

**Nörodejeneratif Hastalıkların Önlenmesine Yönelik *In Silico* Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS) Seçimli İnhibitör Tasarımı**

**Proje No: 211T100**

**Prof.Dr. Kemal YELEKÇİ**

**Nurdan KAYRAK**

OCAK 2013  
İSTANBUL  
ÖNSÖZ

211T100 nolu “Nörodejeneratif Hastalıkların Önlenmesine Yönelik *In Silico* Nöronal Nitrik Oksit Sentaz nNOS Seçimli İnhibitör Tasarımı” isimli projemizin **19.035,00** TL bütçesinin tamamı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından karşılanmıştır. Projemiz 01/02/2012 ile 01/02/2013 tarihleri arasında bir yıl sürede bitirilmiştir.

Bu vesile ile projemizi yürütölmeye uygun bulan TÜBİTAK’a, izleyen ve değeriendiren değeri bilim insanlarına ve bizlerden bir yıl süre ile desteklerini esirgemeyen kurum görevlilerine en içten duygularımızla teşekkür ederiz.

# İçindekiler

<b>Şekiller.....</b>	<b>4</b>
<b>Tablolar.....</b>	<b>5</b>
<b>Özet .....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Giriş</b>	
<b>1.1 NOS (nitrik oksit senteaz) enzimlerinin hazırlanması.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Doklama .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Enzimlerin Seçimi</b>	
<b>2.1 nNOS enzim seçimi: .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 eNOS ve iNOS enzimlerinin seçimi .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Deneysel ve hesapsal verilerin karşılaştırılması .....</b>	<b>21</b>
<b>4. nNOS seçimli inhibitörlerin tasarımı .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 ZINC kütüphanesi kullanılarak gerçekleştirilen inhibitör tarama işlemi.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Seçilmiş inhibitör adaylarının nNOS, eNOS ve iNOS enzimleri için yapılan doklama çalışmaları .....</b>	<b>25</b>
<b>5. ADMET .....</b>	<b>33</b>
<b>6. GOLD Doklaması .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Sonuç ve tartışma .....</b>	<b>35</b>
<b>8. Referanslar.....</b>	<b>38</b>
<b>Proje Özet Bilgi Formu .....</b>	<b>40</b>

## Şekiller

<b>Şekil 1</b> nNOS enziminin orijinal üç boyutlu minimize edilmiş (tek domain) görünümü.....	11
<b>Şekil 2</b> eNOS enziminin orijinal üç boyutlu minimize edilmiş (tek domain) görünümü.....	11
<b>Şekil 3</b> iNOS enziminin orijinal üç boyutlu minimize edilmiş (tek domain) görünümü.....	12
<b>Şekil 4</b> 20 bileşiğin logaritmik inhibisyon katsayılarının nNOS enzimlerine karşı inhibisyon davranışları.....	17
<b>Şekil 5</b> 17 bileşiğin logaritmik inhibisyon katsayılarının nNOS enzimlerine karşı inhibisyon davranışları. (10, 12, 13 Nolu “outlier” bileşikler çıkartılmış).....	17
<b>Şekil 6</b> 17 bileşiğin logaritmik inhibisyon katsayılarının eNOS enzimlerine karşı inhibisyon davranışları.....	19
<b>Şekil 7</b> 17 bileşiğin logaritmik inhibisyon katsayılarının iNOS enzimine karşı inhibisyon davranışları.....	21
<b>Şekil 8</b> Tablo 12 deki logaritmik değerlerin grafiksel gösterimi .....	27
<b>Şekil 9</b> KN5 İnhibitörünün eNOS enzimi içinde 2D ve 3D görünümleri.....	28
<b>Şekil 10</b> KN5 İnhibitörünün iNOS enzimi içinde 2D ve 3D görünümleri.....	29
<b>Şekil 11</b> KN5 İnhibitörünün nNOS enzimi içinde 2D ve 3D görünümleri.....	30
<b>Şekil 12</b> Modelleme sonucu elde edilen 19 inhibitörün ADMET değerleri.....	31

## Tablolar

<b>Tablo 1</b> Deneysel inhibisyon katsayıları hesapsal değerlerle karşılaştırılan 20 bileşik ve bileşiklerin alındığı referanslar.....	13
<b>Tablo 2</b> Referanslardan seçilen 10 adet nNOS enzimi ve bu enzimlere dock edilen 20 adet bileşiğin hesapsal ve deneysel (son kolon) inhibisyon katsayıları (bütün değerler nano moldur).....	15
<b>Tablo 3</b> Referanslardan seçilen 10 adet nNOS enzimi ve bu enzimlere dock edilen 20 adet bileşiğin hesapsal ve deneysel (son kolon) inhibisyon katsayılarının logaritmik değerleri (bütün değerler nano moldur).....	16
<b>Tablo 4</b> Referanslardan seçilen 3 adet eNOS enzimi ve bu enzimlere dock edilen 17 adet bileşiğin hesapsal ve deneysel (ilk kolon) inhibisyon katsayıları (bütün değerler nano moldur).....	18
<b>Tablo 5</b> Referanslardan seçilen 3 adet eNOS enzimi ve bu enzimlere dock edilen 17 adet bileşiğin hesapsal ve deneysel (ilk kolon) inhibisyon katsayılarının logaritmik değerleri (bütün değerler nano moldur).....	19
<b>Tablo 6</b> Referanslardan seçilen iNOS enzimi ve bu enzime dock edilen 17 adet bileşiğin hesapsal ve deneysel (ilk kolon) inhibisyon katsayıları (bütün değerler nano moldur).....	20
<b>Tablo 7</b> Referanslardan seçilen iNOS enzimi ve bu enzime dock edilen 17 adet bileşiğin hesapsal ve deneysel (ilk kolon) inhibisyon katsayılarının logaritmik değerleri (bütün değerler nano moldur).....	20
<b>Tablo 8</b> Bu çalışmada kullanılan ana iskeletler (leads).....	22
<b>Tablo 9</b> Seçilmiş nNOS inhibitör adayları.....	23
<b>Tablo 10</b> Elde edilen 19 inhibitörün nNOS, eNOS ve iNOS enzimleri için yapılan doklama sonuçlarının logaritmik değerleri. (Değerler nanoMolar (nM) cinsinden $K_i$ , bağlanma katsayılarıdır).....	25
<b>Tablo 11</b> Elde edilen 19 inhibitörün nNOS, eNOS ve iNOS enzimleri için yapılan doklama sonuçları (Değerler nanoMolar (nM) cinsinden $K_i$ , bağlanma katsayılarının logaritmik değerleridir).....	26
<b>Tablo 12</b> ADMET hesaplamaları için programda kullanılan parametre değerleri (ADMET Descriptors).....	32
<b>Tablo 13</b> 19 Potansiyel aday inhibitörlerin Gold doklama sonuçları.....	34

## Özet

Nitrik oksit sentazlar (NOS) L-Arginin aminoasidini L-sitrüline oksitleyerek Nitrik oksit molekülü üreten bir enzim ailesidir. Memelilerde NOS enziminin nöronal NOS (nNOS, beyinde ve omurilikte), indüklenebilir NOS (iNOS, makrofajlarda), endotelyal NOS (eNOS, kan damarlarımızın iç çeperlerinde) olmak üzere üç izoenzimi bulunur. Bu üç değişik izoenzimden üretilen nitrik oksit (NO) molekülü, bir dizi fizyolojik fonksiyonda görev alır: makrofajların mikroorganizmalarla mücadelesinde, endotelyal hücrelerde damarların esnekliğinin sağlanmasında ve beyin hücreleri arasında nörotransmitter olarak. NO normal şartlarda gaz halinde, radikal ve yüksek toksisiteli bir moleküldür. İnsan bünyemizde uygun zamanda uygun derişimde üretilir ve lokal olarak kullanılır. Beyinde nörotransmitter görevi üstlenen NO ileri yaşlarda kontrolsüz üretildiğinde doku hasarına ve oksidatif strese sebep olur. Bu durum da Alzheimer hastalığı, romatoid artrit ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna katkıda bulunur. Damar iç çeperlerinde endotelyal tabakada üretilen NO damara esneklik vererek kan basıncının düşmesine neden olur. Vücuda giren mikroplara karşı bizi koruyan makrofajlar da NO molekülünü silah olarak kullanır. Dolayısı ile sadece beyinde üretilen NO molekülünün azaltılması için nNOS enziminin seçimli olarak inhibe edilmesi çok önemlidir. Üç izoenzimin yapısı birbirlerine son derece benzemektedir. Bu benzerlik nNOS seçimli inhibitör tasarımını zorlaştırmaktadır. Birçok çalışma olmasına rağmen henüz bunu başaracak bir ilaç geliştirilememiştir. Nörodejeneratif hastalıklar, gelişmiş ülkelerde kalp damar hastalıkları ve kanserden sonraki en sık görülen ölüm nedenidir. Bu projede amacımıza uygun olarak nNOS'a seçimli bir dizi inhibitör tasarlanmıştır. Bunun için hedeflenen izoenzimlerin yapılarını temel alan bilgisayar destekli ilaç tasarımından yararlanılmıştır. İlk olarak bugüne kadar çalışılmış önemli NOS hedefli inhibitörler sistemimizde her 3 izoenzim için test edilip benzerlik ve farklılıklar bir model oluşturmak amacıyla incelenmiştir. Hesapsal sonuçları deneysel sonuçlarla en çok uyuşan 3 izoenzimin (nNOS, eNOS ve iNOS) kristal yapıları *in silico* tarama yapılmak için seçilmiştir. Seçilen bu enzimler için ZINC veri bankası taranarak uygun ana yapılar (leads) bulunmuş, daha sonra da *de novo* programı kullanılarak bu ana yapılar fragmentlar (ZINC ve

Accelrys fragmant kütüphanesinden) eklenerek nNOS seçimli olan inhibitörler belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda nNOS enziminin aktif bağlanma bölgesine seçimli olarak yüksek ilgiyle bağlanan inhibitörlerin yapıları, bağlanma enerjileri ve inhibisyon katsayıları elde edilmiştir. Sonuçlar rapor kapsamında şekil ve tablolarda verilmiştir

**Anahtar Kelimeler:** Nitrik Oksit sentaz, nNOS, eNOS, iNOS, doklama, skorlama, moleküler modelleme, *in silico* tarama.

**Project Title :***In Silico* Design of Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) Inhibitors in Order to Prevent Neurodegenerative Diseases

**Abstract**

Nitric Oxide synthases (NOS) are the family of enzymes which catalyzes the oxidation L-Arginine amino acid to nitric oxide molecule (NO) L-citrulline.

Mammals contain three different NOS isozymes: Neuronal NOS (nNOS, in the brain), inducible NOS (iNOS, in macrophage cells), endothelial NOS (eNOS, the inner walls of blood vessels). Nitric Oxide (NO) is an important messenger molecule, which regulates several physiological functions in cardiovascular system and neuronal cells in the brain.

Indeed, NO is a free radical gaseous molecule under normal conditions and highly toxic substance to our cells. In our body, it is produced locally at proper concentration at proper time. In endothelial cells, it relaxes smooth muscle causing to decrease blood pressure. Macrophage cells generate NO as an immune defense system to destroy microorganisms and pathogens.

In our brain under certain pathological conditions after a certain ages produced excessive NO, causes tissue damage and oxidative stress. This leads a variety of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis and Parkinson's diseases. For this reason, it is important to inhibit selectively neuronal isozyme of NOS, nNOS in the brain. Three isozymes show extraordinarily structure similarities hindering the selective inhibitor design. In the literature there are many outstanding studies, however there has not being developed any drug which accomplished the required affinity and selectivity. Neurodegenerative diseases were very common death cause after cardiovascular diseases and cancer in the developed countries. We plan to use computer modeling based on the known crystal structure of three NO isozymes. In this project computationally, we developed, highly selective nNOS inhibitors via *in silico* screening. The inhibitors whose experimental inhibition values reported up to now were tested within our prepared model NOS isozymes. The obtained computational binding constants were compared with literature experimental values. The enzymes whose experimental values agreed with computational values were chosen for



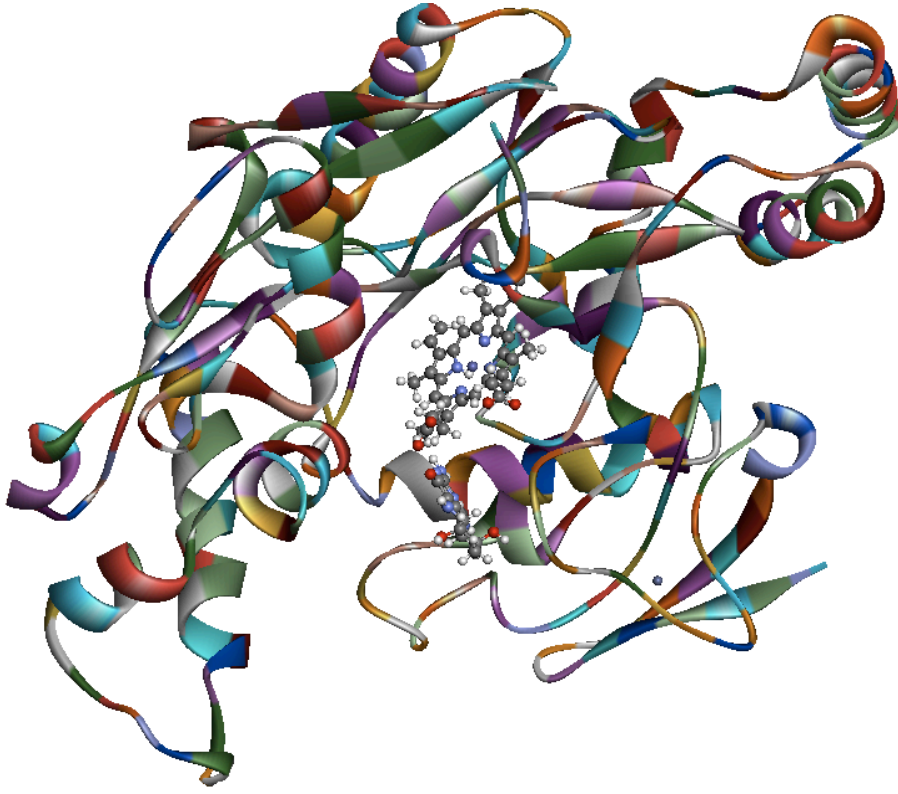
further studies. First, several suitable scaffolds (leads) were determined from lead library of ZINC database. These leads were optimized using fragment library of ZINC and Accelrys in the nNOS active site. The new selective and potent inhibitors were determined as a result of *in silico* screening. The inhibitors binding energy and inhibition constants toward nNOS, eNOS and iNOS enzymes are reported.

