

**HIV-1 PROTEAZ ENZİMİNİN İNHİBİTÖRLERİYLE
ETKİLEŞİMİ ESNASINDAKİ KONFORMASYONEL
DEĞİŞİKLİKLERİN TEORİK İNCELEMESİ VE YENİ
ANALOGLARIN TASARIMI**

**THEORETICAL INVESTIGATION ON CONFORMATIONAL
CHANGES OF HIV-1 PROTEASE ENZYME DURING
INTERACTION WITH ITS INHIBITORS AND DESIGN OF
NEW ANALOGUES**

MERVE SENEM AVAZ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2011

ANKARA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından KİMYA ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....

Üye (Danışman) :.....

Üye :.....

Üye :.....

Üye :.....

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil Denizli
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

HIV-1 PROTEAZ ENZİMİNİN İNHİBİTÖRLERİYLE ETKİLEŞİMİ ESNASINDAKİ KONFORMASYONEL DEĞİŞİKLİKLERİN TEORİK İNCELEMESİ ve YENİ ANALOGLARIN TASARIMI

MERVE SENEM AVAZ

ÖZ

HIV Proteaz enzimi, HIV virüsünün yayılmasında en etkili yapıdır. Bu enzimin inhibe edilmesi sonucunda, virüsün diğer hücrelere saldırması ve yayılması durdurulmuş olacaktır. HIV Proteaz inhibitörlerinin kombine terapide kullanımına 1995 yılında başlanmıştır.

Günümüzde AIDS tedavisinde kullanılan HIV Proteaz(PR) ilaçlarının (inhibitörlerin) çoğu, **peptidomimetik** yapıya sahiptir ve enzimin “ **substrat bağlanma bölgesine**” bağlanır. Ne yazık ki, bütün bu ilaçlara karşı virüs direnç geliştirmiş ve ilaçların etkisi giderek azalmıştır. Bu nedenle yeni daha etkili **peptidomimetik** inhibitörlere veya **proteaz** enzimidaki substrat bağlanma bölgesi dışında alternatif bölgeleri hedefleyen yeni ilaçlar tasarlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllardaki araştırmalar, **Proteaz** enziminin “ **kanat bölgesi**” kısmını hedef alan ilaçların tasarlanmasına yönelmiştir. Yapılan çalışmalar, beta-laktam bileşiklerinin enzimin yeni hedef bölgesi olan “ **kanat bölgesi**” ile etkileştiğini göstermiştir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında X-Ray yapısı bilinen **14** HIV-Proteaz kompleksi için, 3 ayrı doking yönteminin; **FlexX**, **Autodock (AD)** ve **Autodock (AD) Vina**, validasyonu yapılmıştır. Literatürde, sadece HIV PR test seti için yapılmış herhangi bir doking programlarının karşılaştırılması ve validasyon çalışması bulunmamaktadır. Test seti içinde 7 çift FDA onaylı ilaç; **Ritonavir**, **İndinavir**, **Nelfinavir**, **Darunavir**, **Saquinavir**, **Lopinavir** ve **Tipranavir** ve bu ilaçların HIV PR enzimiyle kompleksleşmiş yapılarının X-Ray koordinatları bulunmaktadır. Her kompleks çifti enzimin doğal ve/veya mutant (aktif bölge aminoasitleri dışında) yapısını içermekte ve bunlar enzimin “ **substrat bağlanma bölgesine**” ile etkileşmektedir. Hesaplamalarda, HIV-Proteaz enziminin “**substrat bağlanma bölgesi**”nde yer alan aminoasitler için ligandın 6.5 Å etrafı aktif bölge (doking yapılacak bölge) olarak

seçilmiştir. Uygun parametreler saptandıktan sonra, deneysel X Ray yapısı ile hesaplama sonucunda elde edilen iki yapı RMSD sonuçlarının karşılaştırılması ile yöntemin doğruluğu test edilmiştir. İncelenen üç yöntem arasında yapılan karşılaştırmalar sonucunda, HIV Proteaz enzimi için **AD Vina**'nın en iyi sonucu verdiği bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci kısmında, literatürde hiç bir hesapsal çalışmanın yer almadığı, yeni hedef bölge “ **kanat bölgesi**” için doking işlemleri yapılmıştır. Bu amaçla, literatürde deneysel aktiviteleri bilinen beta-laktam bileşiklerine, **AD Vina** programı ile HIV-PR enziminin etkileştiği bölgeyi araştırmak için serbest doking hesaplamaları yapılmış ve beta-laktam bileşikleri için enzimin hedef bölgesinin “**kanat bölge**” olduğu bulunmuştur. Hesaplama sonucunda elde ettiğimiz değerler ile deneysel aktivite değerleri arasında çok yüksek bir uyum gözlenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında ise hem kendi sentezlediğimiz hem de **ZINC** veri bankası kullanılarak hazırlanan veri seti için görsel ligand taraması yapılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda, sentezlediğimiz bileşiğin yüksek aktiviteye sahip, ümit verici bir aday inhibitör olabileceği bulunmuştur.

Araştırma sonucunda elde ettiğimiz veriler, hem yeni doking programlarının yazılımı ve test edilmesine hem de enzimin alternatif “ kanat bölgesi” ile etkileşecek yeni ve etkili aday inhibitörlerin tasarlanmasına ve sentezlenmesine katkıda bulunacaktır.

Anahtar Sözcükler: AIDS, HIV Proteaz, Doking, Görsel Ligand Taraması, Doking Metodu Validasyonu, Beta Laktam

Danışman: Prof. Dr Vildan ADAR, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya Anabilim Dalı

THEORETICAL INVESTIGATION ON CONFORMATIONAL CHANGES OF HIV-1 PROTEASE ENZYME DURING INTERACTION WITH ITS INHIBITORS and DESIGN OF NEW ANALOGUES

MERVE SENEM AVAZ

ABSTRACT

HIV Protease enzyme has been the most important factor in virus infection. Inhibition of this enzyme will result with the end of virus attack into other cells and therefore spreading of the infection will be prevented. In order to fight with AIDS, HIV Protease inhibitors have been using in combination therapy since the year of 1995.

Most of the HIV Protease (PR) drugs (inhibitors) marketed today are in **peptidomimetic** structure and bind to “**substrat binding region**” of the enzyme. Unfortunately, the virus has somehow developed resistance against HIV PR inhibitors that are currently in use. Design of some new and more effective peptidomimetics or discovery of new drug candidates that targets regions of the enzyme different than substrate binding site therefore draws most attention of the pharmaceutical researchers. Research trends on this concept has directed to design of the inhibitors that targets the flap region of the enzyme. In addition, some studies in the literature are emphasizing the interaction between beta-lactam compounds and the flap region of the enzyme.

The first part of this study consists of the validation of three different docking methods; **FlexX**, **AutoDock (AD)** and **AutoDock (AD) Vina**, against 14 HIV PR complexes. To our knowledge, there are no such study found out in the literature, that focus on the comparison of the docking programs and validation of docking methods for a specific dataset of HIV PR. Our dataset of HIV PRs composes of 7 couples of FDA approved drugs; **Ritonavir**, **Índinavir**, **Nelfinavir**, **Darunavir**, **Saquinavir**, **Lopinavir** and **Tipranavir** respectively, and the X-Ray coordinates of these inhibitors in complex with their HIV PR enzyme structures. Each complex couple contains the wild type and/or mutant (mutation except the active site aminoacids) structures of enzymes and inhibitors that interact with the “**substrate**

binding region” of the enzyme. For computations, aminoacids that surrounds 6.5 Å of ligands were selected as the active site (docking region) of the HIV PR enzyme. After the appropriate parameters were determined, accuracy of method was tested by comparing the the X Ray structures with RMSD results obtained from computations. In the end of the comparisons between the three investigated method, AD Vina has been found out to gave the best results.

In the second part of the study, docking procedures has been carried out for a new target, the flap region, that haven't studied earlier in the literature. For this purpose, beta lactam compounds with known experimental activities were docked freely on HIV PR enzyme in order to search for possible interaction regions and it was found out that these copmounds do interact with the flap region of the enzyme. The results obtained from computations showed a very well correlation with experimental values.

The final part of our study includes the virtual ligand screening of a set of beta lactam compounds into the flap region of HIV PR. For this study, beta lactams dataset was extracted from ZINC database and enriched with the compounds we have synthesized. The computations was resulted with a statement that the compound we have synthesized showed high affinity for the enzyme and could be considered as a promising candidate for HIV PR inhibition.

The results obtained from this study will contribute both to the design and synthesis of some new and potent inhibitor candidates that interact with alternative flap region of the enzyme and to the development and testing of new docking tools.

Keywords: AIDS, HIV Protease, Docking, Virtual Ligand Screening, Docking Method Validation, Beta-lactams

Advisor: Prof. Dr Vildan ADAR, Hacettepe University, Department of Chemistry, Organic Chemistry Division

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bana her türlü konuda ilham veren ve tecrübeleriyle ufkumu genişleten değerli danışmanım ve sevgili hocam Prof. Dr. Vildan ADAR'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezin yazımı süresince esirgemediği yapıcı katkılarından dolayı sayın hocalarım Prof. Dr. Erdem Büyükbıngöl ve Prof. Dr. Canan Ünaleroğlu'na;

Bilgi ve deneyimleriyle bana daima yardımcı olan hocalarım Dr. Hülya Şenöz ve Dr. Barış Temelli'ye;

Dostlukları ve sonsuz destekleri için değerli arkadaşlarım Araşt. Gör. Demet Baykan, Seçkin Fikirdeşici, Onur Ülgen ve Onur Alten'e;

En zor zamanlarımda yanımda olmayı her zaman başarabilen ve beni her konuda cesaretlendirip bu tez çalışmasını tamamlamamı sağlayan sevgili dostum Serhan Şuvak'a,

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölümü çalışanlarına;

Çalışmamızı desteklerinden dolayı TÜBİTAK 106T088, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi BAP 07A601009 ve BAP 010D08601004 nolu projelere;

Ve son olarak, tüm hayatım boyunca bana olan inançlarını asla kaybetmeyip desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni bu günlere getiren aileme; sevgili annem ve canım kardeşime sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim...

SENEM AVAZ

DİZİN

Sayfa Numarası

ÖZ	i
.....	
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
DİZİN	vi
.....	
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Protein	3
2.2. Enzim Ligand Etkileşimi	9
2.2.1. Tersinir inhibitörler	10
2.2.2. Tersinmez inhibitörler	11
2.2.2. Geçiş hali inhibitörleri	11
2.3. AIDS & HIV Proteaz	12
2.3.1. HIV proteaz yapısal ve fonksiyonel özellikleri	13
2.3.2. HIV proteaz inhibitörleri	15
2.3.3. HIV proteaz üzerine yapılmış doking çalışmaları	19
2.3.4. HIV proteaz inhibitörü olarak Beta Laktam molekülleri	22
2.4. Protein Veritabanı	23
2.5. Moleküler Doking Yöntemi	24
2.5.1. Konformasyonel tarama algoritmaları	25
2.5.2. Skorlama ve sıralama fonksiyonları	27
2.5.3. Kullanılan doking programları	29
2.5.3.1. FlexX	29
2.5.3.2. AutoDock ve AutoDockTools	30

2.5.3.3. AD Vina	31
2.5.3.4. İncelenen doking programlarının farkları	31
2.6. Görsel Ligand Taraması	33
2.6.1. Ligand veri tabanı: ZINC.....	35
2.7. Kullanılan yardımcı programlar: Chimera	36
3. DENEYSEL METOD	37
3.1. Doking Metodu Validasyonu	37
3.1.1.HIV proteaz yapıları için veri setinin hazırlanması	37
3.1.2. Ligand moleküllerin hazırlanması	40
3.1.3. HIV proteaz enzimlerinin hazırlanması	41
3.1.4. FlexX programı ile doking	46
.....	
3.1.5. AutoDock programı ile doking.....	47
3.1.6. AD Vina programı ile doking	48
3.2. Beta Laktam Moleküllerinin Doking Çalışması	49
3.3. Görsel Ligand Taraması	53
3.4. Bazı Beta Laktam Bileşiklerinin Sentezi.....	55
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	57
4.1. Doking Metodu Validasyon Sonuçları	55
4.2. Vina Doking Programının Beta Laktam Moleküllerine Uygunluğu	63
4.3. Beta Laktam Bileşikleri İçin Görsel Ligand Taraması Sonuçları	64
5. YORUMLAR ve ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	75
EKLER DİZİNİ	83
ÖZGEÇMİŞ	96

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa Numarası
Şekil 2.1. Peptid bağı oluşum reaksiyonu	5
Şekil 2.2. Polipeptid zinciri omurgası ve yan zincirler	5
.....	
Şekil 2.3. Alfa sarmalı yapısı	6
Şekil 2.4. Beta katmanı yapısı	7
Şekil 2.5. Bir proteinin üçüncül yapısının gösterimi	7
Şekil 2.6. Enzim ile substrat arasındaki indüklenmiş uyum modeli	8
Şekil 2.7. Protein-ligand etkileşiminin simgesel gösterimi.....	9
Şekil 2.8. HIV yaşam döngüsü diagramı.....	13
Şekil 2.9. HIV proteaz'ın Tipranavir ile kompleks yapısı	14
Şekil 2.10. Peptid substratı üzerinde proteaz bağlanma bölgeleri	15
.....	
Şekil 2.11. HIV proteaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları	17
Şekil 2.12. Saquinavir ilacı üzerinde proteaz bağlanma bölgeleri.....	19
Şekil 2.13. Protein veritabanının web sayfası görünümü	23
Şekil 2.14. Moleküler doking yönteminin şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.15. Doking yöntemlerinin atıf sayılarına göre dağılımı	25
Şekil 2.16. FlexX programının grafiksel kullanıcı ara yüzü	29
Şekil 2.17. AutoDockTools grafiksel kullanıcı ara yüzü	30
Şekil 2.18. AD Vina için hazırlanan konfigürasyon dosyası örneği.	31
Şekil 2.19. Görsel ligand taraması akış şeması.....	34
Şekil 2.20. ZINC veri tabanının web sayfası görünümü	35
Şekil 2.21. Chimera programının kullanıcı ara yüzü	36
Şekil 3.1. Veri setindeki FDA onaylı HIV PR ilaçlarının kimyasal yapıları	38
Şekil 3.2. 1sdu yapısının ligandının Chimera ile FlexX doking hazırlığı	40
Şekil 3.3. 2nmz yapısı için ADT ile ligand hazırlık prosedürü	41
Şekil 3.4. FlexX GUI ile 1rl8 yapısı için aktif bölgenin tanımlanması	42
Şekil 3.5. 2nmz yapısı için ADT ile hedef molekül hazırlama prosedürü	43
Şekil 3.6. 2o4p yapısı için hazırlanan grid kutusu hazırlama örneği	44
Şekil 3.7. 2o4p yapısı için hazırlanan gpf örneği	45

Şekil 3.8. 2o4p yapısı için hazırlanan dpf örneği.	45
Şekil 3.9. FlexX ile seçilen ligand ve aktif bölge aminoasitleri.	46
Şekil 3.10. FlexX programıyla hazırlanan doking parametreleri örneği.....	47
Şekil 3.11. AD için hazırlanan doking parametreleri.	48
Şekil 3.12. Vina için hazırlanan konfigürasyon dosyası içeriği ve cygwin ile gerçekleştirilen doking çalışması	49
Şekil 3.13. Beta laktam moleküllerin çizilmesi ve optimizasyonu	50
Şekil 3.14. Seçilen beta laktam bileşiklerinin kimyasal yapıları.....	51
Şekil 3.15. ADT ile hazırlanan ligand *.pdbqt dosyalarının görüntüsü	52
Şekil3.16. Vina dokingi otomatik hale getirmek için yazılan komut dosyası..	53
.....	
Şekil 3.17. ZINC web sayfasında tarama seçenekleri	54
.....	
Şekil 3.18. ZINC veri tabanında tarama sonucunda elde edilen moleküllerin özelliklerini ve sağlayıcılarını gösteren web sayfası görünümü	55
Şekil 3.19. Sentezlenen beta laktam bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	56
.....	
Şekil 4.1. Doking programları ile elde edilen doğru doking yüzdeleri.....	58
Şekil 4.2. Tüm doking programları ile gerçekleştirilen doking sonuçlarının RMSD değerlerinin 2 Å limitinde değerlendirilmesi	59
Şekil 4.3. Ortalama RMSD değerleri ve karşılık gelen PDB kodları	62
Şekil 4.4. Vina doking ile elde edilen sonuçlar ile deneysel % inhibisyon değerlerinin korelasyonu	64
Şekil 4.5. Görsel ligand taraması sonucunda elde edilen RMSD değerlerinin tümünün 2 Å limitinde gösterimi.....	65
Şekil 4.6. Görsel ligand taraması sonucunda en iyi bağlanma afinitesi değerlerini veren beta laktam bileşiklerinin fonksiyonel grupları.....	66

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa Numarası
Tablo 2.1. Doğal amino asitlerin gösterimi ve kimyasal özellikleri	3
Tablo 2.2. Literatürde bulunan, HIV proteaz içeren karşılaştırmalı doking ve doking validasyonu çalışmaları	20
Tablo 3.1. HIV proteaz veri seti için seçilen X Ray komplekslerinin kristalografik özellikleri	39
Tablo 3.2. ligandın 6.5 Å etrafında seçilen aktif bölge amino asitleri	43
Tablo 4.1. Tüm doking çalışmaları sonucunda elde edilen genel doking sonuçları	57
Tablo 4.2: Tüm doking programları ile elde edilen doğru poz sayıları	60
Tablo 4.3. Tüm dokingler sonucunda en iyi pozun sıralaması	61
Tablo 4.4. Tüm dokingler sonucunda elde edilen RMSD ortalamaları	62
Tablo 4.5. Beta laktam doking sonuçları ve % inhibisyon değerleri	64
Tablo 4.6. Görsel ligand taraması sonucu elde edilen düşük bağlanma afiniteli doking sonuçlarının en iyi 20'si	71

KISALTMALAR

HIV: İnsan immün bağıışıklık yetmezliği virüsü (Human immunodeficiency virus)

AIDS: Edinilmiş immün sistem yetmezliği sendromu (Acquired Immunodeficiency syndrome)

YEART: yüksek etkili antiretroviral terapi (highly active antiretroviral therapy, HAART)

FDA: Birleşik Devletler Besin ve İlaç heyeti

HIV PR: HIV proteaz enzimi

RNA: Ribonükleik asit

VdW: van der Waals etkileşimleri

DNA: Deoksiribonükleik asit

Gp120: Glikoprotein 120

Gp41: Glikoprotein 41

CD4: immün sisteminin bir parçası olan reseptörleri taşıyan hücreler (T-helper cells)

CCR5: T- hücreleri üzerinde bulunan bir reseptör

CXCR4: T- hücreleri üzerinde bulunan bir reseptör

Host hücre: Konak hücre

MD: Moleküler Dinamik simülasyonu

ADME: Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım

PDB: Protein veritabanı

NMR: Nükleer magnetik rezonans

X-Ray: X-ışınları

XRD: X-ışınları kırınımı

AD: AutoDock doking programı

ADT: AutoDockTools görsel kullanıcı arayüzü

AD Vina: AutoDock Vina doking programı

AD4: AutoDock4

RMSD: Etkin değer (Orijinal yapıdan sapmanın karekökü)

npts: Grid kutusunda bulunan nokta sayısı

gpf: Grid parametre dosyası

dpf: Doking parametre dosyası

Config: Konfigürasyon dosyası

DFT: Density functional teorisi

Script: Bilgisayar alfabesine göre elle girilmiş komutlar

JME: Java moleköl düzenleyici

Kcal: Kilo kalori

Ki: İnhibisyon sabiti

B.E: Bağlanma enerjisi

nRotB: Döndürülebilir bağ sayısı

LGA: Lamarckian genetik algoritma

GUI: Grafiksel kullanıcı arayüzü

Rit (R_1, R_2): Ritonavir

Ind (I_1, I_2): Indinavir

Nelf (N_1, N_2): Nelfinavir

Dar (D_1, D_2): Darunavir

Saq (S_1, S_2): Saquinavir

Lop (L_1, L_2): Lopinavir

Tipr (T_1, T_2): Tipranavir

Ala: Alanin

Arg: Arginin

Asn: Asparagin

Asp: Aspartik asit

Cys: Sistein

Glu: Glutamik asit

Gln: Glutamin

Gly: Glisin

His: Histidin

Ile: İzolösin

Leu: Lösin

Lys: Lizin

Met: Metionin

Phe: Fenilalanin

Pro: Prolin

Ser: Serin

Thr: Treonin

Trp: Triptofan

Tyr: tirozin

Val: Valin

1. GİRİŞ

HIV proteaz enzimi, HIV virüsünün yayılmasında en etkili faktörlerden biri olduğundan AIDS hastalığı tedavisinde önemli bir unsurdur. Bu enzimin HIV virüs replikasyonundaki kilit rolünün yanı sıra literatürde günümüze kadar bu konuda yapılmış birçok enzimatik ve kinetik çalışmanın mevcut olması, ayrıca enzimin çözülmüş X-Ray yapısının çokluğu ve nedeniyle yapı temelli ilaç tasarımında önemli bir hedef molekül haline getirmiştir.

Günümüzde HIV proteaz inhibisyonunda kullanılan ilaçların, diğer tüm AIDS tedavi yöntemleri gibi birçok yan etkisi bulunmaktadır. Ayrıca virüsün vücut içerisinde mevcut ilaçlara karşı geliştirdiği direnç bu ilaçların çoğunlukla etkisiz kalmasına neden olmaktadır. Kullanılan HIV proteaz inhibitörlerinin hepsinin peptid yapısında olması da ayrıca bileşiklerin sentezini zorlu kılmaktadır. Bu noktada HIV virüsünün inhibisyonunda yeni ve virüste gelişen mutasyonlara karşı etkili inhibitör adaylarına ihtiyaç duyulmaktadır. HIV proteaz enziminin virüsün yaşam döngüsünde bilinen en etkili hedeflerden biri olması da bizi bu ihtiyaca yönelik çözümün bu enzimden geçtiğine yöneltmiştir. AIDS tedavisinde kullanılan HIV proteaz inhibitörleri enzimin aktif bölgesi ile etkileşim gösterir. Dolayısıyla virüste ilaçlara karşı oluşan direnç de enzimin ilaçlarla etkileşimi için gerekli aktif bölgenin inaktivasyonunu içerir. Bu sebeple geliştirilmesi amaçlanan yeni inhibitörlerin enzimi aktif bölge dışında bir bölgeden inhibe etmesi gerekmektedir. Son yıllarda araştırmalar enzimin “kanat bölgesi” kısmına yönelmiştir. Beta laktam bileşiklerinin antibakteriyel, antifungal gibi birçok özelliklerinin yanı sıra anti-HIV etkisi olduğu rapor edilmiştir. Bu inhibitörlerin enzimle kanat bölgesi adı verilen farklı bir bölgeden etkileşerek enzimi inhibe ettikleri bilinmektedir. Bu sebeple çalışmamız, hem sentezlediğimiz hem de literatürde bulunan ve HIV proteaz inhibitörü olarak kullanılan, yeni ve etkin beta laktam bileşiklerinin tasarımını amaçlamaktadır.

Enzimatik çalışmaların yanı sıra, günümüzde ilaç tasarımı, hesaplamaya dayalı yöntemlere yönelmektedir. Bu yöntemlerin başında ise enzim-inhibitör yapılarının moleküler modellemesi ve doking çalışmaları gelmektedir. Bu çalışma bir molekülün proteine bağlanarak kararlı bir kompleks oluşturması sırasında tercih edilen

yönlenmeyi tahmin etmede kullanılan doking metodu ile yeni HIV proteaz inhibitörlerinin tasarımı içermeaktadır.

Bu tez çalışması 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada doking metodu validasyonu yapılarak HIV proteaz yapıları için uygun doking programı ve uygun kristal yapı seçilmiştir. İkinci aşamada ise beta laktam inhibitörlerinin doking çalışması için kullanılan programın deneysel verilere uygun sonuçlar verip vermediği test edilmiş, üçüncü aşamada ise yeni beta laktam inhibitörlerinin tasarımı için görsel ligand taraması gerçekleştirilmiştir. Görsel ligand taraması veri setine sentezlediğimiz beta laktam yapıları da eklenerek veri seti genişletilmiştir.

Tezin birinci aşamasında, HIV proteaz yapılarının bilinen HIV proteaz inhibitörleriyle elde edilmiş X-Ray kristalografik yapılarından yola çıkılarak, AutoDock, AD Vina ve FlexX doking programları ile bir metod validasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin amacı HIV proteaz yapısı için rapor edilmiş yüzlerce X-Ray yapısı arasından en iyi yapıyı seçmek, aynı zamanda mevcut doking yöntemleri içerisinde bu enzim yapısı için en uygun olanını tayin etmektir.

İkinci aşamada, literatürde deneysel sonuçları bilinen ve sentezlenmiş beta laktam bileşikler için, enzimin kanat bölgesine doking hesaplamaları yapılarak deneysel sonuçlarla uyumunun incelenmiştir.

Metod validasyonu arkasından, belirlenen beta laktam inhibitörleri için görsel ligand taraması adı verilen bir yöntem ile umut verici HIV proteaz inhibitörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Görsel ligand taramasında kullanılan beta laktam veri setine deneysel olarak sentezlenen beta laktam molekülleri de ilave edilerek veri tabanı biraz daha genişletilmiş ve görsel tarama sonucunda etkili olabilecek inhibitör adayları ve bu adaylarda bulunan bazı ortak fonksiyonel gruplar belirlenmiştir.

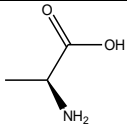
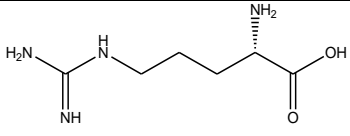
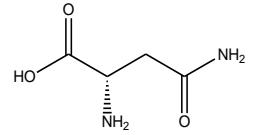
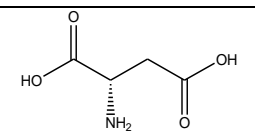
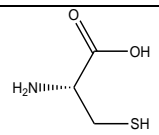
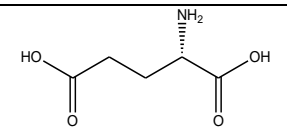
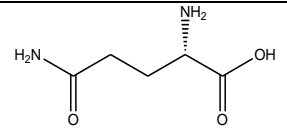
Bu çalışmanın amacı, HIV virüsünün direncini azaltacak veya yok edecek HIV PR enziminin aktif bölge dışında alternatif bir bölgesini hedefleyen etkili ilaç aday moleküllerinin tasarlanmasıdır. Araştırma sonucunda elde edilen bulgular hem yeni doking programlarının yazılımı ve geliştirilmesine, hem de yeni bileşiklerin sentezine katkıda bulunacaktır.

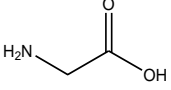
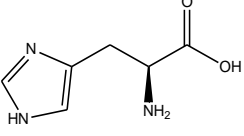
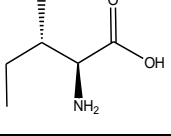
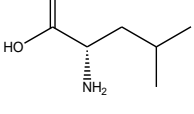
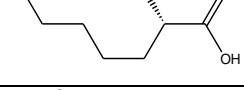
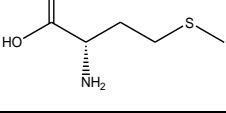
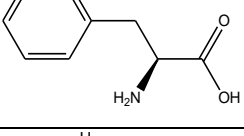
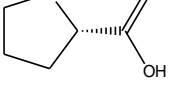
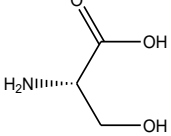
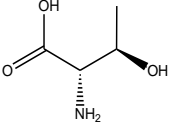
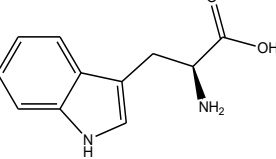
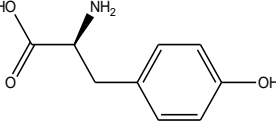
2. GENEL BİLGİLER

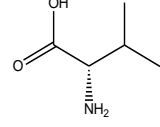
2.1. Protein

Proteinler, düz bir zincir halinde düzenlenmiş ve küresel formda katlanmış amino asitlerden oluşan organik bileşiklerdir. Protein zincirindeki amino asitler karboksilik asit ve amin grupları arasında yapılan peptid bağlarıyla birbirlerine bağlanırlar.

Proteinler ilk olarak Hollandalı kimyager Gerhardus Johannes Mulder tarafından tanımlanıp İsveçli kimyager Jöns Jakob Berzelius tarafından 1838 yılında isimlendirilmiştir. Doğada 20 çeşit amino asit bulunur ve tüm proteinler bu 20 amino asitin farklı dizilimlerinden türemektedir. Doğada bulunan amino asitlerin birçoğu L-formundadır. Doğada bulunan 20 amino asidin yapıları ve özellikleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

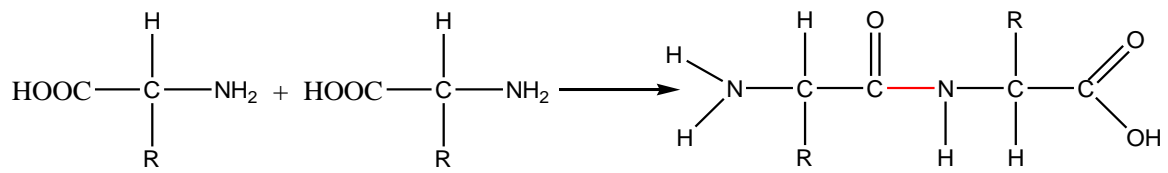
Amino asit ismi	Tek harf kodu	Üç harf kodu	Özellik	Yapısı
Alanin	A	Ala	Hidrofobik	
Arginin	R	Arg	Bazik	
Asparagin	N	Asn	Nötr	
Aspartik asit	D	Asp	Asidik	
Sistein	C	Cys	Nötr	
Glutamik asit	E	Glu	Asidik	
lutamin	Q	Gln	Nötr	

Glisin	G	Gly	Temel	
Histidin	H	His	Bazik	
İzolösin	I	Ile	Hidrofovik	
Lösin	L	Leu	Hidrofovik	
Lizin	K	Lys	Bazik	
Metionin	M	Met	Nötr	
Fenilalanin	F	Phe	Hidrofovik	
Prolin	P	Pro	Temel	
Serin	S	Ser	Nötr	
Treonin	T	Thr	Nötr	
Triptofan	W	Trp	Hidrofovik	
Tirozin	Y	Tyr	Hidrofovik	

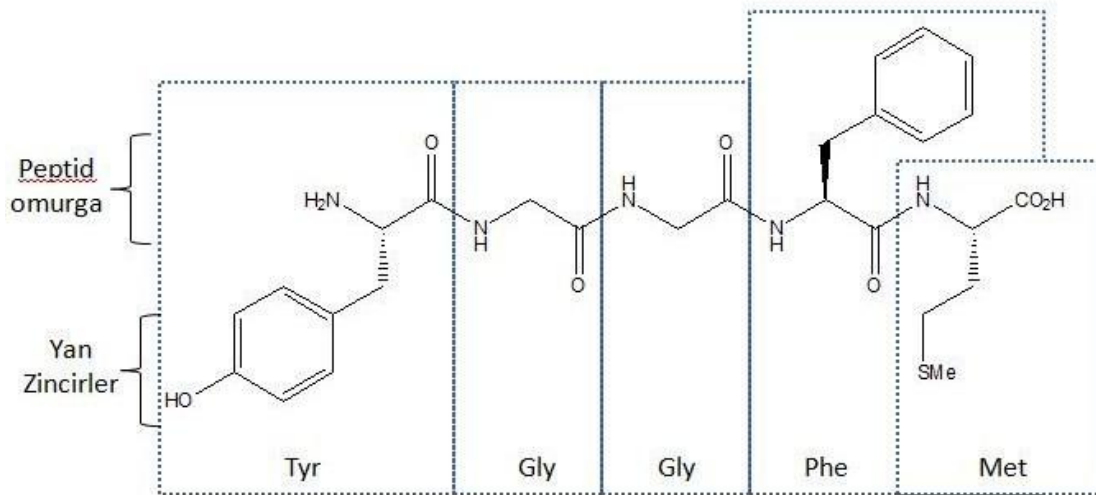
Valin	V	Val	Hidroforbik	
-------	---	-----	-------------	---

Tablo 2.1: Doğal amino asitlerin gösterimi ve kimyasal özellikleri

Protein içerisindeki amino asitler birbirlerine peptid bağları ile bağlanır. Peptid bağı, bir amino asidin karboksil grubuyla diğerinin amin grubu arasında gerçekleşir. Şekil 2.1 peptid bağı oluşum reaksiyonunu göstermekte, Şekil 2.2 ise bir polipeptid zincirinde peptid zinciri omurgası ve yan zincirleri tanıtmaktadır.



