

T. C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HESAPLAMALI KİMYA DESTEKLİ ANTI-HIV İLAÇ TASARIMI

Selami ERCAN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DIYARBAKIR
Şubat 2012

Oğlum Ali'ye ithaf olunur.

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Selami ERCAN tarafından yapılan “Hesaplamalı Kimya Destekli Anti-HIV İlaç Tasarımı” konulu bu çalışma , jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>
Başkan: Prof. Dr.	Vildan ADAR
Üye : Prof. Dr.	Giray TOPAL
Üye : Prof. Dr.	Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU
Üye : Doç. Dr.	Murat KIZIL
Üye : Doç. Dr.	Mahmut TOĞRUL

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/02/2012

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20...

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŐEKKÖR

Akademik hayatıma yeni bir pencere açan ve bu çerçevede çalıŐmalarım süresince yol gösteren danıŐmanım Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU'na ve kendilerine ayrılması gereken vakitlerimi bu çalışma için kullanmama izin veren tüm sevdiklerime teŐekkürlerimi borç bilirim.

Bu araŐtırmada yer alan nümerik hesaplamaların bir kısmı TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarıım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA Kaynaklarında) gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	VI
ABSTRACT	VIII
TABLO LİSTESİ	X
ŞEKİL LİSTESİ	XI
KISALTMA ve SİMGELER	XXXIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarih Öncesi Dönemde İlaç ve Tıp	2
1.2. Mezopotamya’da İlaç ve Tıp	3
1.3. Mısır’da İlaç ve Tıp	4
1.4. Hindistan’da İlaç ve Tıp	5
1.5. Çin’de İlaç ve Tıp	6
1.6. Yunanistan ve Roma’da İlaç ve Tıp	8
1.6.1. Dört Sıvı	8
1.6.2. Empedocles	8
1.6.3. Hipokratik Yazılar	9
1.6.4. Aristotle	9
1.6.5. Yunan Bitki Geleneği	10
1.6.6. Dioscorides	10
1.6.7. Pliny the Elder	11
1.6.8. Galen	11
1.7. Arap Dünyası	12
1.7.1. Huneyn İbn İshak	13
1.7.2. Ebu Bekir El-Razi	13
1.7.3. Ebu Ali El-Hüseyin İbn Abdullah İbn Sina	13
1.7.4. Ebu El-Kasım El-Zehravi	14
1.7.5. Avrupa’da Arap Tıbbı	14
1.7.6. Toledo	15
1.7.7. Arapça Metinlerin Latince Çevirileri	15
1.8. Rönesans Tıbbı	16

1.8.1. Modern Anatominin Kurucusu Vesalius.....	16
1.8.2. Kan Dolaşımı Keşfi.....	16
1.9. Mikroorganizmaların Dünyası.....	17
1.9.1. Mikroorganizmaların Sınıflandırılması.....	20
1.9.2. Virüsler.....	21
1.9.2.1. Virüslerin Yapısı.....	24
1.9.2.2. Virüslerin Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi.....	25
1.9.2.3. Retrovirüsler.....	27
1.10. Modern Dönem.....	28
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	33
2.1. HIV (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü).....	33
2.1.1. AIDS'in Keşfi.....	34
2.1.2. AIDS'in Belirlenmesi ve Semptomları.....	34
2.1.3. AIDS'in Bulaşma Yolları.....	35
2.1.4. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü'nün (HIV) Keşfi.....	35
2.1.5. Dünya'da ve Türkiye'de HIV/AIDS.....	36
2.1.6. HIV/AIDS İlaçları ve Geliştirilmekte Olan İnhibitörler.....	36
2.1.7. HIV Hayat Döngüsü.....	37
2.1.8. HIV Viryon Yapısı ve Genomu.....	40
2.1.8.1. Yapısal Proteinler.....	44
2.1.8.2. Zarf Proteinleri.....	46
-Transmembran Proteini (gp41).....	46
-Yüzey Proteini (SU).....	47
2.1.8.3. Yardımcı Proteinler.....	47
-Negatif Faktör.....	47
-Viryon Proteinleri İfadesi Düzenleyicisi.....	48
-Transaktivatör Proteini.....	48
-Viral Enfektivite Faktörü.....	48
-Viral Protein R.....	49
-Viral Protein X.....	49
-Viral Protein U.....	49
2.1.8.4. Viral Enzimler.....	49
-Ters transkriptaz.....	50
-Proteaz.....	51

2.1.9. HIV-1 İntegraz	52
2.1.9.1. İntegrazın Yapısı	53
- N-terminal Bölgesi	55
- Katalitik Öz Bölgesi	57
- C-terminal Bölgesi.....	60
2.1.9.2. İntegrazın Fonksiyonları	61
2.1.9.3. Giriş Mekanizması	62
2.1.10. HIV-1 İntegraz ile İlgili Bilgisayar Destekli Çalışmalar	67
2.2. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı ve İlaç Geliştirme İşlemleri.....	69
2.2.1. Ligand Temelli İlaç Tasarımı.....	75
2.2.1.1. İstatistiksel Yöntemler (QSAR).....	76
2.2.1.2. Kemoinformatikler.....	77
2.2.1.3. Farmakoforlar	77
2.2.2. Yapı Temelli İlaç Tasarımı	78
2.2.2.1. Protein Yapısını Belirleme.....	79
-Homoloji Modelleme.....	80
-Katlanma Bölgelerinin Tanınması.....	80
- <i>Ab initio</i> Protein Modellenmesi.....	81
-Aktif Bölgenin Belirlenmesi.....	81
2.2.2.2. De Novo	81
2.2.2.3. Ligand Yerleştirme	82
2.2.2.4. Moleküler Dinamik.....	84
2.2.3. ADMET Modeli.....	84
2.2.4. Kombinatoriyal Kütüphane Tasarımı.....	85
2.3. Moleküler Modelleme ve Hesaplamalı Kimya	87
2.3.1. Kuantum Mekanik	88
2.3.1.1. Temel Setler	90
2.3.2. Moleküler Mekanik.....	90
2.3.3. Enerji Yüzeyleri ve Enerji Görünümü	92
2.3.4. Enerji Minimizasyonu.....	95
2.3.4.1. Türeve Dayalı Minimizasyon Yöntemleri	96
2.3.5. Monte Carlo Metodu.....	97
2.3.6. Moleküler Dinamik Metotları	99
2.3.6.1. Simüle Edilen Çevre	103

2.3.6.2. Çözücü Modeli.....	104
2.3.6.3. Kuvvet Alanları.....	106
2.3.7. Bağlanma Serbest Enerjisi	108
3. MATERYAL ve METOT.....	111
3.1. Materyal	111
3.2. Metot.....	112
3.2.1. HIV-1 İntegrazın Üç Boyutlu Yapısının Hazırlanması.....	112
3.2.2. C-terminal Bölgesinin Eksik Kalıntıları	114
3.2.3. Tam Uzunluktaki İntegraz Modelinin Hazırlanması.....	116
3.2.4. Çinko ve Çinkoya Bağlı Kalıntı Parametrelerinin Hazırlanması	117
3.2.5. N-terminal Bölgesinin Hazırlanması	120
3.2.6. Katalitik Öz Bölgesinin Hazırlanması	120
3.2.7. C-terminal Bölgesinin Hazırlanması.....	120
3.2.8. Ligand Taraması ve Ligand Tasarımı	121
3.2.9. Ligandların Yerleştirilme Çalışmaları için Hazırlanması	126
3.2.10. Ligand Yerleştirme Çalışmaları.....	126
3.2.11. Komplekslerin Hazırlanması.....	128
3.2.12. Moleküler Dinamik Hesaplamaları.....	129
3.2.12.1. N-terminal Bölgesinin Moleküler Dinamik Hesaplamaları	129
3.2.12.2. Katalitik Öz Bölgesinin Moleküler Dinamik Hesaplamaları	130
3.2.12.3. C-terminal Bölgesinin Moleküler Dinamik Hesaplamaları	131
3.2.12.4. Tam Uzunluktaki HIV-1 İntegraz Modellerinin MD Hesaplamaları.....	132
3.2.12.5. Komplekslerin Moleküler Dinamik Çalışmaları.....	133
3.2.13. MM/PBSA ile Ligandların Bağlanma Sabitlerinin Hesaplanması.....	134
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	135
4.1. HIV-1 İntegrazın 3 Boyutlu Yapılarının MD Simülasyonu Analizleri.....	135
4.2. Ligandların Hazırlanması Çalışmaları	172
4.3. Ligand Yerleştirme Çalışmaları	173
4.4. Komplekslerin Moleküler Dinamik Hesaplamaları Sonuçları.....	196
4.5. Bağlanma Serbest Enerjileri.....	378
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	388
6. KAYNAKLAR	393

ÖZET

HIV İNTEGRAZ İÇİN HESAPLAMALI KİMYA DESTEKLİ İLAÇ TASARIMI

DOKTORA TEZİ

Selami ERCAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2012

Dünya nüfusunu büyük oranda tehdit eden AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) hastalığına neden olan HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Type-1) virüsüdür. HIV-1 integraz, virüs hayat döngüsünde önemli roller alan üç proteinden biri olup viral DNA'nın konak kromozomal DNA'sına girişinden sorumludur. İntegraz, N-terminal bölgesi (1-49 kalıntıları), katalitik öz bölgesi (50-212 kalıntıları) ve C-terminal bölgesi (213-288 kalıntıları) olarak isimlendirilen üç bölgeden oluşan 32 kDa'luk bir enzimdir. Her ne kadar şu anda HIV integrazın tam uzunluktaki üç boyutlu yapısı mevcut olmasa da kesilmiş proteinin N-terminal, katalitik öz ve C-terminal bölgelerinin tek başlarına ve N-terminal-katalitik öz, katalitik öz-C-terminal ikili bölgelerinin X-ray ve NMR destekli üç boyutlu yapıları yayınlanmış ve bunlar Protein Data Bank'ta rapor edilmiştir.

Moleküler dinamik hesaplamalar için AMBER 9 ve AMBER 11 paket programları kullanılırken ligand yerleştirme işlemleri için ise AutoDock 4.2, Dock 6.5, ve AutoDock Vina 1.2 programları kullanıldı. Komplekslerin bağlanma enerjileri MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area) yaklaşımıyla Perl ve Python ile derlenen iki versiyonu kullanılarak yapıldı.

Bu çalışmada integrazın ayrı bölgeleri için mevcut X-ray yapıları bir araya getirilerek ve eksik olan kalıntılar tamamlanarak 288 amino asit kalıntısı barındıran tam uzunlukta bir yapı tasarlandı. Bu yapının yanı sıra üç bölgenin moleküler dinamik (MD) hesaplamalar ile kararlılıkları test edildi. Viral DNA'nın kesilmesi ve viral DNA'nın konak hücre genomuna bağlanmasında rol alan katalitik öz bölgesine 31 tanesi daha önce deneysel olarak literatürde çalışılmış, 4 tanesi (L32, L33, L34 ve L35) daha önce IN inhibitörü çalışmasında kullanılmamış ve 5 tanesi de (LGA, LGB, LGC, LGD ve LGE) yeni tasarlanmış toplam 40 ligand yerleştirildi. Yerleştirme programlarından Autodock ve Dock'ın birbirlerine paralel sonuçlar verdiği belirlenirken aynı ligandlar için Vina farklı sonuçlar vermiştir. Ligandlar için Autodock programı -5.06 ile -11.93 kcal/mol aralığında yerleştirme skorları verirken bunların 12 tanesi -10 kcal/mol altında yerleştirme skoruna sahip olup, üç tanesi (LGA, LGB ve LGE) yeni tasarlanan ligandlardan oluşmaktadır. Aynı ligandlar için Dock programı -33.79 ile -94.41 kcal/mol aralığında yerleştirme skorları verirken bunların 19 tanesi -50 kcal/mol altında yerleştirme skoruna sahip olup dört tanesi (LGA, LGB, LGC ve LGE) yeni tasarlanan ligandlardandır. Vina yerleştirme skorlarının dar bir aralıkta (-4.6 ile -8.0 kcal/mol) olduğu ve üretilen skorların birbirine yakın olduğu görüldü. HIV integraz inhibitörü olarak kullanılan

Raltegravir'in Autodock, Dock ve Vina yerleştirme skorları orta derecede olup sırasıyla -6.40, -51.85 ve -7.2 kcal/mol olarak bulundu.

Tasarlanan yeni ligandların yanında yerleştirme skorları iyi olan ligandların oluşturdukları komplekslerin MD hesaplamaları yapıldı. Bunların 25'i Autodock, 22'si Dock ve 17'si Vina ile hazırlanmış komplekslerden oluşmaktadır. Ligandların Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle hazırlanan komplekslerdeki koordinatları seçilerek tam uzunluktaki proteinin bu ligandlar ile oluşturdukları 4 kompleksin MD hesaplamaları da yapıldı.

MM/PBSA programının Perl ve Python ile derlenen iki versiyonu kullanılarak hesaplanan bağlanma enerjileri arasında uyum olduğu belirlendi. Autodock ile hazırlanan komplekslerin, Perl ile hesaplanan bağlanma enerji değerleri -2.85 ile -86.06 kcal/mol arasında değiştiği gözlenirken ligandlardan 9 tanesi -40 kcal/mol altında enerji değerlerine sahip olup bir tanesi (LGE) yeni tasarlanan ligandlardan olmuştur. Dock ile hazırlanan komplekslerde bağlanma enerjilerinin -0.37 ile -84.05 kcal/mol arasında değiştiği gözlenirken, ligandların 6 tanesinin -40 kcal/mol altında enerji değerlerine sahip olduğu ve iki tanesinin (LGA ve LGB) yeni tasarlanan ligandlardan oluştuğu belirlenmiştir. Vina ile hazırlanan komplekslerde, bağlanma enerjilerinin -3.07 ile -40.79 kcal/mol arasında değiştiği gözlenirken sadece yeni tasarlanan ligandlardan LGB'in -40 kcal/mol altında bir değere sahip olduğu görülmüştür.

Tam uzunluktaki protein ve bu proteinin bazı ligandlarla oluşturdukları komplekslerin MD davranışları incelendiğinde tam uzunluktaki yapının katalitik öz bölgesinde anlamlı konformasyonel değişikliklere yol açmadığı ve dolayısıyla katalitik bölgenin ligandlarla oluşturdukları komplekslerin bağlanma enerjilerine anlamlı katkı yapmadığı görüldü.

Sonuç olarak X-ray yapısı bilinmeyen ve HIV-1 için yeni bir ilaç hedefi olan integrazın üç boyutlu yapısı başarılı bir şekilde oluşturulmuş ve bu yapının MD davranışları çalışılmıştır. Bu proteinin katalitik öz bölgesinin biyolojik aktivitesini inhibe edebilecek hali hazırda çalışılmış ve yeni tasarlanan inhibitörlerin bu bölge ile oluşturdukları komplekslerin MD davranışları bu ligandlardan bazılarının bu protein için ciddi inhibitör adayı olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Hesaplamalı Kimya, AIDS, HIV-1, İntegraz, Moleküler Dinamik, Ligand Yerleştirme, Modelleme, İlaç Tasarımı, Bağlanma Enerjisi, MM/PBSA.

ABSTRACT

COMPUTER AIDED DRUG DESIGN FOR HIV INTEGRASE

PhD THESIS

Selami ERCAN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF DICLE

2012

HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Type-1) is the cause of AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) which treat a very large population in the World. HIV-1 integrase is one of three proteins playing crucial roles in virus life cycle. Integrase inserts viral DNA into host chromosomal DNA. It is composed of three domains, called N-terminal domain (1-49 residues), catalytic core domain (50-212 residues) and C-terminal domain (213-288 residues) with a weight of 32 kDa. Although the 3D structure for the protein has not been fully resolved but they have been resolved for the domains by X-ray and NMR techniques and all of these structures have been reported at Protein Data Bank.

Molecular dynamics (MD) and MM/PBSA calculations were performed with AMBER 9 and AMBER 11 programmes while docking studies were employed by AutoDock 4.2, Dock 6.5, and AutoDock Vina 1.2. Binding free energies of each complex were obtained from MM/PBSA (Molecular Mechanic/Poisson-Boltzmann Surface Area) calculations.

In this work, the full-length (288 residues) 3D structure of integrase was constructed by gathering the resolved structures and completing the missing residues. Molecular dynamics calculations were performed to see the stability and dynamic behaviours of the constructed full-length structure as well as those of three domains by comparing with corresponding original domains. A total of 40 ligands (4 of them have not been used as integrase inhibitor before (L32, L33, L34, and L35) and 5 of them has been newly designed (LGA, LGB, LGC, LGD, and LGE)) were docked into the catalytic domain, taking part in the cleavage of viral DNA and joining of viral DNA into host DNA. Autodock and Dock gave parallel docking scores while Vina's scores were different for same ligands. Autodock has produced docking energy scores for the ligands ranging from -11.93 to -5.06 kcal/mol where 12 of them had scores below -10 kcal/mol, among which three of them (LGA, LGB, and LGE) were newly designed while Dock has produced docking energy scores ranging from -94.41 to -33.79 kcal/mol where 19 of them had scores below -50 kcal/mol, among which four of them (LGA, LGB, LGC, and LGE) were newly designed. On the other hand, Vina has produced docking energy scores with a very narrow range (-8.0 to -4.6 kcal/mol). Docking scores found for Raltegravir, already employed as a HIV integrase inhibitor, using Autodock, Dock and Vina were moderate, -6.40, -51.85 and -7.2 kcal/mol, respectively.

MD calculations were performed for the complexes of the ligands with good docking scores as well as for all newly designed ones. They include 25 complexes prepared by Autodock, 22 complexes prepared by Dock and 17 complexes prepared by Vina. MD

calculations were also carried out for the complexes of four ligands with the full-length protein, which were prepared by Dock using the initial coordinates in their complexes with the catalytic core domain. A consistency in the binding energies was found between Perl and Python versions of MM/PBSA. The binding energies calculated by Perl for the complexes prepared by Autodock were in the range of -86.06 to -2.85 kcal/mol where 9 ligands had a binding energy below -40 kcal/mol, including one newly designed ligand (LGE) while the binding energies for the complexes prepared by Dock vary from -84.08 to -0.37 kcal/mol where 6 of the ligands had a binding energy below -40 kcal/mol, including two newly designed ligands (LGA and LGB) whereas the binding energies for the complexes prepared by Vina were between -40.79 and -3.07 kcal/mol and only the newly designed LGB had a binding energy below -40.0 kcal/mol.

MD calculations performed for the complexes of the full-length protein with the ligands showed that the introduction of the missing part of HIV integrase to the catalytic core does not have significant influence on the dynamic behaviors of the protein as well as on the complex stability compared with the catalytic core domain alone.

In conclusion, the 3D structure of HIV-1 integrase whose X-ray structure has not been fully resolved was successfully constructed and its dynamic behaviours were studied by MD calculations. MD calculations for the complexes of ligands already showing potential inhibition as well as newly designed ones with the catalytic core indicated that some of the ligands, mostly newly designed have a promising inhibition profile against this protein.

Key Words: Computataional Chemistry, AIDS, HIV-1, Integrase, Molecular Dynamics, Docking, Modelling, Drug Design, Binding Energy, MM/PBSA.

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Virüs ve Bakterilerin Karşılaştırılması	24
Tablo 3.1. MD çalışmaları için seçilen aminoasit bölgeleri ve yeni yapıların isimleri	117
Tablo 3.2. Katalitik Çinko Bağlı Histidinler için Atom Tipleri ve Yükleri	118
Tablo 3.3. Katalitik Çinko Bağlı Sisteinler için Atom Tipleri ve Yükleri	119
Tablo 3.4. Katalitik Çinko için Bağ Parametreleri	119
Tablo 3.5. Katalitik Çinko için Açık Parametreleri	120
Tablo 3.6. Katalitik Çinko için Dihedral Parametreleri	120
Tablo 3.7. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar	122
Tablo 4.1. E1 ve E2 yapılarında metal bölgelerindeki kalıntı atomları arasındaki ortalama mesafeler	169
Tablo 4.2. Ligandların katalitik öz bölgesine farklı programlarla yerleştirilme skorları	175
Tablo 4.3. MD hesaplamaları sonucu komplekslerdeki Mg atomu ile Mg atomuna yakın atomlar arasındaki ortalama mesafeler	375
Tablo 4.4. Ligandların Autodock, Dock ve Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle hazırlanan ve MD hesaplamaları sonucu MM/PBSA ile kcal/mol cinsinden bulunan bağlanma enerjileri	379
Tablo 4.5. Ligandların Autodock, Dock ve Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle hazırlanan ve MD hesaplamaları sonucu MM/PBSA ile bulunan bağlanma enerjilerine kcal/mol cinsinden elektrostatik enerji ve van der Waals katkıları	381
Tablo 4.6. Ligandların E1 yapısı ile oluşturdukları komplekslerde MM-PBSA metodunun Perl versiyonu kullanılarak belirlenen bağlanma enerjileri ve bağlanma enerjilerine elektrostatik enerji ve van der Waals etkileşimlerinin katkıları	382

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Mikrobiyoloji Alanındaki Gelişmeler	19
Şekil 1.2.	Mikroorganizmaların genel sınıflandırması	21
Şekil 2.1.	HIV-1 hayat döngüsü	38
Şekil 2.2.	HIV genomu ve IN proteini bölge yapısı	41
Şekil 2.3.	Hiv Viryonunun genel yapısı ve çeşitli görüntüleri	42
Şekil 2.4.	Olgun HIV viryon yapısı yapısal olarak karakterize edilmiş viral proteinler ve protein parçalarının ribbon görüntüleri ile çevrelenmiştir	43
Şekil 2.5.	HIV-1 ters transkriptaz yapısı	50
Şekil 2.6.	HIV-1 Proteaz'ın saquanavir inhibitörü içeren x-ray yapısı	51
Şekil 2.7.	HIV-1 integrazın bölgeleri	54
Şekil 2.8.	HIV-1 İntegraz N-terminal Bölgesi	56
Şekil 2.9.	HIV-1 İntegraz Katalitik Öz Bölgesi	58
Şekil 2.10.	Hareketli ilmeğin 1BL3.pdb ve 2ITG.pdb yapısındaki konformasyonu	60
Şekil 2.11.	HIV-1 İntegraz C-terminal Bölgesi	61
Şekil 2.12.	Viral DNA'sının konak DNA'sına girişinin bir moleküler mekanizması; HIV-1 İntegraz tarafından katalizlenen A) 3'-işleme reaksiyonu, B) DNA zincir transfer reaksiyonu	64
Şekil 2.13.	İki metal-iyonu katalizi ve inhibisyon mekanizması	66
Şekil 2.14.	Bilgisayar destekli ilaç tasarımının örnek bir akış şeması	71
Şekil 2.15.	Basitleştirilmiş ilaç keşfi işlemi	74
Şekil 2.16.	Protein yapı hiyerarşisi	79
Şekil 2.17.	Kombinatoryal sentez. Amitlerin kombinatoryal kütüphanesi amin ve karboksilik asitlerden inşa edilebilmektedir.	86
Şekil 2.18.	Klasikten modern fiziğe geçişi sağlayan keşifler	88
Şekil 2.19.	Moleküler mekanik (kuvvet alanı) metodu ile bir molekülün temsil edilmesi	91
Şekil 2.20.	Çözücü sisteminin iki boyutlu yapısı	104
Şekil 3.1.	İncelenen HIV-1 İntegraz kristal yapılarının amino asit dizilişi	113

Şekil 3.2.	AMBER ve Modeler programları ile hazırlanan 18 kalıntılık yapılar	115
Şekil 4.1.	A proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri	135
Şekil 4.2.	A proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi	136
Şekil 4.3.	A proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerinin 1K6Y.pdb (N-terminal bölgesinin türetildiği yapı) yapısı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü	137
Şekil 4.4.	A proteininin MD hesaplamaları sonucu elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi	138
Şekil 4.5.	A proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)	138
Şekil 4.6.	B proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri	139
Şekil 4.7.	B proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi	140
Şekil 4.8.	B proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerinin 1BL3.pdb (Katalitik öz bölgesinin türetildiği yapı) yapısı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü	140
Şekil 4.9.	Magnezyum iyonunun başlangıç (1BL3.pdb) ve B proteininde MD hesaplamalar sonucu oluşan konumu	141
Şekil 4.10.	B proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi	142
Şekil 4.11.	B proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)	142
Şekil 4.12.	C1 proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri	143
Şekil 4.13.	C1 proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi	144

Şekil 4.14.	C1 proteininin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerinin 1EX4.pdb (C-terminal bölgesinin türetildiği yapı) yapısı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü	144
Şekil 4.15.	C1 proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi	145
Şekil 4.16.	C1 proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)	146
Şekil 4.17.	C2 proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri	147
Şekil 4.18.	C2 proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi	147
Şekil 4.19.	C2 proteininin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerinin 1EX4.pdb (C-terminal bölgesinin türetildiği yapı) yapısı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü	148
Şekil 4.20.	C2. proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi	149
Şekil 4.21.	C2 proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)	149
Şekil 4.22.	D proteininin 30 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri	151
Şekil 4.23.	D proteininin 30 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi	151
Şekil 4.24.	D proteininin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin, başlangıç yapısı (1K6Y.pdb, 1WJD.pdb, 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb) ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü.	152
Şekil 4.25.	D proteininin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin A, B ve C1 yapılarının MD sonucu elde edilen ve düşük enerjili bir konformere tekabül eden yapılar ile üst üste çakışmasından elde edilen görüntü	153
Şekil 4.26.	D proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi (son 15 ns)	154

Şekil 4.27.	D proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)	155
Şekil 4.28.	E1 proteininin 30 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri	157
Şekil 4.29.	E1 proteininin 30 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi	158
Şekil 4.30.	E1 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin (1K6Y.pdb, 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb) yapıları ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü.	159
Şekil 4.31.	E1 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin A, B ve C2 yapılarının MD sonucu elde edilen ve düşük enerjili bir konformere tekabül eden yapılar ile üst üste çakışmasından elde edilen görüntü	160
Şekil 4.32.	E1 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin D için (1-270 uzunluğundaki yapı) elde edilen düşük enerjili bir yapı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü	161
Şekil 4.33.	E1 proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi (son 15 ns)	162
Şekil 4.34.	E1 proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)	163
Şekil 4.35.	E2 proteininin 15 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri	164
Şekil 4.36.	E2 proteininin 15 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi	165
Şekil 4.37.	E2 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin E1 ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü	166
Şekil 4.38.	E1 proteininde metallere bağlı kalıntı (A: Zn atomuna bağlı kalıntılar B: Mg atomuna bağlı kalıntılar) atomları arasındaki mesafelerin MD simülasyonu süresince değişimi	167
Şekil 4.39.	E1 proteininden metallerin çıkarılması ile oluşturulan E2 proteininde metaller ile ilgili kalıntı (A: Zn atomuna bağlı kalıntılar B: Mg atomuna bağlı kalıntılar) atomları arasındaki mesafelerin MD simülasyonu süresince değişimi	168

Şekil 4.40.	N-terminal bölgesinin HHCC motifindeki kalıntıların Zn atomu varlığında (E1.pdb) ve yokluğunda (E2.pdb) aralarındaki mesafeler	169
Şekil 4.41.	Katalitik öz bölgesinin DDE motifindeki kalıntıların Mg atomunun varlığında (E1.pdb) ve yokluğunda (E2.pdb) aralarındaki mesafeler	170
Şekil 4.42.	E2 proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi	171
Şekil 4.43.	E2 proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)	172
Şekil 4.44.	Keto-enol formları arasındaki enerji farkları	173
Şekil 4.45.	L01 ligandının 1QS4.pdb yapısına üç ayrı programla yerleştirilmesi ve ligandın X-ray koordinatları	174
Şekil 4.46.	L01 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	176
Şekil 4.47.	L02 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	176
Şekil 4.48.	L02t ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	177
Şekil 4.49.	L03 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	177
Şekil 4.50.	L04 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	178
Şekil 4.51.	L05 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	178
Şekil 4.52.	L06 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	179
Şekil 4.53.	L07 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	179
Şekil 4.54.	L08 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	180
Şekil 4.55.	L09 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	180
Şekil 4.56.	L10 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	181
Şekil 4.57.	L11 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	181
Şekil 4.58.	L12 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	182
Şekil 4.59.	L13 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	182
Şekil 4.60.	L14 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	183
Şekil 4.61.	L15 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	183
Şekil 4.62.	L16 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	184

Şekil 4.63.	L17 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	184
Şekil 4.64.	L18 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	185
Şekil 4.65.	L19 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	185
Şekil 4.66.	L20 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	186
Şekil 4.67.	L21 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	186
Şekil 4.68.	L22 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	187
Şekil 4.69.	L23 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	187
Şekil 4.70.	L24 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	188
Şekil 4.71.	L25 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	188
Şekil 4.72.	L26 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	189
Şekil 4.73.	L27 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	189
Şekil 4.74.	L28 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	190
Şekil 4.75.	L29 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	190
Şekil 4.76.	L30 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	191
Şekil 4.77.	L31 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	191
Şekil 4.78.	L32 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	192
Şekil 4.79.	L33 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	192
Şekil 4.80.	L34 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	193
Şekil 4.81.	L35 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	193
Şekil 4.82.	LGA ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	194
Şekil 4.83.	LGB ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	194
Şekil 4.84.	LGC ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	194
Şekil 4.85.	LGD ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	195
Şekil 4.86.	LGE ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi	196
Şekil 4.87.	A) L01 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom01) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	198

Şekil 4.88.	L01 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	199
Şekil 4.89.	A) L01 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom01) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)	200
Şekil 4.90.	L01 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	201
Şekil 4.91.	A) L01 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom01) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	202
Şekil 4.92.	L01 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	203
Şekil 4.93.	İntegrainin katalitik öz bölgesindeki (A: acom01.pdb, B: dcom01.pdb, C: vcom01.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	204
Şekil 4.94.	L01 ligandının katalitik öz bölgesinde (dcom01) ve tam uzunluktaki yapıda (full01) MD hesaplamaları sonucu proteinle etkileşimlerinin karşılaştırılması	205
Şekil 4.95.	L01 ligandının tam uzunluktaki proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin (full01) MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	206
Şekil 4.96.	A) L02 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom02) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	207
Şekil 4.97.	L02 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	208

Şekil 4.98.	A) L02 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom02) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	209
Şekil 4.99.	L02 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	210
Şekil 4.100.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: full01.pdb, B: dcom02.pdb, C: vcom02.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	211
Şekil 4.101.	L02 ligandının katalitik öz bölgesinde (dcom02) ve tam uzunluktaki yapıda (full02) MD hesaplamaları sonucu proteinle etkileşimlerinin karşılaştırılması	212
Şekil 4.102.	L02 ligandının tam uzunluktaki proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin (full02) MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	213
Şekil 4.103.	A) L02t ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom02t) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	214
Şekil 4.104.	L02t ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	215
Şekil 4.105.	A) L02t ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom02t) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	216
Şekil 4.106.	L02t ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	217
Şekil 4.107.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: full02.pdb, B: acom02t.pdb, C: dcom02t.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	218

Şekil 4.108.	A) L03 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom03) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	220
Şekil 4.109.	L03 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	221
Şekil 4.110.	A) L03 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom03) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	222
Şekil 4.111.	L03 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	223
Şekil 4.112.	A) L04 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom04) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	224
Şekil 4.113.	L04 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	225
Şekil 4.114.	İntegrain katalitik öz bölgesindeki (A: acom03.pdb, B: dcom03.pdb, C: acom04.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	226
Şekil 4.115.	A) L04 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom04) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	228
Şekil 4.116.	L03 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	229
Şekil 4.117.	A) L05 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom05) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	230

Şekil 4.118.	L05 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	231
Şekil 4.119.	A) L06 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom06) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	232
Şekil 4.120.	L06 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	233
Şekil 4.121.	İntegrain katalitik öz bölgesindeki (A: dcom04.pdb, B: vcom05.pdb, C: acom06.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	234
Şekil 4.122.	A) L07 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom07) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	236
Şekil 4.123.	L07 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	237
Şekil 4.124.	A) L07 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom07) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	238
Şekil 4.125.	L07 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	239
Şekil 4.126.	A) L13 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom13) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	241
Şekil 4.127.	L13 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	242

Şekil 4.128.	İntegrainın katalitik öz bölgesindeki (A: acom07.pdb, B: vcom07.pdb, C: dcom13.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	243
Şekil 4.129.	A) L13 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom13) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	245
Şekil 4.130.	L13 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	246
Şekil 4.131.	A) L14 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom14) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	247
Şekil 4.132.	L14 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	248
Şekil 4.133.	A) L16 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom16) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	249
Şekil 4.134.	L16 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	250
Şekil 4.135.	İntegrainın katalitik öz bölgesindeki (A: vcom13.pdb, B: vcom14.pdb, C: acom16.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	251
Şekil 4.136.	A) L17 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom17) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	253
Şekil 4.137.	L17 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	254

Şekil 4.138.	A) L17 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom17) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	255
Şekil 4.139.	L17 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	256
Şekil 4.140.	A) L18 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom18) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	257
Şekil 4.141.	L18 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	258
Şekil 4.142.	İntegrainin katalitik öz bölgesindeki (A: acom17.pdb, B: dcom17.pdb, C: acom18.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	259
Şekil 4.143.	A) L18 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom18) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	261
Şekil 4.144.	L18 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	262
Şekil 4.145.	A) L19 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom19) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	263
Şekil 4.146.	L19 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	264
Şekil 4.147.	A) L20 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom20) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	265

Şekil 4.148.	L20 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	266
Şekil 4.149.	İntegrain katalitik öz bölgesindeki (A: dcom18.pdb, B: vcom19.pdb, C: acom20.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	267
Şekil 4.150.	A) L20 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom20) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	269
Şekil 4.151.	L20 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	270
Şekil 4.152.	A) L21 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom21) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	272
Şekil 4.153.	L21 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	273
Şekil 4.154.	A) L21 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom21) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	274
Şekil 4.155.	L21 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	275
Şekil 4.156.	İntegrain katalitik öz bölgesindeki (A: dcom20.pdb, B: acom21.pdb, C: dcom21.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	276
Şekil 4.157.	A) L22 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom22) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	278

Şekil 4.158.	L22 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	279
Şekil 4.159.	A) L22 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom22) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	280
Şekil 4.160.	L22 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	281
Şekil 4.161.	A) L25 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom25) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	282
Şekil 4.162.	L25 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	283
Şekil 4.163.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: acom22.pdb, B: dcom22.pdb, C: acom25.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	284
Şekil 4.164.	A) L25 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom25) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	286
Şekil 4.165.	L25 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	287
Şekil 4.166.	A) L26 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom26) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	288
Şekil 4.167.	L26 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	289

Şekil 4.168.	A) L27 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom27) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	290
Şekil 4.169.	L27 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	291
Şekil 4.170.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: dcom25.pdb, B: acom26.pdb, C: acom27.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	292
Şekil 4.171.	A) L27 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom27) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	294
Şekil 4.172.	L27 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	295
Şekil 4.173.	A) L28 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom28) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	296
Şekil 4.174.	L28 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	297
Şekil 4.175.	A) L29 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom29) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	298
Şekil 4.176.	L29 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	299
Şekil 4.177.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: dcom27.pdb, B: acom28.pdb, C: vcom29.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	300

Şekil 4.178.	A) L32 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom32) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	302
Şekil 4.179.	L32 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	303
Şekil 4.180.	A) L32 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom32) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	304
Şekil 4.181.	L32 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	305
Şekil 4.182.	A) L33 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom33) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	306
Şekil 4.183.	L33 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	307
Şekil 4.184.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: acom32.pdb, B: dcom32.pdb, C: acom33.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	308
Şekil 4.185.	A) L33 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom33) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	310
Şekil 4.186.	L33 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	311
Şekil 4.187.	A) L34 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom34) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	313

Şekil 4.188.	L34 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	314
Şekil 4.189.	A) L34 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom34) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	315
Şekil 4.190.	L34 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	316
Şekil 4.191.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: dcom33.pdb, B: acom34.pdb, C: dcom34.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	317
Şekil 4.192.	A) L34 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom34) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	319
Şekil 4.193.	L34 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	320
Şekil 4.194.	A) L35 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom35) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	321
Şekil 4.195.	L35 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	322
Şekil 4.196.	A) L35 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom35) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	323
Şekil 4.197.	L35 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	324

Şekil 4.198.	A) L35 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom35) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	325
Şekil 4.199.	L35 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	326
Şekil 4.200.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: vcom34.pdb, B: acom35.pdb, C: dcom35.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	327
Şekil 4.201.	A) LGA ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acoma) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	329
Şekil 4.202.	LGA ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	330
Şekil 4.203.	A) LGA ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcoma) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	331
Şekil 4.204.	LGA ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	332
Şekil 4.205.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: vcom35.pdb, B: acom35.pdb, C: dcoma.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	333
Şekil 4.206.	A) LGA ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcoma) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	335
Şekil 4.207.	LGA ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	336

Şekil 4.208.	LGA ligandının katalitik öz bölgesinde (dcoma) ve tam uzunluktaki yapıda (fulla.) MD hesaplamaları sonucu proteinle etkileşimlerinin karşılaştırılması	337
Şekil 4.209.	LGA ligandının tam uzunluktaki proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin (fulla) MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	338
Şekil 4.210.	A) LGB ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acomb) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	339
Şekil 4.211.	LGB ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	340
Şekil 4.212.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: vcoma.pdb, B: fulla.pdb, C: acomb.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	341
Şekil 4.213.	A) LGB ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcomb) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	343
Şekil 4.214.	LGB ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	344
Şekil 4.215.	A) LGB ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcomb) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	345
Şekil 4.216.	LGB ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	346
Şekil 4.217.	LGB ligandının katalitik öz bölgesinde (dcomb) ve tam uzunluktaki yapıda (fullb) MD hesaplamaları sonucu proteinle etkileşimlerinin karşılaştırılması	347
Şekil 4.218.	LGB ligandının tam uzunluktaki proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin (fullb) MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	348

Şekil 4.219.	İntegrainın katalitik öz bölgesindeki (A: dcomb.pdb, B: vcomb.pdb, C: fullb.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	349
Şekil 4.220.	A) LGC ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acomc) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	351
Şekil 4.221.	LGC ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	352
Şekil 4.222.	A) LGC ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcomc) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	353
Şekil 4.223.	LGC ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	354
Şekil 4.224.	A) LGC ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcomc) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	355
Şekil 4.225.	LGC ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	356
Şekil 4.226.	İntegrainın katalitik öz bölgesindeki (A: acomc.pdb, B: dcomc.pdb, C: vcomc.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	357
Şekil 4.227.	A) LGD ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acomd) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	359
Şekil 4.228.	LGD ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	360

Şekil 4.229.	A) LGD ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcomd) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	361
Şekil 4.230.	LGD ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	362
Şekil 4.231.	A) LGD ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcomd) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	364
Şekil 4.232.	LGD ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	365
Şekil 4.233.	İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: acomd.pdb, B: dcomd.pdb, C: vcomd.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	366
Şekil 4.234.	A) LGE ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acome) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	368
Şekil 4.235.	LGE ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	369
Şekil 4.236.	A) LGE ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcome) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	370
Şekil 4.237.	LGE ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	371
Şekil 4.238.	A) LGE ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcome) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi	372

Şekil 4.239.	LGE ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; A) enerji, B) başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi	373
Şekil 4.240.	İntegrainin katalitik öz bölgesindeki (A: acome.pdb, B: dcome.pdb, C: vcome.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi	374
Şekil 4.241.	Autodock ile proteine yerleştirilen ligandların bağlanma enerjisi hesaplamalarında kullanılan programların (Perl/Python) verilerinin karşılaştırılması	384
Şekil 4.242.	Ligandların Autodock ile proteine yerleştirilme skorları ve MMPBSA (Perl) ile elde edilen bağlanma enerjilerinin karşılaştırılması	385
Şekil 4.243.	Ligandların Dock ile proteine yerleştirilme skorları ve MMPBSA (Perl) ile elde edilen bağlanma serbest enerjilerinin karşılaştırılması	386
Şekil 4.244.	Ligandların Vina ile proteine yerleştirilme skorları ve MMPBSA (Perl) ile elde edilen bağlanma serbest enerjilerinin karşılaştırılması	387

KISALTMA ve SİMGELER

Å	: Angstrom
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
ALA	: Alanine
ARG	: Arginine
ASN	: Asparjin
ASP	: Aspartik asit
ASV	: Avian sarkoma virüsü
CA	: Kapsid proteini
CADD	: Computer aided drug design (Bilgisayar destekli ilaç tasarımı)
CD	: Katalitik Bölge
CD4	: Farklılaşma kümesi 4/cluster differentiation 4
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CTD	: C-terminal Bölgesi
CYS	: Sistein
EIAV	: At anemi enfeksiyöz virüs
EVG	: Elvitegravir
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Bakanlığı
GLN	:Glutamin
GLU	: Glutamik asit
GLY	: Glisin
HAART	: Yüksekçe aktif anti-retroviral terapi
HID	: Histidin delta hidrojenli
HIE	: Histidin epsilon hidrojenli
HIS	: Histidin
HIV-1	: Humman Immunodeficiency Virus Tip-1
HIV-2	: Humman Immunodeficiency Virus Tip-2

HTLV-1	: İnsan T-lenfotropik virüs Tip-1 (Human T-lymphotropic virus Type I)
IC ₅₀	: İnhibitör inhibisyon yarı konsantrasyonu
ILE	: İzolösün
IN	: İntegraz
INI	: İntegraz inhibitörü
kDa	: Kilodalton
KM	: Kuantum Mekanik
LAV	: Lenfadenopati ilişkili virüs (lymphadenopathy associated virus)
LEU	: Lösün
LTR	: Uzun terminal tekrarlar (Long Terminal Repeat)
LYS	: Lizin
MA	: Matriks proteini
MC	: Monte Carlo
MD	: Moleküler Dinamik
MET	: Metiyonin
MM	: Moleküler Mekanik
NC	: Nükleokapsid
Nef	: Negatif düzenleyici faktör
NLS	: Çekirdek lokalizasyon sinyali
ns	: Nano saniye
NTD	: N-Terminal Bölgesi
PDB	: Protein data bank
PHE	: Fenilalanin
PI	: Proteaz İnhibitörü
PIC	: Ön entegrasyon kompleksi
PMEMD	: Parçacık Örgüsü Ewald Moleküler Dinamik
PR	: Proteaz

PRO	: Prolin
QSAR	: Kantitatif Yapı-Aktiflik İlişkileri
Rev	: Viryon proteinleri ifadesi düzenleyicisi
RGV	: Raltegravir
RT	: Ters Transkriptaz
RTI	: Ters transkriptaz inhibitörü
SANDER	: NMR-Türevli Enerji Sınırlamaları ile Benzetimli Tavlama
SER	: Serin
SIV	: Maymun immün yetmezlik virüsü
SU	: Yüzey proteini
Tat	: Transkripsiyon transaktivatörü
THR	: Treonin
TM	: Transmembran
TRP	: Triptofan
TYR	: Tirozin
UNAIDS	: Birleşmiş Milletler Ortak HIV/AIDS Programı
VAL	: Valin
Vif	: Viryon enfektivite faktörü
Vpr	: Viral protein R
Vpu	: Viral protein U
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
θ	: Teta
ϕ	: Phi

χ : Chi

ψ : Psi

1. GİRİŞ

Hastalık ve sağlık, karanlık ve aydınlık gibidir. Birinin varlığında diğeri yoktur. Sağlıklı işleyen bir yapıda meydana gelen çeşitli türden bozukluk veya hasarlarla oluşan yeni duruma hastalık denilir. Hastalık halinde, hastalıktan etkilenen yapı (organ, doku, hücre vb.) görevlerini eksik, sıkıntılı yapmaya ya da hiç yapmamaya başlar. Bu durum hem yapı için hem de yapının ait olduğu organizma için tehdit oluşturmaya başlar.

İşte tam da bu durumlarda insanlığın hastalıkla savaşı başlamıştır. Bozulmuş olanı düzeltmek, yeniden işlerlik kazandırmak ve hatta (günümüzde) yenisini yapmak bu savaştaki temel amaçlardan olmuştur.

Tedavi edici ilaçların keşfetme arayışı her zaman egemen sosyal ve kültürel faktörlerden etkilenmiştir. İletişim kurma yeteneğinin en önemli özelliği başkalarından öğrendiklerimizdir. Modern ilaç araştırmalarının başarısı büyük oranda bilimsel sonuçların hızlı ve evrensel yayına bağlılığıdır. Yaklaşık beş bin yıl önce yazının bulunmasından evvel bilgi birikimi ve bilgi nesilden nesile aktarılarak ancak ağızdan ağıza kelimelerle geçebilmiş veya destan ve şiirlerde onların içeriğini ezberleyen ozanlar tarafından söylenmesi ile korunmuştur. Bazı durumlarda, bu beyitler nihayetinde yazıya dökülmüştür.

Yazılı belgelere göre, başlangıçta çoğu toplumların günlük yaşamın küçük rahatsızlıklarını tedavi etmek için şifalı otları deneme yanılma yoluyla seçerek basit bir ampirik yaklaşımı benimsedikleri düşünülmüştür. Sıcak, kumlu çöl şartları burada yaşayanları kuru derilerine ve gözlerine uygulamak üzere rahatlatıcı krem ve losyonları keşfetmeye iterken, yiyecekleri liflerden yoksun olan diğerlerini kabızlıklarını gidermek için çeşitli bitkileri bulmaya sevk etmiştir. Bozulmuş yiyeceklerin yenilmesini izleyen ağrılar, mide duvarını tahriş edici ve kusmayı kolaylaştırıcı bitkilerin yutulmasıyla giderilirken, küçük kesiklerin kanamaları veya yanık ağrıları çeşitli bitki yaprakları veya kanama kesici tanince zengin kabuklarla ovalanarak yapılmaktaydı (Sneader 2006).

Ağır hastalıklar meselenin başka bir parçasını oluşturmaktaydı. Bir an içinde zinde ve sağlıklı iken bir sonraki anda acılar içinde kıvrınma ve hatta ölür hale gelmenin nasıl mümkün olduğunu açıklayamamak, atalarımızı sihir ve doğaüstü güçlere yöneltmiştir. Tedavi etme sanatı, sihir ve din ile içinden çıkılmaz bir şekilde birlikte dokunmuş hale gelmiştir (Powell 1993).

Bir kere gerçekten etkili bir çare bulunduğunda, genellikle alternatiflerinin arayışı sona ermekte veya bizim modern çağımızda olduğu gibi ticari olarak uygun birkaç alternatif ile sınırlandırılmaktaydı. Şu anlatılacak bir noktadır ki geçmişte uygulanan ve hala bazı kesimlerde tercih edilen doğal ürünler sık sık farklı medikal şartların geniş bir yelpazesi için önerilmiştir. Bu antik ilaçların hiçbirinin yararlı etkiye sahip olmadığı anlamına gelmemektedir; yararı olanlar ise bilerek uygulanmasından ziyade istisnaydı.

Felsefeye eğilimli Yunanlılar sahneye geldiklerinde, doğüstü inançlar yerini mantıklı kavramlara bırakmıştır. İlaçların bulunması arayışı hastalığa sebep olduğu düşünülen vücut sıvılarındaki dengesizliği düzeltereği inancı üzerine kurulmuştur. Bu ilaç olarak kullanılacak bitkilerin seçiminde önemli bir etkiye sahip olmuştur.

İkinci yüzyıl hekimlerinden Galen belli bir bilgi birikimine sahip Yunan tıbbını öyle inandırıcı bir şekilde sunmuştur ki on yedinci yüzyıl veya daha sonrasına kadar tıbbi düşünceye hâkim olmuşlardır. Hristiyan Kilisesi'nin sofuluğu, hastaların tedavisinin ancak Allah'ın elinde olduğuna dair inancı desteklemiştir. Yine de ruha dikkat edilmesi gerekliliğine inanılmış ve dolayısıyla bazı manastırlar hastane haline getirilmiştir.

Hristiyan etkisi Arap dünyasına uzanamamıştır. Özellikle dokuzuncu yüzyıl Bağdat'ında Arap hekimleri Yunan meslektaşlarından kalan mirastan çok hoşnut olmuş ve bunu üzerine tedavi bilimine kendi katkılarını uzun uzadıya detaylandırarak eserler derlemişlerdir.

1.1. Tarih Öncesi Dönemde İlaç ve Tıp

Columbia Üniversitesi'nden Ralph Solecki 1975 yılında, 60 bin yıl önce cenin pozisyonunda hazırlanmış Neandertal kemiklerini yeryüzüne çıkardığı Irak'ın kuzeyindeki Zagros Dağlarının Şanidar Mağarasındaki kazıları açıklamıştır (Solecki 1975). Bunun yanında 28 türden çiçeğin çok sayıda polen taneciği bulunmuştur. Bunların yedi tanesi tıbbi otlar olarak kabul edilmiş ve bu otların burada bulunmalarını açıkladığını düşünmüşler (Lietava 1992). Solecki, bu polen taneciklerinin otları toplayıp depolayan bir kemirgen olan Pers sıçanının (*Meriones persicus*), inini kazarken depolamış olabileceğini göz ardı etmiştir. Daha sonra Michigan Üniversitesinden

Jeffrey Sommer Şanidar'daki bu polen taneciği türlerinin sıçanların inlerinde de bulunduğunu göstermiştir (Sommer 1999).

11 bin yıl önce başlayan Neolitik dönemde ilaç kullanımını gösteren dolaylı deliller bulunmuştur. Tayland'ın kuzey batısındaki Spirit Mağarasında bulunan bitki kalıntıları arasında MÖ 7000-5500 yılları arasında buraya yerleştirilmiş hafif psikoaktif hurma (Arek palmyesi) tohumları bulunmuştur (Gorman 1969). İnsanların betel nut (Doğu Hindistan'da yerlilerin çiğnediği bir yemiş) tüketimiyle ilgili ilk doğrudan deliller kireç içeren kabukların yanında gömülü bulunan MÖ 2680 yılına ait Filipinler'in Duyong Mağarasındaki bir iskeletten gelmektedir. Bu, fındığın betel yaprağına sarılması, kireç eklenmesi (bu kolayca absorplanabilen arekolin (bir alkaloid) bazını serbest bırakır.) sonra çiğnenmesi hala Hindistan'da görülen uygulamayı çağrıştırmaktadır. Modern betel nut kullanıcıları gibi Duyong Cave iskeletlerinin dişleri de siyahlaşmıştır (Rudgley 1999).

1.2. Mezopotamya'da İlaç ve Tıp

Mezopotamya'da kullanılan ilaçlar hakkındaki bilgilerin en büyük kaynağı Asur'un son kralı Assurbanipal'in (MÖ 669-626) Ninova Sarayının kütüphanesinden 1920'lerde bulunan 660 kil tablettten sağlanmıştır. Bunların birçoğunun yaklaşık olarak MÖ 1700 yıllarında yazıldığı sanılmaktadır. Bunlar, işgalciler sarayı ateşe verdiklerinde bilmeden pişirilerek korunan yaklaşık 20 bin tablettir. Çoğunun çok eski yazıların kopyası olduğu R. Campbell Thompson tarafından belirlenen tabletler MÖ 3. milenyumdan kalma Sümer isimlerine sahip bazı ilaç isimleriyle birlikte çözülmüştür (Thompson 1924).

Campbell Thompson'ın belirlemeye çalıştığı ve öldükten sonra yayınlanan makalesinde yer alan bitkiler aloe, kürdan bitkisi, anemon (dağ lalesi), anason, asafotida, pelesenk yağı, pancar kökü, çörek otu, karacaot, acı ve siyah it üzümü, esrar, keçiboynuzu vb. otlar içermektedir. Bu bitkilerin çoğunun günümüzde bitkisel ilaç olarak kullanılmasına rağmen onun vardığı sonuçları kabul etmede dikkat etmek gerekir zira bunların çoğu ilaç olarak kullanılmamış olabilir. Antik tabletlerde yer alan ilaçların kimlikleri hakkında problemler olabilir, ama onlar ilaçların nasıl hazırlandığı ve uygulandığı hakkında önemli bilgiler verebilir. Samuel Kramer bilinen en eski farmasötik metin olma ihtimali olan Nippur'da kazılmış dört bin yıllık kil tablet

hakkında yazmıştır. O ve kimyacı Martin Levey tableti tercüme etmişler ve bunun hayvan, sebze ve mineral kaynaklardan oluşan bir düzineden fazla reçete içerdiğini bulmuşlardır. Fakat ilaçların kullanımıyla ilgili hiçbir ayrıntı bulunamamıştır (Sneader 2006).

Mezopotamya’da dini ve mistik sebeplere dayandırılan hastalığın, insanın işlediği günaha karşı verilen bir çeşit ceza olduğu inancı hâkimdir. İnanişâ göre; insan, yasak olan tabuyu bozarsa sağlık tanrıları o kişiyi gözlemekten vazgeçer.

Mezopotamya’da tedavi hastanın işlediği günahı itiraf etmesi, dua ve ayinlerle kurban kesme törenleri, tanrının öfkesini gidermek için kullanılan yöntemlerdi. Muska ve sihir hastalık yapan kötü ruhları çıkartmak için kullanılmıştır. İlk olarak ilaçların ambalajlama ve mühürleme geleneği Mezopotamya’da başlamıştır. Tanrı Marduk’un sembolü olan “ **Rx** ” işareti reçetelerde kullanılmıştır. Tarihte en eski hekim mührünün de Mezopotamya’da kullanıldığı ileri sürülmektedir. İlaçla tedavinin yanı sıra jimnastik, masaj gibi fizik tedavi uygulamaları kullanılmıştır. Hijyenik kuralların bulunduğu Mezopotamya’da yapılan kazılarda, kanalizasyon sistemi ve tuvaletlere rastlanmaktadır. Bulaşma fikrinin varlığını düşündüren uygulamalar da görülmektedir. Babil tıbbi için en önemli belge *Hammurabi Kanunları*’dır. MÖ iki bin yılın başlarında hükümdar olduğu kabul edilen Babil kralı Hammurabi (MÖ 2000-2250); Dünya tarihinde ilk kez meslek yasası (etik kodu) koyan kişidir (Ersoy 2002).

1.3. Mısır’da İlaç ve Tıp

Antik Mısır’da kullanılan ilaçlar hakkındaki en yararlı kayıt eski Mısır bilimci George Ebers tarafından 1872’de Thebes (Teb)’de elde edilen bir dokümandır. Genel olarak Ebers Papirüs’ü olarak bilinir ve tarihi yaklaşık M. Ö. 1550’ye dayanmaktadır. Bu papirüs Thompson’ın Ninova’daki kil tabletlerin tercümesinden elde ettiği ilaçların çoğunu da kapsayacak şekilde 800’den fazla reçeteyi listelemektedir. Bu kültürel alış-veriş Mısır ve Mezopotamya arasındaki ticaret yollarından ileri gelmektedir. Ninova tabletlerinde olduğu gibi reçetelerin çoğu deri ve göz şikâyetleri ile ilgiliyken gastrointestinal şikâyetler için tedaviler de aynı zamanda ortaktı. Son olarak, ilki şüphesiz sıcaklığın ve kumlu ortamın etkisi ve ikincisi büyük ihtimalle o günlerin sağlıksız beslenmesine atfedilmekteydi.

Mısır'daki hekimlerin çoğu rahiplerdi. Tarihçilerce bilinen ilk hekim Imhotep, MÖ 2650 civarında Yaşlı Krallık'ın Üçüncü Hanedanlığı döneminde yaşamıştır ve Heliopolis'in Baş Rahibi idi. O zamanlar, sihir ve din unsurları ilaç kullanımıyla sıkıca örülüydü, ilacın üzerine şifa özelliği bahşetmek amacıyla uygulamadan önce ilahiler rutin olarak dile getirilirdi. Yapılan bu büyüler olmadan çoğu durumda ilaçların etkisiz olacakları düşünülürdü (Sneider 2006).

Mısır'da hastalık yaptığına inanılan nedenleri su şekilde sınıflandırabiliriz:

- i. *Dini nedenler*: Hastalığın tanrının öfkesine-gazabına uğramak sonucu oluştuğuna inanılmaktaydı. Tanrılar için yapılan tapınaklar birer sağlık yurdu, hatta tıp eğitimi yapılan yerlerdi.
- ii. *Metafizik-Sihirsel nedenler*: Ölülerin öç alması, büyü yapmak hastalık nedenleri arasındaydı.
- iii. *Doğal nedenler*: Dış etkenleri oluşturan rüzgâr, toz, ısı, nem ve gıdalar hastalığa neden olmaktadır. "Pnöma" adı verilen havanın kalbe ve organlara yayıldığını, çürüdüğünde de hastalık meydana getirdiği sanılmaktaydı.

Her ölümden sonra ölüm sebebinin araştırıldığı Mısır'da hastalık teşhisi için, elle muayene, kulakla dinleme ve gözle kontrol kullanılmaktaydı. Dışkı ve idrar tetkiki yapılmakta ve nabız kontrol edilmekteydi.

Dini, sihirsel ve ilaçla (bitkisel, hayvansal ve madensel) tedavinin geçerli olduğu Mısır'da cerrahi ve koruyucu tıp da gelişmişti. Trepanasyon, kırık-çıkık yerleştirmesi, sünnet, el-ayak ameliyatları, hadımlaştırma gibi cerrahi müdahaleler çok sık uygulanmaktaydı.

Mısır'da hekimler diğer uygarlıklarda olduğu gibi yaptıkları işe göre ayrılmaktaydı: *Sihirbaz hekim*, *Rahip hekim*, *Halk hekimi*, *Saray hekimi* gibi. Tüm hekimler başhekimin gözetimi altında çalışmaktaydılar ve ünlü hekimlerin önerdiği tedavilerden farklı bir uygulama yapamazlardı (Ersoy 2002).

1.4. Hindistan'da İlaç ve Tıp

Doğu ve Batı'nın antik tıbbi sistemlerinde hem benzerlik hem de farklılıklar mevcuttur. Hinduizm'in Brahmanik temelini oluşturan dört vedanın, milattan önce ikinci milenyumda yazıldığına ve bunların içinde yer alan mantraların (dini hece veya

şiiir) kökenlerinin bir veya iki bin yıl daha geriye dayandığına inanan pek çok kişi bulunmaktadır (Feuerstein ve ark. 1995).

Vedalarından biri olan Susruta’da yapılan tanıma göre Hintlilerde hastalık kavramı “hastalık, insan sağlığının kabıdır ve insan için ağrıya, ıstıraba neden olan şeye denir”. Hastalıklar; yaralar, iç rahatsızlıklar, akli hastalıklar ve olağan hastalıklar olarak dörde ayrılmaktaydı.

Hindistan’da hastalıkların tanısı için beş duyunun hepsi kullanılmaktaydı. İdrarı tat duyusuyla kontrol ederek diyabet tanısı koymaktaydılar. Nabız sık kullanılan bir tanı yöntemiydi. Ateş kontrolü, bazen de fal bakma kullanılmaktaydı.

Hindistan’da çeşitli ilaçlar, telkin, yoga, şok ve çeşitli cerrahi tedavi yöntemleri olarak kullanılmaktaydı. Zehri alınmış yılanlarla şok tedavisi; korkutma esasına dayanmakta ve korkuyla hastayı ve onu hasta yapan şeyi korkutarak kaçırmak esas alınmaktaydı. Dağlama yöntemi ile yaralarının tedavisi yapılmaktaydı. Cerrahi tedavide karınca başlarını dikiş materyali olarak kullanıyorlardı. Hacamat, sonda takmak, ponksiyon, yabancı cisim çıkartmak, laparotomi, taş çıkartma, rinoplasti sık kullanılan cerrahi yöntemlerdi. Çiçek aşısını ve protez kullandıkları ileri sürülmektedir (Ersoy 2002).

1.5. Çin’de İlaç ve Tıp

Çin’de Han Hanedanlığı (MÖ 206-MS 220) sırasında devletin saygınlığını artırmak amacıyla tarihin kurulmasına bir eğilim vardı. Ateşi, yazıyı ve tarımı keşfeden mitolojik figürlerin dünyayı kaostan kurtardıklarına inanılırdı. Daha sonra çiftçi olduğu düşünülen Shen Nung MÖ 3. milenyumda imparator olmuştur ve kendi üzerinde 300’den fazla otu nasıl test ettiğini açıkladığı bitkisel (herbal) Pen Ts’ao Ching (Classic of Materia Medica)’un sayfalarının taranmasıyla ilaçların kullanımı hakkında önemli bilgilerin derleneceği iddia edilmektedir (Sneader 2006).

Eski Çin’de hastalık nedenleri olarak mevsimler, rüzgârlar, pnöma - hava gibi dış etkenlerin yanı sıra Taoizm ile açıklanan dini nedenler sayılmaktaydı. Taoizm’de “yang” ve “yin” olmak üzere tanımlanan iki zıt prensip bulunmaktadır. Zıtlar Kuramı olarak isimlendirilen bu görüşte Yang; kalp, karaciğer, akciğer, dalak ve böbreği, Yin; mide, safra kesesi, mesane, ince barsak, kalın bağırsağı temsil etmektedir. Yang ve Ying

arasındaki dengesizlik yang ve yin'in temsil ettiği organların uyumunu bozmakta ve bir organda hastalık ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Eski Çin'de hastalık tanısı, nabız ve dil kontrolüne dayanmaktaydı. Bu nedenle 200 çeşit nabız tanımlamış ve nabzın yıllardan, mevsimlerden etkilendiğini savunulmuştur.

Eski Çin'de çeşitli tıbbi bitkiler, masaj, jimnastik, moxa ve akupunktur en sık kullanılan tedavi yöntemlerini oluşturmaktaydı. Çiçekler renklerine ve şekillerine göre sınıflandırılmış ve buna göre hastalık tedavisinde kullanılmıştır. Moxa; bedendeki akupunktur noktaları üzerine misk otu konularak yakma ve ısı etkisiyle o noktayı uyarma ya da uyarılmasını önleme prensibine dayanır. Akupunktur ise, bedendeki uyarılma noktaları üzerine çeşitli metal iğneler batırma ilkesine dayanır. Hastalığa neden olan bölge üzerinde akupunktur uygulanarak, hastalığın ortadan kalkmasına yardımcı olunmaktadır. Çocuk hastalıklarını ayırabilen Çinliler, çiçek aşısını ilk uygulayanlardandır (MÖ 1000'den beri). Eski Çin'de cerrahinin babası olarak kabul edilen Hua-Tuo (MÖ 200), ameliyattan önce hintkeneviri kullanarak hastaya anestezi uygulamıştır.

Doğu tıbbının en gelişmiş örneklerine rastlanan Çin tıbbında sağlık hizmetleriyle ilgilenen altı farklı meslek bulunmaktaydı. Bunlar;

- 1) Saray hekimleri,
- 2) Simyagerler; hayat iksirini arayanlar,
- 3) Çıplak ayaklı hekimler; şifalı bitkilerle hasta tedavisi yapanlar,
- 4) Kör masörler; masajla hasta tedavi edenler,
- 5) Akupunkturla tedavi edenler ve
- 6) Kırık-Çıkıkçılardır. Çömlekçilikle ilgilenen bu esnaf, çömlek çamuru ile kırık-çıkıkları tespit etmektedir.

Çin tıbbında, tedavi etme işinin yapıldığı yere ve yönteme göre gözlenen bu farklılık uzmanlık dallarının doğmasına yol açmıştır. Bu dönemde hekimi cezalandıran yasaların bulunduğu da bildirilmektedir (Ersoy 2002)

1.6. Yunanistan ve Roma'da İlaç ve Tıp

Antik Yunanistan, modern tıbbın doğum yeri olarak adlandırılır (Kanellou 2004). Odyssey'de Truva'lı Helen'in Odiseus'un (Odysseus) uzun süre görünmeyişine hüzünlünen misafirlerinin unutkanlıklarını tetiklemek için şaraba döktüğü ilaç, olan nepentheden bahsedilmektedir (Homer). Bunula beraber nepenthenin içeriği açıklanmamıştır. MÖ 8. yüzyılda Odyssey'in yazımından önce Mısır'da afyon veya eroin kullanımıyla ilgili güvenilir delil olmamasına rağmen ikisi de sıklıkla aday olarak önerilmiştir.

Mısırlılar tarafından milattan önce 6. yüzyılda tapınılan Imhotep'e Yunanlılar çok büyük saygı duyarlardı. Imhotep'in ölümünden yaklaşık iki bin yıl sonra, onun rolünün kendi şifa tanrıları olan Asklepios'ta vücut bulduğuna inanmaktaydılar. Hastaların yardım bulabildiği mabetler Imhotep için de yapılmış olduğu gibi, Asklepios'a adanırdı. Asclepius'un esas simgesi, bir Asclepian yılanının etrafına sarıldığı bir hekim asası, modern tıp mesleğinin sembolü olarak günümüzde kullanılmaktadır (Kanellou 2004). Başarıları onu tanrısal statüye yükselten Asklepios'un gerçekte bir şifacı olup olmadığı asla kesin şekilde bilinmemektedir (Homer).

1.6.1. Dört Sıvı

Akılcı bir yaklaşımı olan Hipokrat tıbbın temelini felsefi bir görüş olan unsurlar nazariyesine (humoral patoloji teorisine) dayandırdı. Hipokrat tıbbına göre, insan bedeninde bulunan dört unsurdan kan, sıcak ve yaş; sarı safra, sıcak ve kuru; kara safra (sevda), soğuk ve kuru; balgam, soğuk ve yaş niteliklere sahiptir. Bu dört unsur her uzuvda farklı oranlarda bulunur.

1.6.2. Empedocles

Empedocles, çok seyahat etmiş olması ve kök sökücü (rhizotomoi) ilmi ile ünlüydü. O, evrenin sevgi ve çekişme arasında dengelendiğini öne sürmektedir. İki tarih öncesi yaratıkların, bütün maddelerin kendisinden türetildiği dört kök ile etkileşerek üstün türlerin gelişimine tesir etmesidir (Powell 1993). Farklı nesnelere bu köklerin farklı oranlarından oluşmuştur; bunlar çoğunlukla 'element' olarak adlandırılırlar, fakat Empedocles bu terimi kullanmamıştır. Onları toprak, hava, ateş ve

su olarak tanımlamıştır. Yazılarındaki bir açıklamada toprağı Hera (evlenme ve doğum tanrıçası), havayı Zeus (tanrıların ve erkeklerin tanrısı), ateş Hades (yer altı dünyasının tanrısı) ve suyu Persephone (yer altı dünyasının tanrıçası) ile ilişkilendirdiğini göstermektedir. Aynı zamanda büyük evrenle de bir bağlantı vardı: ‘toprak’ kara ile, ‘hava’ gök ile, ‘ateş’ güneş ile ve ‘su’ deniz ile ilişkilendirilmişti.

1.6.3. Hipokratik Yazılar

Hipokrat sıklıkla ‘Tıbbın Babası’ olarak anılan tıp tarihinin en ünlü figürlerinden biridir (Kanellou 2004). Yaklaşık olarak 60 tane tıbbi ilim kitabı ona atfedilmektedir. Hipokratik Yazılar filozofların rasyonel terimlerin doğasını, sihir ve batıl inançları dışarıda bırakarak açıklamaya çalıştıkları klasik dönemin doruğunda derlenmiştir. Dört sıvı *kan, balgam, iltihap ve melankolinin* bilinen ilk beyanları olan Empedocles’in görüşlerinin açık şekilde çok güçlü etkiye sahip olduğu Hipokratik Yazılar’da görülmektedir.

Balgam ve iltihabın hastalıkta içerilen birincil faktörler olduğu düşünülmüştür. Birincisi su ile sonraki ateş ile ilişkilendirilmiştir. Onların varlığı hasta vücuttan dışarı akmaları ile belirlenebilmiştir. Her ne kadar dışkıda bulunması bazı yazarlar tarafından hastalığın sebebi olarak yazılmış olsa da kan, hayat için elzem olarak düşünülmüştür (Sneader 2006).

1.6.4. Aristotle

Hümodal ilaçlarının çekiciliğı karşı konulmaz gibi görünmektedir. Aristotle (MÖ 384-322) bile bunun büyüüne kapılmıştır. Onun düşüncesi dört elementin, iki zıt takım içeren, sıcak-soğuk ve kuru-yaş gibi dört güç veya nicelikle ilişkili olduğudur. O böylece huyların her birinin Empedocles’in dört niceliğinden ikisine sahip olan elementlerden oluştuğunu kabul etmiştir. Buna ek olarak, bu niceliklerin ruhsal boyutlara sahip oldukları söylenmiştir. Bu nedenle Aristotle nasıl ki ilaçlar niceliklerin serisi olan elementlere sahip ise, ruh halinin dengesizliğinin de uygun ilaç tedavisiyle herhangi bir eksikliği gidermek için tedavi edilebileceğine hükmetmiştir (Sneader 2006).

1.6.5. Yunan Bitki Geleneği

Aristotle Platon'un MÖ 387 yılında kurduğu, üniversitelerin müjdecisi Atina Akademisi'nin başıydı. Aristotle'dan sonra arkadaşı ve ilk öğrencisi Theophrastus (MÖ 370-287) gelmiştir. Theophrastus'un edindiği bilgiler onun içinde 500'ün üzerinde bitkiyi sınıflandırıp açıkladığı *Bitkilerin İncelenmesi (Historia Plantarum)* ve içinde bitkilerin fizyolojisini açıkladığı *Bitkilerin Büyümesi (De Causis Plantarum)* adlı Yunanca iki eser yazmasını sağlamıştır. Bunlar türünün ilk yayınlarıydı ve Aristotle tarafından geliştirilen dört nicelik konseptinin asla unutulmamasını sağlamıştır. Mısır'ın Akdeniz sahili üzerinde bulunan İskenderiye'ye giderek burayı Yunan kültürünün merkezine dönüştürmüştür. Roma güç ve sermayede büyüdüğünde en iyi Yunan hekimleri uygulama yapmak için buraya gitmişlerdir.

Karadeniz'in güney kıyısındaki Pontus'un kralı VI. Mithridates (MÖ 120-63) çok düşmanı olan bir hükümdardı. Romalılar tarafından zehirlenmekten korkmuş ve korumayı sağlayan bir panzehir arayışına girmiştir. O, ilk resimli bitkisel Rhizotomikon'u da içeren birçok kitabın yazarı rhizotomist (kök toplayıcı) Crateuas'un yardımına başvurmuştur. Crateuas mithridatium olarak bilinen kendi adını verdiği panzehirde çok sayıda etken madde (muhtemelen 40'in üzerinde) toplamaya başlamıştır. Galen'e göre bu, kasten zehirlenmiş köleler üzerinde test edilmiştir. Mithridates'in Pompey tarafından yenilgiye uğratılmasından sonra, formül Romalıların eline geçmiştir. Nero'nun hekimi Andromachus Galen'in yaptığı gibi daha fazla etken madde ekleyerek toplamını 77'ye getirip "*Theriac of Andromachus (Andromachus macunu)*" olarak yeniden adlandırmıştır. Galen'in düşüncelerine göre, etken maddelerin çok sayıda olması, vücudun zehre uygun olan panzehirlerden birini seçmesini garantiye almaktadır (Sneader 2006).

1.6.6. Dioscorides

Crateuas *çiğdem soğancığını (güz çiğdemi)* gut hastalığına tedavi olarak tavsiye etmiş fakat popülerliğini ağır toksikliğinden dolayı yitirmiştir. Ondokuzuncu yüzyılda çiğdem izole edildiğinde gerçekten gut için etkili olduğu kanıtlanmış olup özellikle şimdi toksisitenin çoğuna sebep olan *veratrin* safsızlığından arındırılmıştır. Dioscorides ilaçlarda yapılan hilelerin belirlenebilmesi için her bir bitkinin sıvısal nitelikleri ve karakteristiklerini ele alarak tasvirini ve habitatını belirtmiştir. O, aynı zamanda ilaçların

niteliğinin sadece muayene veya tatma ile belli olmayacağını bildirmiştir; onların test edilmeleri gerekmektedir. Dioscorides pek çok topraktan aralarında *badem yağı*, *avrat otu* (ölümcül it üzümü), *böğürtlen*, *kimyon*, *tarçın* vb. otların bulunduğu ilaçları açıklamıştır (Riddle1959).

1.6.7. Pliny the Elder

Pliny the Elder (23-79) bir Romalı olup 900 civarındaki otlardan bahseden bir ansiklopediyi, (Doğal Tarih; The Natural History) yazmıştır. Kitap doktor hizmeti alamayanların halk ilaçları kullanımını ifade etmekteydi ve Dioscorides'in bitkiselinden daha anlaşılır bir dille yazılmıştı. Latin dilinin kullanılması kitabın daha sonra manastırlarda kopyalanmasını kolaylaştırmıştır. Bu da onun, sihir ve batıl inanç elementlerinin bundan sonraki birçok nesil boyunca sürmesini sağlamıştır.

1.6.8. Galen

Bütün Yunan hekimlerinin arasında tartışmasız en etkili olanı, Galen'dir (MS 129-199). Onun, toplanmış 20 ciltlik çalışmaları Bütün Eserleri (Opera Omnia) olarak isimlendirilmiştir. Bu, abartısız olarak o zamanın bütün tıbbi bilgilerini içinde saklamaktadır. Özellikle, hastalığın nedeninin dört sıvının dengesizliği olduğunu öğretmiştir fakat dogmatik bakışı sıvısal dengesizliği düzeltmenin sadece eksik niceliklerin benzer özelliklere sahip olan otlarla değil, aynı zamanda karşı niceliklere sahip otların uygulanmasıyla desteklenmesi ile mümkün olabileceğini önermekle daha ileriye gitmiştir. Bunu kısa bir şekilde "karşıt karşıtı tedavi eder" (*contraria contrariis curantur*) özdeyişiyle açıklamaktadır. Galen'in terapiye yaklaşımı aynı zamanda polifarmasiyi de içermektedir ve galenikler olarak bilinir hale gelen çok sayıda bitki kompleks formülasyonlarla bileşik haline getirilmiştir. O vücudun, hangi bileşenin sıvı dengesizliğini düzeltereğini seçme kabiliyetinde olduğunu öne sürmüştür. Galen doğanın mükemmel bilgelikle davrandığını ve vücudun ancak ruhun enstrümanı olduğunu ileri sürmektedir. Bu kilisenin hoşuna gitmiş ve her hangi birinin Galen'in öğretilerini sorgulamasını zor hale getirerek Galen'in otoritesini güçlendirmiştir. Galen'in etkisi öyle bir yaygındı ki, patolojinin olgun bir bilim haline geldiği on dokuzuncu yüzyıla kadar (patolojinin Pasteur'ün hastalığın mikrop teorisi ile desteklenene kadar) genellikle hastalığın bünyedeki bir bozulmadan oluştuğu kabul

edilirdi. Bu acı bir şekilde hastalıkların harici sebeplerinin araştırılmasını ve etkili ilaçların geliştirilmesini engellemiştir (Sneader 2006).

1.7. Arap Dünyası

İslam dünyasının önde gelen tıp merkezi olarak Bağdat'ın kökenleri belirsizdir. Ancak sık sık iddia edildiği gibi 765 yılında Jirjis Bakhtyishu (Gundishapur'daki önemli bir tıp okulunun başkanı) Halife El-Mansur'un dispepsi hastalığının tedavisi için başkente çağırılmıştır. Yaptığı başarılı uygulamalar onun uzun yıllar kentte kalmasını sağladığı söylenir. Oğlu Jibra'il ibn Bakhtishu, ondan sonra lider doktorların biri haline geldiğine inanılır ve beşinci Abbasi Halifesi olan Harun el-Reşit'in isteği üzerine 805 yılında ilk hastaneyi kurmuştur. Fakat Gundishapur'da önde gelen tıp okulunun varlığına dair inandırıcı hiç bir delil yoktur.

Bağdat'ın bir tıp merkezi olarak ortaya çıkmasında daha olası bir hikâye Nasturi Hıristiyanlarını içermektedir. Nasturiler İsa'nın iki kişi olduğuna inanıyordu, biri ilahi ve diğeri insandı. Onların müstahkem mevkileri günümüzde Türkiye'nin güneydoğusunda, İran sınırı yakınlarında bulunan Edessa'dır. Nasturi Kilisesinin bilim adamları İbranice İncili kendi ana dillerine, Süryaniceye, kolaylıkla tercüme etti. Bizans İmparatoru Zeno sapkın görüşlerinden dolayı Nasturileri 489 yılında Edessa'dan sürgün ettiğinde yanlarında Yunan dili ve edebiyatı hakkında bilgileri alarak doğuya doğru kaçtılar. Bağdat kurulduktan sonra bazıları buraya yerleşti ve böylece Arap, Yahudi, İskenderiyeli ve Hint bilim adamları yeni kentin entelektüel ortamına katkı yaptılar.

Başka yerlerde sıvısal (humoral) tıp klasik kültürün reddedildiği gibi ortadan kaybolurken ve Hristiyan inanisine göre hastalıkların günahların cezası olduğu düşüncesiyle tıp tehlikeye girerken, dokuzuncu yüzyılda Bağdat humoral tıbbın canlandığı bir odak oldu. Arapça, ihmal edilen Yunan dilinin yerine evrensel bilimin yeni dili olmuştu. Ayrıca şehrin refahı, tıp eğitimi için gerekli olan kitapları edinebilen ve tıp öğretebilen eğitimli bir elit varlığını sağladı. Sonuç olarak Müslümanların topraklarının genişlemesi onlara ödünç alma, satın alma veya klasik olarak savaş ganimeti kabul edilen klasik metinlerin saklandığı Mısır, Suriye ve Iraktaki manastırlara ulaşma imkânı sağladı (Sneader 2006).

1.7.1. Huneyn İbn İshak

Ölümünden bir yıl önce 833'te Ma'mun, bilim adamlarını bir araya getirdiği Bayt al-Hikma'yı (Bilim Evi) kurmuştur. Burası Nasturi çeviricilerin öne çıktığı yerdi ve bunların en dikkate değer olanı Hunayn ibn İshak'tı (ortaçağ Avrupa'sında Johannitius olarak bilinirdi). Hunayn ortak çalışanlarıyla birlikte bıkmadan pek çok sayıda tıbbi ve diğer dokümanları, özellikle de Galen'e ait olanları, toplamak için dört bir yanda araştırma yapmışlardır. Sonra da bunları büyük itina ve dikkatle detaylı olarak çevirmişlerdir (Sneader 2006).

1.7.2. Ebu Bekir El-Razi

Bağdat'ta çalışan hekimlerin en büyüklerinden biri olan İranlı Ebû Bekir er-Razi (Batı'da Rhazes olarak da bilinir) sadece şehirde bir hastane müdürü değil, aynı zamanda seçkin bir filozof ve çeşitli konularda yaklaşık 200 kitabın yazarıdır. O, Kitab el-Mansur fi el-Tıbb (Mansur için Tıp Kitabı) ve Kitab el-Havi fi et-tıbb (Tıp tarihinin Kapsamlı Kitabı) adlarında iki büyük tıp eseri yazmıştır. Gerardo de Cremona (1114-1187) on ikinci yüzyılın sonlarına doğru İspanya'da bütün çalışmalarını Liber Almansoris kitabı olarak Latinceye çevirmiştir. El-Razi'nin en büyük ikinci çalışması öğrencileri tarafından ölümünden sonra yayınlanan ve Yunan, Yahudi, Süryani ve Arap kaynaklarından materyaller içeren tıbbi yazıların en büyük koleksiyonundan oluşmaktadır (Sneader 2006).

1.7.3. Ebu Ali El-Hüseyin İbn Abdullah İbn Sina

İbni Sina, Galen'in sadık bir takipçisi olmuştur ve Galen'in fikirlerini izah ederek daha da geliştirmiştir. Ünü büyük ölçüde Avrupa'da tıp öğrencileri için standart metin olarak kabul edilen ansiklopedik el-kanun fi et-Tıbb (Tıp Kanunu) adlı eserinden kaynaklanır. Yunan ve Arap geleneklerini birleştirmiş ve daha sonra kendi klinik deneyimleriyle kitabını süslemiştir. İbn Sina, kendisinin tercih ettiği alfabetik olarak düzenlenmiş 760 ilacın etkinliğini ve kullanımını açıklamıştır. Diğer binlercesi ise Arap dünyası tarafından tamamen reddedilmiştir (Sneader 2006).

1.7.4. Ebu El-Kasım El-Zehravi

Batı'da Latince adı Albucasis olarak bilinen, Ebu el-Kasım el-Zehravi (936-1013) şimdiki kadar yazılmış en büyük ansiklopedik tıbbi metinlerden birinin al-Tasrif li-man 'ajaza 'an al-ta'lif (Yazamayanlar için Kılavuz) yazarıydı. Bin yıl öncesinin tıbbi ve ilaç bilgisinin devlet kayıtlarını içeriyordu, fakat ne yazık ki sadece bazı parçaları çevrildi. Son 30 cildi, resimli ameliyat rehberi, Gerardo de Cremona tarafından Latinceye tercüme edildi ve daha sonra 1497 yılında Venedik'te basıldı. Bunun sonucu olarak kitabın yazarı en iyi bilinen cerrah oldu. El-Tasrif'in geri kalanında ise geniş bir kimya, ilaç ve tedavi bilgileri vardı. Yirmi sekizinci cildi kısaca Liber Servitoris diye bilinir. Bu ilaç süreçleri hakkında bir bilgi veren ilk elden kaynak olarak Avrupa eczacılarına birçok nesiller boyu dayanak oldu (Sneider 2006).

1.7.5. Avrupa'da Arap Tıbbi

Beşinci yüzyılda Batı Roma İmparatorluğu'nun yıkılmasından sonra, eski Yunan'dan beslenen miras yavaş yavaş Avrupa'nın birçoğundan kayboldu. Ancak Güney İtalya'da bir istisna vardı ve bu topraklar İtalya'nın 568 yılında Lombardlar tarafından istila edilmesinden sonra bile Bizans'ın bir parçası olarak kaldı. Yunan kültürü, yedinci yüzyılın sonlarına doğru Benedictine keşişleri Salerno'nun batı sahilindeki şehirde bir hastanede kurdukları zaman da devam etti. Açıkça laik bir kurumdu, rahiplerin yanında kadınlara ve Yahudilere Yunan tıp eğitimi vermiştir. Arap dünyasının büyük bölümünde yolculuk yapmış bir âlimin Salerno'ya gelişi ile birlikte Salerno Arap tıbbına giriş için belirleyici nokta oldu. Genellikle Afrikalı Konstantin (c. 1020-1087) olarak bilinen kişi çok sayıda Arapça metni Latinceye çevirdi. Tercümeleleri önde gelen savunucularına eser sağlamıştır. Ayrıca okula ilk Arap tıbbi ile bir aşinalık kazandırmıştır.

Salerno'lu Nicolas, 1140 yılında hastalığa sebep olduğuna inanılan aşırı miktardaki vücutsal sıvılara karşı 139 bileşik formüllü galenik tedavi özellikli Andtidotarium'u üretmiştir. İlk formüller ilaç kitabı olması itibariyle eczacılığın sistemi olarak bilinecek olan ağırlıkları ve ölçüleri gösteren bir tablo içermekteydi.

On birinci yüzyıldan itibaren Salerno'nu ünü Avrupa'nın her tarafına yayılmış ve dört bir yandan öğrencileri kendine çekmiştir. Bununla birlikte 1139 yılında Lateran Konseyi hizmetleri için artan talebin Hristiyan din adamları ve rahipleri asıl

görevlerinden saptırdığı düşüncesiyle pratik tıbbı onlara yasaklamıştır. Ve böylece bir sonraki yüzyıl Oxford, Padua, Bologna, Montpellier ve Paris'in yeni üniversitelerinde rakip enstitülerin kurulmasına tanık olmuştur. Sonraki üç veya dört asırdan itibaren Arap tıbbında yükselen Galen'nin polifarmasisi moda haline gelmeye başlayacaktı (Sneader 2006).

1.7.6. Toledo

Arap dünyasında Yunan tıbbı Batı Roma İmparatorluğu'nun çöküşünden sonra yeniden canlandırıldığı gibi; tarihin bir cilvesi ile Araplar İspanya dışına sürüldükten sonra da Arap tıbbı Hıristiyan Avrupa'da benzer bir canlanma yaşadı. Toledo 1085'te, Cordoba 1236 yılında ve nihayet Granada 1492 yılında Hıristiyanların eline geçti.

Er-Razi'nin Kitab el-Mansur fi el-Tıbb'ın, İbn Sina el-Kanun'unun ve el-Zehravi el-Tasrif 30. Cildi'nin Latince tercümelerine referans zaten Gerardo de Cremona tarafından on ikinci yüzyılın sonlarında yapılmıştı. Hıristiyanların ve Yahudilerin birlikte yaşadığı kozmopolit bir şehir olan Toledo'ya yerleşmişti. Cordoba'nın büyük kütüphanesine ait birçok metnin, 1013 yılında şehrin Berberiler tarafından fethinden sonra saklama ve yağmadan korunması için getirildiği yerd. Gerardo 1185 yılındaki ölümünden önce bu koleksiyonunun önemli işlerinden 60'dan fazlasını çevirmeyi başardı (Sneader 2006).

1.7.7. Arapça Metinlerin Latince Çevirileri

Hristiyan Avrupa, Latince'nin Kilise'deki egemen dil olması nedeniyle; ki bu Latince'nin entelektüel konuşmanın dili haline geldiği anlamındaydı, beşinci ile on ikinci yüz yıllar arasında Yunan tıbbi metinlerine olan erişimini kaybetmiştir. Antik el yazmaları manastırlarda kopyalanıp muhafaza edilirdi ancak çoğu rahip Yunanca bilmediği için bunlar ancak Latince'de yazılmış olanlarla sınırlı kalmaktaydı. Ancak en büyük Latince tıbbi metin Pliny'nin güvenilirmez çalışmasıydı.

Klasik zamanlara göre ortaçağ eğitiminin çok aşağı olması nedeniyle, İbn Sina'nın net ve bariz mantığı büyük ölçüde, ona ilham olan adam Galen'in kıvrık zor yazılarına tercih edildi. Tıp Kanun'unu öğrenmek kısa zamanda tıp kariyeri için olmazsa olmaz bir şart oldu ve Arap tıbbı Avrupa'da moda olmuştur (Sneader 2006).

1.8. Rönesans Tıbbı

Paraselsus 16. yüzyılda tıp dünyasında daha önce olanları reddedip tıpta rönesansı başlatan hekimdir. Gezgin ve simyacı olan Alman hekim, gittiği yerlerde etkili tedavi yöntemlerini araştırmış, doğanın gizli güçlerini öğrenmeye çalışmıştır. Bin beş yüz yirmi dörtte döndüğü Almanya’da Basel Üniversitesi’nde hocalığa başlamış ve dersleri büyük ilgi görmüştür. Tıp kitaplarını yakarak “Bunlardaki bütün bilgiler benim sakalım kadar değil” gibi davranışları zamanla tepki ile karşılanmış ve fakülteyi terk ederek genç yaşta ölmüştür.

Paraselsus, ilaçların çoğunun bitkilerden hazırlandığı halde bunları reddetmiş ve madensel ilaçları tedaviye sokmuştur. Civar, kükürt, demir, bakır sülfat içeren bileşimleri hazırlamıştır. Antimon’u tedaviye dâhil etmiş ve frenginin cıva ile tedavisini başlatmıştır (Sneader 2006).

1.8.1. Modern Anatominin Kurucusu Vesalius

Vesalius dogmaya karşı çıkma, gözlem ve araştırma ile sağlam bir temel kurma ve sonuçlara ulaşmada önemli bir isimdir. Disseksiyona olan ilgisinden dolayı İtalya’ya Padua’daki tıp okuluna gitmiştir. Bin beş yüz otuz sekiz yılında kendisinin ilk anatomi kitabını yazmıştır. Daha sonra 1543 yılında çalışmalarını içinde topladığı “*De Humanis Corporis Fabrika*” (İnsan Vücudunun Yapısı) eserinde Galen’in anatomisindeki 200’den fazla hatasını açığa çıkarmıştır (Sneader 2006).

1.8.2. Kan Dolaşımı Keşfi

İngiliz William Harvey “Kalp bir pompadır, kan dolaşıyor.” diyerek Tıp Rönesansı’nın önemli temsilcilerinden olmuştur.

MÖ 4. yüzyılda kan dolaşımı üzerine ileri sürülen ilk teorilerden biri atardamarların içinde hava bulunduğu idi. Galen MS 2. yüzyılda atardamarlarda kanın dolaştığını söylemişti. Ama kanın kalp hareketleriyle değil, damarların kasılmasıyla bir “Med-Cezir” olayı gibi yayıldığını düşünüyordu. Harvey hayvanlar üzerinde yaptığı deneyler neticesinde 1628 yılında 12 yıllık çalışmalarını topladığı “*Hayvanlarda Kalp ve Kanın Hareketleri Üzerine Anatomik İnceleme*” adlı eserinde kanın vücutta dolaştığını ve kalbin bir pompa görevi yaptığını ispatladı.

1.9. Mikroorganizmaların Dünyası

Mikroskobun keşfinden önce doğadaki bütün canlı yaratıkların hayvan ya da bitki olduğu düşünülürdü. İlk insanlar ürkütücü doğa olayları ve bulaşıcı hastalıklarla karşılaşınca korkmuşlar; hastalık, şimşek, yıldırım gibi doğal afetlerin tanrıların kendilerine verdiği cezalar olduğunu düşünerek hastalıklardan korunma çarelerini tapınaklarda aramışlardır.

Eski Mısırlılar (MÖ 3400-2450) yaşadıkları devre göre yaşamın tüm alanlarında olduğu gibi tıpta da önemli birçok bilgiye sahiptiler.

Tıbbın kurucusu ve babası kabul edilen Hipokrat (MÖ 460-377) topraktan çıkan kötü havanın (Miasma Teorisi) hastalıklara yol açtığını bildirmiştir. Besinlerle bulaşan hastalıklar fark edilerek din kitaplarında yasaklı besinlere yer verilmiştir. Hintlilerin Sustrata'sında (MS 500) ise farelerin veba faktörü olduğunu bildirmiştir. Buharalı İbni Sina (MS 980-1038) bulaşıcı hastalıklara gözle görülmeyen etkenlerin neden olduğunu belirtmiştir. Ortaçağda bilimsel düşünce ve buluşlar nedeni ile bilim adamlarına verilen cezalar sona erince, düşüncenin baskılanmadığı Rönesans döneminde (1453-1600), tıp alanında pek çok gelişme meydana gelmiştir. Fracastorius (1478-1553) gözle görülmeyen canlıların bulaşmada etken (Contagium vivum) olduğunu ileri sürmüştür. Roger Bacon'dan (1210-1290) başlayarak 400 yıl gibi uzun bir gelişme sürecinden sonra ilk basit mikroskop Hollandalı Antony Von Leeuwenhoek (1632-1723) tarafından yapılmıştır. Leeuwenhoek basit bir lupa benzeyen bu aletle gördüğü bakterilerin şekillerini çizerek İngiliz Kraliyet Akademisi'ne yollamıştır. 1680 yılında İngiltere Kraliyet Akademisi'ne üye olarak kabul edilmiştir. Kanın alyuvarlarını, kas liflerindeki çizgileri, bakterileri ve protozoaları tanıtmıştır. Bu nedenle modern mikrobiyolojinin kurucusu kabul edilir. Francesko Redi (1626-1697) canlının canlıdan olduğunu, çürümüş maddelerden olmadığını ispatlayarak canlı mikroorganizmaların kendiliğinden oluş teorisini (spontan jenerasyon) geçersiz kılmıştır. Bir bilim olarak mikrobiyolojinin gerçek anlamda gelişmesi Louis Pasteur'un (1822-1895) çalışmaları ile başlamıştır. Fermantasyonda mikroorganizmaların rolünü göstermiş, ismi ile anılan pastörizasyon işlemini, şarbon ve kuduz aşılarını bulmuştur. Robert Koch (1843-1910) enfeksiyon hastalıklarında etken ispatı için, **Koch postulatı** denen kuralları saptamıştır. Tüberküloz basilini de Robert Koch bulmuştur. 19. yüzyılın ikinci yarısında bakteriler ile ilgili

1.GİRİŞ

buluşlar devam ederken bakteri tutan süzgeçlerden geçen küçük partiküllerin varlığı ileri sürülmüştür. İlk kez, Iwanovski 1892 yılında bitkilerde tütün mozaik hastalığına neden olan etkenin virüs olduğunu bulmuştur.

İnsanlar eski Çin’de (MÖ 1050) hastalıklardan korunmak için aşı yerine geçen ampirik yöntemler uygulamakta idi. Edward Jenner (1749-1823) çiçek aşısını icat ederek immünolojik yolla bu çok önemli hastalıktan korunma olanağını insanlığın faydasına sunmuştur.

Mikrobiyolojide kemoterapi; önce sülfamidlerin, sonra Sir Alexander Fleming (1881-1955) tarafından antibiyotik penisilinin keşfi ile başlar. Başlangıçtan itibaren birçok bilim adamına mikrobiyoloji bilimine önemli hizmetleri nedeni ile Nobel ödülleri verilmiştir. Yurdumuzda ilk mikrobiyoloji laboratuvarı Dr. M. Nicolle tarafından 1893 yılında kurulmuştur.

MİKROBİYOLOJİNİN ALTIN ÇAĞI

- 1665 Hooke—Hücrenin ilk gözlenimi
 1673 van Leeuwenhoek—Canlı mikroorganizmaların ilk gözlenimi
 1735 Linnaeus—Canlıların sınıflandırılması
 1798 Jenner—İlk aşı
 1835 Bassi—İpekböceği mantarları
 1840 Semmelweis—Lohusalık humması
 1853 DeBary—Bitki mantar hastalığı
 1857 Pasteur—Fermantasyon
 1861 Pasteur—Kendiliğinden üremenin olmadığının ispatı
 1864 Pasteur—Pastörizasyon
 1867 Lister—Steril cerrahi
 1876 *Koch—Hastalığın mikrop teorisi
 1879 Neisser—Beloğukluğu mikrobi
 1881 *Koch—Saf kültürler
 Finley—Sarı humma
 1882 *Koch—Kolera mikrobi
 1884 *Metchnikoff—Fagositoz
 Gram—Gram boyama prosedürü
 E scherich—E scherichia coli
 1887 Petri—Petri kutusu
 1889 Kitasato—T etanos bakterisi
 1890 *von Behring—Difteri antitoksini
 *E hrlich—İmmün teorisi
 1892 Winogradsky—Kükürt döngüsü
 1898 Shiga—Shigella dizanteri
 1908 *E hrlich—Frengi
 1910 Chages—Şagaz hastalığı
 1911 *Rous—Tümör etkeni virüs
 1928 *Fleming, Chain, Florey—Penisilin
 Griffith—Bakterilerde değişim
 1934 Lancefield—Streptokokal antijenler
 1935 *Stanley, Northrup, Sumner—Kristalize edilmiş virüsler
 1941 Beadle ve Tatum—Genler ve enzimler arasındaki ilişki
 1943 *Delbrück ve Luria—Bakterilerin viral enfeksiyonu
 1944 Avery, MacLeod, McCarty—Genetik materyal DNA
 1946 Ledeborg ve Tatum—Bakteriyal bağlanma
 1953 *Watson ve Crick—DNA yapısı
 1959 Stewart—Virüslerin insan kanserine sebep olması
 1962 *E delman ve Porter—Antikorlar
 1964 Epstein, Achong, Barr—İnsan kanserine sebep olan Epstein-Barr virüsü
 1971 *Nathans, Smith, Arber—Kısıtlama enzimleri
 (rekombinant DNA teknolojisi için kullanılmaktadır.)
 1973 Berg, Boyer, Cohen—Genetik mühendisliği
 1975 Dulbecco, Temin, Baltimore—Ters transkriptaz
 1978 Woese—Arkealar
 *Mitchell—Kimyasal ozmotik mekanizması
 1981 Margulis—Ökaryotik hücrelerin orijinleri
 1982 *Klug—Tütün mozağı virüsünün yapısı
 1983 *McClintock—Transpozonlar
 1988 *Deisenhofer, Huber, Michel—Bakteriyel fotosentez pigmentleri
 1994 Cano—40 milyon yaşında bakteri kültürü elde ettiğini bildirmiştir
 1997 *Prusiner—Prionlar
 2003 *Agree ve MacKinnon—Plazma membranlarında su ve iyon kanalları
 2008 Barre-Sinoussi ve Montagnier—İnsan immün yetmezlik virüsü(HIV)



Louis Pasteur(1822-1895)
 Canlılığın yaşamayan maddelerden kendiliğinden oluşmadığını ispatladı



Robert Koch(1843-1910)
 Spesifik bir mikrobun spesifik bir hastalıkla direkt ilgisini deneysel basamaklarla gösterdi.

Şekil 1.1. Mikrobiyoloji Alanındaki Gelişmeler (Sarı ile gösterilen bölge altın çağı ifade ederken, * işareti Nobel Ödülü'nü ifade etmektedir.) (Totoro ve ark. 2010)

1.9.1. Mikroorganizmaların Sınıflandırılması

Sınıflandırma, özellikle de canlı formların sınıflandırılmasına *taksonomi* (Yunancada tertipli bir şekilde düzenlemek) denir. Taksonomi aynı zamanda hali hazırda sınıflandırılmış organizmaların tanınması için ortak bir referans sağlar. Örneğin özel bir hastalığa sebebiyet verdiği şüphelenilen bakteri bir hastadan izole edildiğinde, izolatu tanımlamak için özellikleri daha önceden sınıflandırılmış bakterilerin karakteristiklerinin listesi ile eşleştirilir. Sonuç olarak taksonomi bilim adamları için iletişimin evrensel bir dilini sağlayan temel ve gerekli bir araçtır. Modern taksonomi heyecan verici ve dinamik bir alandır. Moleküler biyoloji ve genetikteki yeni teknikler sınıflandırma ve evrime yeni anlayışlar sağlamaktadır.

Aristo'nun zamanından beri canlı organizmalar bitkiler ve hayvanlar olarak sadece iki yolla kategorize edilmişlerdi. 1735'te İsveçli botanikçi Carolus Linnaeus canlı organizmaları *Plantae* ve *Animalia* olarak iki âleme ayıran biçimsel bir sistemi tanıtmıştır. Biyoloji biliminin gelişmesiyle, biyologlar organizmaları atalarıyla olan ilişkileri temelinde gruplandırarak ve hayattaki türleri görmemizi sağlayan doğal bir sınıflandırma sistemini aramaya başlamışlardır. 1857'de Carl von Nageli bakteri ve mantarların bitki âleminde yer almasını önermiştir. 1866'da Ernst Haeckel bakteri, protozoa, algler ve mantarları içeren protista âlemini önermiştir.

Elektron mikroskopunun gelmesiyle hücreler arasındaki fiziksel farklılıklar belirginleşmeye başlamıştır. *Prokaryot* terimi bitki ve hayvanların çekirdek bulduran hücrelerini, çekirdek buldurmamayanlardan ayırmak için 1937'de Edouard Chatton tarafından kullanılmıştır. Roger Stainer 1961 yılında prokaryotların bugünkü tanımını yapmıştır. Buna göre, prokaryotlar hücre içindeki çekirdek materyalleri bir çekirdek zarı ile çevrilmiş olmayan hücreleri ifade etmektedir. Robert G. E. Murray 1968'de *Prokaryot Âlemini* önermiştir. Robert H. Whittaker 1969'da prokaryotların Prokaryot Âlemi veya Monera içinde ve ökaryotların diğer dört âleme karşılık geldiği beş âlem sistemini kurmuştur. Nihayetinde moleküler biyolojideki yeni teknikler iki tip prokaryotik ve bir tip ökaryotik hücre olduğunu göstermiştir. Bu üç farklı hücre tiplerinden biri belirtildiği gibi ökaryotlara aitken diğer iki tür ise prokaryot türü olan bakteri ve arkea hücreleridir. Bu sınıflandırmaya göre hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve protistler ökaryot bölge içinde, bütün patojenik prokaryotların yanı sıra toprak ve suda

bulunan patojenik olmayan çoğu prokaryotlar da bakteri bölgesine girerler. Arkea bölgesi ise hücre duvarlarında peptidoglikan bulundurmayan prokaryotları içermektedir. Mikroorganizmaların genel bir sınıflandırılması Şekil 1.2.'de görülmektedir.



Şekil 1.2. Mikroorganizmaların genel sınıflandırılması

Bu mikroorganizmaların dışında bir de hücre olmayan mikroorganizmalar vardır ki bunlara ise virüs denilmektedir. Virüsler üç alana yani ökaryot, bakteri ve arkea sınıflarına sokulmamıştır (Tortora ve ark. 2010).

1.9.2. Virüsler

Virüsler bütün hücresel formlara etki ederler: ökaryotlar (omurgalı hayvanlar, omurgasız hayvanlar, bitkiler, mantarlar) ve prokaryotlar (bakteriler ve arkealar). Prokaryotlara bulaşan virüsler genellikle bakteriyofaj veya kısaca fajlar olarak adlandırılırlar.

Her ne kadar virüslerle ilgili bütün sorunlar çözülmüş değilse de onlarla ilgili temel bilgiler son 40 yıl içinde ortaya konulmuştur. Virüsler hakkındaki ilk bilgiler 1894'de Adolph Mayer tarafından elde edilmiştir. Mayer tütün mozaik hastalığı (TMV) üzerinde durmuştur. Çalışmada Mayer bitkiyi ezerek elde ettiği sıvıyı sağlıklı bitkilere sürdüğünde, hastalığın bu yolla sağlıklı bitkilere de geçtiğini görmüştür. Ancak o zamanlar hastalık etkenlerinin bakteri olduğu bilindiğinden Mayer de tütün mozaik etkeninin bir bakteri olduğunu sanmış ve bu hastalık etkenini izole edememiştir. Daha sonra Iwanowsky tütün mozaik hastalığına tutulmuş bir tütün bitkisini ezerek elde ettiği sıvıyı çok küçük gözenekleri olan porselen bir filtreden geçirdikten sonra filtreden geçen sağlıklı olduğunu düşündüğü sıvıyı sıhhatli bitkilere sürmüştü ve yine hastalığın bu bitkilere de geçtiğini gözlemlemiştir. O zamanlar bakterilerin filtrelerden geçemediği ve üstte kaldığı bilindiğinden Iwanowsky bu duruma şaşırılmış ama yine de bu hastalık etkeninin bakteri olacağını düşünmüş ve hastalık etkenini izole edememiştir. Daha sonra

1.GİRİŞ

Beijerinck 1898 yılında Iwanowsky'nin çalışmalarından habersiz olarak yaptığı çalışmalarında Mayer'in bıraktığı yerden devam etmiş ve filtreden geçebilen bazı canlıların hastalık etkeni olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Ancak Beijerinck de bu etkeni izole edememiştir.

Bazı hastalık etkenlerinin bakteriden daha küçük olan virüsler olduğu, 1930'larda saptanmışsa da bu organizmaların ışık mikroskopunda görülemeyecek kadar küçük olmaları nedeniyle onlar hakkındaki gerekli bilgiler ancak 1940'larda elektron mikroskopunun bulunmasından sonra elde edilebilmiştir (Öner 2009). Bakteri ve virüslerin genel bir karşılaştırması Tablo 1.1.'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Virüs ve Bakterilerin Karşılaştırılması

	Bakteri		Virüs
	Tipik Bakteriler	Riketsiyalar/Klamidiyalar	
Hücre içi Parazitlik	Hayır	Evet	Evet
Plazma Membranı	Evet	Evet	Hayır
Bölünerek Üreme	Evet	Evet	Hayır
Bakteriyolojik Filtrelerden Geçebilme	Hayır	Hayır /Evet	Evet
DNA ve RNA'nın İkisine de Sahip Olma	Evet	Evet	Hayır
ATP-Üretme Metabolizması	Evet	Evet/Hayır	Hayır
Ribozomlar	Evet	Evet	Hayır
Antibiyotiklere Duyarlılık	Evet	Evet	Hayır
İnterferonlara Duyarlılık	Hayır	Hayır	Evet

Konak organizmasında hastalığın işaretlerini gösteren virüslerin varlığı aşikârdır. Bununla beraber birçok sağlıklı organizma bazılarının aktifken bazılarının durgun olduğu non-patojenik virüs enfeksiyonlarının konağıdır. Ayrıca birçok organizmanın genomları konak genomlarına uzun zaman önce yerleşmiş antik virüs genomlarının kalıntılarını içermektedir. Konaklarda buldukları gibi virüsler aynı zamanda toprakta, havada ve suda da bulunmaktadırlar. Çoğu sulu ortamlar, bu ortamlarda yaşayan canlılara bulaşan çok yüksek konsantrasyonda virüs ihtiva etmektedirler.

Virüsler, protein veya kompleks bir yapıdan (glikoprotein) oluşan bir muhafaza içine paketlenmiş DNA ve RNA'lerden sadece birine sahip çok küçük infeksiyöz ajanlardır. Virüs kelimesi Latince zehir anlamına gelmektedir (Arda 2006). Virüslerin kendine özgün ve diğer mikroorganizmalardan ayrılan birçok özellikleri mevcuttur. Virüslerin yalnız tek tip nükleik asit içermeleri de diğer mikroorganizmalardan ayrılan bir niteliğidir. Bu özellik virüslerin sınıflandırılmasına esas teşkil etmektedir. Viral genom ya DNA veya RNA yapısı içerir. Virüsler diğer mikroorganizmalardan oldukça küçüktürler ve büyüklükleri nanometre (1 mikron=1000 nm) ile ifade edilir. Virüslerin büyüklükleri 20 ile 300 nm arasında değişmektedir (Ustaçelebi 1999).

Virüsler konak hücresi olarak adlandırılan bir hücreye girmeden kendilerini çoğaltamazlar. Kendi başlarına ne enerji üretebilirler ne de protein yapabilirler. Virüsler yapılarında konak hücresini kullanarak üremelerini sağlayan nükleik asitler içermektedirler ve nükleik asidi bir hücreden diğer hücreye taşıyacak özel bir hücre dışı forma sahiptirler (Vandemark ve Batzing 1986).

Virüsler çok geniş bir konakçı spektrumuna sahiptirler. Bazılarının zoonotik enfeksiyonlara yol açmasına karşın, bir bölümü de sadece insan veya hayvanlara özgü kalmaktadır (Arda 2006). Virüslerin basit yapısal organizasyonları ve onların çoğalmalarının mekanizması arasındaki ilişkiyi belirtmek için tam belirgin özellikleri günümüzde bilinmektedir. Buna göre virüsler:

- Tek tip nükleik asit içeren, DNA veya RNA.
- Nükleik asidi çevreleyen bir protein kılıf içeren (bazen, kendisi lipid, protein ve karbonhidratların bir zarfı tarafından sarılmıştır).
- Canlı hücre içinde çoğalmayı hücrenin sentezleme mekanizmasını kullanarak yapan.
- Viral nükleik asitlerin diğer hücrelere taşıyabilecek özelleşmiş yapıların sentezine neden olan parçacıklardır (Tortora ve ark. 2010).

Hiç şüphesiz virüslerin keşfedildiği durum, onların dünya üzerindeki sadece küçük bir kısmını temsil etmektedir. Bitkilerin, hayvanların, mantarların, bakterilerin ve arkeaların çoğu henüz virüslerin varlığı için araştırılmaktadır ve potansiyel yeni virüs konakları hala keşfedilmektedir. Ayrıca, doğal çevreden DNA analizleri bir laboratuvar ortamında henüz izole edilmemiş birçok bakteri türünün olduğunu göstermektedir;

'yetiştirilemeyen bakteriler de' aynı zamanda virüslere konaklık ediyor gibi görünmektedir (Carter ve Saunders 2007).

1.9.2.1. Virüslerin Yapısı

Bütün virüsler, ağırlıklarının en az %50'si civarında ve bazı durumlarda ise %90'a çıkan miktarda protein ve nükleik asit içermektedirler ve virüs genomları virüs parçacığının bir bölümü olmalarından dolayı yapısal proteinler olarak adlandırılan proteinler tarafından sarılmışlardır. Bu proteinler nükleik asitleri nükleaz degradasyonu ve kırılmaya karşı korur ve virüslerin uygun hedef hücreyi tanınmasını sağlayan belirleyici elementler bulundurlar (bitki virüsleri ancak enjeksiyon veya zedelenme ile direkt olarak hücreye girerler). Bunun yanında virüs genomunun bir parçadan sadece uygun zamanda salıverilmesini sağlayan genom-salma sistemini ve virüslerin çoğunda enfeksiyon için gerekli enzimleri içerirler (Dimmock ve ark. 2007).

Konak hücresinin dışında virüsler viryon olarak bilinen virüs parçacıkları olarak yaşamlarını sürdürürler. Viryon bir gen teslim sistemidir; virüs genomunu içerirler ve fonksiyonları genomu korumak, kopyalanabildiği ve yeni viryonlara paketlenbildiği bir konak hücresi içine girmesine yardım etmektir. Genom kapsid olarak bilinen bir protein yapısı şeklinde paketlenmiştir. Virüslerin yapısında bulunan proteinler yapısal ve yapısal olmayan proteinler şeklinde iki çeşittirler. Yapısal proteinler viryonun çeşitli bölgelerinde lokalize olmuşlardır. Kapsid proteinleri, kapsomerler, zarf proteinleri ve matriks proteinleri bu sınıfta yer almaktadır. Yapısal olmayan proteinler genellikle virüs tarafından kodlanana ve enzim karakteri gösteren proteinlerdir. Bunlar virüslerin hücre içinde replikasyonu ve transkripsiyon işlemlerinde görev almaktadırlar.

Virüslerin çoğu, genellikle viryonun yüzeyinde bir zarf oluşturan lipid bileşenine de sahiptirler. Bu zarf aynı zamanda virüsün hücre içine girmesine yardım etme rolleri olan proteinleri de içermektedir.

İnsan ve hayvan enfeksiyonuna neden olan virüsler genel bir terim olarak hayvan virüsleri adı ile anılırlar. Bunlar morfolojik özellikleri bakımından fazla çeşitlilik göstermemekle birlikte, elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde olgun virüslerde bazı farklı formlar gözlemlenmiştir (Arda 2006).

Bir viryon nükleik asitlerin bir veya daha fazla molekül şeklindeki virüs genomunu içerir. Her hangi biri için virüs genomu RNA veya DNA'nın birinden oluşmaktadır. Bir virüs izole edildiğinde onun RNA veya DNA virüsü olduğunu belirlemenin yollarından biri onun ribonükleaz ve deoksiribonükleaz duyarlılığını test etmektir. Virüsün nükleik asidi bu enzimlerden sadece birine karşı bozunma duyarlılığı gösterir.

Her bir nükleik asit dsDNA, ssDNA, dsRNA ve ssRNA olarak dört kategoriyi oluşturan tek sarmallı (single-stranded) veya çift sarmallı (double-stranded) yapıya sahiptirler. dsDNA virüsleri genlerini hayvan, bitki, bakteri ve diğer hücrel organizmalar gibi aynı tür molekül içinde şifrelerken, diğer üç tipin genomları virüslere özgüdür. Şunu belirtmek gerekir ki çoğu mantar virüsleri dsRNA genomuna, çoğu bitki virüsü ssRNA genomuna ve çoğu prokaryotik virüsleri ise dsDNA genomuna sahiptirler (Carter ve Saunders 2007).

Bütün DNA virüslerinde genom bir molekülden oluşmaktadır. Bunlar da ya tek ya da çift sarmallı, lineer veya sirküler özelliğe sahiptirler. DNA virüslerinde genom büyüklüğü, küçük DNA virüslerinde (porcine circovirus) yaklaşık 1.7 kilobaz (kb), büyük DNA virüslerinde (poxvirus) ise 130-280 kb'ın arasındadır (Arda 2006, Carter ve Saunders 2007).

RNA virüsleri RNA karakterinde genoma sahiptirler ve nükleik asitlerinin yapısal özellikleri bakımından DNA virüslerinden daha komplike haldedirler. RNA virüslerinde tek veya çift sarmallı, lineer, segmentli ve segmentsiz gibi yapısal formlar söz konusudur. RNA virüsleri hem ikosahedral hem de helikal simetri özelliğe sahiptirler ve RNA virüslerinin küçükleri örneğin hepatitis delta virüsü 1.7 kb büyüklüğünde iken, büyük olanları örneğin coronavirüsler 33 kb büyüklüğündedir (Carter ve Saunders 2007).

1.9.2.2. Virüslerin Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesi

Virüsleri taksonomik modeller içinde gruplandırmak için birçok kriter mevcuttur. Genellikle ilk başta virüsün konak yelpazesi gibi geniş karakteristiklere bakılır. Yani bunun bir bakteri, bitki veya omurgalı veya başka bir cinse ait olup olmadığı şeklinde sınıflandırılır. Bir sonraki adımda viryon yapısına bakılır. Nükleik asit tipine göre, nükleik asit zincir tipine göre (çift veya tek sarmal), nükleik asidin

1.GİRİŞ

moleküler ağırlığına göre, nükleokapsid simetrisine göre, kapsidin helikal simetri veya ikozahedral olmasına göre, genomunun parçalanmış olup olmadığına göre ve viryonun büyüklüğüne göre sınıflandırmalar yapılabilir. Bunların dışında etkinlik gösterdikleri doku ve organlara göre de sınıflandırmalar yapılabilmektedir.

Virüslere isim verme ve onları gruplar içinde sınıflandırma işini bir düzene konulmasına 1966 yılında karar verildi ve Virüs Taksonomisi Uluslararası Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)) oluşturuldu. Komite günümüzde birçok çalışma grubunda oluşmakta ve dünyanın her tarafındaki virologlar tarafından tavsiyeler almaktadır. Londra'da 1977 yılında yapılan toplantıda virüs sınıflandırılması ile ilgili konular yeniden düzenlenmiştir. Buna göre;

- i.** Bakteri adlandırılması kodu virüslere uygulanmayacak,
- ii.** Adlandırma uluslararası olacak,
- iii.** Latin çift adlandırma olacak,
- iv.** Mevcut Latin adları uygun hale getirilecek,
- v.** İnsan adı kullanılmayacak,
- vi.** Anlamsız ad kullanılmayacak, gibi bir dizi düzenleyici kurallar konulmuştur.

Buna göre virüslerin sınıflandırılmasında ICTV üç önemli kriter üzerinde durmuştur.

- Nükleik asit karakteri: DNA-RNA, polaritesi, tek-çift iplikcikli, lineer-sirküler, molekül ağırlığı, spesifik enzim kodlar, segmentleri, vs.
- Replikasyon Tarzları: Yuvarlak çember, yarı korumalı, vs.
- Viryon morfolojisi: Kübik simetri, sarmal simetri, kompleks yapı, zarflı-zarfsız oluşu, kapsomer sayısı, büyüklüğü, vs.

Şu durum belirtilmelidir ki virolojideki sürekli yeni buluşlar standart ve devamlı geçerli olan bir sınıflandırmaya engel olmaktadır. Virüs sınıfları için –virales, familyaları için –viridae, alt familyaları için –virinae, cinsleri için –virus sonekleri kullanılmaktadır (Carter ve Saunders 2007).

1.9.2.3. Retrovirüsler

Tavuklarda bulaşabilen kanser ve lösemiye sebep olan ajanların ilk rapor edildiği 1911'den beri retrovirüsler birçok araştırmacının başlıca bilimsel merak konusu olmuştur. Retroviroloji birkaç sebepten dolayı önemli bilimsel uğraş olmaya devam etmektedir. Bu sebepler aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

- i. Retrovirüsler insanlarda immün yetmezlik ve lenfoproliferatif hastalıklarına (AIDS yetişkin T-hücre lösemisi) ve fare ve tavuk gibi küçük primatlarda çeşitli kanser ve lösemi hastalıklarına sebebiyet vererek birçok omurgalı türü için hastalık ve ölüm kaynağıdırlar.
- ii. Retrovirüslerin hücre dengesi (homeostatis) düzenlenmesinde ve başkalaşımında rol oynayan hücresel genlerin keşfinde çok büyük katkıları olmuştur. Böylece kanserojenlerin moleküler mekanizmalarını ve gelişimsel biyolojinin çeşitli görüşlerini anlayışımıza önemli ilerlemeler sağlamıştır.
- iii. Retroviral hayat döngüsü, daha üst ökaryotlarda rekombinasyon (entegrasyon), ters transkripsiyon ve translasyon (çeviri) gibi temel biyolojik proseslerin çalışmasını uygun kılan bir sistem sağlamıştır
- iv. Eşsiz stildeki replikasyonlarının bileşenleri insan genetiğindeki karışıklıkların düzeltilmesi için gen transfer tekniklerinin gelişmesinde olduğu gibi çeşitli moleküler biyoloji işlemlerinde yararlar sağlamışlardır (Ellison 1994).

Retrovirüs familyası, Retroviridae, bütün omurgalılarda görülen çok büyük ve çok çeşitli olan virüs gruplarını içermektedir (Knipe ve ark. 2001). Bunlar replikasyonları sırasında genomlarını DNA'ya kopyalayan RNA virüsleridirler. Bu virüslerin keşfinden önce genetik bilgilerin her zaman DNA'dan RNA'ya doğru transfer olduğu bir dogma vardı. Bu nedenle bazı virüslerin ters transkripsiyon (reverse transcription) yaptıklarının bulunması devrim gibi bir etkiye neden olmuştur (Carter ve Saunders 2007).

Retrovirüslerin sınıflandırılması Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi tarafından basit virüsler olarak tanımlanan *alfaretrovirüsler*, *betaretrovirüsler* ve *gamaretrovirüsler* ve kompleks olarak tanımlanan *deltaretrovirüsler*, *epsilonretrovirüsler*, *lentivirüsler* ve *spumavirüsler* şeklinde yapılmıştır. Basit virüsler sadece Grup-spesifik antijen (Gag), pro gen (Pro), Polimeraz (Pol) ve envelope (Env)

gen ürünlerini kodlarken, kompleks virüsler bunların yanında bir dizi fonksiyonla, küçük düzenleyici proteinlerin bir serisini de kodlarlar (Knipe ve ark. 2001).

Retrovirüsler zarflı 80-110 nm çapında ve viryon büyüklüğü 9-10 kb büyüklüğünde, (+) polariteli virüslerdir. Viryon RNA genomunun iki kopyasını içerir, bu yüzden viryon diploid olarak tanımlanabilir. İki molekül birbirini tamamlayan seriler arasında baz eşleşmesiyle oluşan bir dimer olarak bulunur. İki RNA molekülü arasındaki etkileşen bölgeler öpüşen lob kompleksi olarak açıklanabilir.

1.10. Modern Dönem

On sekizinci yüzyıla kadar geçen zaman botanik çağı olarak adlandırılmaktadır (Somberg 1996). İnsanlık tarihinin başlangıcından bu yana bitkilerin yemek, dini önemi olan nesnelere ve ilaç olarak kullanılmasıyla ilgili belgeler mevcuttur. Yunanistan ve Mısır'da çeşitli hastalıklar için bileşen miktarları ve dozaj gereksinimlerini içeren ecza kitaplarının delilleri bulunmaktadır. Daha sonra, 19. yüzyılın ilk yarısında hastalıklar semptomlar ile belirlenmeye başlandı ve sağlığa giden yol semptomla mümkün olduğunca şiddetli saldırmaktı. Patent ilaçlar ve özellikle homeopati bu yüzyılın ikinci yarısında, daha sonraları farmasötik sanayinin doğmasına yol açacak olan ticari temelli bir ilaç endüstrisi için zemin hazırlamışlardır. Geliştirilen ilaçlar arasında kinin, digitalis (yüksükotu), kokain ve yüzyılın sonlarına yakın ise antipirin ve aspirin gibi otantik ilaçlar kazara keşfedilmiştir.

Bu dönem, doğada bulunan bazı maddelerin biyolojik aktivitelerini anlamaya yönelik bilgiyle modern ilaç keşfini getirmiştir. Buna ek olarak hastalığın mikrobiyal teorisinin kabul edilmesi yaşayan mikroskopik canlıların bulaşıcı hastalıklara sebep olduğunu açıklamada yardımcı olmuştur. Bu teori tıbbi ilimde anahtar bir gelişmedir.

Vitaminlerin keşfi ve kimyadaki gelişmeler 1920 ve 1930'ların ana karakteristiğidir (Pizzi 2000). Aynı zamanda yeni aşılarda ve ilaçlar geliştirilmiştir. Bunların en önemlilerinden biri 1928 yılında penisilinin Alexander Fleming tarafından bulunmasıdır. Son olarak bu dönemin diğer bir katkısı yeni tıbbi malzemelerin ve bunlarla ilişkili teknolojinin geliştirilmesine yol açan disiplinler arası düşünce olmuştur. İlk defa biyoloji, fizik ve kimyada elde edilmiş olan bilgiler farmasötik bilimi alanını geliştirmek için birleştirilmiştir.

Genellikle antibiyotik dönem olarak bilinen 1940'lı yıllar ilaçların şans eseri bulunmasının azaldığı yıllardır. Araştırmacılar spesifik ilaçlar aramaya başladılar ve sıklıkla onları bulmaya odaklandılar. Bu çeşitli hastalıkları hedef alan çok sayıda ilacın keşfedilmesine yol açmıştır. Aynı zamanda II. Dünya Savaşı da önemli bir rol oynamıştır. Örneğin enfekte olmuş askerlerin korunması ihtiyacı penisilin ve antibiyotiklerin geliştirilmesi ve üretilmesini hızlandırmıştır.

Bin dokuz yüz ellilerdeki Soğuk Savaş, Kore Savaşı, 1957 yılında ilk yörünge uydusunun fırlatılması gibi dünya olayları aynı zamanda ilaç keşfini etkilemiştir. Daha önce bilimsel amaçlar veya savaş için kullanılan teknolojiler artık siviller için kullanılmaya başlanmıştır. Yeni teknoloji ve yeni enstrümanların insan vücudunun nasıl çalıştığı anlayışıyla birleştirilmesi ve DNA'nın yapısının öğrenilmesi yeni ilaçların geliştirilmesi için yeni imkânların pencerelerini açmıştır.

Altmışlı yıllar yüzyılın farmasötik on yılı olmuştur. Bu dönemde yaşamlarının her yönüyle hapları hakkında bilinçli olmuşlardır. Analitik kimyacılar ve biyologlar hiçbir zaman olmadığı kadar yeni ilaçların keşfi için birlikte çalışmışlardır. DNA hakkındaki bilgi ve aslında DNA'nın genetik materyal olduğunun kabul edilmesi sonraki yıllarda iz bırakmıştır. Araçlardaki gelişme ve güçlü hesaplama teknolojileri laboratuvar otomasyonunu kolaylaştırmış ve yeni ilaçların geliştirilmesini ve keşfini de desteklemiştir. Son olarak, etiyojideki (hastalıkların nedenlerinin çalışması) atılımlar yeni ilaçların keşfedilmesi için kullanılan stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olmuştur.

Yetmişli yıllar kansere karşı savaşın başladığı yıllardır. Hesaplama teknolojisi canlı bilimi ile birleşmiş ve genetik mühendisliğini doğurmuştur. San Francisco'da 1976 yılında Genentech Inc., yeni keşiflere sermaye sağlamak için kurulmuş ve bu da biyoteknoloji endüstrisinin doğumunun işareti olmuştur. Sonuç olarak 1970'lerde edinilen bilgi ve enstrümanlar 1980 ve 1990'larda rasyonel ilaç dizaynının başlamasına yol açmıştır.

Bin dokuz yüz seksenler daha ileri bilimsel ve teknolojik gelişmelerin yanı sıra AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) gibi önemli hastalıkların görülmesi ile tanımlanabilir. AIDS immünolojinin gelişmesini sağlamıştır. Yeni araştırmaları tetikleyen diğer bir olgu ise eski hastalıkların klasik ilaçlara karşı direnç göstermesidir.

1.GİRİŞ

İlaç keşfi alanında bu on yılda iz bırakan gelişmeler yeni ilaçların dizaynı için hesaplama teknolojisi uygulamaları ve küçük biyoteknoloji şirketlerinin daha büyük farmasötik şirketler tarafından satın alınması stratejisi etrafında şekillenmiştir. Moleküler biyoloji ve bilgisayarların kullanımı buluşlara yeni bir yaklaşım doğurmuştur. Farmasötik tarihinde bu zamana kadar, aktif bileşiklerin keşfi ampirik bir yaklaşımla dene ve gör şeklindeydi. Bu periyotta, vücut fizyolojisi ve tıbbi bozukluklar ile ilgili bilgiler, ilaçlar hakkındaki bilgilerle birleşerek gerçek moleküllerin kavramsallaşmasına neden olmuştur. Kimyacılar bu ideal moleküle en yakın olan yapıları araştırmaya başlamışlardır.

Bu on yıl aynı zamanda ilaç tasarımının ticarileştiği dönemi görmüştür. Aktif bileşiklerin keşfedilmesi için girişimci küçük şirketler kuruldu. Bununla beraber 80'lerin ortalarına kadar bu şirketler yaşam savaşı vermekteydiler. Bu onların büyük ilaç firmaları tarafından satın alınmasına neden oldu.

Son olarak, diğer çok büyük bir gelişme kombinatoriyal kimyadır. Kombinatoriyal kimya saha sonra biyolojik aktiviteleri için görüntülenecek olan binlerce organik bileşiğin aynı anda üretilmesi için kimyasal olarak birbirine benzer ajanların büyük setlerinin eş zamanlı olarak kullanılmasıdır.

Bin dokuz yüz yetmiş ve seksenli yıllarda hesaplamalı teknolojiye gelişmeleri ve onların sağlık biliminde kullanılmasını takriben, doksanlı yıllar ilaç keşfinde robotların ve otomasyonun kullanılmasını görmüştür. Esasen, bilgisayarların kullanılmasından dolayı ilaç keşfinde meydana gelen hızlı gelişmelerin dışında, daha önceden tedavi edilmiş hastalıkların yeniden görünmesi de bu aynı zamanda on yıla damga vurmuştur.

Yüzyılın son on yılının asıl katkıları ve karakteristikleri ilaç keşif işleminin rasyonelleştirilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Rekabetin baskıları ve keşiflerin sayısının direkt olarak organizasyonların finansal performansına bağlı olması etkili ilaç keşfinin geliştirilmesini daha çok zorlamıştır. Buna ek olarak yeni teknolojiler bilim adamlarına ilaç dizaynında destek olacak olan bileşiklerin kütüphanelerinin kurulmasına da yardım etmiştir (Tsinopoulos ve McCarthy 2002).

Görüldüğü üzere insanlık tarihi boyunca hastalıkların tedavisi için her türlü yola başvurulmuştur. Bin sekiz yüz-bin dokuz yüzlü yıllara kadar hastalıkların temel

etkenlerine inilememiştir. Bu yıllarda özellikle mikroskobun bulunmasından sonra olan gelişmeler ve mikropların keşfi ile birlikte yavaş yavaş bazı gözle görülemeyen varlıkların da hastalık sebebi ve taşıyıcısı olabileceği düşünülmeye başlanmıştır.

Daha sonra bilim ve teknolojideki gelişmelerin sağlık alanında kullanılmasıyla insan anatomisi ve insan vücudunun işleyişi hakkında geniş şekilde bilgi elde edilmiştir. Hastalığa etken olan sebepler bulunduktan sonra bu etmenlerin vücutta hangi işlemler yaparak, hangi yapıları etkilediği veya değiştirdiği de belirlenmeye başlanmıştır. Mikrobiyoloji alanındaki gelişmeler bunda oldukça etkili olmuştur. Mikropların yapısı, üremesi ve diğer fonksiyonları öğrenildikçe, vücuttaki aktivitelerini sonlandırmak veya en aza indirmek için yapılabilecekler düşünüldüğünde çözümler yavaş yavaş belirmiştir. Tek başlarına üreme yeteneği olmayan bu canlıların konaktaki proteinleri, konak DNA ve RNA'sı gibi materyalleri kullanarak bu işlevleri yerine getirdiği saptanmıştır. O halde hedef, mikropların bu yapılara ulaşmasını engellemek ya da ulaştığı yapılarda işlev görmesini engellemek olmalıdır. Bunun yanında gelişen teknoloji ile birlikte birçok proteinin kristal yapıları elde edilmiş ve bu kristal yapıların kütüphaneleri oluşturulmaya başlanmıştır.

Bilgisayarların gelişmesi ile birlikte birçok alanda olduğu gibi sağlık alanında da oldukça geniş şekilde bilgisayarlardan yararlanılmıştır. Moleküler Dinamik (MD) yöntemleri ilk olarak 1950'li yıllarda teorik fizik topluluğunda tasarlanmıştır. Alder ve Wainwright, içinde atomların sadece mükemmel çarpışmalarla etkileştiği sabit-küre modeli olarak adlandırılan yöntemi kullanarak 1957 yılında ilk MD simülasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Alder ve Wainwright 1957). Daha sonra Rahman, gerçek atom etkileşimlerini taklit etmek için düzgün, sürekli bir potansiyel uygulamıştır (Rahman 1964). Bilgisayarların daha yaygın hale gelmesiyle MD simülasyonları 1970'li yıllar süresince daha kompleks sistemler için geliştirilmiştir. Bu gelişme fizik temelli ilk ilkeler varsayımı ile oluşturulan bir ampirik enerji fonksiyonu kullanılarak 1976'da ilk protein simülasyonunu ile sonuçlanmıştır (MacCammon 1976, McCammon ve ark. 1977). MD simülasyonları günümüzde özellikle materyal kimyası ve biyofizik alanlarında popüler olarak geniş ve sıklıkla uygulanmaktadır (Adcock ve McCammon 2006).

Bilgisayar desteği ve yapı temelli ilaç tasarımı kullanılarak ilk inhibitör glaucomaya karşı geliştirilen bir karbonik anhidraz inhibitörü (Böhm ve Klebe 1996) olan dorzolamide'dir (Andrews ve ark. 1984). Human Immunodeficiency Virus (HIV) ile ilgili yapılan çalışmalarda ise yine yapı temelli ilaç tasarımı kullanılarak nelfinavir (Jones ve ark. 1991), saquinavir (Brunger ve ark. 1998), ritonavir (Brünger 1990), indinavir (Anonim 1994), amprenavir (Marti-Renom ve ark. 2000) ve lopinavir (Oshiro ve ark. 1995) ligandları geliştirilmiştir. Bu HIV proteaz inhibitörleri hali hazırda klinik kullanımdadır (Andrew ve ark. 2003). Yine yirmi yıllık bir integras araştırmasından sonra 2007 yılında IN inhibitörü Raltegravir (marka ismi Isentress) duyurulmuştur (Cahn ve Sued 2007). Bu inhibitörün geliştirilmesinde moleküler dinamik simülasyonları ve ligand yerleştirme gibi hesapsal yöntemler önemli rol oynamışlardır (Sippel ve Sotriffer 2010). Bu çalışmada da benzer yöntemler kullanılmış ve hesaplamalı kimya destekli ilaç geliştirme basamaklarından biri olan, ilaç adayının proteine yerleştirilmesi işleminde Raltegravir'in geliştirilmesinde kullanılan program da (Lin ve ark. 2003, Schames ve ark. 2004) yine bu çalışmada yer almıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. HIV (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)

HIV (Human Immunodeficiency Virus, insan immün yetmezlik virüsü) retrovirüslerin lentivirüs cinsinin bir üyesidir. HIV enfeksiyonu, etken virüsün etkisiyle bağışıklık sisteminin giderek baskılandığı kronik bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan virüs (HIV), lentivirüs ailesine mensup bir retrovirüstür. Retrovirüsler, tek sarmallı RNA içeren zarflı virüslerdir. Ters transkriptaz enzimi aracılığı ile genetik materyallerini çift sarmallı DNA'ya çevirip konakçı kromozomuna entegre etme özelliklerine sahiptir. İnsan lenfositlerinin yüzeyinde, hücre aktivitesi ve fonksiyonunda rol alan spesifik glikoproteinler mevcuttur. Farklılaşma kümesi 4 (CD4;cluster differentiation) hücre yüzey antijeni taşıyan lenfositler, immunolojik reaksiyonlara yardım eden hücrelerdir. CD4 pozitif lenfositler aynı zamanda HIV enfeksiyonunun primer hedefleridir. HIV enfeksiyonunun seyri boyunca CD4 pozitif T lenfosit hücre sayısı giderek azalır buna bağlı olarak da AIDS (acquired immune deficiency syndrome) için karakteristik fırsatçı enfeksiyonlar ve kanserler ortaya çıkar. Virüs alındıktan sonra hastalık belli evrelerle seyreder (Güven 2007). Lentivirüs ailesinin diğer üyelerine maymun immün yetmezlik virüsü (SIV), visna virüsü ve at anemi enfeksiyöz virüs (EIAV) örnek olarak gösterilebilir (Turner ve Summers 1999). Kendi doğal primat konaklarına zarar vermeyen SIV'in tersine, HIV enfeksiyonu bağışıklık sistemine zarar verip, vücudu geniş bir aralıktaki bakteri, virüs, mantar ve protozoaya karşı hassas hale getirmektedir. Bu duruma kazanılmış immün yetmezlik sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) (Carter ve Saunders 2007) denir.

Her biri farklı simian immün yetmezlik virüsünden (SIV) gelişen iki tip insan immün yetmezlik virüsü vardır (HIV-1 ve HIV-2). Her ikisi de de 20. yy sonlarında meydana çıkmıştır. İnsanlar HIV virüsünü konuşurken kastettikleri HIV-1'dir. Gerçekte virüsün iki ayrı büyük türü vardır, HIV-1 ve HIV-2. HIV-2, HIV-1'inkine benzer etkilere sahiptir, ancak sadece belirli alanlarda görülmektedir. ABD'de çok az insan (100'ün altında) HIV-2 tarafından enfeksiyon kapmıştır. HIV-2 virüsünün yoğun olarak görüldüğü yer Afrika'nın kuzey kesimleridir. İki tür arasında birkaç farklılık vardır. Birincisi HIV-2 yayılması zordur, çünkü sadece cinsi münasebet sırasında anneden döl yatağında bulunan çocuğuna geçerken, HIV-1 bunlarla taşınmasının yanında kan-kan

etkileşimi ve iğne paylaşımı ile de taşınabilmektedir. İkincisi HIV virüsünün ikinci formuyla enfekte olmuş olanlar kan dolaşımalarında genellikle daha düşük bir virüs yoğunluğuna sahiptirler. Bu AIDS'in HIV-2 saldırısının (başlangıcının) HIV-1'e göre daha yavaş olması gerçeğinin sebebidir. HIV-2'ye eğilimli olan bölgelerle ilişki halinde olan insanlara, bazen sadece HIV-2'yi bulmak için tasarlanmış ikinci bir testi yapmaya neden olan son bir fark şudur ki HIV için olan testlerin çoğu ikinci türü belirlemez (Harold 2004).

Dünya genelinde salgın olan HIV-1 asıl tiptir ve üç grupta incelenebilir: M (majör), O (outlier), N (non-M/O). 2009 yılında gorillerden türediği düşünülen ve bahsedilen üç türden farklı yeni bir grup; P önerilmiştir. M grubunun altında dokuz alt grup (A, B, C, D, F, G, H, J, K) ve birkaç ana dolaşım rekombinant formlar (CRFs) bulunmaktadır. Global enfeksiyonların yarısına sebep olan alt tip C'dir. En yaygın ikinci tip ise A'dır. Alt tip B batı dünyasında baskındır ve araştırma laboratuvarlarında en çok çalışılan alt tiptir (Dimmock ve ark. 2007, Tortora ve ark. 2010, Teixeira ve ark. 2011, Chukkapalli 2011).

2.1.1. AIDS'in Keşfi

İlk AIDS vakası 1981'de Amerika'da rapor edilmiştir (Gottlieb ve ark. 1981, Masur ve ark. 1981). Beş genç homoseksüel erkeğe sadece bağışıklık sistemi ilaç veya hastalıkla yok edilmiş kişilerde görülen Pnömonikistis karini zatürresi teşhisi konmuştur. Bir sonraki ay yirmi altı eşcinsel erkeğe yaşlı Musevilerde veya İtalyanlarda görülen nadir bir deri kanseri hastalığı olan Kapsosi's Sarcoma teşhisi konmuştur. 1983-84'te AIDS'li hastadan retrovirüsün izoloasyonu rapor edilmiştir. Bu virüs insan immün yetmezlik virüsü tip 1 idi (Barre-Sinoussi ve ark. 1983, Popovic ve ark. 1984, Levy ve ark. 1984).

2.1.2. AIDS'in Belirlenmesi ve Semptomları

Ocak 1993'te Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) AIDS'in belirlenmesi için bir yöntem önermiştir. Bu yöntem HIV virüsünün saldırdığı bağışıklık hücreleri CD4'ün kandaki sayısı ve tespit edilen AIDS vakalarında görülmüş olan hastalıkların bulunmasıyla ilgilidir. Buna göre CD4 pozitif T hücre sayısının mm^3 'te 200'ün (normal insanlarda 500-1500 arası) altına düşmesi ve AIDS vakalarında karşılaşılan Kapsosi's

Sarkoma, rahim ağzı kanseri (invasive servical cancer) ve nükseden bakteriyal iltihaplar AIDS testinin günümüz kriterleridir.

AIDS evre olarak üç bölüme ayrılabilir; erken akut dönemi, kronik/gizil dönem ve AIDS dönemi. Akut evresi CD4 hücre sayısı aralığının 1000-5000 hücre/mm³ olduğu 1-2 haftalık sürede sona erer. Bu aşamadaki belirtileri ateş, baş ağrısı, bulantı, iştahsızlık, yorgunluk, boğaz ağrısı ve kuru öksürüktür. Kronik/gizil dönem 8-10 yıl kadar sürer. Bu dönemde CD4 sayısı aralığı 750-500 hücre/mm³'e düşer ve gözlenebilir belirtiler bulunmamaktadır. Son olarak, CD4 hücre sayısı aralığının 500-0 hücre/mm³ olduğu AIDS evresi 1-2 yıl sürer. Bu dönemdeki başlıca işaretler tüberküloz, lenfadenopati, Kaposi's sarcoma, ağız ve yemek borusu ağrısı, odinofaji (yutmada ağrı ve zorlanma) ve merkezi sinir sistemi (CNS) lenfoması olarak sayılabilir (San 2005).

2.1.3. AIDS'in Bulaşma Yolları

HIV çeşitli yollarla bulaşır. HIV virüsünün taşınması meni, vajinal sıvı veya kan gibi vücut sıvıları alışverişi yoluyla her türlü cinsel ilişki sırasında gerçekleşebilir. Bunun yanında HIV bulaşmış kan ve kan ürünlerinin nakliyle, ilaç kullanıcılarının enjeksiyon sırasında iğnelerini paylaşmaları yoluyla, sağlık çalışanlarının iğne uçları, açık yaralar ve mukoza membranına maruz kalması ile ve HIV ile kirlenmiş cilt delici aletler yoluyla HIV bulaşabilmektedir. Son olarak HIV virüsü kapmış anneler dölyatağı, peripartum ve süt emzirme yollarıyla virüsü çocuklarına bulaştırabilirler (San 2005).

2.1.4. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü'nün (HIV) Keşfi

AIDS etkeni olan virüs, ilk defa 1983 yılında iki ayrı grup tarafından bağımsız olarak saptanmış ve etkene farklı isimler verilmiştir. Pasteur Enstitüsündeki araştırmacılar genç bir eşcinsel erkekte retrovirüs izole ederek hastada tipik bir lenfadenopatinin varlığı nedeniyle virüse "lenfadenopati ilişkili virüs (lymphadenopathy associated virus: LAV) adını vermişlerdir (Barre_Sinoussi ve ark. 1983, Ustaçelebi 1999). Bir yıl sonra Gallo ve çalışma arkadaşları yetişkin ve pediatrik AIDS hastalarının periferik tek çekirdekli kan hücrelerinden izole edilen HTLV'nin haricinde başka bir insan retrovirüsü buldular ve bunu HTLV-III (Gallo ve ark. 1984) olarak adlandırdılar. O zamanlar Levy ve çalışma arkadaşları da AIDS hastalarından elde ettikleri ve AIDS-ilişkili retrovirüs olarak adlandırdıkları virüsü bildirmişlerdir (Levy ve ark. 1984). Bu

virüslerin üçünün de aynı olduğu, retrovirüslerin aynı grubuna ait oldukları görülmüş, özellikleri lentivirine olarak belirlenmiş ve 1986 yılında bu virüse standart bir isim olan insan immün yetmezlik (HIV) virüsü verilmiştir (San 2005, Kane 2008).

2.1.5. Dünya’da ve Türkiye’de HIV/AIDS

Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) modern dünyanın en önemli hastalıklarından biridir (Marchand ve ark. 2006, Delelis ve ark. 2008). The Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS 2010) 2010 raporuna göre dünyada 33.3 milyon insan HIV virüsü ile yaşamaktadır. Bunların 30.8 milyonunu yetişkinler oluştururken HIV virüsü ile yaşayan kadın sayısı 15.9 milyondur. İki bin dokuz yılında 2.6 milyon insanın yeni enfekte olduğu ve bunların 370 000’inin çocuk olduğu öngörülmektedir. Aynı yılda AIDS hastalığından ölenlerin sayısının 1.8 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Bu sayı çocuklarda ise 260 000 olarak bildirilmiştir. HIV virüsünden etkilenenlerin sayısında 2001-2009 arasında 33 ülkede %25’in üzerinde azalma görülmüştür.

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2010 verilerine göre Türkiye’de 2001 HIV enfeksiyonu taşıyanların sayısı 142 iken bu sayı sürekli artış göstererek 2010 yılında 557 kişiye ulaşmıştır. Ayrıca bu rapora göre 2010 yılında Türkiye’de 70 kişi AIDS hastalığına yakalanmış bulunmaktadır (Sağlık Bakanlığı 2011).

2.1.6. HIV/AIDS İlaçları ve Geliştirilmekte Olan İnhibitörler

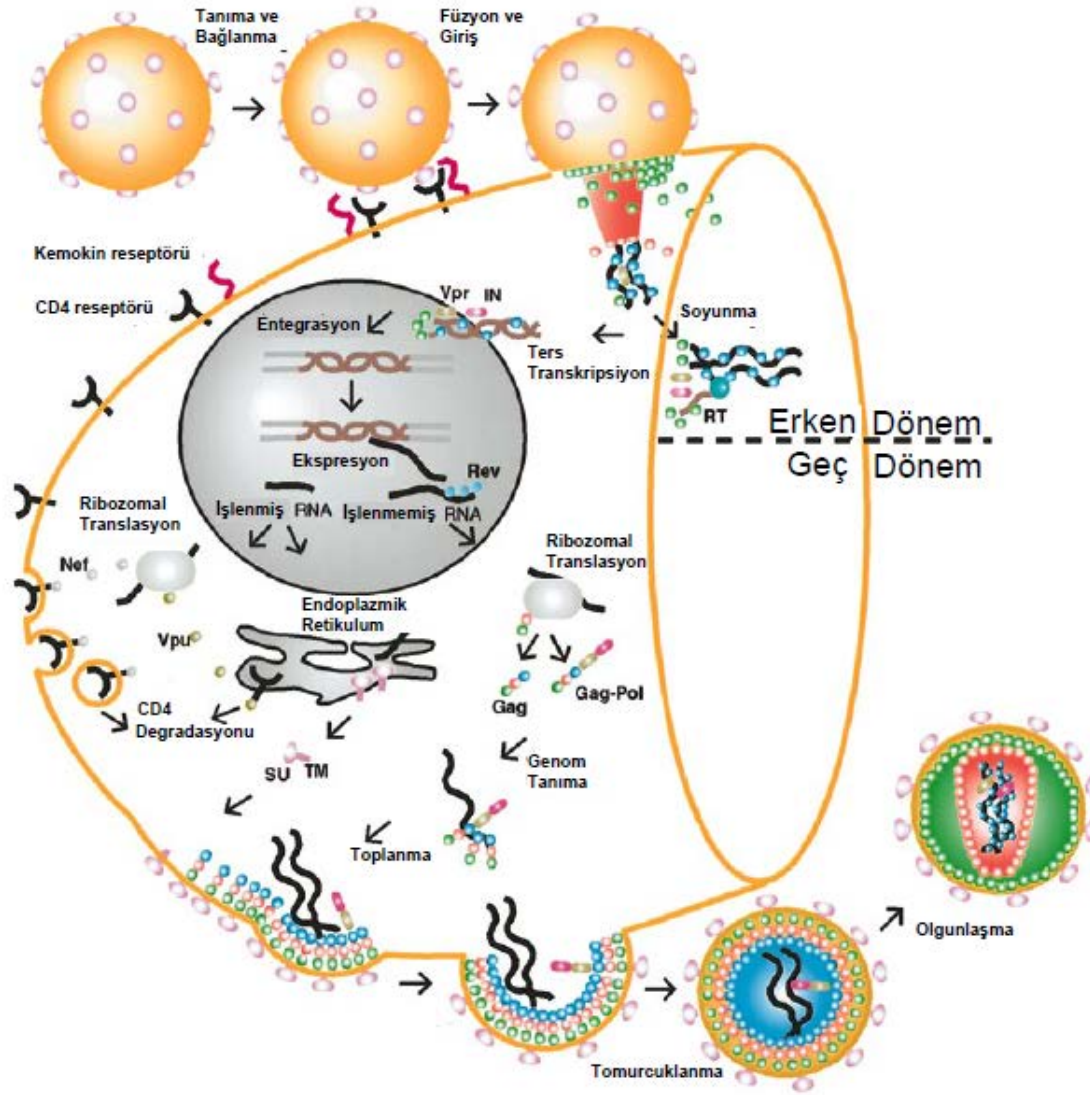
Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Bakanlığı (FDA) tarafından 2012 yılı itibarı ile 2 si bazı ilaçların kombinasyonundan oluşan 35 anti-HIV ilacını onaylamıştır. Bunlardan 30’u ters transkriptaz enzimi (RT) ve proteaz enzimini (PR), kalan 3 ilaç efuvirtide, maraviroc ve raltegravir (RGV) ise sırasıyla viral füzyon, giriş veya cDNA entegrasyonunu hedef almıştır (FDA, 2012). Yüksekçe aktif anti-retroviral terapi (HAART) olarak bilinen PR ve RT inhibitörlerinin kombinasyonundan oluşan ilaç kokteylleri viral yüklemeleri belirlenemeyen derecelere kadar düşürmekte ve bu seviye iki veya daha fazla yıl süresince korunabilmektedir (Gulick ve ark. 1997, Turner ve Summers 1999, Deng ve ark. 2006, Crosby 2010). Bununla birlikte ilaç-direnci yaygınlığı artmaktadır. HIV’in yüksek replikasyon oranının RT’nin hata eğilimi ile birleşmesi ilaca karşı direncin büyük ölçüde sorumlusudur. Enfeksiyonların yaklaşık

%10-15'i tek ilaca karşı ve %5-10'u ise çoklu ilaca karşı dirençlidir (Chen ve ark. 2008, Crosby 2010).

Ekim 2007'de U.S Food and Drug Administration'ın (FDA) Raltegravir'i (RGV) kabul etmesi kullanılan HIV hedefleri listesine integrasyonu (IN) içererek şekilde genişletti. RGV'nin ilaca dirençli HIV ile enfekte olan hastalar için değerli bir kurtarma tedavisi olmasına rağmen, RGV'ye karşı direnç de rapor edilmiştir (Carpentier ve ark. 2008, Cooper ve ark. 2008). Diğer bir IN hedefleyen ilaç, Elvitegravir (EVG) FDA'nın III. faz klinik denemelerindedir ve tedavisi başarısız olan hastalar için başka değerli bir kurtarma seçeneği olmayı vaat etmektedir (Crosby 2010).

2.1.7. HIV Hayat Döngüsü

HIV-1 replikasyon döngüsünün genel özellikleri Şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Erken dönem, hedef hücrenin olgun viryon tarafından tanınmasıyla başlar ve genomik DNA'nın konak hücrenin kromozomuna entegrasyonuna yol açan ve kapsayan bütün işlemleri içerir. Geç dönem entegre olmuş proviral genomun düzenlenmiş anlatımıyla başlar ve bundan sonraki virüs tomurcuklanması ve olgunlaşmasını içeren bütün prosesleri içerir.



Şekil 2.1. HIV-1 hayat döngüsü (Turner ve Summers 1999)

HIV-1 parçacıkları normalde bağışıklık tanımada fonksiyon gören CD4 taşıyan hücrelere spesifik olarak bağlanır. Bağlanma viral zarf glikoproteini SU (gp120) ve CD4'ün amino-terminal immüoglobulin bölgesinin spesifik etkileşimiyle meydana gelir. Bu etkileşimler enfeksiyon için yeterli değildir ancak bağlanma için yeterlidir. Diğer retrovirüslerin tersine, primat lentivirüsler viral ve hücrel membranların füzyonu için ek hücre yüzey proteinlerine ihtiyaç duyar. HIV-1 için, membran füzyonu CXCR4 ve CCR5'i içeren birkaç kemokin reseptöründen biri ile başlatılabilir (Turner ve Summers 1999).

Koreseptöre bağlandıktan sonra viral ve hücrel membranlar birleşir ve viral öz hücrenin sitoplazmasına salınır (Sierra ve ark. 2005). Membran füzyonunu, hücre içi ters transkripsiyon kompleksini karşılayan tam olarak anlaşılmamış açılma (uncoating)

olayı takip eder. Ters transkripsiyon sitosol içinde ters transkriptaz (RT) tarafından katalizlenir (Turner ve Summers 1999). Viral soyunma hücrel faktörleri ve viral proteinler matriks (MA), negatif düzenleyici faktör (Nef) ve viryon enfektivite faktörünü (Vif) kapsamaktadır (Sierra ve ark. 2005).

Viral DNA sentezlendikten sonra integras (IN), MA, RT ve viral protein R (Vpr) proteinlerinin yanı sıra konak proteini HMG-I(Y)'nin de içinde bulunduğu ön entegrasyon kompleksinin (PIC) bir parçası olarak çekirdeğe taşınır. Ön entegrasyon virüsünün çekirdek lokalizasyonu, yardımcı gen Vpr tarafından yönetilir. Vpr aynı zamanda enfekte olmuş hücrelerin büyümesini G2 (hücre konformasyonlarından biri) fazında tutarak hücrenin normal döngüsüne de engel olur. Çekirdeğe aktif taşınmadan sonra viral DNA IN'ın katalitik aktivitesiyle konak genomuna kovalent olarak bağlanır (Turner ve Summers 1999).

Virüs hayat döngüsünün geç dönemi translyasyon için çekirdek dışına taşınan işlenmiş ve işlenmemiş mRNA transkriptlerinin sentezi ile başlar. Başlangıçta, yardımcı proteinler transkripsiyon transaktivatörü (Tat), viryon proteinleri ifadesi düzenleyicisi (Rev) ve Nef'i kodlayan kısa işlenmiş RNA türleri sentezlenir (Turner ve Summers 1999). Başlangıçta az olan Tat sayısı belli seviyelere ulaşınca daha ileriki HIV-1 genlerinin transkripsiyonunu yönetir (Sierra ve ark. 2005).

Genellikle işlenmemiş mRNA'lar ilerde işlenebilecekleri veya bozunabilecekleri yer olan çekirdek içinde tutulurlar. Ancak, Gag ve Gag-Pol sentezleri, paketlenmeleri için sitoplazmada fonksiyonel intronları içeren tam uzunlukta ve tek başına işlenmiş mRNA transkriptlerine ihtiyaç duyulmaktadır ve bunların taşınmasına elzem HIV yardımcı proteini Rev aracılık etmektedir. Rev bir oligomer olarak Rev yanıt elementi (RRE)'ne bağlanır ve hücrel çekirdek mekik proteini eksportin-1'i (XPO) ve çekirdeksel dışarı salma faktörü Ran guanozin trifosfatazı (GTP) toplar. Bu kompleks daha sonra GTP'nin guanozin difosfata (GDP) hidrolizlendiği çekirdek gözeneklerine doğru sitozole taşınır, kompleks ayrışır ve Rev'in amino-terminal çekirdek lokalizasyon sinyali (NLS) onu çekirdek içine geri yönlendirir. Bu şekilde Rev yüksekçe işlenmiş mRNA'ların (Tat, Rev ve Nef'i kodlar) erken sentezi ile işlenmemiş (Gag ve Gag-Pol proteinlerini kodlar) ve bir kere işlenmiş (Env, viral protein U (Vpu), Vif ve Vpr'ı

kodlar) mRNA'ların geç sentezlenmesi arasında bir anahtar olarak işlev görür (Turner ve Summers 1999, Sierra ve ark. 2005).

Env öncül poliproteini (gp160) işlenmiş env mRNA genini mesaj olarak kullanarak endoplazmik retikulum (ER) içinde sentezlenir. Öyle görünüyor ki protein ER içinde trimer bir yapıya oligomerleşmekte ve yüksekçe glikozitlenmektedir. Env posttranslasyonel olarak ER ve Golgi cisimciği içinde değişir ve kovalent olmayan bir şekilde bir araya gelmiş trimerik (TM-SU)₃ glikoprotein kompleksini oluşturmak üzere kırılır. Heterojen olarak glikozitlenmiş TM-SU trimeri daha sonra virüs birleşmesi için hücre membranına taşınır. Env ve CD4 moleküllerinin ikisi de ER içinde sentezlenir ve CD4'ün Env'e ER içinde zamanından önce bağlanması Env'in hücre membranına translokasyonunu veya tam fonksiyonel TM-SU kompleksinin oluşmasını inhibe edebilir. Böylece, CD4 moleküllerine bağlanan ve ubiquitin-proteazom yoluyla onların degradasyonu için sinyal veren viral yardımcı protein, Vpu tarafından ER'den kaldırılması için CD4 hedef haline getirilmiş olur. Benzer şekilde, hücre-yüzey CD4 molekülleri de endozomal degradasyon için Nef proteinin bağlanmasıyla hedef haline gelmektedir.

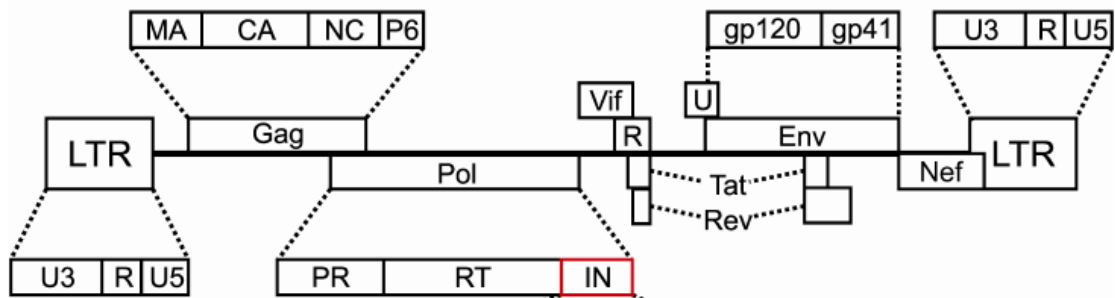
Gag poliproteini işlenmemiş mRNA tarafından ribozomlarda sentezlenir. Gag poliproteini ile hücrenel membranda birleşen Gag-Pol öncül proteinlerinin daha küçük miktarlarının nesillerinde translasyonel bir çerçeve kayması meydana gelir (Şekil 2.1.). N-terminalinden miristollenmiş (miristik asit bağlanmış) poliproteinlerin MA bölgesi hücrenel membrana bağlanmayı sağlar ve TM'nin sitoplazmik kuyruğu ile etkileşir. Gag'ın yaklaşık 1200-2000 kopyası işlenmemiş viral genomun iki kopyasını enkapside eden olgunlaşmamış bir parçacığı oluşturmak için tomurcuklanır. Tomurcuklanma sonunda poliproteinler MA, kapsid (CA) ve nükleokapsid (NC) yapısal proteinler gibi bağımsız enzimlerin üretilmesi için PR tarafından kesilirler. Yapısal proteinler enfekte edici virüs parçacığını oluşturmak için matürasyon denilen bir işlemle yeniden düzenlenirler (Turner ve Summers 1999).

2.1.8. HIV Viryon Yapısı ve Genomu

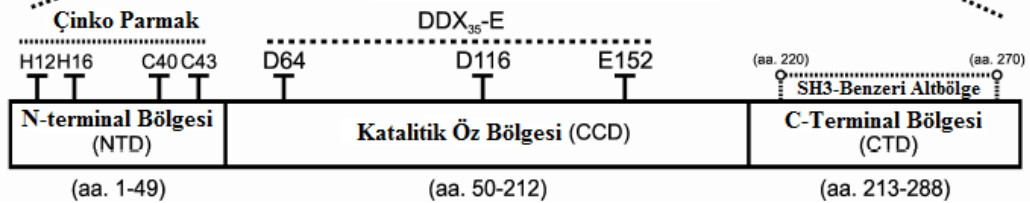
Tipik bir retrovirüs olan HIV enfeksiyöz viryon yapısı pozitif polariteli iki adet birbirinin aynı olan tek sarmallı RNA içerir, yani diploittir. HIV proteinleri proviral DNA'dan kopyalanan m-RNA'lar tarafından kopyalanır. HIV'in hücreleri

enfeksiyonundan sonra erken dönemde viryon RNA'sı ters transkriptaz tarafından lineer çift sarmallı DNA haline çevrilir ve her iki ucunda uzun terminal tekrarlar (Long Terminal Repeat; LTR) yer alır. Bu lineer DNA hücre genomuna entegre olarak "provirüs" yapısını oluşturur. Genomik viral RNA ve m-RNA'lar proviral DNA'dan hücre polimeraz II enzimi yardımı ile sentez edilmektedirler (Ustaçelebi 1999). HIV-1 genom organizasyonu ve IN enziminin bölge yapıları Şekil 2.2.'de verilmiştir.

HIV cDNA Genomu



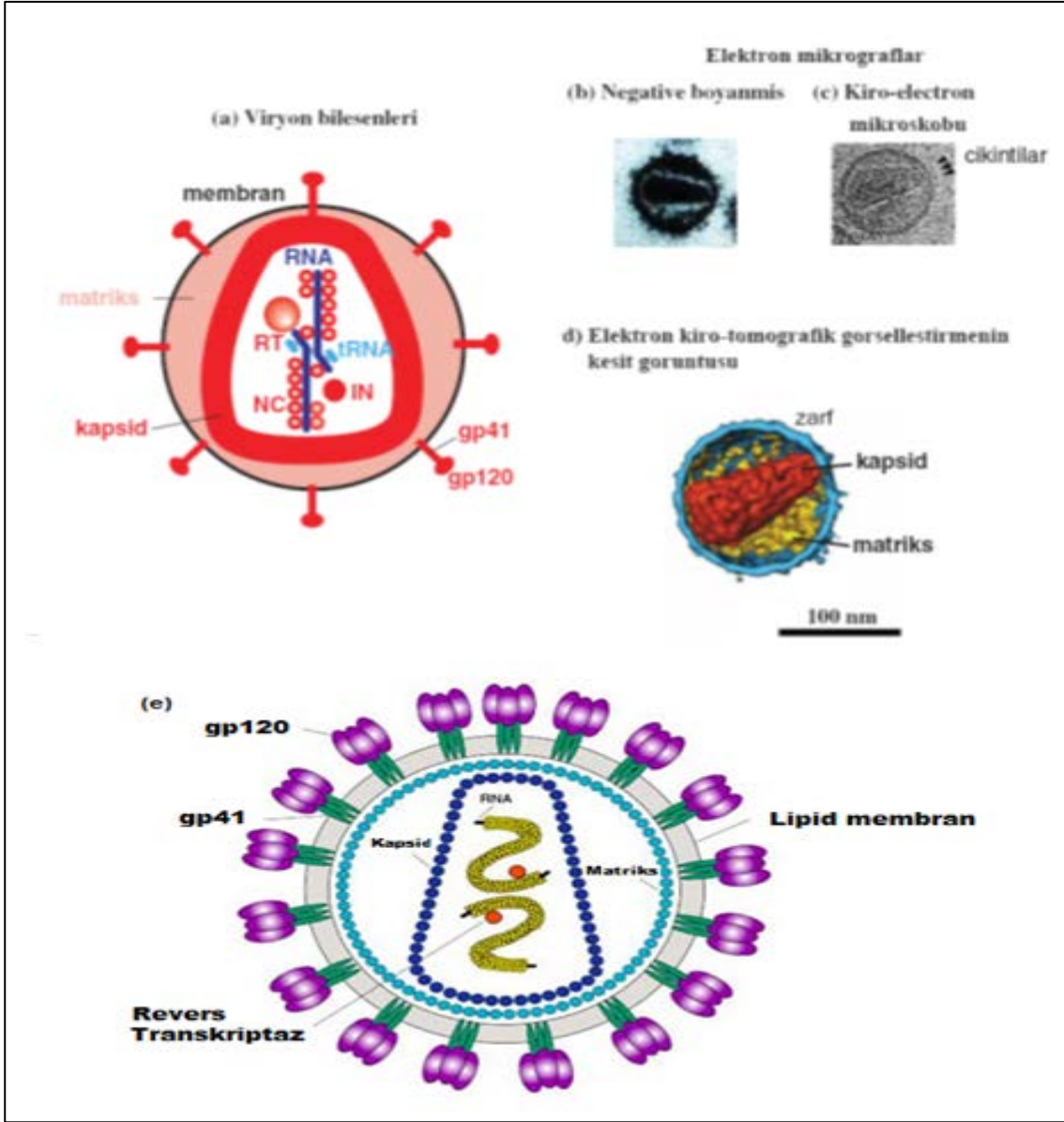
IN Enziminin Yapısı



Şekil 2.2. HIV genomu ve IN proteini bölge yapısı

Olgun HIV viryonu 100-120 nm çapında küresel bir yapıya sahiptir ve genomik RNA moleküllerini, viral proteaz (PR), ters transkriptaz (RT), integraz (IN), Vpu, Vpr ve Nef ile bazı hücre faktörleri içeren, kalın kesik bir koni şekilli nükleokapsidi (öz) çevreleyen çift katlı lipid membranından oluşmaktadır. Viryon içinde HIV-1 genomu tek sarmallı, 9.2 kb'lık iki RNA molekülünden oluşurken, enfekte olmuş hücre içindeki kalıcı halinin genomu çift sarmallı proviral DNA'dan oluşmaktadır (Sierra ve ark. 2005).