**Key words:** Nitric oxide synthase, nNOS, eNOS, iNOS, docking, scoring, molecular modeling, *in silico* screening.

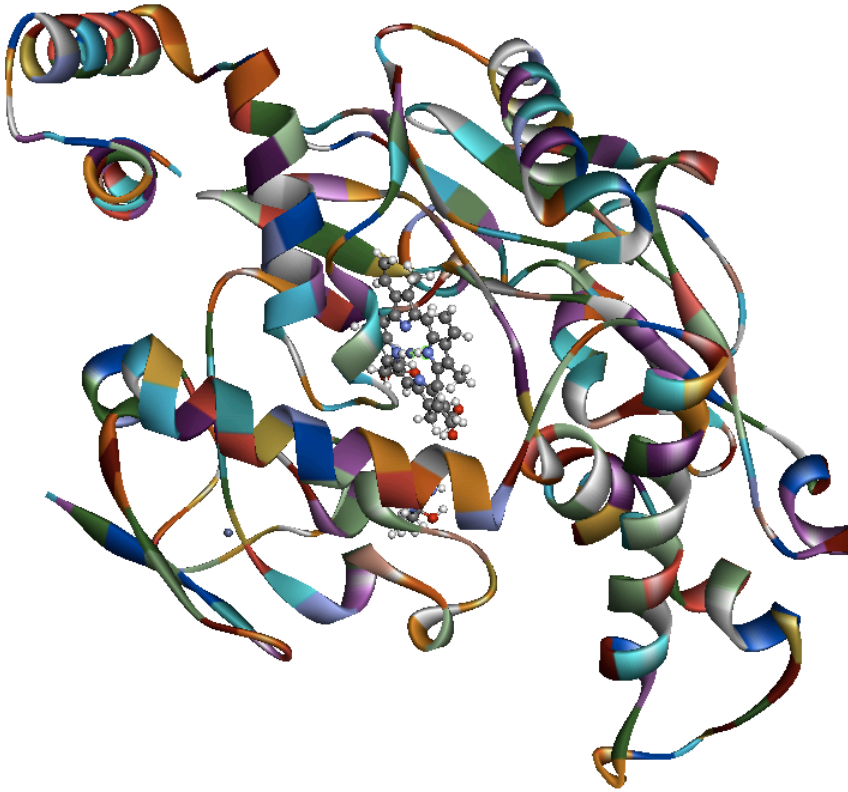
## 1. Giriş

### 1.1 NOS (nitrik oksit senteaz) enzimlerinin hazırlanması

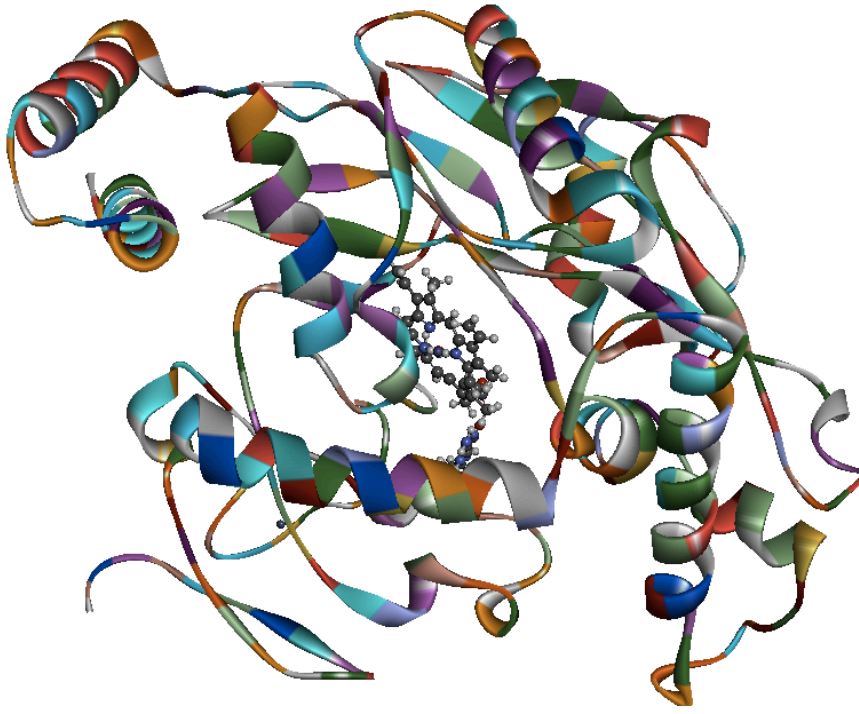
Yaptığımız çalışmada nNOS (nöronal, beyinde) eNOS (entotelial, damarların iç çeperinde) ve iNOS (induced, makrofajlarda), enzimlerinin yapısını temel alan fakat sadece nNOS enzimi için seçimli olan potansiyel inhibitörlerin belirlenmesi amacıyla sistemimizin doğru çalışıp çalışmadığı test edilmek istenmiştir. Üç enzimin moleküler yapısı ve şekli son derece benzerlik gösterdiğinden sadece nNOS'a bağlanan inhibitör tasarlanması oldukça zordur. Bu maksatla literatürde değişik makalelerde mevcut deneysel verileri olan inhibitörlerin verilen kristal yapıları deneyerek elde edilen sonuçlar sistemimize oturtulmaya çalışılmıştır. İlk olarak literatür taraması sonucunda nNOS için 3PNE, 3PNF, 3PNG, 3SVP, 3SVQ, 1OM4, 1P6I, 1P6J, 1QWC, 1RS7, 3B3N, 3B3O, 3DQR, 3N2R, 3SVP, 3B3M; eNOS için 3PNH, 1FOI, 3DQS, 3DQT enzimlerini seçerken iNOS için 1NSI pdb kodlu proteinler bilgi bankasından alınmıştır. Çalışmamız enzimlerin arginin kompleksi ile birlikte kristalize edilmiş 3 boyutlu yapılarının alt ünitelerinin birinde yapılacağı için proteinlerin yalnızca tek domain kullanılmıştır. Protein veri bankasından elde ettiğimiz enzim kristal kompleksi içinde bulunan inhibitörler su, ilgisiz moleküller ve atomlar çıkarılmıştır. Kofaktör olarak görev alan heme molekülü içindeki Fe atomunun yükü (+3) yapılmıştır. Accelrys Discovery Studio programı kullanılarak heme molekülünün arkasında bulunan ve farklı proteinlerin dizinlerinde farklı konumlanmış olan CYS aminoasidi ile heme molekülündeki Fe atomu arasındaki bağ kırılmıştır. Daha sonra hidrojenleri eklenmiş protein zinciri üzerindeki bozukluklar tekrar Accelrys programı kullanılarak düzeltilmiştir. Proteinler kısa bir minimizasyona tabi tutularak atomlar arası bağ uzunlukları ve açıları ayarlanmıştır. Böylece optimize ettiğimiz bu ön yapılar doklama (ligantların enzimlerin aktif kısımlarına yerleştirilmesi) çalışmalarımızda kullanılabilir hale getirilmiştir (**Şekil 1**, **Şekil 2** ve **Şekil 3**).



**Şekil 1** nNOS enziminin orijinal üç boyutlu minimize edilmiş (tek domain) görünümü.



**Şekil 2** eNOS enziminin orijinal üç boyutlu minimize edilmiş (tek domain) görünümü.



**Şekil 3** iNOS enziminin orijinal üç boyutlu minimize edilmiş (tek domain) görünümü.

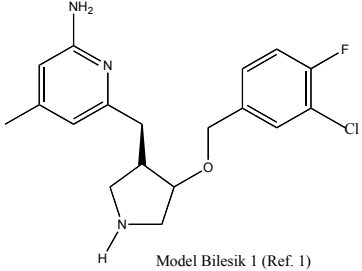
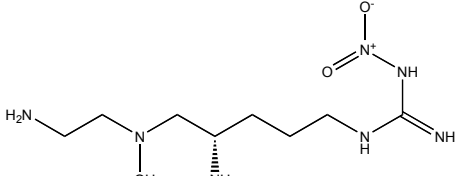
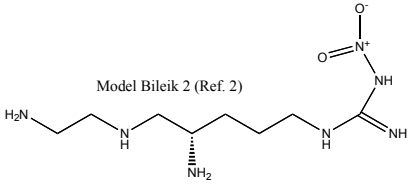
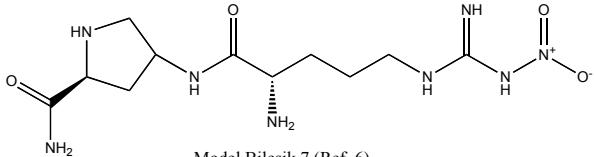
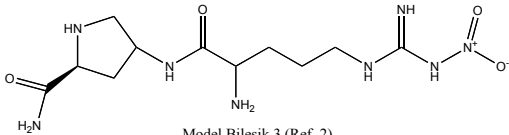
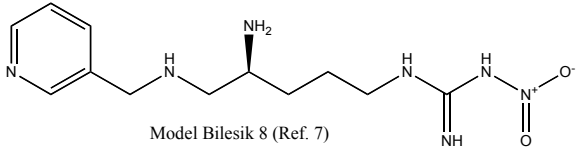
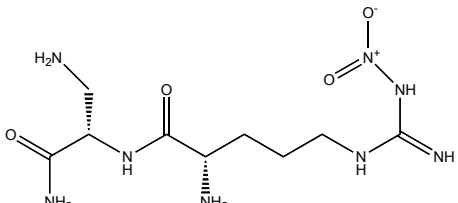
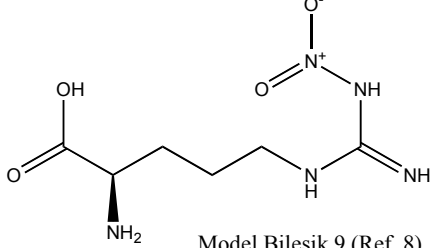
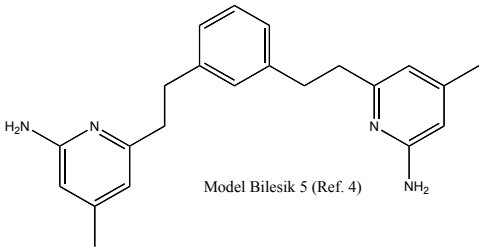
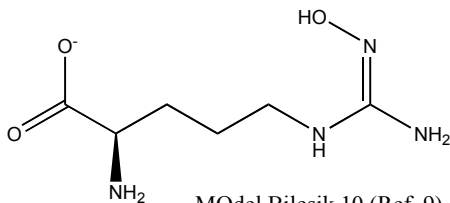
## 1.2 Doklama

