

149958

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

**BİLGİSAYAR DESTEKLİ RASYONEL KEMOTERAPÖTİK
ETKİLİ İLAÇ ETKEN MADDE TASARIM ÇALIŞMALARI VE
ENZİM SAFLAŞTIRMA**

Berk ZAFER

**DİSİPLİNLERARASI BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Esin AKI-ŞENER

149958

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2001 K-120-240(110) proje numarasıyla desteklenmiştir.**

2005 – ANKARA

Prof. Dr. Esin AKI-ŞENER danışmanlığında, Ecz. Berk ZAFER tarafından hazırlanan bu çalışma, 14/09/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Disiplinlerarası Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Esin AKI-ŞENER

İmza: 

Üye: Prof. Dr. İsmail YALÇIN

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Erdem BÜYÜKBİNGÖL

İmza: 

Üye: Prof. Dr. İlkay YILDIZ

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Lemi TÜRKER

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.


Prof. Dr. Nejat AKAR
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Tablolar	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. İlaç Tasarımında Rasyonel Yaklaşımlar	3
1.1.1. Geleneksel Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (2D-QSAR)	5
1.1.1.1. Geleneksel 2D-QSAR'ın Tarih İçerisinde Gelişimi	5
1.1.1.2. Geleneksel 2D-QSAR Çalışmalarında Fizikokimyasal Parametrizasyon	11
1.1.1.2.1. Hidrofobik Parametreler	11
1.1.1.2.2. Elektronik Parametreler	11
1.1.1.2.3. Sterik Parametreler	12
1.1.2. Moleküler Modelleme Teknikleri	13
1.1.3. Geometrik Optimizasyon	20
1.1.4 Üç Boyutlu Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (3D-QSAR)	23
1.1.4.1. Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizleri Yöntemi (CoMFA)	24
1.1.4.2. Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizleri Yöntemi (CoMSIA)	27
1.1.5 Farmakofor Analizi	28
1.2. Enzim Saflaştırma	30
1.2.1 DNA Topoizomeraz II Enzimi Hakkında	30
1.2.2. Topoizomerazların Saflaştırılmaları	34
2. GEREÇ ve YÖNTEM	35
2.1. Geometrik Optimizasyon	35
2.2. CoMFA Çalışması	36
2.3. CoMSIA Çalışması	37
2.4. Farmakofor Analizi Çalışması	38
2.5. Enzim Saflaştırma Çalışmaları	39
2.6. Topoizomeraz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Yöntemler	39

3. BULGULAR	41
3.1. CoMFA Çalışması	41
3.2. CoMSIA Çalışması	45
3.3. Farmakofor Analizi Çalışması	51
3.4. Enzim Safılaştırma Çalışmaları	58
4. TARTIŞMA	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
ÖZET	63
SUMMARY	64
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	74

ÖNSÖZ

Çalışmalarımı yıllardır yakından izleyen ve destekleyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana yeni ufuklar açan, destek ve yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen danışman hocam Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Esin AKI-ŞENER'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, her sorunumla yakından ilgilenen Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. İsmail YALÇIN'a ve Sayın Prof. Dr. İlkey YILDIZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Araştırma grubu olarak bilimsel kooperasyon içerisinde olduğumuz Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Leyla AÇAN'a, Doç. Dr. Aslı PINAR'a, ve H.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.D. Öğretim Elemanı Araş. Gör. Pınar YURDAKUL'a da yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Moleküler modelleme ve biyoinformatik konularında farklı bilgiler ve tecrübeler edinmemeye olanak sağlayan North Carolina Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Alexander TROPSHA'ya ve laboratuvar ekibine teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya A.D. öğretim üyelerine, başta Ecz. Kayhan BOLELLİ olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma; bilgisayar teknikleri konusunda uzun yıllardır bana yol gösterici olan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji A.D. Araştırma Görevlisi Sayın Aydın TAY'a da özel teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca esirgemediği desteklerinden dolayı Biyoteknoloji Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a, ve resmi işlemlerdeki yardımlarından dolayı başta Sayın İraz HASPOLAT olmak üzere tüm enstitü çalışanlarımıza teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmayı destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne de içten teşekkürlerimi sunuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

3D – 3 Boyutlu (3 Dimensional)

ADME – Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Eliminasyon (Administration, Distribution, Metabolism and Elimination)

Ar-Ge – Araştırma-Geliştirme

ATP – Adenozin trifosfat

CADD – Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (Computer Aided Drug Design)

CoMFA – Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizi (Comparative Molecular Field Analysis)

CoMSIA – Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizi (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis)

DNA – Deoksiribonükleik Asit

HTS – Yüksek Çıktılı Tarama (High Throughput Screening)

in silico – Bilgisayar Ortamında

kD – Kilodalton

NMR – Nükleer Manyetik Rezonans

QSAR – Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri (Quantitative Structure-Activity Relationships)

VdW – Van der Waals

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	DNA Topoizomeraz II'nin katalitik döngüsü.	30
Şekil 1.2.	Topoizomeraz II'nin varsayılan yapısı ve katalitik döngüsü.	31
Şekil 1.3.	Bazı Topoizomeraz II inhibitörlerinin yapıları.	33
Şekil 2.1.	(a) Sybyl 7.0 Minimizasyon Penceresi (b) Minimizasyon İşlem Detayları (c) Minimizasyon İşlemi Enerji Ayarları.	35
Şekil 2.2.	1 nolu molekülde çakıştırma işleminde sabitlenen atomlar..	36
Şekil 3.1.	Topoizomeraz II inhibitörleri çalışma (training) setinin çakıştırımı.	41
Şekil 3.2.	CoMFA'daki çalışma (training) set moleküllerinin gözlenen aktiviteye karşı hesaplanan aktivitelerin farklı açılardan grafiksel görüntüsü.	42
Şekil 3.3.	CoMFA 3D-QSAR test seti moleküllerinin gözlenen log 1/C değerlerine karşı hesaplanan log 1/C değerlerinin grafiği.	44
Şekil 3.4.	1 ve 13 bileşiklerine CoMFA sterik alanları.	44
Şekil 3.5.	1 ve 13 numaralı bileşiklerle CoMFA elektrostatik alan plotları.	45
Şekil 3.6.	Topoizomeraz II İnhibitörleri çalışma (training) setinin çakıştırımı.	46
Şekil 3.7.	View CoMSIA – Alan Detayları penceresi.	47
Şekil 3.8.	1 nolu bileşiğe ait sterik, hidrojen bağı akseptörü, hidrofobik ve elektrostatik özelliklerin CoMSIA çalışmasıyla elde edilen grafikleri.	48
Şekil 3.9.	13 numaralı bileşiğin sterik, hidrojen bağı akseptörü, hidrofobik ve elektrostatik özelliklerinin grafikleri.	49
Şekil 3.10.	1 ve 13 numaralı bileşikler bir aradayken sterik ve elektrostatik özelliklerin transparan temsili.	50
Şekil 3.11.	1 ve 13 numaralı bileşikler bir aradayken elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağı akseptör özelliklerin transparan temsili.	50
Şekil 3.12.	2 HBA (yeşil) ve iki Hp (mavi) içeren 3 numaralı Hipotez.	55
Şekil 3.13.	3f bileşiğinin 3 numaralı hipoteze haritalanması.	55
Şekil 3.14.	1b bileşiğinin 3 numaralı hipoteze haritalanması.	56
Şekil 3.15.	Tüm çalışma (training) moleküllerinin 3 numaralı hipoteze haritalanması.	56
Şekil 3.16.	3 Numaralı hipoteze etopozitin haritalanışı.	57

TABLÖLAR

Tablo 1.1.	Geliştirilen geleneksel QSAR analiz yöntemleri.	9
Tablo 1.2.	Topoizomeraz II'yi hedef alan ilaçların sınıflandırılması.	33
Tablo 2.1.	PLS analizinde kullanılan bileşenler ve ortaya çıkan q^2 değerleri.	38
Tablo 3.1.	Çalışma (training) serisinde kullanılan moleküllerin yapıları ve biyolojik aktiviteleri.	41
Tablo 3.2.	CoMFA 3D QSAR modelinin PLS İstatistikleri.	42
Tablo 3.3.	Test serisinde kullanılan moleküllerin yapıları ve biyolojik aktiviteleri.	43
Tablo 3.4.	CoMFA modelinde test seti bileşiklerinin gerçek ve hesaplanan biyolojik aktiviteleri ve farkları.	43
Tablo 3.5.	Çalışma (training) serisinde kullanılan moleküllerin yapıları ve biyolojik aktiviteleri.	45
Tablo 3.6.	CoMSIA Çalışması için Partial Least Squares analizi detayları.	46
Tablo 3.7.	CoMSIA kontur haritalarında kullanılmak üzere istenilen ve istenmeyen özellikleri temsil eden renklerin seçimi.	47
Tablo 3.8.	Test serisi bileşikleri ile CoMSIA çalışmasından elde edilen aktivite tahminleri.	48
Tablo 3.9.	Ökaryotik DNA Topoizomeraz II İnhibitör Aktivite için test edilmiş olan bileşiklerin çalışma (training) seti.	51
Tablo 3.10.	Uygulanan Ortak Özellik Hipotezinin Karakteristikleri.	54
Tablo 3.11.	Uygulanan Ortak Özellik Hipotezinin Sonuçları.	54

1. GİRİŞ

Farmasötik Biyoteknoloji, yaşayan sistemlere ait bilginin, bu sistemleri veya bileşenlerini endüstriyel amaçlar için kullanmaya yönelik bir uygulamasıdır. “Biyoteknoloji” kelimesi ilk kez Macar zirai ekonomist Kark Ereky tarafından 1919 yılında, “canlı organizmalar yardımıyla her türlü ürün üretim işi” anlamında kullanılmıştır. Bu tanım daha sonra biraz daha genişletilerek ürün oluşturulmasında yeni teknolojilerin odaklanılmasını hedeflemiştir. Bugün için biyoteknoloji, yaşayan sistemlere ait bilgilerin uygulamaya dönük kullanımları için bilim ve teknolojinin pragmatik kombinasyonu olarak tanımlanmaktadır (Bains ve ark., 1998).

Farmasötik Biyoteknoloji kapsamında proteomiks çalışmaları yakın zamanda önemli bir alanı oluşturmuştur. Hücrelerdeki fonksiyonel moleküllerden olan proteinler ilaç aksiyonu için majör hedeflerdir. Proteomiks, protein yapısındaki hedeflerin ve hastalık sürecindeki biyokimyasal yolların tanımlanmasında büyük umutlar vaatmektedir. Proteomiks, çok basamaklı ilaç geliştirme işleminde giderek önemi artan bir rol oynamaktadır. Bu işlem hedef tanımlanmasını, validasyonunu, önder bileşik seçimini, küçük moleküllerle tarama ve optimizasyonu ve de toksisite testlerini kapsamaktadır. Bunun ötesinde, bilgisayarlı proteomiks, kimyasal proteomiks, yapısal proteomiks ve topolojik proteomiks gibi alt disiplinler, özellikle bilgisayar destekli ilaç tasarımına belirgin katkılar sunmaktadır. Akılcı ilaç tasarımında, ilk olarak patogeneizde hangi proteinlerin ilaç hedefi olabileceğinin bulunması esastır (Wang ve ark., 2005).

Biyoteknoloji kapsamında biyoinformatik, biyolojik bilginin bilgisayar kullanılarak değerlendirilmesidir (Bioinformatics.org, 2005). Biyoinformatik, dört ana iş bölümünü kapsar: Bilgi edinilmesi, veritabanı geliştirimi, entegrasyon ve bağlantıların sağlanması, ve analiz (Bains ve ark., 1998).

Kemoinformatik ise, ilaç tasarımı ve geliştirilmesini yönlendirmek için kullanılan kimyasal sentez, biyolojik tarama ve veri araştırma-toplama yaklaşımlarının bir kombinasyonudur (ColorBasePair.com, 2005).

Kemoinformatik terimi ilk kez 1998 yılında, “bir bilim adamının, temel olarak bir liganttan ilaç molekülüne geçilebilmesi sürecinde özelliklerinin optimize edilmesi için gereksinim duyacağı tüm bilgi ve veri kaynaklarının bir kombinasyonu” anlamında Brown tarafından kullanılmıştır (Brown, 1998).

Kemoinformatik başlığı altında toplanan ve bilgisayar teknolojisinin kullanıldığı metotlar aşağıda sıralanmıştır (ColorBasePair.com, 2005):

- Kimyasal verilerin toplanması, analizi ve işlenmesi;
- Veri temsili ve iletişim;
- Veritabanı tasarımı ve organizasyon;
- Kimyasal yapı ve özelliklerin tahmini;
- Moleküler benzerlik ve çeşitlilik analizi;
- Bileşik veya kütüphane tasarımı ve optimizasyon;
- Veritabanı taraması ve sanal tarama;
- Bileşik sınıflandırımı ve seçimi;
- Kalitatif ve kantitatif yapı-etki veya yapı-özellik ilişkileri;
- Kimyasal problemlere uygulanan bilgi teorisi;
- Kimyasal tanımlayıcıların istatistiksel modelleri;
- *In vivo* bileşik karakteristiklerinin tahmini

Günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birisi olan tüberküloz nedeniyle her yıl üç milyondan fazla insan hayatını kaybetmektedir (Nuermberger ve ark., 2004). Dirençli suşların ortaya çıkışı nedeniyle, mevcut klasik ilaçlara direnç gösteren hastaların tedavisi için acilen yeni ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir (Kochi ve ark.,1991). Tüberküloz tedavisi için topoizomeraz inhibitörlerinin ilaç olarak kullanılması planlanmıştır (Nagaraja ve ark., 2002).

Bu çalışmanın amacı, günümüz bilgisayar teknolojilerinden faydalanılarak DNA topoizomeraz enzimi inhibitörü ilaç etken maddelerinin rasyonel olarak tasarlanmasına ışık tutmaktır.

DNA topoizomeraz enziminin saflaştırma çalışmaları da, ticari olarak elde edilebilen enzimlerin kullanımlarına alternatif bir yaklaşım niteliği taşımaktadır.

Bu çalışmada, benzoksazol, benzimidazol, benzotiyazol ve oksazolopiridin türevleri gibi bazı yeni heterosiklik bileşiklerin ökaryotik Topoizomeraz II enzimi üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir.

DNA Topoizomeraz II (Topo II) enzimi, memeli hücrelerinin çekirdeğinde bulunan ve DNA'nın topolojik izomerlerini fosfodiester bağlarını kırıp tekrar birleştirmek suretiyle birbirine dönüştüren bir enzimdir. Topo II, DNA sarımını iki basamakta modifiye ederek kapalı sarküler çift-iplik DNA molekülünün süpersarmal formunu ATP gibi bir enerji kofaktörünün varlığında rahatlatabilmektedir (Wang ve ark., 1989).

Topoizomeraz enzimleri başlıca tip I ve tip II olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Son yıllarda topoizomerazlar antibakteriyel ve antikanser etkiye sahip çeşitli ilaçların hedefi olarak önem kazanmışlardır. Topoizomeraz inhibitör etkisinin araştırılması, yeni ilaç geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Pınar, 2005).

Enzim saflaştırma çalışmaları, ayrıca ticari olarak elde edilemeyen enzimlerin saflaştırılmasında yol gösterici bir nitelik taşımaktadır.

1.1. İlaç Tasarımında Rasyonel Yaklaşımlar

Günümüzde, özgün bir ilacın araştırılması ve geliştirilmesi çalışmaları sırasında harcanan emeği, zamanı ve yatırım maliyetlerini en aza indirgeyebilmek amacıyla bir çok yeni teknik geliştirilmiş durumdadır. Geliştirilen bu tekniklerle, araştırma harcamalarını daha ekonomik düzeyde tutabilecek yeni yaklaşımların ortaya konulmasına çalışılmaktadır. Yeni ilaç etken madde Ar-Ge çalışmalarından verimli sonuçlar elde edebilmek için öncelikle gerçekçi ve uygulanabilir hedeflere yönelmek gerekmektedir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Gelişmiş ilaç sanayisinin en önemli beklenti ve hedefi, yeni etken madde içeren orijinal ilaçlar üretebilmektir (Yalçın ve Şener, 1996).

Yürütülen araştırmalar sonucunda yeni ilaç etken maddesi olmaya aday özgün bir kimyasal bileşik ortaya çıktığında, klinik çalışmaların başlatılmasına ancak söz konusu ilaç etken maddesinin etkisi ve emniyeti hakkında yeterli bilgi sağlandığında izin verilmektedir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Yeni bir teknoloji olan Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD), mevcut ilaçlara ve hastalıklara ait birikmiş bilgileri diğer sahalardaki disiplinlerarası girdilerle kombine halde kullanarak ilaç geliştirme sürecini hızlandırmaktadır (Carlson ve McCammon, 2000; Street ve Mayo, 1999; Veselovsky ve Ivanov, 2003).

Rasyonel ilaç tasarımı yaklaşımı, ilaç hedefinin moleküler yapısını modelleyerek bu yapıya en uygun ilacı geliştirmeyi amaçlamaktadır. Rasyonel ilaç tasarımında, ilaç hedeflerinin, genellikle de proteinlerin kimyasal yapılarının bilinmesi ya da bulunması esastır. Roche firmasının bir HIV proteaz inhibitörü olan ilacı Saquinavir, 1996'da onay almış ve tamamen rasyonel ilaç tasarım teknikleri ile "tasarlanmış" başarılı örneklerden birisidir (Bains, 1998).

Temel olarak, ilaç keşif çalışmaları klinik denemeler öncesi “pre-klinik” basamaklar içerir. Bu basamaklar hedef seçimi, önder bileşik tanımlanması, ve klinik aday bileşik seçimidir (Wang ve ark., 2005).

İlaç tasarımındaki rasyonel yaklaşımlar, ligant yapısına dayalı tasarım ve hedef yapısına dayalı tasarım olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ligant yapısına dayalı tasarım içerisinde kantitatif yapı-etki ilişkileri çalışmaları da önemli bir yer tutmaktadır.

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren araştırmacılar, yeni ilaç etken maddesi bileşiklere ulaşabilmek amacıyla kimyasal bileşiklerin moleküler yapıları ile biyolojik etkileri arasındaki ilişkileri tanımlama çalışmalarına yoğunlaşmışlardır. Bu süreç içerisinde söz konusu çalışmalar geliştirilerek kantitatif yapı-etki ilişkilerinin çözümlenmesine imkan sağlayan çeşitli teknikler ortaya konulmuştur. Bu yeni teknikler, yeni ilaç etken maddesi niteliğindeki kimyasal bileşiklerin geliştirilmesi, daha ideal etkili bileşiklere ulaşılması, etki mekanizmalarının tanımlanabilmesi ve etkinliklerinin yürütülmesinde giderek önemli rol kazanmışlardır (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Farmasötik Endüstride Mevcut CADD Uygulamaları:

Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD), sadece potent bileşiklerin tasarımına değil, “konseptten kliniğe” giden yoldaki basamakların çoğuna katkı sağlayabilmektedir. Söz konusu “keşif süreci” nde yer alan bazı araştırma alanları geleneksel olarak daha çok geliştirilmiştir ve/veya bilgisayar desteğine diğerlerine nazaran daha iyi adapte edilmiştir. Bu işlemler için ciddi bilgisayar desteği gereksinimini artıran çok sayıda yaklaşım mevcuttur. İnterdisipliner bir ilaç keşif ekibi içerisinde sonuçların paylaşılması gerekliliğine ek olarak, tedavinin evde ve hastanede devam etmesi nedeniyle yüklü miktarda veriler bulunmaktadır ve bu veriler kolaylıkla idare edilememektedir. Bu dev veritabanlarını değişik şekillerde analiz edebilmek için, yapı-etki modellerini ortaya çıkartmak için ve yeni önder bileşikler keşfedebilmek için metotlar geliştirilmelidir.

Araştırma grupları arasında artan bir rekabet söz konusudur. Yeni bir araştırma keşfi başararak bunu yeni bir aktif önder bileşiğe çevirebilecek kadar hızlı hareket eden bir araştırma grubu, çok büyük olasılıkla da yeni alanda ilk terapötik ajanı geliştirerek anahtar patentlere sahip olacak olan gruptur. Etkatif olarak kullanılan bilgisayar metotları uzman bir ilaç keşif ekibine büyük bir kompetitif avantaj sağlayabilmektedir (Cohen, 1996).

1.1.1. Geleneksel Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri (2D-QSAR)

1.1.1.1. Geleneksel 2D-QSAR'ın Tarih İçerisinde Gelişimi

Kimyasal yapı ve biyolojik aktivite arasındaki ilişkilere yönelik ilk ifade, 1863 yılında, Fransa'dan A. Cros'un, bazı alkollerin sudaki çözünürlüklerinin azalmasıyla birlikte memelilerdeki toksik etkilerinin de yükseldiğini gözlemlemesine dayanmaktadır (Borman, 1990).

Lipofilisite ve toksisite arasındaki ilişkinin niteliği, Richet'in, alkol, eter ve keton yapısı içeren bir grup basit yapıdaki organik bileşiğin sudaki çözünürlük özellikleri ile toksik etkileri arasında ters bir orantı olduğunu gösterdiği çalışmasıyla ilk kez sistematik olarak örneklenmiştir (Richet ve Séances, 1893; Rekker, 1992; Tute, 1990; Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Kimyasal bileşiklerin moleküler yapıları ile biyolojik aktiviteleri arasında bir ilişkinin var olduğu düşüncesi ilk defa 1868 yılında, İngiltere'de, Crum-Brown ve Fraser tarafından sitriknin türevi kuaternize alkolooidlerin kürarizan etkileri araştırılırken ileriye sürülmüştür. "Fizyolojik aktivite (Φ), bileşiğin yapısına bağlıdır (C)" görüşü aşağıda verilen formül ile açıklanmıştır (Rekker, 1992; Tute, 1990; Crum-Brown ve Fraser, 1869; Kubinyi, 1993).

$$\Phi = f(C)$$

1

Bu ifade, ilaç etken madde tasarım araştırmalarında kullanılan yapı-etki ilişkileri çalışmalarında başlangıç ilkesi olarak kabul edilmektedir. Bugünkü bilgilerimiz, yapı ile etki arasındaki ilişkilerin, kimyasal yapının, başta fizikokimyasal özellikleri olmak üzere moleküler niteliklerine bağlı olarak ortaya çıktığını göstermektedir.

19. yüzyıl sonlarında, Overton ve Meyer, bu konuda parametrik değer içeren ilk kantitatif çalışmaları gerçekleştirmişlerdir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

1899 yılında, İsviçre'de Charles Ernst Overton (1901) ve Almanya'da Hans Horst Meyer (1899) çeşitli bileşiklerin, zeytinyağı/su ortamındaki bağlı çözünürlük oranları ile gözlenen narkotik potensleri arasında doğrusal bir bağıntı olduğunu saptamışlardır (Rekker, 1992; Tute, 1990; Kubinyi, 1993). Bu gözlemlerin anlaşılabilirliği, 1939 yılında Ferguson'un kimyasal bileşiklerin gözlenen narkotik veya toksik potenslerinin, organizmadaki dışfaz ile biyofaz (etki yörenesindeki faz) arasındaki konsantrasyonlarına bağlı olduğunu ifade etmesi ile artmıştır.

Bir kimyasal bileşimin birbiri ile karışmayan iki sıvı içerisindeki dağılımına dair ilk çalışmalar, 1872 yılında Berthold ve Jungfleish tarafından brömür ve iyodürler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ancak dağılım ve partisyonla ilgili çözünürlük kavramları, 1891 yılında, Nernst'in sistematik çalışmalarıyla birlikte ilgi odağı olmuştur.

Moleküler özelliklerle biyolojik aktivite arasındaki ilişkileri rasyonel bir şekilde ele alan ilk kantitatif çalışmalar, 1930'lu yılların sonunda İngiltere'de Albert ve 1940'lı yılların başlarında Amerika'da Bell ve Roblin tarafından gerçekleştirilmiştir.

Albert, 1939 yılında, 100'den fazla aminoakridin türevi üzerinde yaptığı çalışmada bu türevlerin iyonizasyon oranları ile bakteriyostatik aktiviteleri arasında bir ilişkinin varlığına dikkat çekmiştir. Bu gözlem, ortam pH sına bağlı olarak, bileşiklerin moleküler nitelikleri ile biyolojik aktiviteleri arasında nonlinear bir ilişkiye işaret etmesi açısından önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra, Albert, bir bileşimin biçim ve boyut gibi yapısal niteliklerini de ele alarak, yapı-etki ilişkilerinde birden fazla parametrisasyonun söz konusu olduğunu ortaya çıkartmıştır (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Bell ve Roblin ise, 1942 yılında 46 adet sülfonamid türevinin grafiksel analizini yaparak; bu sülfonamid türevlerinin antibakteriyal etkinlikleri ile pH=7 deki pKa değerleri arasında nonlinear (bifazik) bir ilişkinin varlığını tespit etmişlerdir.

Bell ve Roblin'in çalışmaları, yapı-etki ilişkilerinde moleküler yapıdaki süstitüentlerin de dikkate alınması gerekliliğini ve aktivite üzerinde önemli rol oynayabileceklerini ilk defa göstermiş olması bakımından önem taşımaktadır.

1930'lu ve 1940'lı yıllarda, kimi medisinal kimyacılar bileşiklerin iyonizasyonu ve antibakteriyal aktivite arasındaki ilişkilerin tanımlanmasına, kimi fizikokimyacılar ise organik reaksiyonlarda iyonizasyonun gerçekleşmesinde süstitüentlere ait elektronik etkileri kantitatif olarak tanımlayan parametrisasyonu belirlemeye çalışmışlardır (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Bu çalışmaları takiben 1937 yılında Louis Hammett, bazı meta ve para-süstitüe benzen türevler ile nonsüstitüe türevin belirli bir kimyasal reaksiyon ortamındaki iyonizasyon oranlarını karşılaştırarak, çeşitli aromatik süstitüentlerin hidrojene göre potansiyel elektronik katkı değerlerini belirten sigma (σ) süstitüent sabite değerlerini hesaplayarak ilk kantitatif elektronik parametrisasyonu gerçekleştirmiştir. (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Hammett'in araştırmalarını yakından takip eden R.W. Taft 1952 ve 1956 yılları arasında, ilk sterik parametre olan *E_s* sabitesini keşfetmiş ve 1959 yılında Lewis ile ortak çalışmaları sonucunda, indüktif (σ I) ve rezonans (σ R) etkileri gösteren parametrizasyonla birlikte alifatik sübstitüentlerin polar etkinliklerini içeren σ^* parametresini ortaya çıkarmıştır. Bu sayede organik kimyasal reaksiyonlarda, sübstitüentlerin rol aldığı elektronik ve sterik etkileşmelerle ilgili lineer serbest enerji ilişkileri gösteren termodinamik olayların analizi mümkün olabilmifitir (Akı-şener ve Yalçın, 2003).