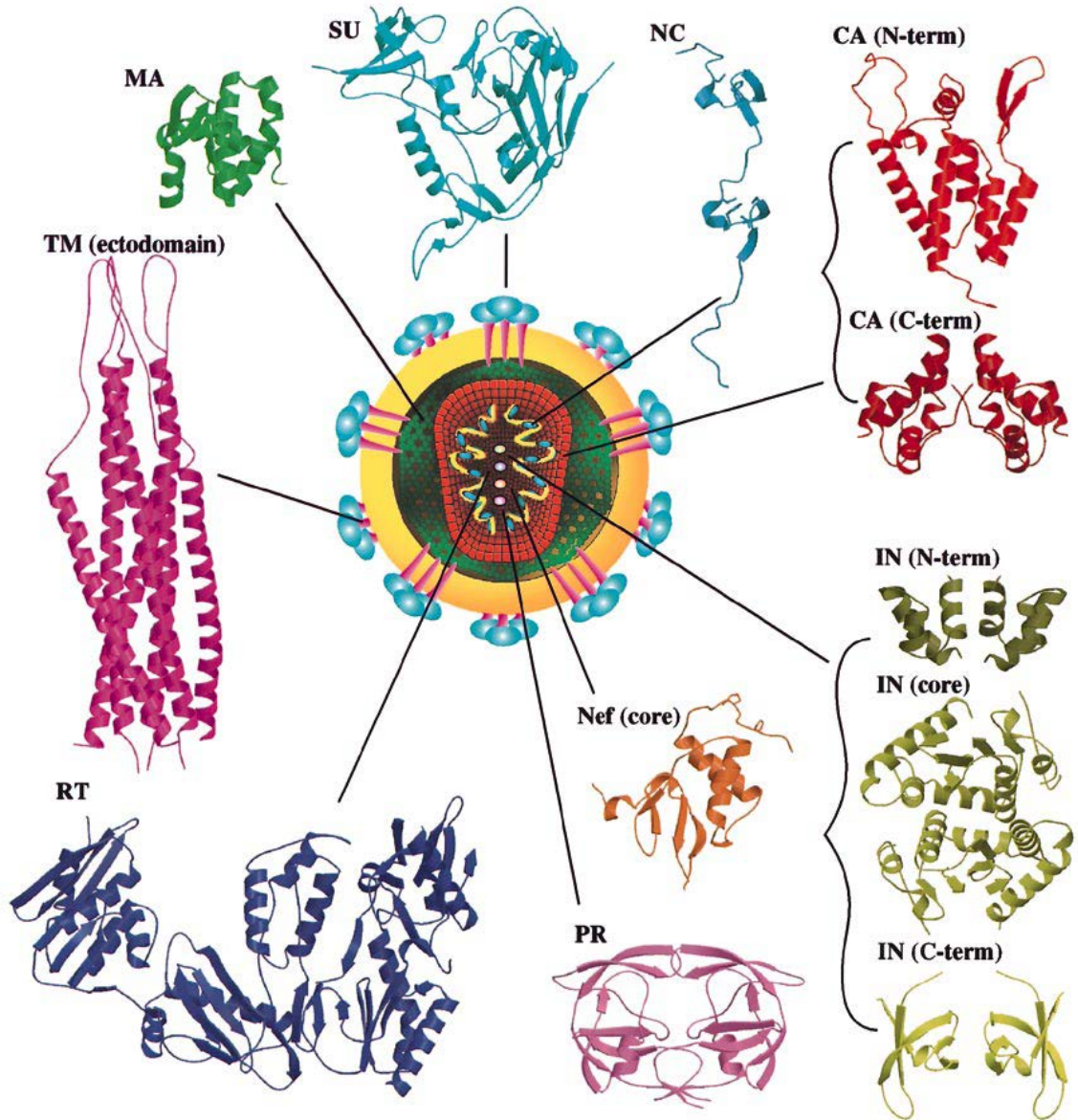
Viryon, retrovirüslerin genel karakteristiklerine sahiptir ancak retrovirüslerin tersine kapsid, geniş tarafı 40-60 nm ve dar tarafı yaklaşık 20 nm çaplı olan koni şeklindedir (Şekil 2.3.). İki veya daha fazla kapsidli viryonlar rapor edilmesine rağmen genellikle viryon başına bir kapsid vardır (Carter ve Saunders 2007).



Şekil 2.3. Hiv Viryonunun genel yapısı ve çeşitli görüntüleri (Carter ve Saunders 2007)

Olgun HIV viryonunun genel özellikleri ve viral proteinlerinin ribbon çizimleri şekil 2.4.'de gösterilmiştir. Bütün lentivirüsler konak hücresinin membranından türetilmiş sarı ile gösterilen çift tabakalı lipid ile sarılmışlardır. Ortaya çıkarılan yüzey glikoproteinleri (SU, gp120; açık mavi) virüse transmembran proteini (TM, gp41; menekşe rengi) ile etkileşimleri yoluyla bağlanmıştır. Çift katmanlı lipid aynı zamanda büyük doku uygunluk antijenleri aktin ve ubikitin dâhil çeşitli hücrel membran proteinlerini içerirler (Arthur ve ark. 1992). Matriks proteininin yaklaşık 2000 kopyasından oluşan bir matriks kabuk (MA, p17; yeşil) viral zarın iç yüzeyinde ve bir konik kapsid çekirdek parçacığı Kapsid Proteini (CA) arasında uzanır. Kapsid proteininin (CA, P24; kırmızı) 2000 kopyası virüsün merkezinde yer almaktadır. Kapsid

partikülü CA ile bir ribonükleoprotein kompleksi olarak stabilize olan viral genomun birleşmemiş iki kopyasını ihtiva eder. Kapsid içinde ayrıca nükleokapsid proteininin (NC, p7; mavi) 2000 kopyası ve viral olarak kodlanan enzimler proteaz (PR; pembe), ters transkriptaz (RT; eflatun) ve integraz (IN; zeytin yeşili) yer almaktadır. Virüs partikülü aynı zamanda Nef (turuncu), Vif ve Vpr yardımcı proteinleri de içermektedir.



Şekil 2.4. Olgun HIV viryon yapısı yapısız olarak karakterize edilmiş viral proteinler ve protein parçalarının ribbon görüntüleri ile çevrelenmiştir (Turner ve Summers 1999)

HIV, replikasyon için konak hücrenin transkripsiyon ve çevrim mekanizmasına ihtiyaç duyan bir parazittir. Viral genom büyüklüğü 9.2 kb olan birçoğu üst üste bindirilmiş okuma parçalarına sahip 15 proteini kodlamaktadır (Şekil 2.3.). Bu genler

fonksiyonel olarak dört grup içinde sınıflandırılabilirler: 1) yapısal: *gag*, 2) zarf: *env*, 3) enzimatik: *pol* ve 4) yardımcı: *tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *vif* ve *nef*.

2.1.8.1. Yapısal Proteinler

HIV *gag* geni olgunlaşmamış viryonu oluşturmak için hücre membranında kendiliğinden birleşen 55 kDa Gag poliproteinini kodlamaktadır. Gag aslında diğer viral bileşenlerin yokluğunda membran-zarflı virüs benzeri parçacıkları oluşturabilmektedir (Gheysen ve ark. 1989). Gag olgunlaşma sırasında proteolitik olarak düşük molekül kütleli parçalanma ürünleri p1, p2 ve p6'ya ek olarak MA, CA ve NC proteinlerine parçalanmaktadır (Turner ve Summers 1999).

HIV'in Gag proteinleri diğer retrovirüslerde olduğu gibi infeksiyöz olmayan virüs-benzeri parçacıkların oluşumu için gerekli ve yeterlidir. Retroviral Gag proteinleri genel olarak poliprotein öncüleridirler; HIV-1 Gag öncüsü belli molekül ağırlığı temel alınarak Pr55Gag olarak isimlendirilmiştir. Retroviral Gag proteinleri virüsün bağlanması süresince;

- Viryonun yapısal çerçevesini oluşturmak,
- Viral genomu kapsid ile sarmak,
- Yeni oluşan parçacıkların hücreden çıkmasına hedef oluşturmak,
- Parçacık salınımı sırasında çift tabakalı bir lipid ve ilişkili zarf glikoproteinleri elde etmek gibi çeşitli temel fonksiyonları yerine getirmektedir (Knipe ve ark. 2001).

Yapısal proteinleri matriks, kapsid ve nükleokapsid isimleri altında incelemek mümkündür.

Matriks Proteini, viryon nükleokapsid ile zarf arasındaki matrikste yer alır. Genetik çalışmalar, özellikle viryon ile hedef hücrenin füzyonunda rol oynadığını ortaya koymaktadır. HIV-1 matriks proteininin üç boyutlu yapısı nükleer magnetik rezonans (NMR) ile tayin edilmiştir (Massiah ve ark. 1994, Matthews ve ark. 1994, 1995). Kısa süre sonra SIV (Rao ve ark. 1995) ve HIV-1 (Hill ve ark. 1996) matriks proteininin x-ray yapıları bovine leukemia virüsünden ve insan T-hücre leukemia virüsü tip-II'den (Christensen ve ark. 1996) elde edilmiştir.

PR55Gag'ın MA bölgesi viral hayat döngüsü sırasında çeşitli temel fonksiyonları yürütmektedir. Gag sentezlenmesinden sonra MA çok parçalı bir membran bağlama sinyali ile Pr55Gag'ı plazma membranına yönlendirir. Bunun yanında MA proteininin virüsün bağlanmasında ve zarf proteininin birleşmesinde ve virüs hayat döngüsünde rol aldığı belirtilmektedir (Knipe ve ark. 2001).

Kapsid proteini yüksek hidrofob özelliğe sahiptir ve kapsid yapısının temel elamanıdır. MA gibi CA da virüs replikasyonun ilk ve son basamaklarının ikisinde de fonksiyon görür (Knipe ve ark. 2001). Kapsid proteinleri olgun virüsün merkezinde viral RNA'yı NC proteinlerini ve anahtar enzimleri saran yoğun ekektronlu bir koni şekli oluştururlar. NMR ile görüntülenen sınırlı proteoliz çalışmaları HIV-1 CA'nın iki bölgeden oluştuğunu göstermiş (Gitti ve ark. 1996) olup bunlar proteinin üçte ikisini oluşturan öz bölgesi olarak adlandırılan N-terminal ve dimerizasyon bölgesi olarak adlandırılan C-terminal bölgesidir (Knipe ve ark. 2001). C-terminal oligomerizasyon bölgesindeki mutasyonlar veya silmeler genellikle viral bağlanmayı azaltırken veya kaldırırken amino-terminal öz bölgesi sıklıkla bağlanma ve tomurcuklanmayı arttırmaktadır ancak bulaşıcı değildirler ve genel anlamda normal bir kapsid şekli oluşturmazlar. HIV-1 CA aynı zamanda insan hücrel prolin izomerazı, siklofilin A'yı (Cyp A) da bağlar. Bunun sonucu olarak CypA'nın 200 kopyasını her bir HIV-1 viriyonuna paketlemiş olur (Turner ve Summers 1999).

Nükleokapsid proteininin en bilinen fonksiyonu nükleik asitlerle etkileşimleri içermektedir. Gag öncüsü içinde bir bölge olarak NC viral genomun tanınmasında ve paketlenmesinde ve ters transkripsiyon öncülü tRNA'nın paketlenmesinde (De Rocquigny ve ark. 1992) görev alır. Proteolitik işlemde sonra NC olgun viriyonda bir ribonükleoprotein oluşturur, tRNA öncülünü viral genomla bağlayarak ters transkripsiyonu başlatır, ters transkriptazı kararlı gövde-düğüm bölgelerinde duraklatarak azaltmak suretiyle proviral DNA'nın uzamasını sağlar ve son olarak proviral DNA'yı kararlı hale getirir. NC aynı zamanda viral parçacıkların oluşumu içinde önemlidir ve proteinler arası NC-NC etkileşimlerini oluşturma yoluyla fonksiyon görebilir (Turner ve Summers 1999).

Gag öncülünün bir parçası olarak sentezlenen üçüncü büyük bölge NC'dir. NC'nin temel fonksiyonlarından biri, birleştirilmemiş (genomik) tam uzunluktaki

RNA'yı viryon içinde enkapside etmektedir. Bununla beraber diğer Gag proteinleri gibi NC de virüs yaşam döngüsü süresince çok sayıda roller üstlenmektedir (Knipe ve ark. 2001).

2.1.8.2. Zarf Proteinleri

HIV-1 zarf proteinleri, hüresel proteazlar tarafından fonksiyonel iki form olarak gp120 ve gp41'e parçalanan bir polipeptid öncülü, glikoprotein 160 (gp160), olarak kodlanmaktadır. Proteinler, golgi sistemi içinde glikozitlenip gp120-gp41 heterodimerlerinin trimeri içinde bağlanırlar. Bunlar, gp41'in sitoplazmik kuyruğunun viryon nükleokapsitlerini bağladığı yerde konak hücresi plazma membranına taşınırlar. Viral partiküllerin zarf proteinleri içeren plazma membranı boyunca tomurcuklanması olgun viral parçacıklarını oluşturur (Cooley ve Lewin 2003).

HIV Env glikoproteinleri virüs hayat döngüsünde önemli rol oynar. Onlar CD4 reseptör ve koreseptörü ile etkileşen belirleyicileri içerirler ve viral zarfın çift tabaka lipidi ile konak hücre plazma membranı arasındaki füzyon reaksiyonunu kataliz ederler. Buna ek olarak, HIV Env glikoproteinleri teşhis ve aşı geliştirme perspektiflerinin her ikisi için de önemli olan bağışıklık tepkilerini gösteren epitoplari içermektedirler (Knipe ve ark. 2001).

-Transmembran Proteini (gp41)

HIV-1 gp41, gp120 tarafından viral membrana sabitlenen transmembran (TM) alt ünitesidir. TM konak hücresine giriş yapan füzyon proteinini içermektedir (Cooley ve Lewin 2003, Pan ve ark. 2010, Costin 2007, Checkley ve ark. 2011). HIV-1 transmembran proteini bir N-terminal ektodomain, bir transmembran bölge ve MA ile etkileşen intraviral C-terminal segmentinden oluşmaktadır (Turner ve Summers 1999, Teixeira ve ark. 2011). HIV-1 ve Maloney murine lenkoma virüsü transmembranlarının amino terminal ektodomain bölümlerine karşılık gelen peptidlerin yapılar x-ray kristalografi ile belirlenmiştir (Turner ve Summers 1999).

-Yüzey Proteini (SU)

HIV-1 gp120 zarf proteininin dış membran alt ünitesinden teşekküldür ve konak hücre reseptör etkileşiminin ilk basamağında yer almaktadır. HIV-1 gp120, CD4 ile T yardımcı lenfositlerin ve diğer hücrelerin (makrofaj kökenli ve dendritik (dallanmış) hücreler) yüzeylerinde ifade edilen kemokin reseptörlerini bağlama kapasitesine sahiptir (Cooley ve Lewin 2003). SU geniş ölçüde glikozitlenmiştir. HIV-1 gp120 beş korunmuş ve beş değişken (V1-V5) protein bölgesinden oluşmaktadır (Turner ve Summers 1999, Checkley ve ark. 2011, Teixeira ve ark. 2011). Protein 25 β - ve 5 α - heliks düğüm içeren küresel bir yapıdadır (Cooley ve Lewin 2003).

2.1.8.3. Yardımcı Proteinler

Viral yapısal proteinler (Gag ve Env), *pol*- tarafından kodlanan enzimler (PR, RT ve IN) ve düzenleyici proteinlere (Rev ve Tat) ek olarak HIV genomu çeşitli Vif, Vpu, Vpr, Vpx ve Nef gibi “yardımcı” proteinleri de sentezler. İlk çalışmalar bu proteinlerin açık okuma çerçevelerinin (ORF) bozulması kültür ortamında virüs replikasyonunda çok az değişiklik yaptığı veya hiç yapmadığını belirtmiştir. Ancak son dönemdeki doku kültürü ve *in vivo* deneyleri etkili virüs replikasyonu ve hastalığın ilerlemesi için bu gen ürünlerine güçlü bir ihtiyacın olduğunu ortaya çıkarmıştır. Genellikle karmaşık olan bu proteinlerin fonksiyonlarının aydınlatılması aktif araştırmaların odağı olmaya devam etmektedir (Knipe ve ark. 2011).

-Negatif Faktör

Nef geni sadece primat lentivirüslerde mevcuttur fakat diğer retrovirüslerde yoktur (Qi ve Aiken 2008, Jere ve ark. 2011). N-terminalinden miristiklenmiş (miristik asit kökü bağlanmış) 206 aminoasit kalıntılı yardımcı faktör HIV-1 negatif faktörü (Nef) 27 kDa'dur ve viral enfeksiyondan sonra yüksek konsantrasyonda üretilir (Goldsmith ve ark. 1995). Bu yardımcı protein canlıya yüksek viral yüklemenin yapılması ve bunu sürdürülmesi için önemlidir. Nef, viral replikasyonu artırma, enfekte olmuş hücrenin yüzeyindeki CD4 reseptörlerinin sayısında azalma olduğu uyarısını verme ve T hücre aktivasyon basamağının düzenlenmesi gibi rollere sahiptir (Turner ve Summers 1999, Jere ve ark. 2011, Knipe ve ark. 2011).

-Viryon Proteinleri İfadesi Düzenleyicisi

HIV-1 genomu konak hücrenin enfeksiyonunun ilk döneminde tam işlenmiş viral RNA transkriptleri tarafından sentezlenen 13 kDa'luk basit bir protein olan viryon proteinleri ifadesi düzenleyicisini (Rev) kodlar (Blanco ve ark. 2001). Rev işlenmemiş ve işlenmesi tamamlanmamış viral mRNA'ların çekirdekten sitoplazmaya diziye özgü taşınmasına katılmaktadır. 116 kalıntılık protein env geninin işlenmemiş viral transkriptlerinde yer alan Rev-cevap elementi (RRE) RNA hedef dizisine spesifik olarak bağlanır (Daly ve ark. 1989, Malim ve ark. 1989, 1990). Rev çekirdek lokalizasyonunda sinyal verme, Rev'in RRE'ye bağlanmasında ve tanınma bölgesinde Rev'in multimerizasyonunda fonksiyon gösteren basit bir bölge (Arg35'ten Arg50'ye kadar) içerir (Turner ve Summers 1999, Wilkinson ve ark. 2000).

-Transaktivatör Proteini

Transkripsiyon transaktivatör proteini (Tat) viral enfektivite ve patojenlikte önemli bir rol oynar. Viral gen ifadesini düzenlemeye ek olarak Tat, konağın çeşitli genlerinin ifadesini de düzenler. Böylece genel viral patojenliğe katkıda bulunmuş olur. Ayrıca Tat'ın ekstrasellüler olarak salgılandığına inanılmaktadır. Ekstrasellüler Tat viral gizli kalmayı yönetir ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunur. Tat'ın konak immün yanıtlarını yoğun bir şekilde hafiflettiğine inanılmaktadır (Kashi ve ark. 2009).

HIV-1 Tat iki ekzon tarafından kodlanan 101 kalıntılık bir proteindir (Shojania ve O'Neil 2006, Knipe ve ark. 2011). İlk ekzon bir asidik ve prolince zengin N ucu (aminoasit 1-21), basit bölge (aminoasit 22-37), bir öz (aminoasit 38-47) ve glutamince zengin segment (aminoasit 58-72) olmak üzere 1-72 arası aminoasitleri belirler. İkinci ekzon 73-101 arası kalıntıları belirler (Turner ve Summers 1999, Shojania ve O'Neil 2006).

-Viral Enfektivite Faktörü

Düşük seviyedeki dizi korumasına rağmen viral enfektivite faktör geni *vif* at enfeksiyöz anemisi hastalığı virüsü (EIAV) dışındaki tüm lentivirüslerde bulunur (Henriet ve ark. 2005). Vif HIV genomunun ortalarına yakın pol ve vpr ile örtüşen bir yerde bulunmaktadır (Knipe ve ark. 2011). HIV-1 Vif viral hayat döngüsünün kısmen yüksekçe düzeylerinde sentezlenen 192 aminoasitlik oldukça, basit 23 kDa'luk

fosforlanmış proteini kodlar. Vif yüksekçe korunaklıdır ve *in vivo* ortamında verimli enfeksiyon için gerekli gibi görünmektedir. Vif'in farklı hücre soyları için gerekliliği değişirken T-lenfosit hücrelerinde HIV-1 replikasyonu için ihtiyaç duyulmaktadır (Lake ve ark. 2003).

-Viral Protein R

HIV-1 viral protein R 96 aminoasitlik 14 kDa ağırlığında küçük bir proteindir. Oldukça korunaklı olan Vpr proteini HIV-1 hayat döngüsünün erken safhasında HIV-1 ön entegrasyon kompleksinin (PIC) sınırlayıcı çekirdek gözeneklerinden geçmesini sağlar ve konak hücre çoğalmasını engelleme yeteneğine sahiptir (Morallet ve ark. 2003).

-Viral Protein X

HIV-2 ve lentivirüs ailesi diğer üyeleri SIV_{mac}, SIV_{sm} viral protein X (Vpx) olarak adlandırılan küçük bir protein kodlarlar. HIV-1 ve SIV Vpr proteinine benzerliğinden dolayı aynı gen tarafından kodlandıkları düşünülmektedir. Vpr proteininin benzer fonksiyonlarına ek olarak makrofajların replikasyonu için de gereklidirler (Mahnke ve ark. 2006).

-Viral Protein U

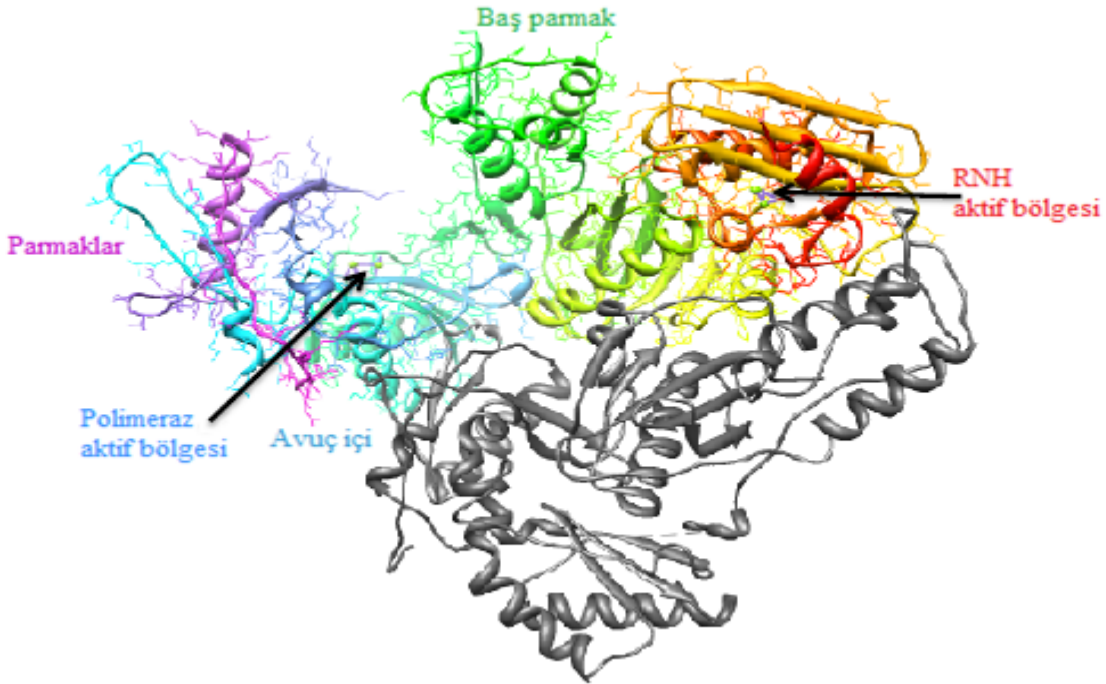
Yardımcı proteinler içinden Vpu sadece HIV-1 ve SIVcpz ve SIVgsn (maymun immün yetmezlik virüsü alt tipleri) içinde bulunur. Diğer primat immün yetmezlik virüslerinde bulunmaz. N-terminal transmembran ve sitoplazmik bölgeden oluşan 81 aminoasitlik tip I iç membran proteindir (Candler ve ark. 2005, Nomaguchi ve ark. 2008). Virüs salınımını arttırmak ve CD4 bozunmasını sağlamak Vpu'nun belirlenen fonksiyonlarıdır (Knipe ve ark. 2011).

2.1.8.4. Viral Enzimler

HIV'in hücrede olgunlaşması sırasında proteaz (PR), ters transkriptaz (RT) ve integras (IN) enzimleri oluşturulur. Başlık altında RT ve PR enzimlerine kısaca değinilecektir ancak IN enzimi araştırmamızın merkezinde yer aldığından ayrı bir başlık altında incelenecektir.

-Ters transkriptaz

RNA ve DNA'dan DNA sentezleme fonksiyonu taşır. Ters transkriptaz enzimi (RT) HIV gibi retrovirüslere özgüdür çünkü normalde insan hücresinin ters transkripsiyon yapmaya ihtiyacı yoktur. RT ilaç terapisi için bir numaralı hedefdir. Ters transkripsiyon sırasında yanlış nükleotidlerin nükleik asit içerisine birleştirilmesi tek baz mutasyonlarına yol açmaktadır. Bu mutasyonlar antiviral ilaçlara karşı olan direncin oluşmasına neden olmaktadır.



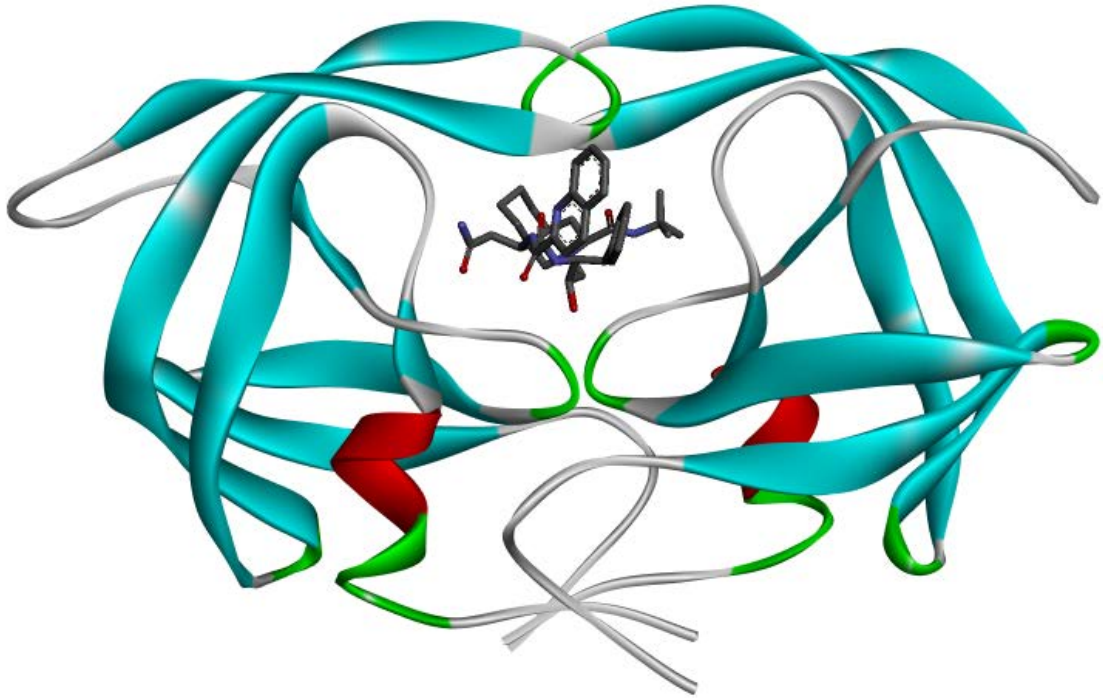
Şekil 2.5. HIV-1 ters transkriptaz yapısı (Şekil 1RTD.pdb dosyasından alınmıştır (Huang ve ark., 1998). Daha sonra UCSF Chimera (Pettersen ve ark. 2004) ile hazırlanmıştır.)

HIV-1 RT molekülü p66 ve p51 olarak adlandırılan alt bölgelerden oluşan bir asimetrik heterodimer yapısı teşkil etmektedir (Renit ve ark. 1995, Westby ve ark. 2005, Sarafianos ve ark. 2009). Her iki alt ünite işlenmemiş viral RNA tarafından sentezlenen Gag-Pol polipeptidinin, viral proteaz tarafından kesilmesiyle oluşmaktadır. p66 560 amino asit p51 ise 440 amino asit uzunluğundadır (Renit ve ark. 1995, Sarafianos ve ark. 2009). HIV-1 viryonu viral proteinlere ek olarak iki tek sarmallı RNA genomu kopyası içermektedir. RT iki enzimatik aktiviteye sahiptir; bir DNA veya RNA kalıbını kopyalayabilen DNA polimeraz ve sadece RNA'yı bir RNA/DNA çiftinin parçası olduğunda parçalayan RNase H. RT'nin iki enzimatik fonksiyonunu gerçekleştiren polimeraz ve RNase H (endoribonükeaz enzim), birlikte hareket ederek RNA'yı çift

sarmallı lineer DNA'ya dönüştürürler. Bu dönüşüm enfekte olmuş hücre içinde gerçekleşir. DNA sentezi tamamlandıktan sonra, oluşan lineer çift sarmallı viral DNA integras tarafından konak hücresine yerleştirileceği çekirdeğe taşınır (Sarafianos ve ark. 2009, Knipe ve ark. 2011). Her ne kadar günümüzde pazarlanan ajanlar HIV-1 RT'ın DNA polimeraz enzimini inhibe ediyor ise de ters transkripsiyon prosesinin her hangi bir adımının inhibisyonu viral replikasyonun inhibisyonu ile neticelenecektir (Westby ve ark. 2005).

-Proteaz

Proteaz (PR) enzimi 99 amino asit büyüklüğündedir (Şekil 2.6.). Genetik çalışmalar proteazın viral replikasyonda önemli olduğunu ortaya koymuştur. Proteaz, proteinleri segmentlere parçalar. HIV'in gag ve pol genleri son şekilleriyle kendi proteinlerini üretmezler, ama daha geniş kombinasyon proteinleri için; HIV tarafından kullanılan spesifik proteaz bunları ayrı fonksiyonel birimler şeklinde parçalar. Proteaz inhibitör ilaçları bu basamağı bloke eder.



Şekil 2.6. HIV-1 Proteaz'ın saquanavir inhibitörü içeren x-ray yapısı (Kovalevsky ve ark. 2007) (HIV proteaz birbirinin aynı iki 99 amino asitlik alt üniteden oluşur, DS Visualizer (Accelrys 2011) ile hazırlanmıştır

HIV-1 Gag ve Pol polipeptit öncüleri olgun yapısal ve enzimatik gen ürünlerini oluşturmak için viral şifrelenmiş aspartil proteaz tarafından parçalanırlar. HIV-1 proteazın aktif formu, aktif bölgedeki iki aspartattan birinin korunmasına katkı yapan her biri 11 kDa'luk monomerleri ile 22 kDa'luk bir homodimerdir (Westby ve ark. 2005). HIV-1 PR etkinliği viral replikasyon için önemlidir ve HIV-1 proteaz inhibitörlerinin (PI) güçlü antiviral aktivitesi klinik olarak ispatlanmıştır. Sonuç olarak ilaç tasarım çalışmaları mevcut HIV-1 PI'lerine karşı dirençli değişken HIV-1'e karşı doğrulanmış bu hedef için aktif yeni inhibitörlerin belirlenmesi üzerine odaklanmaya devam etmektedir (Westby ve ark. 2005). Diğer hücrel enzimler gibi, retroviral PR'lar aktif bölgede bir birine yakın olan bu iki Asp kalıntısını bir su molekülüne koordine ederek hedef proteindeki peptid bağının hidrolizini kataliz etmede kullanır (Knipe ve ark. 2011).

HIV proteaz gibi enzimler doğanın kendi katalizörleridir. Enzimlerin farklı bir türü olan proteazlar peptit ve proteinlerin kesilmesini katalizler. Bir substratın (peptit veya protein) proteazla etkileşimi, moleküler düzendeki serbest enerjisi yüksek olan peptit bağ kırılım reaksiyonunun geçiş halini stabilize ederek aktivasyon enerjisini düşürür. Böylece enzimler aksi takdirde uzun reaksiyon zamanı gerektiren reaksiyonları oda sıcaklığında hızlı hale getirebilmektedirler. Nötral pH'da oda sıcaklığında peptit bağının yarı ömrü 500 yıl olarak tahmin edilmektedir (Alterman 2001).

2.1.9. HIV-1 İntegraz

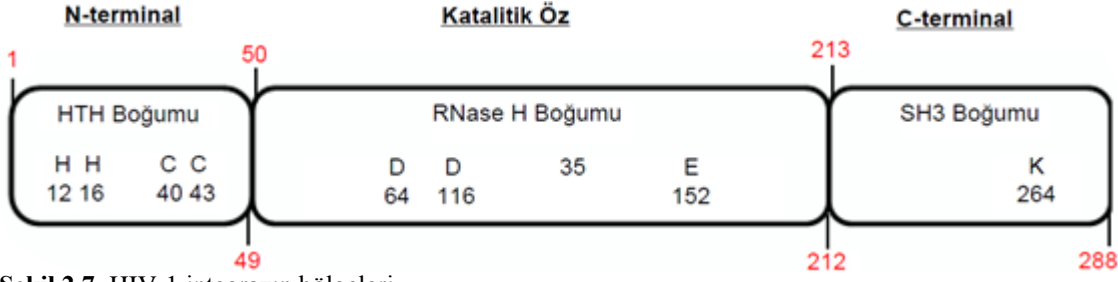
İntegraz, pol geninin son kısmı tarafından sentezlenen 288 aminoasit kalıntısı olan bir proteindir. IN viral proteaz aracılığıyla meydana gelen kırılma ile Gag-Pol polipeptid öncülünün bir parçası olarak üretilir (Hindmarsh ve Leis 1999, Delelis ve ark. 2008).

HIV-1 IN gerekli ilgiyi geç görmüştür. Sonradan gelen bu ilginin sebebinin çoğu Merk ve ortak çalışanlarının HIV-1 IN'ı terapötik bir hedef olduğunu klinik olarak doğrulamasındandır. HIV-1 integrazın başlıca görevi, HIV-1 gen ekspresyonu ve viral replikasyon için ihtiyaç duyulan bir basamak olan yeni transkribe edilmiş HIV-1 cDNA'nın konak hücre DNA'sına yerleşme işlemini katalizlemektir (Westby ve ark. 2005).

IN enzimi, viral DNA'nın parçalanması ve yeniden birleştirilmesinde aktif olarak görev almaktadır. Böylece proviral DNA'nın konak hücre genomuna birleştirilmesi sağlanmaktadır. IN, konak DNA'sını kesme işleminin "kes-ve-yapıştır" operasyonunu ve proviral genomunun kesilmiş bu uçlara bağlanmasını katalizler. İntegraz retrovirüslere çok fazla özgü olan bir fonksiyonu icra eder, zira insan hücresi kendi genomlarının içine DNA'nın herhangi bir parçasını kesip yapıştırmaya ihtiyaç duymaz. Bu, integras inhibisyonunun ilaç terapisi için iyi bir hedef olabileceği anlamına gelir, çünkü insan hücrelerinin normal operasyonlarını engelleyecek gibi görünmemektedir.

2.1.9.1. İntegrazın Yapısı

HIV-1 integras enzimi N-terminal bölgesi (NTD; 1-49 kalıntıları), katalitik öz bölgesi (CD; 50-212 kalıntıları) ve C-terminal bölgesi (CTD; 213-288 kalıntıları) (Karki ve ark. 2004, Bera ve ark. 2009) olarak isimlendirilen üç bölgeden (Şekil 2.7) oluşan 32 kDa'luk bir enzimdir (Karki ve ark. 2004, Nunthaboot ve ark. 2007). N-terminal bölgesi çinko iyonu ile koordine olmuş heliks bir bohça şeklindedir ve IN'ın dimerleşmesine katılır. Mg^{2+} veya Mn^{2+} gibi divalent bir metal iyonu bağlayan D,D-35-E motifi (ASP64, ASP116 ve GLU152) içeren katalitik öz bölgesi kataliz için kritik role sahiptir. IN'ın aktif bölgesinde avian sarcoma virüsü (ASV) integrasında olduğu gibi iki metal iyonu bulundurduğu düşünülmese rağmen aydınlatılmış HIV-1 IN x-ray yapısında tek bir metal olduğu görülmüştür. Bunun yanında, ikinci metalin sadece HIV-1 IN bir substrata bağlandığında mevcut olduğu önerilmektedir. C-terminal bölgesi ise dimerleşmede yer alır ve aynı zamanda LTR DNA'yı bağlar (Hindmarsh ve Leis 1999, Nunthaboot ve ark. 2007, Bera ve ark. 2009). Her üç bölge de 3'-işleme ve DNA zincir transfer reaksiyonları için gereklidir ancak ayrışma ve spesifik olmayan alkoli gerçekteşirmek için katalitik öz bölgesi yeterlidir (Chen ve ark. 2002).



Şekil 2.7. HIV-1 integrazın bölgeleri

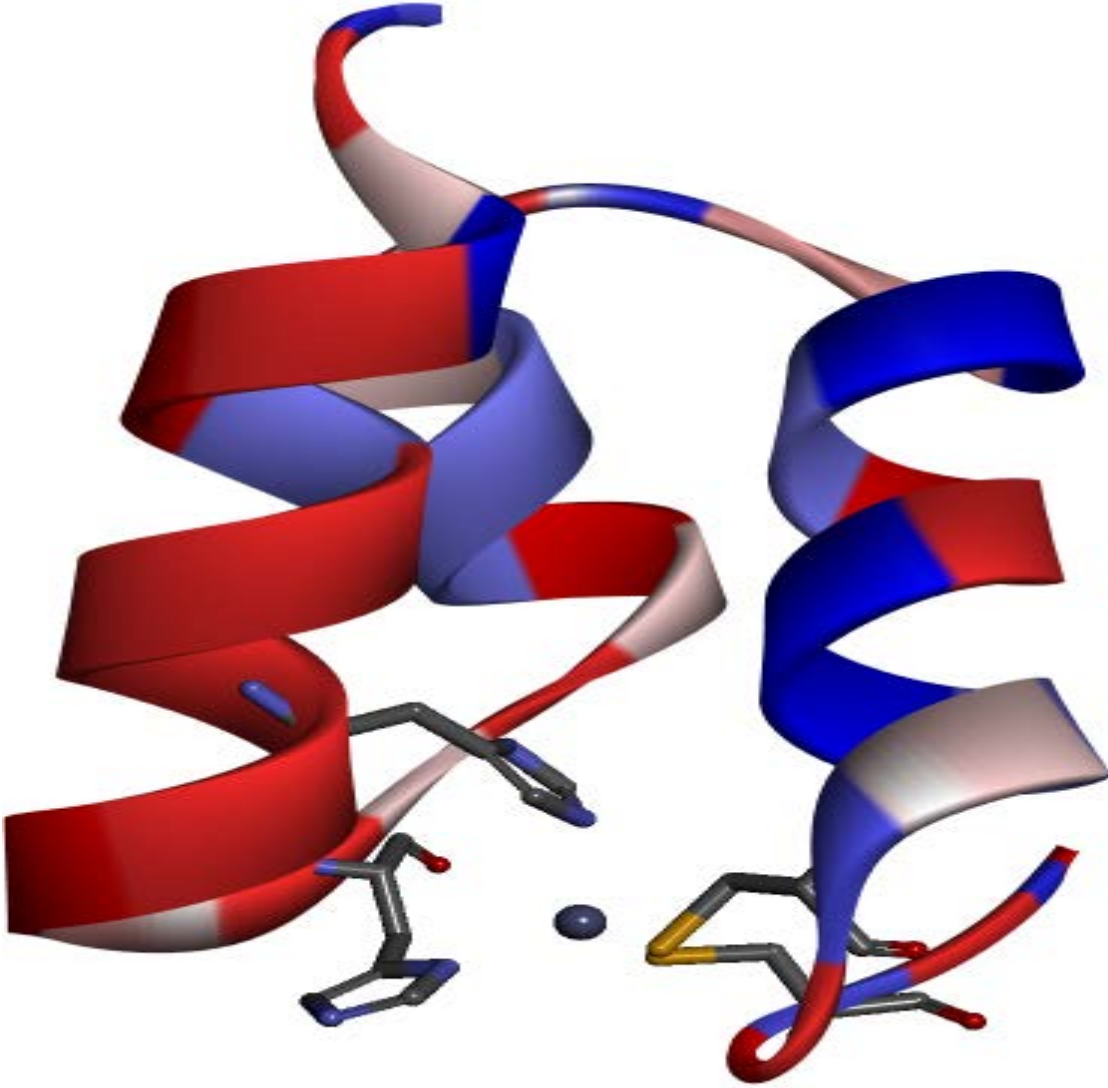
İntegraz monomer (IN), dimer (IN2) ve dimerin dimeri (IN4) olarak bulunabilir. (Fenollar-Ferrer ve ark. 2008) İntegraz haloenziminin kristalografik çalışmaları düşük çözünürlük ve çözelti içinde kümeleşme isteği nedeniyle zor olmasına rağmen integrazın katalitik öz bölgesinin çözünürlüğünü artırarak kriztalizasyonu kolaylaştıran bazı mutasyonlar açıklanmıştır (King 2000, Craigie 2011). Her ne kadar, şu anda HIV integrazın tam uzunluktaki üç boyutlu yapısı mevcut olmasa da kesilmiş proteinin N-terminal-katalitik öz bölgeleri (Wang ve ark. 2001) ve katalitik öz-C-terminal (Chen ve ark. 2000) kısımları için x-ray destekli üç boyutlu yapıları yayınlanmış ve bunlar Protein Data Bank'ta (Berman ve ark. 2000) rapor edilmiştir (Parrill 2003). Davies ve arkadaşları katalitik bölgenin yapısını belirlemek için x-ray kristalografik metotları kullanarak belirlemişlerdir (Dyda ve ark. 1994). N-terminal çinko bağlanma bölgesinin (Cai ve ark. 1997) ve C-terminal DNA bağlanma bölgesinin (Eijkelenboom ve ark. 1995, Lodi ve ark. 1995) çözücü içindeki yapılarının belirlenmesi için NMR metotları kullanılmıştır. Eksiksiz HIV-1 integrazın bir tetramer olarak fonksiyon gösterdiği belli ise de ilginçtir ki izole edilmiş bölgeler de kararlı dimerler oluşturmaktadır. IN aktivitesini inhibe eden peptitler açık hidrofobik kalıntılara coiled-coil etkileşimleri ile bağlanıp yüksek düzeydeki oligomerleşmeyi engelleyerek fonksiyon gösterebilir (Sourgen ve ark. 1996, Turner ve Summers 1999).

Günümüze kadar HIV-1 IN yapı tayini ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu N-terminal bölgesi için NMR metotları kullanılarak 1WJA, 1WJB, 1WJC, 1WJD (Cai ve ark. 1997) ve 1WJE, 1WJF (Cai ve ark. 1998) yapıları bulunmuştur. Katalitik öz bölgesine ait çalışmalarda F185K mutasyonu yapılarak 1ITG (Dyda ve ark. 1994), 1B9D, 1B9F, 1B92 (Greenwald ve ark. 1999), 1BIZ, 1BIS, 1BIU (Goldgur ve ark. 1998), 1HYV, 1HYZ (Molteni ve ark. 2001), 1QS4 (Goldgur ve ark. 1999), 2B4J (Cherepanov ve ark. 2005) yapıları, F185H mutasyonu ile 1BHL, 1BI4, 1BL3 (Maignan ve ark. 1998), 2ITG (Bujacz ve ark. 1996) yapılar ve C56S, W131D, F139D, F185K ve

C280S mutasyonları yapılarak 1EXQ (Chen ve ark. 2000) yapıları elde edilmiştir. C-terminal bölgesi için bir NMR metotları çalışması olan 1QMC (Eijkelenboom ve ark. 1999) yapısı bulunmaktadır. Bunun yanında N-terminal ile katalitik öz bölgesini ve katalitik öz bölgesi ile C-terminal bölgelerini içeren kristal yapılar da elde edilmiştir. N-terminal–katalitik öz bölgelerine ait kristalografik 1K6Y (Wang ve ark. 1997) yapısında, W131D, F139D ve F185K mutasyonları mevcut iken katalitik öz-C-terminal bölgelerine ait kristalografik 1EX4 (Chen ve ark. 2000) yapısı için ise C56S, W131D, F139D, F185K ve C280S mutasyonları kullanılmıştır.

- N-terminal Bölgesi

Yapısında bir çinko iyonunu bağlayarak tetrahedral bir koordinasyon bölgesi oluşturan HIS12, HIS16, CYS40 ve CYS43 (HHCC motifi) kalıntılarını bulduran integrazın N-terminal bölgesi (Şekil 2.8.) dört α -heliksten (monomer başına) oluşmaktadır (Turner ve Summers 1999). Birinci heliks E formunda 2-14 kalıntılara ve D formunda 2-8 kalıntılara, ikinci heliks 19-25 kalıntılarının, üçüncü heliks 30-39 kalıntılara ve dördüncü heliks ise 41-45 kalıntılara karşılık gelir (Jaskolski 2011). E ve D konformasyonlar, HIS12'nin çinkoya farklı bağlanma modlarına dayanmaktadır. HIS12 çinkoya $N^{\delta 1}$ halka atomu ile bağlanınca D, $N^{\epsilon 2}$ atomuyla bağlanınca E konformasyonu oluşur ve bu iç dönüşümün oda sıcaklığındaki denge sabiti birdir. Yüksek sıcaklıklarda D-formu baskındır ve bu form kısmen düzensiz bir heliks-1 içeriyor gibi görünmektedir.



Şekil 2.8. HIV-1 İntegraz N-terminal Bölgesi (Wang ve ark. 1997) (DS Visualizer (Accelrys 2011) ile hazırlanmıştır.)

İlginçtir ki, heliks 2 ve heliks 3 çeşitli DNA bağlayan protein türlerinde görülene benzer bir heliks yapan heliks (helix-turn-helix; HTH) oluşturmaktadır (Hindmarsh ve Leis 1999, Turner ve Summers 1999). Bununla beraber, HTH proteinlerindeki benzeri heliksler DNA bağlarken, IN'ın heliks 3'ü protein-protein etkileşmelerine katılırlar (Cai et ve ark. 1997, Turner ve Summers 1999).

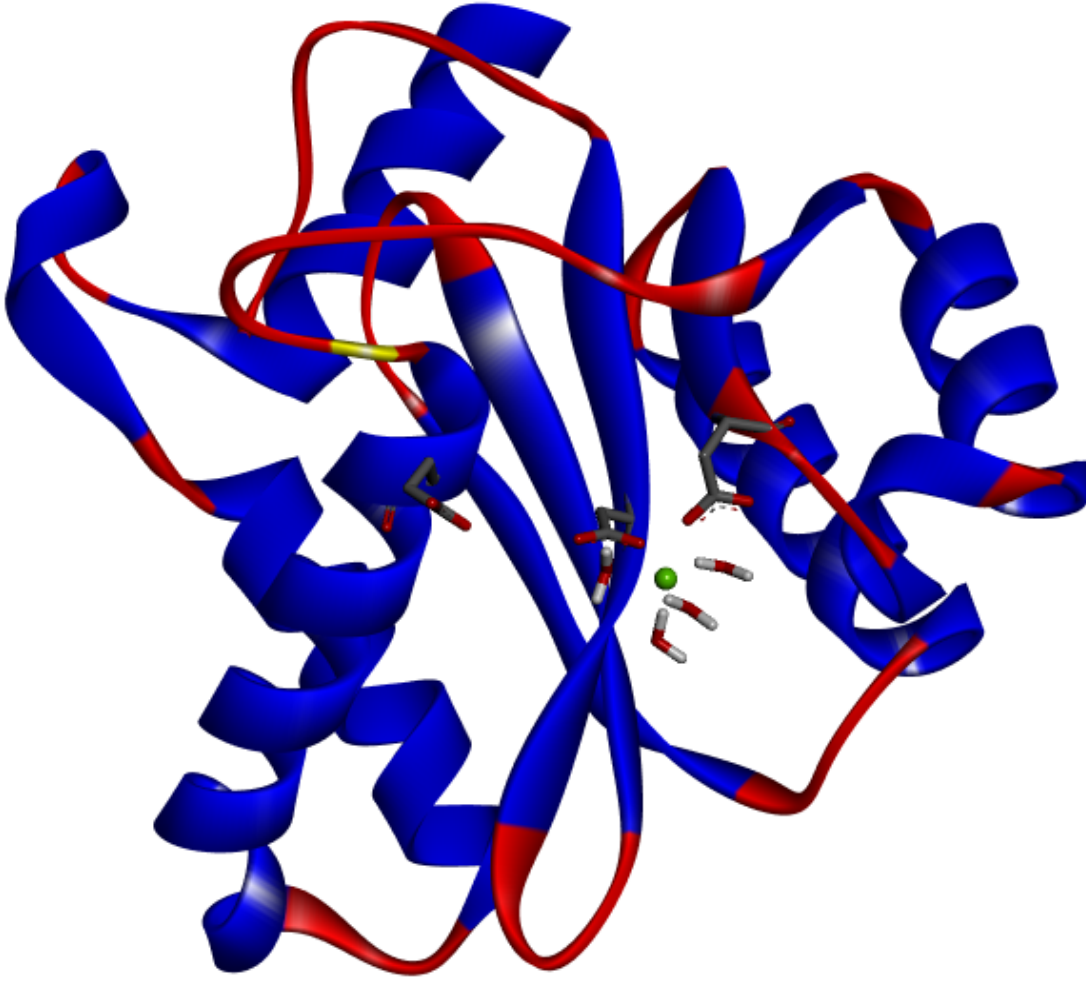
HIV -1 IN'ın HHCC motifindeki bir mutasyon 3'işleme ve zincir transferini zayıflatır veya durdururken (Hindmarsh ve Leis 1999, Chiu ve Davies 2004), Mn^{2+} varlığında mutasyonlar, ayrılma reaksiyonunun aktifliğini azaltmamaktadır. Ayrılma reaksiyonundansa işleme ve zincir transferinin bu tercihi bozulması DNA kesme ve ligand bağlanma aktif sitesinin bu bölgede olmadığını ve proteinde HHCC bölgesinin yegâne DNA bağlanma bölgesi olmadığını göstermektedir. Bu aynı zamanda bölgenin

filogenetik olarak korunaklı terminal CA dinükleotidinin yakınında DNA ile etkileşimde rol aldığını da göstermektedir (Chen ve ark. 2002). Diğer taraftan çinko multimerizasyonu iletir ve HIV-1 integrazın katalitik aktifliğini artırır. Bu bölgenin tam uzunluktaki integraz içinde proteinin tetramerizasyonunda yer almasına rağmen bu bölgeyi eksilten mutasyonlar hala tetramer oluşturabilir. Çözelti içinde her bir bölge tek başına monomer-dimer dengesinde iken tam uzunluktaki veya C-terminal ile katalitik öz bölgesi birlikteyken dimer-tetramer dengesinde bulunur (Chiu ve Davies 2004).

N-terminal bölgesinin üç boyutlu eriyiği nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopisi kullanılarak çözülmüş ve çinko iyonunun HIS12, HIS16, CYS40 ve CYS43 ile tetrahedral olarak koordine olduğu N-terminal peptidlerinin çözeltide dimer olarak bulunduğunu göstermiştir (King 2000).

- Katalitik Öz Bölgesi

Katalitik öz bölgesi (Şekil 2.9.), kalıntı 50-212, genellikle polinükleotidil transferazlarda bulunan DD35E katalitik triad motifini içermektedir (Goldgur ve ark. 1998, Turner ve Summers 1999, Chiu ve Davies 2004). Bu güne kadar, kristalizasyon şartları değiştirilerek ve çözünebilir mutantlar F185K ve F185H kullanılarak çok sayıda HIV-1 IN katalitik öz bölgesinin yapısı kristalografik olarak çözülmüştür (Goldgur ve ark. 1998, Maignan ve ark. 1998). Bir birinden bağımsız olarak Goldgur ve arkadaşları (Goldgur ve ark. 1998) ve Maignan ve arkadaşları (Maignan ve ark. 1998) tarafından belirlenen yapılar HIV-1 IN katalitik öz bölgesinin altı α -heliks tarafından çevrilmiş beş β -çarşafın bir karışımı olduğunu göstermiştir. İlk iki katalitik kalıntı, ASP64 (1. B çarşafın üzerinde) ve ASP116 (4. B çarşafın üzerinde) dört su molekülü ile birlikte tek bir Mg^{2+} iyonunu oktahedral bir kompleks oluşturarak koordine eder. Üçüncü katalitik kalıntı GLU152 4. α -heliks üzerine yerleşmiştir (Chen ve ark. 2002). Üç DDE kalıntısı proteinin yüzeyinde oldukça sık bir yerde bulunmaktadır. IN geniş yüzeyi göz önüne alındığında, bu özelliğin substratların katalitik kalıntılara daha rahat ulaşmasına izin vermesi nedeniyle katalitik reaksiyonlar kolaylaşmaktadır.



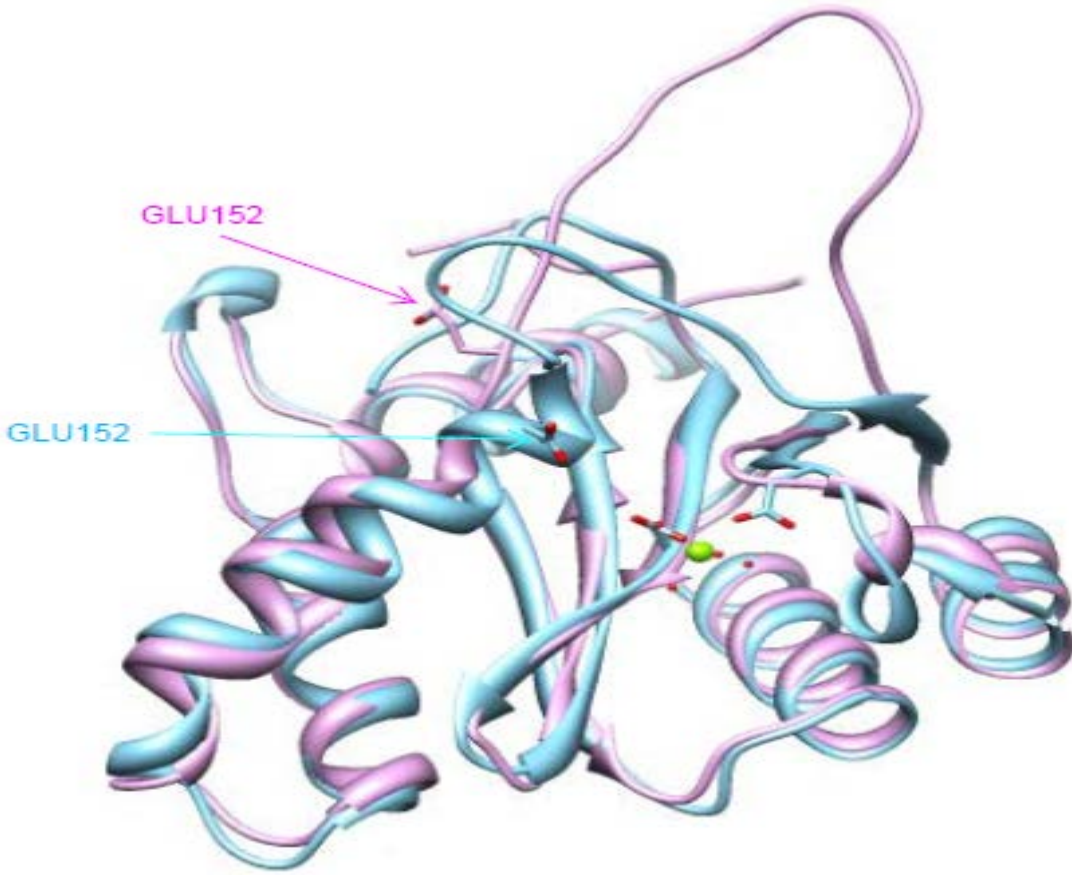
Şekil 2.9. HIV-1 İntegraz Katalitik Öz Bölgesi (Maignan ve ark. 1998) (DS Visualizer (Accelrys 2011) ile hazırlanmıştır. Kristal yapıda Mg atomu ile etkileşen 4 tane su molekülü mevcuttur.)

DDE motifinde son Asp ve Glu kalıntıları arasında her zaman 35 aminoasit bulunmaktadır (HIV-1 IN'de Asp64, Asp116 ve Glu152; avian sarcoma virüsü (ASV) IN'de Asp64, Asp121 ve Glu157). Bu motif bütün retroviral ve retrotranspozon integrazlarının yanı sıra bazı bakteriyel transpozaslarda da evrimsel olarak korunmaktadır. Korunan bu DDE triadın önemi bu kalıntılardan her hangi birinin mutasyonu ile bütün polinükleotidil transfer ailesi üyelerinde katalitik aktivitesini ortadan kaldırmakla kanıtlamıştır (Dyda ve ark. 1994, Esposito ve Craigie 1998, Greenwald ve ark. 1999, Hindmarsh ve Leis 1999, Chen ve ark. 2002).

DDE motifinin elzem bir rolü kataliz için gerekli olan divalent metal iyonunu koordine etmesidir (Şekil 2.9.). Mevcut HIV-1 IN'in metalli bütün yapılarında metal iyonu Asp64 ve Asp116 ile koordine olmuştur. Aktif bölgenin yapısı ve metal iyonlarının varlığı açısından DNA polimeraz I ile benzerliklerine dayandırılarak IN'in

iki metal iyonunun katalitik mekanizması aracılığıyla işlev gördüğü önerilmektedir. DNA polimeraz I'de metallere biri su molekülünü, atak yapan hidroksit iyonuna aktive eder (Lewis asiti olarak sudaki H^+ iyonu uzaklaştırarak) diğeri ise bağ kırılması için fosfattaki pentakoordine geçiş halinin kararlı olmasına yardım eder (Esposito ve Craigie 1998, Sechi ve ark. 2011). DNA Polimeraz I mekanizması HIV-1 IN yapı bilgisi ile birleştirildiğinde ilk metal bağlanma bölgesinin ASP64 ile ASP116 arasında diğeri ise ASP116 ile ASP152 arasında olacaktır. HIV-1 IN'ının iki metal ile kokristalizasyonu belirlemede başarılı olunamasa da ASV için böyle bir yapı mevcuttur. Bu yapıda birinci metal iyonu ASP64 ile ASP121 arasında ve ikincisi ASP121 ile GLU157 arasında bulunmaktadır. HIV-1 integras için önerilen mekanizma bu sonuca uygundur (Sechi ve ark. 2011, Chen ve ark. 2002).

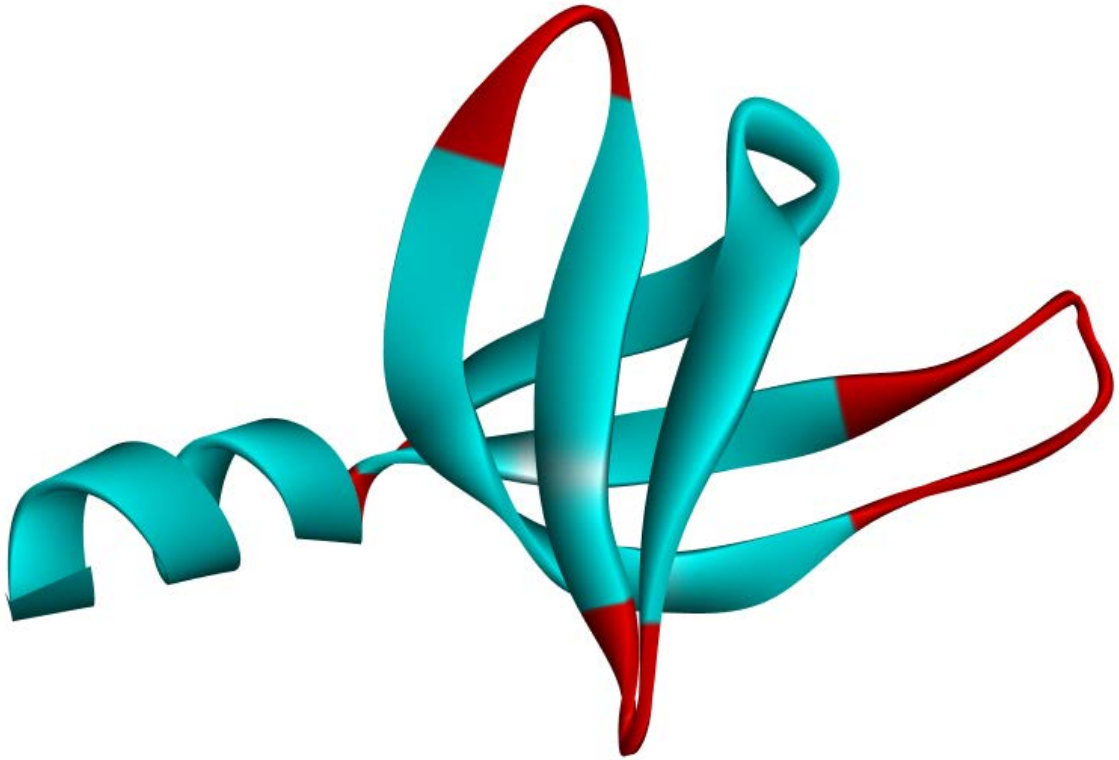
Katalitik bölgedeki diğeri önemli bir alan 138-150 kalıntıları (Dayam ve Neamati 2004) arasında uzanan esnek ilmeaktır (5. β -çarşafın sonundan başlayıp 5. α -heliksin öncesine kadar sürer). Bölgenin viral DNA bağlamada önemli olduğunu fotokroslinking ve mutasyon çalışmaları göstermiştir ve böylece bölge inhibitör tasarım çalışmalarına dâhil edilmiştir. Ne yazık ki HIV-1 katalitik öz bölgesinin mevcut 15 kristal yapısından sadece iki tanesi izlenebilir ilmek konformasyonuna sahiptir. Bujacz ve arkadaşları tarafından çözülen yapı (PDB kodu 2ITG) DDE katalitik bölgesinden uzaklaşan bir ilmek içermektedir. Maignan ve arkadaşlarının öz bölgesi (PDB kodu 1BL3, C monomeri) aktif bölge kalıntılarının hemen üzerinde yer alan daha yakın bir esnek ilmek konformasyonuna sahiptir (Şekil 2.10). Şunu belirtmek gerekir ki önceki yapılarda aktif bölgeye bağlı katalitik olarak gerekli olan divalent metal iyonu bulunmazken daha sonraki yapılar aktif bölgede bir tane Mg^{2+} iyonu içermektedirler (Chen ve ark. 2002). Katalitik bölgede DNA bağlanma sırasında bulunduğu düşünülen ikinci Mg^{2+} iyonuna koordine olacak GLU152 kalıntısının 2ITG yapısında bu bölgeden uzak kaldığı Şekil 2.10.'da görülmektedir.



Şekil 2.10. Hareketli ilmeğin 1BL3.pdb ve 2ITG.pdb yapısındaki konformasyonu

- C-terminal Bölgesi

İntegrazın C-terminal bölgesi üç bölgenin en az korunaklı olanıdır (Hindmarsh ve Leis 1999). HIV-1 IN enziminin 213-288 arası kalıntılarına karşılık gelen bölge, C-terminal bölgesi (Karki ve ark. 2004, Bera ve ark. 2009). DNA spesifik olmayan bir şekilde bağlamaktadır. C-terminal bölgesi yapısı ilk olarak bir birinden bağımsız iki grup tarafından NMR metotlarının kullanılmasıyla elde edilmiştir (Eijkelenboom ve ark. 1995, Lodi ve ark. 1995). İki yapı da esas itibariyle aynı görünmektedir. NMR ile belirlenmiş HIV-1 IN C-terminal bölgesinin 220'den 270'e kadar olan kalıntıları bir SH3 motifi kıvrımı içermektedir (Şekil 2.11.). Böyle yapılar birçok proteinde bulunmaktadır ancak DNA bağlayan proteinlerden sadece birinde, hipertermofilik arkea kromozomal proteininde (Sso7d) bulunmaktadır (Hindmarsh ve Leis 1999). Bir dimer olarak bulunan C-terminal bölgesinin her bir monomeri, 5 β -çarşaf bir karışımıdır ve önemli bir dizi homolojisi olmamasına rağmen boğum topolojisi Src homoloji 3 (SH3) bölgelerinin yapılarına benzerdir (Chen ve ark. 2002).



Şekil 2.11. HIV-1 İntegraz C-terminal Bölgesi (Chen ve ark. 2000) (DS Visualizer (Accelrys 2011) ile hazırlanmıştır.)

Her bir monomerin üç β -çarşaf zincirinin yüz yüze paketlenmesiyle yoğun olarak hidrofobik bir yüzey olan dimer yapısı oluşmaktadır (Şekil 2.11.). Dimerleşme sonucu çeşitli pozitif yüklenmiş kalıntı içeren büyük semer şekilli bir oyuk meydana gelir. Bu kalıntılardan biri de DNA bağlanmasında rol aldığı belirlenen (Puras-Lutzke ve ark. 1994) LYS264 kalıntısı da bulunmaktadır. Bu çıkıntı yapan lizin kalıntısı, onu çevreleyen pozitif kalıntılarla birlikte DNA'ya bağlanmada fonksiyon gösterebilir (Lodi ve ark. 1999, Turner ve Summers 1999).

2.1.9.2. İntegrazın Fonksiyonları

HIV-1 IN, HIV-1 RT tarafından viral RNA'dan sentezlenen viral DNA'yı konak kromozomuna iki basamaklı bir mekanizmayla girişini katalizleyerek fonksiyon gösterir. 3'-işleme olarak adlandırılan ilk basamakta IN viral DNA'nın her 3'-sonundan bir dinükleotit koparır. Zincir transferi olarak adlandırılan ikinci basamakta IN önceden kesilmiş girintili 3'-sonları hedef DNA'nın zıt 5' pozisyonuna beş baz çifti uzunluğu boyunca yerleştirir. 3'-işleme ve zincir transferi alt bölgelerinin, divalent katyonun 3'-işleme aktivitesi bakımından kritik öneme sahip olduğu hipotezine dayanılarak Mg^{2+} iyonu çevresindeki aktif bölgede olduğu düşünülmüştür. 3'-işleme

kovuğu Asp64, Cys65, Thr66, His67, Glu92, Asn120, Phe121, Asp116 ve Mg²⁺ iyonundan oluşurken Gln62, Ile141, Pro142, Tyr143, Gln148, Ile151, Glu152, Lys156, Asn155 ve Lys159 kalıntıları zincir transfer kovuğunu temsil etmektedir (Dayam ve Neamati 2004, Nunthaboot ve ark. 2007).

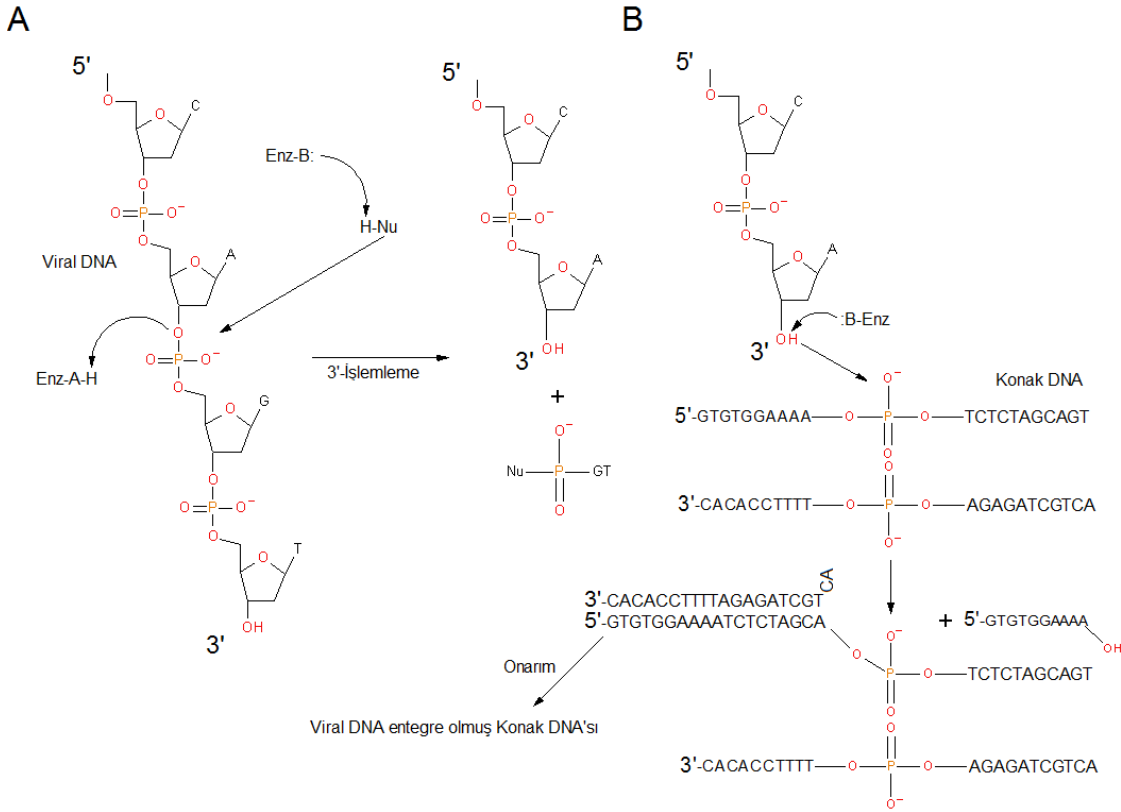
2.1.9.3. Giriş Mekanizması

HIV-1 replikasyonu sırasında IN'in rolü ters transkripsiyonun sitoplazmada tamamlanmasından sonra başlar. Sonuç olarak, viral DNA'nın konak genomuna girişi aktif ve gizil viral rezervlerin her ikisi ile sonuçlanan kalıcı HIV-1 enfeksiyonu meydana getirir. IN ilk başta yeni sentezlenmiş çift sarmallı viral DNA'nın long terminal repeat (LTR) olarak bilinen kısa bir dizisine bağlanır ve 3'-işleme olarak anılan, viral DNA'nın her bir ucundan bir dinükleotidin uzaklaştırıldığı endonükleotid kırılmayı (Şekil 2.12) katalizler (Delelis ve ark 2008, McColl ve Chen 2010). IN hemen viral DNA'nın her iki 3'sonunda (U3 ve U5 LTR sonlarında) bütün retrovirüslerde ve bazı transpozlanabilen elementlerde korunaklı olan CA dinükleotidlere (Kukulj ve Shalka 1995) nükleofilik bir atak yaparak GT dinükleotidleri ayırır. Nükleofilik atak deoksiguanozin ve deoksiadenozin arasındaki fosfodiester bağına yapılır.

Bir retrovirüsün RNA genomu, hücrenin sitoplazmasına girmeyi başardıktan sonra ters transkribe edilir. Bunun sonucunda çift sarmallı DNA 50-100 integras molekülü ile birlikte ön entegrasyon kompleksi (PIC) olarak adlandırılan ve daha sonra girişi mümkün hale getirebilmek için konak DNA'sına ulaşmayı başarması gereken büyük bir nükleoprotein yapısının içinde yer alır. HIV-1 bulaşmış hücrelerden izole edilen PIC'in viral DNA ve integraza ek olarak MA, RT, NC, viral protein R (Vpr) ve hücre protein HMG I(Y) içerdiği rapor edilmiştir. Bu komplekslerin içinde diğer hücre proteinlerinin de olabileceğinin işaretleri belirtilmiştir. Böylece, hedef hücrenin içinde viral nükleik asitlerle sadece integrasın ilişkisi yoktur ve bu ilişkilerin önemini belirlenmesi hala aktif bir araştırma alanıdır (Asante-Appiah ve Shalka 1997, McColl ve Chen 2010).

Enfekte olmuş hücrelerden izole edilmiş viral DNA analizleri DNA girişi hazırlığının sitoplazmada başladığını göstermiştir. Viral DNA sentezi biter bitmez iki nükleotid lineer çift sarmallı DNA 3' sonundaki LTR'ından kesilir (Roth ve ark. 1989, Miller ve ark. 1997). HIV-1 ve Moloney murine leukemia virüsü (MoMLV) bulaşmış

hücrelerden alınan viral DNA sonlar analizleri, işleme reaksiyonunun bulaşmadan sonraki 5-6 saat içinde gerçekleştiğini göstermektedir. İşleme olarak adlandırılan bu ilk basamak saflaştırılmış integras ve viral DNA sonlarını temsil eden DNA substratları kullanılarak laboratuvar ortamında tekrarlanmıştır (Katzman ve ark. 1989, Sherman ve Fyfe 1990). Bu reaksiyonda tek sarmallı viral DNA'yı temsil eden oligonükleotitlerden uygun 3'-terminal dinüklotidi, uzunluk olarak iki nükleotid daha kısa olan ürünü vermek üzere spesifik bir şekilde kaldırılmıştır. Endonükleolitik kırılma her zaman 3'sondaki korunaklı dinükleotid CA'da gerçekleşir ve viral DNA'nın 3' sonunda yeni bir hidroksil grubunun ortaya çıkması ile sonuçlanır. Cragie ve arkadaşları fosforotiyoat oligonükleotid substratlarının yardımıyla işleme reaksiyonunun stereokimyasını belirlemişlerdir. Normalde kirala olmayan fosfodiester bağları köprü oluşturmayan oksijenlerden biri kükürt ile değiştirilerek kirala yapı oluşturulmuş ve böylece suyun nükleofilik atağı kiralite değişikliğine sebep olacaktır (Engelman ve ark. 1991). Bu direkt transesterifikasyon reaksiyonu mekanizması ile bir birine uymaktadır. *In vivo*'da LTR'lerden birinin sonundaki korunaklı CA'da yapılan mutasyonların diğer sondaki CA'da integras tarafından yönetilen işleme bozduğu gözlenmiştir (Murphy ve Goff 1992). İşleme reaksiyonunu temsil eden benzer sonuçlar *in vitro*'da da elde edilmiştir (Kukolj ve Skalka 1995). İşleme basamağında oluşan yeni 3'-hidroksil grubu sonraki yerleşme basamağında atak yapan nükleofil olarak kullanılır.



Şekil 2.12. Viral DNA'nın konak DNA'sına girişinin bir moleküler mekanizması; HIV-1 İntegraz tarafından katalizlenen A) 3'-işleme reaksiyonu, B) DNA zincir transfer reaksiyonu (Mazumder ve ark. 1995)

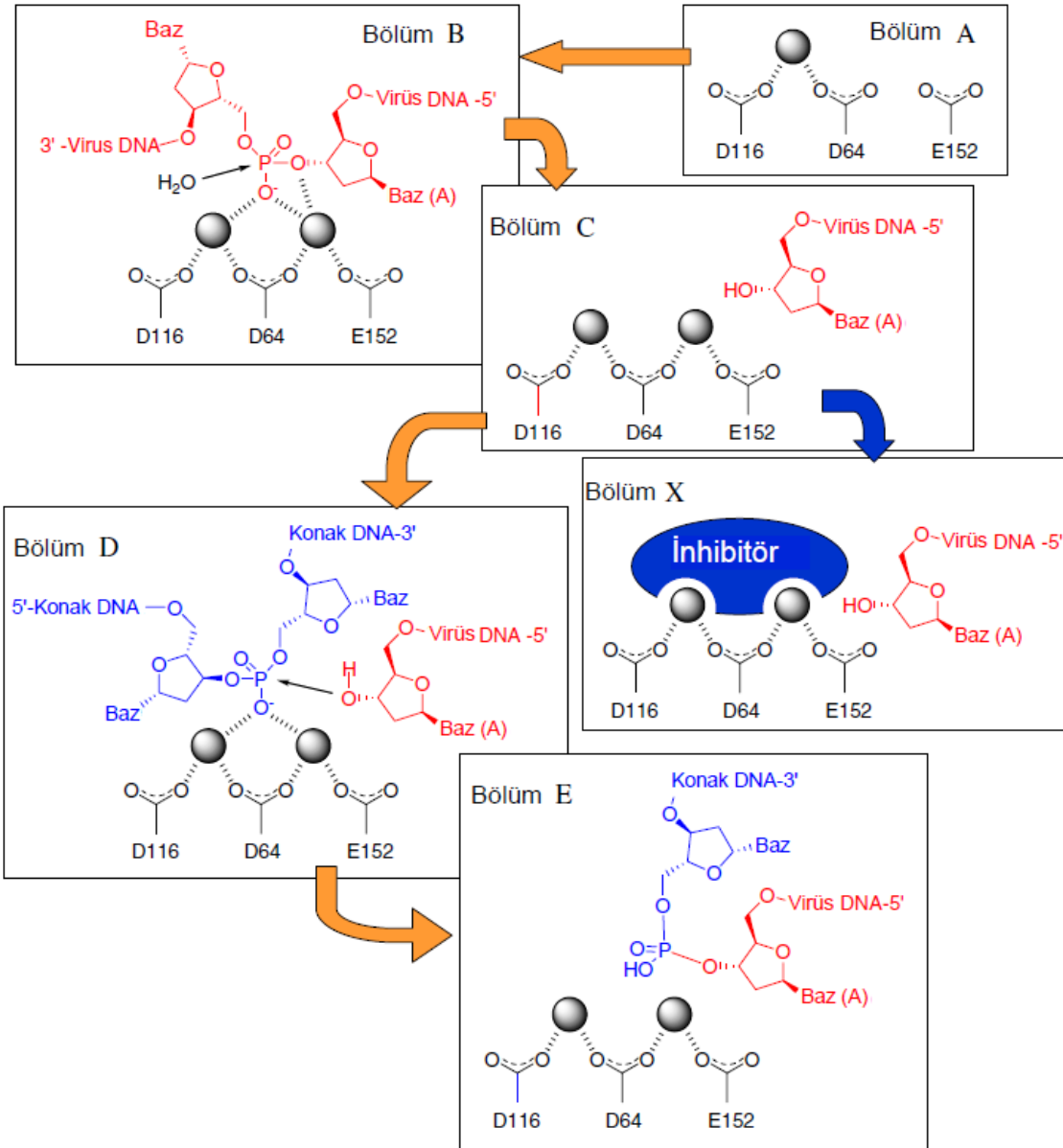
Ön entegrasyon kompleksleri çekirdekteki konak hücre DNA'sına erişimi sağlamak için birden fazla yoldan yararlanabilir. MoMLV için, giriş ancak mitoz bölünme sırasında çekirdek zarfının parçalanması sırasında olabilmektedir (Roe ve ark. 1993). Bu mekanizmanın, diğer retrovirüslerin çekirdeğe girişini izah etmesine rağmen HIV gibi lentivirüslerin bölünmeyen hücrelere bulaşma yetenekleri için alternatif veya ek mekanizmaları ileri sürer. Ön-entegrasyon komplekslerinde bulunan IN (Kukolj ve ark. 1997), MA (Bukrinsky ve ark. 1993; Gallay ve ark. 1995) ve Vpr (Heinzinger ve ark. 1994) gibi bazı proteinlerde çekirdek lokalizasyon sinyallerinin (NLS) olduğu kanıtlanmıştır.

Çekirdeğe giriş başarılı olduğunda işlenmiş viral DNA sonları zincir transferi veya eklenme olarak ifade edilen saniyelik katalitik olay ile konak hücre genomuna girerler. İşleme reaksiyonunda olduğu gibi *in vitro* deneylerin hazırlanması zincir transfer reaksiyonunun daha detaylı anlaşılmasını sağlar. Oligonükleotid substratlar kullanılarak viral DNA sonlarının hedef DNA'ya bağlanmasının retroviral integras tarafından *in vitro* katalizasyonu gösterilmiştir (Craigie ve ark. 1990, Katz ve ark. 1990). Böyle bir

deneyin en basit versiyonunda substrat oligonükleotidler aynı zamanda hedef DNA'nın yerini de tutmaktadırlar. Bu reaksiyonun ürünlerinin çoğu hedef molekülden daha uzundur ve poliakrilamid jelin içinde elektroforez ile denatüre edilerek onlardan ayırt edilebilirler. Zincir transfer reaksiyonu aynı zamanda direkt transesterifikasyon yoluyla ilerler ve yüksek fosfat transfer potansiyeli bileşiklerine gerek duymaz (Engelman ve ark. 1991, Asante-Appiah ve Shalka 1997).

Zincir transfer reaksiyonu 3'-işleme reaksiyonu ile benzerdir ancak buradaki nükleofil bir su molekülü yerine viral DNA'nın 3' OH grubudur. Biyokimyasal çalışmalar 3'-son işleme reaksiyonu ve zincir transfer reaksiyonlarının ikisinin de gerçekten integras ve DNA arasında kovalent bağlı bir ara ürün içermeyen tek basamaklı bir mekanizmayla katalizlendiğini göstermektedir (Engelman ve ark. 1991). Nükleik asitlerdeki fosforil transfer reaksiyonları bir S_N2 sıralı yer değiştirme mekanizması ile gerçekleşir. Eğer fosforotiyoat kiral hale getirilirse oluşacak reaksiyonların türü ürünün stereokimyasal yapısından anlaşılabilir. Zincir transfer reaksiyonu ürünleri ile fosforotiyoat içeren hedef DNA analizleri reaksiyon sırasında fosforotiyoatın kiralitesinin tersine döndüğünü kanıtlamıştır. Bu $CA_{OH-3'}$ sonunun hedef DNA'daki fosfodiester bağına direkt saldırdığı tek basamaklı mekanizma için tahmin edilen sonuçtur. Eğer reaksiyon integras ve DNA arasında kovalent bağlı bir ara ürün üzerinden yürüseydi iki tane S_N2 basamağı olması gerekirdi ve bu durumda fosforotiyoatın kiralitesi korunmuş olacaktır (Engelman ve ark. 1991, Craigie 2011). Sonuç olarak zincir transfer reaksiyonunda integras kesilmiş viral DNA'nın 3'-OH sonlarını hedef DNA'nın zıt zincirlerine bağlar. Hedef DNA'daki bağlanma bölgeleri bağlanmadan sonra viral 5'-sonların yanında boşluklar bırakan, karşıt zincirler üzerinde ve birkaç nükleotid aralıklıdır. Bu aralık HIV ve bazı bakteriyofajlarda 5 baz çifti (bp) iken, avian sarcoma ve leukosis virüslerinde (ASLV) 6 bp, murine leukemia virüslerinde (MuLV) 4 bp'dir (Kukolj ve Shalka 1995, McColl ve Chen 2010).

HIV-1 integrasın 3'-işleme ve DNA zincir transfer reaksiyonlarının ikinci bir Mg^{2+} iyonunun varlığını gerektirdiği düşünülmektedir. Reaksiyonların mekanizması ile ilgili bir gösterim Şekil 2.13.'te verilmiştir.



Şekil 2.13. İki metal-iyonu katalizi ve inhibisyon mekanizması (Bölüm A'dan C'ye kadar olan kısım 3'-işleme reaksiyonunu ve bölüm C'den E'ye olan kısımlar zincir transfer reaksiyonunu içermektedir. (Bölüm A'dan B'ye) Enzim viral DNA'nın 3'-sonunda korunaklı olan adenin bazını tanıyıp ve sonra iki metal ile yakınındaki fosforik ester bağı aktif eder. (Bölüm B'den C'ye) Aktive edilmiş fosforik ester, terminal dinükleotidin kesilmesi için hidrolizlenir ve tanınan adenozin bir ön-entegrasyon kompleksini vermek üzere yeni 3'-son olarak ortaya çıkar.(Bölüm C'den D'ye) Ön entegrasyon kompleksi, fosforik esterini iki metal atomu ile aktifleştirmek için spesifik olmayan bir şekilde konak DNA'sına bağlanır. (Bölüm D'den E'ye) Aktifleştirilmiş fosforik ester, kesilmiş DNA'nın 3'-sonu tarafından S_N2-benzeri nükleofilik reaksiyon yoluyla saldırıya uğrar. Sonra viral DNA ve konak DNA birbirine bağlanır. (Bölüm X) Bir inhibitör konak DNA bağlanmasını engellemek için Bölüm C'nin iki metal iyonu ile şelat yapar.) (Kawasuji ve ark. 2006)

Retroviral integrazların *in vitro*'da açıklanan üçüncü katalitik aktivitesi ayrılma olarak adlandırılmıştır. İçinde tek veya çift-sonlu viral DNA sonlarının bir hedef DNA'sına bağlanmış halini tasvir eden bir substratın molekül içi çözünmeyle viral ve

hedef bileşenlerine dönüştüğü reaksiyon, zincir transfer reaksiyonunun tersi görünümünde olan ayrılma reaksiyonudur (Chow ve ark. 1992, Asante-Appiah ve Shalka 1997). Bu reaksiyondaki bir modifikasyon bağlanma reaksiyonunu takiben boşluğun onarımına katkıda bulunması amacıyla ortaya çıkan uç birleştirme reaksiyonudur. Bununla beraber *in vivo*'da integras tarafından katalizlenen her hangi bir belirti bulunmamıştır (Chow ve ark. 1992, Delelis ve ark 2008, Craigie 2011). 3'-işleme ve zincir transfer reaksiyonlarının tersine molekül içi ve moleküller arası ayrılma reaksiyonları N-terminal veya C-terminal bölgelerine ihtiyaç duymaz. Bu nedenle, bu iki bölgenin eksikliğini sağlayacak bir integras silme mutanlığı IN⁵⁰⁻²¹² ayrılma reaksiyonları testlerinde kullanılması aktivite düzeyini doğal tip enzime göre 4-5 kat azalmıştır (Mazumder ve ark. 1995, Asante-Appiah ve Shalka 1997).

2.1.10. HIV-1 İntegras ile İlgili Bilgisayar Destekli Çalışmalar

HIV-1'e karşı ilaç geliştirme çalışmalarında, pol geni tarafından kodlanan üç enzimden genellikle PR ve RT hedef alınmıştır. Her iki enzimin yapısı da tamamen aydınlatılmış ve bunları hedef alan onlarca inhibitör FDA tarafından onaylanmıştır. Pol geni tarafından kodlanan üçüncü enzim integrasdır. IN ile ilgili çalışmalar geç başlamış ve ancak 2007 yılında Raltegravir'in FDA tarafından onaylanmasıyla yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır. Bunun en büyük nedeni IN enziminin tam uzunluktaki yapısının belirlenememesinden kaynaklanmaktadır. IN enziminin aydınlatılan bölümleri Başlık 2.1.9.1.'de geniş şekilde verilmiştir.

Diğer iki enzime karşı geliştirilen ilaçlar çok sayıda yan etkilere sahipken IN için geliştirilecek olan ilaçların da çok az veya hiç yan etkisinin olmaması beklenmektedir. Zira insan vücudunda IN enziminin benzeri şekilde işlev yapan bir yapı bulunmamakta ve gerçekte insan vücudunun böyle bir yapıya ihtiyacı da yoktur.

HIV-1 IN'ın yapısının tam olarak aydınlatılmadığına yukarıda değinilmiştir. Tam uzunluktaki yapı x-ray veya NMR yöntemleriyle belirlenemediğinden çalışmalar daha çok teorik olarak bu eksik yapıların inşası yoluna gitmeye veya başka canlıların IN enziminden yararlanarak çalışmalar yapmışlardır. Aynı ayrı elde edilen yapılar birleştirilmiş ve yapıya viral ve insan DNA'sı ilave edilmiştir. Daha başka çalışmalarda böyle bir yapıya inhibitör yerleştirilerek ilaç geliştirme çalışmaları yapılmıştır. İlk HIV-1 IN-DNA modeli 1998 yılında Heuer ve Brown tarafından geliştirilmiştir. Bu modelde

N-terminal yer almamıştır çünkü yapısı henüz aydınlatılmamıştır. Bütün bölgeleri içeren ilk HIV-1 integras modeli ilk modelden iki yıl sonra Chen ve arkadaşları tarafından inşa edilmiştir. Daha sonra 2001’de Gao ve arkadaşları HIV-1 IN’ın viral ve hedef DNA’sı içeren tetramerini oluşturmuşlardır. Yine 2001’de Wang ve arkadaşları kendilerinin elde ettikleri N-terminal ve katalitik öz bölgesi içeren 1K6Y.pdb yapısını diğer var olan kristal ve NMR yapılarıyla kombine ederek modellerini oluşturmuşlardır. McCammon ve Bushman’ın gruplarının işbirliğiyle hem viral hem de konak DNA’sını içeren HIV-1 IN tetramer modeli oluşturmuşlardır (Podtelezhnikov ve ark. 2003). De Luca ve arkadaşları integrasın dimerini 2003 yılında modellemişlerdir. Bunların dışında HIV-1 IN’ın 2004 yılında tetramer modelini (Karki ve ark. 2004), 2005 yılında Wielens ve arkadaşları Tn5 tranpozasin homologlarını kullanarak dimer modelini, 2005 yılında Wang ve arkadaşları homoloji modelleme kullanarak tetramer modelini, 2006 yılında Chen ve arkadaşları tetramer modelini, aynı yıl içinde Wijitkosom ve arkadaşları değişik bölge modellerini, 2008 yılında Chen ve arkadaşları katalitik bölgenin DNA içeren modelini ve son olarak Fenollar-Ferrer ve arkadaşları yine 2008 yılında tetramer modelini oluşturmuşlardır. Bunların arasında sadece Karki ve arkadaşlarının modelinde 271-288 kalıntıları modellenerek yapıya ilave edilmiştir. Son yıllarda ise Prototip Foami Virüsü’nün (PFV) IN yapısı aydınlatılmış ve HIV-1 IN’ın mevcut bölgeleri bu yapı ile karşılaştırılarak modeller türetilmeye başlanmıştır (Johnson ve ark. 2012). PFV IN’ın *in vitro* çalışmalarda çeşitli ligandlarla kristal yapıları yine bu çalışmalarla elde edilmiştir.

HIV-1 IN ile ilgili moleküler dinamik hesaplamalarında genellikle katalitik bölge kullanılmıştır. Diğer taraftan IN fonksiyonlarının mekanizmalarını aydınlatmak için de bazı çalışmalar literatürde yer almıştır (Laboulais ve ark. 2001, Barreca ve ark. 2003, Lee ve ark. 2005, Brigo ve ark. 2005b, Nunthaboot ve ark. 2007, Alves ve ark. 2008, Jianping ve Cunxin 2010, Wei ve ark. 2010, Huang ve ark. 2011, Alves ve ark. 2007a, Lins ve ark. 1999, Hu ve ark. 2008, Ruiz-Pernia ve ark. 2009).

Bu çalışmada kullanılan tam uzunluktaki yapı sadece Karki’nin bazı modellerinde görülmektedir. Diğer bütün yapılarda en fazla 1-270 arasındaki kalıntılar kullanılmıştır. İncelenen modellerin genellikle minimizasyon işlemine tabi tutulup bunun sonucunda elde edilen yapının kaydedildiği görülmüştür ve bu işlemlerin çoğunda yapıların ağır atomlarına kuvvet uygulanmıştır. Sadece Karki’nin modelinde moleküler dinamik hesaplamaları yürütülmüştür. Ancak bunda da süre oldukça kısa

tutulmuş (3 ns) ve bu sürenin 1.72 ns'lik bölümünde yine yapıya kuvvet uygulanmıştır. Bu çalışmada oluşturduğumuz tam uzunluktaki modellere ise 30 ns süresince moleküler dinamik hesaplamaları yapılmış ve sadece 5 ns'lik sürede yapıya kuvvet uygulanmıştır.

2.2. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı ve İlaç Geliştirme İşlemleri

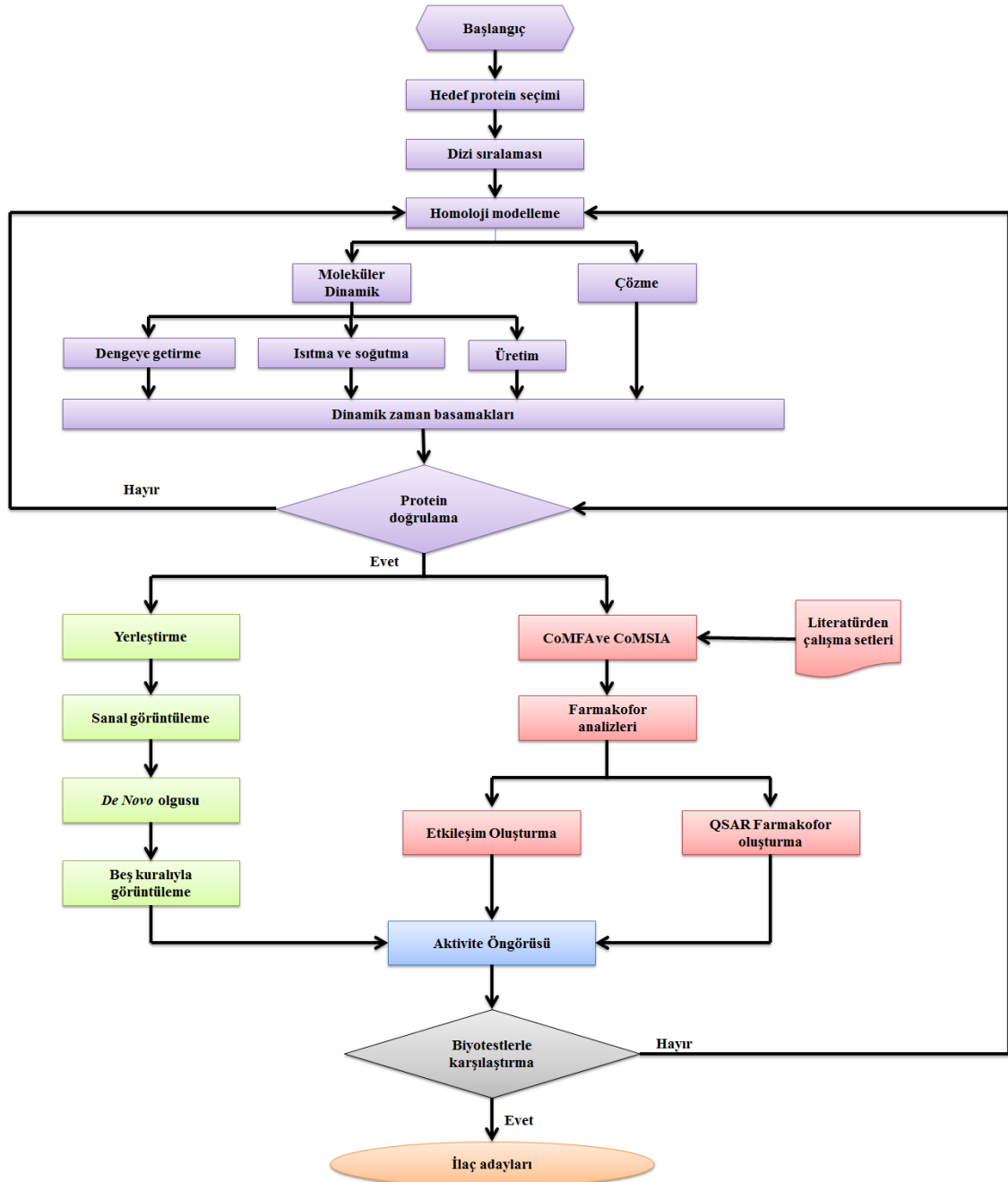
Farmasötik endüstride 1960'lı yıllardan önce ilaç keşfi programları tamamen binlerce doğal ya da sentetik bileşiğin aktivitelerine göre taranmasına dayanmaktaydı. Bu işlemle potansiyel ilaç bileşiği seçildiğinde ilaç kimyacıları hastaların kullanması için en güvenli ve etkili bileşiği geliştirmek için bahsedilen bileşiklerden yüzlercesini sentezlerlerdi. Ancak bu prosesle ilişkili risk ve fiyat korkunç hale gelmiştir (Reddy ve Parrill 1999). Bir ilacın markete gelmesi için 800 milyon \$'dan fazla bir maliyet gerekmektedir (Tang ve ark. 2006). Yüzbinlerce kimyasal bileşiğin araştırmacılar tarafından test edilmesine rağmen Amerika'da yılda ancak 25 dünya genelinde ise 40-45 yeni ilaç bulunabilmektedir (Reddy ve Parrill 1999). Hayvanlar üzerinde test edilen 40 000 bileşikten 5 tanesi insan üzerinde test edilmekte ve bu 5 bileşikten klinik çalışmalara ulaşan ancak bir bileşik ilaç olarak onaylanmaktadır. Bütün bunlar zaman, para, insan ve diğer kaynaklar açısından korkunç bir yatırımı ifade etmektedir. Bilgisayarlı modelleme ve simülasyonların farmasötik araştırma ve geliştirme masraflarını %10 kadar azalttığı ve 2016 yılında bu rakamın %20'ye ulaşacağı tahmin edilmektedir (Kapetanovic 2008).

İlaç tarama stratejisinin, bir bileşiğin neden aktif veya inaktif olduğunu ya da nasıl geliştirilmesi gerektiğini göstermemesi büyük bir sınırlamadır. Aynı zamanda aktif bir bileşiğin belirlenen bir insan hedef proteini için spesifik olduğuna da hiçbir güvence vermemektedir. Böyle bir özgünlüğün olmaması bir ilacın klinik gelişimini durdurabilecek istenmeyen yan etkilerin kaynağı olabilmektedir. İlaç taraması, pazarlanabilir bir tane ilaç bulmak için yaklaşık 20 000 bileşiğin test edilmesine ihtiyaç duyulması sebebiyle aslında kör bir prosestir (Reddy ve Parrill 1999).

Kimyasal yapıların tıbbi amaçlar için optimize edilmesinde kullanılan prosete köklü değişikliklere yol açan kayda değer çalışmalar 1962 yılında ortaya çıkmaya başlamıştır (Hansch 1969, Reddy ve Parrill 1999). Bu çalışma bugün yaygın olarak kullanılan çok parametrelili Kantitatif Yapı Aktivitesi İlişkileri (QSAR) yöntemleri için temel oluşturmuştur.

Bin dokuz yüz doksanlı yıllarda ve yeni milenyumda, farmasötik endüstride ticari işlemler kadar araştırma ve geliştirme açılarından da büyük değişimler oluşmuştur. Bilgisayarların yeni ilaç adaylarının dizaynı için kullanımı, ilericiğin önemli bir seviyesini geliştirmiştir. İlaç adayının bağlanması istenen aktif bölgenin bilgisayarda görüntülenmesiyle, bu amacı başarmak için bir molekül, sıklıkla dizayn edilebilir (Smith ve O'Donnel 2006).

Yeni ilaçların dizaynı hiç şüphesiz günümüzün en ilgi çekici işlerinden biridir. Farmasötik endüstri, biyoteknoloji şirketleri, düzenleyici kurumlar, akademik araştırmacılar ve diğer özel ve resmi sektörlerin birlikte çabalarıyla sürdürülen yeni ilaçların geliştirilmesi çok komplekstir ve bilimler arası işlemler gerektirir. Bu girişim, yeni ve daha etkili ilaçların keşfi ve imalatıyla sadece sağlıkta genel bir iyileştirme meydana getirmemiş, aynı zamanda komplekslerin ve yeni aktif bileşiklerin keşfi, iyileştirilmesi ve onların hedeflerini anlamak için daha doğru araçların ve tekniklerin gelişmesine sevk ederek bilimin kendisinin ilerlemesine katkıda bulunmuştur (Alonso ve ark. 2006). Bir ilaç tasarım işleminde takip edilen genel basamaklar Şekil 2.14.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Bilgisayar destekli ilaç tasarımının örnek bir akış şeması

Bilgisayar simülasyonları, moleküllerin kendi yapılarına ve kendi aralarındaki mikroskobik etkileşimlerine dayanarak, toplanma özelliklerinin anlaşılması umularak icra edilmektedirler. Bu olay, yeni bir şeyler, diğer yollardan bulunamayan bir şeylerin öğrenilmesini mümkün kılarak, geleneksel deneyleri tamamlayıcı olarak hizmet eder. İki ana simülasyon tekniği moleküler dinamik (MD) ve Monte Carlo (MC)'dur; buna ilaveten her iki yöntemin özelliklerini birleştiren çok sayıda melez teknik vardır. MD'in MC üzerindeki aşikâr avantajı sistemin dinamik özelliklerine bir yol vermesidir:

taşınma katsayıları, zamana bağlı sarsıma cevap, reolojik (akış bilimsel) özellikler ve spektrumlar (Allen 2004).

İlaç keşfi işlemi (veya araştırma ve ön klinik geliştirmesi) tıbbi kimyada ulaşılabilen teknolojiye bağlı olarak çeşitli yollardan yapılmaktadır. 20. yüzyılın erken dönemlerinde ilaçlar, hastaların fenotipik aktivitesindeki değişimin temeli üzerinde görüntülenen bileşiklerle deneme-yanılma testleriyle geliştirilmekteydi. Çeşitli farmasötik birimlerin aksiyonunun mekanizması hakkındaki, fonksiyonel grupların incelenmesi yoluyla bulunan bilginin evrimi, ilaçların nasıl çalıştığı ve önemli farmakodinamik etkileşimleri neyin değiştirdiği anlayışımızın çok sofistike olmasını sağlamıştır (Liang 2002).

Son zamanlarda, ilaç kimyacıları ilaç keşfi için, bütün bileşik türlerini çabucak yapabilen kombinatoriyal kimya, moleküler ve hücresele düzeyde hastalık hedeflerine büyük bir anlayış getiren genom bilimi, daha sofistike ve tam görüntüleme metotlarının geliştirilmesini mümkün kılan biyoteknoloji ve bileşik aktivitesi üzerinde bilgi elde etme ve görüntüleme için robotları kullanan high throughput screening metotlarını içeren daha yeni teknikler kullanabilmektedirler. Bu tekniklerin kombinasyonu, daha fazla bileşiğin daha fazla hedefe daha hızlı uygulanmasını sağlar, onlar hastalıkların tedavisinde yararlı olabilecek bileşikler ve bileşik sınıfları hakkında büyük miktarda veri oluşturmaktadırlar (Liang 2002).

Kantitatif yapı aktivitesi ilişkileri (QSAR) analizleri olarak 1960 yılında çıkmasından sonra CADD konsepti özellikle son on yılda yapısal biyoloji ve bilgisayar kabiliyetlerinin benzersiz şekilde ilerlemesiyle çok hızlı gelişmiştir. Moleküler modelleme ve simülasyonu içeren CADD teknolojileri ilaç tasarımında ümit vermeye başlamıştır. Son zamanlarda, CADD diğer metotlarla yapılması zor olan birçok proteinle benzer yapılar taşıyan belirli bir hedef için yüksekçe seçici ligandların dizaynında kullanılmaktadır. Postgenomik (genomik sonrası) dönemde, küçük molekül ve biyomakromolekül bilgisinin dramatik artışından dolayı, CADD araçları ilaç araştırma ve geliştirmenin hemen her alanında uygulanmıştır, çoğunlukla strateji ve ilaç tasarımının akış şemasının değişmesinde kullanılmıştır (Tang ve ark. 2006).

Geleneksel olarak, bilgisayar destekli ilaç tasarımı üzerinde bir projeye girilmeden önce ilk düşünce, ilaç hedefinin detaylı 3 boyutlu yapısının bulunup

bulunmadığıdır. Bu daha sonra tekrarlamalı bir işlemle değerlendirilen, ligand temelli (QSAR, ComFA, farmakofor) veya yapı temelli yaklaşımlarından (yerleştirme, *de novo* ligand dizaynı) hangisinin kullanılacağını belirlemektedir. Bu metodoloji, sentezlenen veya elde edilen ve hedefte aktiflik için test edilen az sayıdaki en iyi adayların seçimini başlatmaktadır. Sonuçlar daha sonra CADD işlemi içine geri verilir (Griffithb ve ark. 2005).

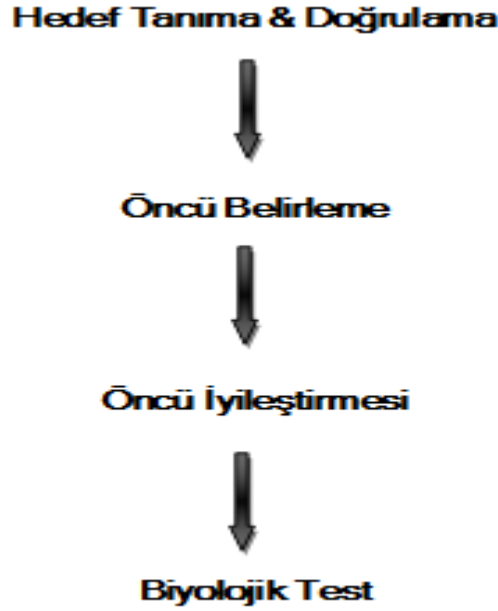
Ligand ve yapı temelli CADD metotlarının tam ayrılması çok sayıda eksikliğe sahiptir. Ligand temelli stratejilerin çoğu, mevcut ligandların aktifliğinde çok önemli olduğuna inanılan, bir iskelet üzerindeki fonksiyonel grupların üç boyutlu düzenlenişini korumak amacıyla, potansiyel öncü bileşiklere öne sürer ve değerlendirir. Bu, hedef proteinle farklı etkileşimleri üzerine alan yeni ligandların keşfini engellemektedir. Bununla beraber, yerleştirme metotlarında yeni potansiyel ligandın hedefin bağlanma bölgesine yerleşmesi ve uygunluğunun değerlendirilmesi, özellikle ligand ve proteinin ikisinin de uygunluğunun değerlendirilmesi hesapsal olarak çok pahalıdır. Bu çalışmalarda, protein içinde ligand bağlanmasının üzerindeki konformasyonel değişimler özellikle büyük ölçekli değişimler, göz ardı edilmektedir. Yapı temelli metotlar da hedefin kendisiyle kompleks yapmış ve yapmamış ligandların detaylı yapısının ulaşılabilirliği ile sınırlıdır (Griffithb ve ark. 2005).

Hepsinin amacı, sonunda biyolojik bir araç olarak yararlı olacak veya ideal olarak ilaç olmaya doğru gidecek yeni ve güçlü moleküllerin keşfine yardımcı olmak olan birçok teknik CADD'i yürütmektedir (Meek ve ark. 2006).

İlaç araştırması ve geliştirmesi (R&D:research and development) geniş kapsamlı, pahalı, zaman alıcı ve riskle doludur. Fikir halindeki bir ilacın markete gelmesi 12 yıl ve bunun için harcanan paranın ortalama 800 milyon \$'dan fazla olduğu hesaplanmaktadır. Bu nedenle ilaç araştırması ve geliştirilmesinde araştırma süresini kısaltmak ve pahalılığını düşürmek için birçok yeni teknoloji geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD) böyle evrimsel teknolojilerden biridir (Tang ve ark. 2006).

Kompleks ve çoklu bilim dalı çalışması gerektiren çok basamaklı ilaç keşfi işlemi dört ana safhada gruplandırılabilir: hedef tanınması ve doğrulanması, öncü tanınması, öncü optimizasyonu ve biyolojik testler (Şekil 2.14.). Uygun bir hedefin

seçilmesi ilaç tasarımı işleminde genellikle ilk basamaktır. Hedef seçimi, insan hastalıklarını ve özel bir hastalığa götüren biyolojik işlemlerin bir anlayışını gerektirmektedir. Her ne kadar tarihsel olarak ilaçlar moleküler hedefler bilgisi olmadan keşfediliyor idiyse de, hedefin bilinmesi birinin kısa bir vakit içinde yeni ilaçları keşfetmesi kabiliyetini büyük ölçüde arttırmaktadır. İnsan genom dizilişi ve buna ilaveten insan patojenlerinin birçoğunun genom dizilişindeki son gelişmeler, potansiyel yeni moleküler hedeflerin büyük bir havuzunu sağlamaktadır. Gelecekteki birçok ilaç keşfi çabaları, doku yayılması, genom yerleşimi ve/veya bilinen bir proteine homolog diziler veya yapısal benzerlik gibi kendi işleyişine bir işaret sağlayabilecek olan bir veya birden fazla özellik üzerine dayandırılmış bir veri tabanı dizisinden seçilen kısmen bilinmeyen bir gen ile başlayacaktır (Makriyannis ve Biege ve ark. 2004).



Şekil 2.15. Basitleştirilmiş ilaç keşfi işlemi

İkinci basamak, moleküler hedefle etkileşecek uygun öncü molekülün tanınmasıdır. Bu genellikle tipik olarak bileşiklerin yüz binlercesini içeren mevcut kimyasal bileşik kütüphaneleri ve doğal ürünlerin hightrougput görüntülemesi ile başarılmaktadır (Makriyannis ve Biege 2004).

Üçüncü basamak, ihtiyaç duyulan güçlülükte, seçicilikte, biyoyararlanımda ve ilaç metabolizmi ve farmakokinetik (DMPK=drug metabolism and pharmacokinetics) özelliklerde, moleküller elde etmek amacıyla tekrarlamalı kimyasal sentez ve biyolojik testler yoluyla öncü molekülü optimize etmedir (Makriyannis ve Biege 2004).

İlaç keşfi işleminin son basamağı etkinlik, biyoyararlanım ve güvenlik konularının belirlenmesi için öncü bileşiklerin test edilmesini içermektedir. Testler laboratuvar denemelerini gerektirebilir ancak nihayetinde uygun bir hasta modeli ve hayvanlarda çalışmayı gerektirecektir. İstenilen bütün özelliklerdeki bir bileşiği tanımlamak için birçok bileşiğin tasarımı ve sentezlenmesi gerekebilmektedir. Böyle bir bileşik ön klinik çalışmaları ve nihayetinde kliniklere kadar ilerleyebilmektedir (Makriyannis ve Biege 2004).

Günümüzde ilaç tasarımı için birçok modern yaklaşım kullanılmaktadır. Bunlar proteomikler, biyoinformatikler, görüntüleme teknikleri, kombinatoriyal kimya, bileşik kütüphanesi dizaynı, ligand ve yapı temelli ilaç tasarımı ve farmakokinetik yaklaşımlar gibi farklı araştırma alanlarını içermektedir. Özellikle, yüksek sayıda örneklerin işlenmesine izin veren high throughput teknikleri kullanan metodolojik yaklaşımlar araştırılmaktadır (Presegué 2007). CADD teknikleri geniş iki ana kategori altında toplanır: bilinen aktif moleküllerin yapıları ve yapı temelinde biçimsel ya da fizikokimyasal olarak benzer olan bileşikler için veritabanı tarayan ligand temelli metotlar ve hedefin aktif bölgesini bir kalıp olarak kullanan ve var olan boşluğu dolduracak küçük molekülleri arayan yapı (reseptör) temelli metotlar. Bu iki yaklaşım ihtiyaç halinde birleştirilebilmektedir (Meek ve ark. 2006).

2.2.1. Ligand Temelli İlaç Tasarımı

Yapısal bilgi mevcut olmadığında, hesaplamalı kimyacılar yeni ilaç öncülleri araştırmak için ligand temelli metotları kullanmaktadırlar. Onlar aktifliği bilinen ligandların bir serisini hedef karşısına yerleştirerek yapısal ve kimyasal özelliklerini araştırmaktadırlar. Ligand temelli metotlar yapı temelli metotlardan önce gelir ve yüksek kan basıncı, ağrı ve depresyonu tedavi eden ilaçları içeren birçok ilacın geliştirilmesine yardım etmektedir (Cobb 2007).

Ligand temelli yaklaşımda hedef yapısı bilinmemektedir. Bunun yerine deneylerden elde edilen veriler ilaç tasarımı işlemlerine rehberlik etmek üzere kullanılmaktadır. Örneğin, bir kanser projesinde biri zarar verici hücreleri küçük moleküllü bileşiğe maruz bırakabilir ve hücre sahibini zamanla ve farklı dozlar altında dener (Martin 1992).

Günümüzde, ligand temelli dizayn metodu aktiviteden sorumlu yapısal özellikleri sistematik bir şekilde çözebilmek üzerine dayanır. Bu genellikle bilgilendirici bir şekilde dizayn edilmiş kütüphanelerin kullanımı ve deneysel dizaynın geliştirilmesi ile yapılmaktadır. Anahtar, her bir molekülün, şeklinin karakterize edilmesiyle veya belli farmakoforların varlığı veya yokluğuyla karakterize edilebilmesidir. Takdir edileceği gibi, büyük veri tabanlarının araştırılması gerektiğinden, bu metot etkili üç boyut açıklayıcılara ihtiyaç duymaktadır (Martin 1992).

2.2.1.1. İstatistiksel Yöntemler (QSAR)

Kantitatif yapı aktifliği ilişkileri metotları bileşiklerin yapısal ve/veya özellik açıklayıcıları ile biyolojik aktiviteleri arasında ilişki kurmak için bir teşebbüs gösterir. Bir dizi molekülün sterik, topolojik, elektronik ve hidrofobik özelliklerini karakterize eden bu açıklayıcılar, geleneksel olarak başlıca deneysel olarak belirlenirler ve sadece son zamanlarda bilgisayarlı metotlarla yapılmaktadırlar. 3D QSAR metotlarının en güçlü olanlarından biri olan karşılaştırmalı moleküler alan analizi (Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) şu anda geniş ve başarılı bir şekilde aktif bileşiklerin dizaynına uygulanmaktadır. CoMFA moleküllerin etrafındaki sterik, elektrostatik ve lipofilik potansiyelleri hesaplayarak ve sonra veri takımına kısmi en küçük kareler metodunu uygulayarak, moleküler özellikleri biyolojik aktiviteyle ilişkilendirir (Taft ve ark. 2008).

İstatistiksel öğrenme metotları artan bir şekilde spesifik özellikli bileşiklerin tahmini için ve genellikle bileşiklerin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin görüntülenmesi için kullanılan algoritmaları ölçmek için kullanılmaktadır. Son zamanlarda Neural Networks (biyolojik nöral ağlar üzerine dayandırılan matematiksel veya hesapsal model) ve SVM (support vector machines) gibi diğer istatistiksel öğrenme metotları yüksek yapısal farklılıktaki bileşiklerin öngörülmesi için Kantitatif Yapı-Aktiflik İlişkileri (QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships) ve Kantitatif Yapı-Özellik İlişkileri (QSPR: Quantitative Structure-Property Relationships) tarafından sağlanandan daha fazla araştırılmıştır (Taft ve ark. 2008).

2.2.1.2. Kemoinformatikler

Uzun gelenekli yeni bir alan olan kemoinformatikler kimyasal problemler için informatik (bilişim) metotları uygulamasıdır. Her ne kadar bu terim ile birkaç yıl önce tanışılmışsa da bu alan uzun bir tarihe sahiptir. Analitik kimyadan, ilaç tasarımına kadar bütün kimya alanları kemoinformatiklerden yararlanabilmektedir. Ve hala çok sayıda ilgi çekici problem çözüm beklemektedir. Kemoinformatiklere genel bir bakış kimyasal bileşik ve kimyasal reaksiyonların gösterimi, veri, veri kaynakları, veri tabanları, fiziksel ve kimyasal verileri hesaplayan metotlar, yapı açıklayıcı hesaplaması ve buna ilaveten analiz metotları başlıklarını kapsar. Uygulamanın sınırları çok geniştir ve: İstenen özelliği elde etmek için hangi yapıya ihtiyaç duyuyorum? Bu yapıyı nasıl sentez edebilirim? Yaptığım reaksiyonun ürünü nedir? gibi soruları cevaplamalıdır (Taft ve ark. 2008).

Kemoinformatiklerin kimyanın değişik alanlarındaki bazı tipik uygulamaları kimyasal yapıların ve veri denizini yönetmek için birleştirilmiş verilerin yeniden kazanılması ve depolanması, bileşiklerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin tahmini, keşfedilmiş maddelerin niteliği, soyu ve yaşı üzerinde tahmin yapmak için analitik kimyadan verilerin analizi, spektroskopik verilere dayalı olarak bir bileşiğin yapı izahı, organik reaksiyonların yön ve ürünlerinin tahmini, organik sentezlerin dizaynı, yeni öncü yapıların tanımlanması, öncü yapıların optimizasyonu, QSAR'ın kurulumu, kimyasal kütüphanelerin karşılaştırılması, yapısal farklılığın analizi ve belirlenmesi, kimyasal kütüphanelerin planlanması, high-throughput verilerinin analizi, bir ligandın reseptöre yerleştirilmesi, ligandların *de novo* dizaynları, ADME-TOX (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) ve özelliklerinin modellenmesi, ksenobiotiklerin metabolizinin tahmini ve biyokimyasal yollarının analizini içerir (Taft ve ark. 2008).

2.2.1.3. Farmakoforlar

Elimizde üç boyutlu bir yapı olmadığında, farmakofor gibi ligand temelli bir model geçerli bir alternatiftir. Bir farmakofor biyoaktiflik için gereken minimum moleküler özelliklerin üç boyutlu düzenlenişidir (Martin 1992, Martin ve ark. 1993) ve tedavi amaçlı hedefler için veritabanı görüntülemeye geniş şekilde uygulanmıştır (Wang

ve ark. 1994, Sprague 1995, Barnum ve ark. 1996, Kaminski ve ark. 1997, Nicklaus ve ark. 1997, Sprague ve Hofmann 1997).

Farmakofor belirleme ve 3D araştırmaları ilaç dizaynının önemli bir parçasıdır. Farmakofor modeli yapısal özelliklerin 3D düzenlenmesi üzerine bir hipotezdir. Bu modeller aromatik halkalar, hidrojen bağ verici ve alıcı grupları gibi bir biyolojik hedefe bağlanan bileşiklerin hidrofobik gruplarını içermektedir. Reseptör hedefinin 3D yapısının bilinmesi durumunda veya inaktif analoglarla karşılaştırma yoluyla daha ileri geometrik ve/veya sterik sınırlamalar belirlenebilmektedir. Farmakofor modelleme ve 3D veritabanı araştırması yeni biyoaktif bileşiklerin keşfinde amaçlanan görüntüleme deneylerinin zenginleştirilmesi için başarılı araçlara sahiptir (Taft ve ark. 2008).

2.2.2. Yapı Temelli İlaç Tasarımı

Yapı temelli ilaç tasarımı ilaç keşfini idare etmek için bir ilaç hedefinin üç boyutlu yapısını kullanır. İlaç hedefinin ligand-bağlanma bölgesinin şekil ve özelliklerinin bilinmesi geleneksel ilaç tasarım pratiğine karşı çok iyi bir avantaj sağlamaktadır. Çeşitli hesaplama araçları kullanılarak küçük moleküller aktif cep içine modellenmektedir (Zhou 2008).

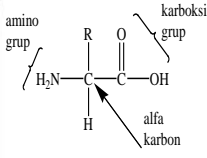
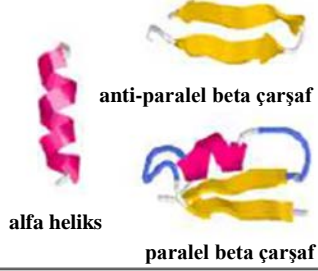

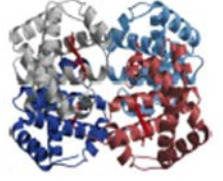
Yapı temelli ilaç tasarımı veya bazen söylendiği gibi rasyonel ilaç tasarımı, bir makromolekülün veya önemli insan hastalıklarına yeni ilaçları tasarlamak için ilgili ligand-hedef komplekslerinin üç boyutlu yapılarında bulunan bilginin kullanımının karışık işlemine ifade etmektedir. Mevcut yapılardan ilgili bilgilerin tamamının çıkarılması için hesaplamalı metotlara ve hedef için iyileştirilmiş ligandların tasarımı için kabiliyetli yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yapı temelli ilaç tasarımında ilk adım olan hedef makromolekülün (protein veya nükleik asit) üç boyutlu yapısı x-ray kristalografi veya NMR'dan belirlenmektedir. Birkaç örnekte, bir homoloji modeli (Ring ve ark. 1993) başlangıç noktası olarak kullanılmıştır, ancak daha doğru yapısal bilgi, hesapsal sonuçları daha kestirimci (iyi öngörü) yapmaktadır. Bir öncü bileşiğin birileri tarafından bulunması, hedefe bağlanan öncü bileşiğinin üç boyutlu yapısının çözümlenmesini, bu yapının sınanmasını ve bağlı ligandın etkileşimlerinin türlerinin karakterize edilmesini ve bileşiğe iyileştirmeler tasarlamak için hesapsal metotların kullanılmasını içeren işlemlerin başlayacağı anlamına gelmektedir (Joseph-McCarthy 1999).

2.2.2.1. Protein Yapısını Belirleme

Proteinler bütün canlı organizmaların büyük bir kısmını oluşturan ve biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesi, hormonlar ve diğer sinyal veren moleküller için reseptör olarak ve doku ve kas liflerinin oluşumu gibi çoğu önemli fonksiyonları yerine getiren üç boyutlu yapıya bürünmüş aminoasitlerin bir zinciridirler. Protein yapılarının, fonksiyonları hakkında önemli bilgileri gösterdiğine geniş şekilde inanılmaktadır. Bununla beraber bir proteinin yapısını laboratuvar deneyleri ile belirlenmesi çok uzun zaman ve emek gerektirir. Örneğin, tek bir proteinin x-ray difraksiyon metotları ile 3 boyutlu (3D) yapısının belirlenmesi amacıyla kristalize etme çalışmaları aylarca sürmektedir.

Biyologlar proteinlerin yapısal özelliklerini daha iyi karakterize etmek için dört seviyelik bir yapı hiyerarşisi belirlemiştirler. Birincil yapı proteini oluşturan aminoasitlerin basit lineer zincirini veya dizisini, ikincil yapı aminoasitlerin düzenli yapı içindeki lokal konformasyonunu (α -heliks, β -çarşaf ve helezon ya da ilmek olmak üzere üç büyük yapı tipi mevcuttur), üçüncül yapı bütün bir protein veya protein bölgesinin global üç boyutlu yapısını ve dördüncül yapı ise hidrojen bağları da dâhil olmak üzere çoklu protein zincirlerini ifade eder (Şekil 2.15.).

Proteinler aminoasitlerin lineer polimerleridirler. Aminoasitler bir amino grubu (NH_2), bir karboksil grubu, bir hidrojen atomu (H) ve merkez alfa karbonuna (C_α) bağlı bir yan zincir (R-grubu) içeren küçük moleküllerdir. Bir aminoasidi diğer bir aminoasitten ayırarak standart 20 aminoasit oluşturan öge yan grupların farklılığıdır.

Aminoasit	İkincil Yapılar	Üçüncül Yapılar	Dördüncül Yapılar
	 <p>alfa heliks</p> <p>anti-paralel beta çarşaf</p> <p>paralel beta çarşaf</p>		

Şekil 2.16. Protein yapı hiyerarşisi

Protein dalarını kaydeden birkaç tane veritabanı mevcuttur. Bunlardan Protein Data Bank (PDB) 1971'de Brookhaven Ulusal Laboratuvarları tarafından 1971 yılında protein ve nükleik asitlerin biyolojik makromoleküler kristal yapılarını arşivlemek için kurulmuştur (Berman ve ark. 2000). Şimdiye kadar deneysel olarak çözülmüş 3-D yapı dalarını dünya genelinde işleyen ve dağıtımını yapan tek depodur (Liu 2006). Bu deponun veri tabanlarına www.rcsb.org internet adresinden ulaşmak mümkündür.

Diğer bazı protein ve nükleik asit veri tabanlarına The UniProt (Universal Protein Resource) (Leinonen ve ark. 2004), Swiss-Prot (Boeckmann ve ark. 2003), SCOP (Structural Classification of Proteins) (Murzin ve ark. 1995) ve Genbank (Benson ve ark. 2009) örnek verilebilir.

Bir hastalığın tedavisi veya bir semptomun etkisini azaltmak için tıbbi bir ürün dizayn etmek amacıyla terapötik bir hedef seçmede hastalığın yolu ve ilgili süreçlerin açık bir şekilde anlaşılması çok önemlidir. Yapı temelli ilaç tasarımında reseptör-ligand ilişkileri araştırılmadan önce birinci öncelik hedef yapısının belirlenmesidir. X-ray difraksiyonu ve NMR protein yapısının fiziksel ölçümlerle belirlenmesinde kullanılan başlıca metotlardır (Marti-Renom ve ark. 2000, Huang ve ark. 2010). Yapısı belirlenmiş proteinlerle ilgili bilgiler yukarıda bahsedilen veri tabanlarından elde edilebilir ancak eğer protein yapısı çözümlenmemişse bu durumda modelleme yaklaşımları kullanılabilir.

-Homoloji Modelleme

Homoloji modelleme, benzer diziler içeren proteinlerin benzer üç boyutlu konformasyonlarda olma eğiliminde olduğu gözlemine dayanmaktadır. Eğer dizi eşleştirmesinden yapısal eşdeğer kalıntılar belirlenmiş ise deneysel olarak belirlenmiş protein yapılarına diğer proteinlerin yapısının öngörülmesinde kullanılabilir (Aszodi ve Taylor 1996). Bu yaklaşım, yapısı bilinen proteinlerle % 30'dan fazla dizi benzerliği taşıyan proteinlere uygulanabilir (Liu 2006, Simms 2010).

-Katlanma Bölgelerinin Tanınması

Aynı zamanda düğümlenme (threading) olarak bilinen katlanma tanınması metodu, kalıntı etkileşimleri ortamını açıklamak için kullanan Bowie ve arkadaşları tarafından 1991'de uygulanmıştır. Katlanma bölgelerinin tanınması verilen bir protein

dizisinin oluşturabileceği 3D yapıların ihtimallerini hesaplar (Mishra 2009). Hem kalıntı etkileşimleri ve hem de protein yüzey alanının çevreleri düğümleme protokolü içinde düşünülür. Olması en yüksek ihtimal protein modelini oluşturmada tercih edilir (Huang ve ark. 2010).

-*Ab initio* Protein Modellenmesi

ab initio metodu hedefi oluşturmak için fizik prensipleri, kalıntı etkileşimleri merkezi ve proteinin örgü gösterimine dayanmaktadır (Huang ve ark. 2010). *Ab initio* yapı öngörüsü bir proteinin doğal konformasyonlarını yalın aminoasit dizisinden tahmin etmeye çalışır. Birçok proteinin doğal düğüm konfigürasyonlarının dizilerin en düşük enerji seviyelerine dayandığı inancı üzerine temellendirilmiştir (Liu 2010). Bu metot, diğer bahsedilen protokoller bilinmeyen protein yapısını öngörmeye başarısız olunca son derece kullanışlıdır (Huang ve ark. 2010).

-Aktif Bölgenin Belirlenmesi

Yapı temelli ilaç tasarımı diğer bir önemli konu proteinin aktif bölge veya bölgelerinin belirlenmesidir. Aktif bölge, x-ray kristalografiden sonra ligandın yeri kristal örgü içinde belirlenebilirken, kristallendirilemeyen proteinler için bu mümkün değildir. Proteinin aktif bölgelerinin belirlenebilmesi için çeşitli programlar geliştirilmiştir (Fernandez-Recio 2011).

2.2.2.2. De Novo

İlaç tasarımı elde edilen bir öncünün iyileştirilmesi çalışmalarından biri de *de novo* ligand tasarımıdır. *de novo* ligand tasarımı genellikle bileşik veri tabanlarında bulunmayan yeni yapılar içeren aktif bileşiklerin dizaynı anlamına gelmektedir. Çoğu durumda dizayn x-ray yapıları, homoloji modelleri ve farmakofor haritalarını içeren hedef yapının üç boyutlu yapıları üzerine temellendirilmiştir (Honma 2003). Ligand yerleştirme işlemlerinden sonra ligandlar iki şekilde modifiye edilebilir. İlk metot reseptörle kuvvetli etkileşimler kurabilecek fonksiyonel grupların belirlenmesi için aktif bölgenin özellikleri üzerinde temellendirilmiştir. Bu fonksiyonel gruplar daha sonra orijinal ligand yapısına link edilebilir veya yapıştırılabilir. İkinci metot reseptörü tamamlayıcı türevler geliştirmek için orijinal ligand iskeletini kullanır (Huang ve ark. 2010).

2.2.2.3. Ligand Yerleştirme

Moleküler yerleştirme reseptör-ligand komplekslerinin yapı öngörüsü olarak tanımlanabilir. Reseptör genellikle protein veya protein oligomeri, ligand ise küçük bir molekül veya başka bir proteindir. Ligand yerleştirme çalışmalarında MD yaygın olarak kullanılmaktadır. Çoğu ligand yerleştirme metodu MM temellidir (Addock ve McCammon 2006).

Moleküler yerleştirmeyeyle sanal taramanın ilaç keşfindeki önemi giderek artmaktadır. Böyle bir sanal tarama genellikle üç basamakta gerçekleştirilir. İlk olarak, moleküler yerleştirme programı bir hedef proteinin ve tarama kütüphanelerinden bir bileşiğin kompleksi için en uygun yapıyı ön görür. İkinci olarak, kompleksler bağlanma enerjisi kuvvetlerine göre skorlandırılırlar. Son olarak, yerleştirilme skorlarına göre sınıflandırma yapılır ve sanal tarama sonuçlarından en iyi derecedekiler seçilirler (Onodera 2007). Böylece, moleküler yerleştirme bir ilaç geliştirme basamağının en önemli ayaklarından birini teşkil eder.

İlk yerleştirme algoritmasının 1980'lerde Kuntz ve arkadaşları tarafından bulunmasından beri çok sayıda değişik yerleştirme yaklaşımı ve aracı geliştirilmiştir (Kuntz ve ark. 1982). Bununla birlikte, bazı çalışmalar çoğu araçların yerleştirme performansının dikkate alınan hedefe güçlü şekilde bağlı olduğunu göstermiştir ve bu nedenle eldeki durumda en iyi olan programı seçmek zordur. Farklı araçların, farklı şartlar altında, farklı hedefler için kullanılmalarından ve deneme çalışmalarındaki kriterlerin farklılığından dolayı yerleştirme araçlarının karşılaştırmak da zordur (Wolf ve ark. 2007). Diğer taraftan sağlam bir karşılaştırma yapabilmek için her bir programın onlarca farklı parametrelerini değiştirerek deneme çalışmalarını yapmak son derece uğraştırıcı, zaman alıcı ve belki de gereksizdir. Sonuç olarak yerleştirme programlarının performansının hedef protein yapısına bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini (Yang ve ark. 2005; Kontoyianni ve ark. 2004) ve bir kaç hedef protein üzerindeki deneme sonuçlarının bir yerleştirme programının gerçek performansını tahmin etmekte yetersiz kalacağını belirtmekte fayda vardır (Onodera ve ark. 2007). Çeşitli ligand yerleştirme programlarının karşılaştırılması çokça çalışılmıştır (Wang ve ark. 2003, Kellenberger ve ark. 2004, Park ve ark. 2009, Hevener ve ark. 2009). Bahsedilen sebeplerden dolayı bu çalışmada farklı üç ligand yerleştirme programının kullanılması uygun görülmüştür.

Ligand yerleştirme programlarının altında yatan algoritmaları sınıflandırmanın yollarından biri ligandın yerleştirme sırasındaki davranışlarıdır. Bu algoritmalarından bazıları ligandın bir parçasını yerleştirmeye başlanarak, ligandın geri kalanı bu parça üzerine inşa edilir. DOCK (Lang ve ark. 2009), ve FlexX (Rarey ve ark. 1996) bu yaklaşımı izleyen programlardan bazılarıdır. Autodock (Morris ve ark. 2009), GOLD (Jones ve ark. 1997), ICM-Dock (Totrov ve Abagyan 1997) ve QXP (McMartin ve Bohacek 1997) gibi programlar ligandı bütün olarak hedefle etkileştirir (Kroemer 2007). Sürekli bir gelişim halinde olan ligand yerleştirme programları günümüzde ligandı tamamen, proteini ise kısmen hareketli hale getirerek yerleştirme işlemlerini yapabilmektedir. Benzer yerleştirme özellikleri bu çalışmada kullanılan Autodock, DOCK ve Autodock Vina (Trott ve Olson 2010) için de geçerlidir. Ayrıca üç program da çok sayıda çekirdek üzerinde paralel çalışabilmektedir.

Autodock'ın en çok kullanılan konformasyonel araştırma logaritması Lamarckian genetik algoritmasıdır (LGA). Bunun yanında benzetimli tavlama ve geleneksel genetik algoritmaları da içermektedir. Autodock küçük moleküllerin makromoleküllere bağlanma serbest enerjisini öngörmeye yarı empirik bir kuvvet alanı kullanır. Program, ligandın tümünü ve aynı zamanda proteinin bazı özel kısımlarının tamamen esnek olmasına izin vermektedir (Morris ve ark. 2009). Üç boyutlu yapıyı tanımlandırmak ve van der Waals ve kulombik etkileşimleri hesaplamak için AMBER kuvvet alanı temelli bir dizi örgü seti AutoGrid tarafından kullanılmaktadır (Huang ve ark. 2010).

DOCK biyomoleküler hedefin aktif bölgesine ligandı esnek olarak inşa etmek için demirleme-ve-büyüme (anchor-and-grow) olarak adlandırılan bir örnekleme algoritması kullanır. Bu algorithmada ligandın en büyük rijit parçası (anchor) tanımlanır ve aktif bölgeye yönlendirilir. Sonra, rijit yapı üzerinde tam bir molekül oluşuncaya kadar geometrik çeşitliliği en üst seviyeye çıkaracak şekilde büyümenin her tabakasında kümeleme yapılarak ligandın esnek kısımları sistematik bir şekilde büyütülür. DOCK DOCK3.5 skora, Hawkins-Cramer-Truhlar (HCT) genelleştirilmiş Born ile çözücü-ulaşabilir yüzey alanıyla (GB/SA) skora, Poisson-Boltzmann ile çözücü-ulaşabilir yüzey alanıyla (PB/SA) skora ve AMBER moleküler mekanik ile GB/SA skora özelliklerine ilaveten kısmi reseptör esnekliğine de sahiptir (Lang ve ark. 2009).

Autodock Vina skorlama fonksiyonu olarak bilgi-tabanlı potansiyeller ve empirik skorlama fonksiyonlarının kombinasyonunu kullanmaktadır. Yöntem empirik bilgileri reseptör-ligand komplekslerinin konformasyonel deneyimlerinden ve deneysel affinite hesaplamalarından almaktadır. Autodock Vina genetik algoritmalar, parçacık-yığılma optimizasyonu ve benzetimli tavlama gibi algoritmaları içeren skoastik global iyileştirme yaklaşımlarını kullanmaktadır. Autodock4 ile uyumlu olduğundan bu programın araçlarını kullanması bir avantaj olarak görülmektedir (Trott ve Olson 2010).

Bu çalışmada kullanılan programlar gerek HIV-1 ile gerekse başka ilaç hedefleri ile ilgili birçok çalışmada kullanılmışlardır. Onodera ve arkadaşları (2007) DOCK, Autodock ve GOLD programlarını 116 hedef protein üzerinde test etmiştir. Benzer bir çalışmalarda Wang ve arkadaşları (1999) Autodock, FlexX (Rarey ve ark. 1996) ve GOLD programlarını, Hevener ve arkadaşları FlexX, DOCK, Glide (Friesner ve ark. 2004), GOLD ve Surfex (Jain 2003) programlarını karşılaştırmışlardır (Hevener ve ark. 2009). DOCK programı G Proteinin $\beta\gamma$ alt ünitelerine küçük moleküllerin yerleştirilmesinde kullanılmıştır (Park ve ark. 2009). Healy ve arkadaşları (2009) HIV-1 integraza L-chicoric asit yerleştirilmesinde Autodock programını kullanmıştır. Bunların dışında yine Autodock programı dinükleotitlerin HIV-1 integrazın C-terminal bölgesine (Zhu ve ark. 2009) ve katalitik öz bölgesine (Perryman ve McCammon 2002) yerleştirilmesinde kullanılmıştır. Brigo ve arkadaşları (2005a) ve Loizidou ve arkadaşları (2009) çalışmalarında HIV-1 integraz enzimine ligand yerleştirmede, Autodock programını kullanmışlardır. Tsai ve arkadaşları (2006) SARS-CoV proteaz için Xiao ve arkadaşları (2011) karbonik anhidraz için inhibitör geliştirme çalışmalarında DOCK kullanmışlardır. Vildman ve arkadaşları (2011) asetilkolinesteraz inhibitör tasarımı için Autodock ve Autodock Vina kullanmışlardır.

2.2.2.4. Moleküler Dinamik

Moleküler dinamik kavramı ve uygulamaları ile ilgili geniş bilgi 2.3.7. başlığı altında geniş şekilde anlatılmıştır.

2.2.3. ADMET Modeli

1990'lerde ilaç gelişimindeki son basamak başarısızlıklarının nedeni ile ilgili yapılan araştırmalar zayıf farmakokinetikler ve toksisitenin sorunlarının çoğundan

sorumlu olduğunu açığa çıkartmaktadır. *In silico*'da (bilgisayar ortamında) ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) araçları zamanı ve ilaç keşif işlemi fiyatını düşürmede önemli araçlardır. ADMET modellerinin yapılandırılması için kullanılan veriler sıklıkla deneysel ortam ekranında high throughput tarafından sağlanmaktadır (Taft ve ark. 2008).

İlaç taşıyıcılarının modellenmesi için hesaplamalı yaklaşım önemi artan bir başlıktır. İlaçların hedeflerine ulaşmaları için ilk basamak, sistemik dolaşımın içine absorpsiyonları oluşturmaktadır. Bunu takiben ilaçların vücuttan dışarı atılabilecek formlara çok kolayca parçalanabildiği (metabolize edildiği) ve sistem döngüsünden dışarı atıldığı dokulara yayılma gerçekleşmektedir. Taşıyıcı proteinler yukarıda bahsedilenlerin tümüne aracı etmekte veya onları etkilemektedir. Hesaplamalı modelleme, deneysel metotlardan bulunamayan ilaç-taşıyıcı etkileşimlerinin bilgilerini direkt veya dolaylı yoldan sağlayarak bizim, ilaç absorpsiyonu, dokuya yayılması, atılması ve toksisitesi anlayışımızı ilerletmiştir. Substrat temelli veya taşıyıcı temelli modeller, taşıyıcı modelleme için tamamlayıcı yaklaşımlardır (Taft ve ark. 2008).

2.2.4. Kombinatoriyal Kütüphane Tasarımı

Son on yıl, kimyasal sentezin, bir süre zarfında bir bileşik temeline dayanan geleneksel yaklaşımdan, kombinatoriyal kütüphaneler olarak adlandırılan çok sayıda bileşiğin sentezini paralel olarak mümkün kılan robotların kullanımına doğru değişimini görmüştür. High-throughput screening'in (HTS) bahsedilen tekniği bir günde on binlerce, yüz binlerce bileşiğin biyolojik etkisinin test edilmesine müsaade eder. Böylece sentezin sonucu çıkan ürünler ve test döngüsü korkunç şekilde artmış olur. Bununla beraber, kullanılabilir bileşiklerin sayısındaki artışa rağmen, onlar hala potansiyel olarak yapılabilecek ilaç benzeri bileşiklerin sayısının küçük bölümünü göstermektedir; örneğin 10^{40} kadar ilaç benzeri bileşiğin olduğu tahmin edilmektedir. Böylece şu aşikârdır ki kombinatoriyal kütüphanelerde kullanılan bileşikler hakkında seçici olma gereği vardır (Gillet 2004a).

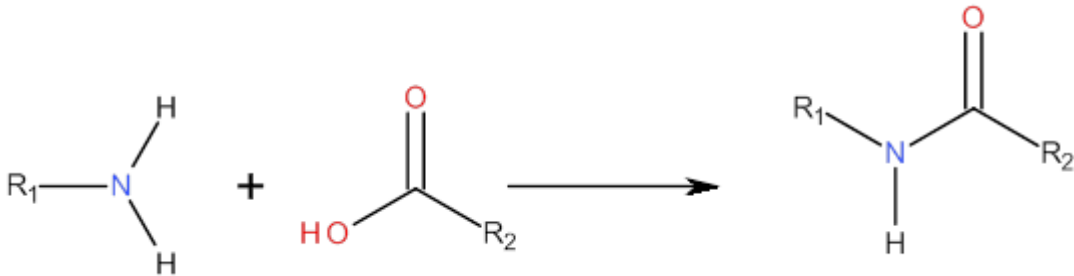
Kombinatoriyal sentezin ilk zamanlarında, çeşitliliğin maksimum yapılması biyolojik aktifliğin farklı türlerinin kapsamını maksimuma çıkaracağı düşüncesiyle, önemli olan husus mümkün olduğu kadar farklı bileşik sentez edilmesiydi. Bununla beraber bu ilk kütüphaneler şaşırtıcı sonuçlar vermiştir: onlar umulandan daha düşük

başarı oranlarına sahiptiler ve başarı gösterenler de öncü keşfi için iyi bir başlangıç noktası sağlanması için istenmeyen fizikokimyasal özelliklere sahip olma eğiliminde idiler (Gillet 2004a).

Günümüzde şu aşikârdır ki eğer yeni teknolojiler ilaç keşfi için etkili olacak ise kütüphanelerin çok dikkatli dizayn edilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak, önem, büyük değişik kütüphanelerden, hedef hakkında olabildiğince bilgi içeren daha küçük kütüphanelerin dizaynına kaymıştır (Gillet 2004a).

High-throughput screening ve kombinatoriyal sentez geçen on yıl süresince ilaç keşfi işlemini tamamen değiştirmiştir. High-throughput screening otomatikleştirilmiş bir işlemdir. Ve onun vasıtasıyla çok büyük sayıdaki bileşikler (10^4 - 10^5) biyolojik aktiflikleri için hızlı bir şekilde görüntülenmektedir. Bununla ilgili olan kombinatoriyal sentez, ürün moleküllerinin mevcut reaktif veya yapı taşlarının bir kombinasyonu olarak oluştuğu çok sayıdaki bileşiklerin paralel sentezi olarak bilinir. Örneğin, mümkün olan her süstitüsyon pozisyonunda sırasıyla NA, NB ve NC'nin bulunduğu üç pozisyon içeren bir kombinatoriyal sentez $N_x N_y N_z$ sayısı kadar ürün molekülü verecektir. Böylece, kombinatoriyal sentez high-throughput screening kullanımıyla görüntülenebilen yeni bileşiklerin bir kaynağı olarak görülebilmektedir (Bultinck ve ark. 2004).

Kombinatoriyal sentez aynı zamanda çok sayıda bileşiğin sentezlendiği bir işlemdir. Bir birine bağlı amin ve karboksilik asit gibi iki bileşenli bir reaksiyon düşünelim (Şekil 2.17.). Eğer 100 farklı amin ve 100 farklı karboksilik asit mevcut ise bunların kombinatoriyal sentezleri 100×100 (10^4) sayıdaki ürünlerin tümünü tek deneyde sentezleme potansiyeli göstermektedir.



Şekil 2.17. Kombinatoriyal sentez (Amitlerin kombinatoriyal kütüphanesi amin ve karboksilik asitlerden inşa edilebilmektedir.)

Bunun tersine, bir süre içinde tek bir bileşik yapabilen geleneksel sentezi kullanan bir kimyacı bir yılda genelde 50 bileşik sentezlemektedir (Gillet 2004b).

2.3. Moleküler Modelleme ve Hesaplamalı Kimya

Moleküler modelleme bir molekülün özellikleri veya yapısının her hangi bir konusunu tasvir etmek, tarif etmek veya değerlendirmek için yapılan hemen hemen her şeyi ifade etmek için kullanılan genel bir terimdir (Pensak 1989). Moleküler modelleme, molekülleri veya moleküler sistemleri analiz etmek ya da moleküler, kimyasal veya biyokimyasal özellikleri öngörmek için kullanılabilen, teorik kimya metotları ve deneysel verilere dayanan bilgisayarlı tekniklerin bir alanı olarak kabul edilebilir. Modelleme teori ve deney arasında:

- i) Belirli bir model için sonuç çıkarmak,
- ii) Sitemin deneysel sonuçlarını karşılaştırmak,
- iii) Model için teorik öngörülerde bulunmak,
- iv) Deneysel gözlemleri anlamak ve yorumlamak,
- v) Mikroskobik detayları atomik ve moleküler düzeyde makroskobik özelliklerle ilişkilendirmek,
- vi) Gerçek deneylerden elde edilemeyen bilgileri sağlamak

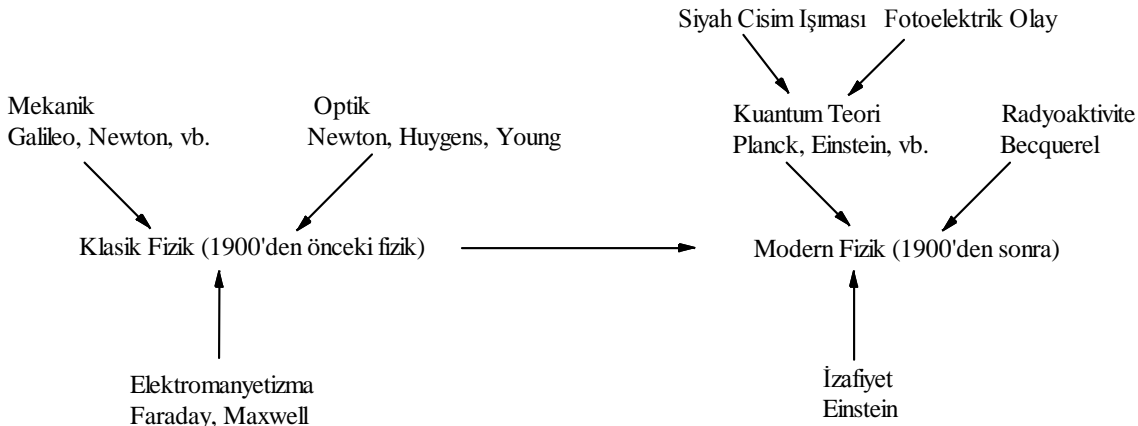
için bir köprü vazifesi görür. Böylece moleküler modelleme bilgisayar kullanımıyla moleküler yapılar ve onlarla ilişkili fizikokimyasal ve biyokimyasal özelliklerin oluşturulması, manipülasyonu, hesaplanması ve öngörülmesi olarak tanımlanabilir (Tsai 2002). Bazı kaynaklar hesaplamalı kimya ile moleküler modellemeyi aynı terimler olarak ifade ederken (Lewars 2004), bazı kaynaklar ise moleküler modellemenin daha geniş bir tanım olarak hesaplamalı kimyayı kapsadığını ve hesaplamalı kimyayı moleküler modelin çekirdeği olarak tanımlamaktadır (Tsai 2002). Aynı zamanda moleküler modelleme ve moleküler simülasyon terimleri arasında da farklılık mevcuttur. Moleküler modelleme, moleküler yapı, fonksiyon ve etkileşimi rasyonalize etmek için kuantum mekanik ve moleküler mekanik metotları tarafından incelenebilen bir molekülün veya sistemdeki bir kaç molekülün özelliklerini içeren mikroskobik modellerin inşası ve uygulaması şeklinde ifade edilirken, moleküler simülasyon

mikroskobik modellerin kullanılarak bir sistemin makroskobik özelliklerinin bulunması olarak tanımlanır (Doucet ve Weber 1996).

2.3.1. Kuantum Mekanik

Moleküler mekanik modern fizikten önceki klasik fiziğe dayanmaktadır. Modern fiziğin köşe taşlarından biri ise kuantum mekaniğidir. Kuantum kelimesi Latin kökenlidir (quantus “ne kadar?”, çoğulu quanta) ve ilk olarak 1900 yılında Max Planck tarafından kullanılmıştır.

Mekanik fizikte geleneksel olarak yerçekimi gibi kuvvetlerin etkisi altındaki cisimlerin davranışları ile ilgilenir. Moleküller çekirdek ve elektronlardan oluşmaktadır ve kuantum kimyası esas itibarıyla çekirdek yükleri tarafından çıkarılan elektromanyetik kuvvetlerin etkileri altındaki elektronların hareketleri ile ilgilenmektedir (Şekil 2.18.).



Şekil 2.18. Klasikten modern fiziğe geçişi sağlayan keşifler (Her ne kadar radyoaktivite 1886'da bulunmuş ise de anlaşılması için izafiyet ve kuantum teorisini beklemek zorunda kaldı.)

Newton mekaniğinin bilinen prensipleri direkt olarak gözlemlenebilen çoğu şey için şaşırtıcı şekilde çalışmaktadır. Ancak bir sistem dakika detayında incelenmek istendiğinde, örneğin atomik düzeyde, basit eşitlikler tam kâfi gelmez. Kuantum mekanik (KM) bir sistem için enerjinin ayrı ayrı düzeyleri olduğunu ifade eden bir teoridir. Enerji düzeyleri birbirine o kadar yakındır ki Newton mekaniğinin düzenlenmiş fonksiyonları yüksek enerjilerde KM'in bir yaklaşımı olarak görülebilir. H 'nin Hamilton operatörünü, ψ 'nin dalga fonksiyonunu ve E 'nin enerjii ifade ettiği $H\psi = E\psi$ denklemi ile KM eşitliği aldatici bir şekilde basittir. Aslında bu sadece zamandan bağımsız, göreceli olmayan Schrödinger denkleminin short-hand şeklidir (Schall 2002). Kuantum mekaniğin başlıca teknikleri *ab initio*, semiempirical (SE), ve yoğunluk

fonksiyonel hesaplamaları (density functional theory; DFT) metotları kuantum mekaniğin yöntemleridir.

ab initio (Latin kökenlidir, ilk prensipten) hesaplamaları Schrödinger denklemine dayanmaktadır. Bu modern fiziğin temel denklemlerinden birisidir ve bu arada elektronların bir molekülde nasıl davrandığını açıklamaktadır. *Ab initio* metodu Schrödinger denklemini bir molekül için çözer ve bize molekülün enerjisini ve dalga fonksiyonunu verir. Dalga fonksiyonu elektron dağılımını hesaplamakta kullanılan matematiksel bir fonksiyondur. Elektron dağılımından biz molekülün polarlığının nasıl olduğunu ve hangi kısmının nükleofiller veya elektrofiller tarafından ataklara uğrayacağına benzediğini ifade edebiliriz.

Yarı empirik (semiempirical; SE) hesaplamaları *ab initio* gibi Schrödinger denklemine dayanmaktadır. Bununla beraber denklemleri çözmede daha fazla yaklaşımlar yapılmıştır ve *ab initio* metoduyla hesaplanması gereken çok komplike integraller SE hesaplamalarında gerçekte değerlendirmeye alınmamıştır: program bunun yerine geometri ve enerji (oluşma ısı) gibi bazı ölçülen hesapların deneysel verilere uyumunu bulunmasıyla derlenmiş integraller kütüphanesini kullanır. En iyi hesaplama değerleri almak için bu deneysel değerlerin bir matematiksel prosedür içine sokulması parametreleştirme olarak adlandırılmaktadır. Metodu “yarı empirik” yapan teori ve deneyin karışımı olmasındandır: Schrödinger denklemine dayandırılmıştır ancak deneysel değerlerle parametrelendirilmiştir.

Yoğunluk fonksiyonel hesaplamaları (genellikle density functional theory; DFT hesaplamaları olarak isimlendirilir) *ab initio* ve SE hesaplamaları gibi Schrödinger denklemine dayanmaktadır. Bununla beraber diğer iki metottan farklı bir şekilde, DFT dalga fonksiyonunu hesaplamaz, tersine elektron dağılımını (electron *density function*) direkt olarak türetir. Buna göre DFT bütün elektronik enerjiyi veren bir elektron yoğunluğu fonksiyonu olduğunu kabul eder (Irikura ve Frurip 1998).

Moleküler dinamik hesaplamaları moleküllere hareket yasalarını uygular. Böylece biri enzimin substrata bağlanırken şekil değiştirirken onun hareketlerini veya çözülmüş bir molekülün etrafındaki su molekülleri kümesinin hareketlerini görüntüleyebilir (Lewars 2004).

2.3.1.1. Temel Setler

Atomik ve moleküler orbitallerin lineer kombinasyonunu (LCAO-MO) inşa etmek için kullanılan atomik fonksiyonların seti temel set olarak adlandırılır. Örneğin $1s_{HA}$ ve $1s_{HB}$ $\sigma 1s$ molekül orbitalinin temel setini oluşturur. Temel setler de kullanılan başlıca üç fonksiyon vardır; Slater veya üslü fonksiyonlar, Gaussian fonksiyonları ve plane-waves fonksiyonları (Field 2007).

2.3.2. Moleküler Mekanik

Deneysel kuvvet alanı metodolojisi klasik mekanik ve bir yapının toplam “sterik” enerjisinin birçok etkileşim türünden katkıların bir toplamı olarak açıklanabileceği varsayımı esasına dayandırılmıştır. Diğer önemli bir varsayım moleküllerin bir serisinden belirlenen kuvvet alanı ve parametrelerinin diğer moleküllere taşınabilir olduğudur.

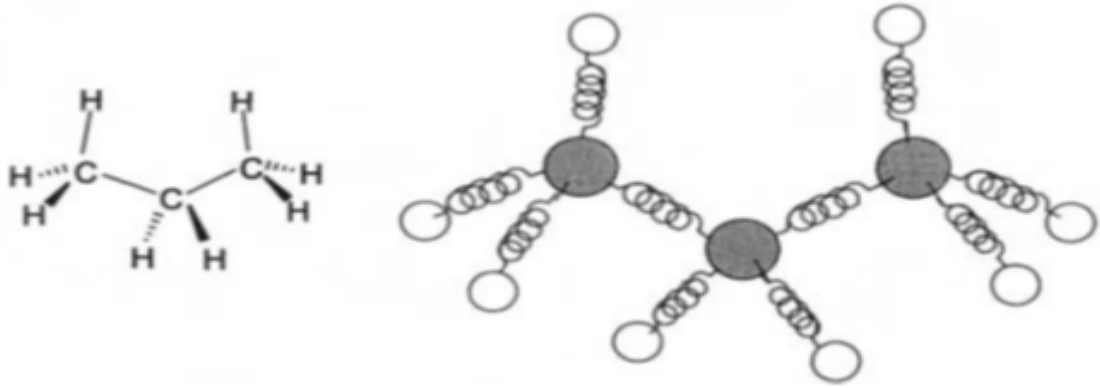
Moleküler mekanik metotları KM metotlarından birkaç merteye daha hızlıdır. MM’in en büyük eksikliği metot ve hesaplamaların niteliği aşırı derecede deneysel parametrelere dayanmaktadır. Böyle parametreler genellikle deneysel çalışmalar veya yüksek seviyeli *ab initio* hesaplamalarından belirlenmektedir (Bultinck ve ark. 2004).

Moleküler mekanik (kuvvet alanı) hesaplamaları hesaplamalı medikal kimyada en çok kullanılan hesaplama türüdür ve yıllar boyunca çok sayıda farklı kuvvet alanı geliştirilmiştir. Moleküler mekanik hesaplamaları, kuvvet alanının potansiyel enerji fonksiyonlarının fonksiyonel şekline ve onların parametreleştirme kalitesine fazlasıyla bağlı bulunmaktadır (Bultinck ve ark. 2004).

Moleküler mekanik yaylar (bağlara tekabül eden) tarafından hep beraber tutulan topların bir koleksiyonu (atomlara tekabül eden) olarak bir molekülün matematiksel modeline dayanmaktadır (Şekil 2.19). Bu modelin iskeletinin içinde, molekülün enerjisi geometrisi ile değişir çünkü yaylar bazı doğal uzunluk veya açılardan dolayı gerilme veya çekilmeye karşı gelir ve toplar birlikte çok yakınlaşmaya karşı gelir. MM modeli elektronları açık bir şekilde yok sayar.

MM’in arkasındaki prensip bir molekülün enerjisini onun bağ gerilmesi, bağ bükülmesi ve atom birikmesi karşısındaki direncinin bir fonksiyonunu olarak ifade etmek ve bu enerji denklemini bağ uzunluğunu, açılarını ve minimum enerjiye veya

daha eksiksiz olarak çeşitli muhtemel potansiyel enerji yüzey minimumlarına karşılık gelen dihedralleri bulmak için kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle, MM kavramsal olarak bir molekülün mekaniksel modelini onun minimum enerji geometrisini (örneğin esnek moleküller, çeşitli konformerlerin geometrileri) bulmak için kullanılmaktadır. Enerji için matematiksel ifadenin şekli ve içindeki parametreler bir kuvvet alanı oluşturur ve MM metotları bu yüzden bazen kuvvet alanı metotları olarak adlandırılır. Terim, bir parçacığın potansiyel enerjisinin, bir yön boyunca yer değiştirmesine göre birinci türevinin negatif parçacık üzerindeki kuvvet olmasından ortaya çıkmaktadır; bir “kuvvet alanı” E (atomların x , y , z koordinatları) her atomun üzerindeki kuvveti vermesi için farklılaştırılabilir.



Şekil 2.19. Moleküler mekanik (kuvvet alanı) metodu ile bir molekülün temsil edilmesi

Eğer MM uygulamalarına kullananların amaçlarının bakış açısından bakılırsa; başlıca uygulamalar aşağıdakilerdir:

1. Çok sıklıkla hesaplamaların başka tipleri (*ab initio* gibi) için uygun bir başlangıç geometrisi için, küçük ve orta büyüklükteki moleküllerin geometrilerini (ve belki enerjilerini) hesaplamak,
2. Polimerlerin (başlıca protein ve nükleik asitler) geometri ve enerjilerini hesaplamak,
3. Nadiren geçiş hallerinin geometrilerini ve enerjilerini hesaplamak,
4. Organik senteze bir destek olarak,
5. Moleküler dinamik hesaplamaları için hareket eden moleküller altında potansiyel enerji fonksiyonu oluşturmak.

Bu uygulamaların hepsi bağımsız değildir. Örneğin, sentez planlayan bir kimyacı sentezde yer alan bir ara ürün için akla uygun bir geometri elde etmek için MM kullanmak zorundadır ve bir protein veya nükleik asit moleküler dinamik ile çalışılabilmektedir (Lewars 2004).

2.3.3. Enerji Yüzeyleri ve Enerji Görünümü

Protein yapısının fonksiyonlarına çok büyük etkisi vardır. Konu ile ilgili bilgiler başlık 2.2.3.1. altında verilmiştir. Hesaplamalarda kullanılan protein yapısının çözücü ortamındaki konformasyonu aktifliğini belirleyen etkenlerden biridir. Her hangi bir fonksiyona özgü proteinin yapısı değiştirildiğinde aktifliği azalmakta veya kaybolmaktadır. Dolayısı ile proteinin çözücü içindeki davranışları ilaç tasarımı için göz önünde bulundurulması gereken konuların başında geliyor. Proteinin davranışları konformasyonları ile ilişkili olduğundan ve termodinamiğin yasaları gereği minimum enerjili olacağı halde bulunma ihtimalinin yüksek olmasından dolayı enerji çalışmaları hesaplamalı kimyada köşe taşlarından birisidir.

Kristalografik çalışmalar protein hareketliliğinin ligand bağlanmadaki rolünün önemini kanıtlarken, kristal yapıların elde edilmesindeki pahalılık ve yoğun çaba gereksinimi protein hareketlerinin öngörülmesi için çoğu kişiyi hesaplamalı tekniklere yöneltmiştir (Durrant ve McCammon 2011). Ancak büyük biyomoleküllerin hesaplamaları için kuantum mekanik yöntemlerinin kullanılması hem çok karışık hem de elinizde süper bilgisayarlar olması dâhilinde bile çok zaman alıcıdır. Bu nedenle makromoleküllerin yapılarının ve davranışlarının modellenmesinde moleküler mekanik metotları uygulanır (Tsai 2002, Durrant ve McCammon 2011). Moleküler mekanik (MM), moleküler sistemleri modellemek için basit potansiyel enerji fonksiyonlarını (harmonik oskilatör veya kulombik potansiyeller vb.) kullanmayı ifade etmektedir. Moleküler mekanik yaklaşımı moleküler yapı iyileştirmede, moleküler dinamik (MD) simülasyonları, Monte Carlo (MC) simülasyonları ve ligand-yerleştirme simülasyonlarında geniş olarak uygulanmaktadır (Adcock ve McCammon 2006).

Molekül içi ve moleküller arası etkileşimleri açıklayacak uygun bir enerji fonksiyonunun seçilmesi, başarılı bir moleküler dinamik simülasyonu için önemlidir. Geleneksel MD simülasyonlarında, bağ yapmayan etkileşimlerin enerji fonksiyonları sadece çekirdek koordinatlarının basit ikişerli toplanırlık fonksiyonu (hesapsal sebepler

için) olmaya eğilimlidir. Atomları tasvir eden bu tek çekirdek koordinatının kullanımı Born-Oppenheimer yaklaşımı terimleri içinde düzenlenmiştir.

Enerji fonksiyonları genellikle çok sayıda parametrize edilmiş ifadelerden oluşmaktadır. Bu parametreler başlıca küçük molekül veya parçacıkların deneysen ve/veya kuantum mekanik çalışmalarından sağlanır ve bu parametrelerin ilgi duyulan daha büyük moleküllere transfer edilebileceği farz edilir. Fonksiyonların takımı, ilgili parametrelerin takımı ile beraber bir kuvvet alanı olarak adlandırılır. Çeşitli kuvvet alanları proteinlerin simülasyonu için geliştirilmiştir.

Dikkate değer istisnalar mevcuttur ancak bu, bir kuvvet alanının tamamen katkı sağlaması içindir. Örneğin, bağ uzunluklarının bağ açlarına bağlı olduğu göz önüne alınmamıştır ve kısmi yükler bir büyüklüğe sabitlenmiştir. Bu, her ne kadar kusursuz olmasa da makul bir potansiyel enerji görünümü yaklaşımı elde etmek için genellikle kabul edilir. Dinamiklerin araştırılması için alternatif metotlar ek sınırlamalar veya potansiyel enerji tarafından uygun görülen özellikleri gerektirebilir.

Bazı kuvvet alanları karşıt terimler ya da daha yüksek düzeyde terimler içerebilirler. Böyle kuvvet alanları II. sınıf kuvvet alanı olarak adlandırılırlar. Bunlar tipik olarak doğru titreşimsel spektrum üretmek veya denge hallerindeki geometrilerinden uzakta olan yapıları düzeltmek için geliştirilmektedirler.

Oldukça geniş olarak uygulanan kuvvet alanlarından biri CHARMM kuvvet alanıdır. Diğer geniş çaplı olarak kullanılan kuvvet alanları bir birinden ayrı çeşitli terimler içermektedir. Bu terimlerin her biri basit bir fonksiyonel forma sahiptir ve verilen bağıl atomik koordinatlar seti sistemiyle sergilenen molekül içi veya moleküller arası kuvvetleri açıklar.

$$\begin{aligned}
V(\vec{R}) = & \sum_{\text{bağlar}} K_d (d - d_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_{UB} (S - S_0)^2 + \sum_{\text{açılar}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
& + \sum_{\text{dihedraler}} K_\chi (1 + \cos(n\chi - \delta)) + \sum_{\text{uygunsuz dihedraller}} K_\varphi (\varphi - \varphi_0)^2 \\
& + \sum_{\text{bağ yapmayan}} \left\{ \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_l r_{ij}} \right\} \quad (2.1.)
\end{aligned}$$

Denklemden K_d , K_{UB} , K_θ , K_χ , ve K_φ bağ uzunluğunu, Urey-Bradley (1-3 bağ uzunluğu, bağ açısı, dihedral açısı ve uygunsuz dihedral açı kuvveti katsayılarını ifade etmektedir. Benzer şekilde geçerli konfigürasyonda d , S , θ , χ ve φ bağ uzunluğu, Urey-Bradley (1-3 bağ uzunluğu), bağ açısı, dihedral açısı ve uygunsuz dihedral açı değerlerini göstermekte ve sıfır alt bilgisi bütün bunların referans veya denge değerlerini ifade etmektedir. Bu terimler bağ yapan etkileşimleri göstermektedir. Bağ yapmayan etkileşimleri ifade eden fonksiyondaki son terim Kulombik ve Lennard-Jones etkileşimlerini içermektedir. ϵ_{ij} Lennard-Jones kuyu derinliğini, R_{ij}^{min} Lennard-Jones potansiyeli sıfır olduğunda uzaklığı, q_i i atomunun kısmi yükünü, ϵ_l efektif dielektrik sabiti ve r_{ij} i ve j atomu arasındaki mesafeyi anlatmaktadır. Lorentz-Berthelodt kombinasyonu yasaları farklı her atom çifti için gerekli Lennard-Jones parametrelerini bulmada kullanılır; ϵ_{ij} değerleri, ϵ_{ii} ve ϵ_{jj} değerlerinin geometrik anlamı iken, R_{ij}^{min} değerleri R_{ii}^{min} ve R_{jj}^{min} değerlerinin aritmetik anlamıdır. Atomik kısmi yüklerin değerleri, q_i , dielektrik kabuk etkileri (örneğin yüksek dielektrik sabiti olan çözücülerden gelen shielding etkilerini taklit etmek için) üretmek için sıklıkla değiştirilen yüklerle bir kalıp-kaynaklı şemadan belirlenir. ϵ_l genellikle explicit çözücü gösterimlerini içeren simülasyonları için hücreye kurulur.