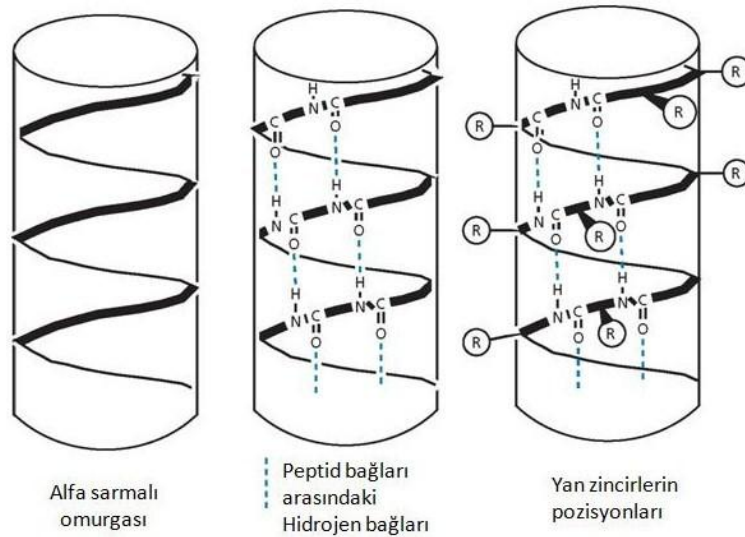
Şekil 2.1: Peptid bağı oluşumu reaksiyonu



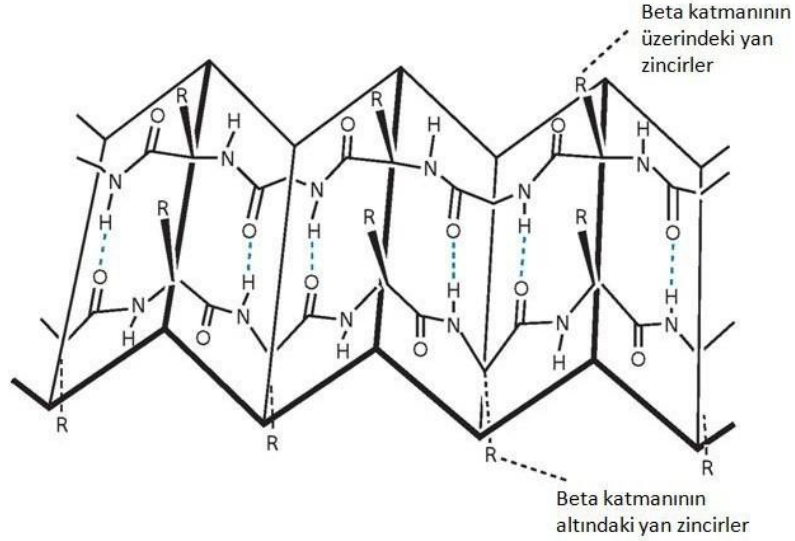
Şekil 2.2: Polipeptid zinciri omurgası ve yan zincirler

Proteinleri yapısal ve işlevsel olarak birbirlerinden farklı kılan, amino asit dizilimleri ve konformasyonlarının farklılığıdır. Çoğu protein benzersiz 3 boyutlu yapılarına katlanır. Proteinin kendiliğinden katlandığı yapısı doğal (native) konformasyonu olarak bilinir (Deechongit vd., 2004). Biyokimyacılar çoğu zaman protein yapısının 4 bölümde inceler:

- Birincil yapı: Aminoasit düz zincirine verilen addır. Proteinin 3 boyutlu yapısı veya fonksiyonu hakkında bilgi vermez.
- İkinci yapı: Hidrojen bağları ile kararlı kılınmış düzenli olarak yinelenen lokal yapılardan meydana gelir. En yaygın örnekleri alfa sarmalı, beta katmanı ve kıvrımlardır. İkincil yapılar lokal olduğu için, aynı proteinin içinde farklı ikinci yapılara sahip pek çok bölge bulunabilir. Alfa sarmalı ve beta katmanı yapıları Şekil 2.3 ve Şekil 2.4'te görülmektedir.
- Üçüncül yapı: Tek bir proteinin tamamının şeklidir. İkincil yapıların birbirleriyle olan uzaysal ilişkisini içerir. Proteinin üçüncül yapısı genelde lokal olmayan etkileşimler tarafından stabilize edilir. Bunlar hidrofobik çekirdekler, tuz köprüleri, hidrojen bağları ve translasyon sonrası modifikasyonlardır. Üçüncül yapı terimi genellikle eş anlamlı olarak katlanma terimi yerine kullanılır. Üçüncül yapı proteinin temel fonksiyonunu kontrol eder. Bir proteinin üçüncül yapısının gösterimi Şekil 2.5'te verilmiştir.
- Dördüncül yapı: Proteinlerin genellikle protein alt birimleri adı verilen, polipeptid zincirleri tarafından oluşturulan ve tek bir protein kompleksi halinde fonksiyon gösteren yapılarına verilen addır.



Şekil 2.3: Alfa sarmalı yapısı. Hidrojen bağlanmaları ve yan zincirlerin pozisyonları gösterilmiştir. (Graham L. Patrick, 2005)



Şekil 2.4: Beta katmanı yapısı (Graham L. Patrick, 2005)



Şekil 2.5: Bir proteinin üçüncül yapısının gösterimi (Graham L. Patrick, 2005)

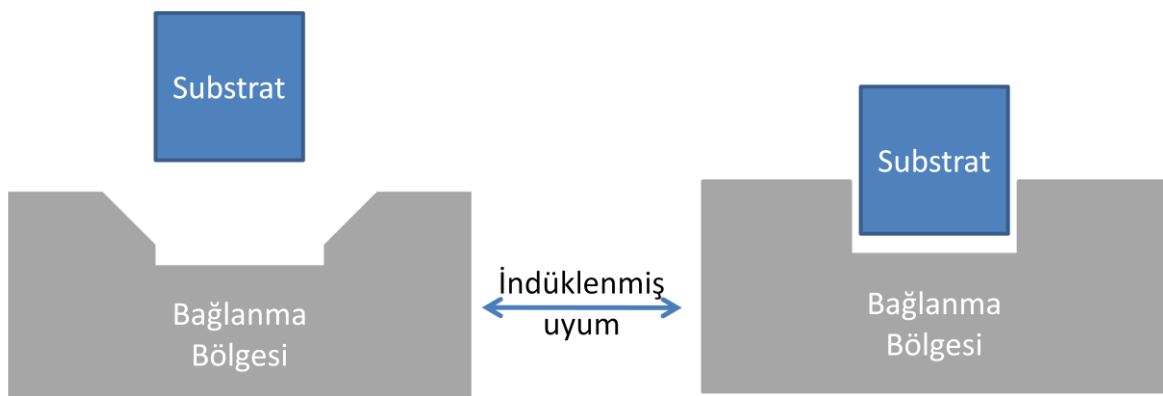
Biyolojik öneme sahip olan ve en önemli ilaç hedefleri olan proteinler, enzim ve reseptörlerdir. Bunlardan enzimler vücudun katalizörleri, reseptörler ise vücudun iletişimden sorumlu yapıları olarak tanımlanabilir.

Enzimler vücuttaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörlerdir. Diğer tüm katalizörler gibi enzimler de aktivasyon enerjisini düşürerek dahil oldukları reaksiyonu

hızlandırırlar. Enzim tarafından ürüne dönüştürülen moleküller substrat olarak adlandırılır. Enzim aktivitesi başka moleküller tarafından değiştirilebilir. Bir enzimin aktivitesini düşüren moleküllere inhibitör, enzim aktivitesini artıran moleküllere ise aktivatör adı verilir.

Reseptörler, vücutta hücre membranında veya hücre içerisinde sitoplazmada bulunan, hücreler arası iletişimi sağlayan bir veya daha fazla sinyal molekülünün bağlanabildiği yapılardır. Reseptöre bağlanan moleküllere ligand adı verilir. Bu ligand moleküller bir peptid veya nörotransmitör veya hormon gibi daha kısa moleküller olabilir. Reseptöre bağlanarak hücrenin cevabını tetikleyen moleküllere agonist, agonistin oluşturacağı bu cevabı engelleyen ligandlara ise antagonist adı verilir. Antagonist yapıların reseptöre bağlanması bir biyolojik cevap meydana getirmemekle birlikte agonist molekülün oluşturduğu cevabı engeller. Agonistler reseptöre bağlanarak belli bir hücresel cevabı tetiklerken antagonistler reseptörü bloke ederek hücresel cevabı durdururlar. Antagonist moleküller reseptörün bağlanma bölgesiyle etkileşerek agonist moleküllerin bağlanmasını engeller.

Proteinler esnek moleküllerdir. Yapılarının yukarıda değinilen seviyelerine ek olarak, proteinler görevlerini yaparken çeşitli yapıları arasında geçiş yapabilir. Bu fonksiyonel düzenlemeler kapsamında, proteinin üçüncül veya dördüncül yapılarına "konformasyonları" denir ve bu konformasyonlar arasındaki geçişlere konformasyonel değişim adı verilir. Bu tür değişiklikler bir substrat molekülün bir enzimin aktif bölgesine bağlanmasıyla indüklenir. Şekil 2.6, bir enzimin indüklenmiş uyum modunu göstermektedir.

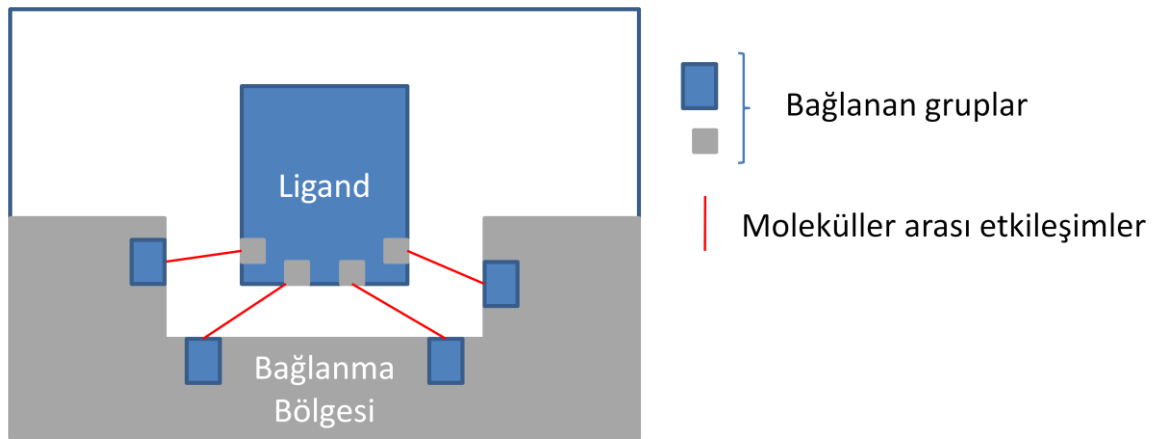


Şekil 2.6: Enzim ile substrat arasındaki indüklenmiş uyum modeli

2.2. Enzim-Ligand Etkileşimi

Ligandlar, biyolojik bir amaç için bir biyomolekülle kompleks oluştururlar. Başka bir deyişle ligandlar hedef proteinin bir bölgesine bağlanarak biyolojik bir sinyali tetiklerler.

Enzim ile ligand arasındaki bağlanma intermoleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu etkileşimler güçlüden zayıfa doğru kovalent, iyonik veya elektrostatik, hidrojen bağı, Van der Waals ve hidrofobik etkileşimler olarak sıralanabilir. Ligand ile hedef molekül arasında, tersinmez olarak gerçekleşen kovalent bağ ender olarak görülür. Tersinir olan etkileşimler ise daha sık gözlenmektedir. Bu etkileşimlerin simgesel bir gösterimi Şekil 2.7'de verimiştir.



Şekil 2.7: Protein-ligand etkileşiminin simgesel gösterimi

Ligand molekülün enzime bağlanması hedef enzimin kimyasal konformasyonu olan 3 boyutlu yapısını değiştirir. Ligand ile enzim arasında gerçekleşen bağlanmanın kuvvetine affinite adı verilir.

Biyokimyasal enzimler ve reseptörler bir ligandın bağlanmasıyla aktiveleşebilen büyük protein molekülleridir (Kenakin, 2006). Ligand ile enzim arasındaki bağlanma, enzim üzerinde bağlanma bölgesi adı verilen bölgelerde kovalent olmayan bir etkileşimle sonuçlanır. Bir reseptör farklı ligand molekülleri için birden fazla bağlanma bölgesi içerebilir.

İlaçların çoğu enzim inhibitörü olarak davranırlar. Diğer bir deyişle ilaç molekülleri, özel bir reaksiyonu katalizleyen enzimleri durdururlar.

2.2.1. Tersinir İnhibitörler

Tersinir inhibitörler enzimlere Hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler ve iyonik bağlar gibi non kovalent etkileşimlerle bağlanırlar. Bu tür inhibisyonda inhibitör ve etkileştiği aktif bölge arasında birçok zayıf bağ oluşur ve bu bağlar bir arada güçlü ve spesifik bir bağlanma meydana getirir. Tersinir inhibitörler enzime bağlandıklarında genellikle kimyasal reaksiyona girmezler ve bu nedenle de kolayca uzaklaştırılabilirler. Genel olarak 3 farklı tersinir enzim inhibitöründen bahsedilebilir.

- **Rekabetçi** (Competitive) İnhibitörler: Bu tip inhibitörlerin gerçekleştirdiği inhibisyonda substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanamaz. Bu durum inhibitörün enzimin, substratın da bağlandığı aktif bölgesine olan yüksek afinitesinden kaynaklanır. Rekabetçi inhibisyonda substrat ve inhibitör moleküller enzimin aktif bölgesine bağlanmak için yarışırırlar. Rekabetçi inhibitörler genelde gerçek substrata benzer kimyasal yapıda olurlar. Bu şekilde enzimin aktif bölgesi tarafından kolayca tanınırlar. Kan basıncını kontrol eden diüretik ilaçlar, bazı antidepresanlar ve kolesterol oluşumunu azaltan statin ilaçları rekabetçi inhibitörlerdir.
- **Rekabet etmeyen** (Uncompetitive) İnhibitörler: Bu tip inhibisyonda inhibitör, enzim-substrat kompleksine bağlanarak enzimin aktivitesini engeller. Çok yaygın olarak görülmez. HIV proteaz enzimi için yeni bir inhibitör adayı olan beta laktam yapıları bu enzim için rekabet etmeyen inhibitörlere bir örnektir.
- **Rekabet gerektirmeyen** (Noncompetitive) İnhibitörler: Bu tip inhibisyonda inhibitörün bağlanması enzimin aktivitesini düşürür, ancak substratın bağlanmasını engellemez. İnhibitör enzimin allosterik bölgesine (aktif bölgeden farklı bir bölge) bağlanarak doğal ligand olan substratın enzimin aktif bölgesine bağlanmasını etkilemeksizin, enzim katalizlenmiş reaksiyonu durdurur.

2.2.2. Tersinmez İnhibitörler

Tersinmez inhibitörler enzime kimyasal olarak bağlanarak enzimi modifiye ederler ve bu nedenle inhibisyonları geri dönüşsüzdür. Bu tip inhibitörler genelde elektofilik fonksiyonel gruplar içerirler ve bu fonksiyonel gruplar amino asitlerin nükleofilik grup içeren yan zincirleriyle reaksiyona girerek kovalent bağ oluşturur.

Tersinmez inhibisyon tersinmez enzim inaktivasyonundan farklıdır. Tersinmez inhibitörler genelde bir enzim sınıfı için spesifiktir ve tüm proteinleri inaktive etmezler. Bu inhibitörler protein yapısını yok etme fonksiyonu göstermezler, sadece hedef molekülün aktif bölgesinde değişikliğe neden olurlar.

Tersinmez inhibitörler enzim yapısına geri dönüşsüz olarak bağlandıklarından çoğunlukla toksiktirler. Sinir gazları tersinmez inhibitörlerdir ve oldukça toksiktirler. Buna benzer olarak penisilinler, bakterinin hücre duvarı sentezinde görev alan enzimi tersinmez olarak inhibe ederler ve bakteriler için toksiktirler. Toksik olmayan tersinmez inhibitörlere örnek olarak antiülser ilacı olarak kullanılan proton pompası inhibitörleri ve bir anti obezite ilacı olan **Orsilat** gösterilebilir.

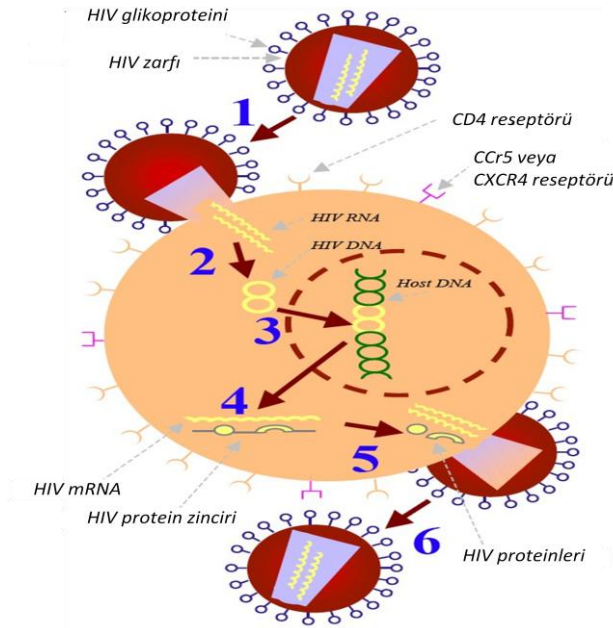
2.2.3. Geçiş hali inhibitörleri

Enzim inhibitörlerinin tasarımında sıklıkla kullanılan bir yöntem enzim ile substratın etkileşimi esnasında oluşan geçiş hali kompleksi veya ara ürünü taklit edilmesi yöntemi kullanılır. Diğer tüm katalizörler gibi enzimler, reaksiyonun yüksek enerjili geçiş halini stabilize ederek aktivasyon enerjisini düşürür. Geçiş hali inhibitörleri de yüksek afiniteli (daha düşük K_i değerli) ara ürünleri taklit etmekte ancak kimyasal reaksiyona girmemektedir. Bu nedenle enzime substratından daha güçlü bir şekilde bağlanır ve enzim substratlarını inhibe ederler. Bu tür substrat taklitçisi inhibitörlere iyi bir örnek HIV proteaz inhibitörüdür. HIV proteaz inhibitörlerinden **Ritonavir**, 3 adet peptid bağı içeren bir peptid yapısı temel alınarak tasarlanmıştır. Bu ilaç enzimin substratı olan protein molekülüne yapıca benzediğinden enzimin aktif bölgesine bağlanmada bu proteinle yarışır.

2.3. AIDS ve HIV Proteaz

AIDS (Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu), 20 yüzyılda önceden bilinmeyen bir patojen tarafından meydana gelen büyük bir bulaşıcı hastalıktır. Bu hastalık insan bağışıklık yetmezliği virüsü-tip 1 (*HIV-1*) adı verilen bir virüsün vücuda girmesinden kaynaklanır. HIV-1 virüsü, RNA genomu taşıyan kapsüllü virüslerden oluşan retrovirüs ailesinin bir üyesidir. 1980'lerde görülen salgının başlangıcında AIDS için etkili olabilecek herhangi bir ilaç bilinmemekteydi ve salgının tüm dünyadaki genel etkilerinden dolayı böyle bir ilaca talep çok büyüktü (Wlodaver vd., 1998). AIDS salgınının başlangıcından itibaren HIV-1 virüsünü hedefleyen bir antiviral terapi geliştirmeye yönelik önemli çabalar sarf edilmiştir. HIV virüsünün tanımlanması ve farklı elemanlarının yaşam döngüsü üzerine etkisi hakkında hızla artan bilgi birikimi dünyanın her yerinden araştırmacıların ilgisini çekmiş ve HIV yaşam döngüsünün farklı adımlarını hedefleyen inhibitörler tasarlanmaya başlanmıştır. Bu hedeflerden bir tanesi de HIV Proteaz'dır. HIV Proteaz, virüsün olgunlaşmasında etkili olan temel bir enzimdir. Bu enzimin yapı ve fonksiyonunu aydınlatılması ise etkili inhibitörlerin sentezinde önemli rol oynamıştır.

HIV virüsü, genetik bilgisini RNA formunda taşıyan ve retrovirüs adı verilen bir virüs sınıfına üyedir. HIV virüsü vücutta yüzeyinde CD4 antijeni bulunduran T hücrelerini etkiler. Virüsün bulaşması viral ve hücrel membranların füzyonunu gerektirir. Bu işlem viral zarf glikoproteinleri olan gp120 ile gp 41, ve hedef hücre üzerinde bulunan CCR5 veya CXCR4 gibi CD4 reseptörleri tarafından gerçekleştirilir. Virüs hücreye girdikten sonra RNA'sı viral bir enzim olan Revers Transkriptaz ile ters-replikasyona uğrar ve DNA transkripsiyonu bu şekilde gerçekleşir. Viral DNA hücre çekirdeğine girer ve viral İntegröz enzimi ile genetik bilgisini hücreye aktarır. Host hücrenin aktivasyonu viral DNA'nın mesajcı RNA'ya transkripsiyonunu sağlar ve translasyon sonrasında viral proteinler elde edilir. HIV Proteaz bu basamakta viral poliprotein öncülerini uygun bölgelerden keserek olgun proteinlerin oluşmasını sağlar. Viral RNA ve viral proteinler hücre yüzeyinde toplanarak yeni virionları oluşturur ve sonrasında bu virionlar tomurcuklanarak hücreden ayrılır ve başka hücreleri etkilerler. Host hücrenin genetik sisteminde meydana gelen büyük kapsamlı hücre hasarı enfekte hücrelerin ölümüyle sonuçlanır. HIV virüsünün yaşam döngüsü Şekil 2.8'de görülmektedir.

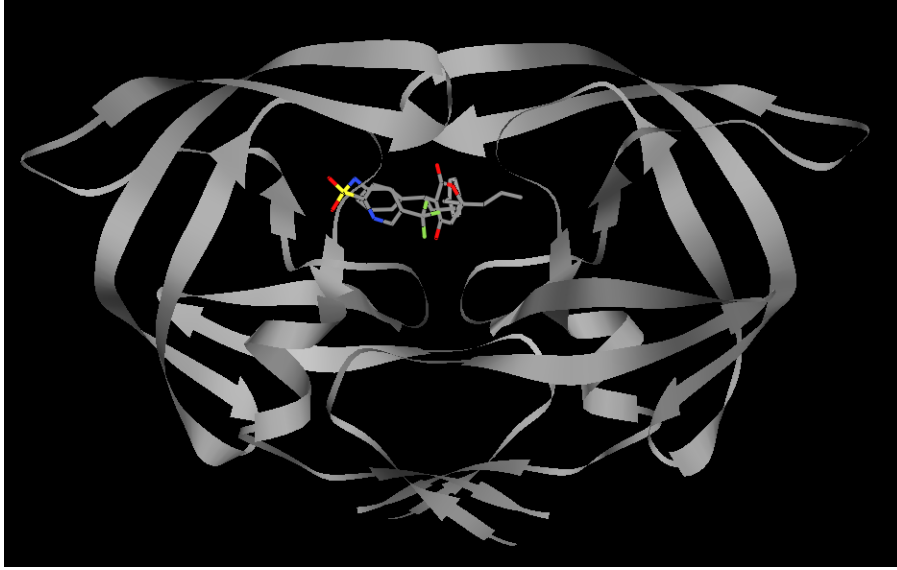


Şekil 2.8: HIV yaşam döngüsü diagramı

Özel tedavi yöntemleriyle HIV yaşam döngüsünü kırmak mümkün olsa da, virüs vücuda girdikten sonra infeksiyonu vücutta hızla yayılır ve immün sistemin zayıflamasına ve çökmesine sebep olur. HIV yaşam döngüsünde müdahale edilebilecek ve replikasyonunu durdurabilecek birçok basamak vardır ve bu amaçla kullanılan ticari ilaçların bir kısmı virüsün proteaz enzimini inhibe etmek için tasarlanmıştır. HIV'nin yaşam döngüsünde kritik bir nokta olan polipeptid öncülerinin olgun enzimleri ve yapısal proteinleri oluşturmak üzere uygun bölgelerden kesilmesi işlemi virüsün proteaz enzimi tarafından katalizlenir. Katalitik olarak inaktif proteaz içeren viral parçacıkların olgunlaşma aşamasına giremediği gösterilmiştir (Kohl vd., 1988). HIV yaşam döngüsündeki önemi bu enzimi HIV enfeksiyonu terapisinde önemli bir hedef haline getirmektedir (Kramer vd., 1991).

2.3.1. HIV-Proteaz yapısal ve fonksiyonel özellikleri

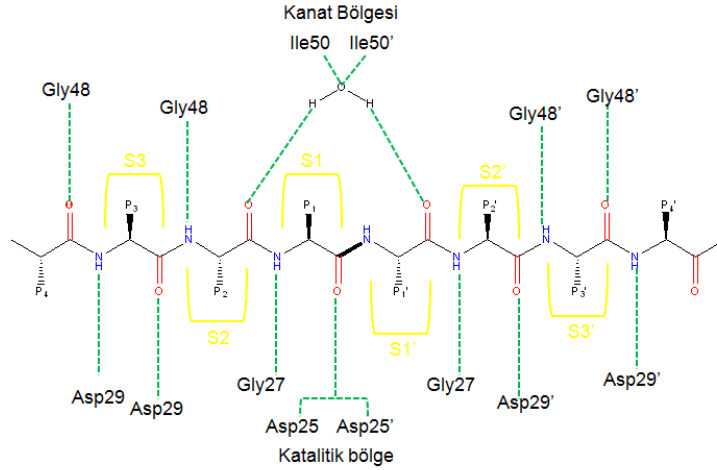
HIV proteaz'ın kristal yapısı ilk olarak 1989 yılında elde edilmiştir (Navia vd., 1989). HIV proteaz 99 aminoasitlik bir homodimerdir. Aspartil proteaz familyasına üye olan bu enzimin homodimer yapısının tam ortasında serbest formda C_2 simetrisi gösteren bir aktif bölgesi bulunur. Bu enzimin kristal yapısına bir örnek Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9: HIV proteaz'ın Tipranavir ilacı ile kompleks yapısı (pdb kodu: 2o4p). Enzim molekülü kurdele diagramı ile gösterilmiştir.

HIV proteaz yapısı her bir monomerde kanat adı verilen bir beta katmanı içerir. Bu kısım glisin amino asiti içeriğince zengindir. Kanat kısmı substrat bağlanma bölgelerini birbirine bağlar ve substrat bağlanmasında önemli rol oynar. Enzimin işlevi bakımından başlıca önemli amino asitler olan Asp25 ve Asp25' bu oyuğun (cavity) altında dip kısmında yer alır.

Enzimin aktif bölgesi monomerlerin ortasında bulunan C_2 simetrik bir bölgedir. Dimerik aktif bölge üçlüsü olarak adlandırılan ve Asp, Thr ve Gly amino asitlerinden oluşan grup amino asit dizilim sırasında 25, 26, ve 27. sıralardadır. Bu üçlü içerisinde Asp24 ve Asp25' (her bir monomerden birer tane) doğrudan substratla etkileşir. Thr26, Thr26' amino asitlerinin aktif bölgenin konformasyonunu stabilize ettiği, Gly27 ve Gly27' amino asitlerinin ise substratı Asp25 ve Asp25' amino asitlerinin karbonil grubunun bağlanmasını sağlayabilecek şekilde yerleşmesini sağladığı öne sürülmüştür (Mager, 2001).



Şekil 2.10: Peptid substratı üzerinde Proteaz bağlanma bölgeleri. Kesilebilir amit bağı kalın olarak gösterilmiştir. Şekil üzerindeki P ile gösterilen bölgeler amino asidin yan zincirini, S ile gösterilen bölgeler ise proteaz bağlanma bölgelerini temsil eder. Bağlanma bölgeleri olan S1, S1', S2, S2' ve S3 hidrofobik özellik gösteren bölgelerdir.

Proteazlar birçok biyolojik proseste temel rol oynarlar. Peptid bağlarının hidrolizini yüksek seçicilikte katalizlerler. Bu enzimlerin kataliz mekanizması iki çeşittir; bunlardan ilki substratın kesilebilir amit bağının karbonil grubuna saldırarak için aktifleşmiş bir su molekülü içerir. Su molekülünün aktivasyonu bir Çinko molekülüyle veya aktif bölgedeki Asp amino asitlerinin β -karboksi grubuyla gerçekleşir. Su molekülünü aktifleştirmek için Çinko molekülü kullanan yapılar Çinko metalloproteinaz olarak anılırken aspartil gruplarından faydalananlar aspartat proteazlar olarak geçer. Mekanizmalardan ikincisinde ise amino asidin yan zincirinden bir nükleofilik atom amit hidrolizini başlatmada görev alır. Aktifleşmiş nükleofil karbonil grubuna saldırarak bir ester veya tiyoester açıl ara ürünü oluşturur. Bu olayla açılan enzim su molekülüyle hidroliz edilir.

2.3.2. HIV proteaz inhibitörleri

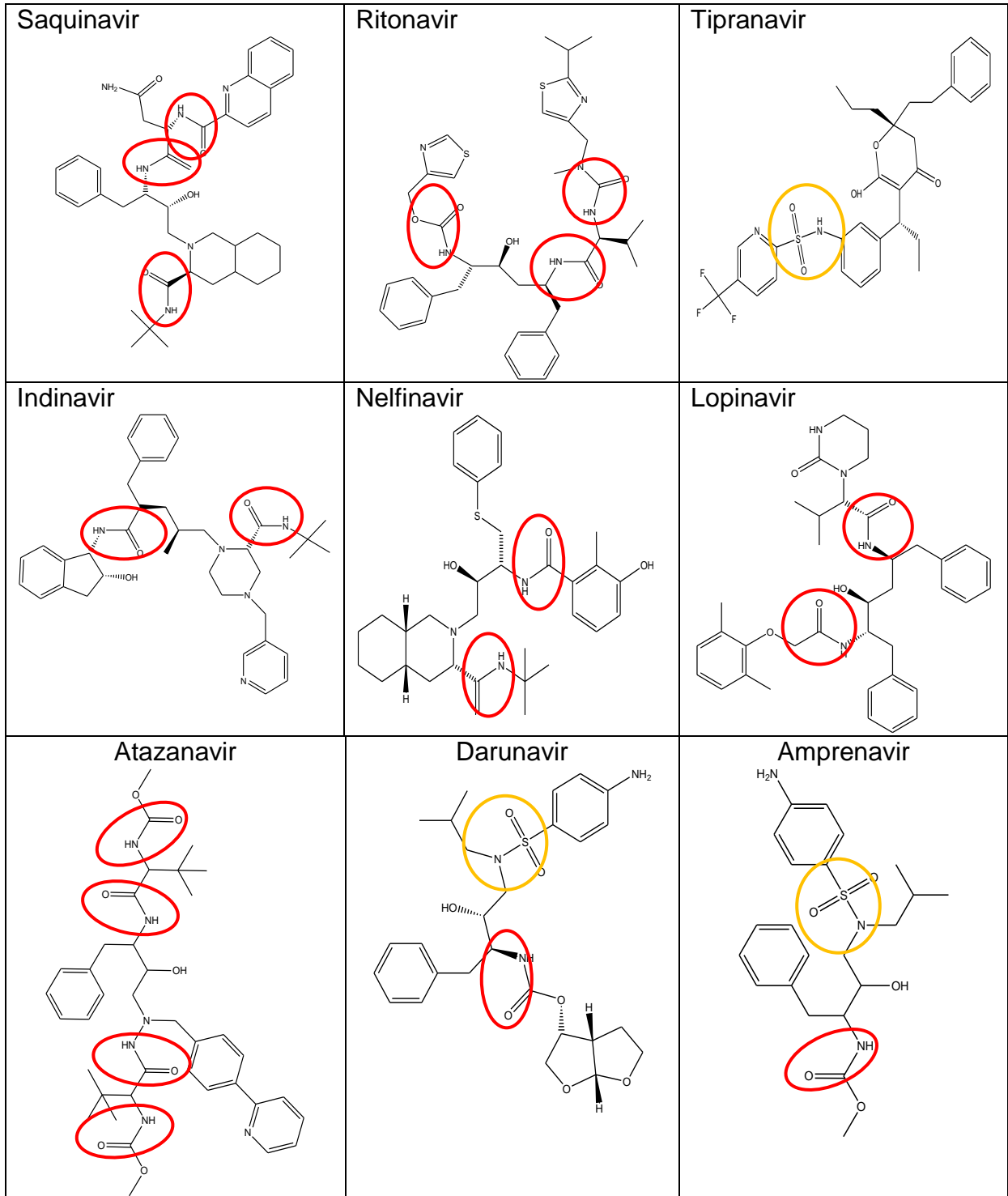
HIV yaşam döngüsü virüsün hücreye girmesinden itibaren yeni viral parçacıkların konak hücreyi terk etmesine kadar yaklaşık 1.5 gün sürer (Ho vd., 1996). HIV virüsü ters transkripsiyon (reverse transcription) yaparken meydana gelen hataları düzeltebilecek enzimlere sahip değildir. Kısa yaşam döngüsü ve yüksek hata oranı

virüsün hızlıca mutasyona uğramasına sebep olur. Bu durum HIV için yüksek genetik çeşitlilikle sonuçlanır.