1962 yılında birbirlerinden bağımsız olarak, Hansen, Zahradnik ve Hansch Hammett'in iyonizasyonla ilgili olarak ortaya çıkarttığı lineer serbest enerji ilişkileri denklemini biyolojik sistemlere uyarlayarak, benzeş bir dizindeki bileşiklerde yer alan sübstitüentlerin sergilediği kantitatif yapı-etki ilişkilerinin analizine yönelik ilk çalışmaları gerekleştirmifitirdir. Hansen ve Zahradnik çalışmalarında tek bir parametrizasyonu temel aldıklarından başarılı olmamış, ancak Hansch, mutliparametrik bir hesaplama yöntemi (Hansch Analiz Yöntemi) geliştirerek yapı ve etki arasındaki ilişkilerin kantitatif analizini gerçekleştirebilmiştir (Akı-şener ve Yalçın, 2003).

Hansch, R. M. Muir ile birlikte fenoksiasetik asit türevlerinin aktivite ilişkilerini araştırırken, söz konusu bileşiklerin lipofilik karakterlerinin aktiviteyle ilişkisi olduğunu farketmiştir. Bunu takiben Hansch, Maloney ve Fujita ile birlikte, bileşiklerin 1-oktanol/su ortamındaki partiyon katsayı sabitelerini ($\log P$) hesaplayarak, benzen halkası üzerinde bulunan sübstitüentlerin hidrofobik özelliklerini ifade eden pi (π) aromatik sübstitüent sabitesini ortaya koymuşlardır (Hansch ve ark., 1962). Fujita, belirlemiş oldukları $\log P$ ve π sabitelerinin, Hammett'in σ elektronik sabitesi benzeri bir serbest enerji değişkeni olduğunu farkederek biyolojik ortamdaki lineer serbest enerji ilişkilerini tanımlamak üzere bu hidrofobik parametreleri Hammett'in sigma (σ) elektronik sabitesi ile birarada kullanmayı önermiştir (Fujita ve ark., 1964). Hansch ve arkadaşları, biyolojik yanıtın ortaya çıkmasına tek başına hidrofobik özellik neden oluyorsa eşitlik 2 veya 3; hidrofobik ve elektronik faktörler birarada etkin oluyor ise eşitlik 4 veya 5 ile gösterilen denklemlerin ele geçeceğini düşünmüşlerdir. Bu eşitliklerdeki biyolojik aktivite değerini belirten $\log 1/C$ terimi, doğrusal serbest enerji ilişkileri formatına uyması için, bileşiğin molar konsantrasyonunu (C) içeren dozun ters logaritmasını belirtir biçimde kullanılmıştır.

$$\log 1/C = k_1 \log P + k_0 \quad 2$$

$$\log 1/C = k_1 \pi + k_0 \quad 3$$

$$\log 1/C = k_1 \log P + k_2 \sigma + k_0 \quad 4$$

$$\log 1/C = k_1 \pi + k_2 \sigma + k_0 \quad 5$$

Hansch ve arkadaşları, farklı biyolojik aktivitelere ait birçok veriyi irdeleyerek yukarıda belirtilen bu doğrusal serbest enerji ilişkilerini içerip içermediklerini araştırmışlardır ve geniş bir spektruma yayılan $\log P$ değerleri içeren bileşik dizilerinin yer aldığı analizlerde lineer nitelikteki denklemlerle yeterli çözümler üretemediklerini görmüşlerdir. Bunun üzerine Hansch (1969) aşırı hidrofilik veya lipofilik özellik taşıyan bileşiklerin etki yöresine taşınması sırasında organizmadaki sulu ve/veya lipid fazlarca engelleneceğini belirterek, bileşiğin, belirli bir zaman aralığında hedefe maksimum konsantrasyonda ulaşabilmesi için optimum bir $\log P$ veya π süstitüent sabite değerine sahip olması gerekliliğini ileri sürmüştür. Bu ifadeyi matematiksel olarak tanımlayabilmek amacıyla, $\log 1/C$ ile hidrofobik parametreler arasındaki parabolik (nonlineer) ilişkiyi gösteren aşağıdaki analiz denklemlerini türetmiştir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

$$\log 1/C = k_1 \log P - k_2 (\log P)^2 + k_0 \quad 6$$

$$\log 1/C = k_1 \pi - k_2 (\pi)^2 + k_0 \quad 7$$

$$\log 1/C = k_1 \log P - k_2 (\log P)^2 + k_3 \sigma + k_0 \quad 8$$

$$\log 1/C = k_1 \pi - k_2 (\pi)^2 + k_3 \sigma + k_0 \quad 9$$

Hansch, bu denklemlere Taft'ın sterik süstitüent sabitesini de (E_s) katarak (Bkz. eşitlikler 10 ve 11), kimyasal bileşiklerdeki süstitüentlere ait hidrofobik, elektronik ve sterik nitelikteki fizikokimyasal özelliklerin birarada rol aldığı yapı-etki ilişkilerini kantitatif olarak çözümlene olanağını sağlamıştır (Hansch, 1969).

$$\log 1/C = k_1 \pi + k_2 \sigma + k_3 E_s + k_0 \quad 10$$

$$\log 1/C = k_1 \pi - k_2 (\pi)^2 + k_3 \sigma + k_4 E_s + k_0 \quad 11$$

Hansch'ın gerçekleştirdiği bu çalışmalar sonucunda, yapı ile etki arasındaki ilişkilerin kantitatif analizini sağlayan matematiksel çözümler açığa çıkarılmış ve bu gelişme, yeni ilaç etken madde tasarımı için günümüzde yürütülen rasyonel çalışmaların başlamasına önayak olmuştur. Hansch'ın belirlediği bu analiz denklemleri, daha sonraki yıllarda geliştirilen değişik yöntemlerle birlikte (Bkz. Tablo 2), yapı ile etki arasındaki ilişkilerin kantitatif çözümlenmelerini sağlamak amacıyla günümüzde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Yeni ilaç etken madde tasarımı veya mevcut ilaç moleküllerinin daha spesifik ve potent hale getirilmeleri çalışmaları artık günümüzde, etki mekanizmalarının tanımlanmaya çalışıldığı mekanistik tasarım yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla, kimyasal bileşiğin etki yöresindeki hedefle

etkileşmesiyle biyolojik yanıtın ortaya çıkmasına neden olan farmakodinamik etmenler tanımlanmalıdır. Bunun için de söz konusu kimyasal bileşiğin fizikokimyasal/yapısal özellikleri ile biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkilerin belirlenmesi önem taşımaktadır (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Corwin Hansch'ın 1962 yılında başlattığı çalışmalar sonucunda ortaya çıkan QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) terimi, günümüzde yaygın bir şekilde kantitatif yapı-etki ilişkilerini belirtmek üzere kullanılmaktadır. Kantitatif yapı-etki ilişkileri (QSAR) analizleri, kimyasal bileşiklerin moleküler nitelikleri (fizikokimyasal/yapısal özellikleri) ile biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişkileri matematiksel yöntemlerle kantitatif olarak çözümlenme çalışmalarıdır. QSAR analizlerinin yürütülebilmesi için,

- Söz konusu biyolojik etkiyi aynı mekanizmaya dayalı olarak ortaya çıkaran bir dizin test serisi kimyasal bileşiğe,
- Bu dizinde yer alan kimyasal bileşiklerin veya sübstitüentlerin fizikokimyasal/yapısal niteliklerini kantitatif olarak ifade eden parametrik sabitelere,
- Bu dizindeki test serisi kimyasal bileşiklere ait biyolojik etkinin aynı şart ve ortamda kantitatif olarak saptanmasına,
- Moleküler nitelikleri tanımlayan parametrik değişkenlerle, gözlenen biyolojik etkiyi belirten değerler arasındaki ilişkiyi çözümlenecek kemometrik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Hansch analiz yönteminin ortaya çıkışından sonra, yapı ile etki arasındaki kantitatif ilişkilerin çözümlenmesine yönelik farklı yöntemler geliştirilerek kullanılmaya başlanmıştır. Geleneksel QSAR analiz yöntemleri Tablo 1.1.'de gösterilmektedir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Tablo 1.1. Geliştirilen Geleneksel QSAR Analiz Yöntemleri.

Tarih	Araştırmacı	Analiz Yöntemi
1964	Corwin Hansch	Hansch Analiz Yöntemi (Kimyasal Bileşiklerin Fizikokimyasal Özellikleri ile Biyolojik Aktiviteleri Arasındaki Multiparametrik İlişkilerin Çözümlemesi)
1964	Spencer M. Free, James W. Wilson	Free-Wilson Analiz Yöntemi (Kimyasal Bileşiklere Ait Yapısal Parametrelerle Biyolojik Aktiviteleri Arasındaki İlişkilerin Çözümlemesi)
1970	Toshio Fujita, Takashi Ban	Fujita-Ban Analiz Yöntemi (Free-Wilson Analiz Yöntemi'nun Modifiye Şekildeki Uygulamaları)
1976	Hugo Kubinyi	Karışım Analiz Yöntemi (Hansch ve Fujita-Ban Yöntemi Analizlerdeki Parametrizasyonun Birarada Kullanılması Sonucu Geliştirilen Çözümlenmeler)
1976	Hugo Kubinyi	Bilineer Analiz Yöntemi (Kimyasal Bileşiklerin Lipofiliseleri ile Biyolojik Aktiviteleri Arasındaki Bifazik Bilineer İlişkilerin Çözümlemesi)

Bu analiz metotlarındaki farklılık ele alınan parametrizasyon biçiminden kaynaklanmaktadır. Çözümlemeler Hansch analiz yönteminde fizikokimyasal parametreler aracılığıyla gerçekleştirilirken, Free-Wilson (1964) ve Fujita-Ban (1971) analiz metotlarında kimyasal bileşikler üzerinde yer alan çeşitli atom ve/veya atom gruplarını içeren yapısal değişikliklerin parametrizasyonu üzerinden yürütülmektedir.

Kubinyi, 1976 yılında, Fujita-Ban ve Hansch metotlarındaki fizikokimyasal parametrelerin birarada kullanıldığı Karışım analiz yöntemini geliştirmiştir. Buna ilave olarak, kimyasal bileşiklerin lipofilik özellikleri ile biyolojik etkinlikleri arasında rol oynayan nonlineer ilişkileri çözümleneyen Bilineer analiz yöntemini de tanımlamıştır. QSAR analizleri;

- Kimyasal bileşiklerin organizmadaki emilim, dağılım ve transportunda rol alan farmakokinetik ilişkilerin tanımlanması,
- Kimyasal bileşikler ve hedef (reseptör, enzim ve diğerleri) arasındaki etkileşimlerde rol alan dinamiklerin belirlenmesi,
- Kimyasal bileşiklerin organizmada biyotransformasyonunu sağlayan enzimatik ilişkilerin tanımlanması ve
- Kimyasal bileşiklerin istenmeyen veya toksik etkilerden arındırılması

gibi çözümlemelere ulaşılmasını sağlayarak, ilaç etken maddesi olabilecek yeni önder bileşiklerin tasarım ve/veya geliştirilmesine ışık tutacak önermelerin açığa çıkartılmasına yardımcı olmaktadır. QSAR analizleri günümüzde medisinal kimya alanı dışında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu analizlerde kullanılan kemometrik işlemler, başta çoklu regresyon analizi olmak üzere çeşitli istatistiksel yöntemler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Karmaşık hesaplamalar içeren bu matematiksel işlemler, 1980 yılından itibaren bilgisayar teknolojisinin hızla gelişmesiyle günümüzde, kolay ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir.

QSAR analizleri için vazgeçilmez hale gelen bilgisayar teknolojisiyle yürütülen çalışmalar, bilgisayar destekli ilaç tasarımı (Computer Assisted veya Aided Drug Design, kısaca CADD) olarak tanımlanmıştır (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Aktif bileşikler üzerindeki Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri (QSAR) analizleri önemli farmakoforlar önerebilir, ancak sadece hedef makromolekülle etkileşen bu bileşiklerin analizi bu grupların fonksiyon için neden önemli olduklarını açıklayabilmektedir. Bu, "rasyonel ilaç tasarımı"nın temelini oluşturur ve daha komplike sistemler incelendikçe ve daha büyük moleküllerin sıkı bağlanma ve yüksek spesifikliği garantilemesine ihtiyaç duyuldukça giderek daha önemli bir araç haline gelmektedir.

1.1.1.2. Geleneksel 2D-QSAR Çalışmalarında Fizikokimyasal Parametrizasyon

Bir kimyasal bileşiğin moleküler fizikokimyasal özelliklerini kantitatif olarak belirten sabiteler olmaksızın, yapı ile etki arasındaki ilişkilerde rol oynayan kinetik ve dinamik etmenlerin tanımlanması mümkün olamamaktadır (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

Hammett'in sigma (σ) süstitüent sabitesi (1940) ve Taft'ın Es sabitesinin (1956) ortaya çıkışından bu yana yüzlerce parametre ortaya konulmuştur.

Efektör-hedef arasındaki etkileşmelerde rol alan dinamiklerin, ve de ilaç etken maddesi bir kimyasal bileşiğin organizmadaki transportunu kapsayan farmakokinetik olayların aydınlatılmasında hidrofobik (lipofilik), elektronik ve sterik etkinlikleri tanımlayan moleküler ve/veya süstitüent sabiteleri, QSAR analizlerinde en yaygın olarak kullanılan fizikokimyasal parametrelerdir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003).

1.1.1.2.1. Hidrofobik Parametreler

Hidrofobik (Lipofilik) etkinlikler, biyolojik yanıtın ortaya çıkışı sırasında, ilaç etken maddesi bileşiklerin organizmada dağılımı, biyoçevirimi, etki yoresine taşınması ve/veya hedefle etkileşmeleri kapsayan olaylarda önemli rol almaktadırlar (Kubinyi, 1979 ve 1993; Rekker, 1977; Hansch ve Leo, 1979; Van De Waterbeemd ve Testa; 1987; Taylor, 1990; Leo ve ark, 1971; Leo, 1990; Franke, 1984).

Kantitatif yapı-etki ilişkileri analizlerinde kullanılan başlıca lipofilik parametreler şunlardır:

- Partisyon Katsayı Sabitesi ($\log P$),
- Pi Aromatik Süstitüent Sabitesi (π),
- Kromatografik Dağılım Sabitesi (R_M),
- Hidrofobik Fragment Sabitesi (f)

1.1.1.2.2. Elektronik Parametreler

Moleküllere ait elektronik özellikler, çeşitli mekanizmalarla biyolojik yanıtın ortaya çıkışını sağlayan efektör-hedef etkileşmelerinde rol alan kimyasal reaksiyonlarda ve/veya kimyasal bileşiğin organizmadaki dağılım olaylarında etkinlik göstermektedirler (Akı-Şener ve Yalçın, 2003). Yük-transfer etkileşimleri, hidrojen bağ oluşumları, elektrostatik etkileşimler, polarizasyon ve iyonizasyon

gibi olaylar bu etkinliklerdendir. Bu etkileşimleri tanımlamak amacıyla yürütülen QSAR analizlerinde yer alan elektronik nitelikleri ifade eden parametreler, üç değişik yolla elde edilen sabiteler halinde kullanılmaktadırlar. Bunlar;

- Farklı atom ve/veya atom gruplarına ait saptanmış ve literatürde tanımlanmış durumda bulunan çeşitli **elektronik sübstitüent sabiteleri** şeklindeki parametreler.
- Çeşitli ölçüm veya hesaplamalar sonucu saptanan **moleküler nitelikli elektronik parametreler**.
- **Kuantum mekanik hesaplamalar** sonucu saptanan parametreler.

1.1.1.2.3. Sterik Parametreler

Kimyasal bileşikler ve/veya sübstitüentlere ait sterik etkilerin organik reaksiyonlarda oynadıkları rolün tanımlanması ile ilgili araştırmalar ondokuzuncu yüzyılın son çeyreğinde başlamış (Unger ve Hansch, 1976) ve kantitatif sonuçlar içeren ilk çalışma 1895 yılında Meyer tarafından yayınlanmıştır. Meyer, çalışmasında, orto-sübstitüe aromatik asitlerin esterifikasyon oranları ile orto-sübstitüentlerin atomik ağırlıkları arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır. Sübstitüentlerin sterik özelliklerini kantitatif olarak belirten ilk parametrenin ortaya çıkışını ise 1952 yılında Taft gerçekleştirmiştir.

Yapı-etki ilişkileri analizlerinde, kimyasal bileşiğe ait sterik özelliklerin tanımlanması oldukça karmaşık olayları içerir (Akı-Şener ve Yalçın, 2003). Özellikle yapısal esneklik gösteren moleküllerin yer aldığı ortamlarda, tek ve/veya iki boyutlu tanımlamaları içeren parametrik değerlerin kullanılması yetersiz bazı yorumlarla karşı karşıya kalınmasına yol açabilir. Bu gibi durumlarda, moleküler yapının konformasyonel özelliklerini daha net biçimde tanımlayan üç boyutlu parametrik değerlerin yapı-etki ilişkileri analizlerinde yer alması daha doğru olur.

Sterik parametreler moleküler yapıda yer alan sübstitüentler arasındaki ve/veya efektör-hedef arasındaki intermoleküler sterik etkileşmeler ile ilgili ilişkileri tanımlarlar. Kantitatif yapı-etki ilişkileri analizlerinde kullanılan sterik parametreler, taşıdıkları benzer fizikokimyasal niteliklere göre biraraya toplandığında, aşağıda belirtilen başlıca grupları oluştururlar.

- Geometrik Özellikleri Tanımlayan Parametreler.
- Moleküler Farklılıkları Tanımlayan Parametreler.
- Polarize Özellikleri Tanımlayan Parametreler.

1.1.2. Moleküler Modelleme Teknikleri

Modern moleküler modelleme metotları, geçtiğimiz yüzyılın başlarında nükleer fizikte moleküler yapıların ilk başarılı temsillerinin ortaya çıkmasıyla birlikte önemli bir gelişme göstermiştir (Höltje ve Folkers, 1997).

Moleküler Modellemenin Tarihi

Hueckel, Mullican ve diğerleri moleküllerin delokalize „moleküler orbitaller“ deki elektron kümeleriyle çevrelenmiş çekirdeklerden oluşmuş olabileceklerini varsaymışlardır; bunu takiben Pauling, Roberts, Streitwieser, Pople, Dewar ve diğer araştırmacıların ayrıntılı çalışmaları moleküler yapıların ve özelliklerinin hesaplanması için yeni nesil moleküler orbital programlarına öncülük etmiştir (Cohen, 1996).

Westheimer, Hendrickson, Wiberg, Boyd ve daha birçokları, bağımsız olarak, kızıl ötesi spektral absorbanların açıklanması amacıyla titreşen moleküllerin teorileri üzerine kurarak, yapıların, konformasyonların, etkileşim enerjilerinin, moleküler dinamiğin ve diğer özelliklerin hesaplanması için mevcut „klasik mekanik“ programları geliştirmişlerdir (Cohen, 1996).

Modern bilimsel bilgisayarlık ve ticari bilimsel yazılım şirketlerinin 1970'lerin sonuna doğru ortaya çıkışıyla hızlı bir ilerleme yaşanmıştır. Günümüzde moleküler modellemeci şaşırtıcı düzeyde donanım ve yazılım seti seçenekleriyle yüz yüzedir (Cohen, 1996).

Kristalografi, moleküler modellemenin gelişiminde belirgin bir basamaktır. Kristal yapıların karmaşıklığına dair bilgilerin artışı, kağıt üzerindeki iki boyutlu temsillerde bile yoğun hesaplamalar gerektirmiştir. O dönemlerde, moleküler kitlerin kullanımı, kristal yapıların 3D görünümünün eldesi için mümkün olan tek yöntem olmuştur. Dreiding Modelleri, o zamanların yapısal kimya bilgilerinin tamamını içerdiğinden yoğun ilgi görmüştür. Prefabrik modüller elementler, örneğin hibridizasyon durumlarına ve aromatik özelliklere göre doğru bağ sayısına ve açılara sahip farklı azot atomlarıyla, kristal yapıların bire bir 3D modellerinin oluşturulmasına ve dolayısıyla moleküler modellemeye olanak sağlamıştır. Ebatlar doğrusal olarak Angström boyutundan oranlanmıştır. Sübstitüentlerin sterik engelleri, hidrojen bağı etkileşimleri, vb. özellikleri modellerle oldukça iyi bir şekilde temsil edilmiştir. Benzer kalitede bir modelleme, her ne kadar daha az tutarlı olsa da, ancak hacim dolum (space filling), Stuart-Briegleb veya CPK modelleri tarafından sağlanabilmiştir.

Watson ve Crick, baz eşleşmesini ve dolayısıyla DNA çifte sarmalının ana hatlarını bu tür moleküler kitler yardımıyla açıklamışlardır (Höltje ve Folkers, 1997).

Moleküler modelleme bir bilgisayar bilimi varsayımı değildir. İşlemcilerin gelişmesine paralel olarak bilgisayar teknolojisi de sinerjik bir gelişme göstermiştir ve tüm bunların sonucunda günümüzde binlerce atom içeren protein molekülleriyle kolaylıkla başa çıkılabilmektedir (Höltje ve Folkers, 1997).

Bir molekülün ilk yalancı-3D temsili, 1970 yılında, renkli ve rotasyon yapabilen bir biçimde sanal Dreiding modelleri yaratılarak ancak bilgisayar ekranlarında mümkün olabilmektedir (Höltje ve Folkers, 1997).

Bilgisayar teknolojisi olmadan, protein gibi kompleks yapılardan doğan veri yığını ile insan gücünün başa çıkması olanaksızdır (Proteinlerin ölçümleri, bilgisayar teknolojisi olmadan X-ışınları kırınımı veya nükleer manyetik rezonans gibi metotlarla gerçekleştirilemezdi.) (Höltje ve Folkers, 1997).

Bu metotların günümüzde taşıdıkları önem, bilgisayar teknolojisinin bir getirisidir. 1930'lardan beri, nükleer fizik, sadece analitik değil, aynı zamanda atom bombasının yapımında temel bir bileşen olan sistematik düşünceye ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle, fiziksel durumların hesaplanması ve hatta tahminleri için matematiksel modelleme tekniklerine başvurulmaktadır (Höltje ve Folkers, 1997).

O yıllarda ortaya çıkartılan Monte Carlo Simülasyonu, gaz partiküllerinin fiziksel durumlarının tahmini için uygulanmaktaydı. O zamanlarda, moleküler sistemler üzerine mekanik analogilerin ilk uygulamaları geliştirilmiş; güç alanları kavramı ortaya atılmış, optimize edilmiş ve zamanla inanılmaz bir yeterliliğe kavuşmuştur (Höltje ve Folkers, 1997).

Günümüzde matematiksel teknikler hidrojen atomundan daha büyük sistemlerin kuantum kimyalarına ait hesaplamalarına ve ligant-enzim aktif bölge bağlantı simülasyonlarına olanak sağlamıştır (Höltje ve Folkers, 1997).

Yeni terapötik ajanların rasyonel tasarımında medisinal kimyacılar için emsalsiz fırsatlar yaratan Moleküler Modelleme, farmasötik araştırmalarda etkinliğini ispatlamış bir disiplin haline gelmiştir. Bilgisayar donanımındaki, yazılımındaki ve teorik medisinal kimyadaki gelişmeler çoğu akademik ve endüstri laboratuvarlarının kapsamındaki bilgisayar çalışmalarına ve grafik araçlara yüksek performans sağlamış, ve böylelikle de rasyonel ilaç tasarımında yararlı yaklaşımların gelişmesine zemin hazırlamıştır (Cohen, 1996).

İlaç tasarımında günümüzde göz önünde bulundurulmuş reseptörlerin varlığı ve anahtar-kilit kavramları P. Erlich (1909) ve E. Fischer (1894) tarafından formüle edilmiştir. Yaşamsal işlemlerde

rol alan mekanizmaların detaylarından bazılarını anlamak 1970'lerde mümkün olmuştur. Protein hedeflerinin saf örnekleri izole edilerek X-ışınları kristalografisi ile de moleküler yapıları günışığına çıkartmıştır.

Üç boyutlu (3D) yapıların yaşamsal işlemlerin düzenlenişini nasıl kusursuzca kontrol ettiklerinin öğrenilmesi böylelikle mümkün olabilmıştır. Böylesi bir aşamayı daha ileriye götürebilmek amacıyla farmasötik endüstride ilaç keşfine yönelik akılcı bir yaklaşım ortaya konulmuştur ve bu yaklaşım, moleküler modellemenin tam bir disiplin olarak hızla gelişimine katkıda bulunmuştur. Bu alan, 1980'lerden bu yana daha da ivme kazanarak moleküler biyolojide ve deneysel/teorik yapısal kimyada ve de bilgisayar teknolojilerinde olağanüstü gelişmelere neden olmuştur. Bu gelişmelerin her biri, moleküler modellemenin temelinde önemli bir yere sahiptir. Söz konusu disiplin artık tamamen tanınmış ve araştırma işlemlerine entegre olmuştur (Cohen,1996).

Moleküler modellemenin amacı, bir molekülün kimyasal ve fiziksel özellikleri arasındaki temel ilişkiyi, kimyasal yapısını ve almış olduğu üç boyutlu (3D) yapıyı anlamaktır. Bu anlayış, bu özelliklerin moleküllerin kimyasal, katalitik veya biyolojik fonksiyonlarıyla ilişkilendirilmesi ve en önemlisi değişen fonksiyona ait moleküllerin rasyonel olarak tasarlanmasına olanak sağlamaktadır. Kimyasal yapı ve fonksiyon arasındaki bu bağlantı, moleküler biyoloji, protein bilimi, ilaç tasarımı, kimyasal kataliz veya materyal ve polimer bilimi gibi birçok bilimsel çaba için hayati önem taşımaktadır (Cohen, 1996).

Grafik ve Modelleme için Donanım ve Yazılım Gereksinimi:

Sınırları kesin ayrılmamakla beraber, modelleme çalışmalarında kullanılan üç belirgin bilgisayar sınıfı tanımlanmaktadır: merkezi bölümsel hesap ve dosya sunucuları, yüksek performanslı grafik iş istasyonları ve kişisel iş istasyonları.

Moleküler modellemede yazılım gereksinimi kullanıcı arayüzleri ve başlangıç modelinin oluşturulmasında (1D, 2D veya 3D), oluşturulan modelin refine edilmesi, manipule edilmesi, vektör grafiklerle görselleştirimde ortaya çıkmaktadır.