Eşitlik 2.1.'i kullanan biri, bağıl uzaklıklar ve açılar kolayca belirlendiğinden atomik koordinatların tek bir setinden oluşan sistemin potansiyel enerjisi, $V(r)$ 'yi bulabilir. Enerji, sistemin enstantane olarak ifade edilen tek bir gösterimidir.

$V(r)$ sistemdeki her bağ açısı ve dihedral açısının katkısını içerir; bununla beraber Urey-Bradley ifadeleri ve uygunsuz dihedral açılarının çoğunun kullanılmadığı not edilmelidir. Sadece hesapsal sonuçları gözlenebilir titreşim spektrumuna ayarlamak için gerekli olanlar kullanılmaktadır. Buna ek olarak orijinal Urey-Bradley fonksiyonundaki lineer terim hiç dahil edilmemiştir. Bu makul bir yaklaşımdır çünkü şu görülmüştür ki, Kartezyen koordinatları kullanıldığında titreşim frekanslarının bulunması için sadece ikinci dereceden terime ihtiyaç vardır. Bağ yapmayan terimleri bir ya da iki kovalent bağ ile bağlı olmayan bütün atomlara uygulanır. Belirli, spesifik durumlarda Lennard-Jones terimi deneysel olarak gözlenen yapıları doğru olarak taklit etmek için üç kovalent bağ ile bağlı atomlar için uyarlanır. Böyle bir duruma örnek amidlerin azot ve oksijen atomlarıdır.

MD'nin amaçları için, atomun pozisyonuna göre etkin bir şekilde erişilebilir birinci ve ikinci türevlere (sırasıyla atomik kuvvetin fiziksel kuvveti ve kuvvet gradiyentine karşılık gelir) sahip olması kuvvet alanının avantajlıdır ve bu genellikle basit matematiksel formların seçilmesinin en kayda değer sebeplerinden biridir.

CHARMM kuvvet alanları proteinler, nükleik asitler, lipidler ve karbonhidratlar için bu setler arasında tutarlılık amacıyla birçok heterojen sistemin simülasyonuna izin verecek şekilde ayrı ayrı parametrize edilmiştir. Küçük organik moleküller ve zeolitler gibi biyolojik olmayan makro moleküller için değişik kuvvet alanları bulunmaktadır.

2.3.4. Enerji Minimizasyonu

r 'nin, $r=(r_1, r_2, r_3, \dots, r_N)$ olduğu verilen N tane bağımsız r değişken seti için amaç bu değişkenlerin her biri için belirli fonksiyon $V(r)$ 'nin global minimumuna sahip olduğu r_{min} olarak ifade edilen değerleri bulmaktır (Walker 2003, Adcock ve McCammon 2006). Moleküler mekanik protein modelinde N atomik koordinat başına serbestlik derecesinden üç defa atomun numarasını, r atomik koordinatları (örneğin kartezyen koordinatları) ve V eşitlik 2.1.'deki gibi eşitliklerde potansiyel enerjiyi ifade etmektedir. Böyle lineer olmayan optimizasyon problemlerini çözmek için birçok algoritma bulunmaktadır ve bunların küçük bir bölümü proteinlerin moleküler mekanik modellemelerinde geniş olarak uygulanmaktadır (Adcock ve McCammon 2006).

Bir düzineden fazla bağımsız değişkenli lineer olmayan genel bir fonksiyonun global minimumunu bulmak oldukça zordur. En az yüz atomlu tipik biyomoleküler sistemler yaklaşık 300 değişkenle açıklanacaktır, böylece, global minimumu kanıtlanabilir bir şekilde belirlemek imkânsız olacaktır. Aynı zamanda enerji minimizasyon metotları moleküler yapıları iyileştirmede etkin olarak kullanılırken, konformasyonel uzayı örneklendirmede tamamen yetersizdirler. Bağ açıları ve uzunlukları kendi minimumundan sapmış veya atomları arasında sterik çakışmalar olan iyileştirmesi yapılmamış bir moleküler yapının arızalarını düzeltmede enerji minimizasyon metotları oldukça yararlı olabilir ve bu nedenle protein sistemlerine rutin olarak uygulanmaktadır (Adcock ve McCammon 2006).

Enerji minimizasyonu yöntemleri enerji yüzeylerinde bir minimum belirlemek için kullanılan türev yaklaşımına göre farklı sınıflara ayrılabilir (Adcock ve McCammon 2006). Türevde kullanılma yöntemlerine bağlı olarak genellikle kullanılan iki tip numerik minimizasyon metodu mevcuttur. Türeve dayanmayan başlıca metotlar Sequential Univariate Metodu ve Simplex Metodu fonksiyonun türevine ihtiyaç duymayan yöntemlerdir. Bu metotlar hesapsal olarak zor ve yakınsama için yavaşlardır ancak analitik ilk türevler olmadığında kullanışlıdır. Assited Model Building with Energy Refinement (AMBER) (Case ve ark. 2006, Case ve ark. 2010) kuvvet alanı için analitik gradientler mevcut olduğundan türev temelli metotlar tercih edilmelidir (Walker 2003). Farklı seviyelerde türev kullanan popüler minimizasyon metotları arasında; birinci türeve dayanan steepest descent ve conjugate gradient metotları ve ikinci türeve dayanan Newton-Raphson metodu yer almaktadır.

2.3.4.1. Türeve Dayalı Minimizasyon Yöntemleri

Enerji minimizasyonunda türevin kullanılması lokal minimumun bulunmasında verimliliği artırabilir. İlk türev veya gradient minimumun ilerlediği yönü belirtir ve onun gradienti eğimin dikliğini belirtir. Gradientin negatifi kuvvettir ve bu nedenle her atomu üzerine etkiyen kuvvete cevap olarak hareket ettirilerek sistemin enerjisi düşürülebilir. Etkili birinci derece minimizasyon metotları enerji fonksiyonu eğrisini hesaba katmaz ve böylece bazen bir enerji minimumundan ziyade geçiş haline optimize edebilir. İkinci derece metotları minimumu belirlemek için birinci ve ikinci türevlerin ikisini de kullanabilir (Walker 2003).

Steepest descent metodunda bir minimum noktasının bulunması için enerji fonksiyonunun birinci türevleri sayısal olarak hesaplanır. Enerji başlangıç koordinatları için hesaplanır ve atomlardan birinin koordinat sisteminin yönlerinden birinde hareket etmesinden sonra tekrar hesaplanır. Bu işlem nihayetinde enerji yüzeyinde aşağı doğru bir pozisyona hareket eden bütün atomlar için tekrarlanır. Prosedür önceden belirlenmiş bir eşik durumuna varınca durur. Optimizasyon işlemi minimum yakınında yavaştır, ve dolayısıyla, steepest descent minimumdan uzak olan yapılar için ilk, kaba ve giriş niteliğinde kullanılan bir metottur. Son olarak conjugate gradient gibi daha gelişmiş algoritmaları bir minimizasyon işlemi uygulanır.

Conjugate gradient algoritması bir döngüden bir sonrakine kadar olan fonksiyon hakkında bilgiler toplar. Bu işlemle daha önceki döngülerde yapılmış olan ilerlemenin geri gitmesi engellenebilir. Her minimizasyon basamağı için gradiyent hesaplanır ve minimizasyon prosedürünün yeni bir yön vektörünün hesaplamasında ek bilgi olarak kullanılır. Böylece birbirini izleyen her adım yönü minimuma doğru iyileştirir. Hesapsal çaba ve depolama gereksinimleri steepest descentten daha fazladır ancak conjugate gradient büyük sistemler için tercih edilen bir yöntemdir. Büyük hesaplamalı giderleri ve döngü başına uzun zaman, minimuma daha etkili yaklaşma ile conjugate gradient tarafından fazlasıyla karşılanmaktadır (Sanchez 2003).

Newton-Raphson metodu, tipik biyomoleküler MM sistemlerine uygulanmadan önce bazı basit modifikasyonlar gerektirmesine rağmen popüler bir ikinci türev metodudur. Temel metot potansiyel enerjinin en azından minimum bölgede ikinci dereceden ayrı değişkenlere ikinci dereceden bağlı olduğu varsayımına dayanmaktadır (Adcock ve McCammon 2006).

2.3.5. Monte Carlo Metodu

AMBER'de kullanılan programların benzerleri sadece geometrileri ve enerjileri hesaplamak için kullanılmamaktadırlar, aynı zamanda moleküler devinimin simülasyonu, örneğin moleküler dinamik için, ve çeşitli konformasyonların kısmi popülasyonları veya Monte Carlo'daki diğer geometrik düzenlemeler (örneğin bir makromolekülün etrafına çözücü molekülleri dağılımı) için de kullanılmaktadır. Her ne kadar sistemin nispeten küçük parçaları kuantum mekanik metotları ile simüle edilirse de, bir MM kuvvet alanında hareket eden moleküllere, moleküler dinamikte Newton'un devinim yasası uygulanmaktadır. Monte Carlo metotlarında rastgele numaralar daha sonra bazı filtrelere göre kabul edilen veya reddedilen yeni konformasyon ve geometrik düzenlemeleri (haller) oluşturmak için nasıl hareket ettiklerine karar verir. Durumların on binlercesi veya daha fazlası oluşturulur, sonra bir Boltzmann dağılımı oluşturularak her birinin enerjisi MM ile hesaplanmaktadır (Lewars 2004).

Monte Carlo simülasyonları genellikle bir molekülün veya moleküller sistemin ortalama termodinamik özelliklerini hesaplamak için kullanılmaktadır ve sıvıların ve çözeltilerin yapı ve denge özelliklerinin çalışılmasında geniş şekilde hizmet

vermektedir. Monte Carlo hesaplamaları aynı zamanda dengede olmayan şartlar altında konformasyonel araştırmalarının yürütülmesinde de kullanılmaktadır.

Monte Carlo hesaplamaları bir dereceye kadar moleküler dinamik hesaplamalarına benzerdir. Hepsi, içinde bulunulan konformasyondan yeni bir konformasyon oluşturan hesaplamalı algoritmanın tekrarlanan uygulamasıyla çalışır. Moleküler sistemlerin konfigürasyon serileri bir eğri oluşturmaktadır ve ilk denge fazından sonra, sistem özellikleri örneklenebilmekte ve grubun ortalamasını elde etmek için işlemin süresinin ortalaması alınabilmektedir. Dinamik simülasyonlar, yeni konfigürasyonları oluşturmamak için sistemin dinamik eğrisini oluşturan, devinimin bir denklemini temel olarak kullanır. Monte Carlo simülasyonları faz boşluğunda bir eğri gösteren konfigürasyonları oluşturmamak için bir istatistiki örnekleme tekniğı kullanılmaktadır. Böylece, ortalamanın zamanla hesaplanmasıyla grup ortalamalarını hesaplayan moleküler dinamiğın tersine, Monte Carlo hesaplamaları grup ortalamalarını direkt olarak istatistiksel gruplardan örnekleme konfigürasyonlarıyla değerlendirmektedir.

Eğer yeterince uzun çalışılırsa, Monte Carlo ve moleküler dinamik aynı sistem için aynı ortalama sonuçları verecektir (sistemin ergodik olması koşuluyla). Bununla beraber, sadece moleküler dinamik rasyonel frekans veya geçiş oranları gibi, bir sistemin zamana bağlı özelliklerini hesaplayabilmektedir. Diğer taraftan, Monte Carlo izin verilen halin örneklemesinde genellikle daha iyidir ve böylece ortalama özellikleri sıklıkla daha hızlı ve doğru bir şekilde hesaplayabilmektedir (HyperChem 2002).

Monte Carlo metotları uygulamalı matematikte büyük sayı dizilerinin karışık örnekleme üzerine dayandırılmış teknikleri olarak iyi bilinmektedir. Özellikle, Monte Carlo yaklaşımı çok boyutlu integraller için iyi kurgulanmıştır, sayısal integrasyona yatkın değildir ve sınırlar komplike olduğunda, integrand çok küçük bölgelerde kuvvetli pikli değildir ve nispeten düşük doğruluk kabul edilebilmektedir. Monte Carlo integrasyonunun temel prensibi noktaların rastgele örneklerinde fonksiyonun değerlendirilmesi ve rastgele örnekleme üzerine kurulmuş integralin tahmininden oluşmaktadır.

Moleküler sistemlerin Monte Carlo simülasyonlarında, konfigürasyon dizileri verilen bir olasılık dağılımı ile oluşturulmuştur ve çözeltilerin serbest enerjisi gibi

termodinamik özellikler bu konfigürasyonlar üzerinden ortalama olarak hesaplanmaktadır. Monte Carlo simülasyonları kullanılarak çokça araştırılan sistemlerden biri şüphesiz akışkan sudur. Bu suyun kendisinin ve sulu çözeltilerin hem kimya ve hem canlı bilimindeki önemindedir. Suyun özelliklerinin ilk Monte Carlo simülasyonu 1969 yılında Barker ve Watts (1969) tarafından yapılmıştır (Doucet ve Weber 1996).

2.3.6. Moleküler Dinamik Metotları

Dinamik simülasyon metotları protein ve biyolojik diğer makromoleküllerin zaman içindeki konformasyonlarının bilgilerini ve aynı zamanda kinetik ve termodinamik bilgileri elde etmek için geniş şekilde kullanılmaktadır. Simülasyonlar zamanın bir fonksiyonu olarak ayrı parçaların hareketleri hakkında güzel detaylar sağlayabilir. Bir sistemin özelliklerini hassasiyetle ve aksi takdirde belirlenemeyeceğinden bir zaman ölçeği üzerinde ölçmede bunlardan yararlanılabilir. Bu nedenle simülasyon model sistemleri anlayışımızı geliştiren değerli bir araçtır (Adcock ve McCammon 2006).

Bilgisayarların gelişmesi ile birlikte birçok alanda olduğu gibi sağlık alanında da oldukça geniş şekilde bilgisayarlardan yararlanılmıştır. Moleküler Dinamik (MD) yöntemleri ilk olarak 1950'li yıllarda teorik fizik topluluğunda tasarlanmıştır. Alder ve Wainwright, içinde atomların sadece mükemmel çarpışmalarla etkileştiği sabit-küre modeli olarak adlandırılan yöntemi kullanarak 1957 yılında ilk MD simülasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Alder ve Wainwright 1957). Daha sonra Rahman, gerçek atom etkileşimlerini taklit etmek için düzgün, sürekli bir potansiyel uygulamıştır (Rahman 1964). Bilgisayarların daha yaygın hale gelmesiyle MD simülasyonları 1970'li yıllar süresince daha kompleks sistemler için geliştirilmiştir. Bu gelişme fizik temelli ilk ilkeler varsayımı ile oluşturulan bir ampirik enerji fonksiyonu kullanılarak 1976'da ilk protein simülasyonunu ile sonuçlanmıştır (MacCammon 1976, McCammon ve ark. 1977). MD simülasyonları günümüzde özellikle materyal kimyası ve biyofizik alanlarında popüler olarak geniş ve sıklıkla uygulanmaktadır (Adcock ve McCammon 2006)

Farklı deneysel şartlar modern teori ve algoritmalarla simüle edilebilmektedirler. İlk simülasyonlar gaz fazında tek moleküllerdi. Zamanla daha realistik veya biyolojik

olarak uygun simülasyonlar sergilenebildi. Trend günümüzde devam etmektedir. İlk protein MD simülasyonu olan küçük bir sığır pankreatik tripsin inhibitörü (BPTI) simülasyonu sadece 9.2 ps sürmüştür. Dengeleme periyotları olarak adlandırılan modern simülasyonlar bundan çok uzun sürmektedir ve ilk mikro saniye simülasyonunun 1998'de rapor edilmesiyle onlarca nano saniyelik ürün simülasyonları artık sıradandır. Buna ek olarak BPTI simülasyonu yaklaşık 500 atom kullanılmıştı. Günümüzde 10^4 - 10^6 sayıda atom kullanımı yaygındır. Bu gelişmelerin çoğu bilgisayar gücünün muazzam artışından kaynaklanıyorsa da büyük teorik ve metodolojik gelişmeler de önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (Adcock ve McCammon 2006).

Moleküler dinamik günümüzde yapısal biyokimya, biyofizik, enzimoloji, moleküler biyoloji, farmasötik kimya ve biyoteknoloji alanlarını içeren birçok alanda araştırmacılar tarafından dinamik özellikler ve proseslerin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. MD simülasyonları kullanan biri termodinamik özellikleri ve zamandan bağımsız (örneğin kinetik) fenomeni çalışabilir. Bu, biyomoleküler yapı, tanınma ve fonksiyonun çeşitli dinamik görüşleri geliştirme anlayışını mümkün kılar. Bununla beraber tek başına kullanıldığında MD sınırlı bir fayda sağlar. Bir MD yolağı (trajectory) (simüle edilen yapının zamana göre ilerlemesi gibi) genel olarak atomik pozisyonlar, hız ve tek nokta enerjisi düzeyinde bilgiler sağlar. Makroskopik özellikleri elde etme ile ilgilenen biri mikroskobik simülasyonları gözlenebilen makroskopi ile birleştiren *istatistiksel mekanik* uygulamasına ihtiyaç duyar (Adcock ve McCammon 2006).

İstatistiksel mekanik, atom ve moleküllerin yayılma ve hareketlerini basınç, ısı kapasitesi ve serbest enerji gibi makroskopik özelliklerle ilişkilendiren matematiksel ifadelerle ilgili sıkı bir çerçeve sağlar. Böylece, makroskopik gözlenebilirlerin mikroskobik bilgilerden çıkarılması mümkündür. Örneğin belirli bir ilaç adayının bağlanma serbest enerjisindeki değişim ya da belirli bir proteindeki konformasyonel değişimim enerjisi veya mekanizması öngörülebilir (Adcock ve McCammon 2006).

Biyomoleküler yapı, kinetik ve termodinamiğin MD ile araştırılabilen özel alanları moleküler kararlılık, konformasyonel ve alosterik özellikler, enzim aktivitesinde dinamiğin rolü, moleküler tanıma ve komplekslerin özellikleri, iyon ve küçük molekül taşınması, protein birleşmesi, protein katlanması ve protein hidrasyonu gibi konuları

içermektedir. Dolayısıyla MD moleküler dizayn (ilaç dizaynı ve protein dizaynı) ve yapı belirlenmesi ve iyileştirilmesini (x-ray, NMR ve modelleme) içeren çeşitli çalışmaları yürütebilme fırsatı sunmaktadır (Adcock ve McCammon 2006).

Moleküler dinamik (MD) simülasyonları, basit ifadelerle bir MM sisteminde mevcut olan kuvvetlerin ve bunların neticesinde sistemdeki hareketlerin tekrarlanan hesaplamasını içermektedir. MM sistemi klasik mekanikte (yani Newton mekaniği) tanımlanan hareket denklemlerine göre etkileşimlerine karşılık olarak hareket eden bir dizi parçacıktan oluşmaktadır. Klasik MD belirtilen önemli yaklaşımlardan dolayı biyomoleküler sistemler fiziğinin tam değerlendirmesinde beklenenden çok daha etkilidir. Özellikle kuantum dinamik etkileri genellikle göz ardı edilir. Bunun yerine her bir parçacık (genellikle tek bir atom ancak bazen de bir atom takımının rijit seti) bir nokta kütle olarak kabul edilir. Bu yaklaşım Born-Oppenheimer yaklaşımı (yani sadece çekirdek yer değiştirmelerinin dikkate alınması gerekir) terimlerine dayandırılır.

m_i kütleli ve pozisyonu 3-boyutlu vektör r_i ile gösterilen bir i atomu için, atomun hızı ve momentumu, p_i , arasında,

$$\frac{dr_i}{dt} = \frac{p_i}{m_i} \quad (2.2.)$$

ilişkisi mevcuttur. Geri kalan sistem tarafından i atomu üzerine uygulanan net kuvvet F_i , i atomunun pozisyonuna karşı potansiyel enerji fonksiyonunun negatif gradiyenti ile verilmektedir.

$$F_i = -\frac{dV}{dr_i} \quad (2.3.)$$

i atomu için Newton'un hareket denklemi;

$$\frac{dp_i}{dt} = F_i \quad (2.4.)$$

şeklinde ifade edilir. Konum (tek boyut boyunca konum, x) tek bileşenli bir vektör, r_i , spesifik bir zamanda, t , kısa ve sınırlı bir aralıktan sonraki pozisyonu, Δt , verildiğinde standart bir Taylor serisi elde edilir.

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \frac{dx(t)}{dt} \Delta t + \frac{d^2x(t)}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (2.5.)$$

Taylor serisindeki yüksek dereceden terimlere yaklaşımlarda bulunulursa hareket denkleminin sayısal çözümü için konum $x(t)$, hız $dx(t)/dt$ ve ivme $d^2x(t)/dt^2$ yeterlidir. Bu tek boyut için, Newton'un ikinci yasası F_x 'in x yönüne paralel olarak atoma etkiyen net kuvvet bileşeni olduğu denklemlerle ivmeyi açıklar.

$$\frac{d^2x(t)}{dt^2} = \frac{F_x}{m} \quad (2.6.)$$

Bu sadece Taylor açılımının yüksek mertebeden sonsuz terimleri için belirsiz tasarlanabilir bir yaklaşım bırakır. En basit yaklaşım Taylor açılımını ikinci türev, ivmeden keserek, yüksek mertebeden terimlerin toplamını sıfır kabul etmektir. Genel durumda, Newton'un üçüncü yasasının da vurguladığı gibi bu çok zayıf bir yaklaşımdır. Sistem içinde etkiyen net kuvvet, toplam enerji (yani kinetik enerji ve potansiyel enerjinin toplamı) ve toplam momentumun korunmasına sebep olacak şekilde sıfır olmalıdır. Önerilen basit yaklaşımla, simülasyon ilerledikçe sistemin toplam enerjisinde zamanla önemli dalgalanmalar ve sapmalar meydana gelir. Bu basit yaklaşım için modern moleküler dinamik simülasyonu yazılımlarında geniş ölçüde iyileştirmeler yapılmıştır (Adcock ve McCammon 2006).

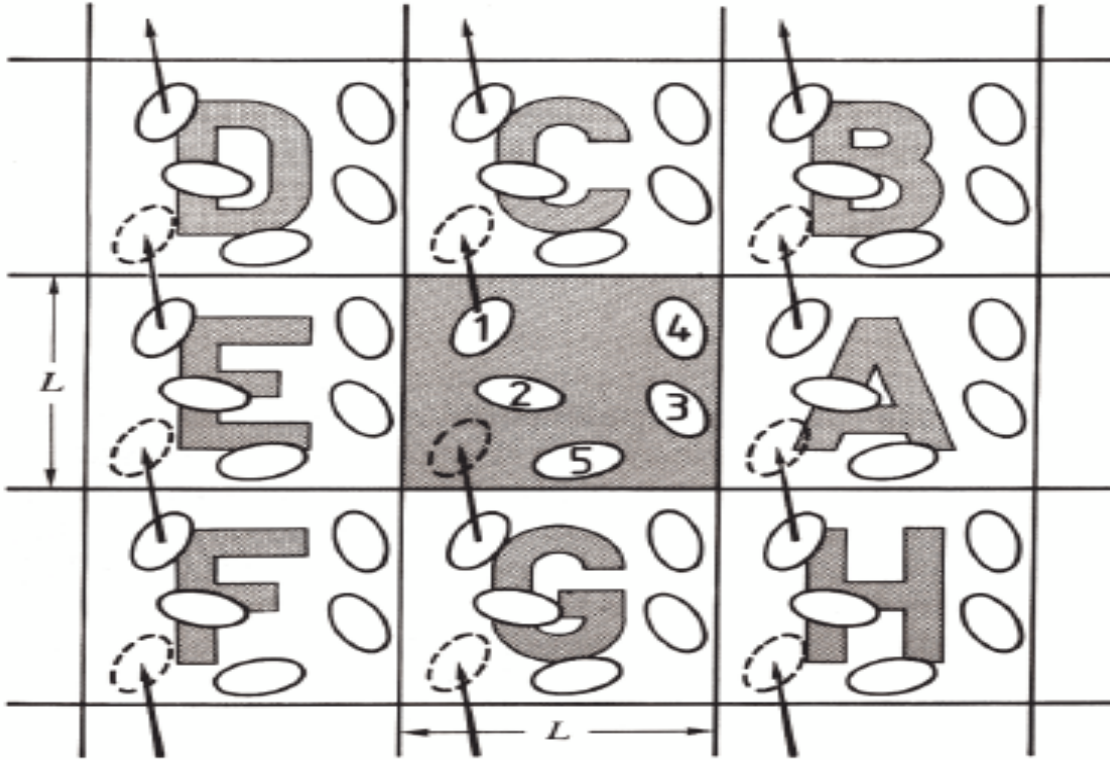
Moleküler dinamik hesaplamaları için kullanılan başlıca programlar **GRO**ningen **MA**chine for **C**hemical **S**imulations (GROMACS) (Van Der Spoel ve ark. 2005), **Not** (just) **A**nother **M**olecular **D**ynamics (NAMD) (Philips ve ark. 2005), **C**hemistry at **HAR**vard **M**olecular **M**echanics(CHARMM) (Brooks ve ark. 1983) ve **A**ssisted **M**odel **B**uilding with **E**nergy **R**efinement (AMBER) (Case ve ark. 2005)'dir. GROMACS protein ve lipid gibi biyokimyasal moleküllerin moleküler dinamik simülasyonlarını gerçekleştirmek için kullanılan çok yönlü bir paket programdır. Program, GROMOS (Scott ve ark. 1999) paketinin yeniden yazılmış sürümüdür. NAMD özellikle çok sayıda işlemci üzerinde paralel çalışarak şaşırtıcı performans göstermektedir. CHARMM enerji minimizasyonu, moleküler dinamik ve Monte Carlo simülasyonlarını içeren makromoleküler simülasyonlar için çıkarılmış bir programdır. CHARMM ile birlikte en çok kullanılan ve itibar gören program AMBER programıdır. Birbirinden pek farklı olmayan felsefelerle 1980'lerde derlenmişlerdir. AMBER özel görevleri olan birbirinden farklı programların bir paketi iken CHARMM'da sistem hazırlanmasından, simülasyona ve analizlere kadar bütün işlemler tek uygulama ile yapılmaktadır. AMBER paket programını önemli kılan bir başka gelişme ise Sander olarak bilinen MD

programının iyileştirilmiş hali olan PMEMD programıdır. PMEMD ile MD simülasyonu çok sayıda işlemci üzerinde çalışabilmektedir ve Sander programından oldukça hızlıdır.

2.3.6.1. Simüle Edilen Çevre

MD ile bir dizi deneysel şartlar simüle edilebilmektedir. Daha önceki protein simülasyonları molekülleri izole edilmiş parçacıklar olarak, fiilen boşlukta olduğunu, düşünmüştür. Sonraki simülasyonlar kristal çevrede protein moleküllerinin etrafındaki gibi explicit su içermektedir. Genel olarak merkez kübik kutusunun yinelenmesi için kübik bir kafes kullanılır. Merkez kutunun dışındaki atomlar sadece bu kutu içinde simüle edilen atomların görüntüleridir. Periyodik sınır koşulları (periodic boundary conditions) komşu atomlar görüntü olsun veya olmasın simüle edilen bütün atomların komşu atomlarla sarılı olmasını sağlar. Minimum görüntü düzeni (minimum image convention) her atom çifti için çiftli etkileşimlerden birinin hesaplanması yoluyla atomlar arasındaki eş etkileşimlerin içerilmediğini garantiler. i ve j atomları için etkileşimler dikkate alındığında etkileşim i ve j atomunun kopyası arasındadır, j atomunun orijinal veya görüntü olması önemli değildir, aslolan i atomudur (Adcock ve McCammon 2006).

Bir çözeltinin realistik modeli için çözüneni kapsayacak şekilde çok sayıda çözücü molekülü gerekmektedir. Bazı çözücü molekülleri çözünen ve çözücü arasındaki sınırdaki olacak ve çözücü yığını içinde olacak olan diğerlerinin çoğu çözücünün ve onu çevreleyen boşluğun kenarında olacağından sadece çözüneni bir çözücü kutusu içine koymak yeterli değildir. Tabiki bu bir sıvı yığınının gerçekçi bir resmi değildir. Dıştaki çözücü moleküllerinin buharlaşarak uzaya çıkmasını engellemek ve yığının özelliklerini üretecek kısmen daha az sayıda çözücü moleküllerinin içerilmesi için periyodik sınır koşulları kullanılır. Bu yöntemde simüle edilen parçacıklar daha sonra periyodik bir diziliş elde etmek için her üç boyutta kopyalandığı bir kutu içine alınmıştır (Walker 2003). Bu durumun iki boyutlu görüntüsü Şekil 2.20'de verilmiştir.



Şekil 2.20. Çözücü sisteminin iki boyutlu yapısı (Allen ve Tildesley 1987) (Kutuların iki boyutlu dizilişi bir moleküllü merkezdeki kutudan C kutusuna hareket ederken G kutusundan merkez kutuya hareket eden görüntüsü ile yer değiştirmiş olur. Bu hareket bütün kutularda tekrar eder.)

2.3.6.2. Çözücü Modeli

Protein çevresinin makul bir gösterimi simülasyonla özelliklerinin karakterizasyonunda önemlidir. Günümüz anlayış düzeyi ve hesaplamalı kaynaklar herhangi bir proteinin bütün fizyolojik çevresini tam olarak tasvir etmemiz imkânsızdır. Bazı spesifik haller daha fazlaca tasvir edilebilir ancak genel haller çok komplikedir.

Çoğu protein hiç olmazsa kısmen sulu bir çevre içinde bulunur. Bundan haklı olarak proteinin simülasyon sırasında saf veya iyon içeren suda tamamen çözüldüğünü farz etmek normaldir. Bununla beraber hesaplama zamanının kayda değer bir kısmının çözücü-çözücü etkileşimlerini tayin etmek için harcanabilmektedir. Bu nedenle mümkünse explicit sudan kaçınmak caziptir. Ancak çözücü etkileşimleri önemlidir ve tümünden ihmalen gelinemez. Netice olarak çok sayıda implicit çözücü modelleri geliştirilmiştir.

Explicit bir çözücü, dielektrik görüntüleme etkilerine ek olarak çoğu kez protein yapısını ve fonksiyonunu bağdaştırmak için önemli olan spesifik etkileşimlerine katkıda bulunur. Böylece explicit çözücü elektrostatik etkilerin doğru tahmini ve serbest

enerjilerin geçerli dekompozisyonu için simülasyonlarda önemli rol oynar. Aksine çözünmenin implicit modelleri, explicit çözünme modellerinden daha doğru çözünme serbest enerjisi tahmini yapar. İmplicit çözünme modellerinin istatistiksel mekanik karakteristikleri ve özellikleri oldukça çalışılmıştır.

İmplicit çözücü modellerinden biri özellikle paralel bilgisayar sistemleri üzerinde explicit modellerden önemli şekilde daha hızlı MD simülasyonu çalıştırmada kullanılabilen geliştirilmiş Born (GB) modelidir. Diğer implicit modeller gibi GB'nin de kesin mikroskobik çözücü özelliklerini üretmeye muktedir olmadığı bilinmektedir. Üstelik explicit modellerle karşılaştırıldığında implicit modellerin protein moleküllerinin konformasyonel dinamiklerinin değişimini kolaylaştırdığı bilinmektedir ki, bu genellikle arzu edilmez.

Çözücünün explicit olması istendiği veya gerektiği durumlar için geniş çapta explicit su modelleri mevcuttur (Adcock ve McCammon 2006). TIP3P, TIP4P (Jorgensen ve ark. 1983), TIP5P (Mahoney ve Jorgensen 2000), SPC (Berendsen ve ark. 1969) ve SPC/E (Berendsen ve ark. 1987) bu modellerin önde gelenleridir. Su modelleri basit rijit model, biraz esneklik içerenler ve son olarak polarlaşmaya ve çok kütleli etkilerine izin veren modeller olarak üç grup altında incelenebilir. Bu modellerden basit grupta yer alan TIP3P ve SPC en çok tercih edilen modellerdir. Basit su modelleri molekül başına üç-beş arası etkileşim bölgesi kullanırlar ve su molekülleri rijit tutulur ki böylece bağ veya açılı deformasyonları oluşmaz. Bu modellerde yük iki hidrojen atomu üzerine ve dengeleyici karşıt bir yük oksijen atomu üzerine yerleştirilmiştir. İki su molekülü arasındaki van der Waals etkileşimleri oksijen atomu üzerinde tek bölge merkezli olarak hesaplanır. Su moleküllerinin mevcut serbestlik derecelerini ve böylece hesaplanması gereken etkileşim sayısını azaltarak simülasyonu çok pahalı yapmaksızın önemli sayıda çözücü moleküllerinin içerilmesini mümkün kılmaktadır (Walker 2003). Bu çalışmada bahsedilen modeller içinden TIP3P su modeli kullanılmıştır.

Uzak mesafe elektrostatik etkileşimleri protein stabilitesinde baskın bir rol oynar ve aynı zamanda çoğu birleşme proseslerinin başlangıç çarpışmaları için önemli belirteçlerdir. Genel olarak bir MD simülasyonunun hesapsal olarak en pahalı bölümü uzak mesafe elektrostatik etkileşimlerinin değerlendirilmesidir. Bir sistemde yük sayısı arttıkça, potansiyel olarak etkileşimlerin büyük bir miktarının hesaplanmasını

engelleyecek şekilde Kulombik etkileşimler de bu sayının karesi kadar artar. Bu yüzden MD simülasyonlarında elektrostatik etkileşimlerin mesafesine küresel kesme olarak bilinen cutoff uygulanmaktadır. Bu cutoff mesafesinin, örneğin 12 Å'luk mesafe, gerisindeki etkileşimler ihmal edilir böylece maksimum etkileşim sayısı sınırlandırılmış olmaktadır (Adcock ve McCammon 2006).

2.3.6.3. Kuvvet Alanları

Potansiyel enerji fonksiyonunun doğruluğu proteinlerin daha doğrusu bütün makromolekülleri MD simülasyonlarının geçerliliği ve kararlılığı için kritik önemdedir. Enerji fonksiyonu, hesaplamaların kolay işlenir hale gelmesi için basit olmalıdır. Aynı zamanda türevlerin etkili minimizasyon ve etkili hareket integratörlerini kolaylaştırmak için hızlıca ulaşılabilir olması önemlidir.

Proteinlerin MD simülasyonlarında istifade edilen çoğu kuvvet alanı önemli benzerlikler taşımaktadırlar. Harmonik ifadeler bağ uzunluğu ve açıları, Fourier serileri dihedralleri, bir Lennard-Jones fonksiyonu ve bir Kulombik fonksiyonu atom çiftinin etkileşimlerini açıklar. Her zaman olmamakla birlikte genellikle parametreler protein sistemleri için elde belirlenir ve nükleik asitler, lipidler ve diğer biyolojik moleküller protein seti ile uyumlu olacak bir yolla müteakip parametreler türetilir. Çeşitli kuvvet alanları arasındaki temel farklılıklar ayrı ayrı parametrelerin türetilmesi için tutulan farklı yaklaşımlardan kaynaklanmaktadır. Parametrelerin önemli ilişkileri ve dengeleyici bileşenleri içermesi olağandışı değildir öyle ki nihai sonuçlar tam bir simülasyon sistemi ile arzu edilen deneysel gözlenebilirleri üretir. Simülasyonda farklı yazılım paketleri tarafından teknik detayları ele alma yolundaki kısmen zararsız görünen, uzak-mesafe etkileşimlerinin elektrostatik etkilerinin iyileştirilmesi veya az sayıdaki ara ürün atomlarına bağlanmış atomlar arasındaki etkileşimlerin iyileştirilmesi gibi farklılıklar aslında alternatif bir enerji fonksiyonu ile değişik enerjilere yöneltebilir. Bunun bir dezavantajı şudur ki bir atom tipi için verilen parametreler kuvvet alanları arasında mukayese edilemez. Bir kuvvet alanından diğerine direkt parametre transferi genellikle uygun değildir.

İstikrarlı-valans kuvvet alanı (CVFF: consistent-valance kuvvet alanı) (Ewig ve ark. 1999) daha karmaşık fonksiyonel formu olması itibarıyla bu kuvvet alanlarının çoğundan farklılık gösterir. Diğerlerinin çoğu, uygunsuz bükülmelerine (düzlem dışı

dihedral açıları gibi) nasıl muamele edildiği, bağ yapmayan etkileşimler için hangi ölçüm faktörlerinin kullanıldığı veya hidrojen bağlarının explicit olarak içerilip içerilmediği gibi küçük noktalarda birbirinden farklılaşır. Bahsedilen bütün kuvvet alanlarının van der Waals parametreleri sıvı veya katı fazdaki küçük molekül modeli sistemlerinden deneysel düzeltmelerle geliştirilmektedir. Sonuç olarak çözülmüş protein sistemlerin yoğunluğu gerçeğe yakın olmaya dikkat etmektedir. Bükülme parametreleri KM ve deneysel verilerin karışımı ile uyumlu olmasında dikkat edilir. Kalıntılardaki atomların kısmi yüklerinin parametrize edilmesi daha zordur. Son elektrostatik etkileşimlerin belirli su modelleriyle dengelenmesi gerekir (Adcock ve McCammon 2006).

En çok kullanılan kuvvet alanları arasında CHARMM22 (MacKerell ve ark. 1998), AMBER95 (Cornell ve ark. 1995) ve OPLS-AA (Jorgensen ve ark. 1996) bulunmaktadır. CHARMM22 kuvvet alanında yükler, model bileşikler ile su molekülleri arasındaki etkileşimlerin *ab initio* kuantum kimyasal hesaplamalarından türetilmiştir. OPLS-AA kuvvet alanının bağ uzunluğu ve bağ açısı parametrelerinin çoğu doğrudan AMBER95 kuvvet alanından çıkarılmıştır. Bunun yanında bükülme ve bağ yapmayan parametrelerin çoğu *ab initio* moleküler orbital hesaplamaları ve Monte Carlo simülasyonlarının bir kombinasyonu ile türetilmiştir. AMBER kuvvet alanları ilk olarak Weiner ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Weiner ve ark. 1984). Daha sonraki yıllarda da geliştirilmesine devam edilmiştir ve 1995 yılında yapılan düzenlemesi (Cornell ve ark. 1995) son yıllarda en çok atıfta bulunulan yayınlardan biridir (Case ve ark. 2005). AMBER kuvvet alanının kısmi yükleri kısıtlandırılmış elektrostatik potansiyel (RESP) metodu (Bayly ve ark. 1993, Cornell ve ark. 1995) ile elde edilmiştir. Bu metot bir atoma merkezlenmiş nokta yük modelini kullanarak moleküler yüzeylerde kuantum mekaniksel olarak hesaplanmış elektrostatik potansiyelleri uygun hale getirir (Adcock ve McCammon 2006). AMBER tarafından desteklenen diğer bir kuvvet alanı organik moleküller için kullanılan genel AMBER kuvvet alanı, GAFF'tır. Antechamber programı girdi olarak üç boyutlu bir yapıyı alarak otomatik olarak yük, atom tipi ve kuvvet parametrelerini belirler. Bunun yanında AMBER programının karbonhidratlar için geliştirilmiş olan GLYCAM kuvvet alanı bulunmaktadır (Woods ve ark. 1996).

2.3.7. Bağlanma Serbest Enerjisi

Proteinler ve diğer moleküller arasındaki etkileşimler çoğu biyolojik sistem ve işlemler için kritik önemdedir. Sinyal iletimi, metabolik regülasyon, enzim pekişimi, fizyolojik tepki ve diğer bütün işlemler kovalent olmayan bağlanmaya dayanmaktadır. Bu işlemler, modelleme ve simülasyon ile araştırılabilir.

Bir MD simülasyonunun amacı genellikle model sistem hakkındaki kinetik ve termodinamik verileri türetmektir. Bunun yanında, termodinamik özelliklerin çoğu, bir sistemin uygun örnek konfigürasyonlarından rahatlıkla çıkarılabilir. Önemli termodinamik niceliklerden biri olan serbest enerji, bir sistemin kararlılığının bir ölçüsüdür. Özelde, bağlanma serbest enerjisi bir kompleksin kararlılığının ölçüsüdür ve muhtemelen bu ölçü tüm biyomoleküler bağlanma işlemleri çalışmalarının temelidir.

Simülasyonların serbest enerji tahmini için termodinamik pertürbasyon çevrimi metodunu da içeren hassas teknikler mevcuttur. Ancak, böyle hesaplamalar genellikle küçük veya yüksekçe kısıtlanmış sistemler için pratiktir. Hesaplamalar sıklıkla çok pahalı veya güvenilir istatistikler için gerekli örnekleme seviyesi uygulanabilir sınırlar dışında olabilir. Serbest enerji hesaplamalarını hızlandıracak metotlar önemlidir.

Bağlı veya mutlak bağlanma serbest enerjisi tahmini için mevcut yaklaşımlar doğruluk ve hesaplama gereksinimlerinin geniş bir yelpazesini kapsamaktadır. Serbest enerji pertürbasyonu (FEP) ve termodinamik integrasyon (TI) metotları hesaplamalı olarak pahalıdır ancak komplekslerin bağlanma kuvvetlerinin tahmininde başarılı şekilde uygulanmışlardır (Straatsma ve McCammon 1992, Sen ve Nilsson 1999). Böyle serbest enerji tahminlerini daha hızlı yapacak daha çok veya daha az titiz metotlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında lineer etkileşim (LIE) metodu (Almlöf ve ark. 2004), moleküler mekanik/Poisson Boltzmann yüzey alanı (MM/PBSA) metodu (Gilson ve ark. 1997), kimyasal Monte Carlo/moleküler dinamik (CMC/MD) metodu (Eriksson ve ark. 1999), serbest-enerji bileşenlerini resimli gösterim (PRO-FEC) metodu (Randmer ve ark. 1998), tek-pencere serbest enerji kafesi (OWFEG) metodu (Perlman 1999), λ -dinamik metodu (Banba ve ark. 2000) ve 4D-PMF metodu (Rodiger ve ark. 2005) gibi metotlar bulunmaktadır.

Son nokta serbest enerji metodu olarak isimlendirilen MM/PBSA modeli serbest enerji değişimini tahmin etmek için sadece sistemin başlangıç ve son

durumlarını değerlendirir. Bu, başlangıçtan son duruma hale kadar bütün dönüşüm yolunun denge örnekleme gerektiren daha hassas olan FEP ve TI metodlarına benzer (Adcock ve McCammon 2006). MM/PBSA metodunda, önce bir kompleks sisteminin serbest enerjisini tahmin etmek için genel olarak periyodik bir kutu içinde su ve ters yüklü iyonları ve PME gibi uzun-mesafe elektrostatik etkileşimlerin doğru gösterimini içeren moleküler dinamik simülasyonunu gerçekleştirmek gerekir. Bu MD simülasyonu içinde kompleksin kaydedilmiş gösterimsel yapıları bulunmaktadır. Daha sonra bu gösterimler birer resim olarak çıkarılarak aşağıdaki formüle göre serbest enerji hesaplanır (Kollman ve ark. 2000). Bağlanma serbest enerjisi MM/PBSA'deki Poisson Boltzmann yüzey alanı yerine genelleştirilmiş Born yüzey alanı kullanılarak da gerçekleştirilebilir. Bu durumda yöntem MM/GBSA adını almaktadır.

$$\Delta G_{\text{Bağlanma}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{çöz.}} - T\Delta S \quad (2.7)$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{iç}} + \Delta E_{\text{elek.}} + \Delta E_{\text{vdw}} \quad (2.8)$$

$$\Delta G_{\text{çöz.}} = \Delta G_{\text{PB/GB}} + \Delta G_{\text{SA}} \quad (2.9)$$

ΔE_{MM} , $\Delta G_{\text{çöz.}}$ ve $-T\Delta S$ değerleri sırasıyla gaz fazındaki MM enerjisi, çözünme serbest enerjisi ve bağlanma üzerine konformasyonel entropinin değişimini göstermektedir. ΔE_{MM} , $\Delta E_{\text{iç}}$ (bağ, açı ve dihedral enerjilerini), $\Delta E_{\text{elektrostatik}}$ ve ΔE_{vdw} (van der Waals enerjilerini kapsar. $\Delta G_{\text{çöz.}}$ elektrostatik çözünme enerjisi bileşeni (polar katkı), $\Delta G_{\text{PB/GB}}$ ve elektrostatik olmayan çözünme bileşeni (polar olmayan katkı), ΔG_{SA} 'nın toplamıdır. Polar katkı GB (Generalized-Born) veya PB'nin (Poisson-Boltzmann) kullanılmasıyla hesaplanırken, polar olmayan enerji çözücü ulaşabilir yüzey alanından (SASA) öngörülmektedir (Hou ve ark. 2011).

Çeşitli çalışmalarda, komplekslerin serbest enerjilerini hesaplamak için MM/PBSA metodu kullanılmıştır. Xue ve arkadaşları PFV IN enziminden faydalanarak oluşturdukları HIV-1 IN-DNA modelinin Raltegravir ile olan kompleksinin MM/PBSA metodu ile serbest enerji hesaplamalarını yapmışlardır (Xue ve ark. 2011). Benzer bir çalışma Johnson ve arkadaşları (2012) tarafından yine PFV IN'dan çıkılarak oluşturulan HIV-1-DNA modeli ile birden çok ligand için gerçekleştirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise HIV-1 IN ile insan LEDGF/p75 proteini arasındaki etkileşimlerin serbest enerji hesaplamaları yapılmıştır (Zhao ve ark. 2008). Bunların dışında MM/PBSA metodu ile yapılan enerji hesaplamaları çalışmalarına; HIV-1 proteaz enzimi (Wittayanarakul ve

ark. 2007), Ras-Raf kompleksi (Gohlke ve Case 2003), DNA konformasyonel dönüşümleri (Brice ve Dominy 2011), viscotoxin A3 proteini (Fogolari ve ark. 2003), Plasmodium falciparum DHFR proteini (Rastelli ve ark. 2010), insan XIAP-Smac/DIABLO kompleksi (Obiol-Pardo ve Rubio-Martinez 2007), ve α -trombin, avidin, sitokrome C peroksidaz, nöramidaz, P450cam ve penisilopepsin proteinleri (Hou ve ark. 2011) örnek verilebilir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında yapıların üç boyutlu gösteriminde Chimera, DSVisualizer ve Pymol (Pymol 2011) programları kullanıldı. Yapıların üst üste çakıştırılma işlemlerinde Chimera, Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey ve ark. 1996) ve Pymol programları, moleküler dinamik koordinatlarının gösteriminde ise sadece Chimera programı kullanıldı. Komplekslerdeki etkileşim analizleri DSVisualizer ve Chimera programları ile gerçekleştirildi. Ligandların 2 boyutlu yapıları Symyx programı ile çizilip DSVisualizer programı ile üç boyutlu olarak kaydedildiler. Ligandların minimizasyonunda Gasussian03 (Frisch ve ark. 2004) ile AMBER paket programı içinde yer alan Sander programları kullanıldı. Protein modelinin hazırlanması, moleküler dinamik çalışmaları ve analizleri için AMBER9 (Case ve ark. 2006) ve AMBER11 (Case ve ark. 2010) paket programları kullanıldı. Ligandlar için General Amber Force Field (GAFF) atom tipinin belirlenmesi, bunlar için yük ve parameter hesaplanmasında AMBER içindeki Antechamber programından faydalandı. Atom yükleri AM1-BCC (Wang ve ark. 2006) metoduyla hesaplandı. Moleküler dinamik hesaplamalar için gerekli olan parametre ve topoloji dosyaların hazırlanmasında, sisteme çözücü ve iyon eklenmesinde AMBER paketi içindeki Xleap programı kullanıldı. Zamana bağlı enerji değişimleri Perl ile yazılmış ve AMBER programı içinde yer alan process_mdout.perl scripti ile yapıldı. Zamana bağlı RMSD ve bağ uzunlukları değişimi AMBER'in içinde bulunan PTRAJ programı kullanılarak yapıldı. Zamana bağlı enerji ve RMSD değişimleri Xmgrace grafik programı (Grace 2012) ile gerçekleştirildi. Ligandların proteine yerleştirilmesi DOCK6.5 (Dock) (Lang ve ark. 2009), Autodock4 (Autodock) (Morris ve ark. 2009) ve Autodock VINA (Vina) (Trott ve Olson 2010) programları ile gerçekleştirildi. Bunun yanında, Autodock ve Vina programları için reseptör ve ligand dosyalarının hazırlanmasında MGL Tools (Morris ve ark. 2009) programı kullanıldı. Komplekslerin MD simülasyonları neticesinde elde edilen en düşük enerji yapılarındaki ligand-protein etkileşimleri Chimera ve DSVisualizer programı ile yapıldı. Protein yapılarının kümeleme analizleri (cluster analysis) için MMTSB (Feig ve ark. 2004) programı kullanıldı. Protein ve ligandlar arasındaki bağlanma enerjileri AMBER paketi içinde yer alan MM/PBSA (Srinivasan ve ark. 1998) modülü ile

hesaplandı. Moleküler Dinamik çalışmalarının bir bölümü Intel tabanlı i7 işlemciye sahip, Linux işletim sistemli bilgisayarlarda yapılırken diğer bir bölümü ise TÜBİTAK/GRIDTR altındaki AMD tabanlı Opteron 6174 işlemcili Linux işletim sistemli bilgisayarlarda yürütüldü.

3.2. Metot

3.2.1. HIV-1 İntegrazın Üç Boyutlu Yapısının Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılacak modellerin hazırlanması için önce www.rcsb.org sitesinden integras ile ilgili bütün pdb dosyaları indirildi. İndirilen pdb dosyaları, başlıca NMR ve x-ray yapıları olarak sınıflandırıldı. Bunlar da N-terminal, katalitik bölge, C-terminal, N-terminal + katalitik bölge, katalitik bölge + C-terminal ve modelleme ile oluşturulan tam uzunluktaki yapı olarak gruplara ayrıldı. Başlık 2.1.9.1. altında verilen pdb dosyalarının tamamı incelenmiştir.

Model yapının türetilmesinde kalıntı eksikliği en az olan dosyalar seçildi. Yapılan inceleme sonucunda N-terminal bölgesi için 1WJD.pdb ve 1K6Y.pdb, katalitik öz bölgesi için 1K6Y.pdb, 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb yapıları ve C-terminal bölgesi için de yine 1EX4.pdb yapısı kullanılarak model oluşturuldu. Son 18 kalıntı pdb dosyalarında yer almamakta, ancak aminoasit diziliş sırası bilinmektedir (Parrill 2003). Bu kalıntı sırası aşağıda gösterilmiştir (Chen ve ark. 2000, Karki ve ark. 2004).

N-Terminal Bölgesi

```

As11 Yapı---F L D G I D K K A Q E E H E K Y H S N W R A M A S D F N L P P V V A K K E I V A S C D K C Q L K G E A
1WJ4.pdb---F L N G I N K K A Q E E H E K Y H S N W R A M A S N F N L P P V V A K K E I V A S C N K C Q L K G E A
1K6Y.pdb---F L D G I D K K A Q E E H E K Y H S N W R A M A S D F N L P P V V A K K E I V A S C D K C Q L K G E A

```

Katalitik Öz Bölgesi

```

As11 Yapı---M H G Q V D C S P G I W Q L D C T H L E G K V I L V A V H V A S G Y I E A E V I P A E T G Q E T A Y F L L K L A G R W P V K T V
1WJ4.pdb---M H G Q V N
1K6Y.pdb---M H G Q V D C S P G I W Q L D C T H L E G K V I L V A V H V A S G Y I E A E V I P A E T G Q E T A Y F L L K L A G R W P V K T V
1BL3.pdb---M H G Q V D C S P G I W Q L D C T H L E G K V I L V A V H V A S G Y I E A E V I P A E T G Q E T A Y F L L K L A G R W P V K T V
1EX4.pdb---S G Q V D S P G I W Q L D C T H L E G K V I L V A V H V A S G Y I E A E V I P A E T G Q E T A Y F L L K L A G R W P V K T V
*****
As11 Yapı---H T D N G S N F T S T T V K K A A C W W A G I K Q E F G I P Y N P Q S Q G V I E S M N K K E L K K I I G Q V R D Q A E H L K T A V Q
1K6Y.pdb---H T D N G S N F T S T T V K K A A C W A G I K Q E E G I P Y N P Q S Q G V I E S M N K K E L K K I I G Q V R D Q A E H L K T A V Q
1BL3.pdb---H T D N G S N F T S T T V K K A A C W A G I K Q E F G I P Y N P Q S Q G V I E S M N K K E L K K I I G Q V R D Q A E H L K T A V Q
1EX4.pdb---H T D N G S N F T S T T V K K A A C W A G I K Q E E G I P Y N P Q S Q G V I E S M N K K E L K K I I G Q V R D Q A E H L K T A V Q
*****
As11 Yapı---M A V F I H N F K R K G G I G Y S A G E R I V D I I A T D I Q T K E
1K6Y.pdb---M A V F I H N K K R K G G I G Y S A G E R I V D I I A T D I Q T K E
1BL3.pdb---M A V F I H N K K R K G G I G Y S A G E R I V D I I A T D I Q T K E
1EX4.pdb---M A V F I H N K K R K G G I G Y S A G E R I V D I I A T D I Q T K E

```

C-Terminal Bölgesi

```

As11 Yapı---L Q K Q I T K I Q N F R V Y Y R D S R D P V W K G P A K L L W K G E G A V V I Q D N S D I K V V P R R K A K I I R D Y G K Q M A
1K6Y.pdb---L Q K Q I T K I Q N F R V Y Y R D S R D P V W K G P A K L L W K G E G A V V I Q D N S D I K V V P R R K A K I I R D Y G K Q M A
1EX4.pdb---L Q K Q I T K I Q N F R V Y Y R D S R S L W K G P A K L L W K G E G A V V I Q D N S D I K V V P R R K A K I I R D Y G K Q M A
*****
As11 Yapı---G D D C V A S R Q D E D
1K6Y.pdb---G D D C V A S R Q D E D
1EX4.pdb---G D D S V A S R Q D E D

```

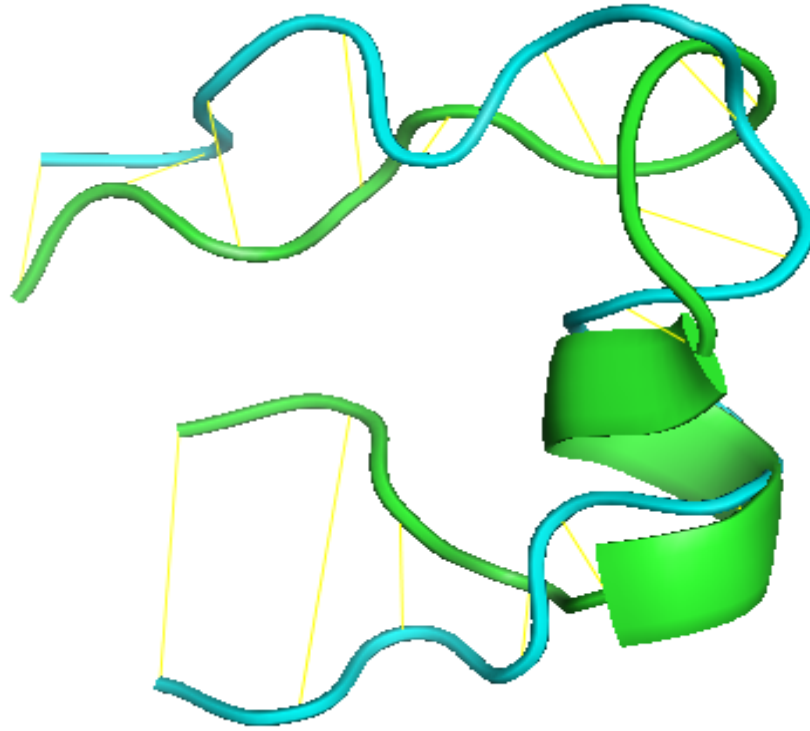
Şekil 3.1. İncelenen HIV-1 İntegraz kristal yapılarının amino asit dizilişi (Farklı olanlar: bordo zemin Yapıda eksikler: sarı zemin, Hem eksik hem de farklı olanlar: eflatun)

Mevcut x-ray ve NMR yapılarının çoğunda özellikle katalitik öz bölgesinin 139-155 kalıntıları eksik olarak rapor edilmiştir. Bu eksikliklerin sebebi yüksek sıcaklık faktörleri olarak gösterilmektedir (Barecca ve ark 2003). Modellemede kullanılan 1WJD.pdb dosyası N-terminal bölgesine ait olup 1-55 arası kalıntıları içermektedir. 1K6Y.pdb dosyası N-terminal ve katalitik öz bölgesi içermektedir. Zincir uzunluğu 1-212 görünmekte ancak 46-56 ve 139-149 arası artıklar eksik olarak görülmektedir. 1BL3.pdb dosyası ise 50-209 arasındaki kalıntıları içeren katalitik öz bölgesini göstermekte ancak yapıda 209-212 artıkları eksik olarak görülmektedir. 1EX4.pdb dosyası ise katalitik öz ve C-terminal bölgesini içermekte olup 50-55, 137-150 ve 270-288 arası artıklar eksiktir.

Eksik olan kalıntılar giderildikten sonra N-terminal-katalitik öz ve katalitik öz-C-terminal yapıları üst üste çakıştırılarak 1-270 aminoasitlerini içeren HIV-1 integrazın üç boyutlu koordinatları kaydedildi.

3.2.2. C-terminal Bölgesinin Eksik Kalıntıları

Daha önceden de bahsedildiği gibi mevcut HIV-1 integraz x-ray ve NMR yapıları birleştirildiğinde ancak 1-270 arası zincir tamamlanmakta ve 18 kalıntı eksik kalmaktaydı. Bu eksik kalıntıların tamamlanması için aminoasit sıralaması belli olan integrazın 18 aminoasit uzunluğundaki peptidi Xleap programında hazırlandı. Peptid'in aminoasit yapısına göre alacağı şekli görmek için Chimera programı içinde yer alan Modeller (Eswar ve ark. 2006) programı ile modeller oluşturuldu. Aynı işlem çevrimiçi olarak <http://salilab.org> sitesinden de yapılabilmektedir. İki yöntemle hazırlanan zincirlerin 3 boyutlu görüntülerinin benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 3.2). Dolayısı ile AMBER ile hazırlanan yapı alınarak modellemede kullanıldı.



Şekil 3.2. AMBER ve Modeler programları ile hazırlanan 18 kalıntılık yapılar (Yeşil: AMBER yapısı, Mavi: Modeler yapısı) (Pymol ile karşılaştırılmıştır.)

Moleküler dinamik çalışmaları sonucu elde edilen yapının Modeler programı ile elde edilen yapı ile benzerliği Şekil 3.2’te görülmektedir. Bu uyum sonucunda oluşturulacak 288 kalıntılık integras enzimi yapısında moleküler dinamik sonucu elde edilen yapının kullanılması kararlaştırıldı.

Moleküler dinamik çalışmaları için peptidin Xleap’te koordinat ve topoloji dosyaları oluşturuldu. Yapı önce 100 000 adımda rms değeri 10^{-2} oluncaya kadar 50 000 adım steepest descent algoritması ve sonrasında conjugate gradient metodu kullanılarak minimize edildi. Yapı küçük olduğundan bağ yapmayan etkileşimleri de hesaba katmak için *cut off* değeri 999 Å alındı. Çözücü sistemi olarak Born implicit çözücü sistemi seçilerek her 100 adımda koordinatlar kaydedildi.

İkinci aşamada yine Born implicit çözücü yöntemi kullanıldı. Periyodik sınırlar kaldırılarak hidrojen içeren bağlar gergin tutuldu. Sıcaklık ayarlaması için Langevin termostadı seçildi. Koordinat ve enerji dosyaları her 250 adımda bir kaydedilerek 0 K’den 400 K’ne 50 derece aralıklarla her biri 100 000 basamak olan sekiz adımda 1.6 ns süresince ısıtma işlemi yapıldı.

Bir sonraki adımda moleküler dinamik hesaplama işlemi yapıldı. Aynı şartlarda 325 K'de sıcaklık sabit tutularak 50 ns süresince moleküler dinamik simülasyonu yapıldı. Moleküler dinamik işleminden sonra sonuçlar analiz edilerek minimum enerjili bir yapı seçilerek pdb dosyası olarak kaydedildi. Kaydedilen yapı 5000 adım steepest descent ve 5000 adım conjugate gradient yöntemleriyle Born implicit çözücü sisteminde minimize edilerek yeniden pdb dosyası olarak kaydedildi.

3.2.3. Tam Uzunluktaki İntegraz Modelinin Hazırlanması

Tam uzunluktaki integraz modelinin hazırlanmasında N-terminal bölgesi için bir X-ray yapısı olan 1K6Y.pdb dosyasının B zinciri kullanıldı. Yapıda eksik olan 47-49 kalıntılarını tamamlamak için bir NMR yapısı olan 1WJD.pdb yapısının A zinciri kullanıldı.

Katalitik öz bölgesi kalıntıları için X-ray ile elde edilmiş 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb yapıları kullanılırken, oluşturulacak tam uzunluktaki modelde C-terminal ve N-terminal bölgelerinin uygun şekilde yerleşmesi için 1K6Y.pdb dosyasından da daha sonra değinileceği gibi yararlanıldı. Modelde 1BL3.pdb yapısının C ve 1EX4.pdb yapısının B zinciri kullanıldı.

C-terminal bölgesindeki kalıntılar için de yine 1EX4.pdb yapısı kullanıldı. C-terminal bölgesinin eksik 18 kalıntının giderilmesi için ise 3.2.1. bölümünde belirtilen şekilde oluşturulan peptid ile sağlandı.

Uzaydaki konumları farklı olan bu yapıları tek bir integraz yapısı haline getirmek için kalıp olarak 1K6Y.pdb ve 1EX4.pdb dosyalarını kullanıldı. Bunun nedeni her iki yapının da katalitik öz bölgesi içermesindedir. Her iki yapının katalitik öz bölgeleri üst üste çakıştırılarak tam uzunluktaki HIV integraz yapısının temel kalıbı oluşturuldu.

Peptid yapısı haricindeki bütün yapılar VMD programında açıldı. Sırasıyla her bir yapı oluşturulan 1K6Y-1EX4 kalıbı üzerine çakıştırılarak bu yapıların yeni koordinatları kaydedildi.

Kaydedilen bu koordinatlar bir editör yardımıyla açılıp katalitik öz bölgesi ile C-terminal bölgesini içeren atom ve koordinatlar N-terminal bölgesi altına kopyalanıp bunlar D.pdb olarak kaydedildi. Bu yapı için 1K6Y.pdb dosyasından 1-46 arası

kalıntılar alınırken, N-terminal bölgesinin eksik kalıntıları 46-49 arası kalıntılar 1WJD.pdb yapısından karşılandı. Katalitik öz bölgesinin eksik kalıntıları ise 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb yapılarının bir birine eklenmesiyle giderildi.

Böylece 1-270 kalıntı aralığına sahip yapı elde edildi. Xleap programında, bu yapıya daha önce hazırlanan 18 amino asitlik peptid zinciri eklenerek 1-288 kalıntı uzunluğundaki zincir oluşturuldu. Katalitik öz bölgesi 1BL3.pdb yapısından alınan model E1.pdb olarak kaydedildi. Bunun yanında metallerin yapı üzerindeki etkisini gözlemek amacıyla E1.pdb yapısından magnezyum ve çinko metali çıkarılarak E2.pdb yapısı oluşturuldu.

N-terminal, katalitik öz ve C-terminal bölgelerinin moleküler dinamik çalışmalarını yapmak için, oluşturulan 288 kalıntılı yapıdan bu bölgeler alınarak farklı dosya adları ile kaydedildiler. Seçilen aminoasit bölgeleri ve yeni yapıların isimleri Tablo 3.1.'de verilmiştir. MD hesaplamalarında uç kısımlardaki kalıntıların hareket yönünde fazla bir değişim olmaması için her bir bölgenin uç kısımlarına diğer bölgelerin bazı kalıntıları da dahil edilmiştir.

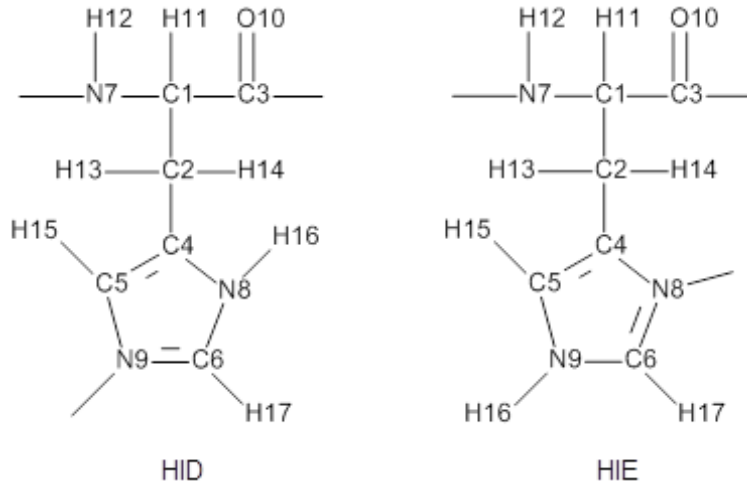
Tablo 3.1. MD çalışmaları için seçilen aminoasit bölgeleri ve yeni yapıların isimleri

Bölge	Kalıntı Aralığı	Kullanılan Kalıntılar	Metal	İsim
N-terminal	1-49	1-60	Zn	A
Katalitik öz	50-212	45-223	Mg	B
C-terminal(270)	213-288	196-270	-	C1
C-terminal(288)	213-288	196-288	-	C2
Bütün Yapı	1-288	1-270	Mg + Zn	D
Bütün Yapı	1-288	1-288	Mg + Zn	E1
Bütün Yapı	1-288	1-288	-	E2

3.2.4. Çinko ve Çinkoya Bağlı Kalıntı Parametrelerinin Hazırlanması

N-terminal bölgesinde yer alan Zn atomu ve onunla kompleks oluşturan HIS12, HIS16, CYS40 ve CYS43 aminoasitleri için AMBER kuvvet alanı parametreleri literatürlerden (Walker 2003, Lin ve Wang 2010) yararlanılarak aşağıda açıklandığı şekilde hazırlandı (Tablo 3.2-3.6).

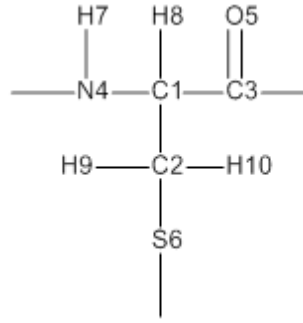
Manuel olarak 12. ve 16. artıkların isimleri sırasıyla HID ve HIE olarak değiştirildi. Xleap'te bu artıklar protonlandıktan sonra LG1 ve LG2 isimleri verildi. Çinkoya bağlı 40 ve 43. artıklar Xleap'te protonlandıktan sonra S-H bağlarındaki hidrojenler silindi ve bu artıklara LG3 ve LG4 isimleri verildi. Çinkonun atom tipine ise ZD ismi atfedildi. Xleap kullanılarak her bir artık için ayrı ayrı kütüphane oluşturuldu. Her bir artık için ff99SB kuvvet alanı kaynağı kullanılarak kütüphaneler oluşturuldu. Çinkoya bağlı histidin kalıntıları ile ilgili parametreler Tablo 3.2.'de verilmiştir.



Tablo 3.2. Katalitik Çinko Bağlı Histidinler için Atom Tipleri ve Yükleri

<i>atom</i>	<i>tip</i>	<i>yük</i> <i>HID</i>	<i>yük</i> <i>HIE</i>	<i>atom</i>	<i>tip</i>	<i>yük</i> <i>HID</i>	<i>yük</i> <i>HIE</i>
C1	CT	-0.096079	-0.172979	O10	O	-0.498915	-0.498915
C2	CT	-0.088318	-0.049518	H11	H1	+0.135500	+0.183400
C3	C	+0.529423	+0.529423	H12	H	+0.209094	+0.209094
C4	CC	-0.034573	+0.178827	H13	HC	+0.092702	+0.089202
C5	CV	-0.029486	-0.379386	H14	HC	+0.092702	+0.089202
C6	CR	-0.034573	-0.076773	H15	H4	+0.188232	+0.259732
N7	N	-0.335847	-0.335847	H16	H	+0.272147	+0.241147
N8	NA	-0.038078	-0.200178	H17	H5	+0.161570	+0.165870
N9	NB	-0.242772	-0.279500				

Çinkoya bağlı sistein kalıntıları ile ilgili parametreler Tablo 3.3.'te verilmiştir. Hidrojen atomunun histidin halkasındaki bağlanma yerine göre ($N^{\delta 1}$ halka atomu ve $N^{\delta 2}$ halka atomu; detaylı bilgi için Başlık 2.1.9.1.'e bakınız.) farklı yükler belirlenirken, böyle bir durumda olmayan sisteinler için tek tip yük belirlenmiştir.

**Tablo 3.3.** Katalitik Çinko Bağlı Sisteinler için Atom Tipleri ve Yükleri

<i>atom</i>	<i>tip</i>	<i>yük</i>	<i>atom</i>	<i>tip</i>	<i>yük</i>
C1	CT	+0.01995	S6	SH	-0.54271
C2	CT	-0.09617	H7	H	+0.25298
C3	C	+0.63948	H8	H1	+0.13291
N4	N	-0.48926	H9	H1	+0.09345
O5	O	-0.59208	H10	H1	+0.09345

Katalitik çinko atomu için bağ parametreleri, açı parametreleri ve dihedral parametreleri sırasıyla Tablo 3.4., Tablo 3.5. ve Tablo 3.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.4. Katalitik Çinko için Bağ Parametreleri

<i>Bağ tipi</i>	<i>Kr (kcal/mol Å²)</i>	<i>r_{eq} (Å)</i>
ZD-NB	85.5	2.30683
ZD-NB	85.5	2.28176
ZD-SH	81.7	2.55106
ZD-SH	81.7	2.38721

Kr: r uzunluğunun enerji sabiti, *r_{eq}*: Å cinsinden denge bağ uzunluğu

Tablo 3.5. Katalitik Çinko için Açı Parametreleri

<i>Açı Tipi</i>	K_{θ} (kcal/mol rad ²)	θ_{eq} (°)
SH-ZD-SH	49.5	146.5
SH-ZD-NB	30.4	103.0
CT-SH-ZD	18.9	111.6
CV-NB-ZD	44.5	123.6
CR-NB-ZD	44.5	123.6
CC-NB-ZD	44.5	123.6
NB-ZD-SH	30.4	103.0
NB-ZD-NB	35.4	104.7

K_{θ} : θ açısının enerji sabiti, θ_{eq} : Derece cinsinden denge açısı

Tablo 3.6. Katalitik Çinko için Dihedral Parametreleri

<i>dihedral tipi</i>	V_n (kcal/mol)	γ (°)	n
X-ZD-NB-X	-2.82	0.00	2.0
X-ZD-SH-X	-0.03	0.00	3.0

V_n : Dihedral kuvvet sabiti, γ : Dihedral θ açısının bir fazı n : Dihedral periyodisitesi

3.2.5. N-terminal Bölgesinin Hazırlanması

N-terminal bölgesi HIV-1 IN'nin 1-49 kalıntılık bölümünü teşkil etmektedir. Başlık 3.2.2.'de hazırlanışı açıklanan 288 kalıntılık E1.pdb yapısının 1-60 arası kalıntıları ve çinko atomu alınarak A.pdb olarak kaydedildi.

3.2.6. Katalitik Öz Bölgesinin Hazırlanması

Katalitik öz bölgesi HIV-1 IN'nin 50-212 arası kalıntılarını içeren bölgedir. Bu bölge ayrıca Mg veya Mn gibi divalent bir metal içermektedir. Başlık 3.2.2.'de hazırlanışı anlatılan ve katalitik öz bölgesi 1BL3.pdb yapısından oluşturulan 288 kalıntılık E1.pdb yapısından katalitik öz bölgesini içerecek şekilde 45-223 arasındaki kalıntılar ve magnezyum atomu alınarak B.pdb olarak kaydedildi.

3.2.7. C-terminal Bölgesinin Hazırlanması

C-terminal HIV-1 IN'nin 213-288 arası artıklarını içermektedir. Bu bölgenin 18 eksik kalıntısı olduğundan bölgeyi 270'e kadar olan kalıntıları ve 288'e kadar olan

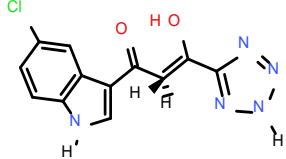
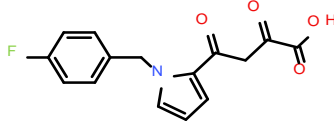
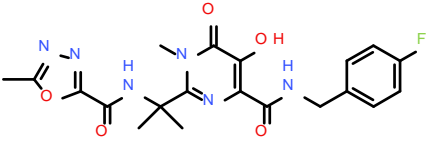
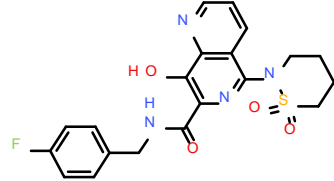
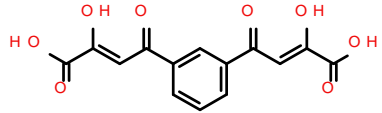
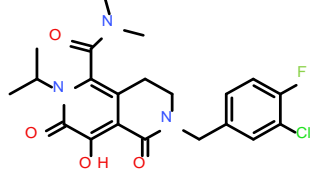
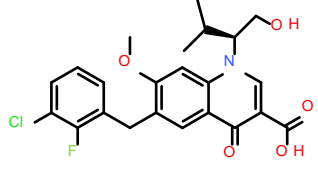
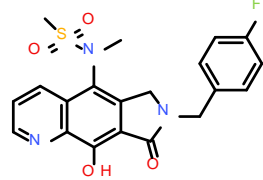
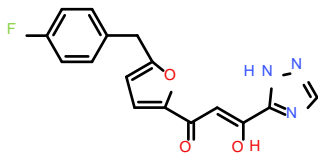
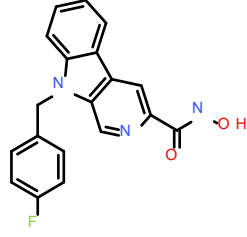
kalıntıları içerecek şekilde iki yapı olarak kaydedildi. Daha önceden oluşturulmuş olan E1.pdb yapısının 196-270 aralığındaki artıklarını alınarak C1.pdb ve 196-288 aralığındaki artıkları alınarak C2.pdb olarak kaydedildi.

3.2.8. Ligand Taraması ve Ligand Tasarımı

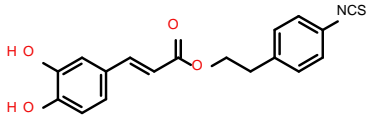
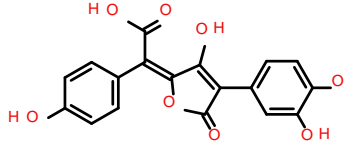
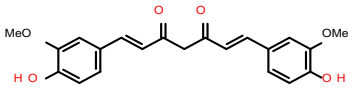
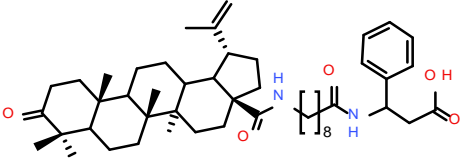
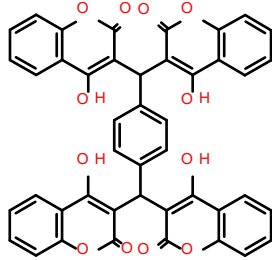
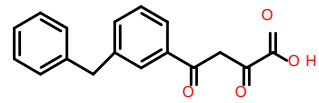
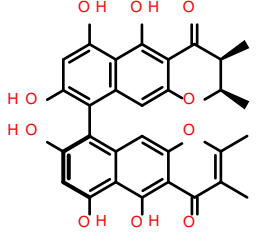
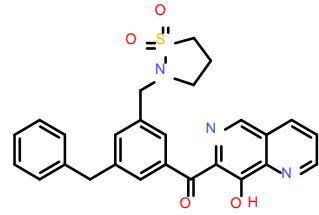
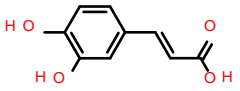
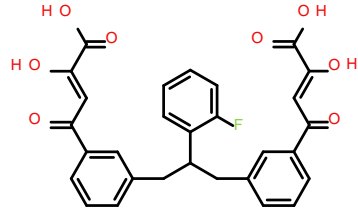
Literatürlerden (Mkhija ve Kulkarni 2002, Dayam ve Neamati 2004, Mustata ve ark. 2004, Yuan ve Parrill 2005, Dayam ve ark. 2006, Kawasuwaji ve ark. 2006, Alves ve ark. 2007a, Alves ve ark. 2007b, Dubey ve ark. 2007, Fossey ve ark. 2007, Loizidou ve ark. 2007, Nair ve ark. 2007, Dayam ve ark. 2008, De Luca ve ark. 2008, Pace ve ark. 2008, Donghi ve ark. 2009, Healy ve ark. 2009, Liu ve ark. 2009, Sechi ve ark. 2009, McColl ve Chen 2010) HIV-1 IN enzimi ile ilgili deneysel ve/veya teorik çalışmalarda kullanılmış ligandlardan 31 tanesi, IC_{50} değerleri dikkate alınarak seçildi. Bunlara ek olarak daha önce çalışılmamış folik asit, metotreksat, pemetreksed ve tetrahidroksisikloheksan-1-karboksilik acid ile birlikte tasarladığımız beş ligand da eklenerek toplam 40 ligand çalışmada kullanıldı. Diğer taraftan, L02 olarak kodlanan Raltegravir'in literatürde karboksamid tuzu olarak kullanıldığı görülmüştür (Cocohoba ve Dong 2008). İki yapının proteine bağlanmasındaki farklılıkları gözlemlemek amacıyla L02 ligandı tuzu şeklinde dizayn edilerek L02t kodu ile çalışmalarda kullanıldı. İntegraz için etkinlik gösterilen yapıların genellikle karboksil grubu ve diketo grupları içeren yapılar olduğu literatür taramalarından ve ilaç olarak kullanılmakta olan raltegravir yapısından anlaşılmaktadır.

HIV-1 IN için literatürden seçilen ve bu çalışmada tasarlanan ligandlar Tablo 3.7.'de verilmiştir. Bu ligandların tamamı Dock6.5, Autodock4 ve Autodock VINA programları ile proteine yerleştirilmiştir. Daha önceden yerleştirilme çalışmaları yapılmış olan bazı ligandların, kullanılan programa göre skorları iyi olanların ve yeni tasarlanan ligandların moleküler dinamik çalışmaları ve bağlanma sabitlerinin hesaplanmaları çalışılmıştır.

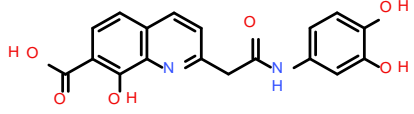
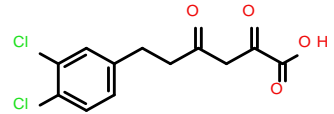
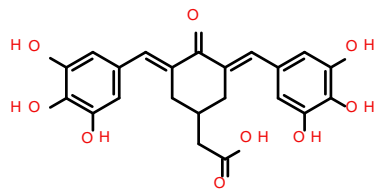
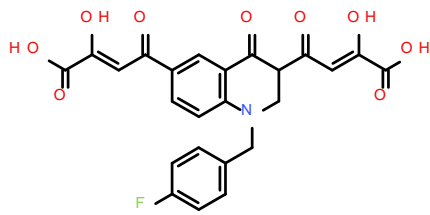
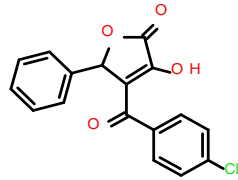
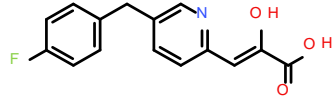
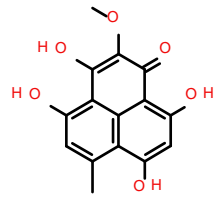
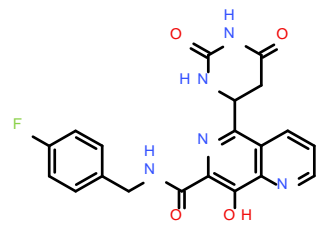
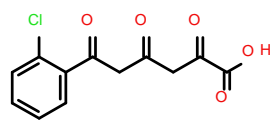
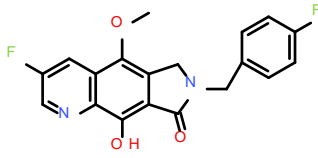
Tablo 3.7. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar

KOD	LİGAND	KOD	LİGAND
L01	 <p>(Z)-3-(5-kloro-1H-3-indol-3-il)-3-hidroksi-1-(2H-tetrazol-5-il)prop-2-en-1-on</p>	L06	 <p>4-[1-(4-florofenil)metil]pirrol-2-yl]-2,4-dioksobütanoik asit (L-731988)</p>
L02	 <p>N-[2-[4-[(4-florofenil)metilkarbamoyl]-5-hidroksi-1-metil-6-oksopirimidin-2-il]propan-2-il]-5-metil-1,3,4-oksadiazol-2-karboksamid (Raltegravir)</p>	L07	 <p>5-(1,1-dioksotiazinan-2-il)-N-(4-florofenil)metil]-8-hidroksi-1,6-naftiridin-7-karboksamid (L870810)</p>
L03	 <p>(2Z, 2'Z)-4,4'-benzen-1,3-diilbis(2-hidroksi-4-oksobüt-2-enoik asit)</p>	L08	 <p>(5E)-2-(3-kloro-4-florofenil)metil]-5-[dimetilamino(hidroksi)metiliden]-6-propan-2-il-3,4-dihidro-2,6-naftiridin-1,7,8-trion (MK0536)</p>
L04	 <p>6-[(3-kloro-2-florofenil)metil]-1-(1-hidroksi-3-metilbütan-2-il)-7-metoksi-4-oksokinolin-3-karboksilik asit (Elvitegravir)</p>	L09	 <p>N-[7-(4-florofenil)metil]-9-hidroksi-8-okso-6H-pirrol[3,4-g]kinolin-5-il]-N-metilmetansülfonamid (GS9160)</p>
L05	 <p>(Z)-1-[5-(4-florofenil)metil]furan-2-il]-3-hidroksi-3-(1H-1,2,4-triazol-5-il)prop-2-en-1-on (s-1360)</p>	L10	 <p>9-(4-florofenil)metil]-N-hidroksipirido [3,4-b]indol-3-karboksamid</p>

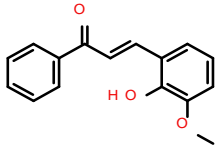
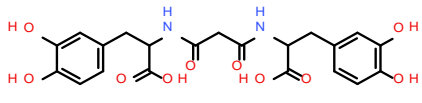
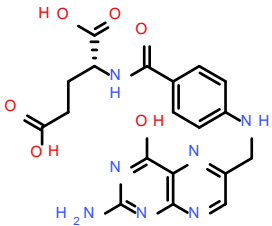
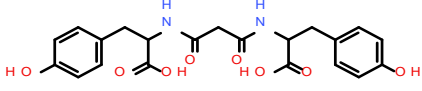
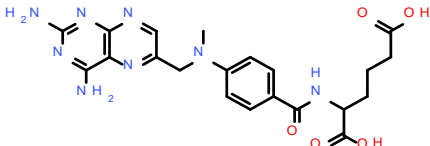
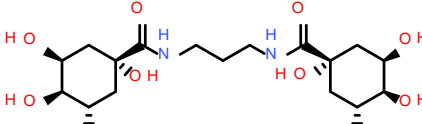
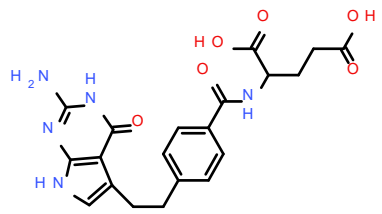
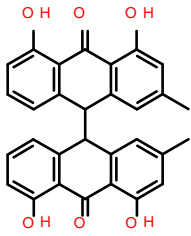
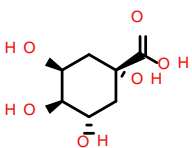
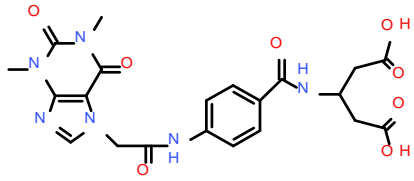
Tablo 3.7. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar (Devamı)

KOD	LİGAND	KOD	LİGAND
L11	 <p>2-(4-izotiyosiyanatofenil)etil (2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoat</p>	L16	 <p>(2E)-2-[4-(3,4-dihidroksifenil)-3-hidroksi-5-oksofuran-2-iliden]-2-(4-hidroksifenil)asetik acit</p>
L12	 <p>(1E,6E)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil) hepta-1,6-dien-3,5-dion</p>	L17	 <p>3-(9-((1R,3aS,5aR,11aR)-5a,5b,8,8,11a-pentametil-9-okso-1-(prop-1-en-2-il)ikosahidro-1H-siklopenta[a]krisen-3a-karboksamido)-3-fenil propanoik acit</p>
L13	 <p>3-[[4-[bis(4-hidroksi-2-oksokromen-3-il)metil]fenil)-(4-hidroksi-2-oksokromen-3-il)metil]-4-hidroksikromen-2-on</p>	L18	 <p>4-(3-benzilfenil)-2,4-dioksobütanoik acit</p>
L14	 <p>5,6,8-trihidroksi-2,3-dimetil-9-(5,6,8-trihidroksi-2,3-dimetil-4-okso-2,3-dihidrobenzo[g]kromen-9-il)benzo[g]kromen-4-on</p>	L19	 <p>(3-benzil-5-((1,1-dioksidoizotiazolidin-2-il)metil)fenil)(8-hidroksi-1,6-naftiridin-7-il)metanon</p>
L15	 <p>(E)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilik acit</p>	L20	 <p>(2Z,2'Z)-4,4'-((2-(2-florofenil)propan-1,3-diil)bis(3,1-fenilen))bis(2-hidroksi-4-oksobüt-2-enoik acit)</p>

Tablo 3.7. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar (Devamı)

KOD	LİGAND	KOD	LİGAND
L21	 2-(2-((3,4-dihidroksifenil)amino)-2-oksoetil)- 8-hidroksikinolin-7-karboksilik asit	L26	 6-(3,4-diklorofenil)-2,4-dioksoheksanoik asit
L22	 2-((3E,5E)-4-okso-3,5-bis(3,4,5- trihidroksibenziliden)sikloheksil)asetik asit	L27	 (2Z,2'Z)-4,4'-(1-(4-florobenzil)-4-okso-1,2,3,4- tetrahidrokinolin-3,6-diil)bis(2-hidroksi-4- oksobut-2-enoik asit)
L23	 4-(4-klorobenzoil)-3-hidroksi-5-fenilfuran- 2(5H)-on	L28	 (Z)-3-[5-[(4-florofenil)metil]-2-piridil]-2- hidroksi-prop-2-enoik acid
L24	 3,4,7,9-tetrahidroksi-2-metoksi-6-metil- fenalen-1-on	L29	 5-(2,6-diokso-1,3-diazinan-4-il)-N-[(4- florofenil)metil]-8-hidroksi-1,6-naftiridin-7- karboksamid
L25	 6-(2-klorofenil)-2,4,6-trioksoheksanoik asit	L30	 3-floro-7-(4-florobenzil)-9-hidroksi-5-metoksi- 6H-pirrolo[3,4-g]kinolin-8(7H)-on

Tablo 3.7. Literatürlerden seçilen ve tasarlanan ligandlar (Devamı)

KOD	LİGAND	KOD	LİGAND
L31	 <p>(E)-3-(2-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenilprop-2-en-1-on</p>	LGA	 <p>3-(3,4-dihidroksifenil)-2-[[3-[[1-[(3,4-dihidroksifenil)metil]-2-hidroksi-2-okso-etil]amino]-3-okso-propanoic asit</p>
L32	 <p>2-[[4-[(2-amino-4-okso-1H-pteridin-6-il)metilamino]benzoil]amino]pentandioik asit</p>	LGB	 <p>2-[[3-[[2-hidroksi-1-[(4-hidroksifenil)metil]-2-okso-etil]amino]-3-okso-propanoic asit</p>
L33	 <p>2-[[4-[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil-metil-amino]benzoil]amino]heksandioik asit</p>	LGC	 <p>(3S,5S)-1,3,4,5-tetrahidroksi-N-[3-[(3R,5R)-1,3,4,5-tetrahidroksisikloheksankarbonil]amino]propil]sikloheksankarboksamid</p>
L34	 <p>2-[[4-[[2-(2-amino-4-okso-3,7-dihidropirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)etil]benzoil]amino]pentandioik asit</p>	LGD	 <p>10-(4,5-dihidroksi-2-metil-10-okso-9H-antracen-9-il)-1,8-dihidroksi-3-metil-10H-antracen-9-on</p>
L35	 <p>(3S,5S)-1,3,4,5-tetrahidroksisikloheksan-1-karboksilik asit</p>	LGE	 <p>3-[[4-[[2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)asetil]amino]benzoil]amino]pentandioik asit</p>

3.2.9. Ligandların Yerleştirilme Çalışmaları için Hazırlanması

Seçilen ligandlar Symyx (Accelrys Software Inc. 2011) programı ile 2 boyutlu çizildi. Daha sonra bu ligandlar DSVisualizer programı ile 3 boyutlu olarak kaydedildi. Ligandlar incelendiğinde çoğu yapıda karboksilik asit, bazılarında ise diketo gruplarının bulunduğu görülmektedir. Fizyolojik şartlar göz önüne alınarak karboksilik grubu içeren yapılar için karboksilat formları seçildi. Ayrıca bazı ligandlarda (L01, L06, L12, L18, L20, L25, L26, L27, LGA ve LGB) kararlı keto-enol tautomerlerini (denge durumunu) belirlemek için kuantum mekaniksel hesaplamalar DFT metoduyla B3LYP/6-31+G(d) seviyesinde vakumda yapıldı.

Bütün ligandlar önce Gaussian03 programı ile AM1 düzeyinde minimize edildikten sonra Antechamber ile yük ve parametre dosyaları hazırlandı. Her ligandın Xleap programında topoloji ve koordinat dosyaları ile birlikte kütüphane dosyaları oluşturularak yapılar pdb formatında kaydedildi.

3.2.10. Ligand Yerleştirme Çalışmaları

Ligand yerleştirme çalışmaları için IN'ın katalitik öz bölgesi yapısı için Başlık 3.12.2.'de moleküler dinamik çalışmaları anlatılan yapının enerji analizi sonucu düşük enerjili bir konformasyonu seçilerek bu yapı minimize edildi.

Autodock pdb veya mol2 formatındaki dosyalar yerine pdbqt uzantılı; atomların koordinatlarını, tipini ve yüklerini içeren dosyaları kullanmaktadır. Bu dosyalar Autodock için geliştirilmiş MGL Tools programı ile hazırlanabilir. Autodock ve Autodock VINA çalışmaları için protein MGL Tools programında açılarak katalitik bölgedekiler dâhil olmak üzere bütün sular silindi. Yine bu program ile yükler otomatik olarak ilave edilerek yapı pdbqt formatında kaydedildi. Ligandlar yine MGL Tools programında açılarak program tarafından otomatik olarak Gasteiger yükleri ilave edildikten sonra dönebilen ve hareketsiz kalan atomlar belirlenip pdbqt formatında kaydedildiler. Grid hesaplamaları için katalitik bölgeyi kapsayacak ve ligandın hareketlerine izin verecek büyüklükte grid kutusu oluşturuldu. Gerekli dosyaların hazırlanmasından sonra ligand etkileşme bölgelerinin belirlenmesi için her bir atom tipi, reseptör ve ligand atomu arasındaki etkileşim enerjisi bağlanma bölgesi boyunca hesaplanarak her bir ligand atomunun grid haritaları çıkarılır. Ligandın uygun bağlanma

pozisyonları, yönelmeleri ve konformasyonlarını bulmak için Lamarckian genetik algoritması (LGA) kullanıldı. Rastgele yerleştirilmiş 150 ayrı popülasyon ile global optimizasyona başlandı. Maksimum enerji değerlendirmesi 2.5×10^6 olarak alındı. Türetilen maksimum LGA ürünü 27 000 olarak seçilirken, her bir ligand için 50 tane yerleştirme sonucu alındı.

Vina programı Autodock için oluşturulan ligand ve protein dosyalarını kullandığı için ayrıca bir dosya hazırlanmadı. Ayrıca Vina grid hesaplamalarını otomatik olarak yapar ve bilgisayara her hangi bir çıktı dosyası kaydetmez. Vina programı ile her bir ligand için 20 tane yerleştirme sonucu alındı.

Ligand ve proteinin Dock için hazırlanmasında Chimera programı kullanıldı. Liganda AM1-BCC (Wang ve ark. 2006) metodu ile yük ilavesi yapılarak mol2 formatında kaydedildi. Proteine de aynı yöntemle yük ilavesi yapılarak yapı, yüklü ve yüzey oluşturmada kullanılmak üzere hidrojenizasyon yapılarak sırasıyla mol2 ve pdb formatlarında kaydedildi. Aynı program ile protein yüzeyi de oluşturulduktan sonra hem Chimera programı hem de DMS programı kullanılarak, su molekülü büyüklüğünde bir topun hedefin van der Waals yüzeyinde yuvarlanmasına dayalı DMS algoritması (Richards 1977, Connolly 1981) ile 1.4 Å çapında prob kullanılarak çözücünün etkileşebileceği protein bağlanma bölgeleri hesaplandı. İşlem sonucunda, ligand bağlanacak bölgeler için protein yüzeyinde noktalar oluşturulmuş oldu. Reseptör küreleri, bu noktalardan SPHGEN programı kullanılarak oluşturuldu ve bağlanma bölgesindeki küreler seçilerek grid hesaplamalarında kullanılmak üzere kaydedildi. Seçilen küreleri içerecek şekilde her yönde ekstra 14 Å mesafe konularak grid kutusu oluşturuldu. Bazı ligandların yerleştirilmesinde sorunlar yaşanmasından dolayı kutu ölçüleri oldukça büyük seçildi. Belirlenen bölgedeki muhtemel ligand-reseptör etkileşimleri taraması için grid hesaplaması yapıldı. Bu hesaplamalar için grid, van der Waals ve elektrostatik bileşenleri içeren moleküler mekanik kuvvet alanını kullanmaktadır. Ligand yerleştirme işlemi için 50 sonuç istenirken, genellikle 500 olarak kullanılan maksimum oryantasyon sayısı bazı büyük ligandların yerleştirilmesinde sorunlar yaşandığından bu ligandlar için değer yükseltildi.

Autodock4, Dock6 ve Autodock Vina, programları kullanılarak elde edilen kompleksler sırası ile acom, dcom ve vcom olarak isimlendirildiler.

3.2.11. Komplekslerin Hazırlanması

Yerleştirme işlemlerinin bitmesinden sonra konformasyonları ve skorları en iyi olan yapılar seçilerek koordinatlar PDB formatında kaydedildiler.

Kütüphaneleri daha önceki aşamalarda hazırlanmış olan ligandlar ve reseptör Xleap programında açıldı. Her bir ligand ve reseptörün ayrı ayrı koordinat, topoloji ve kütüphane dosyaları kaydedildi ve ligand ile reseptör bir araya getirilerek çözücüsüz ortamda komplekslerin topoloji ve koordinat dosyaları kaydedildi. Daha sonra her bir yapı için gerekli görüldüğü yerde iyon ilave edilerek yapıların topoloji ve koordinat dosyaları kaydedildi. Son adımda çözücü ilavesi yapılarak bu yapılar için parametre ve topoloji dosyaları da kaydedildi. Çözücü ilaveleri kesik oktahedron kutusu içinde proteinin her bir tarafından 8.0 Angstrom'luk mesafeye kadar TIP3PBOX (Jorgensen ve ark. 1983) tipi su ilavesi ile gerçekleştirildi. Ayrıca her adımda yapılar PDB formatında kaydedildiler.

Tam uzunluktaki HIV-1 integras yapısının ligandların bağlanmalarına etkisi olup olmadığını incelemek amacıyla daha önce çeşitli literatürlerde yerleştirme ve moleküler dinamik çalışmaları yapılmış olan 5CITEP ve Raltegravir ligandlarına (full01 ve full02t) ilaveten tasarlanmış olduğumuz ligandlardan iki tanesini (fulla ve fullb) de tam uzunluktaki yapıya yerleştirilerek kompleksler hazırlandı. Bunun için ligand yerleştirilmiş reseptör yapıları içeren dcom01.pdb, dcoma.pdb ve dcomb.pdb kompleksleri ile tam uzunluktaki HIV-1 integras yapısının katalitik öz bölgesi üst üste çakıştırılmak suretiyle ligandların ve tam uzunluktaki HIV-1 integras yapısının yeni koordinatları sırasıyla full01, fulla ve fullb isimleri ile kaydedildi. L02 ligandı ise tam uzunluktaki yapıya Dock ile yerleştirildi. Hazırlanan kompleksler Xleap programında açılarak yukarıda bahsedilen şekilde komplekslerin vakumdaki ve sudaki topoloji ve koordinat dosyaları hazırlandı.

3.2.12. Moleküler Dinamik Hesaplamaları

3.2.12.1. N-terminal Bölgesinin Moleküler Dinamik Hesaplamaları

Hazırlanışları, 3.2.3. başlığı altında anlatılan çinko ve çinkoya bağlı artıkların parametreleri ile 3.2.4. başlığı altında anlatılan A.pdb dosyası Xleap programına yüklenerek çözücüsüz ortamda topoloji, koordinat ve kütüphane dosyaları kaydedildi.

N-terminal bölgesi ilk olarak gaz fazında 2000 adım steepest descent ve 2000 adım conjugate gradient metodu ile koordinatları her 100 adımda kaydedilmek üzere minimize edildi. Bu işlem sırasında yapıda çinko ve ona koordine olan LG1, LG2, LG3, LG4 aminoasitleri ile N-terminal bölgesinin Katalitik öz bölgesine bağlandığı 46-49'uncu kalıntılar uygun bir konformasyona erişmeleri için serbest bırakılırken, bunların dışında kalan kalıntılar $500 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ 'luk bir kuvvetle sabit tutuldu.

Isıtma işlemi sırasında ise Katalitik Öz bölgesine yakın 46, 47, ve 48'inci kalıntılar ile N-terminal bölgesinin son aminoasidi 49ALA serbest bırakılırken geri kalan kalıntılar ve çinko atomuna $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ 'luk kuvvet uygulandı. Periyodisite uygulanmadan her 500 adımda koordinat ve enerji sonuçları kaydedilerek 4 ayrı basamakta 100 000'lik adımlarla sıcaklık 0 K'den 400 K çıkarıldı. İşlem 0.8 ps sürdürüldü.

Isıtma işleminden sıcaklığın 400 K civarı olduğu 4'üncü ısıtma adımından en düşük enerjiye sahip yapı alınarak pdb dosyası olarak kaydedildi.

Yükü -4 olan N-terminal yapısına Xleap programında dört tane Na^+ iyonu ilave edilerek proteinin nötral olması sağlandıktan sonra kesik oktahedron kutusu içinde proteinin her bir tarafından 8.0 Angstrom'luk mesafeye kadar TIP3PBOX tipi 4768 su molekülü eklendi. Böylece sistemimizde toplam 15213 tane atom yer almış oldu. Yapının topoloji, koordinat ve kütüphane dosyaları oluşturularak kaydedildi.

N-terminal yapısı iki ayrı adımda minimize edildi. Birinci adımda çinko atomu dahil olmak üzere protein sabit tutulurken suyun protein içine iyice dağılması için sadece su molekülleri minimize edildi. Proteinin sabit kalması için yine $500 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ 'luk bir kuvvet uygulandı. Sabit hacimde 2000 adım steepest descent ve 2000 adım conjugate gradient metodu ile koordinatlar her 100 adımda kaydedilerek minimizasyonun birinci adımı yapıldı. Minimizasyonun ikinci adımında protein ve su

molekülleri serbest bırakılarak aynı şartlarda toplamda 4000 adımda minimizasyon işlemi gerçekleştirildi. Isıtma işleminde protein ve çinko atomu $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ 'luk bir kuvvetle sabit tutulurken su molekülleri serbest bırakıldı. Isıtma işlemi 50 K aralıklarla 6 basamakta gerçekleştirilerek sıcaklık 300 K'e çıkarıldı. Her bir basamakta enerji ve koordinat dosyaları 250 adımda kaydedilerek toplamda 0.9 ns süreyle moleküler dinamik işlemi yürütüldü.

Moleküler dinamik çalışmaları sabit basınç altında yapıldı. SHAKE (Ryckaert et al., 1977) algoritması uygulanarak hidrojen titreşimleri engellendi. Uzak etkileşimlerin hesaplama zamanını arttırmaması için *cut off* mesafesi 10 Å olarak alındı. Basınç değeri 1 atm olarak sabitlendi ve her 2 ps aralığında basıncın gevşemesi sağlandı. Sıcaklık değerlerinin düzenlenmesi için Langevin termostatu seçilerek her 250 adımda koordinat ve enerji değerleri kaydedildi. Moleküler dinamik çalışmaları 10 ns süreyle yürütüldü.

3.2.12.2. Katalitik Öz Bölgesinin Moleküler Dinamik Hesaplamaları

Daha önce anlatıldığı gibi katalitik öz bölgesi için HIV-1 integras enziminin 45-223 arası kalıntıları moleküler dinamik çalışmalarında kullanılmak üzere seçilerek Xleap programında çözücüsüz ortamdaki topoloji ve koordinat dosyaları oluşturuldu.

N-terminal bölgesinde gaz fazı için uygulanan şartlar aynı tutularak 45, 46'ncı kalıntılar, 50-208 arası kalıntılar, 211-223 arası kalıntılar, Mg atomu ve katalitik bölgede yer alan sular sabit tutularak gaz fazında 4000 adımda minimizasyon yapıldı.

Katalitik Öz bölgesinin N-terminal bölgesine bağlandığı ucun koordinatlarının fazla değişmemesi ve 47, 48, 49 kalıntıları arasındaki bağ uzunluklarının uygun değerlere gelmesi için 45 ve 46'ncı kalıntılara $500 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ 'luk sabit bir kuvvet uygulanarak yapı minimize edildi. Aynı büyüklükteki kuvvet 208 ile 211 arasında yer alan kalıntılar 1EX4.pdb dosyasından 1BL3.pdb dosyasına ilave edildiğinden bu kalıntıların da uygun pozisyonları almaları için minimizasyon ve ısıtma işlemleri süresince serbest bırakıldılar. Proteinin ısıtılması sırasında aynı kalıntılar serbest tutularak yukarıda belirtilen kuvvet $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ 'ye düşürülerek uygulandı. Her biri 100000 adımdan oluşan 4 ayrı basamakta 50 K aralıklarla ısıtma gerçekleştirildi. Isıtılan proteinin 350-400 K arasında yer alan konformasyonlarından en düşük enerjili yapılarından birisi alınarak pdb dosyası olarak kaydedildi. Bir önceki işlemde alınan

pdb dosyası çözücü ortamında yapılacak moleküler dinamik çalışmalarına hazır hale getirilmek üzere Xleap programında açıldı. N-terminal bölgesi için izlenen yollarla önce +3.00 olan yükü sıfırlamak için üç tane Cl⁻ iyonu eklendi. Sonra da TIP3PBOX modeli ile 11281 su ilave edildi. Böylece toplam molekül sayısı kristal yapıda bulunan 4 su molekülü, Mg ve Cl iyonları dâhil olmak üzere 11467 olurken, toplam atom sayısı ise 36646 oldu.

Bundan sonra hazırlanan topoloji ve koordinat dosyaları ile proteinin çözücü ortamındaki MD çalışmalarına geçildi. MD çalışmaları N-terminal bölgesi için kullanılan parametreler ve şartlar uygulanarak gerçekleştirildi. MD çalışmalarından sonra analiz sonuçlarından en düşük enerjili yapılarından birisi seçilerek pdb dosyası olarak kaydedildi. Bu yapı gaz fazında 2 basamakta minimize edildi. Her bir basamakta 2000 adım steepest descent 2000 adım conjugate gradient yöntemi uygulandı. Ligand yerleştirme çalışmalarında kullanılmak üzere, minimizasyon işleminin ardından bir pdb dosyası çıkarıldı.

3.2.12.3. C-terminal Bölgesinin Moleküler Dinamik Hesaplamaları

C-terminal bölgesi 213-288 arası kalıntıları içeren bölgedir. Elimizde tam uzunluktaki zincir yapısı bulunmadığından bu bölgeyi peptid ilave edilmemiş ve ilave edilmiş olarak iki şekilde hazırladık. C-terminal bölgesinin 270'e kadar kalıntı içeren bölümünü C1, 288'e kadar olan kalıntıları içeren bölümünü ise C2 olarak adlandırdık.

C1 için 196-270 aralığındaki kalıntılar, C2 için ise 196-288 aralığındaki kalıntılar kullanıldı. Bu yapılar için de N-terminal bölgesi için izlenen yol takip edilerek önce gaz fazında minimizasyon, ardından 400 K'ne ısıtma yapıldı. 400 K'de alınan düşük enerjili bir yapıya çözücü ve iyon eklenerek yeniden moleküler dinamik işlemlerine hazır hale getirildi. C1 yapısının yükü +7 olarak çıktı. Bu yükü sıfırlamak için ortama yedi Cl⁻ iyonu ilave edildi. Yapıya TIP3PBOX modeliyle 11500 adet su molekülü ilave edilerek topoloji ve koordinat dosyaları oluşturuldu. Su ve iyon ilavesi ile yapıdaki toplam molekül ve atom sayısı ise sırasıyla 11582 ve 35773 oldu.

C2 yapısının yükü +4 çıktı. Dört tane Cl⁻ iyonu ilavesiyle yük sıfırlandı. TIP3PBOX modelinde 12996 tane su molekülü ilave edildi. Sistemdeki toplam kalıntı sayısı 13093 ve atom sayısı ise 40511 oldu. Bu yapının da topoloji ve koordinat dosyaları kaydedilerek MD işlemine hazır hale getirildi.

Moleküler Dinamik hesaplamaları daha önceki bölgeler için belirtilen şartlarda gerçekleştirildi. Analiz sonuçları incelenerek her bir yapının en düşük enerjili konformasyonları PDB formatında kaydedildi.

3.2.12.4. Tam Uzunluktaki HIV-1 İntegraz Modellerinin MD Hesaplamaları

Başlık 3.2.2. altında modellerin hazırlanması açıklanmıştır. Buna göre elimizde metal içeren 270 kalıntılı D.pdb, 288 kalıntılı sırasıyla metal içeren ve içermeyen 288 kalıntılı E1.pdb ve E2.pdb yapıları bulunmaktadır. Bu yapılara önce gaz fazında minimizasyon, ısıtma-soğutma ve tekrar ısıtma işlemi uygulandı. Sonraki adımda iyon ve çözücü ilave edilerek minimizasyon, ısıtma ve MD hesaplamaları çözücü ortamında gerçekleştirildi.

Xleap programında Zn atomu ve bağlı olduğu kalıntılar için hazırlanan parametre ve kütüphane dosyaları da kullanılarak yapıların gaz fazındaki topoloji ve koordinat dosyaları oluşturuldu.

Minimizasyon işlemi her üç yapı için de iki ayrı basamakta gerçekleştirildi. İlk basamakta 20 000 adım steepest descent ve 20 000 adım conjugate gradient metotları kullanılarak gaz fazında gerçekleştirildi. Hesaplamalarda yeniden tanımlanan ve yükleri değiştirilen LG1, LG2, LG3, LG4 yapıları ve model oluşturulmasında kullanılan yapıların bağlanma yerleri olan 45-50 ve 208-211 arasındaki kalıntılar serbest bırakılırken geri kalan kalıntı ve metal atomlarına $500 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ ’luk bir kuvvet uygulandı. Koordinatlar her 100 adımda kaydedildi. İkinci basamakta birinci basamaktaki şartlar uygulanırken yapılar üzerindeki kuvvet kaldırılarak bütün protein serbest bırakıldı.

Gaz fazındaki ısıtma işlemleri başlık 3.2.8.1.’de belirtilen şartlarda gerçekleştirildi. Ancak koordinatlar her 100 adımda kaydedildiler ve bu kez soğutma ve ardından tekrar ısıtma gerçekleştirildi. İlk ısıtma işlemi 100 000 adımdan oluşan 4 kademe ile sıcaklık 0 K’den 325 K’e çıkarıldı son bir işlem ile sistem tekrar 0 K’ne düşürüldü. Bu ısıtma işleminde minimizasyon basamağında belirtilen kalıntılara uygulanan kuvvet $5.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ ’e düşürüldü. Sıcaklık 0 K’e düşürüldükten sonra aynı şartlarda, uygulanan kuvvet kaldırılarak sıcaklık yeniden 325 K’ne çıkarıldı ve bu sıcaklıkta en düşük enerjili bir yapı kaydedildi.

Yükü +7 olan D.pdb, +4 olan E1.pdb ve +2 olan E2.pdb yapıları Xleap programı ile açılarak uygun sayıda Cl⁻ iyonları ilavesiyle nötrleştirildiler. Bu işlemde sonra su ilave edildi. Yapılara sırası ile 20275, 21416 ve 19669 su molekülü sistemlere eklenip koordinat ve topoloji dosyaları oluşturuldu.

Minimizasyon işlemleri gaz fazı için belirtilen şartlar kullanılarak gerçekleştirildi. İlk basamakta protein ve varsa metallere kuvvet uygulanarak su moleküllerinin yapıya iyice dağılması sağlandı. İkinci basamakta kalıntılar üzerindeki kuvvet kaldırılarak sistem serbest bırakılarak minimizasyon gerçekleştirildi. Isıtma işlemi belirtilen şartlarda koordinatlar her 250 adımda kaydedilmek üzere 50 K aralıklarla altı basamakta ısıtılarak 300 K'e çıkarıldı. İşlem toplamda 1.2 ns yürütüldü.

MD hesaplamalarında önce 1 ns süresince sistem serbest bırakıldıktan sonra 1-46 ve 59-270 arası kalıntılara ve varsa metallere 5 ns süresince sırasıyla 0.050, 0.100, 0.150, 0.100 ve 0.50 kcal mol⁻¹ Å⁻²'luk düşük bir kuvvet uygulandı. Böylece öncelikle yapıda hareketli olan ve farklı kaynaklardan alınarak bir birine eklenmiş yapıların daha kararlı bir konformasyona ulaşmaları amaçlandı. MD hesaplamaları daha önce n-terminal için belirtilen şartlarda gerçekleştirilirken sadece cut off değeri burada 12'ye çıkarıldı. D.pdb için 30 ns, E1.pdb için 30 ns ve E2.pdb için 15 ns sürelerince MD hesaplaması yürütüldü. İşlemlerin tamamlanmasından sonra her bir yapının en düşük enerjili yapıları çıkarıldı.

MD hesaplamaları sona eren yapıların konformasyon değişimleri için kümeleme işlemi yapıldı. Kümeleme işlemi RMSD temeline dayanılarak 3 angstromluk değer kadar farklılaşan konformasyonların kümeleme işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.12.5. Komplekslerin Moleküler Dinamik Çalışmaları

Bir önceki aşamada hazırlanan her bir yapı için minimizasyon işlemleri iki basamakta gerçekleştirildi. İlk adımda protein, ligand ve metal veya metallere 500 kcal mol⁻¹ Å⁻²'luk bir kuvvet uygulanarak bu yapılar sabit tutulup 5000 adım steepest descent ve 5000 adım conjugate gradient metodu kullanılarak toplamda 10000 adımda suyun minimizasyonu gerçekleştirildi. İkinci adımda ise uygulanan kuvvet kaldırılarak bütün sistem serbest bırakılıp aynı şartlarda minimizasyon yapıldı.

Bundan sonra protein, ligand ve metal veya metaller $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ 'luk bir kuvvetle sabit tutulurken su molekülleri serbest bırakılarak sistem 50 K aralıklarla sıcaklık 300 K'e kadar 6 adımda ısıtıldı. Sistemin sıcaklığı 300 K'de sabitlenerek ligand üzerindeki kuvvet kaldırılarak 0.2 ns süreyle sistemin dengeye gelmesi sağlandı. Koordinat dosyaları 250 adımda kaydedilerek toplamda 1.4 ns süreyle işlemler yürütüldü.

Isıtma sırasında sisteme uygulanan kuvvet 1 ns süresince yeniden uygulandıktan sonra kuvvet kaldırıldı ve moleküler dinamik hesaplamalarına sabit basınç altında 300 K'de devam edildi. Burada SHAKE (Ryckaert ve ark. 1977) algoritması uygulanarak hidrojen titreşimleri engellendi. Uzak etkileşimlerin hesaplama zamanını arttırmaması için *cut off* mesafesi 12 Å olarak alındı. Basınç değeri 1 atm olarak sabitlendi ve her 2 ps aralığında basıncın gevşemesi sağlandı. Sıcaklık değerlerinin düzenlenmesi için Langevin termostatu seçilerek her 250 adımda koordinat ve enerji değerleri kaydedildi. Hesaplamalar 13 basamakta toplam 13 ns süreyle gerçekleştirildi. MD hesaplamalarının sürdürülmesi gereken bazı komplekslerde bu süre daha da uzatılmıştır.

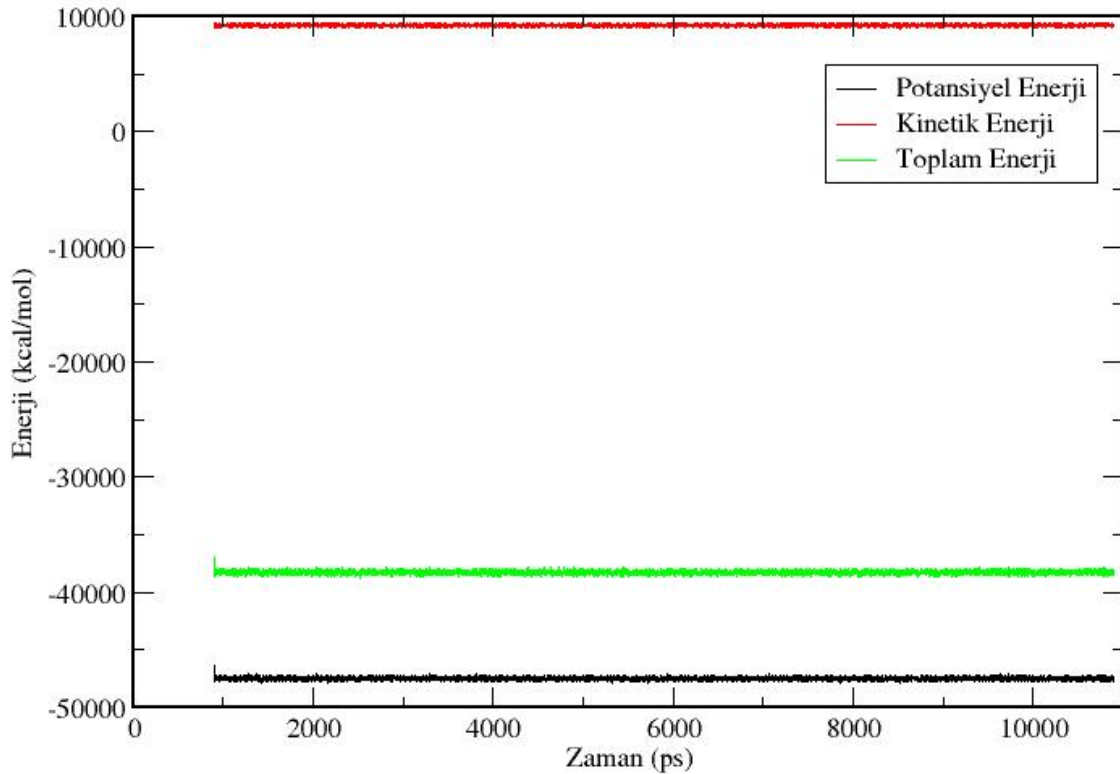
3.2.13. MM/PBSA ile Ligandların Bağlanma Sabitlerinin Hesaplanması

Moleküler Mekanik/Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı AMBER programında iki yöntem kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemleri farklı kılan metodun dayandığı programlama dilidir. Biri perl ve biri python dili kullanılarak oluşturulan iki yöntem de bağlanma enerjisi hesaplamalarında kullanıldı. Komplekslerin MD hesaplamalarından sonra RMSD grafikleri incelenerek yapının dengede olduğu bir aralık seçildi ve bu aralığa denk gelen yolak dosyası belirlendi. Bir yolak dosyasının içerdiği 2000 konformasyon resminden 100 tanesi seçildi ve dielektrik sabiti 80 alınarak MM/PBSA hesaplamaları yapıldı.

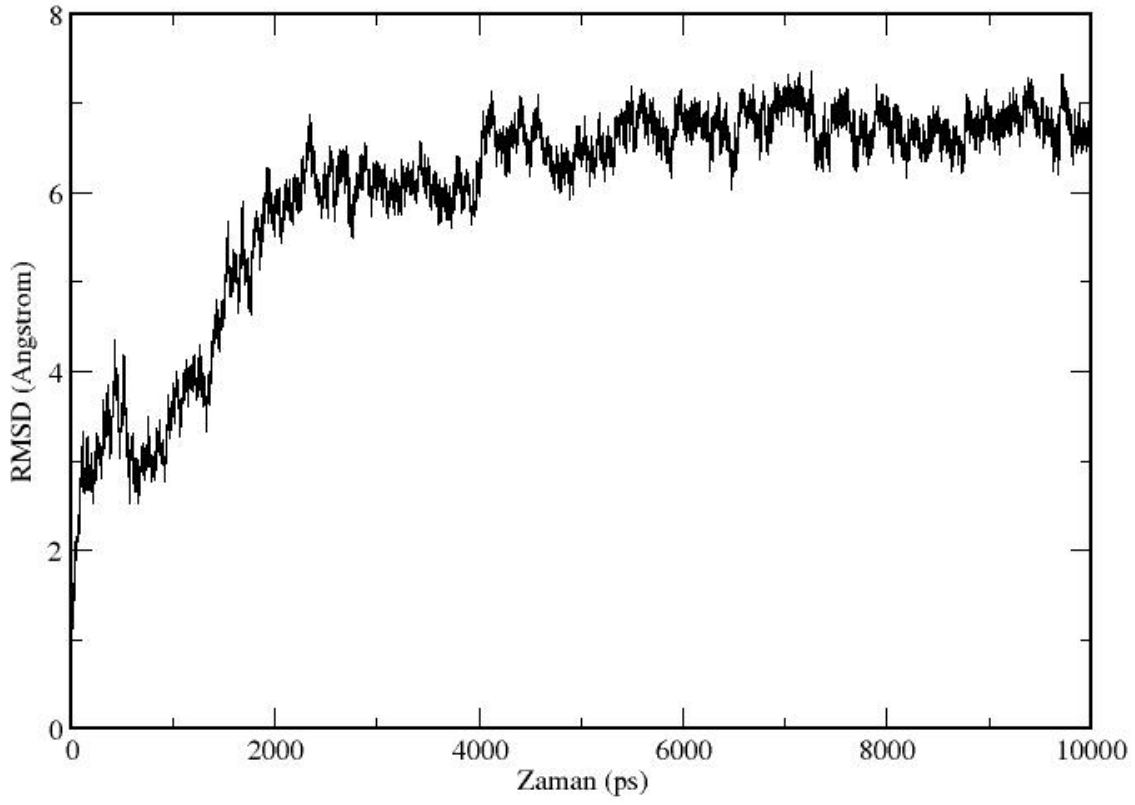
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. HIV-1 İntegrainın 3 Boyutlu Yapılarının MD Simülasyonu Analizleri

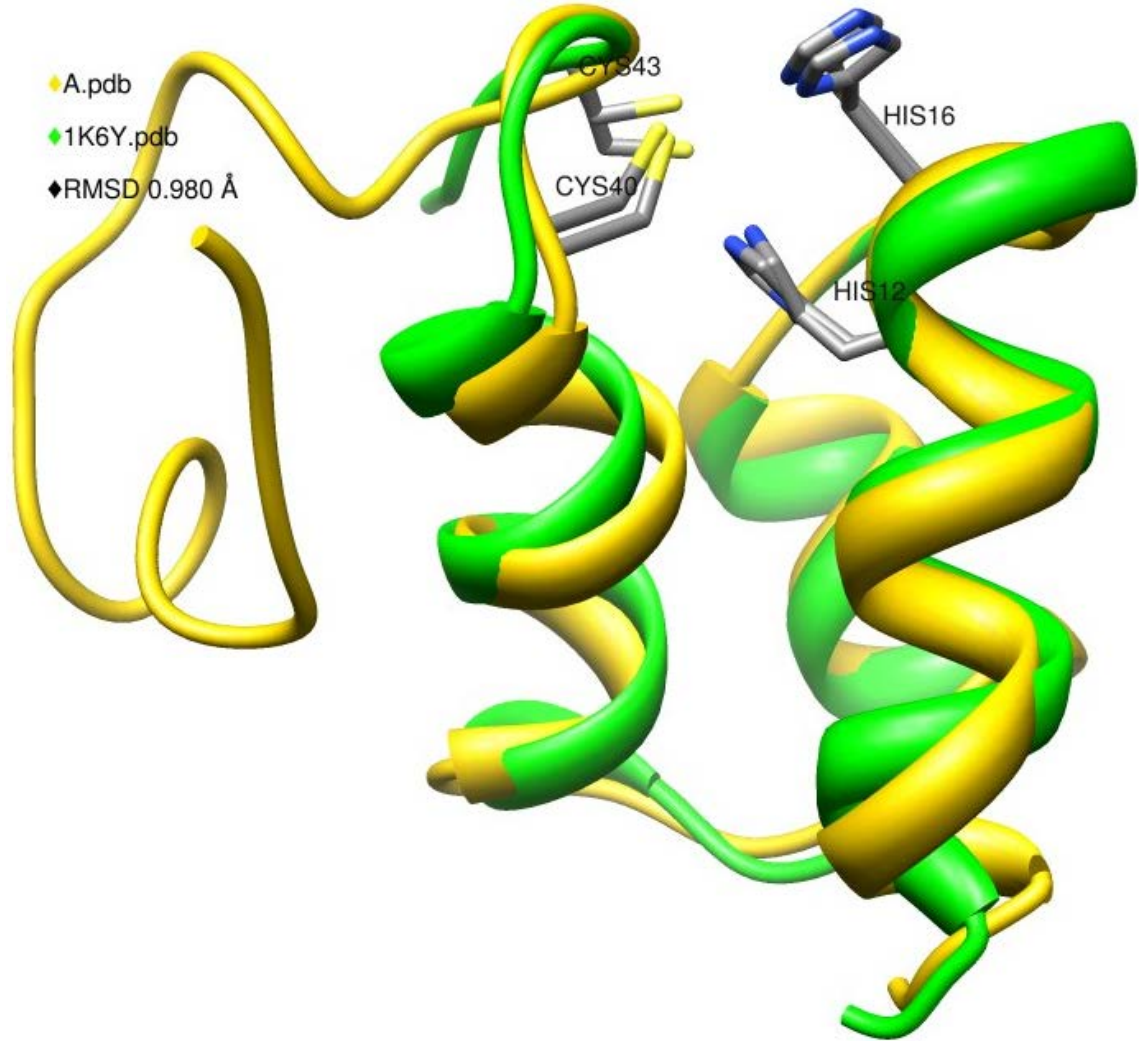
A olarak adlandırılan N-terminal bölgesinin 10 ns süresince yürütülen MD hesaplamaları sonucu zamana bağlı enerji ve RMSD değişiklikleri Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Potansiyel enerji değişiminin periyodik olarak düştüğü dolayısıyla sistemin minimum enerji değerine yakınsadığı görülmektedir. RMSD eğrisinin yaklaşık 3 ns’den sonra sabitlenmesi moleküler dinamik hesaplamalarının yeterli ve başarılı olduğunu göstermektedir. Bu hesaplamalardan elde edilen en düşük enerjili protein konformasyonu ile bu modelin hazırlanmasında kullanılan 1K6Y.pdb X-ray yapısının B zincirinin üst üste çakışması sonucu elde edilen görüntü Şekil 4.3.’te gösterilmiştir. Moleküler dinamik hesaplamalar protein yapısının genel olarak korunduğunu, çinko ve bağlandığı HIS12, HIS16, CYS40 ve CYS43 numaralı kalıntıların statik kaldığını göstermektedir.



Şekil 4.1. A proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri

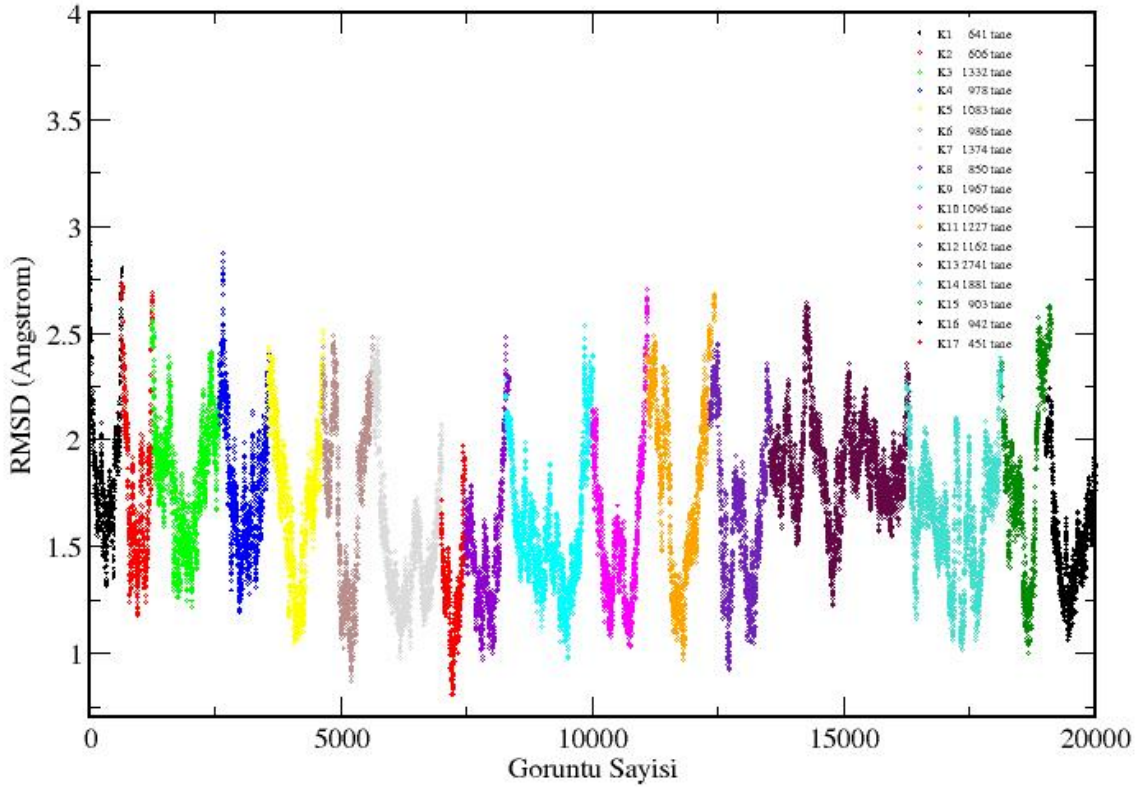


Şekil 4.2. A proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi

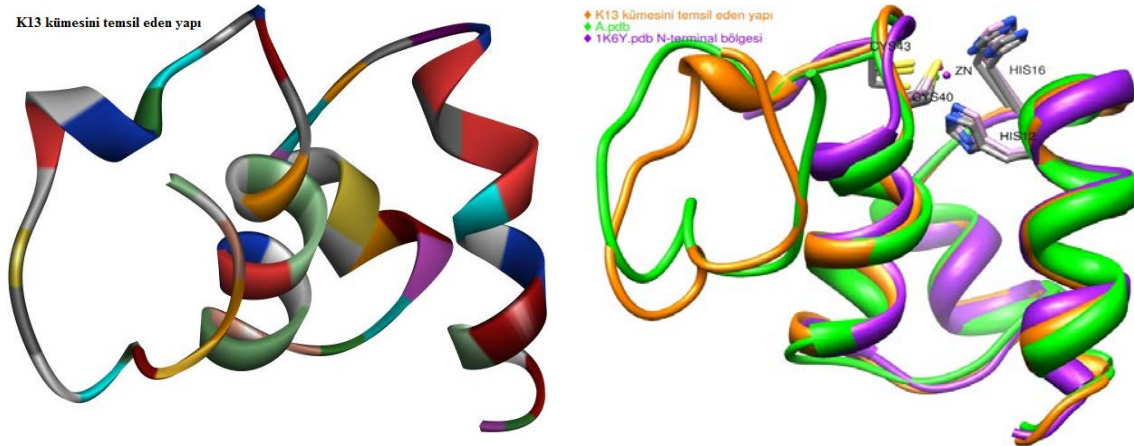


Şekil 4.3. A proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerinin 1K6Y.pdb (N-terminal bölgesinin türetildiği yapı) yapısı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü

N-terminal bölgesine ait konformasyonların kümeleme işlemleri sonucu elde edilen görüntü sayısına karşı RMSD değişimi Şekil 4.4.'te verilmiştir. Bu çalışma sonucunda yapının 17 temel konformasyonda bulunduğu görülmektedir. Buna göre K13 (Şekil 4.5.) 2741 üye proteinin en çok bulunduğu konformasyondur ve bu 20 000 görüntünün %13.71'ine denk gelmektedir. Bu konformasyonun başlangıç ve en düşük enerjili konformeri ile üst üste çakışması Şekil 4.5'te verilmiştir. Çok sayıda temel konformasyon (17 tane) elde edilmesine, yapının son kısmındaki (39-60 arası kalıntılar) hareketli ilmeğin sebep olduğu düşünülmektedir.



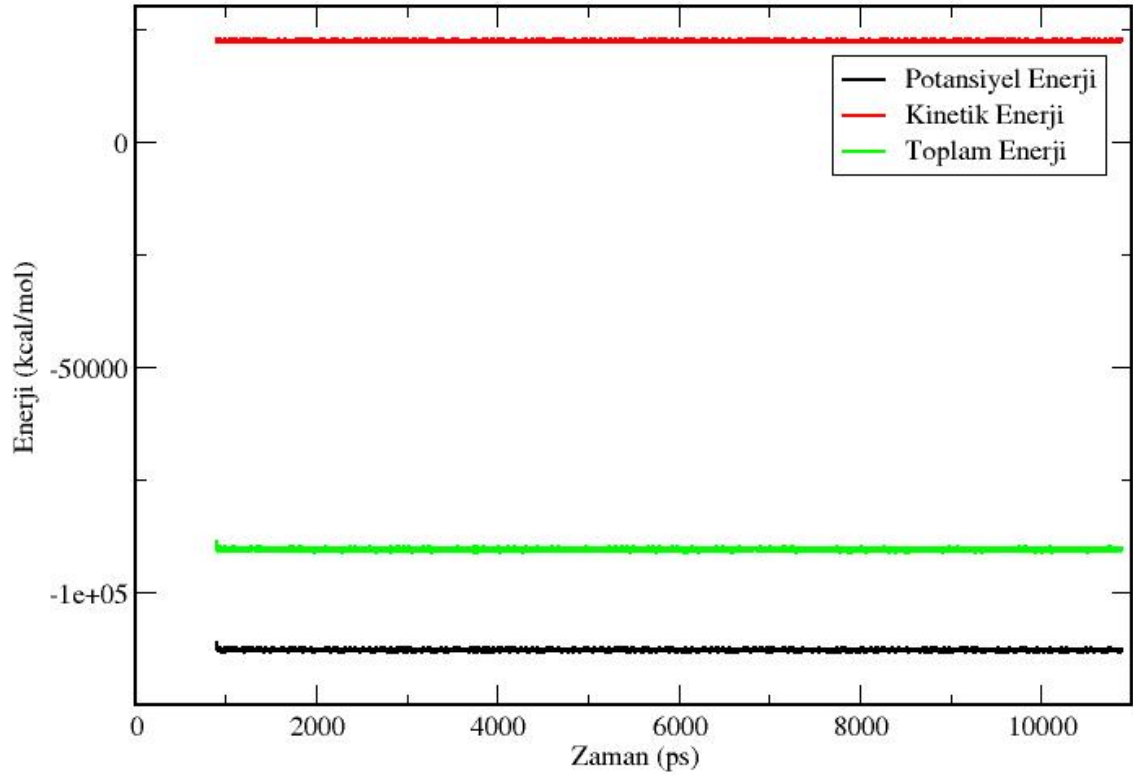
Şekil 4.4. A proteininin MD hesaplamaları sonucu elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi



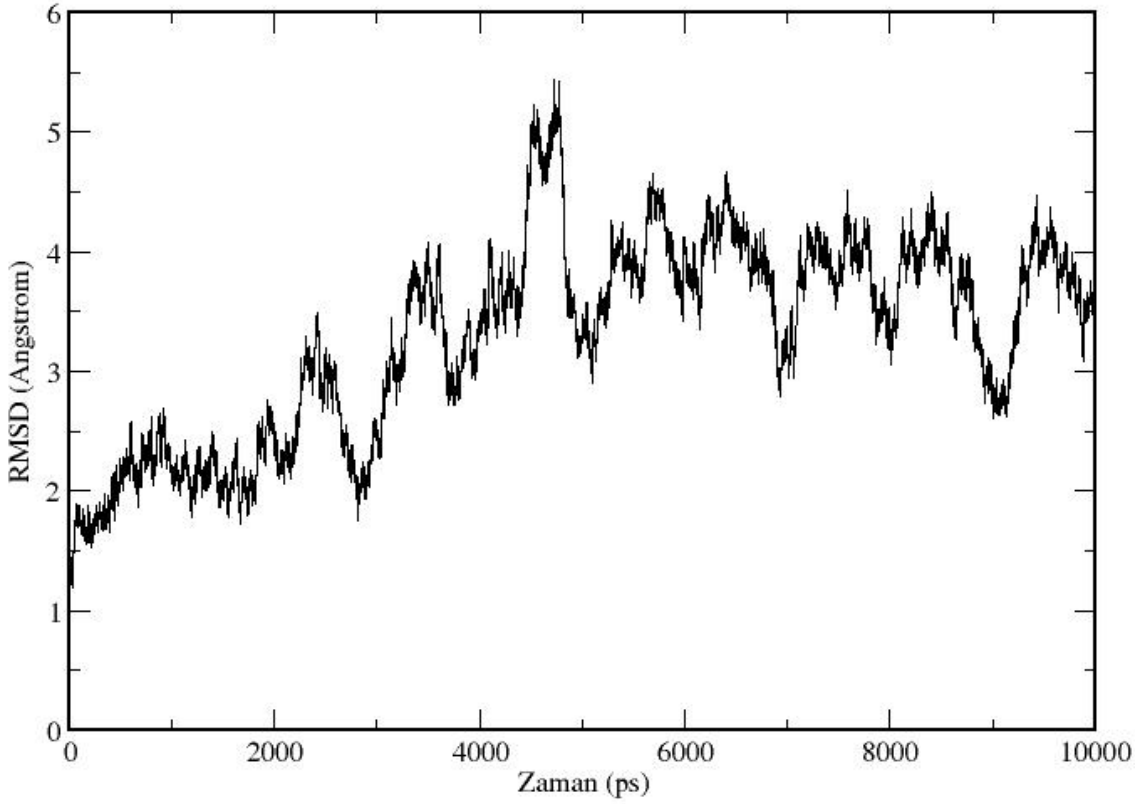
Şekil 4.5. A proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)

B olarak adlandırılan katalitik öz bölgesinin, 10 ns süresince yürütülen MD hesaplamaları sonucu zamana bağlı enerji ve RMSD değişiklikleri Şekil 4.6 ve 4.7’de verilmiştir. Potansiyel enerji değişiminin periyodik olarak düştüğü dolayısıyla sistemin minimum enerji değerine yakınsadığı ve RMSD grafiğinin her ne kadar tam stabil olmamış görünse de yaklaşık 9.5 ns’den sonra sabitlenme eğilimine girdiği görülmektedir. Bu hesaplamalardan elde edilen en düşük enerjili protein

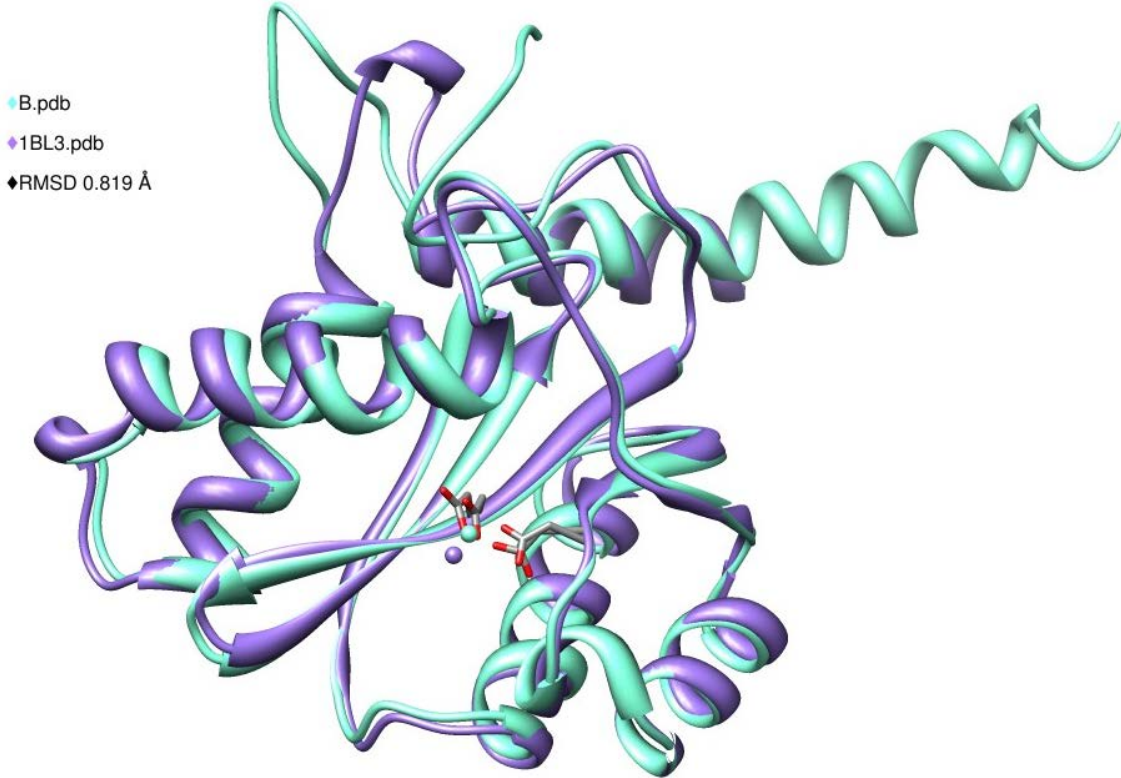
konformasyonu ile bu modelin hazırlanmasında kullanılan 1BL3.pdb X-ray yapısının üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen görüntü Şekil 4.8.'de verilmiştir. MD hesaplamaları, katalitik öz bölgesinde heliks ve çarşaf yapının tamamen statik kaldığını, hareketli ilmeklerde ise anlamlı konformasyonel değişiklikler olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.6. B proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri

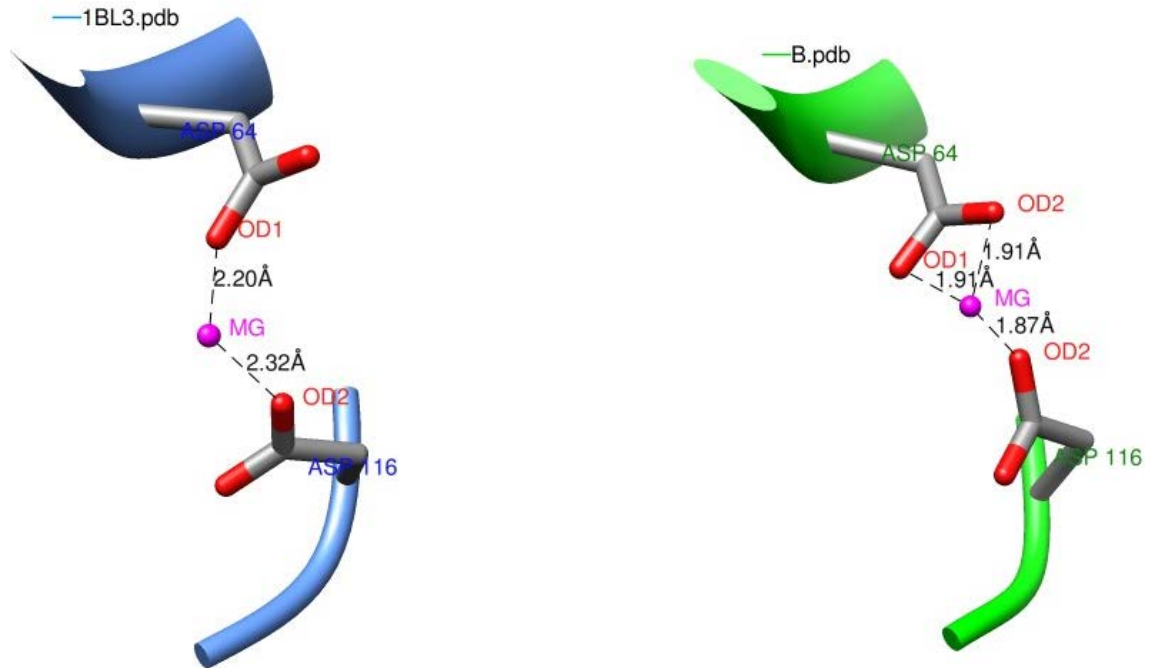


Şekil 4.7. B proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi



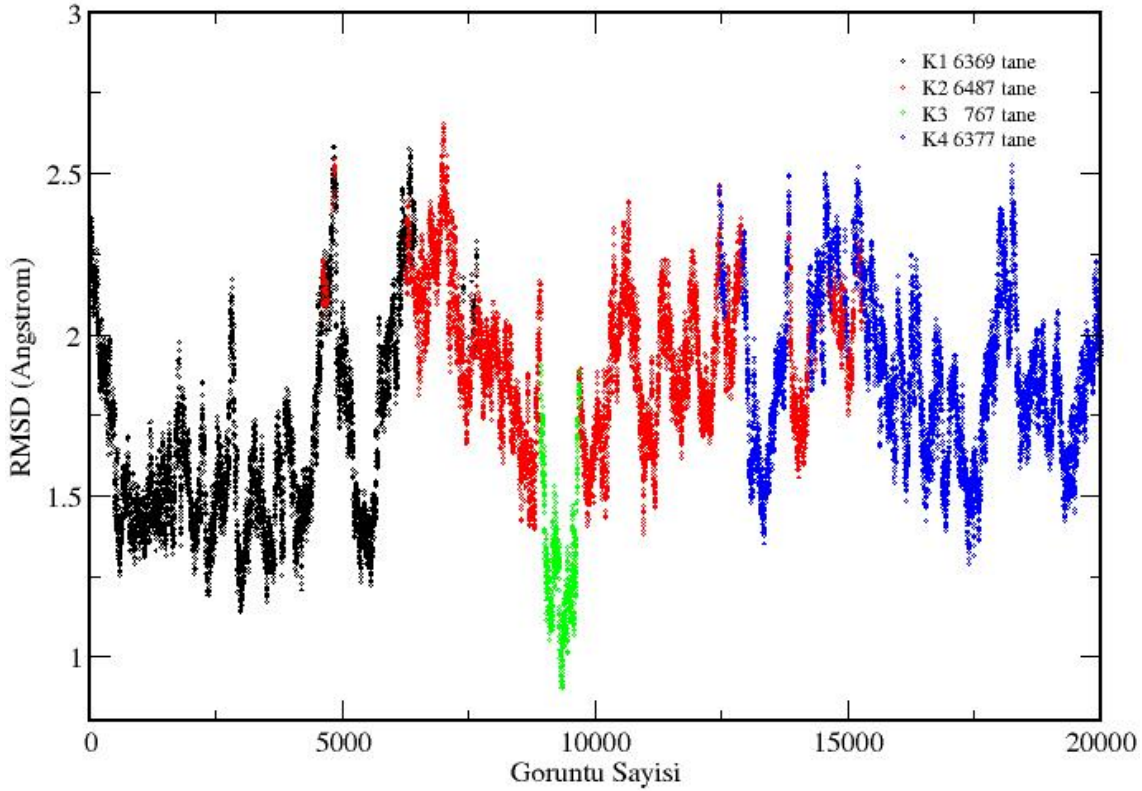
Şekil 4.8. B proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerinin 1BL3.pdb (Katalitik öz bölgesinin türetildiği yapı) yapısı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü

Katalitik merkezde 3'-işleme ve zincir transfer reaksiyonunda rol alan Mg iyonunun kristal yapıdaki ve MD simülasyonundan sonraki pozisyonları Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. İki magnezyum atomu arasında 1.33 Å'luk bir sapma olduğu, kristal yapıda bağ mesafelerinin kısmen daha uzun ve magnezyum iyonunun ASP64 OD1 ve ASP116 OD2 atomları ile koordine bağları oluşturduğu görülmektedir. MD hesaplamaları ile bağ mesafelerinin kısaldığı ve magnezyum iyonunun belirtilen atomlara ek olarak ASP64 OD2 oksijen atomu ile de bağ yapabilecek bir mesafeye kaydığı gözlenmiştir (Şekil 4.9).

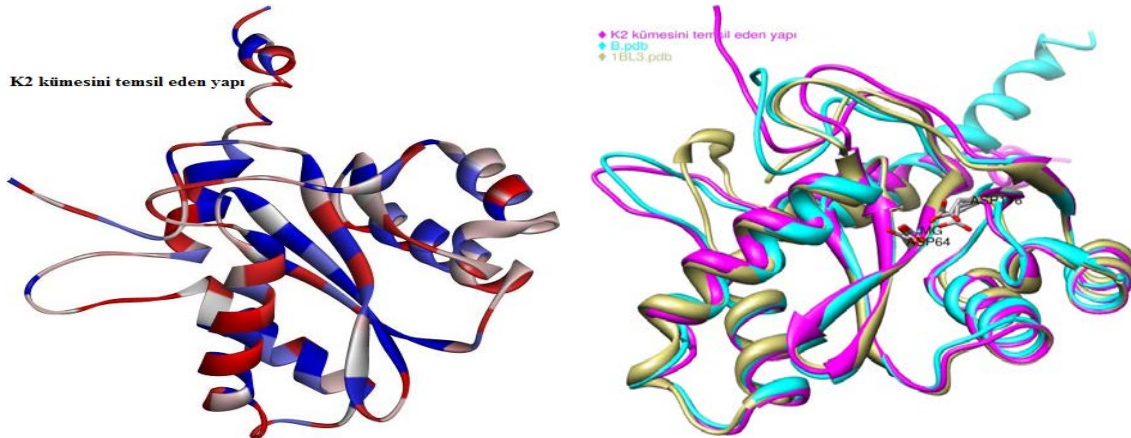


Şekil 4.9. Magnezyum iyonunun başlangıç (1BL3.pdb) ve B proteininde MD hesaplamalar sonucu oluşan konumu

Katalitik öz bölgesine ait konformasyonların kümeleme işlemleri sonucu elde edilen görüntü sayısına karşı RMSD değişimi Şekil 4.10.'da verilmiştir. Bu çalışma sonucunda yapının 4 temel konformasyonda bulunduğu görülmektedir. Buna göre K2 (Şekil 4.11) 6487 üye ile proteinin en çok bulunduğu konformasyon olup 20 000 görüntünün %32.44'ünü oluşturmaktadır. Bu konformasyonun başlangıç ve en düşük enerjili konformerini ile üst üste karşılaştırılması Şekil 4.11'de verilmiştir. Küme sayısının düşük olması katalitik öz bölgesinin N-terminal bölgesine oranla daha az dinamik davranış gösterebilecek kısımlar içerdiği ihtimalini vermektedir.



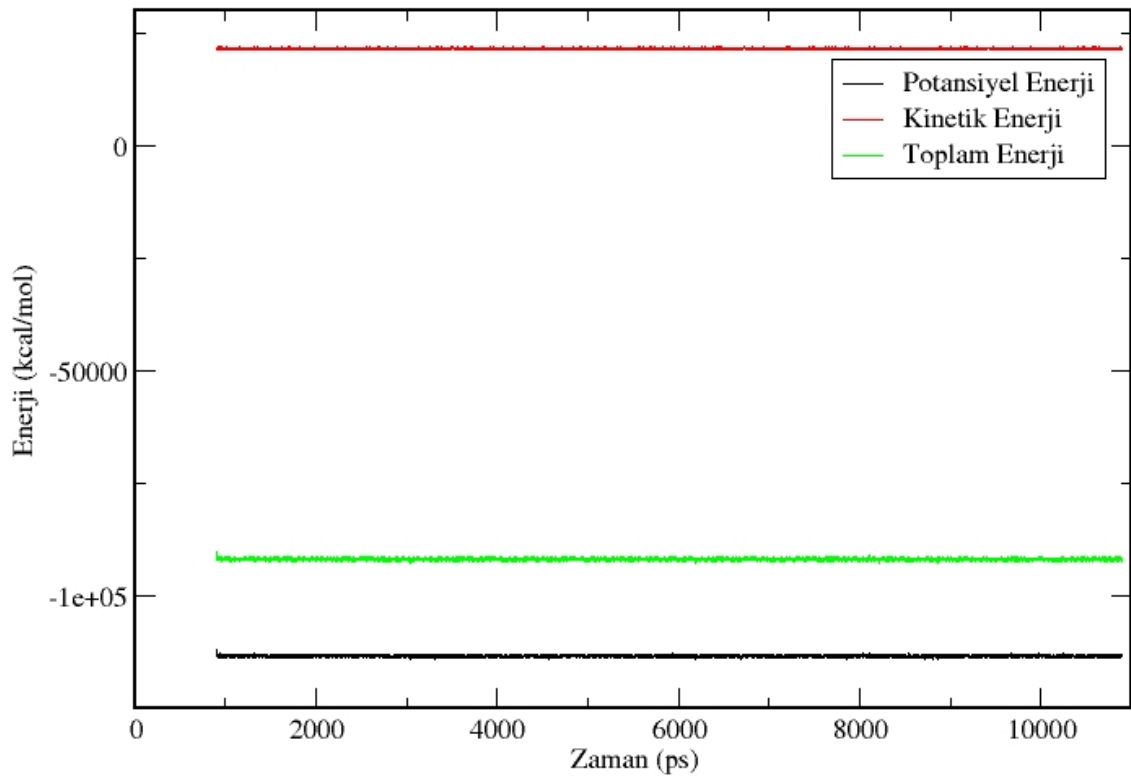
Şekil 4.10. B proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi



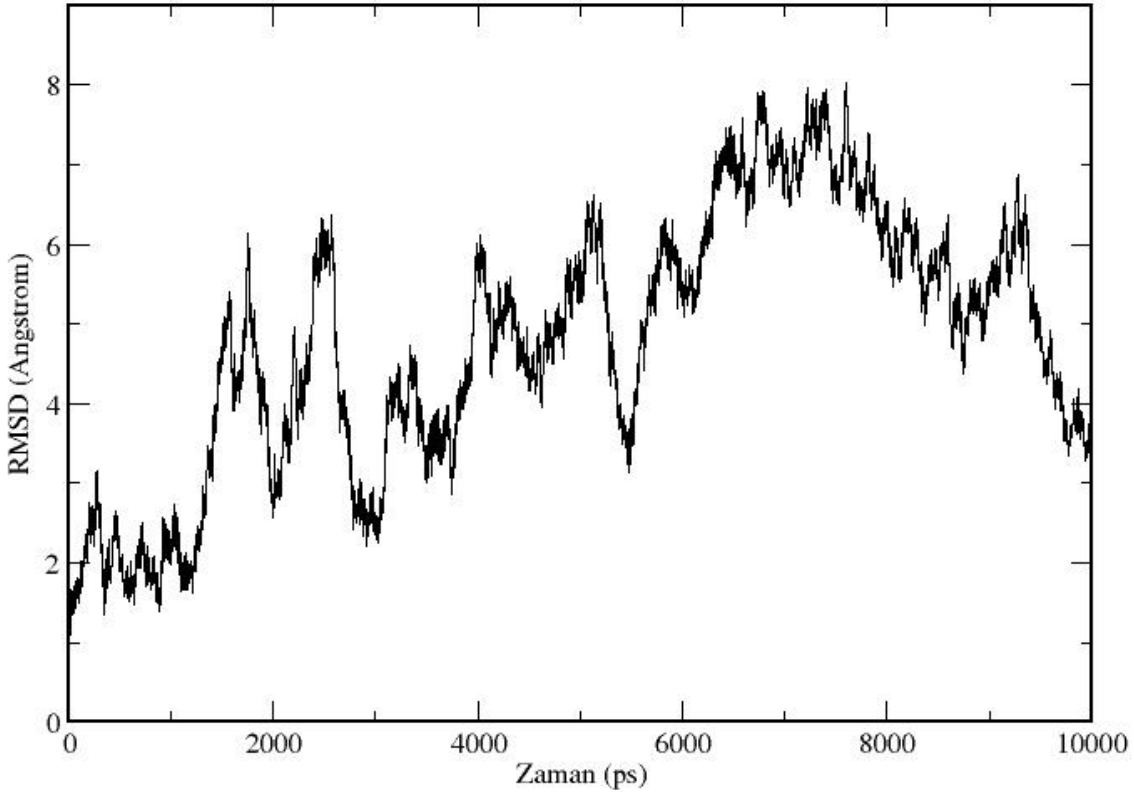
Şekil 4.11. B proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformerini ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)

C1 olarak adlandırılan C-terminal bölgesinin (18 kalıntısı eksik) 10 ns süresince yürütülen MD hesaplamaları sonucu zamana bağlı enerji ve RMSD değişiklikleri Şekil 4.12. ve 4.13.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değişiminin periyodik olarak düştüğü dolayısıyla sistemin minimum enerji değerine yakınsadığı görülmektedir. RMSD'de sürekli yükselme ve alçalmaların olması sistemin ciddi konformasyonel değişikliklere uğradığının göstergesi olup bunun sebebi muhtemelen bu bölgede diğer bölgelere

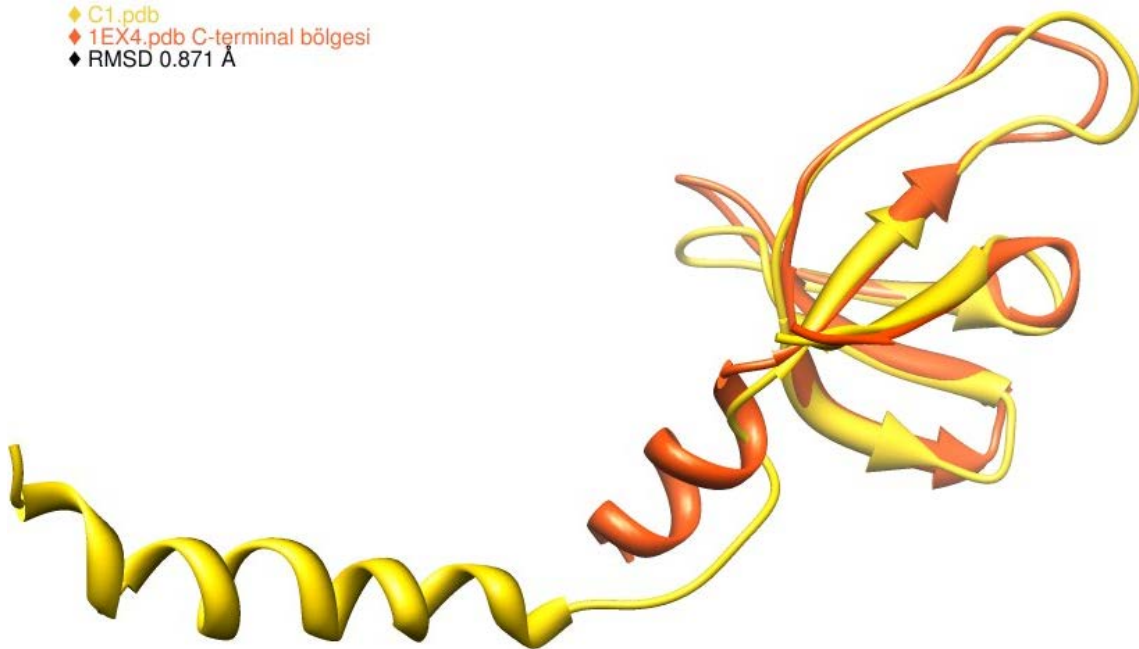
kıyasla (N-terminal ve katalitik öz) fazla dinamik kısımların olmasına bağlanabilir. Özellikle 196-222 arası kalıntılarda heliks yapıların konformasyonel değişikliğe uğradığı görülmektedir. Bununla beraber 10 ns'ye yaklaşıldığında RMSD değerinin 3.5-4 Å değerlerine düştüğü gözlenmektedir. Bu hesaplamalardan elde edilen en düşük enerjili protein konformasyonu ile bu modelin hazırlanmasında kullanılan 1EX4.pdb X-ray yapısının üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü Şekil 4.14.'te gösterilmiştir. C-terminal bölgesinde çarşaf yapının korunduğu, C-terminal ile katalitik öz bölgesini birleştiren heliks yapının ise konformasyonel değişikliklere uğradığı ve bozulma eğiliminde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.12. C1 proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri

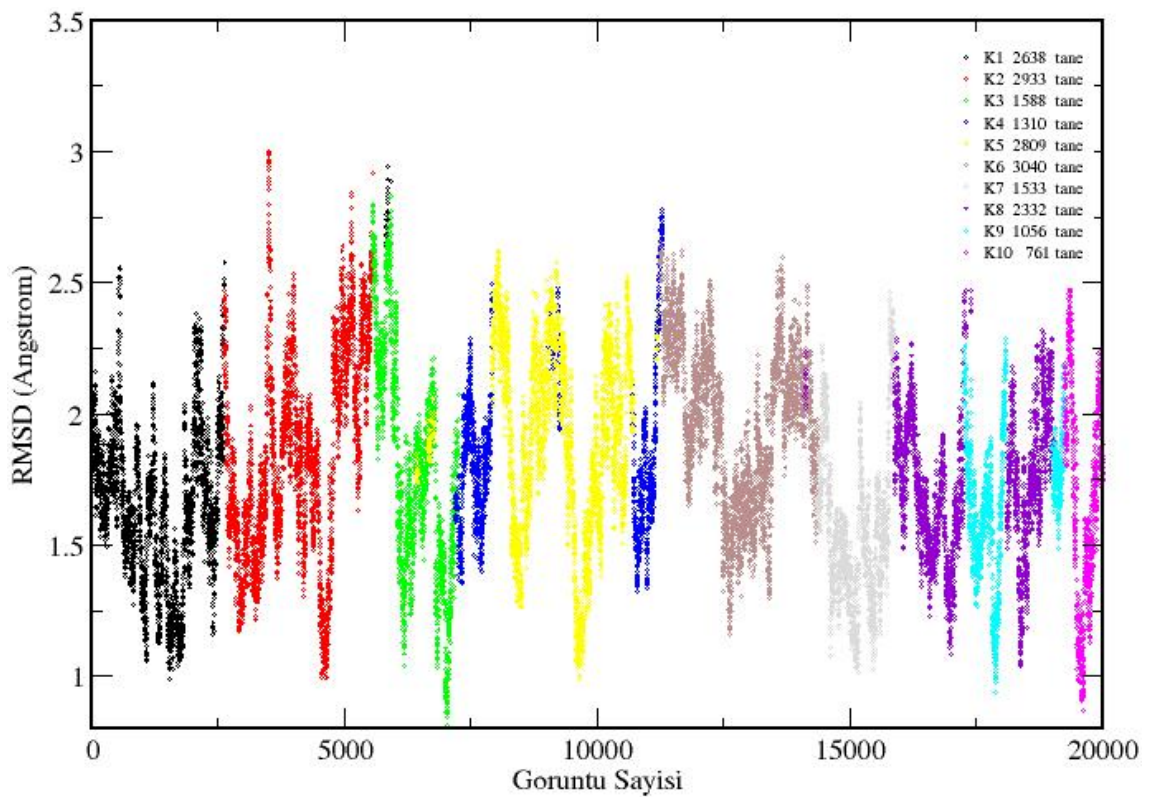


Şekil 4.13. C1 proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi

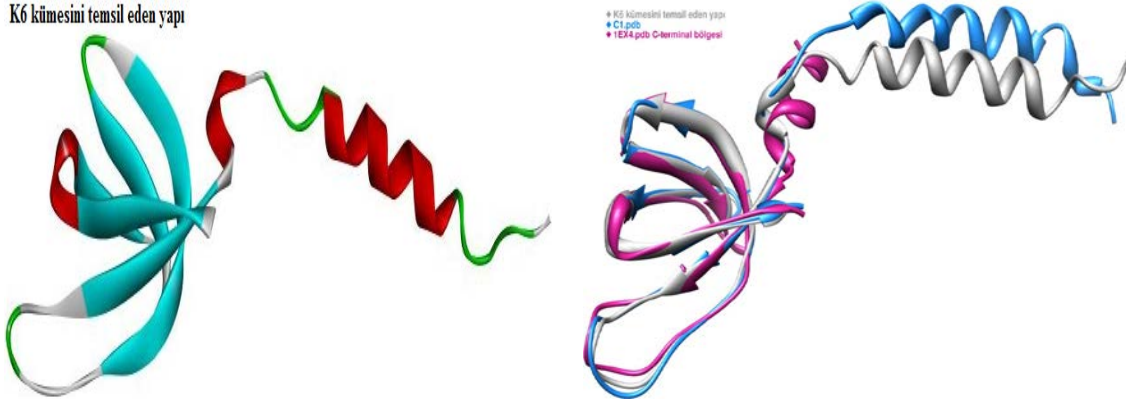


Şekil 4.14. C1 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerinin 1EX4.pdb (C-terminal bölgesinin türetildiği yapı) yapısı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü

C-terminal bölgesine ait konformasyonların kümeleme işlemleri sonucu elde edilen görüntü sayısına karşı RMSD değişimi Şekil 4.15.'te verilmiştir. Bu çalışma sonucunda yapının 10 temel konformasyonda bulunduğu görülmektedir. Buna göre K6 (Şekil 4.16) 3040 üye ile proteinin en çok bulunduğu konformasyondur ve bu 20 000 görüntünün %15.20'sine denk gelmektedir. Bu konformasyonun başlangıç ve en düşük enerjili konformeri ile üst üste karşılaştırılması Şekil 4.16'da verilmiştir. C-terminal bölgesinde çarşaf yapının korunmasına rağmen, C-terminal ile katalitik öz bölgesini birleştiren heliks yapıdaki konformasyonel değişiklikler ve bozulmalar küme sayısının fazla olmasına yol açmış olabilir.