Antiretroviral ilaçlar HIV gibi retrovirüslerin tedavisinde kullanılan ilaçlara verilen genel isimdir. Bu çeşitteki ilaçlardan birkaç tanesinin aynı anda kullanılması antiretroviral terapi, veya yüksek etkili antiretroviral terapi (YEART) olarak anılır. HIV virüsü için mutasyon oranının yüksek olması virüsün kullanılan ilaçlara karşı direncini oldukça artırdığı için tek virüsle savaşırken tek bir ilacın kullanılması yerine birden fazla ilacın kullanılması tercih edilir. Aynı anda kullanılan bu ilaçlar virüsün yaşam döngüsünde farklı adımlara yönelik olabileceken aynı aşama için birden fazla ilaç da kombinasyonda yer alabilir.

HIV proteaz inhibisyonu için geliştirilen ilk ilaçlar enzimle substratın geçiş hali kompleksini taklit eden peptid türevleridir (peptidomimetikler). Bu alanda 1995 yılında FDA tarafından onay alan ilk ilaç **Saquinavir**'dir (Hoffmann-La Roche) (PR Newswire). Bu ilaç HIV proteaz için oldukça potent bir inhibitördür ($K_i = 0.12$ nM).

Abbot Drug firması tarafından üretilen **Ritonavir** (Lea, Faulds, 1996) isimli etkin HIV proteaz inhibitörü ($K_i=0.01$ nM), simetrik bir enzim olan HIV proteaz için tasarlanmış asimetric bir bileşiktir. Bilinen en kompleks inhibitörlerden biri olan Ritonavir antiviral aktivite göstermekle birlikte son zamanlarla bu amaçla çok fazla kullanılmamaktadır. 1996 yılında FDA onayı alan bu ilaç günümüzde daha çok YEART'de diğer proteaz inhibitörlerine yardımcı olarak, proteaz inhibitörlerini metabolize eden enzimlere yönelik kullanılmaktadır. Bu özelliğinden dolayı ritonavir YEART'de, yine aynı laboratuvar tarafından üretilen, 2000 yılında FDA onayı almış bir HIV proteaz inhibitörü olan **Lopinavir** (Miriam vd., 2000) ile birlikte kullanılır. Lopinavir bileşiğinin tek başına alındığında gözlenen düşük biyoyararlanımın düşük dozda Ritonavir kombinasyonu ile artması bu iki bileşiğin ko-formulasyon halinde pazarlanmasına neden olmuştur.



Şekil 2.11: HIV proteaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları. Her ilaç molekülünün içerdiği benzer gruplar daire içerisinde gösterilmiştir. Bu benzer gruplar genelde yapıda bulunan amid (kırmızı) ve sülfonamid (sarı) bağlarına ait gruplardır.

Indinavir, Merck firması tarafından 1996 yılında FDA onayı almış etkin ($K_i=0.56$ nM) bir HIV proteaz inhibitörüdür (The 14th Annual HIV Drug Guide, sayfa 37). Bu ilaç,

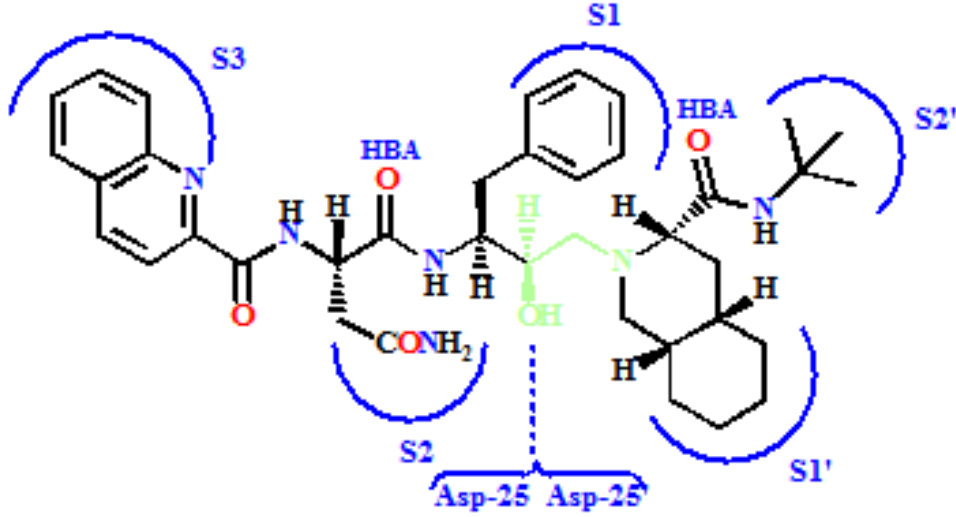
enzim-substrat geçiş hali kompleksinin taklit eden (geçiş kompleksi analogu) bir inhibitördür. Katalitik olarak aktif Asp amino asitlerinin karboksil grubuyla Hidrojen bağı yapan hidroksil grubu birçok aspartik proteaz inhibitöründe bulunan ortak bir noktadır. Dipeptid taklitçisi (mimetik) olarak hidroksietilen (vinilk alkol) isosterlerinin (aynı sayıda atom ve değerlik elektronu içeren yapıların) yapıya eklenmesi yüksek seçicilikte ve etkin HIV proteaz inhibitörlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Indinavir, C ucunda bir benzosikloalkil amin içeren, hidroksietilen bazlı bir inhibitördür. Oldukça etkin olmasına rağmen molekülün suda çözünürlüğünün az olması uygun farmakokinetik profil göstermesini engellemektedir. Bu sebeple son zamanlarda **Atazanavir** gibi daha yeni ilaçlar YEART'de Indinavir'in yerini almaktadır (The 14th Annual HIV Drug Guide, sayfa 43). Atazanavir, yapı olarak Ritonavir'e öncülük eden ön bileşiklere benzeyen, 2003'te ilk günde tek doz olarak FDA onayı almış olan HIV proteaz inhibitörüdür.

Aguron Pharmaceuticals tarafından üretilen **Nelfinavir** (Zhang vd.,2001) ve Vertex Pharmaceuticals tarafından üretilen **Amprenavir** (Wlodaver, Vondrasek, 1998) ise sırasıyla 1997 ve 1999'da FDA onayı almış HIV proteaz inhibitörleridir. Bu iki potenet inhibitör (Ampreavir $K_i= 0.6$ nM, Nelfinavir $K_i= 2$ nM) de Saquinavir'e benzer yapıda hidroksietilamin isosteri içermektedir. Nelfinavir bugüne kadar literatürde en az anlatılmış olan HIV proteaz inhibitörüdür. İnhibitörün yapısının bir kısmı (Hidroksietilamin isosteri) Saquinavir ile aynıdır. Nelfinavir pediatrik AIDS tedavisinde kullanılan FDA onaylı tek ilaçtır. Amprenavir, peptidomimetik özellik göstermediğinden diğer FDA onaylı inhibitörlerden ayrılır. Non peptidik yapısından kaynaklanan düşük molekül ağırlığı inhibitörün biyoelverişliliği için avantajdır.

Amprenavir gibi **Tipranavir** (Doyon vd.,2005) de non peptidik bir HIV proteaz inhibitörüdür. Boehringer-Ingelheim firması tarafında üretilen ilaç 2005 yılında FDA onayı almış olup, diğer proteaz inhibitörlerine direnç gösteren virüsleri inhibe edebilmektedir.

Darunavir (MacArthur, 2007), Tibotec tarafından üretilen, 2006 yılında FDA onayı almış olan en güncel HIV proteaz inhibitörüdür. Diğer HIV proteaz inhibitörlerinin üstesinden gelemediği problemleri aşmak için tasarlanmış olan ikinci nesil bir HIV

proteaz inhibitörü olan Darunavir, enzim ile kuvvetli etkileşim gösterecek şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 2.12: Saquinavir ilacı üzerinde proteaz bağlanma bölgeleri. Katalitik merkez tarafından kesilen amit bağı yeşille gösterilmiştir.

2.3.3. HIV proteaz üzerine yapılmış doking çalışmaları

HIV proteaz, doking metodu validasyonunda ve doking programlarının belirli hedef yapılar üzerindeki performansının değerlendirilmesinde literatürde rastlanan kaynaklarda sıkça kullanılan bir yapıdır. Tablo 2.2’de listelenen çalışmalar incelenen programların doğru doking yapabilme başarısını ölçmektedir. Tablo 2.2’deki çalışmaların hepsi incelenen veri setlerinde HIV proteaz’ın yanı sıra birçok farklı hedef molekül içermektedir.

HIV proteaz’ın yapısı ve mekanizması üzerine yapılan çalışmalar bu enzime karşı etkili inhibitörlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte aspartik proteazların inhibitörlerinin dizaynı üzerine de literatürde çokça kaynak bulunması (Greenle vd., 1992, Meguid vd., 1993) araştırmacıları bu konu üzerine yöneltmiştir. Yapı temelli ilaç tasarımı alanında doking bir molekülün diğerine bağlanması esnasında tercih edilen yönlenmeyi tahmin etmeye yarayan bir methodur. Gelişen X-ray kristalografi teknikleriyle 3 boyutlu yapısı bilinen protein yapılarının sayısının günden güne

artması da bu metodun kullanılmasını araştırmacılar için daha tercih edilir hale getirmektedir.

Veri setinde bulunan protein sayısı	Seçilen karşılaştırma kriteri	Docking programları	Referans
68 (3) 1hvr, 1qbr, 1qbu	En iyi pozun X-ray yapısına göre RMSD	GLIDE SP, GLIDE XP, ICM, Surflex, PhDOCK, DOCK, FlexX	Cross vd., 2009
191 (28) 1g2k, 1g35, 2gno, 1hbv, 1hos, 1hps, 1hqv, 1hpx, 1hsg, 1hvi, 1hvj, 1hvk, 1hvl, 1ohr, 1w5v, 2bpv, 1bpy, 2bqv, 7upj, 1ajv, 1ajx, 1c70, 1hvh, 1dif, 1w5w, 1w5y, 1iiq, 1nh0	Ligandın orijinal konformasyondan RMSD	AutoDock, X-Score, FlexX	Skolnick vd., 2008
(25) 1gno, 1hbv, 1hef, 1heg, 1hvh, 1hiv, 1hps, 1hqv, 1hvi, 1hvj, 1hvk, 1hvl, 1hvr, 1hvs, 1hte, 1htf, 1htg, 1pro, 1sbg, 1upj, 4phv, 4hvp, 5hvp, 8hvp, 9hvp	Bağlanma enerjisi	AUTODOCK (LGA algorithm)	Jenwithe esuk vd., 2003
(11) 1ajv, 1ajx, 1dmp, 1g2k, 1g35, 1hvh, 1hvr, 1hwr, 1pro, 2upj, 7upj, 3phv, 1bvg (X-Ray) and 1bve (NMR)	Proteinin farklı NMR konformasyonlarıyla Tek tek X-ray dokinglerinin karşılaştırılması	"Sequential docking" ^b (yeni bir algoritma)	Huang ve Zou,
5 (1) 1zpa	Bağlanma enerjisi	AutoDock 4.0	Familia vd., 2007
100 (25)	2 Å limitte en iyi pozun RMSD	QXP>Glide≈Surflex>FlexX	Rognan vd., 2004
200 (9) 1hqv, 1ohr, 1qbu	2 Å limitte en yüksek sıradaki pozun RMSD	Glide>GOLD>ICM	Kellenberger vd., 2004

Tablo 2.2: Literatürde bulunan, HIV proteaz içeren karşılaştırmalı docking ve docking validasyonu çalışmaları ^averi setinde bulunan HIV proteaz yapısı sayısı parantez içinde verilmiştir. ^bsequential docking: Her bir NMR konformerine ligandı sırayla docking yapma yöntemi

2001 yılında Akao vd. tarafında gerçekleştirilen bir çalışmada, sentezlenmiş bir dizi HIV proteaz inhibitörünün 3 boyutlu yapıları (Sybyl moleküler modelleme programı ile çizilip optimize edilerek) elde edildikten sonra AutoDock programı ile HIV proteaz yapısına doking yapılmış, ve elde edilen bağlanma afinitesi değerleri deneysel olarak elde edilen K_i değerlerinden türetilen bağlanma enerjisi değerleri ile korelasyonu incelenmiştir. Düşük bağlanma enerjisi gösteren yapının kimyasal özelliklerinin protein yapısının aktif bölgesinin kimyasal yapısı ile uyumu incelenmiştir. Ligandın bağlanma modunda aktif bölge amino asitleri ile yaptığı hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler tespit edilmiştir.

Samudrala vd. tarafından 2005'te gerçekleştirilen bir çalışmada ise HIV proteazın ilaçlara fenotipik dayanıklılığını incelemek için 6 adet FDA onaylı ilaç ile HIV proteaz doking çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada bağlanma enerjilerini tahmin etmek için esnek ligand doking ile birlikte MD simülasyonu da yapılmıştır (MD+doking) . MD+Doking prosedüründe, AutoDock programı ile deneysel olarak hesaplanan inhibitör konsantrasyonu(fenotip) ile HIV proteaz gen mutasyonuna dayanarak hesaplanan bağlanma afiniteleri karşılaştırılmıştır.

Perryman vd. tarafından 2006'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise Serbestleştirilmiş kompleks metodu (Relaxed Complex Scheme) adı verilen bir yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde 2 adet HIV proteaz X-ray yapısının MD simülasyon ile elde edilen farklı protein konformerlerine AutoDock ile bilinen veya potent inhibitör yapıların doking'i yapılmıştır. Farklı MD konformerlerine doking ile protein yapısının esnekliği sağlanmıştır.

2007 yılında Chang vd. tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada 15 adet HIV proteaz yapısına karşı NCI veri tabanından elde edilen 11 adet HIV proteaz inhibitörü için AutoDock program ile doking yapılmıştır. Ligand veri seti içerisinde HIV proteaz için spesifik ve non-spesifik inhibitörler bulunmaktadır. Yapılan doking çalışması sonucunda bu iki farklı grup için bağlanma enerjisi değerleri açısından sabit bir fark elde edilmiş (7 kcal/mol) ve bu farkın HIV proteaz inhibitörlerinden oluşan bir veri seti türetmede kullanışlı bir kriter olabileceği öne sürülmüştür.

2007 yılında Vijjulatha vd. tarafından yapılan bir çalışmada Siklik üre moleküllerinden (5,6-dihidroksi-1,3-diazepan-2,4,7-trion) oluşan bir HIV proteaz ligand setinin hesaplama teknikleriyle dizaynı yapılmış ve bu ligandların FlexX programıyla dokingi ile elde edilen ligand konformasyonları bilinen siklik üre inhibitörleriyle karşılaştırılmış ve bu yapıların ADME özellikleri hesaplanmıştır. Doking sonucunda yüksek skora sahip olan ligandların hesaplanan ADME özelliklerinin de uygun aralıklarda bulunduğu görülmüştür.

Papadopoulos vd. tarafından 2008 yılında gerçekleştirilen gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, bağlanma etkileşimlerini analiz etmek için, bir seri [60] fulleren analogu inhibitörler HIV proteaz yapısına doking yapılmıştır. Bu çalışmada inhibitöre bağlı ve sebest formdaki HIV proteaz sistemlerinin MD simülasyonu sonrasında elde edilen yapıları FlexX programı ile doking için girdi olarak kullanılmıştır.

2.3.4. HIV Proteaz İnhibitörü olarak Beta-Laktam Molekülleri

Beta laktam antibiyotiklerinin antibakteriyel özelliğinin yanı sıra antifungal, antiviral, anti-HIV ve antikanser özellikler gösterdiği çeşitli çalışmalarda öne sürülmüştür (Sanyal vd., 1992, Doherty vd., 1986, Buynak vd., 1997, Kitchin vd., 1994, Hamilton-Miller, 1994, Vrudhula vd., 1995). Bazı beta laktam bileşiklerinin viral serin proteazları ve HIV proteazı inhibe ettiği de bilinmektedir (Hamilton-Miller, 1999). Bu tür bileşiklerin HIV proteaz üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak Sperka vd. tarafından incelenmiştir (Sperka vd., 2005). Bu çalışmada sentezlenen bir dizi beta laktam bileşiğinin HIV proteaz inhibisyon yüzdesi yüksek çıktı performanslı tarama (high throughput screening) ile incelenmiş ve deneysel K_i değerleri elde edilmiştir. Ayrıca inhibitörlerin protein yapısıyla etkileşim mekanizmasını inceleyebilmek için 100 ps moleküler dinamik simülasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve bu çalışma ile inhibitörlerin proteinin kanat (flap) bölgesiyle etkileştiği ve bu bölgede bulunan Gly51 ve Phe53 amino asitleriyle Hidrojen bağı yaptığı öne sürülmüştür. Ayrıca yüksek iyonik şiddette inhibisyon tipinin değiştiği ve bu koşulda inhibitörlerin proteinin aktif bölgesine yöneldiği de öne sürülmüştür.

2.4. Protein Veritabanı

RCSB protein veri tabanı (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank), dünya çapında biyolojik makromoleküllerin 3 boyutlu yapı bilgilerini işleyen ve dağıtan bir kaynaktır (Berman vd., 2000). Deneysel olarak elde edilmiş 3 boyutlu yapılarının bulunduğu bir arşiv olan ve haftada bir kez güncellenen protein veritabanında 20 Nisan 2010 itibarıyla toplamda 64781 adet yapı depolanmış haldedir. Bu yapılardan bazıları X-Ray, bir kısmı da NMR yöntemleriyle aydınlatılmıştır.

Protein veritabanında bulunan bir X-Ray yapısının çözünürlüğü (resolution) o yapı için ne kadar veri biriktirildiğinin bir göstergesidir. Å birimi ile ifade edilen X-Ray çözünürlüğünün sayı değerini düşük olması çözünürlük yüksek çözünürlük anlamına gelmektedir (Lesk vd., 2001).

The screenshot shows the PDB website homepage. At the top, there is a navigation bar with the PDB logo, a search bar, and a 'MyPDB Login' button. Below the navigation bar, there is a main header with the text 'An Information Portal to Biological Macromolecular Structures' and a date stamp 'As of Tuesday Apr 27, 2010 at 5 PM PDT there are 64932 Structures'. The main content area is divided into several sections: a left sidebar with navigation links, a central main content area with a 'Molecule of the Month' section for Concanavalin A and Circular Permutation, and a right sidebar with 'New Features', 'News', and 'Statement on Retraction of PDB Entries'. The 'Molecule of the Month' section includes a 3D molecular model and a short article about evolution. The 'Protein Structure Initiative Featured Molecule' section highlights Mre11 nuclease.

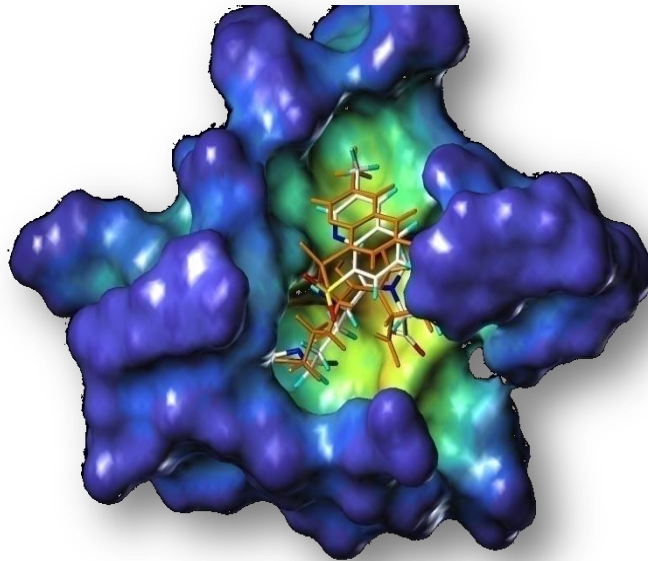
Şekil 2.13: Protein veritabanının web sayfası görünümü

Protein veritabanında bulunan yapılar *.pdb dosya formatında saklanır. Bu format hemen hemen tüm moleküler görüntüleme ve modelleme programı tarafından tanınmaktadır. Bir pdb dosyası makromolkülün atomik koordinatları, birincil ve ikincil yapı bilgileri, kristalografik yapı faktörleri ve NMR yapısal bilgileri gibi veriler içeren bir dosyadır. Protein veritabanında bulunan yapılar, ilki rakam olmak üzere, 4 karakterli isimlerle simgelenir. Bu adlandırma yöntemi PDB kodu olarak anılır.

2.5. Moleküler Doking Yöntemi

Doking prosedürü hedeflenmiş bir bağlanma bölgesinde ligand yapısının konformasyonunun ve yönlenmesinin tahminini içerir. Doking işlemi bir ligand yapısı için hedef olarak seçilen proteine bağlanma modunun belirlenmesi olarak da tanımlanabilir. Doking işlemi için 3 boyutlu yapısı bilinen ligand ve proteinlere ihtiyaç duyulur. Doking programı kısaca 3 boyutlu yapılardan yola çıkarak ligandı proteinin hedeflenen bölgesine yerleştirir ve bu yerleşim esnasında meydana gelen enerji terimlerini sıralar.

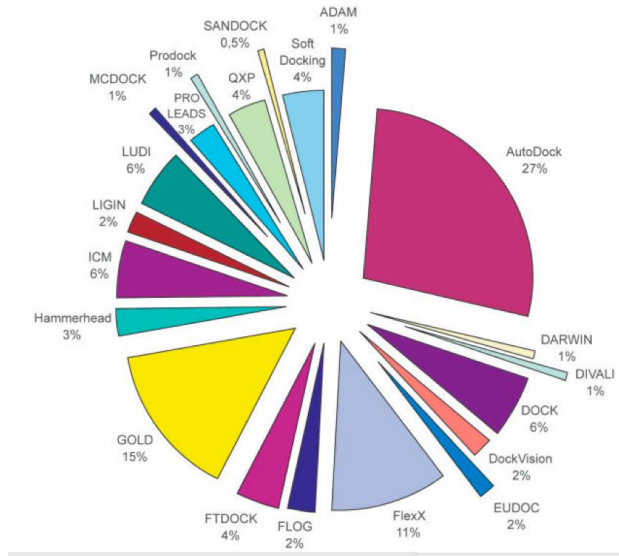
Doking çalışmasının genel olarak 2 hedefi vardır: doğru yapısal modelleme ve aktivitenin doğru tahmini. Ancak biyolojik tanımadan sorumlu moleküler özelliklerin belirlenmesi veya etkinliği artıran molekül modifikasyonları gibi kompleks durumlar anlaşılması ve bilgisayar üzerinde simüle edilmesi zor konulardır.



Şekil 2.14: Moleküler doking yönteminin şematik gösterimi. Hedef molekül Molcad yüzeyinde, gösterilmiş, aktif bölgeye doking yapılan ligand molekülünün farklı konformasyonları farklı renklerde verilmiştir.

Günümüzde doking çalışmaları için birçok farklı program mevcuttur. Bu programlar bir doking pozu belirlemede kullandıkları algoritma ve skora fonksiyonlarına göre farklılıklar gösterir. Literatürde yer alan doking programları ve bunlara atıf sayıları

şekil 2.15’de belirtilmiştir. Çalışılan hedef protein yapısına veya ligand yapılarına göre bir doking programı için genel bir başarıdan söz etmek mümkün değildir.



Şekil 2.15: Doking yöntemlerinin atıf sayılarına göre dağılımı (Sousa vd., 2006)

Doking programlarında ligand ve hedef protein yapılarının esnekliği konusu gerçekleştirilmesi zor ve önemli konulardır. Doking terminolojisinde esneklik, ele alınan kimyasal yapının tüm konformasyonlarını içeren hesaplamalar yapmak demektir. Günümüzde kullanılan doking programlarının birçoğu ligand yapısını esnek olarak değerlendirebilirken protein yapısı genelde esnemez olarak ele alınır. Bunun nedeni protein gibi büyük bir yapıda tüm konformasyonların teker teker incelenmesi ve bu konformasyonların her biri için doking hesaplaması yapmak uzun zaman alıcı bir işlemdir.

2.5.1. Konformasyonel tarama algoritmaları

Bir doking prosesi ligand molekülün hedeflenen bağlanma bölgesine algoritması ile pozlanmasıyla başlar. Burada poz, ligand molekülün aktif bölgedeki tahmin edilen konformasyonu ve yönlenmesi olarak alınmıştır. Küçük organik moleküller bile çok sayıda konformasyonel serbestlik derecesi içerebildiğinden, pozlama başlı başına zor bir konudur. Bağlanma bölgesine en iyi uyacak olacak olan konformasyonun belirlenebilmesi için serbestlik derecelerinin belirlenmesi ve örneklenmesi yüksek

doğrulukta yapılmalıdır. Bu işlem aynı zamanda, binlerce bileşiğin tahmininde kullanılabilecek kadar da hızlı olmalıdır.

Docking programının algoritması ligandı hedeflenen bölgeye yerleştirmek ve yapılarda esnekliği göz önünde bulundurarak hesaplamalar yapmaktır. Ligand yapının esnekliği docking algoritmalarında üç temel kategoride gerçekleştirilir:

- Sistemik metodlar (artan yapı, konformasyonel tarama)
- Rastgele veya olasılıksal metodlar (Monte Carlo, genetik algoritmalar)
- Simülasyon yöntemleri (moleküler dinamik, enerji minimizasyonu)

Sistemik tarama metodları bir molekülde tüm serbestlik derecelerini bulmaya çalışır. Bu metotta genel olarak ligand aktif bölgeye artan yapıda yerleştirilir (incremental construction). Artan yapıda yerleştirme, önceden fragmanlarına ayrılmış bir ligandın fragmanlarının hedef bölgeye docking yapılması ve bu fragmanların kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Sistemik tarama için başka bir yöntem de önceden hazırlanmış konformasyon veri tabanlarının kullanılmasıdır. Bu yaklaşımda, veri tabanında bulunan konformasyonlar önceden hesaplandığı için docking prosedürü ligand yapının esnemez bi şekilde hedef bölgeye yerleştirmesine indirgenmiş olur. Bu yöntem FlexX programı tarafında kullanılmaktadır.

Rastgele tarama algortimaları ligand yapı konformasyonunda rastgele değişiklikler yapar ve bu değişiklikler sonucunda elde elden yeni ligand konformasyonu önceden tanımlanmış bir olasılık fonksiyonuyla değerlendirilir (Kitchen vd., 2004). Sıklıkla kullanılan iki rastgele method Monte Carlo tarama ve genetik algortimadır. Genetik algoritma AutoDock programı tarafından kullanılmaktadır.

Simülasyon yöntemleri içerisinde moleküler dinamik en popüler simülasyon yaklaşımıdır. Ancak moleküler dinamik simülasyon metodu uygun bir simülasyon periyodunda yüksek enerji bariyerini çoğunlukla geçemediğinden ligandı enerji yüzeyinin yalnızca lokal minimumlarına yerleştirebilir. Moleküler dinamik metodunun aksine, enerji minimizasyonu sonucunda ancak lokal minimumlara ulaşılabilirdiğinden bu metod genelde Monte Carlo ile birlikte kullanılır (Trosset vd., 1998).

Protein esnekliği ligand esnekliğine göre daha az geliştirilmiş olmakla birlikte, en azından proteinin bir kısmını esnek olarak modellemede kullanılan çeşitli yaklaşımlar vardır (Carlson vd., 2000). Bu yöntemler de moleküler dinamik ve Monte Carlo simülasyonları ve rotamer veri tabanlarını kullanır. Amino asit yan zincirlerinin rotamer veri tabanlarını kullanma teorisinin altında yatan fikir proteini deneysel olarak elde edilmiş ve tercih edilen yan zincir konformasyonlarına göre modellemedir (Leach,1994). Proteini esnek kabul etmede diğer bir yaklaşım da proteinin birden fazla farklı konformasyonunun ayrı ayrı esnemez halde doking hedefi olarak alınmasıdır (Kitchen vd., 2004).

2.5.2. Skorlama ve sıralama fonksiyonları

Hedef yapı ve ligand arasındaki etkileşimleri tahmin etmede algoritmalar skorlama fonksiyonlarından faydalanır. **Skorlama**, bir ligand molekülün hem pozlanmasını hem de sıralanmasını içerir. Tek başına pozlama skor fonksiyonu ligandın hedef bölgeye uygunluğunun kaba bir ölçüsüdür. Sıralama skor fonksiyonu daha karmaşıktır ve bağlanma enerjilerini tahmin etmeye çalışır. İlk geliştirilen skorlama fonksiyonları moleküllerin bağlanma modunu değerlendirirken yaklaşık Şekil ve elektrostatik tamamlayıcıları içerir. Bu basit skorlama fonksiyonları, özellikle doking simülasyonunun ilk basamaklarında hala sıklıkla kullanılmaktadır. Daha kompleks skorlama fonksiyonları daha detaylı elektrostatik ve van der Waals etkileşimlerinin yanı sıra solvasyon veya entropik terimleri de içerir (Klebe vd., 2002).

Temel olarak 3 farklı skorlama fonksiyonundan bahsedilebilir:

- Kuvvet alanı temelli
- Ampirik
- Bilgi temelli

Moleküler mekanik kuvvet alanlarında toplam enerjiyi ifade etmek için, hedef molekül-ligand etkileşimi ve ligand i enerjisi gibi iki enerji kavramı kullanılır. Kuvvet alanı, sistemin enerjisinin farklı moleküler mekanik terimlerinin toplamı Şeklinde ifade eden bir matematiksel fonksiyondur. Ligand ve hedef yapı etkileşimleri genelde van der Waals ve elektrostatik enerji terimlerini içerir. Van der Waals enerji terimi Lennard Jones potansiyel fonksiyonuyla verilir. Kuvvet alanı skor fonksiyonları farklı

kuvvet alanı parametrelerine dayanır. Buna bir örnek olarak, AutoDock AMBER kuvvet alanını kullanır (Morris vd., 1998).

Ampirik skorlama fonksiyonları bağlanma enerjisi gibi deneysel parametreleri yeniden üretmek için tasarlanmıştır. Ampirik skorlama fonksiyonları ilk olarak Böhm tarafından önerilmiştir (Böhm, 1994). Ampirik skorlama fonksiyonlarının temeli bağlanma enerjilerinin değerlendirilmesi için bireysel düzeltilmemiş terimlerin toplamından yaklaşım yapılabileceği fikrine dayanır. Bireysel terimler, deneysel olarak belirlenmiş bağlanma enerjileri ile X-ray yapısal bilgilerinin regresyon analizinden elde edilir. Bu metodun dezavantajı önceden belirlenmiş moleküler veri setine regresyon analizi yapılmış olması gerekliliğidir. FlexX doking programı, skorlama fonksiyonu olarak ampirik skorlamayı kullanır.