Modelleme çalışmaları, deneysel bir sistemi veya sonuçlarını anlamak; planlanan bir deneyden türetilcek olan bilginin optimizasyonunu sağlamak; veya bilimsel bir probleme teorik veya yapısal bilginin uygulanması amacıyla yürütülmektedir.

Moleküller inanılmaz derecede küçüktürler, ancak bilim adamları yıllarca moleküler kiralite, halka konformasyonu ve sterik gerginlik gibi yararlı kavramları anlamak için çeşitli mekanik modeller

kullanmışlardır. Molekül kitleri bilgisayar modelleri gibi gerçek yapı hakkında fikir vericidir ancak bunun ötesinde bilgisayar modelleri çakıştırma, enerji hesaplaması ve titreşimler gibi mekanik modellerle zor veya imkansız olan manipulasyonlara da izin vermektedir.

Bilgisayar modelleme programları, birçok bilim adamının elde hesap yapmakta yetersiz kalacağı sistematik ve yorucu çalışmaların yürütülmesinde de yararlıdır. Ancak, modelin etkisinde kalmanın bir bilim adamının tarafsızlığına gölge düşürmesine neden olabileceği durumu neredeyse her zaman doğrudur. Modeller test edilmek ve kullanılmak içindir, ancak modellere tam olarak güvenilmemelidir. (Cohen, 1996).

Moleküler Modellemenin Kullanım Alanları:

Moleküler modellemenin birçok olası metotları ve uygulamaları mevcuttur. Yapı oluşturma, yapının görüntülenmesi, konformasyon oluşturulması, biyoaktif konformasyonların türevlendirilmesi, moleküler süperpozisyon ve çakıştırma, farmakoforik kalıpların türevlendirilmesi, reseptör haritalandırımı, biyolojik aktivitelerin tahmini, moleküler etkileşimler; docking, moleküler özelliklerin hesaplanması, enerji hesapları gibi alanlarda moleküler modellemeden faydalanılmaktadır.

Moleküler Modellemede Temel Kavramlar:

Reseptör ve Ligant tasarımında Moleküler Tanımlama: Reseptörler, ligantlarını moleküler iskeletler, atom pozisyonları veya bunlar arasındaki bağlantılar olarak değil, ligantın reseptörle olan bağlı (associated) veya bağlı olmayan (unassociated) durumları arasındaki serbest enerji farklılığı olarak algılamaktadırlar. Hedef reseptöre spesifik bağlanmada en önemli faktörler arasında, moleküler şekildeki 3D uyumluluk ve ilaç ile reseptörün ilaç bağlama yöresi arasındaki submoleküler özellikler ön plandadır. Bu, üç boyutlu gereksinimleri yerine getiren moleküllerin reseptörün spesifik ligantı olabileceği anlamına gelmektedir.

Aktif Konformasyon: Mevcut ilaçların veya ligantların aktif konformasyonlarına ait bilgiler, yeni ilaç moleküllerinin rasyonel tasarımı için yol göstericidir. 3D reseptör yapısı bilinmese bile, tek bir aktif molekülün aktif konformasyonu biliniyorsa veya rijit yapıda tek bir aktif molekül mevcutsa, bilinen ligantların yapıları temel alınarak tasarım çalışması gerçekleştirilir.

Reseptör yapısının bilindiği ve bilinmediği durumlarda 3D yapı-etki ilişkilerini yorumlamak ve yeni aktif yapılar tasarlamak için farklı yaklaşımlar geçerlidir:

Üç Boyutlu Veritabanı Tarama Yaklaşımları:

Yeni bir önder bileşik, her zaman yeni bir bileşik anlamına gelmemektedir. Dünyada varlığı bilinen birkaç milyon bileşiğin birçoğu bilinmeyen biyolojik aktiviteler gösterebilmektedir. Genel olarak, söz konusu herhangi bir bileşik için mevcut olan deney sistemleriyle sadece birkaç biyolojik aktivite veya fonksiyon test edilmiş durumdadır. Bu nedenle neredeyse bütün bilinen bileşiklerin hemen hemen tüm biyolojik aktiviteleri araştırılmamış haldedir denilebilir. Çeşitli tarama programları, reseptör yöresinde ligant olabilecek bileşikleri bulma adına, bilinen biyoaktif bileşiklerle yapısal yakınlığı olan molekülleri tanımlama özelliğine sahiptir. 3D tarama programlarının çoğunluğu halen ligantların özelliklerine odaklanmış durumdadır. Reseptör yapısı biliniyorsa, molekülleri reseptörle uyumluluk açısından taramak daha rasyonel bir yaklaşımdır.

Otomatikleştirilmiş Yapı Oluşturum Metotları:

Veritabanı yaklaşımları, çok sayıda toplanmış bileşikleri en iyi şekilde kullanarak yeni önderler bulmak amacıyla oldukça yararlı yaklaşımlar olarak göze çarpmaktadır. Eldeki veya ticari olarak sunulan bileşikler seçildiyse, aktiviteleri de kimyasal senteze gerek kalmaksızın tayin edilebilmektedir. Bileşikler elde edilemiyorsa bile, bileşiklerin sentez basamaklarına veya fiziksel özelliklerine ilişkin önemli bilgiler literatürde yer alabilmektedir. Otomatikleştirilmiş yapı oluşturma metotları, reseptörün bilinen 3D yapısı ile veya bilinmeyen reseptör yapısıyla oluşturma olmak üzere iki sınıftır.

Yapı oluşturma metotlarında molekül içi validasyon ve stabilite, aktif konformasyonun stabilitesi, moleküllerarası stabilite, yapıların seçimi gibi hususlar gözönünde bulundurulmalıdır.

DeneySEL Teknikler ve Veri Bankaları:

X-Işınları Kristalografisi: Biyolojik makromoleküllerin üç boyutlu (3D) yapılarına ait bilgilerin temeli X-Işınları kristalografik incelemelerinden gelmektedir. Klasik X-Işınları kristalografisinin ardından makromoleküler X-Işınları kristalografisi yöntemi geliştirilmiştir.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR): 1950'lerin sonlarından 1980'lerin ortalarına kadar, X-Işınları kristalografisi bir biyolojik makromolekülün tam 3-D yapısının tayini için tek metot olmuştur. 1980'lerin ortalarından itibaren, NMR spektroskopisine dayanan teknikler biyolojik makromoleküllerin 3D yapılarının tam olarak aydınlatılmasına atomik detaylarına varana kadar imkan sağlamıştır. NMR, molekülleri kristal halde incelemek yerine çözeltide inceler. Bundan dolayı, X – ışınları kristalografisi de kristal yapılar daha statik bir görüntü verirken, NMR yapıların dinamiklerini incelediği için bu iki metot birbirini çok iyi bir şekilde tamamlamaktadır.

Moleküler yapıların modellenmesinde deneysel olarak elde edilen veriler temel oluşturmaktadır. Özellikle de makromoleküllerde deneysel veriler daha da önemli olmaktadır.

X-ışınları kristalografisi ile, makromoleküllü oluşturan bloklar, amino asitler ve nükleozitlerin kantiteleri, bağ uzunlukları, bağ açıları, grup planaritesi ve kiralitesine ait hatasız ölçümler alınmaktadır. Proteinlerin alfa heliks ve beta tabakaları 1950'lerin ve 1960'ların sonlarında henüz sonuçlar alınmadan tahmin edilmiştir. DNA'nın çifte sarmal yapısı da, fiber difraksiyon verileri yardımıyla 3D olarak ve deneysel olarak ortaya konulmadan yorumlanmıştır. Makromoleküllerin diğer makromoleküller veya küçük moleküllerle etkileşimleriyle ilgili yorumlamalar da deneysel kanıtlara ulaşılmadan önce gerçekleştirilmiştir. (Cohen, 1996).

Deneysel Yapıların Protein Modellemesindeki Kullanımları: Deneysel yapılardan elde edilen en temel veriler, kimyasal yapıların genel prensipleridir. Küçük molekül kristalografisinden, atomik bağ uzunlukları ve açıları, temas uzaklıkları ve konformasyonel tercihler için kesin değerler saptanmıştır. Bir makromoleküler yapının en net özelliklerinden birisi modellemeciye üzerinde modelleme yapabileceği bir iskelet vermesidir.

Kimyasal bir Veritabanının Bileşenleri: Kimyasal veritabanları moleküler ve atomik verilerle birlikte kodlanmış kimyasal yapılar içeren veritabanlarıdır. En genel anlamda, bir veritabanı (veya veritabanı sistemi) üç bileşenden oluşmaktadır; taranabilir formda veri, genel bir tarama makinesi, verinin türüne uygun bir sorgulama dili.

CADD - Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

İlaç Geliştirme İşlemi

Bir hastalığın tedavisine yönelik kanıtlanmış bir etkinliğe sahip yeni bir kimyasal bileşiğin keşfi ve geliştirilmesi yoğun çabalar gerektiren uzun vadeli bir işlemdir.

Endüstriyel istatistikler, tıbbi kullanım için onayı bulunan her bir ilaç için 10.000'e yakın bileşiğin sentezlenerek test edildiğine; bu bileşiklerden sadece 100 kadarının emniyet açısından değerlendirmeye alındığına; ve bunların içerisinde sadece 10 kadarının klinik olarak insanlarda test edilebildiğine işaret etmektedir.

Bir ilacın piyasaya çıkış onayı, başarının garantisi anlamına gelmemektedir. Piyasadaki çoğu ilaç, pratikte yeterli etkinliğe sahip olamadıkları için, veya geniş ölçekli deneyimler sonucunda istenmeyen yan etkileri ortaya çıktığı için keşif ve geliştirilmeleri için harcanmış olan yüksek maliyeti

karşılayamamaktadır. Ancak, çok başarılı bir ilaç üretici firmaya ve hissedarlarına çok büyük bir kazanç getirebilmektedir.

İlaç keşif ve geliştirme işlemi üç faza ayrılabilir: 1) yeni önder keşfi ve önder bileşiğin optimizasyonu; 2) prelinik ve kliniğe yönelik önder geliştirilmesi; ve 3) piyasaya sürülüş sonrası takip. Bu basamaklar arasında kesin sınırlar bulunmamaktadır. İleriki basamaklarda problemler yaşanması ihtimaline karşı son basamak hariç çalışmalar tipik olarak birden fazla önder bileşik üzerinde yürütülmektedir.

İlaç Tasarım Ekipleri

Rasyonel ilaç tasarımı ve geliştirimi için çalışan ekiplerin kuvvetli bir karakteristiği, onların yeti ve disiplinler açısından genellikle geniş bir spektrum göstermeleridir. Bunun nedeni, aday ilaçların kimyasal ve biyolojik olarak birçok yönden araştırılmaları, optimize edilmeleri ve belgelenmeleri gerekliliğidir. Üretken araştırma ekiplerinde eğitim ve teknik dil farklılıkları gibi sorunlar kolayca çözülebilmekte, ancak ekip içerisinde etkileşim ve kooperasyonun sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi yoğun çabalar gerektirmektedir. Bilgisayar metotları bu etkileşim ve kooperasyona yardımcı olabilmekte ve ekip üretkenliğini yükseltebilmektedir.

İlaç-Reseptör Etkileşimlerinin Modellenmesi

Makromoleküler Hedefler: İlaçların potansiyel hedefleri organizmayı veya patojeni oluşturan moleküler bileşenler kadar fazladır. Bu etki yöreleri; proteinler, nükleik asitler, lipitler ve sakkaritleri içermektedir. Bilinen en yaygın hedefler enzimler, membran-bağlı reseptörler, iyon kanalları, antikor, ve yapısal proteindir. Bir başka yaygın ilaç etkileşim yörenesi de nükleer ve mitokondriyal DNA ve mRNA'nın da dahil olduğu nükleik asitlerdir. Bununla birlikte en yaygın çalışmalarda hedef alınan proteinlerdir.

Proteinlerin katlanmasına neden olan güçlerin göz önünde tutulması, ilaçların proteinlere bağlanmasından hangi güçlerin sorumlu olduğuna dair bir fikir verebilmektedir, çünkü bu iki işlem birçok ortak karakteristik taşımaktadır.

Mevcut bilgilere dayalı olarak, ilaç tasarımında iki belirgin modelleme stratejisi kullanılabilir. İlaç reseptör hedefinin net bir yapısı mevcut değilse, ve de reseptöre bağlanan birden çok kompetitif ligant biliniyorsa, reseptörün yapısı kendisine bağlanan yapıya dayalı olarak çıkartılabilir. Bu stratejiye reseptör haritalama adı verilmektedir. Öte yandan, net 3D yapı, kristalografi veya NMR çalışmalarından veya homoloji modellenmesinden elde edilebilir, veya reseptör yerleştirimi (fitting) kullanılabilir.

Sulu ve Susuz Solvan Modelleri: Su, biyolojik olayların çoğunu ve ilaçların kendi makromoleküler hedeflerine bağlanmalarını ileri düzeyde etkilemektedir. Sulu ortam, ilaçların ve reseptörlerin konformasyonel tercihlerinin saptanmasında ve de bağlanma partnerleri arasında gözlenen kuvvetlerin modülasyonunda temel bir rol oynamaktadır.

Solvan etkilerini hesaba katmak, protein konformasyonları ve dinamiklerinin yorumunda temel oluşturmaktadır.

1.1.3. Geometrik Optimizasyon

Moleküller sürekli hareket etmekte, şekil değiştirmekte ve bazen de reaksiyon veya tekrar düzenleme sonucu parça kaybetmekte veya kazanmaktadırlar. Bazı konformasyonlar diğerlerinden daha az enerjilidir, çünkü bağlar daha az gergindir, veya istenmeyen VdW etkileşimlerini engellerler. İzole bir sistemde bir molekül enerji kaybedemez, böylece düşük enerji konformasyonları daha hızlı hareket etmeli ve kendi düşük gerilim enerjilerini büyük kinetik enerjiyle dengelemelidirler (Goodman, 1998).

Bu iskeletlerin çoğu hızlı hareket etmediğinden iskelet modelini desteklemiyor gibi görülmektedir. Iskelet çökerse, yine de potansiyel enerjisini kaybeder ve bu, ortam tarafından çeşitli titreşim şekilleriyle absorbe edilir. Bu, bir molekül model içerisinde simüle edilebilir. Enerjinin kaldırılmasıyla molekül düşük enerji konformasyonuna sokulabilir. Bu işleme genel olarak enerji minimizasyonu denir (Goodman, 1998).

Harici bir enerji kaynağı olmaksızın düzensiz bir halden daha düzgün [ordered] bir hale geçiş olmaz. Entropi karışıklığın bir ölçüsüdür. Bu aynı zamanda izole bir molekülün neden belirli konformasyonları tercih ettiğini de açıklar. Molekül, sisteme en yüksek entropiyi verecek konformasyonları seçmektedir. Sikloheksanın kayak ve sandalye formları arasındaki enerji farkı yaklaşık olarak 20 kJ mol^{-1} kadardır. Aslında, bu, bir molekül modelleme yöntemiyle hesaplanmış olan bir iç enerji farklılığıdır, serbest enerji farklılığı değildir. Sandalye sikloheksanı kayak sikloheksana çevirmek için bariyer 40 kJ mol^{-1} kadardır. Bu da çevrimin saniyenin 100.000'de birinde gerçekleşeceği anlamına gelmektedir. 100 kJ mol^{-1} enerji gerektiren bir işlem sadece iki haftada bir gerçekleşecektir.

Bir yapının gerginlik enerjisini (E_{MM}) minimize etmiş olmak, tüm bağlarının uzunluklarını, açılarını doğru saptamak, istenmeyen VdW etkileşimlerini engellemek az enerjili konformasyonu oluşturur; ancak yine de bunun molekülün adapte olmak istediği konformasyon olduğuna dair bir

kesinlik yoktur. Ancak değişik moleküler modelleme yöntemleri uygulanarak konformasyon taraması gerçekleştirilebilir. Moleküler modellemede moleküler orbital ve kuantum mekaniği çok yararlı bilgiler sağlamaktadır. Yukarıdaki örnekte, sandalye formu tercih edilmesine rağmen minimizasyon kayık formu verebilir. Daha basit bir örnek butan ile verilebilir. Butan dört karbon taşıyan bir alkan yapısı olduğu için açık formülünü çizmek kolaydır, bükülü konformasyonu da rahatlıkla oluşturulabilir. Bu konformasyon yaklaşık olarak 3.5 kJ mol^{-1} daha yüksek enerjilidir. Bu tan için rastgele bir konformasyon oluşturulacak olsaydı ve enerjisi minimize edilseydi, sadece bir yapı elde edilecekti ve sadece açık zincir veya bükülü şekillerinden birisi elde edilecekti. Bu yapıların her ikisi de doğrudur. Büyük moleküllerde fazla sayıda, yüzlerce, binlerce hatta milyonlarca konformasyon olabilir. Burada çözümlenme yapmak çok zordur. Moleküler orbital teorisi, kuantum mekaniğine göre daha da kesin bilgiler vermektedir. Özellikle de elektronik bilgilere kusursuz ulaşılmaktadır. Dekalin gibi küçük bir molekülün moleküler mekanik hesaplamaları belki bir saniyeden daha kısa sürmektedir, çünkü burada gözönünde bulundurulacak sadece birkaç atom ve bağ bulunmaktadır. Aynı sistem üzerinde moleküler orbital hesapları tüm atomik çekirdekler ve tüm elektronları ve her birinin birbiriyle etkileşimini ele alacağından oldukça uzun sürmektedir. Dekalinin iki katı kadar bir molekülün özelliklerini hesaplamak moleküler mekanik ile dört kat daha uzun sürmektedir (hesaplar N^2 olarak oranlanır). Bu sistemin moleküler orbital hesaplaması ise (hesaplar N^4 olarak oranlanır, bazı kesin metodlarla N^8 olarak oranlanır) onaltı kez daha uzun sürebilmektedir. Molekül büyüdükçe işler daha hızlı bir şekilde zorlaşmaktadır. Konformasyon taraması problemi bununla bağlantılı olduğunda moleküler orbital teorisinin çok zor olduğu ve çok fazla bilgisayar gücüne ihtiyaç duyduğu söylenebilir. Bu nedenle de minimizasyon çalışmalarında moleküler dinamik hesaplamalardan yararlanılmaktadır (Goodman, 1998).

Moleküler mekanik enerji, E_{MM} , belirli sayıdaki bileşenlerden meydana gelmektedir.

- Bağ Enerjisi ($E_{bağ}$)
- Bağ Açısı Enerjisi ($E_{açılar}$)
- vdW Etkileşimleri (E_{vdw})
- Büküm Açısı Enerjisi ($E_{büküm}$)
- Yük-Yük Etkileşimleri ($E_{yük}$)
- Çeşitli Etkileşimler ($E_{çeşitli}$)

Minimizasyon, bir molekülün geometrisinde küçük düzenlemeler yapma işlemidir. İşlem, tüm küçük düzenlemeler sonucunda enerjide bir düşüşe ulaşılmasıyla durmaktadır. Minimizasyon çok yararlı bilgiler sağlayabilmektedir.

Eğer bir molekül rijit ise, potansiyel enerji yüzeyinde sadece bir adet minimum olabilir, ve molekülün özellikleri hakkında minimize etmek yolu ile bilgi alınabilir. Eğer esnek bir yapıya sahipse, minimizasyona bağlı olarak konformasyon tarama tekniklerinin de kullanılması gerekmektedir.

Bu problemi çözmek için değişik birçok algoritma geliştirilmiştir. Belirli bir durumda en iyi cevap çalışılan molekülün ve kullanılan güç alanının karakteristiklerine ve de cevapta istenilen kesinliğe bağlıdır. Minimizasyon algoritmaları türevsel ve türevsel olmayan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Türevsel Olmayan Yöntemler; potansiyel enerji alanının türevinin (eğim) hesaplanmasını gerektirmez. Bunlar için program yazılması daha kolay, ancak daha az yeterlidir. En yaygın kullanılan türevsel olmayan yöntem „Simplex Minimizasyonu“ dur. Türevsel bilgi kullanan dört yöntem sınıfı; 1) Dik İniş (Steepest Descents), 2) Newton Raphson, 3) Konjuge Derece (Conjugate Gradients) ve 4) Değişken Metrik (Variable Metrics) olarak ayrılmaktadır (Goodman, 1998).

Dik İniş Yöntemi (Steepest Descents): Bu metot lokal minimuma ulaşmak için yaygın kullanılan bir metottur (San Diego Supercomputer Center).

En dik eğim yönünde hareket ederek en dik eğim çizgisindeki minimumu saptayarak en düşük enerjili hale ulaşana kadar o minimumdan yeni yönleri hesaplamaktadır. Bu metot, yön seçerken önceki tarama yönlerine ait bilgileri gözardı ettiği için sınırlı bir metottur. Bu yetersizlik çoğu zaman fazladan hesap basamağı sayısı anlamına gelmektedir (Payne ve ark., 1992).

Dik iniş yönteminin avantajı, mutlaka bir minimum değere ulaşabilmesi ve enerjiyi de düşürebilmesidir. Daha sofistike metotların fonksiyon değerini düşüremediği durumlarda hızlı bir relaksasyon sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Konjuge Derece Yöntemi (Conjugate Gradients): Bu yöntem dik iniş yöntemiyle ilişkilidir, ancak mevcut basamaktaki eğim yönünü doğrulamak için önceki noktadaki eğim bilgisini kullanmaktadır. İlk basamak dik iniş ile gerçekleştirilir, bundan sonra gelen her basamak bir çizgi üzerinde mevcut negatif eğiminin ve önceki tarama yönlerinin bir karışımı olarak yürütülür. Dik iniş yöntemine göre daha yararlı bir minimizasyon yöntemidir. Dik iniş yönteminde tüm ardışık tarama yönleri dikken, konjuge derece yöntemi, önceki tüm yön bilgilerini kombine ederek önceki yönlerden bağımsız (konjuge) bir ardışık tarama yönü oluşturur. Bu, önceki tüm yönlerin değil, bir önceki tarama yönünün hafızaya alınmasıyla başarılmaktadır. Konjuge derece yöntemi aynı zamanda bir –boyutlu vektör-uzayının minimumunun basamaklar halinde saptanmasını da garanti etmektedir. Konjuge yön, önceki konjuge yönler ve mevcut dik eğim yönü kullanılarak belirlenmektedir. Bu teknik bilgisayar yükünü azaltan bir tekniktir (Condensed Matter Theory Web Site). Bu yöntemin dezavantajı, önceki eğimleri ve mevcut eğimi hafızaya alma gerekliliğidir (San Diego Supercomputer Center).

Newton Raphson Yöntemi: Bu yöntem sabit bir noktaya yaklaşmayı artırmak amacıyla ikinci türev bilgisini kullanmaktadır. Lokal minimum ve maksimumların saptanmasında kullanılabilir.

Hessian koordinatlarını kullandığı için bilgisayar yükünü artırması ise bu yöntemin en göze çarpan dezavantajıdır (San Diego Supercomputer Center).

1.1.4. Üç Boyutlu Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (3D-QSAR)

Bir moleküler modelleme çalışmasına başlarken yapılması gereken ilk iş, bir kartezyen koordinat seti ile atomların uzaydaki bağıl pozisyonlarını tanımlayarak molekülün bilgisayarda bir modelinin oluşturulmasıdır. Makul ve güvenilir bir başlangıç geometrisi, bundan sonra yürütülecek temel araştırmaların kalitesini belirler. 3D moleküler yapıları oluşturmak için temel metotlar şunlardır (Höltje ve Folkers, 1997):

X-Işını Kristalografik Veritabanlarının Kullanımı: Küçük moleküllerle çalışırken kristalografik bilgiler için en önemli veritabanı Cambridge Kristalografik Veritabanı'dır. Bu veritabanı 500 atoma kadar olan organik ve inorganik bileşiklerin deneysel olarak belirlenmiş atomik koordinatlarını içermektedir ve devamlı olarak güncellenmektedir. Cambridge Kristalografik Veri Merkezi, veritabanını ve hatta veritabanını taramak ve sonuçları analiz etmek için hazırlanmış olan yazılımı kiralamaktadır (leasing). Veritabanı taramasının çıktısı ilgilenilen molekülün 3D yapısal bilgilerini içeren, basit, okunabilir bir dosyadır. Bu veri dosyası mevcut ticari moleküler modelleme paket programlarının çoğunluğu tarafından açılabilir. Dosya, moleküler modelleme programı tarafından açıldığında, veritabanında listelenmiş olan atomik koordinatlar otomatik olarak kartezyen koordinatlara dönüştürülmektedir. Bunu takiben, yapı, moleküler grafik olarak görüntülenebilmekte ve üç boyutlu yapısıyla çalışılabilir.

Standart Geometrilere Fragman Kütüphanelerinden Derleme: İkinci en yaygın yapı oluşturma yöntemi ise mevcut fragman kütüphanelerinden alınan moleküllerin kullanılmasına dayanmaktadır. Bu metot, kristalografik veritabanlarına ulaşılamadığı veya istenilen yapılar için X-Işınları verileri bulunamadığı hallerde tercih edilmektedir. Günümüzde neredeyse tüm ticari moleküler modelleme programları fragman kütüphaneleri kullanarak molekül oluşturma seçeneğini sunmaktadır. Fragman kütüphaneleri kolay kullanıma sahip elektronik bir 3D yapısal araç seti gibi kullanılmaktadır. Fragman havuzundaki önceden optimize edilmiş standart geometriler sayesinde ortaya çıkartılan 3D yapılar kabul edilebilir bir geometriye sahip olmaktadır.

"Skeç" Yaklaşımıyla 2D Yapıların Basit Çizimi: Bu yaklaşımda bilgisayar ekranında fare imleciyle istenilen molekülün 2D formülü çizilir. Bazen kütüphanede yer alan sınırlı sayıda küçük moleküler standart fragmanlar bu amaçla başlangıç noktası olarak kullanılabilir. Çizim işlemi bitirilirken ekrandaki 2D görüntü 3D bilgilere çevrilir. Bu işlem nedeniyle doğru atom tiplerinin

seçimlerine özellikle dikkat etmek gerekmektedir. Skeç yaklaşımı çok basit bir metot olduğundan, elde edilen geometriler genel olarak çok tatmin edici değildir. Bu nedenle moleküler geometriyi rahatlatmak için kabaca bir geometri optimizasyonu her bir basit çizim işlemi sonunda otomatik olarak yapılmaktadır.