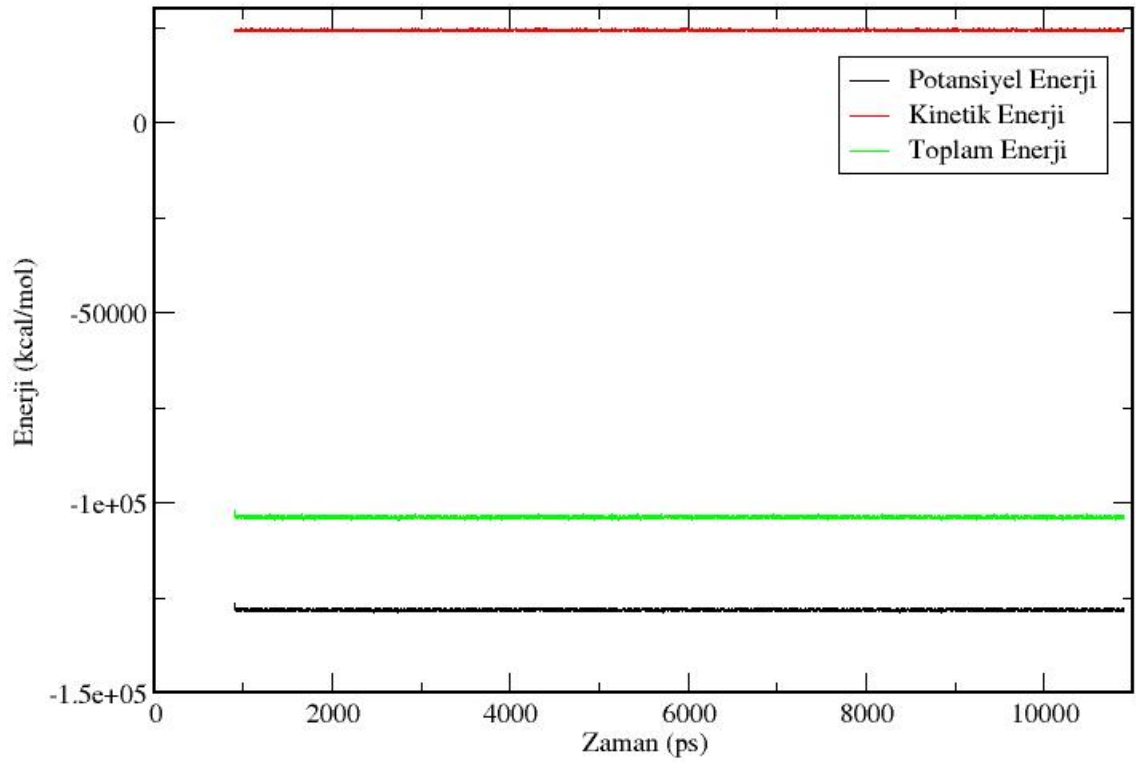


Şekil 4.15. C1 proteininin MD hesaplamaları sonucu elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi

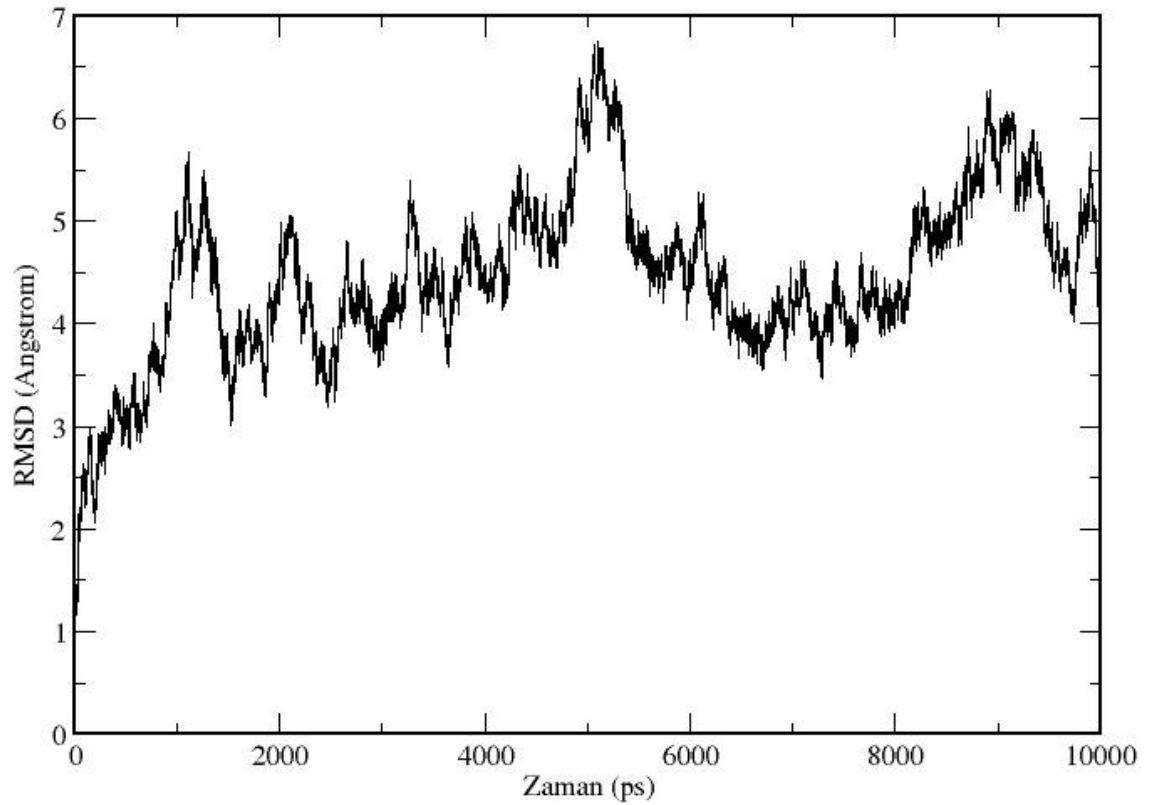


Şekil 4.16. C1 proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (**Sol**) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (**Sağ**)

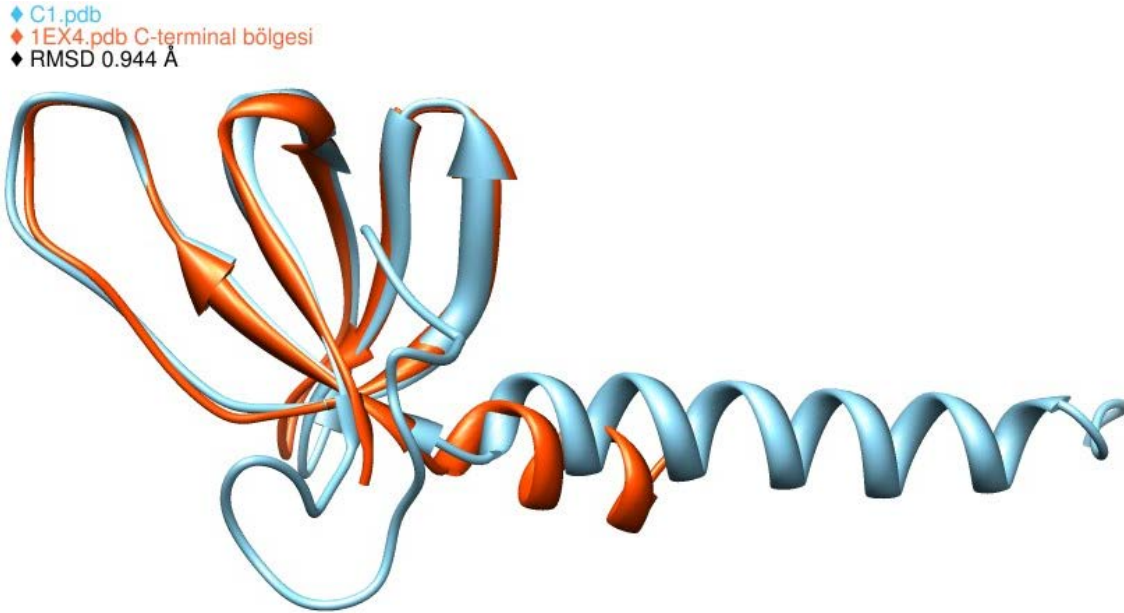
C2 olarak adlandırılan C-terminal bölgesinin (18 kalıntı eklenmiş) 10 ns süresince yürütülen MD hesaplamaları sonucu zamana bağlı enerji ve RMSD değişiklikleri Şekil 4.17. ve 4.18.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değişimin periyodik olarak düştüğü dolayısıyla sistemin minimum enerji değerine yakınsadığı görülmektedir. Kalıntısı eksik (18 kalıntı) yapıya göre RMSD eğrisinin daha stabil olduğu görülmektedir. Bu hesaplamalardan elde edilen en düşük enerjili protein konformasyonu ile bu modelin hazırlanmasında kullanılan 1EX4.pdb X-ray yapısının üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü Şekil 4.19.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.17. C2 proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri

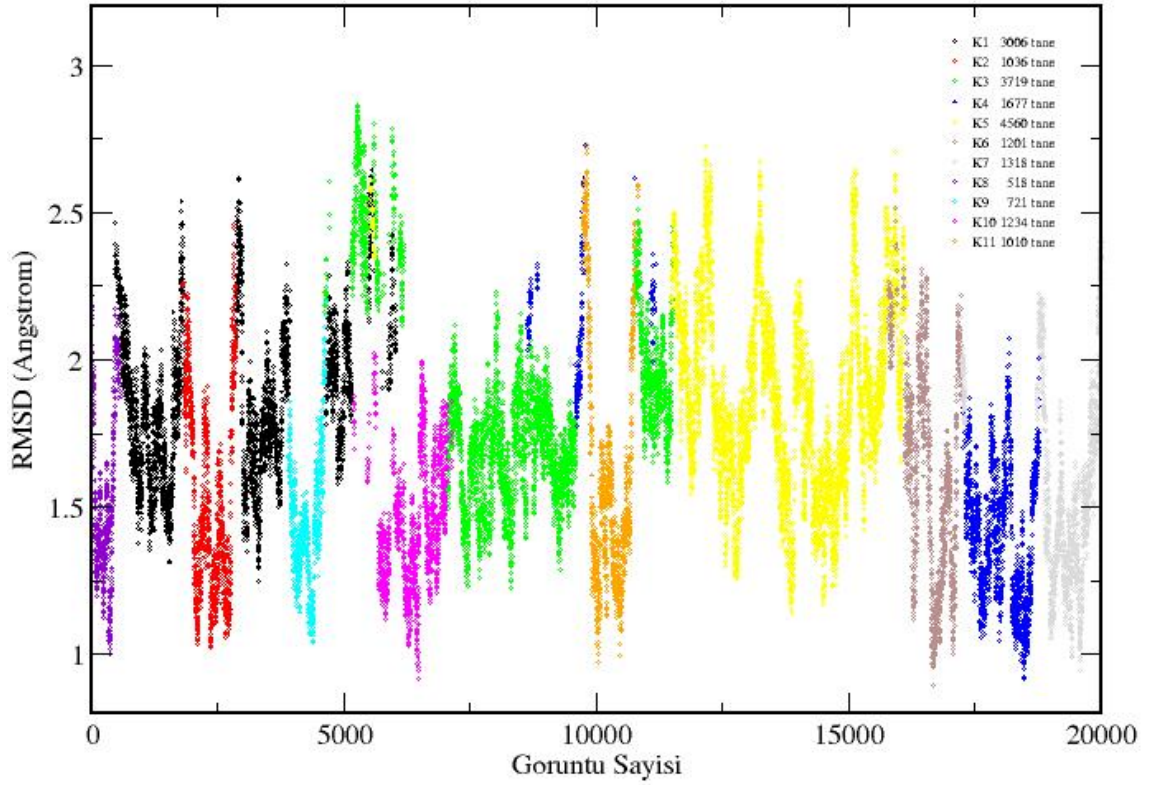


Şekil 4.18. C2 proteininin 10 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi

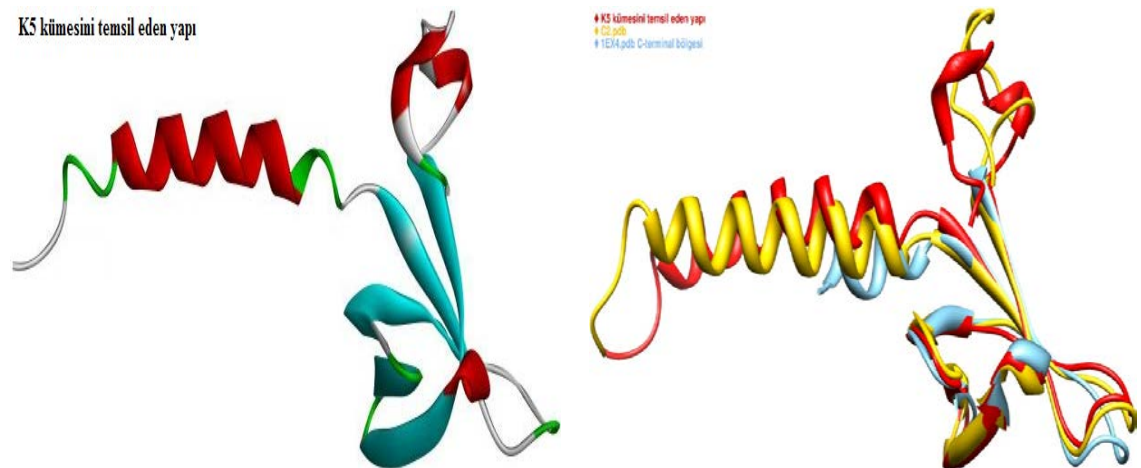


Şekil 4.19. C2 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerinin 1EX4.pdb (C-terminal bölgesinin türetildiği yapı) yapısı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü

C-terminal bölgesine (18 kalıntı eklenmiş) ait konformasyonların kümeleme işlemleri sonucu elde edilen görüntü sayısına karşı RMSD değişimi Şekil 4.20.'de verilmiştir. Bu çalışma sonucunda yapının 11 temel konformasyonda bulunduğu görülmektedir. Buna göre K5 (Şekil 4.21) 4560 üye ile proteinin en çok bulunduğu konformasyondur ve bu 20 000 görüntünün %22.80'ine tekabül etmektedir. Bu konformasyonun, başlangıç ve en düşük enerjili konformerini ile üst üste çakıştırılması Şekil 4.21'de verilmiştir. Eksik kalıntılı yapıya göre heliks yapıda nispeten daha statik davranış gözlenirken konformasyon sayısının fazlalığı son 18 kalıntıdaki ciddi dinamik değişikliklere bağlanabilir.



Şekil 4.20. C2. proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi

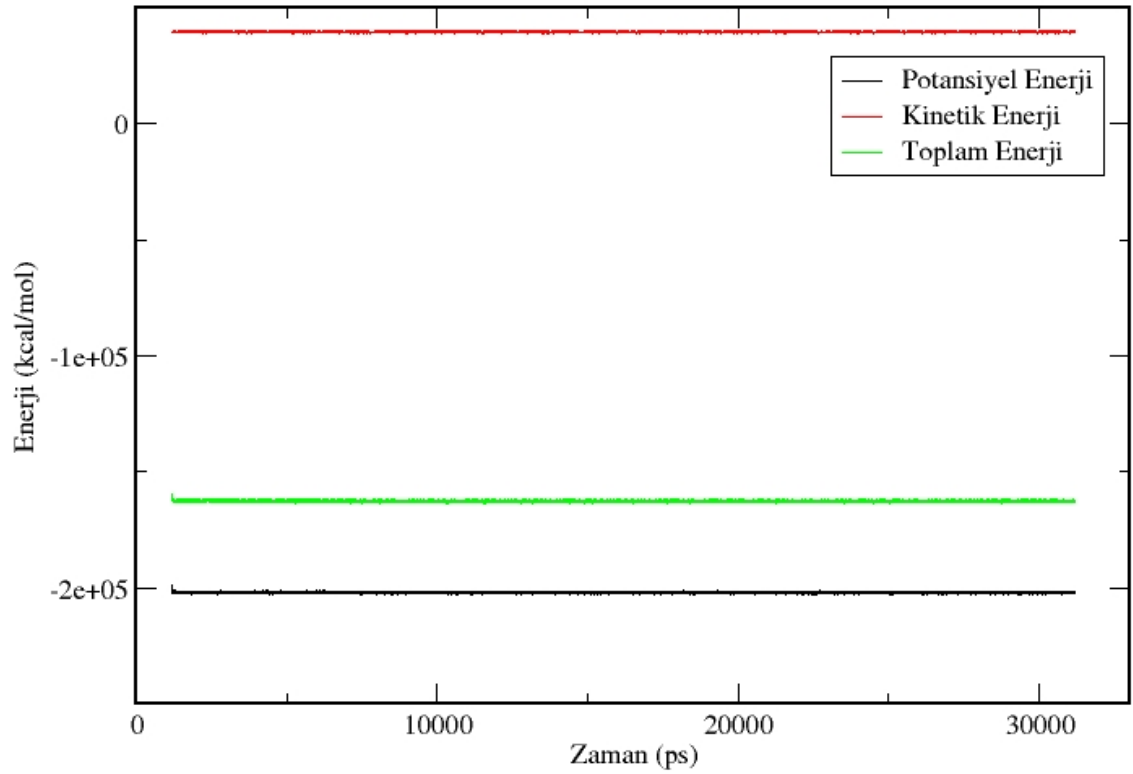


Şekil 4.21. C2 proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformerini ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)

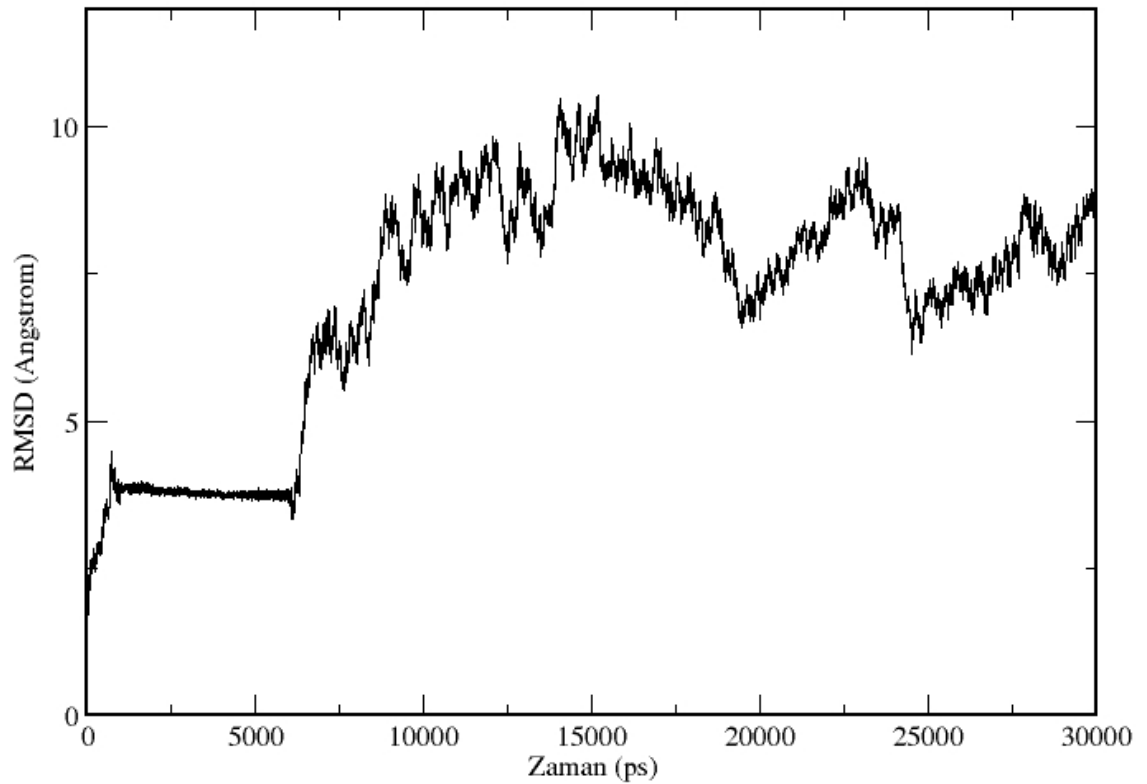
D olarak adlandırılan ve 1-270 uzunluğundaki (18 kalıntı eksik) proteinin 30 ns süresince yürütülen MD hesaplamaları sonucu zamana bağlı enerji ve RMSD değişiklikleri Şekil 4.22. ve 4.23.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değişimin periyodik olarak düştüğü dolayısıyla sistemin minimum enerji değerine yakınsadığı görülmektedir. RMSD değerlerinde hızlı bir artış olduğu ve 20 ve 25. ns'lerde keskin

bir şekilde düştüğü görülmektedir. MD hesaplamaları süresinin arttırılmasıyla daha stabil bir hale ulaşılacağı düşünülmektedir ancak daha önceden de belirtildiği gibi bu, çok büyük zaman ve bilgisayar gücü gerektirdiğinden 30 ns'lik bir MD simülasyonu gerçekleştirilebilmiştir. Her bir ns'lik MD çalışmasının 12 CPU'luk bir bilgisayar gücü kullanımıyla 30-50 saat arasında değişen bir sürede tamamlandığı göz önüne alındığında 30 ns'lik MD simülasyonu oldukça makul bir süre olduğu görülmektedir.

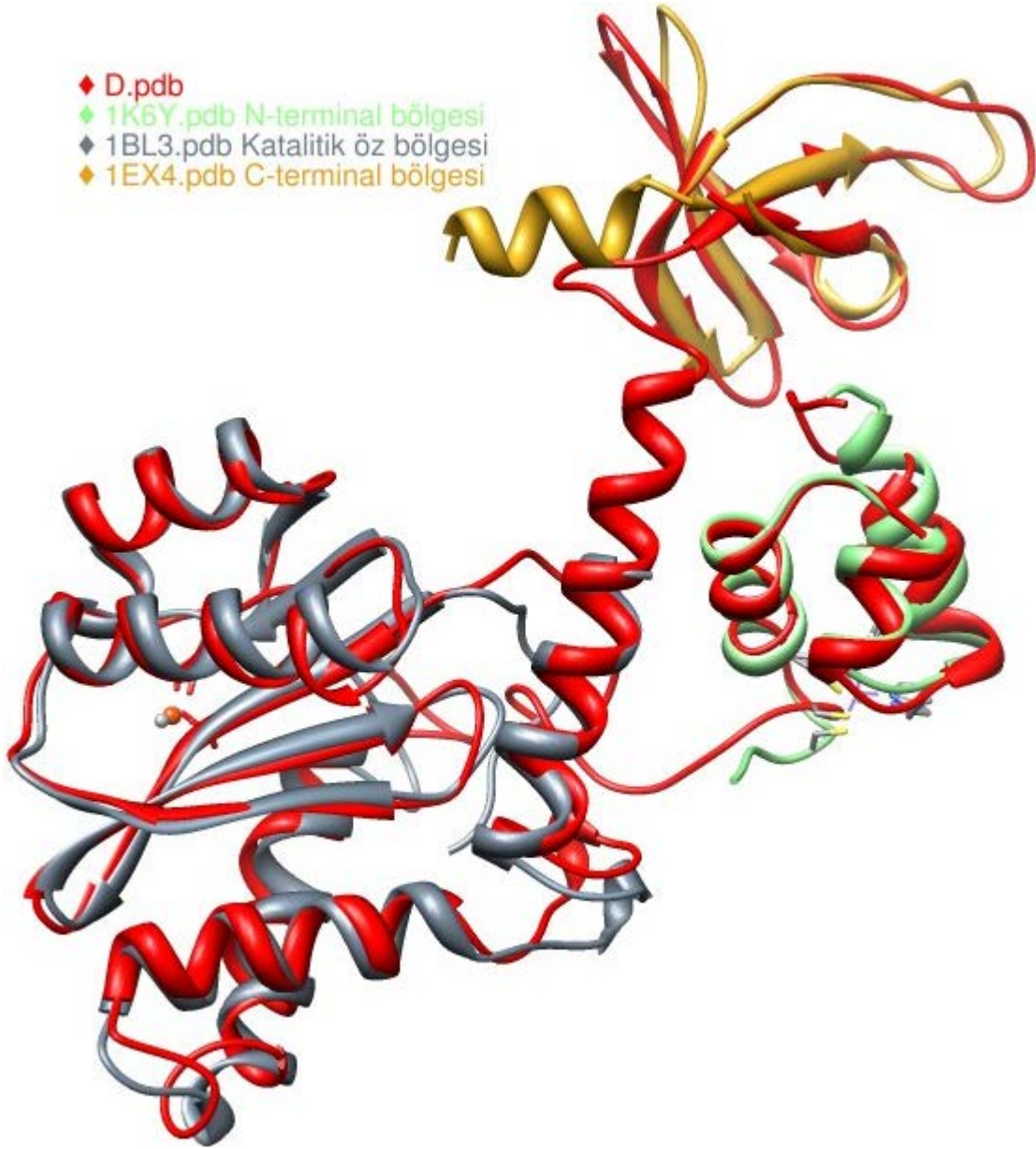
Bu hesaplamalardan elde edilen en düşük enerjili protein konformasyonu ile bu modelin hazırlanmasında kullanılan yapıların (1K6Y.pdb, 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb) üst üste çakışması sonucu elde edilen görüntü Şekil 4.24.'te gösterilmiştir. Bunun yanında, bu konformerin N-terminal (A), katalitik öz (B) ve C-terminal (C1) yapılarının MD sonucu elde edilen ve düşük enerjili bir konformere tekabül eden yapılar ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü Şekil 4.24'te verilmiştir. D proteininin N-terminal bölgesi, bu bölgenin oluşturulmasında kullanılan 1K6Y.pdb kristal yapısı ile karşılaştırıldığında protein kalıntılarının başlangıç pozisyonlarını fazla değiştirmede (Şekil 4.24.) gözlenmektedir. Bunun yanında, 4-8 arası kalıntıların heliks yapılarında bozulmalar meydana geldiği görülmektedir. Sadece N-terminal bölgesi içeren MD hesaplamaları yapılmış A proteininde yapının daha iyi korunduğu (Şekil 4.25.) belirlenmiştir. Kristal 1BL3.pdb yapısından faydalanılarak oluşturulan D proteininin katalitik bölgesi için de benzer şeyler söylemek mümkündür (Şekil 4.24.). Çarşaf ve heliks yapılar genel olarak korunsa da 112-115 ve 164-168 arasındaki kalıntılarda bozulmalar meydana gelmiştir. Diğer taraftan 50-60, 169-171 ve 185-195 arasındaki hareketli bölgelerde anlamlı konformasyonel değişimler gözlenmiştir. Sadece katalitik bölge içeren ve MD hesaplamaları yapılmış B proteini, hareketli bölgeler dışında D proteininin aynı bölgesi ile uyum içerisindedir (Şekil 4.25.). C-terminal bölgesindeki 217-222 arası kalıntılardaki heliks yapının bütün modellerin MD hesaplamaları sırasında az veya çok değişmesi dikkat çekici bir husus olarak görünmektedir. D proteininin bu bölgesi ile bölgenin oluşturulmasında kullanılan 1EX4.pdb yapısının C-terminal bölgesi karşılaştırıldığında; hareketli bölgelerdeki konformasyonel değişiklikler dışında D proteininin C-terminal bölgesinde yapının korunduğu gözlenmektedir (Şekil 4.24.). D proteininin C-terminal bölgesi ile sadece C-terminal bölgesi içeren ve MD hesaplamaları yapılmış C1 proteini kıyaslandığında da benzer durumlar söz konusudur.



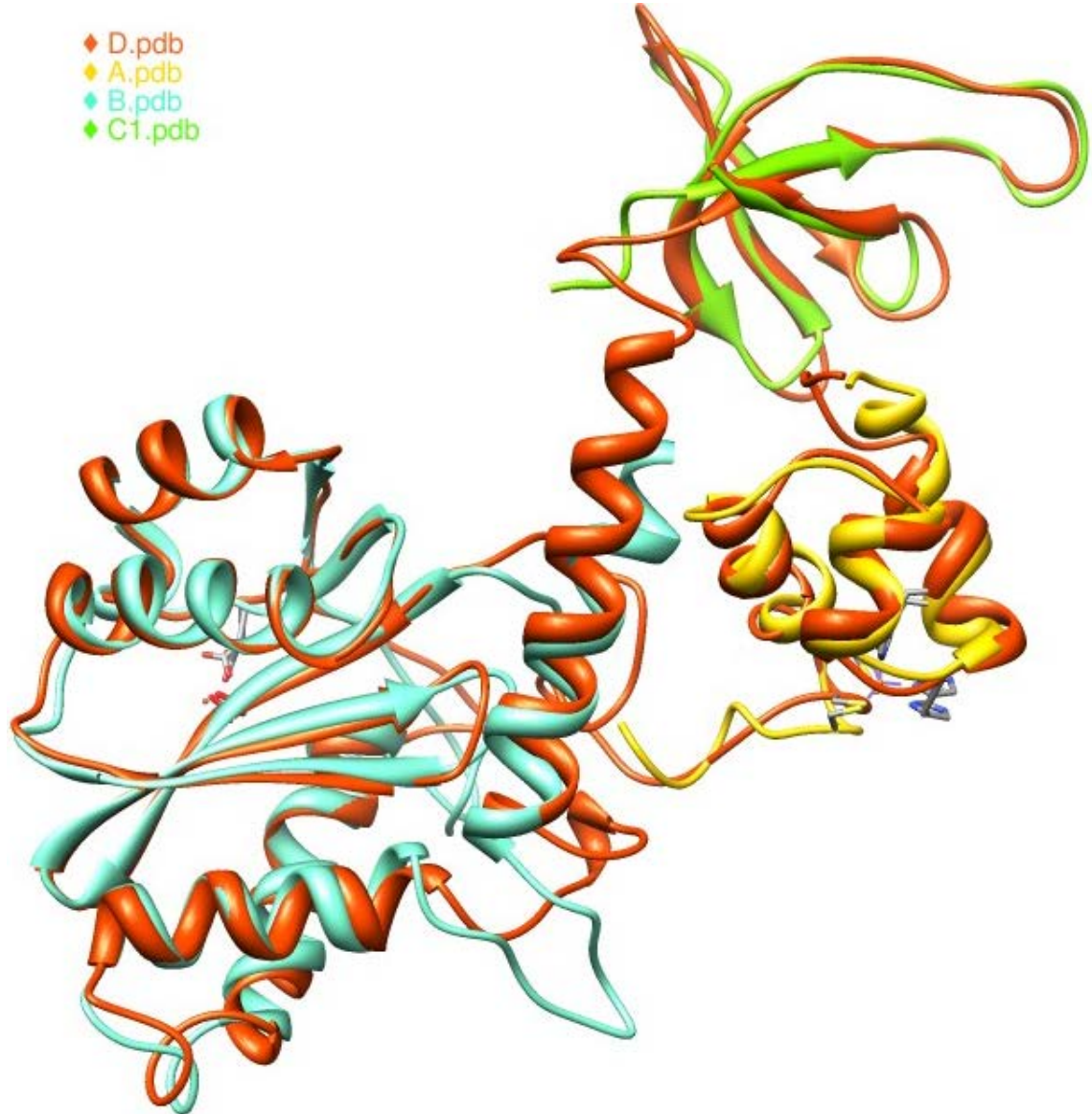
Şekil 4.22. D proteininin 30 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri



Şekil 4.23. D proteininin 30 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi



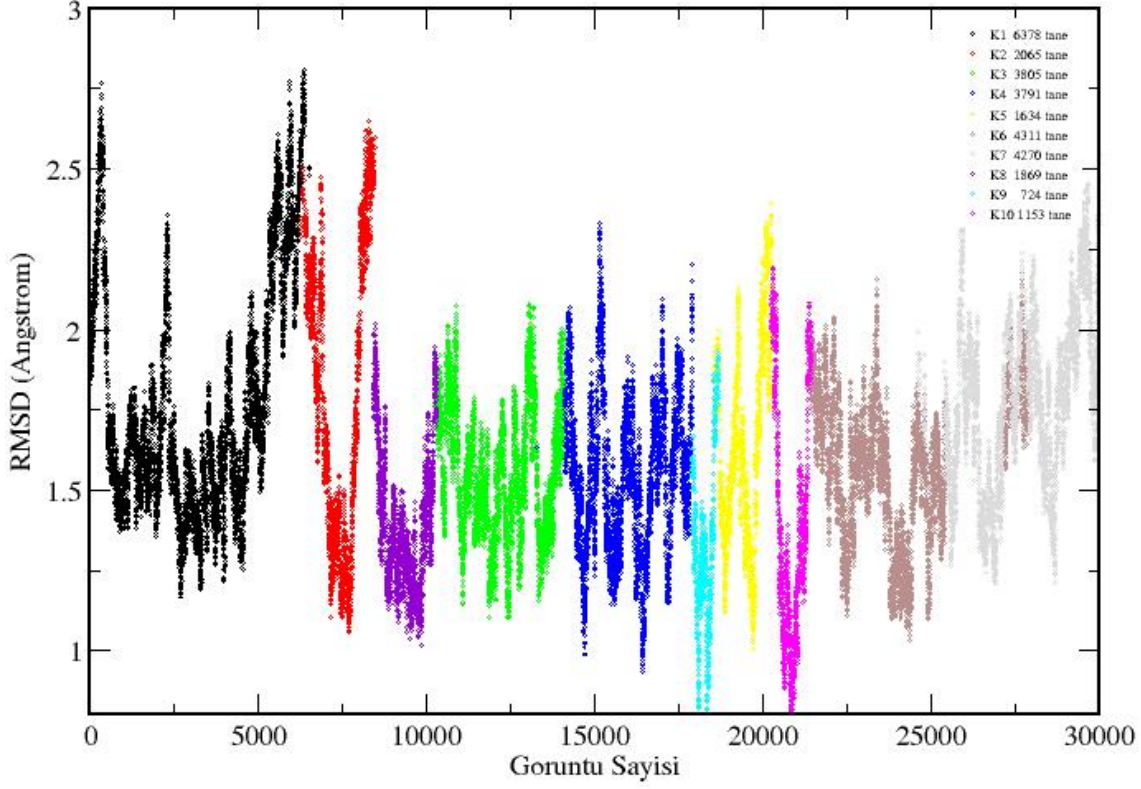
Şekil 4.24. D proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin, başlangıç yapısı (1K6Y.pdb, 1WJD.pdb, 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb) ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü



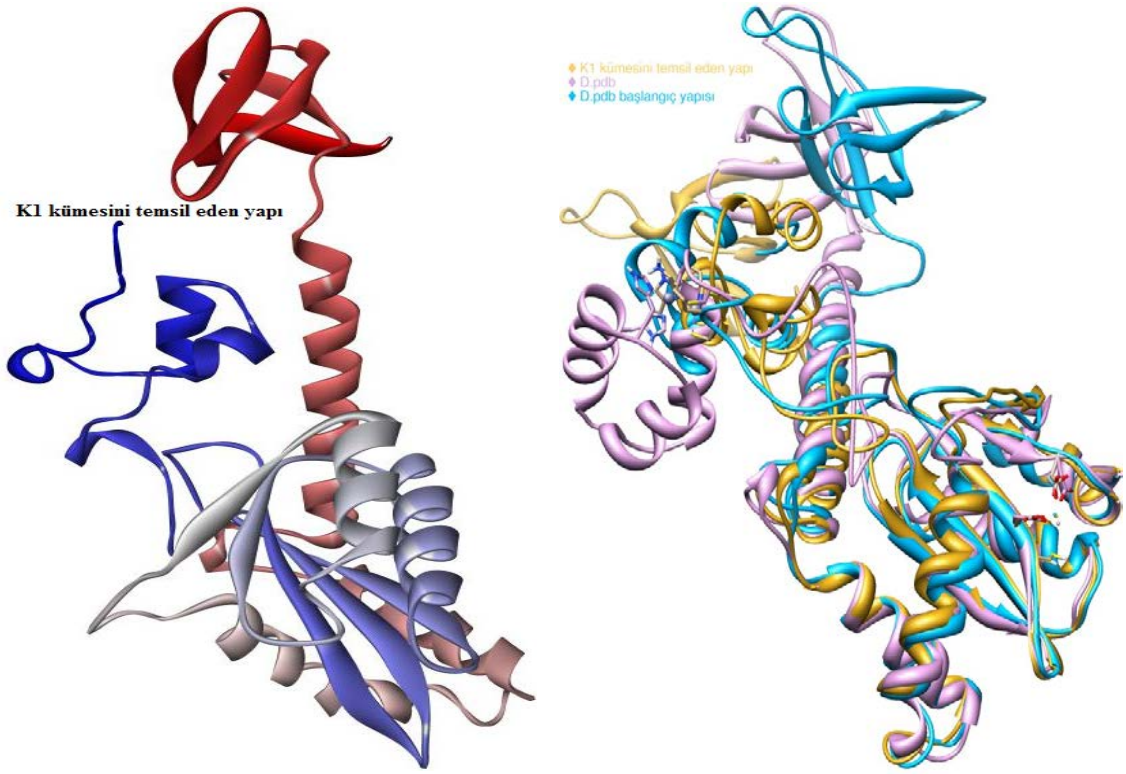
Şekil 4.25. D proteininin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin A, B ve C1 yapılarının MD sonucu elde edilen ve düşük enerjili bir konformere tekabül eden yapılar ile üst üste çakışmasından elde edilen görüntü

1-270 arası kalıntıları içeren yapıya ait ve son 15 ns MD hesaplamalarından elde edilen konformasyonların kümeleme işlemleri sonucu elde edilen görüntü sayısına karşı RMSD değişimi, Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda yapının 10 temel konformasyonda bulunduğu görülmektedir. Buna göre K1 (Şekil 4.27) 6378 üye ile proteinin en çok bulunduğu konformasyondur ve bu 30 000 görüntünün %21.26'sını oluşturmaktadır. Bu konformasyonun, başlangıç ve en düşük enerjili konformeri ile üst üste çakıştırılması Şekil 4.27'de verilmiştir. Katalitik öz bölgesi temel alınarak yapılan çakıştırma işleminde K1 kümesini temsil eden yapıya ait katalitik öz ve N-terminal bölgelerinin, en düşük enerjili proteindeki aynı bölgeler ile başlangıç yapısına göre daha

uyumlu olduğu görülmektedir. Ancak C-terminal bölgesinin 196-222 arası kalıntılarının heliks yapısındaki bozulmalar bu kalıntıları oynak bir yapıya dönüştürmüştür. Bu oynak bölge nedeniyle C-terminal bölgesinin konumunda büyük değişimler gözlenmiştir. Her üç yapının C-terminal bölgelerinin farklı yöndikleri şekiden de görülmektedir.



Şekil 4.26. D proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi (son 15 ns)



Şekil 4.27. D proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (**Sol**) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformerini ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (**Sağ**)

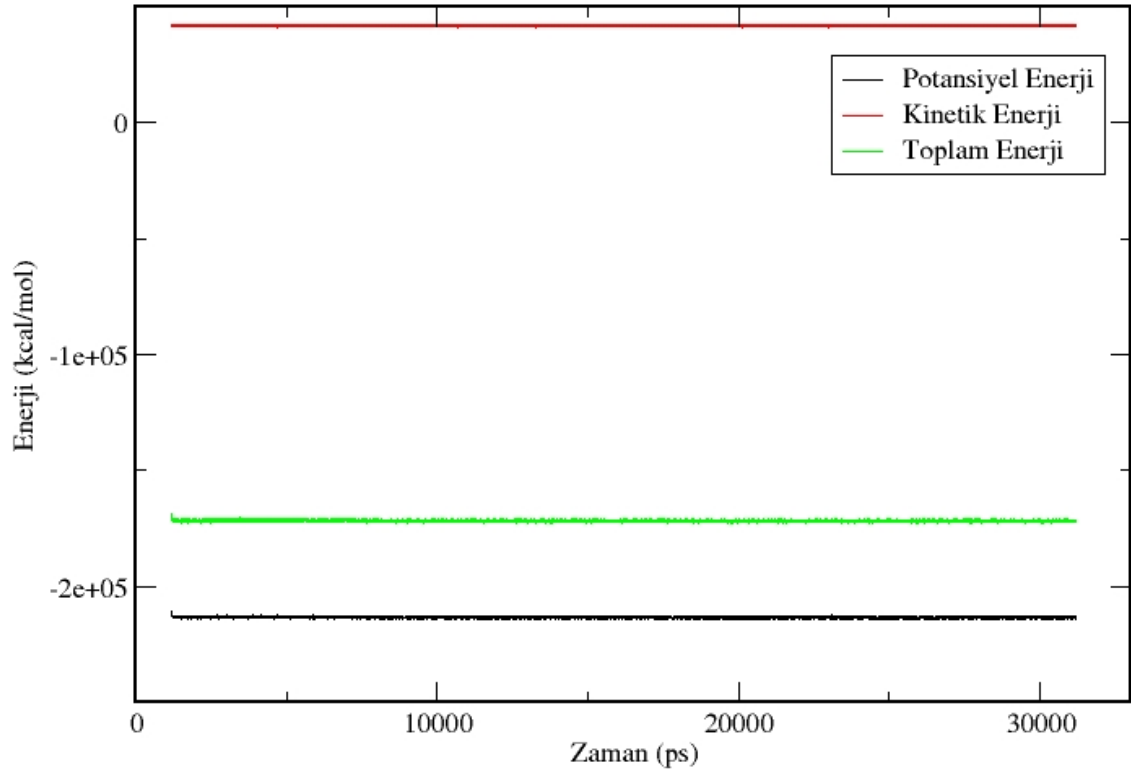
E1 olarak adlandırılan ve 1-288 uzunluğundaki (18 kalıntı eklenmiş) proteinin 30 ns süresince yürütülen MD hesaplamaları sonucu zamana bağlı enerji ve RMSD değişiklikleri Şekil 4.28. ve 4.29.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin periyodik olarak düştüğü dolayısıyla sistemin minimum enerji değerine yakınsadığı görülmektedir. Yine D.pdb yapısında olduğu gibi ilk 1 ns'den sonra 5 ns süresince uygulanan kuvvet kaldırıldıktan sonra E1 proteininin RMSD grafiğinde de iniş çıkışların başladığı gözlenmektedir. Bununla beraber yükselmeler D.pdb yapısında olduğu gibi keskin olmamıştır. Yaklaşık 23 ns'dan sonra hızlı bir yükselme gerçekleşmiştir. Bu yükselmenin olduğu zaman aralığında (23-30 ns) proteinin yapısından farklı bölgeler kullanılarak zamana karşı RMSD değişim grafikleri oluşturulmuş ve bu grafiklerden RMSD değişiminin çoğunlukla son 18 kalıntıdan (271-288) kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu hesaplamalardan elde edilen en düşük enerjili protein konformasyonu ile bu modelin hazırlanmasında kullanılan yapıların (1K6Y.pdb, 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb) üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü Şekil 4.30.'da gösterilmiştir. Bunun yanında, bu konformerin A, B ve C2 yapılarının MD

sonucu elde edilen ve düşük enerjili bir konformerlerine tekabül eden yapılar ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü Şekil 4.31.'de verilmiştir.

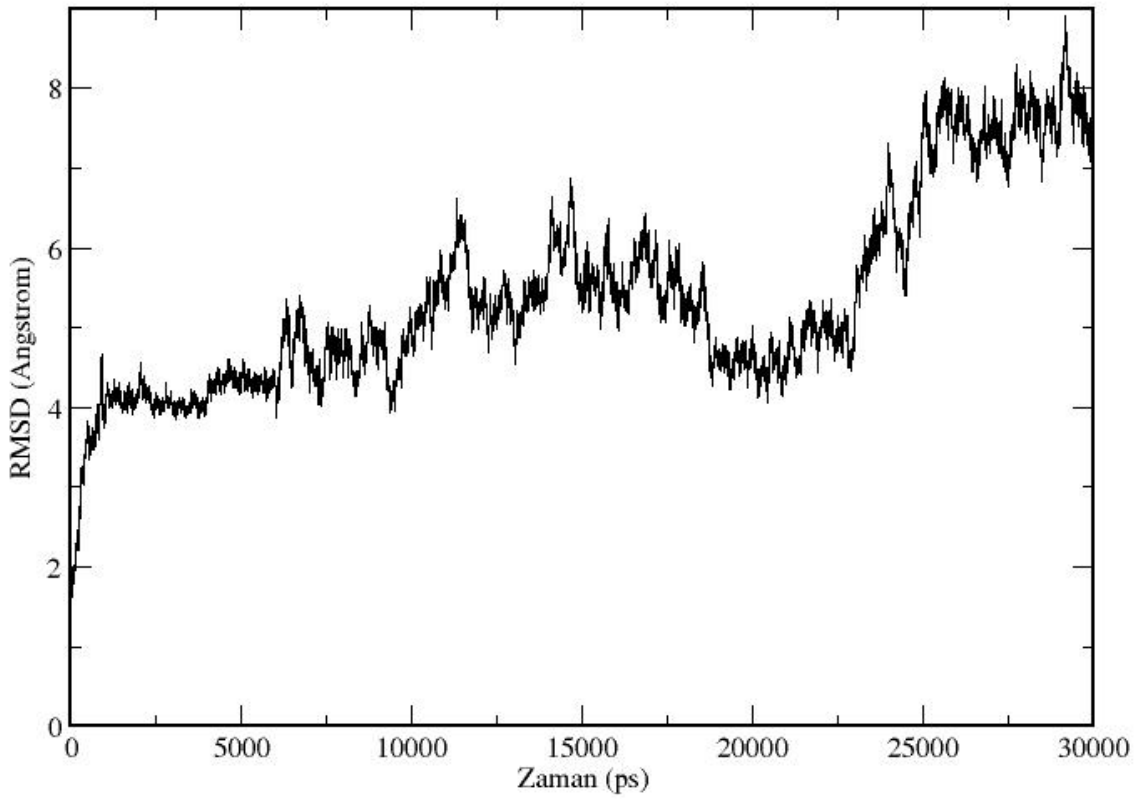
E1 proteininin N-terminal bölgesi bu bölgenin oluşturulmasında kullanılan 1K6Y.pdb kristal yapısı ile karşılaştırıldığında 10-18 ve 38-49 arası kalıntıların başlangıç pozisyonlarına göre oldukça değiştiği (Şekil 4.30.) gözlenmektedir. Bunun yanısıra, 10-15 ve 30-36 arası kalıntıların heliks yapılarında bozulmalar meydana geldiği görülmektedir. Sadece N-terminal bölgesi içeren MD hesaplamaları yapılmış A proteininde yapının daha iyi korunduğu (Şekil 4.31.) belirlenmiştir. Kristal 1BL3.pdb yapısından faydalanılarak oluşturulan E1 proteininin katalitik bölgesi için sonuçlar daha ümit vericidir (Şekil 4.30.). Çarşaf ve heliks yapılar 157-158 ve 163-164 kalıntıları haricinde kristal yapıdaki durumlarını tamamen korumuşlardır. Diğer taraftan beklenen bir sonuç olarak hareketli bölgeler kristal yapıya göre değişmiştir. Sadece katalitik bölge içeren ve MD hesaplamaları yapılmış B proteini, hareketli bölgeler dışında E1 proteininin aynı bölgesi ile uyum içerisindedir (Şekil 4.31.). E1 proteininin C-terminal bölgesi ile bu bölgenin oluşturulmasında kullanılan 1EX4.pdb yapısının C-terminal bölgesi karşılaştırıldığında hareketli bölgelerdeki konformasyonel değişiklikler dışında E1 proteininin C-terminal bölgesinde yapının korunduğu gözlenmektedir (Şekil 4.30.). Daha önceden de belirtildiği gibi 217-222 arasındaki kalıntıların burada da bozulma eğiliminde olduğu görülmektedir. E1 proteininin C-terminal bölgesi ile sadece C-terminal bölgesi içeren MD hesaplamaları yapılmış C2 proteini kıyaslandığında da benzer durumlar söz konusudur (Şekil 4.31.). Ayrıca yapıya ilave edilen son 18 kalıntının (271-288) oldukça hareketli olduğu her iki yapıda da anlaşılmaktadır.

Bu düşük enerjili yapının (E1) D için (1-270 uzunluğundaki yapı) elde edilen düşük enerjili yapı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü Şekil 4.32.'de verilmiştir. Üst üste örtüşen kalıntıların en fazla bulunduğu katalitik bölge üzerinden gerçekleştirilen çakıştırma işlemi sonucunda N-terminal bölgesi ile katalitik bölge arasında yer alan hareketli ilmek (39-60) nedeniyle, her iki yapıda N-terminal bölgesinin katalitik bölgeye farklı mesafelerde ve konumlarda yer aldığı gözlenmektedir. Yine C-terminal bölgesinin 217-222 arası kalıntılarındaki heliks yapının bozulması aynı durumu C-terminal bölgeleri içinde gerçekleştirmiştir. C-terminal bulunduran bütün yapılarda, bu bölgeden kaynaklanan konformasyonel

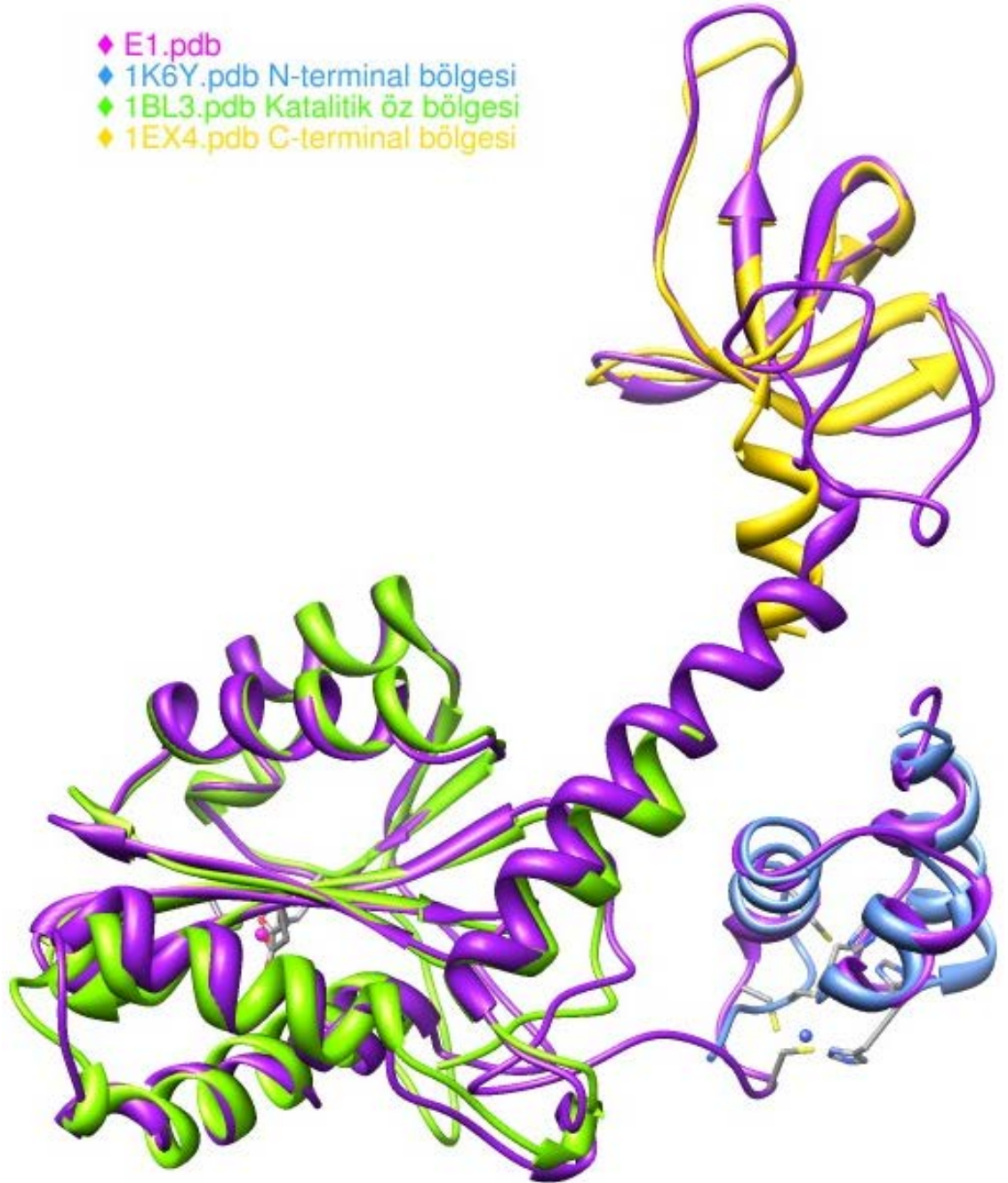
değişimlerden dolayı son 18 kalıntının protein yapısına etkisi net bir şekilde gözlemlenememiştir.



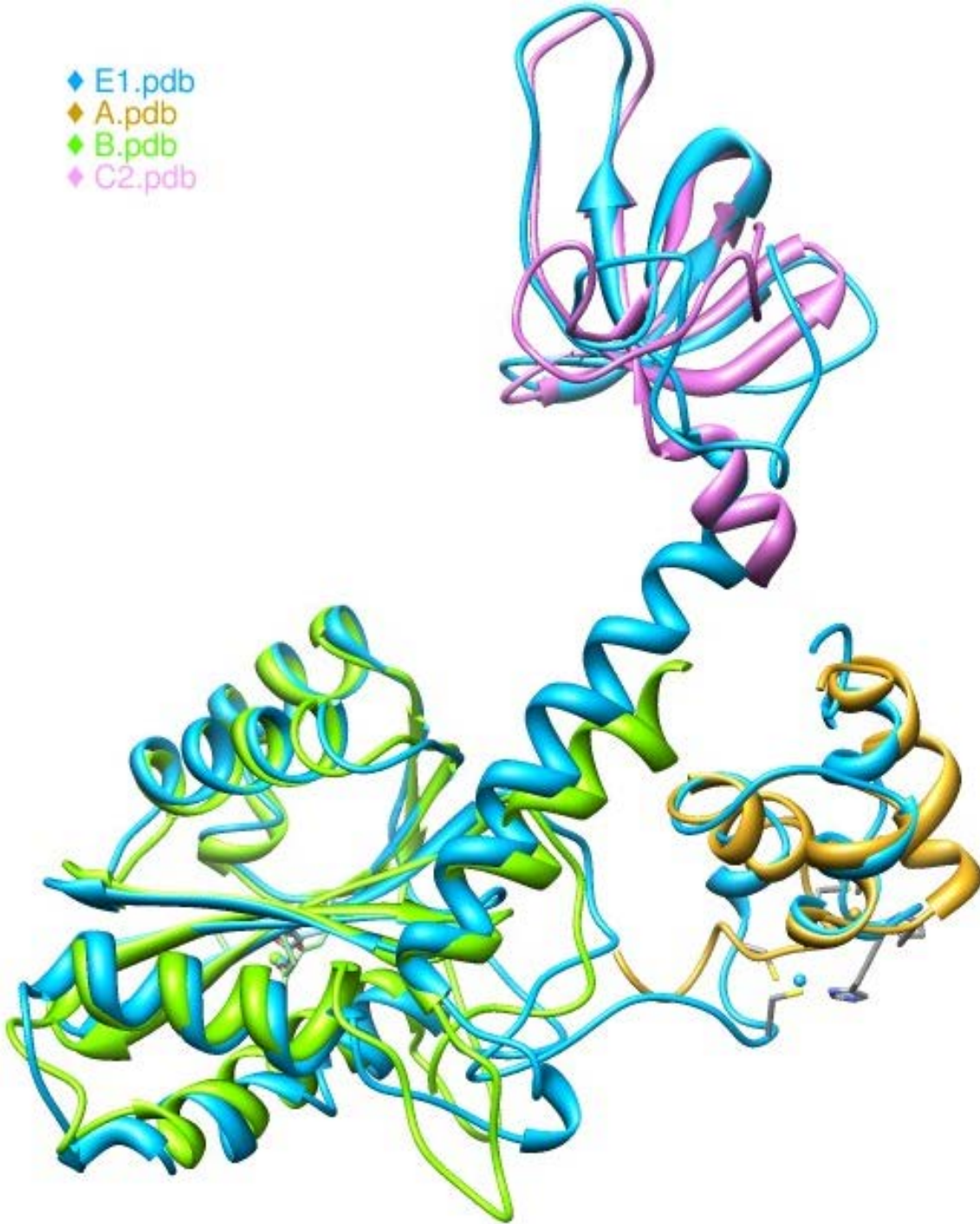
Şekil 4.28. E1 proteininin 30 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri



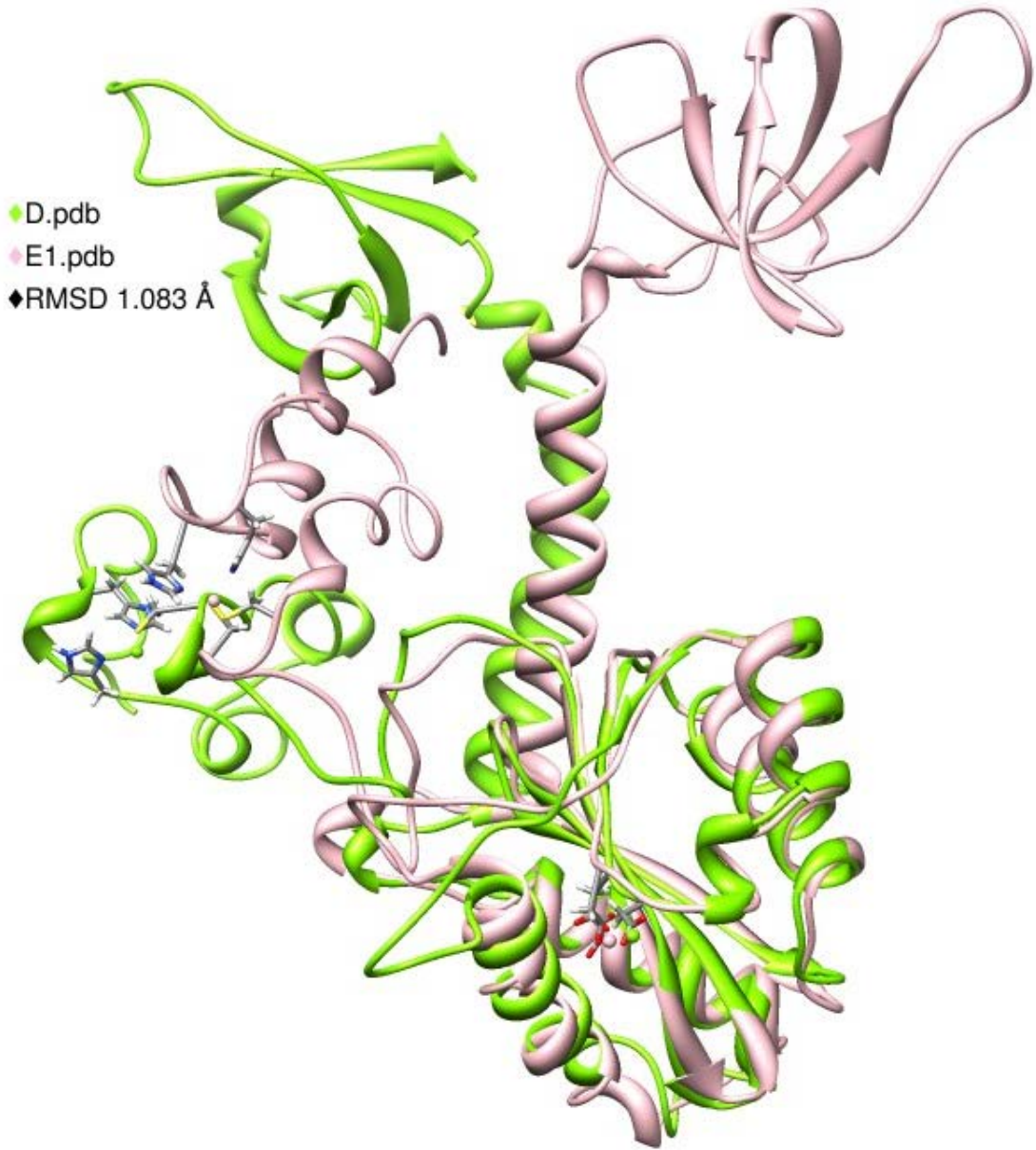
Şekil 4.29. E1 proteininin 30 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi



Şekil 4.30. E1 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin (1K6Y.pdb, 1BL3.pdb ve 1EX4.pdb) yapıları ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü



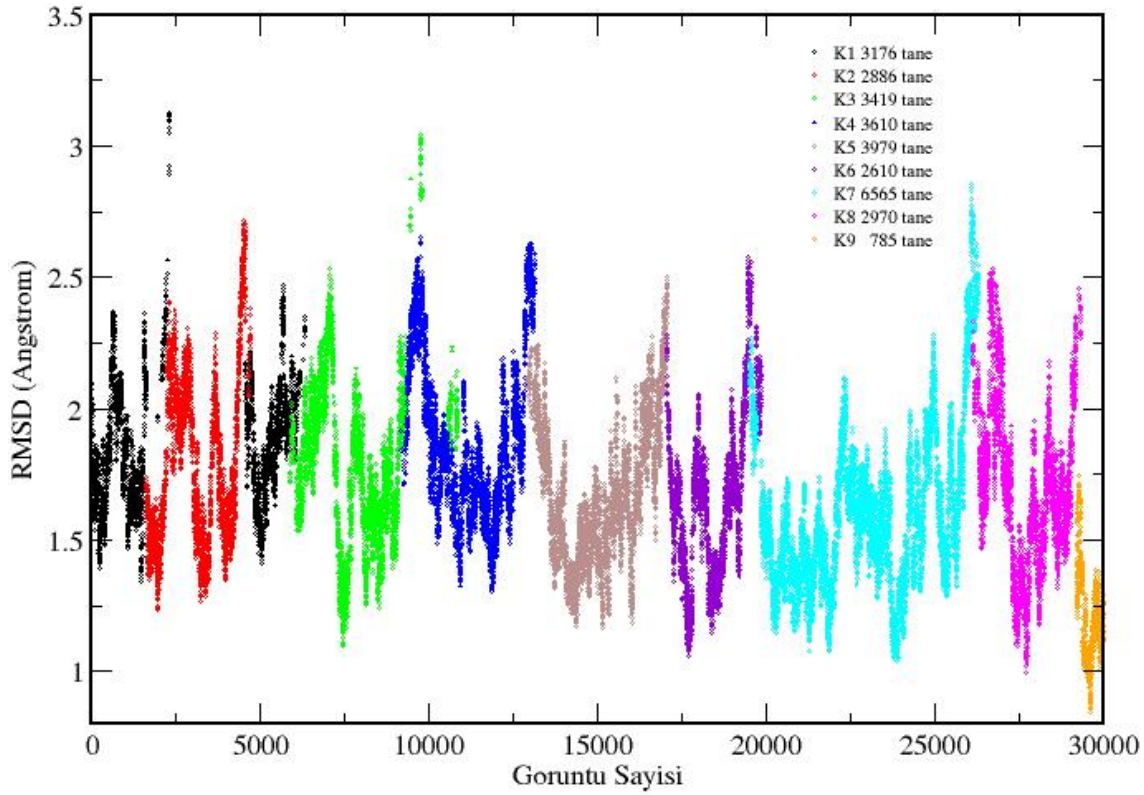
Şekil 4.31. E1 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin A, B ve C2 yapılarının MD sonucu elde edilen ve düşük enerjili bir konformere tekabül eden yapılar ile üst üste çakışmasından elde edilen görüntü



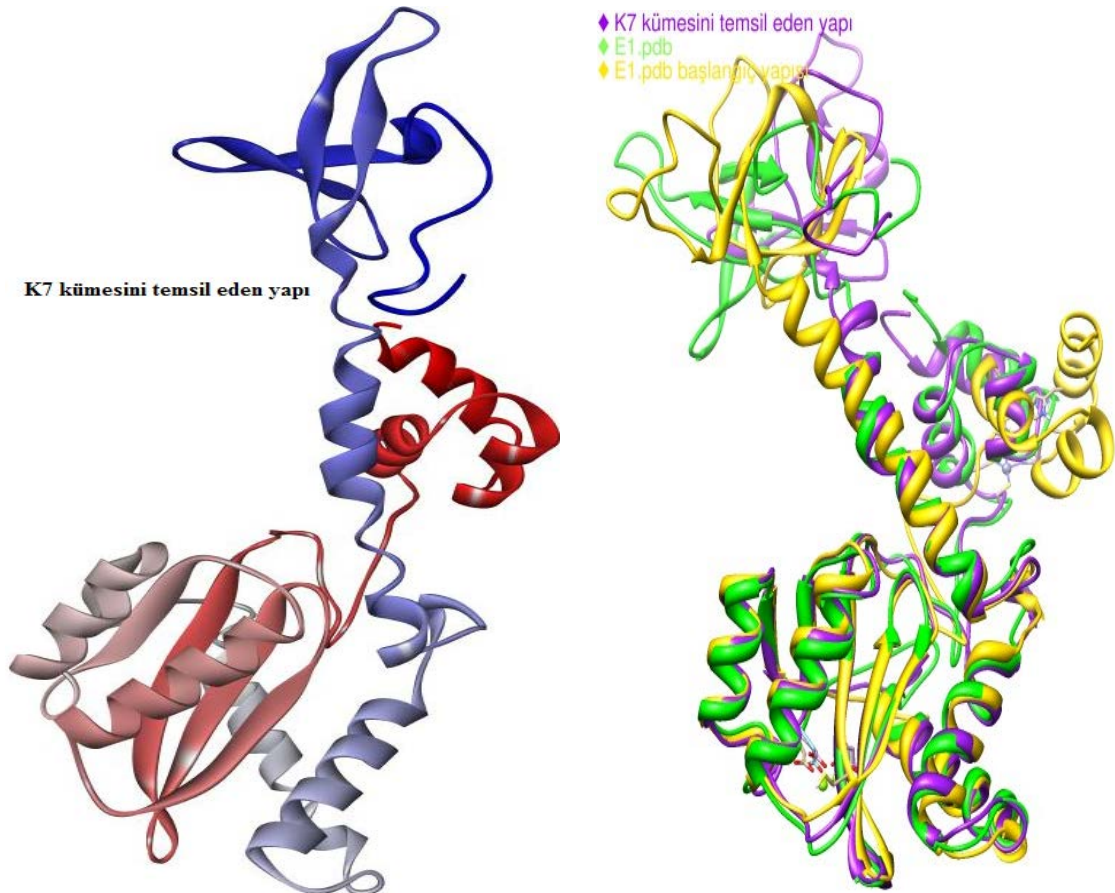
Şekil 4.32. E1 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin D için (1-270 uzunluğundaki yapı) elde edilen düşük enerjili bir yapı ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü

Tam uzunluktaki (1-288 kalıntılı) yapıya ait ve son 15 ns MD hesaplamalarından elde edilen konformasyonların kümeleme işlemleri sonucu oluşan görüntü sayısına karşı RMSD değişimi Şekil 4.33'te gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda yapının 9 temel konformasyonda bulunduğu görülmektedir. Buna göre K7 (Şekil 4.34) 6565 üye ile proteinin en çok bulunduğu konformasyondur ve bu 30 000 görüntünün %11.78'ini oluşturmaktadır. Bu konformasyonun başlangıç ve son 15 ns içindeki en düşük enerjili konformeri ile üst üste çakıştırılması Şekil 4.34'te verilmiştir. K7 kümesini temsil eden yapı ile düşük enerjili yapının katalitik öz ve N-terminal bölgelerinin bir birine yakın

konformasyonda olduğu ve C-terminal bölgelerinin, 217-222 arasındaki kalıntıların oynaklığı nedeniyle birbirinden farklı alanlara yöneldikleri görülmektedir.



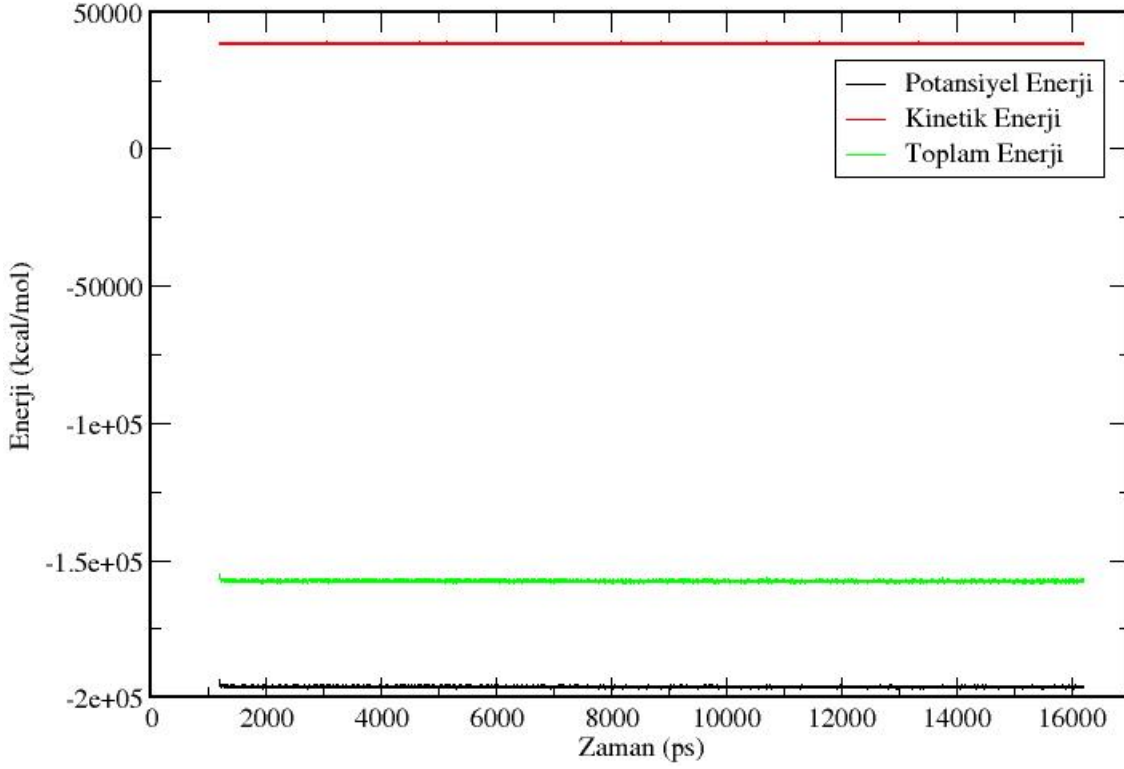
Şekil 4.33. E1 proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi (son 15 ns)



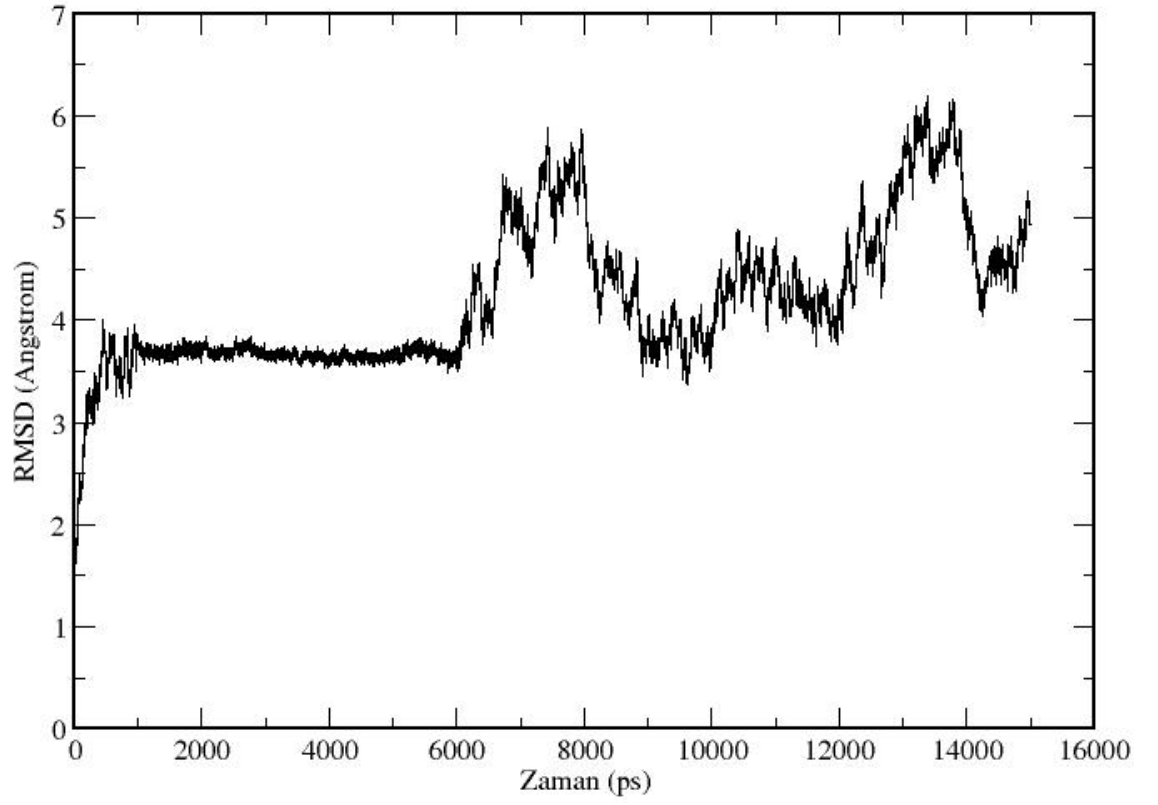
Şekil 4.34. E1 proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (**Sol**) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformerini ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (**Sağ**)

E2 olarak adlandırılan ve 1-288 uzunluğundaki (magnezyum ve çinko iyonlarının yer almadığı) proteinin 15 ns süresince yürütülen MD hesaplamaları sonucu zamana bağlı enerji ve RMSD değişiklikleri Şekil 4.35. ve 4.36.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değişiminin periyodik olarak düştüğü dolayısıyla sistemin minimum enerji değerine yakınsadığı görülmektedir. Sisteme 1-6 ns'ler arasında kuvvet uygulanmıştır. Kuvvetin kaldırılmasıyla RMSD değerinin hızla yükselmeye başladığı görülmektedir. Bu hesaplamalardan elde edilen en düşük enerjili protein konformasyonu ile E1 yapısının üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü Şekil 4.37.'de gösterilmiştir. E1 proteinine kıyasla E2 proteininin N-terminal bölgesindeki heliks yapının neredeyse tamamen bozulduğu gözlenmektedir. E1 proteininin katalitik bölgesindeki 163-164 kalıntılarında meydana gelmiş olan heliks yapıdaki bozulma E2 proteininde 160-165 kalıntı aralığını kapsamaktadır. E1 proteininde Mg metaline bağlı ASP116 kalıntısının bulunduran 115-123 arası hareketli ilmek, metalin yokluğunda metale bağlanan ASP64 kalıntısını içeren çarşaf yapıdan uzaklaşmıştır. C-terminal

bölgesi ile katalitik bölgeyi birleştiren heliks 196-222 arasındaki kalıntılardaki konformasyonel değişimler iki proteinin C-terminal bölgesinin farklı koordinatlara kaymasına neden olmuştur. C-terminal bölgesindeki çarşaf yapılar statik kalırken oynak ilmekler konformasyonel değişikliklere uğramıştır.



Şekil 4.35. E2 proteininin 15 ns süreyle yapılan MD hesaplamalarında zamana karşı potansiyel, kinetik ve toplam enerji değişimleri

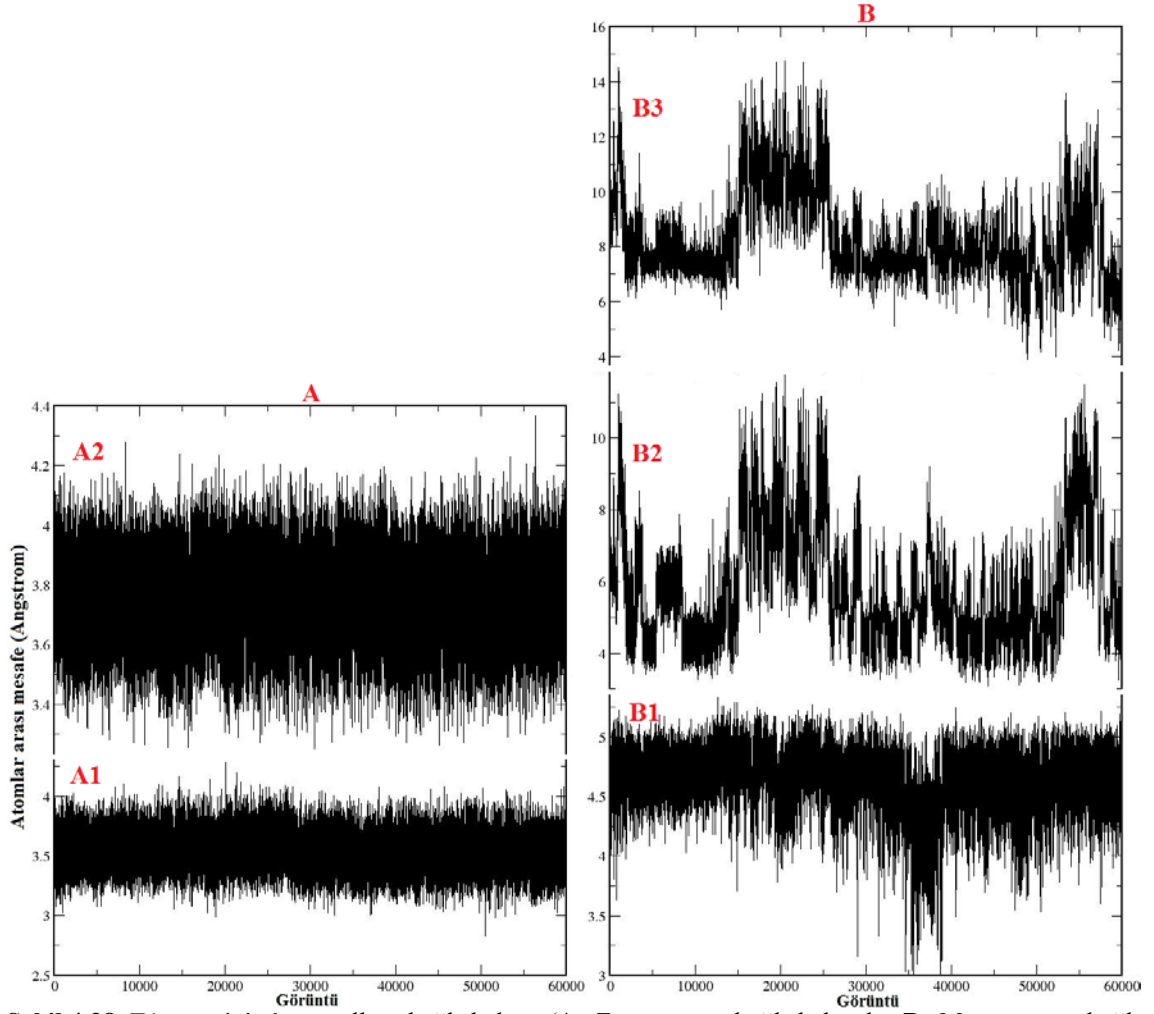


Şekil 4.36. E2 proteininin 15 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucunda başlangıç koordinatları referans alınarak elde edilen zamana karşı RMSD değişimi



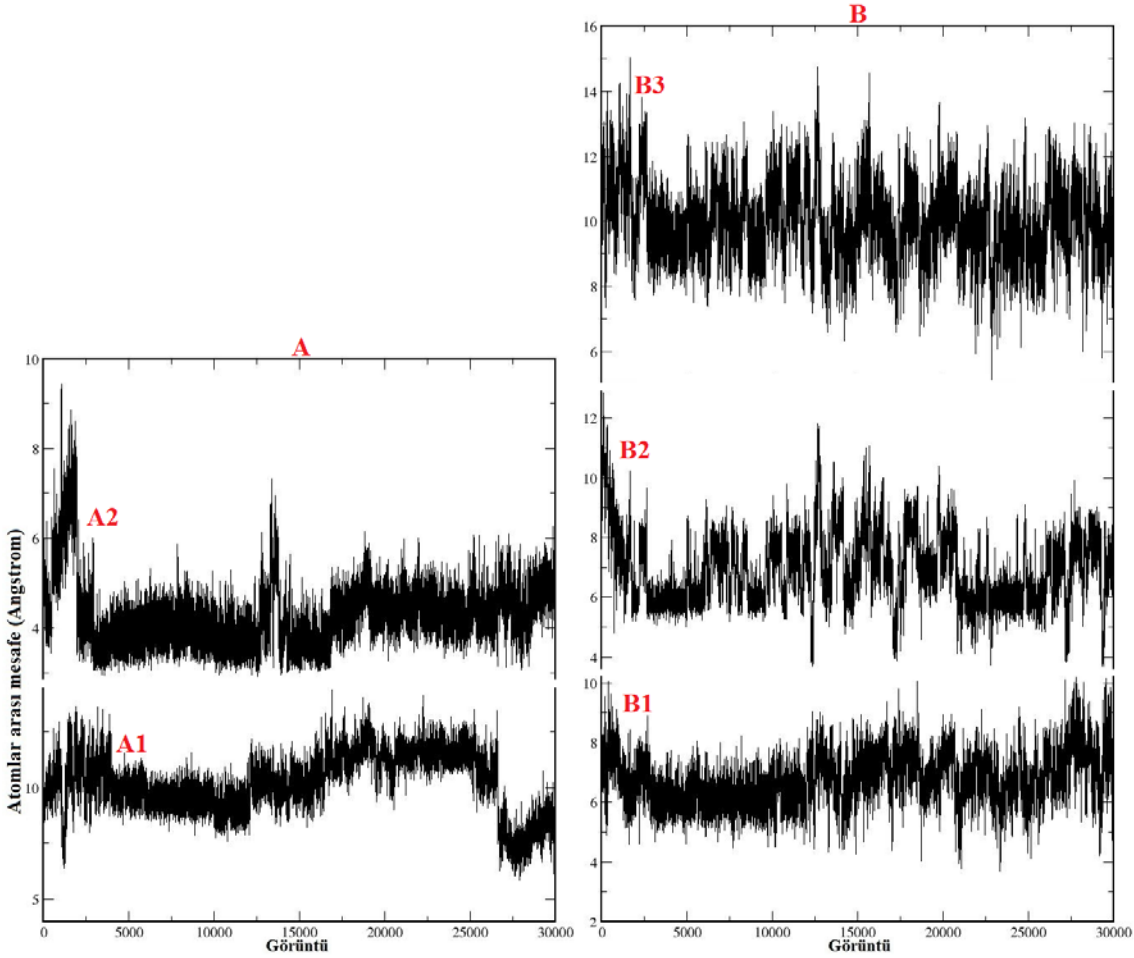
Şekil 4.37. E2 proteinin MD hesaplamalarından elde edilen düşük enerjili bir konformerin E1 ile üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü

Metallerin çıkarılması ile N-terminal bölgesindeki HHCC ve katalitik öz bölgesindeki DDE motiflerinde değişimlerin gözlemlendiği yapılan atomlar arası mesafe analizleri ile belirlenmiştir. Bu durum, özellikle E2.pdb yapısından çinko atomunun çıkarılmasıyla HIS12 NE2 atomu ile CYS 43 SG atomları arasındaki mesafede kendini açıkça göstermiştir. E1 proteininde metallere bağlı kalıntı atomları arasındaki mesafelerin MD simülasyonu süresince değişimi Şekil 4.38.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.38. E1 proteininde metallere bağlı kalıntı (**A:** Zn atomuna bağlı kalıntılar **B:** Mg atomuna bağlı kalıntılar) atomları arasındaki mesafelerin MD simülasyonu süresince değişimi (**A1:** *HIS12 NE2-CYS43 SG atomları*, **A2:** *HIS16 ND1-CYS40 SG atomları*, **B1:** *ASP64 OD1-ASP116 OD1*, **B2:** *ASP64 OD1-ASP152 OE1*, **B3:** *ASP116 OD1-ASP152 OE1*)

E1 proteini için ölçülen bağ uzunlukları değişimi, E2 proteinindeki aynı kalıntı atomları arasında da hesaplanmış ve bu mesafelerin MD simülasyonu süresince değişimi Şekil 4.39.'da gösterilmiştir. E1.pdb ve E2.pdb yapıları için bahsi geçen kalıntı atomları arasındaki mesafelerin ortalama değerleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.



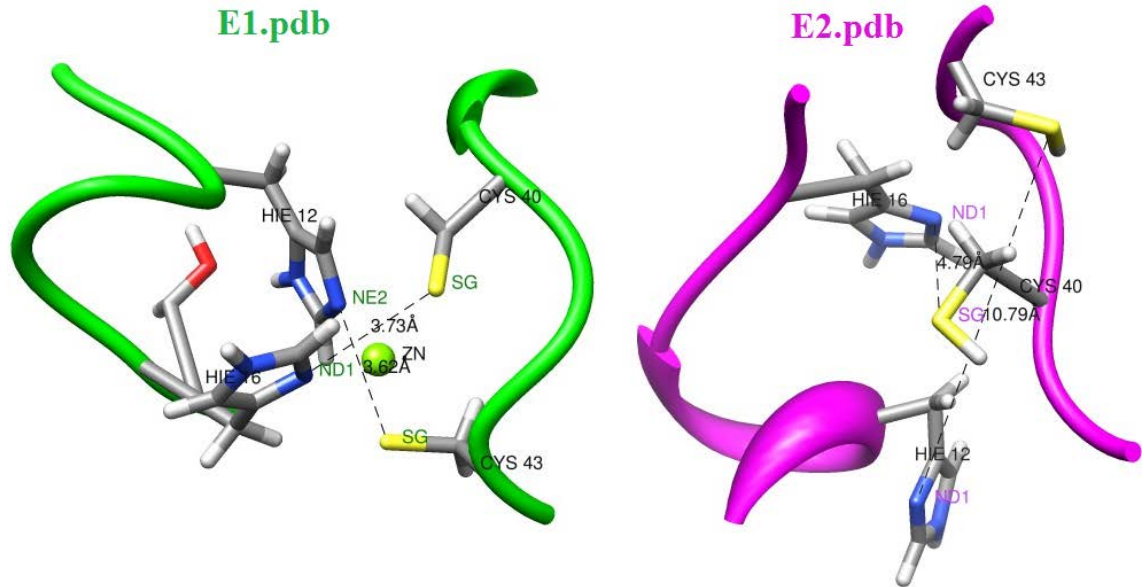
Şekil 4.39. E1 proteininden metallerin çıkarılması ile oluşturulan E2 proteininde metaller ile ilgili kalıntı (A: Zn atomuna bağlı kalıntılar B: Mg atomuna bağlı kalıntılar) atomları arasındaki mesafelerin MD simülasyonu süresince değişimi (A1: *HIS12 NE2-CYS43 SG atomları*, A2: *HIS16 ND1-CYS40 SG atomları*, B1: *ASP64 OD1-ASP116 OD1*, B2: *ASP64 OD1-ASP152 OE1*, B3: *ASP116 OD1-ASP152 OE1*)

Metal içeren HIV-1 IN modelinde metale bağlı kalıntıların birbirine daha yakın durdukları ve yapıdan metallerin çıkarılmasıyla oluşturulan E2.pdb yapısında bu kalıntılar arasındaki mesafenin arttığı Şekil 4.38., 4.39. ve Tablo 4.1.'den anlaşılmaktadır. Bunun yanında, E1 yapısına 30 ns süresince MD hesaplamaları yapıldığı ve bu sürenin E2 yapısı için 15 ns olduğu dikkate alındığında sürenin artmasıyla kalıntılar arası uzaklığın artması da beklenmektedir.

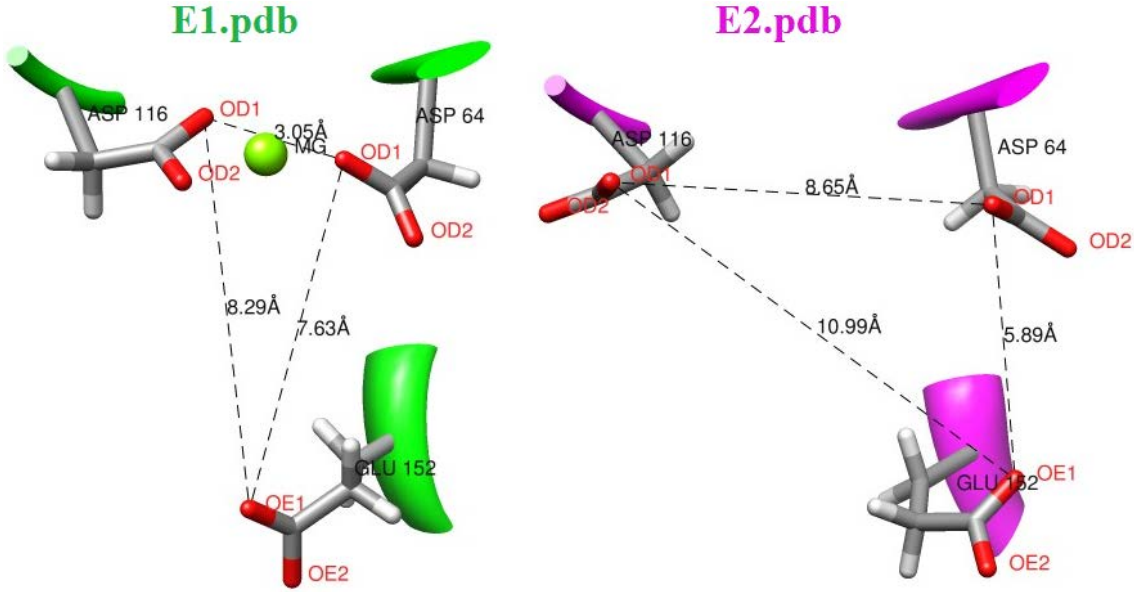
Tablo 4.1. E1 ve E2 yapılarında metal bölgelerindeki kalıntı atomları arasındaki ortalama mesafeler (Angstrom cinsinden)

Atomlar	E1	E2
HIS12 NE2-CYS43 SG	3.54	10.18
HIS16 ND1-CYS40 SG	3.75	4.30
ASP64 OD1-ASP116 OD1	4.64	6.79
ASP64 OD1-ASP152 OE1	5.86	6.94
ASP116 OD1-ASP152 OE1	8.30	9.99

E1.pdb ve E2.pdb yapılarının düşük enerjili konformasyonlarında HHCC motifinin bulunduğu çinko bölgesi kalıntıları arasındaki mesafeler Şekil 4.40. ve DDE motifinin bulunduğu magnezyum bölgesi kalıntıları arasındaki mesafeler 4.41.'de resmedilmiştir.

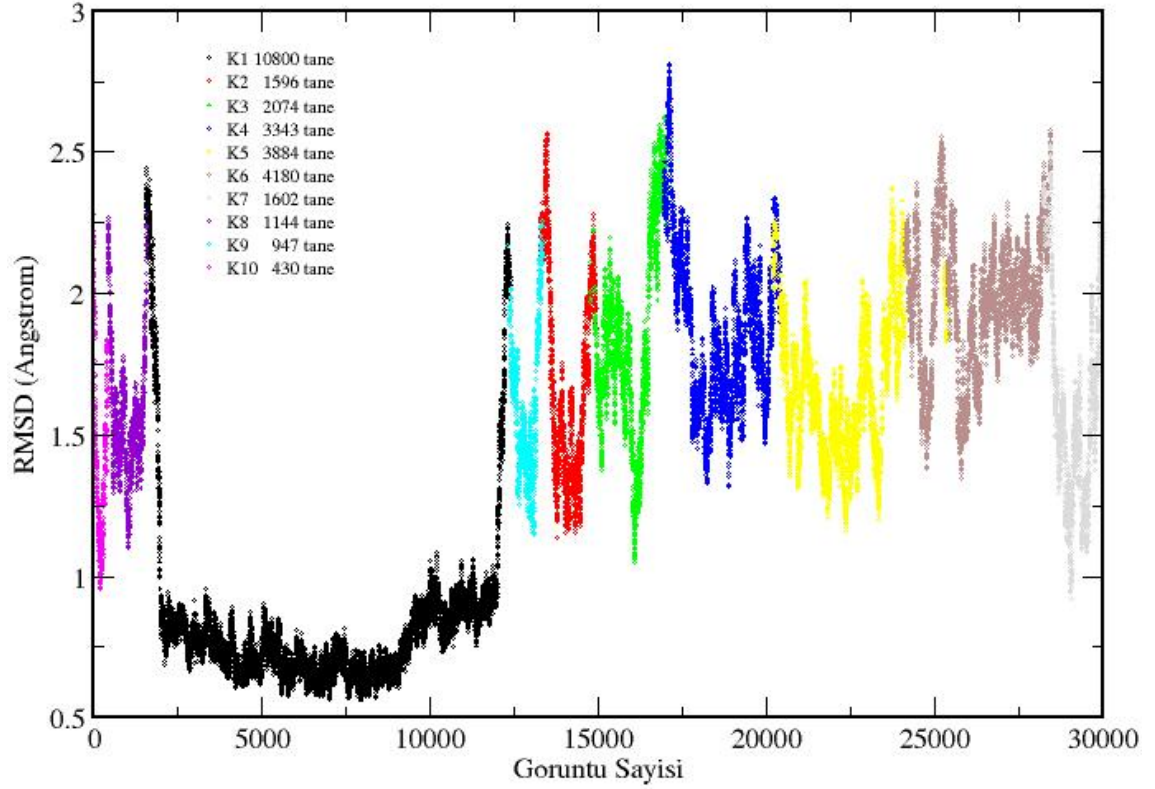


Şekil 4.40. N-terminal bölgesinin HHCC motifindeki kalıntıların Zn atomu varlığında (E1.pdb) ve yokluğunda (E2.pdb) aralarındaki mesafeler

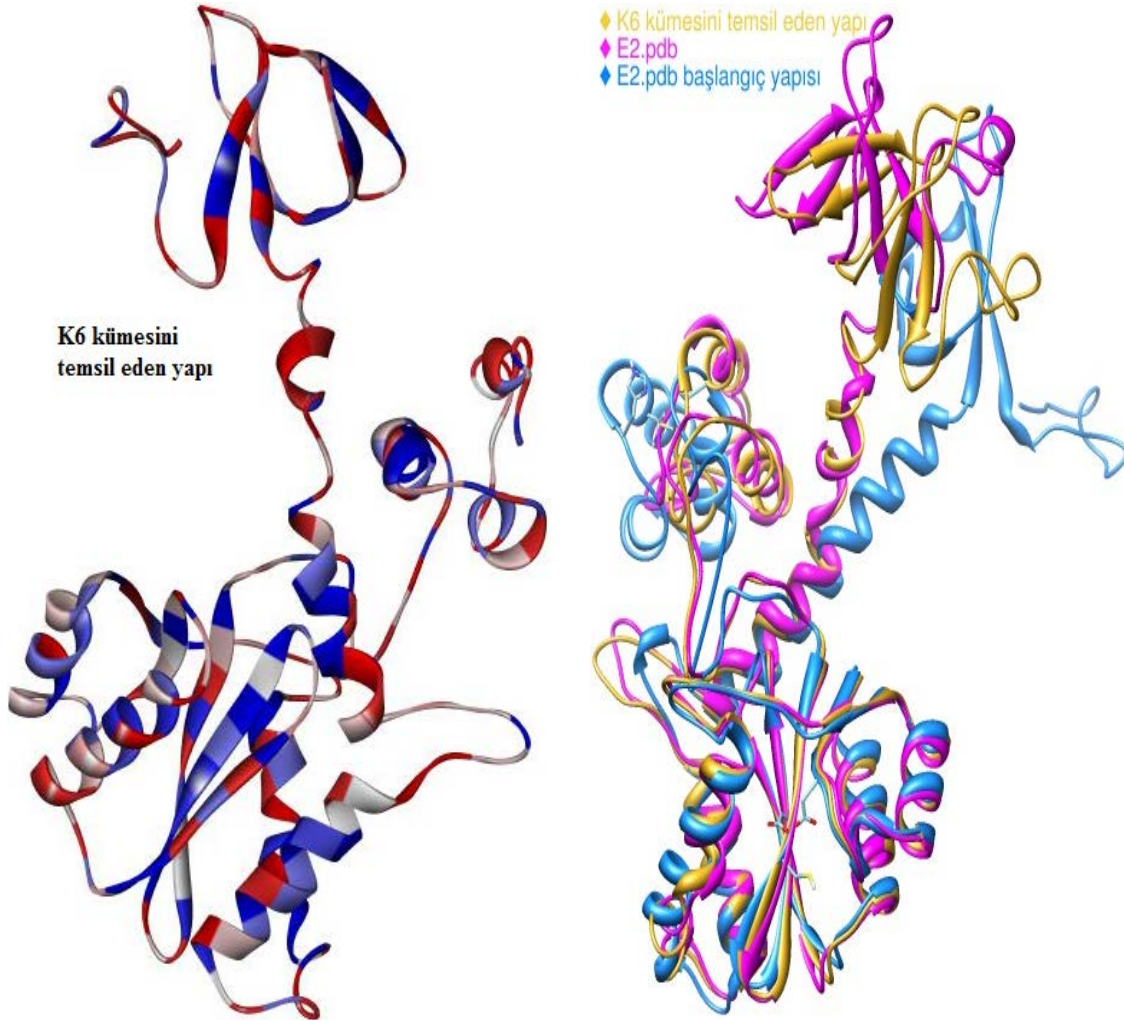


Şekil 4.41. Katalitik öz bölgesinin DDE motifindeki kalıntıların Mg atomunun varlığında (E1.pdb) ve yokluğunda (E2.pdb) aralarındaki mesafeler

Tam uzunluktaki (1-288) metal içermeyen yapıya ait ve 15 ns MD hesaplamalarından elde edilen konformasyonların kümeleme işlemleri sonucu oluşan görüntü sayısına karşı RMSD değişimi Şekil 4.42’de gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda yapının 10 temel konformasyonda bulunduğu görülmektedir. Buna göre K6 (Şekil 4.43.) 4180 üye ile proteinin en çok bulunduğu konformasyondur (K1 kümesi proteine kuvvet uygulanan zaman aralığındaki elemanları içermektedir.) ve bu 30 000 görüntünün %13.93’ünü oluşturmaktadır. Bu konformasyonun, başlangıç ve en düşük enerjili konformeri ile üst üste çakıştırılması Şekil 4.43’te verilmiştir. K1 kümesini temsil eden yapı ile en düşük enerjili yapının uyumlu olduğu görülmektedir. İki yapının N-terminal ve katalitik öz bölgeleri tam örtüşürken C-terminal bölgelerinde farklı uzay bölgelerine kaymalar gözlenmektedir.



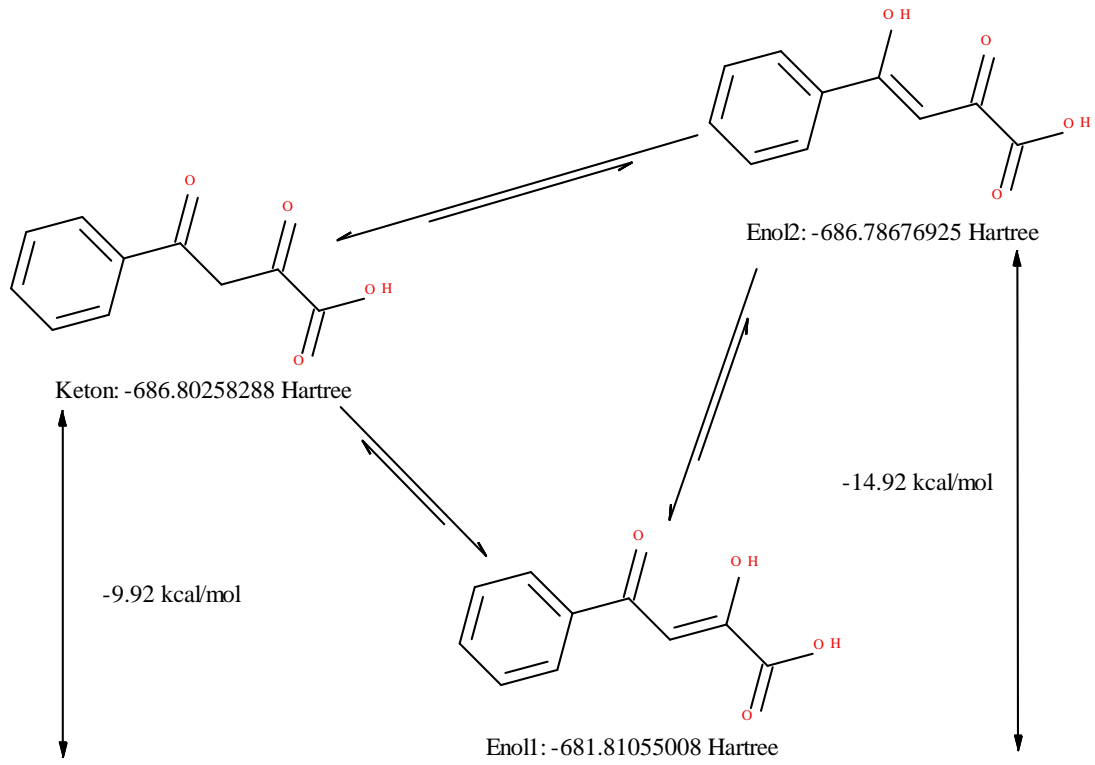
Şekil 4.42. E2 proteininin MD hesaplamaları sonuç elde edilen görüntü sayısına karşılık RMSD değişimini gösteren kümeleme analizi



Şekil 4.43. E2 proteinine ait MD hesaplamaları sonucu yapılan kümeleme analizinden bulunan en yoğun konformer (Sol) ve bu konformerin başlangıç ve en düşük enerjili bir konformeri ile üst üste çakıştırılmasının görüntüsü (Sağ)

4.2. Ligandların Hazırlanması Çalışmaları

Literatür taraması sonucu seçilen ligandların bazılarında keto-enol tautomerisi olduğu belirtilmişti. Enerji hesaplamaları sonucunda, enol1 için -681.81055008 Hartree, enol2 için -686.78676925 Hartree ve keton için -686.80258288 Hartree değerleri bulunmuştur. Hartree değerinin 627.5 kcal/mol'e eşit olmasından yararlanılarak sonuçlar kcal/mol'e çevrilmiştir. Yapılan kuantum mekanik hesaplamaların sonucunda her bir yapı için elde edilen değerler, Şekil 4.44.'te verilmiştir.



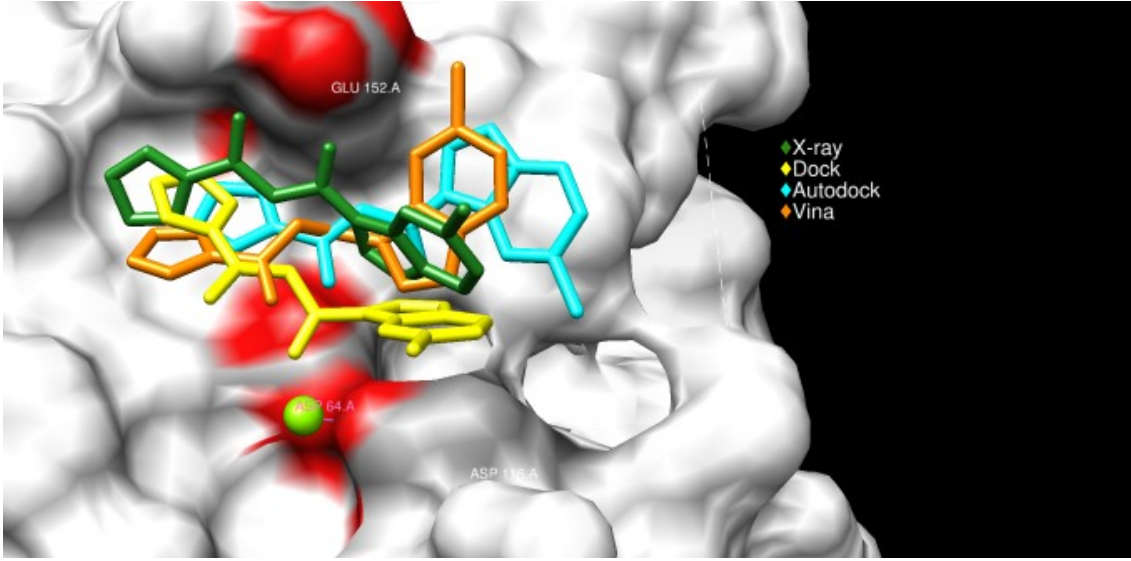
Şekil 4.44. Keto-enol formları arasındaki enerji farkları

Hesaplamalar sonucunda enol1 formunun keton formundan -9.92 kcal/mol daha düşük enerjiye sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmalarda yapıların enol formu kullanıldı. Benzer bileşiklerin çalışmalarda enol formunda kullanıldığı literatürlerden de görülmektedir (Marchand ve ark. 2003, Di Santo ve ark. 2008).

4.3. Ligand Yerleştirme Çalışmaları

Ligand yerleştirme, bilgisayar destekli ilaç tasarımı yöntemlerinde bir ilaç adayının bağlandığı bölgeyi belirleme ve etkileşimlerin analizleri açısından son derece önemli bir basamaktır. Geliştirilen algoritmalar ve görüntüleme tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde ligand yerleştirme, HIV-1 IN için FDA tarafından onaylanan ilk ilaç olan Raltegravir'in geliştirilmesinde de büyük katkıda bulunmuştur. Bu ilacın geliştirilmesi işlemlerinde Autodock programı kullanılmıştır. Yerleştirme çalışmalarının geçerliliğini test etmek açısından x-ray yapısında ligand içeren tek yapı olan 1QS4.pdb yapısı kullanıldı. Bu ligand, aynı zamanda bu çalışmada da kullanılan ve L01 olarak kodlanan 5CITEP'tir. Her üç program da konformasyonlarında farklılıklar olmasına rağmen ligandı X-ray yapısındaki yerine yerleştirme başarısı göstermiştir. Yapılan yerleştirme çalışması Şekil 4.45'te gösterilmiştir. Proteine yerleştirilme işlemleri

yapılan ligandların Autodock4, Dock6 ve Autodock Vina skorları Tablo 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.45. L01 ligandının 1QS4.pdb yapısına üç ayrı programla yerleştirilmesi ve ligandın X-ray koordinatları

Tablo 4.2. Ligandların katalitik öz bölgesine farklı programlarla yerleştirilme skorları

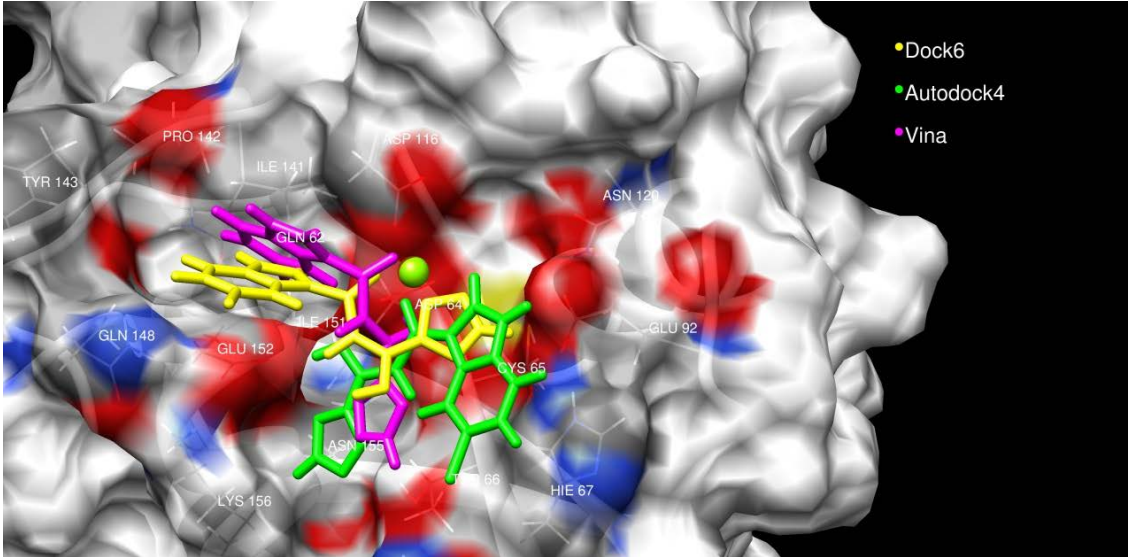
Ligandlar	A-dock ^a	Dock ^b	Vina ^c	Ligandlar	A-dock ^a	Dock ^b	Vina ^c
L01	-6.17	-41.19	-5.8	L21	-10.31	-57.62	-6.4
L02	-6.01	-50.57	-7.2	L22	-10.84	-56.61	-6.8
L02t	-6.40	-51.85	-7.2	L23	-5.19	-34.38	-6.1
L03	-10.13	-58.65	-5.5	L24	-5.56	-33.79	-5.5
L04	-9.36	-56.38	-6.4	L25	-9.29	-51.74	-5.8
L05	-6.06	-43.01	-6.5	L26	-9.40	-47.98	-5.7
L06	-9.03	-49.16	-5.6	L27	-9.39	-59.85	-6.6
L07	-6.58	-46.22	-7.2	L28	-8.72	-43.98	-5.7
L08	-5.88	-46.58	-6.3	L29	-6.86	-44.46	-7.5
L09	-6.03	-43.89	-6.4	L30	-5.79	-40.37	-6.3
L10	-5.76	-45.43	-6.6	L31	-6.14	-41.31	-5.3
L11	-5.25	-48.45	-5.4	L32	-10.16	-60.77	-6.6
L12	-6.33	-49.14	-6.2	L33	-11.93	-60.70	-6.2
L13	-6.60	-70.93	-7.7	L34	-10.55	-59.67	-5.9
L14	-6.55	-37.53	-7.6	L35	-8.65	-42.45	-4.6
L15	-5.06	-37.52	-4.9	LGA	-10.19	-67.21	-6.8
L16	-10.70	-43.56	-6.4	LGB	-10.55	-67.81	-6.2
L17	-9.50	-94.41	-5.5	LGC	-5.56	-58.74	-6.0
L18	-10.13	-51.50	-6.2	LGD	-6.34	-41.23	-7.4
L19	-7.18	-47.76	-8.0	LGE	-11.09	-63.01	-6.6
L20	-10.19	-59.07	-6.8	L02*	-	-50.53	-

^aAutodock4, ^bDock6, ^cAutodock Vina, *L02 ligandı Dock6 ile tam uzunluktaki proteine (E1.pdb) yerleştirilmiştir.

Skorlar dikkate alındığında programların skora tekniğinin farklı olmasına rağmen yerleştirme skorları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında, genel olarak yöntemler arasında paralellik olduğu görülmektedir. Yine de Autodock ve Dock skorları düşük olan bazı ligandlar (LGD, L19, L29 gibi) için Vina yüksek skor belirlerken bazılarında (L21, L03, L34 gibi) ise tersi skorlar üretmiştir. Ligandların etkileştikleri kalıntıların burada verilmesi hem fazla yer tutacağından, hem de bu etkileşilen kalıntıların çoğunun MD hesaplamaları sonucu değişecek olmasından dolayı uygun

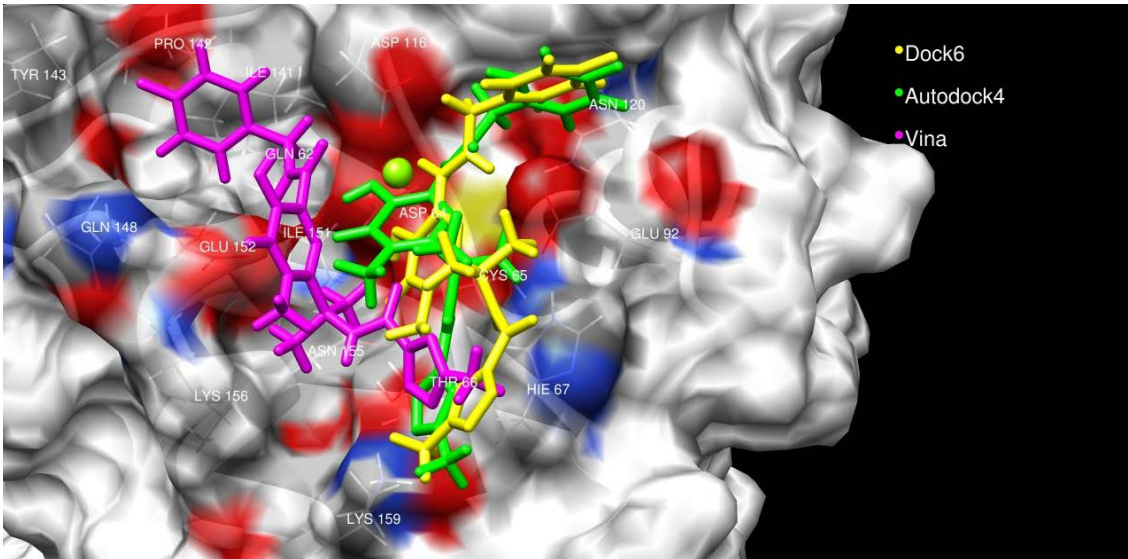
görülmemiştir. Bunun yerine katalitik bölgede yer alan kalıntıların etiketleri şekiller üzerinde gösterilmiş ve böylece ligandların proteinle etkileşimleri kabaca gösterilmiştir.

L01 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.46.'da verilmiştir. Dock6 ve Vina L01 ligandını benzer konformasyonda yerleştirirken Autodock4 ligandı farklı bir konformasyonda farklı bir doğrultuda yerleştirmiştir.



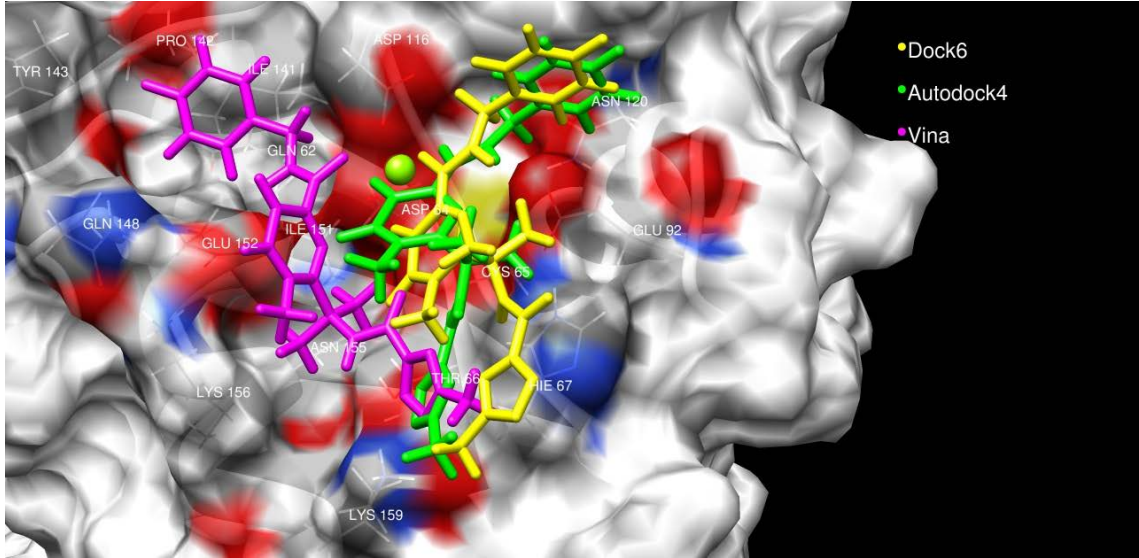
Şekil 4.46. L01 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L02 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.47.'de verilmiştir. Autodock ve Dock6 ligandı aynı doğrultuda ve benzer konformasyonda yerleştirirken Vina farklı yerleştirmiştir.



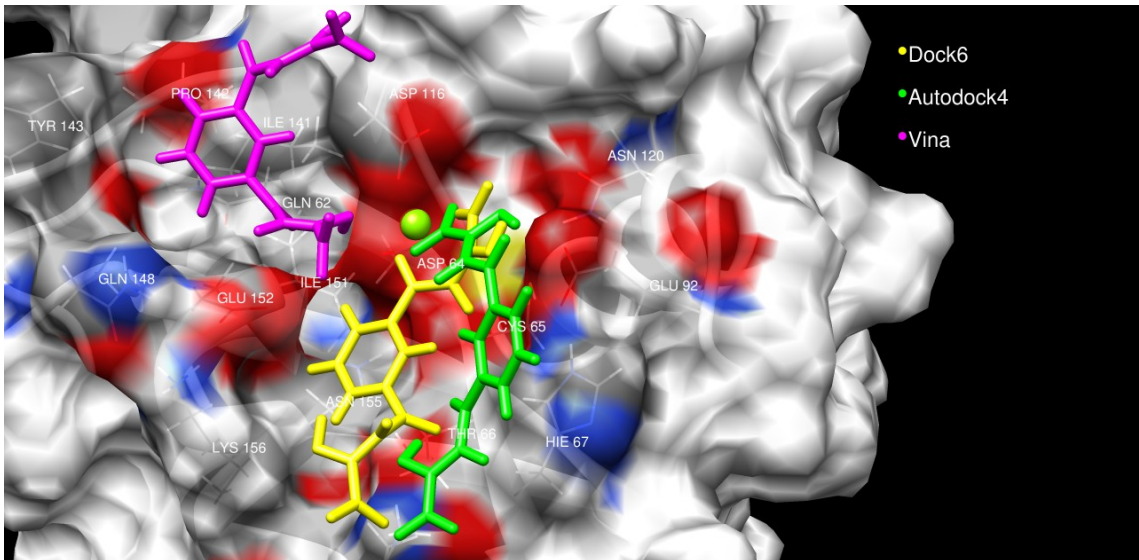
Şekil 4.47. L02 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L02t ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.48.'de gösterilmiştir. Vina programı ligandı diğerlerinden farklı şekilde yerleştirilmiştir.



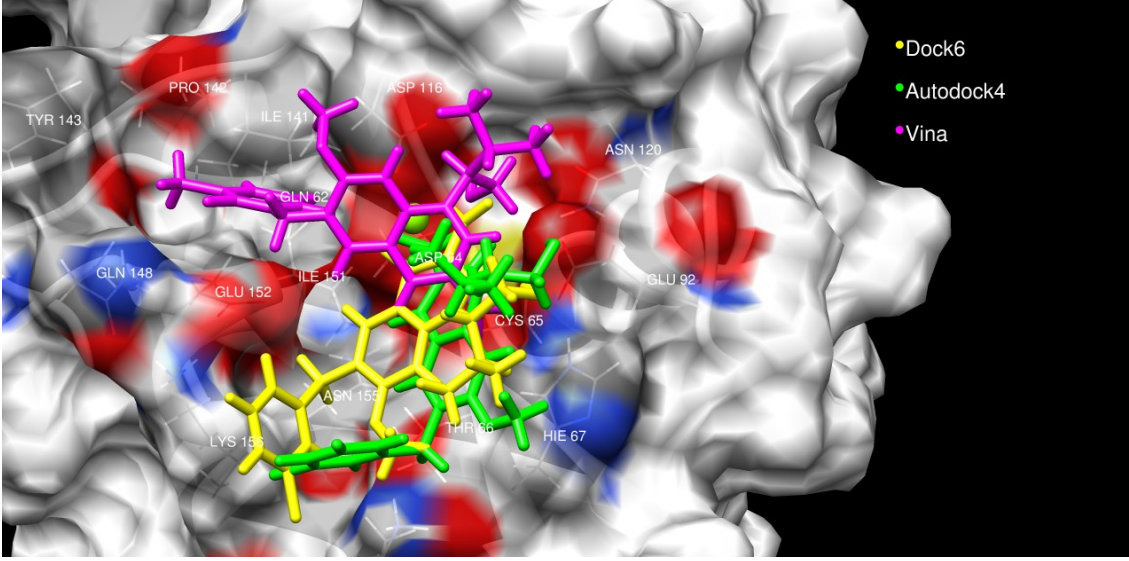
Şekil 4.48. L02t ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L03 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.49.'da verilmiştir. Vina programı ligandı Mg atomuna uzak denilebilecek konuma yerleştirmiştir. Ligandta karboksilik oksijenlerin bulunması bu uçların Mg atomuna yakın tutması daha mantıklı bir konumlandırma olacağına benzemektedir. Nitekim diğer iki program karboksilik uçtaki oksijen atomlarını Mg ile bağ yapacak konuma getirmiştir.



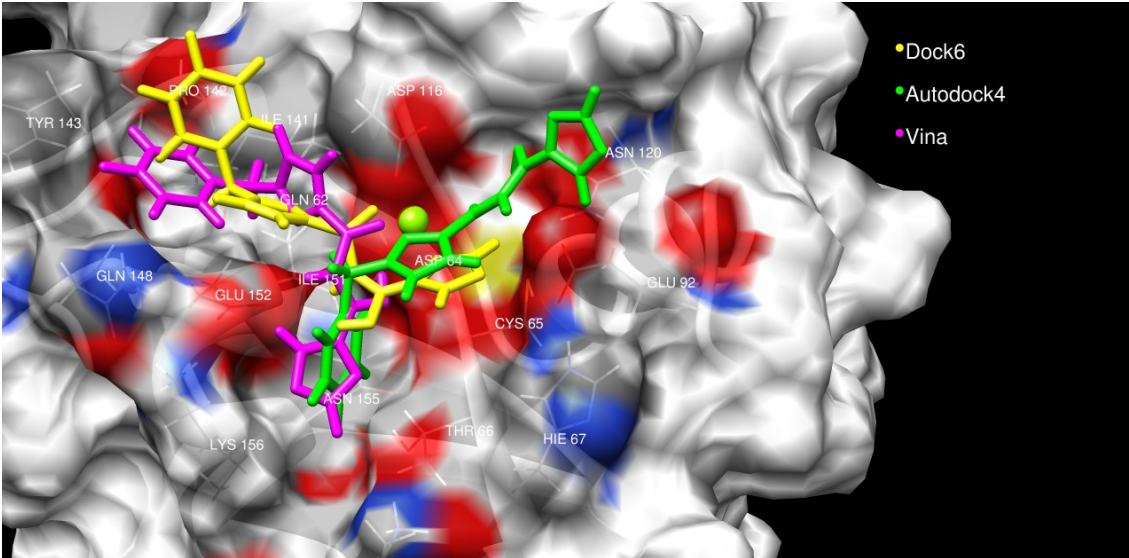
Şekil 4.49. L03 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L04 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.50.'de verilmiştir. Vina yine ligandı diğer programlardan farklı konuma yerleştirmiştir.



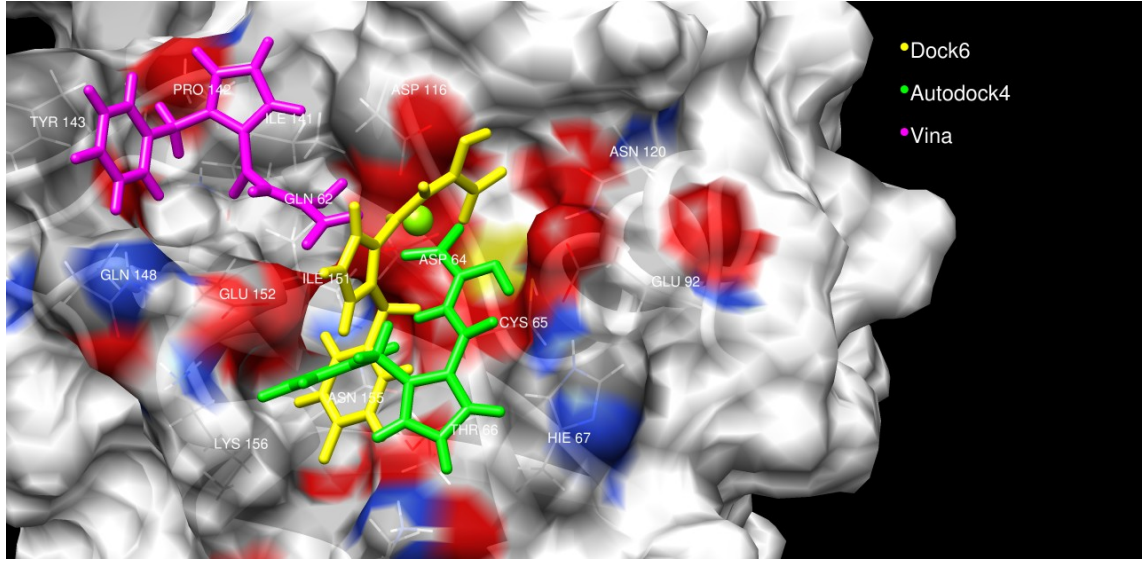
Şekil 4.50. L04 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L05 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.51.'de verilmiştir. Dock ve Vina ligandı benzer konumda yerleştirirken Autodock ASN120-LYS156 doğrultusunda yerleştirmiştir.



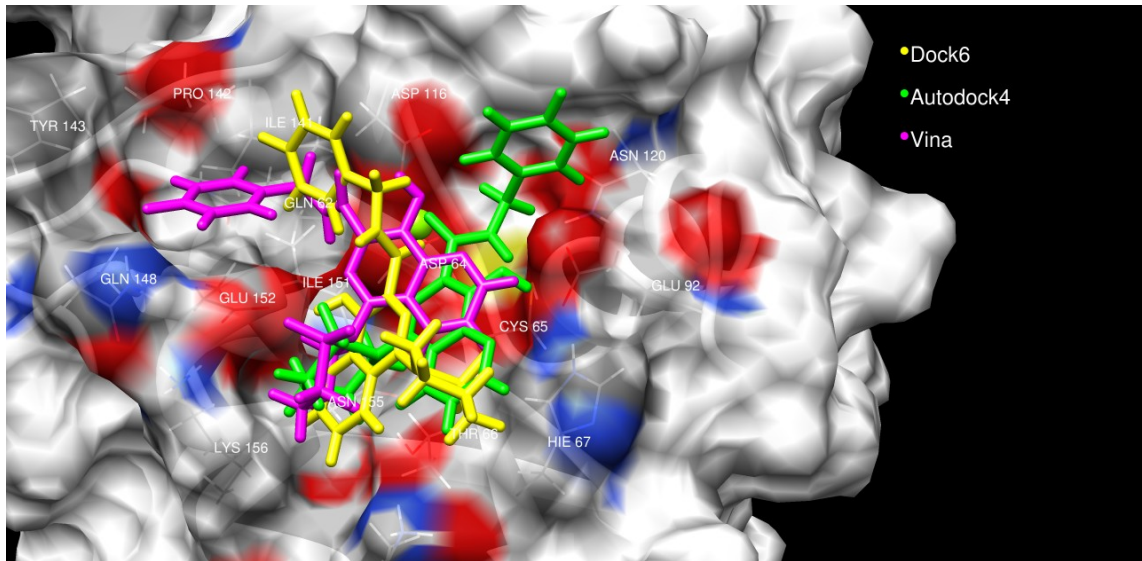
Şekil 4.51. L05 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L06 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.52.'de verilmiştir. Vina ligandı Mg atomundan uzak bir konuma yerleştirirken, Dock ve Autodock bir biriyle uyumlu bir yerleştirme işlemi gerçekleştirmişlerdir.



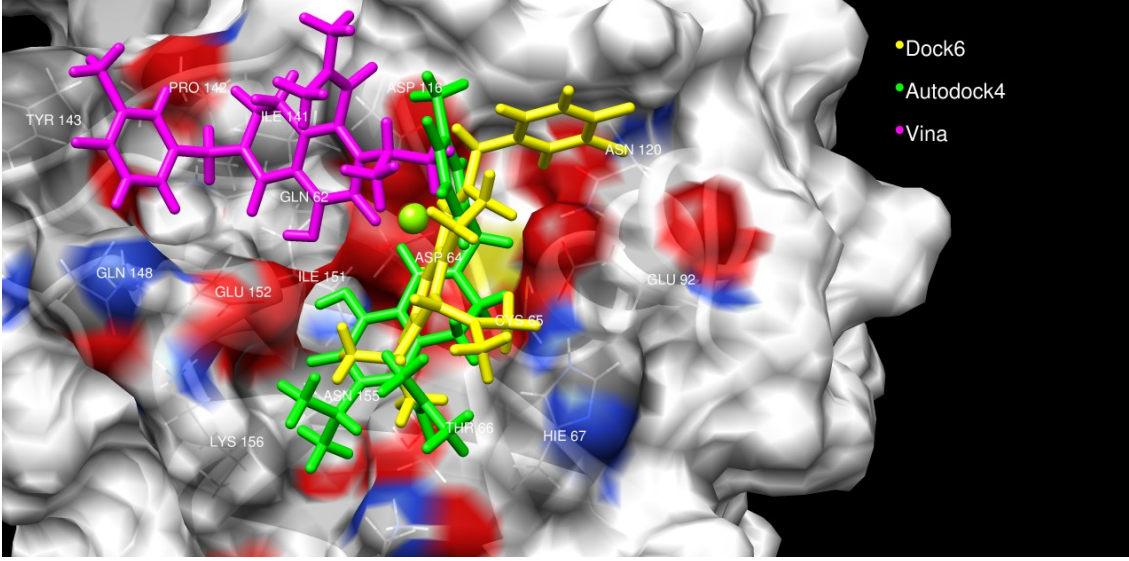
Şekil 4.52. L06 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L07 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.53.'te verilmiştir. Dock ve Vina ligandı benzer konumlarda yerleştirirken Autodock ligandın bir ucunu benzer diğer ucunu ise farklı bir oyuğa yerleştirmiştir.



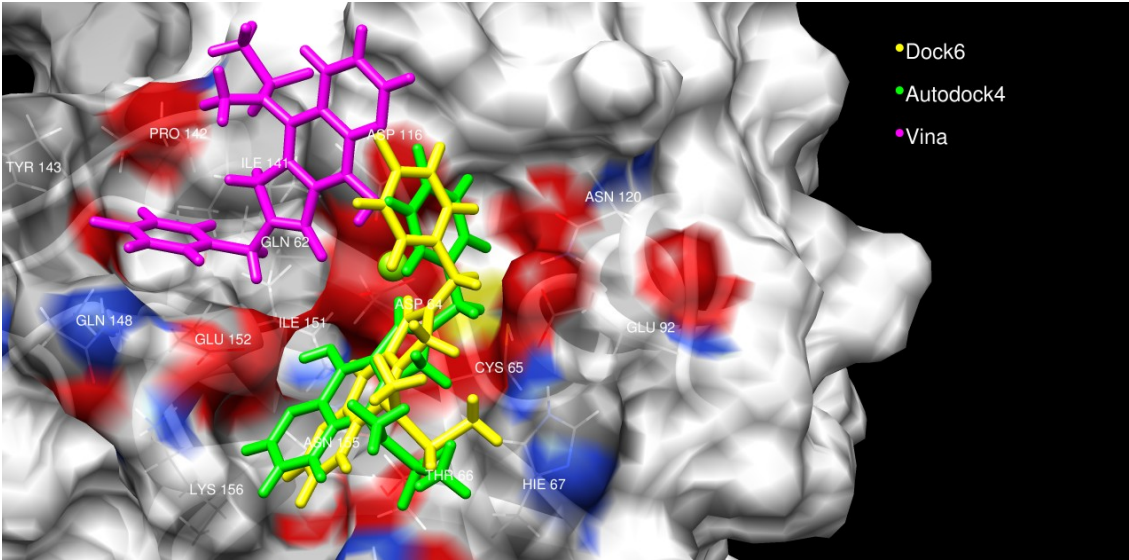
Şekil 4.53. L07 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L08 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.54.'te verilmiştir. Dock ve Autodock ligandı benzer konuma, Vina farklı bir konuma yerleştirmiştir.



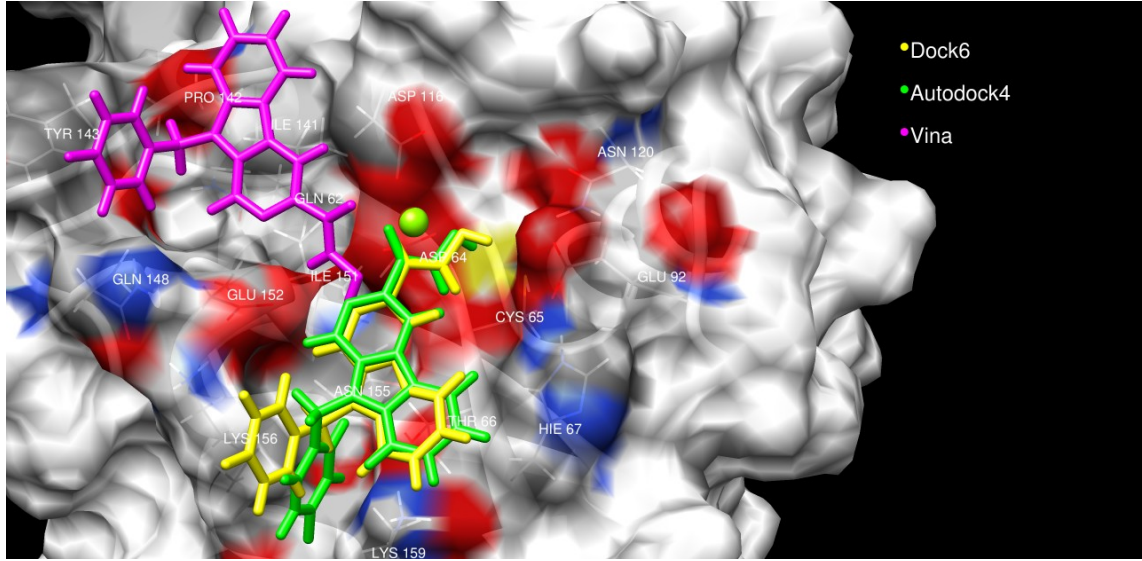
Şekil 4.54. L08 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L09 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.55.'te verilmiştir. Dock ve Autodock ligandı neredeyse aynı konformasyonla aynı konuma yerleştirirken, Vina yine farklı bir konuma yerleştirmiştir.



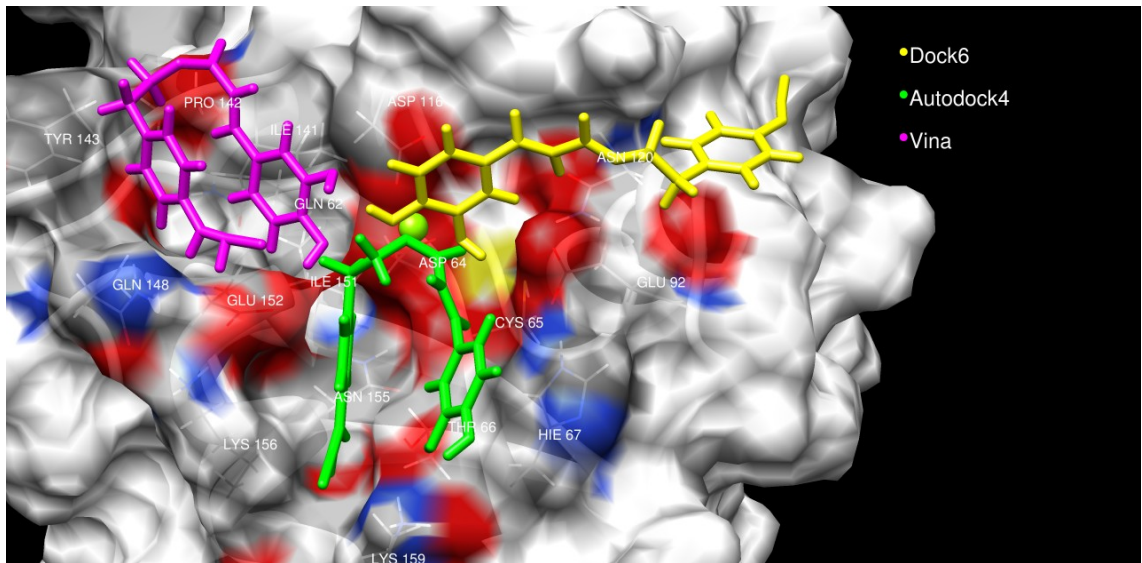
Şekil 4.55. L09 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L10 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.56.'da verilmiştir. Dock ve Autodock ligandı neredeyse aynı konformasyonla aynı konuma yerleştirirken, Vina yine farklı bir konuma yerleştirmiştir.



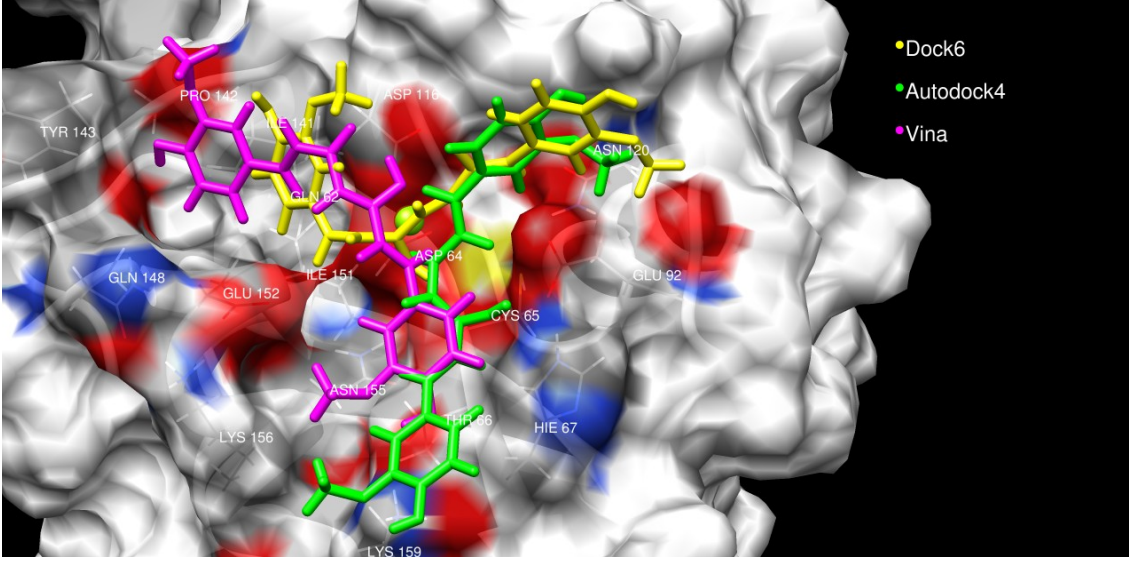
Şekil 4.56. L10 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L11 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.57’de verilmiştir. Her program ligandı farklı konuma farklı konformasyonla yerleştirmiştir.



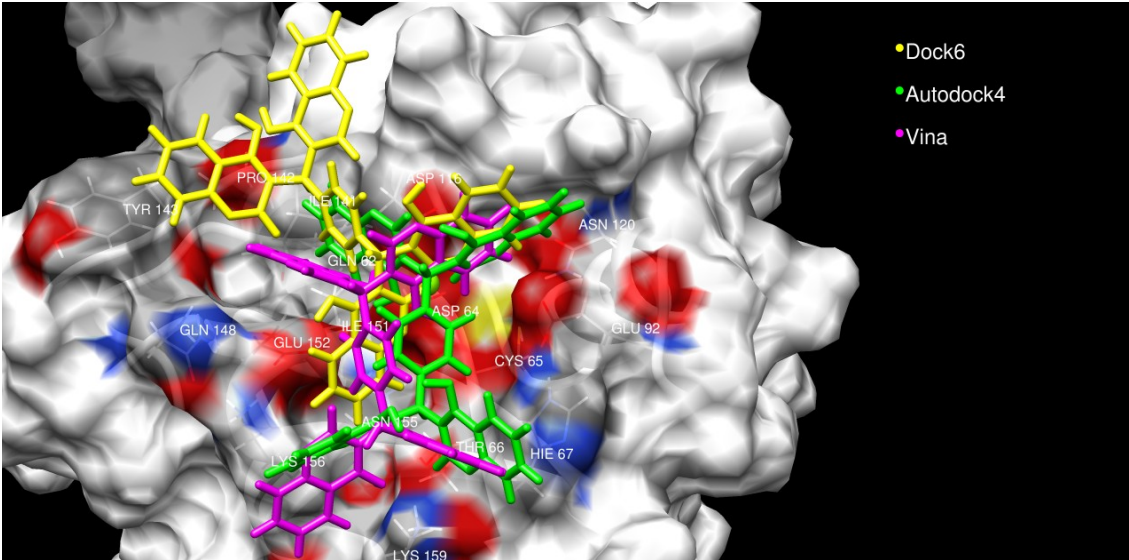
Şekil 4.57. L11 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L12 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.58’de gösterilmiştir. Her program ligandı farklı doğrultularda yerleştirmiştir. Ancak üçü de ligandın Mg ile etkileşmesini sağlamıştır.



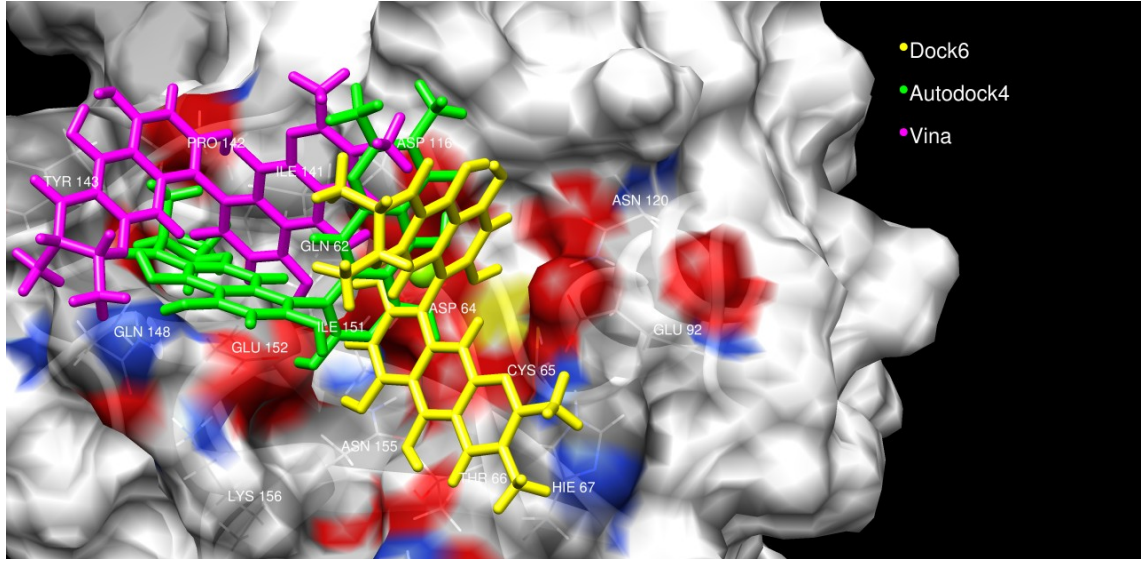
Şekil 4.58. L12 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L13 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.59’da verilmiştir. L13’ün yerleştirilmesinde Autodock ve Vina benzer sonuçlar verirken, Dock ligandı farklı şekilde yerleştirmiştir. Üç yerleştirmede de ligandın Mg ile etkileşmesi sağlanmıştır.



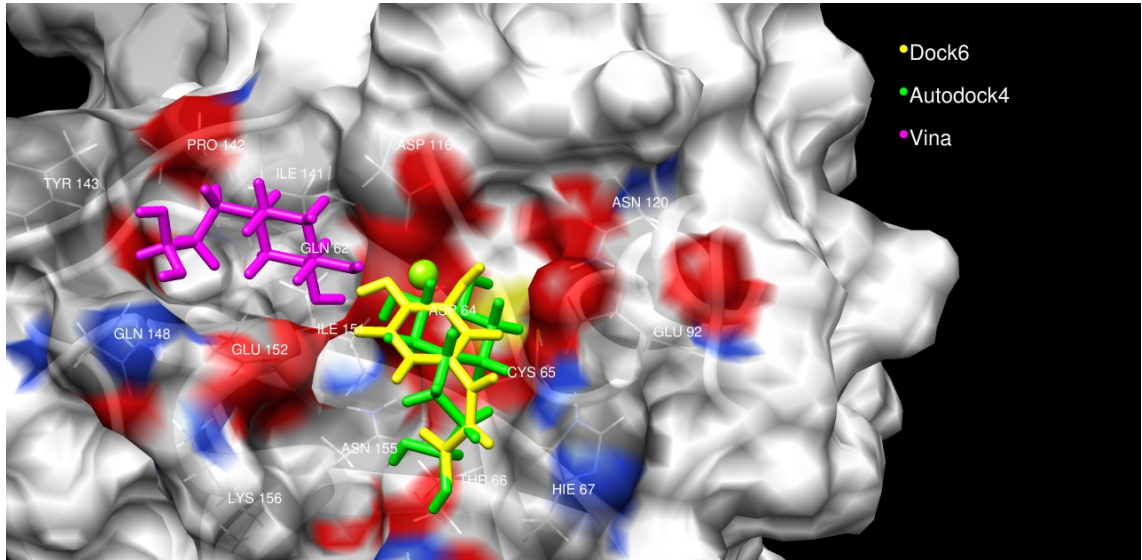
Şekil 4.59. L13 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L14 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.60’ta gösterilmiştir. Oldukça rijit yapıda olan ligand, üç programla benzer konformasyonlarla farklı konulara yerleştirilmişlerdir.



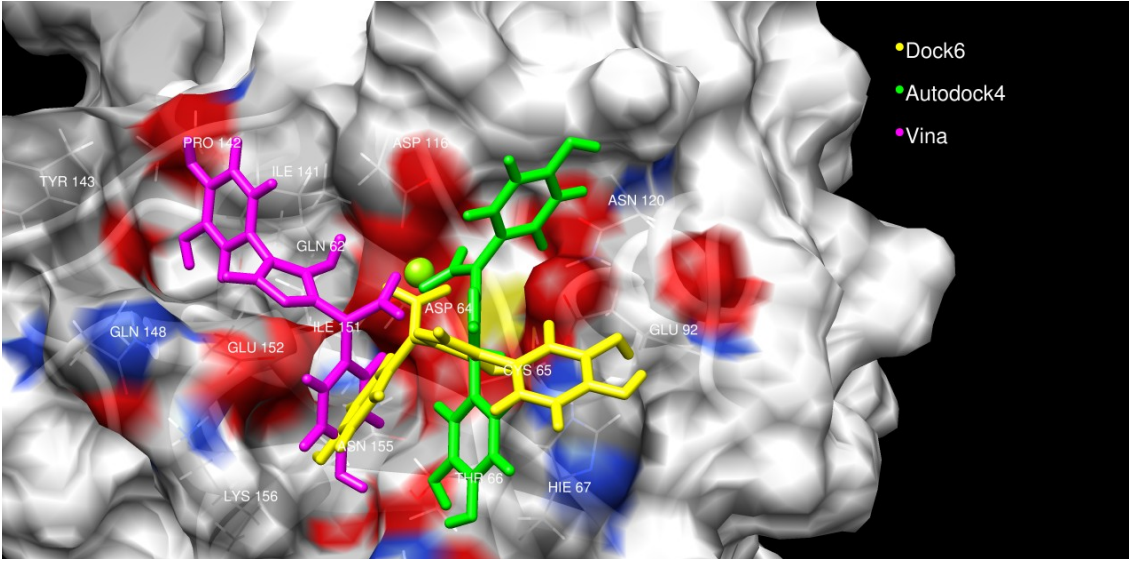
Şekil 4.60. L14 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L15 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.61’de gösterilmiştir. Autodock ve Dock sonuçları birbirine benzer iken Vina ligandı Mg’dan uzak şekilde yerleştirmiştir.



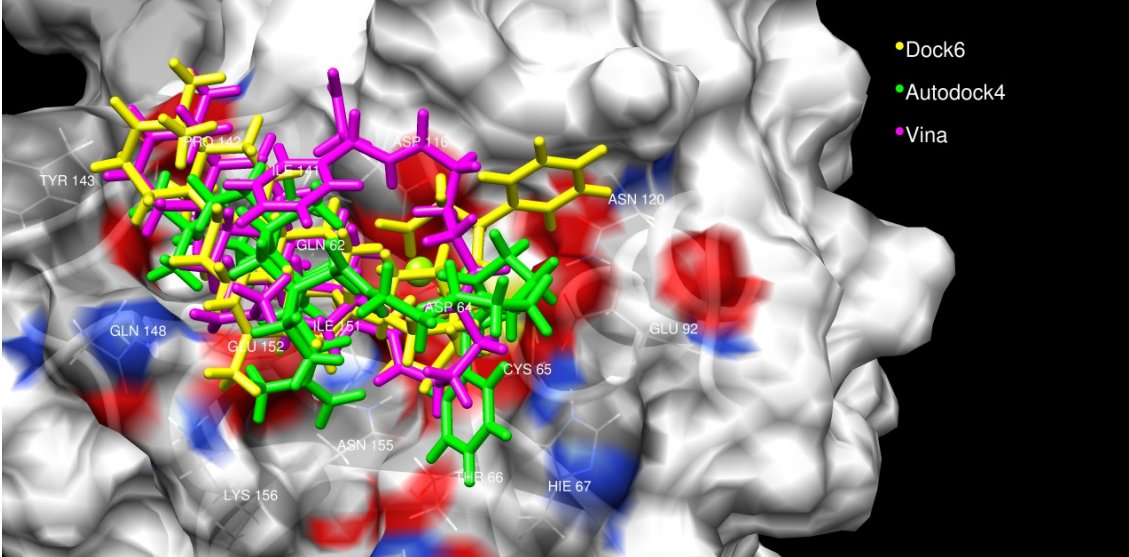
Şekil 4.61. L15 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L16 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.62’de gösterilmiştir. Üç program da ligandın karboksilik uçlarını Mg atomuna yakın tutarken, farklı doğrultularda yerleştirme yapmıştır.



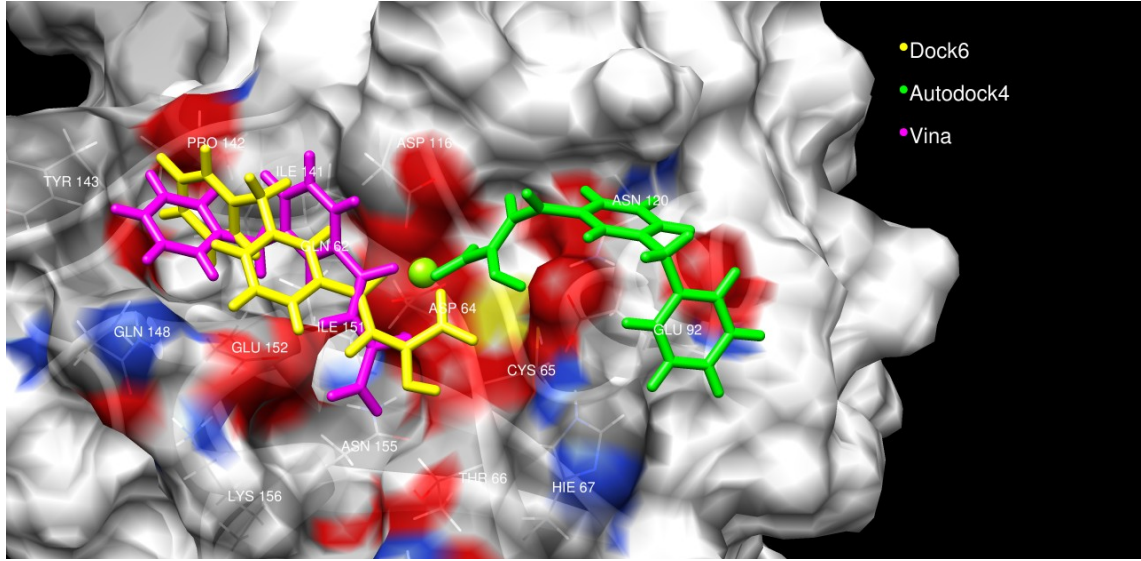
Şekil 4.62. L16 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L17 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.63'te gösterilmiştir. Her üç program da uzun zincirli olan L17 ligandını oyuk içine yerleştirmiştir. Autodock ve Dock karboksilik uçtaki oksijenleri Mg atomuna yakın yerleştirirken, Vina bunlardan farklı olarak keton oksijenini Mg atomuna yaklaştırmıştır.



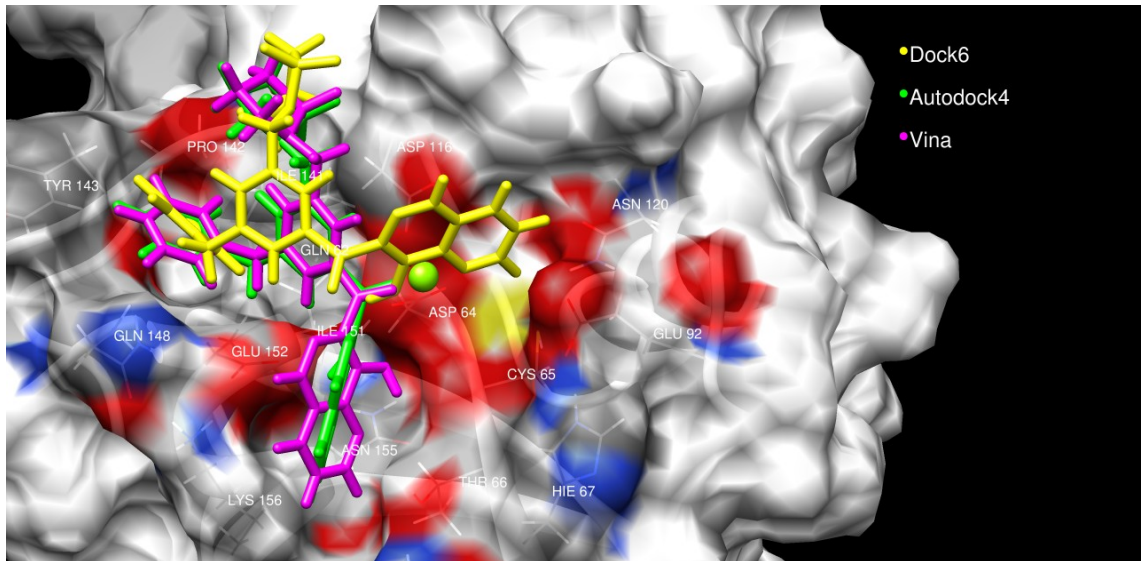
Şekil 4.63. L17 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L18 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.64'te gösterilmiştir. Autodock ve Dock ligandın küçük farklılıktaki konformasyonlarıyla ligandı aynı bölgeye yerleştirirken, Vina ligandı farklı bir bölgeye yerleştirmiştir.



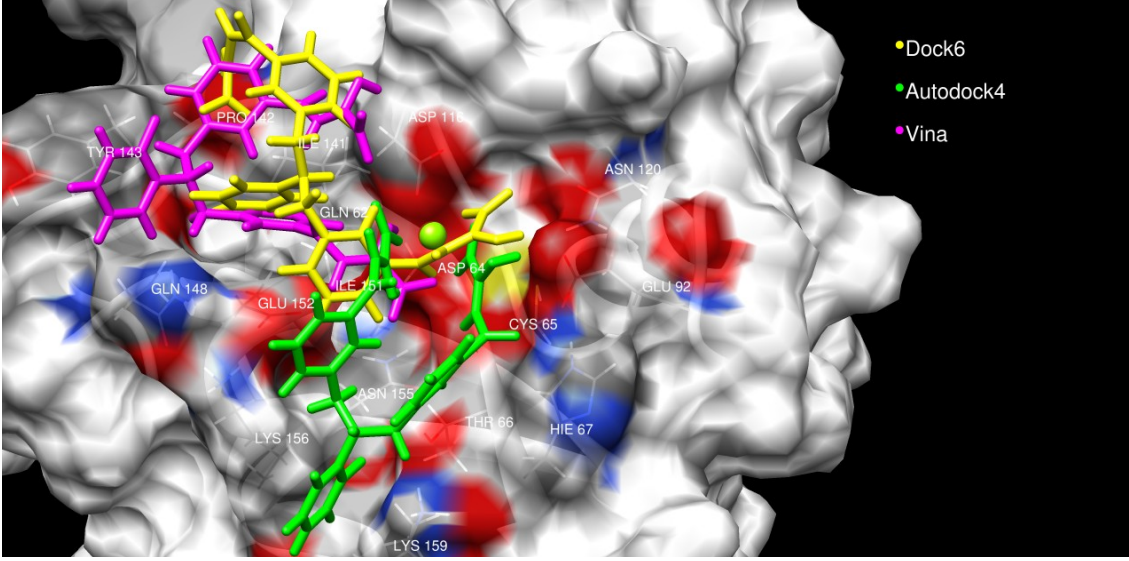
Şekil 4.64. L18 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L19 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.65'te gösterilmiştir. Autodock ve Vina ligandı neredeyse aynı konformasyonla aynı konuma yerleştirirken bu yerleştirmede Dock6 ligandın bir ucunu diğerlerinden farklı doğrultuda yerleştirmiştir.



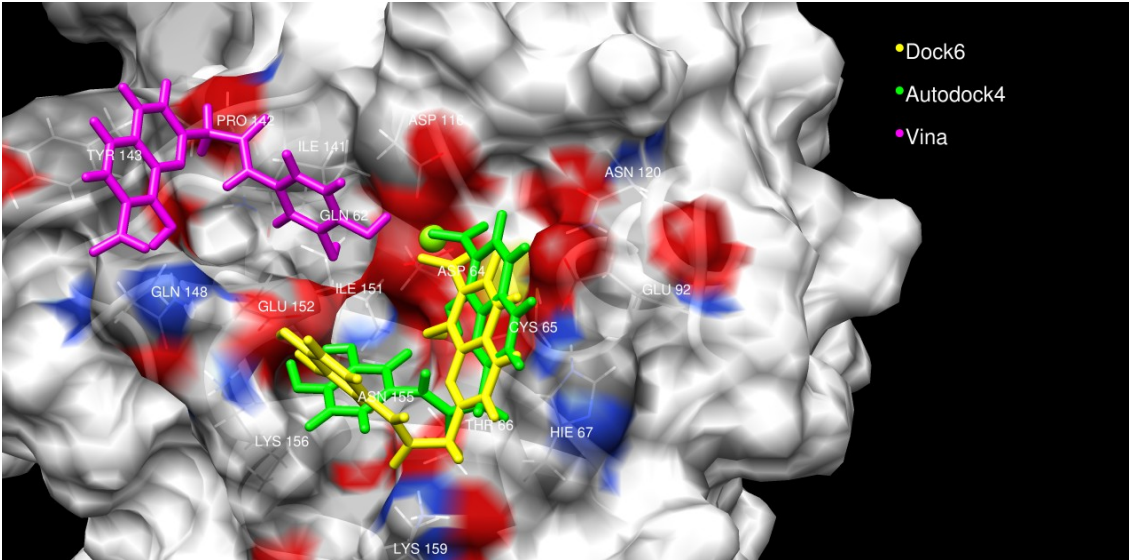
Şekil 4.65. L19 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L20 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.66'da gösterilmiştir. Autodock ligandın her iki karboksilik ucunu Mg atomuna yakınlştırıp yerleştirme işlemini gerçekleştirirken, Dock ve Vina ligandın bir ucunu Mg atomuna yakın şekilde yerleştirmiştir.



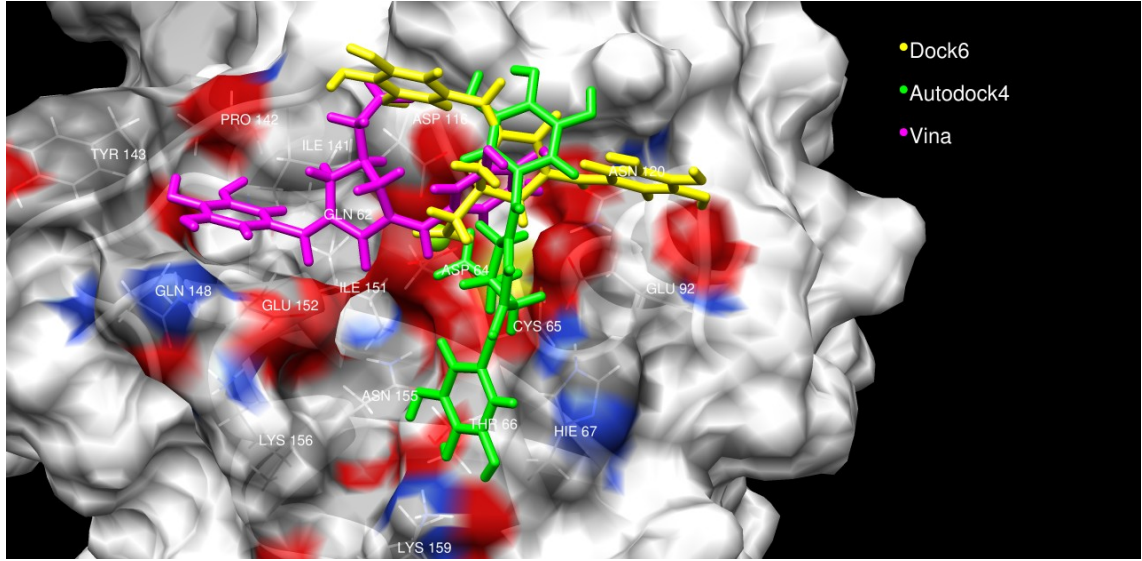
Şekil 4.66. L20 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L21 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.67’de gösterilmiştir. Autodock ve Dock ligandı benzer konformasyonlarla proteine yerleştirirken, Vina yine farklı bir konuma ligand yerleştirme işlemini gerçekleştirmiştir.