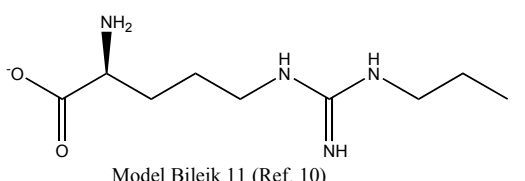
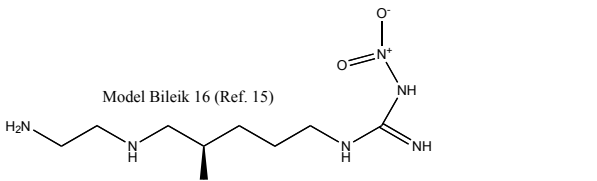
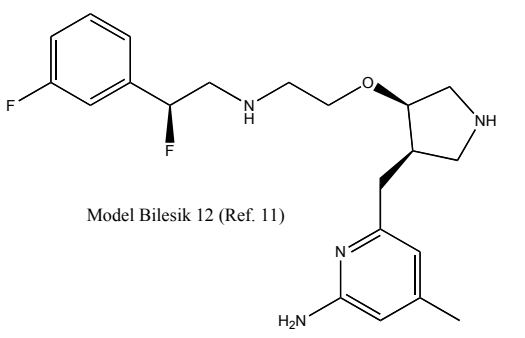
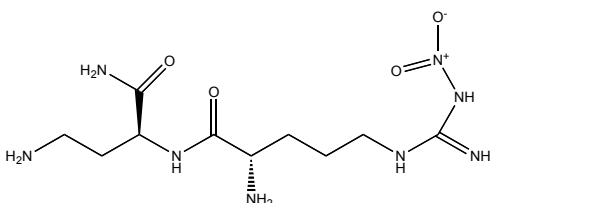
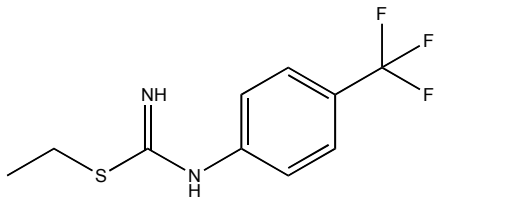
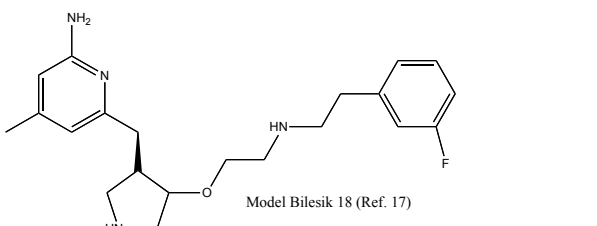
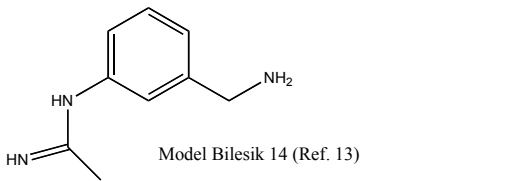
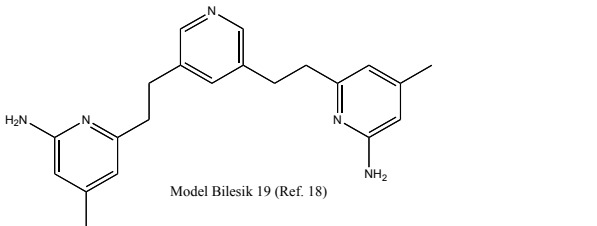
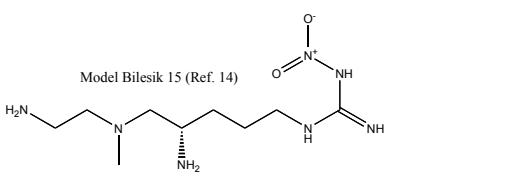
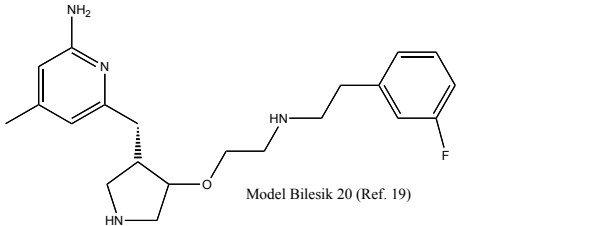
Değişik kaynaklardan enzimler için, deneysel verileri (inhibisyon katsayıları,  $K_i$ ) bilinen 20 model inhibitör seçilmiştir (**Tablo 1**). İnhibitörlerin yapıları çizilerek PM3 seviyesinde minimize edilmiş hesapsal bağlağanma enerjileri AutoDock 4.2 programı kullanılarak bulunmuştur. Accelrys programının Discovery Studio modülü (yapı çizimi) ve protokolleri ve Spartan programı minimizasyon işlemi için kullanılmıştır.

Autodock çalışmamızda inhibitörlerin enzimin aktif bölgelerine ulaşmaları ve gerekli bağların oluşarak etkileşmeleri için “grid box” ölçüleri 60 x 60 x 60 Angstrom olarak belirlenmiş ve “grid box” merkezinin x, y, z koordinatları da her enzim için kofaktör olarak rol oynayan heme’in Fe atomunun x, y, z koordinatları olarak seçilmiştir. Her bir doklama için enerji “evolution” parametresi 50 milyona ayarlanarak her molekül için 10 bağımsız “run” çalıştırılmıştır.

**Tablo 2**'de AutoDock4.2 programı ile elde edilen hesapsal  $K_i$  değerleri ve deneysel  $K_i$  değerleri verilmiştir. **Tablo 3**'te  $K_i$  değerleri logaritmik değerlere çevrilerek yeniden düzenlenmiştir. Bütün değerler nanomolar (nM) cinsindedir.

**Tablo 1** Deneysel inhibisyon katsayıları hesapsal değerlerle karşılaştırılan 20 bileşik ve bileşiklerin alındığı referanslar.

 <p>Model Bileşik 1 (Ref. 1)</p>	 <p>Model Bileşik 6 (Ref. 5)</p>
 <p>Model Bileşik 2 (Ref. 2)</p>	 <p>Model Bileşik 7 (Ref. 6)</p>
 <p>Model Bileşik 3 (Ref. 2)</p>	 <p>Model Bileşik 8 (Ref. 7)</p>
 <p>Model Bileşik 4 (Ref. 3)</p>	 <p>Model Bileşik 9 (Ref. 8)</p>
 <p>Model Bileşik 5 (Ref. 4)</p>	 <p>Model Bileşik 10 (Ref. 9)</p>

 <p>Model Bileik 11 (Ref. 10)</p>	 <p>Model Bileik 16 (Ref. 15)</p>
 <p>Model Bilesik 12 (Ref. 11)</p>	 <p>Model Bileik 17 (Ref. 16)</p>
 <p>Model Bilesik 13 (Ref. 13)</p>	 <p>Model Bilesik 18 (Ref. 17)</p>
 <p>Model Bilesik 14 (Ref. 13)</p>	 <p>Model Bilesik 19 (Ref. 18)</p>
 <p>Model Bilesik 15 (Ref. 14)</p>	 <p>Model Bilesik 20 (Ref. 19)</p>

## 2. Enzimlerin Seçimi

### 2.1 nNOS enzim seçimi:

Deneyisel değerleri bilinen 20 bileşik (Tablo 2, Tablo 3 ve Şekil 4) nNOS enzimlerine AutoDock 4.02 programı ile doklanarak hesaplan değerleri bulunmuştur. Şekil 4'ün incelendiğinde görüldüğü gibi deneyle en iyi uyum gösteren 1OM4 nNOS enzimi modelleme için seçilmiştir. Ayrıca deneyisel sonuçlarla çok farklılık gösteren (10, 12 ve 13 outliers) 3 hesapsal sonuç çıkartılarak grafik tekrar çizdirilmiştir (Şekil 5). Şekilde de görüldüğü üzere 1OM4 nNOS enzimi deneylerle daha uyumlu hale gelmiştir.

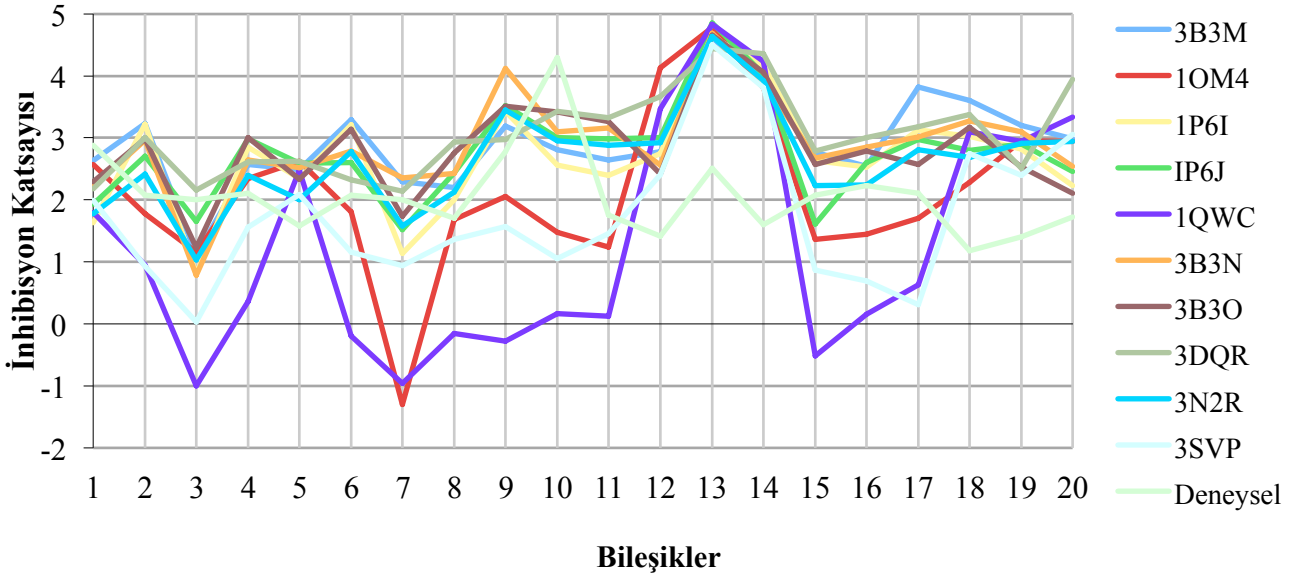
**Tablo 2** Referanslardan seçilen 10 adet nNOS enzimi ve bu enzimlere dock edilen 20 adet bileşiğin hesapsal ve deneyisel (son kolon) inhibisyon katsayıları (bütün değerler nano moldur).

Bileşik	3B3M	1OM4	1P6I	IP6J	1QWC	3B3N	3B3O	3DQR	3N2R	3SVP	Deneyisel
1	421,78	370,16	42,66	84,2	62,59	162,22	192,87	152,86	60,87	97,22	760
2	1710	59,57	1650	509,1	8,99	905,57	964,7	1030	265,79	8,53	120
3	12,97	14,58	6,36	44,96	0,1	5,97	16,86	145,3	10,61	1,06	100
4	368,53	217,86	702,81	959,27	2,29	439,24	1000	406	249,02	36,19	130
5	308,52	416,67	218,16	393,3	301,79	327,46	213,9	420,61	99,25	124,22	38
6	1960	64,54	1630	395,99	0,63	611,71	1370	210,79	603,38	14,39	120
7	194,02	0,05	13,9	33,44	0,11	222,36	53,19	136,84	37,99	8,79	100
8	157,5	47,49	99,08	276,64	0,7	269,51	573,45	855,42	134,67	22,74	50
9	1560	111,62	2680	3340	0,53	13310	3220	932,65	2810	37,02	600
10	652,11	30,54	361,54	990,85	1,49	1250	2630	2690	882,73	11,26	20000
11	431,56	17,22	248,48	947,27	1,33	1440	1810	2150	765,08	29,09	57
12	599,28	13570	561,42	1030	2940	366,09	263,8	4640	823,77	254,35	26
13	39240	60720	42370	70790	67590	49310	45800	27700	43720	31980	320
14	10590	6450	14780	10650	17030	8080	11510	22710	8310	6450	40
15	585,84	22,77	430,22	40,51	0,3	472,66	369,78	619,01	171,04	7,49	120
16	349,86	27,91	335,72	397,25	1,43	703,23	612,95	1010	171,97	4,94	170
17	6640	49,9	1340	941,75	4,22	1040	374,36	1530	652,15	2,05	130
18	3980	188,43	1070	630,45	1270	1880	1470	2410	477,17	566,21	15
19	1580	886,24	655,46	795,41	880,57	1260	338,52	324,3	807,45	249,89	25
20	960,71	863,54	171,28	286,39	2200	345,22	127,52	8660	874,6	1150	52

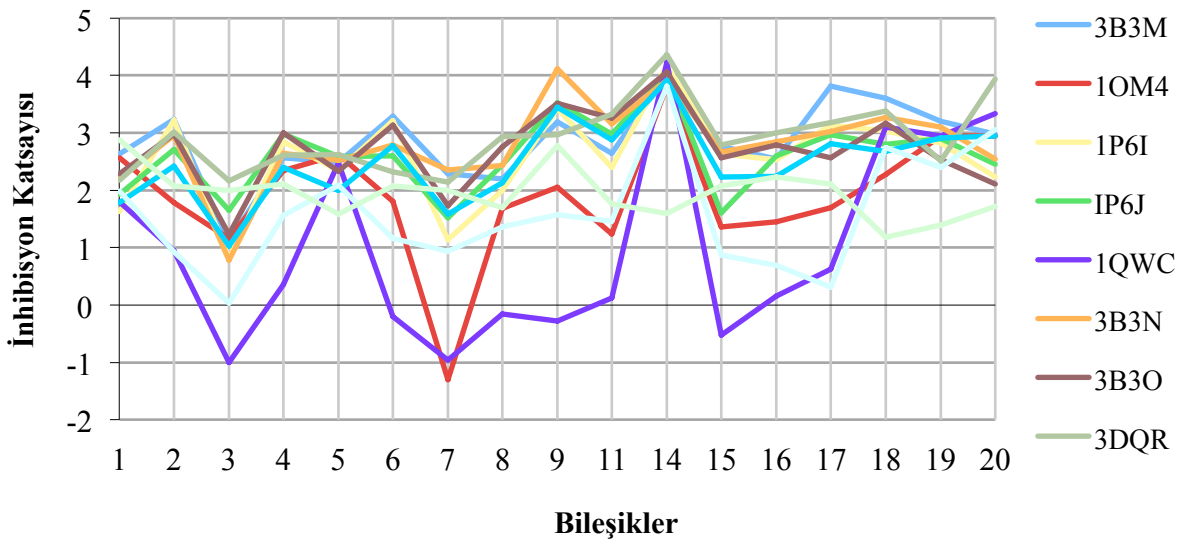
**Tablo 3** Referanslardan seçilen 10 adet nNOS enzimi ve bu enzimlere dock edilen 20 adet bileşimin hesapsal ve deneysel (son kolon) inhibisyon katsayılarının logaritmik değerleri (bütün değerler nano moldur).