1.1.4.1. Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizleri Yöntemi (CoMFA)

CoMFA yöntemi, 1988 yılında ortaya çıkışından bu yana 3D-QSAR çalışmaları içerisinde en kuvvetli araçlardan birisi olmuştur. CoMFA yöntemi temelde, gözlenen biyolojik özelliklerin, bir set ligant molekülünü çevreleyen non-kovalan alanların uygun sterik (Lennard-Jones) ve elektrostatik (Coulomb) örneklemeyle anlaşılabilirliği ve korele edilebileceği varsayımına dayanmaktadır (Zhao ve ark., 2005).

Benzer etki mekanizmasına sahip biyolojik etki gösteren bir seri moleküle uygulanmakta olan CoMFA yöntemi, 1988 yılında Cramer ve ark. tarafından geliştirilmiştir. CoMFA'nın avantajları, moleküllerin biyolojik etkilerini tahmin edebilmesi ve de sterik/elektrostatik özelliklerle biyolojik etkiler arasındaki ilişkileri kontür haritaları halinde temsil edebilmesidir. CoMFA kontür haritalarının kalitatif bilgileri sadece ligant-reseptör etkileşimleri hakkında değil, aynı zamanda reseptör topolojisi hakkında da önemli özellikleri ortaya koymaktadır. CoMFA'nın kapsamının genişletildiği Gelişmiş CoMFA'da H-bağı ve indikatör alanlar da kullanılarak kompleks QSAR analizleri kolayca yapılabilmektedir. CoMFA'dan farklı olarak CoMSIA, korelasyon için daha iyi sonuçlar üretmektedir. CoMFA ve CoMSIA metotları, yapılan çalışmalarda toksisite mekanizmalarına da açıklık getirmektedir. CoMFA Lennard-Jones ve Coulomb potansiyellerine göre sterik ve elektrostatik özellikleri hesaplarken, CoMSIA yöntemi ligant bağlanmasından sorumlu majör katkıları ele almak için beş farklı özelliği (sterik, elektrostatik, hidrofobik, ve hidrojen bağı donörü veya akseptörü) göz önünde bulundurmaktadır. CoMFA'dan farklı olarak, CoMSIA'da, CoMFA'nın orijinal versiyonunda kullanılan Lennard-Jones ve Coulomb potansiyellerinin fonksiyonel formlarından kaynaklanan hatalar söz konusu değildir. CoMSIA kontür haritalarına yorum getirmek, varyansın farklı alan tiplerine bölümlendirilmesine izin verildiği için daha kolaydır (Xu ve ark., 2002).

CoMFA yöntemi, üç boyutlu QSAR çalışmalarında yaygın kullanıma sahip bir metottur. Sübstituent parametrelerine dayalı olan geleneksel Hansch analizinden farklı olarak, CoMFA, bir seri molekülün biyolojik aktivitesini molekül etrafında geniş bir 3-D hacim tanımlayarak sterik ve elektrostatik alanlarıyla ilişkilendirmektedir. CoMFA sütunları (deskriptörleri), her bir molekül için uygun bir prob kullanılarak (genellikle yükü +1 olan bir sp³ karbon atomu) ayrı ayrı her bir ızgara noktasında hesaplanan sterik (Lennard-Jones) ve elektrostatik (Coulomb) potansiyellerden oluşmaktadır.

Bağımsız değişkenler (sterik ve elektrostatik potansiyeller) ve de biyolojik aktivite (bağımlı değişken) arasında ilişki, Partial Least Squares (PLS) regresyon yöntemi ile kurulmaktadır. PLS analizi bağımsız değişkenler açısından hedef özelliklerdeki varyansı açıklayan model denklemleri üretmektedir. Optimum bileşen sayısı (latent değişkenler) çapraz-validasyon ile saptanmaktadır ve tahmin gücü çapraz-validasyon r^2 (r^2_{cv} , q^2) ile değerlendirilmektedir. CoMFA sonuçlarının (izokontur haritalarının) grafiksel temsili, bir veri setindeki farklı moleküllerin sterik ve elektrostatik özelliklerinin varyasyonunun biyolojik aktivitenin varyasyonu ile nerelerde korelasyona girdiğini göstermektedir.

CoMFA, sadece standart sterik ve elektrostatik moleküler alanlara dayalı olduğu için, reseptör-ligant etkileşimlerini modellemek için tüm bağlanma kuvvetlerini uygun olarak temsil edemeyebilmektedir. CoMFA, ligant-reseptör etkileşmelerinin sadece entalpik bileşenini temsil etmektedir. Ek bir alan olarak sunulan yeni moleküler lipofilisite potansiyelinin (MLP), CoMFA'nın tahmin gücünü belirgin bir şekilde artırdığı saptanmıştır. MLP, sterik ve elektrostatik alanlarla yeterli olarak tanımlanamayan hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimleri kodlamaktadır ve ayrıca bir entropi bileşeni içermektedir (Barreca ve ark. 1999).

Boeckler ve ark., Dopamin D₃ reseptör agonist serisinin uzantısı olan 3-sübstitüe 7-aminotetrahidroindolizinler üzerinde yaptıkları çalışmalarda CoMFA ve CoMSIA analizlerinde yeni geliştirilen ve karşılaştırma seçimini kontrol eden bir program uygulaması (IRAS) kullanmışlardır. CoMFA/CoMSIA katkı haritalarından faydalanarak D₃ reseptörünün daha önceden oluşturulmuş homoloji modelini inaktif durumdan aktif duruma dönüştürmüşlerdir. Bu çalışmanın neticesinde, tamamen ligant yapısına dayalı metotlar olarak CoMFA ve CoMSIA'nın yapıya dayalı homoloji modellemesiyle olan kombinasyonunun QSAR verilerinin yorumlanabilirliğini ve aktive edilmiş GPCR bağlanma yöresi modellerinin oluşumuna olan katkısını artırdığı sonucuna varılmıştır. (Boeckler ve ark., 2005)

Peng ve ark., bir seri opioid reseptör antagonistleri üzerinde karşılaştırmalı moleküler alan analizleri tekniği (CoMFA) kullanarak üç boyutlu QSAR modelleri oluşturmuştur. Yaptıkları çalışmalar sonucunda, opioid antagonistlerin bağlanma afinitelerindeki varyasyonların elektrostatik etkileşimlerden çok sterik etkileşimlerle baskın olduğunu göstermişlerdir. Bu yapı-etki ilişkileri gözlemleri, CoMFA modelleriyle birlikte δ , μ , ve κ opioid reseptörlerinin bağıl bağlanma afinitelerinin rasyonel tasarımlarında önem taşımaktadır (Peng ve ark., 2005).

Pajeva ve Wiese, fenotiyazin, tiyoksanten ve çoklu ilaç dirençliliğine sahip yapısal olarak benzer 40 adet bileşikten oluşan bir set üzerinde uyguladıkları CoMFA çalışmalarında 350'den fazla

model türetmiştir. Seçili atom çiftlerine veya alan uyumu çakıştırılmalarına dayalı olarak dört çakıştırma stratejisini karşılaştırmışlardır. Elde edilen tüm modeller istatistiksel açıdan önemli ve çoğunluğunun tahmin yeteneği yüksek bulunmuştur. Tüm alanların çoklu ilaç dirençliliğini geri döndürmede aktivitesine katkıda bulunduğu saptanmıştır. Hidrofobik alanlar, her durumda modellerin korelatif ve prediktif gücünü artırmıştır.

Genel olarak, CoMFA uygulamalarında, modellerin istatistiksel tahmin yeteneği ve araştırılan ilaç-ligant etkileşiminin fizikokimyasal açıdan yorumlanabilirliği önemli iki husustur. Yapılan çalışmada şans korelasyonlarının olasılığını minimuma indirmek için 3D korelasyonları etkileyecek olan CoMFA parametreleri de incelenmiştir. Standart CoMFA sterik ve elektrostatik alanlarıyla paralel olarak, altta yatan en iyi aktivite ilişkilerini bulabilmek amacıyla hidrofobik alanlar da incelemeye alınmıştır. En iyi korelasyonlar, hidrofobisitenin araştırılan çoklu ilaç dirençliliğini dönüştürücü aktivitedeki rolünü gösteren bu alanlarla bulunmuştur. Modellerle gelen grafiksel sonuçların analizi, yaygın olarak tanımlanan kritik alanlara (polisiklik halka sistemi ve N-süstitüe kısım) paralel olarak hidrofobisitenin moleküler profilinin bu ilaçların aktiviteleri için yapısal açıdan spesifik belirleyiciliğini ortaya çıkartmıştır. CoMFA modellerinde lipofilik alanların kullanıldığı araştırmaların sayısı az olmakla beraber, hidrofobisitenin şimdiye kadar gerçekten tam olarak anlaşılmadığı düşünülendiğünden çoğu durumda bu alanların yorumlanması nispeten zor olmaktadır. İlaç-membran etkileşimlerinin çoklu ilaç dirençliliğinin geri dönüşümünde aracılık ettikleri varsayıldığı bu özel durumda hidrofobisitenin temel bir rol oynadığı düşünülmektedir (Pajeva ve Wiese, 1998).

Jiang ve ark., peptidil inhibitörlerinin trombinle inhibisyon mekanizmasını moleküler modelleme, moleküler mekanik ve CoMFA istatistiksel analizi kullanarak ele almışlardır. Bağlanma konformasyonlarının aydınlatılması için BCSPL adında yeni bir işlem tanıtan grup, bu işlemi tripeptidil trombin inhibitörlerinin bir serisinin bağlanma konformerlerini elde etmek amacıyla kullanmıştır. Türetmiş konformerlerin enerjetik çalışmaları ve QSAR analizleri, söz konusu bileşiklerin hesaplanmış olan bağlanma enerjileriyle ve insan α -trombiniyle inhibitör aktiviteleri arasında bir korelasyona işaret etmiştir. BCSPL çakıştırmasına ait CoMFA analizi tatmin edici bir trombin modeli ile sonuçlanmıştır (Jiang ve ark., 1997).

1.1.4.2. Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizleri Yöntemi (CoMSIA)

Gerhard Klebe ve araştırma grubu tarafından 1994 yılında geliştirilmiş olan CoMSIA yöntemi, ortak bir hizaya (alignment) getirilmiş olan ilaç moleküllerinin benzerlik indislerine dayalı olarak özellik alanlarının hesaplarının hesaplanması için alternatif bir yaklaşımdır. Farklı fizikokimyasal özelliklerin alanları Gaussian-tipi uzaklık bağımlılığı (dependence) kullandığından atomik pozisyonlarda sorun yaşanmamaktadır. Bu nedenle, cutoff limitlerinin keyfi tanımlamalarıyla ve alanın farklı eğimlerinden kaynaklanan eksikliklerle de karşılaşılmamaktadır. Alanlar CoMFA formalizmine benzer bir PLS analizi ile değerlendirilmektedir.

Klebe ve grubunun çalışmasında, kortikosteroid bağlayan globuline bağlanan ve termolizin inhibitörü olan iki steroid veri seti, geleneksel CoMFA yöntemi (Lennard-Jones ve Coulomb potansiyel alanları) ile ve de Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizi (CoMFA) yöntemi ile analiz edilmiştir. Karşılaştırmalı istatistiksel önem modelleri elde edilmiş ve farklı modeller için alan katkı haritaları üretilmiştir. CoMFA alanlarındaki kesişimler nedeniyle ve de moleküler yüzeye yakın potansiyellerin dikliği nedeniyle, CoMFA haritaları parçalı ve ayrık bağlanmıştır. Bu durum, yorum yapılmasını zorlaştırmaktadır. CoMSIA yaklaşımıyla elde edilen haritaların yorumlanması ise daha kolaydır. CoMFA haritaları, bölgeleri, varsayılan bir çevre ile etkileşimlerin beklendiği moleküllerden ayrı olarak gösterirken, CoMSIA haritaları aktivite için önemli bir fizikokimyasal özellik gerektiren ligant iskeletlerinin bulunduğu alandaki bölgeleri işaret etmektedir. Yapılan çalışmada özellikle yeni bileşiklerin tasarımı söz konusu olduğunda önemli olan özelliklerin izlenmesinde CoMSIA yönteminin yol göstericiliğinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Klebe ve ark., 1994).

CoMSIA yöntemi, CoMFA yönteminde kullanılan sterik (S) ve elektrostatik (E) alanlara ek olarak hidrofobik (H) ve hidrojen bağı donörü (D) ve akseptörü (A) tanımlayıcılarını da net bir şekilde gösterir. Xu ve ark., yaptıkları bir çalışmada, CoMFA ve CoMSIA metodlarının tahmin güçlerini 20 moleküllük bir test setinden faydalanarak karşılaştırmışlardır. CoMFA ve CoMSIA metodlarının her ikisinin de iyi tahmin yetenekleri olduğu sonucuna varırken, PLS istatistiklerinin CoMSIA'nın daha iyi bir metot olduğuna işaret ettiğini de belirtmişlerdir (Thaimattam ve ark., 2004).

1.1.5. Farmakofor Analizi

İlaç tasarımında sık karşılaşılan, terapötik olarak söz konusu reseptörün üç boyutlu yapısı bilinmediği durumlarda, moleküler modelleme çalışmalarıyla, ligantların yapıları iyice karakterize edilir ve bazen biyolojik etkide rol oynayan konformasyonları kesin bir biçimde ortaya çıkartılmaktadır. Reseptörün yapısı daha sonra bu tür ligantlardan ortaya çıkartılabilmekte veya “haritalanabilmektedir”; böylelikle mevcut yapı-etki ilişkilerini rasyonelize etmek ve yeni ilaç adaylarını tasarlamak için kullanılabilir. Ligantların biyolojik aktiviteleri için gerekli olan temel fonksiyonel grupların bağlı yönlendirmeleri farmakoforu tanımlamaktadır. Bir farmakofor, yapısal olarak farklı ligantların ortak bir reseptöre bağlanmasına açıklama getirmektedir. Günümüzde, bazı bilgisayar programları (örneğin APEX, Catalyst ve DISCO), biyolojik aktiviteye bağlı olarak farmakofor hipotezi oluşturabilmektedirler (Cohen, 1996).

Günümüzde, ortak bir reseptör yöresine yapısal olarak farklı moleküllerin nasıl bağlanabildiğini çözmek, araştırmacılar için zorlu bir görev teşkil etmektedir. Yapısı bilinmeyen bir reseptör göz önüne alındığında, ligant setinin analizi bu moleküllerin hem aktif konformasyon seçimine, hem de birbirleriyle olan varsayılan hizalamalarına yüksek derecede bağlı olmaktadır. Moleküller farklı bileşik yapı sınıflarına ait olmalarına rağmen, özelliklerin ortak üç boyutlu düzenlenmesini içerebilmektedirler. Catalyst HipHop programı, spesifik bir terapötik alanda aktif olarak bilinen bir set bileşikten ortak özellik farmakofor modelleri oluşturmaktadır. Bu özellikler reseptöre bağlanma için gerekli olan karakteristikleri simüle eden geliştirilmiş fonksiyonlardan oluşmaktadır. Ortaya çıkartılan üç boyutlu konfigürasyon, diğer olası önder bileşik adaylarını saptamak amacıyla bir 3D veritabanını taramak için tarama sorgusu olarak kullanılabilir. Bu geliştirilmiş sorgular yardımıyla bir veritabanı taramasından getirilen bileşikler, eğer sorgu sadece topolojiye dayalıysa, sıklıkla yapısal olarak çeşitlidir. Catalyst HipHop programı, aktif moleküller için olası çakıştırmalar (alignment) önermek için de kullanılabilir. Bu, alana dayalı 3D-QSAR metodlarında anahtar basamaktır. Sonuç olarak, Catalyst HipHop programı sayesinde, bilinen bir aktiviteye sahip olan veya olmayan küçük bir bileşik setinden yola çıkarak bir projenin erken basamaklarında bir farmakofor oluşturulabilir. Oluşturulan farmakofor modeli, veya hipotez, yeni önder adaylarının keşfi için basamaklar halinde daha da optimize edilebilir.

Hirashima ve ark., 10 adet oktopamin (OA) agonistinden oluşan bir setten üç boyutlu farmakofor hipotezleri geliştirmiştir. Catalyst HipHop programıyla 10 ortak özellikli model ortaya konulmuştur. OA agonistleri üzerinde yapılmış olan bu çalışmalar molekülde lokalize bir HpAr, üç HpAl ve bir HBAl yörelerinin OA-agonist aktivite için temel olduğunu göstermiştir (Hirashima ve ark., 2002).

Tromelin ve Guichard, tat veren bileşikler ve β -lactoglobulin arasındaki etkileşimlerin doğasını açıklamak amacıyla Catalyst yazılımını kullanarak bir 3D-QSAR çalışması gerçekleştirmişlerdir. 35 bileşikten oluşan bir set üzerinden yapılan çalışmada set üç alt sete bölünmüştür. HypoGen yazılımı sayesinde, otomatikleştirilmiş hipotez oluşumuyla kayda değer bir afinite tahmini yapan bir model geliştirilmiştir. Sonuçlar, β -lactoglobulin aroma bağlanışında hem hidrofobik etkileşimlerin hem de hidrojen bağlarının kritik rolü olduğunu göstermiştir (Tromelin ve Guichard, 2003).

Krovat ve ark., LigandScout ve Catalyst yazılımlarını kullanarak insan Xa faktörüne bağlı inhibitörlerin temel farmakofor yapılarını saptamak amacıyla kimyasal özelliklere dayalı bir modelleme yaklaşımı uygulamışlardır. Ortaya çıkarttıkları kimyasal-özelliklere dayalı hipotezler WDI gibi ticari moleküler veritabanlarının sanal taramasında kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, Xa faktörü inhibitörleri ve proteinler arasındaki ilgili kimyasal etkileşimleri temsil eden ortak-özellik hipotezleri elde etmek amacıyla ligant yapısına dayalı bir moleküler modelleme yaklaşımı uygulamışlardır. Bir sonraki basamakta ise, bilinen inhibitörlerle benzer kimyasal ve uzaysal özelliklere sahip yeni bileşikler oluşturmak için sanal bir kombinatoryel kütüphane tasarlamışlardır. *De novo* olarak türetilmiş olan ve farmakofor kriterlerini yeterli seviyede yerine getirebilen bu moleküler iskeletler, aday bileşiklerin geliştirilmesi için umut verici niteliktedir (Krovat ve ark., 2005).

Deng ve ark., bir seri temsili HIV-1 integras (IN) konformasyonundan geliştirilmiş olan, IN aktif bölgesinin komplementer özelliklerini temsil eden dinamik ve reseptöre dayalı bir farmakofor modeli geliştirmiştir. Elde ettikleri sonuçlar, aktif inhibitörlerin %72'sinden fazlasının dinamik model olarak başarılı olarak tanımlanabileceğini göstermiştir. Statik farmakofor modellerinin çakıştırımıyla dinamik bir farmakofor modeli elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan örnekleme ve farmakofor modeli geliştirme metodları etkin bir şekilde kombine edilmiştir ve yapıya dayalı ilaç tasarımı için başka sistemlere de genişletilebilmektedir (Deng ve ark., 2005).

Catalyst/HipHop programı, bir grup bileşik üzerinden aktiviteleri göz önünde bulundurmaksızın, özelliklere dayalı bir çakıştırma yapmaktadır. İlaç etken maddesi adayı olan bileşiklere karşı bir molekülün kimyasal özelliklerini eşleştirmektedir. HipHop, moleküllerin konformasyonel modellerini ve bir seri kimyasal özelliklerinden yararlanarak çeşitli standart dosya formatlarında belirli moleküler çakıştırımlar üretmektedir. Bu işlem, bir set molekülde ortak olan özelliklerin konfigürasyonlarının tanımlanması ile başlamaktadır. Bir konfigürasyon 3D uzayda bir set bağlı lokasyonlardan ve buna bağlı özellik çeşitlerinden oluşmaktadır. Bir molekül belirli bir tolerans çerçevesinde ideal konumlardan çakıştırılabilecek yapısal özelliklere ve konformasyonlara sahipse konfigürasyonlarla eşleşir.

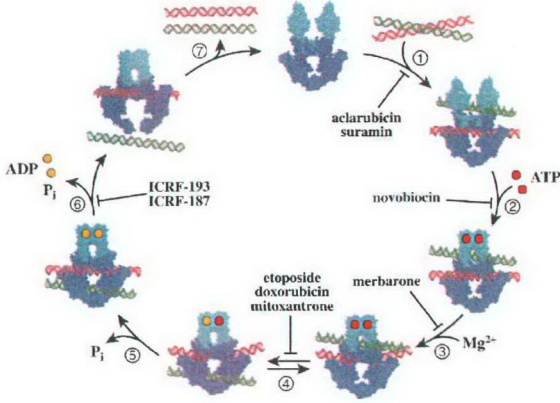
HipHop, üst üste çakıştırılacak setteki moleküllerin kısmi özelliklerini de haritalamaktadır. Bu, çakıştırma işlemi sırasında “kısmi haritalama” seçeneğini de beraberinde getirmektedir. Kısmi haritalama, farmakofor özelliklerinin hepsini haritalaması gerekmeyen bileşiklerin gözden kaçırılması riski olmaksızın daha büyük, daha çeşitli, daha belirgin hipotezlerin ve çakıştırma modellerinin tanımlanmasına izin vermektedir.

1.2. Enzim Saflaştırma

1980’lerden sonra topoizomerazlar klinik önemi olan birçok sitotoksik ilacın primer hedefi olarak büyük önem kazanmışlardır. Topoizomerazı hedef alan ilaçlar bakteriyel veya kanserli hücreleri benzersiz bir biçimde öldürmektedirler. Bu ilaçlar kinolonlar gibi yüksek etkinliği olan geniş spektrumlu antibakteriyellerden, etoposid gibi insan malinitelerinde oldukça yaygın kullanılan antikanser ajanlara kadar uzanmaktadırlar. Topoizomerazı hedef alan ilaçların etki mekanizmalarını anlamak ve daha efektif yeni ajanları yapı-etki ilişkisine dayanarak sentezlemek günümüzde büyük ilgi çeken bir araştırma sahası yaratmıştır (Bu süreçte enzim saflaştırma çalışmaları da ayrı bir önem kazanmıştır) (Pınar, 2005).

1.2.1 DNA Topoizomeraz II Enzimi Hakkında

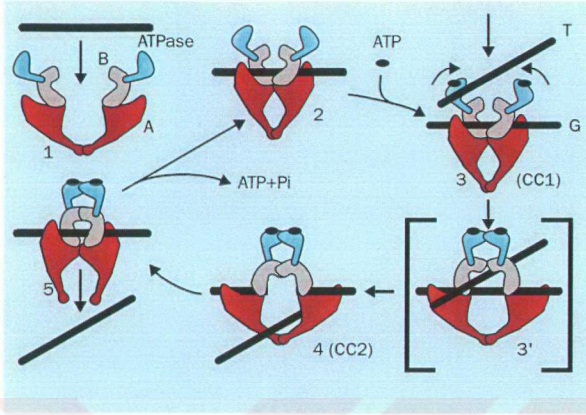
Bir çekirdek enzimi olan DNA Topoizomeraz II, göğüs, akciğer, prostat kanserleri, sarkomlar ve hematolojik malignitelerin tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçların majör hedefidir. Topoizomeraz II’yi hedef alan tüm ilaçlar enzimin katalitik döngüsüne en az bir basamakta müdahalede bulunmaktadır (Şekil 1.1.). Kovalan DNA Topoizomeraz II kompleksini geleneksel olarak stabilize edebilen ilaçlar “Topoizomeraz II zehirleri” olarak adlandırılmaktadırlar. Katalitik döngünün diğer basamaklarında rol alan ilaçlar ise “katalitik inhibitörler” olarak adlandırılmaktadır. Katalitik Topoizomeraz II inhibitörleri ise DNA ve Topoizomeraz II arasındaki bağlanmaya müdahale eden, nonkovalan DNA Topoizomeraz II komplekslerini (merbarone, ICRF-187 ve yapısal olarak benzer bisdiokopiperazin türevleri) stabilize eden, veya ATP bağlanmasını inhibe eden (novobiyosin) heterojen bir bileşik grubunu oluşturmaktadırlar. Topoizomeraz II zehirleri, Topoizomeraz II inhibitörlerinin şimdiye kadar klinikte en sık kullanılan sınıfını oluşturmaktadırlar. Topoizomeraz II zehirleri antitümör etkilerinden dolayı kullanılırlarken, katalitik inhibitörler antineoplastik (aclerubisin ve MST-16), kardiyoprotektör (ICRF-187), veya diğer ilaçların etkisini artıran (suramin ve novobiyosin) modülatör görevlerinden dolayı farklı amaçlar için kullanılabilir (Larsena ve ark., 2003).



Şekil 1.1. DNA Topoizomeraz II'nin katalitik döngüsü.

Şekil 1.1.'de, Topoizomeraz II'nin ATPaz bölgesi açık mavi ile, çekirdek bölgesi koyu mavi ile, aktif bölge tirozin rezidüsü ise kırmızı ile gösterilmiştir. Katalitik döngü, enzimin, G segmenti (kırmızı renkte gösterilmiştir) ve T segmenti (yeşil renkle gösterilmiştir) adı verilen iki çifte-iplik DNA segmentine bağlanması ile başlatılmaktadır. Bunu takiben, ATPaz bölgelerinin dimerizasyonunda iki ATP molekülü bağlanmaktadır (2. Basamak). G segmenti yarılr (3. Basamak), ve T segmenti bir ATP molekülünün hidroliziyle birlikte G segmentindeki kırık içerisinden geçirilir (4. Basamak). G segmenti daha sonra tekrar birleşir ve geriye kalan ATP molekülü de hidrolize olur (5. Basamak). İki ADP molekülünün disosiyasyonunu takiben T segmenti enzimin C-terminal kısmındaki açıklıktan geçirilir (6. Basamak) ve bu açıklık kapanır. En son olarak, N-terminal ATPaz bölgeleri tekrar açılır, böylelikle enzimin DNA'dan ayrılması mümkün olur.

Topoizomerazlar DNA'nın tersiyer yapısını, nükleotit sekansıyla belirlenmiş olan primer yapısını değiştirmeksizin modifiye (izomerize) edebilen enzimlerdir. Prokaryotlarda ve ökaryotlarda bu enzimlerin yüksek derecede korunmuş olması hücre biyolojisinde önemli bir role işaret etmektedir. İnsanlarda tip I ve tip II olmak üzere iki topoizomeraz sınıfı iyi bir şekilde karakterize edilmiştir. DNA'nın tüm fizyolojik fonksiyonları tersiyer konfigürasyonuna bağlıdır, ve bu nedenle DNA içeren tüm hücreler için topoizomeraz aktivitesi hayati önem taşımaktadır (şekil 1.1.). Yapısı çifte sarmal olduğundan dolayı, DNA bükümsel bir gerginlik altındadır. Replikasyon ve gen ekspresyonu işlemleri için DNA süpersarmalının polimerazlara veya transkripsiyon mekanizmasının bileşenlerinin girişine açık olması gerekmektedir. Bu değişim DNA topoizomerazların gevşeme ve dolaşık DNA ipliklerinin çözülmesi işlemlerini gerçekleştirmesini gerektirmektedir (Kellner ve ark., 2002).