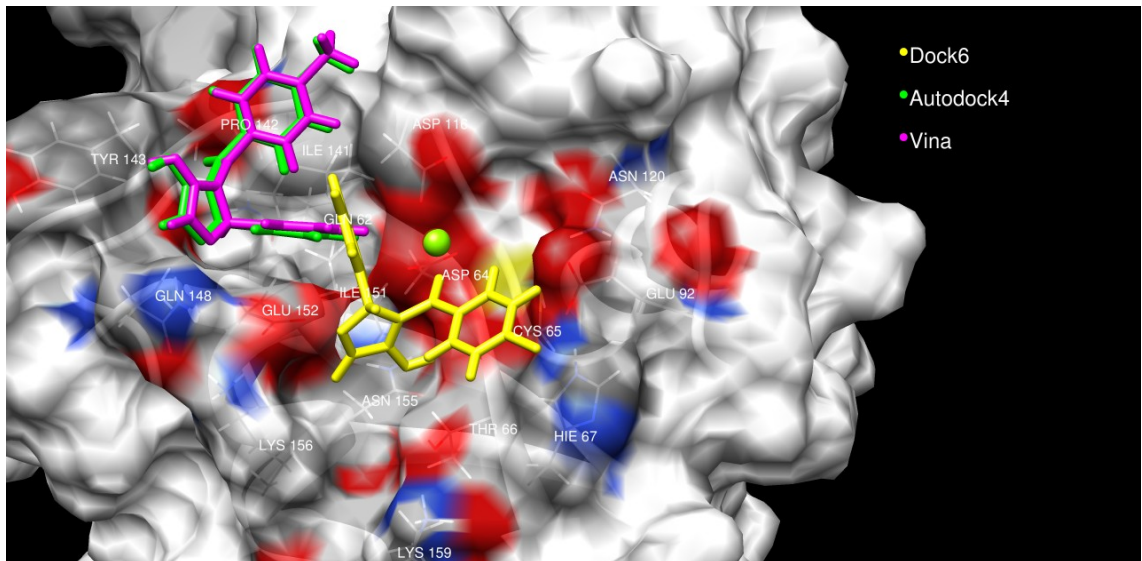
Şekil 4.67. L21 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L22 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.68’de gösterilmiştir. Programların üçü de ligandı farklı konformasyonla, farklı doğrultularda katalitik bölgeye yerleştirmiştir.



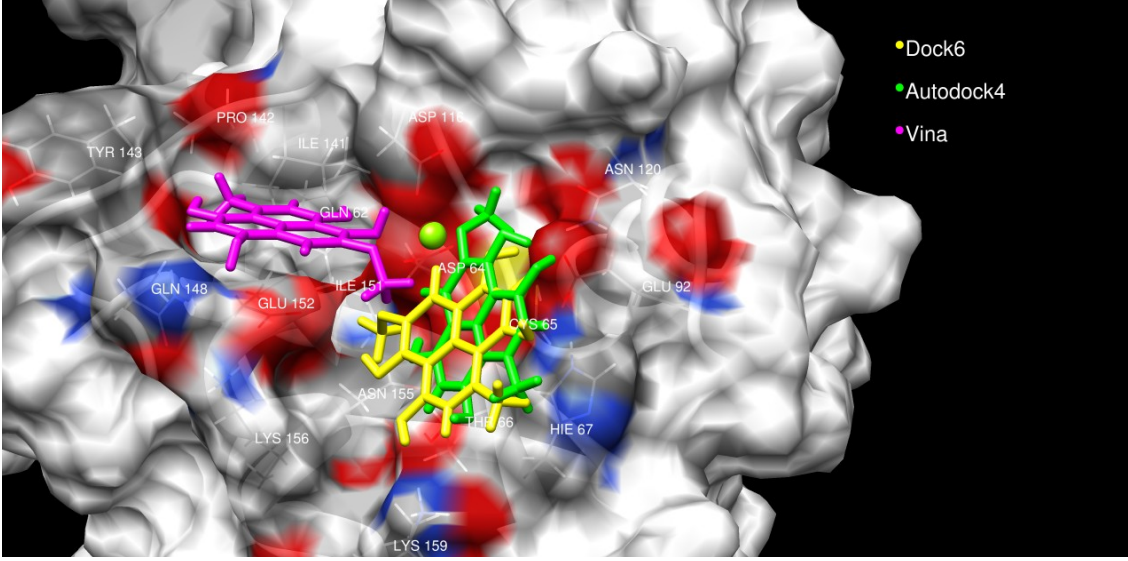
Şekil 4.68. L22 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L23 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.69’da gösterilmiştir. Autodock ve Vina sonuçları bire bir örtüşürken, Dock farklı bir konumda yerleştirme işlemini gerçekleştirmiştir.



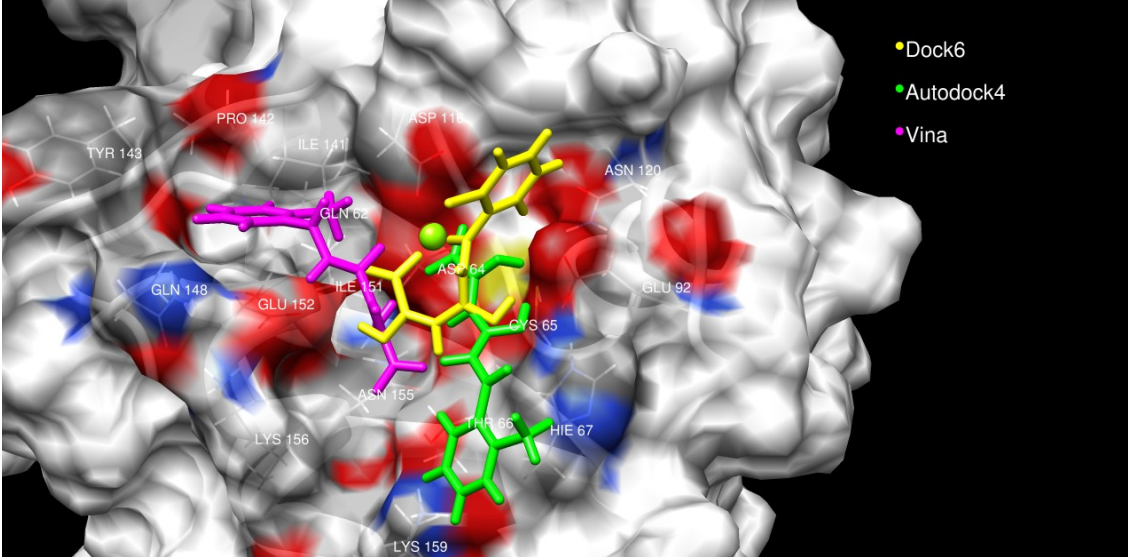
Şekil 4.69. L23 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L24 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.70’te gösterilmiştir. Rijit yapıdaki ligandın yerleştirme işleminde Autodock ile Dock yakın sonuçlar verirken, Vina ligandı farklı konumlandırmıştır.



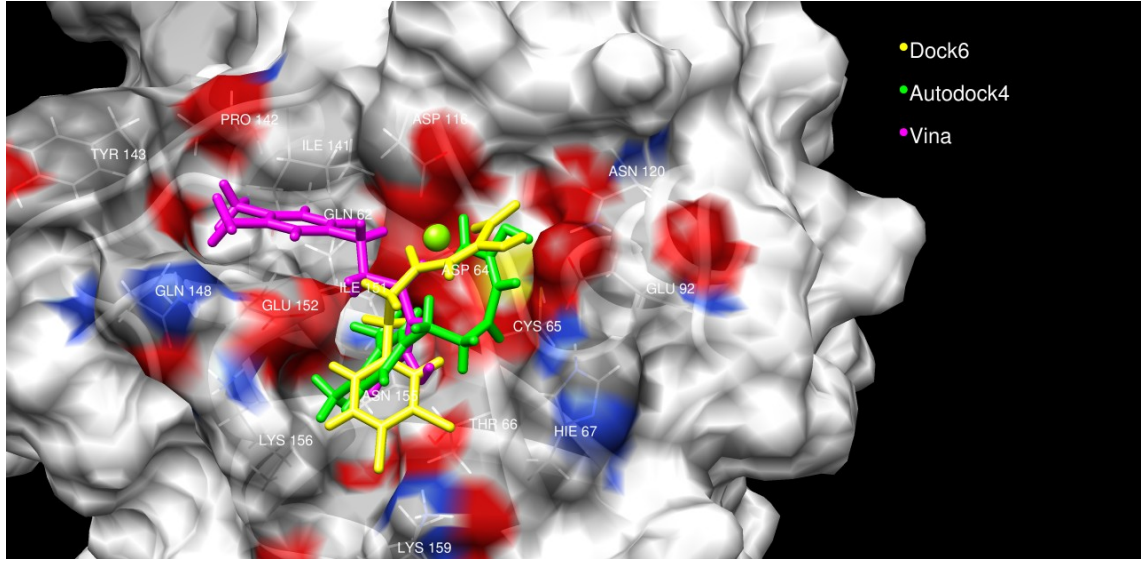
Şekil 4.70. L24 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L25 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.71’de gösterilmiştir. Autodock ligandın karboksilik ucunu Mg atomuna yaklaştırıp yerleştirme işlemini gerçekleştirmiştir. Vina keto-enol grubunu Mg atomuna yakın tutarken, Dock ligandın hem karboksilik ucunu hem de keton oksijenini Mg atomuna yaklaştırarak ligandı yerleştirmiştir.



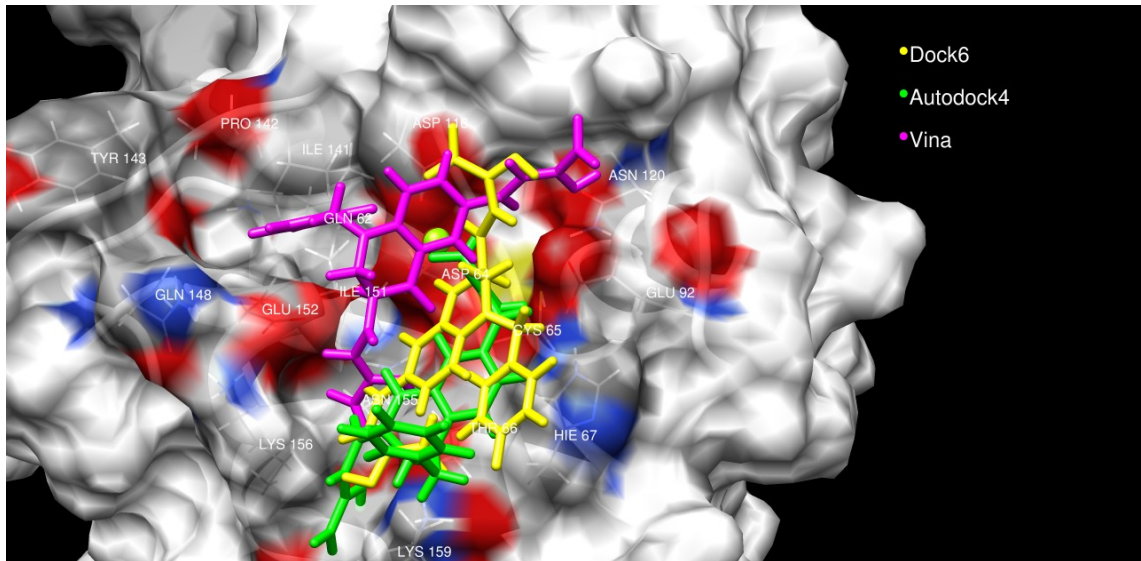
Şekil 4.71. L25 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L26 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.72’de gösterilmiştir. Autodock ve Dock ligandın karboksilik ucunu Mg atomuna yaklaştırarak ligandı yerleştirirken Vina yine keton oksijenini Mg atomuna yaklaştırarak yerleştirme işlemini yapmıştır.



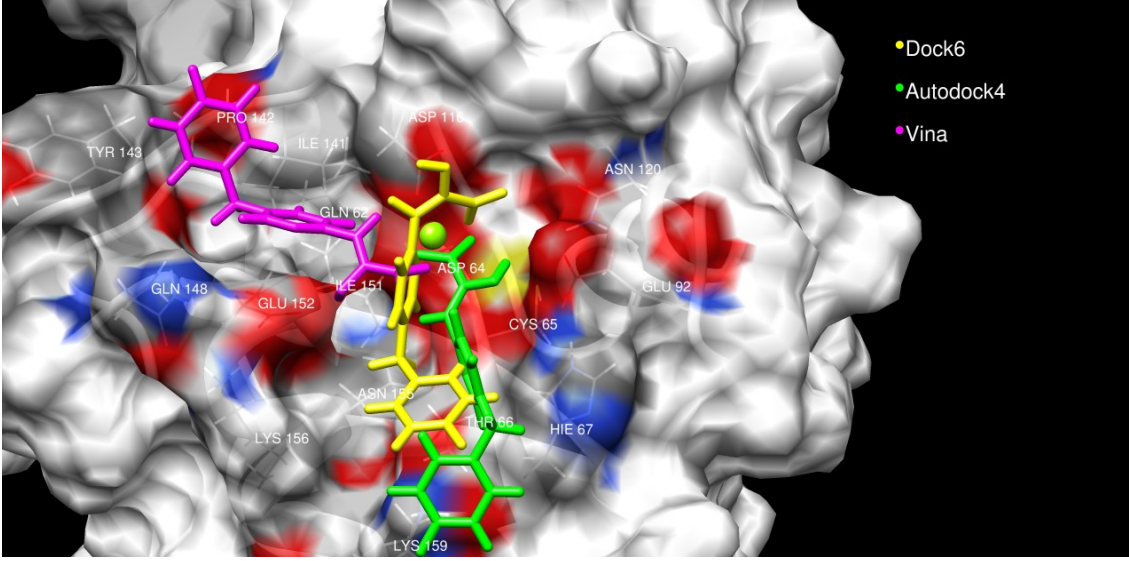
Şekil 4.72. L26 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L27 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.73'te gösterilmiştir. Autodock ligandın karboksilik oksijenlerini, Dock keton grubunu Mg atomuna yaklaştırarak ligand yerleştirme işlemini gerçekleştirirken Vina ile yapılan yerleştirmede oksijen atomları Mg atomundan uzak kalmıştır.



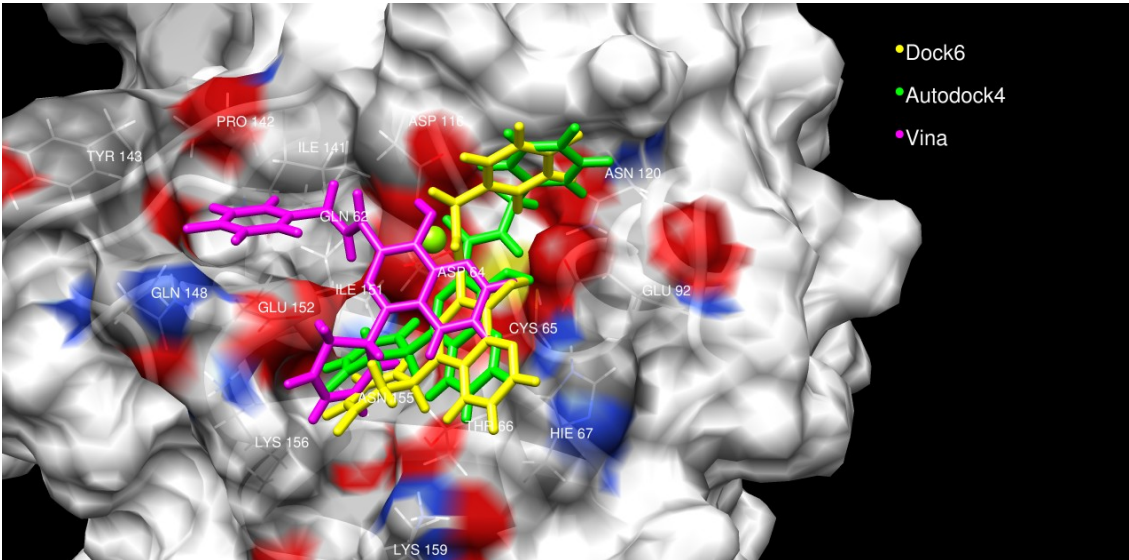
Şekil 4.73. L27 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L28 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.74'te gösterilmiştir. Autodock programı iki karboksil oksijenini Mg atomuna bağ yapacak konuma gelirken, Dock karboksilik uca ek olarak piridin halkasının azot atomunu da Mg atomuna yaklaştırmıştır. Vina ise karboksilik asit oksijenlerinden birini Mg atomuna yerleştirmiştir.



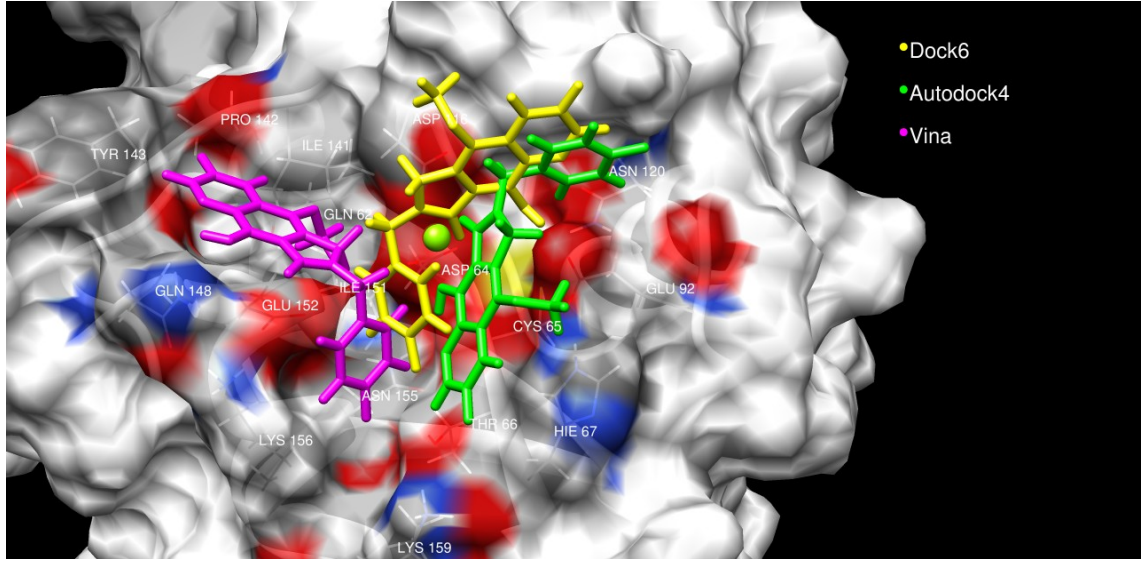
Şekil 4.74. L28 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L29 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.75'te gösterilmiştir. Üç program da keton oksijenini farklı konformasyonlarla Mg atomuna yaklaştırarak ligandı proteine yerleştirmiştir.



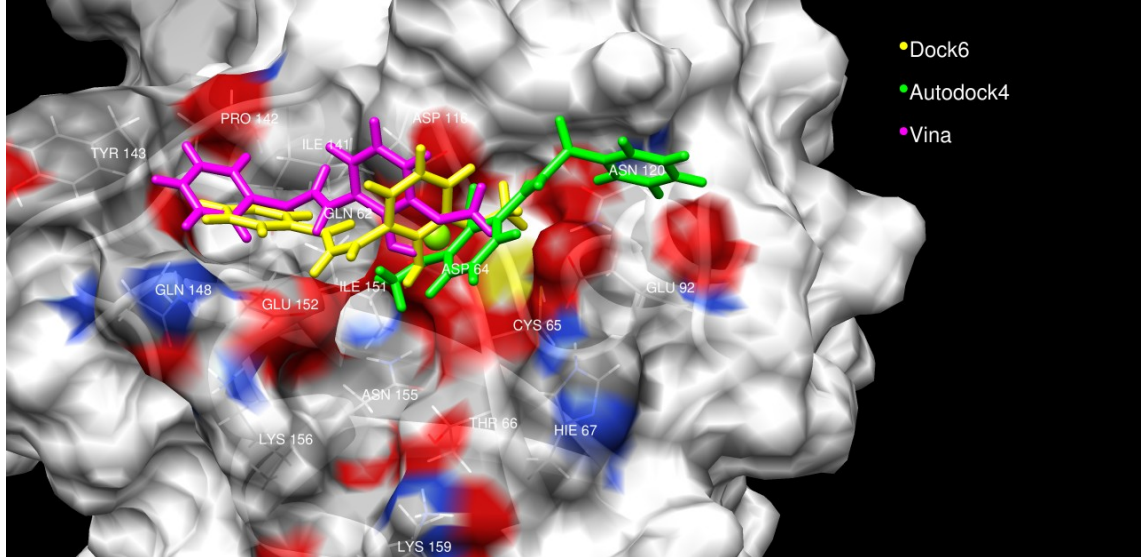
Şekil 4.75. L29 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

L30 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.76'da gösterilmiştir. Autodock ve Dock ligandın keton oksijenini Mg atomuna yaklaştırarak yerleştirme işlemini gerçekleştirirken, Vina yine böyle bir gereksinim duymamıştır.



Şekil 4.76. L30 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

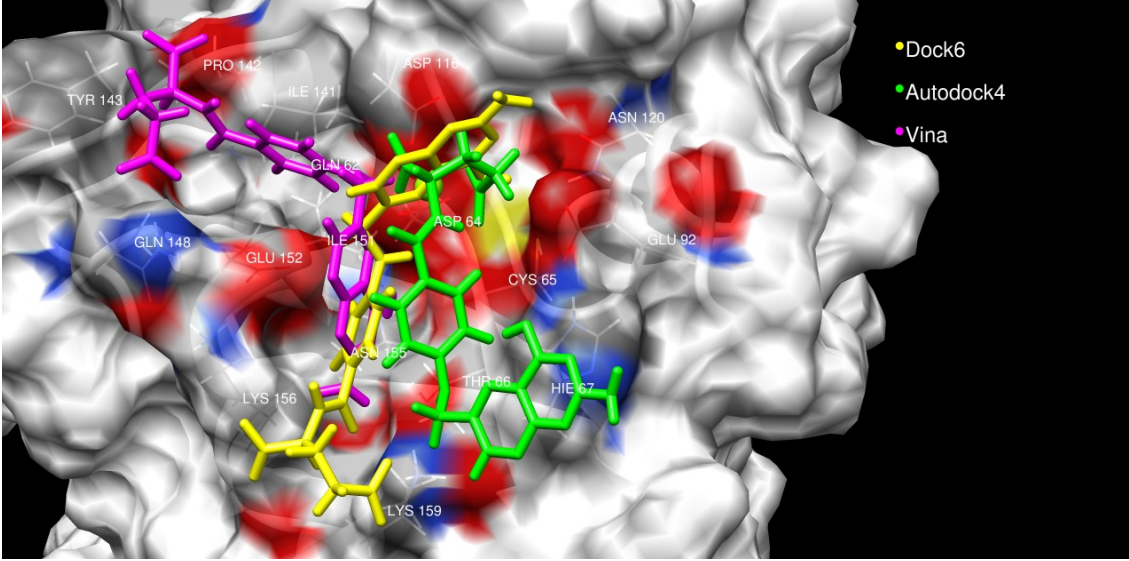
L31 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.77’de gösterilmiştir. Autodock ve Dock ligandın alkol ve eter oksijenlerini Mg atomuna bağlanacak konuma getirerek aynı doğrultuda birbirinin tersi yönde yerleştirme işlemini gerçekleştirmişlerdir. Vina da benzer yerleştirme işlemini yapmış ancak eter oksijeni alkol oksijenine oranla Mg atomuna uzakta kalmıştır.



Şekil 4.77. L31 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

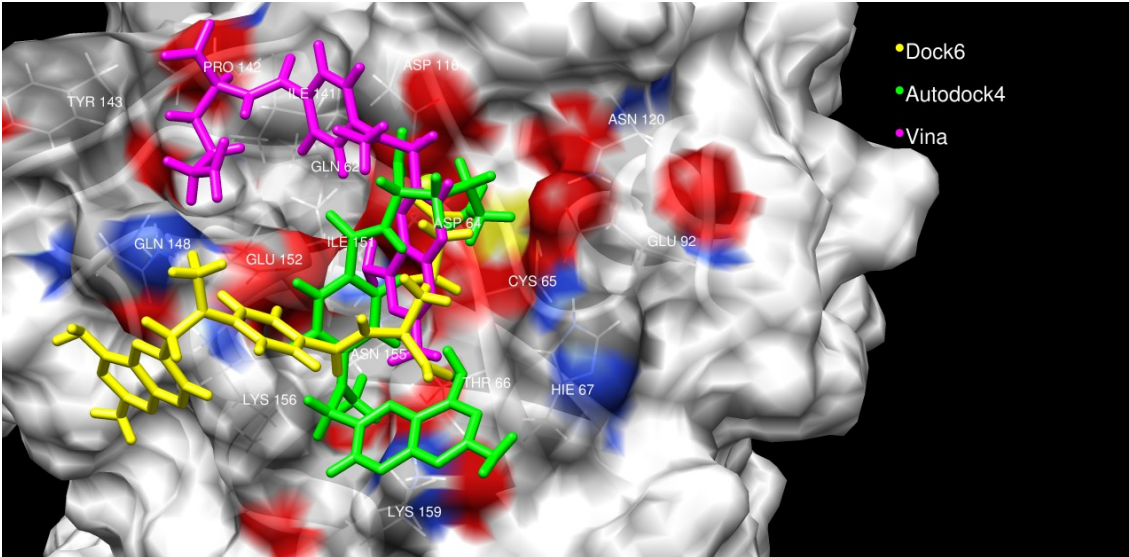
L32 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.78’de gösterilmiştir. Autodock ligandın karboksilik asit oksijenlerini Mg atomuna bağlarken, Dock pteridin halkası azotlarını Mg atomuna yaklaştırmıştır. Azot atomunun Mg atomuna bağlanmada oksijen ile yarışabileceği literatürde belirtilmiştir (Marchand ve

ark. 2003). Vina azot pteridin halkası azotları yerine alifatik zincirdeki azot atomunu Mg atomuna yaklaştırmıştır.



Şekil 4.78. L32 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

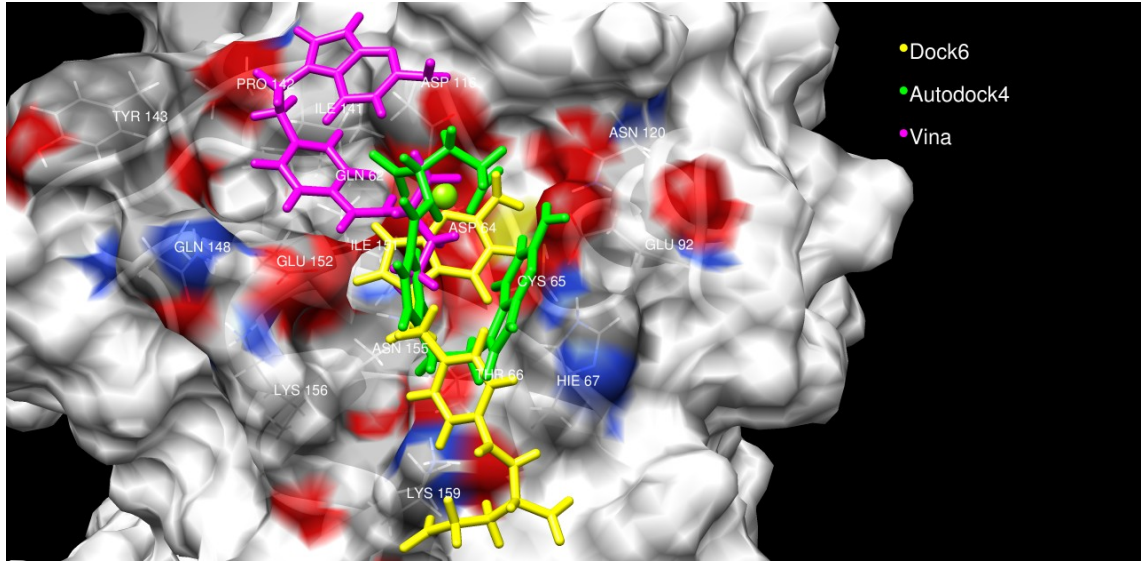
L33 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.79’da gösterilmiştir. L33 ve L34 L32 ligandının türevleridir. Autodock L32’deki gibi bir yerleştirme yapmıştır. Dock L32 ligandının pteridin azotları yerine bu kez karboksilik oksijenleri Mg atomuna yaklaştırmışken, Vina da L32 ligandının aksine pteridin halkasının azot atomlarını Mg ile etkileştirmiştir.



Şekil 4.79. L33 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

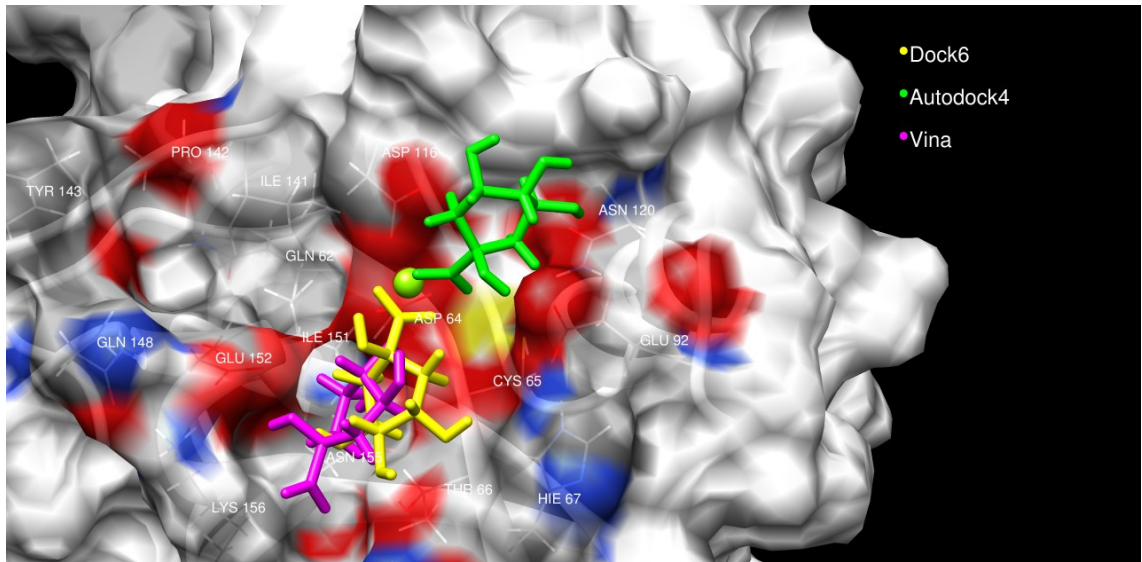
L34 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.80’de gösterilmiştir. Autodock L34 ligandını, L32 ve L33 ligandındaki gibi yerleştirmiştir.

Dock pirimidin halkasındaki azot atomunu Mg atomuna yaklaştırmıştır. Vina ise L32'dekine benzer bir ligand yerleştirme işlemi gerçekleştirmiştir.



Şekil 4.80. L34 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

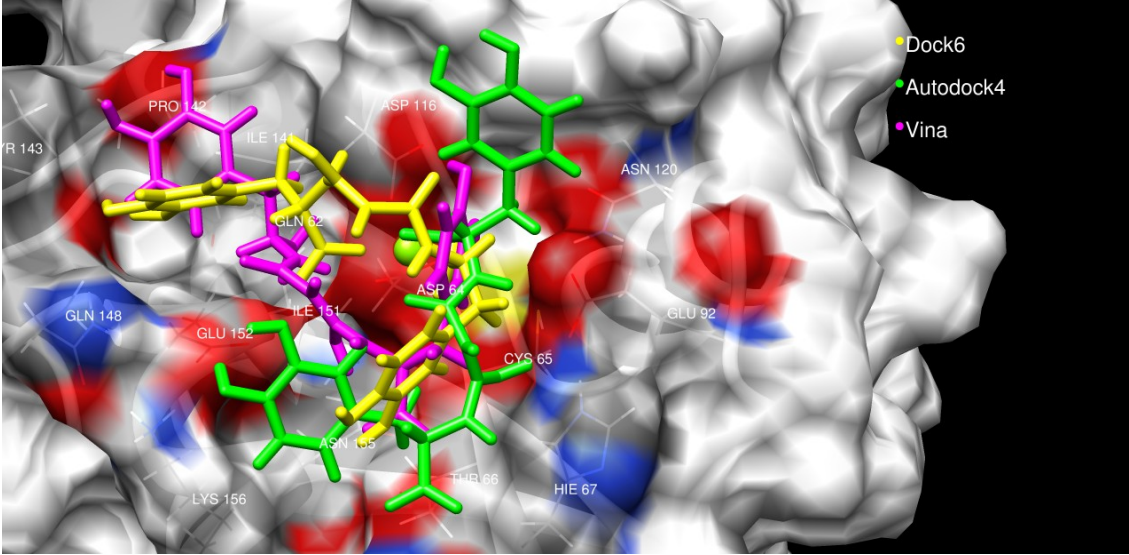
L35 ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.81'de gösterilmiştir. Autodock ve Dock ligandın karboksilik oksijen atomlarını Mg atomuna yaklaştırarak yerleştirme işlemi yaparken, Vina ligandın alkol oksijenini Mg atomuna yaklaştırmıştır.



Şekil 4.81. L35 ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

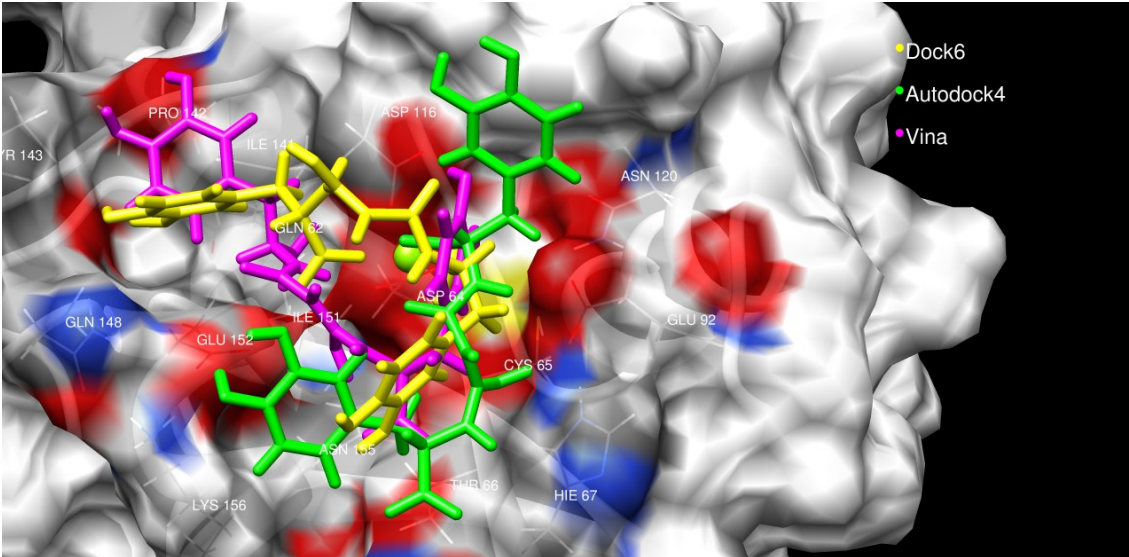
LGA ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.82'de gösterilmiştir. Autodock liganddaki karboksilik uçlardan birindeki oksijen atomlarını Mg atomuna yaklaştırırken, Dock karboksilik uçlardan ikisini de Mg atomuna yaklaştırmıştır. Vina etkileşimden ziyade konformasyonel bir yaklaşımla ligand

yerleştiriyor gibi görünüyor, zira yapıda negatif yüklü oksijen ve kısmen negatif oksijen ve azot atomları varken, bunları Mg atomuna yeterince yaklaştırma becerisini çoğu yerleştirmede becerememiştir.



Şekil 4.82. LGA ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

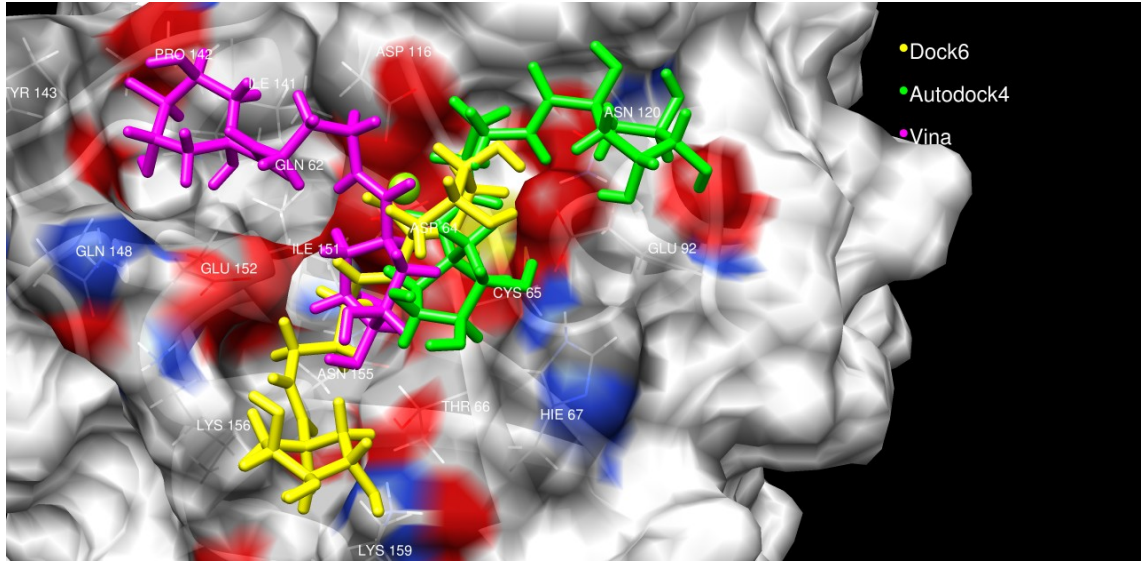
LGB ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.83'te gösterilmiştir. Her program ligandı farklı konformasyon ve doğrultuda yerleştirirken Autodock, Dock ve Vina ligandın karboksilik oksijenleri Mg atomuna yaklaştırarak yerleştirme işlemini yapmışlardır.



Şekil 4.83. LGB ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

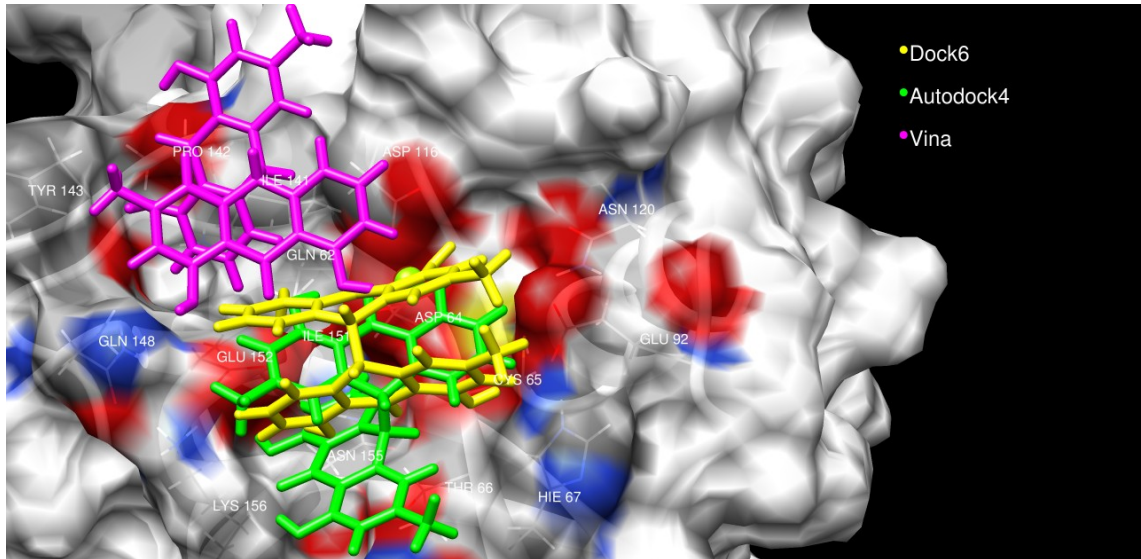
LGC ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.84'te gösterilmiştir. Autodock ligandın keton oksijenini, Dock ve Vina ise alkol

oksijenlerinden birini Mg atomuna yaklaştırmıştır. Üç program da ligandı farklı konformasyonlarla proteine yerleştirmiştir.



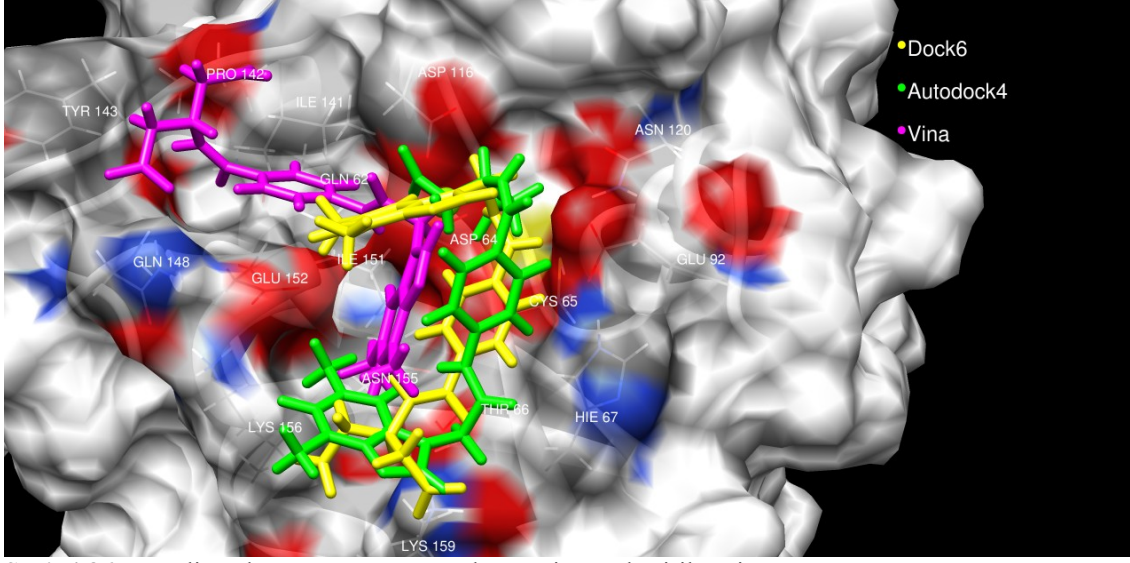
Şekil 4.84. LGC ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

LGD ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.85'te gösterilmiştir. Autodock ve Dock programları ligandın keton ve alkol oksijenlerini Mg atomuna yaklaştırmışken, Vina bir alkol oksijenini Mg atomuna yaklaştırmıştır. Autodock ve Dock farklı konformasyonlarla ligandı birbirine yakın bölgelere yerleştirirken, Vina ligandı farklı bölgeye yerleştirmiştir.



Şekil 4.85. LGD ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

LGE ligandının üç programla proteine yerleştirilmesi sonucu Şekil 4.86'da gösterilmiştir. Autodock ligandın karboksilik oksijenlerini, Dock keton oksijenlerini ve Vina ise keton oksijenini ve azot atomlarını Mg atomuna yaklaştırmıştır.



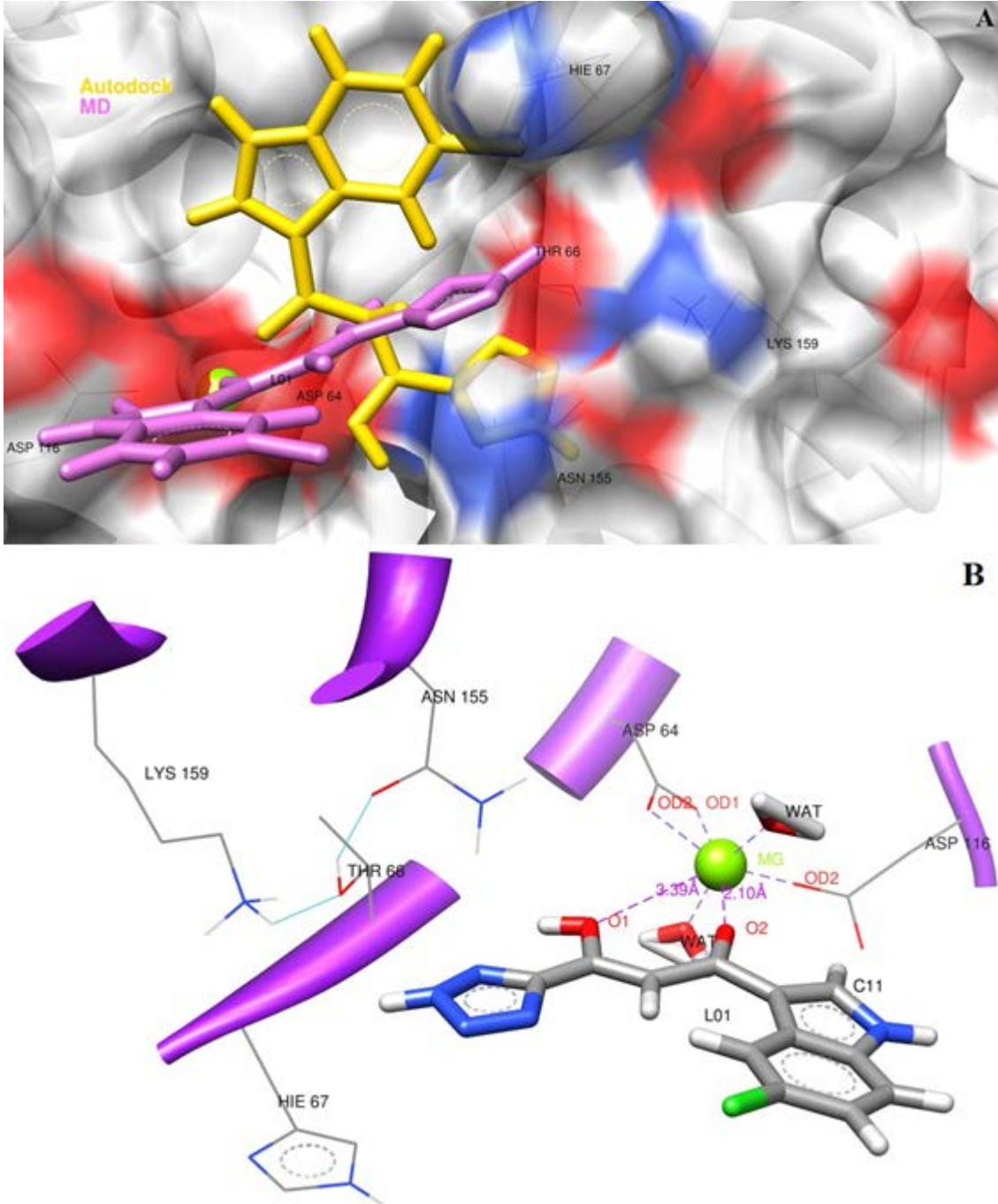
Şekil 4.86. LGE ligandının üç ayrı programla proteine yerleştirilmesi

4.4. Komplekslerin Moleküler Dinamik Hesaplamaları Sonuçları

Yerleştirilme skorları iyi olan ligandlar ve tasarlanan 5 ligandın MD hesaplamaları yapılmıştır. Ligand yerleştirme programlarının daha iyi değerlendirilebilmesi amacıyla, önce her ligandın yerleştirilme konformasyonu ile MD hesaplamaları sonucu elde edilen yapıların(en düşük enerjili bir konformer) üst üste çakıştırılmasıyla verilmiştir. Akabinde ise, MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili kompleks yapısında ligandın proteinle etkileşimleri ve son olarak enerji ve RMSD değişim grafikleri verilmiştir.

L01 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom01) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.87.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L01 ligandının konformasyonunda ciddi değişikliklerin olduğu görülmektedir. Komplekste ligandın tetrazol halkası, HIE67 kalıntısının imidazol halkası ile π - π etkileşimi yaparken, enol oksijenine bağlı hidrojen atomu ile CYS65 oksijeni arasında hidrojen bağı olduğu görülmektedir. Bunun haricinde L01 ligandı ile ASP64, CYS65, THR66, ASP116, ASN117, ASN155 ve LYS159 kalıntıları arasında polar etkileşimler bulunduğu anlaşılmaktadır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerinin zamanla değişimi Şekil 4.93.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile kalıntı atomları arasındaki mesafelerin

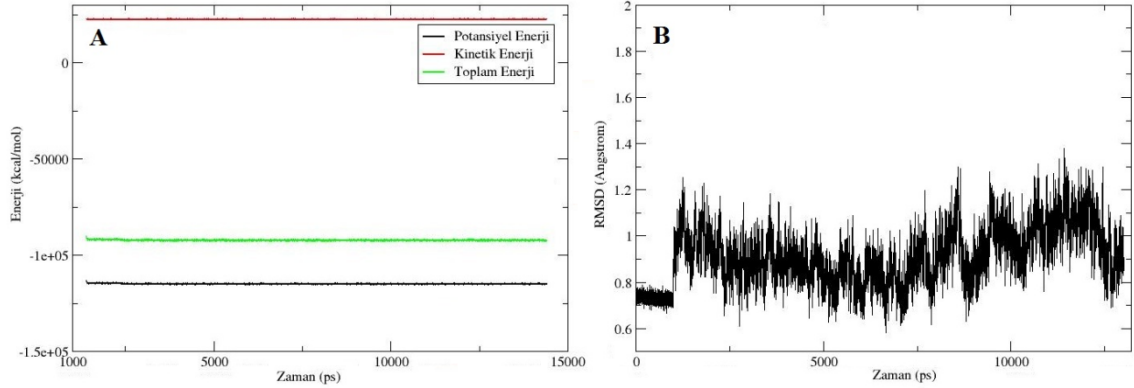
ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteininin ASP64 OD1-OD2, ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 3.39 Å ve 2.10 Å iken, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 3.52 Å ve 1.99 Å olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.87. A) L01 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom01) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

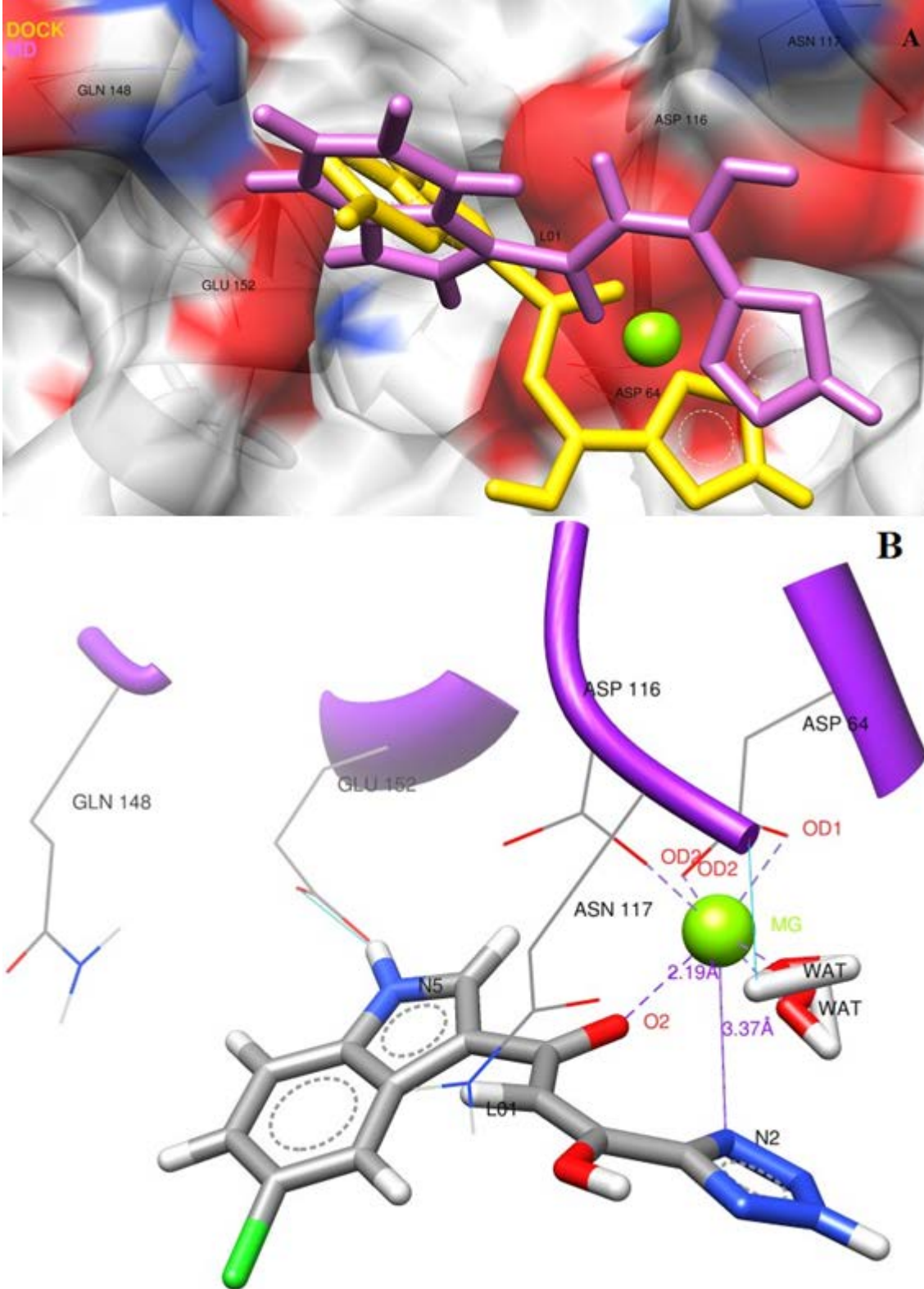
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.88.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



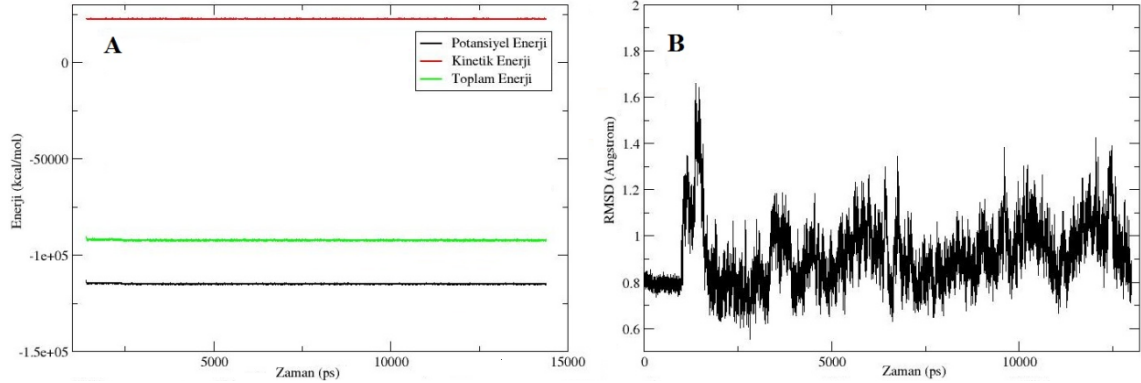
Şekil 4.88. L01 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L01 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom01) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.89.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L01 ligandının konformasyonunun çok az değiştiği, görülmektedir. İndol halkasındaki N5 azotuna bağlı hidrojen ile GLU152 kalıntısı arasında hidrojen bağı bulunurken ligand atomları ile ASP64, ASP116 ve ASN117 ile polar GLN148 ile van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.93.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında, Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2, ASP116 OD2 atomları, ligandın O2, N2 atomları ve iki tane su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve N2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 2.19 Å ve 3.37 Å iken, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 2.01 Å ve 3.70 Å olarak hesaplanmıştır.



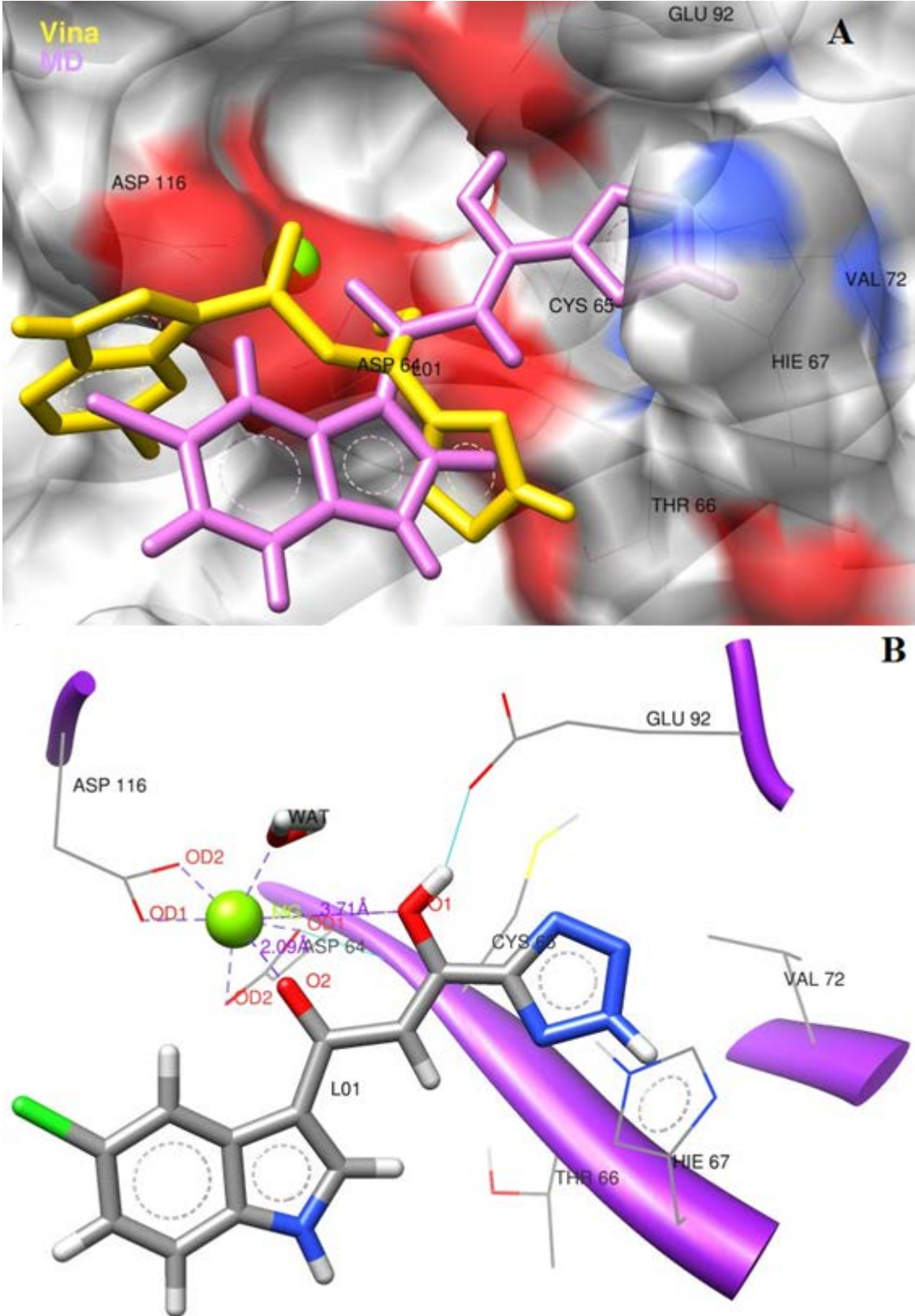
Şekil 4.89. A) L01 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom01) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.90.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



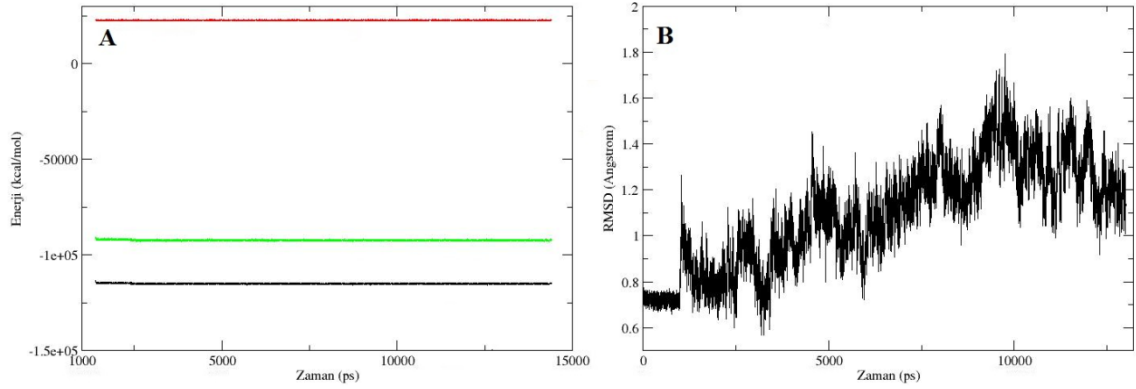
Şekil 4.90. L01 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L01 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom01) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.91'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L01 ligandının konformasyonunun çok az değiştiği görülmektedir. Ligandın O1 oksijenine bağlı hidrojen ile GLU92 ve imidazoldaki tek hidrojen atomu ile HIE67 arasında hidrojen bağlarının olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında, hesaplamalar L01 ligandı ile CYS65 ve THR66 kalıntıları arasında polar, VAL72 ile van der Waals etkileşimler meydana geldiğini göstermiştir. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.93.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD1-OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 3.71 Å ve 2.09 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.99 Å ve 3.36 Å olarak hesaplanmıştır.

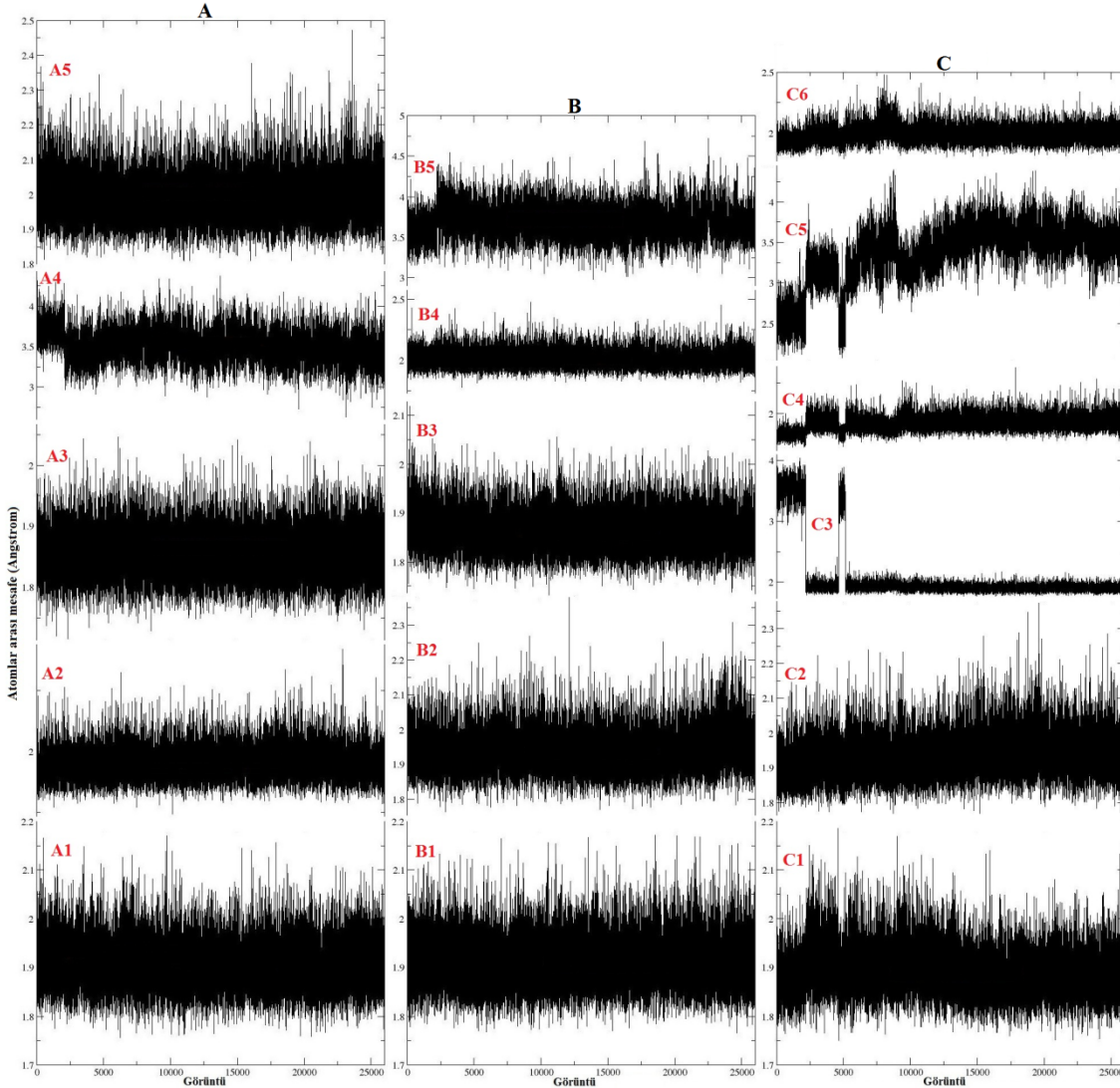


Şekil 4.91. A) L01 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcom01) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksinin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri, Şekil 4.92.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD değerleri 1.8 Å'a kadar çıktıktan sonra tekrar düşmeye başlamıştır.



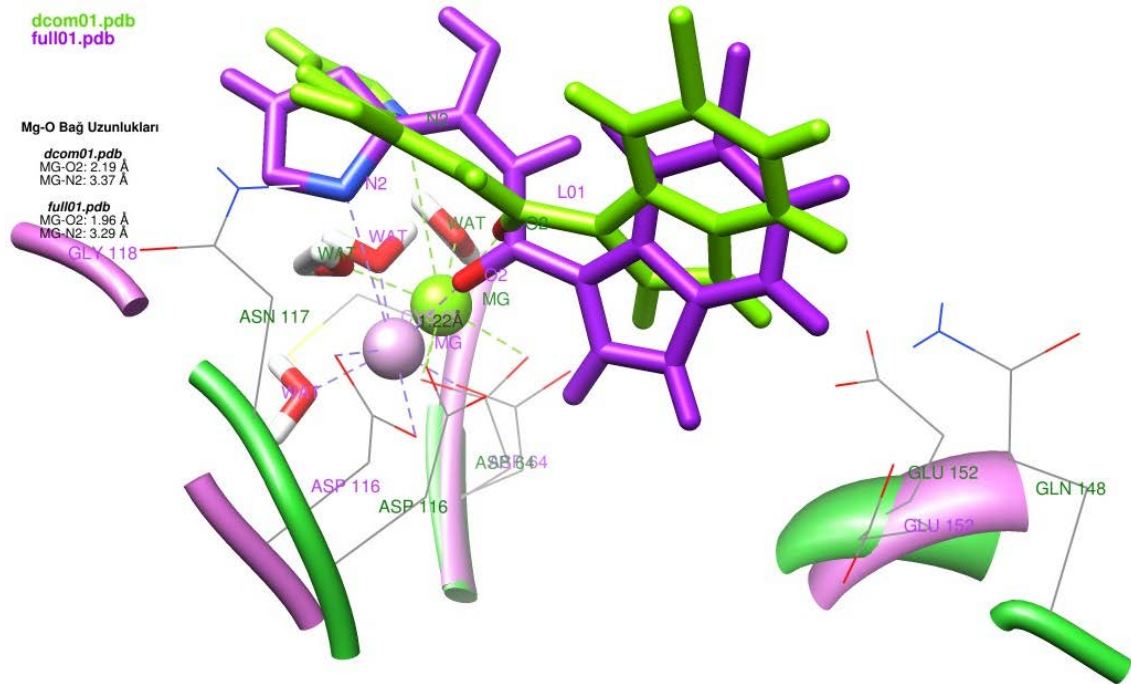
Şekil 4.92. L01 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.93. İntegrasyon katalitik öz bölgesindeki (**A:** acom01.pdb, **B:** dcom01.pdb, **C:** vcom01.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (**A1:** Mg-ASP64 OD1, **A2:** Mg-ASP64 OD2, **A3:** Mg-ASP116 OD2, **A4:** Mg-L01 O1, **A5:** Mg-L01 O2, **B1:** Mg-ASP64 OD1, **B2:** Mg-ASP64 OD2, **B3:** Mg-ASP116 OD2, **B4:** Mg-L01 O2, **B5:** Mg-L01 N2, **C1:** Mg-ASP64 OD1, **C2:** Mg-ASP64 OD2, **C3:** Mg-ASP116 OD1, **C4:** Mg-ASP116 OD2, **C5:** Mg-L01 O1, **C6:** Mg-L01 O2)

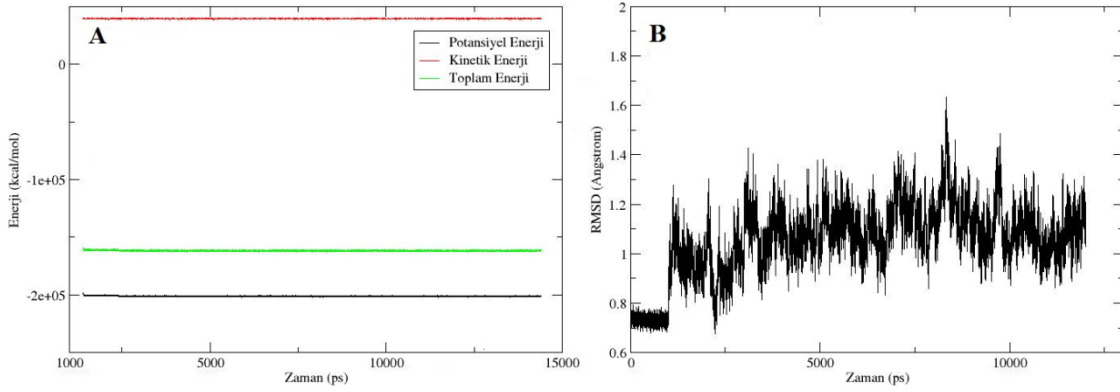
L01 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin E1 yapısı ile üst üste çakıştırılması ile bu yapının L01 ligandı ile oluşan kompleksi (full01) hazırlanmış olup bu kompleksin MD hesaplamaları sonucunda elde edilen yapı ile dcom01'in MD hesaplamaları sonucu elde edilen yapısının üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntü Şekil 4.94'te verilmiştir. Bu iki yapı karşılaştırıldıklarında tam uzunluktaki proteinin kompleksleşme modunda ciddi anlamda farklılık yaratmadığı görülmektedir. Ligand full01 yapısında ASP64, ASP116, GLY118, SER119 ve GLU152 kalıntılarıyla polar etkileşimde bulunmuştur. Mg

atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.96.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1 ve ASP116 OD1-OD2 atomları, ligandın O2, N2 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve N2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.96 Å ve 3.29 Å iken, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 2.03 Å ve 3.70 Å olarak hesaplanmıştır. Bağ uzunlukları dikkate alındığında iki yapının uyum içinde olduğu gözlenmektedir. Zira aynı atomlar arasındaki ortalama mesafeler dcom01 kompleksinde sırası ile 2.01 Å ve 3.70 Å olarak belirlenmişti.



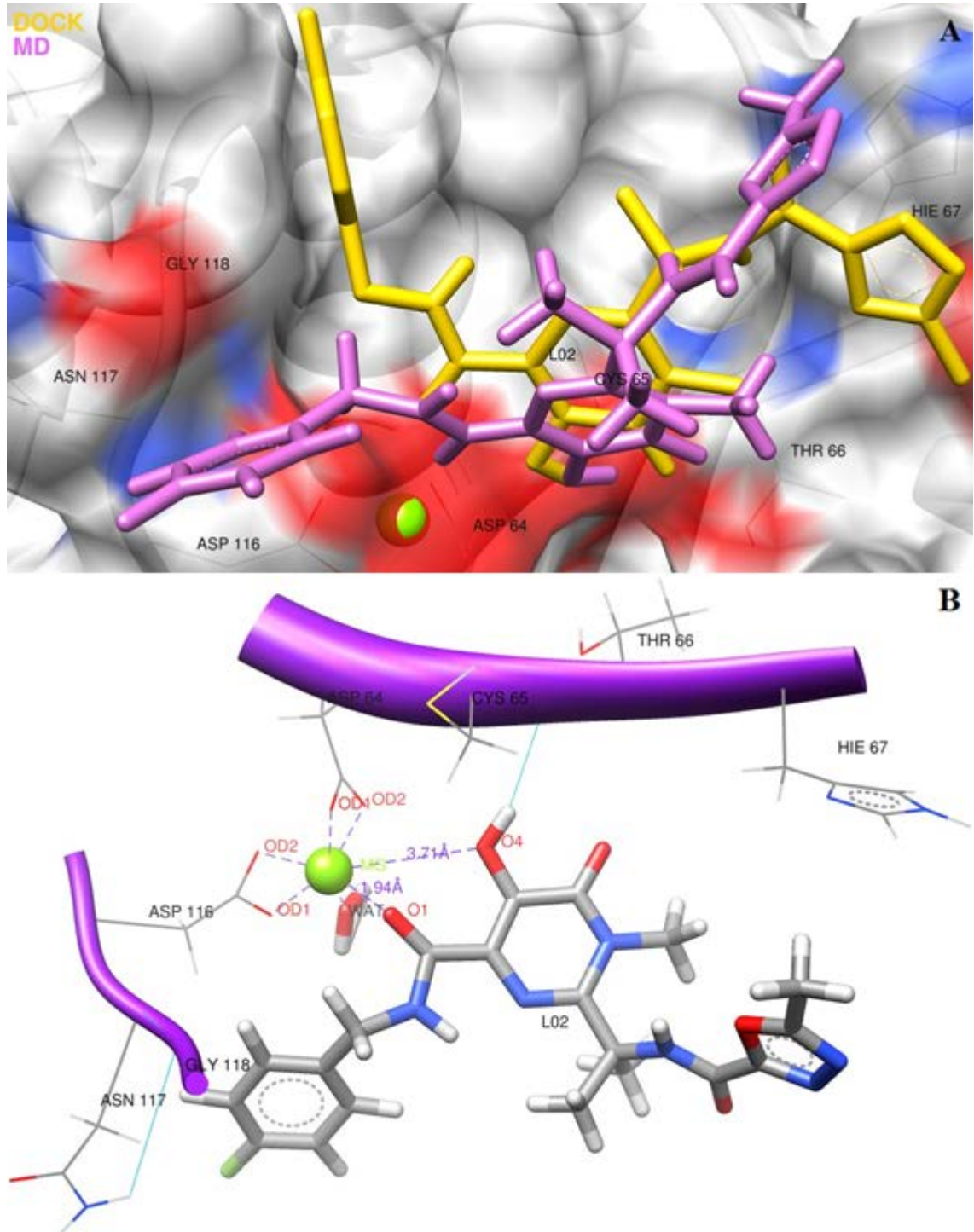
Şekil 4.94. L01 ligandının katalitik öz bölgesinde (dcom01) ve tam uzunluktaki yapıda (full01) MD hesaplamaları sonucu proteinle etkileşimlerinin karşılaştırılması

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.95.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.95. L01 ligandının tam uzunluktaki proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin (full01) MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

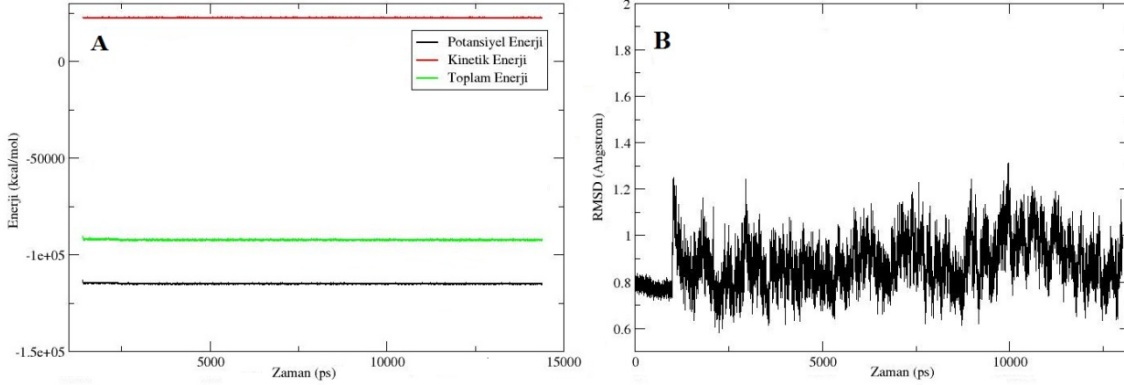
L02 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom02) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.96.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L02 ligandının konformasyonunun çok az değiştiği görülmektedir. L02 ligandının ASP64, CYS65, THR66, HIE67, ASP116, SER119, GLU152, ASN155 ve LYS 159 kalıntıları ile polar, GLU92, GLY118, ASN120 ve PHE121 kalıntıları ile van der Waals etkileşimlerinde bulunduğu anlaşılmaktadır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.100.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.94 Å, 3.71 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.91 Å ve 3.40 Å olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.96. A) L02 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapıdaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapıdaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (dcom02) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

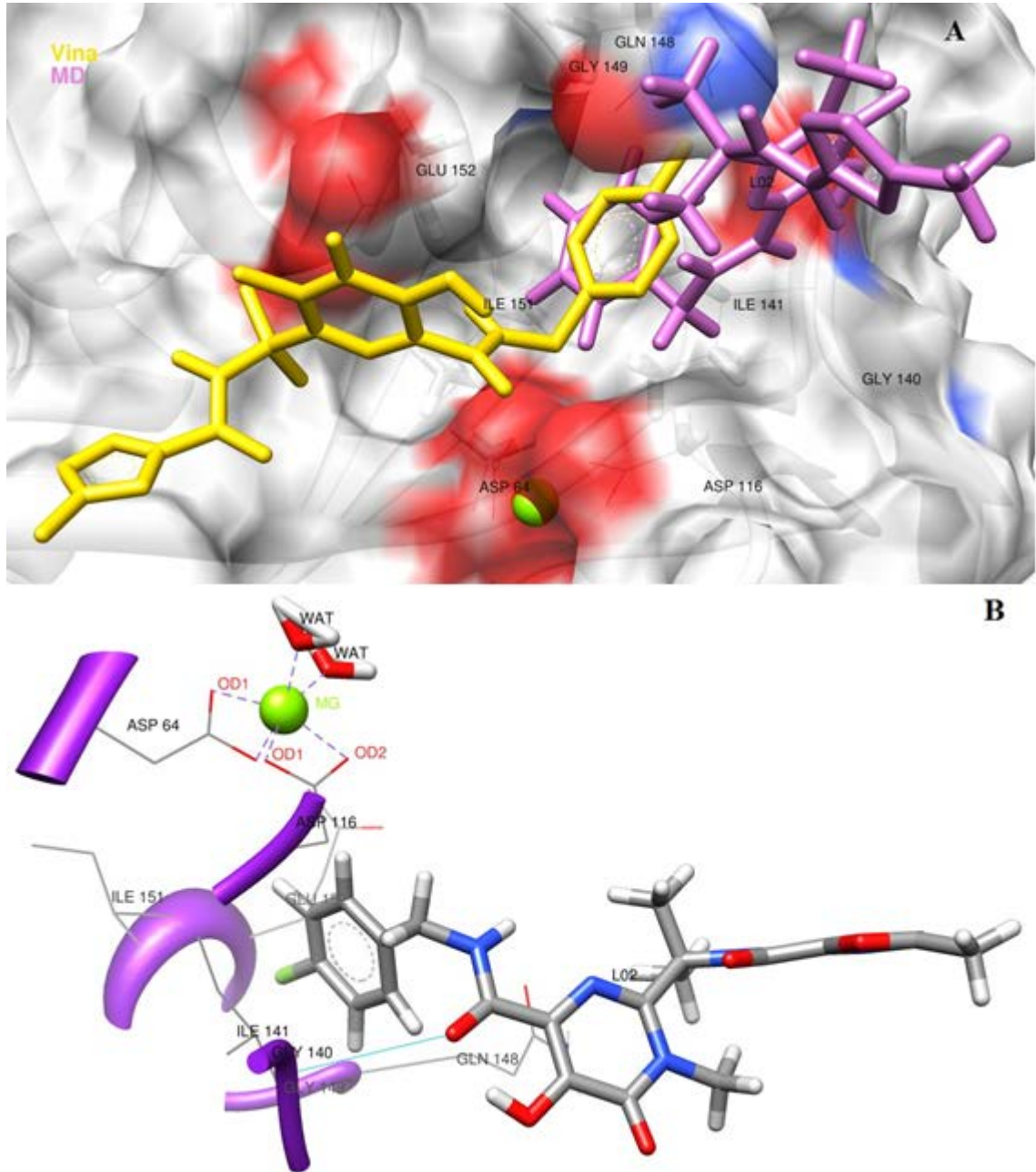
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.97.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan

kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.97. L02 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

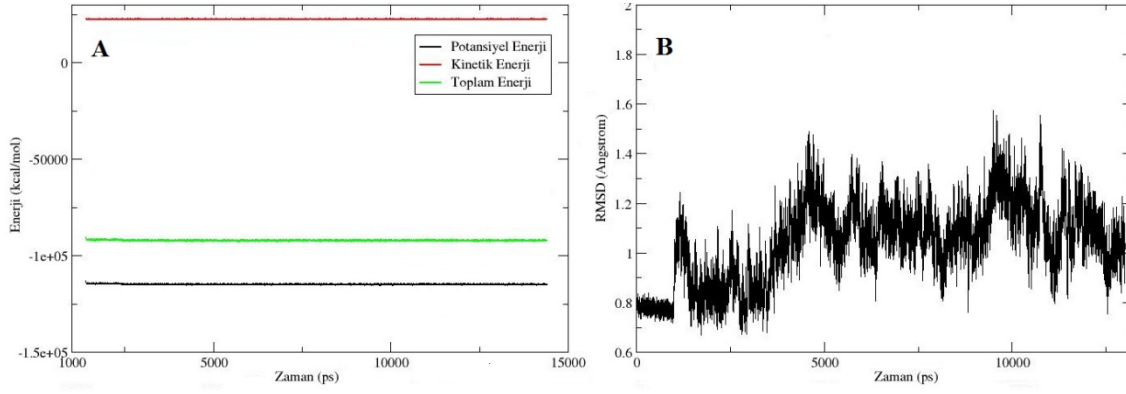
L02 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom02) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.98.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L02 ligandının konformasyonunda büyük değişikliklerin olduğu anlaşılmaktadır. MD hesaplamaları sonucu L02 ligandının komplekste Mg ile etkileşimde bulunmadığını göstermektedir. Mg atomundan uzaklaşan ligand ILE141 ile hidrojen bağı yapmıştır. Ligand ASP64, ASP116, GLY140, ILE141, PRO142, GLN148, GLY149, ILE151 ve GLU152 ile etkileşim halindedir. Bu etkileşimlerden 64, 116, 140 ve 142 kalıntıları ile olanlar van der Waals diğerleri ise polar etkileşimlerdir. ASP64 OD1-OD2 atomları ile ASP116 OD1-OD2 atomları Mg ile bağ yaptığı belirlenmiş olup bu bağ uzunluklarının MD süresince değişimi Şekil 4.100'de, bu mesafelerin ortalamaları ise Tablo 4.3.'te verilmiştir.



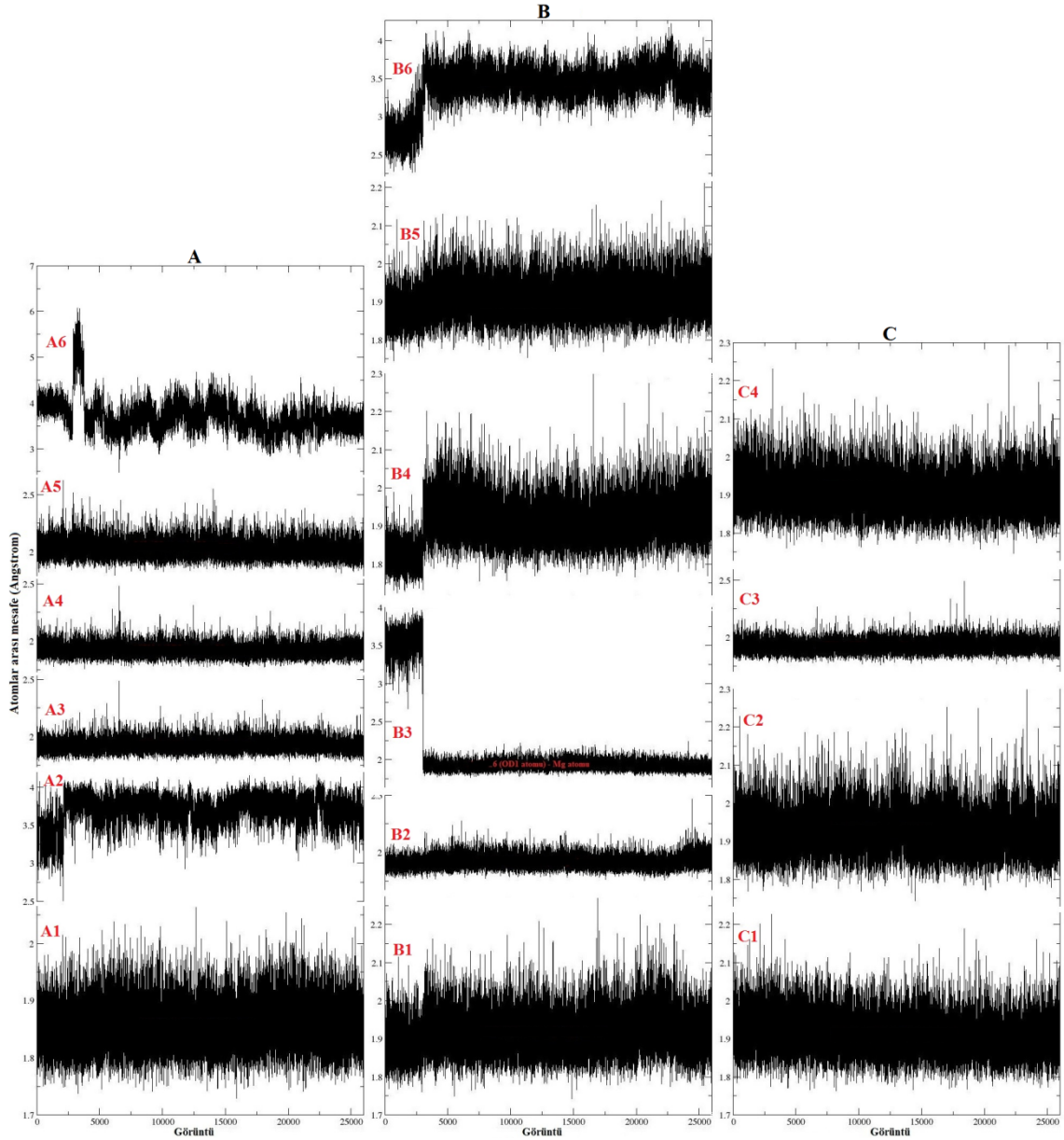
Şekil 4.98. A) L02 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcom02) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.99.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA



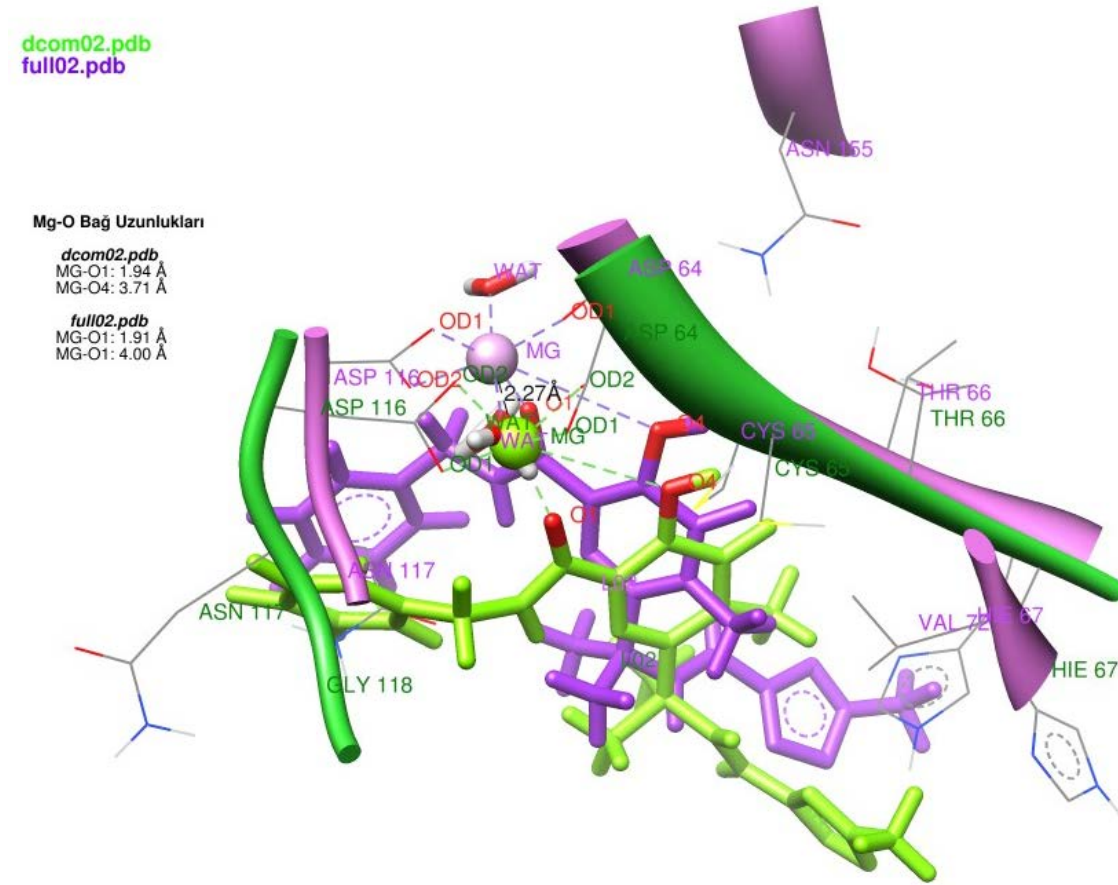
Şekil 4.99. L02 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.100. İntegrasyonun katalitik öz bölgesindeki (A: full01.pdb, B: dcom02.pdb, C: vcom02.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP116 OD1, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L01 O2, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD1, B4: Mg-ASP116 OD2, B5: Mg-L02 O1, B6: Mg-L02 O4, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD1, C4: Mg-ASP116 OD2)

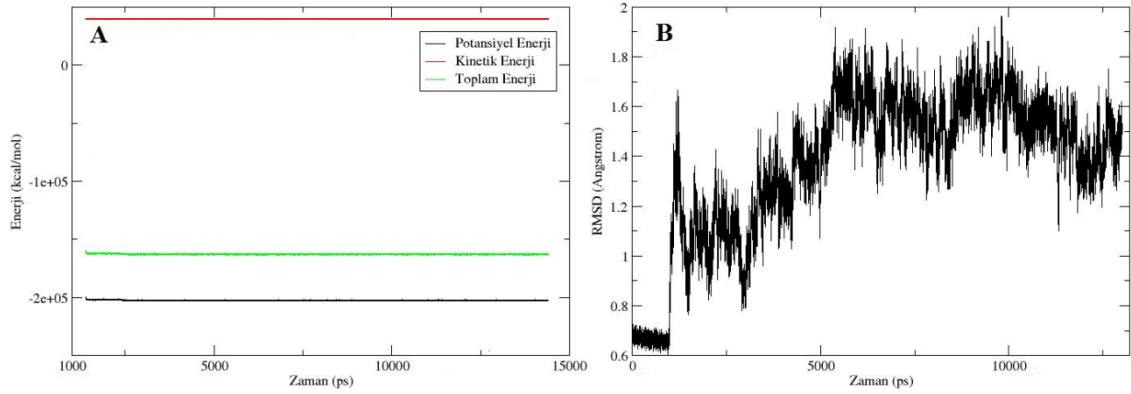
L02 ligandının Dock ile tam uzunluktaki E1 yapısına ve katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle oluşturulan full02 kompleksi ve dcom02 komplekslerinin üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen görüntü Şekil 4.101.'de gösterilmiştir. Ligandın O4 atomuna bağlı hidrojen atomu ile CYS65 arasında hidrojen bağı bulunurken, ligand ile HIE67, VAL72 ve ILE141 arasında van der Waals etkileşimleri ve ASP64, CYS65, THR66, ASP116, ASN117 ve ASN155 kalıntıları ile de polar etkileşimleri bulunmaktadır. full02 yapısının en düşük enerjili konformasyonunda ligandın O1 atomu

ile Mg arasında yakın etkileşim olduğu görülmüştür. Mg atomu ile Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomları arasındaki mesafelerin zamanla değişim grafikleri Şekil 4.107.'de gösterilmiştir. Mg ve protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir. ASP64 kalıntısının OD1 atomu ve ASP116 kalıntısının OD1-OD2 atomları metal kompleksine katılmışlardır. O1 atomu ile Mg arasındaki mesafe değişiminin ortalaması 1.92 Å olarak hesaplanırken en düşük enerjili yapıda bu mesafe 1.90 Å olarak ölçülmüştür.



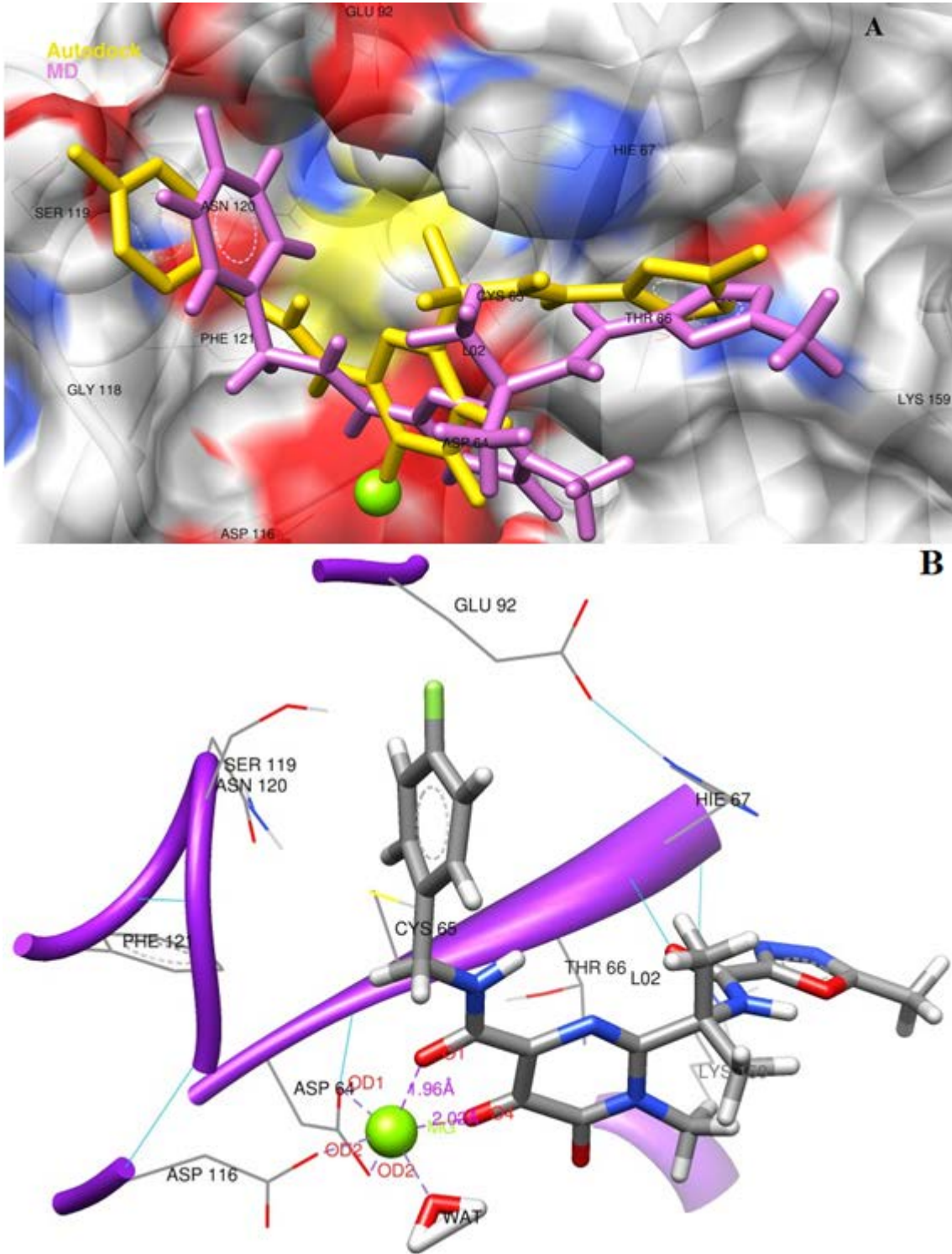
Şekil 4.101. L2 ligandının katalitik öz bölgesinde (dcom02) ve tam uzunluktaki yapıda (full02) MD hesaplamaları sonucu proteinle etkileşimlerinin karşılaştırılması

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.102.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiğinde ise sisteme uygulanan kuvvetin kaldırılmasıyla hızla yükselen eğri yaklaşık 5 ns süresine kadar düzgün bir ortalama yakaladıktan sonra tekrar yükselmiş ve yaklaşık 1.6 Å civarında yeniden kararlı bir hal almıştır.



Şekil 4.102. L02 ligandının tam uzunluktaki proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin (full02) MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

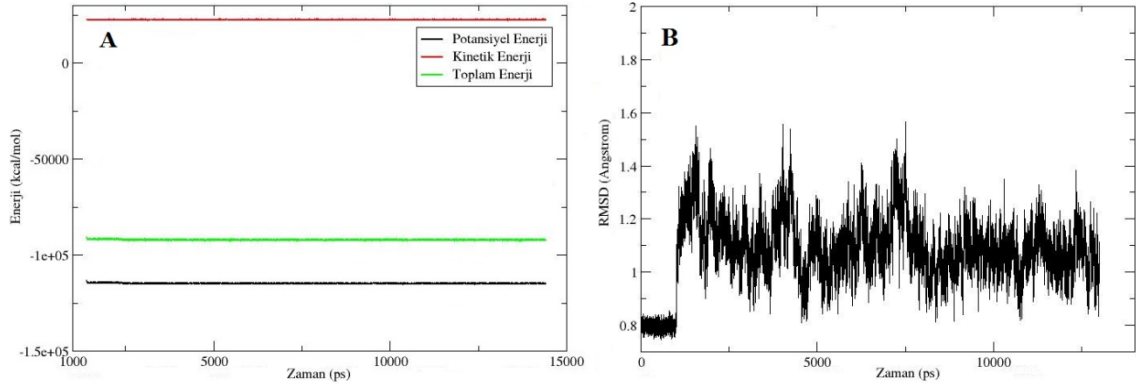
L02t ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom02t) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.103.'te gösterilmiştir. MD hesaplamalarından anlaşıldığı gibi L02t ligandının konformasyonunda pek değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır. HIE67 kalıntısı, oksadiazol halkasına komşu olan keton oksijeni ile hidrojen bağı oluşturmuş ve oksadiazol halkası ile π - π etkileşimi yapmıştır. Bunun yanında ligandın ASP64, CYS65, HIE67, GLU92, ASP116, SER119, ASN155, LYS156 ve LYS159 kalıntıları ile polar ve THR66, GLY118, ASN120 ve PHE121 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri yapmıştır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.96 Å ve 2.02 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.91 Å ve 2.05 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.107.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.103. A) L02t ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom02t) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.104.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de

negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.

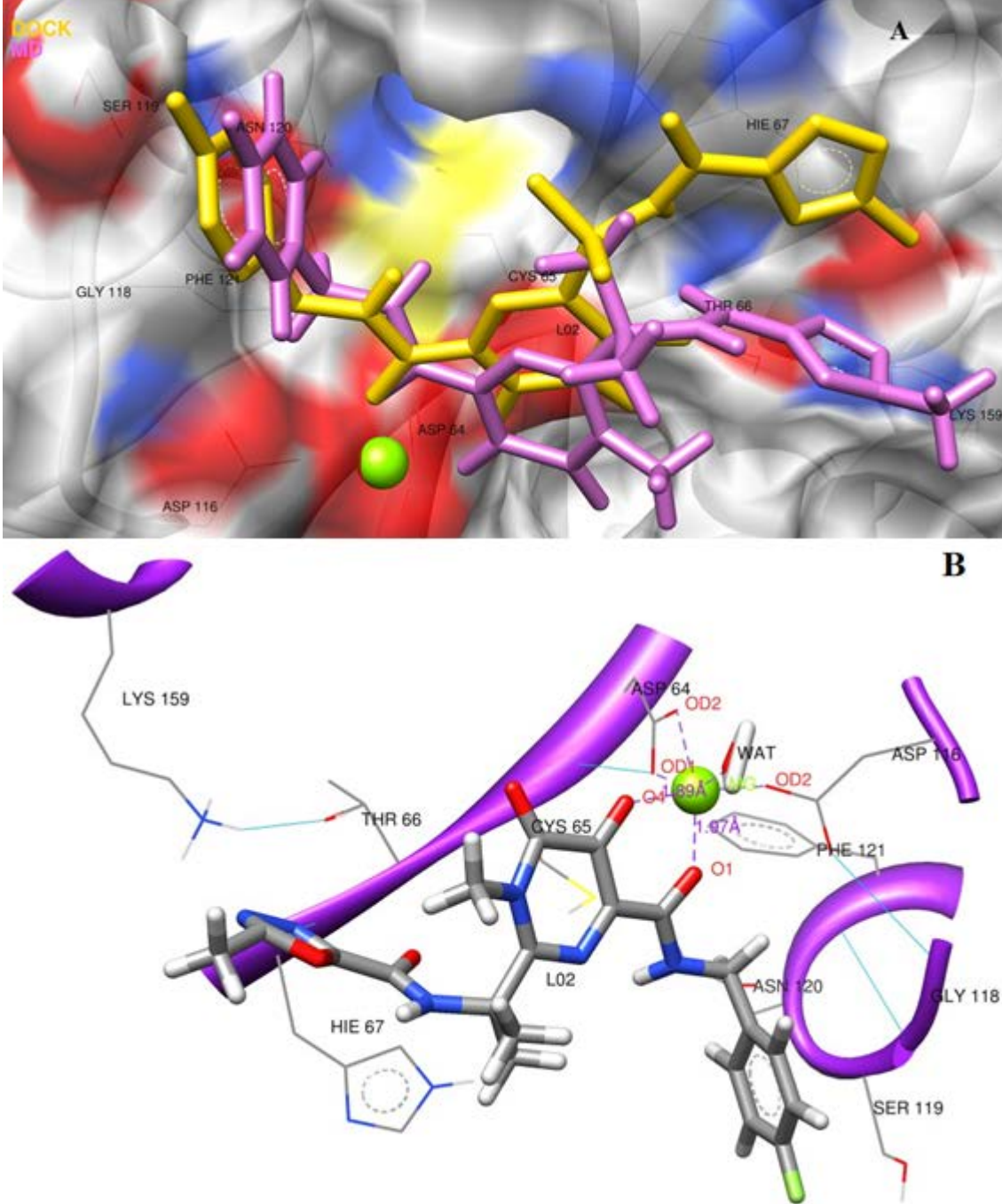


Şekil 4.104. L02t ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L02t ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom02t) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.105.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L02t ligandının konformasyonunun fazla değişmediği anlaşılmaktadır. Ligandın oksadiazol halkası ile HIE67 kalıntısı arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. ASP64, CYS65, THR66, HIE67, ASP116, SER119, GLU152, ASN155 ve LYS159 kalıntıları ile ligand arasında polar etkileşimler bulunurken, ligand ile GLU92, GLY118, ASN120 ve PHE121 kalıntıları arasında van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu, proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.97 Å, 1.89 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.90 Å ve 2.09 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.107.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

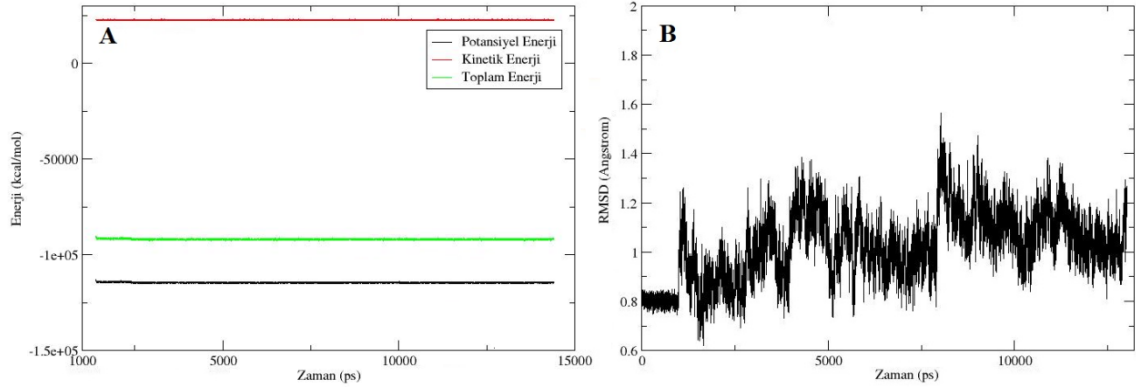
L02 ligandı kullanılarak hazırlanan komplekste (dcom02) Mg-O4 atomları arasındaki ortalama mesafe 3.40 Å iken, L02 ligandında O4 atomuna bağlı hidrojenin

kaldırılmasıyla bu ligandın tuzu olarak hazırlanan L02t ligandının kompleksinde (dcom02t) bu mesafe 2.09 Å değerine düşmüştür. Bu mesafenin MD süresince ortalaması ise ortalama 2.02 Å'luk bir değer almıştır.

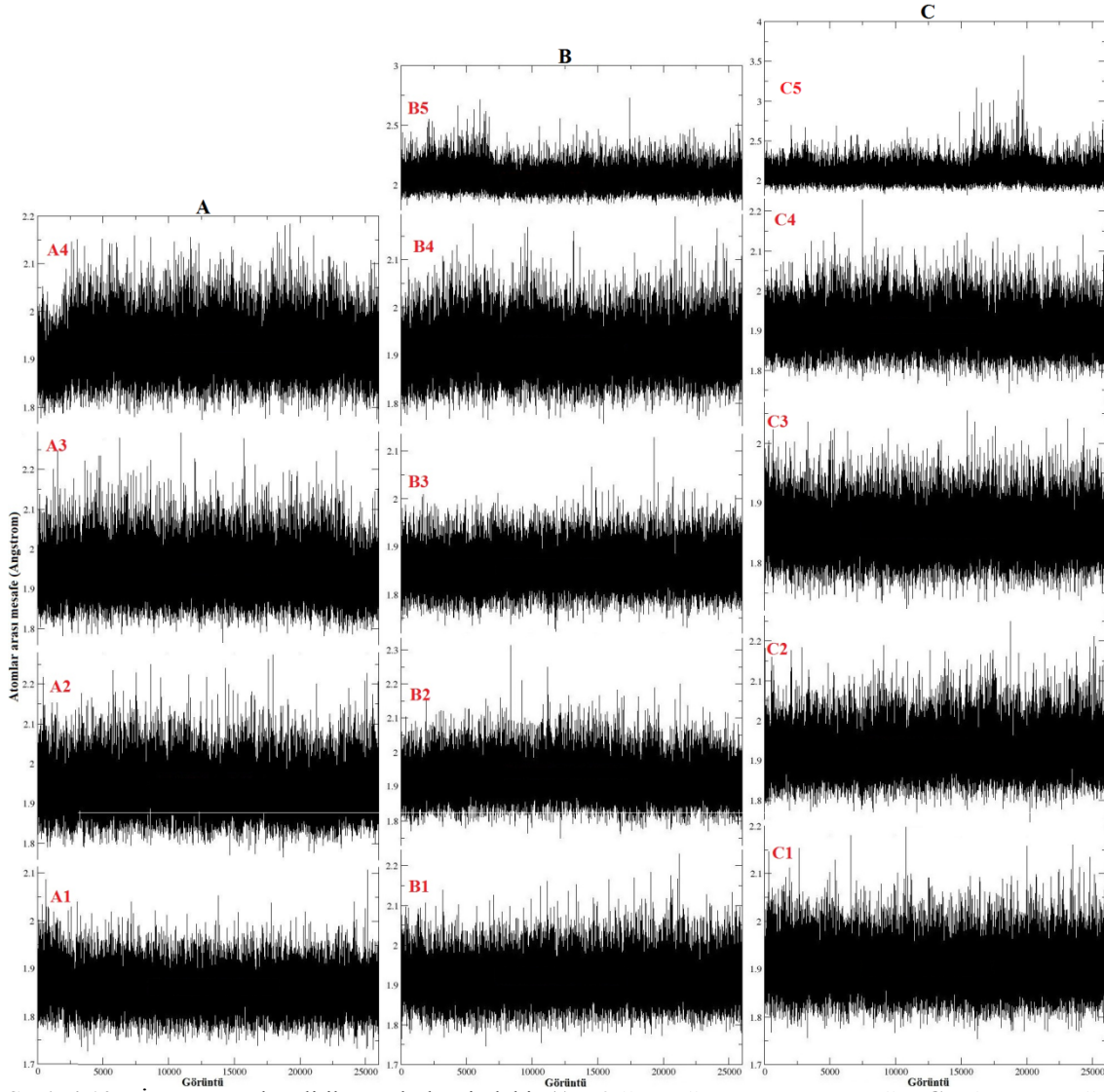


Şekil 4.105. A) L02t ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (dcom02t) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.106.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



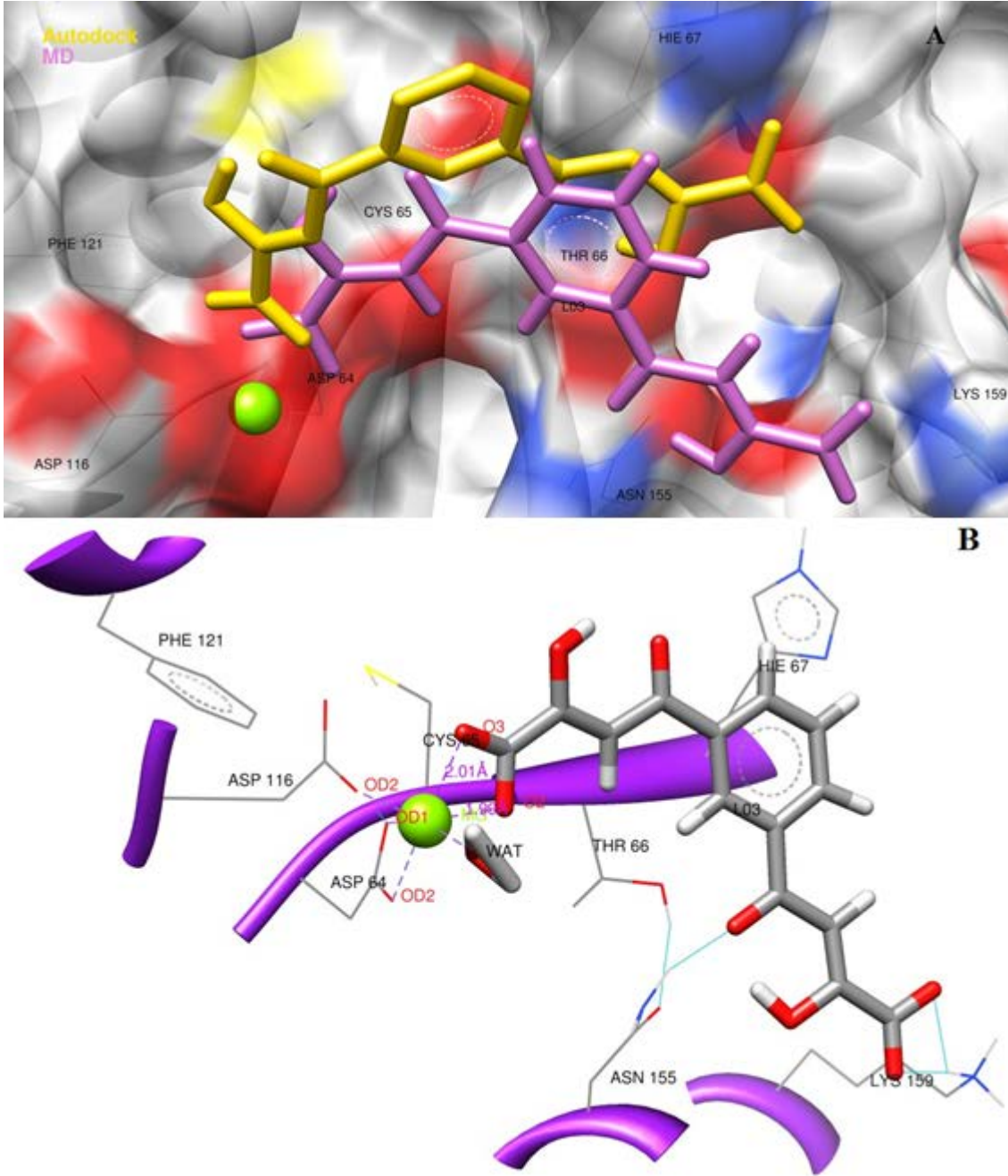
Şekil 4.106. L02t ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.107. İntegrasyon katalitik öz bölgesindeki (A: full02.pdb, B: acom02t.pdb, C: dcom02t.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP116 OD1, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L02 O1, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L02t O1, B5: Mg-L02t O4, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L02t O1, C5: Mg-L02t O4)

L03 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom03) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.108.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L03 ligandının konformasyonunda çok fazla değişiklik meydana gelmediği anlaşılmaktadır. Diketoasit ligandının bir ucundaki karboksilik asit oksijenleri ile LYS159 kalıntısı arasında hem hidrojen bağı, hem de yük etkileşimi bulunmaktadır. Ayrıca ligandın fenil halkası ile HIE67 kalıntısının imidazol halkası arasında π - π etkileşimi bulunmaktadır. ASN155 ile hidrojen bağı ve polar etkileşim, ASP64 ve ASP116 ile yük etkileşimi,

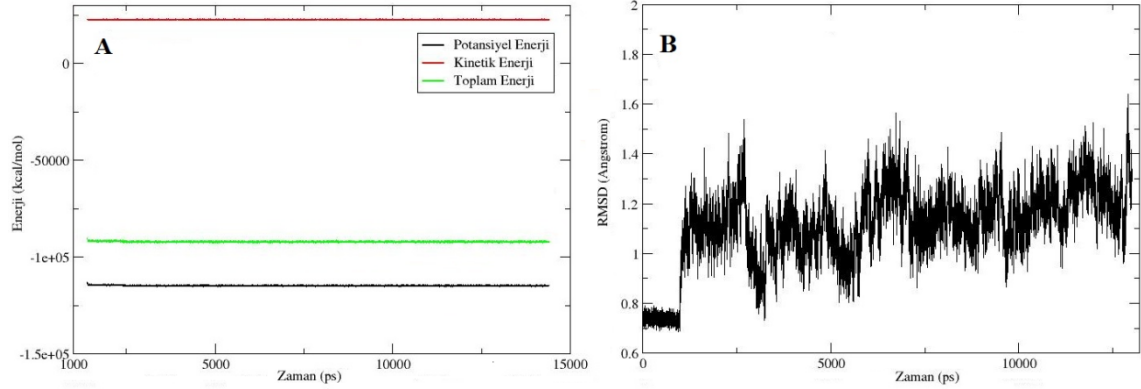
CYS65, THR66 ve ASN155 ile polar etkileşimler ve HIE67, PHE121 ve LYS156 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri ligandın diğer etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O2, O3 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve O3 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.99 Å, 2.01 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.96 Å ve 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.114.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.108. A) L03 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acom03) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

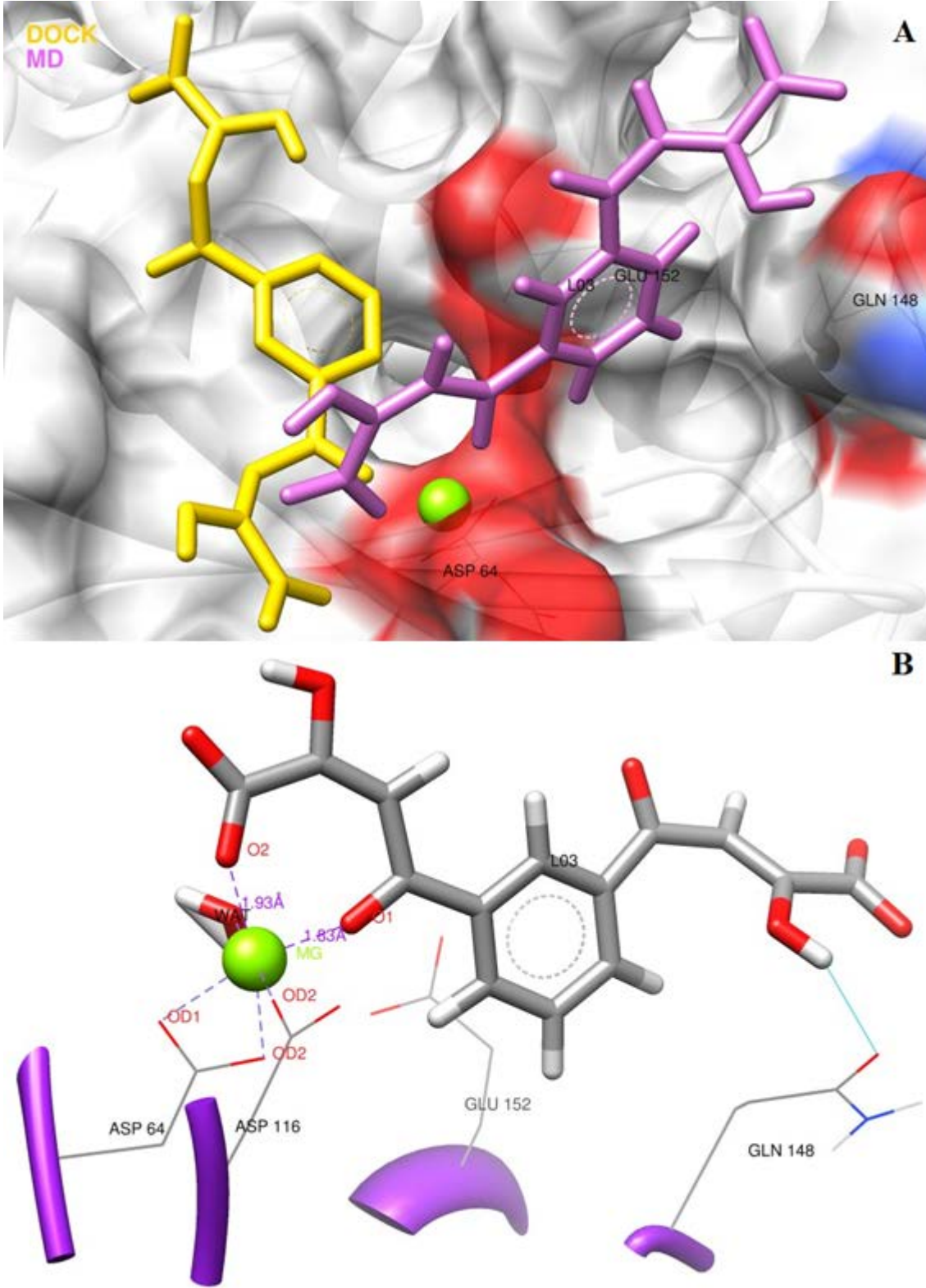
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.109.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



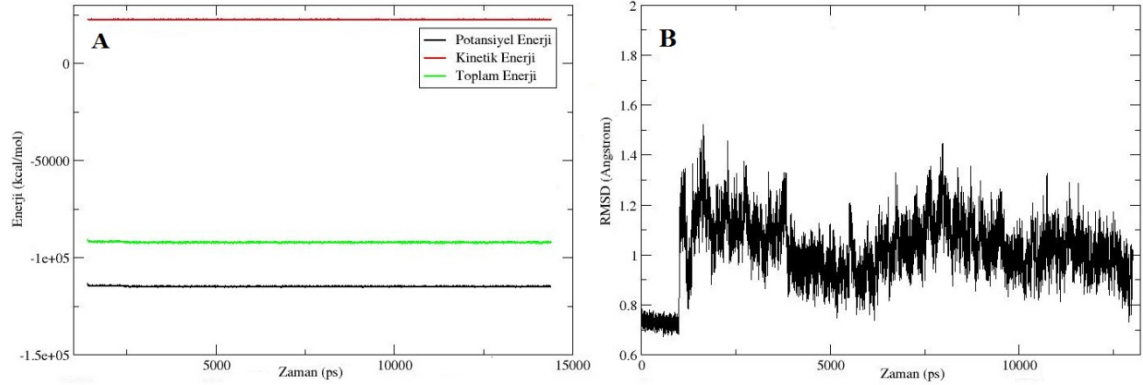
Şekil 4.109. L03 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L03 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom03) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.110.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L03 ligandının konformasyonunda ciddi değişikliklerin olduğu anlaşılmaktadır. Ligand ASP64, ASP116 ve GLN148 kalıntıları ile polar etkileşimde bulunurken, SER147, GLY149 ve GLU152 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri meydana getirmişlerdir. Ligand ile protein kalıntıları arasındaki tek hidrojen bağı GLN148 kalıntısı ile meydana gelmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.83 Å ve 1.93 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.92 Å ve 2.09 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.114.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



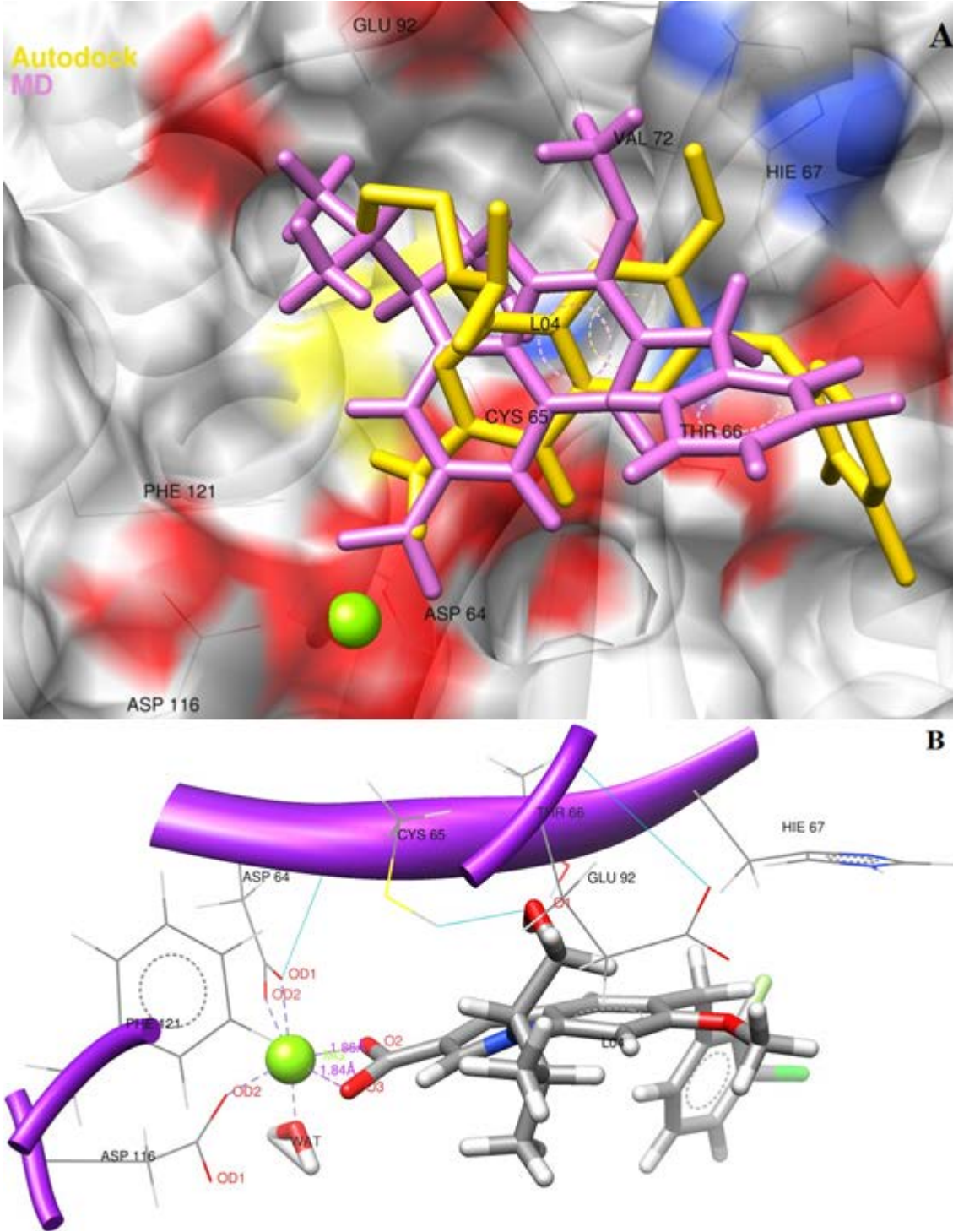
Şekil 4.110. A) L03 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (dcom03) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.111.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.111. L03 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

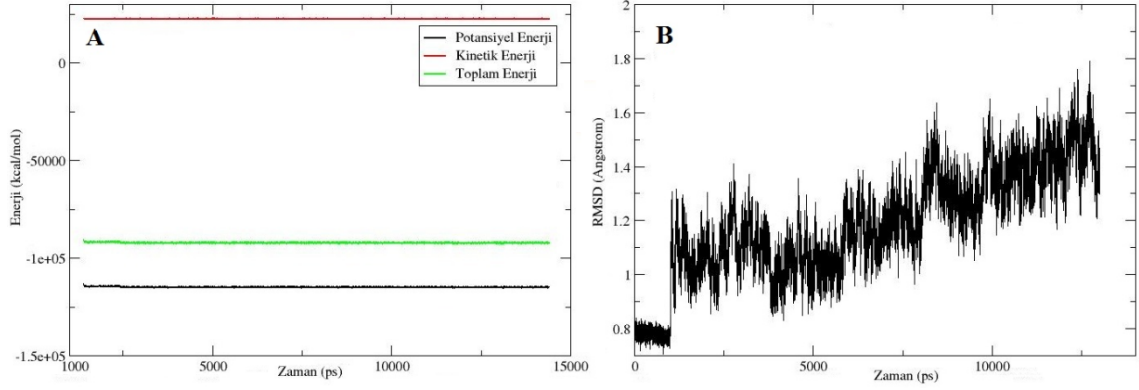
L04 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom04) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.112.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L04 ligandının konformasyonunda fazla değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır. Ligand ASP64, CYS65, THR66, ASP116 ve GLU152 kalıntılarıyla polar ve yük etkileşiminde bulunurken, HIE67, VAL72, GLU92, PHE121 ve LYS159 kalıntılarıyla van der Waals etkileşimleri yapmaktadır. Ligandın alkol oksijeni ile CYS65 arasında hidrojen bağı meydana gelmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O2, O3 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve O3 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.86 Å, 1.84 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları her iki atom çifti için 1.92 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.114.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



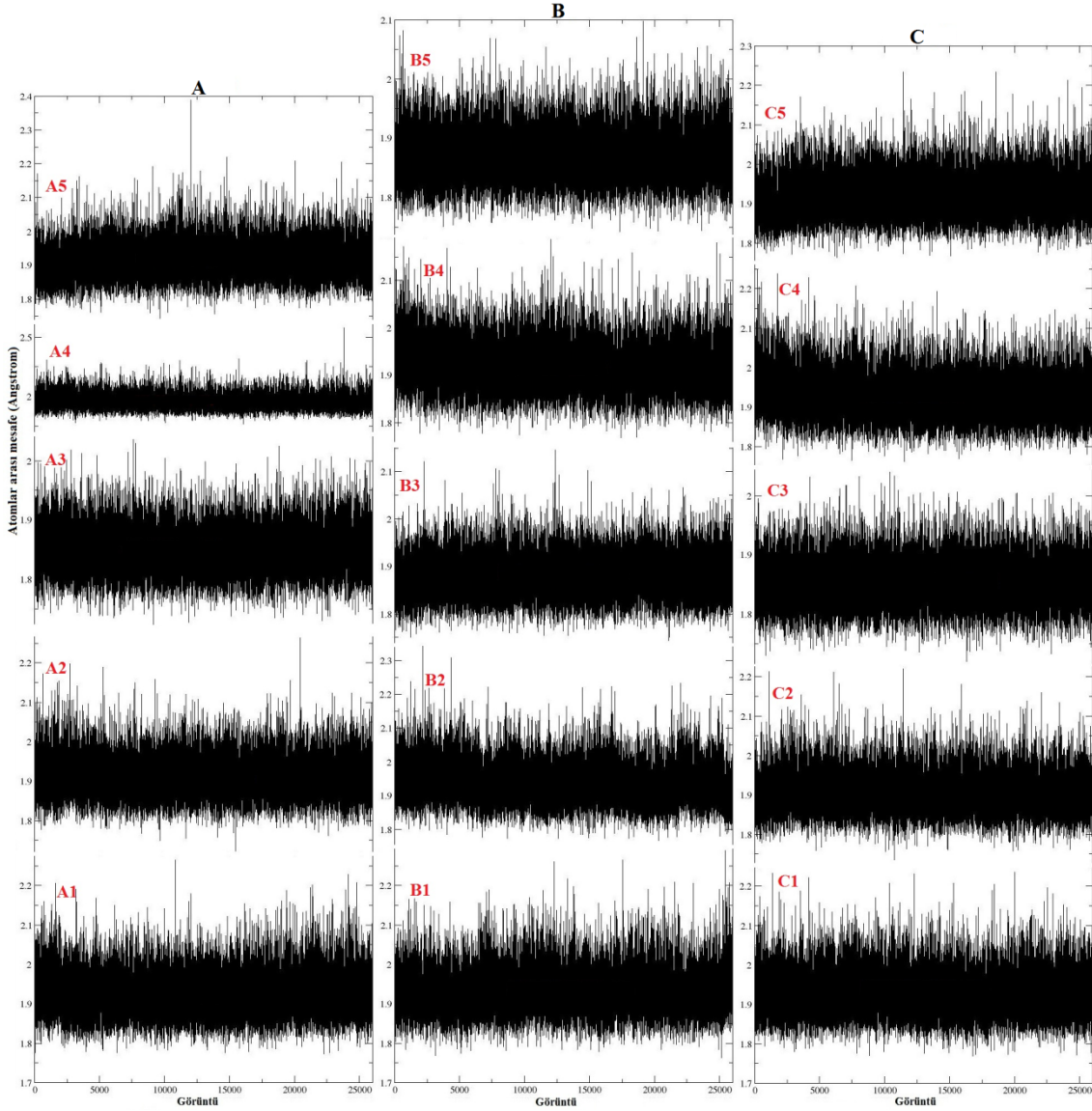
Şekil 4.112. A) L04 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom04) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.113.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan

kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin 6 ns civarında yükselmeye başlamış ve MD simülasyonunun sonuna doğru yeniden inme eğilimi göstermiştir. Yaklaşık 8 ns'den itibaren kompleksin kararlı yapıya ulaştığı görülmektedir.



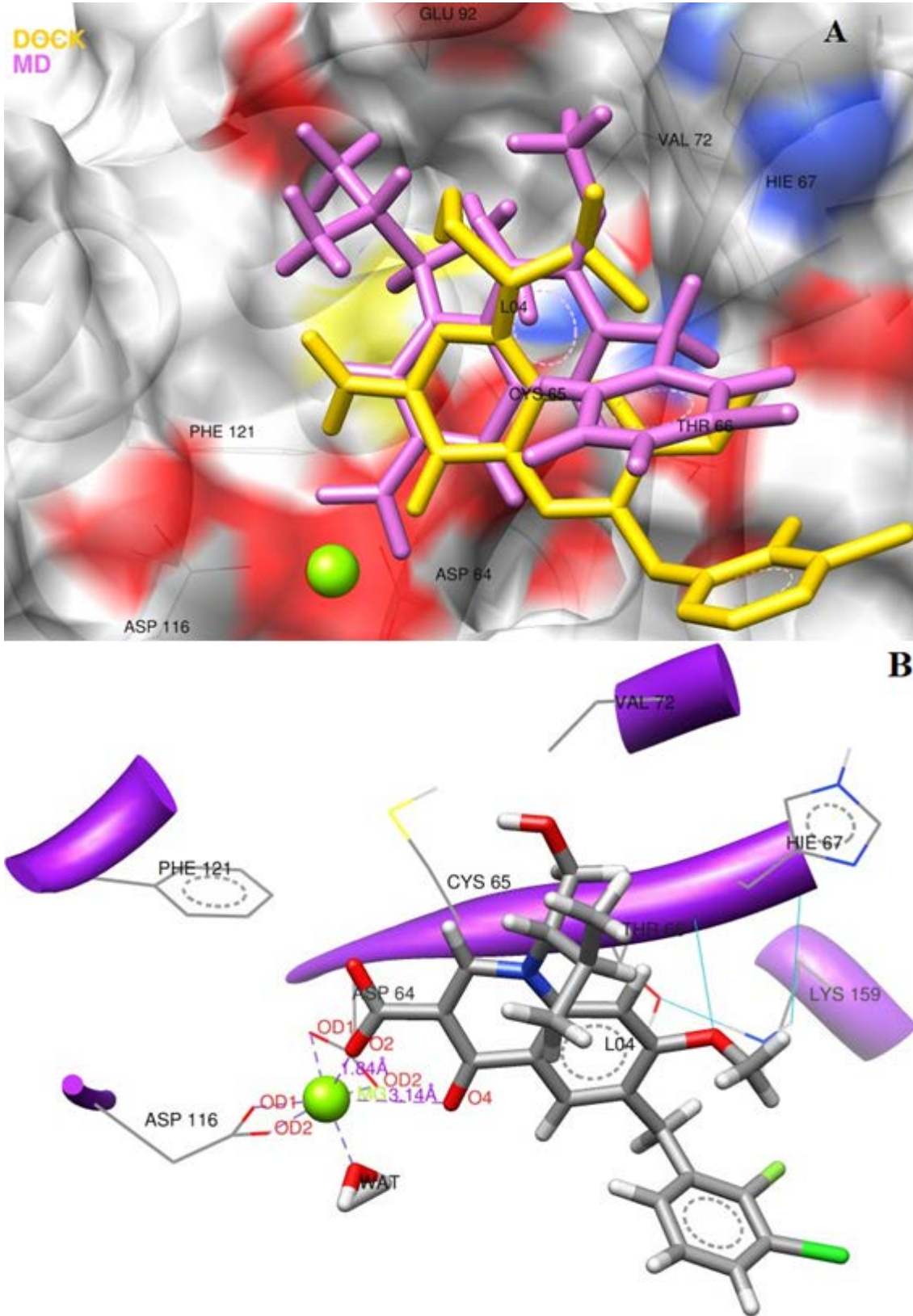
Şekil 4.113. L04 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.114. İntegrızın katalitik öz bölgesindeki (A: acom03.pdb, B: dcom03.pdb, C: acom04.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L03 O2, A5: Mg-L03 O3, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L03 O1, B5: Mg-L03 O2, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L04 O2, C5: Mg-L04 O3)

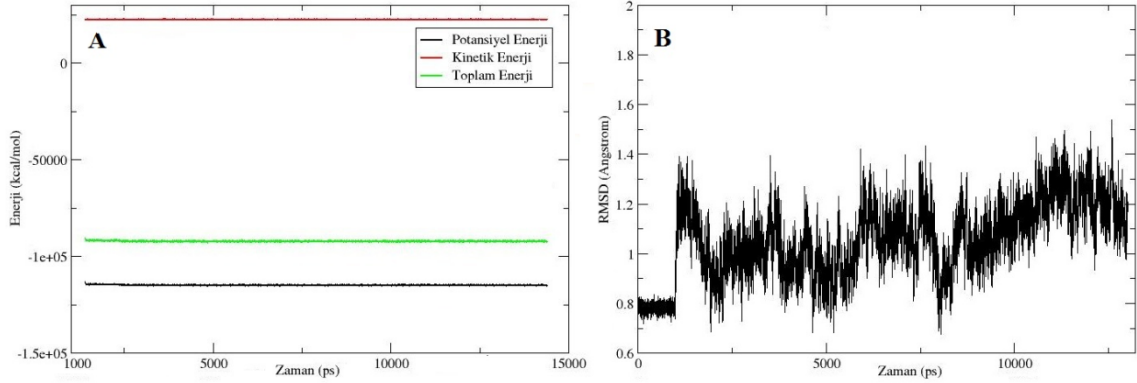
L04 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom04) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.115.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L04 ligandının konformasyonunda negatif yüklü karboksilat oksijenlerinin Mg atomu ile olan güçlü etkileşimleri nedeniyle değiştiği gözlenmektedir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD1-OD2 atomları, ligandın O2, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Kinolin

halkasındaki metoksi oksijeni HIE67 kalıntısı ile hidrojen bağı yaparken, THR66 ile kinolin halkası arasında σ - π bağı etkileşimi bulunmaktadır. ASP64, CYS65, GLU92, ASP116 ve LYS159 ile polar, VAL72, GLY118, PHE121 ve ASN155 ile van der Waals etkileşimleri ligand ile protein arasındaki diğer etkileşimlerdir. Ligandın O2 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.84 Å, 3.14 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.85 Å ve 3.52 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.121.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



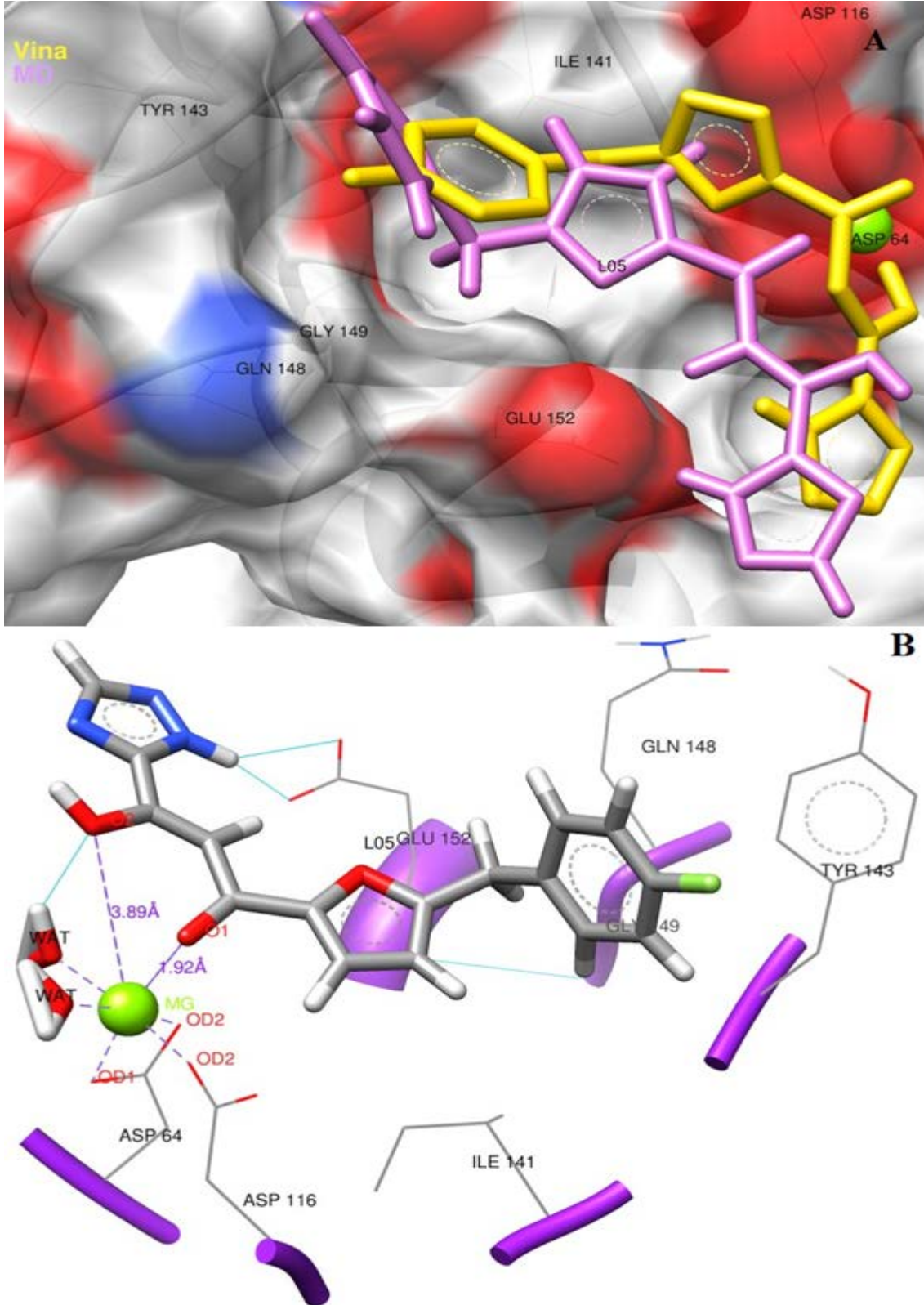
Şekil 4.115. A) L04 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (dcom04) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.116.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



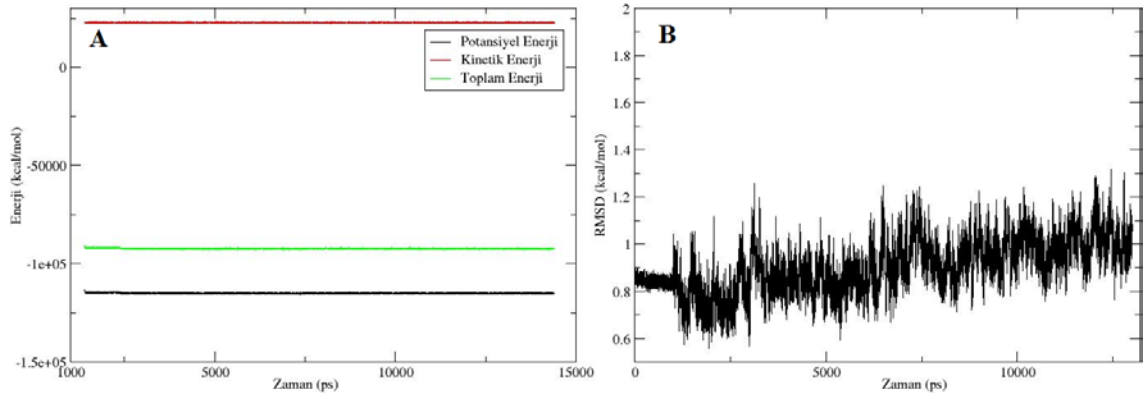
Şekil 4.116. L03 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L05 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom05) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.117.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L05 ligandının konformasyonunda fazla değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır. Ligandın triazol halkasındaki azot hidrojeni ile GLU152 arasında hidrojen bağı gelişmiştir. Ligand protein kalıntılarından ASP64, ASP116 ve GLU152 ile polar etkileşimler, ILE141, PRO142, TYR143, GLN148 ve GLY149 ile de van der Waals etkileşimleri göstermiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.92 Å ve 3.89 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.95 Å ve 3.75 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.21.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



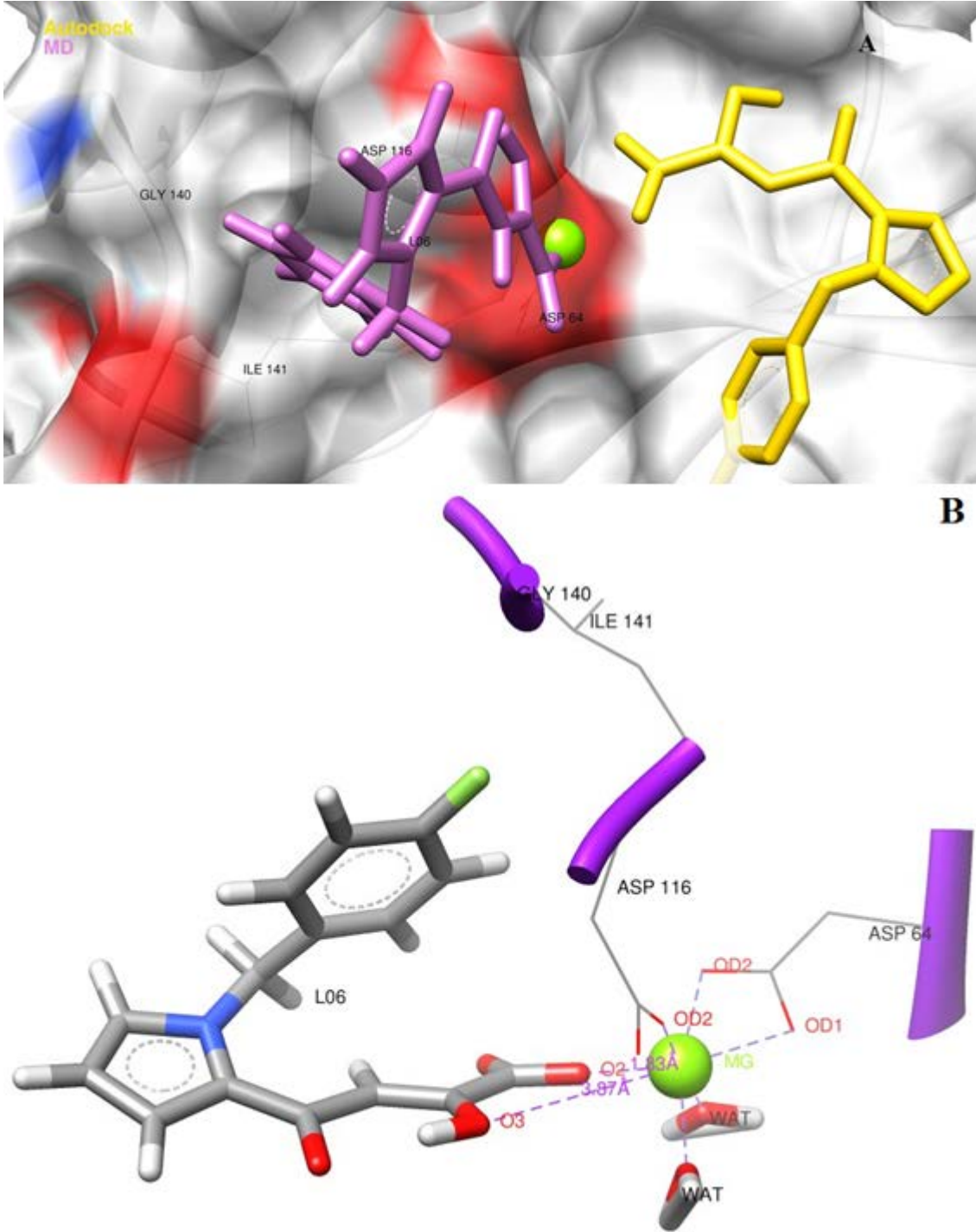
Şekil 4.117. A) L05 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom05) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.118.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin diğer yapıların tersine keskin bir yükseliş göstermeden stabil bir hal almıştır.