Bilgi temelli skorlama fonksiyonları bağlanma enerjisi yerine deneysel yapıları yeniden üretir. Bilgi temelli skorlama fonksiyonlarında protein-ligand kompleksleri görece daha basit olan atomik etkileşim potansiyelleri kullanılarak modellenir. Atom tipi etkileşimler moleküler çevreye göre tanımlanır. Bu yüzden genel olarak, bilgi temelli skorlama fonksiyonları, ampirik metodlarla birlikte, modellemesi zor bağlanma etkilerini dolaylı yoldan anlamaya çalışır

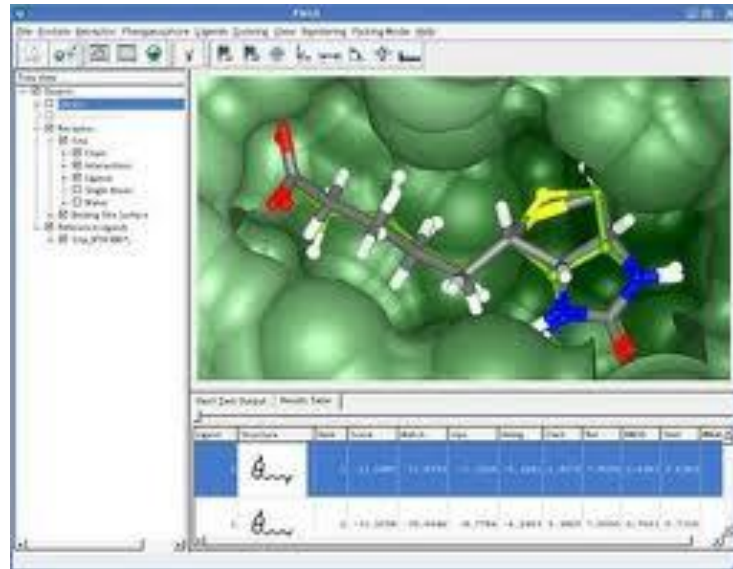
Molekül konformasyonlarının skorlanmasında karşılaşılan zorlukların yanı sıra, bağlanma konformasyonunu doğru tahmin etmede karşılaşılan diğer güçlükler ise hedef molekülün kristalografik çözünürlüğünün düşüklüğü, hedef molekülün esnekliği, bağlanma esnasında oluşan indüklenmiş uyum veya diğer konformasyonel değişimler ve su moleküllerinin protein-ligand etkileşimine katılmasıdır.

Tahmin edilen doking pozlarının doğru bir şekilde sıralanması doking meselesinin en önemli yönlerinden biridir. Bağlanma konformasyonları doğru tahmin edilmiş olsa bile, doğru pozlar yanlış olanlardan ayrılamadığı ve “gerçek” ligandlar tanımlanamadığı sürece hesaplama başarılı kabul edilemez. Bu sebeple güvenilir skorlama fonksiyonunun doking çalışmasında kullanılması temel önem taşır.

2.5.3. Kullanılan doking programları

2.5.3.1. FlexX

FlexX doking programı Rarey ve ekibi tarafından 1996 yılında geliştirilen bir programdır (Klebe vd., 1996). 3 boyutlu yapısı bilinen bir protein ve küçük ligand molekülü için FlexX, protein-ligand kompleksinin geometrisini tahmin etmeye yarar. Kullandığı artan yapıli algoritma oldukça hızlıdır. Skorlama fonksiyonu olarak Böhm tarafından geliştirilmiş olan ampirik bir fonksiyon kullanır (Böhm vd., 1994). Bu program için grafiksel kullanıcı arayüzünün bulunması doking hesaplamaları için parametrelerin hazırlanmasını kolay hale getirmiştir. FlexX programını bir avantajı, yapıda bulunan su moleküllerinin de esnek halde kabul edilebilmesine olanak sağlamasıdır. Bu durum özellikle protein ligand etkileşiminde yer alan hedef bölgede bulunan su moleküllerinin doking hesaplamasına katılabilmesine olanak sağlaması açısından önemlidir. FlexX programının başka bir avantajı da, metal moleküllerinin koordinasyonunu tahmin etmeye olanak sağlamasıdır.



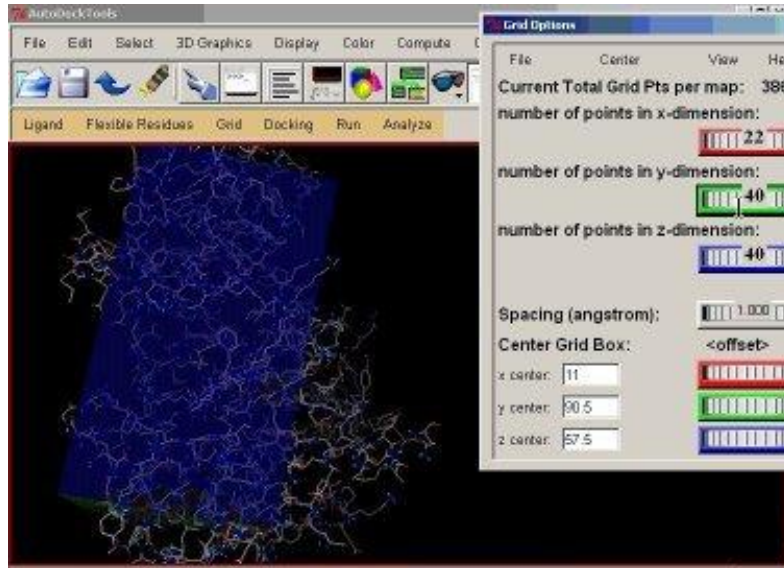
Şekil 2.16: FlexX Programının grafiksel kullanıcı ara yüzü

2.5.3.2. AutoDock 4.0 ve AutoDockTools

AutoDock, 1998 yılında Morris ve ekibi tarafından geliştirilmiştir (Morris vd., 1998). Atom temelli bir doking metodu olan AutoDock, algoritma olarak genetik bir algoritma

kullanır. Genetik algoritmalar genel olarak molekülün yeni oluşturulan bir konformasyonu hakkındaki enerji ve geometri bilgilerini oluşturulacak bir sonraki konformasyona aktararak en uygun konformasyonların elde eder. AutoDock ile doking hesaplamaları, hedef yapı için atoma özel affinite haritalarını oluşturmaya yarayan bir AutoGrid hesaplaması gerektirir. AutoGrid ile hedef molekül öncelikle karelere bölünmüş 3 boyutlu bir sisteme (grid) yerleştirilir ve sonrasında hedef moleküldeki tüm atom tipleri için afinite haritaları oluşturulur. AutoDock programı bundan sonra hedef proteini bu harita bilgileriyle tanıyacaktır.

AutoDock programı ligandın bağlanma enerjisini hesaplamada yarı deneysel bir serbest enerji kuvvet alanı kullanır. Bu kuvvet alanı Ki değerleri bilinen çok sayıda protein-inhibitör kompleksi ile parametrize edilmiştir. Enerji değeri tahmini için hedef yapıların atomik afinite potansiyellerinin bir ön hesaplaması AutoGrid programı ile gerçekleştirilir. Bu hesaplamada, protein yapısı karelere bölünmüş 3 boyutlu bir sisteme (grid) yerleştirilir ve hedef moleküldeki her atom için bir afinite grid değeri hesaplanır.



Şekil 2.17: AutoDockTools grafiksel kullanıcı ara yüzü

AutoDockTools, AutoDock için geliştirilmiş grafiksel kullanıcı arayüzüdür. AutoDockTools ile tüm AutoDock hesaplamaları, grid kutusu, grid dosyaları ve doking

parametre dosyaları ve tüm ligand ve protein moleküllerin hazırlanması görsel olarak gerçekleştirilebildiğinden kullanıcı için büyük kolaylık sağlar.

2.5.3.3. AD Vina

AD Vina, AutoDock ile aynı laboratuvar tarafından 2010 yılında geliştirilmiş bir doking programıdır (Trott vd., 2009). AD Vina'nın algoritması birçok yerel ve global optimizasyon yaklaşımının bir kombinasyonudur. AD Vina, AutoDock'a göre iki kat daha hızlı doking yapabilmektedir. Ancak programın grafiksel kullanıcı ara yüzünün bulunmaması ve programın temel olarak Linux platformu için tasarlanmış olması doking prosedürünün parametrizasyonunu karmaşık hale getirmektedir. Programı Windows ortamında çalıştırabilmek için Cygwin isimli bir simülatör program gerekmektedir. Bunu yanı sıra, AD Vina ile doking hesaplaması için bir konfigürasyon dosyası hazırlanmalıdır. Bu konfigürasyon dosyası, ligand ve hedef molekül bilgileri ile birlikte, AutoDock hesaplaması için hazırlanan grid parametre dosyasından alınan ve doking yapılacak alanı merkezin kartezyen koordinatları ve doking bölgesinin genişliği şeklinde tanımlayan parametreler içerir.

```
receptor = 2o4p_rigid.pdbqt
ligand= 2o4p_lig.pdbqt
flex= 2o4p_flex.pdbqt

center_x = 8.498
center_y = 26.803
center_z = 12.151

size_x = 40
size_y = 40
size_z = 40

num_modes = 10
```

Şekil 2.18: AD Vina için hazırlanan konfigürasyon dosyası örneği.

2.5.3.4. İncelenen doking programlarının farkları

Bu çalışmada HIV proteaz yapıları için 3 farklı doking programı incelenmiştir. Bunlar AutoDock 4.0 (Morris vd., 1998), FlexX (Klebe vd., 1996) ve AutoDock Vina (Trott vd., 2009)'dır. Bu programlar birbirlerinden temel olarak algoritma, skorumlama fonksiyonu ve konformasyonel tarama metodlarında farklılıklar gösterirler.

Çalışmada kullanılan doking programları konformasyonel tarama için kullandıkları algoritma bakımından farklılıklar gösterir. FlexX programı konformasyonel tarama için artan yapı algoritması (incremental construction) isimli, temel olarak 3 adımdan oluşan bir algoritma kullanır. AutoDock 4.0 için farklı konformasyonel tarama metodları mevcuttur. Bu metodlar "simulated annealing", genetik algoritma ve Lamarckian genetik algoritmadır. Bu metodlardan en etkili Morris vd. tarafından açıklanan Lamarckian genetik algoritmadır (Morris vd., 1998). AutoDock'dan farklı olarak Vina, konformasyonel tarama için "ötelenmiş lokal tarama global optimizasyon algoritması" isimli bir algoritma kullanır.

Programların skorumlama fonksiyonları da birbirinden farklıdır. AutoDock program, kuvvet alanı temelli ve lineer regresyon analizine dayalı bir skorumlama fonksiyonu olan Amber kuvvet alanını kullanır. FlexX program ise bağlanma enerjisi gibi deneysel parametreler içeren ve Böhm tarafından yazılan (Böhm, 1994) ampirik bir skorumlama fonksiyonu kullanır. AD Vina ise AutoDock ekibi tarafından yazılan ve AutoDock'ta kullanılan skorumlama fonksiyonunun gelişmiş bir hali olan "united-atom" skorumlama fonksiyonu kullanır.

Doking programları için ligand molekülün esnekliği de önemli bir parametredir. FlexX programı ligand molekülün esnekliğini sağlayabilmek için Cambridge Structural Database (Watson vd., 1979) isimli bir veri tabanından alınan torsiyon açıları kullanarak tercih edilen torsiyon açıları belirler. Halkasal olmayan tekli bağlar için bu torsiyon açıları kullanılırken halkalı sistemler için çoklu konformasyonlar CORINA (Sadowski vd., 1993) programı ile hesaplanır. Çoklu bağların torsiyon açıları, bağ uzunlukları ve bağ açıları ise ligand yapısının orijinal haliyle kabul edilir. 7'den fazla atom içeren halkalı sistemler esnemez kabul edilir. AutoDock ve Vina'da ise ligand esnekliği şu şekilde sağlanır: Önce ligand üzerinde bir kök atom seçilir ve bu atom doking boyunca sabit tutulur. Bu kök atom moleküledeki en büyük dallanmanın

boyutu minimum indirgenecek şekilde seçilir. Ligand esnekliği ise bu kök atoma bağlı atomların döndürülebilirliğiyle sağlanır. AutoDockTools aracından faydalanarak kullanıcı tanımlı ligand esnekliği mümkün olsa da genel olarak AutoDock ve Vina doking hesaplamalarında ligand molekül içerisindeki amit ve aromatik bağlar hariç tüm bağlar döndürülebilir kabul edilir.

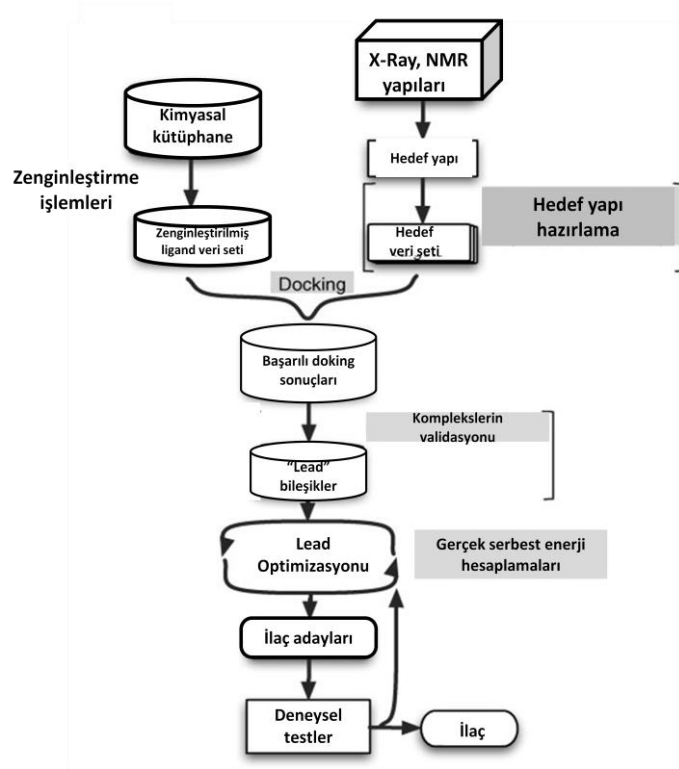
2.6. Görsel Ligand Taraması

Görsel Ligand taraması ilaç keşif araştırmalarında günümüzde sıklıkla kullanılmakta olan, bilgisayar simülasyonuna dayalı (in silico) bir tekniktir. Geniş kimyasal yapılar içeren kütüphanelerin ve veri tabanlarının taranması ile hedef yapı olan proteine en uygun inhibitör olabilecek yapıyı tanımlamakta kullanılır. Çok uzun süreli çalışmalar içeren ve oldukça büyük bütçeler gerektiren yüksek çıktılı tarama (high throughput screening) gibi kimyasal metodlarla karşılaştırıldığında oldukça avantajlı bir yöntemdir. Walters vd. görsel ligand taramasını “çok büyük miktarda bileşik içeren kimyasal kütüphaneleri bilgisayar programları kullanarak otomatik olarak taramak” olarak tanımlamıştır. Tanımın da önerdiği gibi, görsel ligand taraması metodları yaklaşık 10^{60} adet makul bileşikten oluşan oldukça büyük kimyasal uzaydan hedef yapıya uygun sentezlenebilir ve test edilebilir bileşiklerin nasıl fitrelenebileceği üzerine yoğunlaşır. Bütün kimyasal evreni taramak çok zaman alacak bir işlem olduğundan görsel ligand taraması için bir takım tarama kriterleri gerekmektedir.

Genel olarak 2 tarama tekniği kategorisinden bahsedilebilir:

- Liganda dayalı
- Yapıya dayalı

Liganda dayalı tarama yönteminde, bir hedef moleküle bağlanan yapısal olarak çeşitli ligandlardan oluşan bir set için hedef yapının bağlanma bölgesine ait bir model türetilir. Bu modele farmakofor adı verilir ve aday ligand bu farmakofor modelle karşılaştırılarak bağlanmaya uygun olup olmadığı tespit edilir.



Şekil 2.19: Görsel ligand taraması akış şeması.

Liganda dayalı görsel taramanın bir başka yaklaşımında ise molekül veri tabanları bir aktif ligand yapısına göre kimyasal benzerlik analiz metodlarını kullanmaktır (Willet vd., 1998). Bu kimyasal benzerlikler kısaca aktif ligandın molekül ağırlığı, net yükü, döndürülebilir bağ sayısı, Hidrojen-sağlayıcı ve alıcı grupların sayısı gibi özellikleridir.

Yapıya dayalı görsel tarama tekniği aday ligandaları protein hedef yapısına bir skora fonksiyonu uygulanarak doking yapılmasıyla hedef yapıya yüksek afiniteyle bağlanabilecek ligandların belirlenmesini içerir.

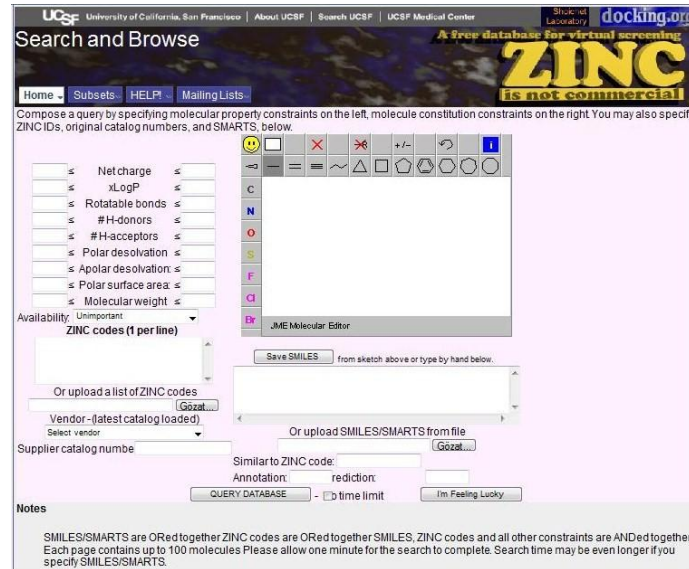
Görsel ligand taraması ilgilenilen kimyasal özellikleri içeren bileşiklerin 3 boyutlu yapılarının taranacak küçük kimyasal bileşikler içeren kütüphaneden ekstrakte edilmesiyle başlar. Elde edilen ligand veri setine kontrol bileşikler ve sentezlenmiş bileşiklerin 3 boyutlu yapıları da eklenerek veri seti genişletilebilir. Daha sonrasında bu bileşiklerin doking yapılacağı hedef protein yapısı veya protein yapı setleri hazırlanır ve son olarak, otomatize edilmiş bir doking işlemiyle ligand yapıları hedef proteinle bağlanma modları ve bu modların skor veya bağlanma enerjisi değerleri

elde edilerek sıralanır. Bir görsel ligand taraması işleminin akış şeması şekil 2.19'da verilmiştir.

2.6.1. Ligand veri tabanı: ZINC

ZINC veri tabanı (Irwin vd., 2005), özellikle görsel ligand taraması çalışmaları gerçekleştirmek adına, sağlayıcılardan (vendor) biriktirilen kimyasal bileşiklerin 3 boyutlu yapılarının saklandığı bir veri tabanıdır. ZINC genellikle farmasötik şirketlerden araştırmacılar, biyoteknoloji grupları, ve araştırma üniversitelerinden kimyager veya biyologlar tarafından kullanılmaktadır.

Diğer kimyasal veri tabanlarından farklı olarak ZINC, biyolojik önemi olan moleküllerin 3 boyutlu yapılarını temsil etmeyi amaçlamaktadır. Veri tabanı düzenli olarak güncellenmektedir ve veri tabanı içinde internet üzerinden tarama ve indirme yapmak mümkündür. John Irwin (Shoichet Laboratory, Department of Pharmaceutical Chemistry, UCSF) tarafından geliştirilmiştir.

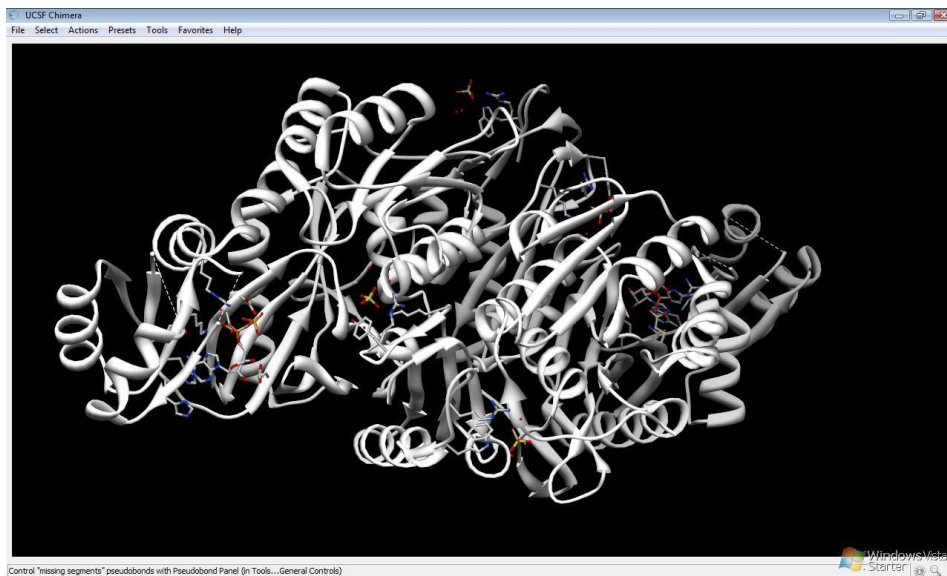


Şekil 2.20: ZINC veri tabanının web sayfası görünümü

Yapı temelli görsel ligand taramasında sık karşılaşılan bir sorun, erişimi kolay ve uygun veri tabanlarının sayıca azlığıdır. Bu amaçla hazırlanan ZINC veritabanı, molekül sağlayıcıların (vendors) katalogları kullanılarak hazırlanmış 3 boyutlu yapıları mevcut, yaklaşık 727842 adet molekül içermektedir. Veritabanının molekül

kütüphanesi gittikçe genişlemektedir. Kütüphanede bulunan tüm moleküller biyolojik açıdan uygun protonlanma basamaklarında, molekül ağırlığı, logP, döndürülebilir bağ sayısı gibi özellikleri işlenmiş ve birçok popüler doking programı için doking prosedürüne hazır formattadır. Belirli limitlerde, moleküller çoklu protonlanma basamakları ve tautomer formlarında hazırlanmış olup, bir molekül için birden çok konformasyon bilgisi içeren dosyalar da mevcuttur. Ayrıca kütüphanede bulunan her molekül için sağlayıcı ve sipariş verme bilgileri de mevcuttur.

2.7. Kullanılan Yardımcı Programlar: Chimera



Şekil 2.21: Chimera programının kullanıcı ara yüzü

UCSF Chimera (Pettersen vd., 2004), "UCSF Computer Graphics Laboratory" tarafından hazırlanmış bir moleküler görüntüleme ve modelleme programıdır. Birçok hesaplama ve görüntüleme fonksiyonu olmakla birlikte Chimera, bu çalışmada ligand moleküllerin protein yapılarından ayrılmasında ve doking çalışması için hazırlanmasında kullanılmıştır.

3. DENEYSEL METOD

Bu tez çalışması 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Görsel ligand taraması için uygun doking yönteminin ve kristal yapının araştırılması.
2. Literatürde deneysel sonuçları bilinen sentezlenmiş beta laktam inhibitörlerinin doking hesaplamaları ve deneysel sonuçlarla uyumunun incelenmesi
3. HIV proteaz inhibitörüne yeni inhibitör adayları geliştirmek için beta laktam inhibitörlerinin görsel ligand taraması

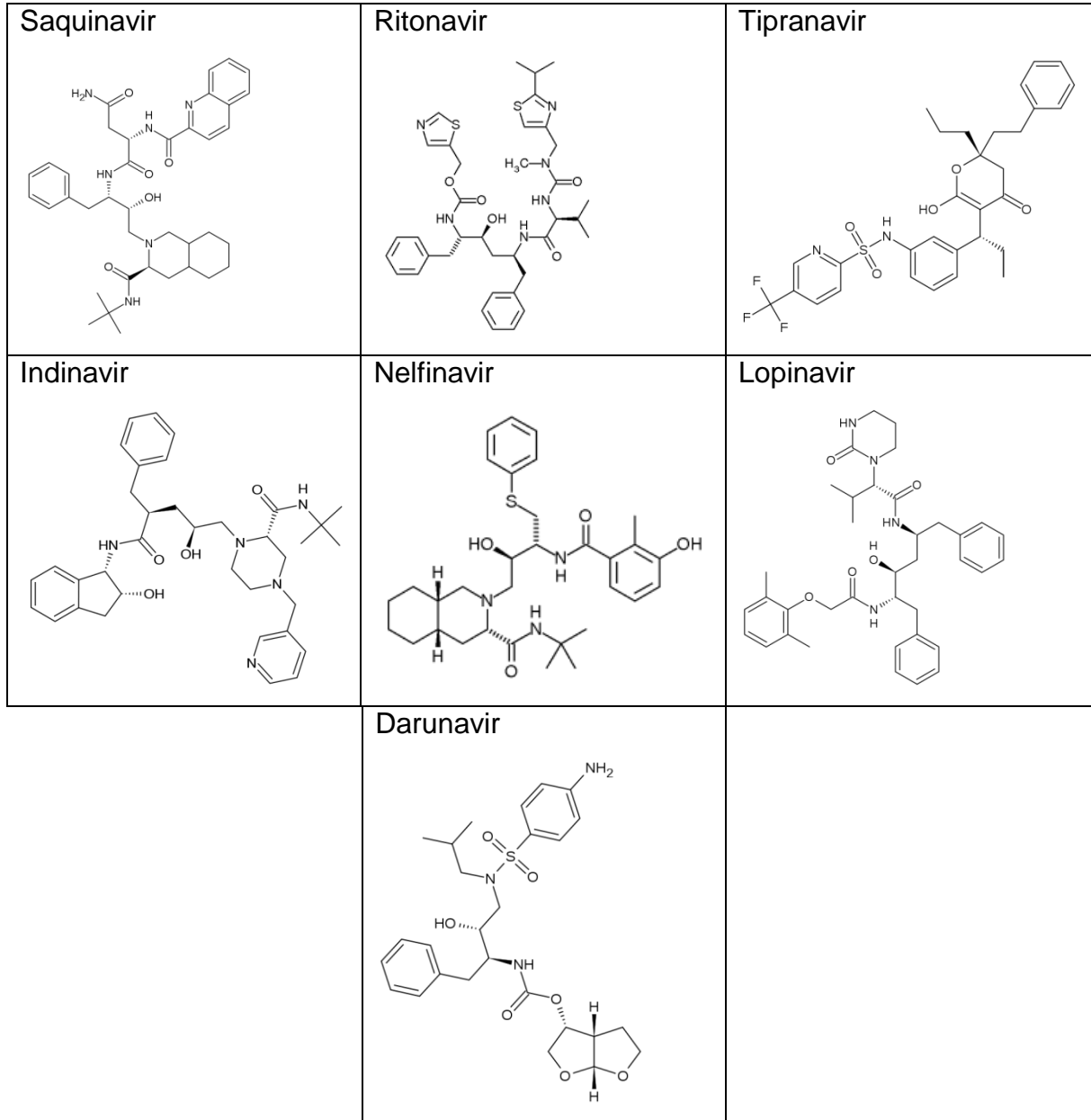
3.1. Doking Metodu Validasyonu

Doking metodunun validasyonu, bir veri seti içerisindeki ligandların reseptör moleküle farklı doking programları kullanılarak yerleştirilmesi ve elde edilen konformasyonların orijinal X-Ray yapısındaki konformasyonundan sapmasının incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Ligandın orijinal yapıdan sapması (RMSD) değerleri, incelenen programların birbirinden farklılıklarına veya reseptör ve ligand molekülün yapısı gibi çeşitli parametrelere bağlıdır.

3.1.1. HIV proteaz yapıları için veri setinin hazırlanması

Doking metodunun validasyonu için HIV proteaz komplekslerinden oluşan ve Protein Databank'tan elde edilen 14 adet HIV-proteaz X-Ray yapısından bir veri seti hazırlanmıştır. Bu veri seti oluşturulurken protein Databank'ta bulunan toplam 200 adet HIV proteaz X-Ray yapısı içerisinde sadece FDA onaylı ilaç molekülleriyle kompleks yapmış yapılar, ve bu yapıların içerisinde de çözünürlüğü en yüksek (sayısal değeri en düşük) olan yapılar seçilmiştir. Bu seçim yapılırken öncelikle Protein Databank içerisinde FDA onaylı ilacın ticari ismine göre arama yapılmış, elde edilen sonuçlar içerisinde kristalografik çözünürlüğü 2.5 Å'dan düşük (sayısal değer olarak 2.5'ten büyük) olanlar atılmış, kalanlar içerisinde en yüksek çözünürlüklü olanlar seçilmiştir. Sonuç olarak elde edilen veri setinde her ilaçtan 2 adet olmak üzere 7 FDA onaylı HIV proteaz inhibitörü için 14 X-ray kompleksi elde edilmiştir. Seçilen X-ray yapılarıyla ilgili detaylar tablo 3.1'de ve ilaç moleküllerinin yapıları şekil 3.1'de verilmiştir.

Ligand yapılarının X-ray koordinatları kompleks yapılardan ekstrakte edilmiş ve böylece ligand ve hedef molekülleri birbirinden ayrılmıştır. Daha sonrasında ligand ve hedef moleküller doking çalışmaları için bir ön hazırlık prosedüründen geçirilmiştir. İncelenen doking programlarının girdi dosyaları formatları birbirinden farklı olduğundan ön hazırlık prosedürü de her doking programı için farklıdır.



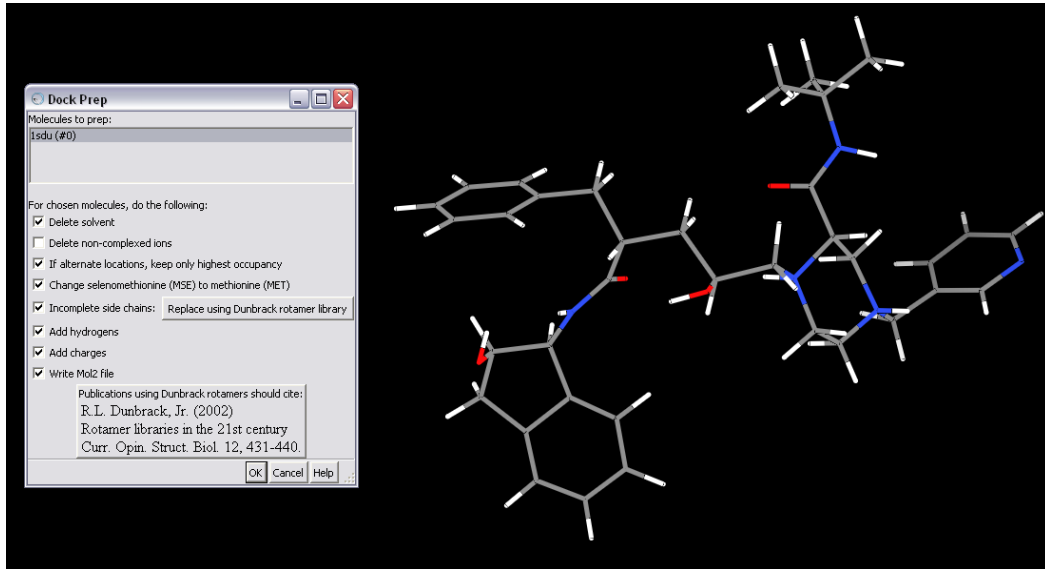
Şekil 3.1: Veri setindeki FDA onaylı HIV PR ilacının kimyasal yapıları

İlaç	Kod	PDB	R (Å)	# AA	LMA	L #DB	LA (Å²)	LH (Å³)
Rit	R ₁	1rl8	2.00	99	636	22	595,8	667,8
Rit	R ₂	1hwx	1.80	99	636	23	582,6	677,7
Ind	I ₁	2b7z	2.20	99	613	16	525,4	574,1
Ind	I ₂	1sdu	1.25	99	613	16	551,7	588,9
Nelf	N ₁	2pyn	1.85	99	567	14	462,4	535,9
Nelf	N ₂	1ohr	2.10	99	567	14	462,1	534,5
Dar	D ₁	2hs1	0.84	99	625	15	423,5	481,7
Dar	D ₂	3d20	1.05	99	625	15	428	485,2
Saq	S ₁	2nmz	0.97	99	670	18	529,2	614
Saq	S ₂	3d1x	1.05	99	670	18	541,1	639,5
Lop	L ₁	2o4s	1.54	99	628	18	525	611,3
Lop	L ₂	2q5k	1.95	99	628	18	516,3	607,3
Tipr	T ₁	2o4l	1.33	99	602	13	469,8	499,2
Tipr	T ₂	2o4p	1.80	99	602	13	473,9	501,6

Tablo 3.1: HIV proteaz veri seti için seçilen X Ray komplekslerinin kristalografik özellikleri. Tabloda PDB sütunu X-Ray yapıların protein veri tabanı kodlamaları, R: X-Ray çözünürlük değeri, #AA: aminoasit sayısı, LMA: ligand molekül ağırlığı, LA: Ligand alanı, LH: Ligand hacmidir. Ligand alan ve hacim değerleri Chimera programı ile hesaplanmıştır. Yapılar bundan sonra kodlarıyla (R₁, R₂) anılacaktır.