Şekil 1.2. Topoizomeraz II'nin varsayılan yapısı ve katalitik döngüsü.

Şekil 1.2.'de gösterildiği üzere, bir DNA ipliği "G" (Gate) yarılırarak bir diğer DNA ipliği "T" (Transport) nin geçişine izin vermektedir. Enzim, bir ATPaz (üst), bir aralık (B) ve bir C-terminal (A) kısmı olmak üzere üç fonksiyonel segmentten oluşan bir homodimerdir. Topoizomeraz-II zehirleri DNA ipliğinin yarıldığı 3. veya 4. basamağı stabilize ederek etki göstermektedirler. Katalitik inhibitörler ya 1. (klorokin ve aklarubisin) ya da 5. (deksrazoksan gibi bisdioxopiperazinler) basamakta müdahalede bulunurlar.

Topoizomeraz II çifte-iplikli DNA'yı kesen ve tekrar birleştirebilen tek enzimdir. Bu enzim gen transkripsiyonu sırasında replikasyon çatalı ilerlerken akümüle olan DNA süpersarmalının gevşetilmesinde rol almaktadır. Topoizomeraz II'nin fonksiyonu genellikle homodimer formunda dimerizasyon gerektirmektedir. Bu enzimlerin ikisi de her iki DNA ipliğini kesen ve yeni DNA 5' ucuna kovalan olarak bağlanan ATP bağımlı endonükleaz ve ligazlardır. Katalitik faaliyet, enerjiden bağımsız bir endonükleik DNA kesimiyle ve 5' kovalan bağlantısıyla başlamaktadır (şekil 1.2.). Çifte iplik kesimi, disülfid bağlarının Topoizomeraz II dimerini köprülemesiyle sabitlenmektedir. ATP hidroliziyle, kesilmiş olan DNA çifte ipliği tekrar birleştirilir ve Topoizomeraz II dimeri böylelikle DNA'dan ayrılır. Bu faaliyet DNA metabolizmasının (transkripsiyon, replikasyon, kromozom kondensasyonu ve segregasyonu gibi) bazı basamaklarında neden Topoizomeraz II aktivitesine ihtiyaç olduğunu da açıklamaktadır. Topoizomeraz II, hücre biyolojisinde vazgeçilmez bir fonksiyona sahip olduğu için çok başarılı bir ilaç hedefidir (Kellner ve ark., 2002).

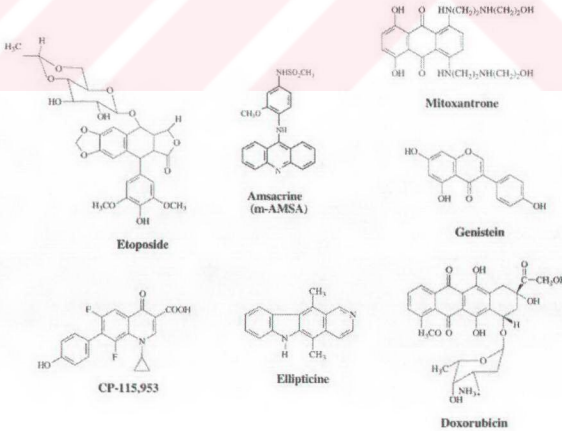
Topoizomeraz II zehirleri DNA'da kırıklar oluşturmak için, yarılmış kompleksi stabilize eden ilaçlar olarak tanımlanmaktadır (Tablo 1.2.). Zehir denilmelerinin sebebi bu temel çekirdek enzimini ölümcül bir zehire çevirmelerinden kaynaklanmaktadır. Topoizomeraz II katalitik inhibitörleri, Topoizomeraz II zehirlerinden farklı olarak DNA kırıklarının indüklemezler. Yarılmış kompleks haricinde enzimatik döngünün herhangi bir basamağında etki gösterirler (Şekil 1.2.). Topoizomeraz II'yi hedef alan ilaçlar, kanser kemoterapisinde daunorubisin'in 1964 yılında ilk kez tedaviye girişinden bu yana geniş çapta kullanılmaktadır (Kellner ve ark., 2002).

Topoizomeraz-2 inhibitörlerinin Sınıflandırımı

1. Topo-2 Zehirleri	VP-16, VM-26, VP-16 fosfoliste, TOP-53, NK-611 Doxorubicin, Epirubicin, Daunorubicin, Idarubicin, Pirarubicin Mitoxantrone CI-937, CI-941, CI-942 Bisantrone Ellipticine, 9-Hydroxyellipticine, 2-Methyl-9-hydroxyellipticine AMSA, CI-921 Amoufide Gemtatin
2. Topo-2 Katalitik Inhibitörleri	ICRF-159, ICRF-186, ICRF-187 Merbarone Fosmecin, Aclarbacin, Novobiocin
3. Topo-2 Dual Inhibitörleri	Inoplasticin, Actinomycin D
Topo-2/Topo-1 Inhibitörleri	

Tablo 1.2. Topoizomeraz II'yi hedef alan ilaçların sınıflandırılması.

Topoizomeraz II'yi hedef alan ilaçların sınıflandırımı Tablo 1.2.'de verilmiştir (Chena ve ark., 2001). Şekil 1.3.'te ise bazı topoizomeraz II inhibitörlerinin yapıları gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Bazı Topoizomeraz II inhibitörlerinin yapıları.

Bazı Topoizomeraz II inhibitörlerinin yapıları şekilde verilmiştir (Burden ve ark., 1998). Topoizomeraz II inhibe eden antineoplastik ajanlar günümüzde kanser terapisinde en efektif antineoplastik ilaçlar arasında yer almaktadır. Ancak bu ilaçlar belirgin toksisiteye sahiptir (Hande, 1998).

1.2.2. Topoizomerazların Saflaştırılmaları

J. C. Wang, 1971 yılında, "ω proteini" olarak isimlendirdiği DNA süpersarmallarını gevşeten proteini *E. coli*'den, 1000 kez saflaştırmıştır. *E. coli*, topoizomeraz izoenzimlerinin en çok saflaştırılıp incelendiği prokaryotik kaynak olmuştur. 70'li yıllarda *E. coli*'den DNA giraz ve Topoizomeraz I (Wang, 1971; Gellert ve ark., 1976) ve 80'li yıllara DNA Topoizomeraz III (Srivenugopal ve ark., 1984) saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir. Topoizomeraz I'in *D. melanogaster*'den (Javaherian ve ark., 1982) ve Topoizomeraz I ve II'nin *S. cerevisiae*'den saflaştırılması (Goto ve ark., 1984) ökaryotik kaynaklı enzim saflaştırma çalışmalarına örnek olarak gösterilebilir. Günümüzde, ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere insan kaynaklı topoizomerazlar da saflaştırılmakta (Holden ve ark., 1999; Boege ve ark., 1992) veya ticari olarak da elde edilebilmektedir.

Farklı antibakteriyel ve antikanser etkiye sahip birçok ilacın hedefi olarak önem kazanan topoizomerazlara karşı inhibitör etkilerin araştırılması yeni ilaç tasarım ve geliştirilmesi çalışmalarında yaygın bir yaklaşım halini almıştır (Burden ve Osheroff, 1998; Cho ve ark., 2000; Holden ve ark., 1999).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Tüm bilgisayarlı deneyler IRIX 6.5 işletim sistemine sahip bir Silicon Graphics O₂ iş istasyonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Veri setinden hipotez oluşturulması Accelrys Catalyst/HipHop (versiyon 4.9) kullanılarak yapılmıştır. Geometrik Optimizasyon, CoMFA ve CoMSIA çalışmaları ise Tripos SYBYL (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA) paket programı (7.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda molekül oluşturulması işlemi de SYBYL programında mevcut olan skeç tekniği ile yapılmıştır.

2.1. Geometrik Optimizasyon

SYBYL paket programıyla (versiyon 7.0) gerçekleştirilen minimizasyon işleminde Powell metodu seçilmiştir. Başlangıç optimizasyonu ise Simplex yöntemiyle yapılmıştır. Maksimum hesap basamağı sayısı 2000 olarak ayarlanmıştır. Kuvvet alanı olarak Tripos Güç Alanı seçilmiştir.

Minimizasyon işlemine ait ekran görüntüleri Şekil 2.1.'de verilmiştir.

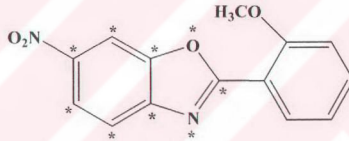


Şekil 2.1. (a) Sybyl 7.0 Minimizasyon Penceresi (b) Minimizasyon İşlem Detayları (c) Minimizasyon İşlemi Enerji Ayarları.

2.2. CoMFA Çalışması

Ökaryotik topoizomeraz inhibitörleri olarak etki gösteren bir seri benzazol üzerinde PLS uyumlu Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizleri (CoMFA) tekniği kullanılarak 3D-QSAR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 23 Bileşik kullanılarak yapılan bu çalışmada QSAR modeli 16 bileşiklik bir çalışma (training) serisi kullanılarak oluşturulmuştur. QSAR modelinin tahmin yeteneği 7 bileşiğin yer aldığı bir test serisinin yardımıyla değerlendirilmiştir.

Üç boyutlu yapıların oluşturulması ve tüm modelleme işlemleri SYBYL paket programı (versiyon 7.0) kullanılarak IRIX 6.5 işletim sistemine sahip Silicon Graphics iş istasyonunda gerçekleştirilmiştir. Geometri optimizasyonu MAXIMIN moleküler mekanik ve SYBYL içerisinde mevcut olan Tripos kuvvet alanları kullanılarak 0.05 kcal/(Å mol) seviyesinde birleşik kriter seti ile yapılmıştır. Çalışma (training) serisi moleküllerinin çakıştırılması işlemi SYBYL içerisinde dahili bulunan FlexS modülü ile gerçekleştirilmiştir. Aktif olduğu bilinen moleküllerden 1 nolu moleküle ait 2-fenilbenzoksazol halkasının Şekil 2.2. 'te gösterilen ağır atomları göz önünde bulundurularak çakıştırmada sabit atomlar belirlenmiştir.



Şekil 2.2. 1 nolu moleküle çakıştırma işleminde sabitlenen atomlar.

Her bir bileşik için hesaplanan tüm değerler Gasteiger yükleri ve valans ile doldurulmuştur. CoMFA modelleri 16 molekül kullanılarak 2.0'lık bir sütun filtreleme değeri (σ) ile hazırlanmıştır.

Topoizomeraz II inhibitörleri için CoMFA çalışmaları da Silicon Graphics iş istasyonu üzerinde SYBYL 7.0 moleküler modelleme programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu moleküllerin karşılaştırmalı moleküler alan analizleri, varsayılan değerler kullanılarak sterik ve elektrostatik alanlar üzerinden yürütülmüştür. Tüm yönlerde ızgaranın moleküler boyutları 4 Å genişliğinde olmasını garantiye almak amacıyla bu moleküllerin etrafında otomatik olarak 2 Å ızgara aralıklı üç boyutlu kübik bir kafes oluşturulmuştur. Analizi hızlandırmak için ve anlamsızlığı miktarını azaltmak için 2.0 kcal/mol düzeyinde eşik sütun filtrelemesi ayarlanmıştır. Sterik ve elektrostatik alanlar, her molekül için yükü 1 olan (SYBYL'de varsayılan prob atomu) sp^3 karbon atom probu yardımıyla ve sterik ve elektrostatik alanların her ikisi için de 30 kcal/mol enerji kesim (cut-off) değerleri kullanılarak ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Metodoloji gereği her bir ızgara düğümüne otomatik olarak bir prob atom yerleştirilmiştir ve moleküldeki her bir atomla olan sterik ve elektrostatik etkileşimleri CoMFA standart oranlama tekniği kullanılarak hesaplanmıştır.

Final analizde kullanılacak olan bileşenlerin optimum sayısını saptamak için başlangıç PLS analizi Leave-One-Out seçeneği (çapraz-validasyon) kullanılarak yapılmıştır.

PLS regresyon analizinde, standart sapması ≤ 2.0 kcal/mol olan CoMFA alanı örnek noktalarından meydana gelen bir altset kullanılmıştır. Sonuç olarak, daha önceden belirlenen bileşenlerin optimum sayısını kullanılarak çapraz-validasyon olmayan bir analiz gerçekleştirilmiştir ve CoMFA'nın sonucunu analizlemek için kullanılmıştır.

2.3. CoMSIA Çalışması

Üç boyutlu yapıların oluşturulması, modelleme işlemleri, geometri optimizasyonu ve çalışma (training) serisi moleküllerinin çakıştırılması işlemleri CoMFA çalışması sırasında SYBYL içerisinde dahili bulunan FlexS modülü ile gerçekleştirilmiştir.

PLS Çalışması:

SYBYL programında PLS çalışmasını gerçekleştirebilmek amacıyla mevcut bileşik tablosuna çakıştırma işleminden sonra bu bileşiklerle tablo oluşturulmuştur. Tabloya bileşiklerin IC_{50} olarak ele geçen aktiviteleri log 1/C şekline çevrilerek ilave edilmiştir. AutoFill seçeneğiyle CoMSIA komutundan default tüm deskriptörler seçilerek tabloya yerleştirilmiştir. Bu deskriptörler sırasıyla sterik (ST), elektrostatik (EL), hidrofobik, Hidrojen bağ donörü ve Hidrojen bağ akseptörü'dür.

Çalışma tablosunun bulunduğu QSAR menüsünden "Do PLS" komutu verilerek PLS hesap ayarlarına girilmiştir. PLS işlemini gerçekleştirmeden önce SAMPLS tekniği kullanılarak optimum bileşen sayısına karar verilmiştir. Bileşiklerin biyolojik aktivitelerine karşı bağımsız parametreler tek tek ve değişik kombinasyonlar şeklinde ele alınarak PLS çalışması yapılarak q^2 değerlerine bakılmış ve bu değerler Tablo 2.1.'te sunulmuştur.

Tablo 2.1. PLS analizinde kullanılan bileşenler ve ortaya çıkan q^2 değerleri.

Bileşenler	q^2 Değeri	Bileşen Sayısı
ST, EL	0.434	4
ST, HYD	0.614	4
ST, HDONOR	0.088	1
ST, HACC	0.236	3
EL, HYD	0.397	4
EL, HDONOR	0.292	3
EL, HACC	0.176	3
HYD, HDONOR	0.322	5
HYD, HACC	0.566	8
HDONOR, HACC	0.286	1
ST, EL, HYD	0.426	4
ST, EL, HDONOR	0.362	3
ST, EL, HACC	0.433	4
ST, HYD, HDONOR	0.478	6
ST, HYD, HACC	0.611	6
ST, HDONOR, HACC	0.317	1
EL, HYD, HDONOR	0.266	4
EL, HYD, HACC	0.323	5
HYD, HDONOR, HACC	0.256	4
ST, EL, HYD, HDONOR	0.352	5
ST, HYD, HDONOR, HACC	0.416	6
ST, EL, HDONOR, HACC	0.390	10
ST, EL, HYD, HACC	0.458	4
EL, HYD, HDONOR, HACC	0.312	4
ST, EL, HYD, HDONOR, HACC	0.396	4

Sırasıyla işaretlenen satırlar için birer kez daha no-validation komutuyla PLS işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.4. Farmakofor Analizi Çalışması

Farmakofor analizi çalışması için moleküller Catalyst programında bulunan dahili 2D/3D görselleştirici kullanılarak hazırlanmıştır. Catalyst programı, her bir bileşik için konformasyonel modelleri Poling Algoritması (Smellie, 1995) kullanarak otomatik bir şekilde oluşturmuştur. “En iyi konformer oluşturulması” işlemi global minimumdan 0-20 kcal/mol’lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için varsayılan olarak 250 seçilerek uygulanmıştır.

Oluşturulan konformasyonlar ortak moleküler özellikleri çakıştırmak ve farmakofor hipotezi oluşturmak için kullanılmıştır. HipHop programı, çalışılan setteki moleküllerde ortak olan ve kimyasal açıdan önem taşıyan fonksiyonel grupları çakıştıran konformasyonlardan yararlanmıştır. Bu çakıştırılan yapılar üzerinden farmakoforik bir hipotez ortaya konulmuştur.

Oluşturulan hipotezdeki özelliklerin hepsini haritalaması gerekmeyen molekül sayısı, yani "gözden kaçırılanlar" 3; oluşturulan hipotezdeki her bir özelliği haritalaması gerekmeyen maksimum molekül sayısı, yani "özellikten kaçanlar" 2; ve hipotezdeki herhangi bir özelliği haritalaması gerekmeyen moleküllerin sayısı, yani "tam kaçanlar" 2 olarak ayarlanmıştır.

2.5. Enzim Saflaştırma Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan topoizomera enzimi, *M. Tuberculosis*'e yakın benzerliği olan *M. phlei*'den izole edilmiştir. *M. phlei* üreme koşullarının optimizasyonu ve yüksek verimde bakteri elde edilebilmesi için beş besiyerinde, 37°C'de, durağan ve çalkalanarak olmak üzere bakterilerin üremeleri takip edilmiştir.

İlk saflaştırma çalışmaları hücrelerin homojenizasyonundan sonra amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE, fosföselüloz, hidroksiapatit, DNA selüloz kolon kromatografisi gibi yöntemlerden oluşmakta (Wang, 1971; Gellert ve ark., 1976; Baase ve ark., 1974; Bauer ve ark., 1977; Biersack ve ark., 1999), daha yakın zamanlarda yapılan çalışmalar ise bu klasik yöntemlere ek olarak FPLC, heparin agaroz, novobiosin agaroz afinite kromatografisi gibi daha modern yöntemleri de (Srivenuogopal ve ark., 1984; Boege ve ark., 1992) içermektedir.

2.6. Topoizomera Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Yöntemler

Aktivite elektroforetik olarak enzimin, plazmidin ve ATP'nin inhibitörlü veya inhibitörsüz karışımının inkübasyonundan sonra tayin edilmiştir. Inkübasyon sonrasında gevşemiş olan plazmid bandındaki artış kantitatif olarak tayin edilmiştir. İnhibitör etki için referans ilaç olarak etopozit kullanılmıştır.

Tip I topoizomera genel olarak benzer tepkime şartlarında optimum aktivite göstermektedirler. Prokaryotik tip I topoizomera Mg^{2+} bağımlıyken, ökaryotik tip I topoizomera Mg^{2+} 'ye gerek duymamaktadırlar. Tip I topoizomera için ATP gerekmez, ancak tip II topoizomera için Mg^{2+} ve ATP gereklidir. Bunun bir istisnası DNA girazın süper sarmalı

gevşetme tepkimesidir (Stewart ve Champoux, 2001). Gevşeme tepkimesi için ökaryotik Topoizomeraz II, Mg^{2+} ve ATP'ye gerek duyarken, DNA girazın bu tepkimeyi katalizlemesi için sadece Mg^{2+} gerekir (ATP gerekmez). DNA girazın gevşetme aktivitesi, süper sarmal oluşturma aktivitesinden 20-40 defa daha azdır. Ökaryotlardan enzim saflaştırma sırasında gevşeme reaksiyonundan faydalanılmaktadır. Ökaryotik tip I ve tip II topoizomerazlar birlikte saflaştırılmış ise gevşeme tepkimesi ATP varken ve yokken yapılır. Böylece ATP bağımlı Topoizomeraz II aktivitesi ATP-bağımsız Topoizomeraz I aktivitesinden ayrılabilir (Pınar, 2005). Topoizomeraz aktivite çalışmalarında kullanılan iki reaksiyon daha vardır: 1) düğümleme/düğüm çözme ve 2) zincir oluşturma/zincir açma reaksiyonları. Bu yöntemler, ökaryotik Topoizomeraz II için kullanılmaktadır (Barrett ve ark., 1990).

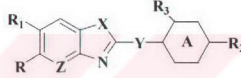
Süpersarmalın gevşetilmesi tepkimesinde genellikle substrat olarak süpersarmal pBR322 kullanılır. Bu reaksiyon, tip I ve II topoizomerazların aktivelerini incelemek için kullanılabilir (Fortune ve Osheroff, 2001). Süper sarmal substrat ve onun gevşemiş ürünü, etidyum bromür ile agaroz jel üzerinde gösterilebilmektedir. Gevşeyen her topolojik izomer süper sarmal DNA'dan kademeli olarak daha yavaş ilerler (Bjornsti ve Megonigal, 1999). Oluşan topoizomerler HPLC ile de ölçülebilmektedir (Onishi ve ark., 1993). Etidyum bromürün, DNA ile bağlandığında floresans kompleks oluşturmamasından yararlanılarak, zamana karşı floresans veren değişimi ile enzim aktivitesinin izlenmesi de mümkün olmaktadır.

3. BULGULAR

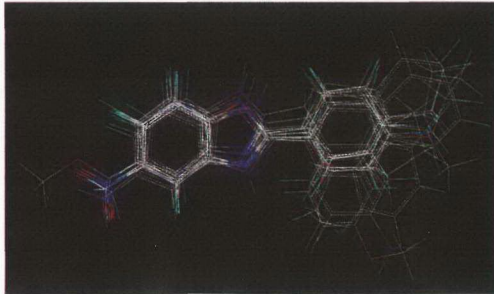
3.1. CoMFA Çalışması

Benzoksazol, benzimidazol ve oksazolo(4,5-b)piridin türevleri olan (Tablo 3.1.) 16 benzazol bileşiminden oluşan bir çalışma (training) serisi kullanılarak gerçekleştirilen CoMFA çalışmasında *in vitro* aktivite log 1/C değerleri bağımlı değişken olarak kullanılmıştır. 16 bileşimin CoMFA analizinin istatistiksel parametreleri, Tablo 3.2.'de özetlenmiştir. Çalışma setini oluşturan bileşiklerin üst üste çakıştırılmış görüntüleri Şekil 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışma (training) serisinde kullanılan moleküllerin yapıları ve biyolojik aktiviteleri.



Bileşik	Z	X	Y	A	R	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (µM)
1	-CH=	O	-	Fenil	H	NO ₂	H	OCH ₃	17.0
2	-CH=	O	-	Fenil	NH ₂	H	C ₂ H ₅	H	115.5
3	-CH=	O	-	Fenil	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	44.4
4	-CH=	O	-	Fenil	NO ₂	H	H	H	32.4
5	-CH=	O	-	Fenil	CH ₃	H	NHCH ₃	H	128.4
6	-CH=	O	-	Fenil	NO ₂	H	OC ₂ H ₅	H	22.4
7	-N=	O	-	Fenil	H	H	C ₂ H ₅	H	45.6
8	-N=	O	-	Fenil	H	H	Cl	H	119.5
9	-N=	O	-	Fenil	H	H	CH ₃	H	91.2
10	-CH=	O	CH ₂	Fenil	H	H	OCH ₃	H	86.6
11	-CH=	NH	CH ₂	Fenil	CH ₃	H	NH ₂	H	46.8
12	-CH=	NH	CH ₂ S	Fenil	CH ₃	H	H	H	27.4
13	-CH=	NH	CH ₂ S	Fenil	COOCH ₃	H	H	H	17.0
14	-CH=	NH	CH ₂ O	Fenil	NO ₂	H	H	H	28.4
15	-CH=	O	-	Sikloheksil	Cl	NO ₂	H	H	101.9
16	-CH=	NH	C ₂ H ₅	Siklopentil	H	H	H	H	216.6



Şekil 3.1. Topoizomeraz II inhibitörleri çalışma (training) setinin çakıştırımı.

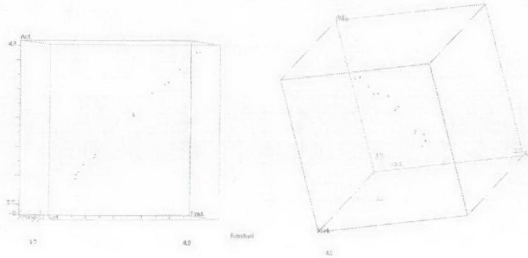
Tablo 3.2. CoMFA 3D-QSAR Modelinin PLS İstatistikleri.

PLS İstatistikleri	CoMFA
q^2 (Modelin Leave-One-Out çapraz-validasyon tahmin gücü)	0.435
r^2 (PLS analizinin korelasyon katsayısının karesi)	0.997
N (Çapraz-validasyon PLS analizinden elde edilen optimum bileşen sayısı ve son çapraz-validasyon olmayan analizde kullanılanı aynı)	5
X (Sütun filtrelemesi 2.0 kcal/mol yapıldıktan sonra PLS'e giren deskriptör sayısı)	208
SEE (Tahminin standart hatası)	0.024
F Değeri ($F_{(5, 10, 0.05)}$)	597.602
F Tablo Değeri:	3.33
Alan Katkısı (CoMFA'dan Sterik ve Elektrostatik Alanlar)	
Sterik	%32.2
Elektrostatik	%67.8

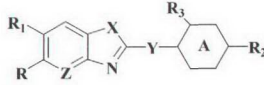
En iyi modelin Leave-One-Out (LOO) çapraz-validasyon PLS analizi, modelin Topoizomerez II inhibitör etkinliğinin tahmininde yararlı bir araç olduğuna işaret eden 0.435 çapraz-validasyon (q^2) değerini vermiştir. Hesaplanan ve deneysel olarak bulunan aktiviteler arasındaki 0.024 standart hatalı 0.997 değerindeki çapraz-validasyon olmayan (r^2) korelasyon katsayısı, analizlenen sonuçların % 99.7 oranında deneysel sonuçlarla uyumluluğunu göstermektedir.

Sterik ve elektrostatik alanların bağlı katkıları sırasıyla %32.2 ve %67.8 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar elektrostatik alanın daha predominant olduğunu göstermektedir.

Çalışma (training) serisinin en iyi modelinin gerçek ve hesaplanan log 1/C değerleri Tablo 3.4.'te verilmiştir. Gözlenen ve hesaplanan Topoizomerez II aktivitelerin grafiği Şekil 3.2.'de sunulmuştur. 3D-QSAR modeli, model oluşturma aşamasında kullanılmayan ve Tablo 3.3.'te gösterilen, 7 bileşik içeren bir test serisi kullanılarak valide edilmiştir.

**Şekil 3.2.** CoMFA'daki çalışma (training) set moleküllerinin gözlenen aktiviteye karşı hesaplanan aktivitelerin farklı açılardan grafiksel görüntüsü (aktivite log 1/C olarak ifade edilmiştir).