Şekil 4.118. L05 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

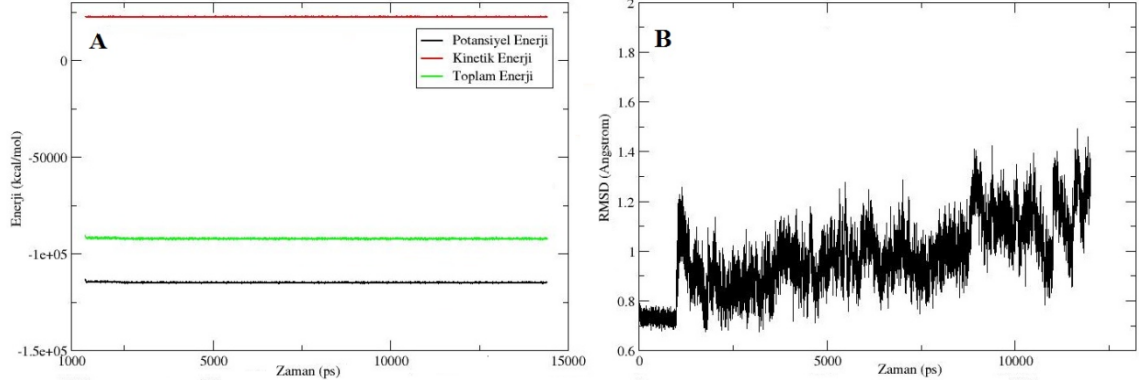
L06 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom06) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.119.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L04 ligandının konformasyonu yanında katalitik bölgedeki yerinin de değiştiği anlaşılmaktadır. Ligand protein etkileşiminin az olduğu komplekste, ligandın ASP64, ASP116 ve ILE141 ile polar ve GLY140 ile van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O2, O3 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve O3 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.83 Å, 3.87 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.87 Å ve 3.98 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.93.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



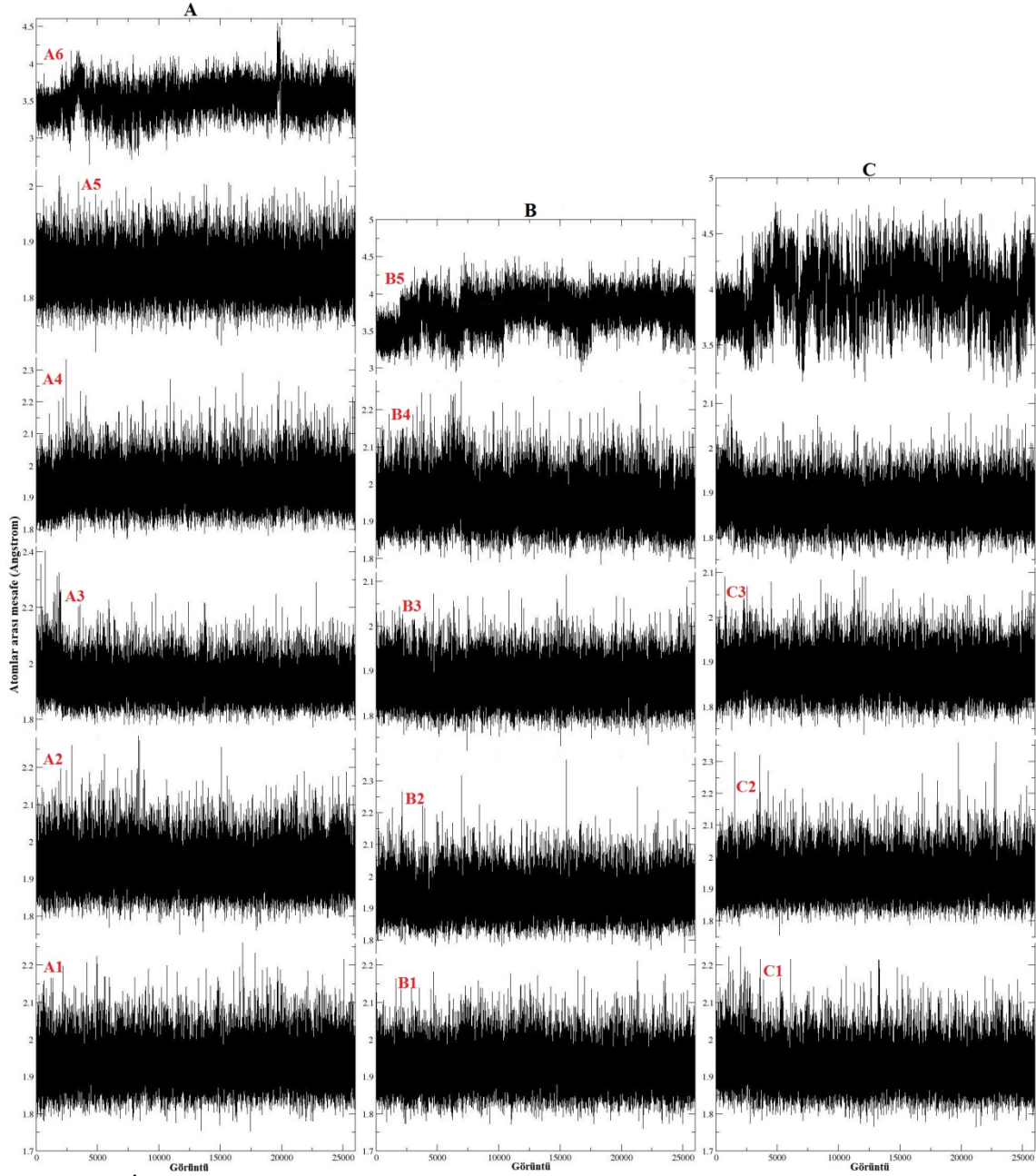
Şekil 4.119. A) L06 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom06) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.120.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan

kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



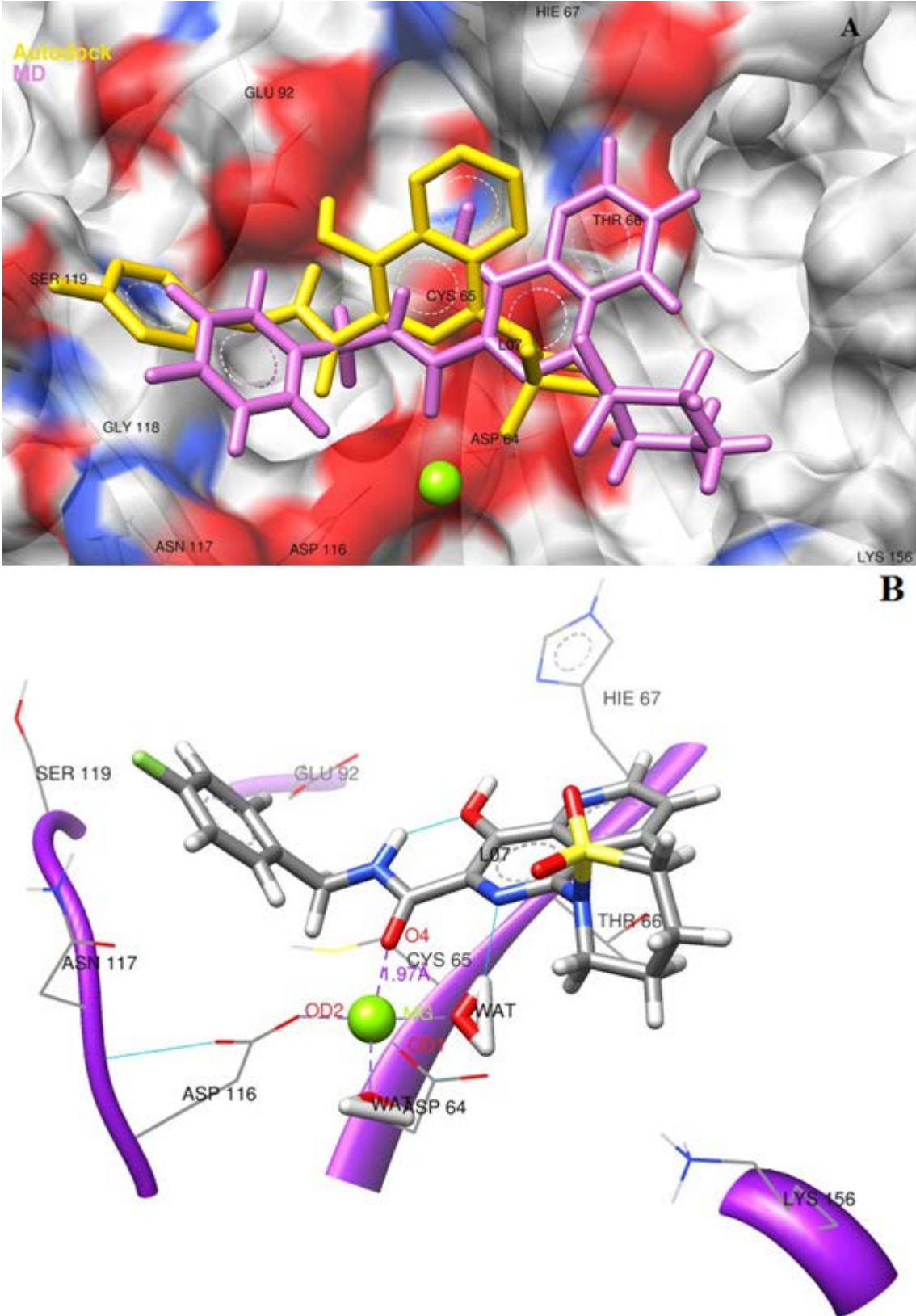
Şekil 4.120. L06 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.121. İntegrasyonun katalitik öz bölgesindeki (A: dcom04.pdb, B: vcom05.pdb, C: acom06.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD1, A4: Mg-ASP116 OD2, A5: Mg-L04 O2, A6: Mg-L04 O4, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L05 O1, B5: Mg-L05 O2, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L06 O2, C5: Mg-L06 O3)

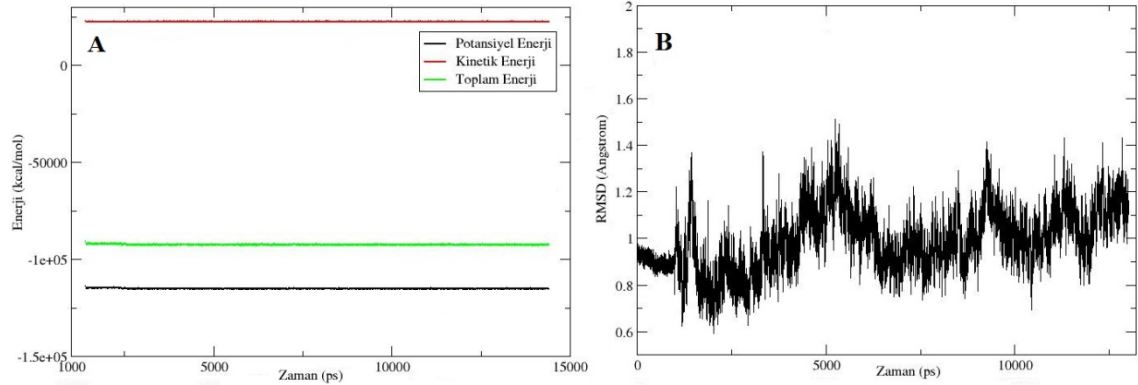
L07 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom07) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.122.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L07 ligandının konformasyonunda fazla değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır. Ligand ASP64,

CYS65, THR66, HIE67, ASP116 ve ASN117 kalıntıları ile polar, GLU92, GLY118, SER119, PHE121, GLU152 ve LYS156 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri gerçekleştirmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O4 atomu ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4 atomu ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafesi en düşük enerjili yapıda 1.97 Å, bu mesafenin MD simülasyonu süresince ortalaması ise 1.93 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.127.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



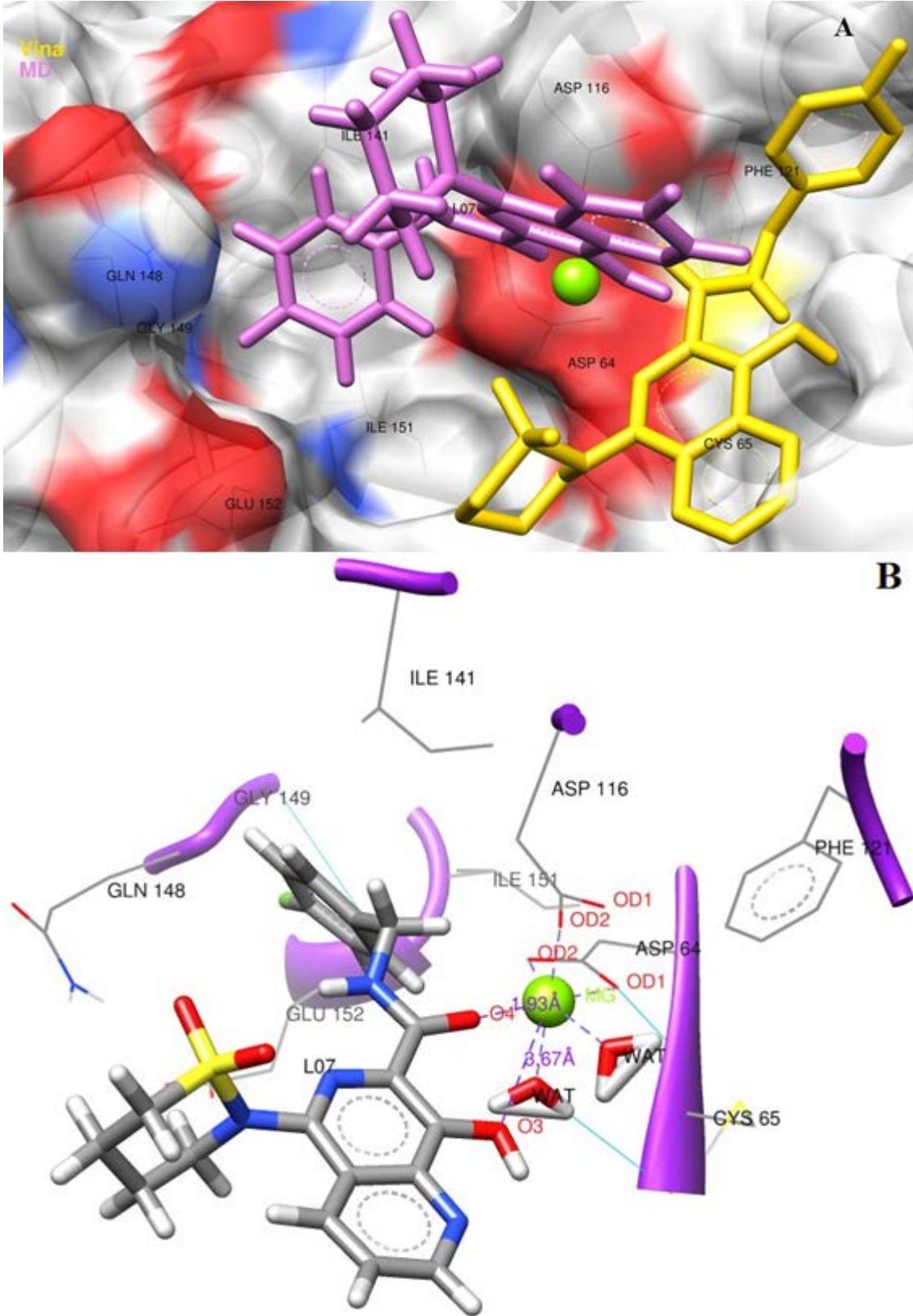
Şekil 4.122. A) L07 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acom07) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.123.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



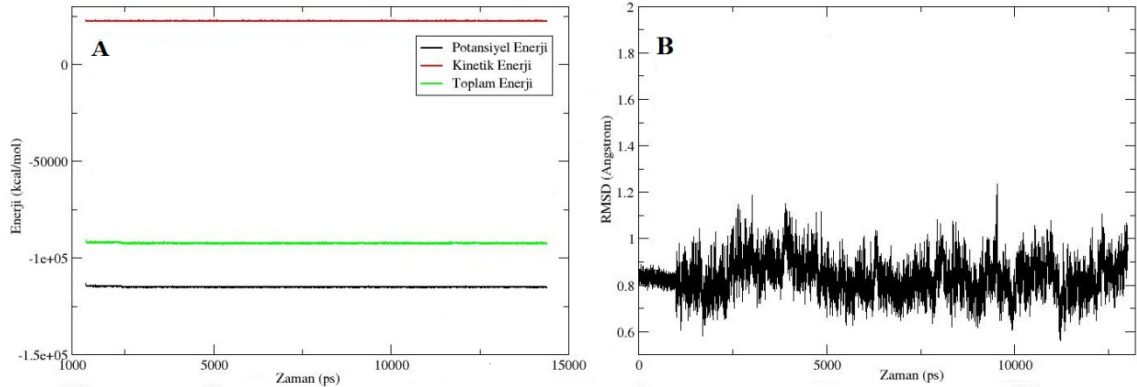
Şekil 4.123. L07 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L07 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom07) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.124.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L07 ligandının konformasyonunda ciddi değişiklikler olduğu anlaşılmaktadır. Ligand atomları ile ASP64, ASP116, SER147, GLY149 ve GLU152'nin atomları arasında polar etkileşimler, ILE141, GLN148 ve ILE151'in atomları arasında ise van der Waals etkileşimleri mevcuttur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O3, O4 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O3 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 3.67 Å ve 1.93 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 3.64 Å ve 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.128.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.124. A) L07 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcom07) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

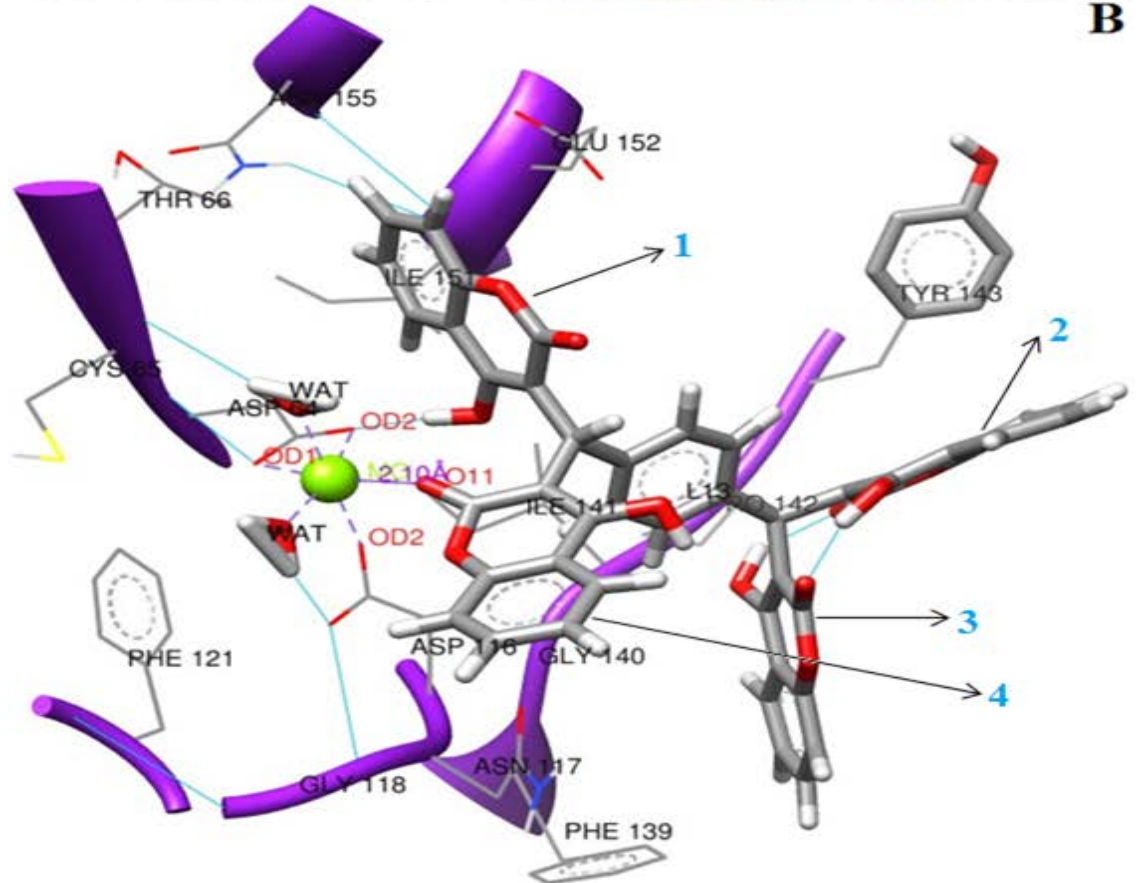
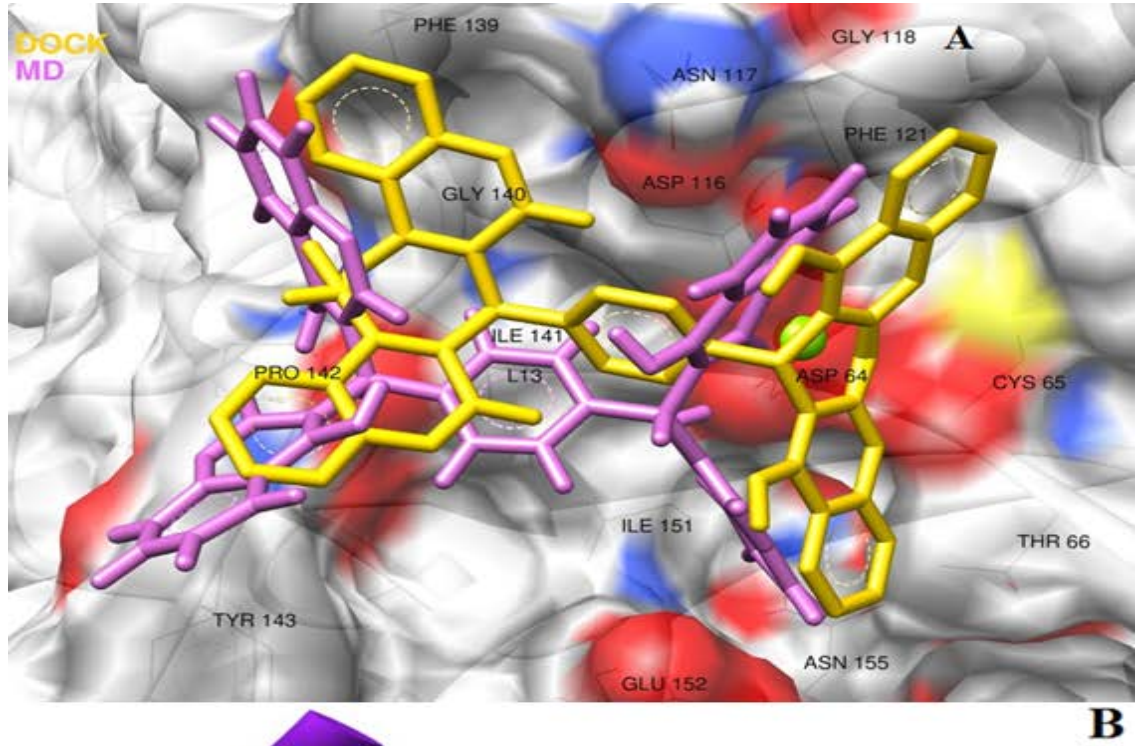
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.125.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.125. L07 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

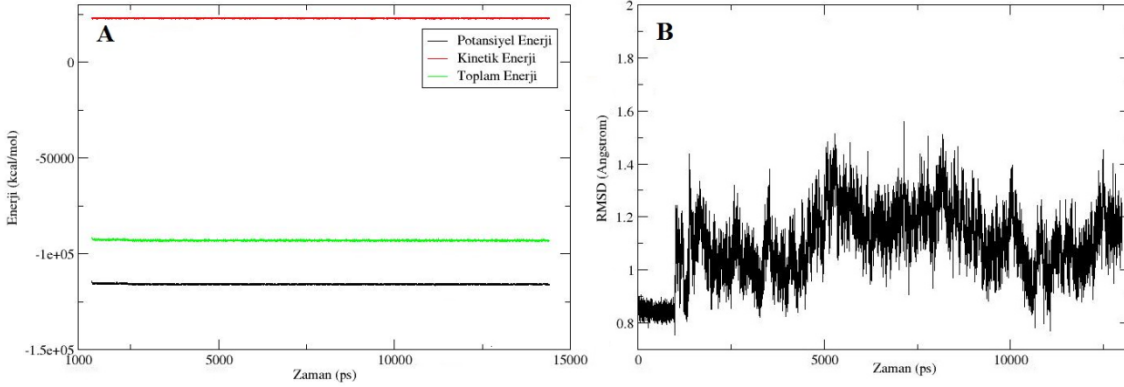
L13 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom13) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.126.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L ligandının konformasyonunda fazla bir değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır. Hacimli olan L13 ligandı ile protein kalıntıları arasında çok sayıda etkileşim meydana gelmiştir. Bir numara ile gösterilen kromen halkasında OH'a komşu çift bağ ile Mg atomu arasında $\pi(+)$ etkileşimi bulunmaktadır. ASP64 ile 1 numaralı kromen halkasındaki OH grubunun hidrojeni tek taraflı, 3 numaralı kromen halkasındaki OH grubu ile ILE141 arasında ise iki taraflı hidrojen bağı meydana gelmiştir. Bunun yanında ligandın ASP64, ASP116, ASN117, PRO142, TYR143 ve GLU152 kalıntılarıyla polar, THR66, GLY118, PHE139, GLY140, ILE151 ve ASN155 kalıntıları ile de van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O11 atomu ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O11 atomu ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafesi en düşük enerjili yapıda 2.10 Å, bu mesafenin MD simülasyonu süresince ortalaması 1.99 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla

değişimi Şekil 4.128.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

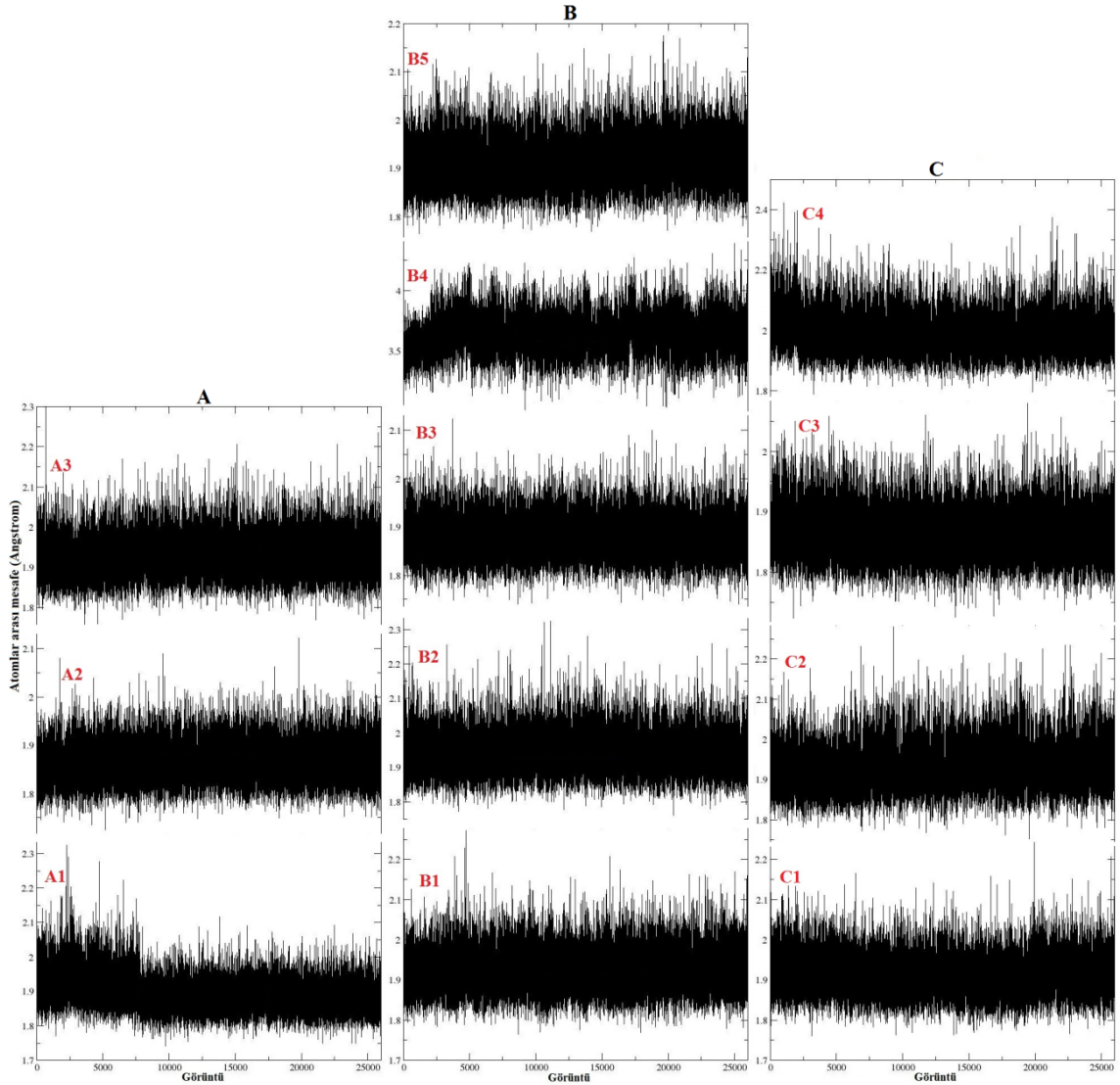


Şekil 4.126. A) L13 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (dcom13) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir. Mavi ile belirtilmiş 1, 2, 3, 4 rakamları için metne bakınız.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.127.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



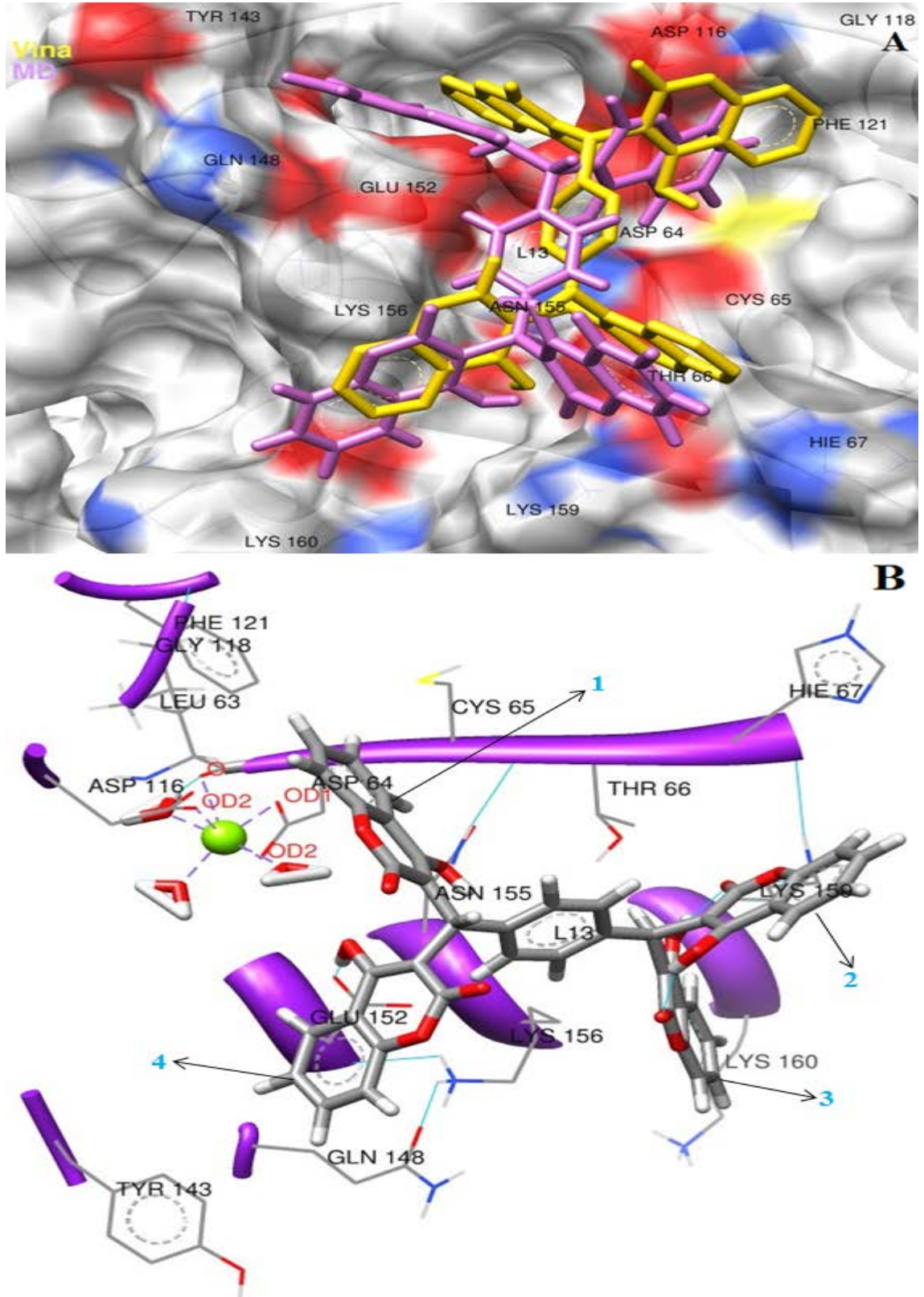
Şekil 4.127. L13 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.128. İntegrızın katalitik öz bölgesindeki (A: acom07.pdb, B: vcom07.pdb, C: dcom13.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP116 OD2, A3: Mg-L07 O4, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L07 O3, B5: Mg-L07 O4, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L13 O11)

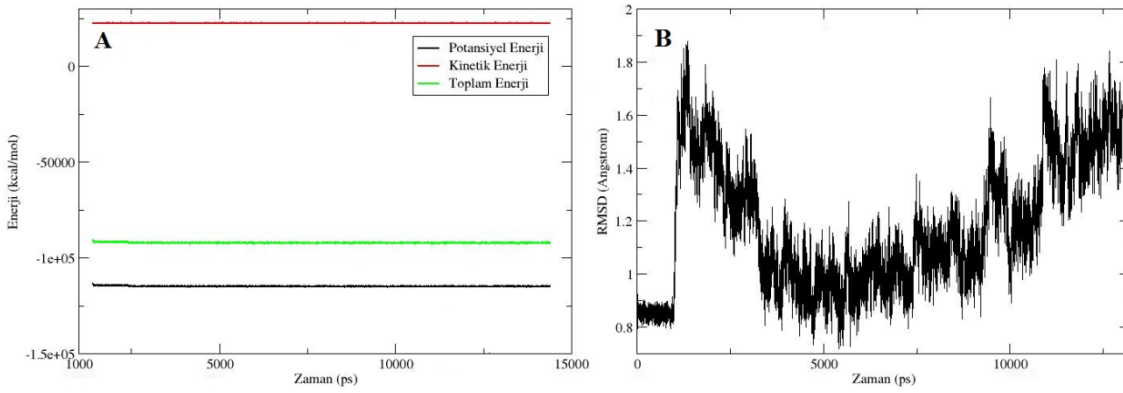
L13 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom13) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.129.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L13 ligandının konformasyonunda fazla değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır. Ligand atomları ile Mg atomu arasında yakın bir etkileşim bulunmamakla birlikte yerleştiği katalitik bölgede çok sayıda kalıntı ile etkileşimlerde bulunmuştur. Ligandın 1 ile belirtilen kromen halkasının fenil ve

piran halkasındaki çift bağ elektronları ile Mg atomu arasında, 3 ve 4 numaralı kromen halkasının aynı bağ elektronları ile LYS156 arasında π -(+) etkileşimleri gerçekleşmiştir. İki numaralı kromen halkasının keton oksijeni ile LYS159 ve 4 numaralı kromen halkasının alkol hidrojeni ile GLU152 arasında hidrojen bağları bulunmaktadır. Ligandın diğer etkileşimleri arasında THR66, HIE67 ve ASN155 kalıntıları ile polar, ASP64, CYS65, ASP116, GLY118, ASN120, PHE121, ILE141, TYR143, GLN148, LYS156 ve LYS160 kalıntıları ile van der Waals etkileşimlerini saymak mümkündür. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.135.'te gösterilmiş olup bu mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



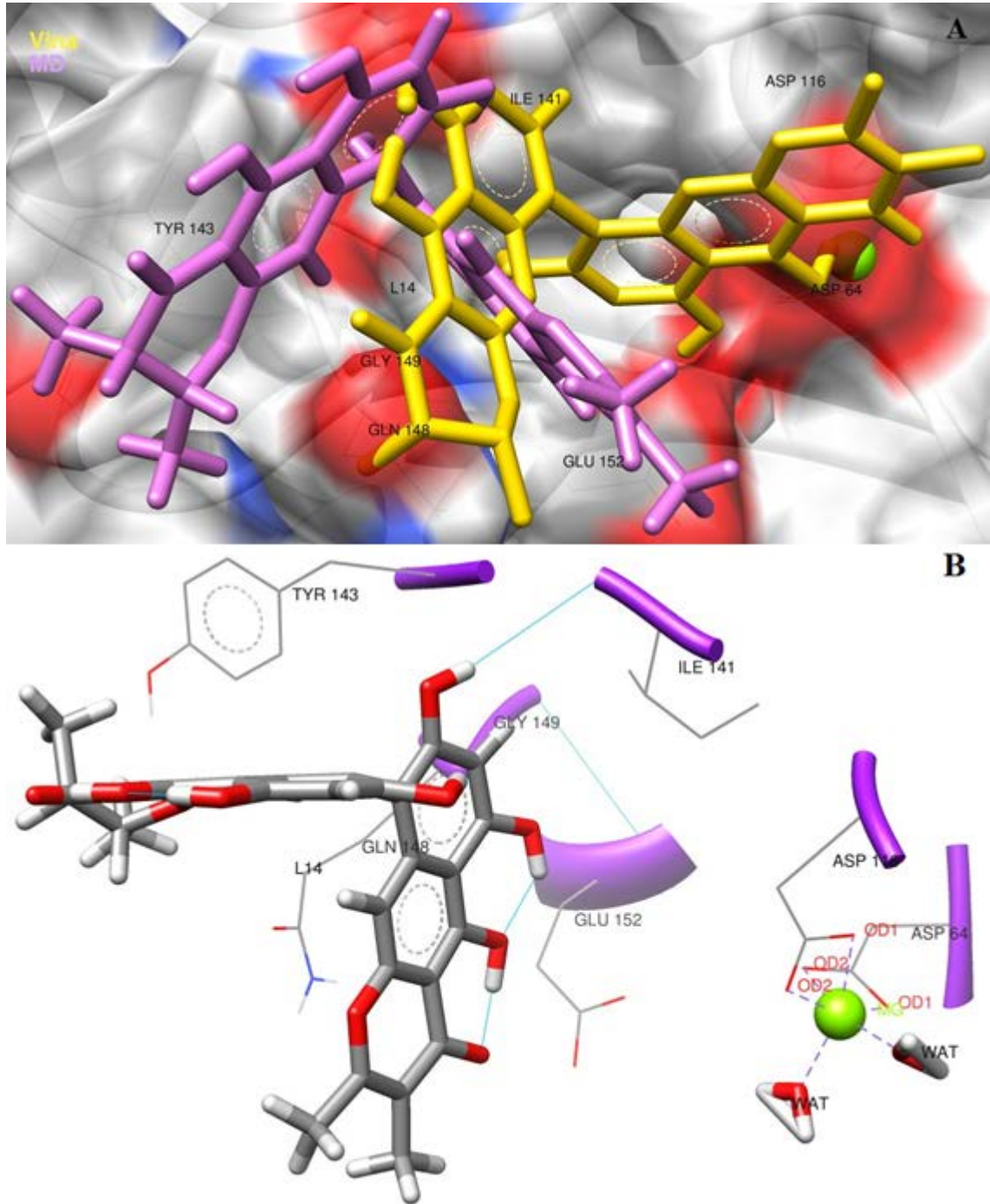
Şekil 4.129. A) L13 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (vcom13) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir. Mavi ile belirtilmiş 1, 2, 3, 4 için metne bakınız.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.130.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiğinde sisteme uygulanan kuvvet kaldırıldıktan sonra hızla yükselip düşmüş ve 4-8 ns süresince düzgün bir değişim gösterdikten sonra yeniden yükselme trendine girmiş ve 12 ns civarında yeniden 1.6 Å değerinde sabit bir doğrultu izlemeye başlamıştır. RMSD değişim grafiğinin yükselmeye denk gelen bölgelerinin MD simülasyonu incelendiğinde, proteindeki hareketli bölgeler 78-84 ve 139-150 arası kalıntıların bu yükselmelere sebep olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.130. L13 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

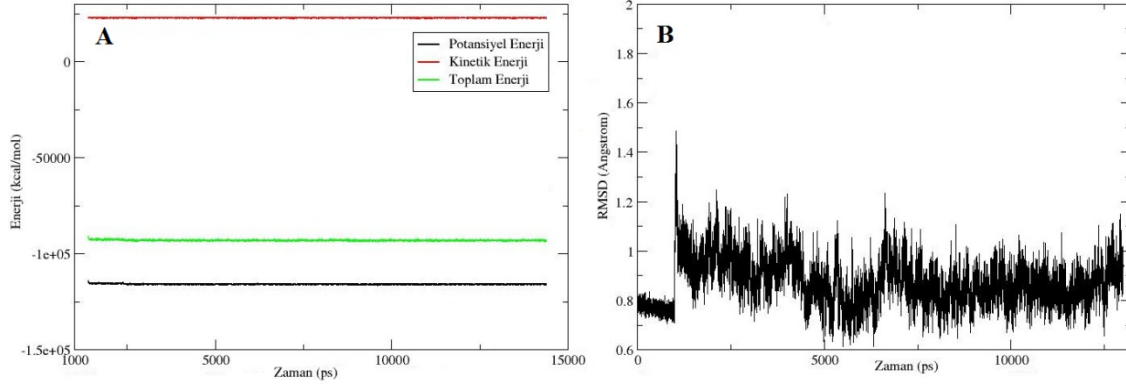
L14 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom14) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.131.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L14 ligandının konformasyonunda değişiklikler olduğu anlaşılmaktadır. Ligand atomları ile Mg atomu arasında yakın bir etkileşim bulunmazken, ILE141 ile hidrojen bağı, PRO142, TYR143, GLN148, GLY149 ve GLU152 kalıntılarıyla polar etkileşimler ligand ile protein kalıntıları arasındaki etkileşimlerdir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD1-OD2 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.135.'te gösterilmiş olup bu mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.131. A) L14 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcom14) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

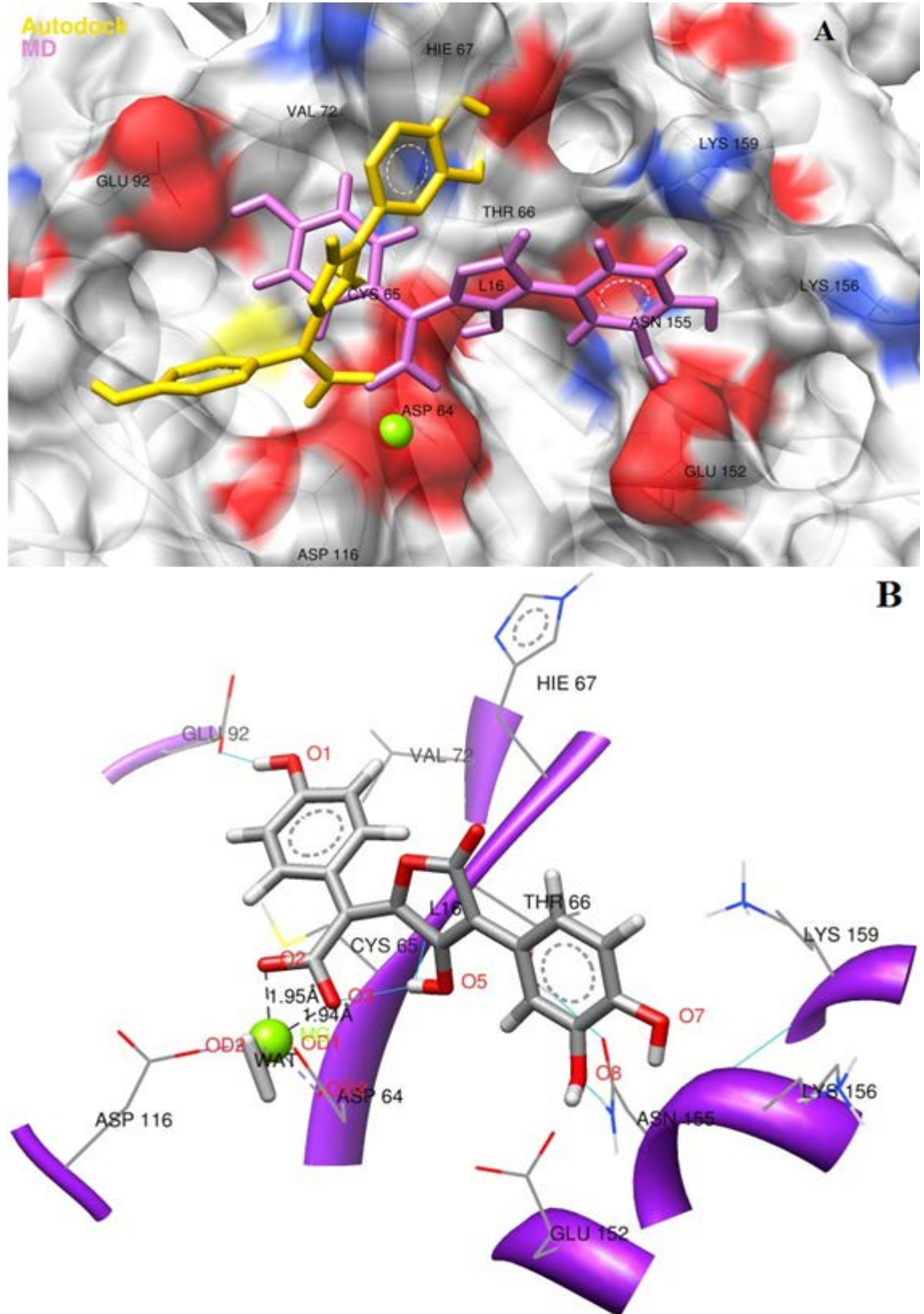
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.132.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



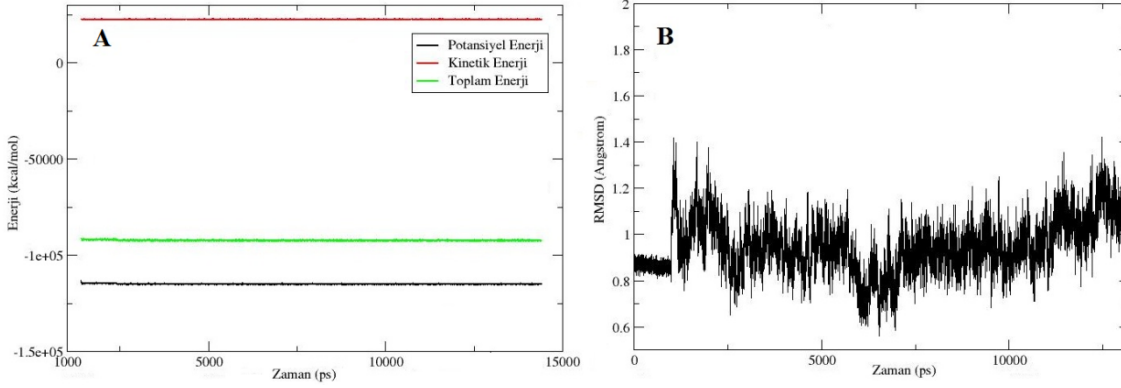
Şekil 4.132. L14 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L16 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom16) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.133.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L16 ligandının konformasyonunda ciddi değişikliklerin olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın O2 oksijeni ile Mg atomu, ASP64 ve ASP116 kalıntıları ile yük etkileşimleri bulunmaktadır. Ligandın LYS159 kalıntısına bakan fenil halkası ile LYS159 arasında π -(+) etkileşimi oluşmuştur. Diğer taraftan O1 oksijeni ile GLU92, O5 ile CYS65 ve O8 ile hem GLU152 (şekilde gösterilmemiş) hem de ASN155 kalıntıları arasında hidrojen bağları meydana gelmiştir. Ligand ayrıca, THR66 ile polar etkileşim, HIE67, VAL72 ve LYS156 ile van der Waals etkileşimi sergilemiştir. Komplekse, ligandın iki karboksilik oksijeninin katılması, ancak bir su molekülünün Mg atomuna yaklaşmasına izin vermiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O2, O3 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve O3 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.95 Å ve 1.94 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları her iki atom çifti için de 1.94 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.135.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

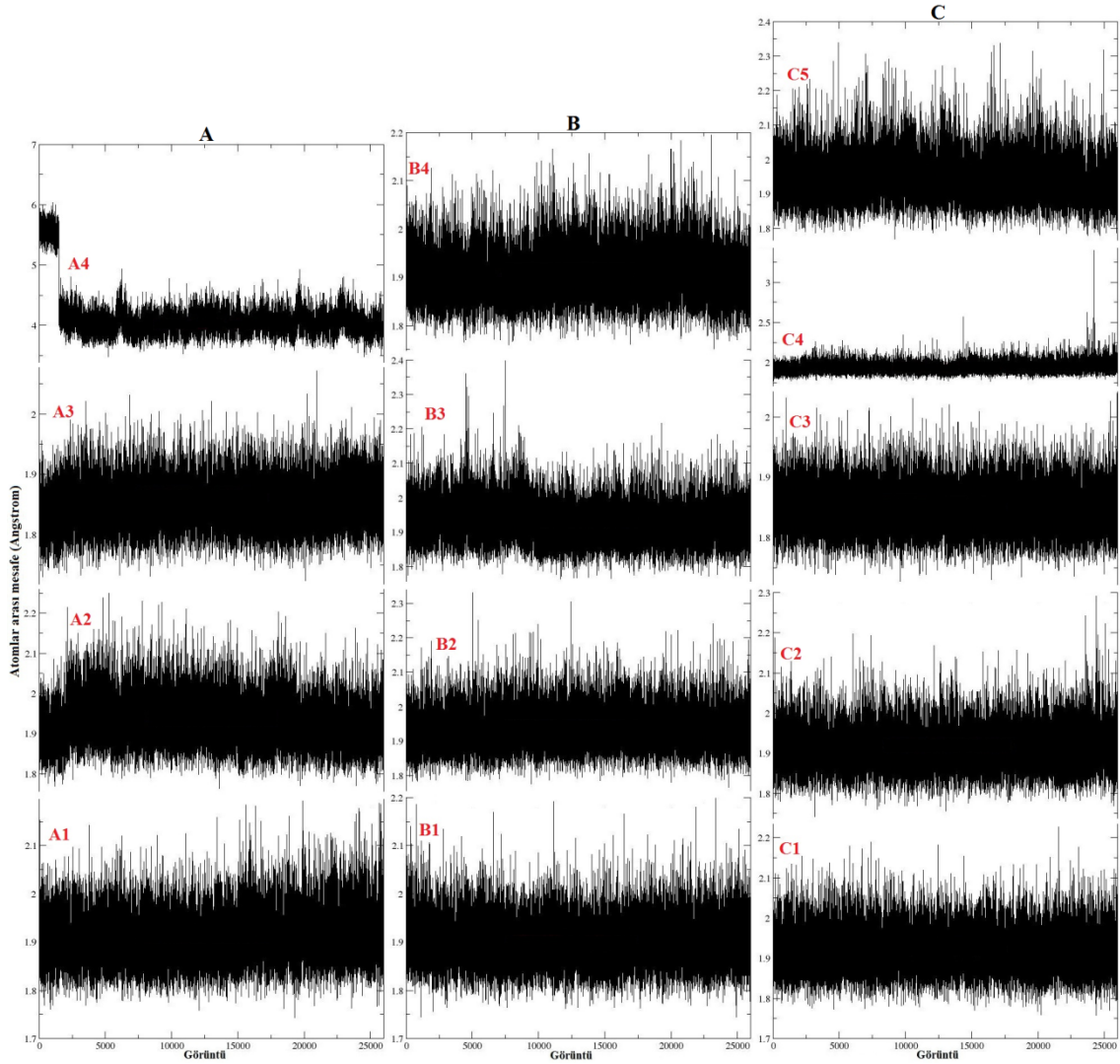


Şekil 4.133. A) L16 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapıdaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapıdaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acom16) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.134.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



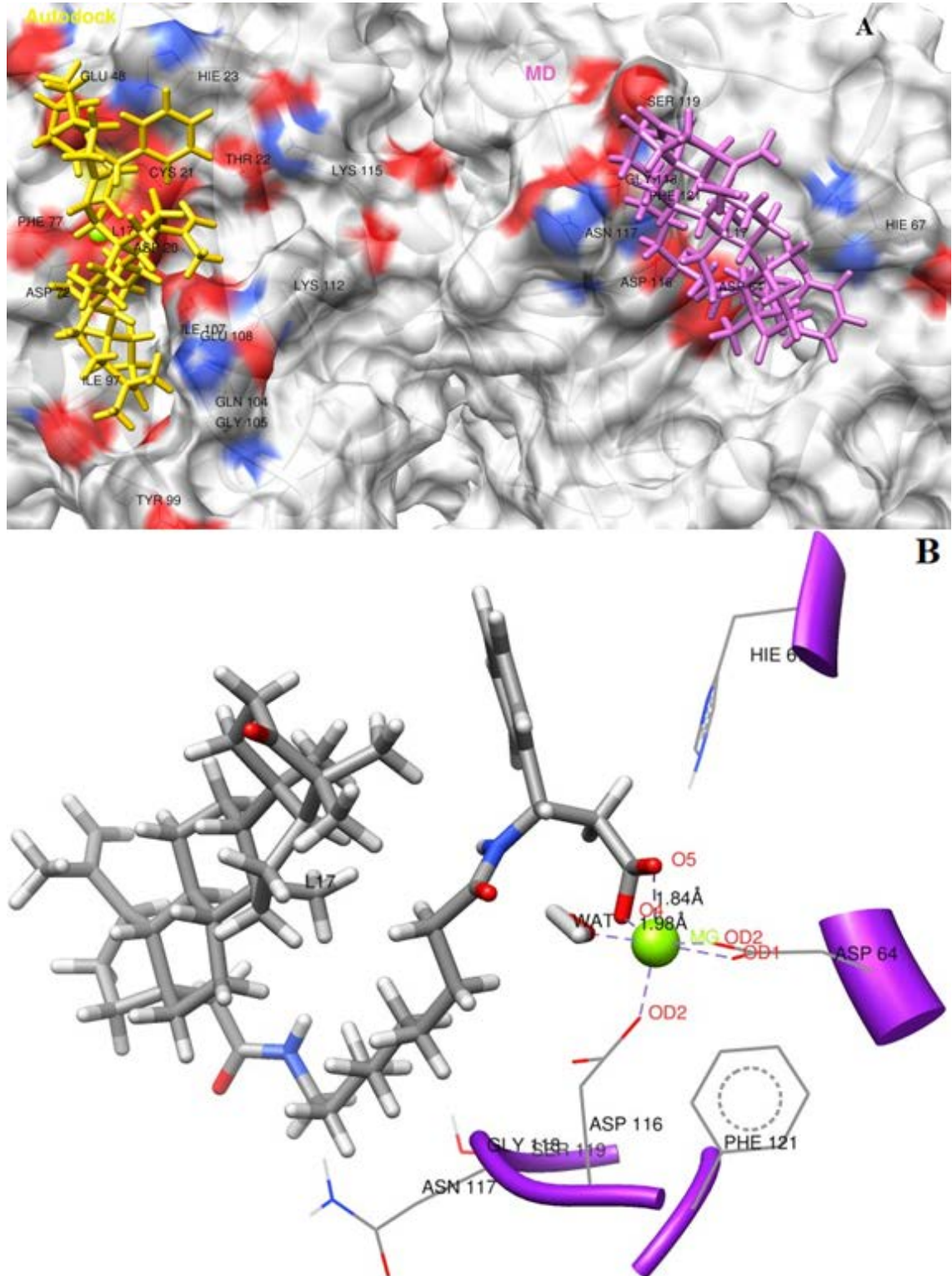
Şekil 4.134. L16 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.135. İntegrasyonun katalitik öz bölgesindeki (**A:** vcom13.pdb, **B:** vcom14.pdb, **C:** acom16.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (**A1:** Mg-ASP64 OD1, **A2:** Mg-ASP64 OD2, **A3:** Mg-ASP116 OD2, **A4:** Mg-LEU63 O, **B1:** Mg-ASP64 OD1, **B2:** Mg-ASP64 OD2, **B3:** Mg-ASP116 OD1, **B4:** Mg-ASP116 OD2, **C1:** Mg-ASP64 OD1, **C2:** Mg-ASP64 OD2, **C3:** Mg-ASP116 OD2, **C4:** Mg-L16 O2, **C5:** Mg-L16 O3)

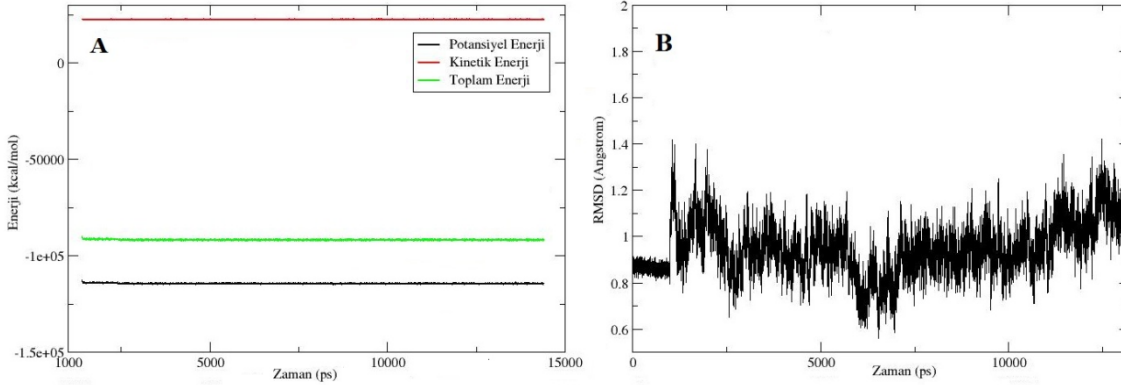
L17 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom17) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.136.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L17 ligandının konformasyonunda önemli değişikliklerin meydana geldiği anlaşılmaktadır. L17 ligandı, ASP64, ASP116 kalıntıları ve Mg atomu ile yük etkileşiminde bulunurken, CYS65 kalıntısıyla polar etkileşim ve HIE67, ASN117, GLY118, SER119 ve PHE121 kalıntıları ile van der Waals etkileşimlerinde bulunmuştur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın

O4, O5 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4 ve O5 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.98 Å, 1.84 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları her iki atom çifti için 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.142.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



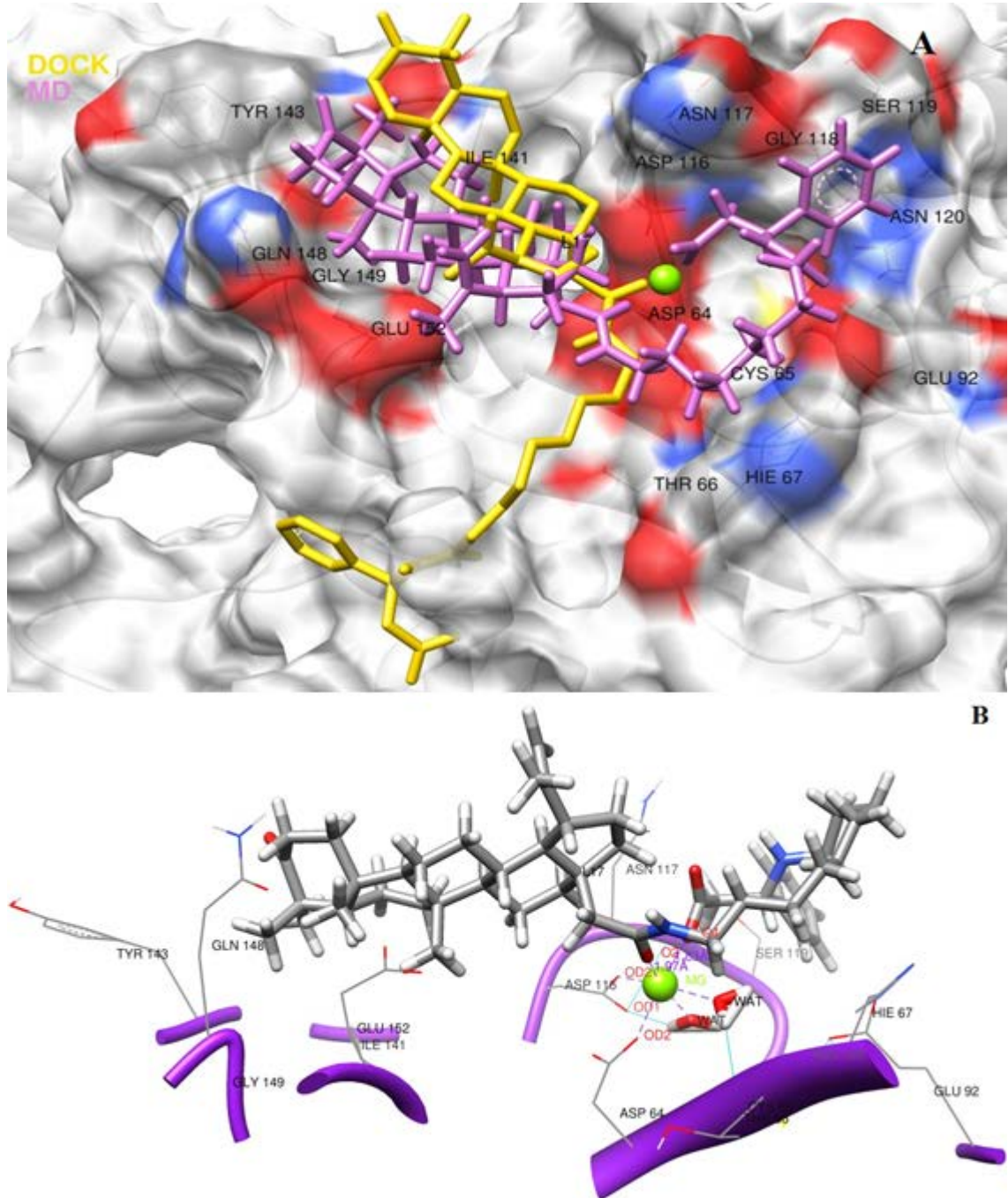
Şekil 4.136. A) L17 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapıdaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapıdaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (acom17) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.137.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.137. L17 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

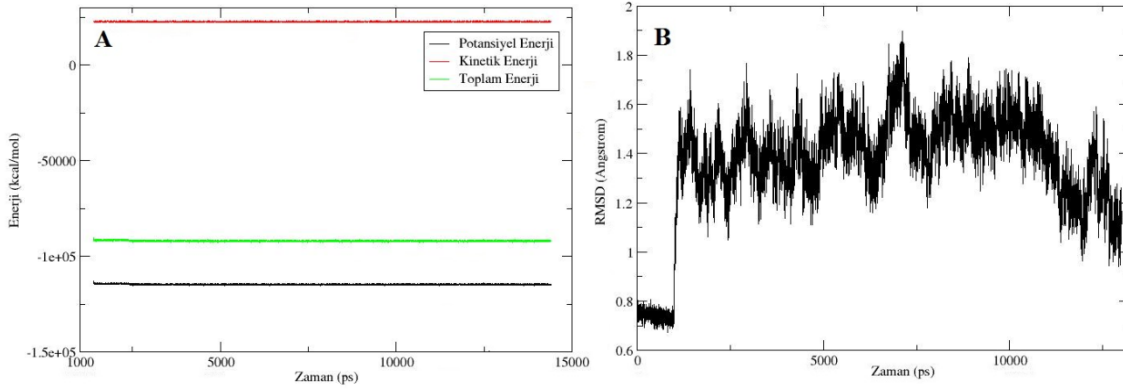
L17 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom17) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.138.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L17 ligandının konformasyonunda ciddi değişikliklerin olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın karboksilik oksijeni O4 ile Mg atomu, ASP64 ve ASP116 kalıntıları ile yük etkileşimleri bulunmaktadır. Diğer taraftan L17 ligandının CYS65 ve GLU92 kalıntılarıyla polar, THR66, HIE67, ASN117, GLY118, SER119, ASN120, ILE141, TYR143, ASN144, GLN148 ve GLU152 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O2, O4 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.97 Å ve 1.83 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.97 Å ve 1.87 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.142.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.138. A) L17 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (dcom17) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

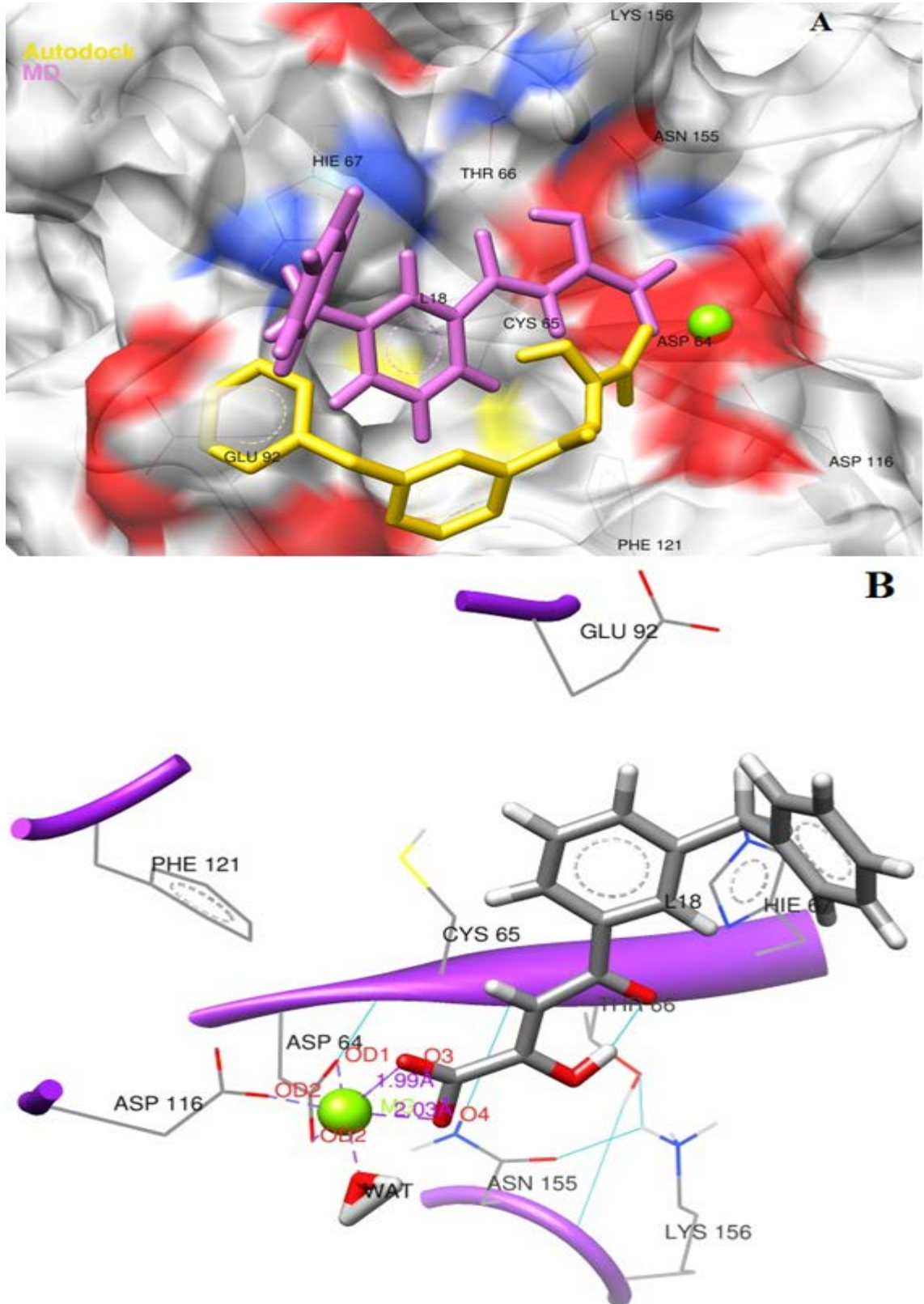
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.139.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



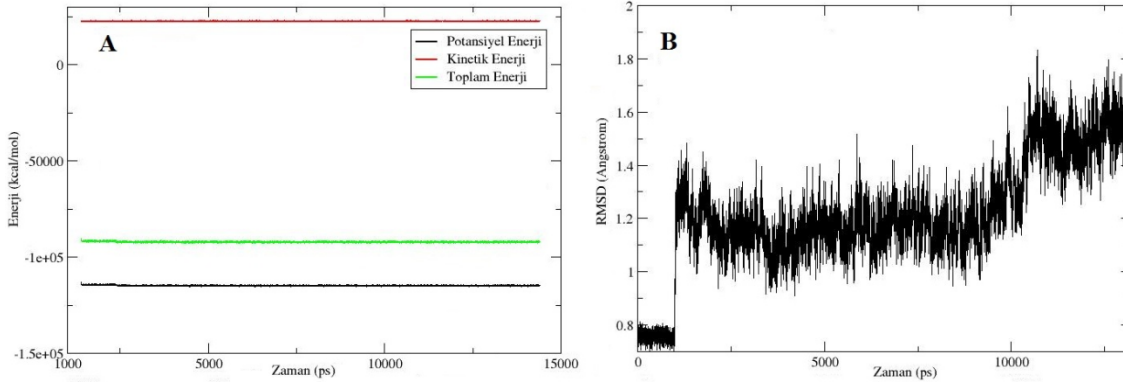
Şekil 4.139. L17 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L18 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom18) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.140.'ta gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L18 ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O3 atomu ASP64 ve ASP116 ile yük etkileşiminde bulunmaktadır. Bunun yanında ligand, CYS65, HIE67, ASN155 ve LYS156 kalıntıları ile polar etkileşimler, THR66, GLU92 ve PHE121 ile van der Waals etkileşimleri göstermiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O3, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O3 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.99 Å ve 2.03 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.93 Å ve 1.96 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.142.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

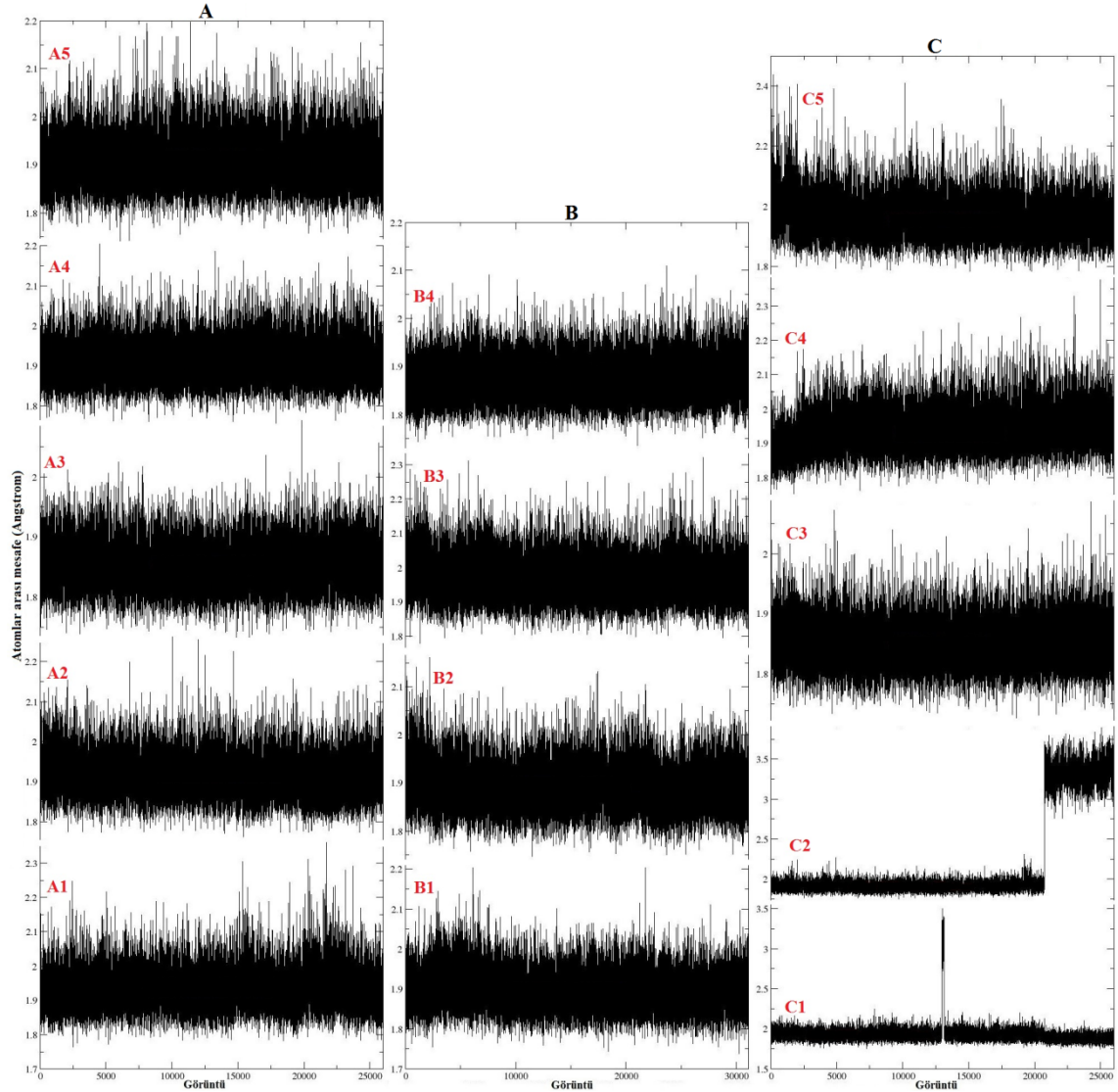


Şekil 4.140. A) L18 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom18) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.141.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiğinde, 10 ns'den itibaren ortalama 1.2 Å civarında seyreden eğrinin 1.6 Å civarına çıktığı gözlenmektedir. Atomlar arası mesafelerin değişimini gösteren Şekil 4.142. C grafik serisi incelendiğinde, C2 grafiğinde yaklaşık 20 000. görüntüden sonra Mg-ASP64 OD2 aomları arasındaki mesafenin aniden arttığı gözlenmektedir. Her bir ns 2000 tane görüntü içermektedir. Dolayısıyla bu ani mesafe artışınının, RMSD grafiğinde gözlenen artışla aynı zamanda gerçekleşmiş olduğu belirlenebilmektedir. Bu da, kompleksin 10 ns'dan sonra konformasyon değiştirdiğini ve bu nedenle de Mg-ASP64 OD2 arasındaki mesafenin uzadığını göstermektedir.



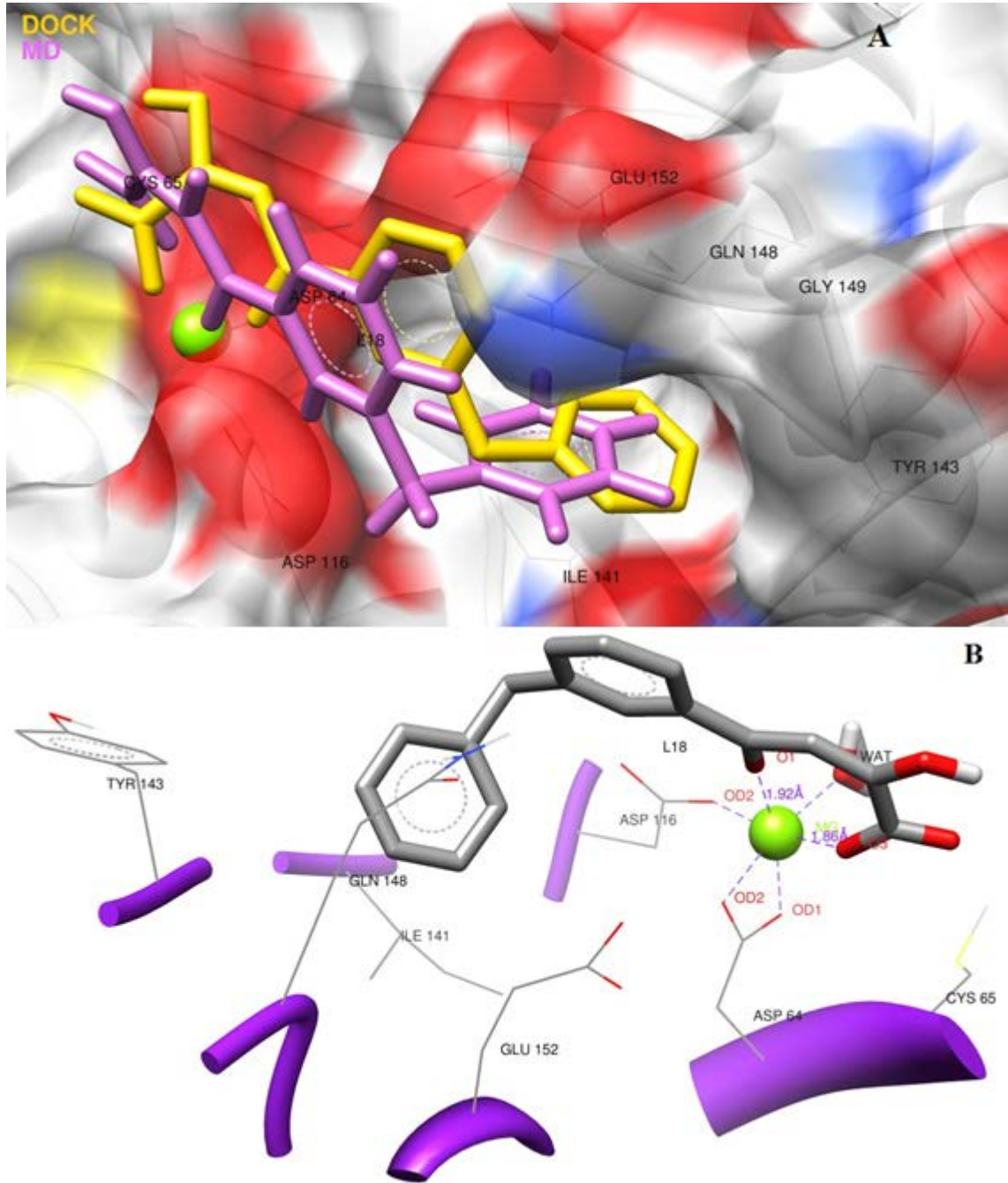
Şekil 4.141. L18 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.142. İntegrızın katalitik öz bölgesindeki (A: acom17.pdb, B: dcom17.pdb, C: acom18.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L17 O4, A5: Mg-L17 O5, B1: Mg-ASP64 OD2, B2: Mg-ASP116 OD2, B3: Mg-L17 O2, B4: Mg-L17 O4, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L18 O3, C5: Mg-L18 O4)

L18 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom18) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.143.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L18 ligandının konformasyonunda fazla değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır. Ligandın karboksilik O3 oksijeni ASP64, ASP116 kalıntıları ile yük etkileşiminde bulunduğu komplekste igand ile CYS65 kalıntısı arasında polar, ASN117, ILE141, TYR143, GLY149, ILE151 ve GLU152 kalıntıları arasında van der Waals etkileşimleri gözlenmektedir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64

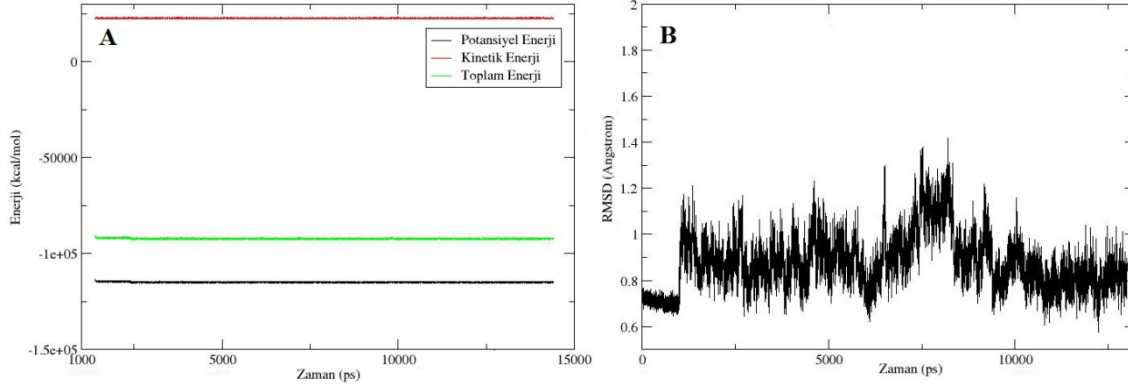
OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O3 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O3 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.92 Å ve 1.86 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.93 Å ve 1.90 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.149.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.143. A) L18 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (dcom18) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

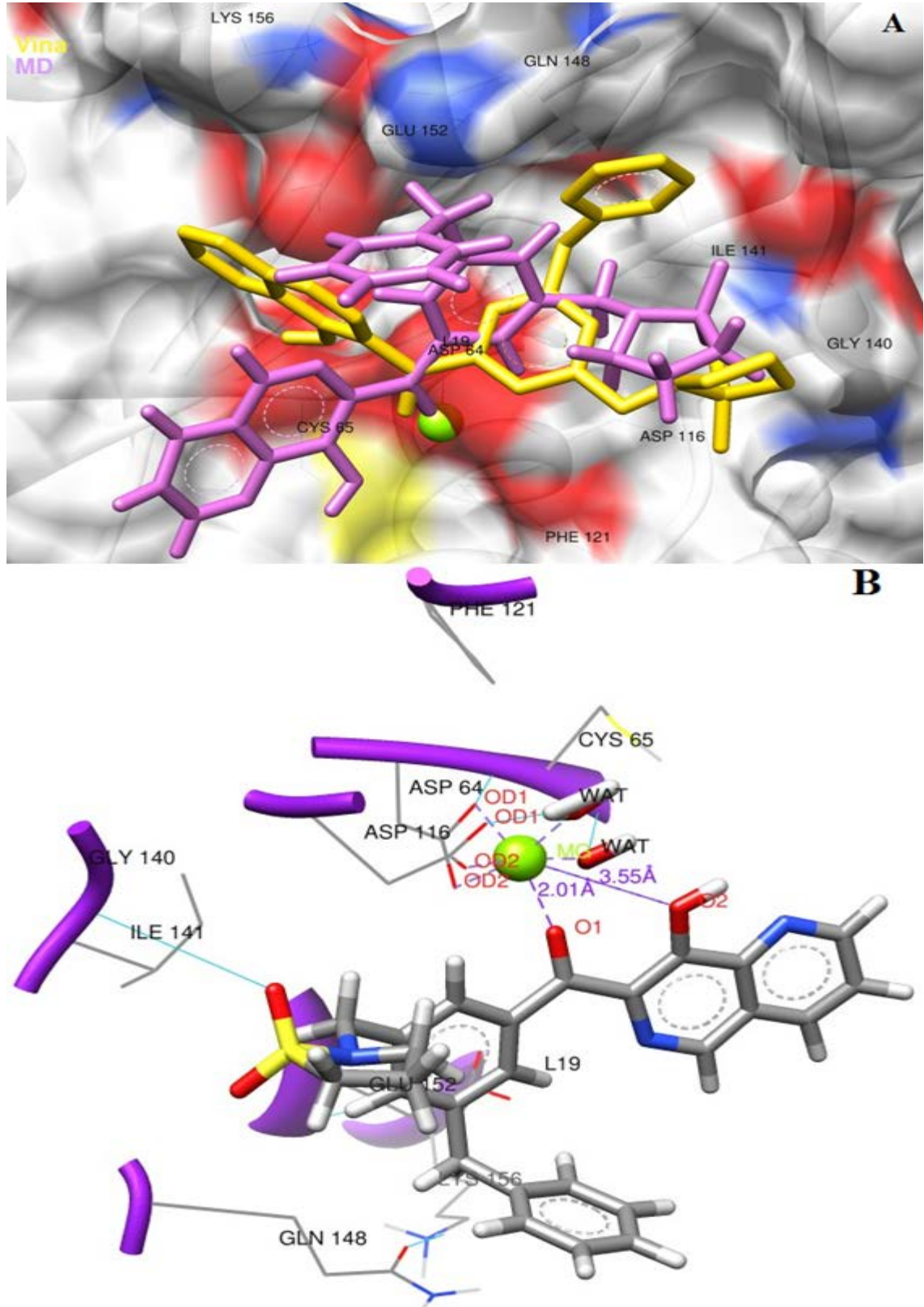
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.144.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



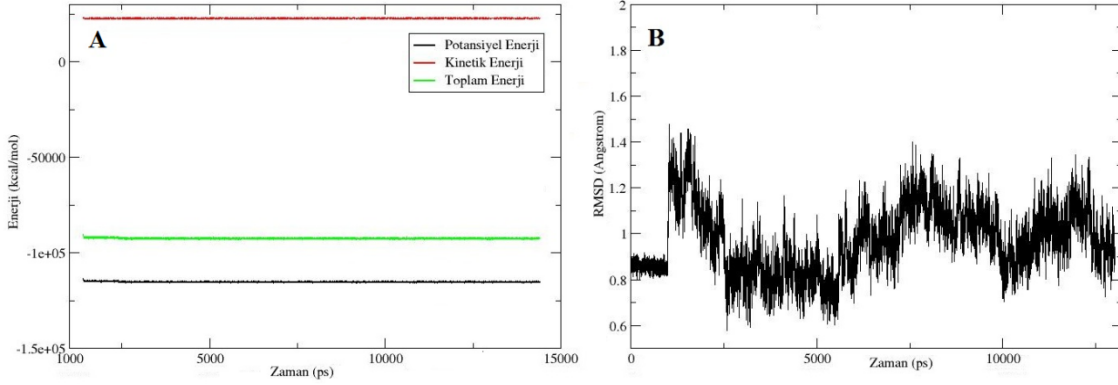
Şekil 4.144. L18 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L19 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom19) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.145.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L19 ligandının konformasyonunda değişiklikler olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın tiazolidin halkasındaki oksijenlerden biri ile ILE141 arasında hidrojen bağı meydana gelmiştir. Bunun yanında, ligandın naftiridin halkası HIE67 ile π - π etkileşimleri yapmaktadır. ASP64, ASP116 ve ILE141 kalıntıları ile polar etkileşimler, GLY140, GLN148, GLU152 ve LYS156 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri ligand ve protein arasındaki diğer etkileşimlerdir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomlarının en düşük enerjili komplekste Mg atomu ile etkileşim mesafeleri sırası ile 2.01 Å ve 3.55 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalaması sırası ile 2.02 Å ve 3.53 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.149.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



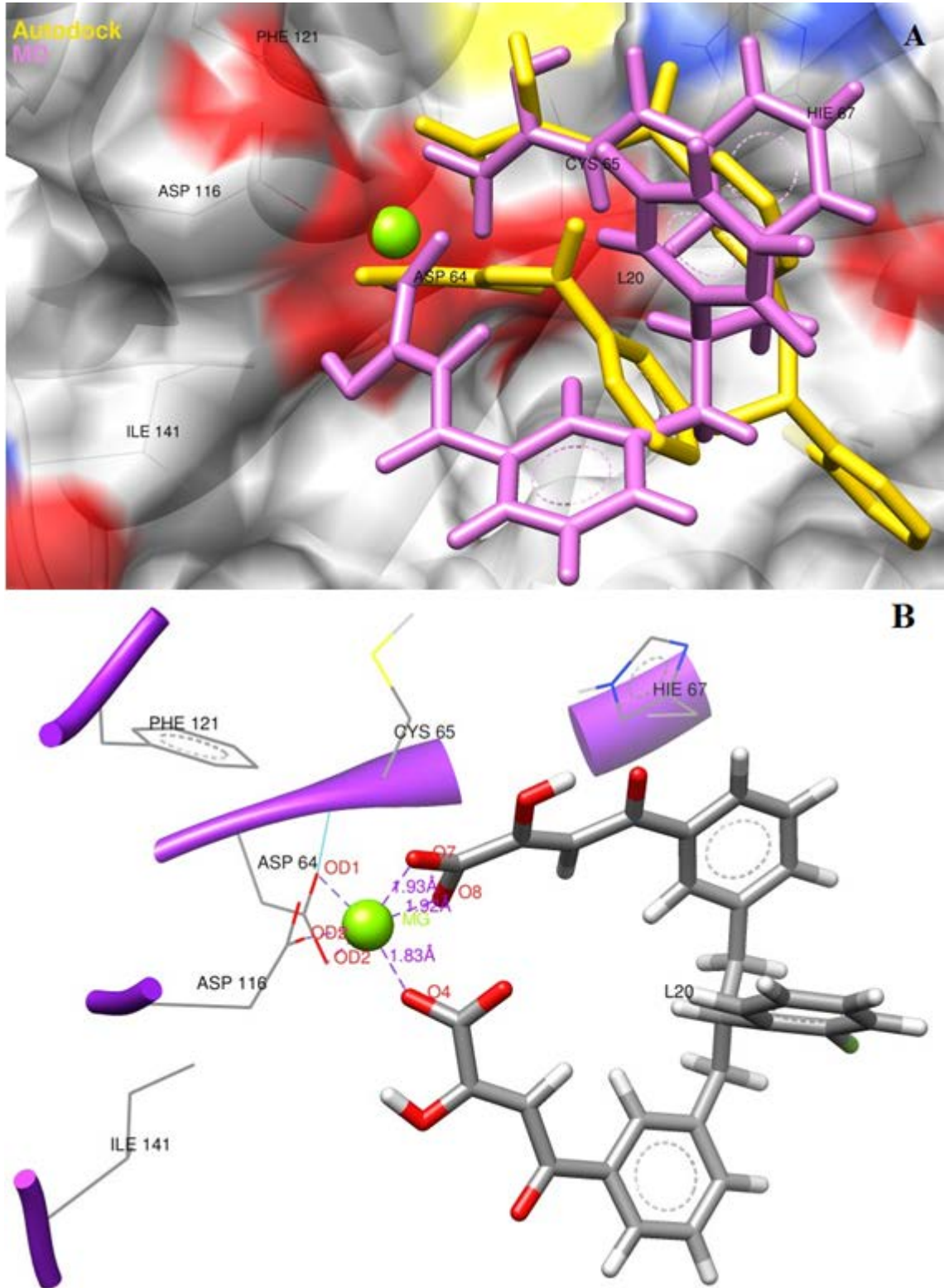
Şekil 4.145. A) L19 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapıdaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapıdaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcom19) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.146.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



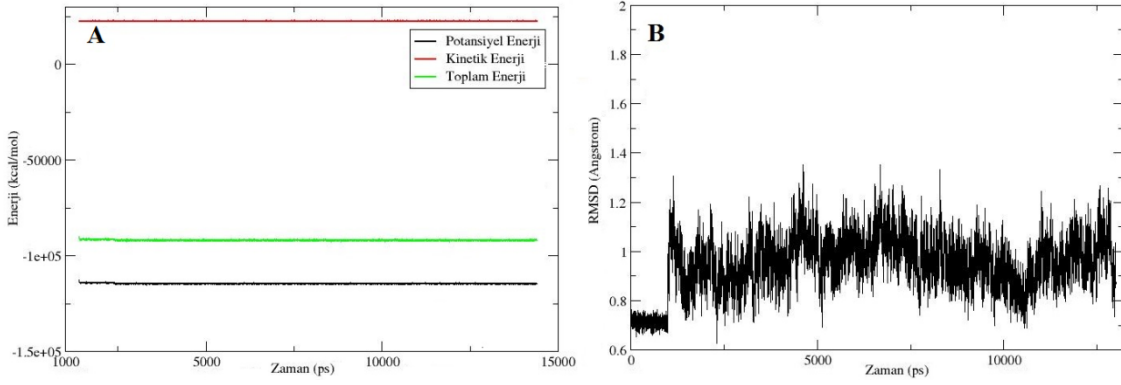
Şekil 4.146. L19 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L20 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom20) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.147.de' gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L20 ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O8 atomu ASP64 ve ASP116 ile yük etkileşiminde bulunmuştur. Ligandın fenil halkası HIE67 ile π - π etkileşimi yapmıştır. Bunu yanında, CYS65 ile polar, THR66, PHE121 ve ILE141 ile van der Waals etkileşimleri en düşük enerjili yapıda ligandın görülen etkileşimleri olarak sayılabilir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O4, O7 ve O8 atomları ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4, O7 ve O8 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.83 Å, 1.93 Å ve 1.92 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.89 Å, 1.94 Å ve 1.97 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.49.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

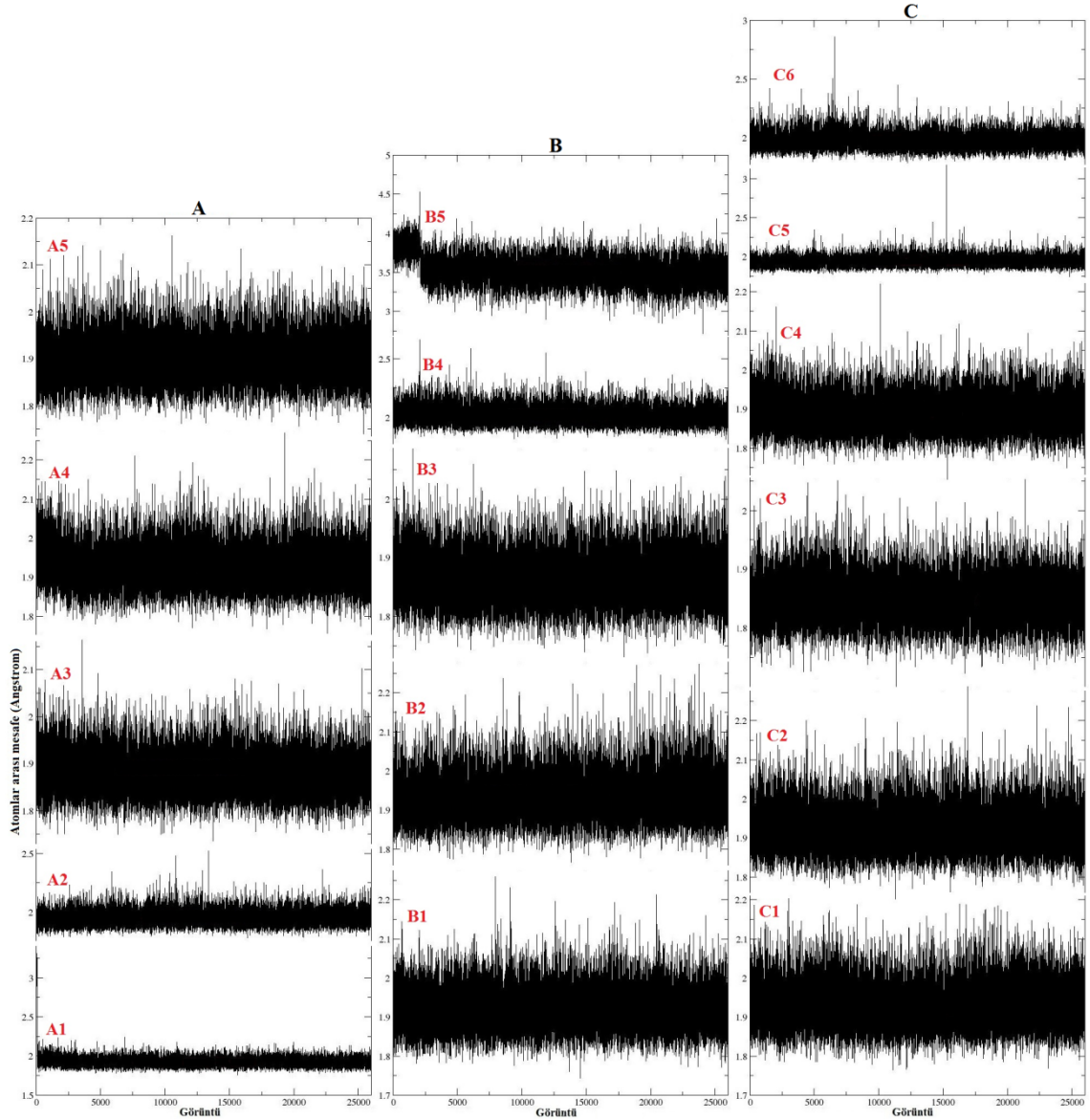


Şekil 4.147. A) L20 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapıdaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapıdaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom20) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.148.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



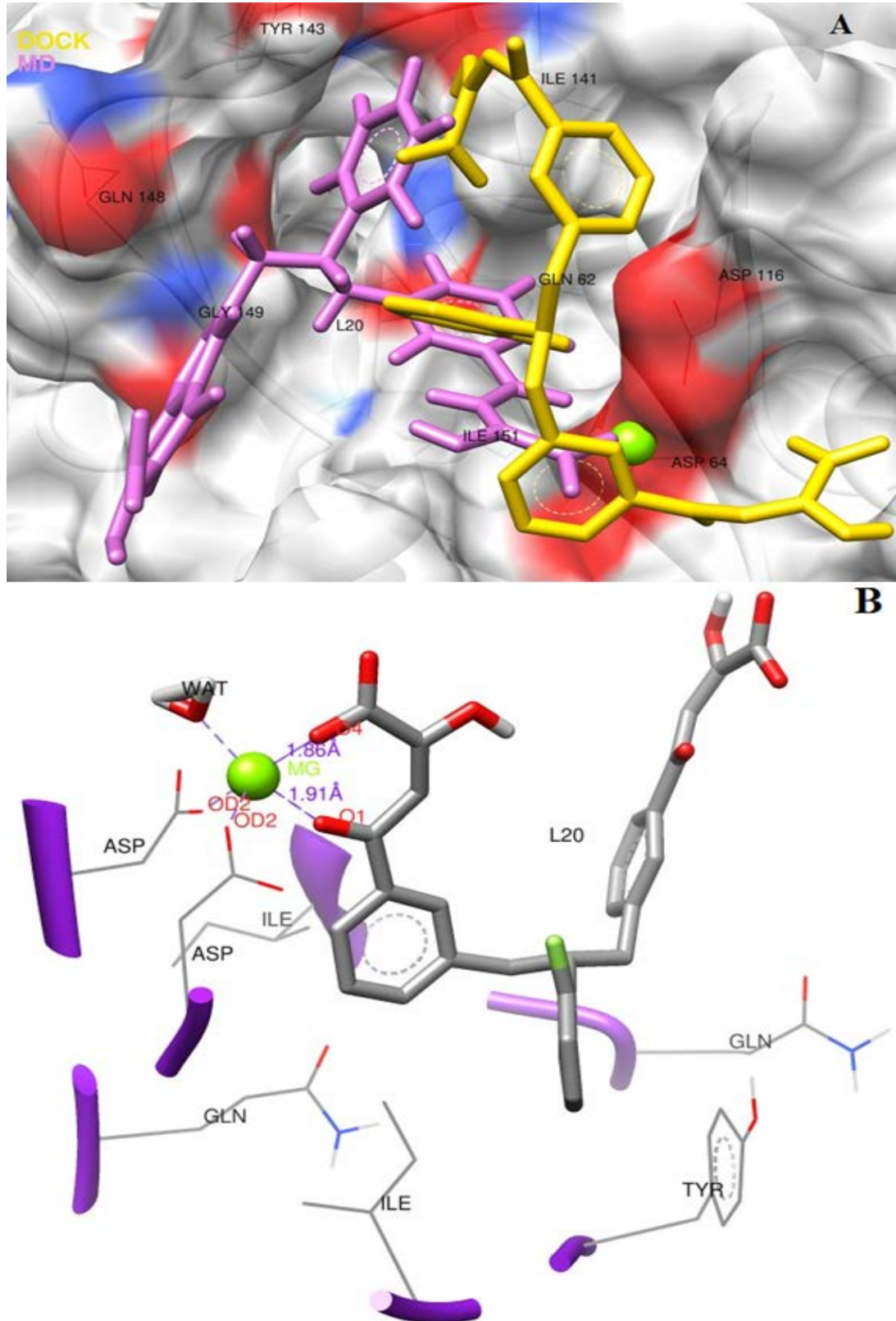
Şekil 4.148. L20 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.149. İntegrızın katalitik öz bölgesindeki (A: dcom18.pdb, B: vcom19.pdb, C: acom20.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L18 O1, A5: Mg-L18 O3, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L19 O1, B5: Mg-L19 O2, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L18 O4, C5: Mg-L18 O7, C6: Mg-L18 O8)

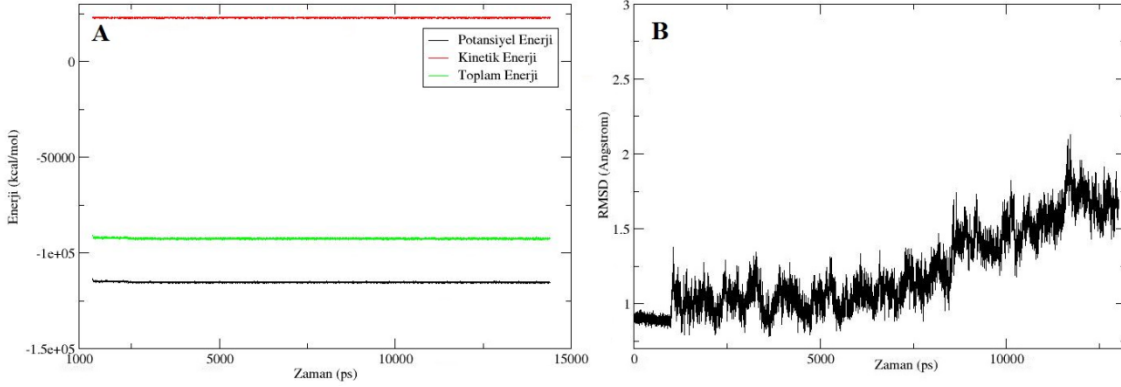
L20 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom20) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.150.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L20 ligandının konformasyonunun oldukça değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın ASP64, CYS65 ve ASP116 ile polar, ASN117, ILE141, TYR143, GLN148, GLY149, ILE151 ve GLU152 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri gözlenebilen etkileşimlerdir. En

düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.91 Å ve 1.86 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.94 Å ve 1.87 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.156.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.150. A) L20 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (dcom20) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

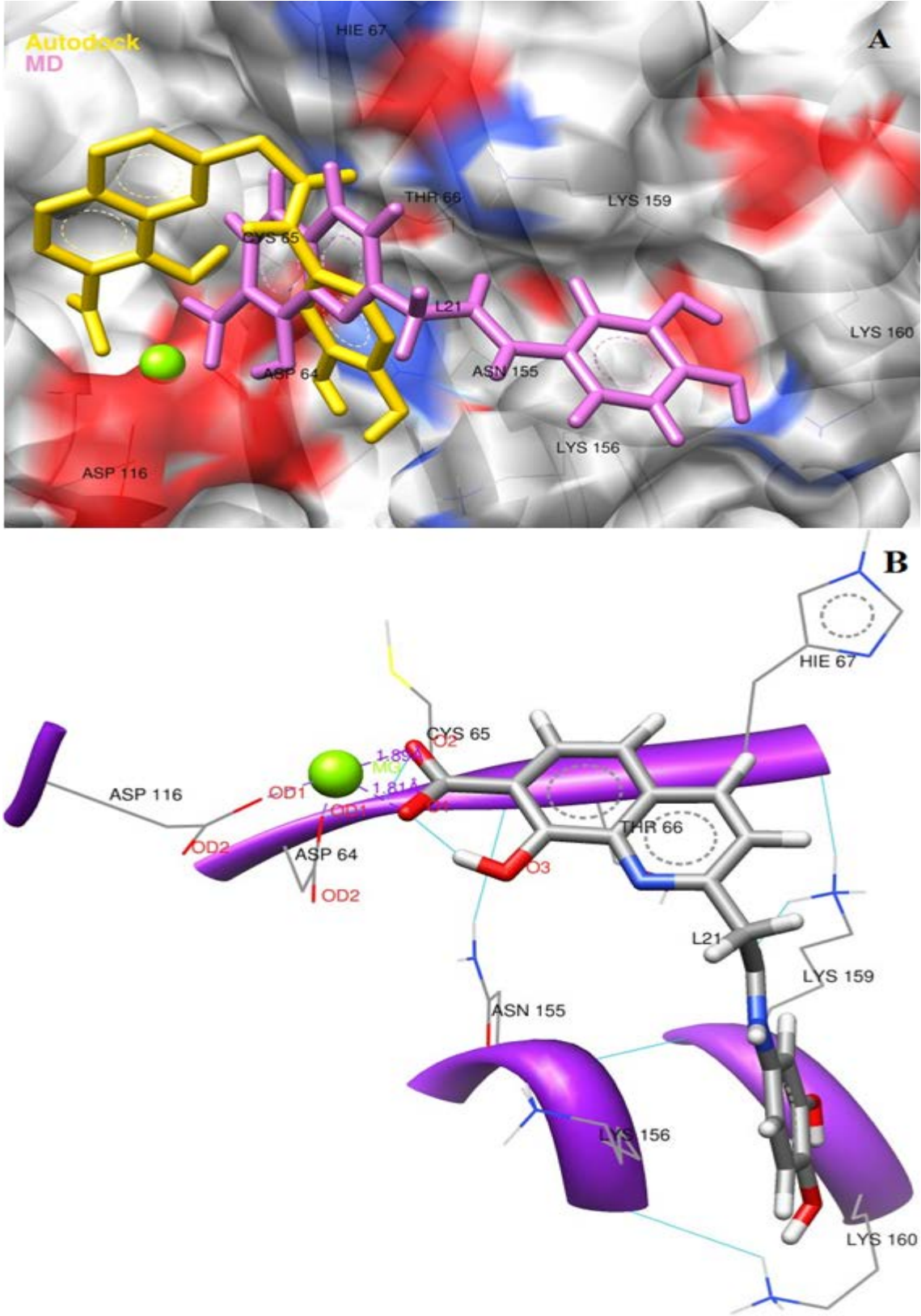
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.151.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.151. L20 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

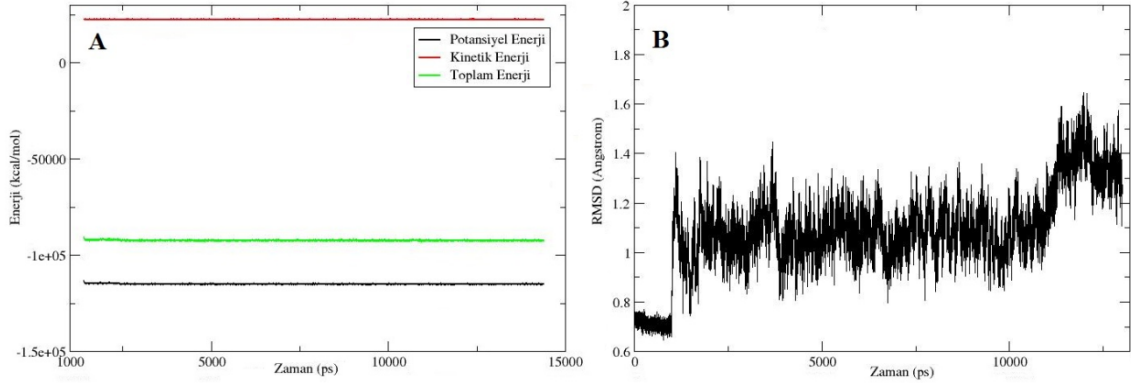
L21 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom21) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.152.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L21 ligandının konformasyonunda önemli değişikliklerin olduğu anlaşılmaktadır. Komplekste ligandın fenil halkası ile LYS156 arasında π - π etkileşimi bulunmaktadır. Ligandın O1 oksijeni ASP64 OD1 ve ASP116 OD1 atomları arasında yük etkileşimi gözlenmektedir. Ligandın keton oksijeni ile LYS159 arasında hidrojen bağı oluşmuştur. Komplekste ligandın polar etkileşimde bulunduğu protein kalıntıları ASP64, CYS65, THR66, ASP116, ASN155, LYS156, LYS159 ve LYS160 iken ligandın van der Waals etkileşimde bulunduğu protein kalıntıları HIE67 ve VAL72 olmuştur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.81 Å ve 1.89 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.91 Å ve 1.94 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.156.'da

gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



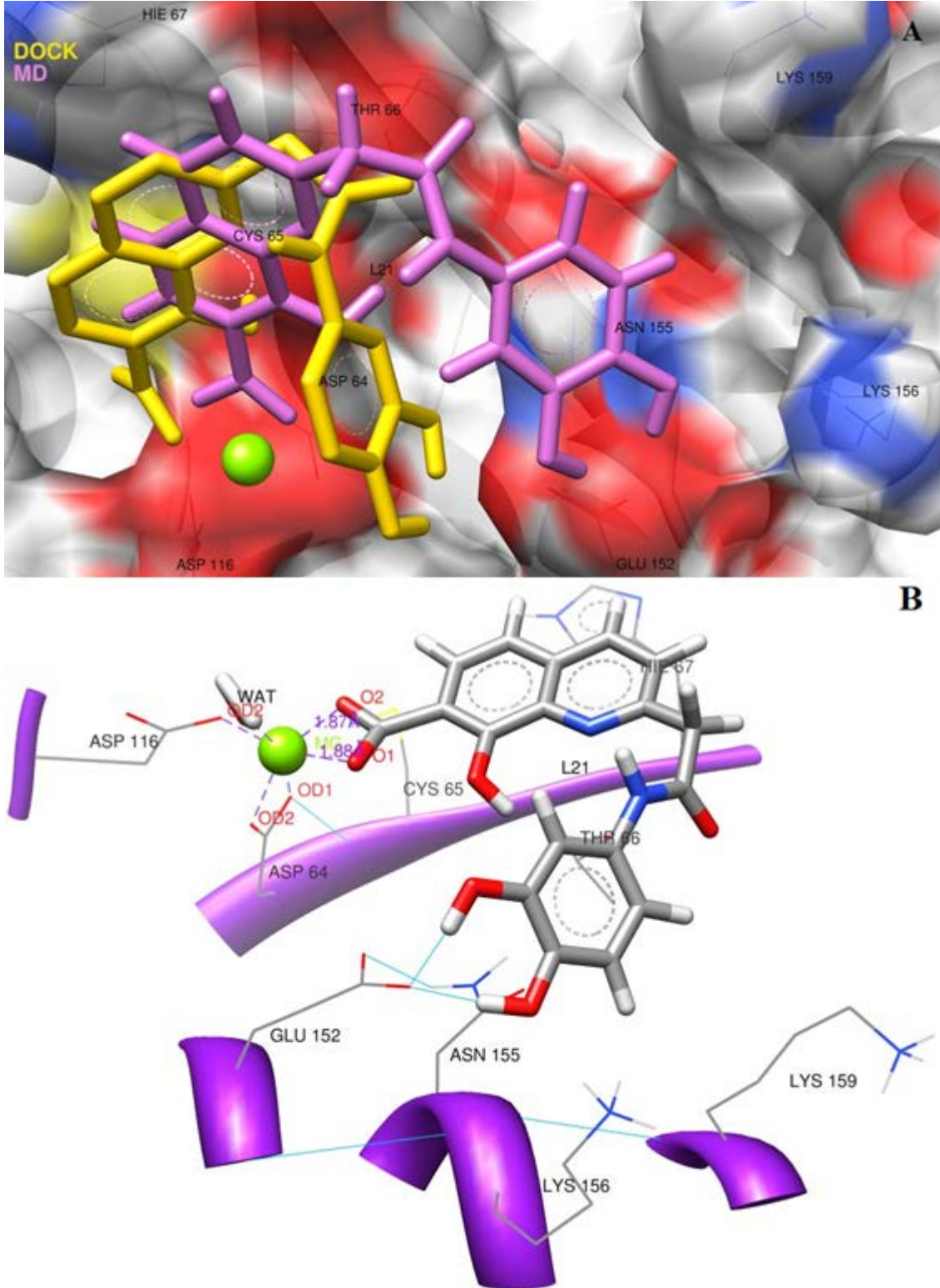
Şekil 4.152. A) L21 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acom21) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.153.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



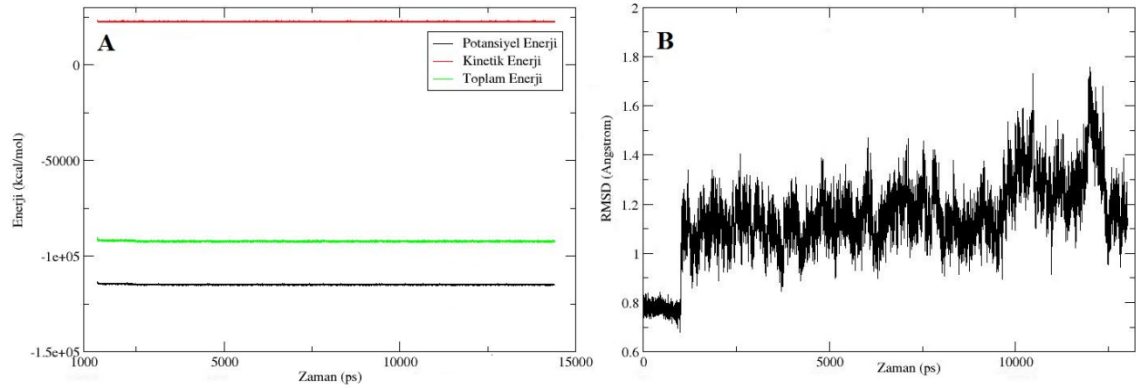
Şekil 4.153. L21 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L21 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom21) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.154.'te gösterilmiştir. Ligandın O2 atomu ile ASP64 ve ASP 116 kalıntıları arasında yük etkileşimi bulunurken, ligandın kinolin halkası ile HIE67 arasında π - π , THR66 arasında π - σ etkileşimi gözlenmektedir. Ayrıca fenil halkasındaki iki alkol hidrojeni ile GLU152 arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. Komplekste ligandın diğer polar etkileşimleri CYS65, ASN155 ve LYS156 ile olurken, ligand sadece LYS159 ile van der Waals etkileşimleri göstermiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.88 Å ve 1.87 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.91 Å ve 1.92 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.156.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

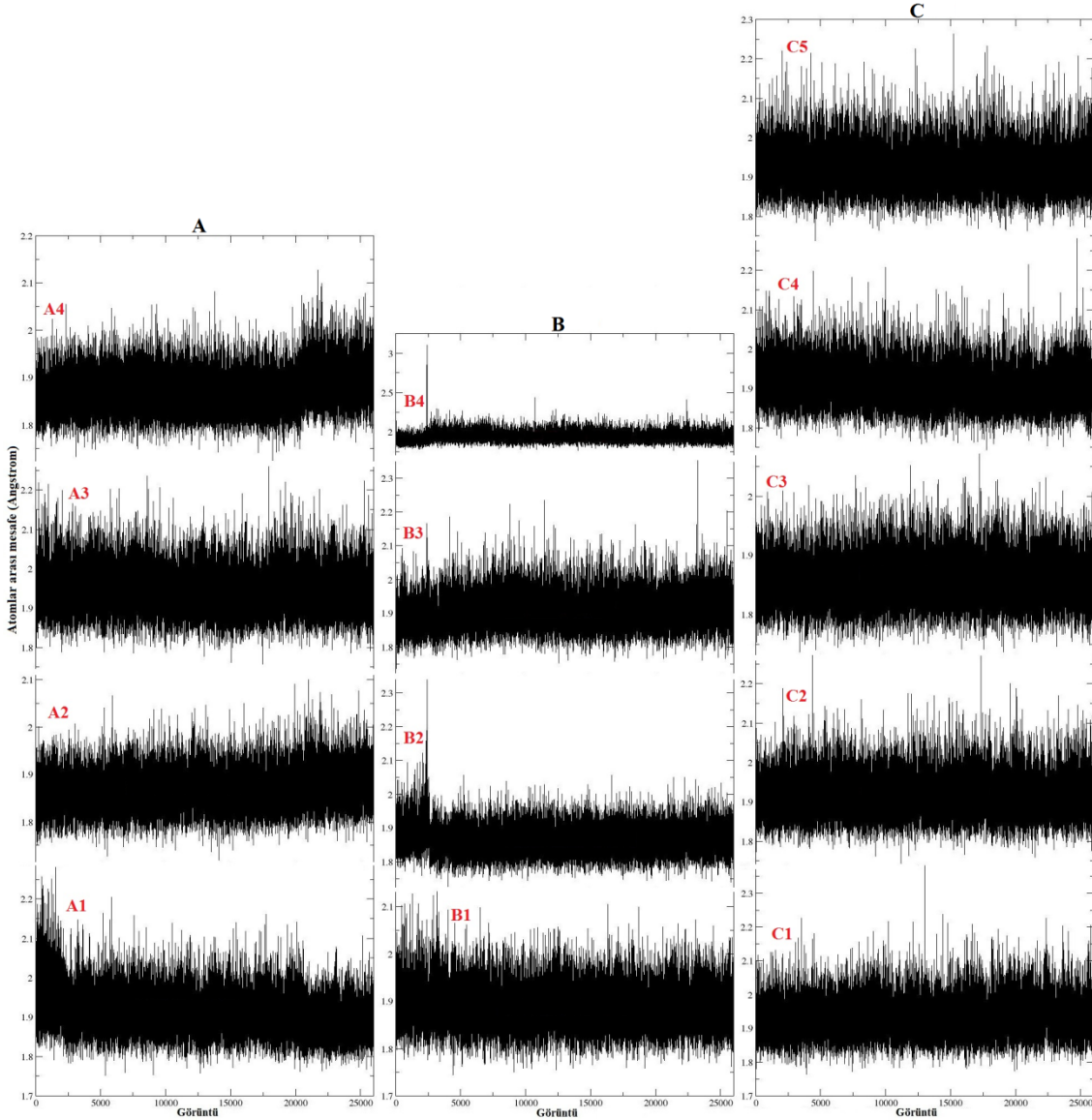


Şekil 4.154. A) L21 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom21) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.155.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



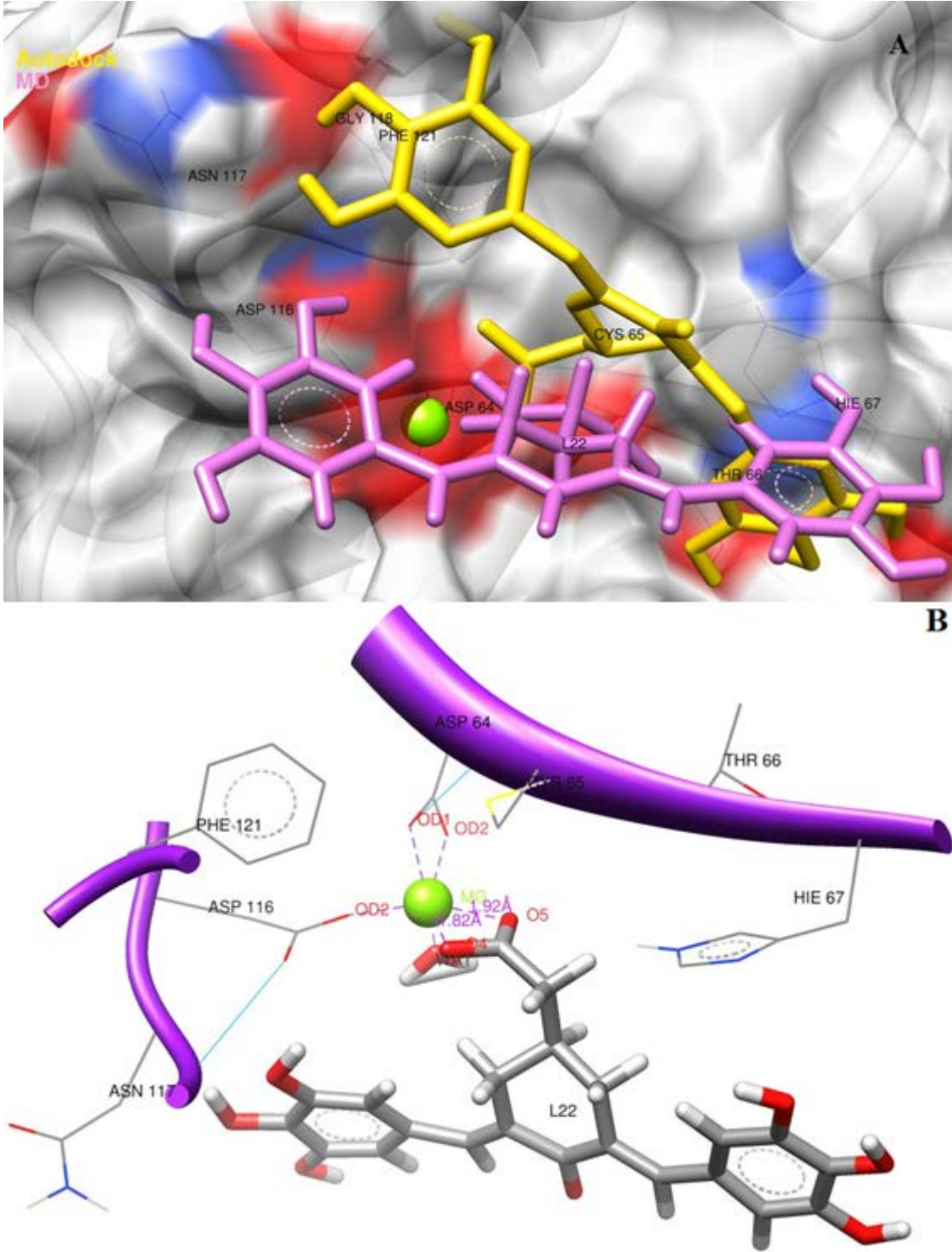
Şekil 4.155. L21 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.156. İntegrızın katalitik öz bölgesindeki (A: dcom20.pdb, B: acom21.pdb, C: dcom21.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD2, A2: Mg-ASP116 OD2, A3: Mg-L20 O1, A4: Mg-L20 O4, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP116 OD1, B3: Mg-L21 O1, B4: Mg-L21 O2, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L21 O1, C5: Mg-L21 O2)

L22 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom22) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.157.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L22 ligandının konformasyonunda değişiklikler olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın O5 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. ASN117 ve ASP116 ile hidrojen bağları oluşturan ligandın diğer etkileşimleri CYS65, HIE67 ve GLY118 ile polar, THR66 ve PHE121 ile van der Waals etkileşimleridir. En düşük

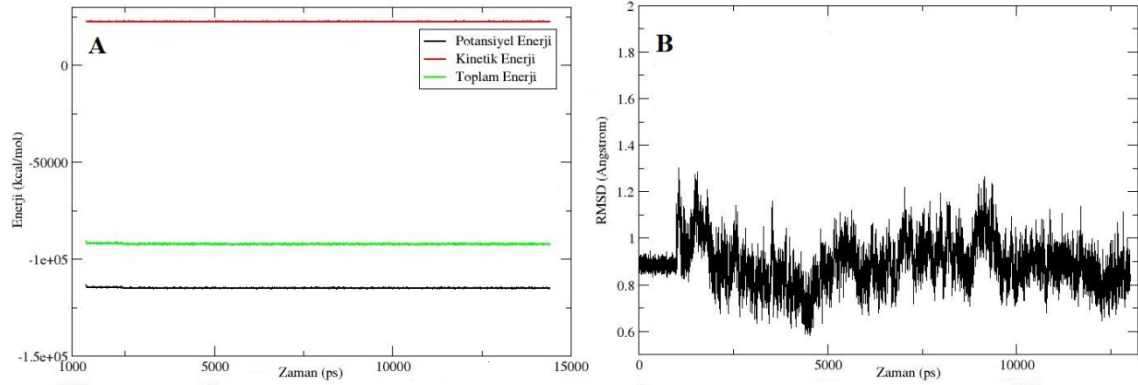
enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O4, O5 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4 ve O5 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.82 Å ve 1.92 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.87 Å ve 1.96 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.163.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.157. A) L22 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom22) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

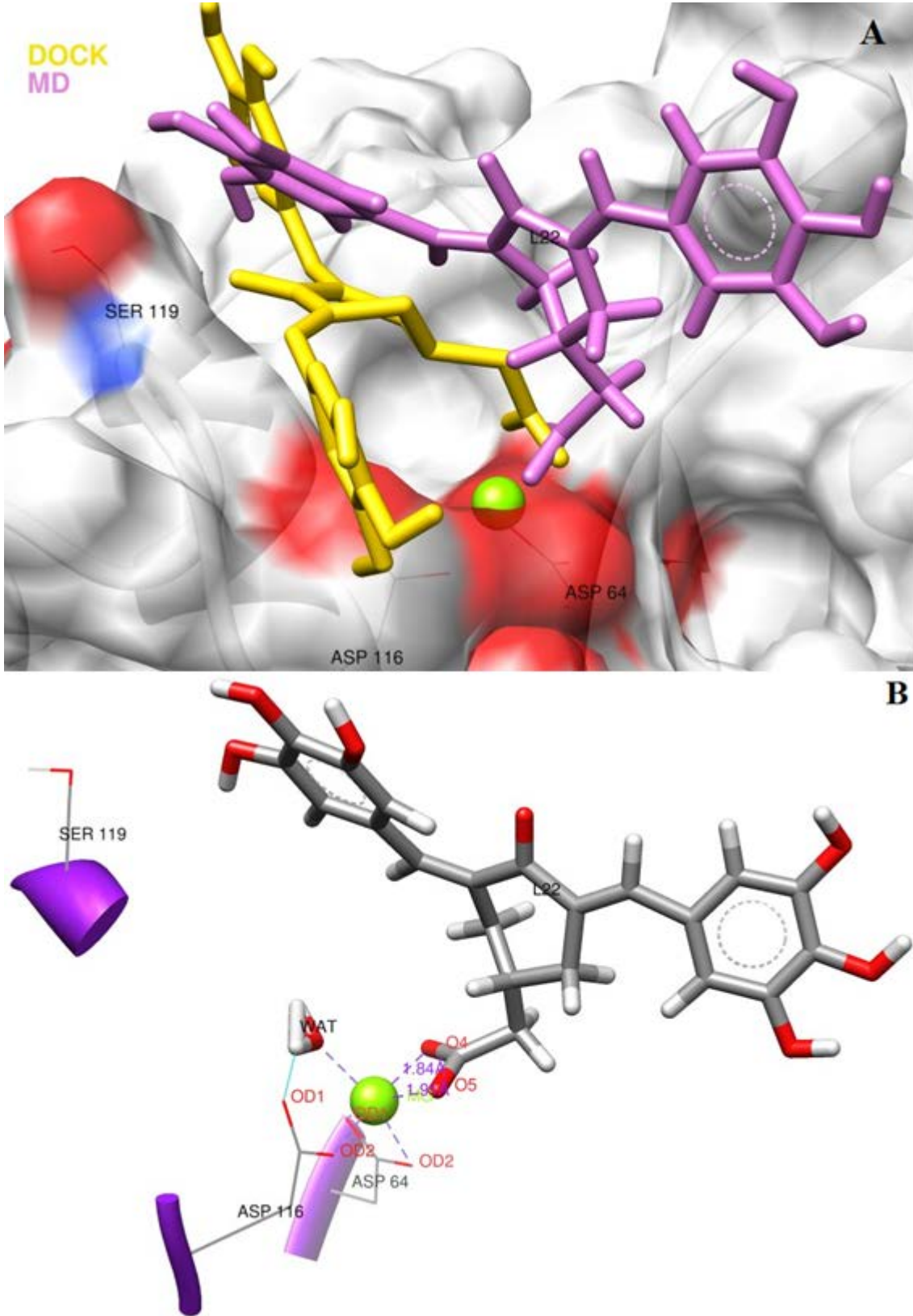
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.158.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de

negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns’de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



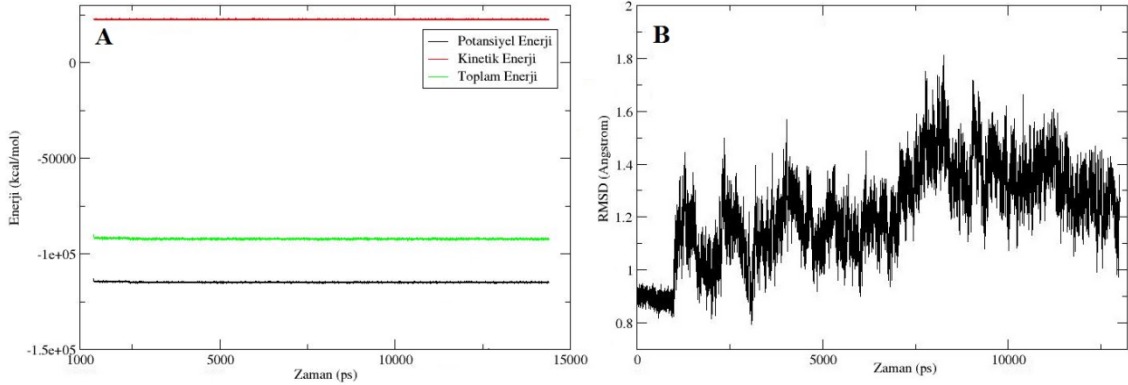
Şekil 4.158. L22 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L22 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom22) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.148.de’ gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L22 ligandının konformasyonunda önemli değişiklikler olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın O5 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligand ayrıca CYS65 ve SER119 ile polar, GLY118 ile van der Waals etkileşimi göstermiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O4, O5 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4 ve O5 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.84 Å ve 1.91 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.89 Å ve 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.163.’te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.’te verilmiştir.



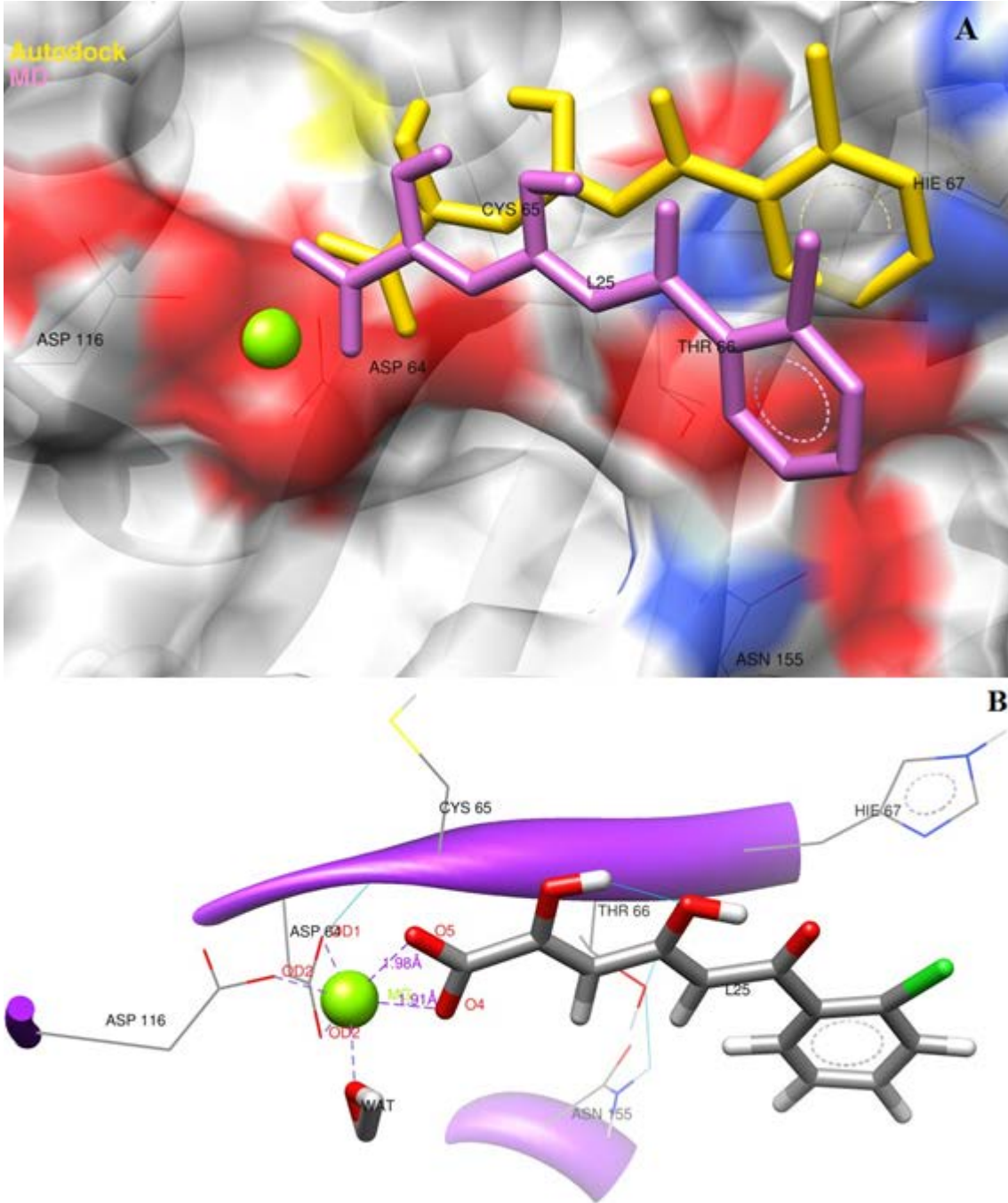
Şekil 4.159. A) L22 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (dcom22) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.160.'ta verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.160. L22 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

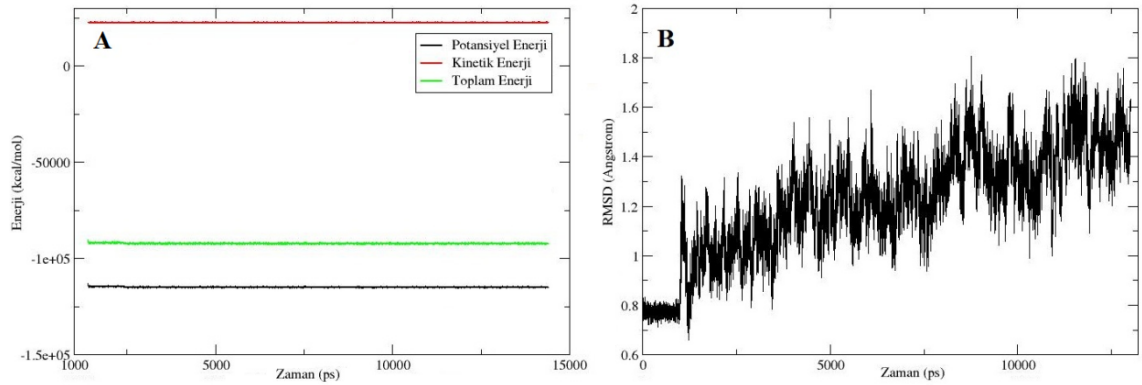
L25 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom25) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.161.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L25 ligandının konformasyonunda fazla değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır. Ligandın O5 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. CYS65 ile polar, THR66, HIE67, PHE121 ve ASN155 ile van der Waals etkileşimleri ligandın protein kalıntılarıyla olan diğer etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O4, O5 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4 ve O5 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.91 Å ve 1.98 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.96 Å ve 1.93 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.163.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



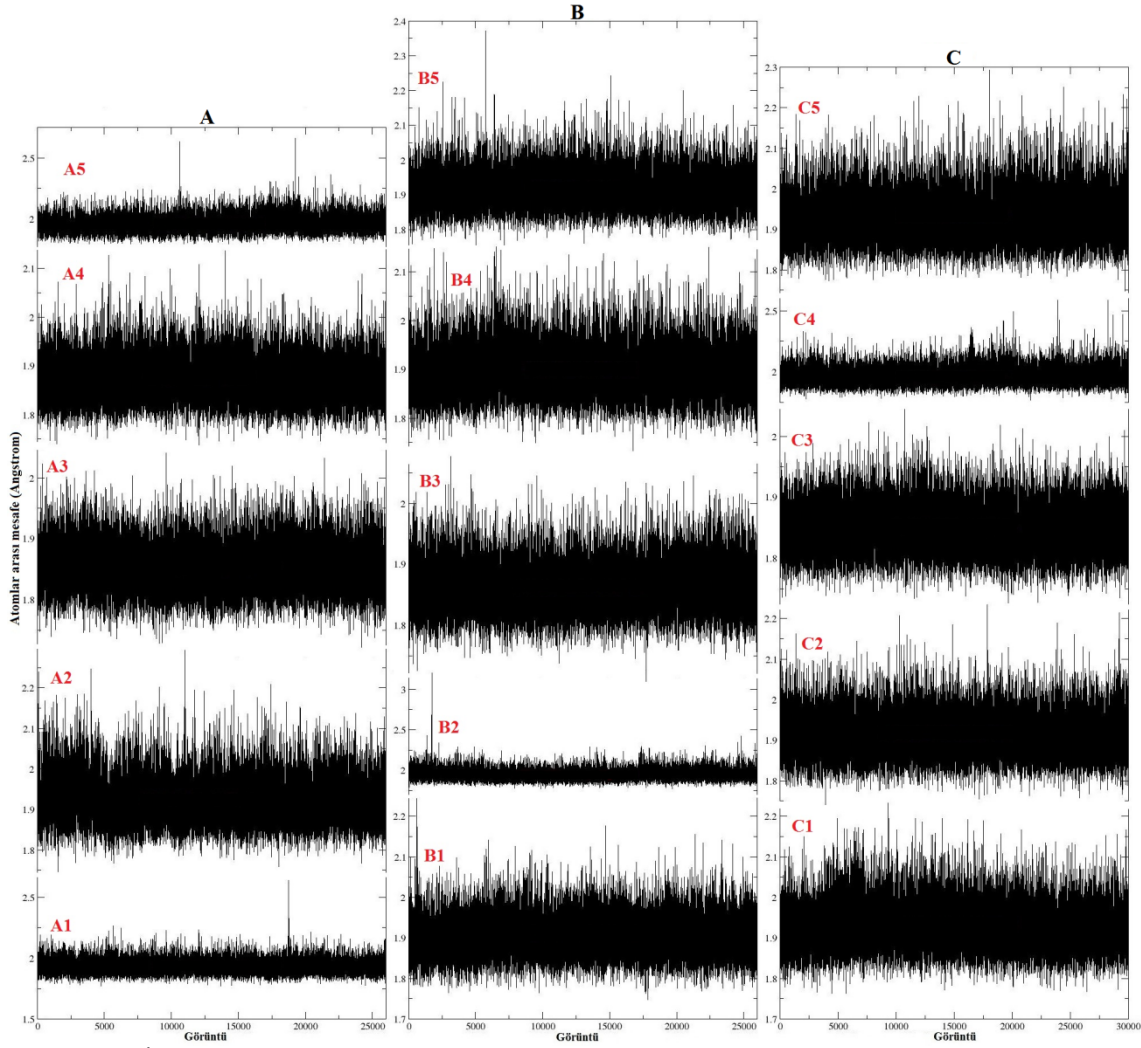
Şekil 4.161. A) L25 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom25) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.162.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



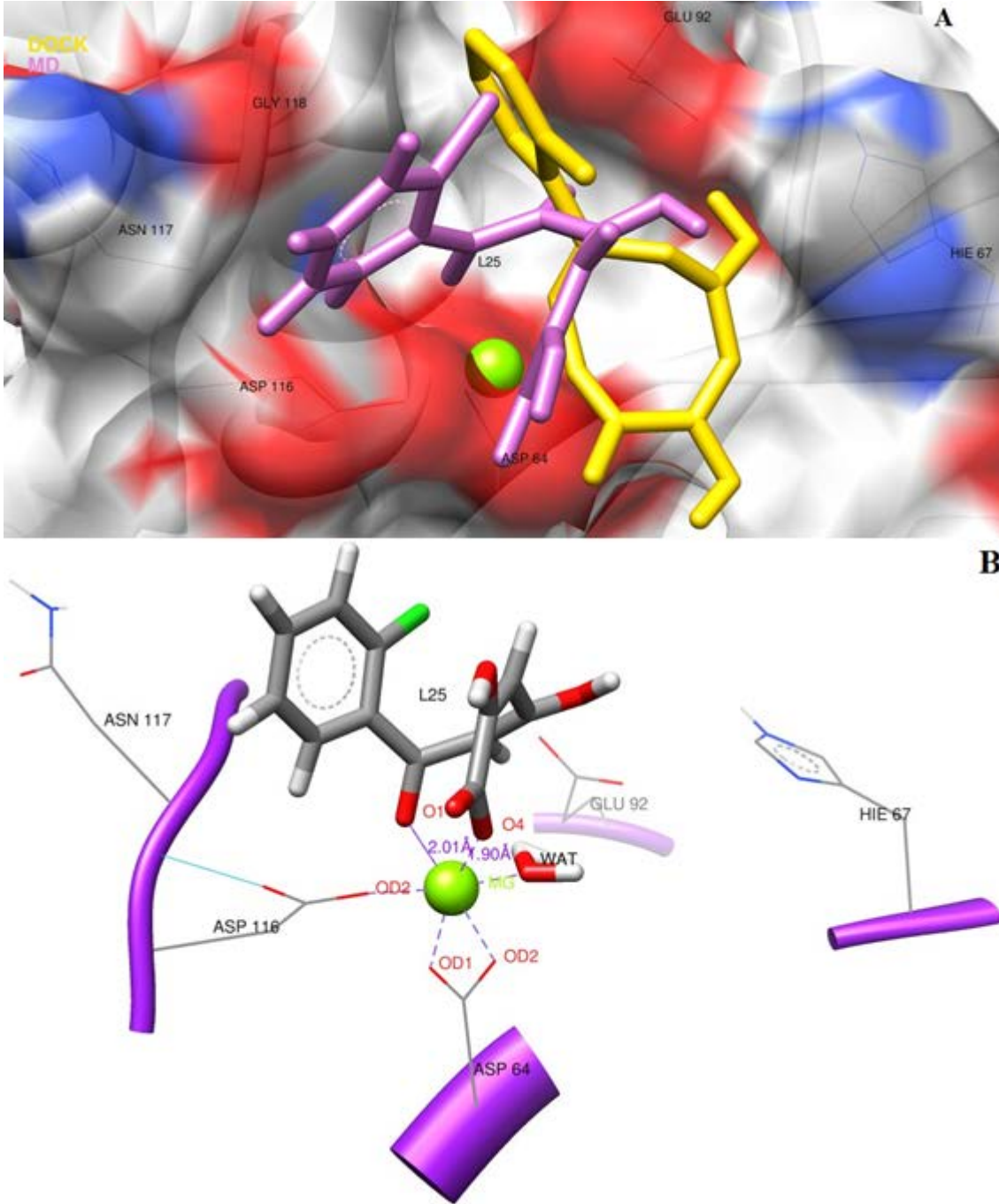
Şekil 4.162. L25 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.163. İntegrinin katalitik öz bölgesindeki (A: acom22.pdb, B: dcom22.pdb, C: acom25.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L22 O4, A5: Mg-L22 O5, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L22 O4, B5: Mg-L22 O5, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L25 O4, C5: Mg-L25 O5)

L25 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom25) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.164.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L25 ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O4 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligandın HIE67, GLU92, ASN117, GLY118 ve PHE121 ile van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim

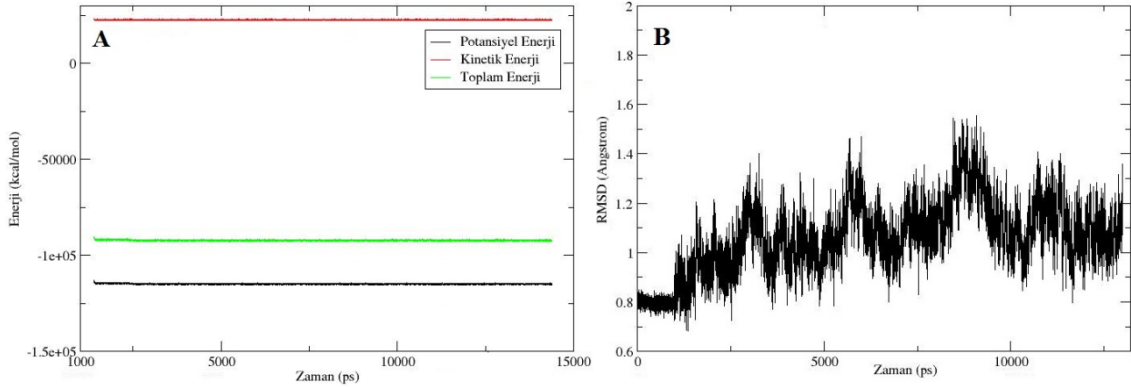
mesafeleri sırası ile 2.01 Å ve 1.90 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.96 Å ve 1.89 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.170.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.164. A) L25 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom25) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

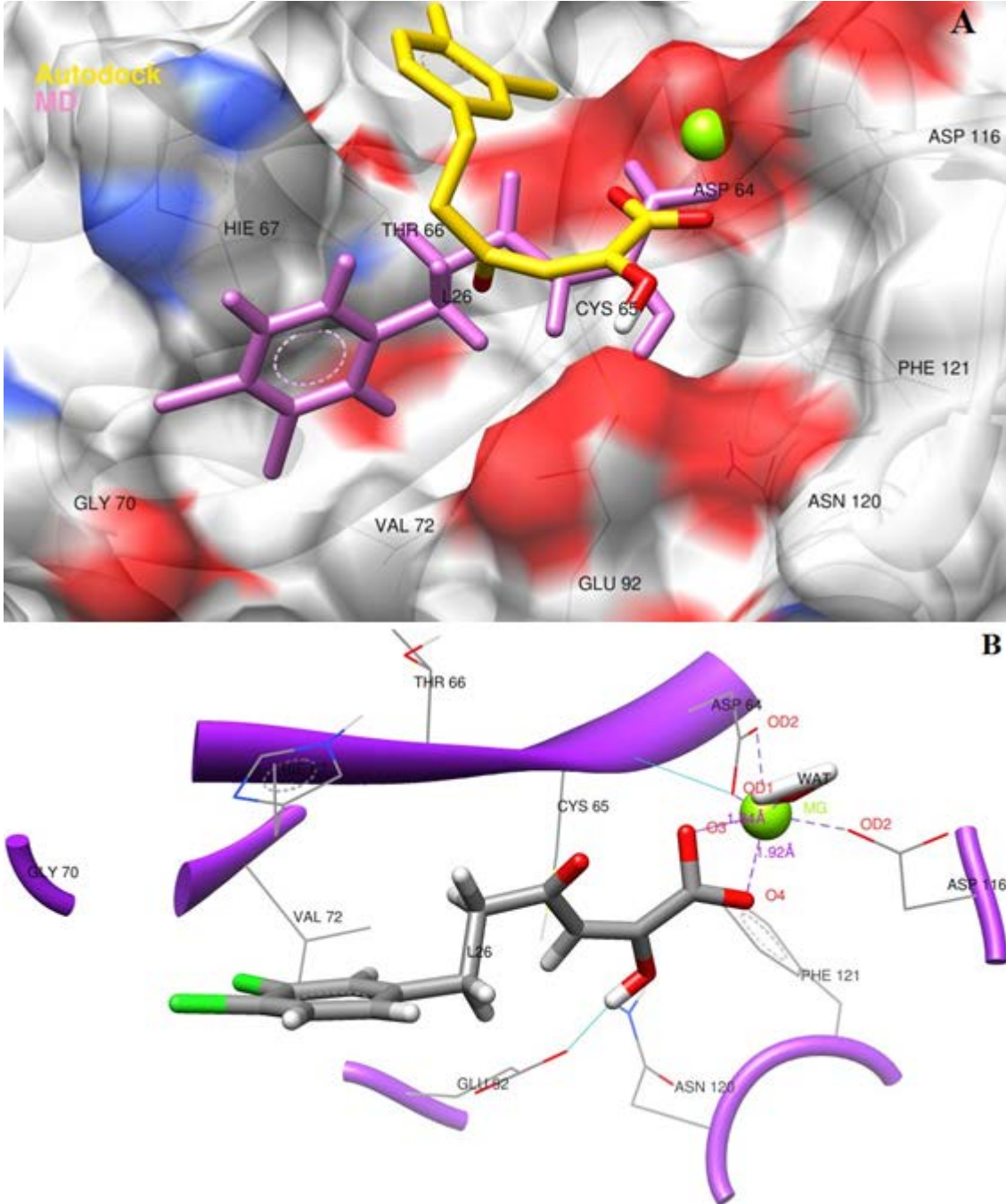
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.165.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.165. L25 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

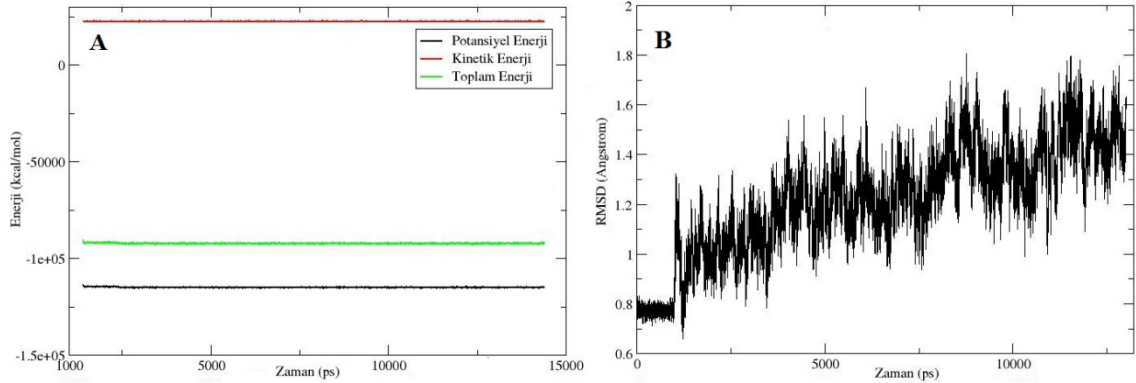
L26 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom26) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.166.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L26 ligandının konformasyonunun önemli ölçüde değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O3 oksijeni ile Mg atomu, ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Karboksilik uca komşu enol hidrojeni ile GLU92 kalıntısı arasında hidrojen bağı oluşmuştur. Ligandın protein kalıntıları CYS65, LYS71, VAL72 ve ASN120 ile polar, THR66 HIE67 ve PHE121 ile van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O3, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O3 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.84 Å ve 1.92 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.92 Å ve 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.170.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.166. A) L26 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acom26) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

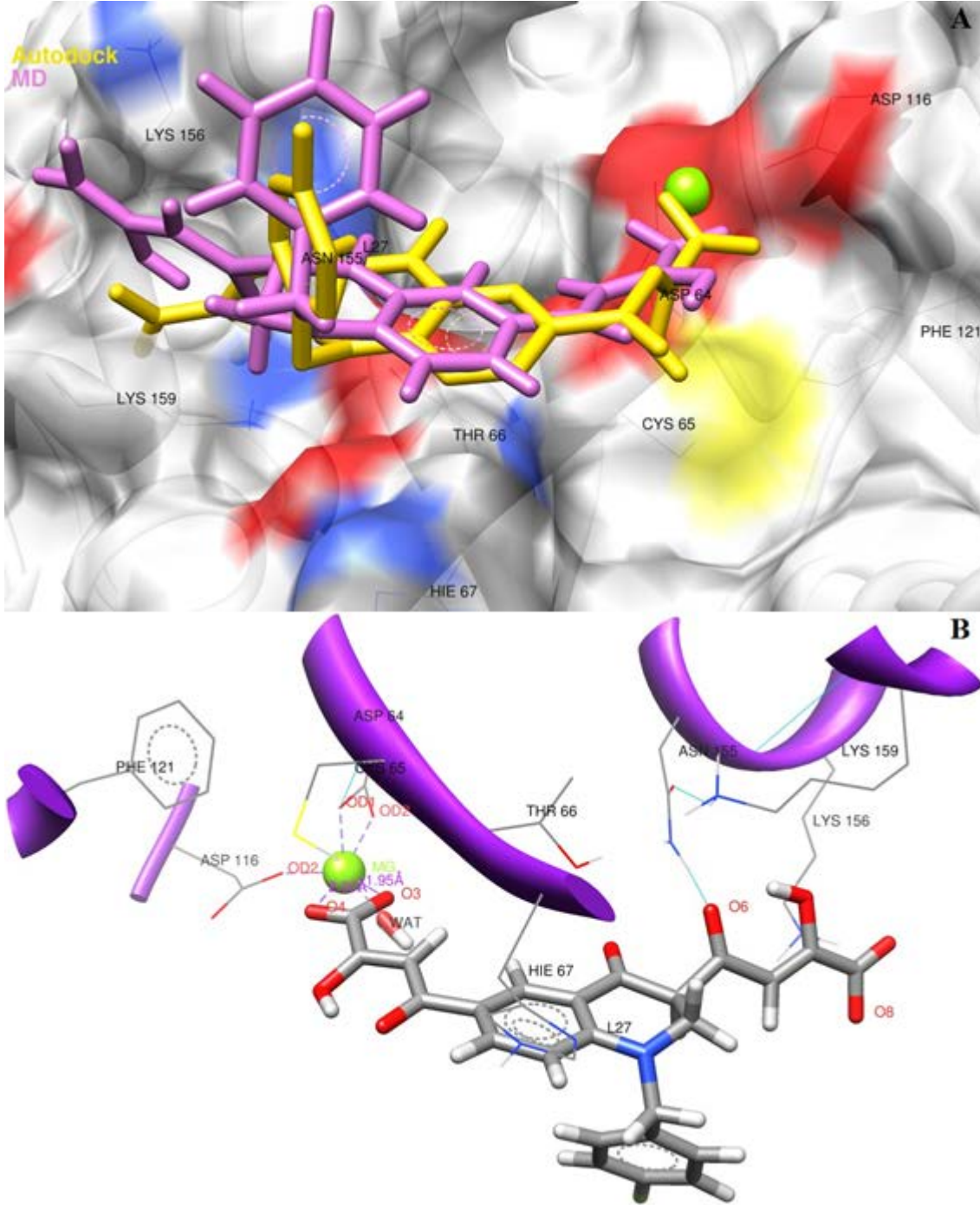
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.167.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.167. L26 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

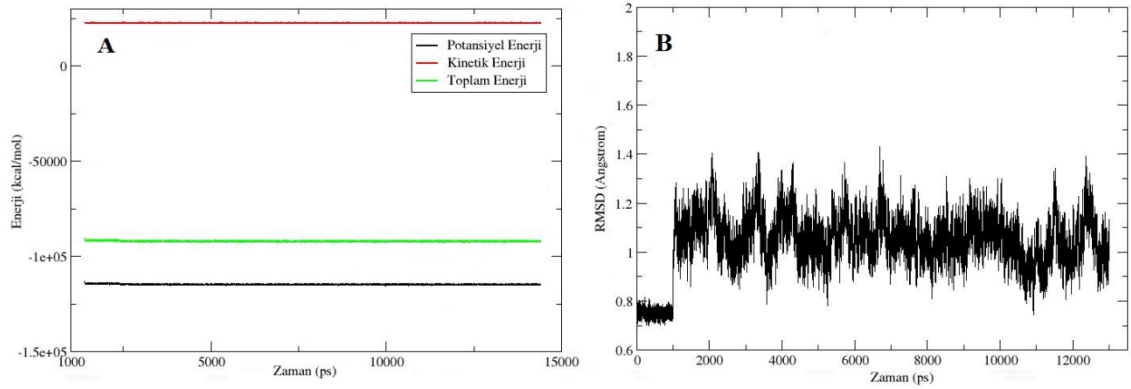
L27 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom27) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.168.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L27 ligandının konformasyonel değişikliğe uğradığı anlaşılmaktadır. Ligandın O4 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Aynı etkileşim O8 atomu ile LYS156 kalıntısı arasında da gerçekleşmiştir. Diğer taraftan tetralin halkasındaki aromatik benzen halka elektronları LYS159 ile π (+) etkileşimi meydana getirmişlerdir. Ligandın O6 atomu ile ASN155 arasında hidrojen bağı meydana gelmiştir. CYS65 ve THR66 ile polar, HIE67 ve PHE121 ile van der Waals etkileşimleri ligandın proteinle diğer etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O3, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O3 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.95 Å ve 2.00 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.97 Å ve 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.170.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



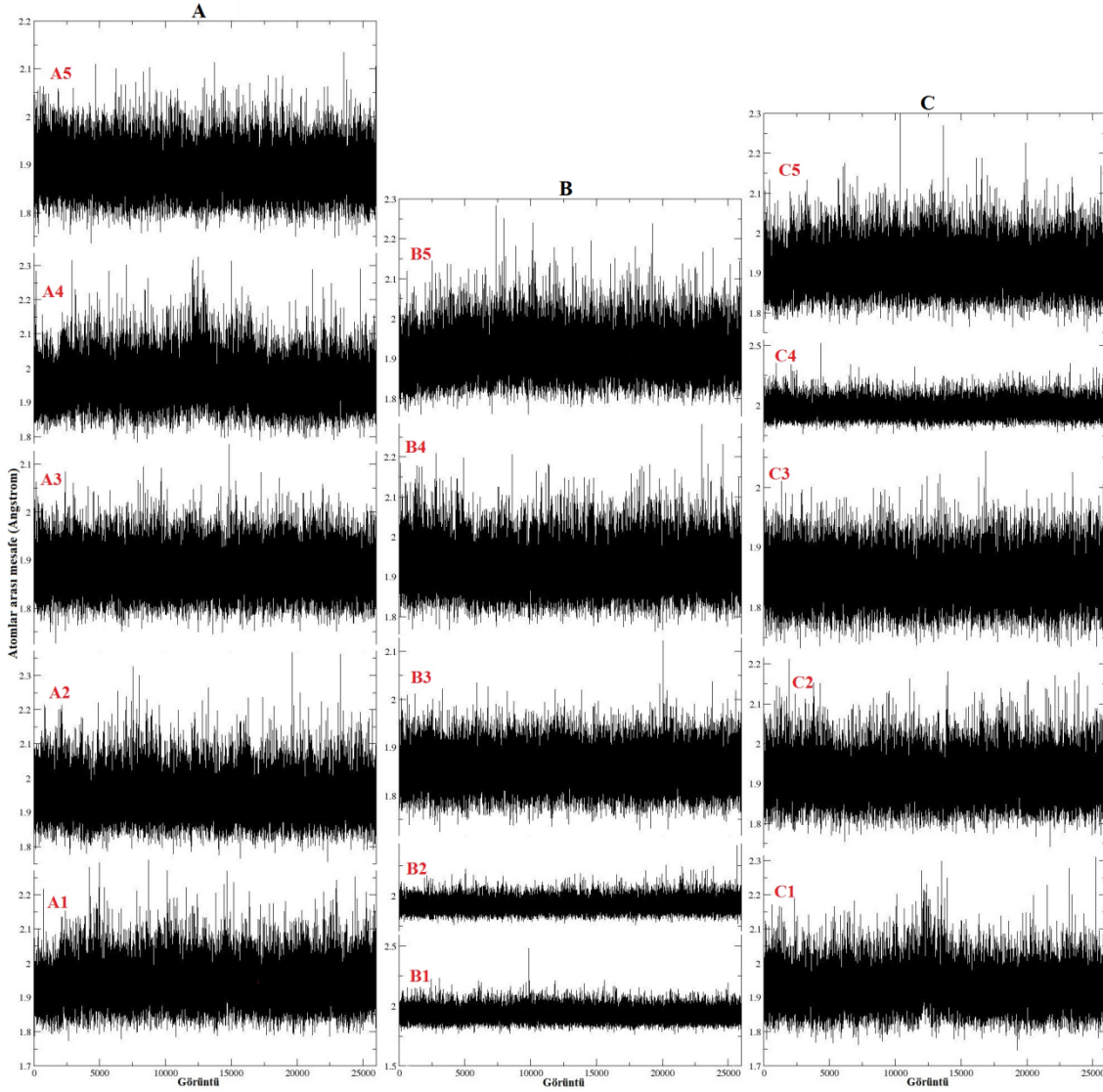
Şekil 4.168. A) L27 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom27) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.169.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



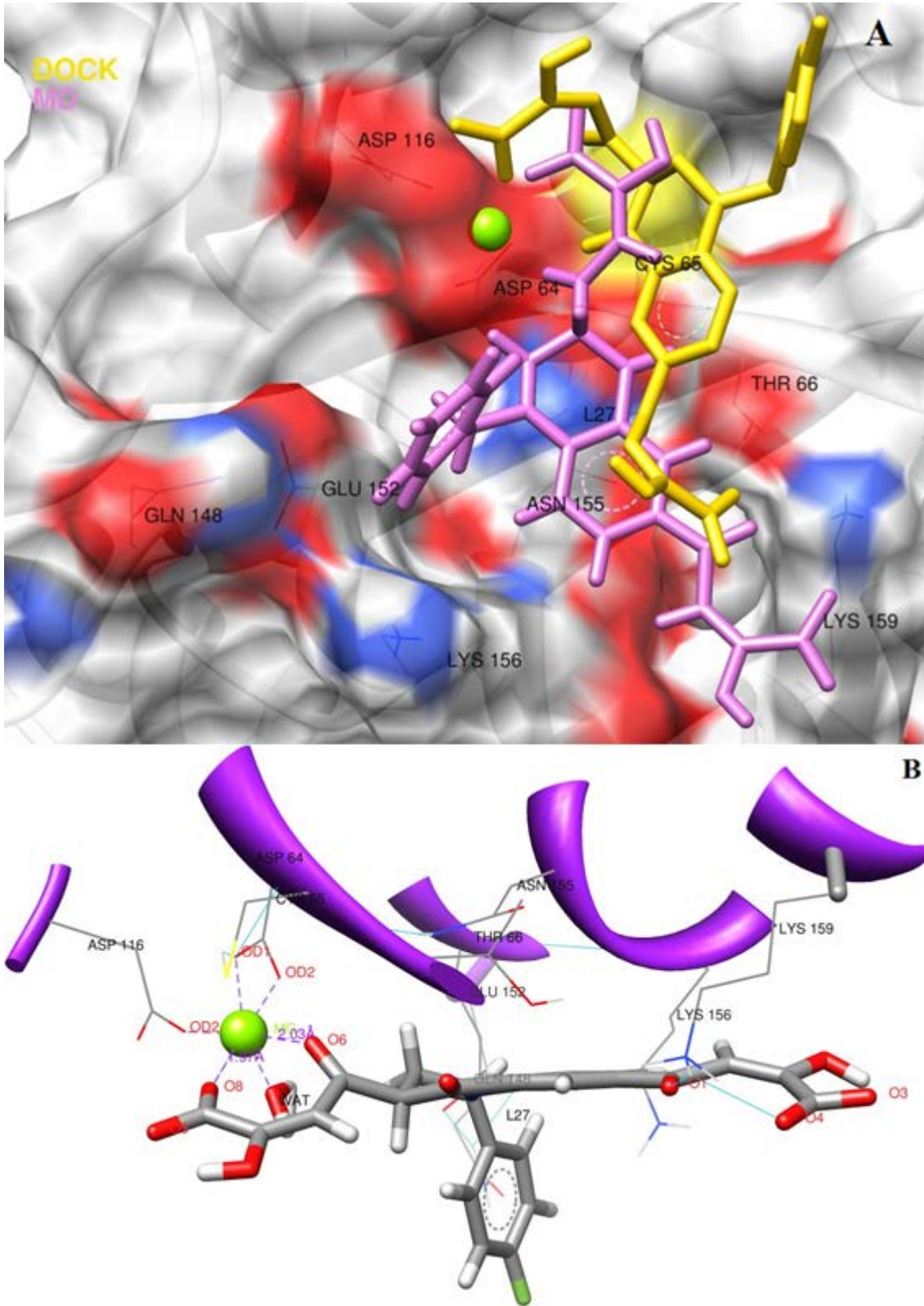
Şekil 4.169. L27 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.170. İntegrızın katalitik öz bölgesindeki (A: dcom25.pdb, B: acom26.pdb, C: acom27.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L25 O1, A5: Mg-L25 O4, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L26 O3, B5: Mg-L26 O4, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L27 O3, C5: Mg-L27 O4)

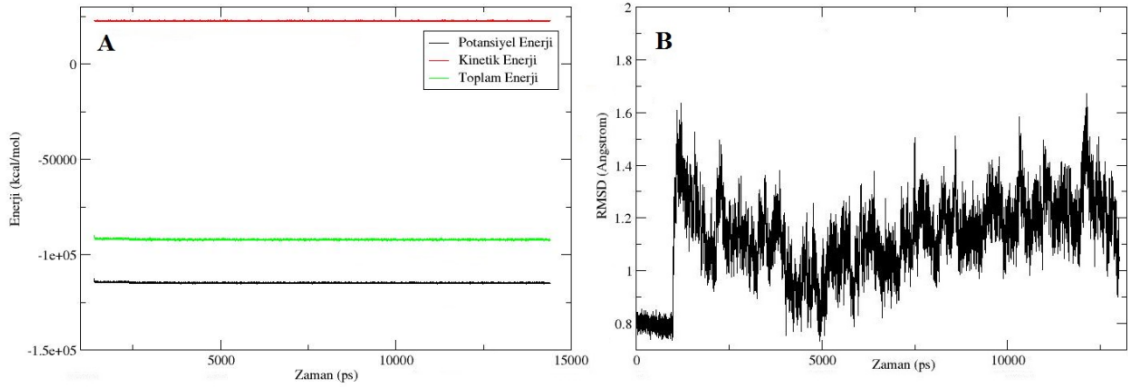
L27 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom27) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.171.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L27 ligandının konformasyonunda önemli değişiklikler olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın O9 oksijeni ile Mg atomu arasında ve O4 atomu ile LYS159 arasında yük etkileşimleri bulunmaktadır. LYS159 ile ligandın O1 ve O4 atomları arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. ASP64, CYS65, THR66, HIE67, GLU92, ASP116, ASN155, LYS156

ile polar, GLN148, GLU152 ile van der Waals etkileşimleri ligand ile protein arasındaki diğer etkileşimlerdir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O6, O8 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O6 ve O8 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 2.03 Å ve 1.97 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 2.00 Å ve 2.13 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.177.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



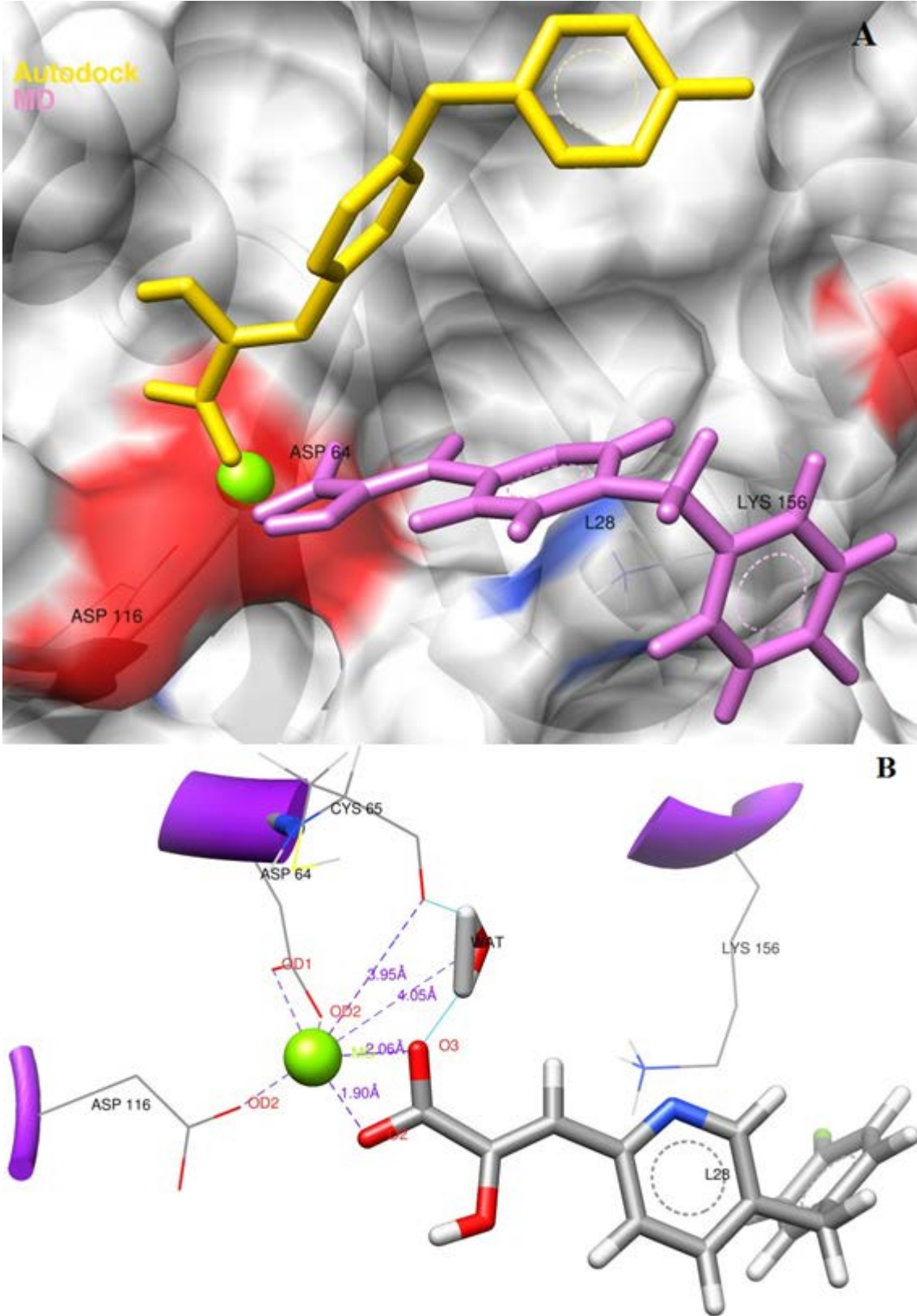
Şekil 4.171. A) L27 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom27) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.172.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



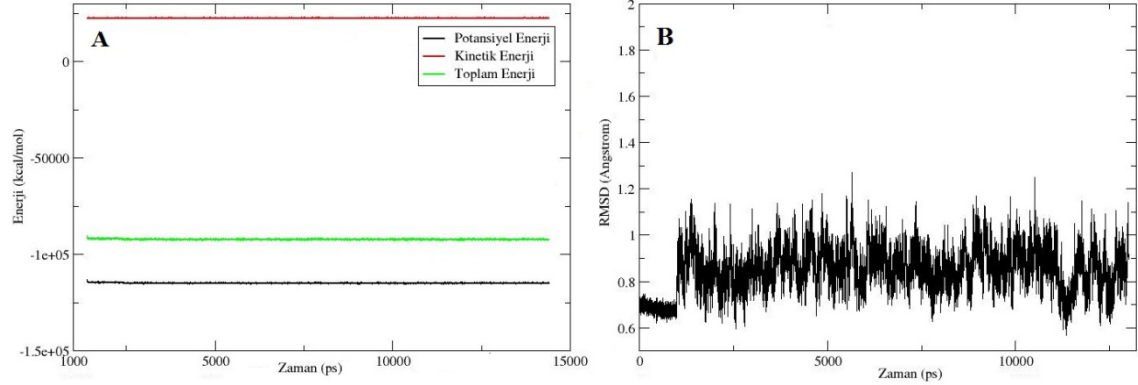
Şekil 4.172. L27 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L28 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom28) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.173.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L28 ligandının konformasyonunda ve yerleştiği bölgede önemli değişiklikler olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın O3 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ayrıca ligandın her iki aromatik halkası da LYS156 kalıntısı ile π (+) etkileşimi içindedir. Ligand aynı zamanda CYS65 ile polar, THR66 ile de van der Waals etkileşiminde bulunmuştur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O2, O3 atomları ve Z tane su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve O3 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.90 Å ve 2.06 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.93 Å ve 1.95 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.177'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



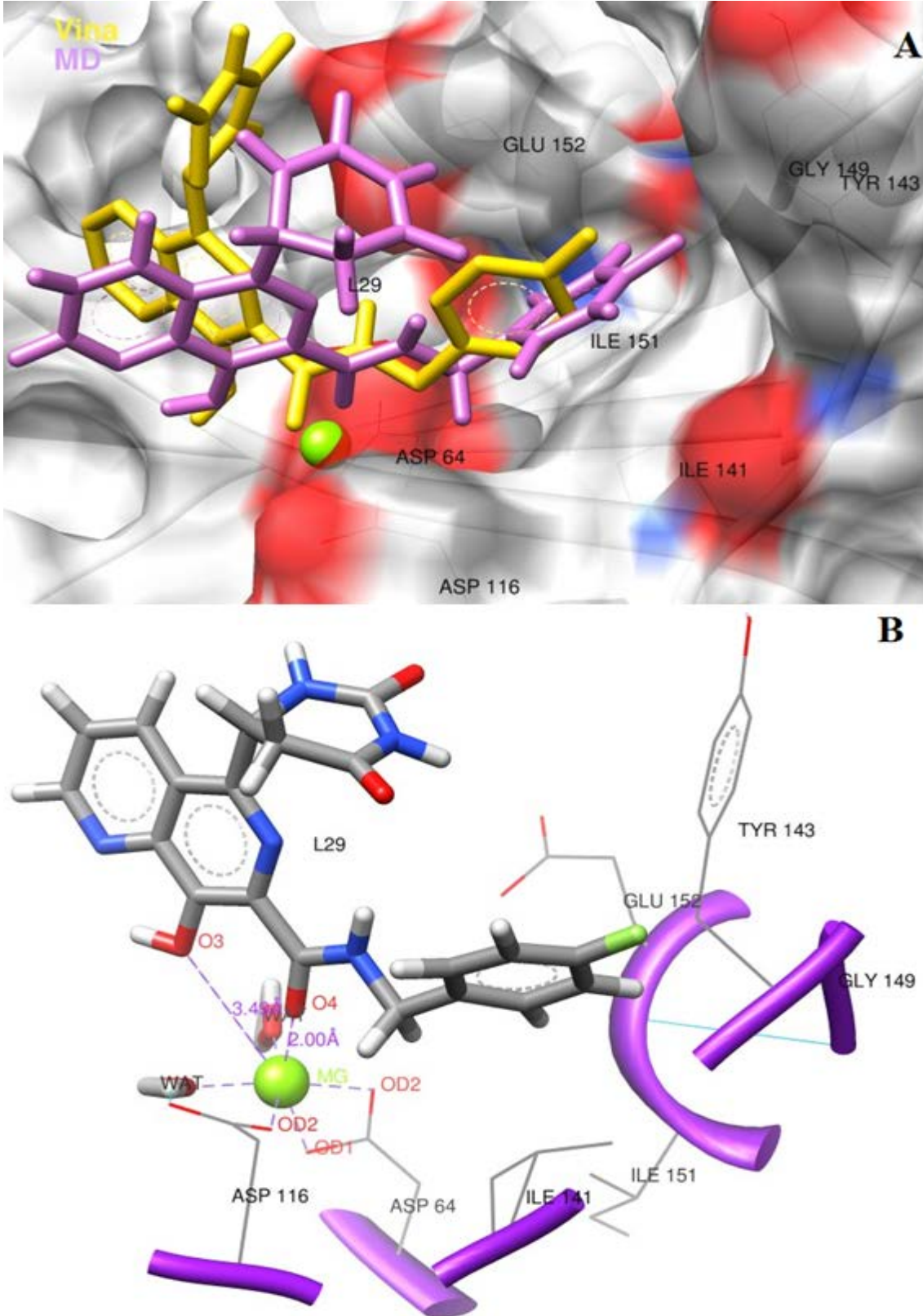
Şekil 4.173. A) L28 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acom28) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.174.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



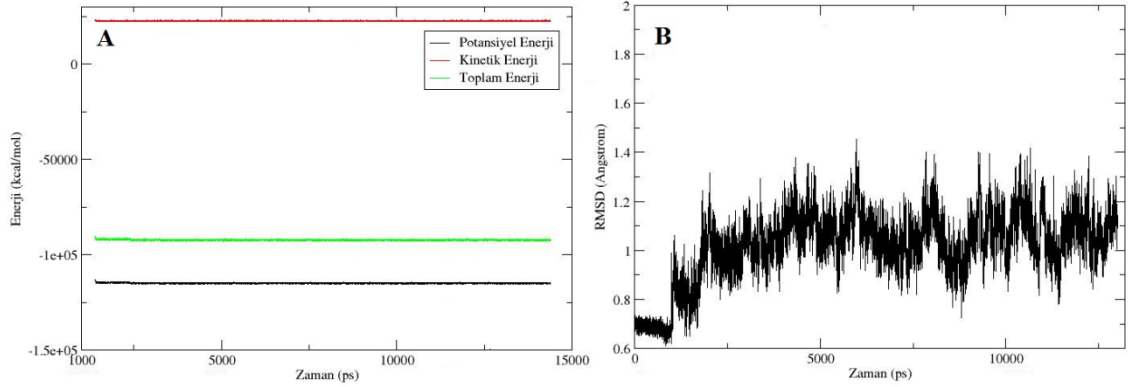
Şekil 4.174. L28 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L29 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom29) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.175.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L29 ligandının konformasyonunda küçük değişikliklerin olduğu anlaşılmaktadır. Ligand ile ASP64, ASP116, PRO142 ve GLY149 kalıntıları arasında polar, ILE141, TYR143, GLN148, ILE151 ve GLU152 kalıntıları arasında van der Waals etkileşimleri görülmektedir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O4 atomu ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O3 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 3.49 Å ve 2.00 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 3.67 Å ve 1.96 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.177.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

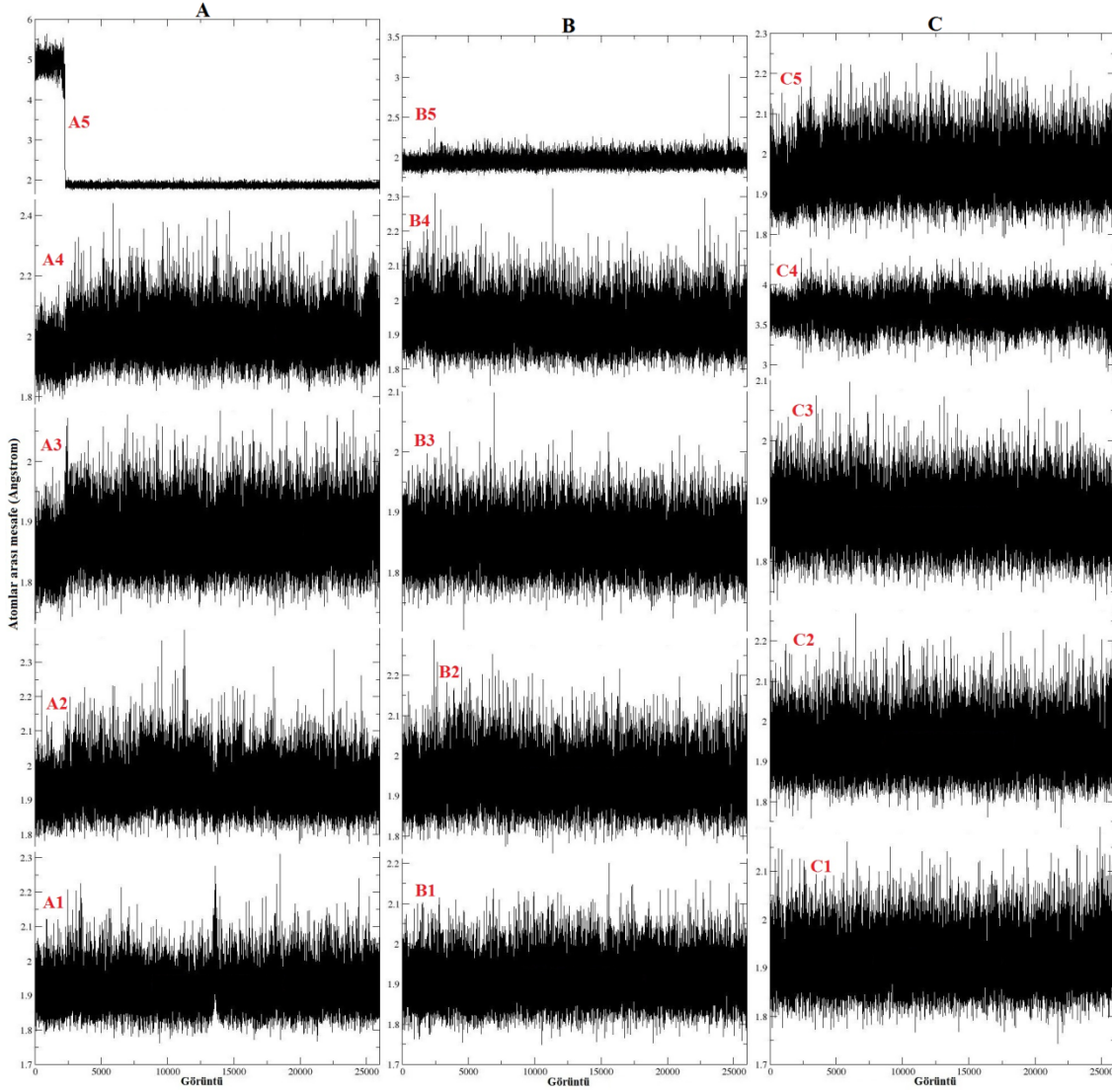


Şekil 4.175. A) L29 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcom29) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.176.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



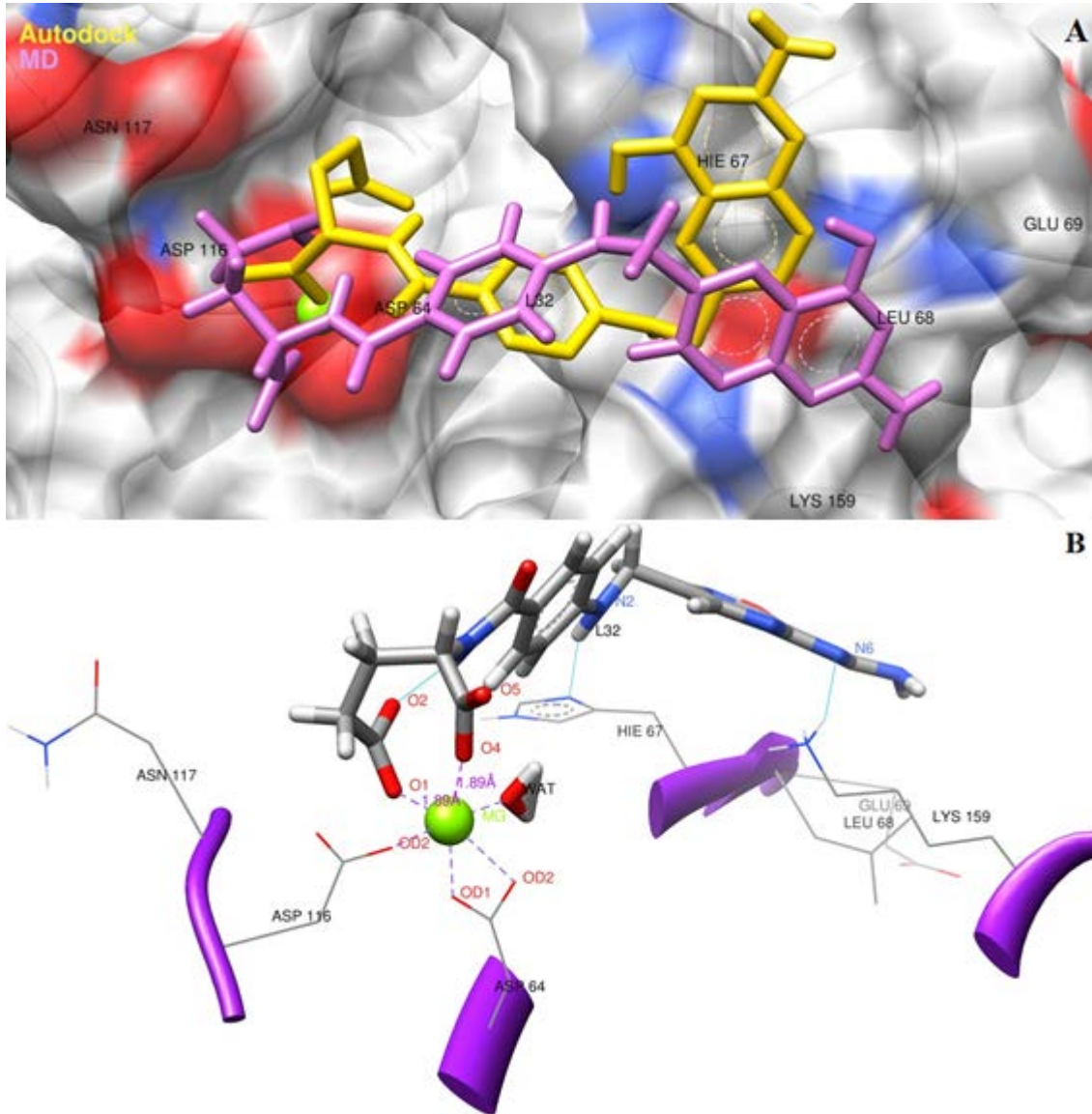
Şekil 4.176. L29 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.177. İntegrızın katalitik öz bölgesindeki (A: dcom27.pdb, B: acom28.pdb, C: vcom29.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L27 O6, A5: Mg-L27 O8, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L28 O2, B5: Mg-L28 O3, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L29 O3, C5: Mg-L29 O4)

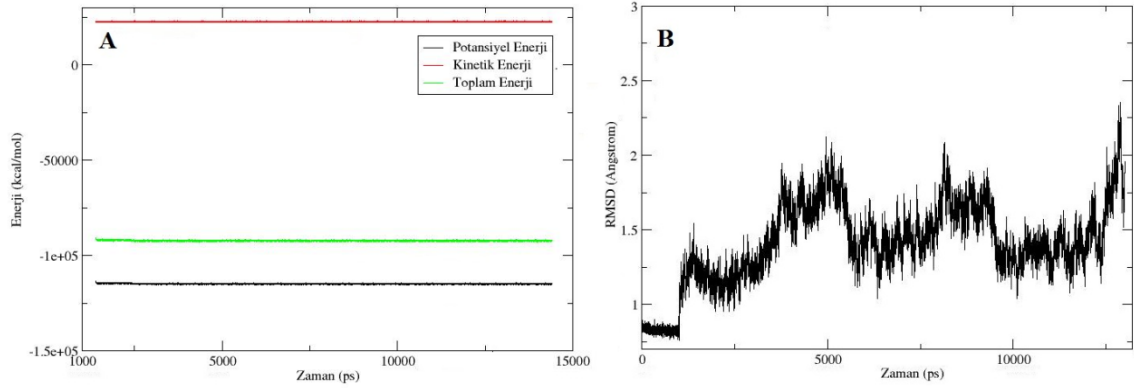
L32 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom32) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.178.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L32 ligandının konformasyonun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O1 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında ve O5 ile Mg atomu arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligandın N2 etiketli azot atomuna bağlı hidrojen atomu HIE67 ile, pteridin halkasındaki N5 etiketli azot atomu ise LYS159 hidrojen atomları ile hidrojen bağı yapmıştır. Ligand ayrıca GLU69 kalıntısı ile polar, THR66, LEU68, ASN117 ve

GLY118 kalıntıları ile van der Waals etkileşimlerinde bulunmuştur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O4 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O4 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri her iki atom çifti için 1.89 Å iken, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.85 Å ve 1.86 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.184.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



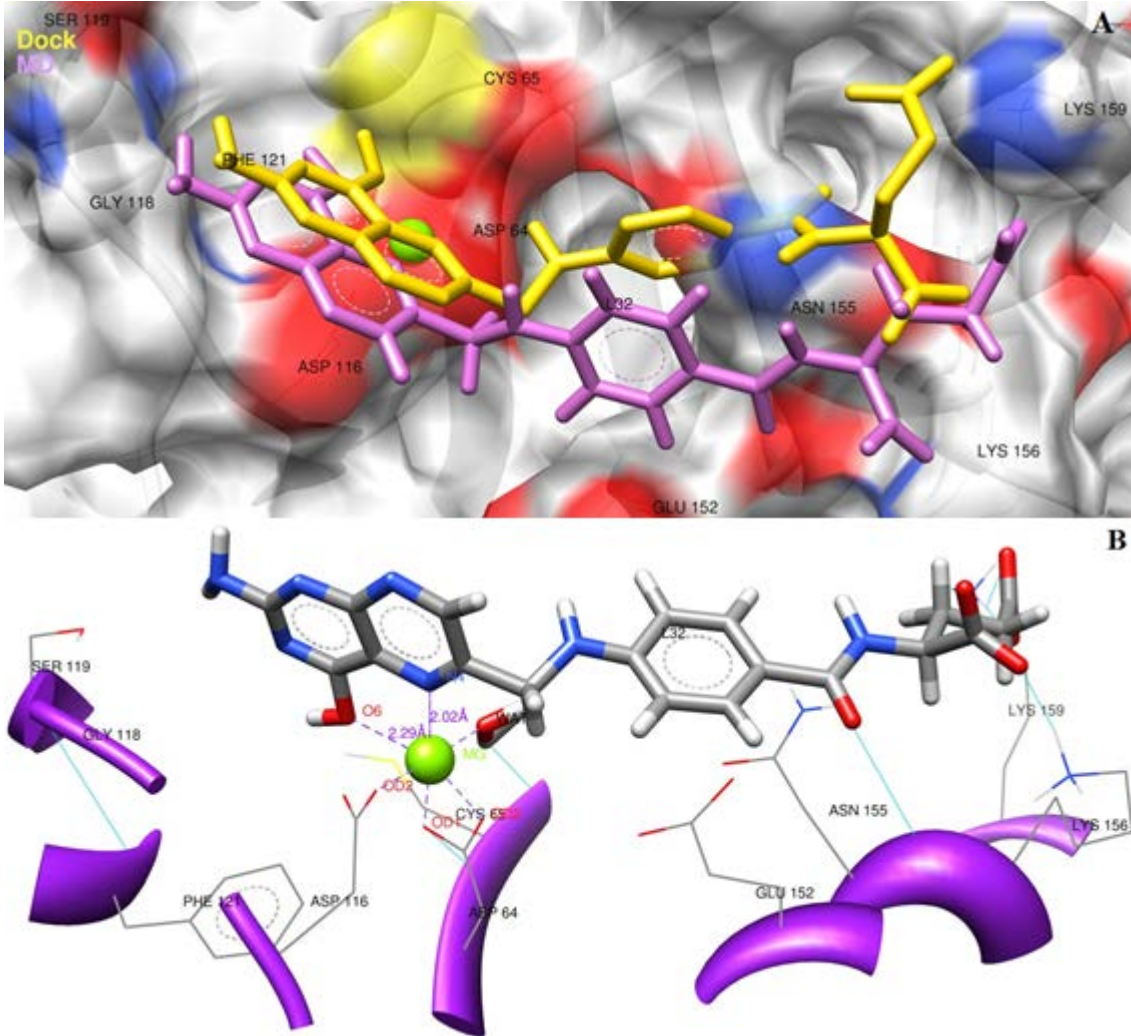
Şekil 4.178. A) L32 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acom32) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.179.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Yaklaşık 3-6 ns'ler ve 13 ns civarında olan yükselmeler proteinin hareketli bölgelerinden kaynaklanmaktadır. Simülasyonun sonuna doğru RMSD değerinin tekrar düşmeye başladığı görülmektedir.



