ile bağlanma affinitesi arasında %38, molekül ağırlığı ve Csp3 değerleri ile yine bağlanma affinitesi arasında %31 oranında korelasyon görülmüştür.

5. TARTIŞMA

SIK ailesi, üyesi olduğu AMPK enzimlerine benzer şekilde birçok temel metabolik rollere sahiptir. Bozulmuş SIK aktivitesi bugüne kadar başta kanser, obezite olmak üzere farklı sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmiş olup aktivitenin farmakolojik olarak düzeltilmesi bu hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak SIK ailesi üyeleri sınırlı çalışma ve fizyolojik zorluklar nedeniyle tam olarak aydınlatılamamış ve üç boyutlu yapısı çözülemediğinden inhibitör çalışmaları üyesi olduğu AMPK kinazlara benzetim üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamız literatürdeki üçboyutlu yapı modeli eksikliğini doldurmak amaçlı, protein katlanma modellemesinde sıkça kullanılan, homoloji modelleme metodu ile geliştirilmiş modeller ve benzetim ile üretilen inhibitörlere alternatif sağlaması amaçlanan domeyn etkileşimlerinin kırılması ile oluşturulmuş allosterik inhibisyonu denemesini içermektedir.

SIK2 için homoloji modelleme çalışmasının ilk basamağı olan şablon seçilimi amaçlı NCBI BLAST hizalama çalışmamızda en yüksek dizilim benzerliği MARK ailesi üyesi olan MARK1 ile çıkmıştır. Protein veri bankaları incelendiğinde bugüne kadar MARK1 kristal üç boyutlu yapısını deneysel olarak çözümleyen dört farklı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında herhangi ligand yapısı ve mutasyon içermeyen iki faklı MARK1 yapısı (2hak ve 6c9d), SIK2 homoloji modelleme çalışmamıza şablon seçilmiş ve geliştirilen modeller sırasıyla Model I ve Model II olarak tanımlanmıştır. Homoloji modelleme programı SWISS-MODEL aynı zamanda daha önce geliştirilen modellerin listelendiği bir veri tabanıdır. Geçmişte yapılmış SIK2 modelleri geliştirdiğimiz Model I ve Model II ile mukayese edildiğinde modellerimiz hem aminoasit dizisinde daha geniş bir alanı katlama başarısı gösterirken hem de yine SWISS-MODEL tarafından sağlanan kalite ölçütü QMEAN ve GMQE puanlarına göre daha başarılıdır. Bu bağlamda geliştirilen modellerin ilgili veri tabanında yer alması, ileride yapılacak çalışmalar için bir model ve mevcut yapılara alternatif sağlayacaktır.

Geliştirdiğimiz SIK2 modelleri homoloji modelleme metodunda sıkça karşılaşılan potansiyel hatalar açısından teyit etmek ve onaylamak için protein modeli validasyon aracı olan ProSA ile ölçümlendi. Yapılan inceleme sonrası ProSA

aracı tarafından sağlanan model Z puanı literatürde yer alan NMR ve x-ışını kristalografi verileri dağılımında yer alarak modellerin tutarlılığını teyit etmiştir. Ek olarak yine ProSA tarafından aminoasit başına doğru katlanma incelemesi n+40 ve n+10 grafikleri özellikle UBA bölgesinde negatif değerlerde kalarak ilgili bölgenin doğruluğunu onaylar.

Protein veri bankası PDB üzerinden elde edilen, modellerimizde şablon olarak kullanılmış, 2HAK ve 6C9D MARK1 kristal yapıları Discovery Studio görselleştirme programında incelenerek UBA ile N-kinaz domeynleri arasındaki etkileşimler listelenmiş ve bu etkileşimlerin SIK2 homoloji modellerinde varlığı incelenmiştir. Buna göre iki domeyn arasında yer alan görece kuvvetli kimyasal etkileşimler mutasyon ve ligand kenetlenme çalışmaları kırılması hedeflenmiştir. İn vitro laboratuvar çalışmalarında da sıklıkla yer bulmuş alanin aminoasidiyle yer değiştirilmesi sonucu geliştirilmiş mutant modeller, görselleştirme programları PyMol programları kullanılarak incelenmiş, UBA ile kinaz domeynleri arasındaki kritik H bağları yok edilerek muhtemel LKB1 kaynaklı SIK2 aktivasyonunun engellenmesi amaçlanmıştır. tripeptit şeklinde tasarladığımız ara yüzü bozmaya yönelik yapılarla eldeettiğimiz düşük afinite ve yükse IC50 değerlerine sahip inhibitörler yerine iki domeyn arasındaki boşluğa daha rahat giriş sağlayabilecek düzlemsel inorganik inhibitörler ZINC15 kimyasal bileşik veri bankasından sağlanarak SIK2 ligand adayları AutoDock Vina programı ile domeynler arası etkileşimi zayıflatması amacıyla modellerimize kenetlenmiştir.

Homoloji modelleme ile geliştirdiğimiz yabanıl modellerimize ek olarak mutant ve ligand kenetli olmak üzere üç farklı modelde protein yapılarını daha detaylı incelemek için MD simülasyon uygulanmıştır. Model I 600 ns ve Model II 20 ns boyunca OPLS-AA/L kuvvet alanında 310° K ve 1 bar basınç altında simüle edilmiştir. Simülasyon sonucu model I RMSD incelemesinde modelin yabanıl, mutant ve ligand kenetli versiyonlarında ortak şekilde yüksek oranda sapma ve hareket görülmektedir. Yine model I RMSF grafiğinde model her üç versiyonu için bu hareketliliğin hedeflenen UBA ve kinaz domeyn alanları dışında kalan uç ve ara bölgelerden kaynaklığı görülmektedir. Model I versiyonları birbirleriyle karşılaştırıldığında mutant versiyonda yabanıl yapıya göre UBA – kinaz etkileşimi zayıflamış ve bu durum domeynler arası mesafeyi artırmıştır. Tripeptiten oluşan ligandın, kenetli SIK2 model I yabanıl yapılı versiyon ile mukayese edildiğinde kenetlenmenin zayıf kaldığı, domeynler arası etkileşimi zayıflatamadığı görülmüştür.

Model II için geliştirdiğimiz mutant ve ligand kenetli versiyonlar model I ile aynı şartlar altında MD simülasyon uygulanmıştır. Yine model I 'e benzer şekilde mutant oluşturulmuş yapı yabanıl versiyona göre zayıf ve esnetilmiş bir domeynler arası etkileşime sahipken ligand kenetli versiyon görece daha başarısız kalmış, UBA – kinaz domeyn ilişkisini kıramamıştır. Bu veriler ışığında SIK2 modellerinin UBA bölgesinde oluşturulmuş mutasyonun daha önceki deneysel çalışmalarla uyumlu şekilde domeyn etkileşimlerini zayıflattığı gösterilmiştir. Tripeptid yapılı ligand kenetli verisyonların ise bu bağlamda daha zayıf kaldığı, ligand yapısının geliştirilmesiyle daha olumlu sonuçların alınabileceği görülmüştür.

Ligand yapısının geliştirilmesi için hedef alan olan domeynler arası bölgenin sterik etkisine ve lipofilisitesine uyumlu aday bileşiklerin bulunması amacıyla kimyasal bileşik kütüphanesi ZINC15 veri tabanında arama yapılmış, bulunan iki yüzün üzerinde aday bileşik arasından doksaniki tanesi yine AutoDock Vina programı ile kenetlenme çalışması yapılarak bağlanma eğilimi incelenmiştir. Yüksek bağlanma affinitesi gösteren aday moleküllerin kimyasal özellikleri incelendiğinden logP değeri yükselmesiyle eş zamanlı olarak kenetlenme başarısını arttığı gösterilmiştir. Adaylar arasında daha başarılı bağlanma sergileyen bu yapılar temel iskelet/öncül molekül olarak ele alınabilir, sergilenen korelasyon veri doğrultusunda farklı sübstitüentlerle türevlendirilebilir ve yeni tasarımlar için çıkış noktası olabilirler.

Tüm sonuçlar ele alındığında SIK2 çalışmalarına alternatif sağlamak amacıyla homoloji modelleme ile modeller geliştirilmiş, domeynler arası etkileşimi hedefleyerek mevcut ATP bağlanmasını hedefleyen konvansiyonel kompetitif inhibitörlere alternatif daha özgün bir yaklaşım denenmiştir. Çalışmamız, UBA domeyninin SIK2'nin katalitik aktivasyonunda görev aldığı fikriyle örtüşür bir şekilde sıkı domeynler arası kimyasal etkileşimleri göstermiş ve bu etkileşimlerin kırılmasının en azından SIK2 nin LKB1 aracılı inhibisyonu için kullanılabileceğini öngörmektedir. Peptid yapılı ligand modeller için yeterli bağlanma ve baskılama sağlamamasına karşın veri tabanlarından sağlanan aday bileşikler gelecek çalışmalar için çıkış noktası olabilir. Çalışma kapsamında seçtiğimiz tripeptit yapıdaki inhibitör öncü moleküllerinin etkileşim ara yüzündeki H bağları donör ve akseptörlerini kullanarak bunları hedeflemeyi amaçlamasına rağmen proteinin üç boyutlu tersiyer yapısındaki bu dizilerin ardışık olmadığı dolayısı ile tripetid formları ile karşılaştırıldığında rijitilerinin daha az olduğu dikkate alınarak daha uzun pepetid

ligandların vasıtası ile hareketliliğin artırılması ve daha uygun kenetlenme yapılabileceği önerilmektedir. Son olarak SIK2'nin LKB bağımlı aktivasyonunu önlemeye yönelik allosterik bir inhibitör geliştirme çabamız dolaylı olarak SIK2'nin LKB1 ile aktivasyonunun hastalık patojenitesi ile daha ilişkili olduğu farklı kanser türlerinde denenmesinin öncelikli hedefler arasına koymaktadır.

KAYNAKLAR

Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E., (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX, 1, 19-25.

Altarejos J. Y., Montminy M., (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. Nature reviews Molecular cell biology, 12(3), 141-151.

Braun A. P., Schulman H., (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. Annual review of physiology, 57(1), 417-445.

Berdeaux R., Goebel N., Banaszynski L., Takemori H., Wandless T., Shelton G. D., Montminy M., (2007). SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. Nature medicine, 13(5), 597-603.

Berggreen C., Henriksson E., Jones H. A., Morrice N., Göransson O., (2012). cAMP-elevation mediated by β-adrenergic stimulation inhibits salt-inducible kinase (SIK) 3 activity in adipocytes. Cellular signalling, 24(9), 1863-1871.

Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland, G., Bhat T. N., Weissig H., ... Bourne P. E., (2000). The protein data bank. Nucleic acids research, 28(1), 235-242.

Bekker H., Berendsen H. J. C., Dijkstra E. J., Achterop S., Vondrumen R., VANDERSPOEL D., Renardus M. K. R., (1993). Gromacs-a parallel computer for molecular-dynamics simulations. In 4th International Conference on Computational Physics (PC 92) (pp. 252-256). World Scientific Publishing.

Burley S. K., Berman H. M., (2021). Open-access data: A cornerstone for artificial intelligence approaches to protein structure prediction. Structure.

Clark K., MacKenzie K. F., Petkevicius K., Kristariyanto Y., Zhang J., Choi H. G., Cohen P., (2012). Phosphorylation of CRTC3 by the salt-inducible kinases controls the interconversion of classically activated and regulatory macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences, *109*(42), 16986-16991.

Chan, J. K., Sun, L., Yang, X. J., Zhu, G., Wu, Z., (2003). Functional characterization of an amino-terminal region of HDAC4 that possesses MEF2 binding and transcriptional repressive activity. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(26), 23515-23521.

Chen F., Chen L., Qin Q., Sun X., (2019). Salt-inducible kinase 2: an oncogenic signal transmitter and potential target for cancer therapy. Frontiers in oncology, 9, 18.

Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Ferguson D. M., Kollman P. A., (1995). A second generation force field for the simulation of proteins,

nucleic acids, and organic molecules. Journal of the American Chemical Society, 117(19), 5179-5197.

Darling N. J., Arthur J. S. C., Cohen P., (2021). Salt-inducible kinases are required for the IL-33–dependent secretion of cytokines and chemokines in mast cells. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100428.

Darling N. J., Cohen, P., (2021). Nuts and bolts of the salt-inducible kinases (SIKs). Biochemical Journal, 478(7), 1377-1397.