3.1.2. Ligand moleküllerin hazırlanması

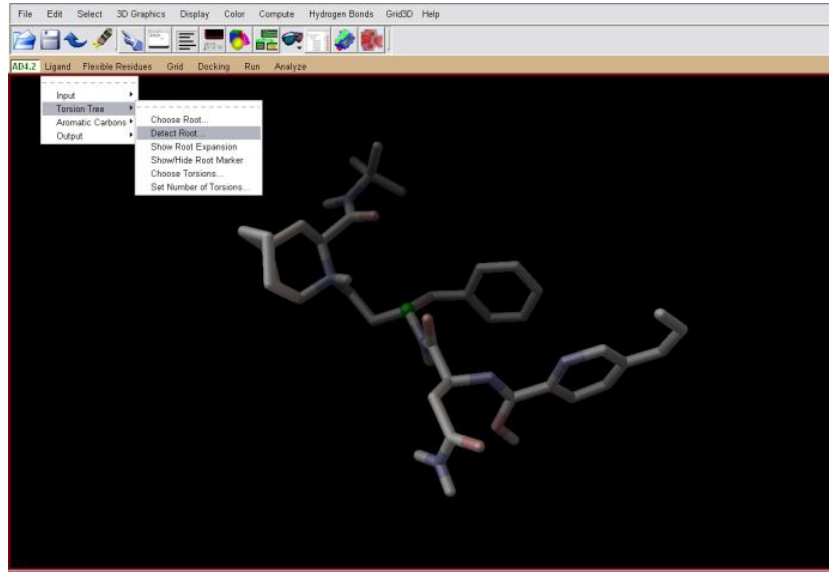
Ligand ve hedef moleküllerinin FlexX doking çalışması için hazırlanması UCSF Chimera moleküler modelleme ve görüntüleme programı ile gerçekleştirilmiştir. FlexX doking için referans oluşturacak ligand yapıları kristal koordinatlarında değişiklik yapılmaksızın kaydedilmiştir. Doking yapılacak olan ligand girdi dosyaları ise Chimera'da DockPrep aracı ile hazırlanmıştır. DockPrep aracı ile ligand yapılarına hidrojenler eklenmiş, yapılar optimize edilmiş ve ANTECHAMBER AM1-BCC metodu (Wang vd., 2006) ile ligand yapıları üzerindeki kısmi (partial) yükler belirlenmiştir. Gerekli durumlarda ligand yapılarıdaki atom tipleri FlexX'in kullandığı SYBYL (SYBYL, Tripos Associates) atom tiplerine (tripos .mol2 dosya formatında tanınan atom tipleri) göre düzenlenmiş ve uygun olmayan hibridizasyon basamakları ve bağ tipleri düzeltilmiştir. Elde edilen ligand molekülleri *.mol2 formatında kaydedilerek FlexX için ligand hazırlık prosedürü tamamlanmıştır. Doking sonucunda RMSD değeri ise doking sonrasında yerleştirilen poz ile referans ligand yapı arasındaki sapmaya göre hesaplanmıştır.



Şekil 3.2: 1sdu yapısının ligandının Chimera ile FlexX doking hazırlığı

AutoDock ve Vina doking için ligand ve hedef molekül girdi dosyaları AutoDock'un grafiksel kullanıcı ara yüzü olan AutoDockTools kullanılarak hazırlanmıştır. Ligand

için, AutoDockTools ile torsiyon kökleri ve ligand moleküldeki torsiyon sayısı belirlenmiştir. Daha sonrasında ligand yapılarına AutoDock ve Vina doking girdi dosyalarının gerektirdiği gibi AD4 atom tipleri ve Kollman yükleri (Kollman, Singh, 1984) tanımlanmıştır. Elde edilen ligand molekülleri *.pdbqt formatında kaydedilmiş ve böylece AutoDock ve Vina için ligand hazırlık prosedürü tamamlanmıştır. (Şekil 3.3)

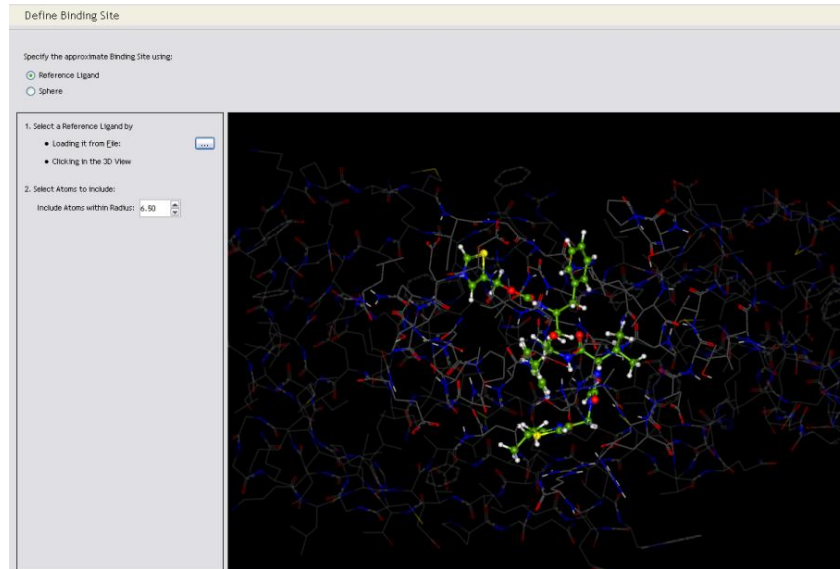


Şekil 3.3: 2nmz yapısı için ADT ile ligand hazırlık prosedürü. Molekül üzerinde torsiyon kökünün belirlenmesi. Torsiyon kökü doking boyunca sabit tutulacaktır.

3.1.3. HIV Proteaz enzimlerinin hazırlanması

Doking işleminde hedef moleküller olan HIV Proteaz enzimlerinin girdi dosyalarının FlexX doking için hazırlanmasında bazı hedef molekül aminoasitleriyle ilgili parametrelerin elle girilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ilk olarak hedef yapıdaki kristal suları silinmiş ve referans ligandın 6.5 Å etrafındaki hedef molekül aminoasitleri aktif bölge olarak seçilmiştir. Bu seçim Şekil 3.4'de görülmektedir. Çalışmanın bu aşaması FlexX BiosolveIT tarafından yapılan FlexX grafiksel kullanıcı ara yüzü (GUI) ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında bu aminoasitler için uygun torsiyon açıları ve protonlanma basamakları fizyolojik pH değerine (pH 7.4) göre belirlenmiştir.

Fizyolojik pH değerine göre Arjinin ve Lysin aminoasitleri protonlanmış, Aspartik ve Glutamik asit amino asitleri ise deprotonanmıştır. Seçilen aktif bölgede bulunan Histidin aminoasitleri için uygun torsiyon açıları ve tautomerleşme basmağı ise 3 boyutlu yapıda görsel olarak belirlenmiştir. Bu aminoasitler üzerindeki potansiyel hidrojen alıcı ve verici gruplar için referans ligand moleküle mümkün olan en yakın şekilde olacak açı seçilmiştir. Hedef molekülde bu modifikasyonlar yapıldıktan sonra her bir hedef molekül *.pdb formatında kaydedilmiş ve FlexX doking için hazırlığı tamamlanmıştır. FlexX doking'de hedef molekülün esnekliği mümkün olmadığı için hedef yapılar tüm doking metodlarında esnemez kabul edilmiştir.



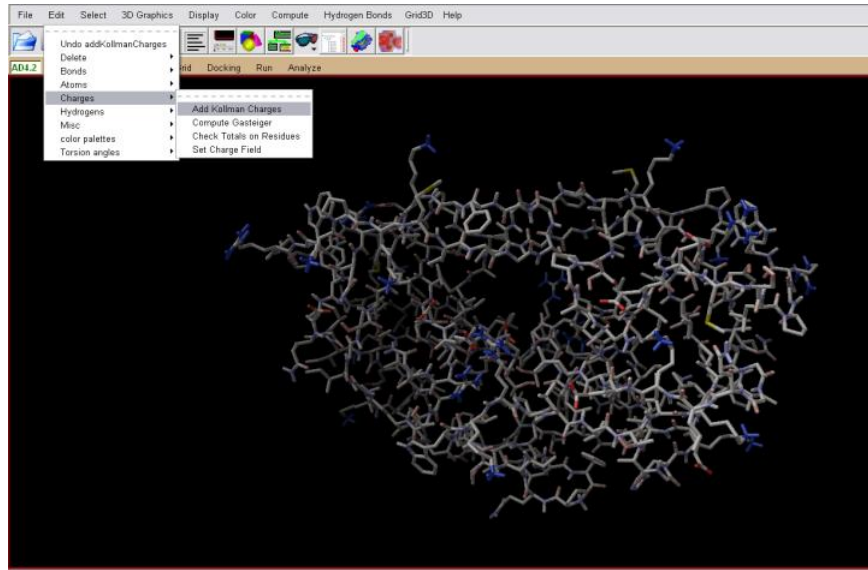
Şekil 3.4: FlexX GUI ile 1rl8 yapısı için aktif bölgenin tanımlanması. Ligand yapısı yeşille, 6.5 Å etrafındaki aminoasitler ise parlak gösterilmiştir.

Hedef molekül girdi dosyalarını AutoDock ve Vina doking'e hazırlamak için ilk olarak kristal suları silinen hedef yapılar pdb2pqr sağlayıcısından (Baker vd., 2007) yararlanılarak *.pqr formatına dönüştürülmüştür. Bu format hedef molekül için girilen pH değerine göre (burada fizyolojik pH olan 7.4) uygun torsiyon açılarını ve protonlanma basmaklarını içerir. Daha sonrasında yine AutoDockTools ile *.pqr dosyaları *.pdbqt'ye dönüştürülmüş, bu dönüşüm esnasında hedef yapılar için AutoDock ve Vina doking'e uygun AD4 atom tipleri ve Kollman yükleri eklenmiştir.

(Şekil 3.5). Çalışmada belirtilen tüm dosya formatlarının içerikleri ekler kısmında ayrıntılı olarak verilmiştir.

Aktif Bölge Amino asitleri	
ARG 8 (A-B)	GLY 48(A-B)
LEU 23(A-B)	GLY 49(A-B)
ASP 25(A-B)	ILE 50(A-B)
THR 26 (A-B)	GLY 51(A-B)
GLY 27(A-B)	GLY 52(A-B)
ALA 28(A-B)	PHE 53(A-B)
ASP 29(A-B)	ILE 54(A-B)
ASP 30 (A-B)	THR 80 (A-B)
THR 31(A-B)	PRO 81 (A-B)
VAL 32 (A-B)	VAL 82 (A-B)
ILE 47(A-B)	ILE 84 (A-B)

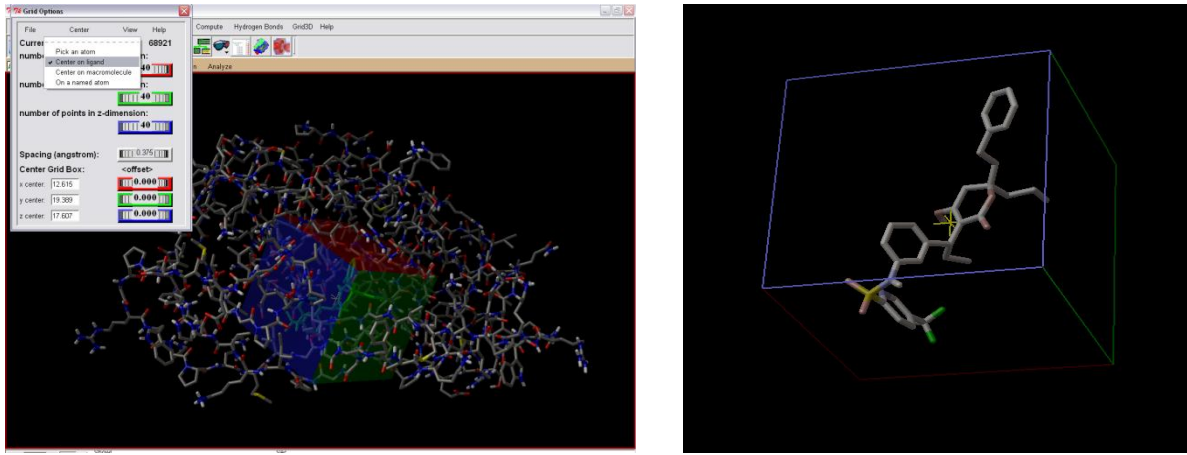
Tablo 3.2: Enzim yapılarından 2q5k pdb kodlu kristal yapı için ligandın 6.5 Å etrafında seçilen aktif bölge amino asitleri. Enzim dimerik yapısında bulunan iki zincir ismi parantez içinde verilmiştir.



Şekil 3.5: 2nmz yapısı için ADT ile hedef molekül hazırlama prosedürü. Hedef moleküle Kollman yüklerinin eklenmesi

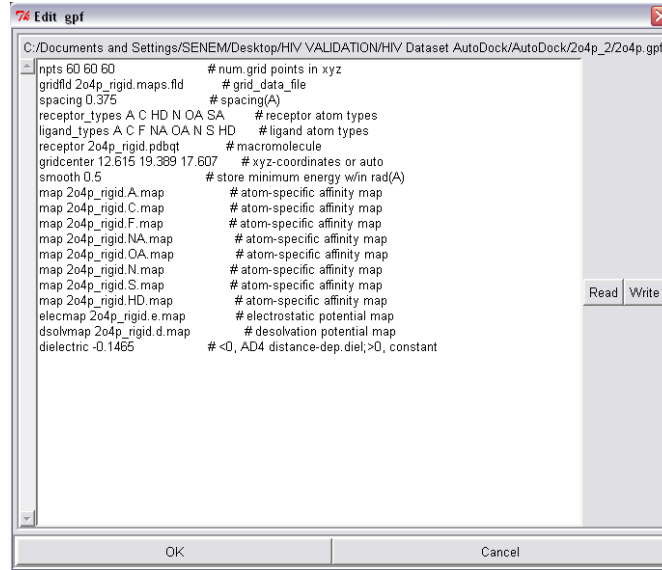
AutoDock doking için gerekli olan bir başka hedef molekül girdi dosyası olan grid haritaları ise yine AutoDockTools kullanılarak hazırlanmıştır. AutoDock ile doking grid haritalarının içerdiği bilgilere ve yönlendirmelere göre gerçekleştirildiğinden bu

haritaların AutoDock doking'e etkisi büyüktür. Grid dosyası özelliklerine bölüm 3.4.2'de değinilecektir. Doking bölgesini tanımlamak için hedef moleküller üzerinde grid kutuları oluşturulmuş ve bu kutuda nokta sayısı 60 60 60 (x,y ve z Kartezyen koordinatlarında), bu noktalar arasındaki boşluklar (grid aralama) 0.375 Å olarak belirlenmiştir. Grid kutusu her yapıda referans molekül üzerine merkezlenmiştir. Grid parametre dosyalarından (gpf) yararlanılarak AutoGrid programı ile AutoDock doking'de kullanılmak üzere grid haritaları hazırlanmıştır. Tüm hedef moleküller için aynı grid parametreleri alınmıştır. Bir grid kutusu örneği şekil 3.6'da görülmektedir. Hazırlanan grid parametre dosyası (gpf) örneği ise şekil 3.7'de görülmektedir.

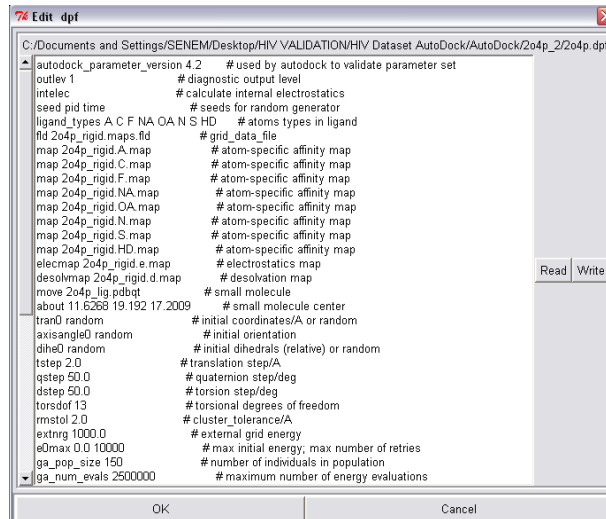


Şekil 3.6: 2o4p yapısı için hazırlanan grid kutusu hazırlama örneği. Hedef molekül üzerinde ligand yapısına merkezlenmiş grid kutusunun görünümü ve parametreleri (sol), grid kutusunun ligandın boyutuna göre ayarlanması (sağ).

AutoGrid tarafından oluşturulan hedef yapıdaki her atoma özel afinite haritaları (grid haritaları) AutoDock doking için doking parametre dosyasında girdi olarak kullanılmıştır. AutoDock doking için gerekli diğer tüm dosyalar gibi doking parametre dosyası (dpf) da AutoDockTools kullanılarak hazırlanmıştır. Doking parametre dosyası gerçekleştirilecek doking çalışmasıyla ilgili tüm detayları içeren bir dosyadır. Kullanılacak doking algoritması ve ligand ve hedef moleküller gibi birçok bilgi bu dosyada bulunur. AutoDock ile yapılan doking çalışmalarının tümünde grid kutusu ve dpf parametreleri sabit tutulmuştur. Aynı zamanda her molekül için kendi dpf'inden elde edilen doking merkezi koordinatları ve grid kutusu büyüklük değerleri (npts) Vina konfigürasyon dosyaları için girdi olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.7: 2o4p yapısı için hazırlanan gpf örneği



Şekil 3.8: 2o4p yapısı için hazırlanan dpf örneği

3.1.4. FlexX programı ile doking

FlexX ile doking'e hedef molekül üzerinde aktif bölgenin tanımlanması ile başlanmıştır. Chimera ile hazırlanmış olan hedef molekül ve referans ligand FlexX ile

açıldıktan sonra referans ligand molekülün 6.5 Å etrafındaki bölge seçilmiştir. Bu bölgedeki aminoasitler için uygun modifikasyonlar bölüm 3.4.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.9'da FlexX programı ile hedef molekülün tanımlanması görülmektedir.

Aktif bölgenin tanımlanmasından sonra Chimera ile hazırlanan doking yapılacak yapısı programa "ligand" olarak tanıtılmış ve son olarak da doking parametreleri girilerek hesaplama başlatılmıştır. FlexX ile yapılan doking hesaplamasının detayları Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Doğru bir metod validasyonu yapabilmek adına, seçilen doking parametreleri veri setindeki tüm hedef yapılar ve ligandlar için sabit tutulmuştur.

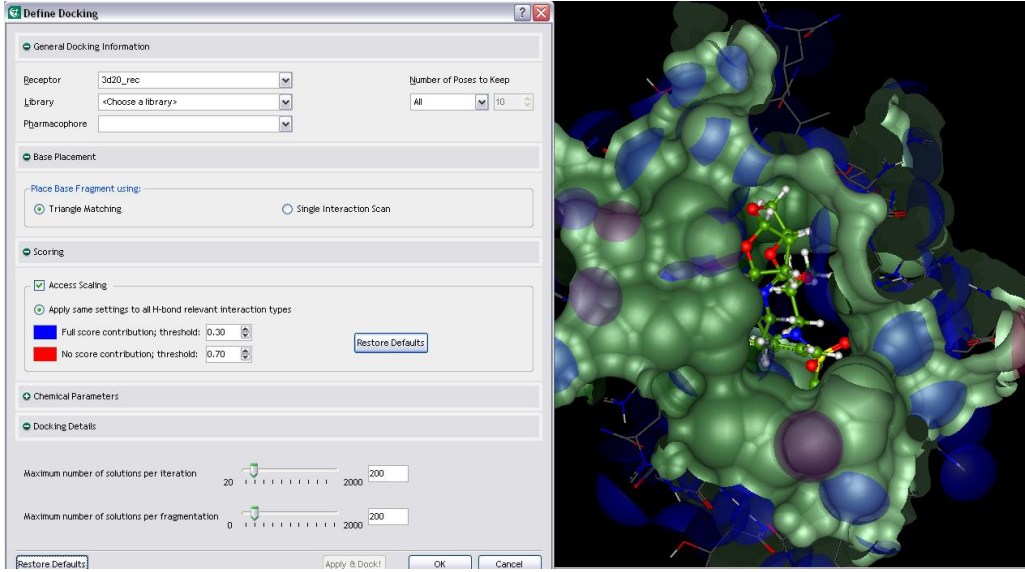
The screenshot displays the FlexX GUI interface. On the left, the 'Protonation & Torsions' table is visible, showing the following data:

AA-Chain	Protonation	Torsion1	Torsion2
ASP-25-A	asp-		
THR-26-A	thr	180	
ASP-29-A	asp-		
ASP-30-A	asp-		
THR-31-A	thr	180	
THR-80-A	thr	180	

Below the table, the 'Water' section is empty. At the bottom, a message box states: 'Please resolve the marked entries in the PROTONATION&TORSIONS table to continue.'

On the right, a 3D molecular model is shown, representing the protein-ligand complex. The protein backbone is shown in grey, and the ligand is shown in green and red. The model is set against a black background.

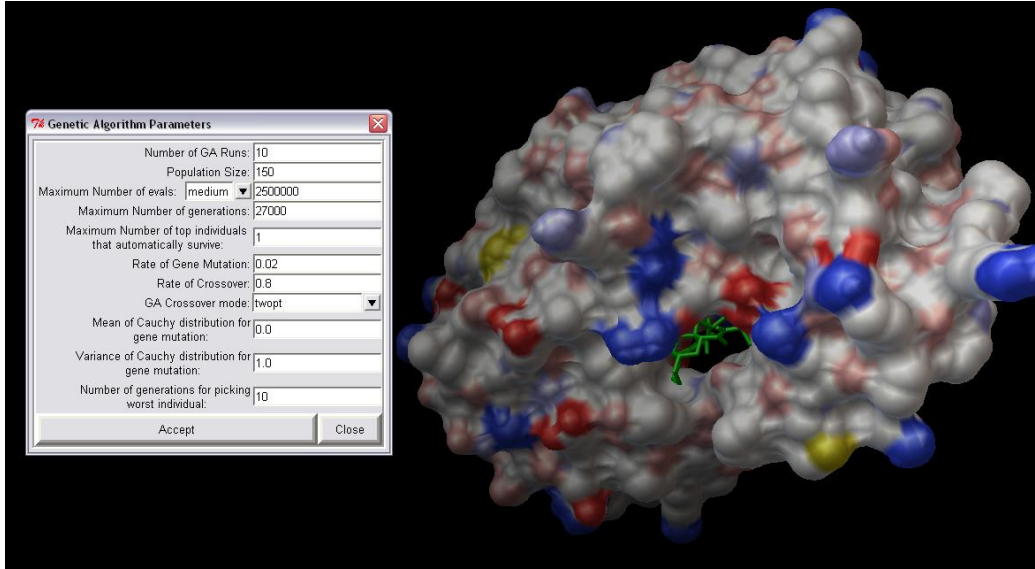
Şekil 3.9: FlexX ile seçilen ligand ve aktif bölge aminoasitleri. FlexX GUI'nin hedef molekül tanımlama seçeneği ile gerçekleştirilen aminoasit modifikasyonları



Şekil 3.10: FlexX programıyla hazırlanan doking parametreleri örneği. Bu parametreler FlexX ile yapılan tüm doking çalışmalarda sabit tutulmuştur.

3.1.5. AutoDock programı ile doking

AutoDock ile doking hesaplaması için *.pdbqt formatında hazırlanan ligand ve hedef molekül girdi dosyaları AutoDockTools ile açılmış ve öncelikle grid hesaplaması yapılmıştır. Grid hesaplaması sonucunda elde edilen atomik afinite harita dosyaları doking parametre dosyası olan *.dpf için girdi olarak kullanılmıştır. Bundan sonraki adım gerçekleştirilecek doking çalışması için uygulanacak algoritmanın seçimidir. Bu çalışmada doking algoritması olarak genetik algoritma seçilmiştir. Genetik algoritma parametreleri Şekil 3.11’de verilmiştir. *.dpf dosyası tarama parametreleri (algoritma seçimi) ve buna bağlı olarak diğer tüm doking parametreleri girildikten sonra AutoDock doking hesaplamasına başlanmıştır. FlexX programı ile hedef molekülün esnekliği mümkün olmadığı için AutoDock hesaplamalarında da hedef molekül esnemez kabul edilmiştir. FlexX doking’de olduğu gibi AutoDock doking için de doking parametreleri veri setindeki tüm hedef yapılar ve ligandlar için sabit tutulmuştur.



Şekil 3.11: AD için hazırlanan doking parametreleri. Hedef molekül moleküler yüzeyi renklendirilerek ligand ise yeşille gösterilmiştir. Tarama parametreleri AutoDock ile gerçekleştirilen tüm doking çalışmaları için sabit tutulmuştur.

3.1.6. AD Vina programı ile doking

AD Vina ile doking için öncelikle her hedef molekül ve ligand dosyası için, hedef molekül ve ligandın AutoDockTools ile hazırlanan *.pdbqt dosyalarını içeren, grid parametre dosyasından alınan ve doking yapılacak alanı merkezin Kartezyen koordinatları ve doking bölgesinin genişliği şeklinde tanımlayan parametrelerden oluşan bir konfigürasyon dosyası hazırlanmıştır. Bu konfigürasyon dosyası Vina hesaplamaları için programa verilen tek girdi dosyasıdır. Bu konfigürasyon dosyasının ayrıntıları Şekil 3.12'de görülmektedir.

AD Vina ile doking hesaplaması için bir grafiksel kullanıcı ara yüzü (GUI) mevcut olmadığından bu doking hesaplamaları cygwin (Delorie, Noer, 1998) ile gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni programın linux Bash kabuğunda çalışmasıdır. Cygwin, Microsoft Windows işletim sistemi üzerinde çalışan bir UNIX simülatörüdür ve ana amacı UNIX, linux, BSD veya benzeri POSIX tabanlı sistemlerde yer alan yazılımların Windows işletim sisteminde çalışmasını sağlamaktır. Bash ise işletim sistemi için bir kabuk ya da başka bir deyişle komut dili yorumlayıcısıdır. Cygwin ile

başlatılan bir doking çalışması örneği Şekil 3.12'de görülmektedir. FlexX ve AutoDock'da olduğu gibi Vina doking için de tüm hedef moleküller esnemez kabul edilmiş, doking parametreleri veri setindeki tüm hedef yapılar ve ligandlar için sabit tutulmuştur.

```

2o4p_conf - Not Defteri
Dosya Düzen Biçim Görünüm Yardım
receptor = 2o4p_rigid.pdbqt
ligand = 2o4p_lig.pdbqt

out = all.pdbqt

center_x = 12.615
center_y = 19.389
center_z = 17.607

size_x = 60
size_y = 60
size_z = 60

exhaustiveness = 16

/cygdrive/c/Users/senoş/Desktop/Vina/2o4p_2
$ ls
2o4p_conf.txt 2o4p_lig.pdbqt 2o4p_rigid.pdbqt
$ "C:/Program Files/The Scripps Research Institute/Vina/vina.exe" --config 2o4p_conf.txt --log 2o4p_log.txt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
Detected 1 CPU
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 750352440
Performing search ...
0%: 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
!-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

```

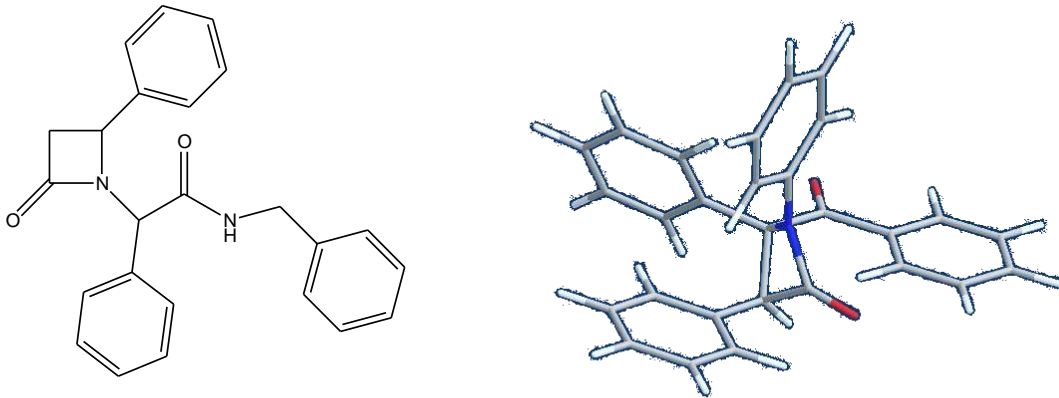
Şekil3.12: Vina için hazırlanan konfigürasyon dosyası içeriği (solda) ve cygwin üzerinden gerçekleştirilen Vina doking çalışması (sağda)

3.2. Beta Laktam Moleküllerinin Doking Çalışması

Beta laktam bileşiklerinin HIV proteaz inhibitör özelliğini incelemek adına, bu moleküller HIV proteaz X-Ray yapısına karşı (PDB kodu:2o4p) doking yapılmıştır. Beta laktam yapılarının doking sonuçlarının deneysel verilere uygun olduğunu görmek için ise Sperka vd. tarafından gerçekleştirilen çalışmada sentezlenen ve inhibisyon yüzdeleri belirlenen bileşiklerin 3 boyutlu yapılarının aynı hedef proteine karşı doking yapılması ve sonuçların deneysel veriler ile korelasyonu incelenmiştir. Sperka vd. tarafından gerçekleştirilen çalışmada sentetik olarak elde edilen bir dizi beta laktam bileşiği için öncelikle bir doking ve moleküler mekanik çalışması yapılarak inhibitör adaylarının enzimin kanat adı verilen bölgesi ile etkileştiği ispatlanmış, ardından bu bileşikler için deneysel % inhibisyon değerleri elde edilmiştir. Moleküler mekanik çalışmaları için PDB kodu 1k1t olan HIV proteaz yapısı

seçilmiştir. 1k1t kristal yapısı bir HIV proteaz enziminin bir peptid substrat ile oluşturduğu kompleks yapısının X-Ray koordinatlarını içermektedir. Tez çalışmamıza dahil edilen kristal yapılar veri seti ise HIV proteaz enziminin FDA onaylı ilaçlarla komplekslerinden oluştuğu için bu yapı veri setine dahil edilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışmada adı geçen inhibitör adayları, metod validasyonu sonucunda uygun X-Ray yapısı olarak seçilen 2o4p yapısına karşı doking yapılmıştır.

Doking yöntemin doğruluğunu test etmek için, öncelikle Sperka vd. tarafından yapılan çalışmada sentezlenen bileşiklerden 5 tanesi seçilmiş, bu bileşikler ChemDraw programı ile çizilmiş ve Gaussian programı ile DFT B3LYP yöntemiyle optimize edilmiştir. DFT (Densiy Fonksiyonel Teori) çoklu bağ sistemlerinin elektronik yapısını incelemek için kullanılan quantum mekaniksel bir teoridir. B3LYP ise DFT'ye uygulanan bir hibrid fonksiyonel yaklaşımdır. Bu yaklaşımda DFT'ye Hartree Fock ve Ab initio teorilerinden bazı korelasyon terimleri dahil edilmiştir.

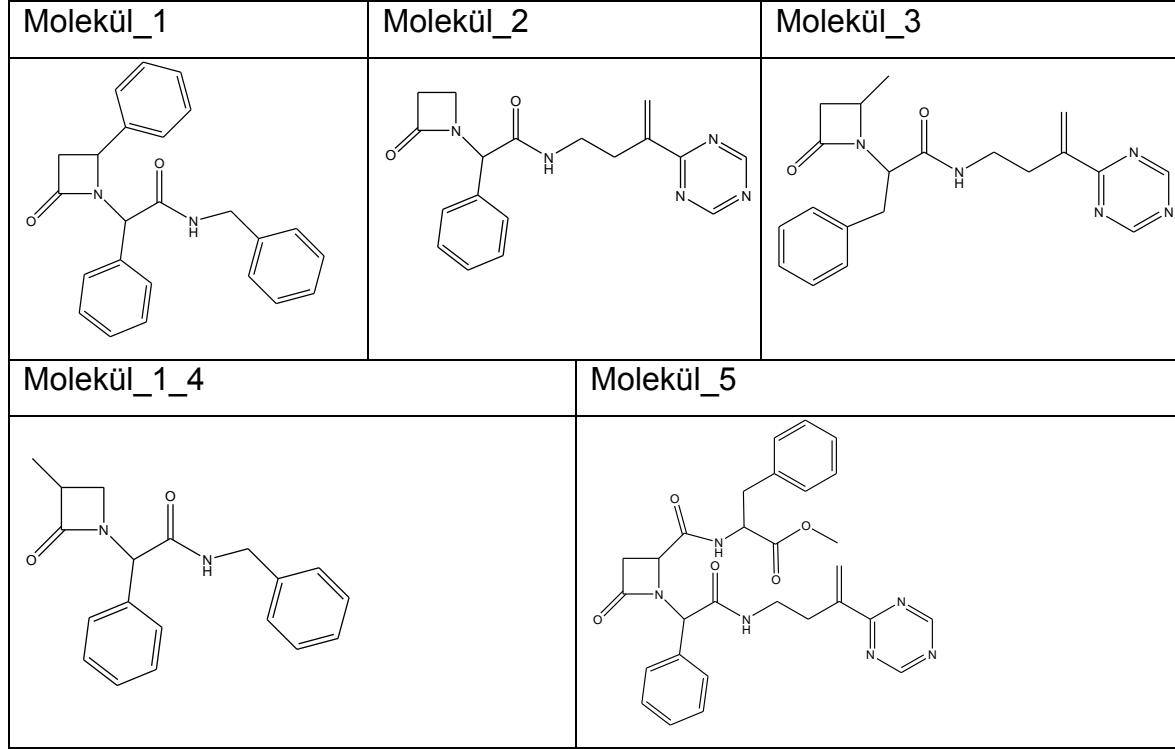


Şekil 3.13: Beta laktam moleküllerin çizilmesi ve optimizasyonu. Çizim işlemleri ChemDraw programı ile (sol) ve optimizasyon işlemleri Gaussian ile DFT B3LYP ile gerçekleştirilmiştir. (sağ)

Optimizasyon işleminden sonra elde edilen inhibitör yapıları AutoDockTools kullanılarak Vina doking için hazırlanmıştır. Vina programı ile doking işlemi bölüm 3.4.6'da anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonu tamamlanan tüm yapılara sırasıyla,

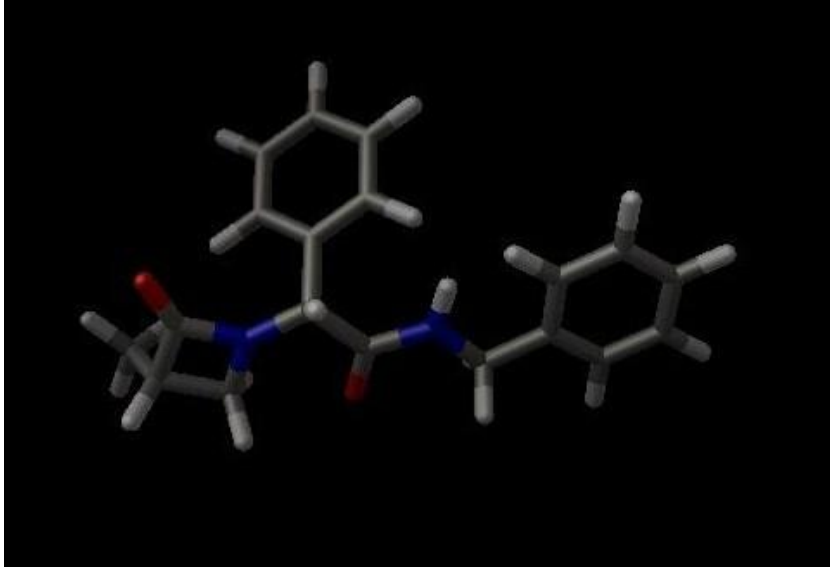
- Ligand moleküller içerisindeki atom tipleri AD4 olarak seçilmesi
- Kollman yükleri hesaplanması
- Ligand dosyaları *.pdbqt olarak kaydedilmesi

işlemleri uygulanmıştır.



Şekil 3.14: (Sperka vd. çalışmasından) Seçilen beta laktam bileşiklerinin kimyasal yapıları

Yapılan doking çalışmasında her molekül için hazırlanan tüm girdi dosyaları aynı parametreleri içermektedir. AD Vina için hazırlanan konfigürasyon dosyasında doking merkezi olarak 2o4p yapısının kanat bölgesinde bulunan, ve beta laktam yapıları ile Hidrojen bağı yaptığı Sperka vd. tarafından yapılan moleküler dinamik simülasyon çalışmasıyla öne sürülen Gly51 amino asidi seçilmiştir. Aynı zamanda, AutoDock Vina ile doking çalışmasını otomatik hale getirebilmek için Windows üzerinden Linux komutlarını çalıştırmak için kullanılan bir UNIX simülatörü olan cygwin'e bir dizi komut girilmiştir. Bu komutlar Şekil3.16'da görülmektedir.



Şekil 3.15: ADT ile hazırlanan ligand *.pdbqt dosyalarının görüntüsü

Bu komutlar ile dosya içerisinde bulunan her molecule*.pdbqt (*=_1, _2, _3, _4, _5) ligandı için bir sonuç dosyası oluşturulup bu sonuç dosyasının içine Vina doking'den gelen ve doking sonuçlarını içeren out.pdbqt ve log.txt dosyalarının kaydedilmesi sağlanmıştır. Ayrıca bu script ile Vina'nın bir molekül için doking'i bitirdiği anda diğerine otomatik olarak başlaması sağlamaktadır. Komut dosyası içerisinde girilen nohup komutu ile de doking hesaplamalarının herhangi bir hata durumunda yarıda kesilmemesi sağlanmıştır.

```
for f in molecule*.pdbqt; do
b=`basename $f .pdbqt`;
nohup echo Processing ligand $b;
mkdir -p $b;
"C:/Program Files/The Scripps Research Institute/Vina/vina.exe" --config conf.txt --
ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log ${b}/log.txt;
done;
```

Şekil 3.16: Vina dokingi otomatik hale getirmek için yazılan komut dosyası

3.3. Görsel Ligand Taraması

Beta Laktam yapılarının görsel ligand taramasını gerçekleştirebilmek için öncelikle beta laktam moleküllerin 3 boyutlu yapılar ZINC veri tabanından (Irwin vd., 2005) indirilmiştir. Veri tabanından moleküllerin ekstrakte edilebilmesi için birçok arama seçeneği mevcuttur. Bunlardan ilki moleküllerin fizikokimyasal özelliklerine göre arama yapmaktır. Aranılan özellikler Şekil 3.17'nin sol kısmında görülen ZINC veri tabanının web sayfasında (<http://zinc.docking.org/>) sol kısma girilerek arama yapılabilir. Başka bir arama yöntemi de istenilen moleküllerin ortak bir özelliği olan bir kimyasal grubu çizmek ve bu grubu içeren molekülleri ekstrakte etmektir. Molekülün şeklinin çizimi Şekil 3.17'nin sağ kısmında yapılır.

ZINC veri tabanında yer alan tüm moleküller 8 haneli bir rakamla kodlanır. Veri tabanı içerisinde bu kodlar kullanılarak belli bir molekülü veya bu moleküle yapıca benzer molekülleri ekstrakte etmek de mümkündür. Bu işlem ise Şekil 3.17'nin ZINC kodları girilen bölümlerinden gerçekleştirilir.

ZINC veri tabanında tarama yaparken önemli olan bir kriter de sağlayıcıları seçilmesidir. Veri tabanı kullanıcısının özel bir sağlayıcı veya tüm sağlayıcılar seçerek arama yapması mümkündür. Sağlayıcı seçimi ise Şekil 3.17'nin alt kısmında yer alan "Vendor" seçeneğinden yapılır.

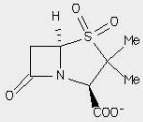
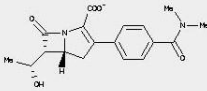

The screenshot displays the ZINC web interface for searching and browsing molecules. The page is titled "Search and Browse" and features a navigation menu with "Home", "Subsets", "HELP", and "Mailing Lists". A prominent banner reads "A free database for virtual screening ZINC is not commercial". Below the banner, instructions state: "Compose a query by specifying molecular property constraints on the left, molecule constitution constraints on the right. You may also specify ZINCIDs, original catalog numbers, and SMARTS, below." The interface is divided into several sections:

- Left Panel:** A list of molecular property constraints with input fields and arrows, including Net charge, xLogP, Rotatable bonds, #H-donors, #H-acceptors, Polar desolvation, Apolar desolvation, Polar surface area, and Molecular weight. There is also an "Availability" dropdown menu.
- Right Panel:** A "JME Molecular Editor" window with a toolbar and a central canvas for drawing chemical structures.
- Search Options:** A section for "ZINC codes (1 per line)" with a text input field and a "Save SMILES" button. Below this, there are options to "Or upload a list of ZINC codes" or "Or upload SMILES/SMARTS from file", each with a "Gözet" (View) button.
- Vendor Selection:** A "Select vendor" dropdown menu and a "Supplier catalog number" input field.
- Advanced Search:** Fields for "Similar to ZINC code:", "Annotation:", and "rediction:".
- Buttons:** "QUERY DATABASE", "time limit", and "I'm Feeling Lucky" buttons.
- Notes:** A footer section explaining that SMILES/SMARTS are ORed together, ZINC codes are ORed together, and ZINC codes and other constraints are ANDed together. It also notes that each page contains up to 100 molecules and search time may vary.

Şekil 3.17: ZINC web sayfasında tarama seçenekleri

Bu çalışmada beta laktam moleküllerinin ZINC veri tabanından ekstrakte edilmesi beta laktam kor yapısının çizilmesi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Beta laktam halkası web sayfasında bulunan JME moleküler editör üzerine çizilmiş ve arama tüm sağlayıcılar üzerinden (“select all vendors” seçeneği ile) gerçekleştirilmiştir. Arama sonucunda ise tüm sağlayıcılardan toplam 370 adet beta laktam bileşiği elde edilmiştir. Arama sonuçlarının bir kısmı Şekil 3.18’de görülmektedir.

Elde edilen 370 adet beta laktam bileşiğine herhangi bir ligand hazırlama işlemi uygulanmadan 2o4p hedef molekül yapısına karşı doking aşamasına geçilmiştir. Tüm beta laktam molekülleri Bölüm 3.2’de anlatıldığı gibi hedef proteinin kanat (flap) bölgesine doking yapılmıştır. AD Vina doking için kullanılan konfigürasyon dosyası Bölüm 3.1.6’da anlatılan konfigürasyon dosyasıdır. Vina programının otomatik doking yapabilir hale getirilebilmesi için de yine Bölüm 3.2’de anlatılan cygwin komutları kullanılmıştır.

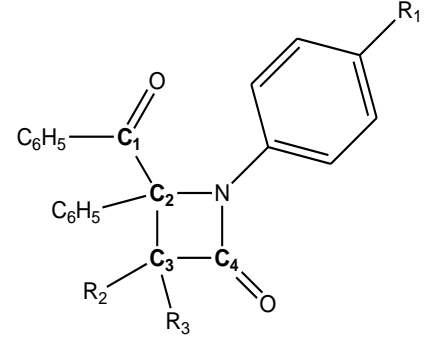
ZINC ID	Supplier information; Representations Properties: xLogP, ap & p desolvation, HBD, HBA, Charge, Mwt, NRB Annotations; Similarity	Structure Click for quick 3D display
2086 #1 FIND SIMILAR Go SEAI	Ambinter: STK177284 APAC Sourcing Solutions: 810783 APIChem: AC-1430, AC-15979 Aurora Fine Chemicals: K06.991.295 Chembio2: 472241... 24 total ref: mol2 , SDF , SMILES , flexibase -2.38,-0.23,-51.35,0.6,-1, 232.237, 1 SEA predictions: Lactam (beta) Enhancer pPvalue:12 maxTC:48 (annotated) Lactamase (beta) Inhibitor pPvalue:30 maxTC:56 (annotated)	
3455 #2 FIND SIMILAR Go SEAI	PubChem: 10132247 ref: mol2 , SDF , SMILES , flexibase -0.08,3.87,-71.78,1.7,-1, 343.359, 4 SEA predictions: Antibiotic pPvalue:19 maxTC:82 (annotated) Lactam (beta) Antibiotic pPvalue:23 maxTC:39 (annotated) Carbapenem pPvalue:224 maxTC:82 (annotated)	
4582 #3	PubChem: 125459 ref: mol2 , SDF , SMILES , flexibase 2.39,2.8,-10.55,0.2,0, 231.629, 2	

Şekil 3.18: ZINC veri tabanında tarama sonucunda elde edilen moleküllerin özelliklerini ve sağlayıcılarını gösteren web sayfası görünümü

3.4. Ligand Veri Setinin Genişletilmesi

Görsel ligand taramasında ZINC veri tabanından ekstrakte edilen moleküllerin yanı sıra deneysel olarak sentezleri gerçekleştirilmiş 8 adet beta laktam bileşiği de veri setine eklenerek set genişletilmiştir. Beta laktam bileşiklerinin sentezi Alcaide vd. tarafından yapılan çalışmada anlatılan bir keten ve imin bileşiğinin siklokatalması yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Alcaide vd., 1982). Bu tür siklokatalmaların 2+2 siklokatalma verdiği önceden yapılan çalışmalarla ispatlanmış olup bu veriyi destekleyen XRD alışmaları da mevcuttur (Kabak vd., 2003, Kabak vd., 2010). Bu sentezlerin ayrıntıları başka bir çalışmanın konusudur (Hacettepe BAP 07A601009).

Bileşik ismi	R1	R2	R3
Beta1	-H	-H	-Ph
Beta2	-Me	-H	-Ph
Beta3	-OMe	-H	-Ph
Beta4	-Cl	-H	-Ph
Beta5	-H	-Cl	-Cl
Beta6	-Me	-Cl	-Cl
Beta7	-OMe	-Cl	-Cl
Beta8	-Cl	-Cl	-Cl



Şekil 3.19: Sentezlenen beta laktam bileşiklerinin kimyasal yapısı (solda) ve içerdikleri fonksiyonel gruplar (sağda)

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Doking Metodu Validasyonu Sonuçları

Çalışmanın bu kısmının amacı docking programlarının doğruluğunu test etmektir. Bu amaçla 14 adet (her bir ilaç yapısından 2 adet olmak üzere 7 çift) HIV-proteaz inhibitörü, kendi hedef molekül bağlanma bölgelerine docking yapılmıştır. Doking metodunun doğruluğunu belirlemek amacıyla ilk olarak hesaplanan ve deneysel ligand konformerleri arasındaki RMSD değeri karşılaştırılmıştır. Tüm docking hesaplamaları sonucunda elde edilen değerler ile birlikte HIV PR-inhibitör kompleks yapıları için deneysel K_i ve bağlanma enerjisi değerleri tablo 4.1'de verilmiştir.

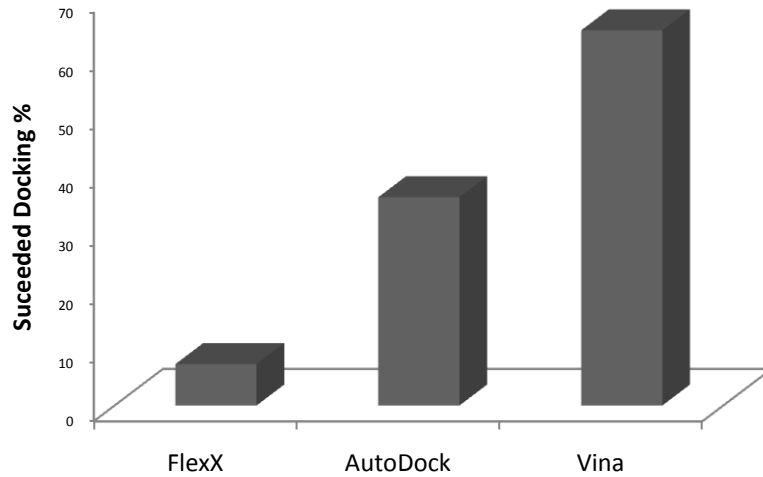
Kod	R ¹	K _i dny ² nM	B.E(dny) ³ kcal/mol	nRot B ⁴	AD Vina		AutoDock			FlexX		
					B.E. kcal/mol	RMS D (Å)	B.E. kcal/mol	Ki nM	RMS D Å	Score	# ligand fragma n	RMSD (Å)
R ₁	1,8	0,01	-14,75	22	-6,9	2,78	-2,6	0,01	4,38	9,27	19	9,59
R ₂	2	N/A ⁵	-	22	-6,1	3,46	-3,02	0,01	4,20	6,32	19	9,7
I ₁	1,2 5	N/A	-	16	-10,4	1,99	-0,15	0,78	1,76	31,74	15	1,18
I ₂	2,2	0,09	-13,72	16	-10,5	1,91	-3,57	0,01	1,97	20,00	15	3,27
N ₁	2,1	2,00	-11,86	14	-9,2	1,30	-3,1	0,01	1,57	6,71	12	8,18
N ₂	1,8 5	7,00	-11,12	14	-11	1,96	-2,7	0,01	2,34	12,87	12	3,49
D ₁	0,8 4	3,30	-11,56	15	-8,5	2,54	-0,4	0,51	5,00	22,31	13	1,46
D ₂	1,0 5	5,00	-11,31	15	-8,5	2,54	-1,88	0,04	4,20	20,27	13	5,15
S ₁	0,9 7	4,30	-11,40	18	-9,7	1,64	-0,91	0,21	5,47	10,61	17	10,41
S ₂	1,0 5	2,20	-11,80	18	-11	2,31	-0,48	0,44	1,97	29,57	17	4,08
L ₁	1,5 4	0,03	-14,32	18	-8,2	1,26 7	-1,39	0,10	2,86	11,13	18	12,96
L ₂	1,9 5	0,01	-15,41	18	-9,7	1,18 2	-1,18	0,14	3,21	20,58	18	10,29
T ₁	1,3 3	0,61	-12,56	13	-9,6	1,63 5	-2,71	0,01	2,56	6,05	13	2,93
T ₂	1,8	0,02	-14,56	13	-10,7	1,56	-2,41	17,1	1,17	25,93	13	1,16

Tablo 4.1: Tüm docking çalışmaları sonucunda elde edilen genel docking sonuçları.

Tabloda; ¹ R: Çözünürlük ² bindingMOAD veritabanından elde edilen deneysel inhibisyon sabitleri; <http://www.bindingmoad.org> ³ B.E, bağlanma enerjisi; $\Delta G = -RT \ln K_i$ bağıntısından türetilmiştir. Burada; $R=1.986 \text{ cal K}^{-1}\text{mol}^{-1}$, ve $T=298.15 \text{ K}$

olarak alınmıştır. Bağlanma enerjisi kavram olarak Gibb's serbest enerjisinin tersidir. ⁴ nRotB: ligand moleküldeki döndürülebilir bağ sayısı. ⁵ Ki değerleri binding MOAD veya başka bir K_i veritabanında bulunmayan moleküllerdir.

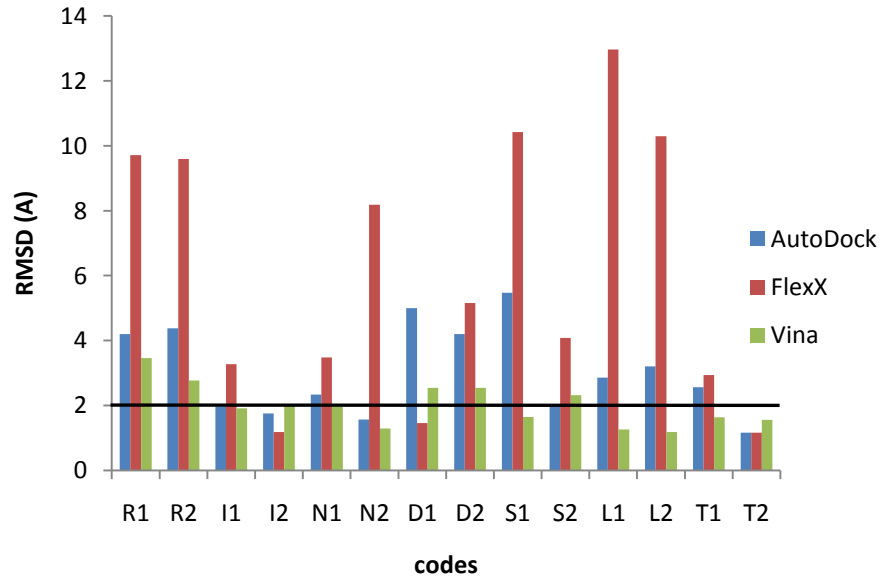
Elde edilen doking sonuçları RMSD değeri 2 Å'den küçük olduğunda doğru olarak nitelendirilmiştir. Burada RMSD, ligand molekülün X-ray yapısında belirlenen konformasyonundan kök ortalama kare sapmasıdır. Tüm sonuçlar RMSD cinsinden karşılaştırıldığında Vina doking programı diğer programlara göre daha çok miktarda doğru doking sonucu vermiştir. Bu sonuçlar şekil 4.1'de görülmektedir. Veri setindeki 14 kristal yapısı için Vina ile 9, AutoDock ile 5, ve FlexX ile 3 sonuç RMSD değeri 2 Å'den küçük olarak sonuçlanmıştır. Bu sonuçlara göre, FlexX AutoDock ve Vina için doğru doking yüzdeleri sırasıyla 7.1%, 35.7% ve 64.3%'dir.



Şekil 4.1. Doking programları ile elde edilen doğru doking yüzdeleri

Doking sonuçlarına ilk bakışta doking programlarının aynı hedef ve ligand molekül çiftleri için her zaman aynı sonuçları vermediği görülmektedir. **Saquinavir** çifti olan S₁ ve S₂ yapılarının AutoDock sonuçları (sırasıyla 5.47 ve 1.97) bu duruma bir örnektir. Bu durumda doking programı aynı hedef molekül yapısı ve aynı kimyasal yapıdaki ligandlardan biri için (S₂) doğru doking sonucu vermişken diğer yapı için başarısız bir doking çalışması sergilemiştir. Aynı durum FlexX doking'de N₁ ve N₂ çifti için de gözlenmiştir. Bu durum ilk bakışta bir doking hatası olarak yorumlanabilir ancak

docking sonuçları sadece ligand ve hedef moleküllerin kimyasal yapısına bağlı olmadığından bunu bir hata olarak değerlendirmek doğru olmayacaktır. X-Ray yapılarındaki bazı farklılıklar da bu duruma sebep olmuş olabilir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, bahsedilen enzim çiftleri için (S ve N çiftleri) kristal yapıları elde edilirken oluşan mutasyonlar farklı docking sonuçlarına yol açmış olabilir. FlexX ve AutoDock ile yapılan dockinglerde bu enzim çiftlerinde görülen mutasyonların docking sonuçlarını etkilediği görülmüştür. Ancak AD Vina ile yapılan dockingler ise enzim çiftleri için birbirine yakın RMSD sonuçları vermiştir. Bu nedenle AD Vina programının mutasyona karşı hassasiyet göstermediği, aynı ligandın farklı HIV PR enzimleri ile etkileşiminde benzer sonuçlar verdiği söylenebilir. Yine bu durum docking çalışmaları öncesinde metodu validasyonu yapmanın gerekliliğini göstermektedir. Aynı kimyasal yapılar için farklı docking sonuçlarının bir sebebi aktif bölge parametreleridir. Aynı hedef moleküller için bağlanma bölgeleri alan ölçümlerinde görülen farklılıklar da bu durumu açıklar. Ölçülen bağlanma bölgesi alanlarının farklılıkları hedef moleküllerin X-Ray yapılarının çözülmesi esnasında meydana gelen farklılıklardan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.2: Tüm docking programları ile gerçekleştirilen docking sonuçlarının RMSD değerlerinin 2 Å limitinde değerlendirilmesi

Şekil 4.2'de tüm doking sonuçları RMSD değerlerine göre verilmiştir. Şekle göre **AutoDock** programı **Indinavir** çifti için (I_1 ve I_2) 1.76 ve 1.91 RMSD değerleriyle en iyi sonuçları vermiştir. Her inhibitör çifti için doking sonuçları incelendiğinde ise Ritonavir çifti (R_1 ve R_2) için tüm doking programları ile tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.

Doking sonrasında doğru olarak tahmin edilen ligand pozunun diğer pozlar arasındaki sıralaması da doking programının güvenilirliği açısından önemli bir parametredir. Bu bağlamda iki parametre göz önünde bulundurulabilir. Bunlar sadece ilk sırada elde edilen doğru doking sonucu sayısı ve ilk 10'da herhangi bir sırada tahmin edilen doğru doking sonucudur. Buna göre FlexX programı, ilk 10 tahmini içerisinde en yüksek sayıda doğru doking pozunu elde edilen program olarak sonuç vermiştir. Ancak bu sonuçlardan sadece birkaçı ilk sırada elde edilmiştir. Bir doking programının başarısı doğru poz aynı zamanda ilk sıralarda tahmin etmesine de bağlıdır. Bu nedenle FlexX programı bu noktada yetersiz kalmıştır. İlk sırada tahmin edilen doğru doking pozunda Vina en yüksek sonuçları vermiştir. Bu sonuçlar kısaca Tablo 4.2'de görülebilir.

Program	Doğru poz sayısı (sadece 1. Sırada olanlar)	Doğru poz sayısı (ilk 10 içerisinde herhangi bir sırada)
AutoDock	2	5
FlexX	2	27
Vina	8	17

Tablo 4.2: Tüm doking programları ile elde edilen doğru poz sayıları

Tahmin edilen en iyi pozun (en düşük RMSD'li poz) diğer pozlar içerisindeki sıralaması, doking programının sıralama fonksiyonunun bir güvenilirlik göstergesi olarak ele alınabilir. Buna göre, Vina doking programı ligandın bağlanma modunu tahmin etmede en başarılı program olarak bulunmuştur. İncelenen doking programları arasında Vina, ilk sırada elde ettiği pozların 85.7%'sini en iyi poz olarak tahmin etmiştir. AutoDock ve FlexX ise bu değeri sırasıyla 71.4% ve 35.7% ile takip etmiştir. En iyi RMSD veren pozların sıralamalarının karşılaştırması Tablo 4.3'da verilmiştir.

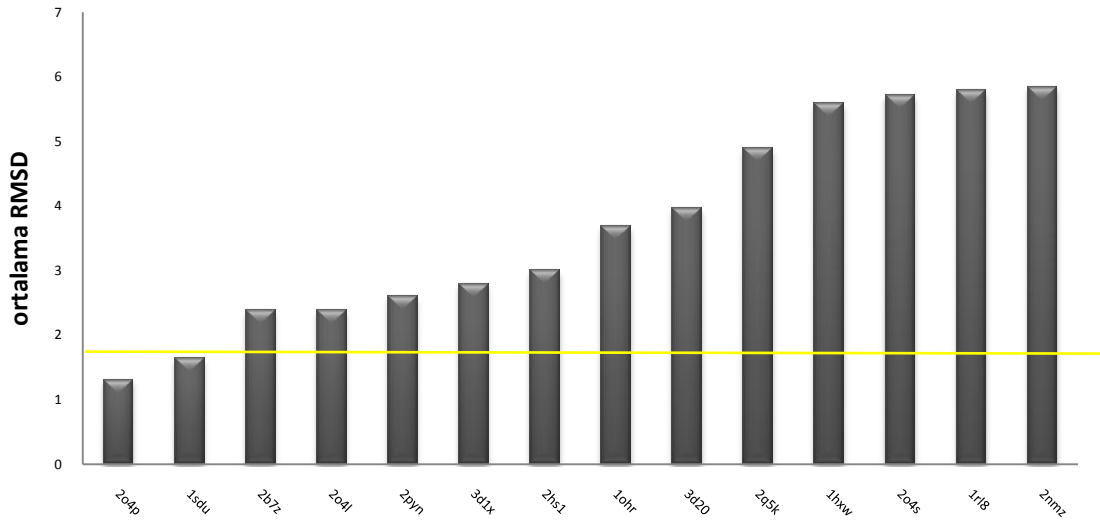
RMSD değrleri başka bir açıdan değerlendirilecek olursa, tüm doking programlarıyla yapılan dokingler sonucunda elde edilen RMSD değerlerinin ortalaması da çalışmanın ileriki aşamalarında kullanılabilir. Başka bir deyişle, her üç doking programıyla da doğru sonuç veren bir hedef yapı görsel ligand taraması gibi doking metodunun daha ileri uygulamalarında kullanılmaya uygun bir yapı olarak değerlendirilebilir. Bu amaçla her hedef molekül için, tüm doking programlarıyla elde edilen RMSD sonuçlarının ortalamaları karşılaştırılmıştır. Bu değerler Tablo 4.4'te görölmektedir. Ortalama RMSD değerleri ve karşılık gelen PDB kodları da şekil 4.3'de vermiştir. Çalışılan veri setinde, 1sdu ve 2o4p PDB kodlu X-ray yapıları için 3 programla ile gerçekleştirilen doking sonucunda elde edilen ortalama RMSD değerleri 2 Å'den küçük, dolayısıyla bu yapılar için ligand bağlanma modu 3 programla da doğru olarak elde edilmiştir. Başka bir deyişle, 1sdu ve 2o4p yapılarına ait hedef moleküller ileriki doking çalışmaları için daha uygun yapılardır. Bu sonuçtan yola çıkılarak çalışmanın ileriki aşamalarında 2o4p yapısı hedef molekül olarak kullanılacaktır.