Tablo 3.3. Test serisinde kullanılan moleküllerin yapıları ve biyolojik aktiviteleri.



Bileşik	Z	X	Y	A	R	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀
17	-CH=	O	-	Fenil	H	CH ₃	H	F	433.2
18	-CH=	O	-	Fenil	H	CH ₃	H	NO ₂	18.8
19	-CH=	O	-	Fenil	CH ₃	H	H	OCH ₃	433.0
20	-N=	O	-	Fenil	H	H	C(CH ₃) ₃	H	108.3
21	-CH=	O	CH ₂	Fenil	CH ₃	H	CH ₃	H	101.9
22	-CH=	S	CH ₂ O	Fenil	H	H	H	H	11.4
23	-CH=	NH	CH ₂	Sikloheksil	Cl	H	H	H	308.1

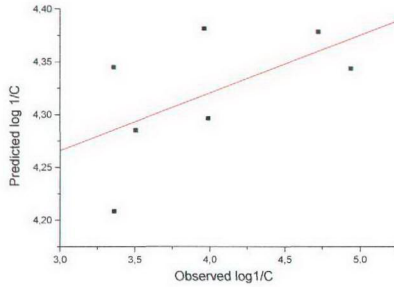
CoMFA 3D-QSAR modelinin PLS istatistiklerine dayanarak, test serisinin rezidüel değerleriyle ek bir validasyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. CoMFA Modelinde test seti bileşiklerinin gerçek ve hesaplanan biyolojik aktiviteleri ve farkları. (rezidüel değerleri)

Bileşik	Topoisomerez II İnhibisyonu Gözlenen Aktivitesi ^a	CoMFA ile Hesaplanan Aktivite	Fark
17	3.363	4.3445	-0,982
18	4.726	4.378	0,348
19	3.364	4.208	-0,844
20	3.965	4.381	-0,416
21	3.992	4.296	-0,304
22	4.943	4.343	0,6
23	3.511	4.285	-0,774

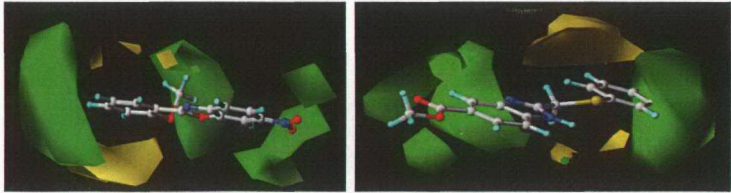
^a Topoisomerez II inhibisyon aktivitesi log (1/C) olarak ifade edilmiştir.

Şekil 3.3., CoMFA 3D-QSAR modeli test serisinin gerçek log 1/C değerlerine karşı gözlenen log 1/C değerlerini göstermektedir.



Şekil 3.3. CoMFA 3D-QSAR test seti moleküllerinin gözlenen log 1/C değerlerine karşı hesaplanan log 1/C değerlerinin grafiği.

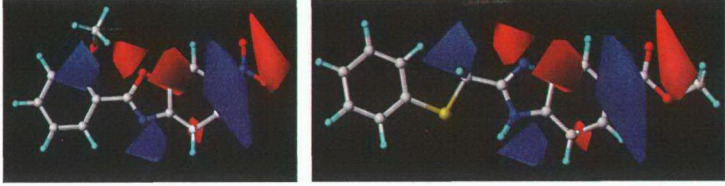
Topoizomerez II inhibitörleri için 1. ve 13. bileşikler referans alınarak gerçekleştirilen CoMFA çalışmasının grafiksel temsilleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir. Yeşil alanlar sterik etkinin biyolojik aktiviteyi artırdığı alanlara, sarı alanlar ise sterik etkinin biyolojik aktiviteyi düşürdüğü bölgelere işaret etmektedir. Mavi renkli alanlar elektropozitif grupların, kırmızı alanlar ise elektronegatif grupların Topoizomerez II inhibitör aktiviteyi yükselttiği alanları göstermektedir. Topoizomerez II'ye karşı inhibisyonu artırmaya yardımcı olan, sterik etkinin istendiği iki önemli yeşil alan bulunmaktadır. Şekil 3.4.'te görüldüğü üzere, bunlardan birisi üstte, diğeri ise sol taraftadır. 2-fenil-5-nitro benzoksazol'ün orto konumunda bulunan ve hacimli bir sübtütüent olan metoksi grubu, üstte bulunan yeşil kontüre oturmaktadır (Şekil 3.4., ilk resim). Bileşik 13 için benzimidazolün ikinci konumundan sübtütüe fenil grubunun hem meta hem de para konumları soldaki yeşil kontüre oturmaktadır. (Şekil 3.4., ikinci resim). Buna ek olarak, yüksek aktiviteye sahip 6. bileşiğin etoksi grubu ve 12. bileşiğin fenil grubu, 13. bileşik gibi yeşil kontüre oturmaktadır.



Şekil 3.4. 1 ve 13 bileşiklerine CoMFA stdev*coeff. sterik alanları; yeşil alanlar geniş hacimli grupların aktiviteyi artırdığı bölgelere, sarı alanlar ise geniş hacimli grupların aktiviteyi düşürdüğü bölgelere işaret etmektedir.

Şekil 3.5.'te verilen elektrostatik kontür haritasında R konumuna denk gelen kırmızı polihedral alan elektronca zengin grupların aktiviteye katkıda bulunduğuna işaret etmektedir. 1 Nolu bileşiğin

nitro grubu ve 13 numaralı bileşiğin ester grubu aktiviteyi artıran bir şekilde kırmızı bölgeye oturmaktadır. Buna ek olarak, kırmızı alanlar 4, 6, 14 ve 15 nolu bileşiklerin benzazol halkalarındaki R pozisyonuna denk gelmektedir.

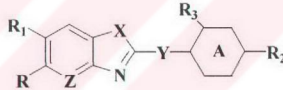


Şekil 3.5. 1 ve 13 numaralı bileşiklerle CoMFA stdev*coeff. elektrostatik alan plotları; mavi alanlar pozitif grupların aktiviteyi artırdığı bölgelere, kırmızı alanlar ise negatif yükün aktiviteyi artırdığı bölgelere işaret etmektedir.

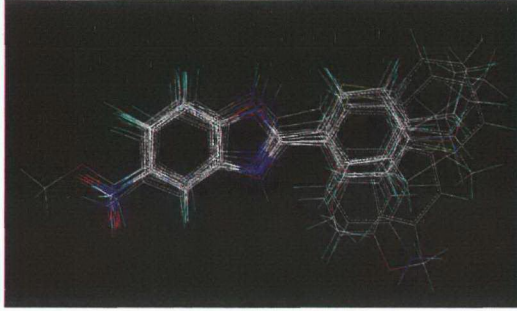
3.2. CoMSIA Çalışması

Etkili bileşiklerden 1 numaralı bileşik referans bileşik olarak seçilmiştir. Çalışma (training) serisinde kullanılan moleküllerin yapıları ve biyolojik aktiviteleri Tablo 3.5.'te verilmiştir.

Tablo 3.5. Çalışma (training) serisinde kullanılan moleküllerin yapıları ve biyolojik aktiviteleri.



Bileşik	Z	X	Y	A	R	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (µM)
1	-CH=	O	-	Fenil	H	NO ₂	H	OCH ₃	17.0
2	-CH=	O	-	Fenil	NH ₂	H	C ₂ H ₅	H	115.5
3	-CH=	O	-	Fenil	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	44.4
4	-CH=	O	-	Fenil	NO ₂	H	H	H	32.4
5	-CH=	O	-	Fenil	CH ₃	H	NHCH ₃	H	128.4
6	-CH=	O	-	Fenil	NO ₂	H	OC ₂ H ₅	H	22.4
7	-N=	O	-	Fenil	H	H	C ₂ H ₅	H	45.6
8	-N=	O	-	Fenil	H	H	Cl	H	119.5
9	-N=	O	-	Fenil	H	H	CH ₃	H	91.2
10	-CH=	O	CH ₂	Fenil	H	H	OCH ₃	H	86.6
11	-CH=	NH	CH ₂	Fenil	CH ₃	H	NH ₂	H	46.8
12	-CH=	NH	CH ₂ S	Fenil	CH ₃	H	H	H	27.4
13	-CH=	NH	CH ₂ S	Fenil	COOCH ₃	H	H	H	17.0
14	-CH=	NH	CH ₂ O	Fenil	NO ₂	H	H	H	28.4
15	-CH=	O	-	Sikloheksil	Cl	NO ₂	H	H	101.9
16	-CH=	NH	C ₇ H ₄	Siklopentil	H	H	H	H	216.6



Şekil 3.6. Topoizomeraz II İnhibitörleri çalışma (training) setinin çakıştırımı.

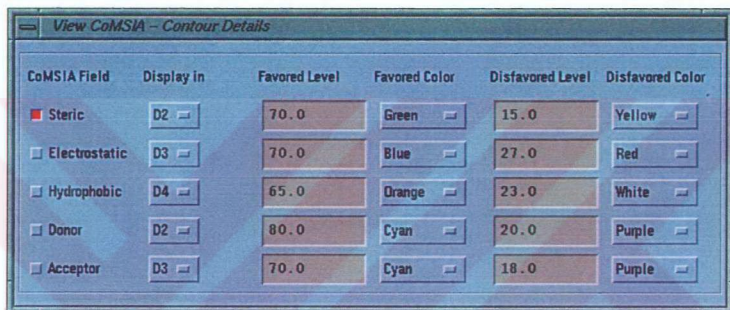
Tablo 3.6. CoMSIA Çalışması için Partial Least Squares Analizi Detayları

PLS İstatistikleri	CoMSIA
q^2 (Modelin Leave-One-Out çapraz-validasyon tahmin gücü)	0.391
r^2 (PLS analizinin korelasyon katsayısının karesi)	0.997
N (Çapraz-validasyon PLS analizinden elde edilen optimum bileşen sayısı ve son çapraz-validasyon olmayan analizde kullanılanı aynı)	4
X (Sütun filtrelemesi 2.0 kcal/mol yapıldıktan sonra PLS'e giren deskriptör sayısı)	356
SEE (Tahminin standart hatası)	0.097
F Değeri ($F_{(4, 11, 0.05)}$)	44.838
F Tablo Değeri : ($F_{(4, 11, 0.05)}$)	3.36
Alan Katkısı (CoMSIA Alanları)	
Sterik	%10.4
Elektrostatik	%46.3
Hidrofobik	%16.1
Hidrojen Bağı Akseptörü	%27.3

View menüsünden QSAR > CoMSIA penceresi açıldıktan sonra, alan ayarlarını değiştirmek üzere "Show Contour Details" komutu verilmiştir. Alan detayları penceresi Şekil 3.7.'de sunulmuştur. İstenen ve istenmeyen özellikleri gösterecek olan alanların temsilleri için renkler belirlenmiştir. Özellikleri temsil eden renkler Tablo 3.7.'de verilmiştir.

Tablo 3.7. CoMSIA alan haritalarında kullanılmak üzere istenilen ve istenmeyen özellikleri temsil eden renklerin seçimi.

Özellik	Renk	
	İstenilen	İstenmeyen
Akseptör	Turkuaz	Mor
Hidrofobik	Turuncu	Beyaz
Sterik	Yeşil	Sarı
Elektrostatik	Mavi	Kırmızı



Şekil 3.7. View CoMSIA – Alan Detayları penceresi.

CoMSIA çalışmasında donör özellik dışında diğer özelliklerin tamamı kullanılmıştır.

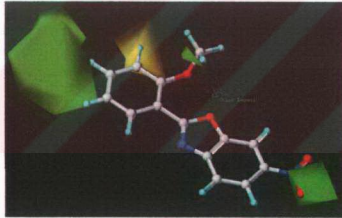
CoMSIA ile Aktivite Tayini

Bu çalışmada seçilen eşitliği valide etmek üzere rastgele seçilen bileşiklerden test serisi oluşturulmuştur. Test serisi aynı zamanda CoMFA çalışması için de kullanılmıştır. Test serisini oluşturan bileşikler moleküler çalışma alanına getirilmiştir. QSAR menüsünden seçilen “Predict Property” komutu ile moleküllerin CoMSIA değerlerinin hesaplaması gerçekleştirilmiştir. Değerler, Tablo 3.8.’de verilmiştir.

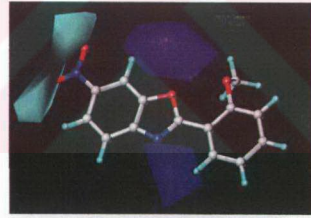
Tablo 3.8. Test serisi bileşikleri ile CoMSIA çalışmasından elde edilen aktivite tahminleri.

Bileşik	Topoizomeraz II İnhibitör Gözlenen Etki	CoMSIA - Hesaplanan Aktivite	Fark - CoMSIA
17	3.363	4.325	-0,962
18	4.726	4.243	0,483
19	3.364	4.100	-0,736
20	3.965	4.290	-0,325
21	3.992	4.172	-0,18
22	4.943	4.220	0,723
23	3.511	4.154	-0,643

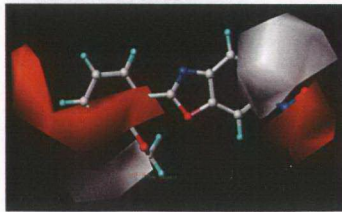
Topoizomeraz II inhibitörleri için 1 ve 13. bileşikler referans alarak gerçekleştirilen CoMSIA çalışmasına ait grafiksel temsiller 3.8, 3.9, 3.10 ve 3.11'de sunulmuştur. Şekillerde yer alan yeşil renkli alanlar sterik etkinin biyolojik aktiviteyi olumlu etkilediği alanlara, sarı renkli alanlar ise sterik etkinin biyolojik aktiviteyi düşürdüğü alanlara işaret etmektedir. Turkuaz renkli alanlar hidrojen bağı akseptörü olan grupların istenildiği, mor renkli alanlar ise hidrojen bağı olan grupların biyolojik aktiviteyi düşüreceği alanları temsil etmektedir. Turuncu renkli alanlar aktivite için hidrofobik grupların istenildiği alanları; mavi renkli alanlar ise elektropozitif grupların aktiviteyi yükselttiği alanlara işaret etmektedir.



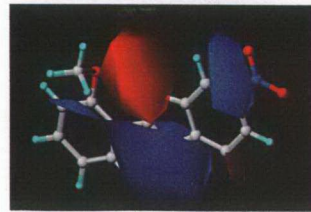
Sterik



Hidrojen Bağı Akseptörü



Hidrofobik

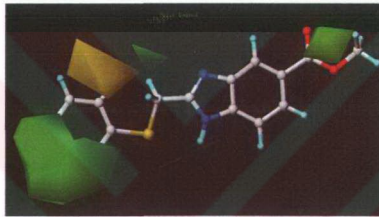


Elektrostatik

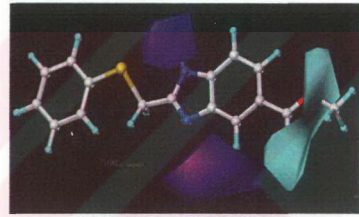
Şekil 3.8. 1 nolu bileşiğe ait sterik, hidrojen bağı akseptörü, hidrofobik ve elektrostatik özelliklerin CoMSIA çalışmasıyla elde edilen grafikleri.

Şekil 3.8'de 1 nolu bileşiğe ait 2. konumdaki fenil sübstitleniminin turuncu renkle gösterilen hidrofobik grupların biyolojik etkiyi yükselttiği bölgeye oturduğu gözlenmektedir. Aynı bileşiğe ait nitro grubunun turkuazla gösterilen yöreye uyumu göze çarpmaktadır. Nitro grubunun hidrojen bağı akseptörü olması, ve bu yöreye uyumu, bileşiğin aktif oluşuna da bir açıklama getirmektedir.

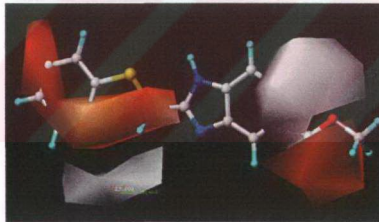
Şekil 3.9.'da, aktif bir bileşik olan 13 numaralı bileşiğin fenil grubunun ve ester grubunun yeşil bölgeye net bir şekilde oturduğu görülmektedir. Bu durum, reseptör üzerinde o bölgelerde bir cep olduğunu, ve bileşikte hacimli bir grubun varlığının aktiviteyi artıracağını göstermektedir. Fenil grubu, turuncu ile gösterilen ve hidrofobik bir grubun istendiği bölgeye de uyum göstermektedir. Bileşiğin ester grubunun da hidrojen bağı akseptörü olan ve turkuazla gösterilen bölgeye oturduğu görülmektedir.



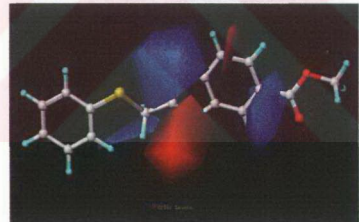
Sterik



Hidrojen Bağı Akseptör



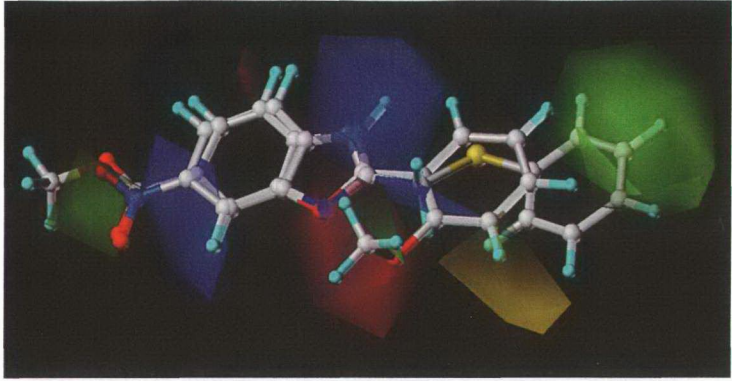
Hidrofobik



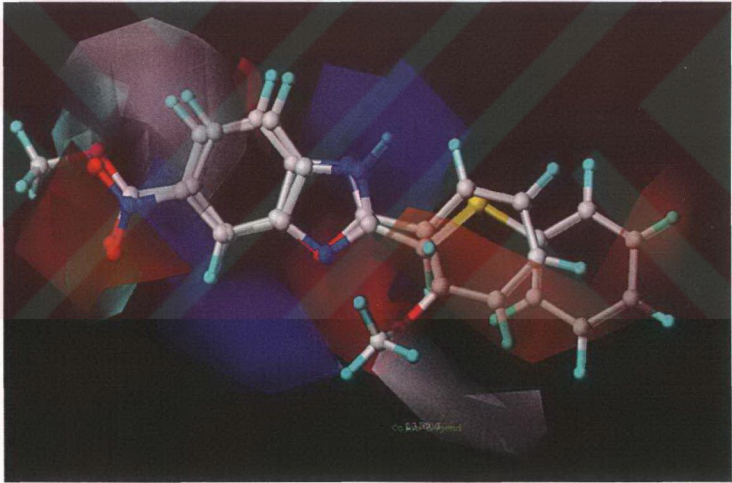
Elektrostatik

Şekil 3.9. 13 numaralı bileşiğin sterik, hidrojen bağı akseptörü, hidrofobik ve elektrostatik özelliklerinin grafikleri. Ester grubu akseptör özelliklerin gösterildiği grafikte turkuaz renkli bölgenin içerisinde görülmektedir.

Şekil 3.10.'da, 1 ve 13 numaralı bileşiklerin sterik ve elektrostatik özelliklere ait; Şekil 3.11.'te ise elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağı akseptör özelliklere ait CoMFA modellerine uyumları birarada verilmiştir. Yörelere transparan temsili, moleküllerin ve çakışmalarının daha net olarak görülmesine imkan sağlamakta, uyumlarının karşılaştırılmasını da kolaylaştırmaktadır. Her iki molekülün de alanlara benzer bir şekilde uyum sağladığı görülmektedir.



Şekil 3.10. 1 ve 13 numaralı bileşikler bir aradayken sterik ve elektrostatik özelliklerin transparan temsili.



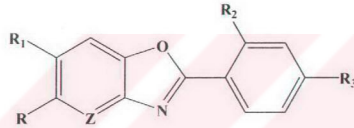
Şekil 3.11. 1 ve 13 numaralı bileşikler bir aradayken elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağı akseptör özelliklerin transparan temsili.

3.3. Farmakofor Analizi Çalışması

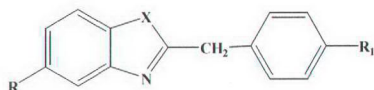
Bu çalışmada ökaryotik Topoizomerez II inhibisyonundan sorumlu 7 aktif bileşik içeren bir sete dayalı olarak üç boyutlu farmakofor hipotezleri oluşturulmuştur.

Tablo 3.9.'da görüldüğü gibi, 28 adet benzoksazol, benzimidazol, benzotiyazol ve oksazolopiridin türevleri gibi bazı yeni birleşik heterosiklik bileşiklerin ökaryotik Topoizomerez II üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir.

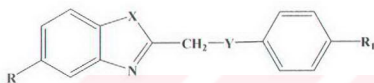
Tablo 3.9. Ökaryotik DNA Topoizomerez II İnhibitör Aktivite için test edilmiş olan bileşiklerin çalışma (training) seti.



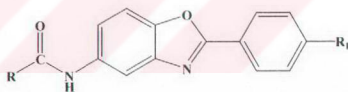
Bileşikler	R	R ₁	R ₂	R ₃	Z	IC ₅₀ (µM)
Ia	-H	-NO ₂	-OCH ₃	-H	-CH=	17.0
Ib	-H	-CH ₃	-F	-H	-CH=	433.2
Ic	-H	-CH ₃	-NO ₂	-H	-CH=	18.8
Id	-NH ₂	-H	-H	-C ₂ H ₅	-CH=	115.5
Ie	-CH ₃	-H	-CH ₃	-CH ₃	-CH=	44.4
If	-Cl	-H	-H	-C ₂ H ₅	-CH=	NE
Ig	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-CH=	433.0
Ih	-NO ₂	-H	-H	-H	-CH=	32.4
Ii	-Cl	-H	-H	-Cl	-CH=	NE
Ij	-CH ₃	-H	-H	-NHCH ₃	-CH=	128.4
Ik	-NO ₂	-H	-H	-OC ₂ H ₅	-CH=	22.4
Il	-H	-H	-H	-C ₂ H ₅	-N=	45.6
Im	-H	-H	-H	-Cl	-N=	119.5
In	-H	-H	-H	-C(CH ₃) ₃	-N=	18.3
Ip	-H	-H	-H	-CH ₃	-N=	91.2



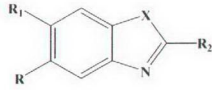
Bileşikler	R	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)
2a	-NO ₂	-Br	-O-	NE
2b	-H	-OCH ₃	-O-	86.6
2c	-CH ₃	-NO ₂	-NH-	NE
2d	-CH ₃	-CH ₃	-NH-	101.9
2e	-CH ₃	-NH ₂	-NH-	46.8



Bileşikler	R	R ₁	X	Y	IC ₅₀ (μM)
3a	-H	-Cl	-S-	-O-	NE
3b	-CH ₃	-H	-NH-	-S-	27.4
3c	-COOCH ₃	-H	-NH-	-S-	17.0
3d	-H	-H	-NH-	-CH ₂ -	NE
3e	-NO ₂	-H	-NH-	-O-	24.8
3f	-H	-H	-S-	-O-	11.4



Bileşikler	R	R ₁	IC ₅₀ (μM)
4a		-H	24.1
4b		-C ₂ H ₅	315.1
4c		-F	206.9
4d		-H	420.1
4e		-F	420.1



Bileşikler	R	R ₁	R ₂	X	IC ₅₀ (μM)
5a	-H	-CH ₃		-O-	NE
5b	-Cl	-NO ₂		-O-	101.9
5c	-H	-H		-O-	NE
5d	-Cl	-H		-NH-	308.1
5e	-H	-H		-NH-	216.6
5f	-Cl	-H		-NH-	NE
ETOPOZİT	-	-	-	-	21.8

Topoizomeraz II inhibitörlerinin spesifikliğini açıklamak üzere hipotezler oluşturulmuştur. Hedef çalışma (training) serisi olarak 7 molekülük bir seri seçilmiştir. Çalışma (training) serisindeki 7 molekülün içerisinde hipotezi kısmı olarak haritalamasına izin verilen 3f bileşiği referans olarak seçilmiştir (Tablo 3.10.).

Tablo 3.10. Uygulanan Ortak Özellik Hipotezinin Karakteristikleri.

Bileşikler	Confs ^a	Features/Confs ^a	Principal ^b	MaxOmitFeat ^c
1a	16	12.94	1	2
1c	6	13.00	1	2
3b	24	11.33	1	2
3c	45	14.07	1	2
3e	16	12.00	1	2
3f	11	11.55	2	0
4a	18	14.50	1	2

Bu sınıflandırmanın dışında, moleküllerin aktiviteleri analizde kullanılmamıştır. HipHop, moleküllerin tek başlarına hipoteze olan uyumlarıyla molekülün aktivitesi arasında korelasyon kurmaya imkan sağlayan hipotezler oluşturmaktadır.

3D-Hipotez çalışması Catalyst (versiyon 4.9) paket programı ile yapılmıştır. Hazırlık aşaması testi hidrojen bağı akseptörü (HBA), hidrofobik (Hp) ve aromatik halka (R) özellikleri ile yapılmıştır (Greene ve ark., 1994). Hipotezlerin HBA ve Hp ile iyi bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Oluşturulan 10 hipoteze ait karakteristikler 3 numaralı tabloda listelenmiştir.

Tablo 3.11. Uygulanan Ortak Özellik Hipotezinin Sonuçları.