Bileşik	3B3M	1OM4	1P6I	IP6J	1QWC	3B3N	3B3O	3DQR	3N2R	3SVP	Deneyisel
1	2,63	2,57	1,63	1,93	1,80	2,21	2,29	2,18	1,78	1,99	2,88
2	3,23	1,78	3,22	2,71	0,95	2,96	2,98	3,01	2,42	0,93	2,08
3	1,11	1,16	0,80	1,65	-1,00	0,78	1,23	2,16	1,03	0,03	2,00
4	2,57	2,34	2,85	2,98	0,36	2,64	3,00	2,61	2,40	1,56	2,11
5	2,49	2,62	2,34	2,59	2,48	2,52	2,33	2,62	2,00	2,09	1,58
6	3,29	1,81	3,21	2,60	-0,20	2,79	3,14	2,32	2,78	1,16	2,08
7	2,29	-1,30	1,14	1,52	-0,96	2,35	1,73	2,14	1,58	0,94	2,00
8	2,20	1,68	2,00	2,44	-0,15	2,43	2,76	2,93	2,13	1,36	1,70
9	3,19	2,05	3,43	3,52	-0,28	4,12	3,51	2,97	3,45	1,57	2,78
10	2,81	1,48	2,56	3,00	0,17	3,10	3,42	3,43	2,95	1,05	4,30
11	2,64	1,24	2,40	2,98	0,12	3,16	3,26	3,33	2,88	1,46	1,76
12	2,78	4,13	2,75	3,01	3,47	2,56	2,42	3,67	2,92	2,41	1,41
13	4,59	4,78	4,63	4,85	4,83	4,69	4,66	4,44	4,64	4,50	2,51
14	4,02	3,81	4,17	4,03	4,23	3,91	4,06	4,36	3,92	3,81	1,60
15	2,77	1,36	2,63	1,61	-0,52	2,67	2,57	2,79	2,23	0,87	2,08
16	2,54	1,45	2,53	2,60	0,16	2,85	2,79	3,00	2,24	0,69	2,23
17	3,82	1,70	3,13	2,97	0,63	3,02	2,57	3,18	2,81	0,31	2,11
18	3,60	2,28	3,03	2,80	3,10	3,27	3,17	3,38	2,68	2,75	1,18
19	3,20	2,95	2,82	2,90	2,94	3,10	2,53	2,51	2,91	2,40	1,40
20	2,98	2,94	2,23	2,46	3,34	2,54	2,11	3,94	2,94	3,06	1,72





**Şekil 4** 20 bileşiğin logaritmik inhibisyon katsayılarının nNOS enzimlerine karşı inhibisyon davranışları.



**Şekil 5** 17 bileşiğin logaritmik inhibisyon katsayılarının nNOS enzimlerine karşı inhibisyon davranışları. (10, 12, 13 Nolu "outlier" bileşikler çıkartılmış).

## 2.2 eNOS ve iNOS enzimlerinin seçimi:

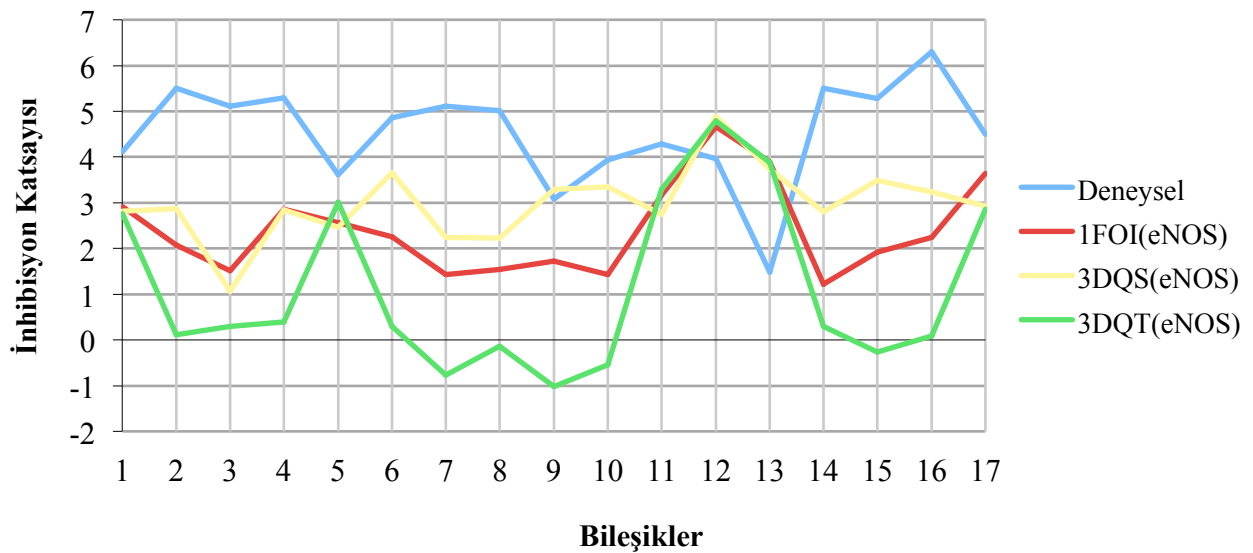
eNOS ve iNOS enzimlerine deneysel değerleri bilinen 17 bileşik (nNOS enzimi için denenen aynı bileşikler) eNOS (**Tablo 4**, **Tablo 5** ve **Şekil 6**) ve iNOS (**Tablo 6**, **Tablo 7** ve **Şekil 7**) enzimlerine de AutoDock 4.02 programı ile doklanarak hesapsal değerleri bulunmuştur. **Şekil 6**'dan deneyle en iyi uyum gösteren 3DQS, eNOS enzimi modelleme için seçilmiştir. Bu bileşikler için denenen iNOS enzimi sadece bir tane olduğundan 1NSI da minimize edilip çalışmalarımızda kullanılmıştır. Hesapsal çalışmalarda birçok parameter dikkate alınmadığından deneyle farklılıklar göstermesi çok normaldir. Kaldı ki bu tür çalışmalarda aynı bileşiklerin farklı deneysel çalışmalarda da farklılık gösterdiği de bilinmektedir. Enzimlerin konformasyonları değiştiğinde yine farklı neticeler olabilmektedir. Hatayı minimize etmek için ortalama bir enzim yapısı ile hesaplamaları yapmak en doğru olan yöntemdir.

**Tablo 4** Referanslardan seçilen 3 adet eNOS enzimi ve bu enzimlere dock edilen 17 adet bileşiğin hesapsal ve deneysel (ilk kolon) inhibisyon katsayıları (bütün değerler nano moldur).

Bileşik	Deneysel	1FOI(eNOS)	3DQS(eNOS)	3DQT(eNOS)
1	13300	822,72	661,69	579,00
2	314000	119,45	736,55	1,32
3	128000	32,75	11,48	1,93
4	200000	718,31	701,88	2,49
5	4200	360,21	291,57	1030,00
6	73000	180,07	4600,00	1,94
7	128000	26,76	174,50	0,17
8	105000	34,44	170,85	0,73
9	1200	54,07	1930,00	0,10
10	8500	26,72	2240,00	0,28
11	19000	1470,00	551,51	1940,00
12	9400	45790,00	78250,00	61780,00
13	30	7980,00	5490,00	7640,00
14	314000	16,72	624,81	1,97
15	191000	82,56	3070,00	0,55
16	2000000	173,48	1730,00	1,21
17	31000	4340,00	848,41	727,16

**Tablo 5** Referanslardan seçilen 3 adet eNOS enzimi ve bu enzimlere dock edilen 17 adet bileşimin hesapsal ve deneysel (ilk kolon) inhibisyon katsayılarının logaritmik değerleri (bütün değerler nano moldur).

Bileşik	Deneysel	1FOI(eNOS)	3DQS(eNOS)	3DQT(eNOS)
1	4,12	2,92	2,82	2,76
2	5,50	2,08	2,87	0,12
3	5,11	1,52	1,06	0,29
4	5,30	2,86	2,85	0,40
5	3,62	2,56	2,46	3,01
6	4,86	2,26	3,66	0,29
7	5,11	1,43	2,24	-0,77
8	5,02	1,54	2,23	-0,14
9	3,08	1,73	3,29	-1,02
10	3,93	1,43	3,35	-0,55
11	4,28	3,17	2,74	3,29
12	3,97	4,66	4,89	4,79
13	1,48	3,90	3,74	3,88
14	5,50	1,22	2,80	0,29
15	5,28	1,92	3,49	-0,26
16	6,30	2,24	3,24	0,08
17	4,49	3,64	2,93	2,86



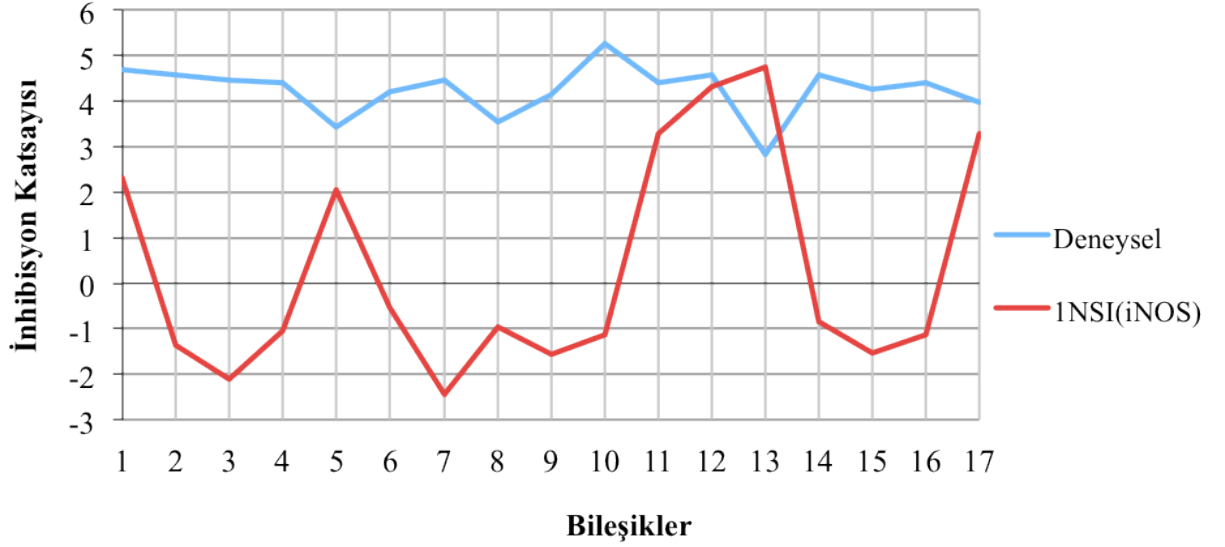
**Şekil 6** 17 bileşimin logaritmik inhibisyon katsayılarının eNOS enzimlerine karşı inhibisyon davranışları.

**Tablo 6** Referanslardan seçilen iNOS enzimi ve bu enzime dock edilen 17 adet bileşimin hesapsal ve deneysel (ilk kolon) inhibisyon katsayıları (bütün değerler nano moldur).

<b>Bileşik</b>	<b>Deneysel</b>	<b>1NSI(iNOS)</b>
1	50000	197,57
2	39000	0,04
3	29000	0,01
4	25000	0,09
5	2730	116,10
6	16000	0,30
7	29000	0,00
8	3510	0,11
9	14000	0,03
10	180000	0,07
11	26000	1900,00
12	37000	20430,00
13	670	55220,00
14	39000	0,14
15	18000	0,03
16	25000	0,07
17	9500	1890,00

**Tablo 7** Referanslardan seçilen iNOS enzimi ve bu enzime dock edilen 17 adet bileşimin hesapsal ve deneysel (ilk kolon) inhibisyon katsayılarının logaritmik değerleri (bütün değerler nano moldur).