Kod	En iyi poz sıralamaları		
	AutoDock	FlexX	Vina
R ₁	1	2	1
R ₂	1	1	6
I ₁	1	9	1
I ₂	4	4	1
N ₁	1	1	1
N ₂	4	8	1
D ₁	1	2	1
D ₂	1	1	1
S ₁	1	9	2
S ₂	4	1	1
L ₁	1	4	1
L ₂	1	1	1
T ₁	1	9	1
T ₂	2	8	1

Tablo 4.3: Tüm dokingler sonucunda tahmin edilen en iyi pozun sıralaması

Kod	RMSD AD	RMSD FlexX	RMSD Vina	ortalama RMSD
R ₁	4,20	9,71	3,46	5,79
R ₂	4,38	9,59	2,78	5,58
I ₁	1,97	3,27	1,91	2,38
I ₂	1,76	1,18	1,99	1,64
N ₁	2,34	3,49	1,96	2,60
N ₂	1,57	8,19	1,29	3,68
D ₁	5,00	1,46	2,54	3,00
D ₂	4,20	5,15	2,54	3,96
S ₁	5,47	10,41	1,64	5,84
S ₂	1,97	4,08	2,31	2,79
L ₁	2,86	12,96	1,26	5,70
L ₂	3,21	10,29	1,18	4,89
T ₁	2,56	2,93	1,63	2,38
T ₂	1,17	1,16	1,56	1,30

Tablo 4.4: Tüm dokingler sonucunda elde edilen RMSD değerlerinin ortalamaları



Şekil 4.3: Ortalama RMSD değerleri ve karşılık gelen PDB kodları

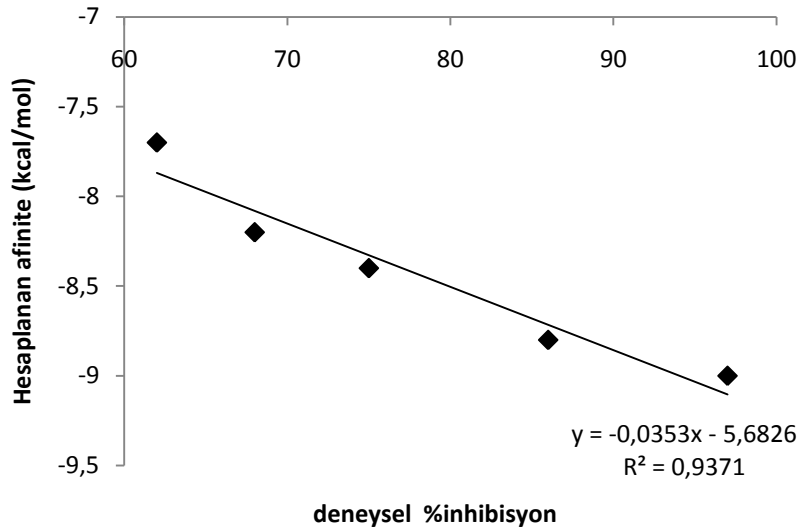
4.2. Vina Doking Programının Beta Laktam Moleküllerine Uygunluğu

Beta laktam bileşiklerinden Sperka vd. tarafından yapılan çalışmada aktif bulunan moleküllerin (şekil 3.14), AD Vina programı ile PDB kodu 2o4p olan ve metod validasyonu sonucunda doking için uygun bulunan kristal yapısına karşı doking sonucunda elde edilen ligand konformasyonları için Tablo 4.5'deki sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre deneysel olarak elde edilen % inhibisyon değerleri ile Vina ile hesaplanan afinite değerleri arasında yüksek bir korelasyon (0.937) bulunmaktadır. Bu korelasyonu gösteren grafik Şekil 4.4'de verilmiştir. Elde edilen yüksek korelasyon, Vina doking yönteminin deneysel değerlere uygun sonuçlar verdiğini göstermektedir. Gerçekleştirilen doking çalışması sonucunda bulunan bağlanma modlarının doğru olduğu, başka bir deyişle doking çalışmasının tüm moleküller için doğru sonuçlar verdiği tabloda görülen RMSD değerlerinden anlaşılmaktadır. Ayrıca bu çalışmadan elde doğru denklemi, görsel ligand taramasından elde edilen umut verici beta laktam bileşiklerinin % inhibisyon değerini tahmin etmede kullanılabilir.

Şekil 4.4'deki doğru denklemi bir kalibrasyon eğrisi olarak ele alınabilir. Hatta bu yolla Bölüm 4.3'te anlatılacak olan görsel ligand taraması sonucunda elde edilen yapılar için yaklaşık bir % inhibisyon değeri tahmin etmek de mümkündür. AD Vina ile elde edilen afinite (bağlanma enerjisi) değerleri ile deneysel olarak elde edilen K_i değerlerinden türetilen bağlanma enerjisi değerleri, tek bir molekül için sayısal değer olarak birebir örtüşmese de, birden fazla yapı ele alındığında, artan afinite değerleriyle, deneysel olarak hesaplanan % inhibisyon değerinin arttığı görülmektedir. Deneysel veriler ile doking sonucunda elde edilen değerler arasındaki ufak farklılıkların nedeni ise doking çalışmaları öncesinde hedef moleküllerin kristal yapısında bulunan tüm su moleküllerinin silinmiş olmasından kaynaklanabilir.

molekül	% inhibisyon (deneysel)	Bağlanma enerjisi (kcal/mol) (hesaplanan)	RMSD
3	62	-7,7	1,781
2	68	-8,2	1,457
1	75	-8,4	2,166
4	86	-8,8	1,991
5	97	-9	1,878

Tablo 4.5: Beta laktam doking sonuçları ve deneysel % inhibisyon değerleri

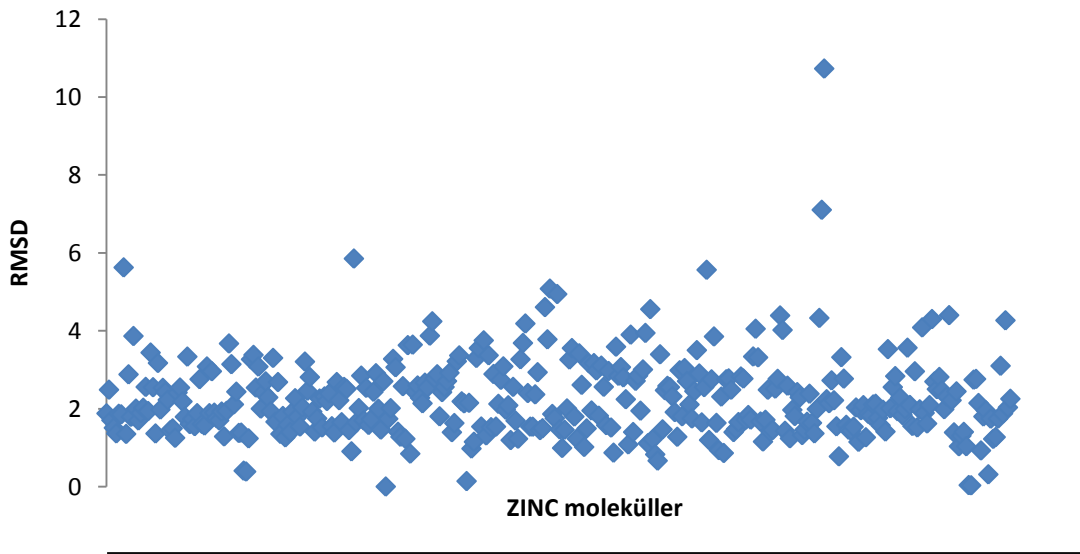


Şekil 4.4: Vina doking ile elde edilen sonuçlar ile deneysel % inhibisyon değerlerinin korelasyonu

4.3. Beta Laktam Bileşikleri İçin Görsel Ligand Taraması Sonuçları

ZINC veri tabanından ekstrakte edilen 370 adet beta laktam bileşiği ile birlikte Bölüm 3.2 ve Bölüm 3.4'te kısaca değinilen sentezler ile elde edilmiş beta laktam bileşiklerini de veri setine eklenerek toplam 378 ligand içeren bir veri seti genişletilmiştir. Görsel ligand taraması işlemi metod validasyonu sonucunda seçilen AutoDock Vina

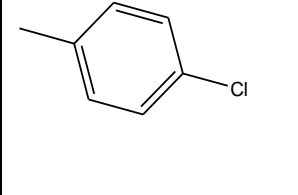
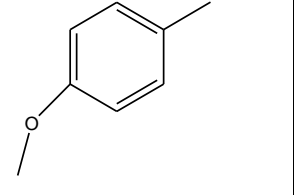
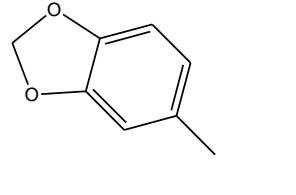
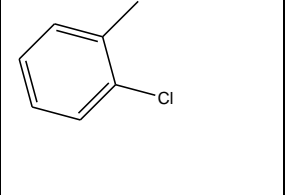
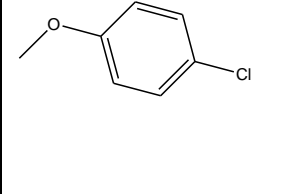
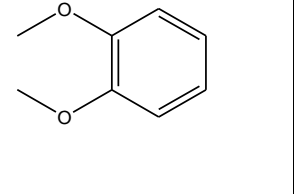
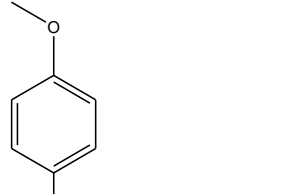
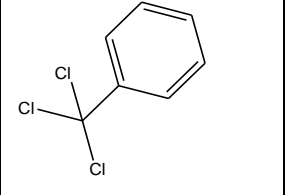
programı ile 2o4p yapısına karşı doking yapılmıştır. Tüm doking çalışmaları otomatik hale getirilmiş ve tüm çalışma cygwin üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, her bir ligand için 10 adet bağlanma modu elde edilmiş, bu bağlanma modlarından (doking konformasyonu) en düşük RMSD değeri veren konformasyon, o ligand için doking sonucu olarak kabul edilmiştir. Böylece elde edilen yüzlerce sonuç, her bir ligand için 1 adet doking sonucu olacak şekilde indirgenmiştir. Bu indirgeme sonrasında RMSD değeri (doking merkezi olarak belirlenen noktadan sapma) 2 Å'den küçük olan toplam 177 sonuç elde edilmiştir. Doking sonuçlarının 2 Å'den küçük olması o ligandın hedef proteine program tarafından doğru doking yapıldığını gösterdiğine önceden değinilmişti. Buna göre, elde edilen doking sonuçlarının 46%'sı 2 Å'den küçük sonuç vermiş ve hedef proteinle yüksek etkileşim göstermiştir. Bu değer beta laktam bileşiklerinin genel olarak HIV PR yapıları ile etkileşiminin yüksek olduğunu göstermektedir. Görsel ligand taraması sonuçları Şekil 4.5'de görülmektedir.



Şekil 4.5: Görsel ligand taraması sonucunda elde edilen RMSD değerlerinin tümünün 2 Å limitinde gösterimi

RMSD değeri 2 Å'den küçük olan tüm sonuçlar daha sonrasında AD Vina ile hesaplanan bağlanma afinitelerine göre sıralanmış ve bu sıralama ile HIV proteaz hedef yapısı için inhibitör adayı olabilecek moleküller belirlenmiştir. Bu moleküllerden

bağlanma afinitesi değerleri en düşük olan ilk 20 molekülün kimyasal yapıları ZINC kodları ile birlikte Tablo 4.6'de verilmiştir. Şekildeki yapılara daha ayrıntılı incelenecek olursa, birçok molekülde beta laktam halkasına bağlı grupların benzer fonksiyonel gruplar içerdiği gözlenmektedir. Bu gruplar içerisinde en çok göze çarpanlar p-kloro benzen, anisol, benzo[d][1,3]dioksol, o- ve p-klorobenzen, 1-kloro-4-metoksibenzen, 1,2- veya 1,4-dimetoksibenzen, triklorometilbenzen gruplarıdır. Bu fonksiyonel gruplar Şekil 4.6'da görülmektedir.

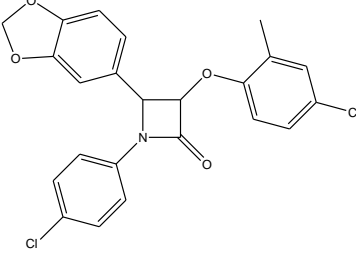
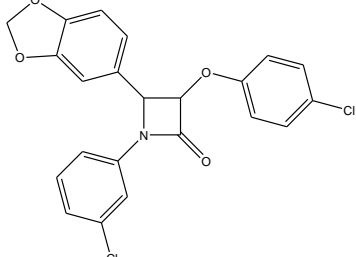
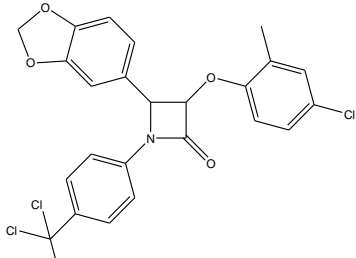
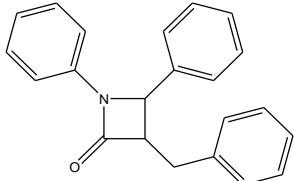
p-kloro benzen	anisol	benzo[d][1,3]diokso	o-klorobenzen
			
1-kloro-4-metoksibenzen	1,2- dimetoksibenzen	1,4-dimetoksibenzen	triklorometilbenzen
			

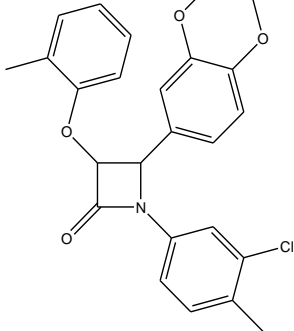
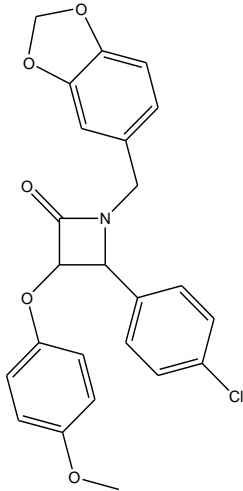
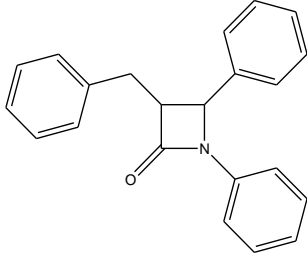
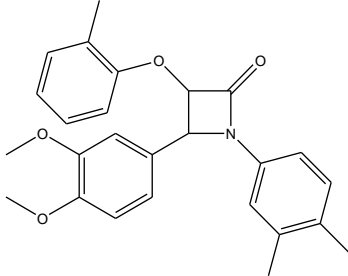
Şekil 4.6: Görsel ligand taraması sonucunda en iyi bağlanma afinitesi değerlerini veren beta laktam bileşiklerinin fonksiyonel grupları

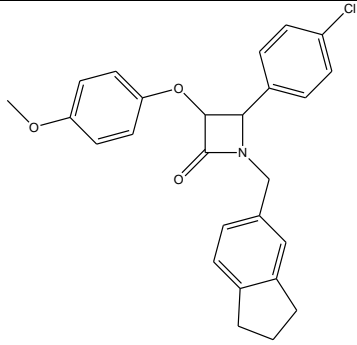
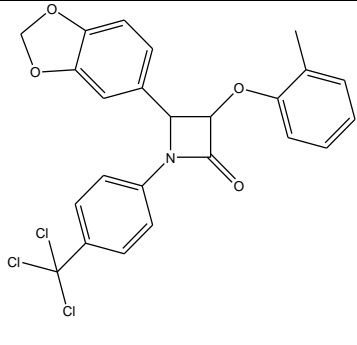
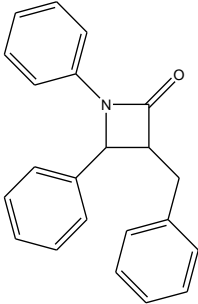
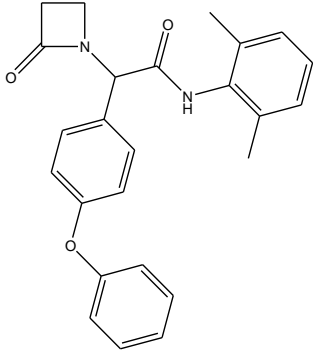
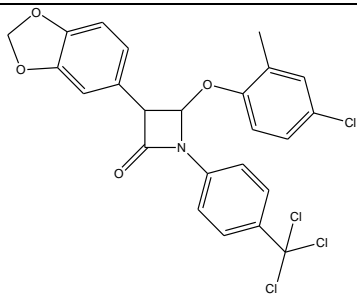
Bu fonksiyonel gruplar HIV proteaz enziminin kanat bölgesinde bulunan ve görsel ligand taraması çalışmasında doking yapılacak bölgenin merkezi olarak seçilen Gly51 amino asidinin amin ve karboksilik asit gruplarına Hidrojen sağlayıcı ve bu gruplardaki elektronegatif atomlara bağlı Hidrojenleri kabul edici atomlar içermektedir.

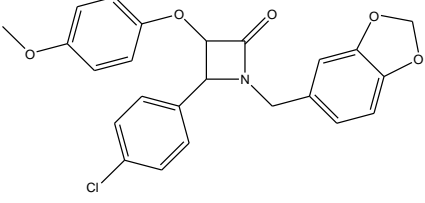
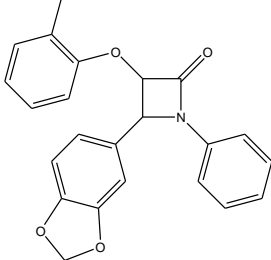
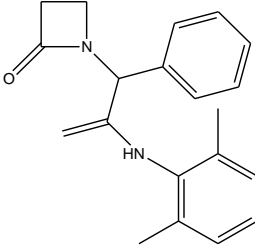
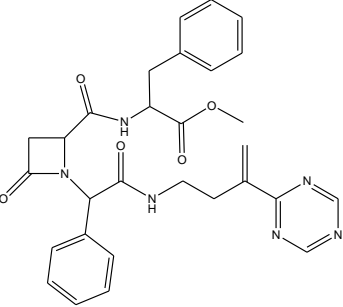
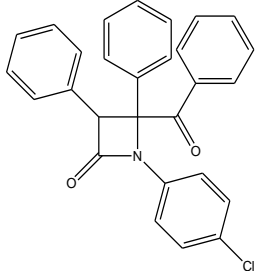
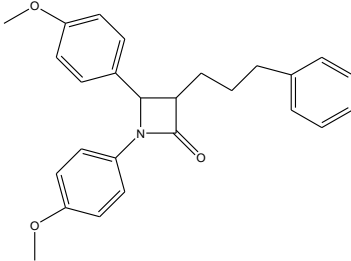
Elde edilen sonuçlar içerisinde RMSD değeri 2 Å'den küçük olan en yüksek bağlanma enerjili ilk 20 sonucun içerisinde Sperka vd. tarafından gerçekleştirilen çalışmada sentezlenen molekülden molekül_5 isimli yapı da yer almaktadır Bu yapı Sperka vd. tarafından sentezlenen ve deneysel Ki değerleri bulunan moleküller içerisinde en yüksek inhibisyon %'si gösteren yapıdır. Görsel ligand taraması

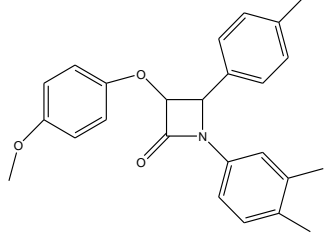
sonucunda elde edilen inhibitör adayı moleküller için hesaplanan bağlanma değerlerinin molekül_5 ile eşit ve daha küçük olması ise bu yapıların HIV proteaz enzimi için umut verici birer rekabet etmeyen (uncompetitive) inhibitör adayı olabileceğini göstermektedir.

ZINC kodu	Bağlanma afinitesi (kcal/mol)	RMSD (Å)	Kimyasal yapısı
ZINC00720531	-9,8	1,447	
ZINC00729579	-9,8	1,714	
ZINC00720516	-9,7	1,536	
ZINC01019834	-9,7	1,034	

ZINC00717901	-9,4	0,844	
ZINC00816114	-9,4	1,456	
ZINC01019831	-9,4	1,033	
ZINC00717824	-9,3	1,996	

ZINC00816116	-9,3	1,534	
ZINC00720507	-9,2	1,227	
ZINC01019832	-9,2	1,304	
ZINC01020787	-9,2	1,953	
ZINC00720517	-9,1	1,534	

ZINC00816115	-9,1	1,433	
ZINC00816232	-9,1	1,821	
ZINC01020780	-9	0,037	
Molecule_5	-9	1,878	
beta4	-9	1,866	
ZINC00598455	-9	1,385	

ZINC00729366	-9	1,276	
--------------	----	-------	--

Tablo 4.6: Görsel ligand taraması sonucu elde edilen düşük bağlanma afiniteli en iyi 20 bileşik

5. YORUMLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın ilk aşamasında, 3 ayrı doking yönteminin; **FlexX**, **Autodock (AD)** ve **Autodock (AD) Vina** validasyonu X-ray yapısı bilinen **14 adet** HIV-Proteaz kompleksi için yapılmıştır. HIV-PR test seti için yapılmış herhangi bir doking programlarının karşılaştırılması ve validasyon çalışması bulunmaması nedeniyle yapılan çalışma ilk olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmamızın her aşamasında elde edilen sonuçları özetleyecek olursak;

VALİDASYON ÇALIŞMASI SONUCUNDA;

1. Hazırladığımız veri seti için doğru doking yüzdeleri; **FlexX**: %7.1, **Autodock**: %35.7, **AD Vina**: %64.3' tür.
2. **AD Vina** programının, HIV Proteaz enzimi için en iyi sonuç veren program olduğu bulunmuş ve çalışmanın diğer aşamaları için bu yöntem seçilmiştir.
3. **AD Vina** programı ile enzimin farklı mutantlarının(aktif bölge dışında olmalı) kullanılmasında herhangi bir sakınca olamayacağı saptanmıştır.
4. **2o4p** Pdb kodlu enzim yapısı ile elde edilen sonuçların kullanılan her üç yöntem içinde başarılı olması yöntem seçme seçeneği olmayanlar için bir alternatif sunmaktadır.
5. HIV Proteaz sistemi için; en uygun x-ray yapısının Pdb kodu:**2o4p** ve en iyi doking yönteminin ise **AD Vina** programı olduğu bulunmuştur.

VALİDASYON ÇALIŞMASI SONUÇLARININ KULLANIM ALANLARI;

1. Sadece HIV-PR enzim yapısını içeren test seti hazırlanmıştır. Bu set, yeni yazılan programları doğruluğunu ve güvenilirliğini test etmek için kullanılabilir.
2. 14 veri içeren test set içinde aynı inhibitör için iki farklı yapının bulunması, hesaplama sonuçlarının doğruluğuna ve/veya sapmasına etki eden "**kimyasal tanımlayıcıların**" belirlenmesinde kullanmak mümkündür.
3. Validasyon hesaplama sonucunda elde ettiğimiz veriler, yeni doking programlarının yazılmasında kullanılabilir.

4. Hesaplama sonuçlarımız, HIV-PR enzimi ile ilgili yeni inhibitörlerin tasarlanması konusunda çalışacak olan araştırmacılara yöntem seçiminde çok büyük kolaylık sağlayacaktır. Hem zamandan tasarruf sağlanacak hem de doğru bir yerden başlama imkanı sağlamış olacaktır. Sadece doğru yöntem değil, aynı zamanda uygun x-ray yapısından başlanması sonucunda hesaplamalar sonucunda elde edilen sonuçların güvenilirliği artmış olacaktır.
5. Sentezlediğimiz bileşiğin aktivitesinin hesaplama sonuçlarının yüksek bulunması bu bileşiğin deneysel aktivite çalışmalarına başlamak için bizleri hem heyecanlandırmış hem de hızlandırmıştır.

Günümüzde tedavide kullanılan ilaçlara karşı virüsün direnç kazanması nedeniyle, HIV **proteaz** enzimidaki alternatif bölgeleri hedefleyen yeni ilaçlar tasarlanması yönündeki çalışmalara ilgi artmıştır. Son yıllardaki yapılan araştırmalar, beta-laktam bileşiklerinin enzimin yeni hedef bölgesi "**kanat bölgesi**" ile etkileştiğini göstermiştir. Bu nedenle çalışmanın ikinci kısmında, literatürde hiçbir hesapsal çalışmanın yer almadığı, yeni hedef bölge "**kanat bölgesi**" için yapılmıştır. Bu amaçla, literatürde aktivite deneyleri bilinen 5 beta-laktam bileşiği için **AD Vina** programı ile enzim etkileşim bölgeleri araştırılmıştır.

BETA-LAKTAM ÇALIŞMASI SONUCUNDA;

1. İlk defa HIV-Pr enziminin "**kanat bölgesi**" ile beta-laktam bileşiklerinin doking çalışması bizim tarafımızdan yapılmış ve etkileştiği gösterilmiştir.
2. Yeni aday inhibitörü olan beta-laktam bileşikleri için deneysel etkileşim değerleri ile hesaplama sonucunda elde edilen değerler arasında çok bir büyük bir uyum bulunmuştur.
3. Deneysel ve hesaplama sonuçlarının uyumu bizlere, **AD Vina** programının "**kanat bölgesi**" hesaplamaları için doğru seçim olduğunu göstermenin yanı sıra, yeni ligandların aranmasında doğru sonuçlara götürebileceğini göstermiştir.
4. ZINC veri bankası kullanılarak ve beta-laktam ana yapısı verilerek hazırlanan 370 adet bileşik içeren set'e deneysel aktivite değeri bilinen 5 bileşik ve kendi sentezlediğimiz 8 yeni beta laktam bileşiği dahil edilerek,

AD Vina programı ile sanal ligand taraması sonucunda, sentezlediğimiz bileşiminin aktivite gösterme özelliğinin yüksek olacağı bulunmuştur.

BETA-LAKTAM ÇALIŞMASI SONUÇLARININ KULLANIM ALANI;

1. Bu güne kadar yapılan hesapsal çalışmalar sadece enzimin “**substrat bağlama bölgesine**” yoğunlaşmış iken enzimin diğer alternatif hedef kısmı “**kanat bölgesi**” ile ilgili yaptığımız çalışma sonuçları ilk olma özelliği açısından diğer araştırmacıları teşvik edebilir.
2. “Kanat bölgesi” ile etkileşecek yeni inhibitörlerin bulunması, AIDS tedavisinin önünde bulunan virüsün direncini kırma açısından oldukça hayati öneme sahip olabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akaho E., Morris G., Goodsell D., Wong D., Olson A., 2001, A Study on Docking Mode of HIV Protease and Their Inhibitors *J. Chem. Software*, Vol. 7, No. 3, p. 103–114

Alcaide B., Leon-Santiago M. A., Ossorio R. P., Plumet J., Sierra M. A., Torre C., 1982, A simple synthesis of 4 –Acyl-2oxoazetidinones, *Synthesis*, 12, 989-991

Atonov V. K., Ginodman L. M., Rumsh L. D., Kapitanikov Y. V., Barsheskaya T. N., Yavashev L. P., Gurova A. G., Volkova L. I., 1981, Studies on the Mechanisms of Action of Proteolytic Enzymes Using Heavy Oxygen Exchange, *Eur. Jour. Biochem.*, 117 (1), 195-200.

Baker N. A., Dolinsky T. J., Czodrowski P., Li H., Nielsen E. J., Jensen J. H., Klebe G., PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations, 2007, *Nucleic Acids Research*, 35 (Web Server issue): W522–W525

Berman M., Westbrook J. , Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E, 2000, the Protein Databank, *Nucleic Acid Research*, 28, 235-242

Buynak J. D., Rao A. S., Ford G. P., Carver C., Adam B., Geng B., 1997, 7-Alkylidenecephalosporin Esters as Inhibitors of Human Leukocyte Elastase *Journal of Medicinal Chemistry* 40, 3423-33

Böhm, H. J., 1994, The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure, *Journal of Computer- Aided Molecular Design*, 8, 243-256

Cairns J., Overbaugh J., Miller S., 1988, The Origin of Mutants, *Nature* 142, 335.

Carlson H. A.; McCammon J. A., 2000, Accommodating Protein Flexibility in Computational Drug Design, *Journal of Molecular Pharmacology*, 57, 213-218

Chang M. W., Lindstrom W, Olson A. J., Belew R. K., 2007, Analysis of HIV Wild-Type and Mutant Structures via in Silico Docking against Diverse Ligand Libraries *J. Chem. Inf. Model.*, 47 (3), 1258-1262

Christopoulos A., 2002, Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery". *Nature reviews. Drug discovery* 1 (3): 198–210.

Cross J. B., Thompson D. C., Rai B. K., Baber C., Fan K. Y., 2009, Comparison of Several Molecular Docking Programs: Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy *J. Chem. Inf. Model.*, 49 (6), pp 1455–1474

Deechongkit, S., Nguyen, H., Dawson, P. E., Gruebele, M., Kelly, J. W., 2004, "Context Dependent Contributions of Backbone H-Bonding to β -Sheet Folding Energetics". *Nature* 403 (45): 101–5.

Doherty J. B., Ashe B. M., Argenbright L. W., Barker P. L., 1986, Cephalosporin antibiotics can be modified to inhibit human leukocyte elastase, *Nature* 322, 192-4,

Doyon L., Tremblay S., Bourgon L., Wardrop E., Cordingley M., 2005, Selection and characterization of HIV-1 showing reduced susceptibility to the non-peptidic protease inhibitor tipranavir. *Antiviral Res.*, 68 (1), 27–35.

Famíliaa C., Santosa J., Taveiraa N., Quintasa A., 2007, Automated docking analysis provides new insights on protease inhibitor selection for antiretroviral therapy in HIV-1 infection, VIII Congress of Virtual HIV/AIDS

Graham L. Patrick, 2005, an Introduction to Medicinal Chemistry, 3rd edition, Oxford University Press, New York.

Greenle W. J., Siegl P. K. S., 1993, *Annu. Rep. Med. Chem.*, 1992, 27, 59; (b) S. S. Abdel-Meguid, *Med. Chem. Rev.*, 13, 731

Hamilton-Miller J. M. T., 1994, Dual-action antibiotic hybrids, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33, 197-200, 1994

Hamilton-Miller J. M. T., 1999, β -Lactams: variations on a chemical theme, with some surprising biological results, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44, 729-34

Ho D. D., Perelson A. S., Neumann A. U., Markowitz M., Leonard J. M., 1996, HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time, *Science* 271, 5255, 1582–1586.

Hoffmann T., Hodges R. S., James M. N. G., 1984, Effect of pH on the activities of penicillopepsin and *Rhizopus* pepsin and a proposal for the productive substrate binding mode in penicillopepsin, *Biochemistry*, 23, 635-643.

Huang S., Zou X., 2007, Efficient molecular docking of NMR structures: Application to HIV-1 protease, *Protein Science* Vol. 16, Issue 1, p. 43–51

Irwin J. J., Shoichet B. K., 2005, ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening, *Journal of Chem. Inf. Model.*, 45, 177-182

Jenwitheesuk E., Samudrala R., 2003, Improved prediction of HIV-1 protease-inhibitor binding energies by molecular dynamics simulations. *BMC structural biology* 3:2

Kabak M., Senoz H., Elmali A., Adar V., Svoboda I., Dusek M., Fejfarova K., 2010, *Crystallography reports*, 55 , 7, 1220-1222

Kabak M., Güner V., Elerman Y., Durlu T. N., 2003, Crystal Structure of 3,3-Dichloro-*N-p*-methoxyphenyl-4-(2-phenylstryl)-2-azetidinone, *Analytical Sciences*, 19 (6), 969-970

Kenakin T., 2006, *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods*, 2nd Edition Elsevier, San Diego

Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D., 2004, Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* Vol. 57, Issue 2, p. 225–242, 1

Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J., 2004, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications, *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 935-949

Kitchin J., Bethell R. C., Cammack N., Dolan S., Evans D. N., Holman S., 1994, Synthesis and Structure-Activity Relationships of a Series of Penicillin-Derived HIV Proteinase Inhibitors: Heterocyclic Ring Systems Containing P1' and P2' Substituents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 3707-16

Kirkpatrick, S., Gelatt, C., Vecchi, M., 1983, Optimization by Simulated Annealing,

Science, 220, 671- 680

Klebe G., Rarey M., Kramer B., Lengauer T., 1996, A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm, *Journal of Molecular Biology*, 261, 3, 470-489

Klebe G., Gohlke H., 2002, Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors, *Angewandte Chemie International Edition*, Volume 41, Issue 15, pages 2644–2676

Kohl N. E., Emini E. A., Schleif W. A., Davis L. J., Davis J. C., Heimbach J. C., Dixon R. A. F., Scolnick E. M., Sigal I. S., 1988, Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 85 (13), 4686-4690

Kollman P. A., Singh U. C., 1984, An approach to computing electrostatic charges for molecules, *Journal of Computational Chemistry*, 5, 129–145

Kramer R. A., Schaber M. D., Skalka A. M., Ganguly K., Wong-Staal F., Reddy E. P., 1986, HTLV-III gag protein is processed in yeast cells by the virus pol-protease, *Science*, 231, 1580-1584.