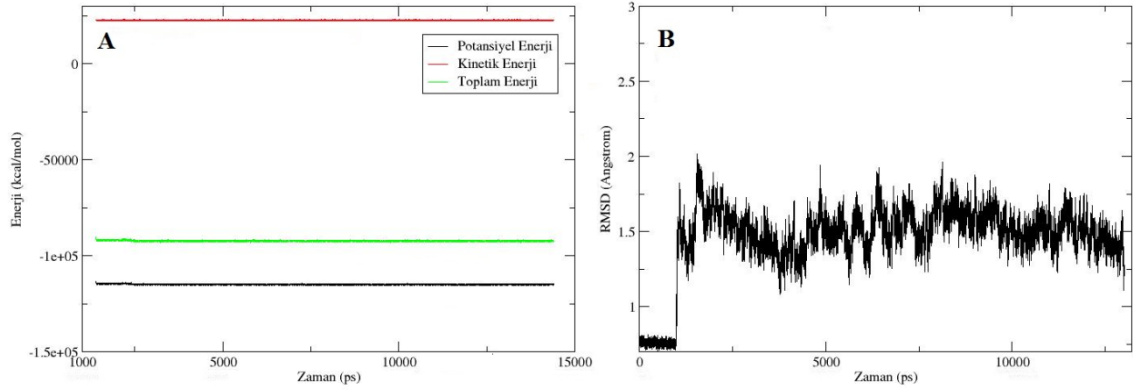
Şekil 4.179. L32 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L32 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom32) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.180.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L32 ligandının konformasyonunda büyük değişikliklerin gerçekleşmediği anlaşılmaktadır. Ligandın ASP64, CYS65, ASP116, SER119, ASN120, GLU152, LYS156 ve LYS159 kalıntıları ile polar, GLY118 ve PHE121 kalıntıları ile de van der Waals etkileşimlerinde bulunduğu görülmüştür. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın N4, O6 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın N4 ve O6 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 2.02 Å, 2.29 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 2.19 Å ve 2.20 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.184.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



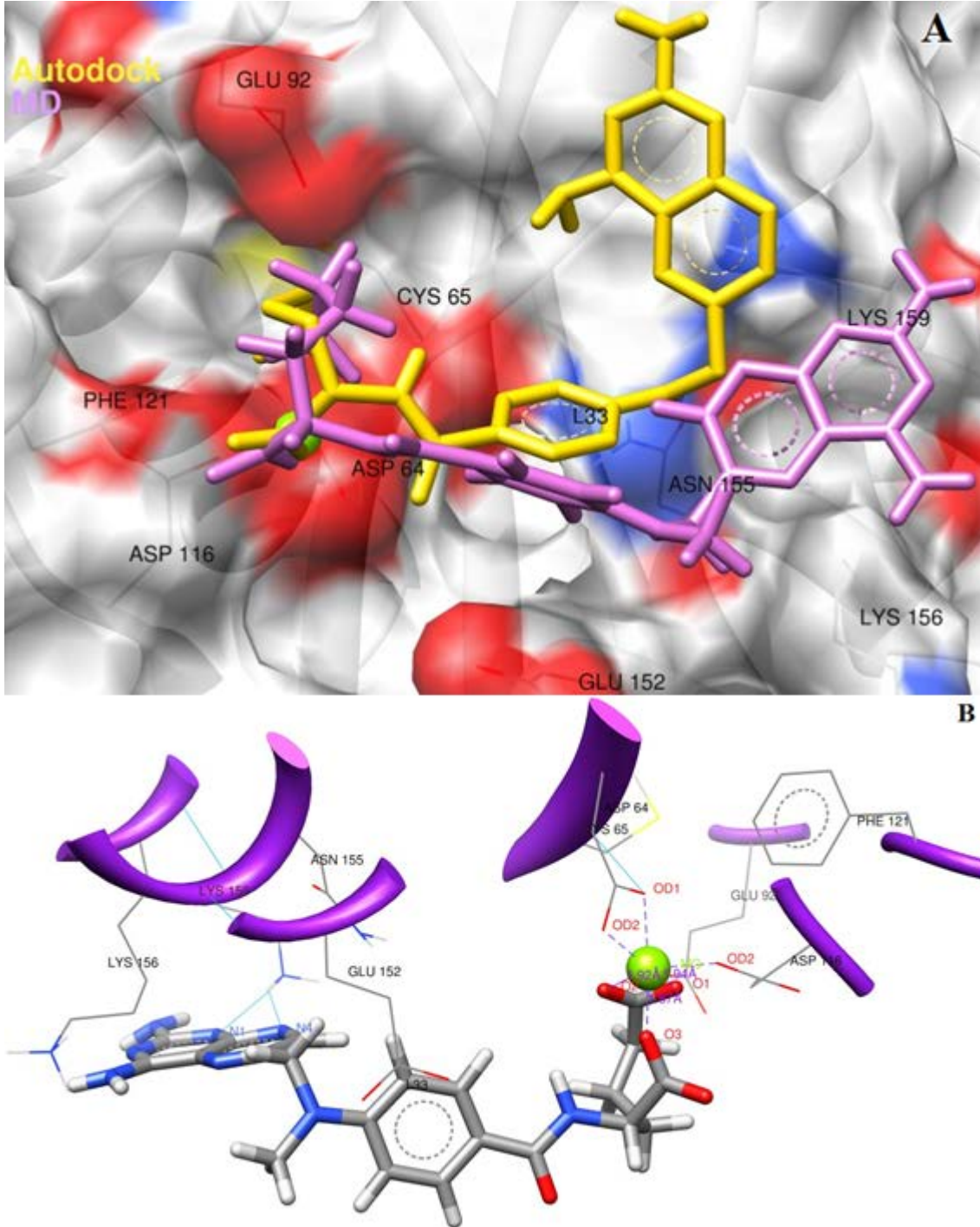
Şekil 4.180. A) L32 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom32) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.181.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.181. L32 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

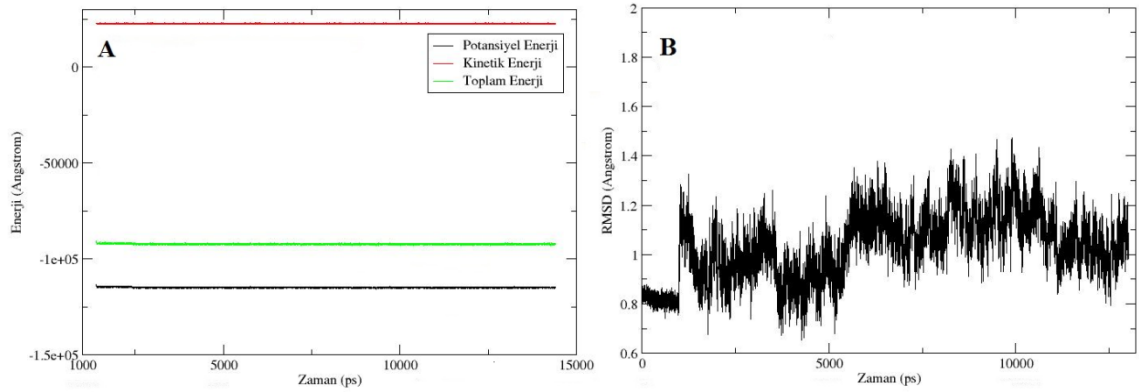
L33 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom33) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.182.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L33 ligandının konformasyonunun oldukça değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O3 oksijeni ile ASP116 kalıntısı arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligandın pteridin halkasındaki N1 ve N4 azot atomları ile LYS159 kalıntısı arasında iki hidrojen bağı bulunurken O1 atomu ile ASP64 ve ASP116 kalıntılarının ana zinciri ve ligandın O2 atomu ile ASP64 kalıntısının ana zinciri arasında hidrojen bağı meydana gelmiştir. Ligand ayrıca CYS65, GLU92 ve ASN155 ile polar, HIE67, PHE121, GLU152 ve LYS159 ile van der Waals etkileşimlerinde bulunmuştur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 ve O3 atomları ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1, O2 ve O3 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.94 Å, 1.92 Å ve 1.87 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.90 Å, 1.92 Å ve 1.86 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.184.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



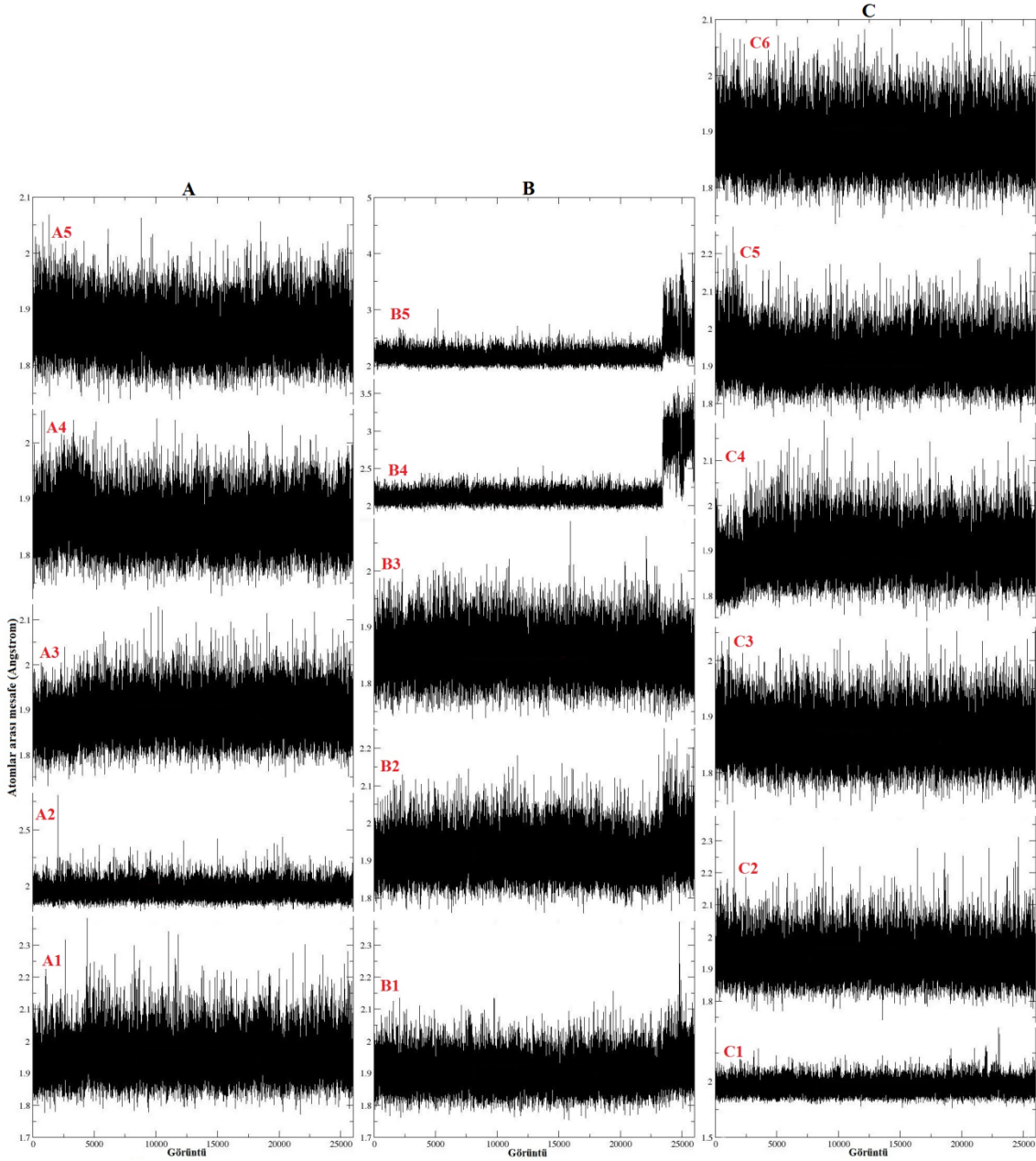
Şekil 4.182. A) L33 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acom33) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.183.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



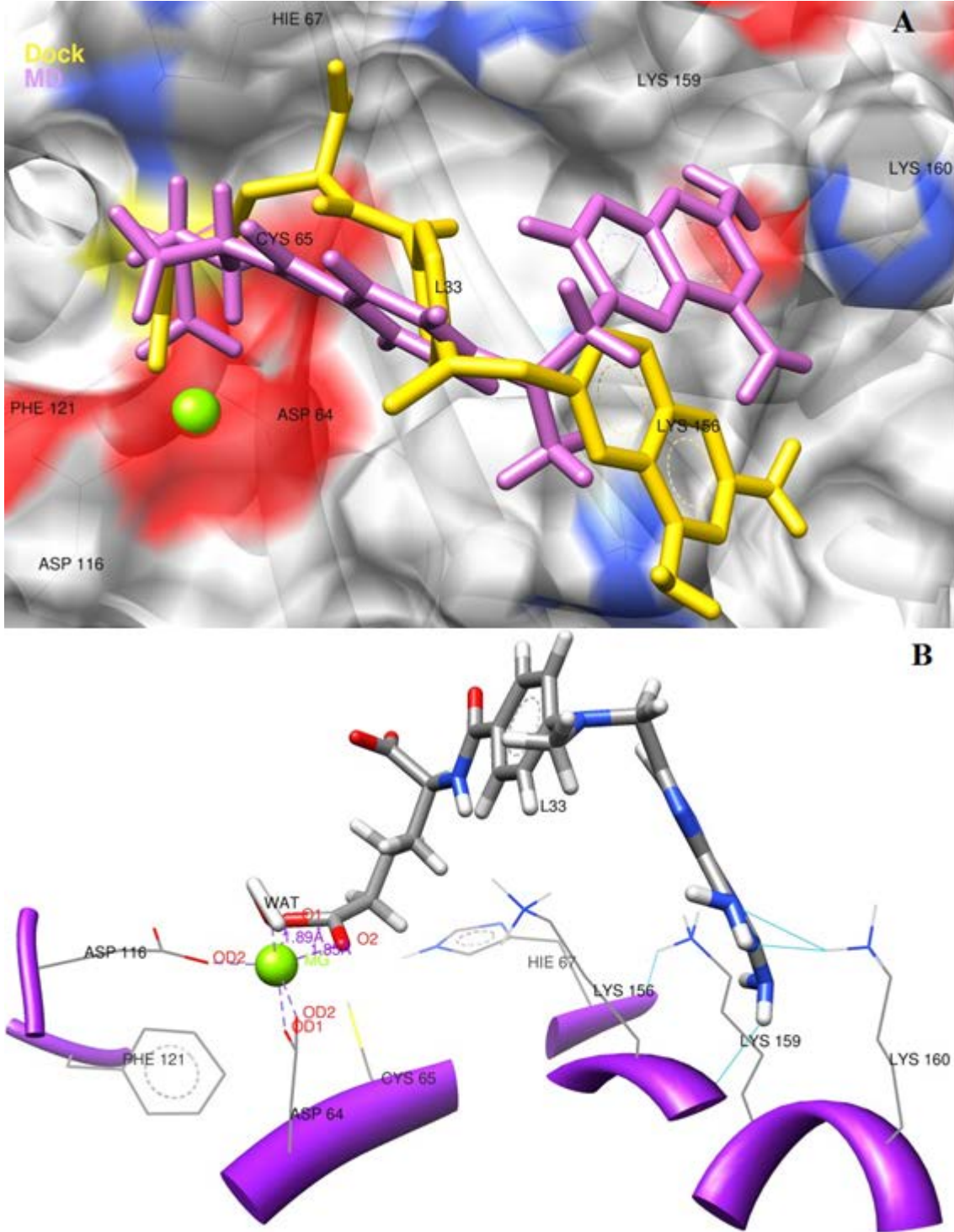
Şekil 4.183. L33 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.184. İntegrasyonun katalitik öz bölgesindeki (A: acom32.pdb, B: dcom32.pdb, C: acom33.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L32 O1, A5: Mg-L32 O4, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L32 N4, B5: Mg-L32 O6, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L33 O1, C5: Mg-L33 O2, C6: Mg-L33 O3)

L33 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom33) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.185.te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L33 ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O1 oksijeni ile

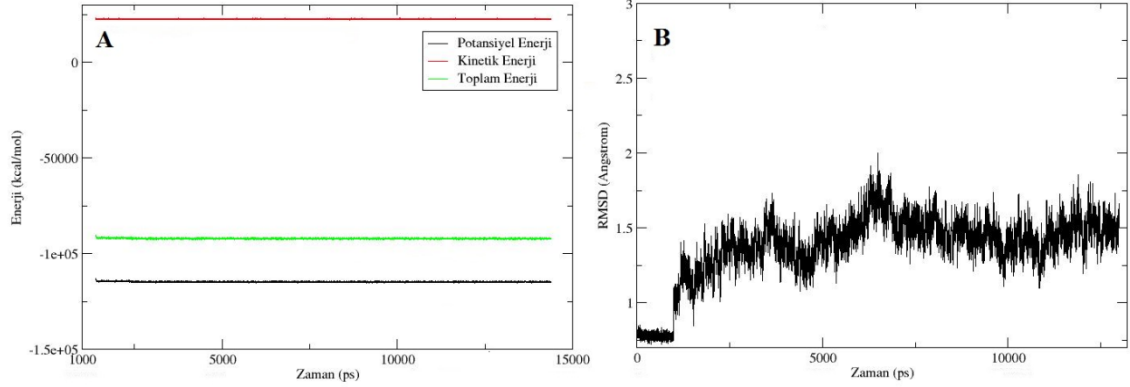
ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri bulunmaktadır. Ligandın pteridin halkası ile LYS156 ve LYS160 kalıntıları arasında hidrojen bağı meydana gelmiştir. Ligand ayrıca CYS65 ile polar, HIE67, PHE121, GLU152 ve LYS159 ile van der Waals etkileşimlerinde bulunmuştur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.89 Å ve 1.85 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.89 Å ve 1.90 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.191.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.185. A) L33 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom33) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.186.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan

kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.

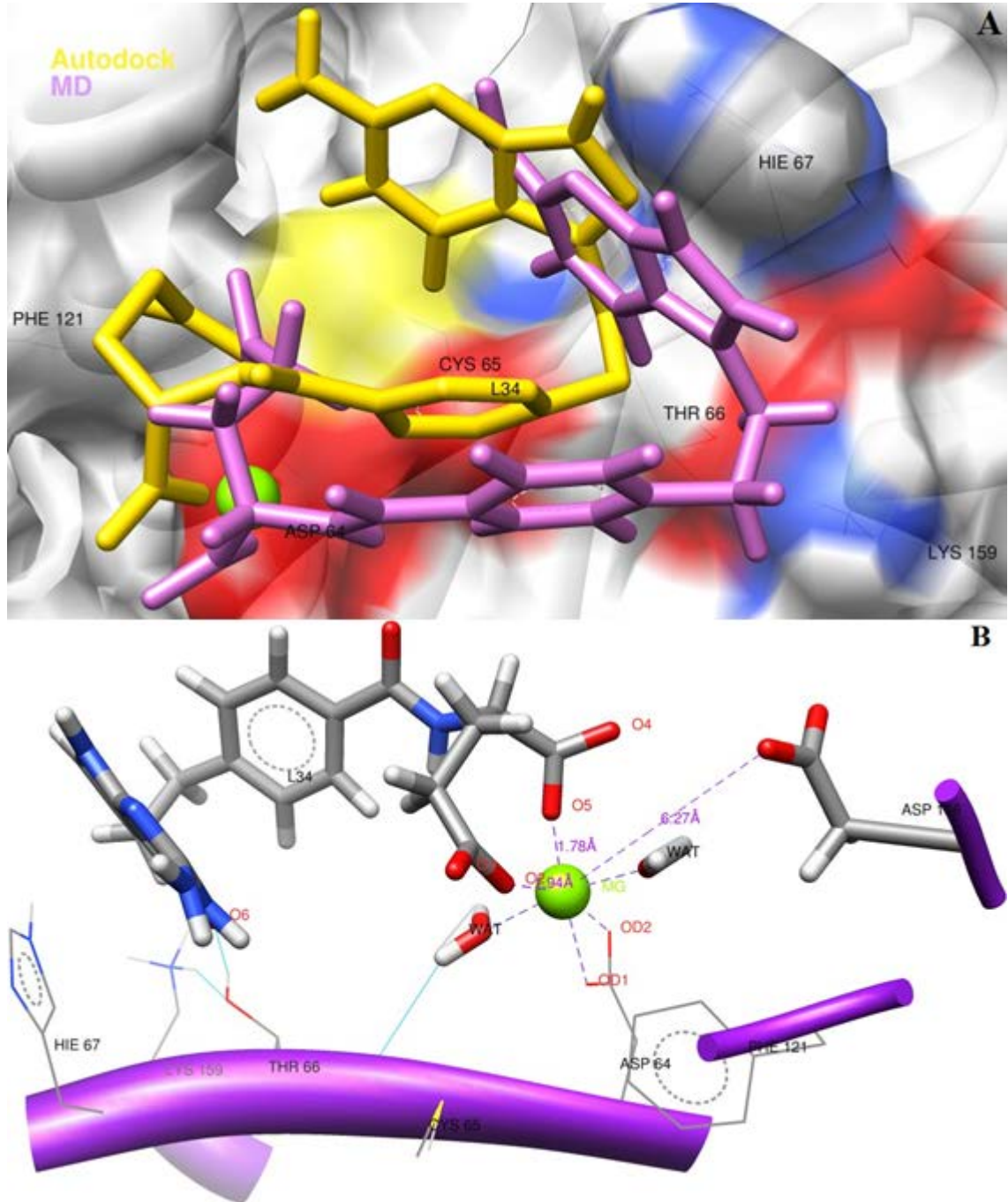


Şekil 4.186. L33 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L34 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom34) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.187.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L34 ligandının konformasyonunun fazla değişmediği anlaşılmaktadır. Ligandın O1 ve O4 oksijenleri ile Mg atomu arasında yük etkileşimleri bulunmaktadır. Ligandın pirol ve pirimidin halka elektronları ile HIE67 kalıntısı arasında π - π etkileşimi gerçekleşirken, pirimidin halkasındaki keton oksijeni ile THR arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. ASP64, CYS65, GLU152 ve LYS159 kalıntıları ile polar, PHE121 kalıntısı ile olan van der Waals etkileşimleri acom34.pdb ligandının gözlenen diğer etkileşimleridir. Mg atomu proteinin ASP64 OD1 ve OD2 atomları, ligandın O2, O5 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve O5 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.95 Å ve 1.78 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.84 Å ve 1.87 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.191.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Diğer komplekslerle karşılaştırıldığında acom34 kompleksinde önemli bir farklılık göze çarpmaktadır. Bütün komplekslerin katalitik bölgesinde Mg metaline

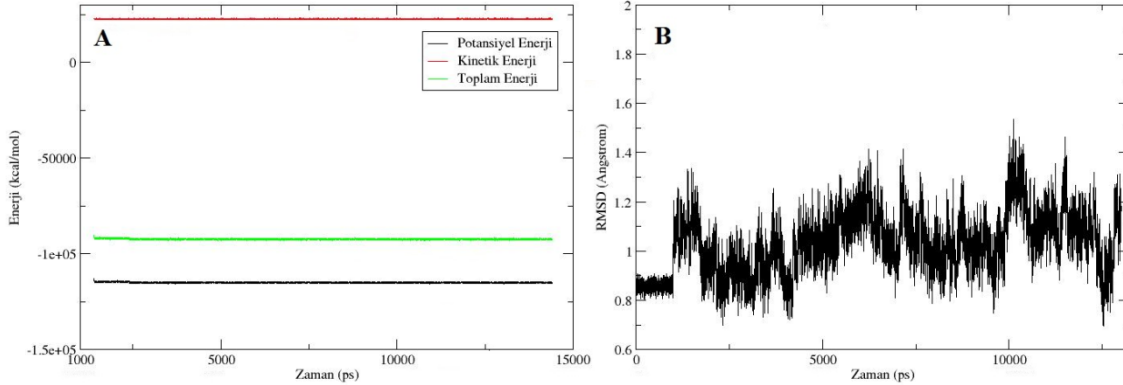
ASP64 ve ASP116 kalıntılarının en az bir karboksilik oksijenleri bağlanırken acom34.pdb kompleksinde ASP116 kalıntısı metalden uzaklaşmıştır. Autodock ile ligandın proteine yerleştirilmesiyle hazırlanan komplekste ASP116 OD1 ve OD2 atomları ile Mg atomu arasındaki mesafeler sırasıyla 3.39 Å ve 1.88 Å iken MD hesaplamaları süresince bu atom çiftleri arasındaki mesafelerin ortalaması sırasıyla 5.93 Å ve 6.41 Å olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.187. A) L34 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (acom34) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

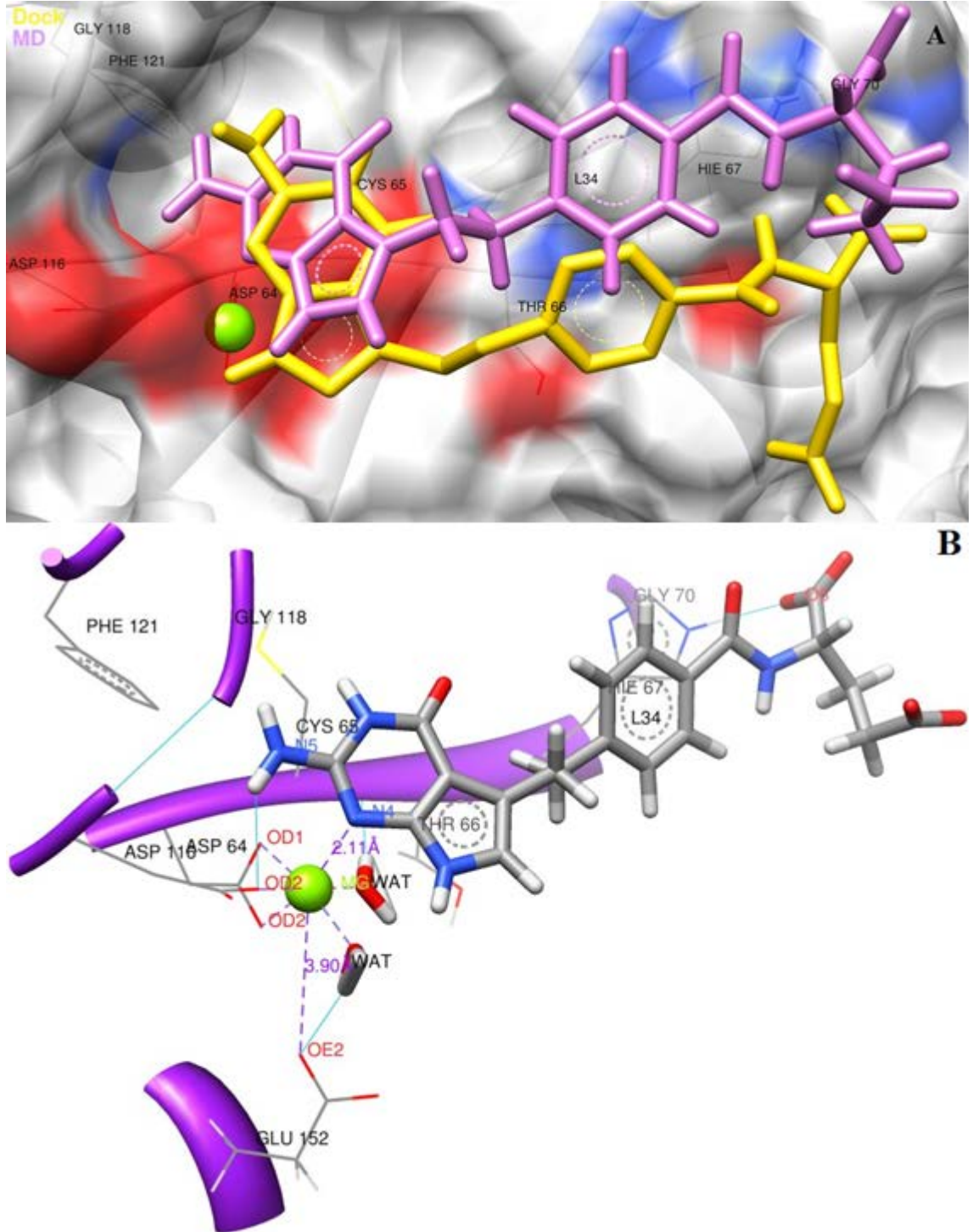
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.188.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.188. L34 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

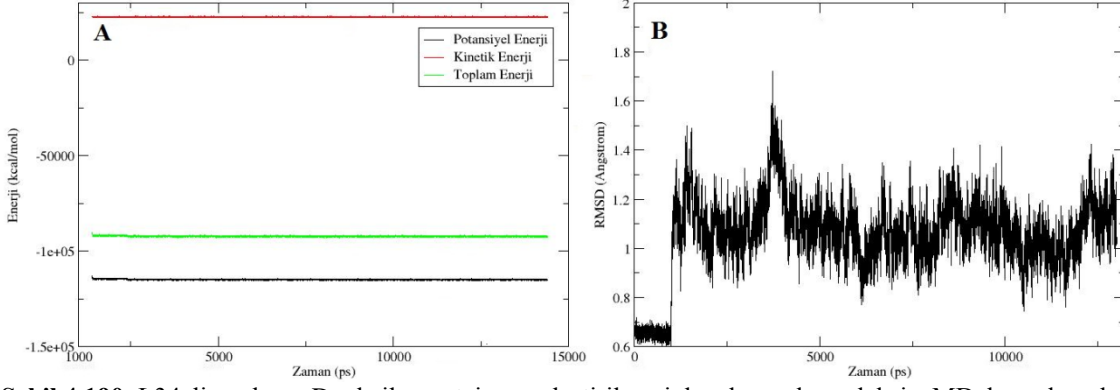
L34 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom34) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.189.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L34 ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın N5 etiketli azot atomuna bağlı hidrojen atomu ASP116 kalıntısı ile ve O5 atomu ise HIE67 kalıntısı ile hidrojen bağı oluştururken, ligandın fenil halkası ile HIE67 kalıntısının imidazol halkası arasında π - π örtüşmesi gerçekleşmiştir. Bunun yanında ligand ile ASP64, CYS65, HIE67, GLY70, GLU92, ASP116, GLY118 ve ASN120 kalıntıları arasında polar, THR66 ve PHE121 kalıntıları ile de van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın N4 atomu ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunurken, sadece bu yapıda meydana gelen Mg-GLU152 OE2 etkileşimi dikkat çekicidir. Ancak MD simülasyonu boyunca iki atom arasındaki mesafenin artarak ortalama 5.28 Å gibi bir değere ulaştığı kaydedilmiştir. En düşük enerjili dcom34.pdb kompleksinde Mg-N4 atomları arasındaki mesafe 2.11 Å olarak belirlenmiştir. MD simülasyonları süresince aynı atom çiftleri arasındaki ortalama mesafeler 2.23 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.191.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



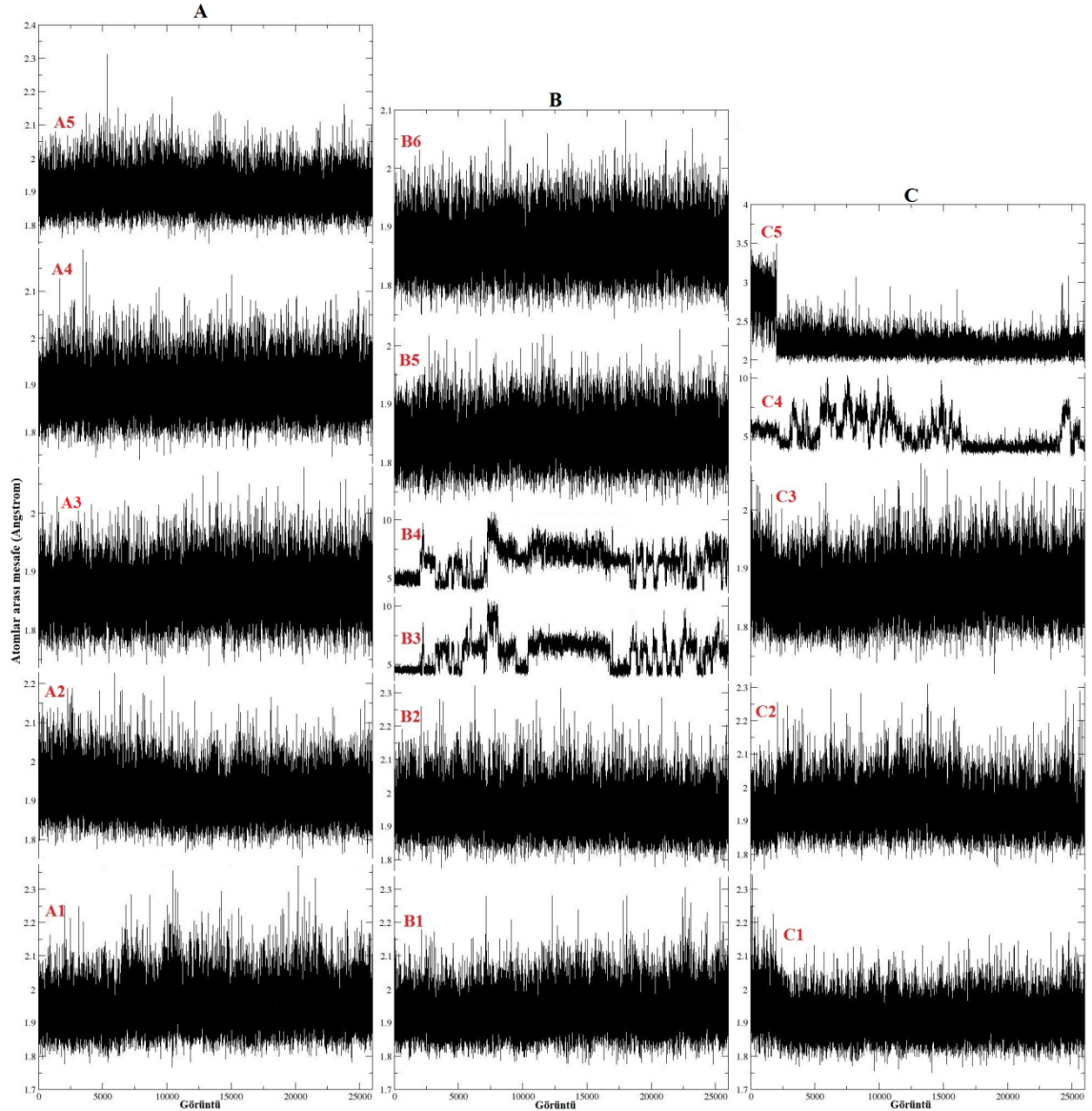
Şekil 4.189. A) L34 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom34) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.190.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan

kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



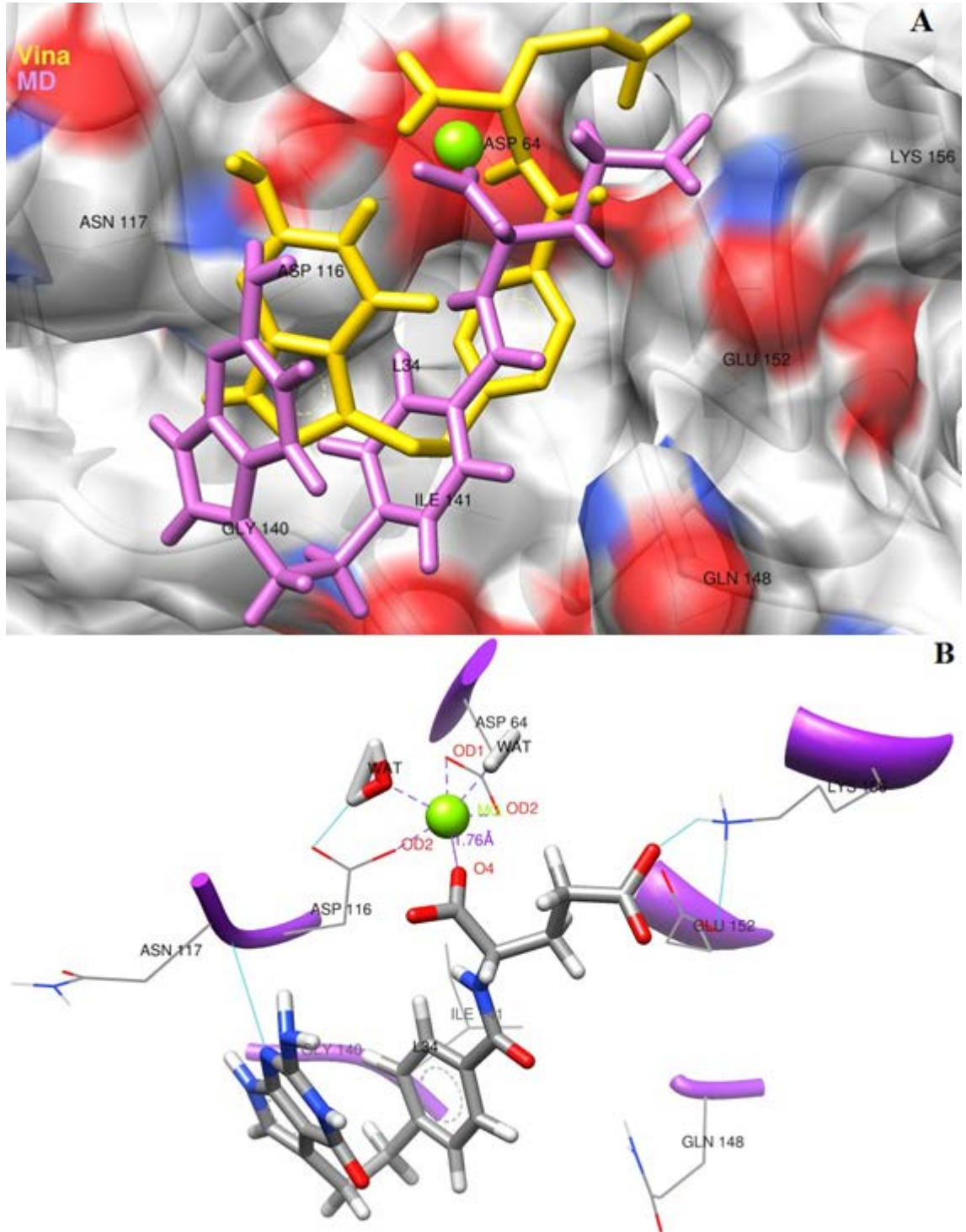
Şekil 4.190. L34 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.191. İntegrızın katalitik öz bölgesindeki (A: dcom33.pdb, B: acom34.pdb, C: dcom34.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: *Mg-ASP64 OD1*, A2: *Mg-ASP64 OD2*, A3: *Mg-ASP116 OD2*, A4: *Mg-L33 O1*, A5: *Mg-L33 O2*, B1: *Mg-ASP64 OD1*, B2: *Mg-ASP64 OD2*, B3: *Mg-ASP116 OD1*, B4: *Mg-ASP116 OD2*, B5: *Mg-L34 O2*, B6: *Mg-L34 O5*, C1: *Mg-ASP64 OD1*, C2: *Mg-ASP64 OD2*, C3: *Mg-ASP116 OD2*, C4: *Mg-GLU152 OE2*, C5: *Mg-L34 N4*)

L34 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom34) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.192.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L34 ligandının konformasyonunda değişikliklerin olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın O5 oksijeni ile ASP116 kalıntısı arasında yük etkileşimleri bulunmaktadır. Ligandın diğer etkileşimleri arasında ASN117 ile hidrojen bağı, ASP64, THR115, PHE139, GLN148,

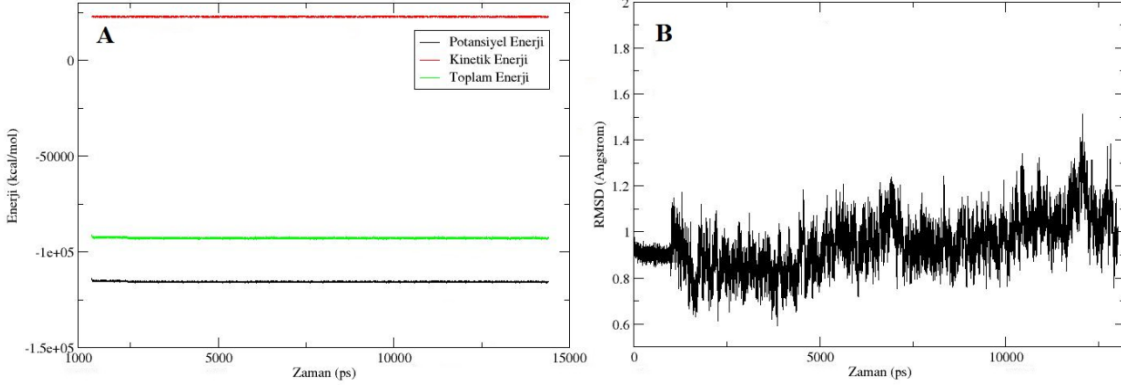
GLU152 ve LYS156 kalıntıları ile polar etkileşimler ve son olarak GLY140 ve ILE141 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri gösterilebilir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O4 atomu ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4 atomu ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafesi 1.76 Å, MD simülasyonu süresince bu mesafenin ortalaması 1.83 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.200.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.192. A) L34 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcom34) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

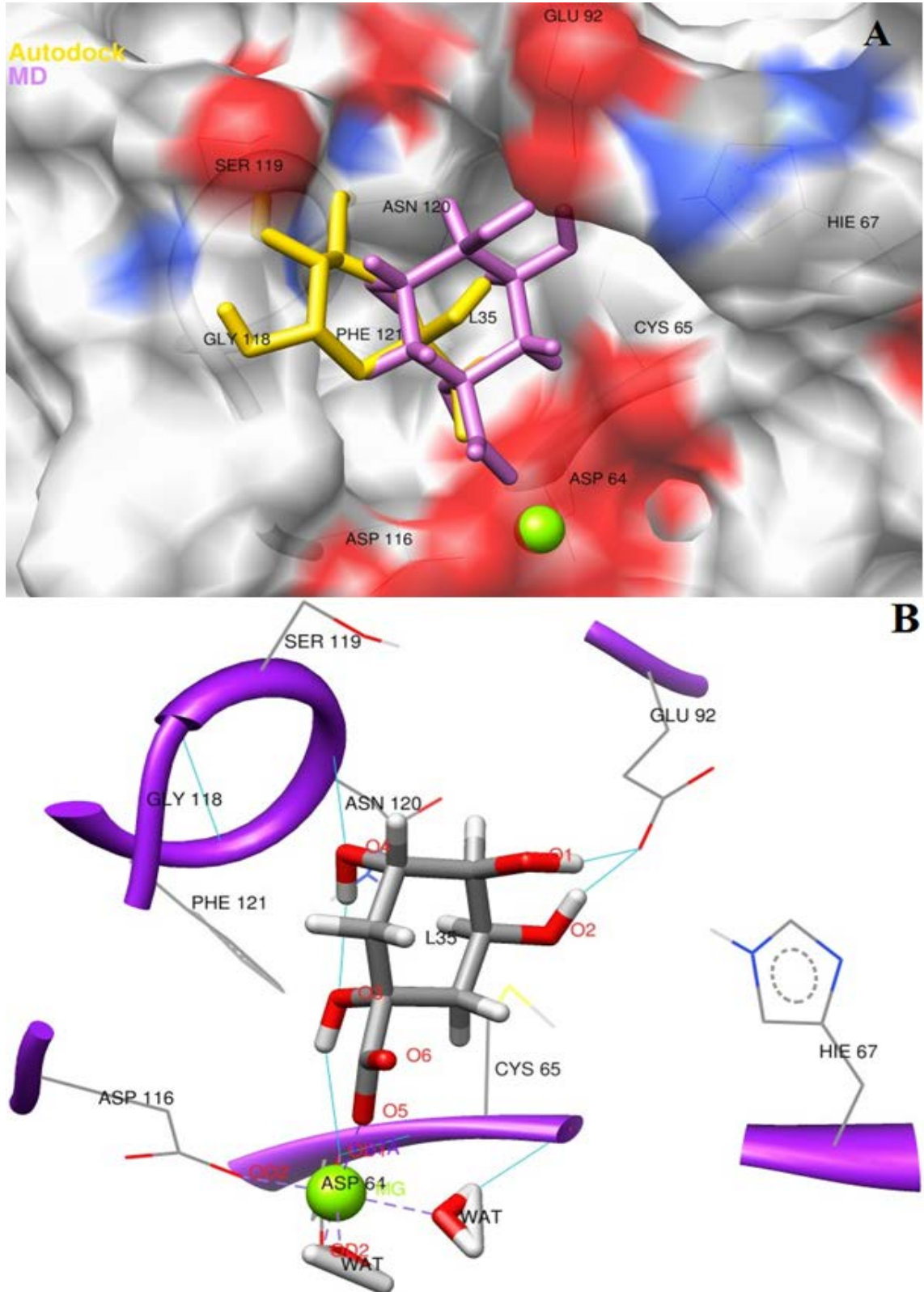
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.193.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan

kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin biraz yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



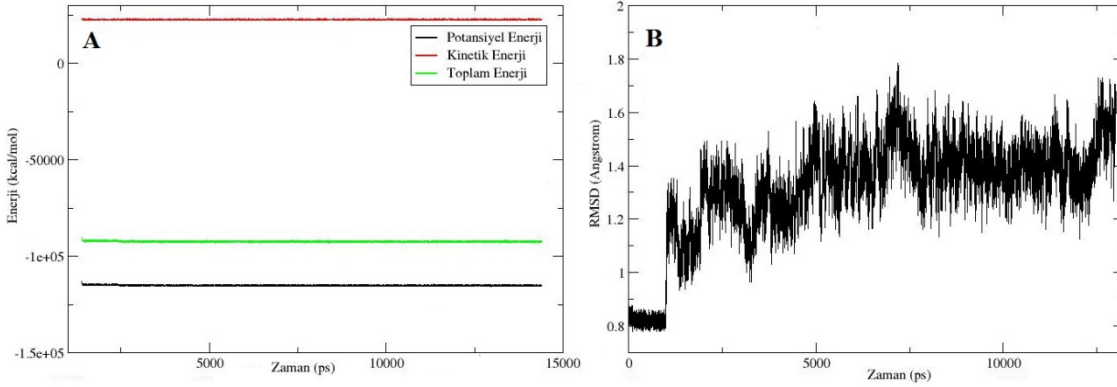
Şekil 4.193. L34 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L35 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acom35) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.194.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L35 ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O1 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligandın O3 oksijenine bağlı hidrojen atomu ile ASP64, O4 oksijenine bağlı hidrojen ile ASN120, O1 ve O2 oksijenlerine bağlı hidrojenler ile GLU92 kalıntısı arasında hidrojen bağları oluşmuştur. CYS65, HIE67, GLY118, SER119 ve PHE 121 ile polar etkileşimler, ASN117 ile van der Waals etkileşimi ligandın diğer etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O5 atomu ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Mg-O5 atomları arasındaki mesafe 1.87 Å iken, MD simülasyonları süresince aynı atom çiftleri arasındaki ortalama mesafe 1.88 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.200.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



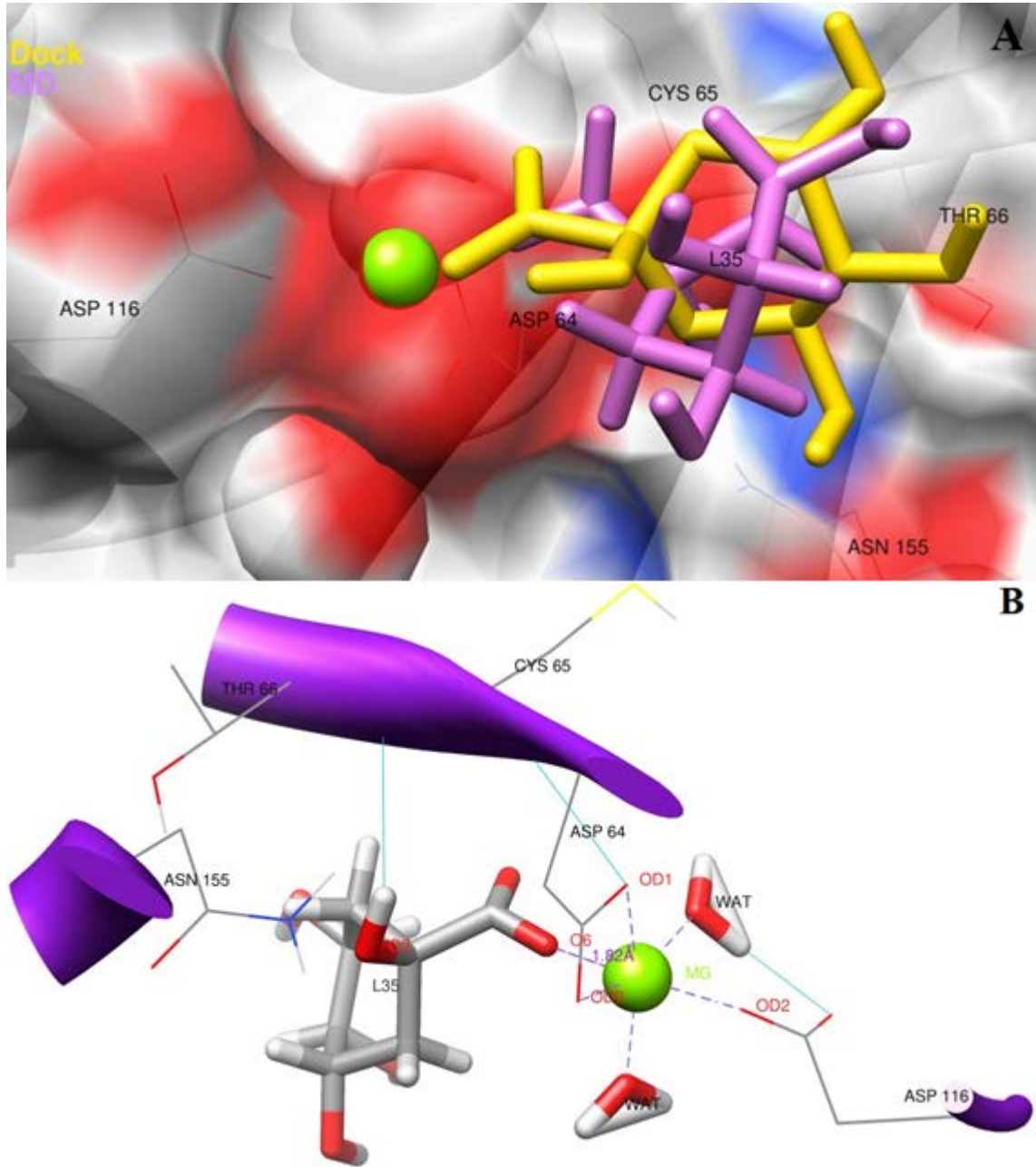
Şekil 4.194. A) L35 ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acom35) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.195.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



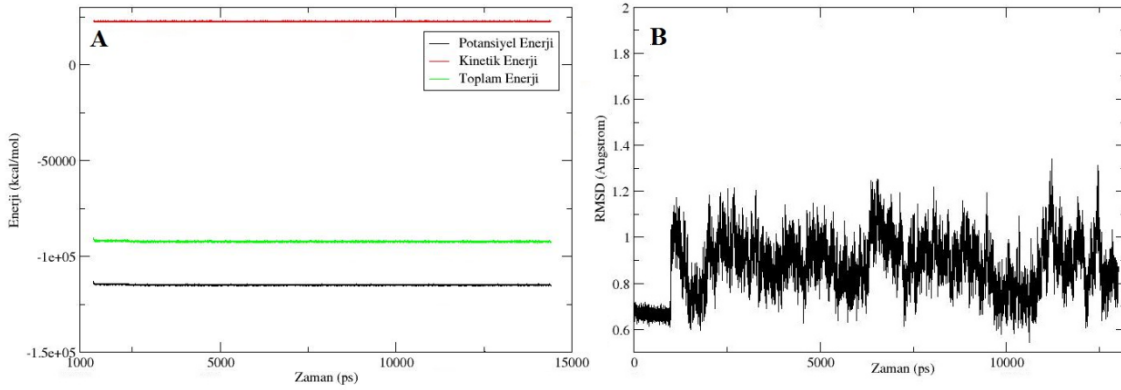
Şekil 4.195. L35 ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L35 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcom35) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.196.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L35 ligandının konformasyonunun az da olsa değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın proteinle başlıca etkileşimleri O3 oksijenine bağlı hidrojen ile CYS65 arasında gelişen hidrojen bağı, ASP64, THR66, ASP116 ve ASN155 ile polar ve HIE67 ile olan van der Waals etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O6 atomu ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Komplekte Mg ile O6 atomları arasındaki mesafe 1.82 Å olarak belirlenmiştir. MD simülasyonları süresince aynı atom çiftleri arasındaki ortalama mesafe 1.89 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.200.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



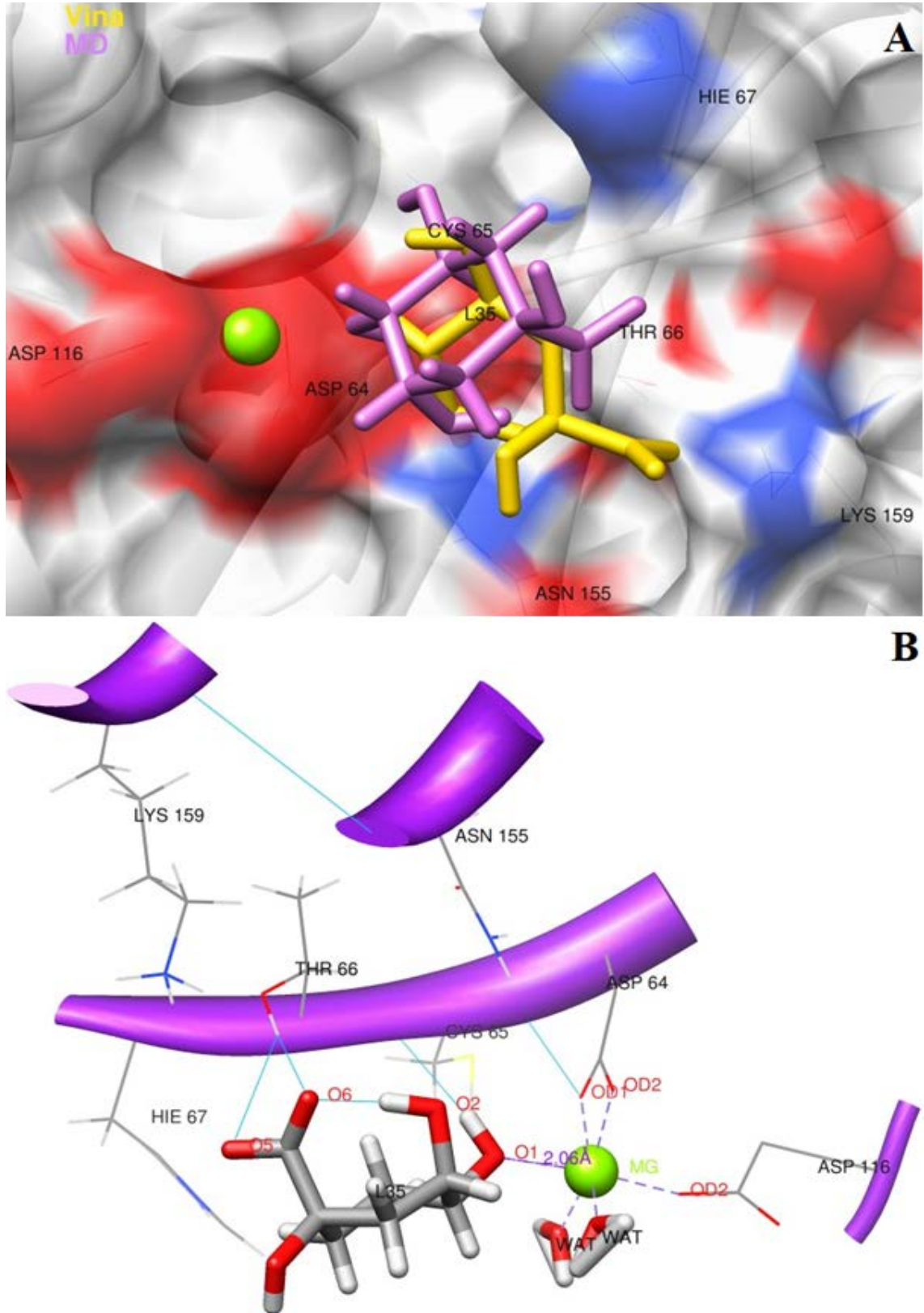
Şekil 4.196. A) L35 ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcom35) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.197.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



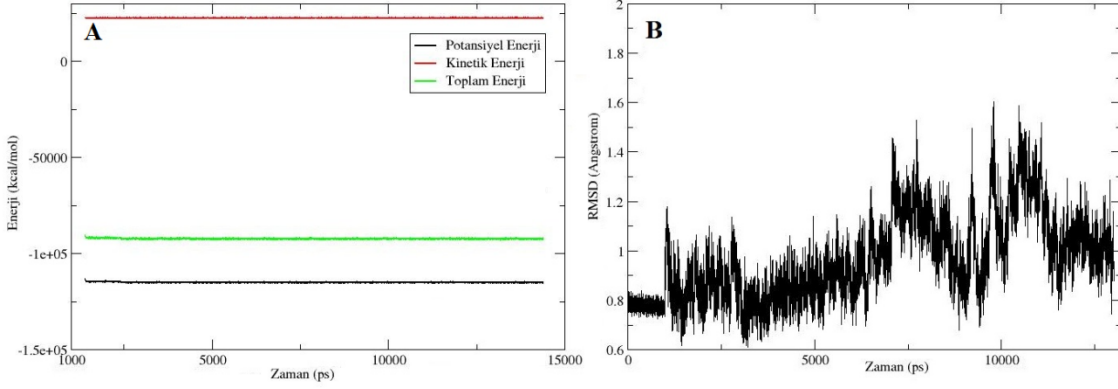
Şekil 4.197. L35 ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

L35 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcom35) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.198.' gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile L35 ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O5 ve O6 oksijen atomlarının THR66 ile, O1 oksijenine bağlı hidrojenin CYS65 ana zincirindeki oksijen atomuyla hidrojen bağı yaptıkları görülmektedir. Bunun yanında ligand ASP64, HIE67, ASP116, ASN155 ve LYS 159 kalıntıları ile de polar etkileşimlerde bulunmuştur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1 atomları ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Komplekste Mg-O1 atomları arasındaki mesafe 2.06 Å iken, MD simülasyonları süresince aynı atom çiftleri arasındaki ortalama mesafe 2.13 Å olarak hesaplanmıştır. Autodock ve Dock ile ligand yerleştirme işlemleri yapılan acom35 ve dcom35 komplekslerinin tersine Vina ligandın karboksilik O5 veya O6 oksijenleri yerine alkol gruplarından O1 oksijenini Mg atomuna yaklaştırmıştır.. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.200.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

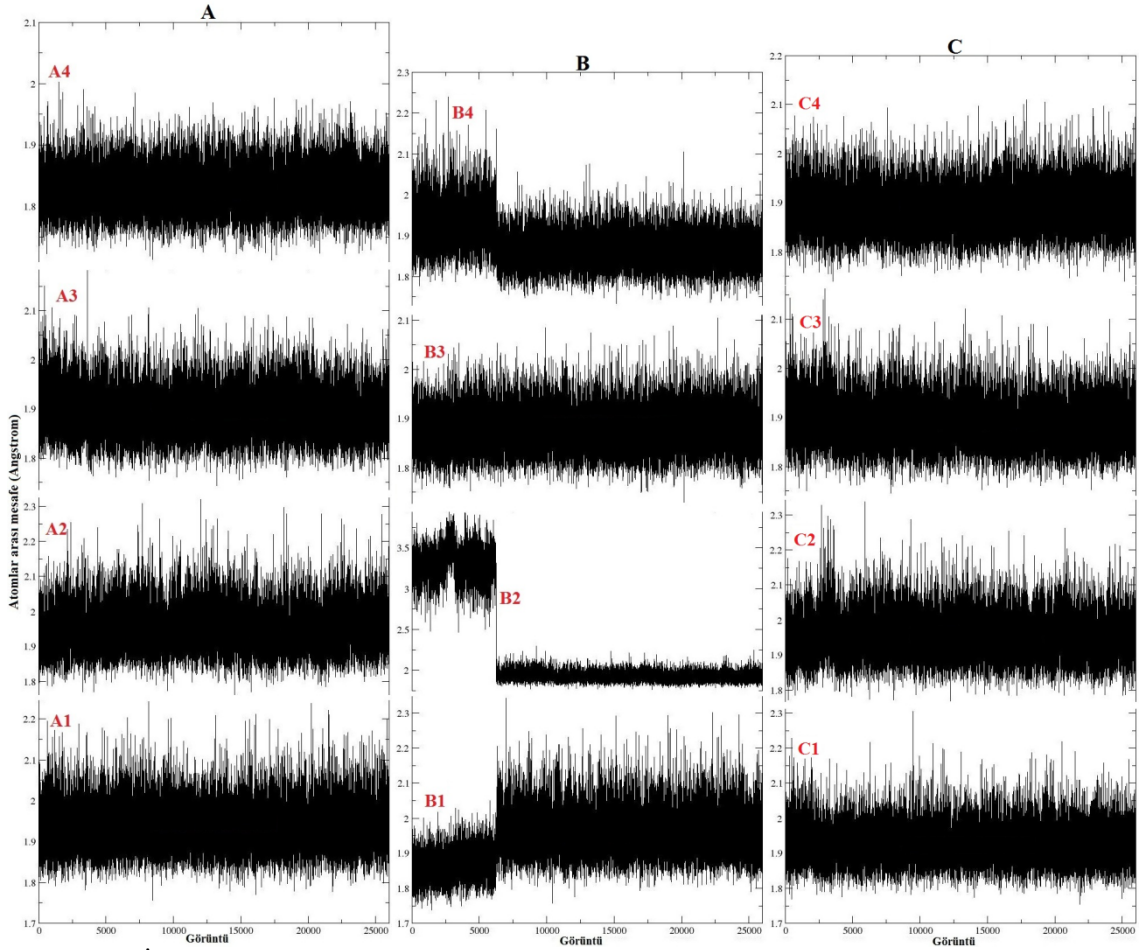


Şekil 4.198. A) L35 ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcom35) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.199.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



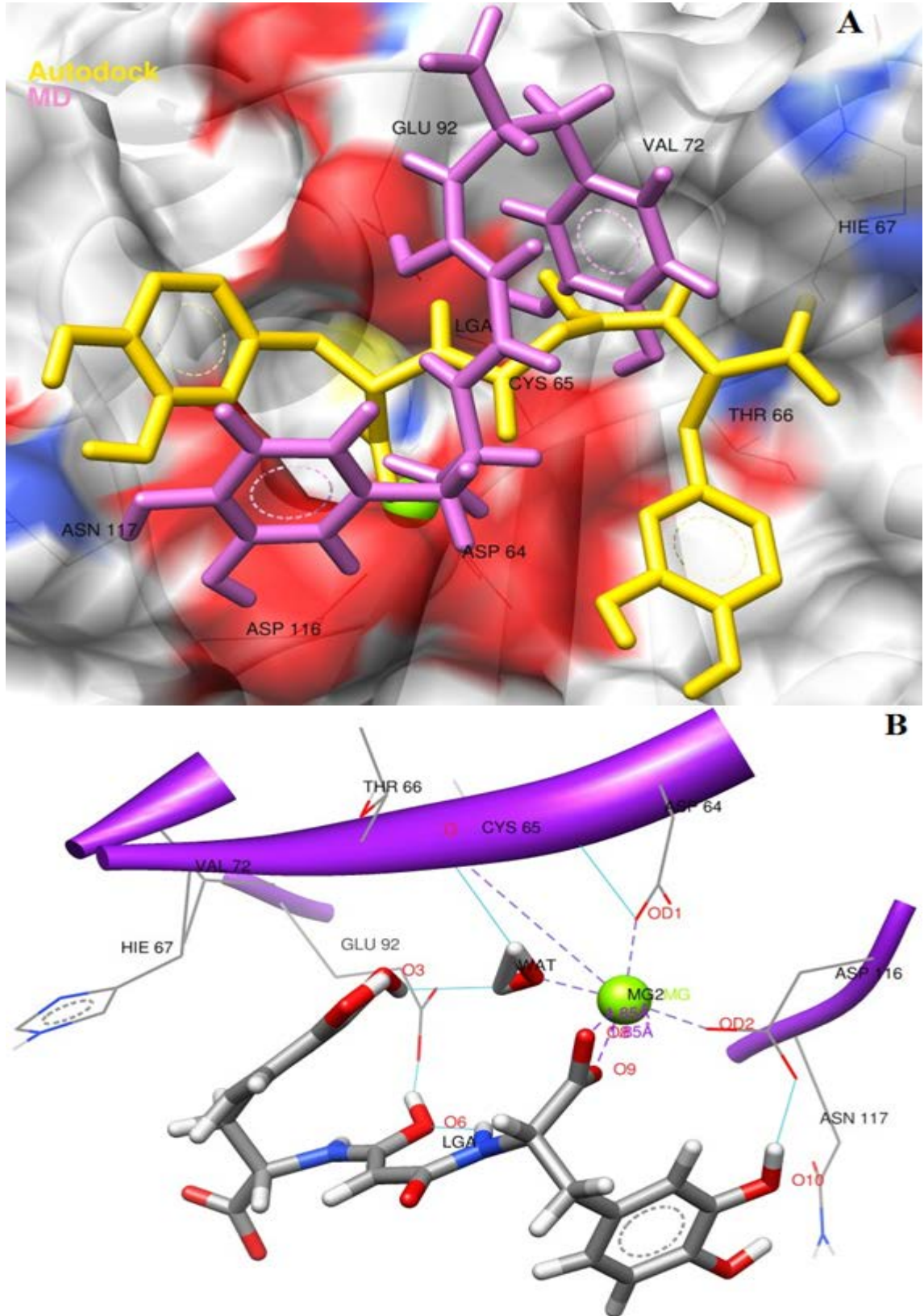
Şekil 4.199. L35 ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.200. İntegrasyonun katalitik öz bölgesindeki (A: vcom34.pdb, B: acom35.pdb, C: dcom35.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-L34 O4, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD2, B4: Mg-L35 O5, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-L35 O6)

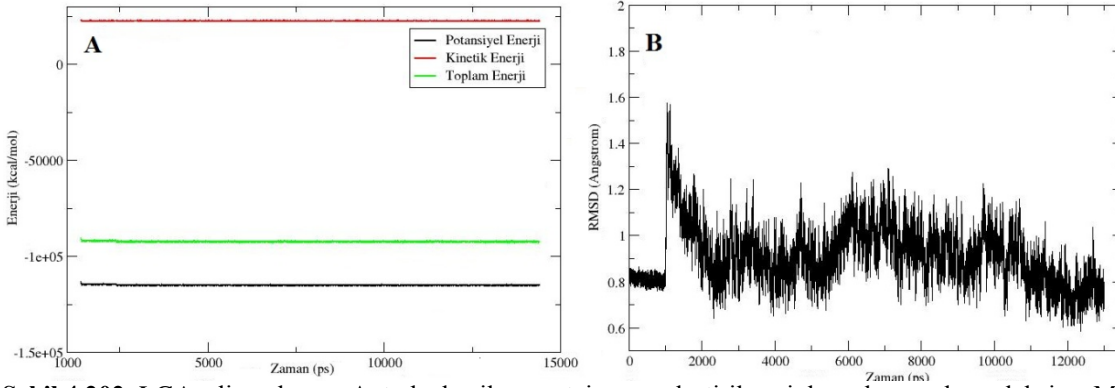
LGA ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acoma) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.201.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGA ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O8 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri bulunmaktadır. Ligandın O3 ve O6 etiketli oksijenlerine bağlı hidrojenler ile GLU92 kalıntısı ve O10 etiketli oksijenine bağlı hidrojen atomu ile ASP116 kalıntısı arasında hidrojen bağları meydana gelmiştir. Ligandın, HIE67 kalıntısına yakın fenil grubu ile kalıntının imidazol halkası arasında π - π örtüşmesi gerçekleşmiştir. Diğer taraftan ligand, CYS65, THR66, GLU92 ve ASN117 ile polar, VAL72 ile de van der Waals etkileşiminde bulunmuştur. En düşük enerjili

kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2, ASP116 OD2 atomları ve uzak da olsa CYS65 kalıntı oksijen atomu (ortalama 4.19 Å), ligandın O8, O9 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O8 ve O9 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri en düşük enerjili komplekste 1.85 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 2.27 Å ve 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.205.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



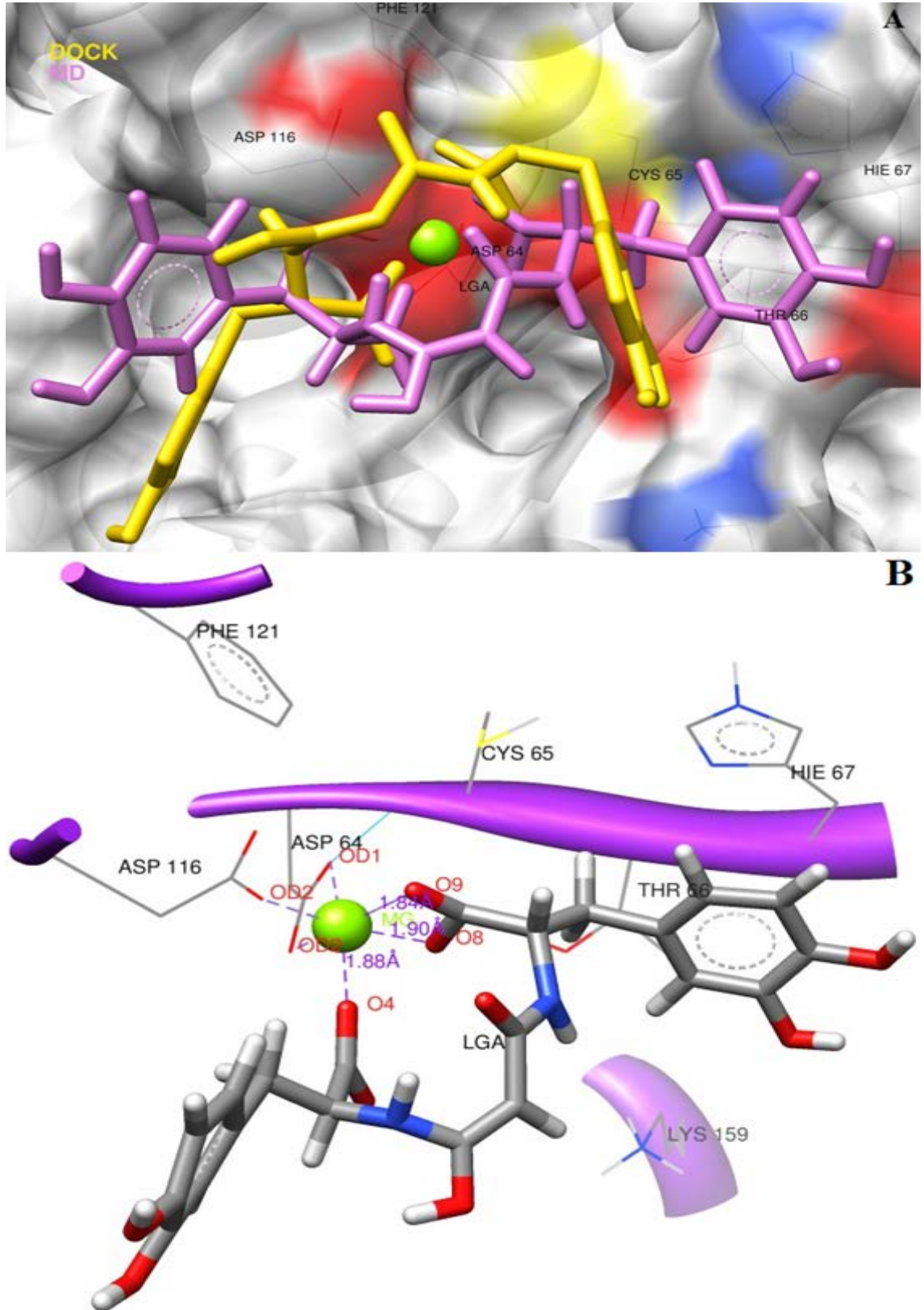
Şekil 4.201. A) LGA ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acoma) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.202.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



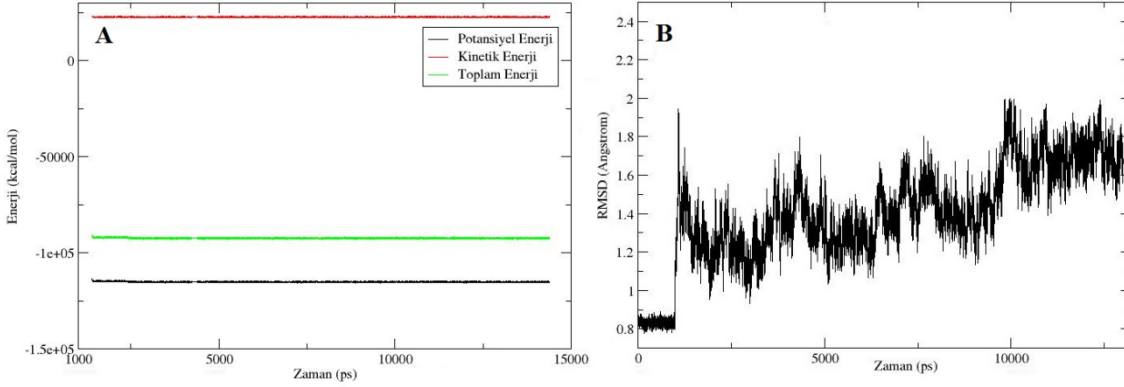
Şekil 4.202. LGA ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

LGA ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcoma) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.203.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGA ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O4 ve O8 oksijenleri ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. HIE67 kalıntısı ile bu kalıntıya yakın olan ligandın fenil halkası arasında π - π etkileşimi bulunmaktadır. ASP64, CYS65 ve ASP116 kalıntıları ile polar, THR66, ASN117 ve LYS159 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri ligandın proteinle olan diğer etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O4, O8 ve O9 atomları ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4, O8 ve O9 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.88 Å, 1.90 Å ve 1.84 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.87 Å, 1.93 Å ve 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.205.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

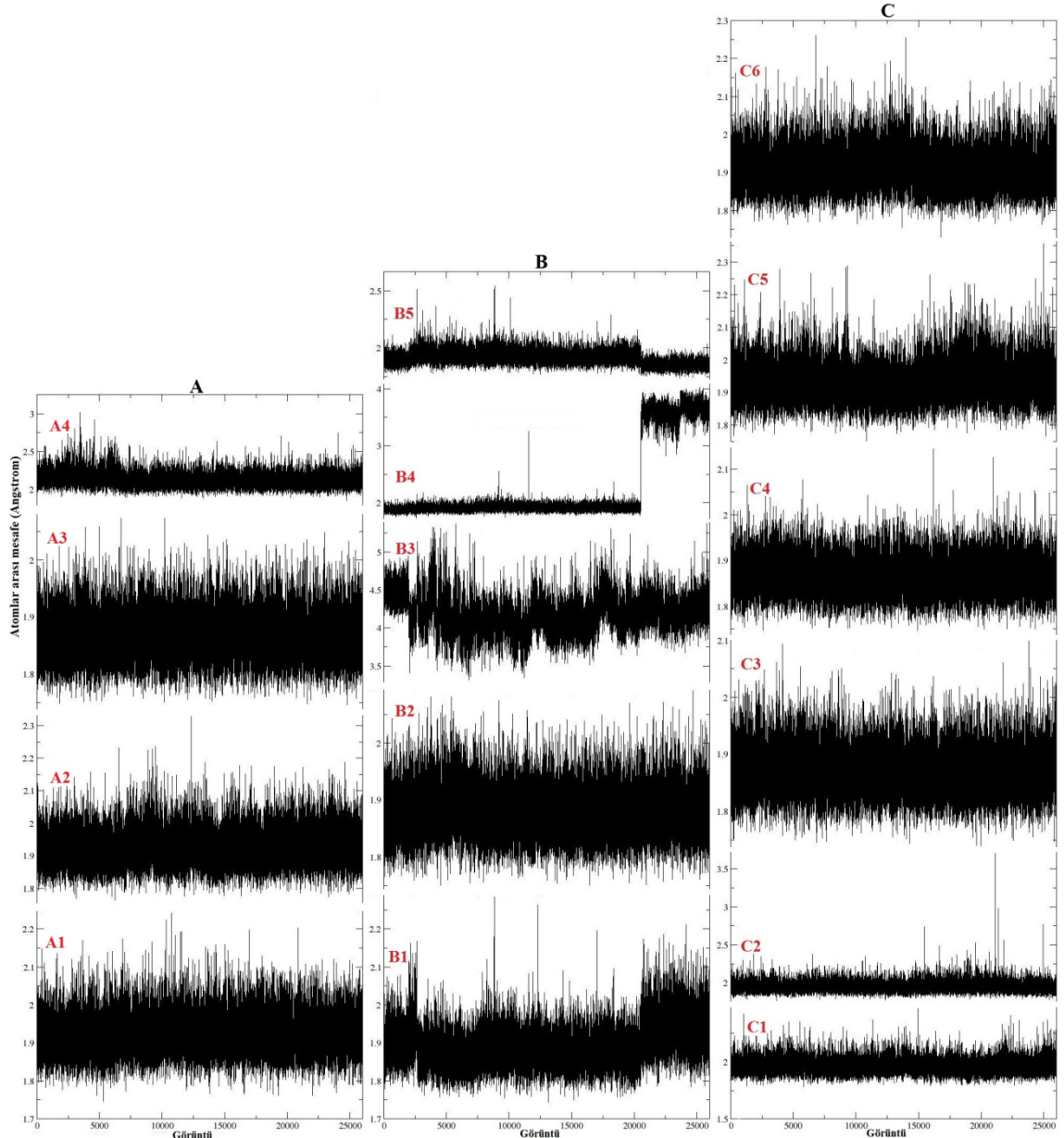


Şekil 4.203. A) LGA ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapıdaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapıdaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcoma) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.204.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



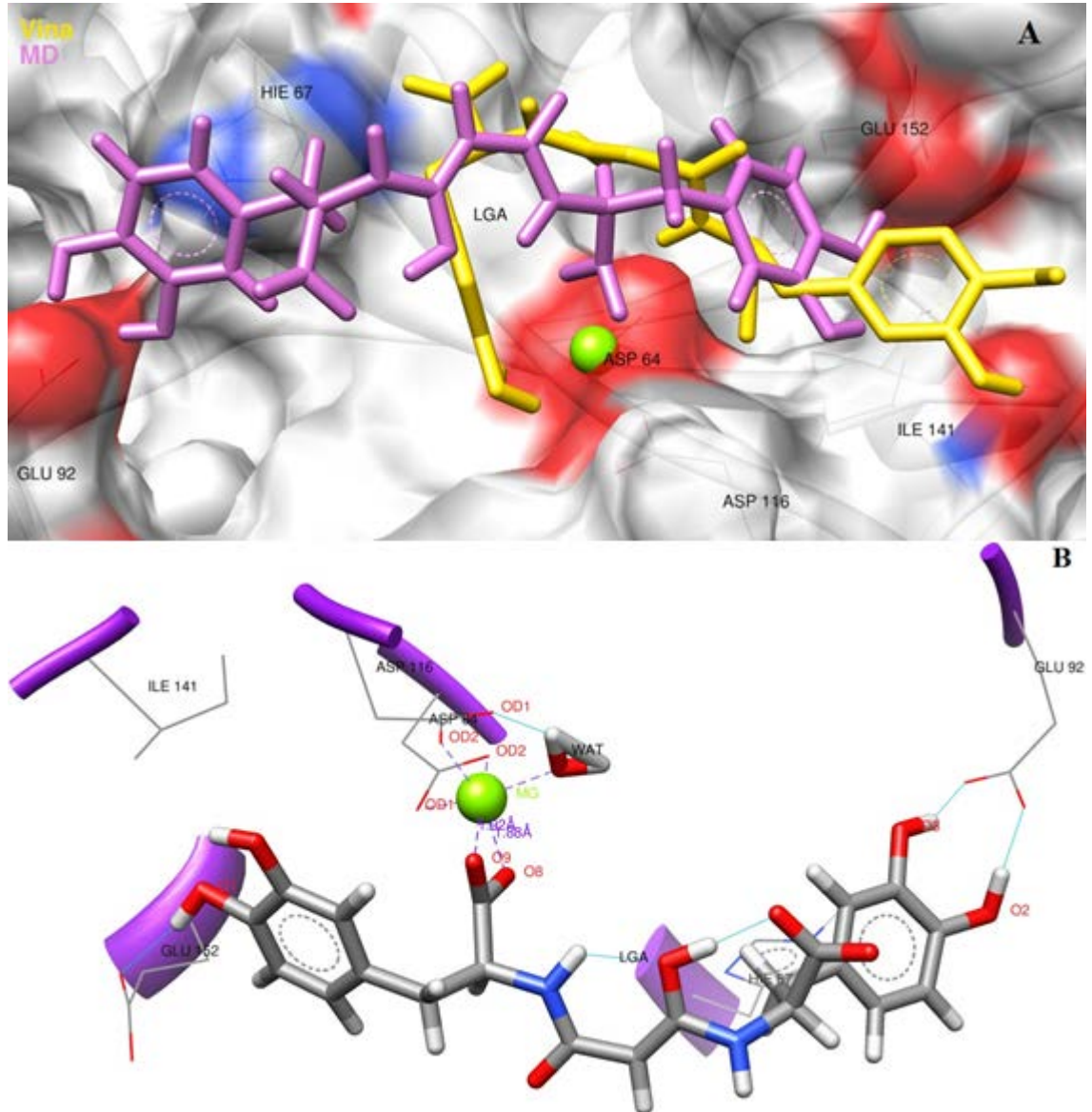
Şekil 4.204. LGA ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.205. İntegrasyon katalitik öz bölgesindeki (**A:** vcom35.pdb, **B:** acoma.pdb, **C:** dcoma.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (**A1:** *Mg-ASP64 OD1*, **A2:** *Mg-ASP64 OD2*, **A3:** *Mg-ASP116 OD2*, **A4:** *Mg-L35 O1*, **B1:** *Mg-ASP64 OD1*, **B2:** *Mg-ASP116 OD2*, **B3:** *Mg-CYS65 O*, **B4:** *Mg-LGA O8*, **B5:** *Mg-LGA O9*, **C1:** *Mg-ASP64 OD1*, **C2:** *Mg-ASP64 OD2*, **C3:** *Mg-ASP116 OD2*, **C4:** *Mg-LGA O4*, **C5:** *Mg-LGA O8*, **C6:** *Mg-LGA O9*)

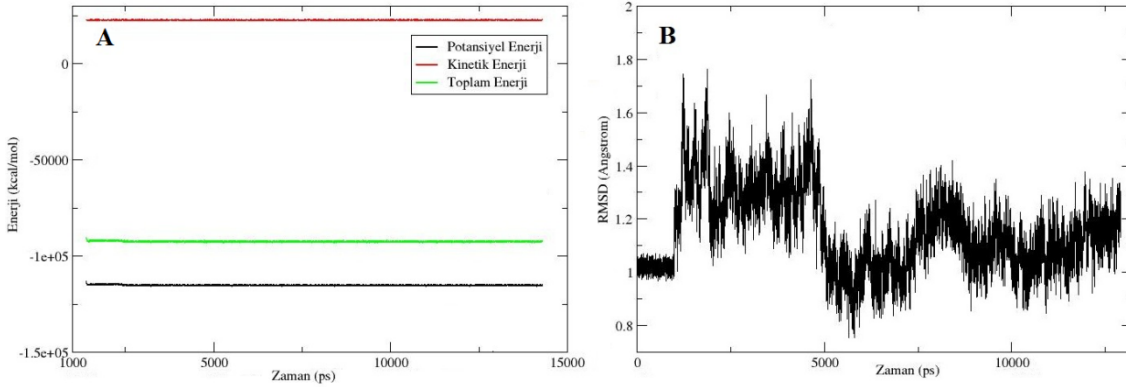
LGA ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcoma) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.206.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGA ligandının konformasyonunun önemli ölçüde değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O8 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri bulunmaktadır.

Bunun yanında, ligand ile protein kalıntıları arasında bazı hidrojen bağları da meydana gelmiştir. Bunlar, O1 hidrojeni ile GLU152, O2 ve O3 hidrojenleri ile GLU92 arasında oluşmuşlardır. Ligandın, GLU152 kalıntısına yakın fenil halkası ile Mg atomu arasında π (+) etkileşimi bulunmaktadır. Ayrıca ligand, CYS65, HIE67 ve ILE141 ile polar, VAL72 ile van der Waals etkileşimlerinde bulunmuştur. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O8, O9 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O8 ve O9 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.88 Å ve 1.92 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 1.92 Å ve 1.90 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.212.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.206. A) LGA ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (vcoma) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.207.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.

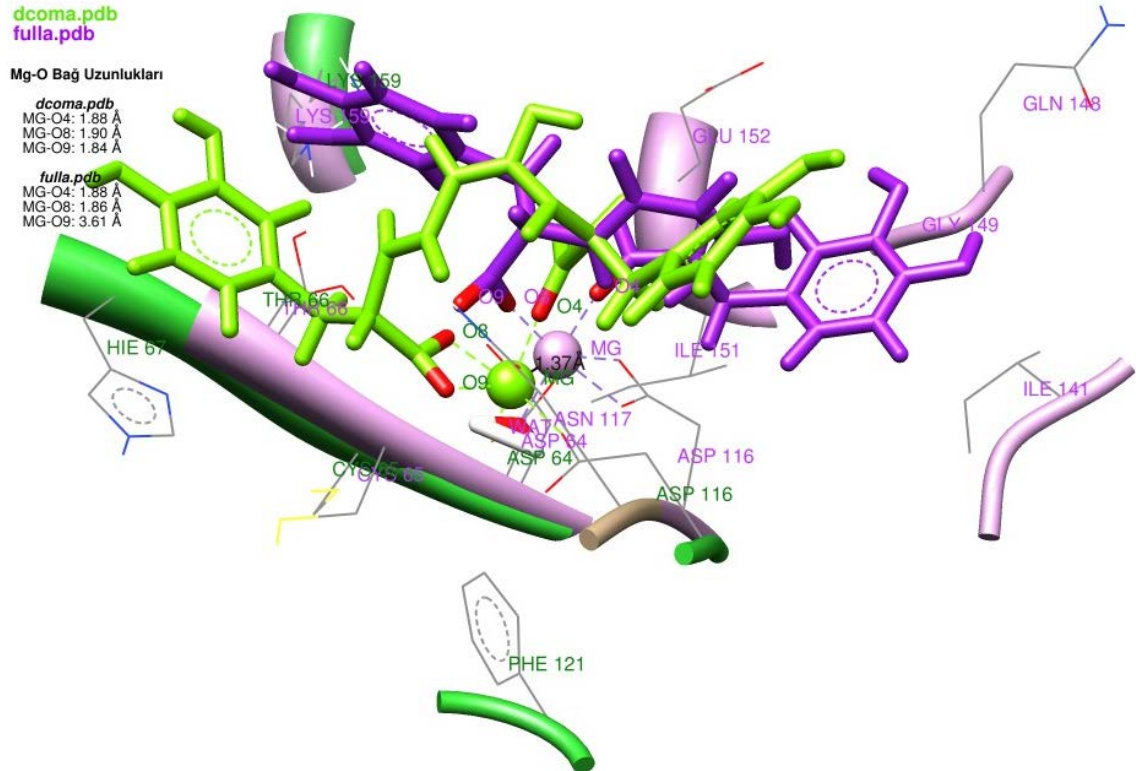


Şekil 4.207. LGA ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

LGA ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin E1 yapısı ile üst üste karşılaştırılması ile bu yapının LGA ligandı ile oluşan kompleksi (fulla) hazırlanmış olup bu kompleksin MD hesaplamaları sonucunda elde edilen yapı ile dcoma'nın MD hesaplamaları sonucu elde edilen yapısının üst üste karşılaştırılmasından elde edilen görüntü Şekil 4.208'de verilmiştir. Bu iki yapı karşılaştırıldıklarında tam uzunluktaki proteinin kompleksleşme modunda bazı farklılıklar meydana getirdiği anlaşılmaktadır. Ligandın O4 ve O8 atomları ASP64 ve ASP116 kalıntılarıyla yük etkileşiminde bulunmuştur. Ayrıca ligandın THR66, ASN117 ve GLY149 ile hidrojen bağı, ILE141, GLU152 ve LYS159 ile polar etkileşimleri ve GLY140, GLN148 ve ILE151 ile van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD2 ve ASP116 OD1-OD2 atomları, ligandın O4, O8 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Kompleksite Mg ile O4 atomları arasındaki mesafe 1.88 Å, Mg ile O8 atomları arasındaki mesafe ise 1.86 Å olarak belirlenmiştir. Aynı atom çiftlerinin MD simülasyonları boyunca ortalama mesafeleri de 1.86 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomu ile Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomları arasındaki mesafelerin zamanla değişim grafikleri Şekil 4.212.'de gösterilmiştir. Mg ve protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

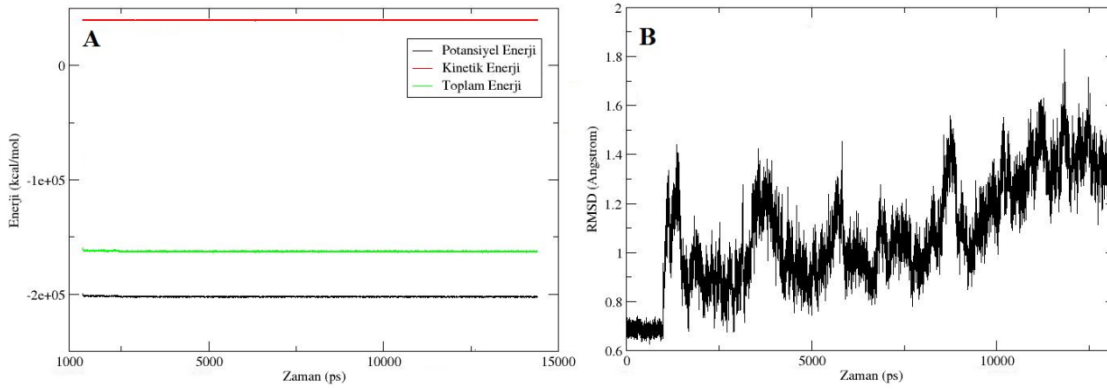
LGA ligandının dcoma kompleksinde Mg ile yakın ilişki içinde olan üç oksijen atomu bulunurken (O4, O8, O9), fulla kompleksinde iki oksijen atomu (O4, O8) bu ilişki içinde yer almıştır. O9 oksijeni ile Mg atomu arasındaki mesafe en düşük enerjili dcoma yapısında 1.84 Å iken, en düşük enerjili fulla kompleksinde bu mesafe 3.61 Å değerine çıkmıştır. Yapılardaki konformasyon farklılığı nedeniyle MD simülasyonu

sırasında zamanla ligandın etkileşimde bulunduğu kalıntılar değişmiştir. Örneğin ligand dcoma yapısında HIE67 ile π - π etkileşiminde bulunurken, fulla kompleksinde bu etkileşim ortadan kalkmış ve ligandın dcoma kompleksinde yer almayan etkileşimlerde (GLY140, ILE141, GLN148, GLY149, ILE151, GLU152 ile ligandın polar ve van der Waals etkileşimleri) bulunmasına neden olmuştur. Sonuç itibarı ile ligand her iki yapıya da yerleşmeyi başarmıştır.



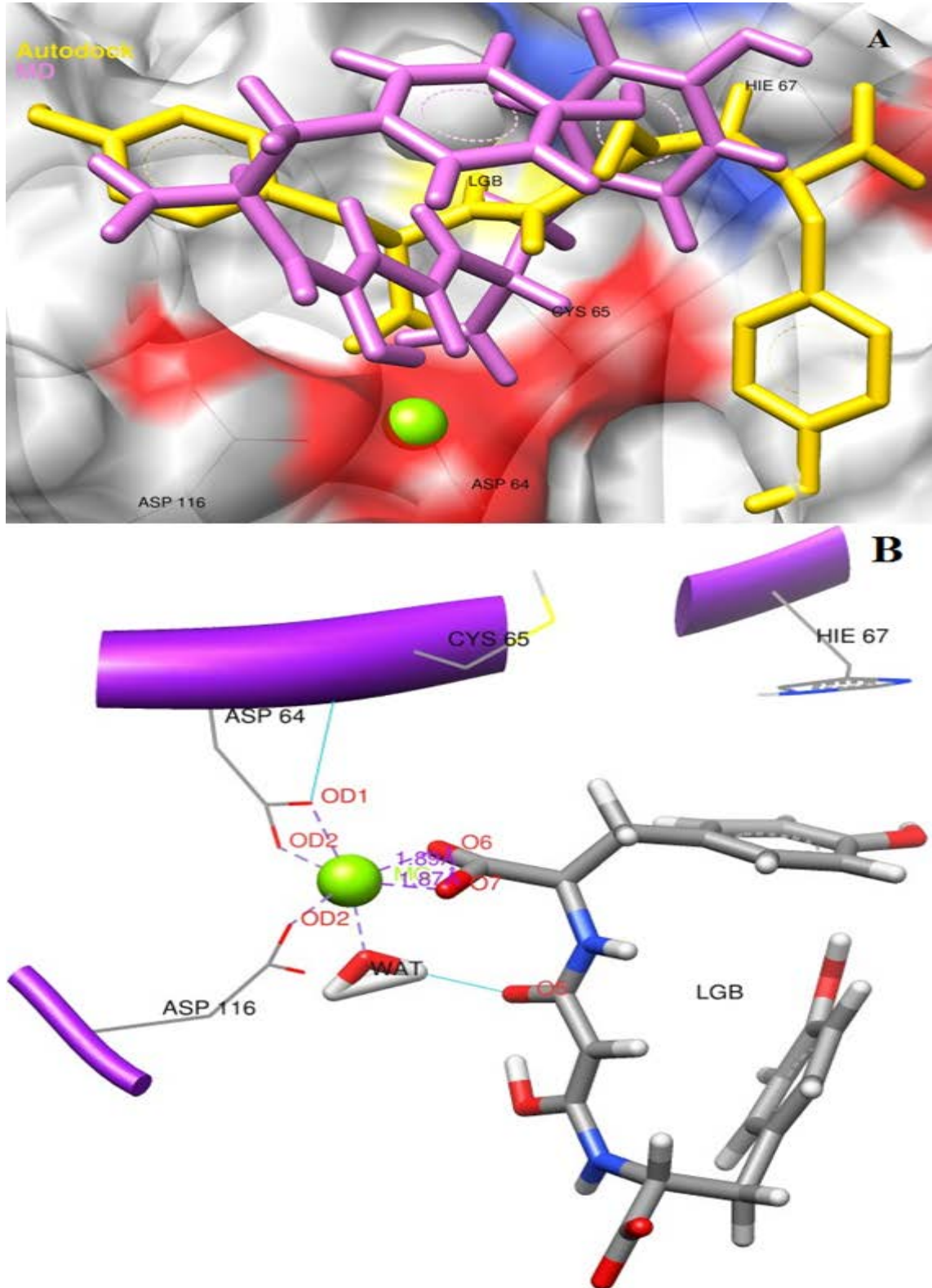
Şekil 4.208. LGA ligandının katalitik öz bölgesinde (dcoma) ve tam uzunluktaki yapıda (fulla.) MD hesaplamaları sonucu proteinle etkileşimlerinin karşılaştırılması

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.209.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



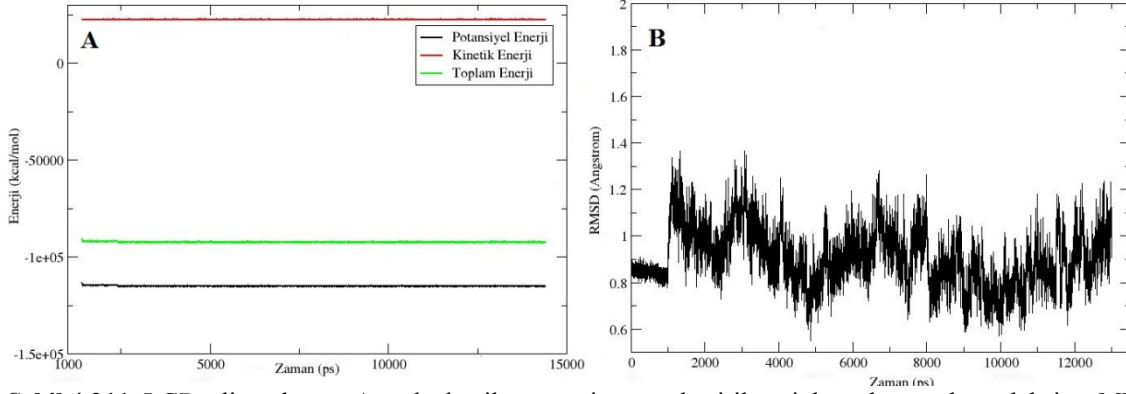
Şekil 4.209. LGA ligandının tam uzunluktaki proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin (fulla) MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

LGB ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acomb) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.210.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGB ligandının konformasyonunda önemli değişikliklerin meydana geldiği anlaşılmaktadır. Ligandın O1 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligandın protein kalıntıları ile diğer etkileşimleri; HIE67 ile bu kalıntıya yakın olan fenil halkası arasında π - π etkileşimi, CYS65 ile polar etkileşim, THR66 ve PHE121 ile van der Waals etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O6, O7 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O6 ve O7 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.89 Å ve 1.87 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.93 Å ve 1.90 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.212.'de gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

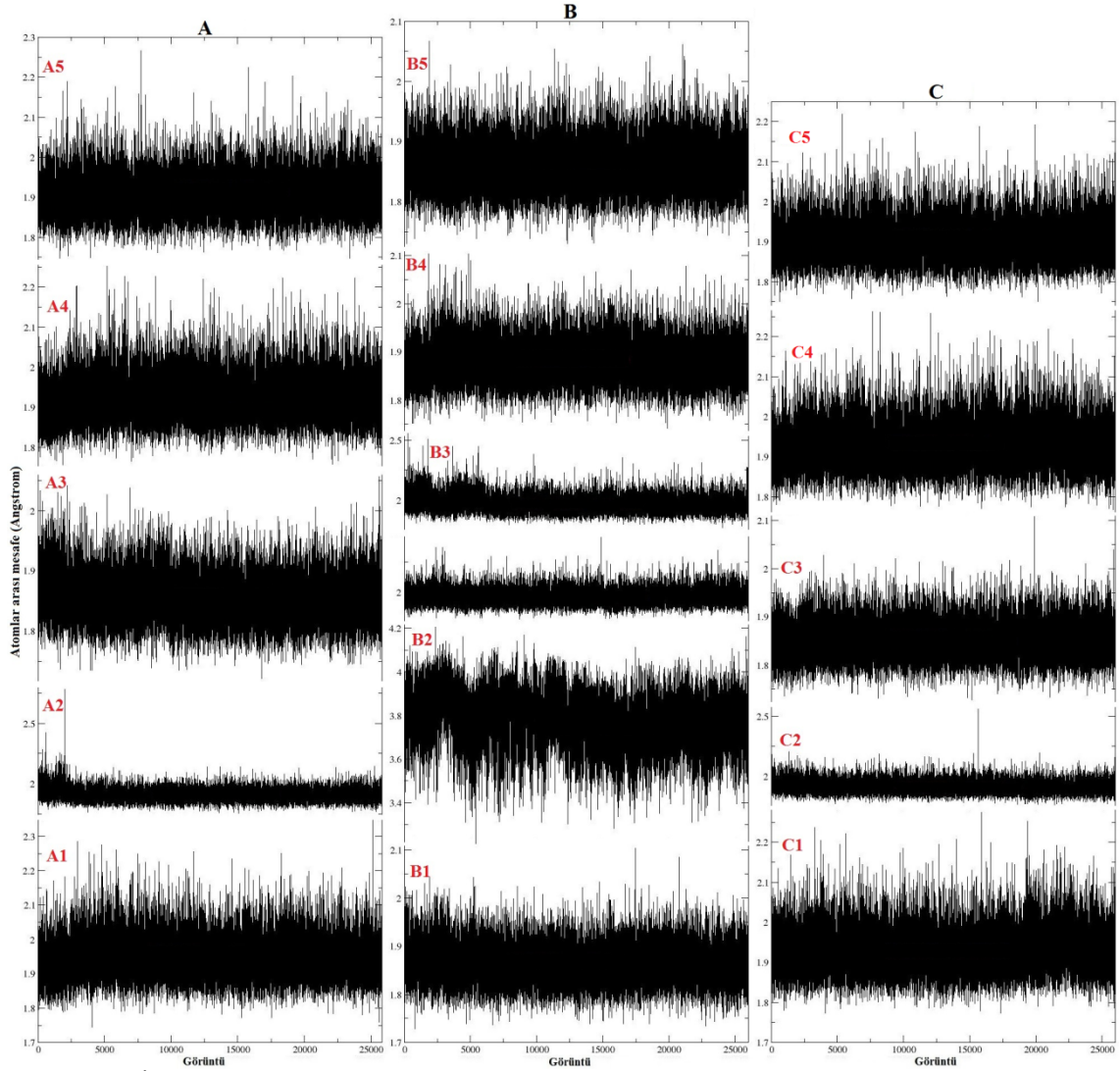


Şekil 4.210. A) LGB ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (acomb) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.211.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



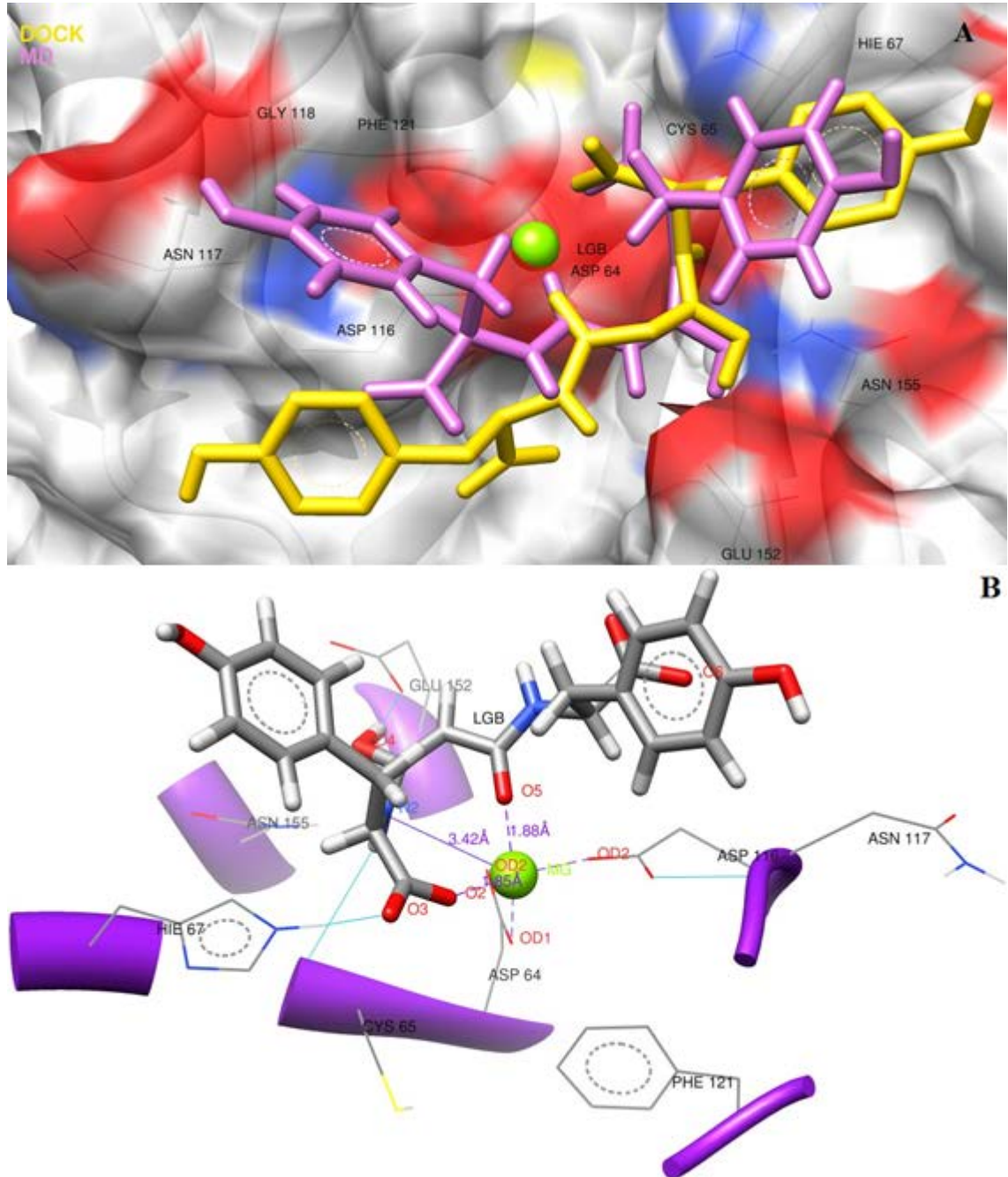
Şekil 4.211. LGB ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.212. İntegrasyon katalitik öz bölgesindeki (**A:** vcoma.pdb, **B:** fulla.pdb, **C:** acomb.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (**A1:** Mg-ASP64 OD1, **A2:** Mg-ASP64 OD2, **A3:** Mg-ASP116 OD2, **A4:** Mg-LGA O8, **A5:** Mg-LGA O9, **B1:** Mg-ASP64 OD1, **B2:** Mg-ASP116 OD1, **B3:** Mg-ASP116 OD2, **B4:** Mg-LGA O4, **B5:** Mg-LGA O8, **C1:** Mg-ASP64 OD1, **C2:** Mg-ASP64 OD2, **C3:** Mg-ASP116 OD2, **C4:** Mg-LGB O6, **C5:** Mg-LGB O7)

LGB ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcomb) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.213.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGB ligandının konformasyonunda anlamlı değişiklikler olduğu anlaşılmaktadır. Ligandın O3 oksijeni ile Mg atomu ve O6 atomu ile ASP116 kalıntısı arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligandın N2 atomuna bağlı hidrojen ile CYS65, O3 atomu ile HIE67 imidazol hidrojeni, O4 atomuna bağlı hidrojen ile GLU152 arasında hidrojen bağları oluşmuştur. Proteinin ASP64, ASP116, ASN117, GLU152, ASN155 kalıntıları ile

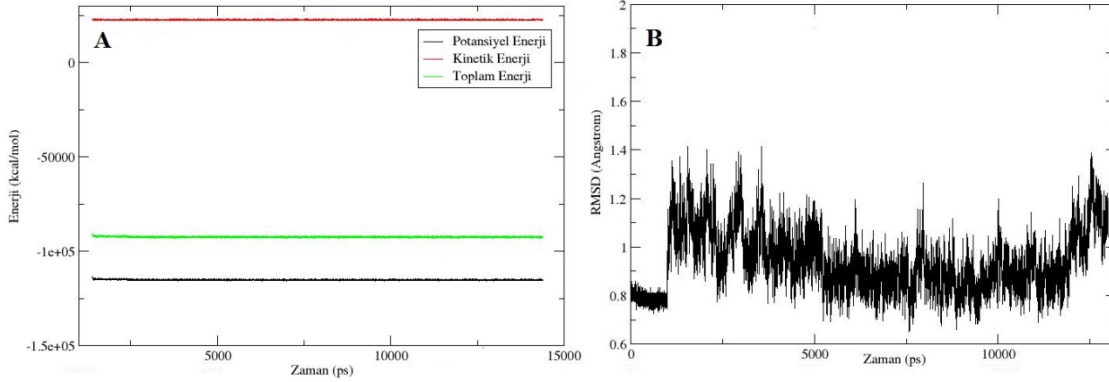
ligand arasında polar, THR66, GLY118 ve PHE121 kalıntıları ile ligand arasında van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O2, O5 ve N2 atomları ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2, O5 ve N2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.85 Å, 1.88 Å ve 3.42 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.87 Å, 1.88 Å ve 3.30 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.219.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.213. A) LGB ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (dcomb) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

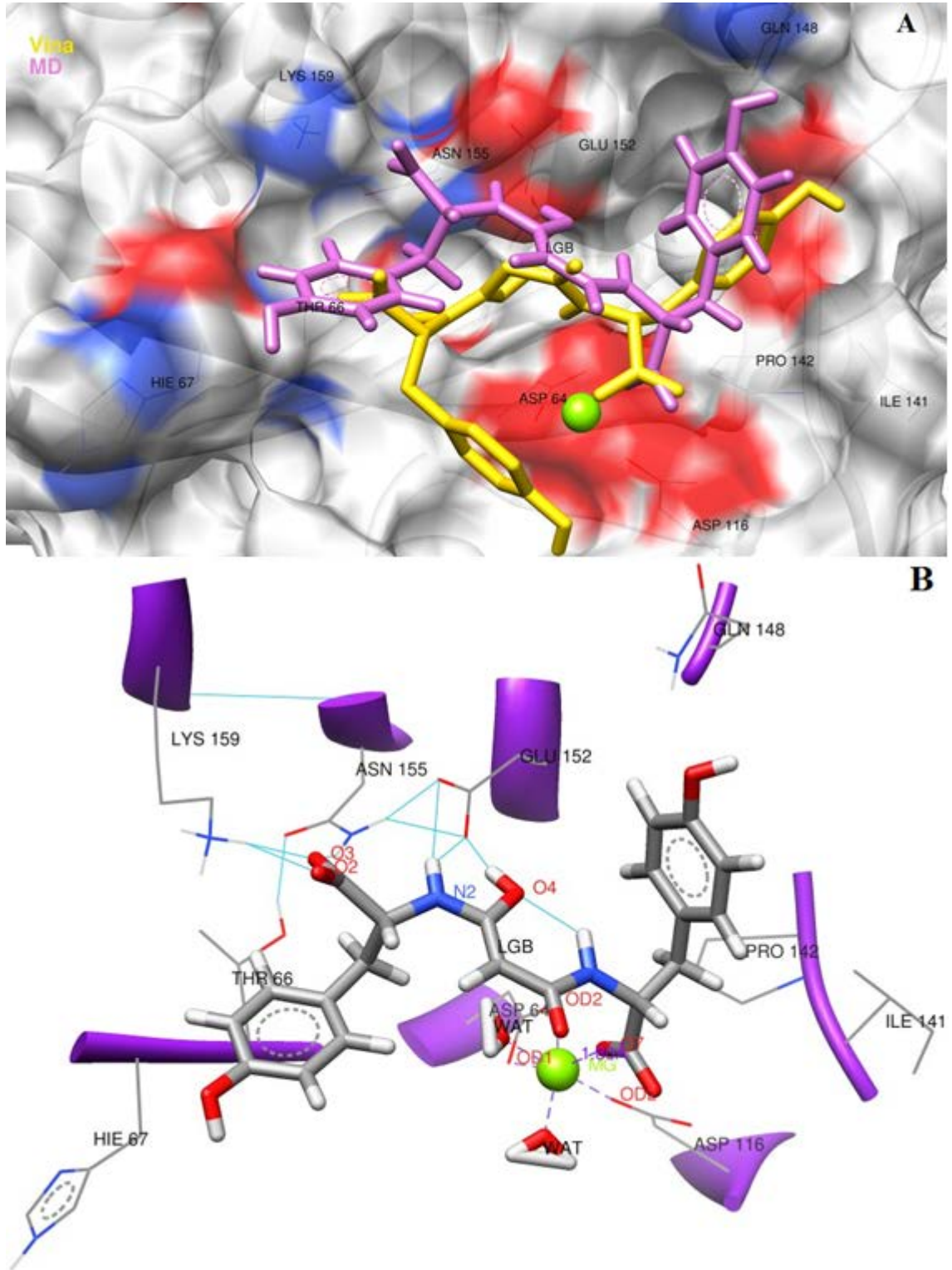
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.214.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



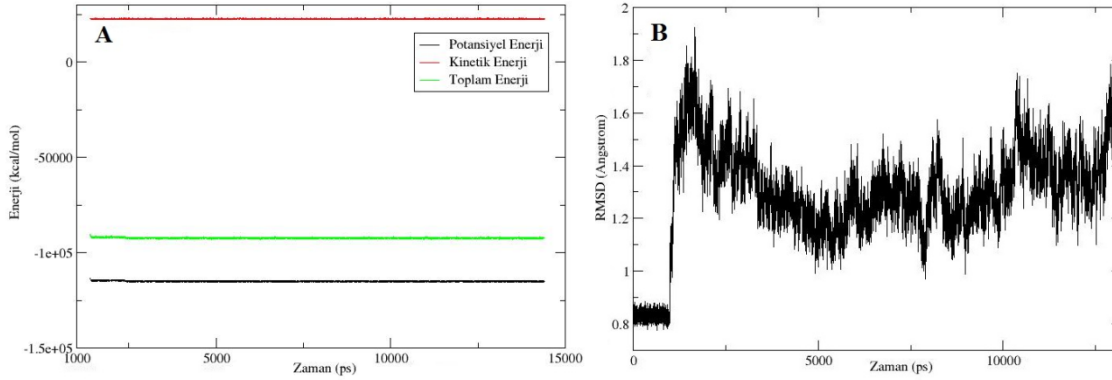
Şekil 4.214. LGB ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

LGB ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcomb) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.215.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGB ligandının konformasyonunda önemli değişiklikler gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O3 oksijeni ile LYS159 ve GLU152 arasında, O7 oksijeni ile ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligandın O2 ve O3 atomları ile LYS159 kalıntısı, N2 ve O4 atomlarına bağlı hidrojenler ile GLU152 kalıntısı arasında hidrojen bağları bulunmaktadır. Ayrıca ligandın HIE67, GLN148, ASN155 kalıntıları ile polar, CYS65, THR66, ILE141 ve PRO142 kalıntıları ile de van der Waals etkileşimleri sergilediği belirlenmiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O7 atomu ve iki su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O7 atomu ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafesi en düşük enerjili komplekste 1.80 Å, MD simülasyonu süresince bu mesafenin ortalaması ise 1.85 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.119.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.215. A) LGB ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcomb) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.216.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.

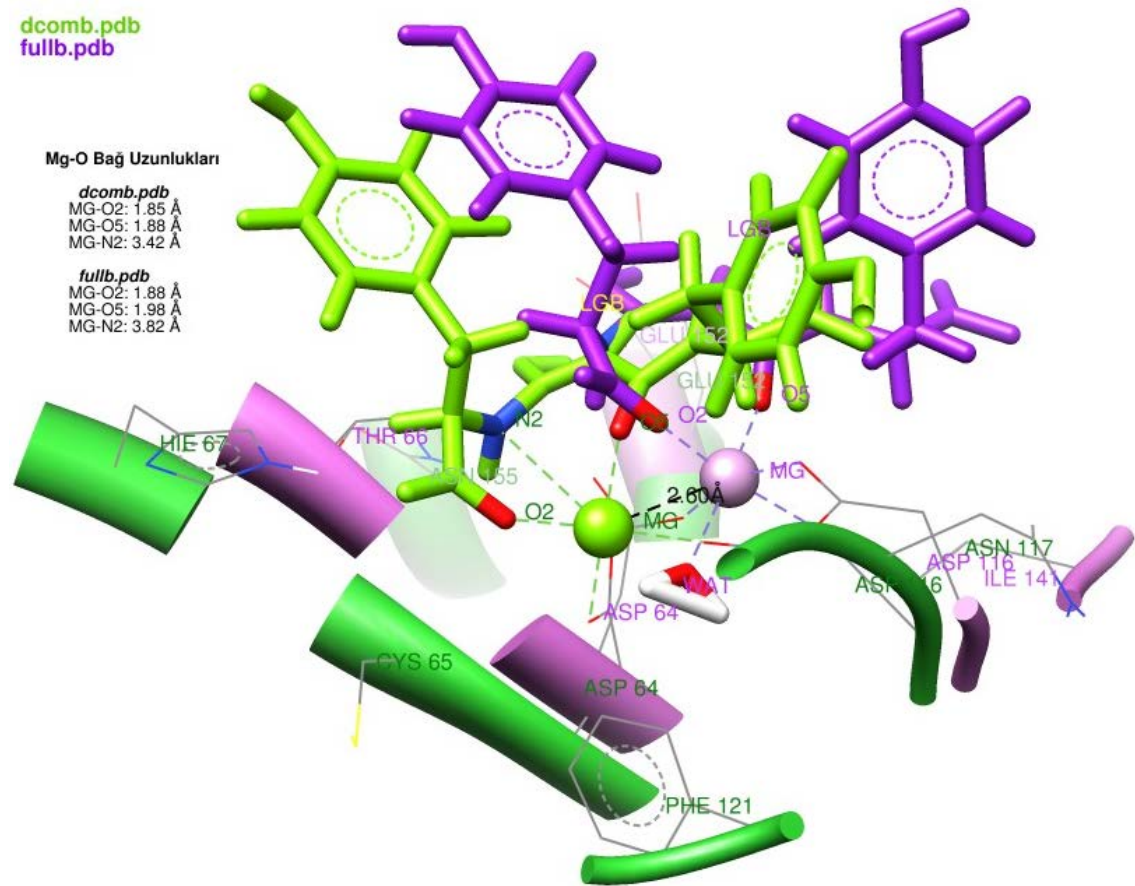


Şekil 4.216. LGB ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

LGB ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin E1 yapısı ile üst üste karşılaştırılması ile bu yapının LGB ligandı ile oluşan kompleksi (fullb) hazırlanmış olup bu kompleksin MD hesaplamaları sonucunda elde edilen yapı ile dcomb'nin MD hesaplamaları sonucu elde edilen yapısının üst üste karşılaştırılmasından elde edilen görüntü Şekil 4.217'de verilmiştir. Bu iki yapı karşılaştırıldıklarında tam uzunluktaki proteinin kompleksleşme modunda farklılıklar meydana getirmediği anlaşılmaktadır. Ligandın O3 oksijeni ile Mg atomu arasında yük etkileşimleri bulunmaktadır. Ligandın N2 azot atomuna bağlı hidrojen atomu ile ASP64 ve N2 atomuna komşu enol hidrojeni ile GLU152 arasında hidrojen bağları meydana gelmiştir. CYS65, ASP116 ve ILE141 arasında polar, THR66 ile van der Waals etkileşimleri başlıca ligand-protein etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1 ve ASP116 OD1-OD2 atomları, ligandın O2, O5 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O2 ve O5 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.88 Å ve 1.98 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.86 Å ve 1.91 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomu ile Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomları arasındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.219.'da

gösterilmiştir. Mg ve protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

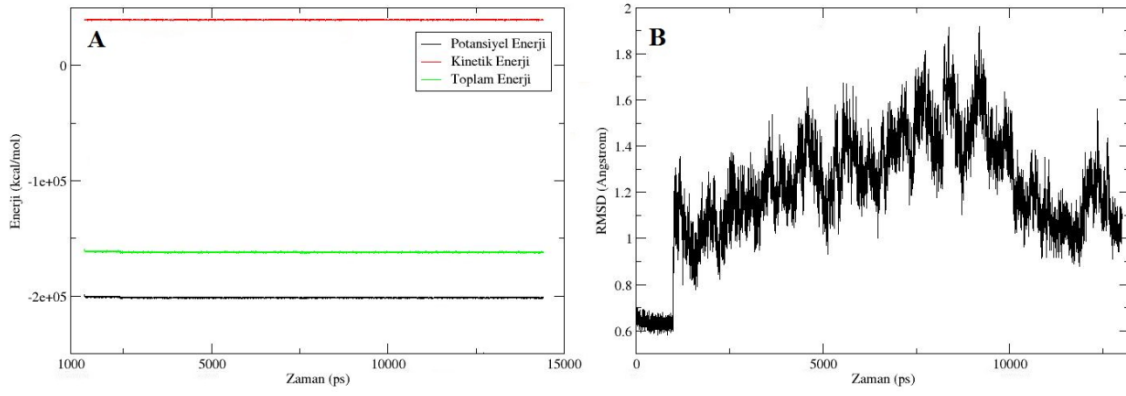
Metal ve metal ile etkileşim halindeki ligand atomları arasındaki mesafeler dikkate alındığında her iki yapının değerlerinin bir birine yakın olduğu görülmektedir. Her iki komplekste etkileşen ligand atomları ile kalıntılardan bazılarının değiştiği görülmektedir. Ligandın yerleştirildiği B ve E1 proteinleri farklı konformasyonlara sahiptir. Dolayısıyla ligandın etkileştiği kalıntıların farklı olması beklenen bir sonuçtur.



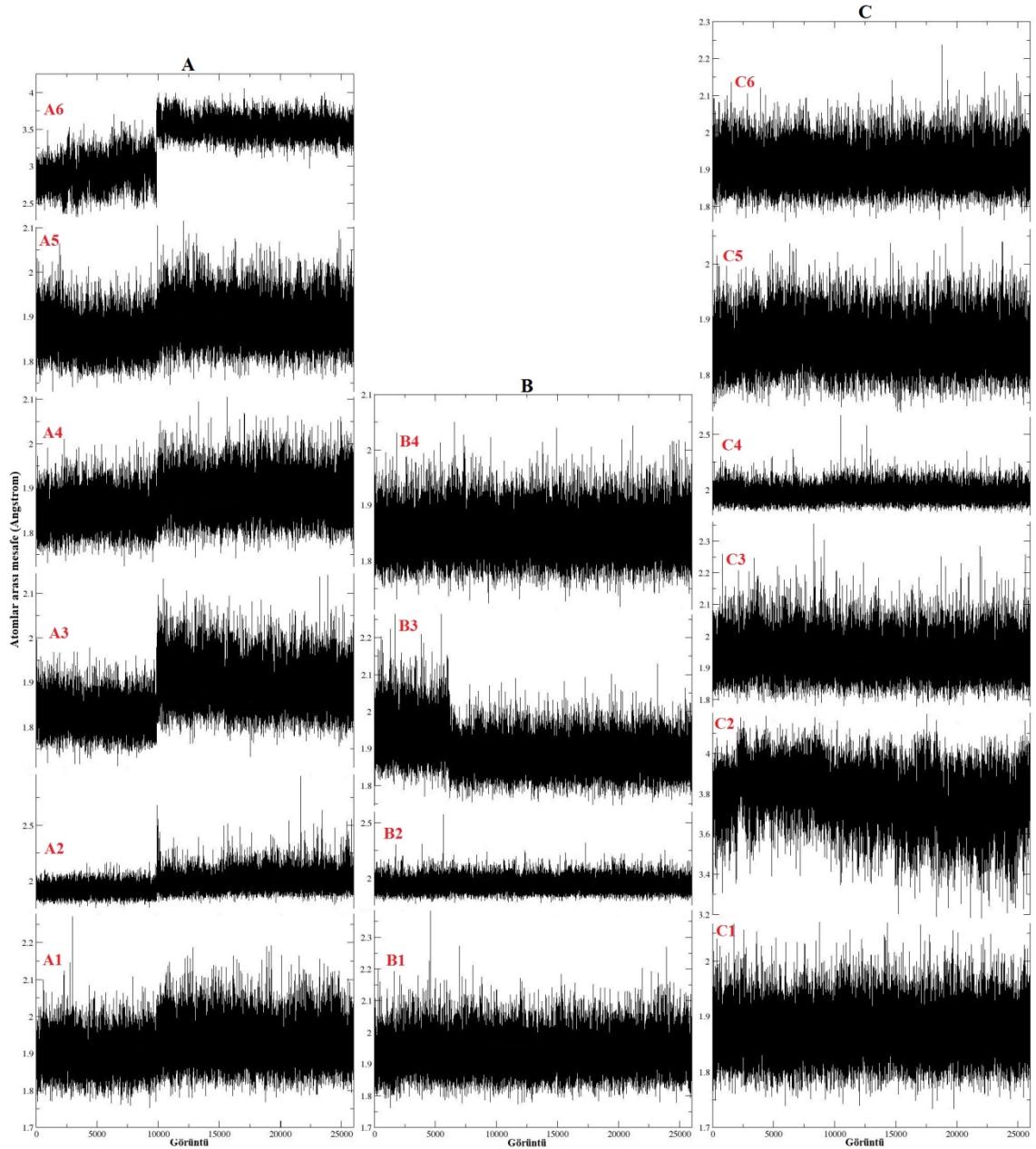
Şekil 4.217. LGB ligandının katalitik öz bölgesinde (dcomb) ve tam uzunluktaki yapıda (fullb) MD hesaplamaları sonucu proteinle etkileşimlerinin karşılaştırılması

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.218.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği yaklaşık 10 ns'den sonra düşerek stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA



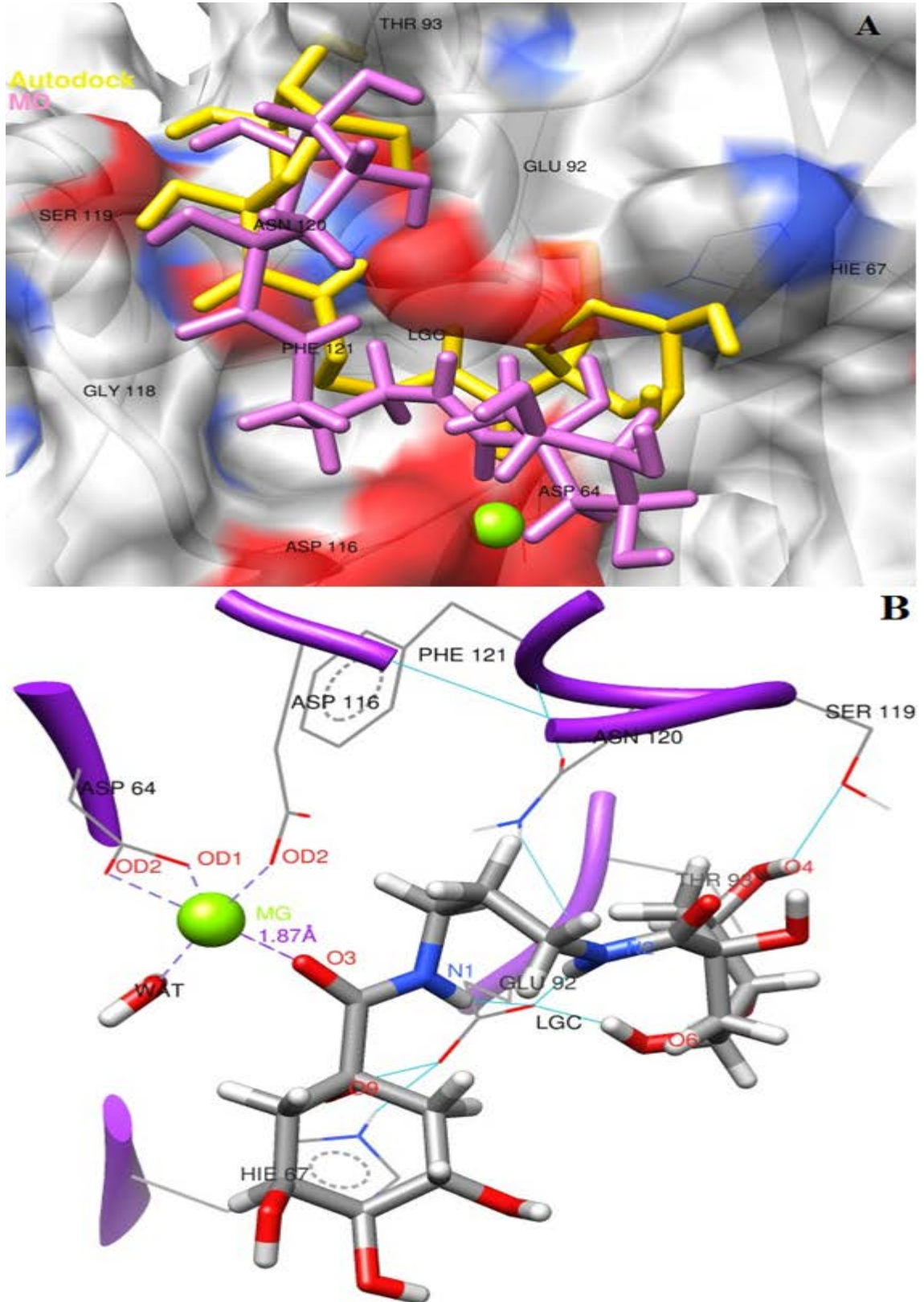
Şekil 4.218. LGB ligandının tam uzunluktaki proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin (fullb) MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.219. İntegrasyonun katalitik öz bölgesindeki (**A:** dcomb.pdb, **B:** vcomb.pdb, **C:** fullb.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (**A1:** *Mg-ASP64 OD1*, **A2:** *Mg-ASP64 OD2*, **A3:** *Mg-ASP116 OD2*, **A4:** *Mg-LGB O2*, **A5:** *Mg-LGB O2*, **A6:** *Mg-LGB N2*, **B1:** *Mg-ASP64 OD1*, **B2:** *Mg-ASP64 OD2*, **B3:** *Mg-ASP116 OD2*, **B4:** *Mg-LGB O7*, **C1:** *Mg-ASP64 OD1*, **C2:** *Mg-ASP116 OD1*, **C3:** *Mg-ASP116 OD2*, **C4:** *Mg-LGB O2*, **C5:** *Mg-LGB O5*)

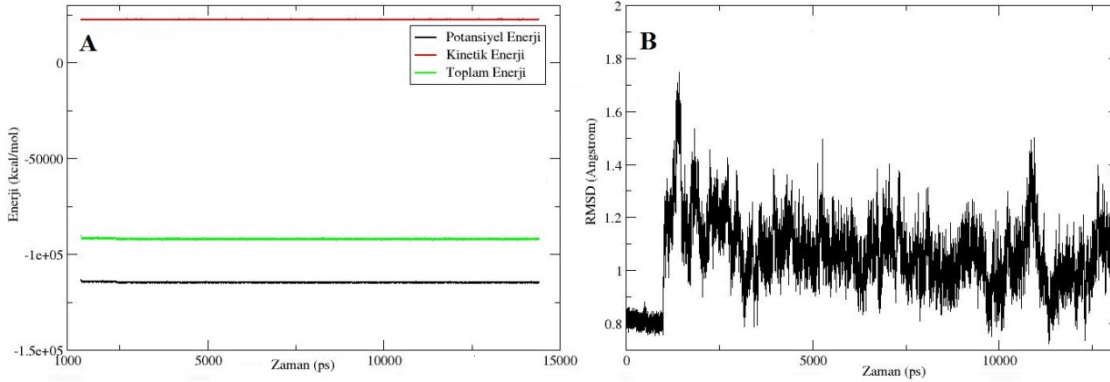
LGC ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acomb) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.220.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGC ligandının konformasyonunun fazla değişmediği anlaşılmaktadır. Ligandın N1, N2, O6 ve O9 atomlarına bağlı hidrojen atomları ile GLU92 karboksilik oksijenleri ile, O4

atomuna bağı hidrojen atomu ile SER119 oksijeni ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Ayrıca ligandın ASP64, CYS65, HIE67, ASP116 ve ASN120 ile polar, THR93, ASN117, GLY118 ve PHE121 ile van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O3 atomu ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O3 atomu ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafesi en düşük enerjili yapıda 1.87 Å, MD simülasyonu süresince bu mesafenin ortalaması 1.95 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.226.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



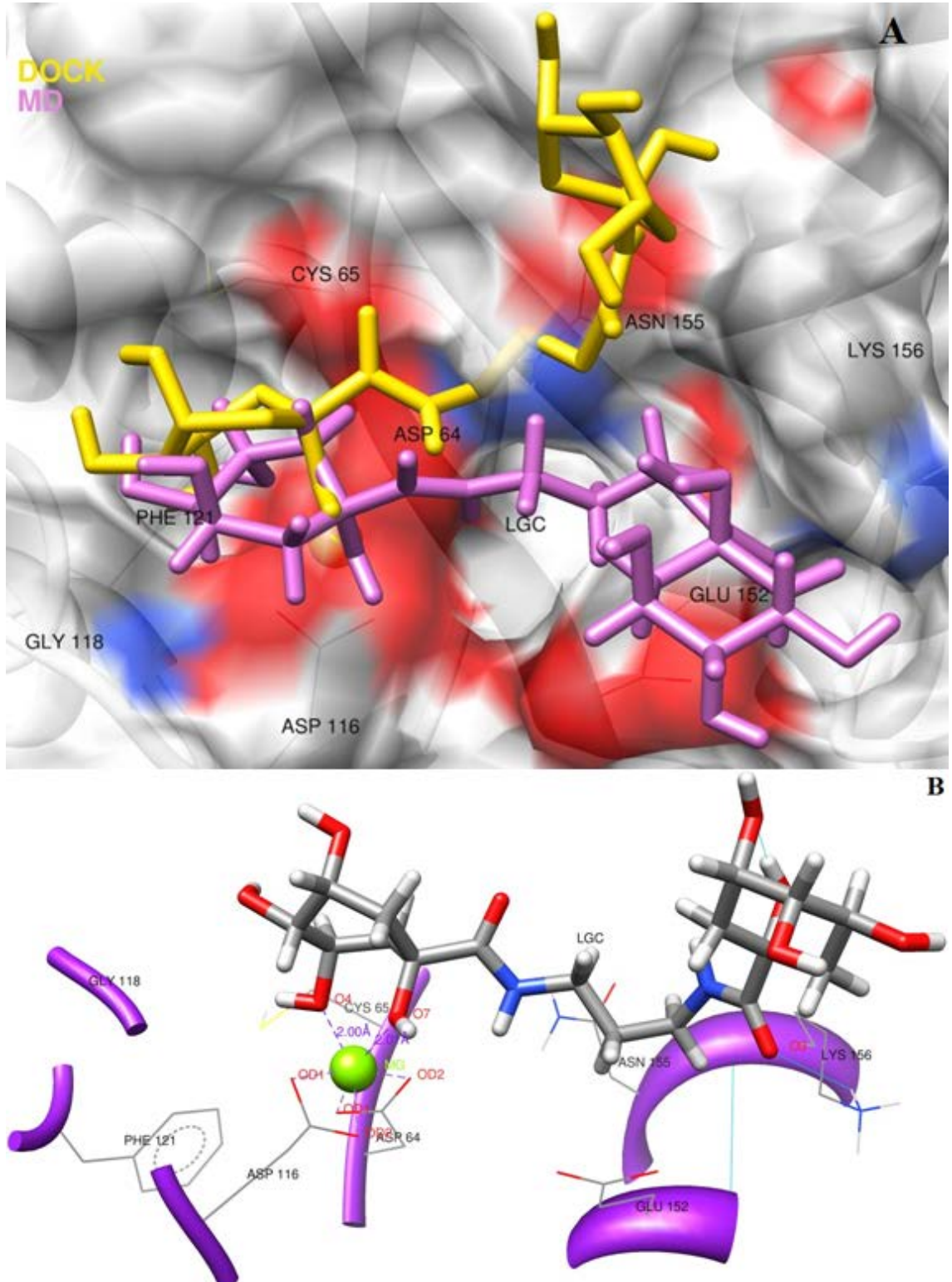
Şekil 4.220. A) LGC ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acome) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.221.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



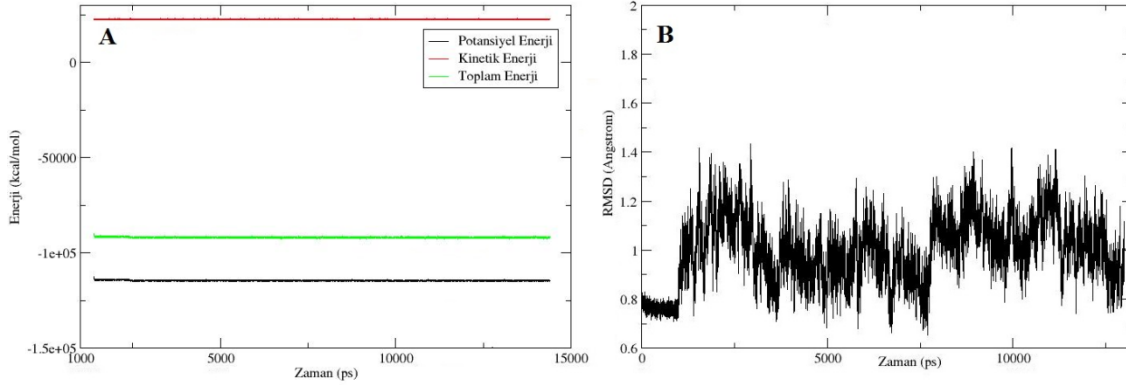
Şekil 4.221. LGC ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

LGC ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcomc) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.222.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGC ligandının konformasyonunun önemli ölçüde değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O3 atomu ile LYS156 kalıntısı ile hidrojen bağı yapmıştır. Ligandın ASP64, CYS65, ASP116, GLU152 ve ASN155 kalıntıları ile polar, GLY118 ve PHE121 kalıntıları ile van der Waals etkileşimleri gerçekleştirmektedir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD1-OD2 atomları, ligandın O4 ve O7 atomları ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O4 ve O7 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 2.00 Å ve 2.01 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları her iki atom çifti için 2.03 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.226.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



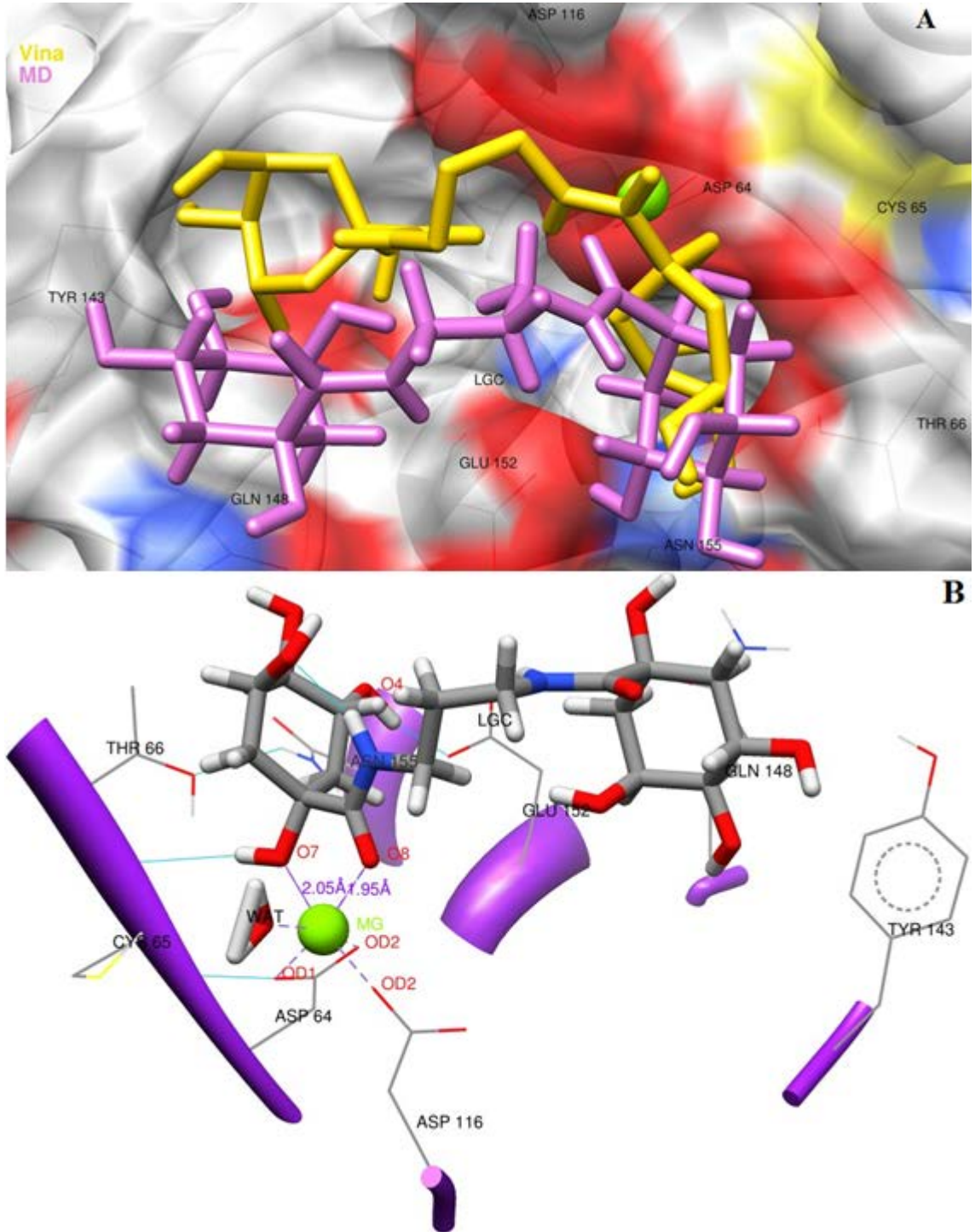
Şekil 4.222. A) LGC ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B)** Bu düşük enerjili komplekste (domec) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.223.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.223. LGC ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

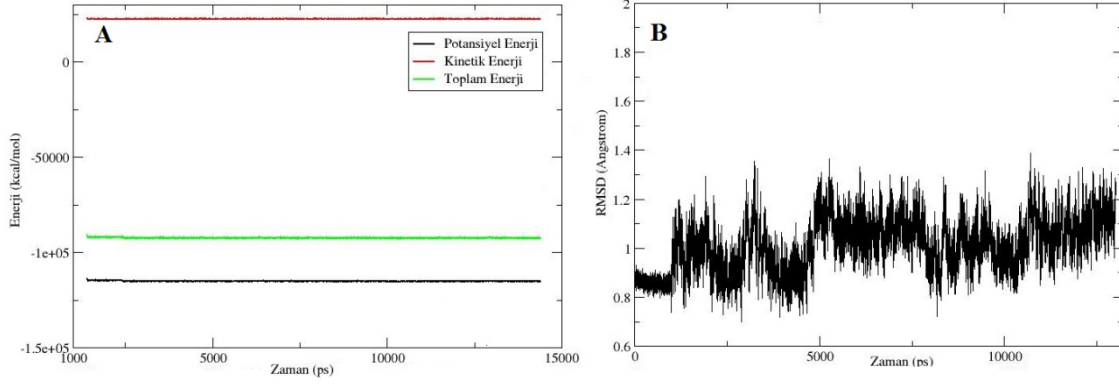
LGC ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcomc) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.224.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGC ligandının konformasyonunda küçük değişimlerin gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Ligandın O4 ve O7 oksijen atomlarına bağlı hidrojenler sırası ile GLU152 ve CYS65 kalıntıları ile hidrojen bağı oluşturmuşlardır. ASP64, THR66, ASP116, GLN148 ve ASN155 kalıntıları ile olan polar etkileşimler, HIE67 ve TYR143 kalıntıları ile olan van der Waals etkileşimleri ligandın vcomc kompleksindeki diğer etkileşimlerdir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O7, O8 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O7ve O8 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 2.05 Å ve 1.95 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 3.04 Å ve 1.95 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.226.'da gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



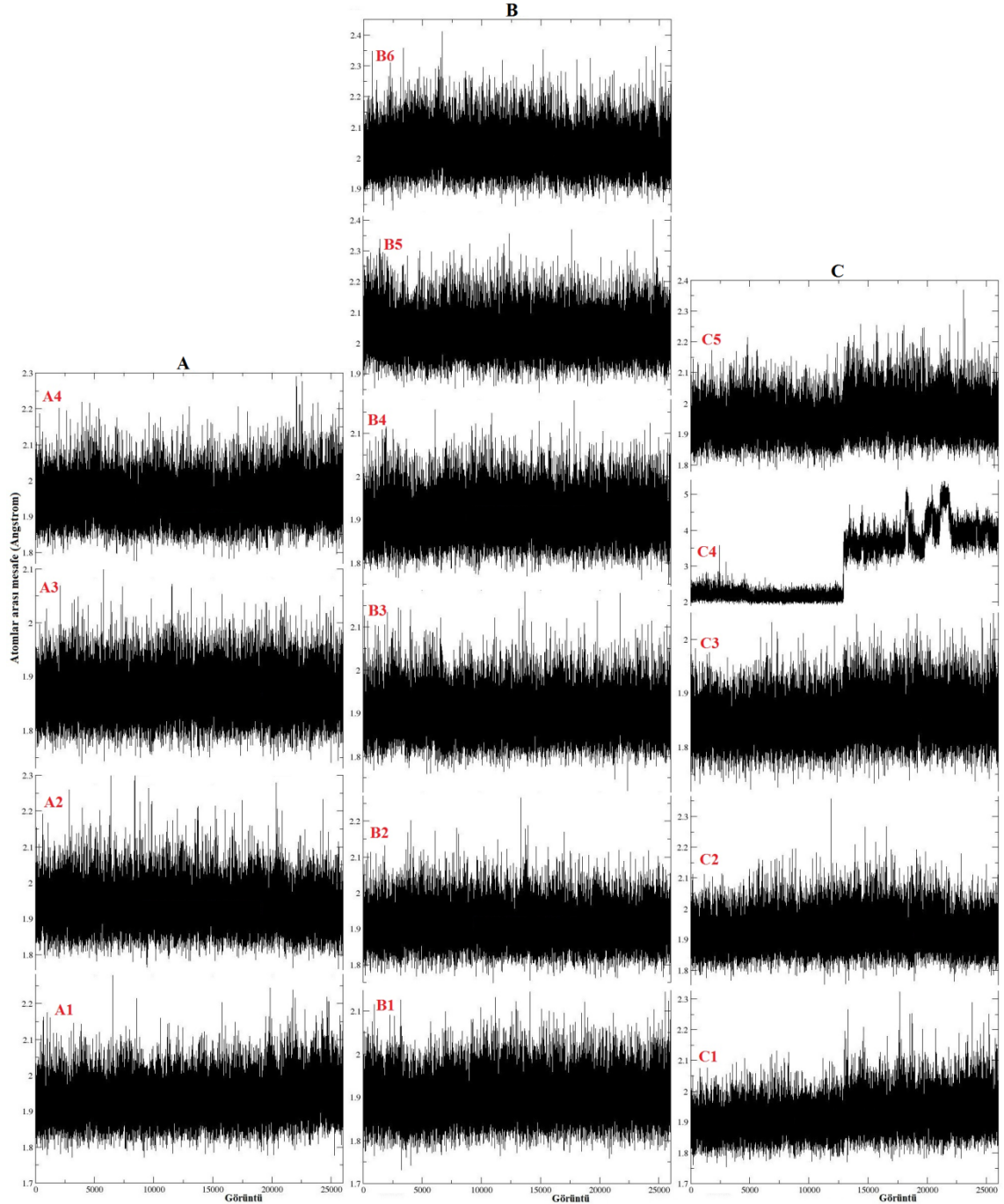
Şekil 4.224. A) LGC ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcom) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.225.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan

kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



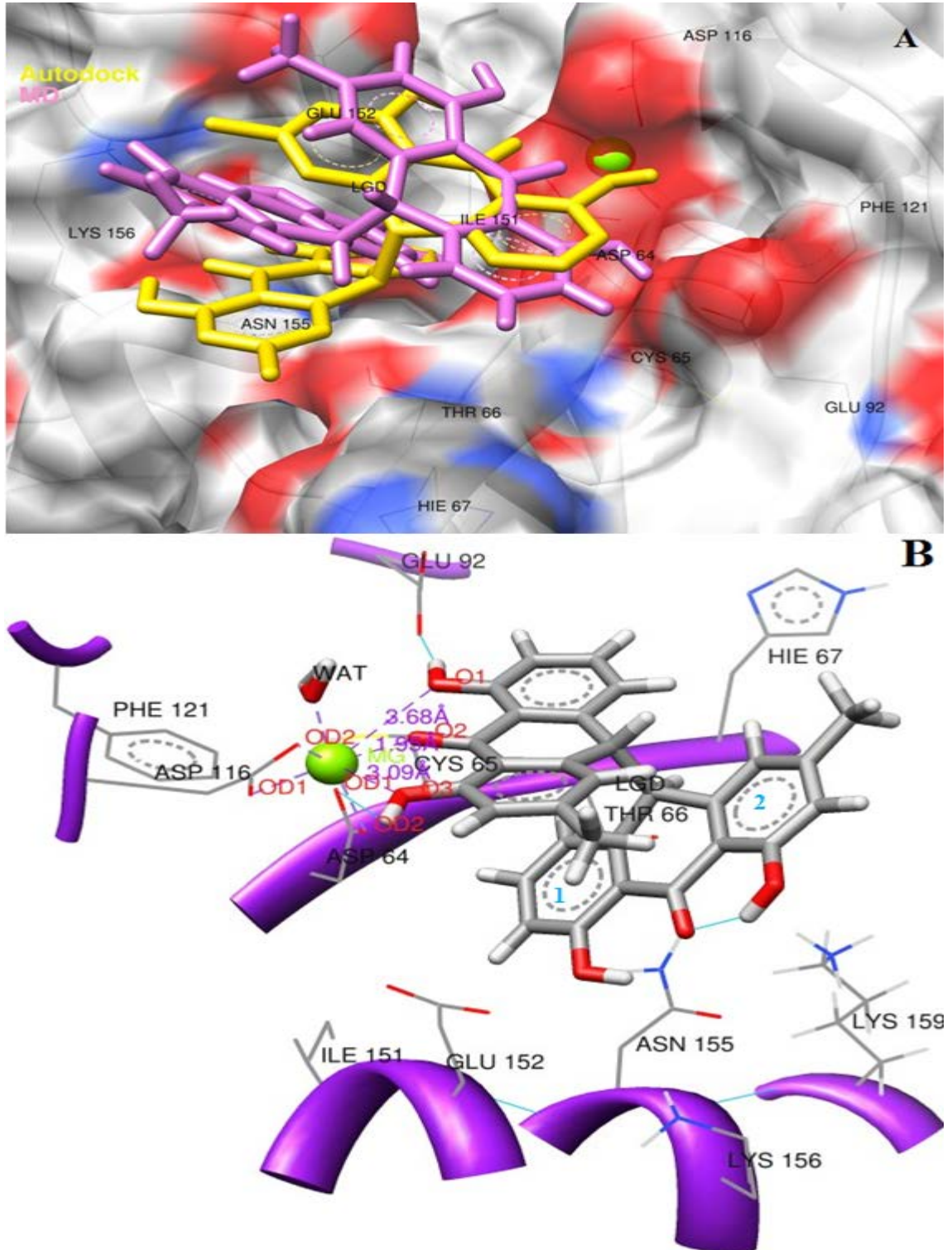
Şekil 4.225. LGC ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.226. İntegrasyon katalitik öz bölgesindeki (A: acomc.pdb, B: dcomc.pdb, C: vcomc.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: Mg-ASP64 OD1, A2: Mg-ASP64 OD2, A3: Mg-ASP116 OD2, A4: Mg-LGC O3, B1: Mg-ASP64 OD1, B2: Mg-ASP64 OD2, B3: Mg-ASP116 OD1, B4: Mg-ASP116 OD2, B5: Mg-LGC O4, B6: Mg-LGC O7, C1: Mg-ASP64 OD1, C2: Mg-ASP64 OD2, C3: Mg-ASP116 OD2, C4: Mg-LGC O7, C5: Mg-LGC O8)

LGD ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acomd) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki

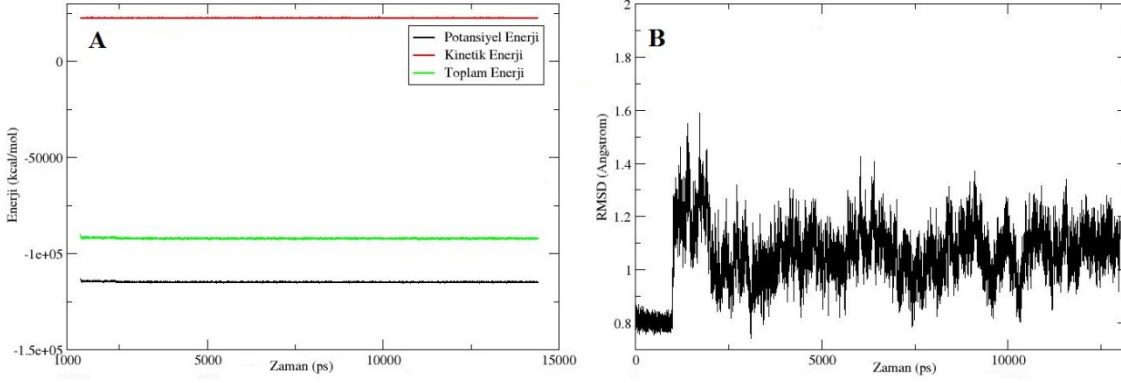
kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.227.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGD ligandının konformasyonunda önemli değişikliklerin meydana geldiği anlaşılmaktadır. Ligandın 1 rakamı ile belirlenmiş aromatik halkası ile Mg atomu ve LYS159 kalıntısı arasında, 2 rakamı ile belirlenmiş aromatik halka ile yine LYS159 kalıntısı arasında π - (+) etkileşimi bulunmaktadır. Ligandın O1 atomuna bağlı hidrojen ile GLU92 arasında hidrojen oluşmuştur. ASP64, CYS65, GLU92, ASP116, ASN155 ve LYS156 ile olan polar etkileşimler, THR66, HIE67, ILE151 ve GLU152 ile olan van der Waals etkileşimleri ligand ile protein arasındaki diğer etkileşimlerdir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD1-OD2 atomları, ligandın O1, O2, O3 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1, O2 ve O3 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 3.68 Å, 1.95 Å ve 3.09 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile 3.44 Å, 1.97 Å ve 3.38 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.233.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.227. A) LGD ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acomd) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir. Mavi ile yazılmış 1 ve 2 rakamları için metne bakınız.)