Dentin R., Liu Y., Koo S. H., Hedrick S., Vargas T., Heredia J., Montminy M., (2007). Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. Nature, 449(7160), 366-369.

Drewes G., Trinczek B., Illenberger S., Biernat J., Schmitt-Ulms G., Meyer H. E Mandelkow E., (1995). MAP/microtubule affinity regulating kinase (p110/mark): a novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site Serine 262. J. Biol. Chem, 270, 7679-7688.

Eastman P., Swails J., Chodera J. D., McGibbon R. T., Zhao Y., Beauchamp K. A., Pande V. S., (2017). OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. PLoS computational biology, 13(7), e1005659.

Emptage R. P., Lemmon M. A., Ferguson K. M., Marmorstein R., (2018). Structural basis for MARK1 kinase autoinhibition by its KA1 domain. Structure, 26(8), 1137-1143.

Emptage R. P., Schoenberger M. J., Ferguson K. M., Marmorstein R., (2017). Intramolecular autoinhibition of checkpoint kinase 1 is mediated by conserved basic motifs of the C-terminal kinase–associated 1 domain. Journal of Biological Chemistry, 292(46), 19024-19033.

Erdoğan N. S., (2020), “Identification of Distrinct Communication Networks In Human β2 Adrenergic Receptor Via Molecular Dynamics Simulation”, Doktora Tezi, Kadir Has Üniversitesi.

Etienne-Manneville S., (2010). From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. Current opinion in cell biology, 22(1), 104-111.

Finsterwald C., Carrard A., Martin J. L., (2013). Role of salt-inducible kinase 1 in the activation of MEF2-dependent transcription by BDNF. PloS one, *8*(1), e54545.

Fogarty S., Hawley S. A., Green K. A., Saner N., Mustard K. J., Hardie D. G., (2010). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-β activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca2+ and AMP. Biochemical Journal, 426(1), 109-118.

Gao T., Zhang X., Zhao J., Zhou F., Wang Y., Zhao Z., Liu S., (2020). SIK2 promotes reprogramming of glucose metabolism through PI3K/AKT/HIF-1α

pathway and Drp1-mediated mitochondrial fission in ovarian cancer. Cancer letters, 469, 89-101.

Gumbiner B. M., Kim N. G., (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. Journal of cell science, 127(4), 709-717.

Haeusler R. A., Kaestner K. H., Accili D., (2010). FoxOs function synergistically to promote glucose production. Journal of Biological Chemistry, 285(46), 35245-35248.

Hashimoto Y. K., Satoh T., Okamoto M., Takemori H., (2008). Importance of autophosphorylation at Ser186 in the A-loop of salt inducible kinase 1 for its sustained kinase activity. Journal of cellular biochemistry, *104*(5), 1724-1739.

Haupt L. J., Kazmi F., Ogilvie B. W., Buckley D. B., Smith B. D., Leatherman S Parkinson A., (2015). The reliability of estimating Ki values for direct, reversible inhibition of cytochrome P450 enzymes from corresponding IC50 values: a retrospective analysis of 343 experiments. Drug Metabolism and Disposition, 43(11), 1744-1750.

Henriksson E., Säll J., Gormand A., Wasserstrom S., Morrice N. A., Fritzen A. M., Göransson, O., (2015). SIK2 regulates CRTCs, HDAC4 and glucose uptake in adipocytes. Journal of cell science, 128(3), 472-486.

Horike N., Kumagai A., Shimono Y., Onishi T., Itoh Y., Sasaki T., Takemori H. ,(2010). Downregulation of SIK2 expression promotes the melanogenic program in mice. Pigment cell & melanoma research, 23(6), 809-819.

Humphrey W., Dalke A., Schulten K., (1996). VMD: visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics, 14(1), 33-38.

Jaleel M., Villa F., Deak M., Toth R., Prescott A. R., Van Aalten D. M., Alessi D. R., (2006). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochemical Journal*, *394*(3), 545-555.

Jiang B., Wang H., Wang J. L., Wang Y. J., Zhu Q., Wang C. N., Li J. X., (2019). Hippocampal Salt-Inducible Kinase 2 Plays a Role in Depression via the CREB-Regulated Transcription Coactivator 1–cAMP Response Element Binding–Brain-Derived Neurotrophic Factor Pathway. Biological psychiatry, 85(8), 650-666.

Jorgensen W. L., Maxwell D. S., Tirado-Rives J., (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. Journal of the American Chemical Society, 118(45), 11225-11236.

Lanjuin A., Sengupta P., (2002). Regulation of chemosensory receptor expression and sensory signaling by the KIN-29 Ser/Thr kinase. Neuron, *33*(3), 369-381.

Liu Y., Tang W., Ji C., Gu J., Chen Y., Huang J., Jiang B., (2020). The selective SIK2 inhibitor ARN-3236 produces strong antidepressant-like efficacy in mice via the hippocampal CRTC1-CREB-BDNF pathway. Frontiers in pharmacology, 11.

Lizcano J. M., Göransson O., Toth R., Deak M., Morrice N. A., Boudeau J., Alessi D. R., (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. The EMBO journal, *23*(4), 833-843.

Luan B., Goodarzi M. O., Phillips N. G., Guo X., Chen Y. D. I., Yao J., Montminy M., (2014). Leptin-mediated increases in catecholamine signaling reduce adipose tissue inflammation via activation of macrophage HDAC4. Cell metabolism, 19(6), 1058-1065.

Luo Q., Viste K., Urday-Zaa J. C., Kumar G. S., Tsai W. W., Talai A., Radhakrishnan I., (2012). Mechanism of CREB recognition and coactivation by the CREB-regulated transcriptional coactivator CRTC2. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(51), 20865-20870.

McCammon J. A., Gelin B. R., Karplus M., (1977). Dynamics of folded proteins. Nature, 267(5612), 585-590.

MacKenzie K. F., Clark K., Naqvi S., McGuire V. A., Nöehren G., Kristariyanto Y., Arthur J. S. C., (2013). PGE2 induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A–SIK–CRTC3 pathway. The Journal of Immunology, 190(2), 565-577.

Mackerell Jr A. D., Feig M., Brooks III C. L. (2004). Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. Journal of computational chemistry, 25(11), 1400-1415.