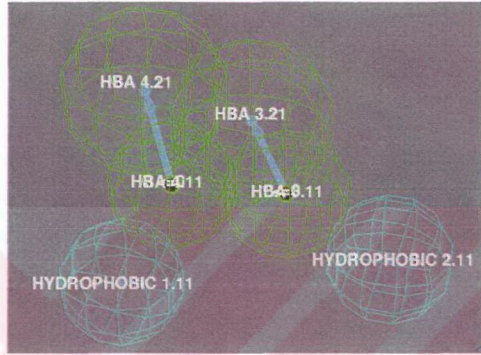
Hipotez No	Fonksiyon ^a	Sıralama Skoru	Direkt Hit ^b	Kısmi Hit ^b
1	r(Hp Hp HBA HBA)	48.3931	1111111	0000000
2	g(Hp Hp HBA HBA)	48.3489	1111111	0000000
3	h(Hp Hp HBA HBA)	47.0964	1111111	0000000
4	j(R Hp HBA HBA)	45.1632	1101110	0010001
5	k(R Hp HBA HBA)	44.9256	1101110	0010001
6	p(R Hp HBA HBA)	41.6595	1101110	0010001
7	r(R Hp HBA HBA)	41.0508	1101110	0010001
8	s(R Hp HBA HBA)	40.9759	1101110	0010001
9	t(R Hp HBA HBA)	40.4197	1101110	0010001
10	u(R Hp HBA)	39.5094	1111111	0000000

^a Hp, Hidrofobik; HBA, Hidrojen bağı akseptörü; R, Aromatik Halka

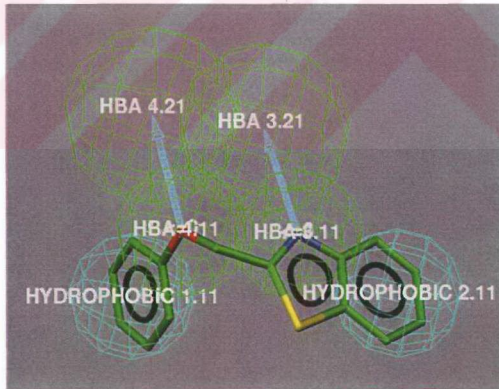
^b Direkt hit, Hipotezin tüm özellikleri haritalanmıştır. Direkt Hit = 1 evet anlamına gelmektedir; Kısmi Hit, hipotezin kısmi olarak haritalandığına edildiğine işaret eder. Kısmi Hit = 0 hayır anlamına gelmektedir. Her numara Tablo 3.10.'daki bir moleküle karşılık gelmektedir (aynı sıra ile).

10 numaralı hipotez dışındaki diğer hipotezlerin tümü 39.5094 ile 48.3931 arasında değişen skora sahip 4 özellik içermektedir. İlk üç hipotez (1-3) iki Hp ve iki HBA'nın aynı ortak-özellik fonksiyonlarından oluşmaktadır.

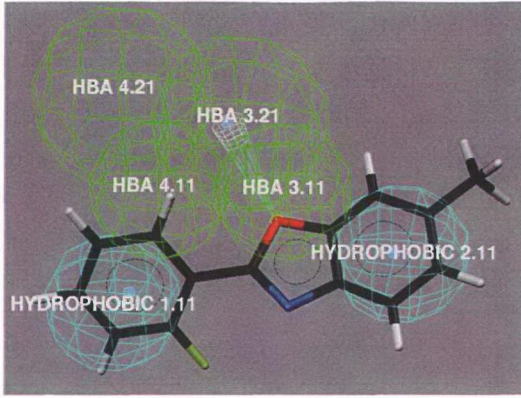
Sonraki altı hipotez (4-9) bir R, bir Hp ve iki HBA özellikleriyle karakterizedir. 10 numaralı hipotez bir R, bir Hp ve bir HBA olmak üzere 3 özellik taşımaktadır. Hipotez 3 (Şekil 3.12.), daha sonraki değerlendirmelerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Şekil 3.13. ve Şekil 3.14., en aktif bileşik 3F'i ve düşük Topoizomerez II inhibitör aktivitesi olan analogu 1b'yi hipotez 3'e haritalanmış şekilde göstermektedir.



Şekil 3.12. 2 HBA (yeşil) ve iki Hp (mavi) içeren 3 numaralı Hipotez.

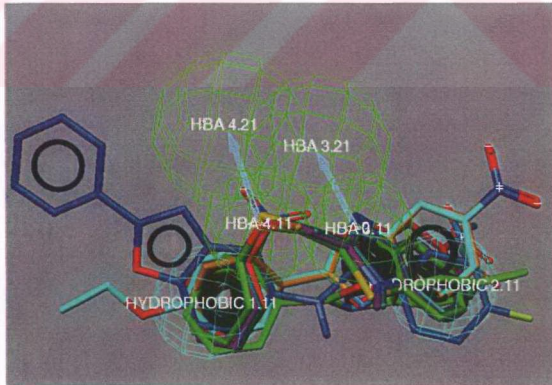


Şekil 3.13. 3f bileşiğinin 3 Numaralı hipoteze haritalanması.

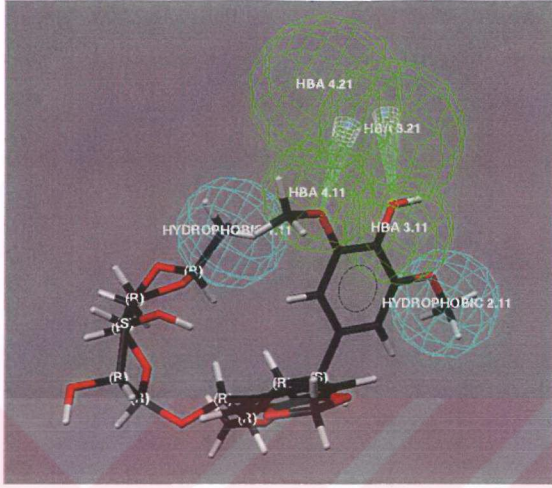


Şekil 3.14. 1b bileşiğinin 3 numaralı hipoteze haritalanması.

3f molekülü 3 numaralı hipotezin dört özelliğine de iyi bir şekilde haritalanmaktadır. HBA özelliklerinden birisi 1b molekülü ile haritalanamamaktadır. Şekil 3.15., çalışma (training) serisindeki tüm yapıların hipotez 3'e haritalanışlarını göstermektedir. Bunların yanında, referans bileşik olarak kullanılan etopozit, 3 numaralı hipoteze belirgin bir şekilde haritalanmıştır (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. Tüm çalışma (training) moleküllerinin 3 numaralı hipoteze haritalanması.



Şekil 3.16. 3 Numaralı hipoteze etopozitin haritalanışı.

Rasyonel ilaç tasarımında, belirli bir proteinin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısına ait bilgiler mevcut değilken, söz konusu protein üzerinde etki gösteren bir seri bileşiğin biyolojik aktivite verilerinin bilindiği durumlara sık rastlanmaktadır.

Bilinen verilerle uyumlu bir farmakofor hipotezi, yeni bileşiklerin değerlendirilmesinde ve daha ileri sentezlerin yürütülmesinde yararlıdır. Bir farmakofor modeli, bir molekülün, aktif bölge tarafından tanınması için sahip olması gereken fonksiyonel grupların temel bir 3D düzenlemesi olduğunu varsayar ve bir moleküldeki ilaçlar ve aktif bölgeleri arasındaki önemli etkileşimlerde rol alan grupları temsil etmeye çalışır, 3D uzaya dağılmış olan ortak özellikleri bünyesinde toplar. Böylelikle bir farmakofor modeli, söz konusu molekülün ortak özelliklerinin hipotez modeliyle ne düzeyde örtüştüğüne dair temel bilgiler sağlamaktadır. Farmakofor modeli, aynı zamanda enerji açısından makul konformasyonlarla, moleküllerin aktif bir bölgeye uyabilmek için konformasyonlarını değiştirme yetileri hakkında da bilgi vermektedir. Bu tür karakterize edilen 3D modeller önemli bilgiler sunmaktadır.

Bu çalışma bir set Topoizomerez II inhibitörünün aktiviteilerinin yüksek aktivite için temel olan moleküler karakteristikleri ortaya çıkartmak için istatistiksel olarak nasıl kullanılacağını göstermektedir. Hipotezler aktif veya inaktif bileşikleri haritalamak için oluşturulmuş ve uygulanmıştır. Topoizomerez II inhibisyonu için iki modelin Hp ve iki HBA gibi belirgin özellikleri bulunmuştur.

3.4. Enzim Safılaştırma Çalışmaları

M. phlei'nin üreme hızı Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde izlenerek logaritmik evrede olan bakterilerin elde edilmesine çalışılmıştır. Bir hafta durgun olarak üretilen *M. phlei*'nin 9-10 günde logaritmik faza geldiği saptanmıştır. Üç gün inkübasyondan sonra, toplam 8 litre besiyerinden yaklaşık 2 g bakteri hücreleri elde edilmiştir. Bir haftalık süre sonunda bu miktarın 10 g olduğu belirlenmiştir.

OADC ve % 0.3 (w/v) Tween 80 içeren Middlebrook karışımı kullanıldığında, çalkalanarak 3-4 günde maksimum üreme sağladığı, 1 litre besiyerinden 8g bakteri eldesinin mümkün olduğu tesbit edilerek saflaştırma çalışmalarında kullanılacak bakterilerin bu koşullarda üretilmesine karar verilmiştir.

Mikobakterilerin homojenizasyonunda Lanigan ve ark. (2004) mikobakterilerin proteom analizlerinde kullandıkları şekilde cam boncuk kullanılmışlar ve verime ulaşımlardır. Bu şekilde hızlı üreyen bakterilerde sonikasyona göre iki kat daha fazla protein elde edildiğini bildirmişlerdir.

Prokaryotik tip I topoizomerazların prototipi kabul edilen *E. coli* Topoizomeraz I'i yoğun olarak incelenmiştir (Wang, 1971). Prokaryotik tip I topoizomerazların molekül büyüklükleri 75-112 kD arasındadır (Slesarev ve ark., 1991; Wang, 1971; Bouthier ve ark., 1998; Anderluzzi ve Pedrini, 1993). *M. tuberculosis*'in Topoizomeraz I geninin klonlanması ile elde edilen 900 aminoasitlik polipeptidin molekül ağırlığı 99.353 kD bulunmuştur (Yang ve Rubin, 1996). *M. smegmatis*'ten saflaştırılan Topoizomeraz I'in molekül ağırlığı ise 110 kD bulunmuştur.

Topoizomeraz I enzimi *Mycobacterium phlei*'den, sonikasyonu takiben DNaz muamelesi, Sephadex G50 kromatografisi ve Heparin Sepharose kromatografisi yöntemleriyle % 1.7 verimle, 5.05 kez saflaştırılmıştır. Kısmen saflaştırılan enzimin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde molekül ağırlığı 125 kD olarak tesbit edilmiştir. Enzim aktivitesinin pH 6.0 - 8.5 arasında oldukça stabil olduğu, aktivite için Mg^{2+} , ATP ve spermidine gerek duymadığı, ökaryotik Topoizomeraz I'in inhibitörü olan kamptotesin tarafından çalışılan konsantrasyonlarda inhibe edilmediği gözlenmiştir. İlaç etkisi araştırmalarında çözücü olarak kullanılan dimetil sülfoksit, ökaryotik Topoizomeraz I üzerinde kuvvetli bir inhibitör etki göstermesine rağmen, mikobakteriden saflaştırılan enzimin bu çözücü tarafından inhibisyonunun çok daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir

Klorokinli ortamda elektroforezler tekrarlanarak, homojenatta topoizomeraz aktivitesine ek olarak nükleaz aktivitesinin de bulunduğu gözlenmiş, daha ileri saflaştırma kademelerinde lineer plazmidde artış gözlenmemiştir.

4. TARTIŞMA

Yapılan CoMFA çalışması sonucunda, çalışma (training) serisindeki 10. bileşiğin fenil halkasının para pozisyonunda bulunan $-OCH_3$ grubunun istenmeyen sterik alanı temsil eden sarı alana çok yakın olmasından dolayı diğer bileşiklere göre daha az aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bileşiklerdeki benzen halkasının üzerindeki negatif yükün, alanlara katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmüştür. $-NO_2$ sübtütientine sahip **1** (17 $\mu\text{g/ml}$), **4** (32 $\mu\text{g/ml}$), **6** (22 $\mu\text{g/ml}$), **14** (28.4 $\mu\text{g/ml}$) nolu bileşiklerin ve benzazol halkasının R veya R1 pozisyonunda $-COOCH_3$ sübtütientine sahip **13** (17 $\mu\text{g/ml}$) nolu bileşiğin, aynı pozisyonda $-NH_2$ taşıyan **2** (115.5 $\mu\text{g/ml}$) nolu bileşiğe göre daha yüksek aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Bunun sebebi yüksek aktiviteye sahip bileşiklerdeki grupların kırmızı alanlara uyum sağlaması ve söz konusu diğer bileşiğin ilgili grubunun kırmızı alanın dışına taşmasıdır. **15** nolu bileşiğin nitro grubu kırmızı alana uyum göstermesine rağmen **4**, **6** ve **14** numaralı bileşiklerden daha az etkiye sahip olmasının nedeni R konumundaki klor atomunun elektropozitif alanı temsil eden mavi alana değmesidir. Elektrostatik alan haritasındaki benzazol ve fenil grupları arasındaki mavi alan, pozitif yük taşıyan bir grubun aktiviteyi yükselteceğine işaret etmektedir. 2-tiyometilen grubuna sahip **13** numaralı molekülün diğerlerine nazaran daha yüksek inhibitör aktivite göstermesinin nedeni de budur.

CoMSIA çalışmasında **1** nolu bileşiğe ait 2. konumdaki fenil sübtütientinin turuncu renkle gösterilen hidrofobik grupların biyolojik etkiyi yükselttiği bölgeye olan uyumu ve yine aynı bileşiğe ait nitro grubunun turkuazla gösterilen (hidrojen bağı akseptör) yöreye uyumu bileşiğin diğerlerine göre daha aktif oluşunu açıklayıcı niteliktedir. **13** numaralı aktif bileşiğin ester grubu yeşille gösterilen yöreye net bir şekilde oturmuştur; sterik olarak büyük bir gruba olan ihtiyacı simgeleyen bu yeşil bölge, reseptör yüzeyinde bir cebe işaret etmektedir.

Farmakofor analizi çalışmasında Catalyst HipHop programı kullanılmıştır. HipHop programı, çalışılan setteki moleküllerde ortak olan ve kimyasal açıdan önem taşıyan fonksiyonel grupları çakıştırırken konformasyonlardan yararlanmaktadır. Çakıştırılan bu yapılar üzerinden farmakoforik bir hipotez ortaya konulmuştur. Çalışmada, en aktif bileşiğin, 2-(fenoksimetil)benzotiyazol'un (3f) hipotezlerdeki tüm özelliklere iyi bir şekilde haritalandığı göstermiştir. Moleküle lokalize olan iki HBA ve iki Hp'nin Topoizomeraz II inhibisyonu için temel olduğu sonucuna varılmaktadır.

Enzim saflaştırma çalışmasında saflaştırma veriminin düşük olmasının nedeninin Sephadex G50 kolonunda nükleaz aktivitesinin uzaklaştırılmış olduğu düşünülmüştür. Düşük verimin diğer bir nedeni ise bakterilerin ürettiği proteazların, proteaz inhibitörleri kullanılsa da, özellikle ilk saflaştırma kademelerinde etkilerinin yüksek olmasıdır. Heparin Sepharose kromatografisinden sonra uygulanacak bir jel filtrasyonu kademesinin daha ileri bir saflaştırma elde etmek için gerekli olduğu düşünülmektedir.

Ortam pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiş, enzim aktivitesinin pH 6-8.5 arasında oldukça stabil olduğu izlenmiştir.

Kısmen saflaştırılan enzimin, ökaryotik Topoizomeraz I'in inhibitörü olan kamptotesin tarafından, çalışılan konsantrasyonlarda inhibe etmediği gözlenmesi literatür ile de uyumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Dimetil sülfoksit, ökaryotik topoizomeraz üzerinde kuvvetli bir inhibitör etki göstermesine rağmen, mikobakteriden saflaştırılan enzimin bu çözücü tarafından inhibisyonunun çok daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Enzimin dimetil sülfoksit tarafından inhibe edilmemesi, ilaç etkisi araştırmalarında çözücü olarak DMSO kullanılması nedeniyle önemlidir.

Enzim saflaştırmaya yönelik daha ileri çalışmalarda daha yüksek saflıkta enzim elde edebilmek ve verimi artırmak için yüksek basınçlı kromatografi tekniklerinin uygulanması, Heparin Sepharose kademesinden sonra elde edilen kısmen saf enzimin, moleküler elek yöntemine tabi tutulması planlanmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Geçtiğimiz 25 yıl süresince, ilaç keşif işlemleri ve bilgi teknolojilerinin ön emli bir bölümü, basit araştırmalarla başlayan ve daha sonra hastalığa özgün ilaçlarla sonuçlanan bir sürecin ayrılmaz parçaları haline gelmişlerdir. Herceptin® i geliştirenler, *in silico* moleküler modellemeden, HTS'den, ve de genomik ve proteomik bilgi içeren veritabanlarından faydalanmışlardır. Bilgisayar teknolojisindeki gelişmeler yeni bir *in silico* biyoloji uygulama sınıfının gelişimine önyak olmuştur. Bu çalışmalarda en büyük hedef bir hastalığı moleküler seviyede modelleyerek, genetik olarak belirli bir hasta popülasyonunun tedavisine en uygun kimyasal bileşiğin bulunması, bu bileşiğin tüm bağlanma deneylerinin *in silico* olarak gerçekleştirilmesi ve de bileşiğin ADME özelliklerinin kesin olarak tahmin edilebilmesidir. Bu hedefleri *in silico* olarak başarmak ilaç keşif işlemini inanılmaz derecede hızlandıracak, emek ve kaybı ve masrafı engelleyecektir. Hastayı ve hastalığı moleküler düzeyde, mekanizma bazında anlayabilen kişiselleştirilmiş tıbbı giden yolu da sağlamlaştıracaktır. Deneysel olarak yapıları aydınlatılmayan proteinlerin çok büyük bir bölümü için 3D bilgi sağlayabildikleri için bilgisayarlı yapı tahmin teknikleri çok büyük bir önem taşımaktadır. Yakın bir gelecekte hedefler genetik ve metabolik işlemlerin modellenmesiyle keşfedilecek ve de önder bileşikler neredeyse tamamen *in silico* olarak sentezlenip test edilebilecektir. *In silico* ADME modellemesi de klinik denemelerin önüne geçerek ilacın metabolik özelliklerinin tahmininde kullanılacaktır. Geleceğin ilaç firmaları, günümüz ilaç firmalarından çok farklı olacaktır. Bilgi teknolojisi altyapısı, biyoinformatik araçlarının etkin kullanımı ve bilgisayar gücünü biyokimyasal ve genetik anlayışa karşı yarıştıracak olan firmalar fark yaratacaklardır (Augen, 2002).

Moleküler modelleme farmasötik araştırmada 1980'lerden itibaren hızla gelişmiş yeni bir disiplin haline almıştır ve yeni öncü bileşiklerin keşfine katkıda bulunmuştur. Bu disiplinin evrimi giderek çözülmekte ve ilaç tasarımında daha akılcı yaklaşımlar çağına öncülük etmektedir. Bu emsalsiz çabaların sonucunda yeni yararlı terapötik ajan sınıflarının ortaya çıkması beklenmektedir (Cohen, 1996).

Yapılan üç boyutlu kantitatif yapı-etki ilişkileri analizlerinde moleküler özellik alanlarının ortaya konulması suretiyle reseptör yapısıyla uyum gösteren yeni bileşiklerin aktiviteleri tahmin edilmiştir. CoMFA yöntemi kullanarak yapılan 3D-QSAR analizi başarılı olarak yeni sentezlenmiş olan benzazol türevlerinin bir setine uygulanmıştır. Hesaplanan ve deneysel olarak bulunan aktiviteler arasındaki 0.024 standart hatalı 0.997 değerindeki çapraz-validasyon olmayan (r^2) korelasyon katsayısı, analizlenen sonuçların % 99.7 oranında deneysel sonuçlarla uyumluluğunu göstermektedir.

Alan haritaları inhibitör aktivite ile yapısal özellikler arasındaki ilişkilere faydalı açıklamalar sağlamıştır ve belirgin Topoizomeraz II inhibitör aktiviteden sorumlu fizikokimyasal özelliklere dair yorum getirmiştir.

CoMSIA yöntemi kullanılarak yapılan 3D-QSAR analizi başarılı olarak yeni sentezlenmiş olan benzazol türevlerinin bir setine uygulanmıştır. Analizlenen CoMSIA modelinin q^2 değeri 0,391; ve r^2 değeri 0,997 olarak bulunmuştur. CoMSIA alanlarının katkısı sterik alanlar için %10,4, elektrostatik alanlar için %46,3, hidrofobik alanlar için %16,1 ve hidrojen bağı akseptörü alanlar için %27,3 olarak bulunmuştur. Alan haritaları inhibitör aktivite ile yapısal özellikler arasındaki ilişkilere faydalı açıklamalar sağlamıştır.

CoMFA ve CoMSIA yöntemleri, farklı özellik alanları tanımlamalarıyla, mevcut moleküllerden hareketle yeni etken madde adayları bileşiklerin aktivite tayinlerinin gerçekleştirilmesine, daha yüksek aktiviteye sahip yeni yapıların önerilmesine olanak sağlamıştır.

Bunlara ek olarak, yapılan farmakofor analizi çalışmasında Catalyst/HipHop (Accelrys Inc., 2004) programı ile oluşturulan on ortak-özellik modelleri arasından, iki hidrojen bağı akseptör (HBA) ve iki hidrofobik (Hp) özellik içeren bir hipotezin Topoizomeraz II inhibitör aktivite için temel olduğu düşünülmektedir. Çalışmada, 7 adet Topoizomeraz II inhibitörü bileşikten oluşan bir set üzerinden üç boyutlu farmakofor hipotezleri oluşturulmuştur. Catalyst/HipHop yazılımıyla oluşturulmuş olan bu on ortak-özellik modeli içerisinden, iki hidrojen bağı akseptörü (HBA) ve iki hidrofobik (Hp) özelliği içeren bir hipotezin Topoizomeraz II inhibisyonunun değerlendirilmesinde önemli olduğu bulunmuştur. En aktif bileşik olan 2-(fenoksimetil)benzotiyazol (3f) hipotezin tüm HBA ve Hp özelliklerine iyi bir şekilde uyum sağlamıştır.

Çalışmalarımız sonucunda, 2. konumda fenil gibi hidrofobik bir grup taşıyan, ve ayrıca yapısında nitro grubu gibi hidrojen bağı akseptörü bir grup bulunduran yeni benzazol türevlerinin ümit vaadeden topoizomeraz II enzimi inhibitörleri olabileceğine karar verilmiştir.

Mikobakteri topoizomerazının tanımlanmasının, tüberkülozlu hastaların tedavisinde yeni seçenekler yaratacak mikobakterileri seçici olarak etkileyen ilaçların geliştirilmesine imkan vereceği ve bu önemli sağlık probleminin çözümüne katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Yeni geliştirilen topoizomeraz inhibitörü olma olasılığı yüksek ilaçların bu enzim üzerinde denemesinin ve seçici olarak mikobakteri enzimini inhibe eden ilaçların tesbitinin tüberküloz tedavisinde yeni ufuklar açacağına inanmaktayız.

ÖZET

Bilgisayar Destekli Rasyonel Kemoterapötik Etkili İlaç Etken Madde Tasarım Çalışmaları ve Enzim Saflaştırma

Ökaryotik topoizomerez inhibitörleri olarak etki gösteren bir seri benzazol üzerinde PLS uyumlu Karşılaştırmalı Moleküler Alan Analizleri (CoMFA) ve Karşılaştırmalı Moleküler Benzerlik İndisleri Analizi (CoMSIA) teknikleri kullanılarak 3D-QSAR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 23 Bileşik kullanılarak yapılan bu çalışmada, QSAR modelleri 16 bileşiklik bir çalışma (training) serisi kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan QSAR modellerinin tahmin yeteneği 7 bileşimin yer aldığı bir test serisinin yardımıyla değerlendirilmiştir.

Bunlara ek olarak gerçekleştirilen farmakofor analizi çalışmasında Catalyst/HipHop (Accelrys Inc., 2004) programı ile 7 adet Topoizomerez II inhibitörü bileşikten oluşan bir set üzerinden üç boyutlu farmakofor hipotezleri oluşturulmuştur.

Yapılan çalışmalar sonucu; reseptörün yapısı yorumlanmış ve topoizomerez II enzim inhibitörü yeni önder bileşiklerin tasarımlarında önerilecek moleküllerin yapıları belirlenmiştir.

Ayrıca, bu çalışma kapsamında *in vitro* etki tayininde kullanılan topoizomerez enziminin saflaştırma çalışmaları, sonikasyonu takiben DNaz muamelesi, Sephadex G50 kromatografisi ve Heparin Sepharose kromatografisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Heterosiklik Bileşikler, Kemoterapötik Etki, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri, Moleküler Modelleme, Enzim Saflaştırma

SUMMARY

Computer Aided Drug Design Studies on Chemotherapeutically Active Compounds and Enzyme Purification

3D-QSAR studies have been performed on a series of benzazoles that act as eukaryotic topoisomerase II inhibitors, using Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) and Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA) with partial least squares (PLS) fit. The studies were carried out using 23 compounds and the QSAR models were developed using a training set of 16 compounds. The predictive abilities of the QSAR models were assessed using a test set of 7 compounds.

In addition to these studies, three-dimensional pharmacophore hypotheses were built from a set of 7 topoisomerase II inhibitors using Catalyst/HipHop (Accelrys Inc., 2004) program.

With the present study, the structure of the receptor has been characterized with molecular biological means, thus uncovering the essential molecular characteristics for new possible lead compounds with high activity.

This work also includes the purification studies (with a method including homogenization followed by DNase treatment, Sephadex G50 and Heparine Sepharose column chromatography steps) of topoisomerase enzyme, which is being widely used for *in vitro* determination of inhibitory activity of new lead compounds.