Lea A. P., Faulds D., 1996, Ritonavir, *Drugs*, 52(4), 541-546

Leach A. R., 1994, Ligand Docking to Proteins with Discrete Side-chain Flexibility, *Journal of Molecular Biology*, 235, 345-356

Lesk M. A., 2001, *Introduction to Protein Architecture*, Oxford University press, New York, 27, 39, 304

Mager P. P., 2001, The Active Site of HIV-1 Protease, *Medicinal Research Reviews*, 21 (4), 343-353.

Mathews C. K., Kensal E. H., Kevin G. A., 1999, *Biochemistry*, 3rd edition, Prentice Hall, New Jersey.

MacArthur R. D., 2007, Darunavir: promising initial results., *The Lancet*, 369 (9568), 1143-1144

Meek T. D., Hyland L. J., Tomaszek T. A., 1991, Human immunodeficiency virus-1 protease. 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism, *Biochemistry*, 30, 8454-8463.

Miriam H., Faulds D., 2000, Lopinavir, *Drugs*, 60 (6), 1371-1379.

Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J., 1998, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comp. Chem.*, 19, 1639-1662

Navia M. A., Fitzgerald D. P., McKeever B. M., Leu C. T., Heimbach J. C., Herber W. K., Sigal I. S., Darke P. L., Spronger J. P., 1989, Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1, *Nature*, 337, 615.

Negus S. S., 2006, Some implications of receptor theory for in vivo assessment of agonists, antagonists and inverse agonists, *Biochem. Pharmacol.* 71 (12): 1663–70.

Papadopoulos M. G., Durdagi S., Mavromoustakos T., Chronakis N., 2008, Computational design of novel fullerene analogues as potential HIV-1 PR inhibitors: Analysis of the binding interactions between fullerene inhibitors and HIV-1 PR residues using 3D QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulations, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 9957–9974

Perryman A.L., Lin J., McCammon J. A., 2006, Optimization and Computational Evaluation of a Series of Potential Active Site Inhibitors of the V82F/I84V Drug-resistant Mutant of HIV-1 Protease: an Application of the Relaxed Complex Method of Structure-based Drug Design *Chem Biol Drug Des.* 67: 336–345

Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E., UCSF Chimera-A Visualization System for Exploratory Research and Analysis, *Journal of Computational Chemistry*, 25, 13, 1605–1612, 2004

Piana S., Sebastiani D., Carloni P., Parrinello M., 2001, Ab Initio Molecular Dynamics-Based Assignment of the Protonation State of Pepstatin A/HIV-1 Protease Cleavage Site, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 8730–8737.

PR Newswire, 1995, FDA Approves First Protease Inhibitor Drug for Treatment of HIV, <http://www.aegis.com/news/pr/1995/pr951217.html>

Rarey M., Kramer B., Lengauer T., 1997, Multiple automatic base selection: protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention, *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 11, 369–384

Sadowski J., Gasteiger J., 1993, From atoms and bonds to three dimensional atomic coordinates: automatic model builders, *Chemical Reviews*, 93, 2567–2581.

Saguna K., Padlan E. A., Smith C. W., Carlson W. D., Davies D. R., 1987, Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (20), 7009-7013.

Samudrala R., Jenwitheesuk E., 2005, Prediction of HIV-1 protease inhibitor resistance using a protein–inhibitor flexible docking approach, *Antiviral Therapy* 10:157–166

Sanyal A. K., Chowdbury B., Banerjee B., 1992, Generation of high antimycotic activity during degradation of beta lactam antibiotics, *Letters in Applied Microbiology* 14, 221-3,

Skolnick, J., Ryangguk, K., 2008, Assessment of programs for ligand binding affinity prediction, *J. Comp. Chem.*, 29(8), 1316-1331.

Smith R., Brereton I. M., Chai R. Y., Kent S. B. H., 1996, Ionization states of the catalytic residues in HIV-1 protease, *Nat. Struct. Biol.*, 3, 946-950.

Sousa, S.F., Fernandes, P.A. & Ramos, M.J., 2006 Protein-Ligand Docking: Current Status and Future Challenges, *Proteins*, 65,15-26

Sperka T., Tözser J., Pítlik J., Bagossi P., 2005, Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 3086-90

Trosset J. Y., Scheraga H. A., 1998, Reaching the global minimum in docking simulations: A Monte Carlo energy minimization approach using Bezier splines, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95(14), 8011-8015

Trott O., Olson A. J., 2009, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31, 2, 455-461

Vijjulatha M., Kanth S. S., 2007, Computational design of novel cyclic urea as HIV-1 protease inhibitor *Central European Journal of Chemistry* 5(4) 1064–1072

Vrudhula V. M., Svensson H. P., Senter P. D., 1995, Cephalosporin Derivatives of Doxorubicin as Prodrugs for Activation by Monoclonal Antibody- β -Lactamase Conjugates, *Journal of Medicinal Chemistry* 38, 1380-5

Walters W.P., Stahl M.T., Murcko M.A., 1998, Virtual screening-an overview, *Drug Discovery Today*, 3, 4, 160-178

Wang J., Wang W., Kollman P. A., Case D. A., 2006, automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, *Journal of molecular graphics and modelling*, 25, 247-260

Watson D. G., Allen F. H., Bellard S., Brice M. D., Cartwright B. A., Doubleday A., Higgs H., Hummelink-Peters T., Kennard O., Motherwell W. D. S., Rodgers J. R., 1979, The Cambridge Crystallographic Data Centre: computer-based search, retrieval, analysis and display of information, *Acta Crystallographica*, B35, 2331–2339

Willett P. Barnard J. M., Downs G. M., 1998, Chemical Similarity Searching, *Journal of Chem. Inf. Comput. Sci.*, 38, 983-996

Wlodawer A., Vondrasek J., 1998, Inhibitors of HIV-1 Protease: A Major Success of Structure-Assisted Drug Design, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27: 249-284.

Zhang K. E., Wu E., Patick A. K., 2001, Circulating Metabolites of the Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor Nelfinavir in Humans: Structural Identification, Levels in Plasma, and Antiviral Activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (4): 1086–1093.

Internet: The 14th Annual HIV Drug Guide, 2010, The positively aware HIV treatment and health, page 37.

Internet: The 14th Annual HIV Drug Guide, 2010, The positively aware HIV treatment and health, page 43

Internet: SYBYL, Tripos Associates, Inc., St. Louis, MO, Sybyl atom types

Internet: Delorie D: J., Noer G., 1998, Cygwin API Reference, Copyright Red Hat, Inc.

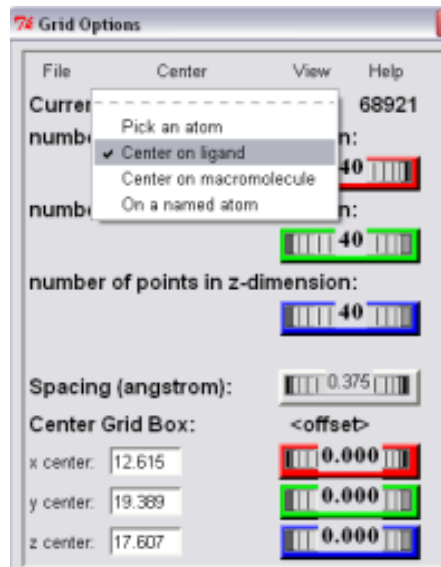
EKLER DİZİNİ

Ek 1

AutoDock ve AD Vina doking çalışmalarında kullanılan grid parametre dosyası örneği (üstte) ve grid kutusu parametreleri (altta). Moleküle göre grid merkezi (grid center) ve reseptör ismi değişiklik göstermektedir.

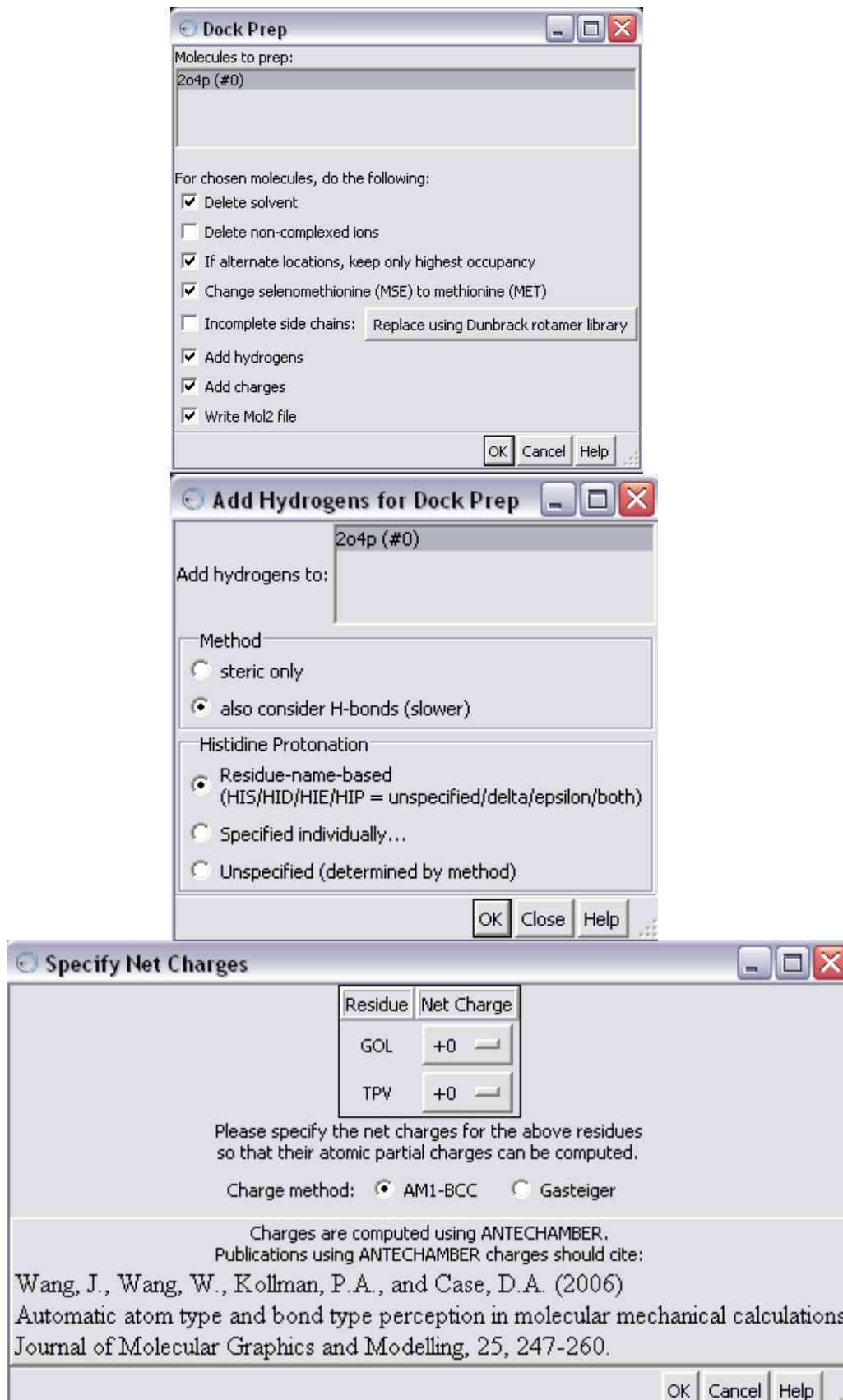
```

74 Edit_gpf
C:/Documents and Settings/SENEM/Desktop/HIV VALIDATION/HIV Dataset AutoDock/AutoDock/2o4p_2/2o4p.gpf
npts 60 60 60 # num.grid points in xyz
gridfld 2o4p_rigid.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C HD N OA SA # receptor atom types
ligand_types A C F NA OA N S HD # ligand atom types
receptor 2o4p_rigid.pdbqt # macromolecule
gridcenter 12.615 19.389 17.607 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map 2o4p_rigid.A.map # atom-specific affinity map
map 2o4p_rigid.C.map # atom-specific affinity map
map 2o4p_rigid.F.map # atom-specific affinity map
map 2o4p_rigid.NA.map # atom-specific affinity map
map 2o4p_rigid.OA.map # atom-specific affinity map
map 2o4p_rigid.N.map # atom-specific affinity map
map 2o4p_rigid.S.map # atom-specific affinity map
map 2o4p_rigid.HD.map # atom-specific affinity map
elecmap 2o4p_rigid.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap 2o4p_rigid.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant
  
```



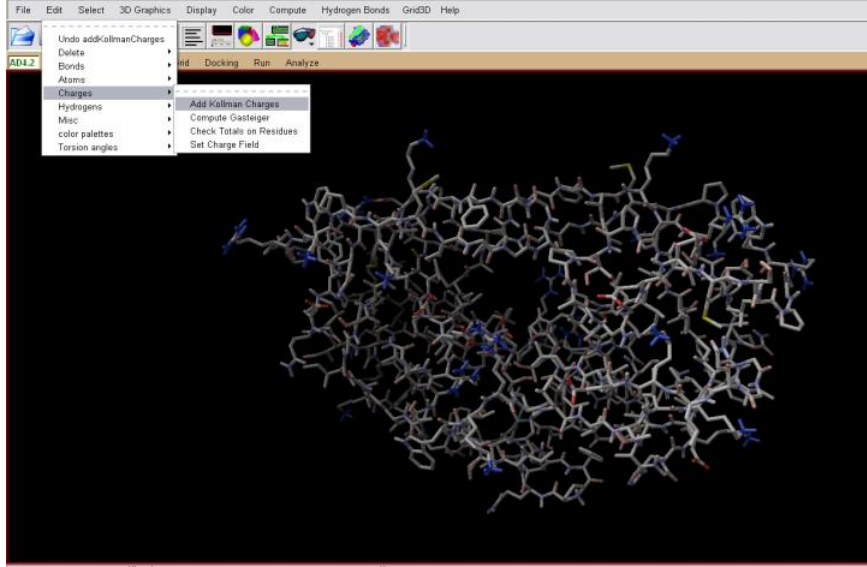
EK 2

Chimera programının DockPrep aracıyla ligandların doking hazırlığı için optimize edilmesi esnasında kullanılan parametreler



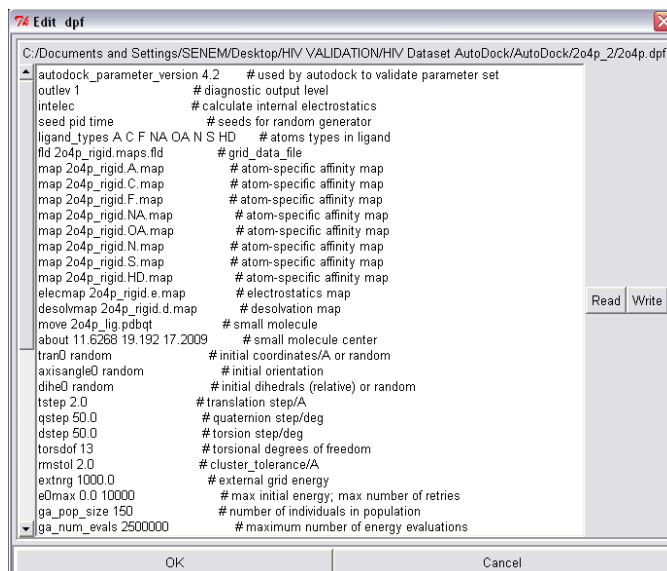
EK 3

AutoDockTools kullanılarak hedef moleküllerin doking çalışmalarına hazırlama prosedürü.



EK 4

AutoDock ile yapılan doking çalışmalarında kullanılan doking parametre dosyası (dpf).



EK 5

Ligand ve aktif bölge aminoasitlerinde FlexX GUI'nin hedef molekül tanımlama seçeneği ile gerçekleştirilen aminoasit modifikasyonları.

Start with: Existing H-atoms from input file.
 FlexX default protonation.

Protonation & Torsions

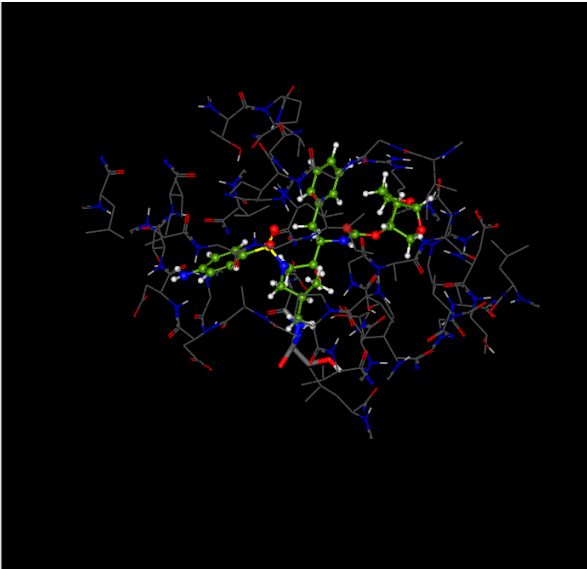
AA-Chain	Protonation	Torsion1	Torsion2
ASP-25-A	asp-		
THR-26-A	thr	⚠ 180	
ASP-29-A	asp-		
ASP-30-A	asp-		
THR-31-A	thr	⚠ 180	
THR-80-A	thr	⚠ 180	

Water

Water	Type	ϕ	ψ	ω
-------	------	--------	--------	----------

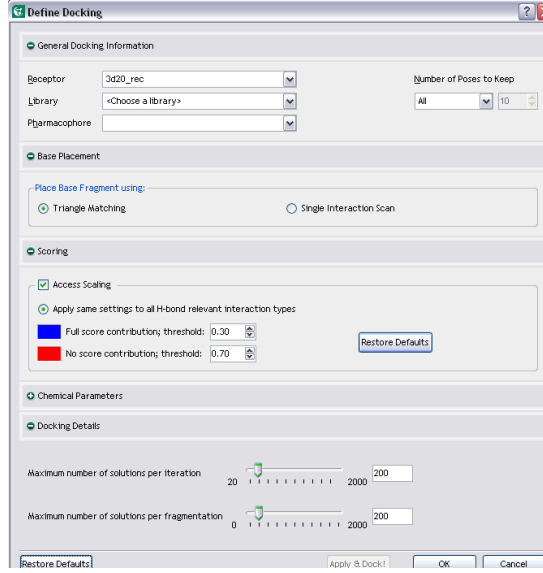
Show water with at least interaction(s) to receptor

⚠ Please resolve the marked entries in the PROTONATION&TORSIONS table to continue.



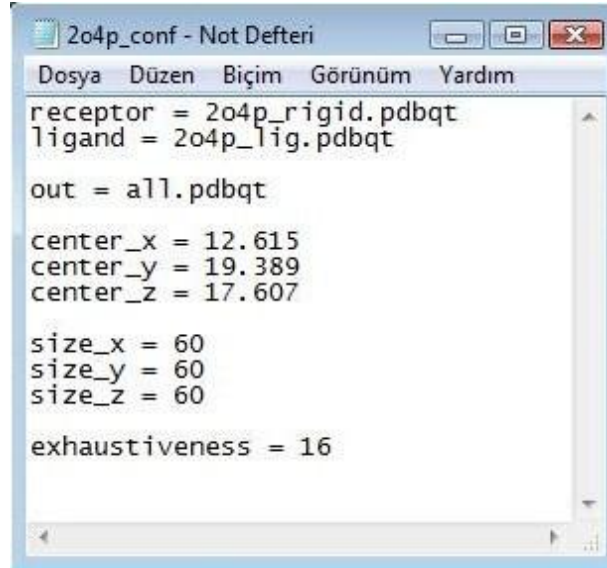
EK 6

FlexX programıyla hazırlanan doking parametreleri. Bu parametreler FlexX ile yapılan tüm doking çalışmalarında sabit tutulmuştur.



EK 7

Vina doking çalışmasına hazırlanan konfigürasyon dosyası içeriği (üstte) ve cygwin üzerinden gerçekleştirilen Vina doking çalışması (altta)



```

receptor = 2o4p_rigid.pdbqt
ligand = 2o4p_lig.pdbqt

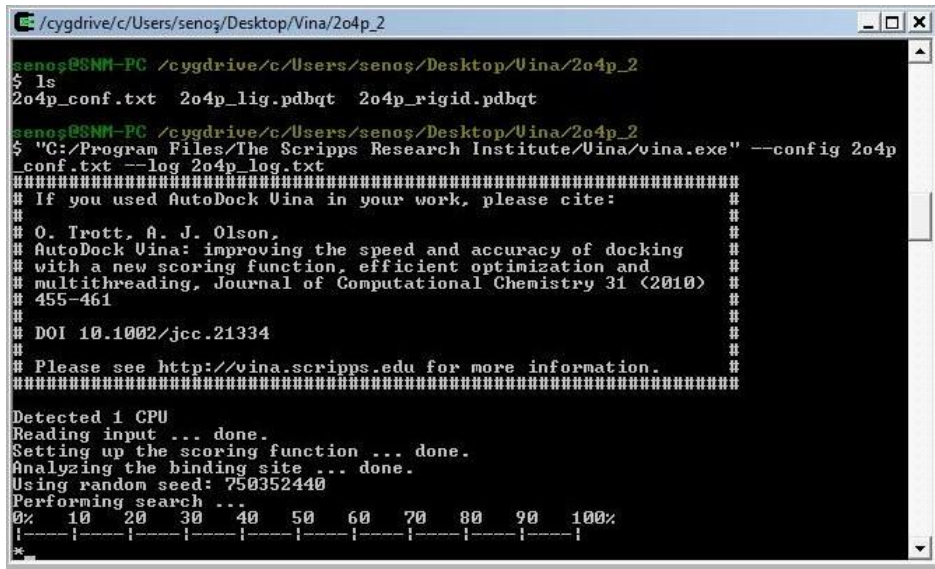
out = all.pdbqt

center_x = 12.615
center_y = 19.389
center_z = 17.607

size_x = 60
size_y = 60
size_z = 60

exhaustiveness = 16

```



```

/cygdrive/c/Users/senoş/Desktop/Vina/2o4p_2
senoş@SNM-PC /cygdrive/c/Users/senoş/Desktop/Vina/2o4p_2
$ ls
2o4p_conf.txt 2o4p_lig.pdbqt 2o4p_rigid.pdbqt
senoş@SNM-PC /cygdrive/c/Users/senoş/Desktop/Vina/2o4p_2
$ "C:/Program Files/The Scripps Research Institute/Vina/vina.exe" --config 2o4p
_lconf.txt --log 2o4p_log.txt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
Detected 1 CPU
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 750352440
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

```

EK 8

Vina ile doking çalışmasını otomatik hale getirebilmek için hazırlanan komut dosyasının içeriği. Aynı zamanda görsel ligand taraması için de doking işleminin ardarda gerçekleştirilmede kullanılmıştır.

```
for f in molecule*.pdbqt; do
b=`basename $f .pdbqt`;
nohup echo Processing ligand $b;
mkdir -p $b;
"C:/Program Files/The Scripps Research Institute/Vina/vina.exe" --config conf.txt --
ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log ${b}/log.txt;
done;
```


EK 9

Doking hesaplamalarında kullanılan enzim molekülü girdi dosyası (*.pdbqt) içeriği

REMARK	4	XXXX	COMPLIES	WITH	FORMAT	V.	2.0		
ATOM	1	N	PRO	U	1	29.478	3.249	17.619	0.00 0.00 -0.202 N
ATOM	2	CA	PRO	U	1	29.784	4.672	17.738	0.00 0.00 0.200 C
ATOM	3	C	PRO	U	1	29.278	5.264	19.042	0.00 0.00 0.526 C
ATOM	4	O	PRO	U	1	28.129	5.030	19.428	0.00 0.00 -0.500 OA
ATOM	5	CB	PRO	U	1	29.052	5.289	16.538	0.00 0.00 0.085 C
ATOM	6	CG	PRO	U	1	28.471	4.103	15.769	0.00 0.00 0.079 C
ATOM	7	CD	PRO	U	1	29.238	2.868	16.215	0.00 0.00 0.188 C
ATOM	11	H2	PRO	U	1	30.128	2.715	18.151	0.00 0.00 0.312 HD
ATOM	13	H3	PRO	U	1	28.549	3.072	17.939	0.00 0.00 0.312 HD
ATOM	1571	N	PRO	U	1	22.219	6.640	33.989	0.00 0.00 -0.202 N
ATOM	1572	CA	PRO	U	1	21.264	5.723	33.374	0.00 0.00 0.200 C
ATOM	1573	C	PRO	U	1	21.469	5.555	31.853	0.00 0.00 0.526 C
ATOM	1574	O	PRO	U	1	22.246	6.311	31.233	0.00 0.00 -0.500 OA
ATOM	1575	CB	PRO	U	1	19.911	6.382	33.669	0.00 0.00 0.085 C
ATOM	1576	CG	PRO	U	1	20.185	7.808	33.923	0.00 0.00 0.079 C
ATOM	1577	CD	PRO	U	1	21.669	8.000	34.115	0.00 0.00 0.188 C
ATOM	1581	H2	PRO	U	1	22.626	6.216	34.796	0.00 0.00 0.312 HD
ATOM	1583	H3	PRO	U	1	22.938	6.874	33.334	0.00 0.00 0.312 HD
ATOM	17	N	GLN	U	2	30.155	5.986	19.732	0.00 0.00 -0.416 N
ATOM	18	CA	GLN	U	2	29.756	6.831	20.841	0.00 0.00 0.082 C
ATOM	19	C	GLN	U	2	29.914	8.289	20.424	0.00 0.00 0.597 C
...									
TER	1995	ASH	U	25					

EK 10

Doking Hesaplamalarında kullanılan FlexX doking girdi dosyası (*.mol2) içeriği.

```
#      Name:                <unnamed>
#      Creating user name:   tripos2
#      Creation time:       Thu Feb 12 17:11:58 2010
@<TRIPOS>MOLECULE
****
@<TRIPOS>ATOM
  1 C1      11.0532  47.6956  22.0944 C.ar    1 BM2_1    0.0000
  2 S11     9.7126  46.9814  21.1665 S.o2    1 BM2_1    0.0000
 58 H23    12.0557  48.5314  20.3842 H      1 BM2_1    0.0000
@<TRIPOS>BOND
  1  1  35 ar
  2  1  27 ar
  3  1  2 1
 60 17 48 1
@<TRIPOS>SUBSTRUCTURE
  1 BM2_1    1 GROUP      0 A    ****  0 ROOT BM2    1
@<TRIPOS>SET
UNK_ATOMS    STATIC    ATOMS    AMSOM    **** Atom types guessed for these
atoms
35 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 \
20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
@<TRIPOS>NORMAL
@<TRIPOS>FF_PBC
FORCE_FIELD_SETUP_FEATURE Force Field Setup information
v1.0  0 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 NONE 0 0 0 0 0
```

Ek 11

AutoDock Vina ile gerçekleştirilen bir doking işleminin çıktı (log) dosyası içeriği.

```
Detected 1 CPU
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1285951360
Performing search ... done.
Refining results ... done.
```

```
mode | affinity | dist from best mode
```

```
  | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
```

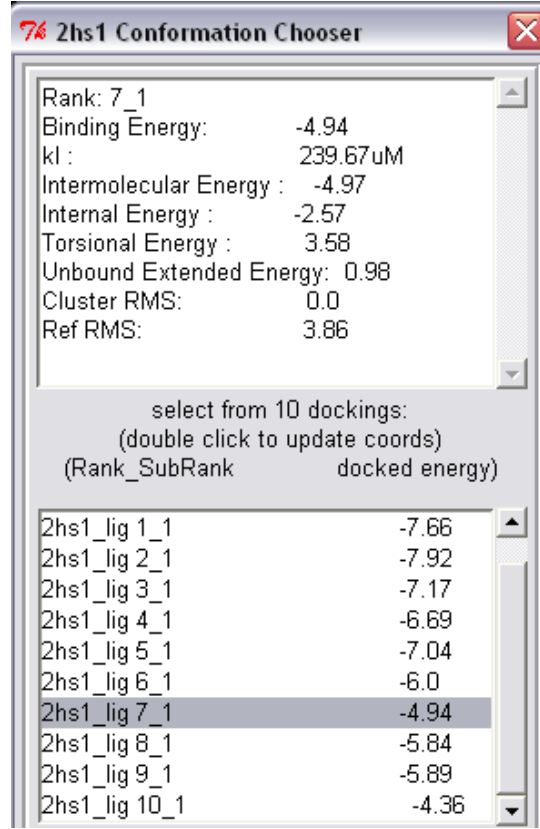
```
-----+-----+-----+-----
```

1	-11.3	0.000	0.000
2	-10.7	1.560	2.141
3	-10.3	2.393	2.917
4	-9.6	5.576	10.544
5	-8.9	7.114	10.579

```
Writing output ... done.
```

EK 12

AutoDock ile gerçekleştirilen bir doking çalışmasının çıktı (log) dosyası içeriği.



Rank: 7_1
Binding Energy: -4.94
kl : 239.67 uM
Intermolecular Energy : -4.97
Internal Energy : -2.57
Torsional Energy : 3.58
Unbound Extended Energy: 0.98
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 3.86

select from 10 dockings:
(double click to update coords)
(Rank_SubRank docked energy)

Rank_SubRank	docked energy
2hs1_lig 1_1	-7.66
2hs1_lig 2_1	-7.92
2hs1_lig 3_1	-7.17
2hs1_lig 4_1	-6.69
2hs1_lig 5_1	-7.04
2hs1_lig 6_1	-6.0
2hs1_lig 7_1	-4.94
2hs1_lig 8_1	-5.84
2hs1_lig 9_1	-5.89
2hs1_lig 10_1	-4.36

Ek 13

Görsel ligand taramasında doking işlemini otomatik hale getirebilmek için cygwin platformunda yazılan script.

```
for f in ZINC*.pdbqt; do
b=`basename $f .pdbqt`;
nohup echo Processing ligand $b;
mkdir -p $b;
"C:/Program Files/The Scripps Research Institute/Vina/vina.exe" --config conf.txt --
ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log ${b}/log.txt; done;
```

ÖZGEÇMİŞ

GENEL

AD, SOYAD: Merve Senem AVAZ	Doğum Tarihi: 02/11/1985
ADRES: Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü 06532 Beytepe/Ankara	
E-POSTA: senemavaz@hacettepe.edu.tr	

EĞİTİM

TARİH	DERECE	OKUL	ALAN
2008-2011	MSc.	Hacettepe Üniversitesi	Organik Kimya
2003-2008	BSc.	Hacettepe Üniversitesi	Kimya Bölümü
2000-2003	Lise	Özel Alp lisesi	

ARAŞTIRMA PROJELERİ

- 2008- 2010: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, “Ketenlerin Konjuge Dienlere Siklokatılmasıyla Beta-Laktam Antibiyotiklerinin Sentezi” (Proje No: 07A601009)
- 2007-2008: Bitirme Ödevi, “Trombin inhibitörlerinden Ximelagatran için görsel ligand taraması ve docking çalışması”
- 2009- 2011: Yüksek Lisans Tez Çalışması, HIV-1 Proteaz Enziminin İnhibitorleriyle Etkileşimi Esnasındaki Konformasyonel Değişikliklerin Teorik İncelemesi ve Yeni Analogların Tasarımı
- 2010- : Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, “Beta Laktam Antibiyotikleri İçin Doking Programlarının Karşılaştırılması” (Proje No: 010D08601004)

SUNUMLAR

- Sözlü Sunum: Anti-AIDS İlaçları İçin Hedef: HIV-1 Revers Transkriptaz inhibitörleri (Lisans Düzeyi, 2008)
- Sözlü Sunum: Trombin İnhibiörleri İçin ZINC Veritabanının Görsel Taranması (lisans Düzeyi, 2008)
- Sözlü Sunum: HIV-Proteaz Aktif Bölge İnhibiörleri İçin Docking Çalışması (Yüksek Lisans Düzeyi, 2009)
- Poster Sunumu: Synthesis of Beta Lactam Antibiotics by Staudinger Ketene-Imine cycloaddition (2009)
- Poster sunumu: Evaluation of Accuracy of Docking Results For Thrombin Inhibitors With Docking Program FlexX (2009)