<b>Bileşik</b>	<b>Deneysel</b>	<b>1NSI(iNOS)</b>
1	4,70	2,30
2	4,59	-1,37
3	4,46	-2,11
4	4,40	-1,05
5	3,44	2,06
6	4,20	-0,52
7	4,46	-2,44
8	3,55	-0,95
9	4,15	-1,56
10	5,26	-1,13
11	4,41	3,28
12	4,57	4,31
13	2,83	4,74
14	4,59	-0,84
15	4,26	-1,53
16	4,40	-1,14
17	3,98	3,28



**Şekil 7** 17 bileşiğin logaritmik inhibisyon katsayılarının iNOS enzimine karşı inhibisyon davranışları.

### 3. Deneysel ve hesapsal verilerin karşılaştırılması

**Tablo 2**, **Tablo 3**, **Şekil 4** ve **Şekil 5** incelendiğinde Bileşik 9, 12, 13 ve 14'ün hesapsal değerleri nNOS enzimlerinin deneysel değerlerinden yüksektir. Bileşik 10'un ise deneysel değeri hesapsal değerinden daha yüksek çıkmıştır. Diğer bileşiklerde deneysel veriler hesapsal verilerle uyum göstermektedirler. Fakat en fazla uyum 1OM4 kodlu nNOS enziminde bulunmuştur. Daha önce bahsedildiği gibi, **Şekil 5'** te çok sapma gösteren (outlier) 3 bileşik (10, 12 ve 13) çıkartılarak grafik tekrar çizilmiştir. Bu grafikte de 1OM4 enziminin deneysel ve hesapsal verileri en çok uyum gösteren enzim olduğu görülmektedir.

Bu çalışmalardan 1OM4 nöronal NOS (nNOS) enzimi hesapsal modellemelerde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

### 4. nNOS seçimli inhibitörlerin tasarımı

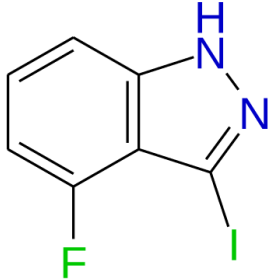
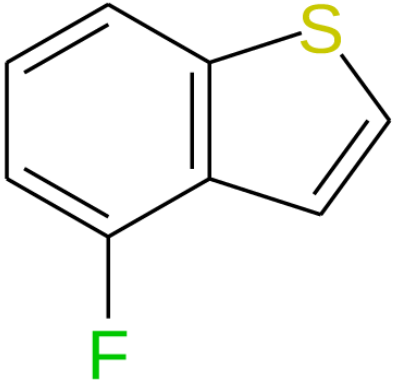
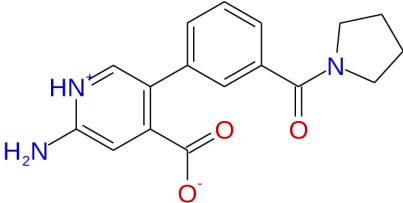
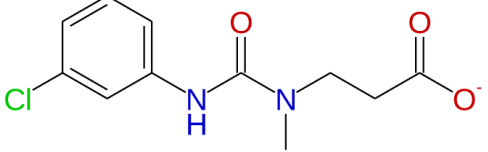
Seçicilik çalışmalarımız sonucunda hesaplarla en çok uyumu gösteren 1OM4 kodlu nNOS enzimi bundan sonraki modelleme çalışmalarımızda inhibitor tasarımları yapılmak üzere kullanılmıştır.

#### 4.1 ZINC kütüphanesi kullanılarak gerçekleştirilen inhibitor tarama işlemi

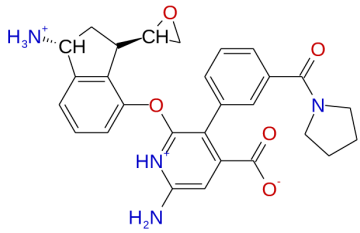
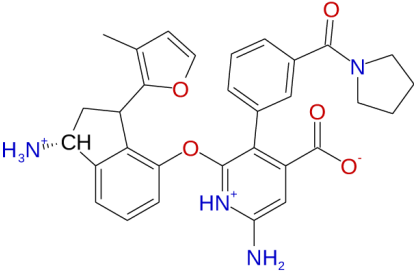
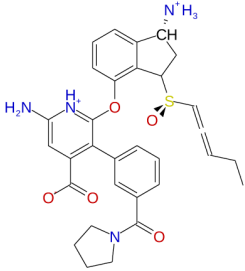
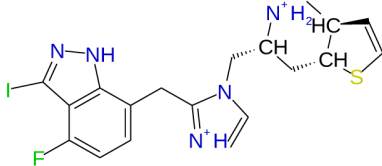
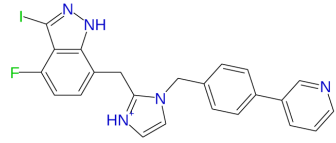
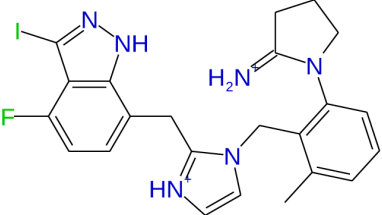
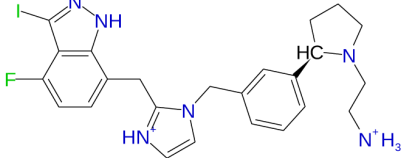
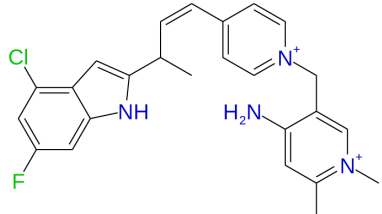
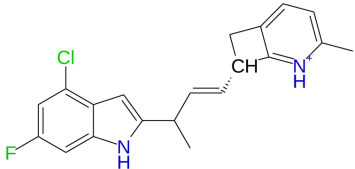
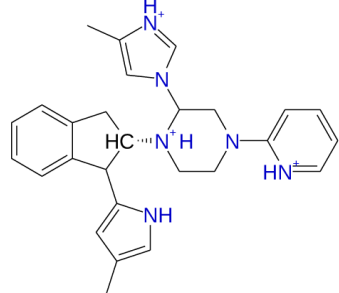
nNOS enzimi için yaklaşık bir milyon molekül içeren ZINC kütüphanesi<sup>20</sup>

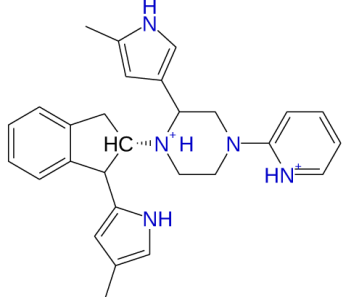
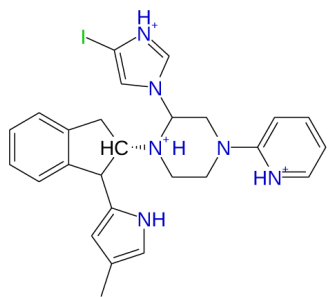
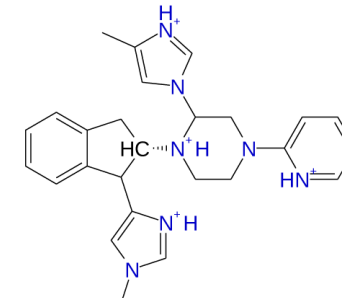
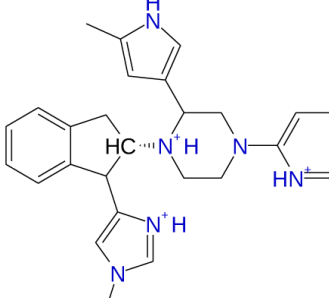
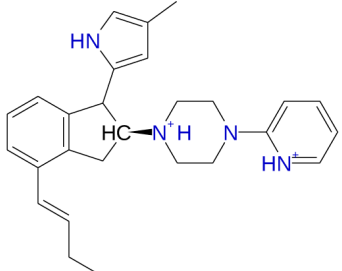
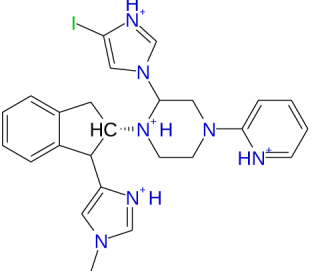
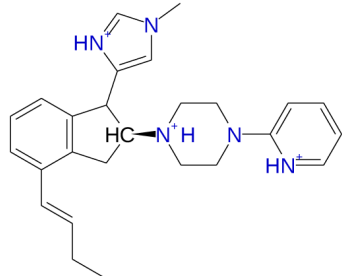
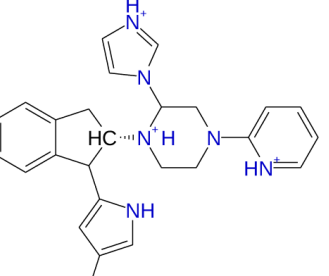
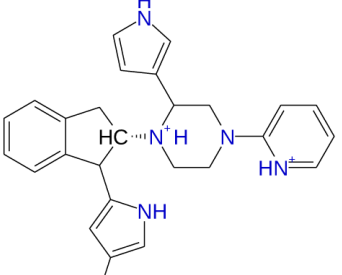
(ZINCv12) kullanılarak nNOS aktif bölgesine uyan 100 civarında ana iskelet (scaffolds, leads) üretilmiştir. Bu iskeletlerden De Novo skoru ve sentezlenebilirliği de göz önünde bulundurularak 4 adet ana iskelet “fragment base de novo” yapılmak üzere seçilmiştir (**Tablo 8**). Seçilen 4 potansiyel ana iskelete toplamda 400 bin fragment (küçük molekül eklentileri) içeren ZINCv12 ve Accelrys 3.1 “fragment-based” kütüphaneleri birlikte kullanılarak 200 potansiyel inhibitör adayı seçilmiştir. Bu adaylar arasından molekül ağırlığı, ADMET özellikleri, nNOS seçiciliği, de novo skoru ve moleküler yapısı dikkate alınarak 19 bileşik potansiyel nNOS inhibitörü olabileceği sonucuna varılmıştır (**Tablo 9**).

**Tablo 8** Bu çalışmada kullanılan ana iskeletler (leads)

Lead1		Lead2	
Lead3		Lead4	

**Tablo 9** Seçilmiş nNOS inhibitör adayları.

<p><b>KN1</b></p>		<p><b>KN2</b></p>	
<p><b>KN3</b></p>		<p><b>KN4</b></p>	
<p><b>KN5</b></p>		<p><b>KN6</b></p>	
<p><b>KN7</b></p>		<p><b>KN8</b></p>	
<p><b>KN9</b></p>		<p><b>KN10</b></p>	

<p><b>KN11</b></p>		<p><b>KN12</b></p>	
<p><b>KN13</b></p>		<p><b>KN14</b></p>	
<p><b>KN15</b></p>		<p><b>KN16</b></p>	
<p><b>KN 17</b></p>		<p><b>KN18</b></p>	
<p><b>KN19</b></p>			



## 4.2 Seçilmiş inhibitör adaylarının nNOS, eNOS ve iNOS enzimleri

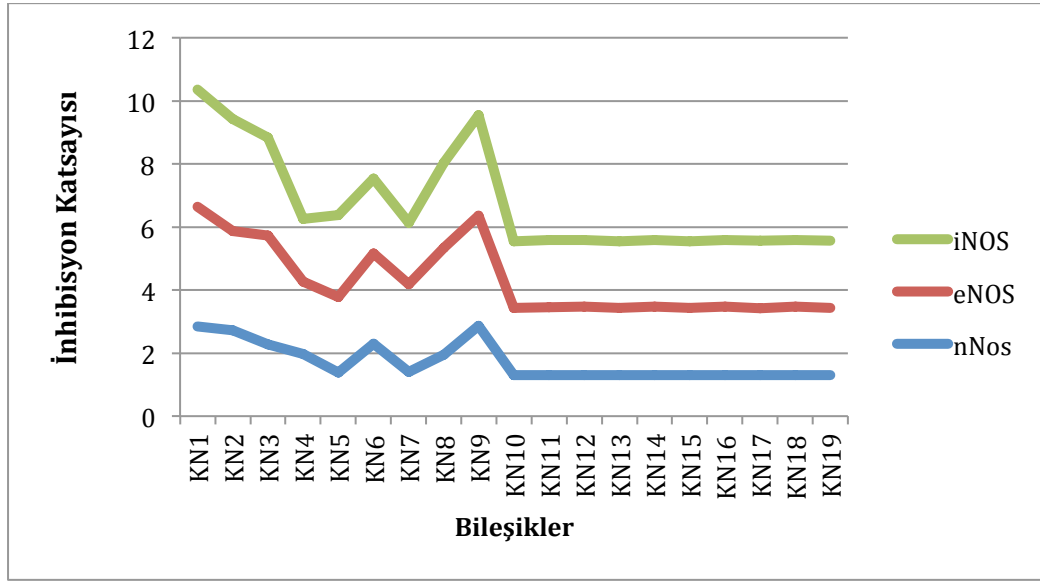
### için yapılan doklama çalışmaları

**Tablo 10** Elde edilen 19 inhibitörün nNOS, eNOS ve iNOS enzimleri için yapılan doklama sonuçlarının logaritmik değerleri. (Değerler nanoMolar (nM) cinsinden  $K_i$ , bağlanma katsayılarıdır).

Molekül No	nNOS Autodock İnhibisyon Katsayısı (nM) nNos	eNOS Autodock eNOS	iNOS Autodock iNOS	Molekül Ağırlığı
KN1	704.77	6310	5160	501
KN2	534.79	1370	3560	539
KN3	185.88	2920	1280	573
KN4	93.28	200.88	97.08	497
KN5	23.99	256.11	389.84	510
KN6	196.87	749.69	227.65	530
KN7	25.21	598.82	88.48	546
KN8	89.43	2420	505.29	436
KN9	734.32	3090	1550	341
KN10	20.22	131.72	129.91	441
KN11	19.97	145.77	129.56	439
KN12	20.18	145.01	133.51	553
KN13	20.11	134.45	129.73	443
KN14	20.23	145.07	130.61	441
KN15	19.9	135.43	128.52	414
KN16	20.35	146.33	132.5	555
KN17	20.4	129.75	137.59	416
KN18	20.28	146.85	131.64	427
KN19	20.11	137.29	133.21	425

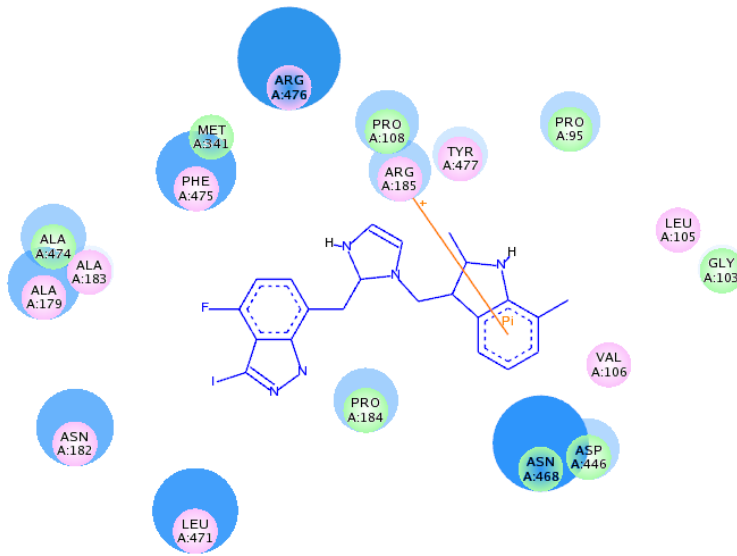
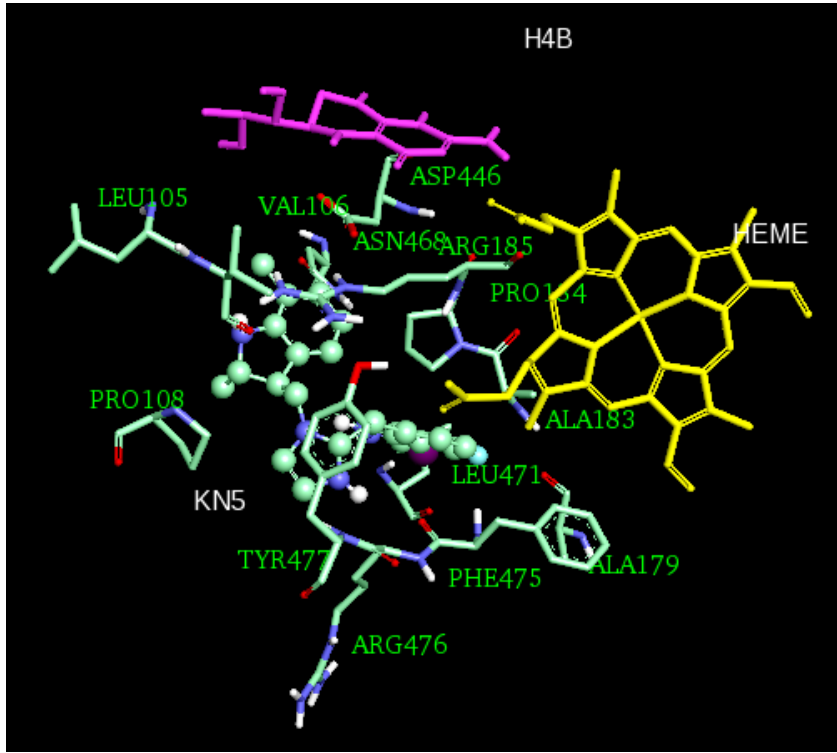
**Tablo 11** Elde edilen 19 inhibitörün nNOS, eNOS ve iNOS enzimleri için yapılan doklama sonuçları (Değerler nanoMolar (nM) cinsinden  $K_i$ , bağlanma katsayılarının logaritmik değerleridir).

	İnhibisyon Katsayısı (nM)		
	nNos	eNOS	iNOS
KN1	2.848047409	3.800029359	3.712649702
KN2	2.728183278	3.136720567	3.551449998
KN3	2.269232664	3.465382851	3.10720997
KN4	1.969788537	2.3029367	1.987129768
KN5	1.380030248	2.408426536	2.590886398
KN6	2.294179541	2.874881718	2.357267655
KN7	1.401572846	2.777296297	1.946845114
KN8	1.951483231	3.383815366	2.703540703
KN9	2.865885357	3.489958479	3.190331698
KN10	1.305781151	2.119651722	2.113642583
KN11	1.300378065	2.163668154	2.112470939
KN12	1.304921162	2.161397953	2.125513796
KN13	1.303412071	2.128560807	2.113040418
KN14	1.305995883	2.161577611	2.115976429
KN15	1.298853076	2.131714878	2.108970717
KN16	1.308564414	2.165333373	2.122215878
KN17	1.309630167	2.113107367	2.138586871
KN18	1.307067951	2.166873951	2.119387874
KN19	1.303412071	2.137638905	2.124536828

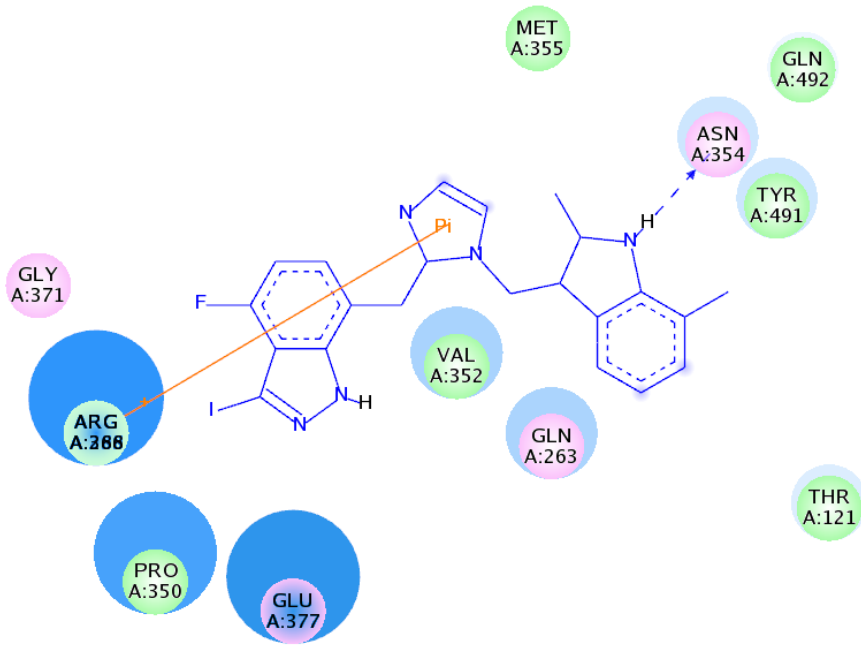
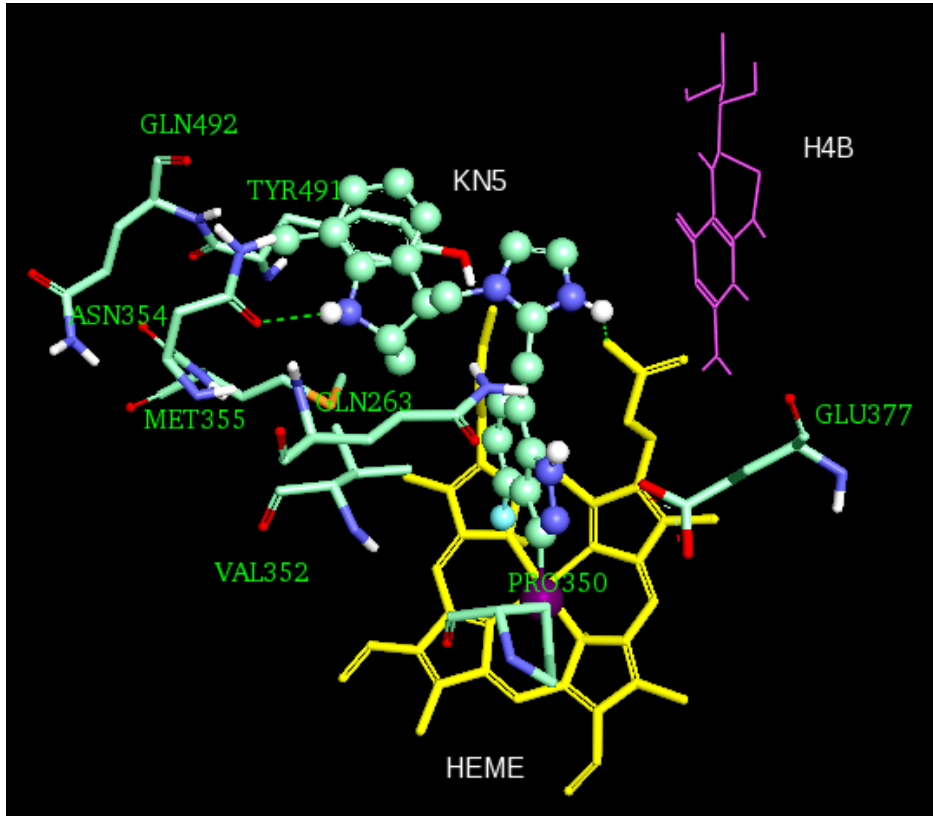


**Şekil 8** Tablo 12 deki logaritmik değerlerin grafiksel gösterimi

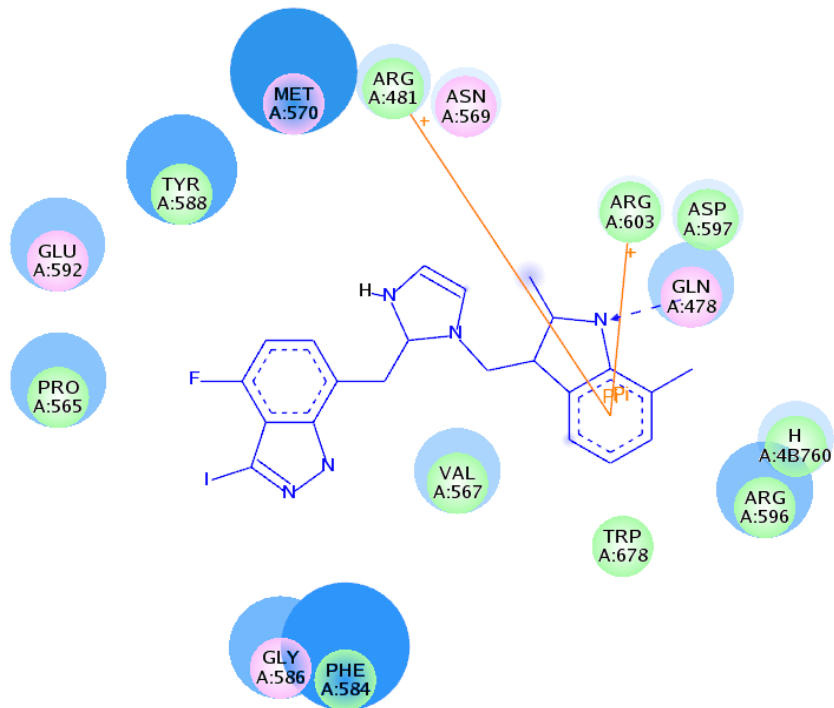
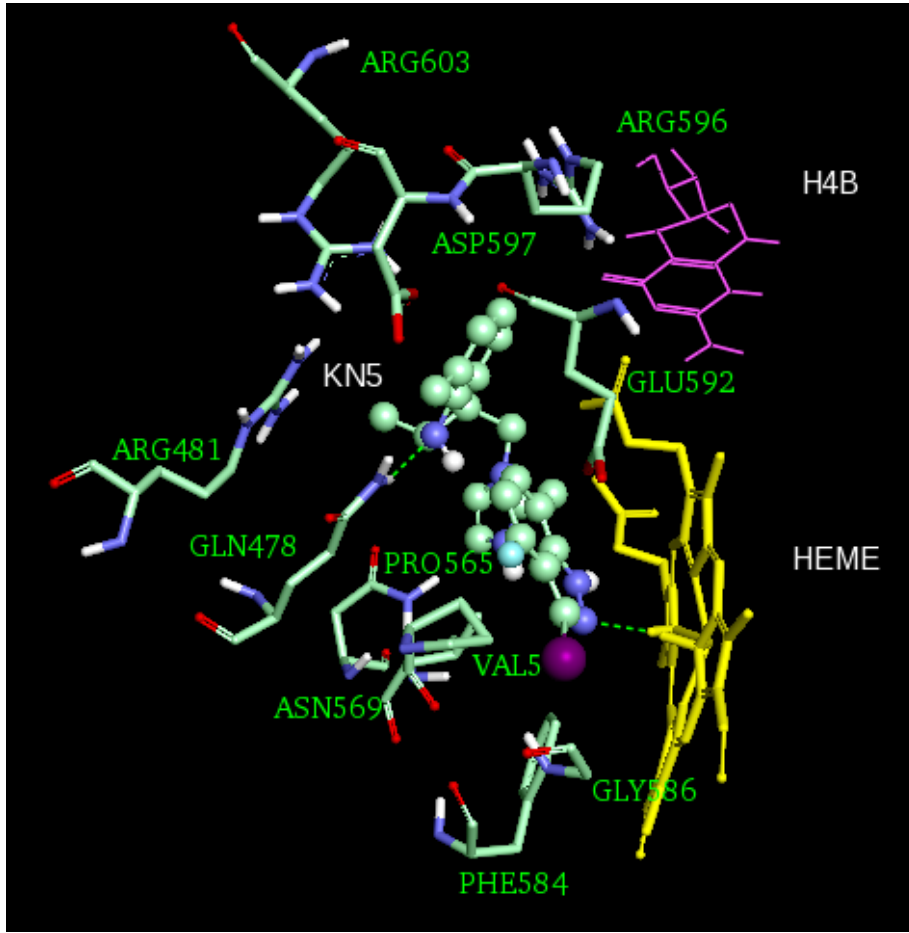
Seçilen aday bileşiklerden KN5 en iyi seçiciliğe (e/n 10.68 ve i/n ise 16.25 tir.) ve inhibisyon katsayısı olarakta en iyilerden biridir. Bu bileşiğin her üç enzimin aktif bölgesinde bağlanma görüntüsü ve yapmış olduğu bağlar hem 2D ve 3D şekillerde verilmiştir (**Şekil 6, 7, 8**).



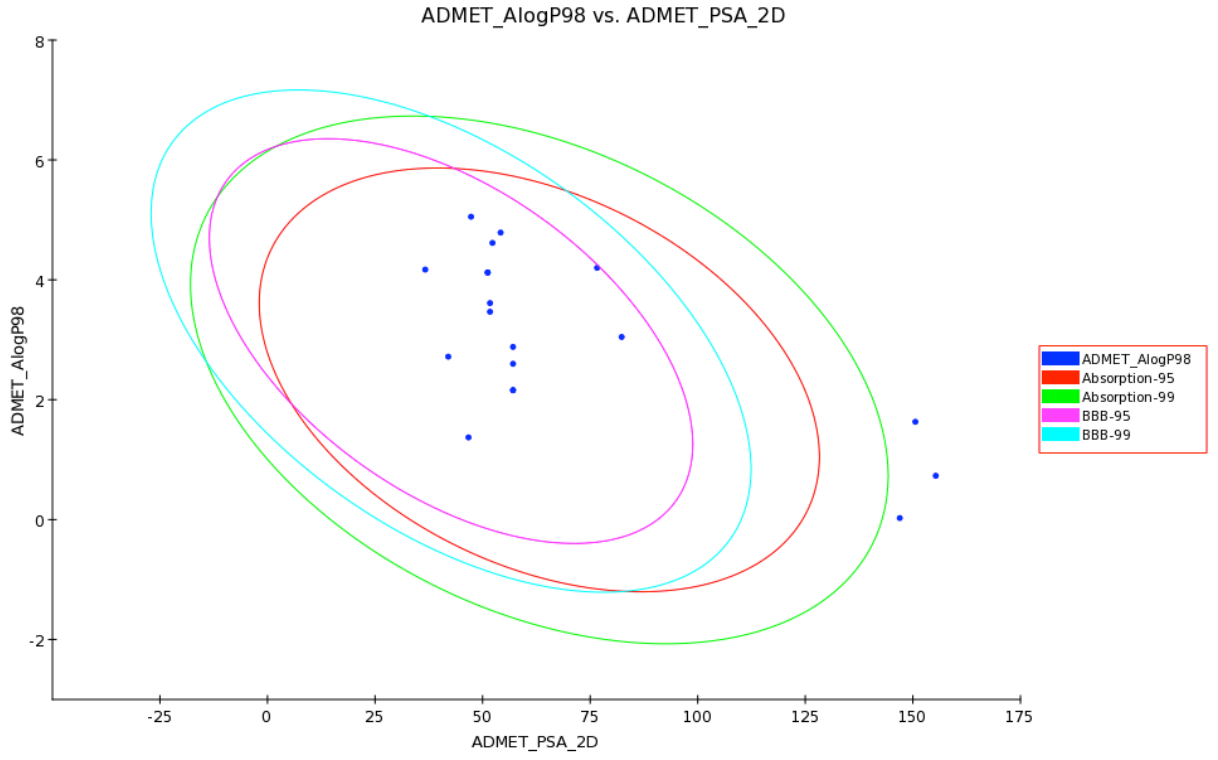
**Şekil 9** KN5 İnhibitörünün eNOS enzimi içinde 2D ve 3D görünümleri. (Üstteki resim eNOS enziminin aktif bölgesinde KN5 nolu inhibitörün 3 boyutlu konumunu gösterilmektedir. Burada amino asit yan zincirleri çubuk, inhibitör ise çubuk ve top şeklinde, kofaktörler de H4B (tetrahydrobiopterin) ise fuşya renginde çubuk ve heme grubu ise sarı renkte verilmiştir. Alt resimde ise eNOS enziminin aktif bölgesinde KN5 inhibitörünün 2 boyutlu şekli gösterilmiştir. Hidrojen bağı veya polar girişimler fuşya (magenta) renkli daireler, vdW ve hidrofobik girişimler ise, yeşil renkli dairelerle gösterilmiştir. Dairelerin etrafındaki mavi renkli hilal şeklindeki gösterimler ise çözücü temas yüzeyleridir (solvent accessible areas). Bu gösterim şekli diğer resimler için de aynıdır.)



Şekil 10 KN5 İnhibitörünün iNOS enzimi içinde 2D ve 3D görünümleri.



Şekil 11 KN5 İnhibitörünün nNOS enzimi içinde 2D ve 3D görünümleri.



**Şekil 12** Modelleme sonucu elde edilen 19 inhibitörün ADMET değerleri.

**Tablo 12** ADMET hesaplamaları için programda kullanılan parametre değerleri (ADMET Descriptors).

## ADMET Descriptors

---

### [-] Description

Computes ADMET descriptors of ligands.

Calculates the following Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity (ADMET) properties:

- Aqueous Solubility
- Blood Brain Barrier Penetration
- CYP2D6 Binding
- Hepatotoxicity
- Intestinal Absorption
- Plasma Protein Binding

Also calculates AlogP98 and PSA\_2D, which are used in plotting the confidence ellipses.

Calculating ADMET descriptors early in the development of a drug is important to help avoid having to eliminate compounds with unfavorable ADMET characteristics later in the development process, preferably before synthesis.

The models used to predict the ADMET properties in this protocol are derived from a variety of experimental data sources and are catalogued in the product documentation.

### [-] Information

<b>Name</b>	ADMET Descriptors
<b>Status</b>	Success
<b>User</b>	kemal
<b>DS Version</b>	3.1.0.11157
<b>PP Version</b>	8.5.0.200
<b>DS Client Version</b>	3.1.0.11157
<b>Server Name</b>	localhost (Linux64)
<b>Server Ports</b>	9946 (9948)
<b>Start Time</b>	04/30/13 17:28:54
<b>Finish Time</b>	04/30/13 17:28:55
<b>Execution Time</b>	00:00:01

### [-] Summary

19 is predicted.

### [-] Results

[Output Ligands](#)

[View Results](#)

### [-] Parameters



## 5. ADMET

ADMET sonuçları **Şekil 12** ve **Tablo 12**'te verilmiştir. Şekil 9 da ADMET PSA (Polar Surface Area) ya karşı ADMET Alog P98 değerleri verilmiştir.

İnhibitörler ise mavi noktalar şeklinde gösterilmiştir. Dairelerin içerisindeki noktaların ADMET testini geçtiğini dışındaki noktaların ise uzaklıklarına göre bir miktar sapma gösterdikleri anlamına gelmektedir.

## 6. GOLD Doklaması

Ticari bir doklama yazılımı olan GOLD v.4.011 (Genetic Optimization for Ligand Docking) GoldScore, ChemScore ve ChemPLP hesaplama fonksiyonlarını kullanır. GoldScore Hidrojen bağı, van der Waals enerjileri ve ligand gerilim terimlerini kullanırken, ChemScore ligandın peptide bağlandıktan sonraki toplam serbest enerji değişimini dikkate alır. ChemPLP ise van der Waals ve repulsif terimleri modellemek için hidrojen bağı terimini ve linear potansiyel modelini kullanır. Her üç medodunda üstünlük ve zayıf yanları vardır. Skorların botutları yoktur. Yüksek değerler daha iyi inhibisyonu göstermektedir. Doklamada GOLD yazılımı da AutoDock yazılımı gibi genetic algoritma metodunu kullanır. Doklama çalışmalarının detayları diğer çalışmada verilmiştir<sup>21</sup>.

**Tablo 13** 19 Potansiyel aday inhibitörlerin Gold doklama sonuçları

İnhibitörler	eNOS (1NSI)			nNOS (1OM4)			iNOS (3DQS)		
	GoldScore	ChemScore	ChemPLP	GoldScore	ChemScore	ChemPLP	GoldScore	ChemScore	ChemPLP
<b>KN1</b>	68,66	25,44	51,06	64,53	23,62	50,52	51,16	25,45	54,33
<b>KN2</b>	61,88	24,14	49,68	53,95	27,06	51,21	67,85	27,81	57,1
<b>KN3</b>	70,7	25,75	57,35	69,41	24,95	60,58	58,98	26,64	58,97
<b>KN4</b>	68,09	32,77	73,22	62,95	28,55	60,71	49,56	29,05	63,13
<b>KN5</b>	73,66	39,44	94,9	70,12	37,36	81,38	67,59	34,37	72,78
<b>KN6</b>	71,27	27,24	71,85	53,59	25,47	62,81	43,62	19,71	52,34
<b>KN7</b>	72,34	37,53	84,37	69,13	31,55	72,44	63,42	30,44	67,61
<b>KN8</b>	71,21	39,5	83,2	68,45	35,32	69,93	73,51	36,33	80,52
<b>KN9</b>	78,84	37,98	70,19	67,82	36,52	66,42	63,41	35,69	59,23
<b>KN10</b>	61,06	27,59	66,77	19,84	24,99	42,28	43,06	20	48,43
<b>KN11</b>	56,71	29,11	58,97	20,68	26,34	42,98	39,3	22,46	48,69
<b>KN12</b>	65,63	17,54	54,21	63,86	18,5	50,4	53,4	17,58	45,8
<b>KN13</b>	58,42	28,13	60,8	22,76	24,95	43,44	43,85	19,86	48,71
<b>KN14</b>	57,98	25,63	60,67	21,37	24,77	43,6	43,01	19,88	47,67
<b>KN15</b>	63,23	35,65	84,79	47,01	28,45	62,12	46,98	28,31	65,53
<b>KN16</b>	36,9	19,28	61,76	45,61	20,33	50,36	46,45	18,35	51,06
<b>KN17</b>	63,23	34,03	85,97	48,95	26,62	59,71	48,77	26,86	65,28
<b>KN18</b>	59,9	27,26	66,66	38,92	24,33	48,62	36,14	20,25	49,78
<b>KN19</b>	55,67	28,67	59,88	38,95	26,29	48,16	43,97	25,89	49,27

## 7. Sonuç ve tartışma

Moleküler modelleme çalışmalarında kullanacağımız enzim seçimleri literatürde yayınlanan bu enzimlere karşı deneysel değerleri bilinen ligantlar seçilerek yapılmıştır. Çalışmalarımızda deneysel değerleri hesapsal değerlerle en fazla uyum gösteren nNOS için 1OM4, eNOS için 3DQS ve iNOS için de 1NSI izoenzimleri tespit edilmiştir. Bu enzimler bir sonraki çalışmada yeni inhibitör geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Accelrys programının De Novo reseptör protokolü kullanılarak nNOS (1OM4) enzim aktif bölgesi içerisinde en yüksek bağlanma afinitesi gösteren ana iskeletler (scaffolds) geliştirilmiştir. Bu iskeletlerin molekül ağırlığı, ADMET özellikleri, de novo skoru ve sentezlenebilirliği de göz önünde bulundurularak dört moleküle indirilmiştir.

ZINC ve Accelrys de novo fragment kütüphaneleri kullanılarak her bir ana iskelet 1OM4 aktif bölgesinde fragmentler eklenerek bağlanma afiniteleri optimize edilmiştir. Elde edilen sonuç molekülleri her üç izoenzime de doklama çalışmaları yapılarak nNOS seçimli olanlar tespit edilmiştir. Molekül yapıları, ADMET özellikleri ve inhibisyon katsayıları en iyi olan 19 bileşik sırasıyla Tablo 10 ve Tablo 11’de verilmiştir.

Şekil 8’den görüldüğü gibi seçilen 19 inhibitör arasında KN5 kodlu inhibitör nNOS enzimine en iyi inhibisyonu ve seçimliliği ( n/e 10.68 ve n/i ise 16.25) göstermektedir. Bu bileşiğin 3DQS, 1NSI ve 1OM4 enzimlerinin aktif bölgelerindeki bağlanma pozlarının görüntüleri üç ve iki boyutlu olarak sırasıyla Şekil 9, Şekil10, Şekil 11’de verilmiştir.

Seçilen bileşiklerin ADMET özellikleri Acelrys Discovery Stuido programının ADMET protokolü kullanılarak test edilmiştir. Kullanılan ADMET diskriptörleri **Tablo 12** ‘te sonuç çıktısı da **Şekil 12** da verilmiştir. Molekül ağırlığı yüksek olan KN2, KN3 ve KN7 inhibitörleri dairelerin biraz dışında kalmıştır. Bu inhibitörlerin diğer inhibitörlere göre ADMET problemlerinin fazla olacağı anlamına gelmektedir.

Seçilen inhibitörler GOLD doklama programı kullanılarak AutoDock programına ilaveten tekrar nNOS, eNOS ve iNOS enzimlerine doklanmıştır. İnhibitörlere ait skor değerleri (GoldScore, ChemScore ve ChemPLP) **Tablo 13**'te verilmiştir. Burada yüksek değerler daha iyi inhibitör anlamına gelmektedir. Gold sonuçları AutoDock doklama sonuçları ile çok fazla uyum göstermemiştir. Genel olarak Gold skorları bu inhibitörlerin nNOS enzimine eNOS'dan daha iyi, iNOS enzimine birkaç sonuç hariç nNOS'tan biraz daha iyi olduğu görülmektedir (her ne kadar aradaki farklılıklar çok fazla değilse de AutoDock sonuçları ile tam bir uyum göstermemiştir). GOLD doklama skorları kendi içinde de bazı farklılıklar içermektedir. Bunun nedeni değişik parametreleri dikkate alan değişik skorlama fonksiyonlarının kullanılıyor olmasıdır. Literatürlerde değişik doklama yazılımlarının aynı enzim ve aynı inhibitörler için farklı sonuçlar verdiği bilinen bir gerçektir<sup>22,23</sup>. Bu aşamada yarı deneysel skorlama fonksiyonunu kullanan AutoDock sonuçları ile devam etmek ilk sentez denemeleri için yeterli olacağı görüşündeyiz.

İndan halkası Şekil 9'da görüldüğü gibi ARG185 ile fenil halkası bir  $\pi-\pi$  girişiminde bulunmaktadır. İnhibitörün etrafı hidrofobik (VAL106, LEU105, ALA182, ALA179, PHE475) ve polar amino asitler (ASP446, ASN468, TYR477, ASN182) ile çevrilmiştir. Diğer taraftan Şekil 10'da görüldüğü gibi aynı inhibitör iNOS enzimi içerisinde indan halkasının N-H grubu ASN354 ile bir hidrojen bağı, histidine halkası ile de ARG288 bir  $\pi-\pi$  yapmaktadır. Bu inhibitörü çevreleyen amino asit resüdüleri ise MET355, GLN492, TYR491, THR121, GLY371, PRO350 ve GLU377 dir. Şekil 11'de ise KN5 inhibitörünün nNOS enzimi içinde 2D ve 3D görüntüleri verilmiştir. Burada ise indan halkası ARG653, ARG481 ile iki tane  $\pi-\pi$  girişimi yapmaktadır. Bunlara ilaveten indan halkasının N-H grubu GLN478 ile kuvvetli bir hidrojen bağı yapmaktadır. Bu çevreleyen amino asit resüdüleri ise ASN569, ASP597, ARG596, TRP678, PHE584, GLY586, PRO565, GLU592, TYR588 ve MET570dir. Bu bağlanma modundan hem daha kuvvetli hidrojen bağı ve 2 tane  $\pi-\pi$  bağı yapan inhibitörün neden KN5 kodlu inhibitörün nNOS enzimine daha iyi bağlandığını açıklamaktadır.

nNOS enzimine henüz denenmemiş fakat Doklama ve De Novo Design'ın Discovery Studio yöntemi ile KN5, KN7, KN10 ve KN11 gibi inhibisyon katsayıları düşük ve ADMET değerleri çok iyi olduğundan potansiyel ilaç adayları olarak seçilmiştir. KN5 bileşiğinin KN10 ve KN11 ve KN12-KN19 bileşiklerinden nNOS seçiciliği çok daha iyidir (n/e 10.68, n/i ise 16.25). Nitel olarak bu bileşik hem bağlanma motifi, inhibisyon, ADMET ve seçicilik bakımından tablodaki en iyi bileşiktir.

Bu bileşiklerinin ilerdeki projelerde sentezlenerek, bu enzimlerle denenmesi görüşündeyiz.

## 8. Referanslar

1. Fengtian Xue, Jinwen Huang, Haa Ji, Jianguo Fang, Huiying Li, Pavel Martasek, Linda J. Roman, Thomas L. Poulos, Richard B. Silverman, Structure-based Design, Synthesis, and biological evaluation of lipophilic-tailed monocationic inhibitors of neuronal nitric oxide synthase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 6526-6537 (2010).
2. Ji H., Stanton B.Z. Igarashi J., Li H., Martasek P., Roman L.J., Poulos T.L., Silverman R.B., Minimal Pharmacophoric Elements and Fragment hopping, an approach directed at Molecular Diversity and Isozyme Selectivity. Design of Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhiitors., *J.Am.Chem.Soc.*, 130, 3900-3914 (2008).
3. Silverman R.B. Design of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases, *Accounts of Chemical Research*, 42, 439-451 (2009).
4. Silvia L. Delker, Fengtian Xue, Huiying Li, Joumana Jamal, Richard B. Silverman, Thomas L. Poulos, Role of Zinc in Isoform-Selective Inhibitor Binding to Neuronal Nitric Oxide Synthase, *Biochemistry*, 49, 10803-10810 (2010).
5. Jiwon Seo, Jotato Igarashi, Huiying Li, Pavel Martasek, Linda J. Roman, Thomas L. Poulos, R.B. Silverman, Structure- Based Design and Synthesis of N-Nitro-L-Arginine-Containing Peptidomimetics as Selective Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. Displacement of the Heme Structural Water, *J. Med. Chem.*, 50, 2089-2099 (2007).
6. Haitao Ji, Jose A. Gomez-Vidal, Pavel Martasek, Linda J. Roman, Richard B. Silverman, Conformationally Restricted Dipeptide Amides as Potent and Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors, *J. Med. Chem.*, 49, 6254-6263 (2006).
7. Haitao Ji, Huiying Li, Mack Flinspach, Thomas L. Poulos, Richard B. Silverman, Computer Modeling of Selective Regions in the Active Site of Nitric Oxide Synthases: Implication for the Design of Isoform-Selective Inhibitors, *J. Med. Chem.*, 46, 5700-5711 (2003).
8. Marion Cowart, Elizabeth A. Kowaluk, Jerome F. Daanen, Kathy L. Kohihaas, Karen M. Alexander, Frank L. Wagenaar, James F. Kerwin Jr, Nitroaromatic Amino Acids as Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase, *J. Med. Chem.*, 41, 2636-2642 (1998).
9. Dennis J. Stuehr, Enzymes of the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway, *J.Nutr.*, 134, 2748S-2751S (2004).
10. Henry Q. Zhang, Walter Fast, Michael A. Marletta, Pavel Martasek, Richard B. Silverman, Potent and Selective Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase by N-Propyl-L-Arginine, *J. Med. Chem*, 40, 3869-3870 (1997).

- 11.** Fengtian Xue, James M. Kraus, Kristin Jansen Labby, Haitao Ji, Jan Mataka, Guoyao Xia, Huiying Li, Silvia L. Delker, Linda J. Roman, Pavel Martasek, Thomas L. Poulos, Richard B. Silverman, Improved Synthesis of Chiral Pyrrolidine Inhibitors and Their Binding Properties to NEURONAL Nitric Oxide Synthase, *J. Med. Chem.* 54, 6399-6403 (2011).
- 12.** Barry G. Shearer, Shuliang Lee, Jeffrey A. Oplinger, Llod W. Frick, Edward P. Garvey, Eric S. Furtine, Substituted N-Phenylisothioureas: Potent Inhibitors of Human Nitric Oxide Synthase with Neuronal Isoform Selective, *J. Med. Chem.*, 40, 1901-1905 (1997).
- 13.** Jon L. Collins, Barry G. Shearer, Jeffrey A. Oplinger, Shuliang Lee, Edward P. Garvey, Mark Salter, Claire Duffy, Thimysta C. Burnette, Eric S. Furtine, N-Phenylamidines as Selective Inhibitors of Human Neuronal Nitric Oxide Synthase: Structure-Activity Studies and Demonstration of in Vivo Activity, *J. Med. Chem.*, 41, 2858-2871 (1998).
- 14.** Jung-Mi Hah, Pavel Martasek, Linda J. Roman, Richard B. Silverman, Aromatic Reduced Amide Bond Peptidomimetics as Selective Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase, *J. Med. Chem.* 46, 1661-1669, (2003).
- 15.** Jiwon Seo, Jotato Igarashi, Huiying Li, Pavel Martasek, Linda J. Roman, Thomas L. Poulos, R.B. Silverman, Structure- Based Design and Synthesis of N-Nitro-L-Arginine-Containing Peptidomimetics as Selective Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase. Displacement of the Heme Structural Water, *J. Med. Chem.*, 50, 2089-2099 (2007).
- 19.** Fengtian Xue, Jianguo Fang, Silvia L. Delker, Huiying Li, Pavel Martasek, Linda J. Roman, Thomas L. Poulos, Richard B. Silverman, Symmetric Double-Headed Aminopyridines, a Novel Strategy for Potent and Membrane-Permeable Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase, *J. Med. Chem.*, 54, 2039-2048 (2011).
- 20.** Irwin J J, Shoichet B K, (2005), ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening”, *J. Chem. Inf. Model.* 45(1), 177–182.
- 21.** Ebru Demet Akdoğan, Burak Erman, Kemal Yelekçi, “In silico design of novel and highly selective lysine-specific histone demethylase inhibitors”, *Turk J Chem*, 35 (2011) 523–542. (doi:10.3906/kim-1102-985).
- 22.** Onodera, K.; Satou, K.; Hirota, H. (2007), Evaluation of molecular docking programs for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* 47, (4) 1609-1618.
- 23.** Cross, J. B.; Thompson, D. C.; Rai, B. K.; Baber, J. C.; Fan, K. Y.; Hu, Y.; Hublet, C. (2009), Comparison of several molecular docking programs: Pose prediction and virtual screening accuracy. *J. Chem. Inf. Model.* 49, (6) 1455-1474.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No: 211T100</b>
<b>Proje Başlığ</b> Nörodejeneratif Hastalıkların Önlenmesine Yönelik <i>In Silico</i> Nöronal Nitrik Oksit Sentaz nNOS Seçimli İnhibitör Tasarımı
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Yürütücü: Prof.Dr. Kemal YELEKÇİ, Araştırmacı: Nurdan KAYRAK
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> <b>Kadir Has Üniversitesi, Mühendislik ve Dpğa Bilimleri Fakültesi, Biyoinformatik ve Genetik Bölümü, Cibali Merkez Kampüsü, Fatih 34083 İstanbul</b>
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Yok
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01.02.2012 - 01.02.2013
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Beyinde nörotransmitter görevi üslenen NO ileri yaşlarda kontrolsüz üretildiğinde doku hasarına ve oksidatif strese sebep olur. Bu durum da Alzheimer, romatoid artrit ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarının oluşumuna katkıda bulunur. Damar iç çeperlerinde endotelial tabakada üretilen NO damara esneklik vererek kan basıncının düşmesine neden olur. Vücudumuza giren mikroplara karşı bizi koruyan makrofajlarda NO molekülünü silah olarak kullanır. Dolayısı ile sadece beyinde üretilen NO molekülünün azaltılması için nNOS enziminin seçimli olarak inhibe edilmesi çok önemlidir. Üç izoenzimin yapısı olağanüstü bir şekilde birbirlerine benzemektedir ve bu benzerlik nNOS seçimli inhibitör tasarımı zora sokmaktadır. Birçok çalışma olmasına rağmen henüz bunu başaracak bir ilaç geliştirilememiştir. Projede hedeflenen izoenzimlerin yapılarını temel alan bilgisayar destekli ilaç tasarımı yararlanılmıştır. Çalışmanın sonucunda nNOS enziminin aktif bağlanma bölgesine seçimli olarak yüksek ilgiyle bağlanan inhibitörlerin yapıları, bağlanma enerjileri ve inhibisyon katsayıları verilmiştir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Nitrik Oksit sentaz, nNOS, eNOS, iNOS, docking, skorlama, moleküler modelleme, <i>in silico</i> tarama.
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Deđil <input checked="" type="checkbox"/> <small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>
<b>Projenin Yapılan Yayınlar:</b> Derleme aşamasında