MacKerell Jr A. D., Bashford D., Bellott M. L. D. R., Dunbrack Jr R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Karplus M., (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. The journal of physical chemistry B, 102(18), 3586-3616.

Marx A., Nugoor C., Müller J., Panneerselvam S., Timm T., Bilang M., Mandelkow E., (2006). Structural variations in the catalytic and ubiquitin-associated domains of microtubule-associated protein/microtubule affinity regulating kinase (MARK) 1 and MARK2. Journal of Biological Chemistry, 281(37), 27586-27599.

Marx, A., Nugoor C., Panneerselvam S., Mandelkow E., (2010). Structure and function of polarity-inducing kinase family MARK/Par-1 within the branch of AMPK/Snf1-related kinases. The FASEB journal, 24(6), 1637-1648.

Matsuuchi L., Naus C. C., (2013). Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1828(1), 94-108.

Miranda F., Mannion D., Liu S., Zheng Y., Mangala L. S., Redondo C., Ahmed A. A., (2016). Salt-inducible kinase 2 couples ovarian cancer cell metabolism with survival at the adipocyte-rich metastatic niche. Cancer cell, 30(2), 273-289.

Moravcevic K., Mendrola J. M., Schmitz K. R., Wang Y. H., Slochower D., Janmey P. A., Lemmon M. A., (2010). Kinase associated-1 domains drive MARK/PAR1 kinases to membrane targets by binding acidic phospholipids. Cell, 143(6), 966-977.

Okamoto M., Takemori H., Katoh Y., (2004). Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis. Trends in Endocrinology & Metabolism, *15*(1), 21-26.

Oostenbrink C., Villa A., Mark A. E., Van Gunsteren W. F., (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. Journal of computational chemistry, 25(13), 1656-1676.

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.

Sabe V. T., Ntombela T., Jhamba L. A., Maguire G. E., Govender T., Naicker T., Kruger H. G., (2021). Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. European Journal of Medicinal Chemistry, 224, 113705.

Sakamoto K., Bultot L., Göransson O., (2018). The salt-inducible kinases: emerging metabolic regulators. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *29*(12), 827-840.

Sippl M. J., (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 17(4), 355-362.

Sonntag T., Moresco J. J., Vaughan J. M., Matsumura S., Yates III, J. R., Montminy, M., (2017). Analysis of a cAMP regulated coactivator family reveals an alternative phosphorylation motif for AMPK family members. PloS one, 12(2), e0173013.

Sonntag, T., Vaughan, J. M., Montminy, M., (2018). 14-3-3 proteins mediate inhibitory effects of cAMP on salt-inducible kinases (SIK s). *The FEBS journal*, *285*(3), 467-480.

Sterling T., Irwin J. J., (2015). ZINC 15–ligand discovery for everyone. Journal of chemical information and modeling, 55(11), 2324-2337.

Studer G., Tauriello G., Bienert S., Biasini, M., Johner N., Schwede T., (2021). ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. PLoS computational biology, 17(1), e1008667.

Su X., Ohi R., Pellman D., (2012). Move in for the kill: motile microtubule regulators. Trends in cell biology, 22(11), 567-575.

Tang E. I., Mruk D. D., Cheng C. Y., (2013). MAP/microtubule affinity-regulating kinases, microtubule dynamics, and spermatogenesis. Journal of Endocrinology, 217(2), R13-R23.

Timm T., Matenia D., Li X. Y., Griesshaber B., Mandelkow E. M., (2006). Signaling from MARK to tau: regulation, cytoskeletal crosstalk, and pathological phosphorylation. Neurodegenerative Diseases, 3(4-5), 207-217.

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), 455-461.

Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., Berendsen H. J., (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. Journal of computational chemistry, 26(16), 1701-1718.

Verlet L., (1967). Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. Physical review, 159(1), 98.

Wang Z. N., Takemori H., Halder S. K., Nonaka Y., Okamoto M., (1999). Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. FEBS letters, *453*(1-2), 135-139.

Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Schwede T., (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic acids research, 46(W1), W296-W303.

Web 1, (2021), https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H0K1 , (Erişim Tarihi 8/11/21).

Web 2, (2021), https://zinc15.docking.org/ , (Erişim Tarihi 10/11/2021).

Web 3, (2021), https://zinc15.docking.org/activities/?gene.name=SIK2 , (Erişim Tarihi 10/11/2021).

Web 4, (2021), https://www.uniprot.org/uniprot/Q9P0L2 , (Erişim Tarihi 8/11/21).

Web 5, (2021), https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast, (Erişim Tarihi: 16/11/2021).

Web 6, (2021) https://swissmodel.expasy.org/docs/help (Erişim Tarihi 16/11/2021).

Web 7, (2021), https://prosa.services.came.sbg.ac.at/ (Erişim Tarihi 22/11/2021).

Web 8, (2021), http://www.rcsb.org/pdb/ (Erişim Tarihi 23/11/2021).

Web 9, (2021), https://manual.gromacs.org/current/user-guide/force-fields.html , (Erişim Tarihi 22/11/21).

Web 10, (2021), https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download (Erişim Tarihi: 18/11/2021).

Web 11, (2021), https://pymol.org/2/#download (Erişim Tarihi 10/11/2021).

Web 12, (2021), https://zinc15.docking.org/substances/subsets/ , (Erişim Tarihi 05/12/2021).

Web 13, (2022), http://www.swissadme.ch/index.php (Erişim 05/01/2022).

Wehr M. C., Holder M. V., Gailite I., Saunders R. E., Maile T. M., Ciirdaeva E., N., (2013). Salt-inducible kinases regulate growth through the Hippo signalling pathway in Drosophila. Nature cell biology, 15(1), 61-71.

Wein M. N., Liang Y., Goransson O., Sundberg, T. B., Wang J., Williams E. A., Kronenberg H. M., (2016). SIKs control osteocyte responses to parathyroid hormone. Nature communications, 7(1), 1-19.

Wiederstein M., Sippl M. J., (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic acids research, 35(suppl_2), W407-W410.

Zeng Q., Hong W., (2008). The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. Cancer cell, 13(3), 188-192.

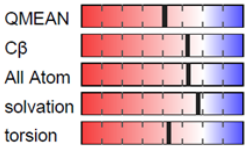
Zohrap N., Saatci Ö., Ozes B., Coban I., Atay H. M., Battaloglu E., Bugra K., (2018). SIK2 attenuates proliferation and survival of breast cancer cells with simultaneous perturbation of MAPK and PI3K/Akt pathways. Oncotarget, 9(31), 21876.

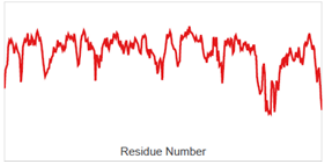
ÖZGEÇMİŞ

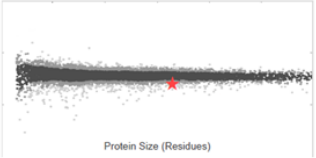
Korkut Furkan Şahin, lise eğitimini Haydarpaşa Bülent Akarcalı Sağlık Meslek Lisesi Radyoloji bölümünden tamamladı. Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'nda Tıbbi Görüntüleme Teknikleri programında eğitime başladı ve 2015 yılında mezun oldu. Lisans eğitimini Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde 2019 yılında tamamladı. Yüksek lisans eğitimini Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik anabilim dalında 2022 yılında tamamladı.

EKLER

Model #01	File	Built with	Oligo-State	Ligands	GMQE	QMEAN
	PDB	ProMod3 3.1.1	monomer	None	0.16	-1.89



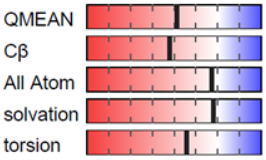


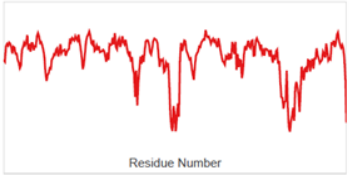


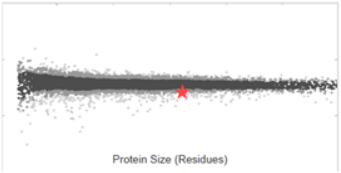
Template	Seq Identity	Oligo-state	QSQE	Found by	Method	Resolution	Seq Similarity	Range	Coverage	Description
6c9d.1.A	51.85	monomer	0.00	HHblits	X-ray	2.50Å	0.45	13 - 341	0.35	Serine/threonine-protein kinase MARK1,Serine/threonine-protein kinase MARK1

Şekil B1.1: Model I'e ait homoloji modelleme detayları.

Model #01	File	Built with	Oligo-State	Ligands	GMQE	QMEAN
	PDB	ProMod3 3.1.1	monomer	None	0.15	-1.87

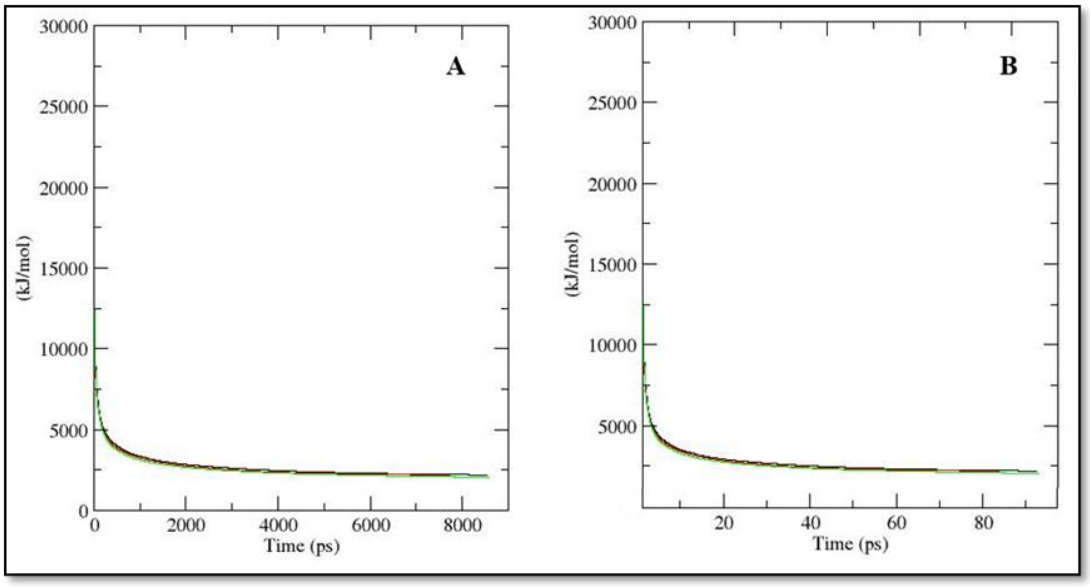




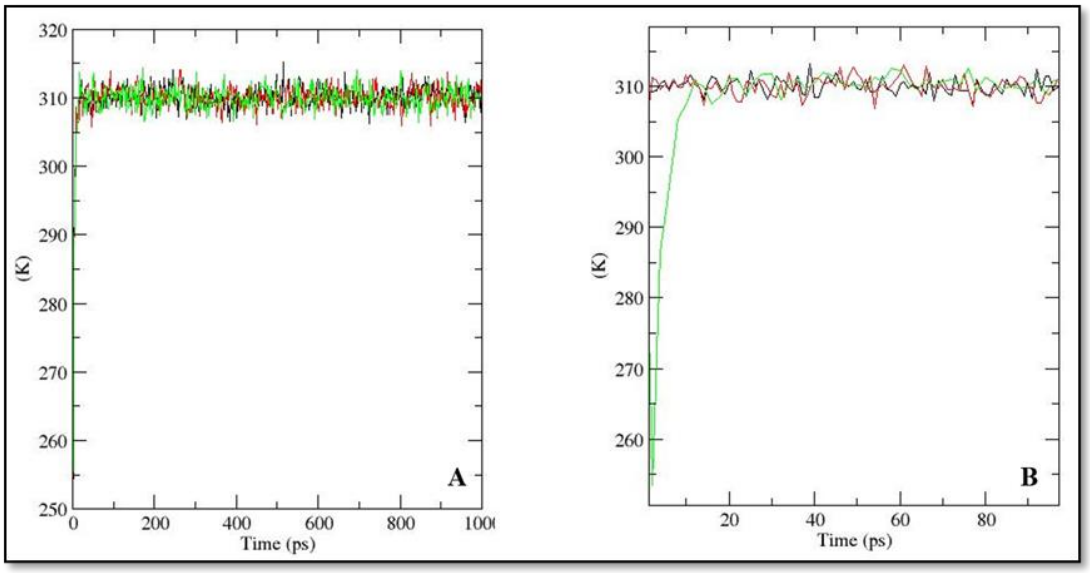


Template	Seq Identity	Oligo-state	QSQE	Found by	Method	Resolution	Seq Similarity	Range	Coverage	Description
2hak.3.A	53.31	monomer	0.00	HHblits	X-ray	2.60Å	0.46	15 - 336	0.34	Serine/threonine-protein kinase MARK1

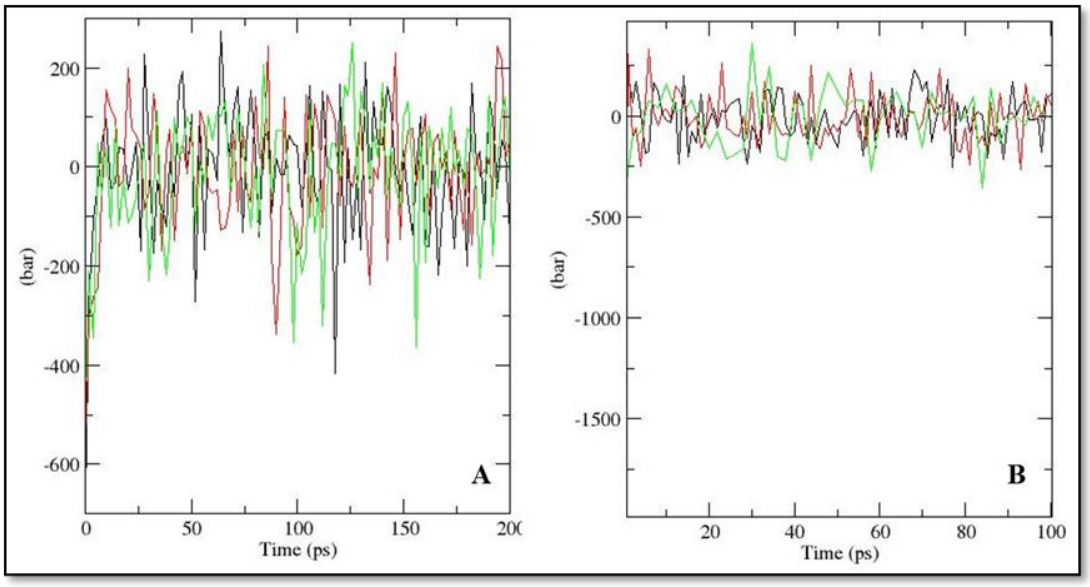
Şekil B1.2: Model II'ye ait homoloji modelleme detayları.



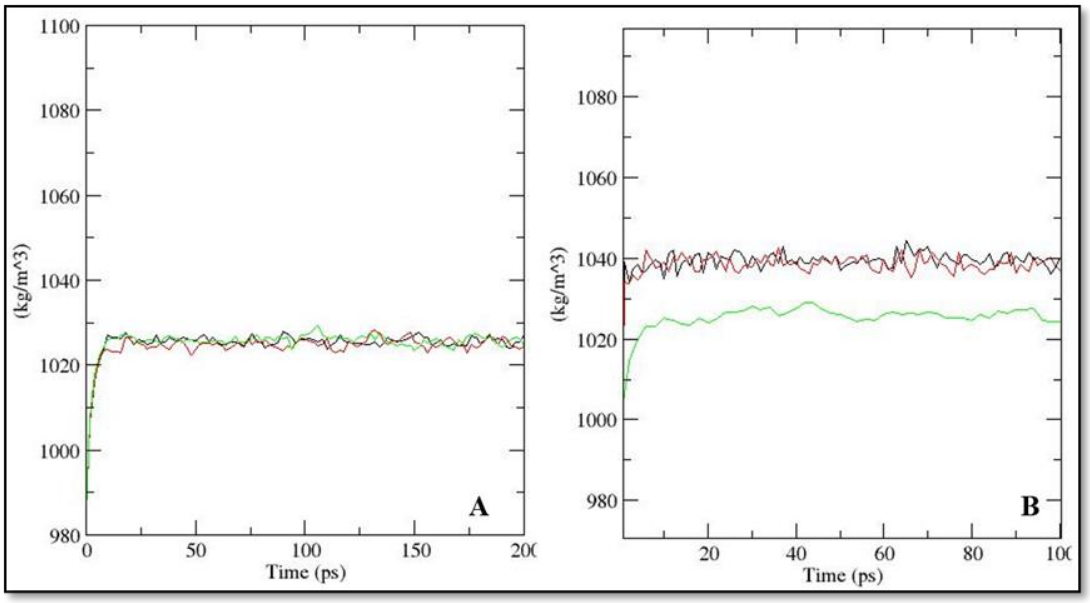
Şekil B1.3: MD Simülasyonlar ait enerji-zaman grafikleri. Model I sol panel (A), Model II sağ panel (B). Yabanıl model siyah, mutant model yeşil ve ligand kenetli model kırmızı renk ile işaretlenmiştir.



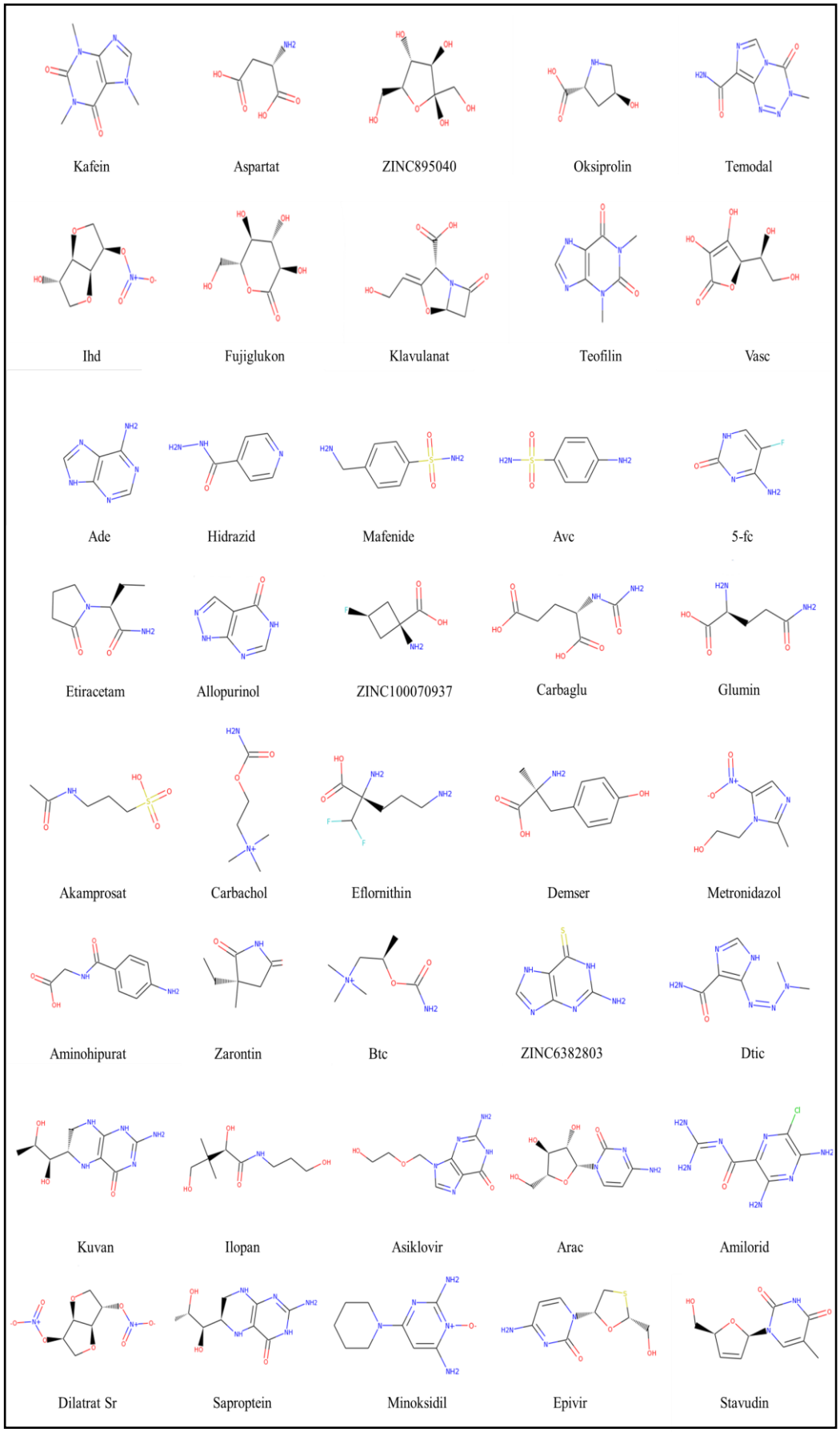
Şekil B1.4: MD Simülasyonlar ait sıcaklık-zaman grafikleri. Model I sol panel (A), Model II sağ panel (B). Yabanıl model siyah, mutant model yeşil ve ligand kenetli model kırmızı renk ile işaretlenmiştir.



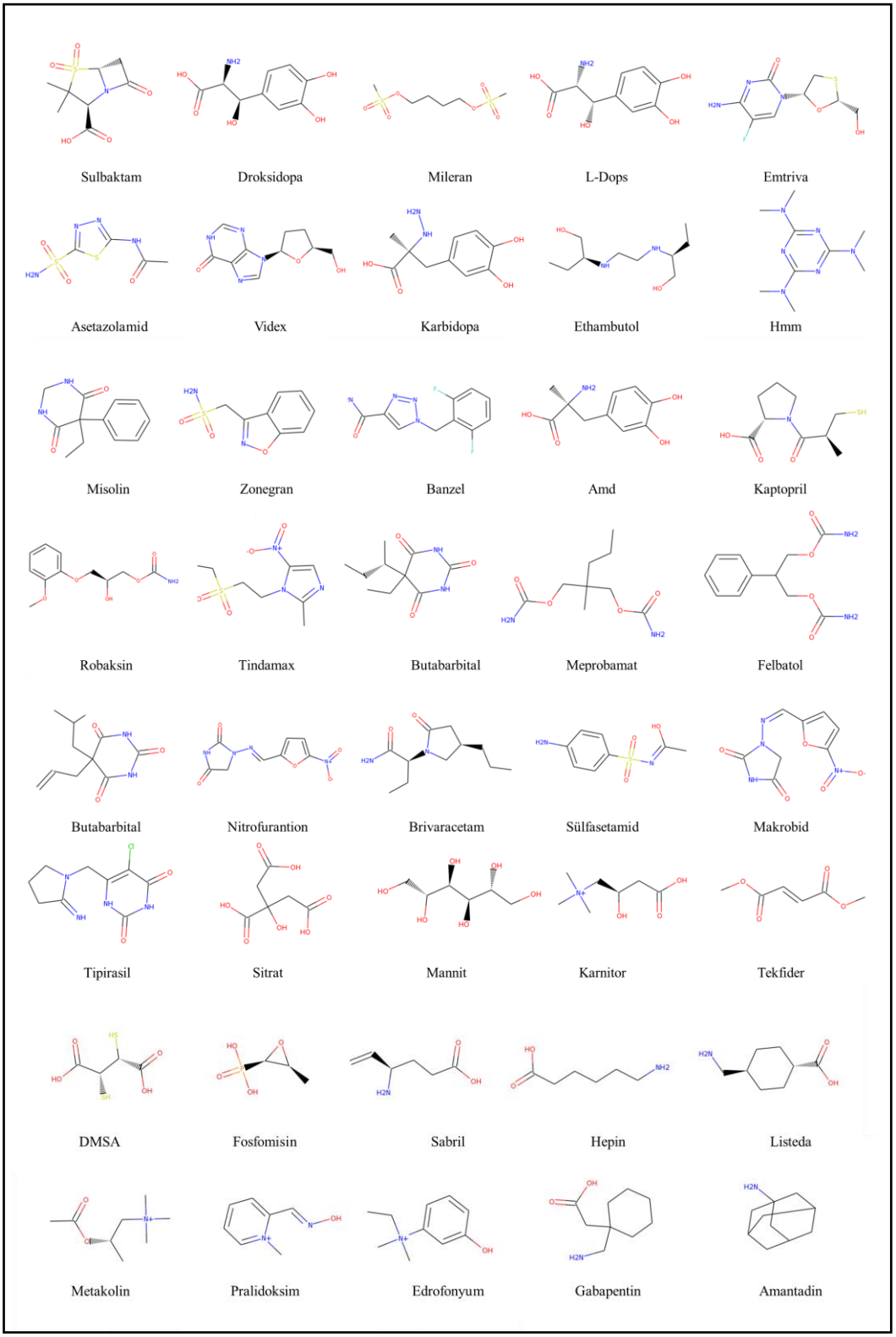
Şekil B1.5: MD Simülasyonlar ait basınç-zaman grafikleri. Model I sol panel (A), Model II sağ panel (B). Yabanıl model siyah, mutant model yeşil ve ligand kenetli model kırmızı renk ile işaretlenmiştir.



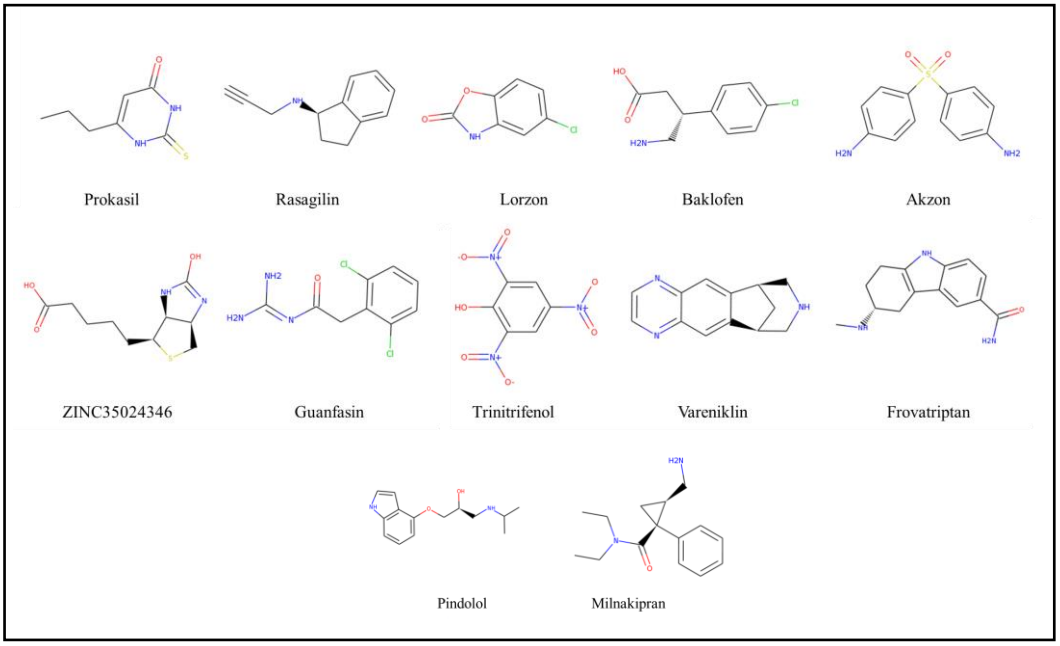
Şekil B1.6: MD Simülasyonlar ait yoğunluk-zaman grafikleri. Model I sol panel (A), Model II sağ panel (B). Yabanıl model siyah, mutant model yeşil ve ligand kenetli model kırmızı renk ile işaretlenmiştir.



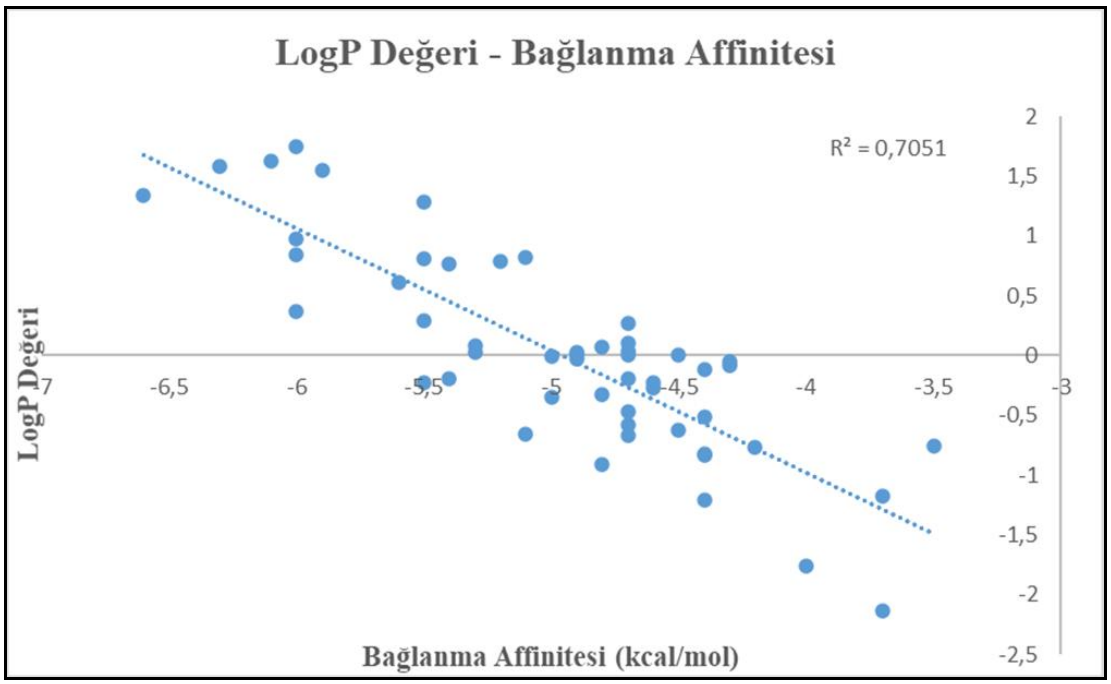
Şekil B1.7: ZINC15 veri tabanından sağlanan ligand adayları.



Şekil B1.7: Devam.



Şekil B1.7: Devam.



Şekil B1.8: Ligand adaylarının LogP değeri-Bağlanma Affinitesi grafiği.