Keywords:

Heterocyclic Compounds, Chemotherapeutical Activity, Quantitative Structure Activity Relationships, Molecular Modeling, Enzyme Purification

KAYNAKLAR

- Accelrys Inc. Catalyst 4.9 (2004). Erişim:
[<http://www.accelrys.com/catalyst/cathypo.html>]
- AKI-ŞENER, E., YALÇIN, İ. (2003). Farmasötik/Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-I, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, **86**: III.
- AKI-ŞENER, E., YALÇIN, İ. (2003). Farmasötik/Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-I, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, **86**: 2.
- AKI-ŞENER, E., YALÇIN, İ. (2003). Farmasötik/Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-I, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, **86**: 40-54.
- ALBERT, A., RUBBO, S. D., GOLDACRE, R. J., DAVEY, M. E., STONE, J. D. (1945). *Br. J. Exp. Pathol.*, **26**: 160.
- ALKORTA, I., PARK, C., KONG, J., GARBİSU, C., ALBETI, M., PON, N., HEARST, J. E. (1999). *Rhodobacter capsulatus* DNA Topoisomerase I Purification and Characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**: 123-140.
- ANDERLUZZI, D., PEDRINI, M. (1993). Structural Similarities between *M. luteus* and *E. coli* DNA Topoisomerase I. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **192**: 657-664.
- ANDOH, T., ISHIDA, R. (1998). Catalytic Inhibitors of DNA Topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1400**: 155-171
- AUGEN, J. (March 2002). *Drug Discovery Today*, **7(5)**: 315-323.
- BAASE, W. A., WANG, J. C. (1974). An ω Protein from *Drosophila melanogaster*. *Biophys.*, **370**: 66-76.
- BAINS, W. (1998). *Biotechnology from A to Z*, 2nd Edition, Oxford University Press, 45-47.
- BAINS, W. (1998). *Biotechnology from A to Z*, 2nd Edition, Oxford University Press, 66-67.
- BAINS, W. (1998). *Biotechnology from A to Z*, 2nd Edition, Oxford University Press, 328.
- BAUER, W. R., RESSNER, E. C., KATES, J., PATZKE, J. V. (1977). A DNA Nicking-closing Enzyme Encapsited in Vaccinia Viirus: Partial Purification and Properties. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**: 1841-1845.
- BARRECA, M. L., CAROTTI, A., CARRIERI, A., CHIMIRRI, A., MONFORTE, A. M., PELLEGRINI CALACE, M., RAO, A. (1999). Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) and Docking Studies of Non-nucleoside HIV-1 RT Inhibitors (NNIs). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **7**: 2283-2292.

- BARRETT, J. F., SUTCLIFFE, J. A., GOOTZ, T. D. (1990). *In vitro* Assays used to Measure the Activity of Topoisomerases. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **34**: 1-7.
- BELL, P. H., ROBLIN, R. O. (1942). *J. Am. Chem. Soc.*, **64**: 2905.
- BERTHELOT, M., JUNGFLEISCH, E. (1872). *Ann. Chim. Phys.*, **4**: 26.
- BHADURI, T., NAGARAJA, V. (1994). DNA Topoisomerase I from *Mycobacterium smegmatis*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **31**: 339-343.
- BHADURI, T., BAGUI, T. K., SIKDER, D., NAGARAJA, V. (1998). DNA Topoisomerase I from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.*, **273**: 13925-13932.
- BIERSACK, H., JENSEN, P. B., WESTERGAARD, O. (1999). Rapid Purification of DNA Topoisomerase II containing a Hexahistidine Tag by Metal Ion Affinity Chromatography. *DNA Topoisomerase Protocols. DNA Topology and Enzymes. Humana Press*, 235-242.
- Bioinformatics.org FAQ (20.06.2005), Erişim:
[<http://fbioinformatics.org/faq/#definitions>]
- BJORNSTI, M. A., MEGONIGAL, M. D. (1999). Resolution of DNA Molecules by One-dimensional Agarose-gel Electrophoresis. *DNA Topoisomerase Protocols. DNA Topology and Enzymes, Humana Press*, 9-17.
- BOECKLER, F., OHNMACHT, U., LEHMANN, T., UTZ, W., HÜBNER, H., GMEINER, P. (2005). CoMFA and CoMSIA Investigations Revealing Novel Insights into the Binding Modes of Dopamine D3 Receptor Agonists. *J. Med. Chem.*, **48**: 2493-2508.
- BOEGE, F., GIESELER, F., MÜLLER, M., BIERSACK, H., MEYER, H. (1992). Activation of topoisomerase II during Partial Purification by Heparin-Sepharose Chromatography. *J. Chrom.*, **625**: 67-71.
- BORMAN, S. (1990). *Chem. Eng. News*, **68**: 20-23.
- BOUTHIER DE LA TOUR, C., PORTEMER, C., KALTOUM, H., DUGUET, M. (1998). Reverse gyrase from the *Hyperthermophilic Bacterium Thermotoga maritima*: Properties and Gene Structure. *J. Bac.*, **180**: 274-281.
- BROWN, F. K. (1998). Chemoinformatics: What is it and How Does it Impact Drug Discovery. *Ann. Rep. Med. Chem.*, **33**: 375-384.
- BURDEN, D. A., OSHEROFF, N. (1998). Mechanism of Action of Eukaryotic Topoisomerase II and Drugs Targeted to the Enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**: 139-154.
- CARLSON, H. A., McCAMMON, J. A. (2000). *Mol. Pharmacol.*, **57**: 213-218.
- CHENA, C. L., THOENB, K. K., UCKUNC, F. M. (2001). High-Performance Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Topoisomerase II Inhibitors. *Journal of Chromatography B*, **764**: 81-119.

- CHO, K. H., PEZZUTO, J. M., BOLTON, J. L., STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., LEE, S. K., CONSTANTINOU, A. (2000). Selection of Cancer Chemopreventive Agents based on Inhibitor of Topoisomerase II activity. *Eur. J. Cancer.*, **36**: 2146-2156.
- CLASSEN, S., OLLAND, S., BERGER, J. M. (2003). Structure of the Topoisomerase II ATPase Region and its Mechanism of Inhibition by the Chemotherapeutic Agent ICRF-187. *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 10629-10634.
- COHEN, N. C. (1996). Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. *Academic Press Inc.*, (Edited)XIII.
- COHEN, N. C. (1996). Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. *Academic Press Inc.*, (Edited)17.
- COHEN, N. C. (1996). Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. *Academic Press Inc.*, (Edited)25-315.
- Condensed Matter Theory Web Site - University of Durham, Erişim:
[http://portellen.phycmt.dur.ac.uk/sjc/thesis_ppr/node23.html]
- CORBETT, K. D., BERGER, J. M. (2004). Structure, Molecular Mechanisms and Evolutionary Relationships in DNA Topoisomerases. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **33**: 95-118.
- ColorBasePair.com (20.06.2005), Erişim:
[http://www.colorbasepair.com/what_is_bioinformatics.html]
- CRUM-BROWN, A., FRASER, T. R. (1868). *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, **25**: 151.
- CRUM-BROWN, A., FRASER, T. R. (1868). *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, **25**: 693.
- DENG, J., LEE, K. W., SANCHEZ, T., CUI, M., NEAMATI, N., BRIGGS, J. M. (2005). Dynamic Receptor-Based Pharmacophore Model Development and Its Application in Designing Novel HIV-1 Integrase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **48**: 1496-1505.
- DUBOS, R. J., MIDDLEBROOK, G. (1948). The Effect of Wetting Agents on the Growth of Tubercle Bacilli. *J. Exp. Med.*, **88**: 81-88.
- FERGUSON, J. (1939). *J. Proc. Roy. Soc. Ser. B*, **127**: 387-404.
- FRANKE, R. (1984). Theoretical Drug Design Methods, Pharmacochimistry Library, eds. W. Th. Nauta, R.F. Rekker, Elsevier, Amsterdam, **7**: 30.
- FREE, Jr. M., WILSON, J. W. (1964). *J. Med. Chem.*, **7**: 395.
- FUJITA, T., IWASA, J., HANSCH, C. (1964). *J. Am. Chem. Soc.*, **86**: 5175.
- FUJITA, T., BAN, T. (1971). *J. Med. Chem.*, **14**: 148.
- GELLERT, M., MIZUUCHI, K., O'DEA, M. H., NASH, H. A. (1976). DNA gyrase: An Enzyme that Introduces Superhelical Turns Into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 3872-3876.

- GOODMAN, J. M. (1998). Chemical Applications of Molecular Modelling. *R. Soc. Chem.*, 31-39.
- GOTO, T., LAIPIS, P., WANG, J. C. (1984). The Purification and characterization of DNA Topoisomerase I and II of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **259**: 10422-10429.
- GREENE, J., KAHN, S. D., SAVOJ, H., SPRAGUE, P. W. (1994). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **34**: 1297-1308.
- GUILLEMIN, I., SOUGAKOFF, W., CAMBAU, E., REVEL-VIRAVAU, V., MOREAU, N., JARLIER, V. (1999). Purification and Inhibition by Quinolones of DNA gyrases from *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum* *bv. peregrinum*. *Microbiol.* **145**: 2527-2532.
- HAMMETT, L.P. (1937). *J. Am. Chem. Soc.*, **59**: 66.
- HAMMETT, L. P. (1938). *Trans. Faraday. Soc.*, **34**: 156.
- HAMMETT, L. P. (1940). Physical Organic Chemistry, MacGraw Hill, New York.
- HANDE, K. R. (1998). Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1400**: 173-184.
- HANSCH, C. (1969). *Acc. Chem. Res.*, **2**: 232.
- HANSCH, C., MALONEY, P. P., FUJITA, T., MUIR, R. M. (1962). *Nature*, **194**: 178.
- HANSCH, C., LEO, A. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, Wiley, New York.
- HANSEN, O. R. (1962). *Acta Chem. Scand.*, **16**: 1593.
- HIRASHIMA, A., MORIMOTO, M., OHTA, H., KUWANO, E., TANIGUCHI, E., ETO, M. (2002). Three-Dimensional Common-Feature Hypotheses for Octopamine Agonist 1-Arylimidazolidine-2-Thiones. *International Journal of Molecular Sciences*, **3**: 56-68.
- HOAGLAND, M. B. (2003). Celebtaring Complementarity. *Ann. Intern. Med.*, **138**: 583-586.
- HOLDEN, J. A. (1999). Purification of DNA Topoisomerase I from Human Placenta. *DNA Topoisomerase Protocols. DNA Topology and Enzymes. Humana Press*, 213-221.
- HOLDEN, J. A., WALL, M. E., WANI, M. C., MANIKUMAR, G. (1999). Human DNA Topoisomerase I: Quantitative Analysis of the Effects of Camptotecin Analogs and the Benzophenanthridine Alkaloids Nitidine and 6-Ethoxydihydroneitidine on DNA Topoisomerase I Induced DNA Strand Breakage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **370**: 66-76.
- HÖLTJE, H. D., FOLKERS, G. (1997). Molecular Modeling – Basic Principles and Applications. VCH Verlagsgesellschaft mbH, **5**: 2.

- HÖLTJE, H. D., FOLKERS, G. (1997). Molecular Modeling – Basic Principles and Applications. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 5: 9-12.
- HU, X., MACHIUS, M., YANG, W. (2003). Monovalent Cation Dependence and Preference of GHKL ATPases and kinases. *FEBS Letters*, 544: 268-273.
- JAFFE, H. H. (1953). *Chem. Rev.*, 53: 191.
- JAVAHERIAN, K., TSE, Y. C., VEGA, J. (1982). *Drosophila* Topoisomerase I: Isolation, purification and Characterization. *Nuc. Acid. Res.*, 10: 6945-6955.
- JIANG, H., CHEN, K., TANG, Y., CHEN, J., LI, Q., WANG, Q., JI, R. (1997). Molecular Modeling and 3D-QSAR Studies on the Interaction Mechanism of Tripeptidyl Thrombin Inhibitors with Human α -Thrombin. *J. Med. Chem.*, 40: 3085-3090.
- KELLNER, U., SEHESTED, M., JENSEN, P. B., GIESELER, F., RUDOLPH, P. (2002). Culprit and victim – DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol*, 3: 235–243.
- KLEBE, G., ABRAHAM, U., MIETZNER, T. (1994). Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity. *J. Med. Chem.*, 37: 4130-4146.
- KOCHI, A. (1991). The Global Tuberculosis Situation and the New Control Strategy of the World Health Organization. *Tubercule.*, 72: 1-6.
- KROVAT, E. M., FRÜHWIRTH K. H., LANGER, T. (2005). Pharmacophore Identification, *in silico* Screening, and Virtual Library Design for Inhibitors of the Human Factor Xa. *J. Chem. Inf. Model*, 45: 146-159.
- KUBINYI, H. (1976). *J. Med. Chem.*, 19: 587.
- KUBINYI, H. (1976). *Arzneim. Forsch.*, 26: 1991.
- KUBINYI, H. (1979). *Arzneim. Forsch.*, 23: 97-198.
- KUBINYI, H. (1993). QSAR, Hansch Analysis and Related Approaches, Methods and Principles in Medicinal Chemistry, eds. R. Mannhold, P. Krogsgaard-Larsen, H. Timmermann, VCH, Weinheim, 1: 4.
- KUBINYI, H. (1993). QSAR, Hansch Analysis and Related Approaches, Methods and Principles in Medicinal Chemistry, eds. R. Mannhold, P. Krogsgaard-Larsen, H. Timmermann, VCH, Weinheim, 1: 21.
- KUNG, V. T., WANG, J. C. (1977). Purification and Characterization of an ω protein from *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.*, 252: 5398-5402.
- LANIGAN, M. D., VAUGHN, J. A., SHIELL, B. J., BEDDOME, G. J., MICHALSKI, W. P. (2004). Mycobacterial Proteome Extraction: Comparison of Disruption Methods. *Proteomics*, 4: 1094-1100.

- LARSENA, A. K., ESCARGUEILB, A. E., SKLADANOWSKIA, A. (2003). Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, **99**: 167– 181.
- LEO, A. J. (1990). Quantitative Drug Design, Comprehensive Medicinal Chemistry, ed. C. A. Ramsden, Pergamon Press, Oxford, **4**: 241-295.
- LEO, A., HANSCH, C., ELKINS, D. (1971). *Chem. Rev.*, **71**: 525-616.
- LEVINE, C., HIASA, H., MARIANS, K. J. (1998). DNA Gyrase and Topoisomerase IV: Biochemical Activities, Physiological Roles During Chromosome Replication and Drug Sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1400**: 29-43.
- LIPNICK, R. L. (1986). *Trends Pharmacol. Sci.*, **7**: 161-164.
- MEYER, H. (1899). *Arch. Exp. Path. Pharm.*, **42**: 109-118.
- MEYER, P., PRODROMOU, C., HU, B., VAUGHAN, C., ROE, S. M., PANARETOU, B., PIPER, P. W., PEARL, L. H. (2003). Structural and Functional Analysis of the Middle Segment of hsp 90: Implications for ATP hydrolysis and Client Protein and Cochaperone Interactions. *Mol. Cell.*, **11**: 647-658.
- MEYER, V. (1985). *Chem. Ber.*, **28**: 1254.
- MITSCHER, L. A. (2005). Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chem. Rev.*, **105**: 559-592.
- NADAL, M., JAXEL, C., PORTEMER, C., FORTERRE, P., MIRAMBREU, G., DUGUET, M. (1988). *Biochem.*, **27**: 9102-9108.
- NAGARAJA, V. (2004). Regulation of DNA Topology in Mycobacteria. *Curr. Sci.*, **86**: 135-140.
- NAGARAJA, V., SIKDER, D., JAIN, P. (2002). DNA Topoisomerase I from Mycobacteria-A Potential Drug Target. *Curr. Pharm. Des.*, **8**: 1995-2007.
- NERNST, W. (1891). *Z. Physikal. Chem.*, **8**: 110.
- NUERMBERGER, E., GROSSET, J. (2004). Pharmacocinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Mycobacterial Infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23**: 243-255.
- OSHEROFF, N. (1998). DNA Topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**: 1-2.
- OVERTON, E. (1901). Studien Über die Narkose, Fischer, Jena.
- PAJEVA, I., WIESE, M. (1998). Molecular Modeling of Phenothiazines and Related Drugs As MultiDrug Resistance Modifiers: A Comparative Molecular Field Analysis Study. *J. Med. Chem.*, **41**: 1815-1826.
- PAYNE, M. C., TETER, M. C., ALLEN, D. C., ARIAS, T. A., JOANNOPOLOUS, J. D. (1992). *Rev. Mod. Phys.*, **64**: 1045.

- PENG, Y., KEENAN, S. M., ZHANG, Q., KHOLODOVYCH, V., WELSHI W. J. (2005). 3D-QSAR Comparative Molecular Field Analysis on Opioid Receptor Antagonists: Pooling Data from Different Studies. *J. Med. Chem.*, **48**: 1620-1629.
- PINAR, A. (2005). Topoizomeraz I'in Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*.
- PINAR, A., YURDAKUL, P., YILDIZ, I., TEMİZ-ARPAÇI, Ö., AÇAN, N. L., AKI-ŞENER, E., YALÇIN, İ. (2004). *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **317**: 670-674.
- POMMIER, Y., POURQUIER, P., FAN, Y., STRUMBERG, D. (1998). Mechanism of Action of Eukaryotic DNA Topoisomerase I and Drugs Targeted to the Enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1400**: 83-106.
- POSTOW, L. (2001). Topological Challenges to DNA Replication: Conformations at the fork. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**: 8219-8226.
- REDINBO, M. R., STEWART, L., KUHN, P., CHAMPOUX, J. J., HOL, W. G. (1998). Crystal Structures of Human Topoisomerase I in covalent and Noncovalent Complexes with DNA. *Science*, **279**: 1504-1513.
- REKKER, R. F. (1977). The Hydrophobic Fragmental Constant. Its Derivation and Application. A Means of Characterizing Membrane Systems. *Pharmacochem. Libr. 1*, Elsevier, Amsterdam.
- REKKER, R. F. (1992). *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **11**: 195-199.
- RICHET, C., SÉANCES, C. R. (1893). *Soc. Biol.*, **9**: 775.
- ROCA, J., BERGER, J. M., HARRISON, S. C., WANG, J. C. (1996). DNA Transport by a Type II Topoisomerase: Direct Evidence for a Two-gate Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 4057-4062.
- SAITO, H., TOMIOKA, H., ATANABE, T., YONEYAMA, T. (1983). Mycobacteriocins Produced by Rapidly Growing Mycobacteria are Twee-hydrolyzing Esterases. *J. Bact.*, **153**: 1294-1300.
- San Diego Supercomputer Center - Optimization Techniques, Erişim:
[<http://www.sdsc.edu/chemdyn/chem515/lecture/week7/lecture.html>]
- SHISHIDO, K., ANDO, T. (1979). Purification and Characterization of DNA-relaxing Enzyme *Haemophilus gallinarum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **563**: 261-265.
- SLESAREV, A. I., ZAITZEV, D. A., KOPYLOV, V. M., STETTER, K. O., KOZYAVKIN, S. A. (1991). DNA Topoisomerase III from Extremely Thermophilic Archeobacteria. ATP-dependent Type I Topoisomerase from *Desulfurococcus amylolyticus* Drives Extensive Unwinding of Closed Circular DNA at High Temperature. *J. Biol. Chem.*, **266**: 12321-12328.
- SRIVENUGOPAL, K. S., LOCKSHON, D., MORRIS, D. R. (1984). *Escherichia coli* DNA Topoisomerase III: Purification and Characterization of a New Type I Enzyme. *Biochem.*, **23**: 1899-1906.

- STEWART, L., HAMPOUX, J. J. (2001). Assaying DNA Topoisomerase I Relaxation Activity. *DNA Topoisomerase Protocols. Enzymology and Drugs, Humana Press*, 1-11.
- STÖRL, K., STÖRL, H. J. (1989). DNA Topoisomerase I from *Diplococcus pneumoniae*. **48**: 69-76.
- STÖRL, K., STÖRL, J., ROTH, M., ZIMMER, C. (1994). DNA Topoisomerases from *Streptomyces noursei*: Influence of Coumarins and Quinolones on the Enzymatic Activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1199**: 143-148.
- STREET, A. G., MAYO, S. L. (1999). *Structure Fold Des.*, **7**: R105-109.
- TAFT, R. W. (1952). *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**: 3120.
- TAFT, Jr. R. W. (1956). Steric Effects in Organic Chemistry, ed. M. S. Newman, Wiley, New York, 556.
- TAFT, R. W., LEWIS, I. C. (1958). *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**: 2436.
- TAFT, R. W., LEWIS, I. C. (1959). *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**: 5343.
- TAYLOR, P. J. (1990). Quantitative Drug Design, Comprehensive Medicinal Chemistry, ed. C. A. Ramsden, Pergamon Press, Oxford, **4**: 241-294.
- THAIMATTAM, R., DAGA, P., RAJJAK, S. A., BANERJEEA, R., IQBAL, J. (2004). 3D-QSAR CoMFA, CoMSIA Studies on Substituted Ureas as Raf-1 Kinase Inhibitors and its Confirmation with Structure-Based Studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12**: 6415-6425.
- TROMELIN, A., GUICHARD, E. (2003). Use of Catalyst in a 3D-QSAR Study of the Interactions between Flavor Compounds and β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 1977-1983.
- TSE-DINH, Y. C. (1998). Bacterial and Archeal Type I Topoisomerases. **1400**: 19-27.
- TUTE, M. S. (1990). Quantitative Drug Design, Comprehensive Medicinal Chemistry, ed. C. A. Ramsden, Pergamon Press, Oxford, **4**: 1-7.
- UNGER, S. H., HANSCH, C. (1976). *Prog. Phys. Org. Chem.*, **12**: 91.
- VAN DE WATERBEEMD, H., TESTA, B. (1987). *Adv. Drug. Res.*, **16**: 85-225.
- VESELOVSKY, A. V., IVANOV, A. S. (2003). *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, **3**: 33-40.
- VOET, D., VOET, J. G. (1995). Nucleic Acid Structures and Manipulation. *Biochemistry*, 2nd ed., John Wiley&Sons Inc., 848-914.
- WANG, J. C. (1971). Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω . *J. Mol. Biol.*, **55**: 523-533.

- WANG, J. C. (1996). DNA Topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**: 635-692.
- WANG, Y., CHIU, J. F., HE, Q. Y. (2005). Proteomics in Computer Aided Drug Design. *Current Computer-Aided Drug Design*, **1**: 43-52.
- WATSON, J. D., CRICK, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic acids. *Nature*, **171**: 737-738.
- WAYNE, L. G. (1994). Cultivation of Mycobacterium for Research Purposes. *Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control*, 73-83.
- WILLIAMS, N. L., HOWELLS, A. J., MAXWELL, A. (2001). Locking the ATP-operated Clamp of DNAGyrase: Probing the Mechanism of Stand Passage. *J. Mol. Biol.*, **306**: 969-984.
- XU, M., ZHANG, A., HAN, S., WANG, L. (2002). Studies of 3D-Quantitative Structure–Activity Relationships on a Set of Nitroaromatic Compounds: CoMFA, Advanced CoMFA and CoMSIA. *Chemosphere*, **48**: 707–715.
- YALÇIN, İ., ŞENER, E. (1996). *İEİS Aylık Rapor*, **4**: 99-101.
- YANG, F., LU, G. (1996). Cloning, Expression, Purification and Characterization of DNA Topoisomerase I of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*, **178**: 63-69.
- YANG, W. (2000). Structure and Function of Mismatch Repair Proteins. *Mut. Res.*, **460**: 245-256.
- ZAHRADNIK, R. (1962). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **135**: 311.
- ZHAOA, W. N., YUA, Q. S., ZOUA, J. W., MAB, M., ZHENGGA, K. W. (2005). Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship Study for Analogues of TQXs Using CoMFA and CoMSIA. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **723**: 69–78.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Berk

Soyadı: Zafer

Doğum Yeri ve Tarihi: Bandırma, 1979

Uyruğu: T.C.

Askerlik Durumu: Tecilli

İletişim Adresi ve Telefonu: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya

AD Araştırma Laboratuvarı, 06100 Tandoğan, Ankara. Tel: +90 312 2126805-2253

II- Eğitimi

- Yüksek Lisans (Danışman: Prof. Dr. Esin AKI-ŞENER)
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2002- 2005)
- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (1997-2002)
- Ankara Üniversitesi Hazırlık Sınıfı - İngilizce (1997-1998)
- Ankara Çankaya Anadolu Lisesi - Almanca (1990-1997)

III- Ünvanları

- Eczacı (2002)

IV- Mesleki Deneyimi

- North Carolina Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Moleküler Modelleme Laboratuvarları, A.B.D. (2005)
- Depar Kozmetik A.Ş. - Mesul Müdürlük (2004 - 2005)
- Ruhsatlandırma Stajı, Pfizer İlaçları A.Ş., İstanbul (2001)
- Ordu İlaç Fabrikası Stajı, Ankara (2001)
- Eczane Stajı (Morgental Eczanesi), Zürih, İsviçre (2000)
- Eczane Stajı (Bahçelievler Eczanesi), Ankara (1999)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Türkiye Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım ve Geliştirme Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

- I. YILDIZ, O. TEMİZ-ARPACI, B. ZAFER, B. TEKİNER-GULBAS, S. ALPER, E. AKI-SENER, I. YALCIN, A. PINAR, P. YURDAKUL, L. ACAN, Pharmacophore Analysis of Some Isosteric Fused Heterocyclics as Topoisomerase II Inhibitor, 15th European Symposium on Quantitative-Structure Activity Relationships & Molecular Modelling, 05-10 September 2004, İstanbul, Turkey.
- O. TEMİZ-ARPACI, I. YILDIZ, E. AKI-SENER, I. YALCIN, B. TEKİNER-GULBAS, S. ALPER, B. ZAFER, E. OKSUZOGLU, N. DIRIL, 2D-QSAR Studies of Some Benzoxazoles and Benzimidazoles, 15th European Symposium on Quantitative-Structure Activity Relationships & Molecular Modelling, 05-10 September 2004, İstanbul, Turkey.
- I. YILDIZ, O. TEMİZ-ARPACI, B. TEKİNER-GULBAS, I. YALCIN, E. AKI-SENER, B. ZAFER, CoMFA and CoMSIA Studies of Microbiologically Active 5-(Substituted-Carbonylamino)-2-Benzylbenzoxazoles, 4th International Symposium on Pharmaceutical Chemistry, 17-19 September 2003, İstanbul, Turkey.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

- Ödüller: Ankara Üniversitesi - Süper Öğrenci (1999)
- Katıldığı Sempozyumlar:
 - The European COST Action B16 Symposium on Multidrug Resistance Reversal, 13-14 Mayıs 2005, Antalya.
 - Euro-QSAR 2004: The 15th European Symposium on Quantitative Structure Activity Relationships & Molecular Modeling, 05-10 Eylül 2004, İstanbul.
 - 4th International Symposium on Pharmaceutical Chemistry, 17-19 Eylül 2003, İstanbul.
 - ISOPS 7: International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Haziran 2002, Ankara.
 - ISOPS 6: International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Haziran 2000, Ankara.

- Verdiği Seminerler:
 - Topoizomeraz II Enzimi ve 3D-QSAR Çalışmaları, 30 Mart 2005, North Carolina Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Chapel Hill, NC, ABD.
 - Moleküler Modelleme Teknikleri, 13 Haziran 2003, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.

VIII- Diğer Bilgiler

- Ankara Eczacı Odası Üyeliği (2003-)
- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bilgisayar Komisyonu üyesi.
(2000 - 2004)
- Uluslararası Eczacılık Öğrencileri Federasyonu (IPSF)'in Ankara kolu olan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğrencileri Grubu (AUPSG)'de yayın sorumluluğu görevi ve başkanlık görevleri.
(1999-2001)