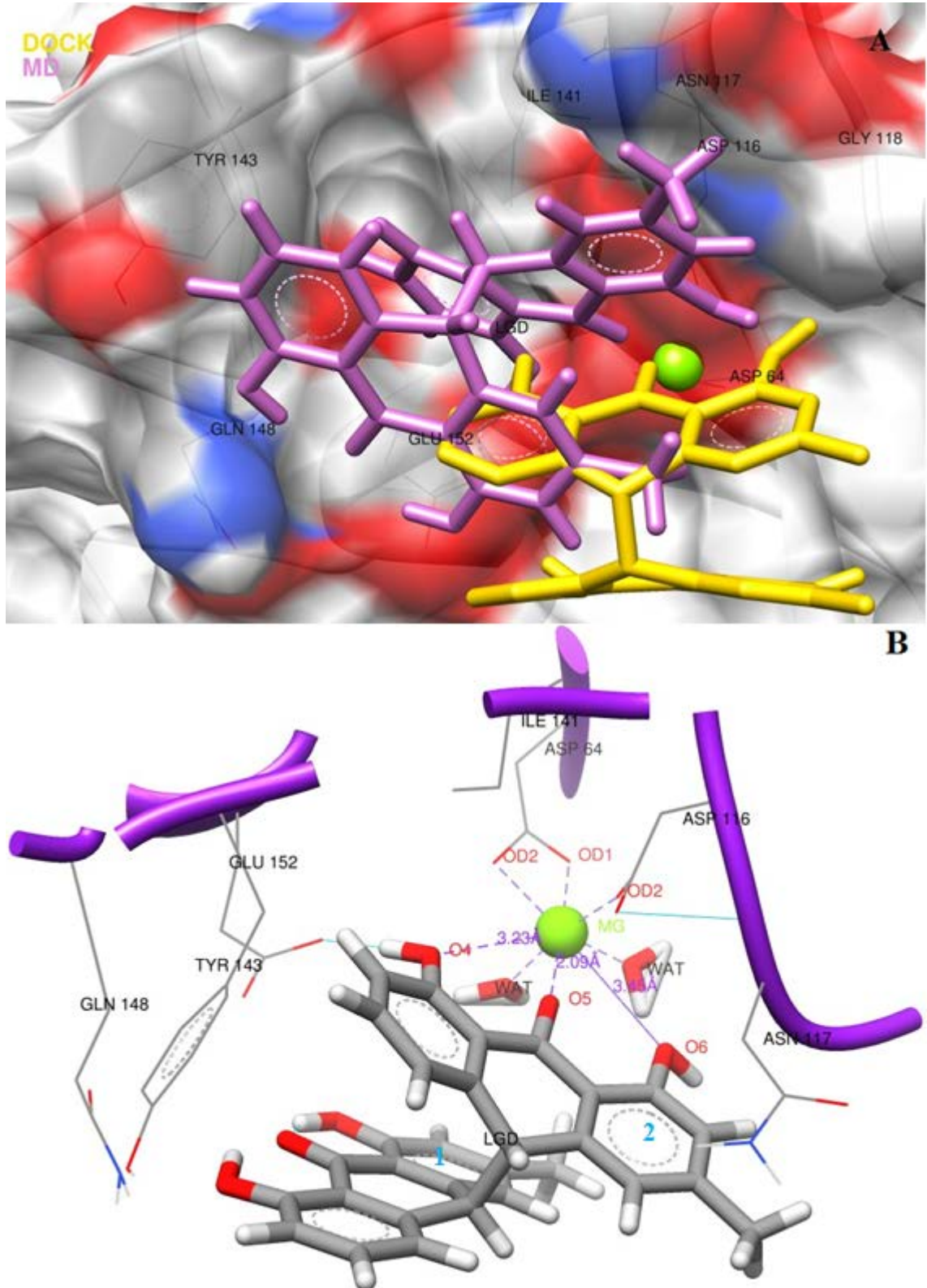
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.228.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de

negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns’de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.228. LGD ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

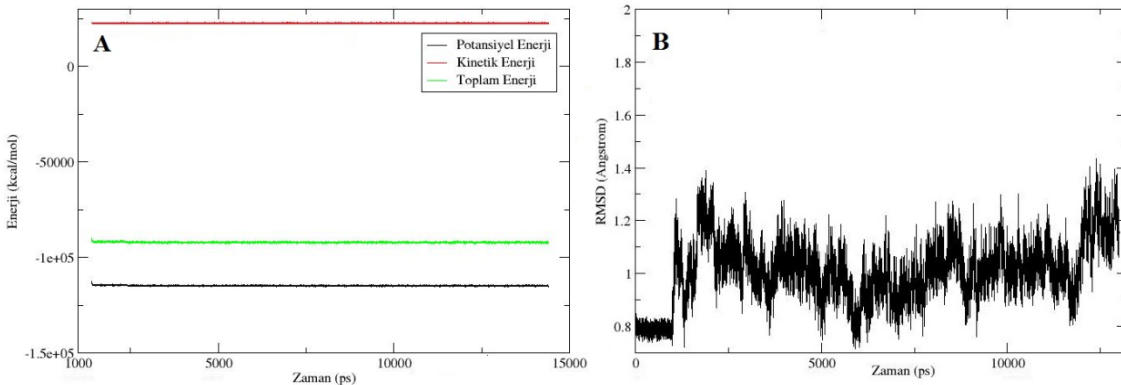
LGD ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcomd) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.229.’da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGD ligandının konformasyonunda değişiklikler meydana geldiği anlaşılmaktadır. Ligandın 1 rakamı ile belirtilen aromatik halkası ile Mg atomu arasında π -(+) etkileşimi, 2 ile belirtilen aromatik halkası ile ASN117 arasında π - σ etkileşimi bulunmaktadır. ligandın O4 oksijen atomuna bağlı olan hidrojen GLU152 kalıntısı ile hidrojen bağı kurmuştur. ASP64, ASP116, GLY118, TYR143 ve GLN148 ile polar etkileşimler, ILE141 ile van der Waals etkileşimi ligandın protein ile olan diğer etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın X, Y atomları ve Z tane su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın X ve Y atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile Å, Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları sırası ile Å ve Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.93.’te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.’te verilmiştir.



Şekil 4.229. A) LGD ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (dcomd) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir. Mavi ile yazılmış 1 ve 2 rakamları için metne bakınız.)

Mg atomu ile Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomları arasındaki mesafelerin zamanla değişim grafikleri Şekil 4.243.'te gösterilmiştir. Mg ve protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir. En düşük enerjili komplekste Mg atomu proteinden ASP64 OD1-OD2, ASP116 OD2 atomlarını, ligandan O5 atomunu ve iki su molekülünü metal kompleksine katmıştır. Ayrıca ligandın O4 ve O6 atomlarının da Mg atomu ile etkileşim halinde olduğu Şekil 4.232.'de görülmektedir. En düşük enerjili dcomd.pdb kompleksinde Mg-O4 atomları arasındaki mesafe 3.23 Å, Mg-O5 atomları arasındaki mesafe 2.09 Å, Mg-O6 atomları arasındaki mesafe ise 3.45 Å olarak belirlenmiştir. MD simülasyonları süresince aynı atom çiftleri arasındaki ortalama mesafeler sırasıyla 3.35 Å, 2.09 Å ve 3.64 Å olarak hesaplanmıştır. Ligandın 1 rakamı ile belirtilen aromatik halkası ile Mg atomu arasında π (+) etkileşimi, 2 ile belirtilen aromatik halkası ile ASN117 arasında π - σ etkileşimi bulunmaktadır. ligandın O4 oksijen atomuna bağlı olan hidrojen GLU152 kalıntısı ile hidrojen bağı kurmuştur. ASP64, ASP116, GLY118, TYR143 ve GLN148 ile polar etkileşimler, ILE141 ile van der Waals etkileşimi ligandın protein ile olan diğer etkileşimleridir.

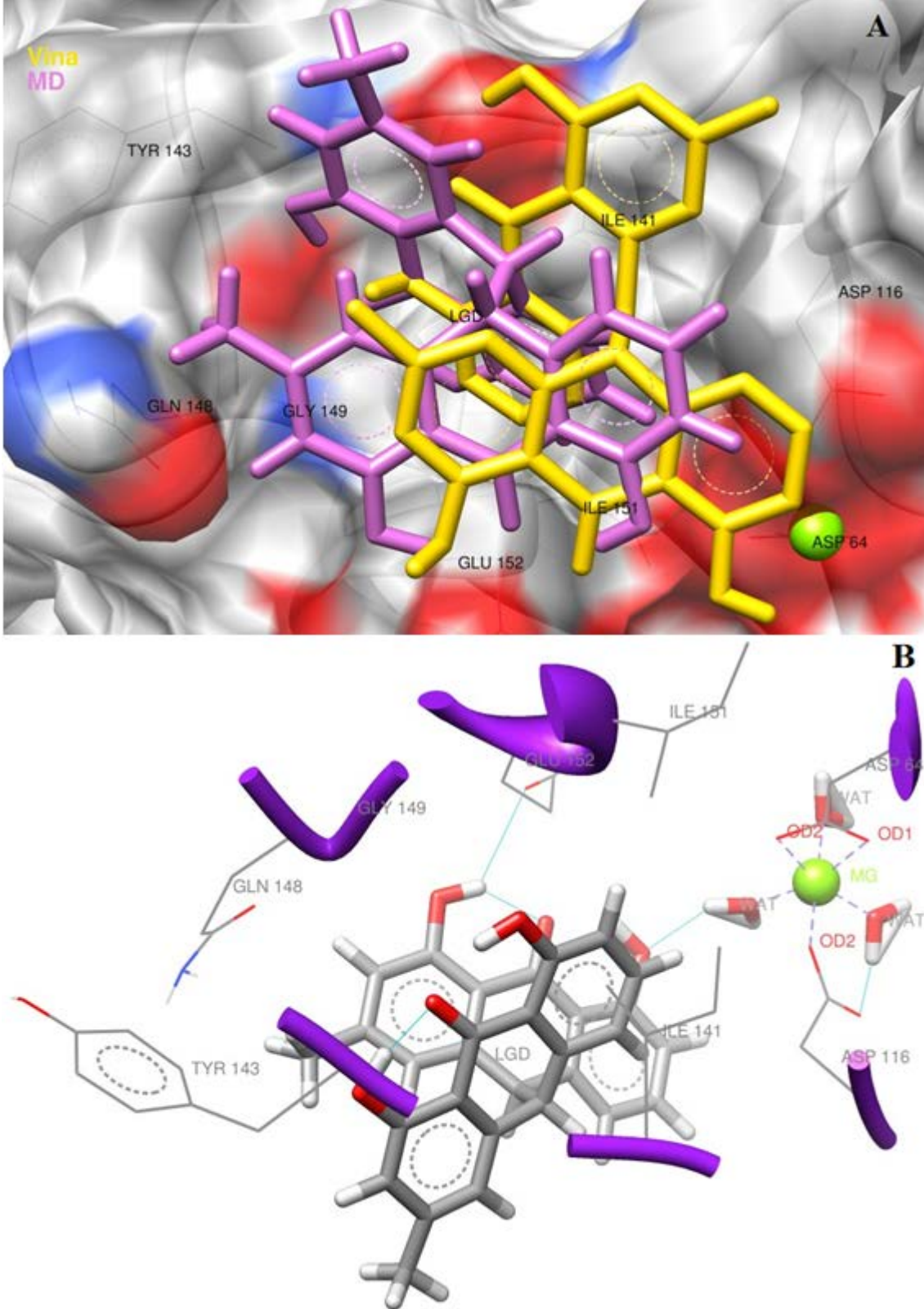
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.230.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.230. LGD ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

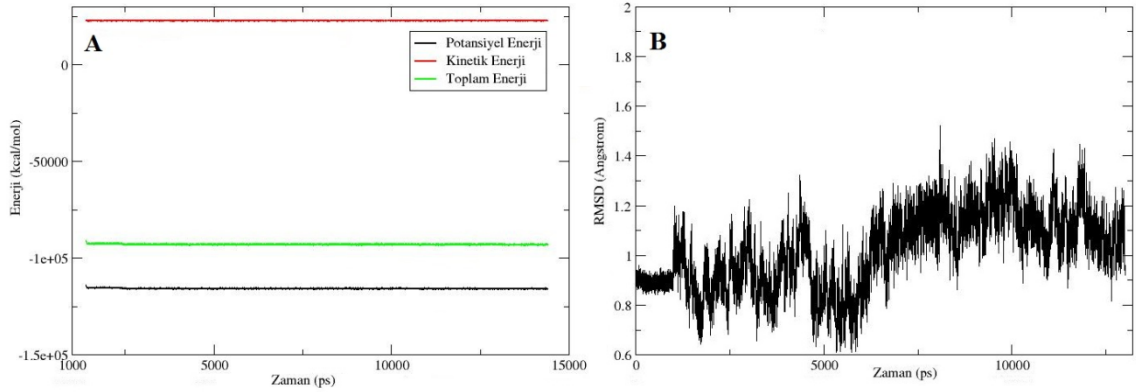
Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değeri önce yükselmiş sonra stabil bir hal almıştır. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.

LGD ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcomd) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.231.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGD ligandının konformasyonunda önemli değişikliklerin meydana geldiği anlaşılmaktadır. Ligand katalitik bölgede proteinin PRO142, TYR143, GLN148 ve GLU152 kalıntıları ile polar, ASP64, ASP116, ILE141, GLY149 ve ILE151 kalıntıları ile de van der Waals etkileşimleri yapmıştır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları ve üç su molekülü ile etkileşimde bulunurken Mg atomu ile etkileşen ligand atomu bulunmamaktadır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.233.'te gösterilmiş olup bu mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

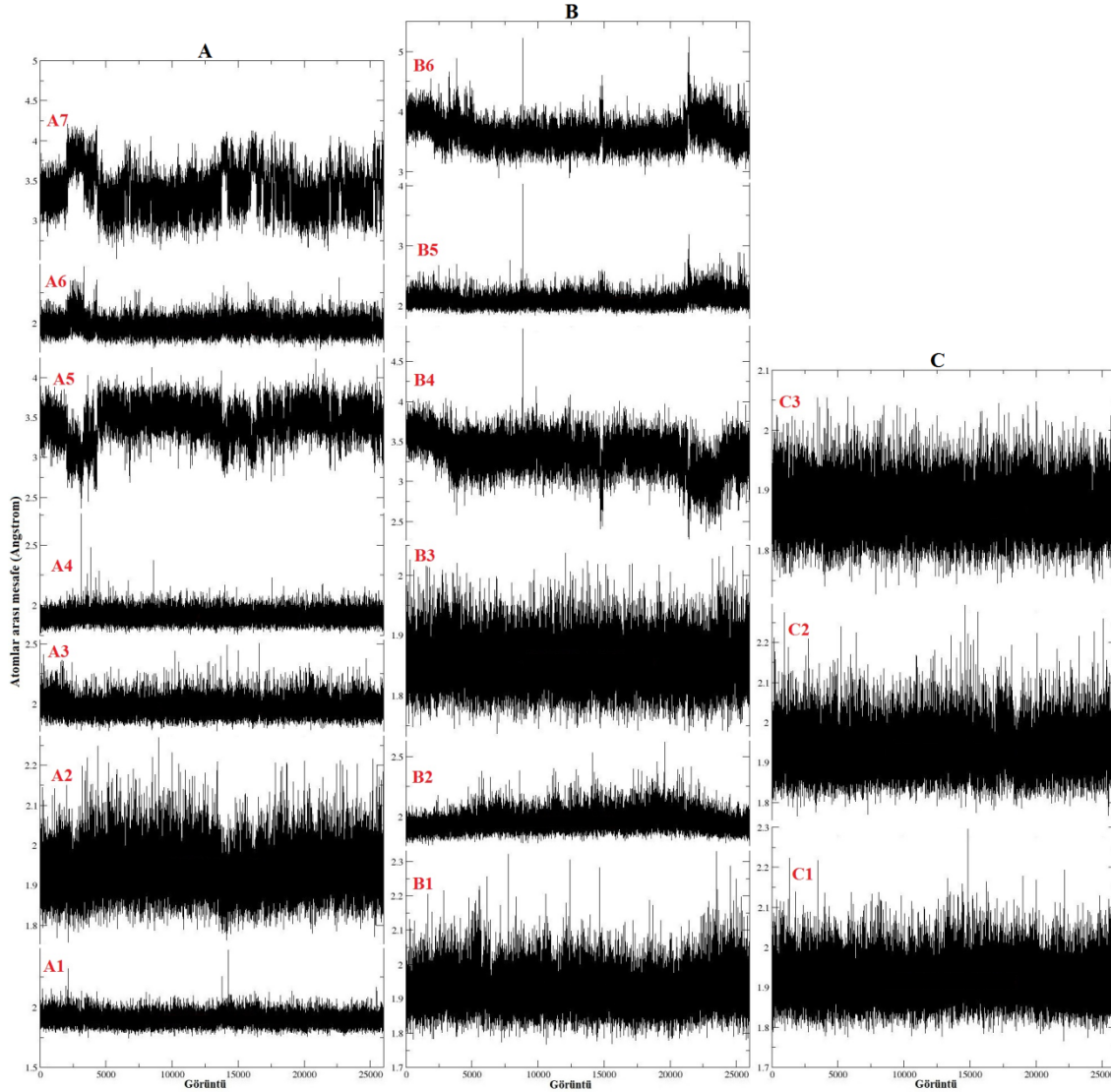


Şekil 4.231. A) LGD ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (vcomd) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.232.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



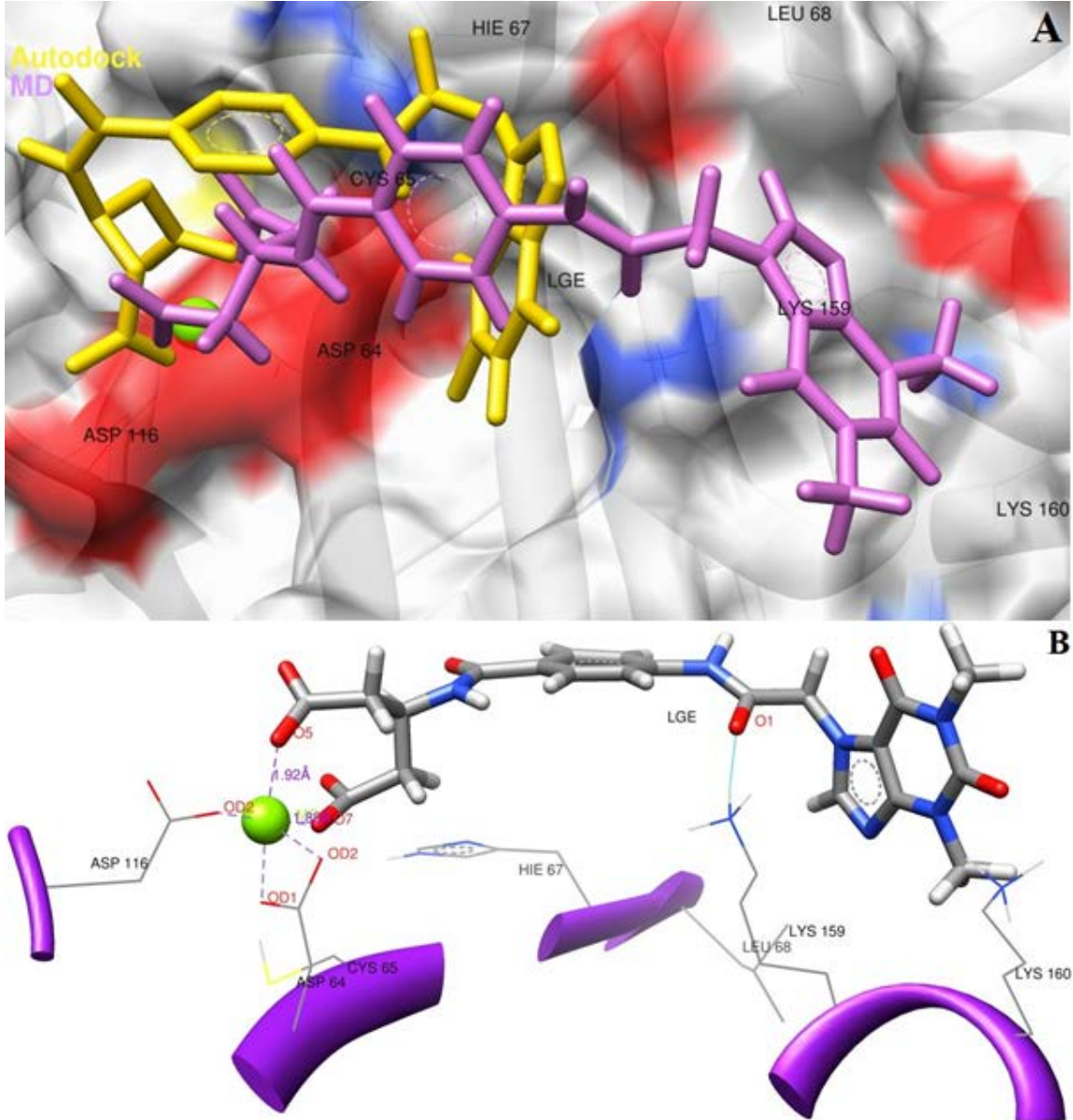
Şekil 4.232. LGD ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)



Şekil 4.233. İntegrainin katalitik öz bölgesindeki (**A:** acomd.pdb, **B:** dcomd.pdb, **C:** vcomd.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (**A1:** *Mg-ASP64 OD1*, **A2:** *Mg-ASP64 OD2*, **A3:** *Mg-ASP116 OD1*, **A4:** *Mg-ASP116 OD2*, **A5:** *Mg-LGD O1*, **A6:** *Mg-LGD O2*, **A7:** *Mg-LGD O3*, **B1:** *Mg-ASP64 OD1*, **B2:** *Mg-ASP64 OD2*, **B3:** *Mg-ASP116 OD2*, **B4:** *Mg-LGD O4*, **B5:** *Mg-LGD O5*, **B6:** *Mg-LGD O6*, **C1:** *Mg-ASP64 OD1*, **C2:** *Mg-ASP64 OD2*, **C3:** *Mg-ASP116 OD2*)

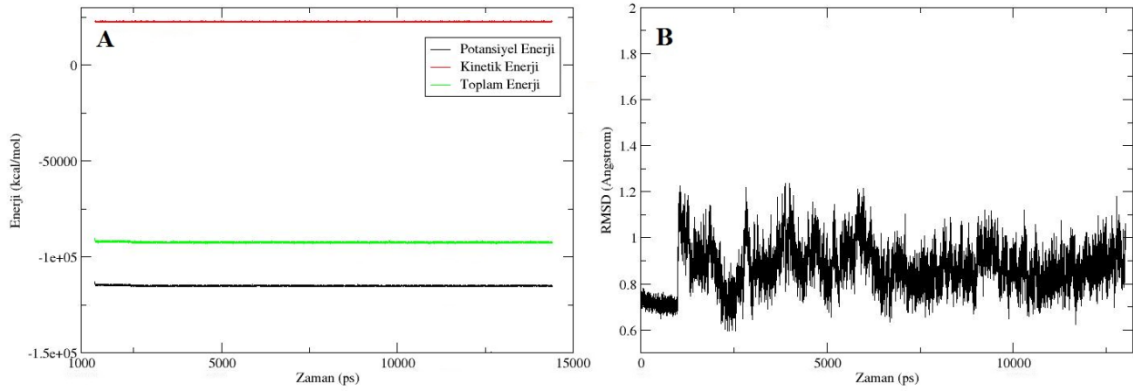
LGE ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (acome) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.234.'te gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGE ligandının konformasyonunda önemli değişiklikler meydana geldiği anlaşılmaktadır. Ligandın O5 ve O7 oksijeni ile Mg atomu, ASP64 ve ASP116 kalıntıları arasında yük etkileşimleri mevcuttur. Ligandın pürin halkası ile LYS159 arasında π (+) etkileşimi bulunmaktadır. Bunun yanında ligand, proteinin CYS65 kalıntısı ile polar, HIE67,

LEU68, LYS156 ve LYS160 kalıntıları ile de van der Waals etkileşimleri göstermiştir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O5 ve O7 atomları ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O5 ve O7 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 1.92 Å ve 1.88 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise sırası ile 1.87 Å ve 1.89 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.240.'ta gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



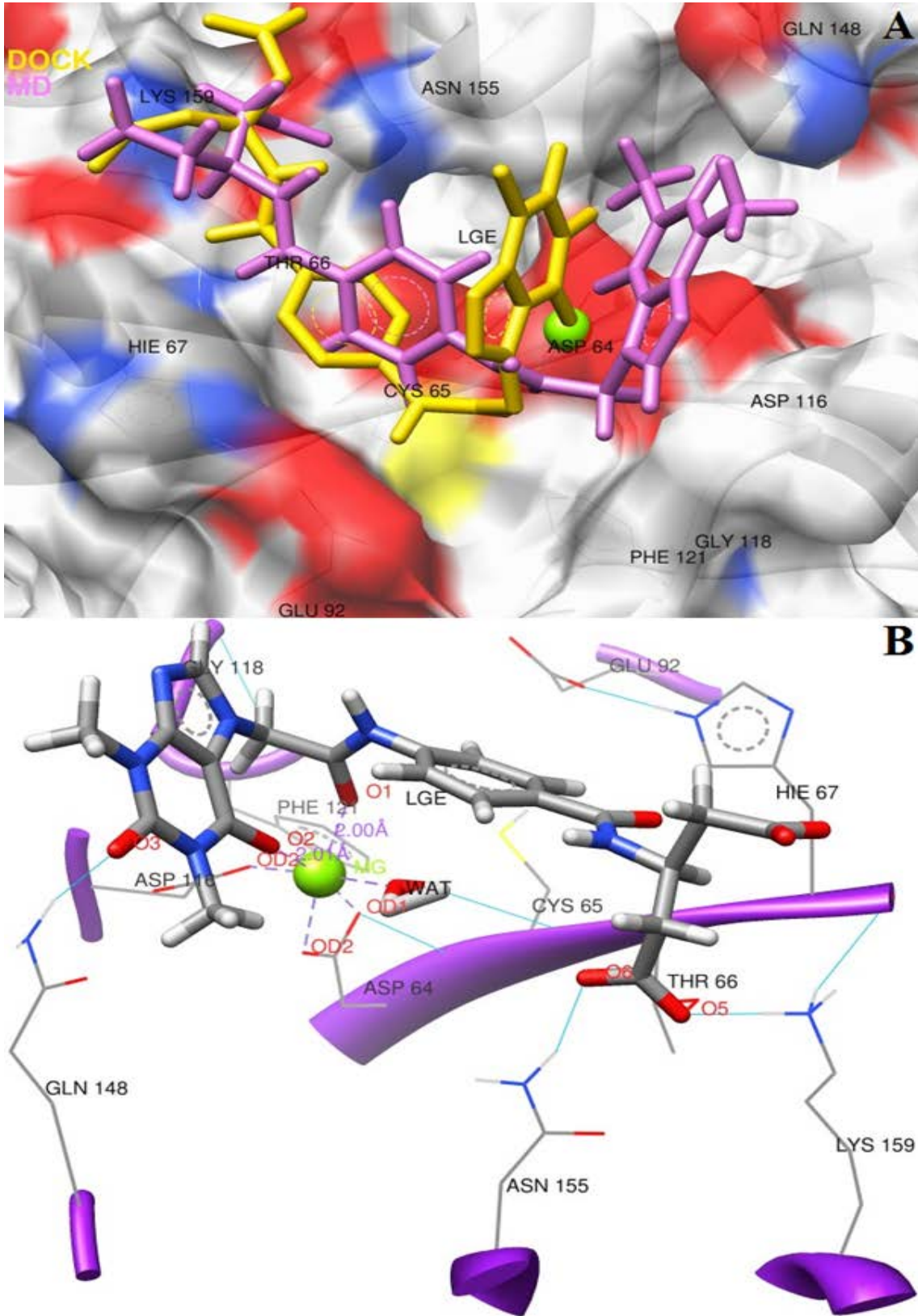
Şekil 4.234. A) LGE ligandının Autodock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (acome) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.235.'te verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



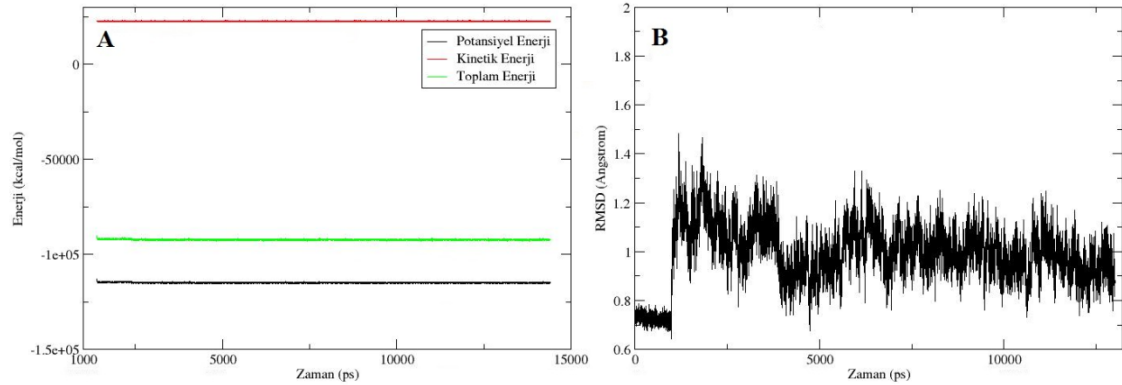
Şekil 4.235. LGE ligandının Autodock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

LGE ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksdeki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (dcomd) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.236.'da gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGE ligandının konformasyonunun fazla değişmediği anlaşılmaktadır. Ligandın fenil halkası Mg atomu ile π (+) etkileşimi yapmıştır. O3 ve O6 oksijen atomları sırasıyla GLN148, LYS159 ile O5 oksijen atomu ise THR66 ve ASN155 ile hidrojen bağı kurmuştur. ASP64, HIE67, ASP116 ve ASN117 ile polar, CYS65, GLU92, GLY118, PHE121 ve GLU152 ile van der Waals etkileşimleri ligandın proteinle olan diğer etkileşimleridir. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ligandın O1, O2 atomları ve bir su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Ligandın O1 ve O2 atomları ile Mg atomu arasındaki etkileşim mesafeleri sırası ile 2.00 Å ve 2.01 Å, MD simülasyonu süresince değişen mesafelerinin ortalamaları ise her iki atom çifti için 1.96 Å olarak hesaplanmıştır. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.240.'ta gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



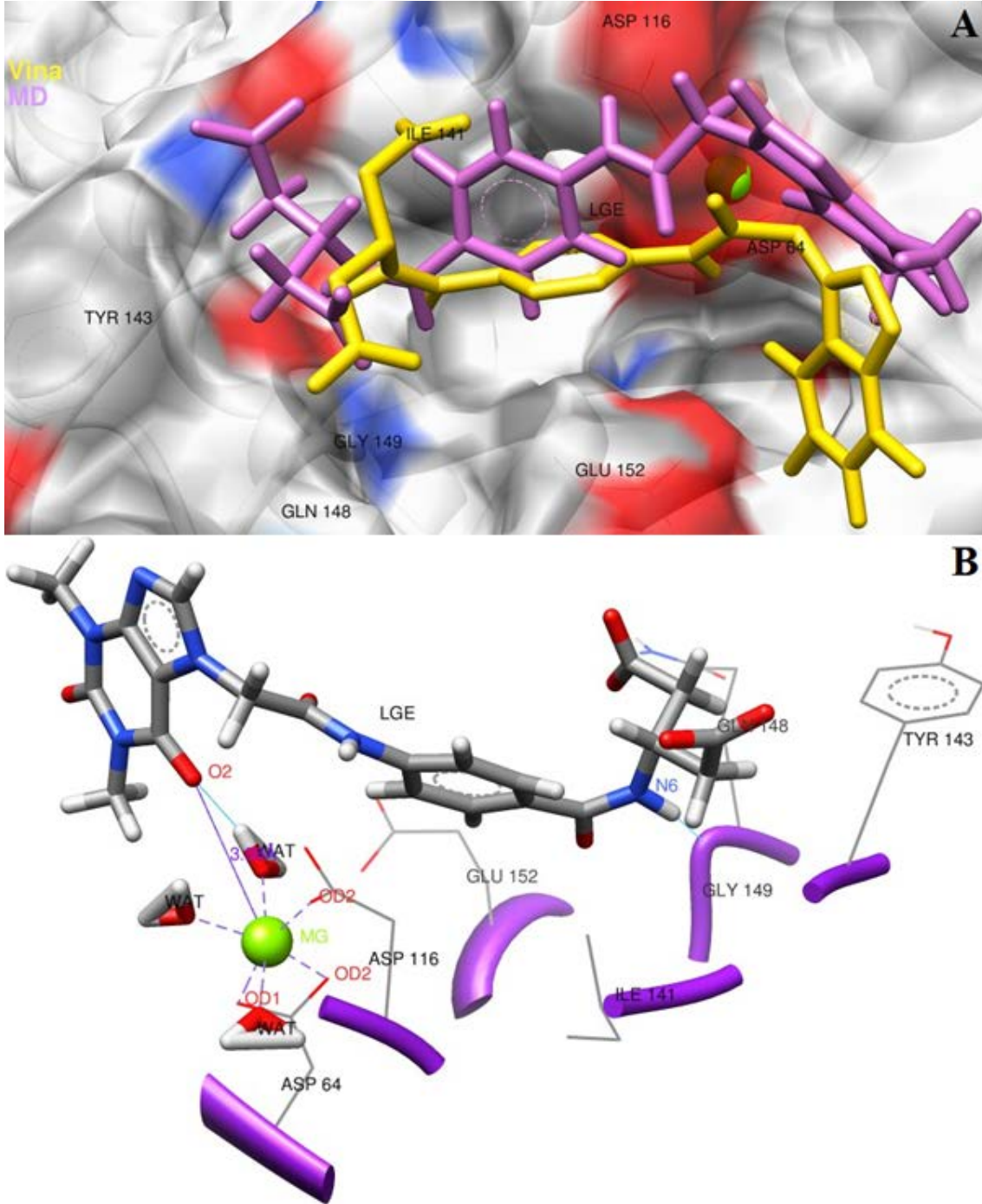
Şekil 4.236. A) LGE ligandının Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapıdaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapıdaki görüntüleri **B**) Bu düşük enerjili komplekste (dcome) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.237.'de verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.237. LGE ligandının Dock ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

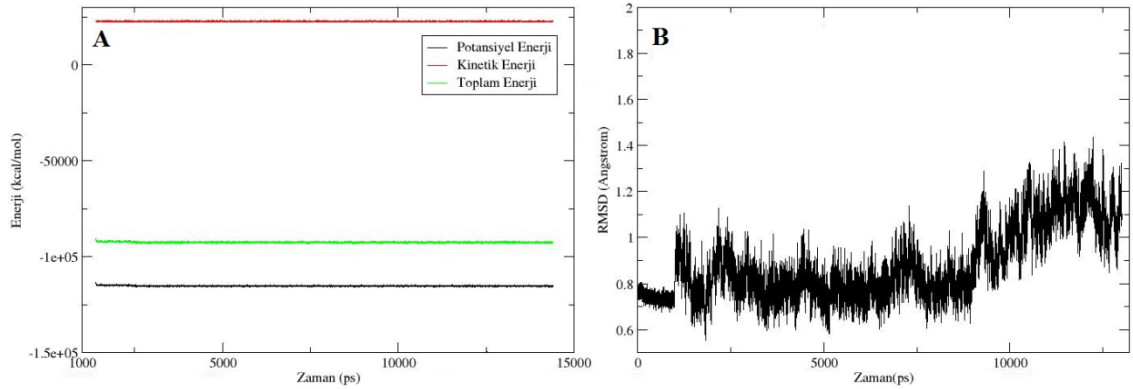
LGE ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksteki başlangıç konformasyonu, bu kompleksin (vcome) MD hesaplamaları sonucu elde edilen en düşük enerjili yapılarından birisindeki konformasyonu ve proteindeki kalıntılarla etkileşimleri Şekil 4.238.'de gösterilmiştir. MD hesaplamaları ile LGE ligandının konformasyonunun değiştiği anlaşılmaktadır. Ligandın N6 azot atomuna bağlı hidrojeni ASP116 ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Diğer taraftan ligandın protein kalıntıları ILE141, PRO142, GLN148 ve GLY149 arasında polar, TYR143, ASN144 ve GLU152 arasında ise van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır. En düşük enerjili kompleks yapısında Mg atomu proteinin ASP64 OD1-OD2 ve ASP116 OD2 atomları, ve üç su molekülü ile etkileşimde bulunmaktadır. Mg ile ligandın O2 oksijeni ile uzak da olsa etkileşimi bulunmaktadır. En düşük enerjili vcome kompleksinde Mg-O2 atomları arasındaki mesafe 3.98 Å iken, MD simülasyonları süresince ortalama mesafeleri sırasıyla 4.47 Å olarak hesaplanmıştır. Bu da Mg ile ligand arasındaki etkileşimin kuvvetli olmadığını göstermektedir. Mg atomuyla etkileşim halinde olan protein kalıntı atomları ve ligand atomlarının Mg atomu ile aralarındaki mesafelerin zamanla değişimi Şekil 4.240.'te gösterilmiş olup Mg atomu ile protein kalıntıları arasındaki mesafelerin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.238. A) LGE ligandının Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu elde edilen ilk yapısındaki ve bu yapının MD hesaplamaları sonucu en düşük potansiyel enerji değerine tekabül eden yapısındaki görüntüleri B) Bu düşük enerjili komplekste (vcome) ligand ile protein etkileşimlerinin açık gösterimi (Turkuaz renkli hatlar hidrojen bağlarını temsil etmektedir.)

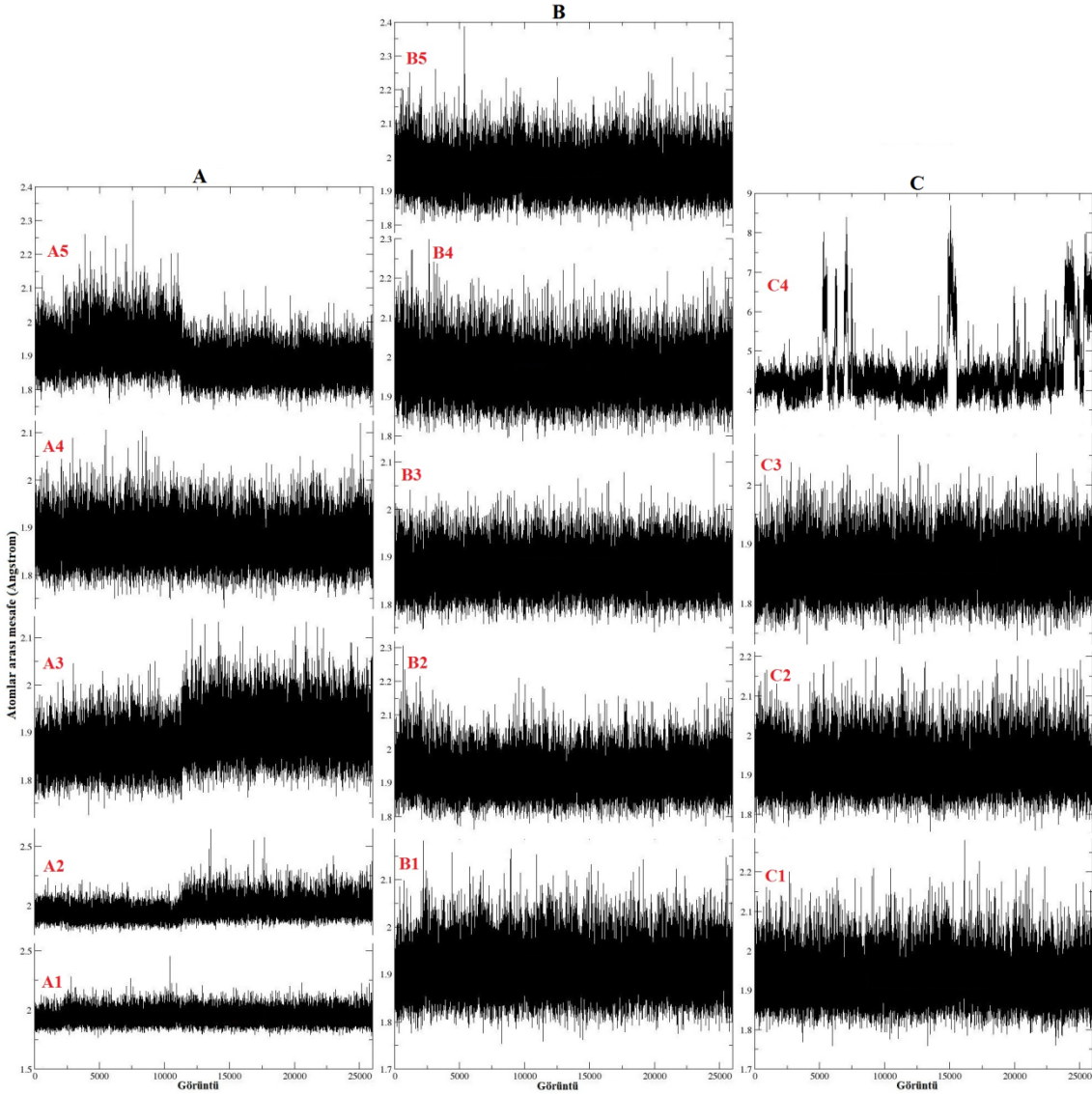
Bu kompleksin zamana karşı enerji ve RMSD değişimleri Şekil 4.239.'da verilmiştir. Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns'de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değerinin önce yükseldiği sonra

stabil bir hal aldığı görülmektedir. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.239. LGE ligandının Vina ile proteine yerleştirilmesiyle oluşan kompleksin MD hesaplamaları sonucu zamana karşı; **A)** enerji, **B)** başlangıç konformasyonu referans alınarak RMSD değişimi (61-185 kalıntıları ve ligand alınmıştır)

Potansiyel enerji değerinin düşerek stabil hale geldiği ve toplam enerjinin de negatif olduğu görülmektedir. RMSD grafiği dikkate alındığında ilk 1 ns’de uygulanan kuvvetin kompleks üzerinden kaldırılması ile RMSD değeri önce yükselmiş sonra stabil bir hal almıştır. Bu da yapının kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.240. İntegrazın katalitik öz bölgesindeki (A: acome.pdb, B: dcome.pdb, C: vcome.pdb) magnezyum atomu ile bağlı bulunduğu atomlar arasında moleküler dinamik sonucu elde edilen bağ uzunlukları değişiminin gösterilmesi (A1: *Mg-ASP64 OD1*, A2: *Mg-ASP64 OD2*, A3: *Mg-ASP116 OD2*, A4: *Mg-LGE O5*, A5: *Mg-LGE O7*, B1: *Mg-ASP64 OD1*, B2: *Mg-ASP64 OD2*, B3: *Mg-ASP116 OD2*, B4: *Mg-LGE O1*, B5: *Mg-LGE O2*, C1: *Mg-ASP64 OD1*, C2: *Mg-ASP64 OD2*, C3: *Mg-ASP116 OD2*, C4: *Mg-LGE O2*)

Mg atomunun bütün komplekslerde MD simülasyonları süresince kendisi ile ilişkide olan protein atomları ile aralarındaki etkileşim mesafelerinin ortalamaları Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.3. MD hesaplamaları sonucu komplekslerdeki Mg atomu ile Mg atomuna yakın atomlar arasındaki ortalama mesafeler (Angstrom cinsinden)

Kompleksler	ASP64		ASP116		X
	Mg-OD1	Mg-OD2	Mg-OD1	Mg-OD2	Mg-O
acom01.pdb	1.90	1.95	-	1.85	-
acom02t.pdb	1.91	1.92	-	1.86	-
acom03.pdb	1.93	1.91	-	1.85	-
acom04.pdb	1.93	1.91	-	1.85	-
acom06.pdb	1.93	1.94	-	1.88	-
acom07.pdb	1.90	-	-	1.87	-
acom16.pdb	1.92	1.91	-	1.85	-
acom17.pdb	1.93	1.91	-	1.85	-
acom18.pdb	1.92	2.20	-	1.85	-
acom20.pdb	1.93	1.92	-	1.85	-
acom21.pdb	1.89	-	-	1.87	-
acom22.pdb	1.93	1.92	-	1.85	-
acom25.pdb	1.93	1.91	-	1.85	-
acom26.pdb	1.93	1.92	-	1.85	-
acom27.pdb	1.93	1.91	-	1.85	-
acom28.pdb	1.91	1.94	-	1.85	-
acom32.pdb	1.95	1.96	-	1.88	-
acom33.pdb	1.95	1.93	-	1.86	-
acom34.pdb	1.93	1.95	5.93	6.41	-
acom35.pdb	1.94	2.26	-	1.88	-
acoma.pdb	1.89	-	-	1.88	-
acomb.pdb	1.93	1.92	-	1.85	-
acomc.pdb	1.93	1.93	-	1.97	-
acomd.pdb	1.90	1.93	1.97	1.91	-
acome.pdb	1.94	1.96	-	1.88	-
dcom01.pdb	1.91	1.94	-	1.86	-

X: Mg atomunun ASP64 ve ASP116 dışındaki kalıntılarla etkileşimi

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Tablo 4.3. MD hesaplamaları sonucu komplekslerdeki Mg atomu ile Mg atomuna yakın atomlar arasındaki ortalama mesafeler (Angstrom cinsinden) (Devamı)

Kompleksler	ASP64		ASP116		X
	Mg-OD1	Mg-OD2	Mg-OD1	Mg-OD2	Mg-O
dcom02.pdb	1.91	1.92	2.12	1.91	-
dcom02t.pdb	1.90	1.92	-	1.85	-
dcom03.pdb	1.93	1.94	-	1.88	-
dcom04.pdb	1.93	1.93	1.93	1.93	-
dcom13.pdb	1.91	1.93	-	1.86	-
dcom17.pdb	-	1.90	-	1.89	-
dcom18.pdb	1.93	1.95	-	1.88	-
dcom20.pdb	-	1.91	-	1.87	-
dcom21.pdb	1.93	1.91	-	1.86	-
dcom22.pdb	1.90	1.95	-	1.86	-
dcom25.pdb	1.94	1.95	-	1.88	-
dcom27.pdb	1.92	1.94	-	1.87	-
dcom32.pdb	1.90	1.91	-	1.85	-
dcom33.pdb	1.95	1.91	-	3.84	-
dcom34.pdb	1.91	1.94	-	1.86	1.84 ^a
dcom35.pdb	1.93	1.95	-	1.89	-
dcoma.pdb	1.96	1.95	-	1.87	-
dcomb.pdb	1.92	1.96	-	1.87	-
dcomc.pdb	1.90	1.91	1.90	1.91	-
dcomd.pdb	1.93	1.96	-	1.85	-
dcome.pdb	1.91	1.92	-	1.87	-
vcom01.pdb	1.89	1.93	1.92	3.36	-
vcom02.pdb	1.91	1.92	1.92	1.90	-
vcom05.pdb	1.92	1.93	1.87	1.95	-
vcom07.pdb	1.92	1.94	-	1.88	-

X: Mg atomunun ASP64 ve ASP116 dışındaki kalıntılarla etkileşimi, ^aGLU152 oksijeni

Tablo 4.3. MD hesaplamaları sonucu komplekslerdeki Mg atomu ile Mg atomuna yakın atomlar arasındaki ortalama mesafeler (Angstrom cinsinden) (Devamı)

Kompleksler	ASP64		ASP116		X
	Mg-OD1	Mg-OD2	Mg-OD1	Mg-OD2	Mg-O
vcom13.pdb	1.91	1.93	-	1.85	4.13 ^b
vcom14.pdb	1.90	1.93	1.93	1.90	-
vcom19.pdb	1.92	1.93	-	1.86	-
vcom29.pdb	1.92	1.94	-	1.87	-
vcom34.pdb	1.94	1.95	-	1.89	-
vcom35.pdb	1.92	1.92	-	1.87	-
vcoma.pdb	1.94	1.91	-	1.85	-
vcomb.pdb	1.93	1.94	-	1.89	-
vcomc.pdb	1.92	1.92	-	1.85	-
vcomd.pdb	1.91	1.93	-	1.87	-
vcome.pdb	1.93	1.92	-	1.86	-
full01.pdb	1.86	-	3.70	1.93	-
full02.pdb	1.86	-	1.94	1.94	-
fulla.pdb	1.86	-	3.78	1.96	-
fullb.pdb	1.87	-	3.79	1.94	-

X: Mg atomunun ASP64 ve ASP116 dışındaki kalıntılarla etkileşimi, ^bLEU63 oksijeni

Mg atomunun proteinin ASP64 ve ASP116 kalıntılarının karboksilik oksijenleri arasındaki mesafelere bakıldığında, Autodock ile yerleştirilen L34 ligandının kompleksi acom34.pdb yapısındaki ASP116 oksijenlerinin uzaklaşması dışında bütün komplekslerde bu etkileşimlerin mesafelerinin uygun olduğu Tablo 4.3.te görülmektedir. Ayrıca Mg atomunun dcom34.pdb yapısında GLU152 oksijeni ile yakın etkileşimde (ortalama 1.84 Å) bulunduğu gözlenmiştir. Mg atomunun ASP64 ve ASP116 dışında etkileştiği kalıntı bulunan diğer bir yapı vcom13.pdb kompleksidir. Burada Mg atomu LEU63 kalıntısının ana zincirdeki oksijen atomu ile uzak da olsa etkileşim kurduğu belirlenmiştir.

Autodock ve Dock ile yapılan yerleştirme işlemleri sonucu oluşan komplekslerin MD hesaplamalarından, tüm komplekslerin kararlı oldukları ve MD hesaplamaları süresince ligandların aktif merkeze bağlı kalarak yerlerini korudukları görülmüştür.

Vina ile yapılan yerleştirmelerin çoğunda Başlık 4.3.'te de bahsedildiği gibi, ligandların çoğu Mg atomuna uzak duracak şekilde konumlanmış ve ve diğer iki programla karşılaştırıldığında diğer programların pek de yüksek skor belirlemediği L19, L29 gibi ligandlara yüksek skorlar vermiştir. Vina programı ile yerleştirilen L32 ve L33 ligandları katalitik bölgeden uzaklaşmış ve bu ligandlara ait MD sonuçları burada verilmemiştir. Diğer taraftan Vina ile proteine yerleştirilen L02, L14 ve LGD ligandlarının Mg atomu ile etkileşmedikleri ancak katalitik bölgedeki kalıntılarla etkileştikleri ve bu nedenle katalitik bölgede tutundukları görülmüştür. Böylelikle; iyi bir inhibitör geliştirilmesinin sadece Mg atomu ile iyi etkileşen bir ligand ile sınırlı olmadığı aynı zamanda katalitik bölgede yer alan kalıntılarla da etkileşimlerin kompleksleşmede önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Tasarımları tarafımızdan yapılan 5 ligandın da (LGA, LGB, LGC, LGD ve LGE) her üç programla oluşturulan komplekslerinin MD hesaplamaları sonucunda katalitik bölgede tutunması ve Mg atomu ile etkileşim halinde oldukları dikkate değerdir. Bunun yanında, ilk kez HIV-1 IN için bir çalışmada inhibitör olarak kullanılan L32, L33, L34 ve L35 ligandlarının da katalitik bölgede tutunduğu ve Mg atomu ile etkileştikleri görüldü. Fakat, bunlardan L32 ve L33 ligandlarının Vina ile hazırlanan komplekslerinde, MD hesaplamaları sonucunda proteinin aktif merkezinden ayrılarak uzaklaştıkları görüldü. Özet olarak, Autodock ve Dock programlarının çalışılan ligandları HIV-1 integras proteinine Vina'dan daha iyi yerleştirdiği ancak Autodock ve Dock arasında bir tercih yapmanın zor olduğu anlaşılmıştır.

4.5. Bağlanma Serbest Enerjileri

Ligandların Autodock, Dock ve Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesi sonucu hazırlanan ve MD hesaplamaları sonucu MM/PBSA ile bulunan bağlanma enerjileri sırası ile Tablo 4.4.'te, bağlanma enerjilerine elektrostatik enerji ve van der Waals etkileşimlerinin katkıları ise Tablo 4.5.'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Ligandların Autodock, Dock ve Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle hazırlanan ve MD hesaplamaları sonucu MM/PBSA ile kcal/mol cinsinden bulunun bağlanma enerjileri (Standart sapmalar parantez içinde verilmiştir.)

Ligand	IC ₅₀ ^c	Perl ^a			Python ^b		
		Autodock ^d	Dock ^e	Vina ^f	Autodock ^d	Dock ^e	Vina ^f
L01	2.1 ^g	-2.85 (3.25)	-6.87 (4.00)	-8.10 (6.15)	-0.72 (3.42)	-4.78 (4.12)	-5.50 (5.79)
L02	0.009 ^h	-	-12.28 (3.74)	-3.07 (6.92)	-	-9.82 (3.96)	-0.25 (7.33)
L02t	0.009 ^h	-34.55 (3.91)	-29.16 (4.12)	-	-32.11 (0.39)	-26.73 (4.07)	-
L03	1.83 ⁱ	-42.86 (3.99)	-30.64 (3.02)	-	-40.45 (0.41)	-28.48 (2.87)	-
L04	0.015 ^h	-38.46 (4.76)	-22.21 (4.20)	-	-36.30 (4.88)	-19.65 (4.25)	-
L05	0.02 ^j	-	-	-11.50 (2.83)	-	-	-9.59 (2.89)
L06	0.05 ^k	-21.09 (3.16)	-	-	-19.24 (3.17)	-	-
L07	0.007 ^h	-11.38 (6.69)	-	-15.80 (4.78)	-8.69 (6.77)	-	-13.03 (4.96)
L13	0.8 ^l	-	-18.26 (4.44)	-3.53 (4.83)	-	-15.57 (4.41)	-0.29 (4.88)
L14	4.0 ^m	-	-	-14.24 (2.42)	-	-	-12.23 (2.55)
L16	1.1 ⁿ	-40.15 (5.86)	-	-	-38.08 (5.76)	-	-
L17	0.17 ⁿ	-36.74 (5.55)	-46.23 (7.14)	-	-40.79 (6.31)	-48.66 (7.60)	-
L18	0.01 ⁿ	-36.13 (4.02)	-40.38 (3.44)	-	-34.70 (4.16)	-38.15 (3.52)	-
L19	0.01 ^h	-	-	-8.01 (3.37)	-	-	-4.98 (3.28)
L20	0.2 ⁿ	-44.29 (6.80)	-45.49 (3.86)	-	-41.57 (6.69)	-43.71 (3.81)	-
L21	0.9 ⁿ	-44.33 (4.42)	-37.74 (4.88)	-	-42.33 (4.52)	-36.10 (4.93)	-
L22	0.2 ⁿ	-37.38 (6.19)	-30.50 (5.15)	-	-34.62 (6.15)	-28.15 (5.41)	-
L25	1.00 ^o	-32.93 (3.69)	-27.61 (3.60)	-	-31.15 (3.77)	-25.29 (3.25)	-
L26	0.01 ^o	-47.04 (3.61)	-	-	-45.43 (3.74)	-	-
L27	0.017 ^o	-37.91 (4.25)	-36.52 (5.71)	-	-35.04 (4.34)	-34.35 (5.72)	-
L28	0.095 ^o	-28.09 (4.30)	-	-	-26.34 (4.45)	-	-
L29	0.01 ^o	-	-	-14.08 (4.58)	-	-	-11.24 (3.15)
L32	-	-59.52 (5.15)	-6.24 (6.04)	-	-56.99 (4.96)	-4.04 (6.14)	-
L33	-	-86.06 (4.55)	-49.60 (4.95)	-	-84.06 (4.80)	-46.93 (4.85)	-
L34	-	-42.23 (8.22)	-1.61 (4.81)	-32.94 (5.00)	-39.04 (8.19)	0.94 (4.90)	-30.34 (5.07)
L35	-	-28.04 (3.25)	-22.42 (2.99)	-12.38 (3.88)	-26.18 (3.35)	-20.48 (3.05)	-10.64 (3.86)
LGA	-	-30.91 (7.38)	-84.05 (5.32)	-36.56 (7.60)	-28.75 (7.67)	-82.55 (5.70)	-34.25 (7.58)
LGB	-	-34.82 (4.53)	-45.24 (6.35)	-40.79 (4.90)	-33.28 (4.59)	-43.79 (6.46)	-37.96 (5.12)
LGC	-	-22.49 (4.05)	-8.88 (5.60)	-23.23 (7.08)	-20.48 (4.09)	-6.93 (5.59)	-21.23 (7.48)
LGD	-	-10.45 (5.61)	-0.37 (10.37)	-7.85 (3.48)	-7.79 (5.33)	12.47 (10.68)	-5.80 (3.57)
LGE	-	-55.93 (5.85)	-28.60 (5.65)	-4.41 (6.55)	-53.81 (5.71)	-26.16 (5.68)	-1.05 (4.41)

^aPerl programlama dili ile derlenmiş MM/PBSA ile ölçülen toplam bağlanma enerjisi, ^bPython programlama dili ile derlenmiş MM/PBSA hesaplaması, ^cİnhibitörün inhibisyon yarı konsantrasyonu, ^dAutodock ile yerleştirilen ligandların bağlanma enerjileri, ^eDock ile yerleştirilen ligandların bağlanma enerjileri, ^fVina ile yerleştirilen ligandların bağlanma enerjileri

^gGoldgur ve ark. 1999

^hHombrouck ve ark. 2008

ⁱMarchand ve ark. 2002

^jAlves ve ark. 2007a

^kNair ve Chi 2007

^lMazumder ve ark. 1996

^mSingh ve ark. 2003

ⁿDayam ve ark. 2006

^oDayam ve ark. 2008

Ligandların proteine bağlanma enerjileri üzerine, bilindiği gibi elektrostatik enerji (EE) ve van der Waals (vdW) etkileşimlerinin önemli etkisi bulunmaktadır. Bağlanma enerjilerine EE ve vdW katkıları her bir program için ayrı ayrı Tablo 4.5.'te verilirken, programın bir ligand için Perl ve Python versiyonları ile belirlediği elektrostatik enerji ve van der Waals değerlerin birbirine eşit olduğunun belirtilmesinde fayda vardır.

Tablo 4.5. Ligandların Autodock, Dock ve Vina ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle hazırlanan ve MD hesaplamaları sonucu MM/PBSA ile bulunun bağlanma enerjilerine kcal/mol cinsinden elektrostatik enerji ve van der Waals katkıları

Ligand	Autodock ^a		Dock ^b		Vina ^c	
	EE ^d	vdW ^e	EE ^d	vdW ^e	EE ^d	vdW ^e
L01	-58.11	-7.07	-59.22	-12.41	-58.57	-15.68
L02	-	-	-76.44	-11.39	-14.88	-24.60
L02t	-193.25	-20.37	-200.81	-21.67	-	-
L03	-349.56	-7.93	-252.83	2.29	-	-
L04	-201.87	-15.46	-163.60	-14.65	-	-
L05	-	-	-	-	-60.96	-14.30
L06	-157.88	0.07	-	-	-	-
L07	-87.38	-20.79	-	-	-71.02	-12.29
L13	-	-	-58.86	-28.97	-	-
L14	-	-	-	-	-48.48	-29.18
L16	-252.15	-11.85	-	-	-10.12	-26.69
L17	-204.46	-8.54	-236.94	-30.43	-	-
L18	-193.61	-9.52	-216.04	-11.24	-	-
L19	-	-	-	-	-50.16	-21.45
L20	-335.21	-7.05	-253.69	-14.70	-	-
L21	-247.13	-15.18	-249.85	-7.68	-	-
L22	-264.03	-2.15	-204.06	1.31	-	-
L25	-159.23	-7.69	-189.73	-0.01	-	-
L26	-238.65	-8.16	-	-	-	-
L27	-295.74	-18.04	-329.41	-17.00	-	-
L28	-211.81	-0.88	-	-	-	-
L29	-	-	-	-	-59.45	-13.68
L32	-317.81	-7.74	-293.34	-20.60	-	-
L33	-403.64	-5.41	-320.24	-10.21	-	-
L34	-407.42	-0.21	-139.01	-17.74	-319.13	-11.09
L35	-171.35	-8.97	-174.67	-2.55	-196.24	-9.31
LGA	-292.14	-4.34	-416.11	2.39	-302.31	+0.08
LGB	-231.31	-1.81	-296.26	-6.39	-326.14	-11.11
LGC	-109.01	-18.42	-100.69	-16.88	-120.44	-13.59
LGD	-77.09	-20.84	-69.28	-17.39	-5.82	-25.07
LGE	-347.79	1.85	-341.93	-14.86	-116.60	-22.68

^aAutodock ile yerleştirilen ligandların EE ve vdW değerleri, ^bDock ile yerleştirilen ligandların EE ve vdW değerleri, ^cVina ile yerleştirilen ligandların EE ve vdW değerleri, ^dToplam elektrostatik enerji, ^evan der Waals etkileşimleri toplamı

Autodock ile yerleştirilen ligandların oluşturdukları komplekslerin genellikle negatif olarak yüksek elektrostatik enerji değerlerine sahip oldukları ve HIV-1 IN için

bağlanma enerjisi en yüksek olan ligandların L26, L32, L33 ve L34 oldukları görülmektedir. HIV-1 IN için geliştirilen ilk ilaç olan Raltegravir'in (L02t) ise ortalama bir değere sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Dock ile yerleştirilen ligandlarda en yüksek skoru L17, L13, LGE gibi ligandların bağlanma serbest enerjileri beklenenden düşük çıkmıştır. Tasarladığımız ligandlarda LGA ve LGB oldukça ümit vaat edici sonuçlar verirken, LGA Dock ile yerleştirilme işlemi yapılan ligandlar içinde en iyi bağlanan ligand gibi görünmektedir. Diğer taraftan LGD'nin Python ile hesaplanan bağlanma serbest enerji değeri pozitif çıkmıştır. Raltegravir'in tuzu olarak hazırlanan L02t ligandının, enol formu L02 ligandına göre daha iyi bağlandığı elde edilen değerlerden anlaşılmaktadır. L02 ligandının Perl ile hesaplanan bağlanma serbest enerji değeri -12.28 kcal/mol iken, L02t ligandının bağlanma serbest enerji değeri -29.16 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Vina ile proteine yerleştirilen ligandlardan LGA ve LGB en yüksek negatif bağlanma serbest enerji değerlerini vermiştir. Diğer taraftan her iki ligandın Vina yerleştirilme skorlarının bütün ligandlar göz önüne alındığında ortalama değerler de olduğunun belirtilmesinde fayda vardır. Ayrıca programın yüksek skorlar verdiği L13, L14, L19, L29 ve LGD ligandlarının bağlanma serbest enerji değerlerinin diğerlerine göre negatif olarak düşük olduğu görülmektedir. Bu da Vina'nın en azında HIV-1 integras için iyi bir ligand yerleştirme programı olmadığını göstermektedir.

Dock yerleştirme işlemiyle katalitik öz bölgesi için hazırlanan koordinatlar kullanılarak tam uzunluktaki E1 yapısının L01, LGA ve LGB ile oluşturdukları komplekslerin ve L02 ligandının Dock kullanılarak direkt E1 yapısına yerleştirilmesi ile hazırlanan kompleksin MD hesaplamaları sonucu MM/PBSA ile bulunan bağlanma enerjileri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Ligandların E1 yapısı ile oluşturdukları komplekslerde MM-PBSA metodunun Perl versiyonu kullanılarak belirlenen bağlanma enerjileri ve bağlanma enerjilerine elektrostatik enerji ve van der Waals etkileşimlerinin katkıları (kcal/mol)

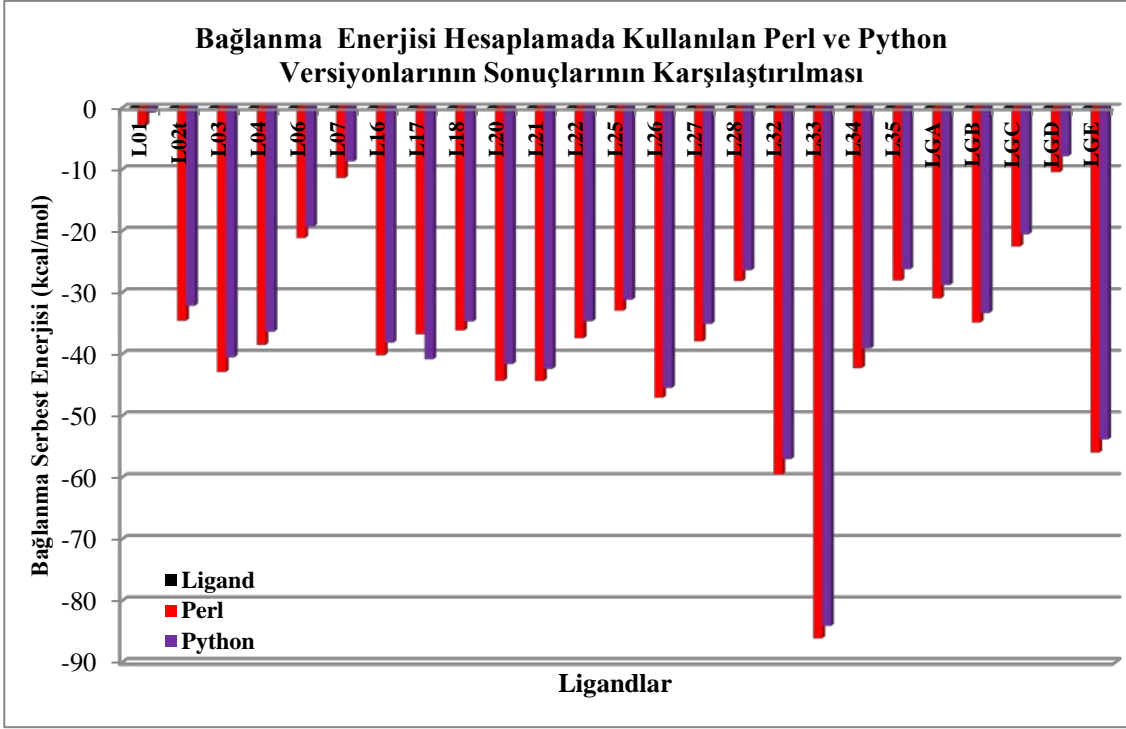
Ligand	IC ₅₀ ^a	EE ^b	vdW ^c	Bağlanma enerjisi
L01	2.1 ^d	-57.94	-9.18	2.04 (4.13)
L02	0.009 ^e	-78.42	-12.60	-12.29 (5.98)
LGA	-	-366.71	-4.49	-50.06 (9.58)
LGB	-	-280.44	-7.87	-60.24 (4.38)

^aInhibitörün inhibisyon yarı konsantrasyonu, ^bToplam elektrostatik enerji, ^cvan der Waals etkileşimleri toplamı, ^dGoldgur ve ark. 1999 ^eHombrouck ve ark. 2008

Tam uzunluktaki yapıdaki bağlanma serbest enerji değerlerine bakıldığında L01 ligandının pozitif, L02 ligandının Dock yerleştirilmesi ile hazırlanan kompleksteki değerine yakın olduğu gözlenmektedir. Burada dikkat çekici bir husus da Dock ile oluşturulan komplekslerde, -84.05 kcal/mol gibi bir değerle en iyi bağlanma enerjisine sahip LGA ligandının değerindeki azalmadır. Diğer taraftan LGB ise aynı durumdaki kompleksine göre tam uzunluktaki yapıda bağlanma enerjisini negatif olarak yükseltmiştir. Buradan, inhibitörün katalitik bölgesindeki etkileşimlerine, tam uzunluktaki yapının etkisinin olmadığı ancak protein ve ligand konformasyonunun bu etkileşimlere son derece büyük etkide bulunduğu sonuçlarına varmak mümkündür.

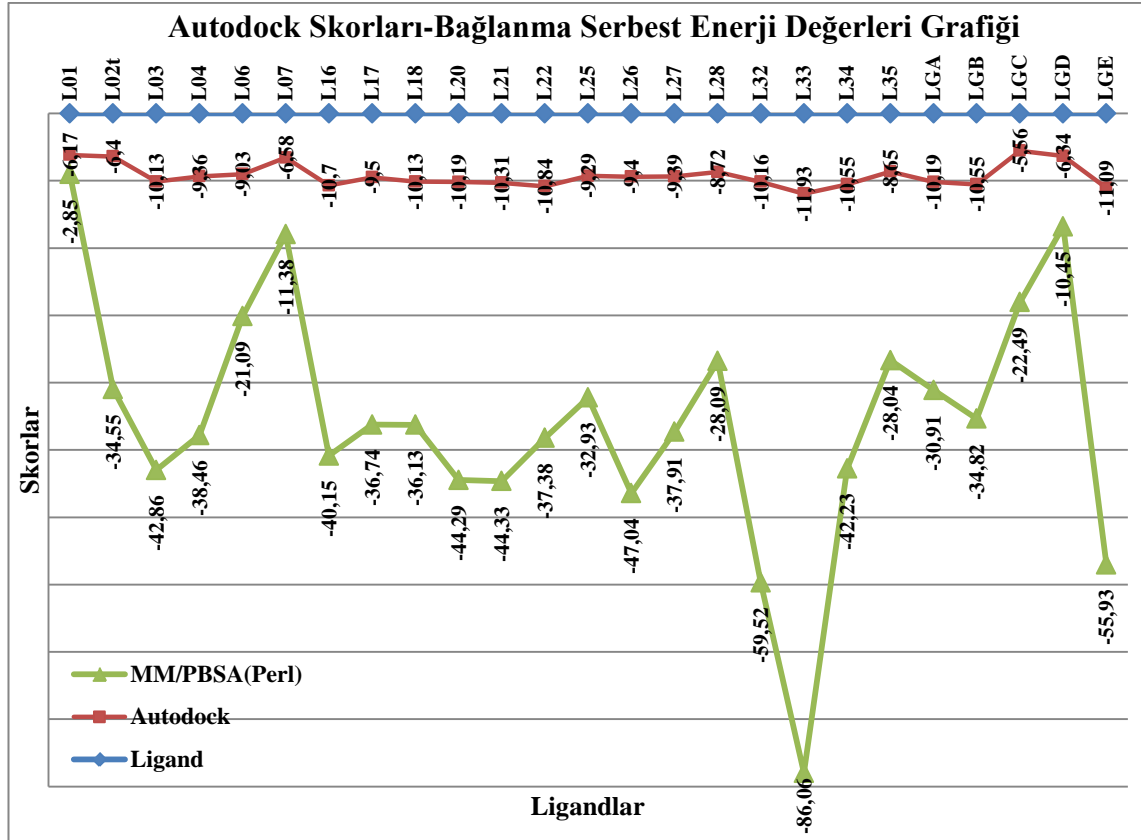
Bütün bağlanma serbest enerji hesaplamalarına genel olarak bakıldığında temel amacımız olan HIV-1 integras için inhibitör tasarlamada teorik olarak başarıya ulaştığımızı söylemek mümkündür. LGA, LGB ve folik asit ve türevlerinin güzel sonuçlar vermiştir. *de Novo* ilaç tasarımı yöntemleriyle bu ligandların türevlerinin hazırlanmasıyla daha iyi sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir.

MM/PBSA sonuçları incelendiğinde programın Perl ve Python ile elde edilen değerlerde tam bir uyum olduğu gözlenmektedir. MM/PBSA'nın bir ligand için iki versiyonla bulunduğu değerler farklı bulunmuştur. Ancak programların ligandlar için bulunduğu değerler doğru orantılı bir yol izlemiştir. Programın bir versiyonunun, kendi ölçütlendirme sistemi içinde bir ligand için hesapladığı bağlanma enerjisinin değeri farklı da olsa büyüklük açısından diğer versiyon tarafından da elde edilmektedir. Örneğin L01 için Perl versiyonu ile bulunan bağlanma serbest enerji değeri -2.85 kcal/mol iken, Python versiyonu ile bulunan değer -0.72 kcal/mol olmuştur. L03 ligandı için Perl versiyonu -42.86 kcal/mol, Python versiyonu ise -40.45 kcal/mol bulmuştur. Programın iki versiyonu arasındaki uyum Şekil 4.241.'de verilen grafikten daha net şekilde görülmektedir. Aynı ligand için genellikle Perl versiyonu, Python versiyonuna göre daha yüksek değerler vermiştir.



Şekil 4.241. Autodock ile proteine yerleştirilen ligandların bağlanma enerjisi hesaplamalarında kullanılan programların (Perl/Python) verilerinin karşılaştırılması

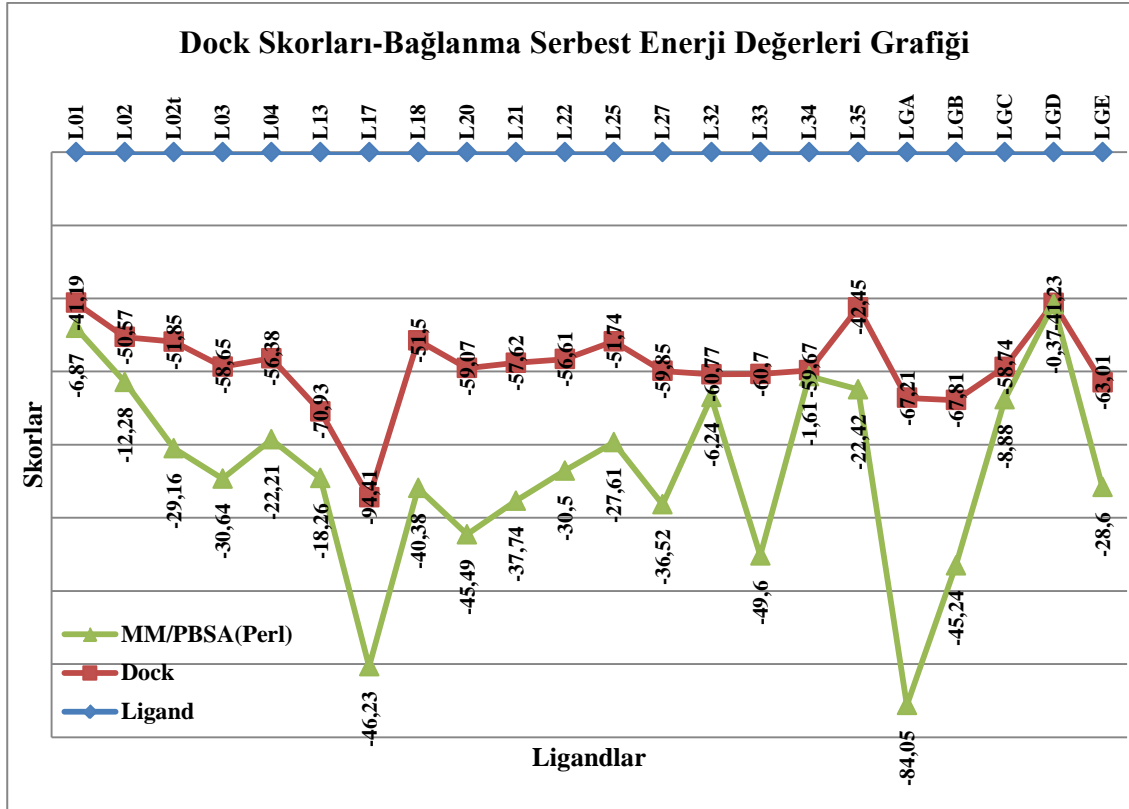
Yerleştirilme işlemleri Autodock ile yapılan ligandlardan MD hesaplamaları ve bağlanma enerjisi hesaplamaları yapılan ligandların yerleştirilme skorları ve bağlanma enerjisi değerleri Şekil 4.242.'de verilmiştir.



Şekil 4.242. Ligandların Autodock ile proteine yerleştirilme skorları ve MMPBSA (Perl) ile elde edilen bağlanma enerjilerinin karşılaştırılması

Ligand yerleştirme programları ligandı bağlarken bir bağlanma enerji hesaplamasıyla yerleştirme yapmaktadırlar. Dolayısıyla yerleştirme skorlarını, bu hesaplamaları daha iyi yapan MM/PBSA gibi bir metot ile hesaplanan değerlerle karşılaştırmak programlar için ayırt edici olur. Şekil 4.242.'de görüldüğü gibi bağlanma enerjisi değerleri ve Autodock skorları bir biri ile doğru orantılıdır. Autodock programının genel özelliklerinden biri yerleştirme skorlarını birbirine yakın aralıklarda vermesidir. Bu nedenle de şekildeki eğride keskin yükseliş veya inişler gözlenmemektedir. Netice itibarı ile bu sonuçların birbirini tamamlaması, hem yerleştirme hem de bağlanma serbest enerji değerlerini uygun şekilde hesapladığımızı göstermektedir.

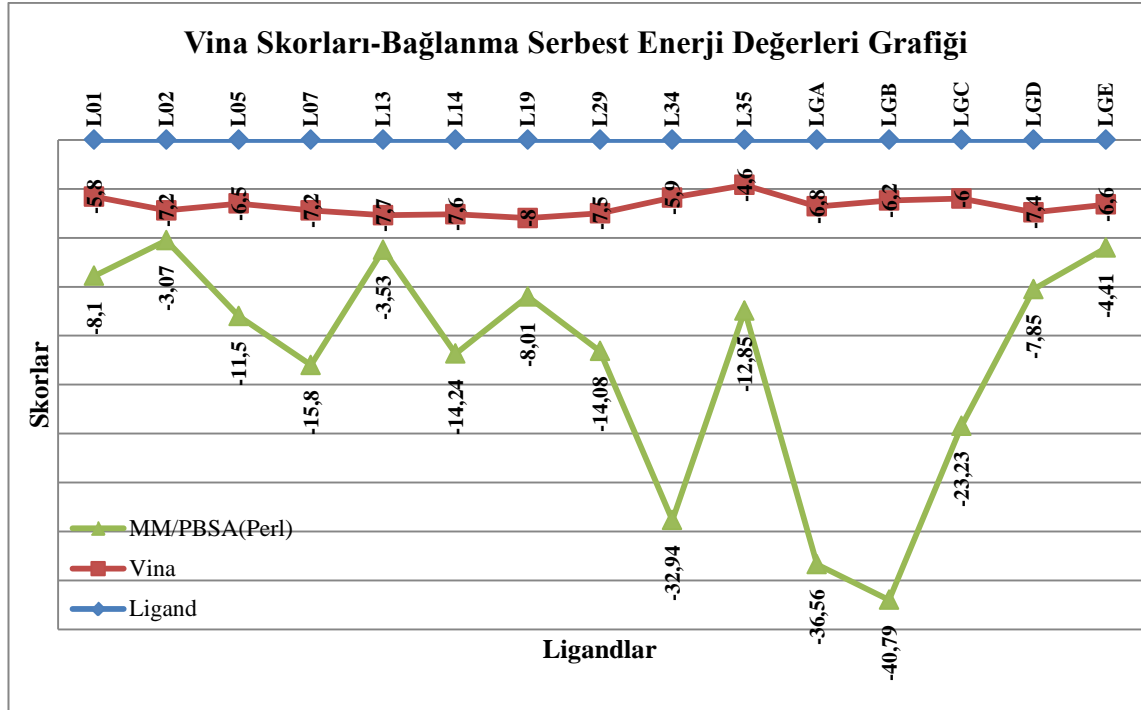
Yerleştirilme işlemleri Dock ile yapılan ligandlardan MD hesaplamaları ve bağlanma enerjisi hesaplamaları yapılan ligandların yerleştirilme skorları ve bağlanma enerjisi değerleri Şekil 4.243.'te verilmiştir.



Şekil 4.243. Ligandların Dock ile proteine yerleştirilme skorları ve MMPBSA (Perl) ile elde edilen bağlanma serbest enerjilerinin karşılaştırılması

Dock programının ligandlar için belirlediği skorların bağlanma serbest enerji değerleri ile son derece uyumlu olduğu Şekil 4.243.'te görülmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi Dock skorları en büyük olan L17, L13 ve LGE gibi ligandlarda bağlanma serbest enerjileri beklenen kadar büyük fark oluşturamamıştır. Diğer bir husus ise LGA ligandının Dock skoru LGB ile neredeyse aynı iken LGA -84.05 kcal/mol'lük bağlanma enerjisi değeri ile bütün ligandlar arasında en iyi bağlanan ligand olmuştur. Ayrıca Dock skorlarının bağlanma enerjisi değerleri ile uyum içinde olması Dock programının ligand-protein etkileşimlerini iyi hesapladığını göstermektedir.

Yerleştirilme işlemleri Vina ile yapılan ligandlardan MD hesaplamaları ve bağlanma enerjisi hesaplamaları yapılan ligandların yerleştirilme skorları ve bağlanma enerjisi değerleri Şekil 4.244.'te verilmiştir.



Şekil 4.244. Ligandların Vina ile proteine yerleştirilme skorları ve MMPBSA (Perl) ile elde edilen bağlanma serbest enerjilerinin karşılaştırılması

Vina programının ligandlar için belirlediği skorların bağlanma serbest enerji değerleriyle pek uyumlu olmadığı Şekil 4.256.'daki grafikten net bir şekilde görülmektedir. Örneğin; L01 ve L02 ligandlarının Vina skorları sırasıyla -5.8 ve -7.2 olarak belirlenmiştir. Beklenen bağlanma serbest enerji sonucunda L02 ligandının negatif olarak daha yüksek bir değer vermesidir ancak görülüyor ki L01 -8.1 kcal/mol, L02 -3.07 kcal/mol'lük enerji değerlerini elde etmişlerdir. Ayrıca yerleştirilme işlemleri Autodock ve Dock programları ile yapılan L01 ve L02 ligandlarının komplekslerinde, L02 ligandının L01 ligandına göre daha iyi bağlandığı Tablo 4.4. ve Tablo 4.6.'da görülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada integrazın ayrı bölgeleri için mevcut X-ray yapıları bir araya getirilerek ve eksik olan kalıntılar tamamlanarak 288 amino asit kalıntısı barındıran tam uzunlukta bir yapı tasarlandı. Bu yapının yanı sıra üç bölgenin moleküler dinamik (MD) hesaplamalar ile kararlılıkları test edildi. Modelleme çalışmalarının genel olarak uygun olduğu gözlenmiştir. MD hesaplamaları sonucu N-terminal bölgesinde bazı kalıntılarda heliks yapının kaybolmasına rağmen protein şeklinin genel olarak korunduğu görülmektedir. Bu bölge için yapılacak ilave bir çalışma Zn atomu ve ilgili kalıntılar için daha uygun kuvvet alanlarının geliştirilerek uygulanması olabilir. Katalitik öz bölgesi bütün yapı içinde en kararlı görünen yapıyı oluşturmaktadır. MD hesaplamaları sonucu Mg atomu ve ilgili kalıntılar arasındaki bağlar kısalmış ve böylece Mg atomu koordinatları az da olsa değişmiştir. Katalitik bölgede yer alan hareketli bölge (139-149 arası kalıntıları) B yapısında konformasyonunu korurken, E1 yapısında 1QX4.pdb yapısındaki konformasyona şekil itibariyle yaklaşmıştır. C-terminal bölgesi için oluşturulan iki modelden C2 genel olarak yapısını korumuştur. C1 yapısı 213-223 arası kalıntılarının bölgesinde heliks yapının bozulması sonucu konformasyonel değişikliğe uğramıştır. Tam uzunluktaki yapılar ile ilgili çalışmalarda da bu bölgede küçük ölçüde bozulmaların olduğu gözlenmiştir. Bu konformasyonel değişiklik C1, C2, E1 ve 1EX4.pdb yapıları üst üste çakıştırıldığında net şekilde görülmektedir. Ve zaten MD hesaplamalarının bir amacı da proteinin çözelti ortamındaki davranışlarını öngörmek olduğundan bu durumun fazla önemli olduğu düşünülmemektedir. Ayrıca daha uzun süreli yapılabilecek bir MD çalışmasında bu konformasyon eski haline de dönebilir. Diğer taraftan şu belirtilmeli ki sağlam temellendirilmiş bir protein yapısı ile yola çıkılması daha uygun ve daha gerçeğe yakın sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle modelleme ile ilgili yapılacak yeni çalışmalarda öncelikle HIV-1 integrazın katalitik işlemler sırasındaki ortamının iyi irdelenmesi ve bu ortamı en iyi taklit edebilecek şartlarda MD hesaplamalarının yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. HIV-1 IN enziminin tetramer olara DNA bağladığı bilinmektedir. O halde enzimi dimer veya tetramer olarak hazırlamak ve modele DNA ilave etmek ligandın katalitik bölgedeki etkileşimlerini daha iyi belirlemede büyük önem taşımaktadır. Ayrıca katalitik reaksiyonlar sırasında, katalitik bölgede bir yerine iki magnezyum atomunun

gerekliliği Başlık 2.9.1.3. altında belirtilmiştir. Bu durumda oluşturulacak DNA bağlanmış bir IN modeline bir Mg atomu ilavesi de şarttır.

Ligand yerleştirme çalışmaları sırasında Autodock4 ve VINA ile yapılan yerleştirme işlemlerinde fazla sıkıntı yaşanmadı ise de bazı ligandların DOCK6 programı ile yerleştirilmesinde zorluklar yaşandı. DOCK6 programı küçük moleküllerin yerleştirilmesi işlemlerini çok kısa sürede gerçekleştirirken, nispeten uzun olan zincirler de ise yapıyı yerleştirme de çok sayıda sorun vermiştir. Bu da büyük zaman israfına neden olmuştur. Önce, ligand içindeki rijit ve büyük olan yapıyı uygun oyuklara yerleştirerek sonra da ligandın diğer kısımlarını hareket ettirerek konformasyonlar elde eden DOCK6 programı, ligand yerleştirilecek bölgeleri nokta yuvarlama tekniği ile belirlediği için muhtemelen uzun zincirleri bu belirlenen yerlere yerleştirmede sorun yaşamaktadır. Bu nedenle ligandın bazı halkalarının iç içe geçtiği gözlenmiştir. Hız açısından üç programdan DOCK6'nın en hızlı olduğunu söylemek mümkündür. Bazı ligandlar için elli farklı konformasyonu 1 dk'nın altındaki bir sürede sonuçlandırmaktadır. Vina programı ligand ve proteinin hazırlanmasında Autodock için tasarlanmış MGL Tools gösterim programını kullanmaktadır. Ayrıca bir grid hesaplamasına ihtiyaç duymadığından oldukça hızlı bir program olduğu söylenebilir. Çok sayıda işlemci üzerinde paralel çalışmada her hangi ek bir uygulama yapmanız gerekmeden kendisi paralel çalışabilmektedir. Autodock4 diğer iki programa nazaran oldukça uzun süre içinde sonuç vermektedir. Ligandların yerleştirilme konformasyonları ve bu konformasyon sonucunda MD hesaplamalarını takriben hesaplanan bağlanma serbest enerji değerleri Autodock ve Dock programlarının HIV-1 IN için uygun ancak Vina programının uygun olmadığını göstermiştir.

Viral DNA'nın kesilmesi ve viral DNA'nın konak hücre genomuna bağlanmasında rol alan katalitik öz bölgesine 31 tanesi daha önce deneysel olarak literatürde çalışılmış, 4 tanesi (L32, L33, L34 ve L35) daha önce IN inhibitörü çalışmasında kullanılmamış ve 5 tanesi de (LGA, LGB, LGC, LGD ve LGE) yeni tasarlanmış toplam 40 ligand yerleştirildi. Yerleştirme programlarından Autodock ve Dock'ın birbirlerine paralel sonuçlar verdiği belirlenirken aynı ligandlar için Vina farklı sonuçlar vermiştir. Ligandlar için Autodock programı -5.06 ile -11.93 kcal/mol aralığında yerleştirme skorları verirken bunların 12 tanesi -10 kcal/mol altında yerleştirme skoruna sahip olup, üç tanesi (LGA, LGB ve LGE) yeni tasarlanan

ligandlardan oluşmaktadır. Aynı ligandlar için Dock programı -33.79 ile -94.41 kcal/mol aralığında yerleştirme skorları verirken bunların 19 tanesi -50 kcal/mol altında yerleştirme skoruna sahip olup dört tanesi (LGA, LGB, LGC ve LGE) yeni tasarlanan ligandlardandır. Vina yerleştirme skorlarının dar bir aralıkta (-4.6 ile -8.0 kcal/mol) olduğu ve üretilen skorların birbirine yakın olduğu görüldü. HIV integras inhibitörü olarak kullanılan Raltegravir'in Autodock, Dock ve Vina yerleştirme skorları orta derecede olup sırasıyla -6.40, -51.85 ve -7.2 kcal/mol olarak bulundu.

Tasarlanan yeni ligandların yanında yerleştirme skorları iyi olan ligandların oluşturdukları komplekslerin MD hesaplamaları yapıldı. Bunların 25'i Autodock, 22'si Dock ve 17'si Vina ile hazırlanmış komplekslerden oluşmaktadır. Ligandların Dock ile katalitik öz bölgesine yerleştirilmesiyle hazırlanan komplekslerdeki koordinatları seçilerek tam uzunluktaki proteinin bu ligandlar ile oluşturdukları 4 kompleksin MD hesaplamaları da yapıldı. Komplekslerin MD hesaplamaları sonucunda hiçbir ligandın bağlı görüldüğü bölgeyi terk etmediği gözlenmiştir. Bu da yerleştirme çalışmalarının oldukça uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca zamana karşı çizilen RMSD değişimleri de komplekslerin kararlı bir hale ulaştığını göstermektedir. MD hesaplamaları uzun sürmesine rağmen, elde edilen sonuçların analizinin son derece önemli olduğu bu çalışmayla öğrenilmiş oldu. Edinilen diğer bir tecrübe ise seri üretimin önemi olmuştur.

Bağlanma enerjisi hesaplamaları bir nevi çalışmalarımızın test edildiği basamak olmuştur. Elde edilen sonuçların uyumluluğu protein ve ligandların uygun şekilde hazırlandığını, ligand yerleştirme çalışmalarının ve MD hesaplamalarının doğru yapıldığını bize göstermiştir. MM/PBSA programının Perl ve Python ile derlenen iki versiyonu kullanılarak hesaplanan bağlanma enerjileri arasında uyum olduğu belirlendi. Autodock ile hazırlanan komplekslerin, Perl ile hesaplanan bağlanma enerji değerleri -2.85 ile -86.06 kcal/mol arasında değiştiği gözlenirken ligandlardan 9 tanesi -40 kcal/mol altında enerji değerlerine sahip olup bir tanesi (LGE) yeni tasarlanan ligandlardan olmuştur. Dock ile hazırlanan komplekslerde bağlanma enerjilerinin -0.37 ile -84.05 kcal/mol arasında değiştiği gözlenirken, ligandların 6 tanesinin -40 kcal/mol altında enerji değerlerine sahip olduğu ve iki tanesinin (LGA ve LGB) yeni tasarlanan ligandlardan oluştuğu belirlenmiştir. Vina ile hazırlanan komplekslerde, bağlanma enerjilerinin -3.07 ile -40.79 kcal/mol arasında değiştiği gözlenirken sadece yeni

tasarlanan ligandlardan LGB'in -40 kcal/mol altında bir değere sahip olduğu görülmüştür.

Bu tezde, HIV-1 IN enzimi için inhibitör tasarımı yanında protein modelleme, ligand yerleştirme programlarından üçünün karşılaştırılması ve bağlanma enerjisi hesaplama yöntemlerinden MM/PBSA'in kullandığı programlama dillerinde Perl ve Python ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması gibi çalışmalara da yer verildi.

Sonuç olarak, bilgisayar alanındaki yenilikler, algoritmalarındaki gelişmeler ve simülasyon tekniklerinin gelişmesine paralel olarak MD hesaplamaları gün geçtikçe daha hızlı ve gerçeğe daha yakın sonuçlar vermektedir. Ayrıca simülasyon tekniklerinin MD simülasyonlarını da içerecek şekilde, çeşitli hastalık etkenlerine karşı üretilen ilaçların elde edilmesindeki kanıtlanmış rolü hesaplamalı kimyayı vazgeçilmez kılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Accelrys Software Inc. 2011 Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.1, San Diego: Accelrys Software Inc.
- Adcock, A. S. McCammon, J. A. 2006. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chem. Rev.*, 106(5): 1589-1615.
- Alder, B. J. and Wainwright, T. E. 1957. Phase Transition for a Hard Sphere System. *J. Chem. Phys.*, 27 (5): 1208. doi:10.1063/1.1743957.
- Allen, M, P. 2004. Introduction to Molecular Dynamics Simulation, John von Neumann Institute for Computing, Jülich, NIC Series, Vol. 23, pp. 1-28
- Almlof, M. Brandsdal, B. O. Aqvist, J. 2004, Binding Affinity Prediction with Different Force Fields: Examination of the Linear Interaction Energy Method, *J. Comput. Chem.* 25, 1242-1254.
- Alonso, H. Bliznyuk, A, A. Gready, J, E. 2006. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design, *Medicinal Research Reviews*, Vol. 26, No. 5, 531-568.
- Alterman, M. 2001. Design and Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors, *Acta Universitatis Upsaliensis. Phd Thesis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from Faculty of Pharmacy*, 245 70 pp. Upsalla.
- Alves, C. N. Marti, S. Castillo, R. Andres, J. Moliner, V. 2008. A Quantum Mechanic/Molecular Mechanic Study of the Wild-Type and N155S Mutant HIV-1 Integrase Complexed with Diketo Acid. *Biophysical Journal*, 94, 2443-2451.
- Alves, C. N. Marti, S. Castillo, R. Andres, J. Moliner, V. Tunon, I. And Silla, E. 2007a. Calculation of binding energy using BLYP/MM for the HIV-1 integrase complexed with the S-1360 and two analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 3818–3824.
- Alves, C. N. Marti, S. Castillo, R. Andres, J. Moliner, V. Tunon, I. and Silla, E. 2007b. A Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Study of the Protein–Ligand Interaction for Inhibitors of HIV-1 Integrase. *Chem. Eur. J.* 13, 7715–7724.
- Andrew, M. D. Teague, S. J. and Kleywegt, G. J. 2003. Application and Limitations of X-ray Crystallographic Data in Structure-Based Ligand and Drug Design. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 2718-2736.
- Andrews, P. R. Craik, D. J. Martin, J. L. 1984. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J. Med. Chem.*, 27, 1648-1657.
- Anonim, Collaborative Computational Project Number 4, 1994. *Acta. Crystallogr. Sect. D.* 50, 760-763.
- Arda, M. 2006. *Temel Mikrobiyoloji*. Medisan, Ankara.

Arthur, L. O. Bess, J. W. Sowder Jr, R. C. I. Benveniste, R. E. Mann, D. L. Chermann, J.-C. & Henderson, L. E. 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: implications for pathogenesis and vaccines. *Science*, 258, 1935-1938.

Asante-Appiah, E. Shalka, A. M. 1997. Molecular mechanisms in retrovirus DNA integration. *Antiviral Research*, 36, 139–156.

Aszodi, A. Taylor, W. R. 1996. Homology modelling by distance geometry. *Folding & Design*, Vol:1 No:5 p: 325-334.

Banba, S. Guo, Z. and Brooks III, C. L. 2000. Efficient sampling of ligand orientations and conformations in free energy calculations using the lambda-dynamics method. *J. Phys. Chem. B* 104, 6903–6910.

Barker, J. A. and Watts R.O. 1969. Structure of water A Monte Carlo calculation. *Chem. Phys. Lett.*, 3: 144-145.

Barnum, D. Greene, J. Smellie, A., Sprague, P., 1996. Identification of common functional configurations among molecules. *Journal of Chemistry Information and Computer Sciences* 36: 563–571.

Barreca, M. L. Lee, K. W. Chimirri, A. Briggs, J. M. 2003. Molecular Dynamics Studies of the Wild-Type and Double Mutant HIV-1 Integrase Complexed With the 5c1ep Inhibitor: Mechanism for Inhibition and Drug Resistance. *Biophysical Journal*, 84, 1450-1463.

Bayly, C. I. Ciepak, P. Cornell, W. D. Kollman, P. A. 1993. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model *J. Phys.Chem.*, 97, 10269-10280.

Benson, D. A. Karsch-Mizrachi, I. Lipman, D. J. Ostell, J. and Sayers, E. W. 2010. GenBank, *Nucl. Acids Res.*, 38, D46-D51.

Bera, S. Pandey, K. K. Vora, A. C. and Grandgenett, D. P. Molecular Interactions between HIV-1 Integrase and the Two Viral DNA Ends within the Synaptic Complex that Mediates Concerted Integration. 2009. *J. Mol. Biol.* 389, 183–198

Berendsen, H. J. C. Grigera, J. R. Straatsma, T. P. 1987. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem.*, 91, 6269-6271.

Berendsen, H. J., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F. and Hermans, J. (1969). "Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration." *Nature* 224: 175-177.

Berman, H. M. Westbrook, J. Feng, Z. Gilliland, G. Bhat, T. N. Weissig, H. Shindyalov, I. N. Bourne, P. E. 2000, The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 28, 235-242.

Blanco F.J. Hess S. Pannell L.K. Rizzo N.W. Tycko R. 2001. Solid-state NMR Data Support a Helix-Loop-Helix Structural Model for the N-Terminal Half of HIV-1 Rev in Fibrillar Form. *J. Mol. Biol.*, 313,845-859.

- Boeckmann, B. Bairoch, A. Apweiler, R. Blatter, M.-C. Estreicher, A. Gasteiger, E. Martin, M. J. Michoud, K. O'Donovan, C. Phan, I. Pilbout, S. Schneider, M. 2003. The Swiss-Prot protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003, *Nucleic Acids Res.* 31: 365-370.
- Böhm H.J. Klebe G. 1996. What Can We Learn from Molecular Recognition in Protein-Ligand Complexes for the Design of New Drugs? *Angew. Chem. Int. Ed. England.* 35, 2588-2614.
- Brice, A. R. Dominy, B. N. 2011. Analyzing the Robustness of the MM/PBSA Free Energy Calculation Method: Application to Conformational Transitions. *J. Comput. Chem.*, 32: 1431-1440.
- Brigo, A. Lee, K. W. Fogolari, F. Mustata, G. I. Briggs, J. M. 2005a. Comparative molecular dynamics simulations of HIV-1 integrase and the T66I/M154I mutant: binding modes and drug resistance to a diketo acid inhibitor. *Proteins.* 159(4):723-41.
- Brigo, A. Lee, K. W. Mustata, G. I. and Briggs, M. J. 2005b. Comparison of Multiple Molecular Dynamics Trajectories Calculated for the Drug-Resistant HIV-1 Integrase T66I/M154I Catalytic Domain. *Biophysical Journal*, 88, 3072-3082
- Brooks, B. R. Brucoleri, R. E. Olafson, B. D. States, D. J. Swaminathan, S. and Karplus, M. 1983. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, *J. Comp. Chem.*, 4, 187-217.
- Brunger, A. T. Adams, P. D. Clore, G. M. DeLano, W. L. Gros, P. Grosse-Kunstleve, R. W. Jiang, J. S. Kuszewski, J. Nilges, M. Pannu, N. S. Read, R. J. Rice, L. M. Simonson, T. Warren, G. L. 1998. *Acta. Crystallogr. Sect.* 54, 905-921.
- Brünger, A. T. 1990. "X-PLOR. A System for Crystallography and NMR", Yale University, New Haven, CT, USA.
- Bujacz, G. Alexandratos, J. Qing, Z.L. Clement-Mella, C. Wlodawer, A. 1996. The catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase: ordered active site in the F185H mutant. *FEBS Lett.* 398: 175-178.
- Bukrinsky, M.I. Sharova, N. McDonald, T.L. Pusharskaya, T. Stevenson, M. 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6125–6129.
- Bultinck, P. Winter, H. D. Langenaeker, W. Tollenaere J. P. 2004. *Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery*, Taylor & Francis Group LLC. NEW YORK: BASEL.
- Cahn, P. Sued, O. 2007. Raltegravir: a new antiretroviral class for salvage therapy. *Lancet*, 369, 1235–1236.
- Cai, M. Huang, Y. Caffrey, M. Zheng, R. Craigie, R. Clore, G.M. Gronenborn, A.M. 1998. Solution structure of the His12 --> Cys mutant of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase complexed to cadmium. *Protein Sci.* 7: 2669-2674.
- Cai, M. Zheng, R. Caffrey, M. Craigie, R. Clore, G. M. and Gronenborn, A. M. 1997. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nature structural biology*, Vol:4, Number: 7 pp:567-577.

- Candler, A. Featherstone, M. Ali, R. Maloney, L. Watts, A. Fischer, W. B. 2005. Computational analysis of mutations in the transmembrane region of Vpu from HIV-1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1716, 1–10.
- Carlton, A. T. Vinicius, B, S. da Silva, C. H. T. de P. 2008. Current topics in computer-aided drug design, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 97, No. 3.
- Carter J. B. Saunders V. A. 2007. *Virology: Principles and Applications* “Human immunodeficiency viruses”. John Wiley & Sons Ltd .page: 197-210, England
- Case, D. A. Cheatham III, T. E. Darden, T. Gohlke, H. Luo, R. Merz Jr., K. M. Onufriev, A. Simmerling, C. Wang, B. and Woods, R. J. The Amber Biomolecular Simulation Programs, *J Comput Chem*. 2005 December 26(16): 1668–1688.
- Case, D. A. Darden, T. A. Cheatham III, T. E. Simmerling, C. L. Wang, J. Duke, R. E. Luo, R. Merz, K. M. Pearlman, D. A. Crowley, M. Walker, R. C. Zhang, W. Wang, B. Hayik, S. Roitberg, A. Seabra, G. Wong, K. F. Paesani, F. Wu, X. Brozell, S. Tsui, V. Gohlke, H. Yang, L. Tan, C. Mongan, J. Hornak, V. Cui, G. Beroza, P. Mathews, D. H. Schafmeister, C. Ross, W. S. and Kollman, P. A. 2006. AMBER 9, University of California, San Francisco.
- Case, D.A. Darden, T. A. Cheatham III, T.E. Simmerling, C. L. Wang, J. Duke, R. E. Luo, R. Walker, R. C. Zhang, W. Merz, K. M. Roberts, B P. Wang, B. Hayik, S. Roitberg, A. Seabra, G. Kolossváry, I. Wong, K. F. Paesani, F. Vanicek, J. Liu, J. Wu, X. Brozell, S. R. Steinbrecher, T. Gohlke, H. Cai, Q. Ye, X. Wang, J. Hsieh, M.-J. Cui, G. Roe, D. R. Mathews, D. H. Seetin, M. G. Sagui, C. Babin, V. Luchko, T. Gusarov, S. Kovalenko, A. and Kollman, P.A. 2010. AMBER 11, University of California, San Francisco.
- Charpentier, C. Karmochkine, M. Laureillard, D. Tisserand, P. Bélec, L. Weiss, L. Si-Mohamed, A. Piketty, C. 2008. Drug resistance profiles for the HIV integrase gene in patients failing raltegravir salvage therapy. *HIV Medicine*, 9: 765-770.
- Checkley, M. A. Luttge, B. G. and Freed, E. O. 2011. HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. *J. Mol. Biol.*, 410, 582–608.
- Chen, A. Weber, I. T. Harrison, R.W. Leis, J. 2006. Identification of amino acids in HIV-1 and avian sarcoma virus integrase subsites required for specific recognition of the long terminal repeat ends. *J. Biol. Chem.*, 281, 4173-4182.
- Chen, J. C. Krucinski, J. Miercke, L. J. Finer-Moore, J. S. Tang, A. H. Leavitt, A. D. Stroud, R. M. 2000. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: A model for viral DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97, 8233-8238.
- Chen, J. Neamati, N. MacKerell, Jr. A. D. 2002. Structure-Based Inhibitor Design Targeting HIV-1 Integrase, *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2, 217-234.
- Chen, X. Tsiang, M. Yu, F. Hung, M. Jones, G. S. Zeynalzadegan, A. Qi, X. Jin, H. Kim, C. U. Swaminathan, S. Chen, J. M. 2008. Modeling, analysis, and validation of a novel HIV integrase structure provide insights into the binding modes of potent integrase inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 380, 504-519.

- Cherepanov, P. Ambrosio, A.L. Rahman, S. Ellenberger, T. Engelman, A. 2005. Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 102: 17308-17313
- Chiu, T. K. Davies, D. R. 2004. Structure and Function of HIV-1 Integrase. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, Volume 4 Issue 9 pp.965-977.
- Chow, A. S. Vincent, K. A. Ellison, V. Brown, P. O. 1992. Reversal of Integration and DNA Splicing Mediated by Integrase of Human Immunodeficiency Virus, *SCIENCE*, Vol.255. p. 723-726.
- Christensen, A. M. Massiah, M. A. Turner, B. G. Sundquist, W. I. & Summers, M. F. 1996. Threedimensional structure of the HTLV-II matrix protein and comparative analysis of matrix proteins from the different classes of pathogenic human retroviruses. *J. Mol. Biol.* 264, 1117-1131.
- Chukkapalli V.2011.Molecular determinants that regulate plasma Membrane-specific binding of HIV-1 structural protein. PHD thesis, The University of Michigan,Michigan, S2-3.
- Cobb, K. 2007. DOCK THIS: In silico Drug Design Feeds Drug Development. *Biomedical Computation Review*, Vol: 3, Issue: 3, 20-30.
- Cocohoba, J. Dong, B. J. 2008. Raltegravir: The First HIV Integrase Inhibitor. *Clinical Therapeutics*, Vol: 30, Number: 10, 1747-1765.
- Connolly, M. L. 1981. Protein surfaces and interiors, Phd. Thesis, University of California at Berkeley.
- Cooley, L. A. Lewin, S. R. 2003. HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy, *Journal of Clinical Virology*, 26, 121-/132.
- Cooper, D. A. Steigbigel, R. T. Gatell, J. M. Rockstroh, J. K. Katlama, C. Yeni, P. Lazzarin, A. Clotet, B. Kumar, P. N. Eron, J. E. Schechter, M. Markowitz, M. Loutfy, M. R. Lennox, J. L. Zhao, J. Chen, J. Ryan, D. M. Rhodes, R. R. Killar, J. A. Gilde, L. R. Strohmaier, K. M. Meibohm, A. R. Miller, M. D. Hazuda, D. J. Nesselly, M. L. DiNubile, M. J. Isaacs, R. D. Tepller, H. Nguyen, B. and the BENCHMRK Study Teams. 2008. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 359:355-365.
- Cornell, W. D. Cieplak, P. Bayly, C. I. Gould, I. R. Merz, K. M. Ferguson, Jr. D.M. Spellmeyer, D. C. Fox, T. Caldwell, J. W. and Kollman, P. A. A. 1995. Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules, *J. Am. Chem. SOC.*, 117, 5179-5197.
- Cornell, W. D. Cieplak, P. Bayly, C. I. Gould, I. R. Merz, K. M. Jr. Ferguson, D. M. Spellmeyer, D. C. Fox, T. Caldwell, J. W. Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179
- Costin J.M. 2007. Cytopathic Mechanisms of HIV-1. *Virology Journal*, 4:100.
- Craigie R. 2011. Integrase Mechanism And Function, in *HIV-1 Integrase: Mechanism and Inhibitor Design* (ed N. Neamati), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/9781118015377.ch3 p.23-33.

Craigie, R. 2011. Integrase Mechanism and Function. HIV-1 Integrase: Mechanism and Inhibitor Design, First Edition. p: 23-33.

Craigie, R. Fujiwara, T. Bushman, F. 1990. The IN protein of Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration in vitro. *Cell*, 62, 829–837.

Crosby, D. C. 2010. Characterization of a Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type I Integrase Inhibitor-Binding Pocket and Discovery of Novel Inhibitors Potent against Drug-Resistant Variants of HIV. Phd Thesis, University of California, IRVINE.

Daly, T. J. Cook, K. S. Gran, G. S. Maione, T. E. & Rusche, J. R. 1989. Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-response element in vitro. *Nature*, 342, 816-819.

Davis A.M. Teaque S.J. Kleywegt G.J. 2003. Application and Limitations of X-ray Crystallographic Data in Structure-Based Ligand and Drug Design. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 2718-2736.

Dayam, R. and Neamati, N. 2004. Active site binding modes of the β -diketoacids: a multi-active site approach in HIV-1 integrase inhibitor design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 6371–6381.

Dayam, R. Deng, J. Neamati, N. 2006. HIV-1 Integrase Inhibitors: 2003-2004 Update. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 26, No. 3, 271-309.

Dayam, R. Gundla, R. Al-Mawsawi, L. Q. Neamati, N. 2008. HIV-1 Integrase Inhibitors: 2005-2006 Update. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 28, No. 1, 118-154.

De Luca, L. Barreca, M. L. Ferro, S. Iraci, N. Michiels, M. Christ, F. Debyser, Z. Witvrouw, M. and Chimirri, A. 2008. A refined pharmacophore model for HIV-1 integrase inhibitors: Optimization of potency in the 1H-benzylindole series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 2891–2895.

De Luca, L. Pedretti, A. Vistoli, G. Barreca, M. L. Villa, L. Monforte, P. Chimirri, A. 2003. Analysis of the full-length integrase-DNA complex by a modified approach for DNA docking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 1083-1088.

De Rocquigny, H. Gabus, C. Vincent, A. Fournie- Zaluski, M.-C. Roques, B. & Darlix, J.-L. 1992. Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 89, 6472-6476.

Delelis, O. Carayon, K. Saïb, A. Deprez, E. and Mouscadet, J-F. 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase, *Retrovirology* 5: 114

Deng, J. Kelley, J. A. Barchi, J. J. Sanchez, T. Dayam, R. Pommier, Y. and Neamati, N. 2006. Mining the NCI antiviral compounds for HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 3785–3792.

Di Santo, R. Costi, R. Roux, A. Miele, G. Crucitti, G. C. Iacovo, A. Rosi, F. Lavecchia, A. Marinelli, L. Di Giovanni, C. Novellino, E. Palmisano, L. Andreotti, M. Amici, R. Galluzzo, C. M. Nencioni, L. Palamara, A. T. Pommier, Y. and Marchand, C. 2008. Novel Quinolinonyl

- Diketo Acid Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Activities. *J. Med. Chem.*, 51, 4744–4750.
- Dimmock, N. J. Easton, A. J. and Leppard, K. N. 2007. *Introduction to Modern Virology Sixth Edition*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Donghi, M. Kinzel, O. D. Summa, V. 2009. 3-Hydroxy-4-oxo-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidine-2-carboxylates—A new class of HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 1930–1934.
- Doucet, J. P. Weber, J. 1996. *Computer-Aided Molecular Design: Theory and Applications*, Elsevier Science & Technology Books.
- Dubey, S. Satyanarayana, Y. D. Lavania, H. 2007. Development of integrase inhibitors for treatment of AIDS: An overview. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 1159-1168.
- Durrant, J. D. McCammon, J. A. 2011, Molecular dynamics simulations and drug discovery, *BMC Biology*, 9:71
- Dyda, F. Hickman, A.B. Jenkins, T.M. Engelman, A. Craigie, R. Davies, D.R. 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* 266: 1981-1986
- Eijkelenboom, A. P. Lutzke, R. A. Boelens, R. Plasterk, R. H. Kaptein, R. & Hard, K. 1995. The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. *Nature Struct. Biol.* 2, 807-810.
- Eijkelenboom, A. P. A. M. Sprangers, R. Hard, K. Puras Lutzke, R.A. Plasterk, R. H. A. Boelens, R. Kaptein, R. 1999. Refined solution structure of the C-terminal DNA-binding domain of human immunovirus-1 integrase. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 36: 556.
- Ellison, V. 1994. *Retrovirus Integration Mediated by HIV Integrase in vitro*. Phd Thesis, Stanford University, 2-3.
- Engelman, A. Craigie, R. 1992. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J. Virol.* 66, 6361– 6369.
- Engelman, A. Mizuuchi, K. Craigie, R. 1992. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* 67, 1211–1221.
- Eriksson, M. A. Pitera, J. Kollman, P. A. 1999. Prediction of the Binding Free Energies of New TIBO-like HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors Using a Combination of PROFEC, PB/SA, CMC/MD, and Free Energy Calculations, *J. Med. Chem.*, 42, 86-881.
- Ersoy, N. 2002. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Tarihi Ders Notları, Kocaeli.
- Esposito, D. Craigie, R. 1998. Sequence specificity of viral end DNA binding by HIV-1 integrase reveals critical regions for protein– DNA interactio, *The EMBO Journal* Vol.17 No.19 pp. 5832–5843,

Eswar, N. Marti-Renom, M. A. Webb, B. Madhusudhan, M. S. Eramian, D. Shen, M. Pieper, U. Sali. A. 2006. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc. Supplement 15, 5.6.1-5.6.30.

Ewig, C. S. Thacher, T. S. Hagler, A. T. 1999. Derivation of Class II Force Fields. 7. Nonbonded Force Field Parameters for Organic Compounds. J. Phys. Chem. B, 103, 6998.

Feig, M. Karanicolas, J. and Brooks, C. L. 2004. MMTSB tool set: enhanced sampling and multiscale modeling methods for applications in structural biology. Journal of molecular graphics & modelling, 22(5):377–395.

Fenollar-Ferrer, C. Carnevale, V. Raugei, S. Carloni, P. 2008. HIV-1 integrase–DNA interactions investigated by molecular modelling. Computational and Mathematical Methods in Medicine Vol. 9, Nos. 3–4, 231–243.

Fernandez-Recio, J. 2011. Prediction of protein binding sites and hot spots. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 1:680–698. doi:10.1002/wcms.45.

Feuerstein, G. Kak, S. Frawley, D. 1995. In Search of the Cradle of Civilization: New Light on Ancient India. Wheaton, Quest Books, Illinois.

Field M. J. 2007. A Practical Introduction to the Simulation of Molecular Systems, Second Edition, Cambridge University Press. New York.

Fogolari, F. Brigo, A. and Molinari, H. 2003. Protocol for MM/PBSA Molecular Dynamics Simulations of Proteins. Biophysical Journal 85:159-166.

Fossey, C. Huynh, N-T. Vu, A-H. Vidu, A. Zarafu, I. Laduree, D. Schmidt, S. Laumond, G. & Aubertin, A-M. 2007. Synthesis and anti-HIV evaluation of hybrid-type prodrugs conjugating HIV integrase inhibitors with d4t by self-cleavable spacers containing an amino acid residue. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22(5): 608–619.

Francisco J. Blanco, Sonja Hess, Lewis K. Pannel, Nancy W. Rizzo, and Robert Tycko, 2001. Solid-state NMR Data Support a Helix-Loop-Helix Structural Model for the N-terminal Half of HIV-1 Rev in Fibrillar Form. J. Mol. Biol., 313, 845-859.

Friesner, R. A. Banks, J. L. Murphy, R. B. Halgren, T. A. Klicic, J. J. Mainz, D. T. Repasky, M. P. Knoll, E. H. Shaw, D. E. Shelley, M. Perry, J. K. Francis, P. Shenkin, P. S. 2004. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy, J. Med. Chem., 47, 1739–1749.

Frisch, M. J. Trucks, G. W. Schlegel, H. B. Scuseria, G. E. Robb, M. A. Cheeseman, J. R. Montgomery, Jr. J. A. Vreven, T. Kudin, K. N. Burant, J. C. Millam, J. M. Iyengar, S. S. Tomasi, J. Barone, V. Mennucci, B. Cossi, M. Scalmani, G. Rega, N. Petersson, G. A. Nakatsuji, H. Hada, M. Ehara, M. Toyota, K. Fukuda, R. Hasegawa, J. Ishida, M. Nakajima, T. Honda, Y. Kitao, O. Nakai, H. Klene, M. Li, X. Knox, J. E. Hratchian, H. P. Cross, J. B. Bakken, V. Adamo, C. Jaramillo, J. Gomperts, R. Stratmann, R. E. Yazyev, O. Austin, A. J. Cammi, R. Pomelli, C. Ochterski, J. W. Ayala, P. Y. Morokuma, K. Voth, G. A. Salvador, P. Dannenberg, J. J. Zakrzewski, V. G. Dapprich, S. Daniels, A. D. Strain, M. C. Farkas, O. Malick, D. K. Rabuck, A. D. Raghavachari, K. Foresman, J. B. Ortiz, J. V. Cui, Q. Baboul, A. G. Clifford, S. Cioslowski, J. Stefanov, B. B. Liu, G. Liashenko, A. Piskorz, P. Komaromi, I. Martin, R. L. Fox, D. J. Keith, T. Al-Laham, M. A. Peng, C. Y. Nanayakkara, A. Challacombe, M. Gill, P. M. W. Johnson, B. Chen, W. Wong, M. W. Gonzalez, C. and Pople, J. A. 2004. Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc. Wallingford CT.

Gallay, P. Swingle, S. Aiken, C. Trono, D. 1995. HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 80, 379–388.

Gallo, R. C. Salahuddin, S. Z. Popovic, M. Shearer, G. M. Kaplan, M. Haynes, B. F. Palker, T. J. Redfield, R. Oleske, J. Safai, B. White, G. Foster, P. & Markham, P. D. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224, 500-503.

Gao, K. Butler, S. L. Bushman, F. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: Arrangement of protein domains in active cDNA complexes. *EMBO J.*, 20, 3565-3576.

Gheysen, D. Jacobs, E. de Foresta, F. Thiriart, C. Francotte, M. Thines, D. & De Wilde, M. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirusinfected insect cells. *Cell*, 59, 103-112.

Gillet, V. J. 2004b. Applications of Evolutionary Computation in Drug Design, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Structure and Bonding, Vol. 110: 133–152.

Gillet, V. J. 2004a. Chemoinformatics: Concepts, Methods, and Tools for Drug Discovery Methods in Molecular Biology: Designing Combinatorial Libraries Optimized on Multiple Objectives, Editor: Bajorath, J. vol. 275, Totowa, NJ

Gilson, M. K. Given, J. A. Bush, B. L. McCammon, J. A. 1997. The Statistical-Thermodynamic Basis for Computation of Binding Affinities: A Critical Review. *Biophys. J.* 72, 1047-1069.

Gitti, R. K. Lee, B. M. Walker, J. Summers, M. F. Yoo, S. & Sundquist, W. I. 1996. Structure of the aminoterminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*, 273, 231-235.

Gohlke, H. Case, D. A. 2003. Converging Free Energy Estimates: MM-PB(GB)SA Studies on the Protein-Protein Complex Ras-Raf. *J. Comput. Chem.*, 25:238-250.

Goldgur, Y. Craigie, R. Cohen, G.H. Fujiwara, T. Yoshinaga, T. Fujishita, T. Sugimoto, H. Endo, T. Murai, H. Davies, D.R. 1999. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: a platform for antiviral drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13040-13043

Goldgur, Y. Dyda, F. Hickman, A.B. Jenkins, T.M. Craigie, R. Davies, D.R. 1998. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 95: 9150-9154

Goldsmith, M. A. Warmerdam, M. T. Atchison, R. E. Miller, M. D. & Greene, W. C. 1995. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol.* 69, 4112-4121.

Gorman, C.F. 1969. Hoabinhian: a pebble-tool complex with early plant associations in Southeast Asia. *Science*, 163, 671–73.

Gottlieb, M. S. Schroff, R. Schanker, H. M. Weisman, J. D. Fan, P. T. Wolf, R. A. Saxon, A. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously health homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305(24): 1425-31.

Grace, 2012. <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace>. 13/01/2012.

Greenwald, J. Le, V. Butler, S.L. Bushman, F.D. Choe, S. 1999. The mobility of an HIV-1 integrase active site loop is correlated with catalytic activity. *Biochemistry* 38: 8892-8898.

Griffithb, R. Luua, T. T. T. Garnera, J. Kellera, P. A. 2005. Combining structure-based drug design and pharmacophores, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23, 439–446

Gulick, R. M. Mellors, J. W. Havlir, D. Eron, J. J. Gonzalez, C. McMahon, D. Richman, D. D. 24 Structural Biology of HIV Valentine, F. T. Jonas, L., Meibohm, A., Emini, E. A. & Chodakewitz, J. A. 1997. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *New Eng. J. Med.* 337, 734-739.

Güven S. G., 2007. HIV İnfeksiyonun Klinik Özellikleri ve Tedavisi, AIDS Tedavi ve Araştırma Merkezi, Hacettepe Üniv. Ankara.

Hansch, C. 1969. A Quantitative Approach to Biochemical Structure-Activity Relationships *Accounts of Chemical Research* 2 (8), 232-239

Healy, E. F. Sander, J. King, P. J. Robinson Jr, W. E. 2009. A docking study of L-chicoric acid with HIV-1 integrase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 27, 584-589.

Heinzinger, N.K., Bukrinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.-A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M., Emerman, M., 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7311–7315.

Henriet, S. Richer, D. Bernacchi, S. Decroly, E. Vigne, R. Ehresmann, B. Ehresmann, C. Paillart, J-C. and Marquet, R. 2005. Cooperative and Specific Binding of Vif to the 5' Region of HIV-1 Genomic RNA, *J. Mol. Biol.* 354, 55–72.

Heuer, T. S. Brown, P. O. 1998. Photo-cross-linking studies suggest a model for the architecture of an active human immunodeficiency virus type 1 integrase-DNA complex. *Biochemistry*, 37, 6667-6678.

- Hevener, K. E. Zhao, W. Ball, D. M. Babaoglu, K. Qi, J. White, S. W. and Lee, R. E. 2009. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase *J. Chem. Inf. Model.* 49, 444–460.
- Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M. & Sundquist, W. I. 1996. Crystal structures of the trimeric HIV-1 matrix protein: implications for membrane association. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 3099-3104.
- Hindmarsh, P. Leis, J. 1999. Retroviral DNA Integration, *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, Vol. 63, No.4, p.836–843
- Homer, *Odyssey*, IV., Homer, *Iliad*, XI.
- Honma, T. 2003. Recent advances in de novo design strategy for practical lead identification. *Medicinal Research Reviews*, 23: 606–632.
- Hou, T. Wang, J. Li, Y. and Wang, W. 2011. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 69-82.
- Hu, J. P. Gong, X. Q. Su, J. G. Chen, W. Z. Wang, C. X. 2008. Study on the molecular mechanism of inhibiting HIV-1 integrase by peptide via molecular modeling approach. *Biophysical Chemistry*, 132, 69–80.
- Huang, H. Chopra, R. Verdine, G. L. Harrison, S.C. 1998. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 282: 1669-1675
- Huang, H. Yu, H. W. Chen, C. Hsu, C. Chen, H. Lee, K. Tsai, F. Chen, 2010. C. Y. Current developments of computer-aided drug design, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 41, 623–635.
- Huang, H. Chopra, R. Verdine, G. L. Harrison, S.C. 1998. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 282: 1669-1675
- Huang, M. Grant, G. H. W. Richards, G. 2011. Binding modes of diketo-acid inhibitors of HIV-1 integrase: A comparative molecular dynamics simulation study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 29, 956–964.
- Humphrey, W. Dalke, A. and Schulten, K. 1996, "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, vol. 14, pp. 33-38.
- HyperChem, 2002. HyperChem Computational Chemistry, Tools for Molecular Modeling. p: 19, USA.
- Irikura, K. K. And Frurip, D. J. 1998. Computational Thermochemistry, ACS Symposium Series American Chemical Society: Washington, DC.
- Jain, A. N. 2003. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine, *J. Med. Chem.*, 46, 499-511.

Jaskolski, M. 2011. Structural studies of retroviral integrases. HIV-1 Integrase: Mechanism and Inhibitor Design, First Edition. p: 35-49.

Jere A. Fujita M. Adachi A. Nomoguchi M. 2010. Role of HIV-1 Nef Protein for virus replication in vitro. *Microbes and Infection* 12,65-70

Jianping, H. Cunxin, W. 2010, Molecular Dynamics Simulation of HIV-1 Integrase Dimer Complexed with Viral DNA, *Chin. J. Chem.*, 28, 33-40.

Johnson, B. C. Metifiot, M. Pommier, Y. and Hughes, S. H. 2012. Molecular Dynamics Approaches Estimate Binding Energy of HIV-1 Integrase Inhibitors and Correlate with In Vitro Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(1), 411-419.

Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), 2010. GLOBAL REPORT UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC Geneva, Switzerland. 20/12/2012.

Jones, G. Willett, R. Glen, R. Leach, A. R. Taylor, R. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol.Biol.*, 267, 727-748.

Jones, T. A. Zou, J. Y. Cowan, S. W. Kjeldgaard, M. 1991. *Acta. Crystallogr. Sect. A* 47, 110-119.

Jorgensen, W. L. Chandrasekhar, J. Madura, J. Impey, R. W. Klein, M. L. 1983. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.*, 79, 926.

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. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 11225.

Joseph-McCarthy, D. 1999. Computational approaches to structure-based ligand design, *Pharmacology & Therapeutics*, 84: 179–191

Kaminski, J. J. Rane, D. F. Snow, M. E. Weber, L. Rothofsky, M. L. Anderson, S. D. Lin, S. L. 1997. Identification of novel farnesyl protein transferase inhibitors using three-dimensional searching methods. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40: 4103–4112.

Kane, M. B. 2008. *Drugs The Straight Facts: HIV/AIDS Treatment Drugs*. Infobase Publishing, Ed. Triggle, D. J. New York.

Kanellou, V. 2004. Ancient Greek medicine as the foundation of contemporary medicine. *Tech Coloproctol*, 8:S3-S4.

Kapetanovic, I. M. 2008. Computer-aided drug discovery and development (CADD): Insilico-chemico-biological approach. *Chemico-Biological Interactions*, 171, 165–176.

Karki, R. G. Tang, Y. Burke, T. R. Jr. And Nicklaus M. C. 2004. Model of full-length HIV-1 integrase complexed with viral DNA as template for anti-HIV drug design. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 18: 739–760.

- Kashi, V.P. Jacob, R. A. Paul, S. Nayak, K. Satish, B. Swaminathan, S. Satish, K.S. Ranga, U. 2009. HIV-1 Tat-specific IgG antibodies in high-responders target a B-cell epitope in the cysteine-rich domain and block extracellular Tat efficiently. *Vaccine*, 27, 6739-6747
- Katz, R.A. Merkel, G. Kulkosky, J. Leis, J. Skalka, A.M. 1990. The avian retroviral IN protein is both necessary and sufficient for integration recombination in vitro. *Cell*, 63, 87–95.
- Katzman, M. Katz, R.A. Skalka, A.M., Leis, J. 1989. The avian retroviral integration protein cleaves the terminal sequences of linear viral DNA at the in vivo sites of integration. *J. Virol.*, 63, 5319–5327.
- Kawasuji, T. Fuji, M. Yoshinaga, T. Sato, A. Fujiwara, T. and Kiyama, R. 2006. A platform for designing HIV integrase inhibitors. Part 2: A two-metal binding model as a potential mechanism of HIV integrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 8420–8429.
- Kawasuji, T. Yoshinaga, T. Sato, A. Yodo, M. Fujiwara, T. and Kiyama, R. 2006. A platform for designing HIV integrase inhibitors. Part 1: 2-Hydroxy-3-heteroaryl acrylic acid derivatives as novel HIV integrase inhibitor and modeling of hydrophilic and hydrophobic pharmacophores. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 8430–8445.
- Kellenberger, E. Rodrigo, J. Muller, P. and Rognan, D. 2004. Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening Accuracy. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57:225–242.
- King, P. J. 2000. Analyses of an L-Chicoric Acid-Resistant Variant of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase. Phd Thesis, University of California, Irvine.
- Knipe, D. M. Howley, P. M. Griffin, D. E. Lamb, R. A. Martin, M. A. Roizman, B. Straus, S. E. 2001. *Fields Virology Volume I Fourth Edition*.
- Kollman, P. A Massova, I. Reyes, C. Kuhn, B. Huo, S. Chong, L. Lee, M. Lee, T. Duan, Y. Wang W, Donini, O. Cieplak, P. Srinivasan, J. Case, D. A. Cheatham TE 3rd. 2000. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.*, 33(12):889-97.
- Kontoyianni, M. McClellan, L. M. Sokol, G. S. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 558-565.
- Kovalevsky, A.Y. Wang, Y. -F. Tie, Y. Weber, I.T. 2007. Atomic resolution crystal structures of HIV-1 protease and mutants V82A and I84V with saquinavir. *Proteins* 67: 232-242
- Kroemer, R. 2007. Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring, *Current Protein and Peptide Science*, 8, 312-328.
- Kukolj, G. and Shalka, A. M. 1995. Enhanced and coordinated processing of . synapsed viral . DNA ends by retroviral integrases in vitro. *Genes & Dev.* 9: 2556-2567.
- Kukolj, G. Jones, K.S. Skalka, A.M. 1997. Subcellular localization of avian sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 integrases. *J. Virol.* 71, 843– 847.

Kuntz, I. D. Blaney, J. M. Oatley, S. J. Lange, R. Ferrin, T. E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, 161, 269-288.

Laboulais, C. Deprez, E. Leh, H. Mouscadet, J-F. Brochon, J-F, and Le Bret, M. 2001. HIV-1 Integrase Catalytic Core: Molecular Dynamics and Simulated Fluorescence Decays, *Biophysical Journal*, 81, 473-489.

Lake, J. Carr, J. Feng, F. Mundy, L. Burrell, C. Li, P. 2003. The role of Vif during HIV-1 infection: interaction with novel host cellular factors, *Journal of Clinical Virology*, 26, 143-152.

Lang, P. T. Brozell, S. R. Mukherjee, S. Pettersen, E. F. Meng, E. C. Thomas, V. Rizzo, R. C. Case, D. A. James, T. L. And Kuntz, I. D. 2009, DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes. *RNA*, Vol. 15, No. 6 219–1230.

Lee, M. C. Deng, J. Briggs, J. M. and Duan, Y. 2005. Large-Scale Conformational Dynamics of the HIV-1 Integrase Core Domain and Its Catalytic Loop Mutants. *Biophysical Journal*, 88, 3133-3146.

Leinonen, R. Diez, F. Binns, D. Fleischmann, W. Lopez, R. & Apweiler, R. 2004. Uniprot archive. *Bioinformatics*. 20, 3236–7.

Levy, J. A. Hoffmann, A. D. Kramer, S. M. Landis, J. A. Shimabukuro, J. M. & Oshiro, L. S. 1984. Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. *J. Infect. Dis.*, 152, 734-738.

Lewars, E. 2004. COMPUTATIONAL CHEMISTRY, Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.

Liang, B. C. 2002. The Drug Development Process I: Drug Discovery and Initial Development, *Hospital Physician*, : The Drug Development Process : pp . 18 – 21

Lietava, J. 1992. Medicinal plants in a middle paleolithic grave Shanidar IV *J. Ethnopharmacol.* 35: 263–6.

Lin, F. And Wang, R. 2010. Systematic Derivation of AMBER Force Field Parameters Applicable to Zinc-Containing Systems. *J. Chem. Theory Comput.* 6, 1852–1870.

Lin, J.H. A.L. Perryman, J.R. Schames, and J.A. McCammon, 2003. The relaxed complex method: Accommodating receptor flexibility for drug design with an improved scoring scheme. *Biopolymers*, 68(1): 47-62.

Lins, R. D. Briggs, J. M. Straatsma, T. P. Carlson, H. A. Greenwald, J. Choe, S. and McCammon J. A. 1999. *Biophysical Journal*, Volume 76, 2999–3011.

Liu, M. Cong, X. J. Li, P. Tan, J. J. Chen, W. Z. Wang, C. X. 2009. Study on the Inhibitory Mechanism and Binding Mode of the Hydroxycoumarin Compound NSC158393 to HIV-1 Integrase by Molecular Modeling. *Biopolymers*, Volume: 91, Number: 9, 700-709.

- Liu, Y. 2006. Conditional Graphical Models for Protein Structure Prediction. Phd Thesis. Language Technologies Institute School of Computer Science, Carnegie Mellon University.
- Lodi, P. J., Ernst, J. A., Kuszewski, J., Hickman, A. B., Engelman, A., Craigie, R., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. 1995. Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. *Biochemistry*, 34, 9826-9833.
- Loizidou, E. Z. Zeinalpour-Yazdi, C. D. Christofides, T. Kostrikis, L. G. 2009. Analysis of binding parameters of HIV-1 integrase inhibitors: Correlates of drug inhibition and resistance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4806–4818.
- MacKerell, A. D. Bashford, D. Bellott, M. Dunbrack, R. L. Evanseck, J. D. Field, M. J. Fischer, S. Gao, J. Guo, H. Ha, S. Joseph-McCarthy, D. Kuchnir, L. Kuczera, K. Lau, F. T. K. Mattos, C. Michnick, S. Ngo, T. Nguyen, D. T. Prodhom, B. Reiher, W. E. Roux, B. Schlenkrich, M. Smith, J. C. Stote, R. Straub, J. Watanabe, M. Wiorkiewicz-Kuczera, J. Yin, D. Karplus, M. J. *Phys. Chem. B* 1998, 102, 3586.
- Mahnke, L. A. Belshan, M. Ratner, Lee. 2006. Analysis of HIV-2 Vpx by modeling and insertional mutagenesis *Virology* 348 (2006) 165–174.
- Mahoney, M. W. Jorgensen, W. L. 2000. A five-site model liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, non-polarizable models. *J. Chem. Phys.*, 112, 8910.
- Maignan, S. Guilloteau, J.P. Zhou-Liu, Q. Clement-Mella, C. Mikol, V. 1998. Crystal structures of the catalytic domain of HIV-1 integrase free and complexed with its metal cofactor: high level of similarity of the active site with other viral integrases. *J.Mol. Biol.* 282: 359-368.
- Makhija, T. M. & Kulkarni, V. M. 2002. 3D-QSAR and molecular modeling of HIV-1 integrase inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 16: 181–200.
- Makriyannis, A. Biege, 2004. D. DRUG DISCOVERY and STRATEGIES METHODS, Marcel Dekker, New York.
- Malim, M. H. Hauber, J. Le, S. Y. Maizel, J. V. & Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, 338, 254-257.
- Malim, M. H. Tiley, L. S. McCarn, D. F. Rusche, J. R. Hauber, J. & Cullen, B. R. 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev transactivator to its RNA target sequence. *Cell*, 60, 675-683.
- Marchand, C. Johnson, A. A. Karki, R. G. Pais, G. C. G. Zhang, X. Cowansage, K. Patel, T. A. Nicklaus, M. C. Burke, T. R. and Pommier, Y. 2003. Metal-Dependent Inhibition of HIV-1 Integrase by β -Diketo Acids and Resistance of the Soluble Double-Mutant (F185K/C280S). *Mol Pharmacol* 64: No:3, 600–609.
- Marchand, C. Johnson, A. A. Semenova, E. Pommier, Y. 2006. Mechanisms and inhibition of HIV Integration. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* Vol. 3, No. 2 253-260
- Martin, Y. C. 1992. 3D database searching in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* 35: 2145–2154.

- Martin, Y. C. Bures M. G. Danaher E. A. DeLazzer J, Lico I, Pavlik P. A. 1993. A fast new approach to pharmacophore mapping and its application to dopaminergic and benzodiazepine agonists. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 7(1):83–102.
- Marti-Renom, M. A. Stuart, A. C. Fiser, A. Sanchez, R. Melo, F. and Sali, A. 2000. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291.
- Marti-Renom, M. A. Stuart, A. Fiser, A. Sanchez, R. Melo, F. Sali, A. 2000. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291-325.
- Massiah, M. A., Worthylake, D., Christensen, A. M., Sundquist, W. I., Hill, C. P. & Summers, M. F. 1996. Comparison of the NMR and X-ray structures of the HIV-1 matrix protein: evidence for conformational changes during viral assembly. *Protein Sci.* 5, 2391-2398.
- Masur. H. Michelis, M. A. Greene, J. B. Onorato, I. Stouwe, R. A. Holzman, R. S. Wormser, G. Brettman, L. Lange, M. Murray, H. W. Cunningham-Rundles, S. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *New England Journal of Medicine*, 305(24):1431-8.
- Matthews, S. Barlow, P. Boyd, J. Barton, G. Russell, R. Mills, H. Cunningham, M. Meyers, N. Burns, N. Clark, N. Kingsman, S. Kingsman, A. & Campbell, I. 1994. Structural similarity between the p17 matrix protein of HIV-1 and interferon- γ . *Nature*, 370, 666-668.
- Matthews, S. Barlow, P. Clark, N. Kingsman, S. Kingsman, A. & Campbell, I. 1995. Refined solution structure of p17, the HIV matrix protein. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 725-728.
- Mazumder, A. Gazit, A. Levitzki, A. Nicklaus, M. Yung, J. Kohlhagen, G. and Pommier, Y. 1995. Effects of Tyrophostins, Protein Kinase Inhibitors, on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase. *Biochemistry*, 34, 15 1 1 1 - 15 122.
- McCammion, J. A. Molecular Dynamics study of the bovine pancreatic trypsin inhibitor. In *Models for Protein Dynamics*. CECAM: Orsay, France, 1976 p 137.
- Mccammon, J. A. Gelin, B. R. & Karplus, M. 1977. Dynamics of folded proteins, *Nature* 267, 585 – 590.
- McColl, D. Chen, D. J. 2010. Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: Bringing IN a new era of antiretroviral therapy. *Antiviral Research* 85, 101–118.
- McMartin, C. Bohacek, R. S. 1997. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J Comput Aided Mol Des.*, 11(4):333-44.
- Meek, P, J. Liu, Z. Tian, L. Wang, C. Y. Welsh, W. J. and Zauhar, R, J. 2006. Shape signatures: speeding up computer aided drug discovery, *Elsevier pg:*895-904
- Miller, M.D. Farnet, C.M., Bushman, F.D. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* 71, 5382–5390.
- Mishra, S. 2009. Function Prediction of Rv0079, a Hypothetical Mycobacterium Tuberculosis Dosr Regulon Protein. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27, 283.

- Molteni, V. Greenwald, J. Rhodes, D. Hwang, Y. Kwiatkowski, W. Bushman, F.D. Siegel, J.S. Choe, S. 2001. Identification of a small-molecule binding site at the dimer interface of the HIV integrase catalytic domain. *Acta Crystallogr., Sect. D* 57: 536-544.
- Morellet, N. Bouaziz, S. Petitjean, P. Roques, B. P. 2003. NMR Structure of the HIV-1 Regulatory Protein VPR. *J. Mol. Biol.* 327, 215–227.
- Morris, G. M. Huey, R. Lindstrom, W. Sanner, M. F. Belew, R. K. Goodsell, D. S. Olson, A. J. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 30, No. 16, 2785–2791.
- Murphy, J.E. Goff, S.P. 1992. A mutation at one end of Moloney murine leukemia virus DNA blocks cleavage of both ends by the viral integrase in vivo. *J. Virol.* 66, 5092–5095.
- Murzin, A. Brenner, S. Hubbard, T. & Chothia, C. 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol.* 247, 536–40.
- Mustata, G. I. Brigo, A. and Briggs, J. M. 2004. HIV-1 integrase pharmacophore model derived from diverse classes of inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 1447–1454.
- Nair, V. Uchil, V. Chi, G. Dams, I. Cox, A. 2007. Biologically-Validated HIV Integrase Inhibitors with Nucleobase Scaffolds: Structure, Synthesis, Chemical Biology, Molecular Modeling, and Antiviral Activity. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 26:665–668.
- Nicklaus, M. C. Neamati, N. Hong, H. Mazumder, A. Sunder, S. Chen, J. Milne, G. W. A. Pommier, Y. 1997. HIV-1 integrase pharmacophore: Discovery of inhibitors through three-dimensional database searching. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40: 920–929.
- Nomaguchi, M. Fujita, M. Adachi, A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection* 10 960-967.
- Nunthaboot, N. Pianwanit, S. Parasuk, V. Ebalunode, J. O. Briggs, J. M. and Kokpol, S. 2007. Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Molecular Dynamics Simulations of HIV-1 Integrase/Inhibitor Complexes. *Biophysical Journal*, 93, 3613-3626.
- O. Trott, A. J. Olson, 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461
- Obiol-Pardo, C. and Rubio-Martinez, J. 2007. Comparative Evaluation of MMPBSA and XSCORE To Compute Binding Free Energy in XIAP-Peptide Complexes. *J. Chem. Inf. Model.*, 47, 134-142.
- Onodera, K. Satou, K. and Hirota, H. 2007. Evaluations of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase, *J. Chem. Inf. Model.* 47, 1609-1618.
- Oshiro, C. M. Kuntz, I. D. Dixon, J. S. 1995. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 9, 113-130.
- Öner, M. 2009. Genel Mikrobiyoloji. Ege Üniv. Fen Fak. Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A. B. D., İzmir.

- Pace, P. Spieser, S. A. H. Summa, V. 2008. 4-Hydroxy-5-pyrrolinone-3-carboxamide HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18 3865–3869.
- Pan, C. Liu, S. Jiang, S. 2010. HIV-1 gp41 Fusion Intermediate: A Target for HIV Therapeutics *J Formos Med Assoc.*, Vol:109 No: 2
- Park, M. Dessel, A. L. Smrcka, A. V. and Ster, H. A. 2009. Evaluating Docking MEthods for Prediction of Binding Affinities of Small Molecules to the G Protein $\beta\gamma$ Subunits, *J. Chem. Inf. Model.* 49, 437-443.
- Parrill A. L. 2003. HIV-1 Integrase Inhibition: Binding Sites, Structure Activity Relationships and Future Perspectives, *Current Medicinal Chemistry*, 10, 1811-1824,
- Pearlman, D. A. J. 1999. Free energy grids: a practical qualitative application of free energy perturbation to ligand design using the OWFEG method. *Med. Chem.*, 42, 4313-4324.
- Pensak, D. A. 1989. Molecular modelling: scientific and technological boundaries. *Pure & Appl. Chem.* Vol. 61, No. 3, pp. 601-603,
- Perryman, A. L. McCammon, J. A. 2002. AutoDocking dinucleotides to the HIV-1 integrase core domain: exploring possible binding sites for viral and genomic DNA. *J Med Chem.*, 45(26):5624-7.
- Pettersen, E. F. Goddard, T. D. Huang, C. C. Couch, UCSF G. S. Greenblatt, D. M. Meng, E. C. Ferrin, T. E. 2004. Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* (13):1605-12.
- Phillips, J. C. Braun, R. Wang, W. Gumbart, J. Tajkhorshid, E. Villa, E. Chipot, C. Skeel, R. D. Kale, L. and Schulten, K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26:1781-1802.
- Pizzi, R. 2000. *Salving with Science: The Roaring twenties and the Great Depression, The pharmaceutical Century: Ten decades of Drug Discovery Supplement to American Chemical Society*, pp. 34-51.
- Podtelezchnikov, A. A. Gao, K. Bushman, F. D. McCammon, J. A. 2003. Modeling HIV-1 integrase complexes based on their hydrodynamic properties. *Biopolymers*, 68, 110-120.
- Powell, M. A. 1993. Drugs and pharmaceuticals in ancient Mesopotamia, in *The Healing Past. Pharmaceuticals in the Biblical and Ancient World*, eds I. Jacob, W. Jacob. Leiden, E.J. Brill, p. 54.
- Presegué, L. B. 2007. Mecanisme d'activació de la Rodopsina i reconeixement molecular de la proteïna Gt, Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Química. Barcelona.
- Puras-Lutzke, R. A., Vink, C. & Plasterk, R. H. A. 1994. Characterization of the minimal DNA-binding domain of the HIV integrase protein. *Nucl. Acids Res.* 22, 4125-4131.
- Pymol, 2011. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.

- Qi, M. Aiken, C. 2008. Nef enhances HIV-1 infectivity via association with the virus assembly complex. *Virology* 373,287-297
- Rahman, A. 1964. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon. *Phys Rev* 136: A405-A411. doi:10.1103/PhysRev.136.A405.
- Randmer, R. J. Kollman, P. A. 1998. The application of three approximate free energy calculations methods to structure based ligand design: trypsin and its complex with inhibitors. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 12, 215–227.
- Rao, Z. Belyaev, A. S. Fry, E. Roy, P. Jones, I. M. & Stuart, D. I. 1995. Crystal structure of SIV matrix antigen and implications for virus assembly. *Nature*, 378, 743-747.
- Rarey, M. Kramer, B. Lengauer, T. Klebe, G. A. 1996. Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.*, 261, 470-489.
- Rastelli, G. Del Rio, A. Degliesposti, G. Sgobba, M. 2010. Fast and Accurate Predictions of Binding Free Energies Using MM-PBSA and MM-GBSA. *J. Comput. Chem.*, 31:797-810.
- Reddy, M. R. Parrill, A. L. 1999. Overview of Rational Drug Design, ACS Symposium Series American Chemical Society: Washington, DC,
- Ren, J. Esnouf, R. Hopkins, A. Ross, C. Jones, Y. Stammers, D. and Stuart, D. 1995. The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with 9-chloro-TIBO: lessons for inhibitor design. *Structure*, 3:915-926
- Richards, F. M. 1977. Areas, volumes, packing and protein structure. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 6:151–76.
- Riddle, J. M. 1986. Dioscorides on Pharmacy and Medicine, History of Science Series, No. 3. Austin: University of Texas Press.
- Ring, C. Sun, E. McKerrow, J. Lee, G. Rosenthal, P. Kuntz, I. & Cohen, F. 1993. Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3583–3587.
- Rodiger, T. Howell, P. L. Pomes, R. 2005. Absolute free energy calculations by thermodynamic integration in four spatial dimensions *J. Chem. Phys.*, 123, 034104.
- Roe, T. Reynolds, T.C. Yu, G. Brown, P.O. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12, 2099– 2108.
- Roth, M.J. Schwartzberg, P.L. Goff, S.P. 1989. Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: dependence of IN function and terminal DNA sequence. *Cell* 58, 47–54.
- Rudgley, R. 1999. Religion and Psychoactive Sacraments: An Entheogen Chrestomathy; Lost Civilizations of the Stone Age. The Free Press. pp. 126–41 New York.

- Ruiz-Pernía, J. J. Alves C. N. Moliner, V. Silla E. Tuñón, I. 2009. A QM/MM study of the reaction mechanism for the 30-processing step catalyzed by HIV-1 integrase. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 898, 115–120.
- Ryckaert, J. P. Cicotti, G. and Berendsen, H. J. C. 1977. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes *J. Comput. Phys.* 23, 327-341.
- Sağlık Bakanlığı 2011, T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2010. Ankara. 13/01/2012.
- San, L. T. 2005. Inhibition of HIV-1 Integrase by α -luffin and RNA Interference, Phd Thesis, The Chinese University of Hong Kong.
- Sanchez, F. J. C. 2003. Computational Studies on the Structure and Dynamics of Bioactive Peptides, Phd Thesis, Escola Tecnica Superior D'engeneria Industrial De Barcelona, Universitat Politecnica De Catalunya. Barcelona.
- Sarafianos, S. G. Marchand, B. Das, K. Himmel, D. M. Parniak, M. A. Hughes, S. H. and Arnold, E. 2009. Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition. *J. Mol. Biol.*, 693–713.
- Schaal, W. 2002. Computational Studies of HIV-1 Protease Inhibitors. Phd Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 263. 88 pp. Uppsala. ISBN 91-554-5213-2.
- Schames, J.R. R.H. Henchman, J.S. Siegel, C.A. Sotriffer, H. Ni, and J.A. McCammon, 2004. Discovery of a novel binding trench in HIV integrase. *J Med Chem*, 47(8): 1879-81.
- Scott, W. R. P. Hunenberger, P. H. Tironi, I. G. Mark, A. E. Billeter, S. R. Fennen, J. Torda, A. E. Huber, T. Kruger, P. van Gunsteren, W. F. 1999. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package, *J. Phys. Chem.*, A 103, 3596.
- Sechi, M. Carcelli, M. Rogolino, D. and Neamati, N. 2011. Role of Metals in HIV-1 Integrase Inhibitor Design, in *HIV-1 Integrase: Mechanism and Inhibitor Design* (ed N. Neamati), John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9781118015377.ch20
- Sechi, M. Carta, F. Sannia, L. Dallochio, R. Dessi, A. Al-Safi, R. I. Neamati, N. 2009. Design, synthesis, molecular modeling, and anti-HIV-1 integrase activity of a series of photoactivatable diketo acid-containing inhibitors as affinity probes. *Antiviral Research*, 81, 267–276.
- Sen S, Nilsson L. Structure, interaction, dynamics and solvent effects on the DNA-EcoRI complex in aqueous solution from molecular dynamics simulation. 1999. *Biophys J.*, 77(4):1782–1800.
- Sherman, P. A. Fyfe, J. A. 1990. Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5119–5123.

- Shojania, S. and O'Neil, J. D. 2006. HIV-1 Tat Is a Natively Unfolded Protein The Solution Conformation and Dynamics of Reduced HIV-1 Tat-(1–72) by NMR Spectroscopy, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 13, pp. 8347–8356.
- Sierra, S. Kupfer, B. Kaiser, R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 AND its replication. *Journal of Clinical Virology*, 34, 233-244.
- Simms, J. 2010. Homology Modelling of G Protein-Coupled Receptors, in *G Protein-Coupled Receptors: Essential Methods* (eds D. R. Poyner and M. Wheatley), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Sippel, M. Sotriffer, C. A. 2010. Molecular Dynamics Simulations of the HIV-1 Integrase Dimerization Interface: Guidelines for the Design of a Novel Class of Integrase Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* 50:604-614
- Smith C. G. O'Donnella J. T. 2006. *The Process of New Drug Discovery and Development* (second edition), Informa Healthcare USA, Inc.
- Sneader, W. 2006. *Drug Discovery: A History*. John Wiley & Sons Ltd, 1-31, England.
- Solecki, R. S. 1975. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science*, 190: 880–1.
- Somberg, J. C. 1996. *The Evolving Drug Discovery Process, The Drug Discovery Process: Increasing Efficiency and Cost Effectiveness*, eds Welling, P. G. Lasagna, L. Banakar, U. V. Marcel Dekker, New York.
- Sommer, J. D. 1999. The Shanidar IV flower burial: a re-evaluation of Neanderthal burial ritual. *Camb. Arch. J.*, 9: 127–9.
- Son L.T. 2005. *Inhibition of HIV-1 Integrase by a-luffin and RNA Interference*. Phd. Thesis, The Chinese University of Hong Kong.
- Sourgen, F., Maroun, R. G., Frere, V., Bouziane, M., Aucoair, C., Troalen, F. & Fermandjian, S. 1996. A synthetic peptide from the human immunodeficiency virus type-1 integrase exhibits coiled-coil properties and interferes with the in vitro integration activity of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 240, 765-773.
- Sprague, P. W. 1995. Automated chemical hypothesis generation and database searching with Catalyt. *Perspectives in Drug Discovery Design*, 3:1–20.
- Sprague, PW. Hoffman, R. 1997. CATALYST pharmacophore models and their utility as queries for searching 3D databases. In: Van de Waterbeemd H, Testa B, Folkers G, editors. *Computer-assisted lead finding and optimization*. Basle: Helvetica Chimica Acta. pp 225–240.
- Srinivasan, J. Cheatham, T. E. III Cieplak, P. Kollman, P. A. Case, D. A. 1998. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate–DNA helices. *J Am Chem Soc* 1998, 120, 9401.
- Straatsma, T. P. McCammon, J. A. 1992, *Computational Alchemy*. *Ann. ReV. Phys. Chem.*, 43, 407.

Taft, C. A. da Silva, V. B. and da Silva, C. H. T. d. P. 2008. Current topics in computer-aided drug design. *J. Pharm. Sci.* 97: 1089–1098. doi: 10.1002/jps.21293

Tang, Y. Zhu, W. Chen, K. Jiang, H. 2006. New Technologies in Computer-Aided Drug Design: Toward Target Identification and New Chemical Entity Discovery, *Drug Discovery Today: Technologies, Medicinal chemistry*, Vol. 3, No. 3,

Teixeira, C. Gomes, J. R. B. Gomes, P. Maurel, F. 2011. Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: Brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 979-992.

Thompson, R. C. 1924. *The Assyrian herbal . . . A Monograph on the Assyrian Vegetable Drugs, the subject matter of which was communicated in a paper to the Royal Society, March 20, London, Luzac.*

Tortora, G. J. Funke, B. R. Case, C. L. 2010. *Microbiology an Introduction Tenth Edition.* Pearson Education, Inc., U.S.A.

Totrov, M. M. and Abagyan, R. A. 1997. Flexible Protein-Ligand Docking by Global Energy Optimization in Internal Coordinates. *Proteins Supplement 1*, 215-220.

Trott, O. Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, 31: 455–461.

Tsai S. C. 2002. *An Introduction to Computataional Biochemistry.* Wiley-Liss, Inc., New York.

Tsai, K-C. Chen, S-Y. Liang, P-H. Lu, I-L. Mahindroo, N. Hsieh, H-P. Chao, Y-S. Liu, L. Liu, D. Lien, W. Lin, T-H. and Wu, S-Y. 2006. Discovery of a Novel Family of SARS-CoV Protease Inhibitors by Virtual Screening and 3D-QSAR Studies. *J. Med. Chem.*, 49, 3485-3495.

Tsinopoulos, C. McCarthy, I. 2002. An Evolutionary Classification of the Strategies for Drug Discovery. In Frizelle G. & Richards H. (eds.), in *Proceedings of the 2002 Conference of the Manufacturing Complexity Network (Tackling industrial complexity: the ideas that make a difference)*, 9th–10th April, University of Cambridge, U.K. pp 373 – 386.

Turner, B. G. and Summers, M. F. 1999. Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285, 1-32.

U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>. 12/02/2012.

Ustaçelebi Ş. 1999. “İnsan İmmünyetmezlik Virusları HIV-1 ve HIV-2” Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji . Güneş Kitapevi, sayfa:987-1001. Ankara.

Van Der Spoel, D. Lindahl, E. Hess, B. Groenhof, G. Mark, A. E. Berendsen H. J. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free, *J Comput Chem.* 2005 Dec26(16):1701-18.

Vandemark, P. Batzing, B. L. 1986. *The microbes: An Introduction to Their Nature and Importance.* The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. Reading, MA.

- Viola, E. 1994. Retrovirus integration mediated by HIV integrase in vitro. PHD thesis, Stanford University.
- Walker, R. 2003. The Development of a QM/MM Based Linear Response Method and its Application to Proteins. Phd. Thesis, Imperial College Department of Chemistry, London.
- Wang, J. Kollman, P. and Kuntz, I. D. 1999. Flexible Ligand Docking: A Multistep Strategy Approach. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 36, 1-19.
- Wang, J. Wang, W. Kollman, P. A. and Case, D. A. 2006. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 25, 247-260.
- Wang, J. Y. Ling, H. Yang, W. Craigie, R. 2001. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: Implications for domain organization in the intact protein. *EMBO J.*, 20, 7333-7343.
- Wang, L. D. Liu, C. L. Chen, W. Z. Wang, C. X. 2005. Constructing HIV-1 integrase tetramer and exploring influences of metal ions on forming integrase-DNA complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337, 313-319.
- Wang, R. Lu, Y. and Wang, S. 2003. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking *J. Med. Chem.*, 46, 2287-2303.
- Wang, S. Zaharevitz, D. W. Sharma, R. Marquez, V. E. Lewin, N. E. Du, L. Blumberg, P. M. Milne, G. W. A. 1994. The discovery of novel, structurally diverse protein kinase C agonists through computer 3D-database pharmacophore search. *Molecular modeling studies. Journal of Medicine and Chemistry*, 37:4479-4489.
- Wei, C. Mei, Y. Zhang, D. 2010 Theoretical study on the HIV-1 integrase-5CITEP complex based on polarized force fields. *Chemical Physics Letters*, 495, 121-124.
- Weiner, S. J. Kollman, P. A. Case, D. A. Singh, U. C. Ghio, C. Alagona, G. Profeta, Jr. S. and Weiner, P. 1984. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 106, 765-784.
- Westby, M. Nakayama, G. R. Butler, S. L. Blair, W. S. 2005. Cell-based and biochemical screening approaches for the discovery of novel HIV-1 inhibitors. *Antiviral Research* 67 121-140.
- Wielens, J. Crosby, I. T. Chalmers, D. K. 2005. A three-dimensional model of the human immunodeficiency virus type 1 integration complex. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 19, 301-317.
- Wijitkosoom, A. Tonmunpheap, S. Truong, T. N. Hannongbua, S. 2006. Structural and dynamical properties of a full-length HIV-1 integrase: Molecular dynamics simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 23, 613-624.
- Wildman, S. A. Zheng, X. Sept, D. Auletta, J. T. Rosenberry, T. L. Marshall, G. R. 2011. Drug-like leads for steric discrimination between substrate and inhibitors of human acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Drug. Des.* 78(4), 495-504.

Wilkinson T. A. Botuyan M.V. Kaplan B.E. Rossi J. J. Chen Y. 2000. Arginine Side-chain Dynamics in the HIV-1 Rev-RRE Complex. *J. Mol. Biol.* 303, 515-529.

Wilkinson, T. A. Botuyan, M. V. Kaplan B. E. 2000. Arginine Side-chain Dynamics in the HIV-1 Rev-RRE Complex, *J. Mol. Biol.* 303, 515-529

Wittanyarakul, K. Hannongbua, S. Feig, M. 2008. Accurate Prediction of Protonation State as a Prerequisite for Reliable MM-PB(GB)SA Binding Free Energy Calculations of HIV-1 Protease Inhibitors. *J. Comput. Chem.*, 29:673-685.

Wolf, A. Zimmermann, M. and Hofmann-Apitius 2007. Alternative to Consensus ScoringsA New Approach Toward the Qualitative Alternative to Consensus ScoringsA New Approach Toward the Qualitative *J. Chem. Inf. Model.* 47, 1036-1044.

Wolters, H. J. 2006. Geometric modeling applications in rational drug design: a survey. *Computer Aided Geometric Design*, 23, 482-494 .

Woods, R. J. 1996. In *Reviews of Computational Chemistry* Lipkowitz, K. Boyd, D. B. Eds. VCH Publishers: New York, Vol. 9, pp 129-165 New York.

Xiao Z, Duan R, Cui W, Zhang Y, Zhang S, Chen F, Zhang Y, Liu J, Zhang D, Meng Y, Wang L, Wang H. 2011. Sythesis and Evaluation of new carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem.*, 1519(10):3221-3229.

Xue, W. Huanxiang, L. and Yao, 2012. Molecular Mechanism of HIV-1 Integrase-vDNA Interactions and Strand Transfer Inhibitor Action: A Molecular Modeling Perspective. *Journal of Computational Chemistry*, 33, 527-536.

Yang, J. M. Chen, Y. F. Shen, T. W. Kristal, B. S. Hsu, D. F. 2005. Consensus scoring criteria for improving enrichment in virtual screening. *J. Chem. Inf. Model*, 45, 1134-1146.

Yuan, H. Parrill, A. 2005. Cluster analysis and three-dimensional QSAR studies of HIV-1 integrase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23, 317-328.

Zhao, Y. Li, W. Zeng, J. Liu, G. and Tang, Y. 2008. Insights into the interactions between HIV-1 integrase and human LEDGF/p75 by molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Proteins*, 72:635-645.

Zhou, J. Z. 2008. Structure-directed combinatorial library design, *Current Opinion in Chemical Biology*, 12: 1-7.

Zhu, H. M. Chen, Z. W. and Wang, C. X. 2005. Docking dinucleotides to HIV-1 integrase carboxyl-terminal domain to find possible DNA binding sites, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 475-477.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılına Karakoçan'da doğdum. İlkokulu Bingöl Karaelmas İlkokulunda, ortaokul ve liseyi Bingöl Anadolu Lisesi'nde tamamladım. Lisans eğitimimi 2001 yılında Fırat Üniversitesi Kimya Bölümü'nde tamamladıktan sonra aynı yıl başladığım Yüksek Lisans eğitimimi ise 2005 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü'nde tamamladım. 2002 yılında öğretmen olarak atandım ve çeşitli okulların ilk ve ortaöğretim kademelerinde görev yaptım. 2005 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Doktora eğitimime başladım. 2010 yılında Batman Üniversitesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım.